บทความพิเศษ

การแยก lipoprotein-cholesterol ด้วยไฟฟ้า อีกวิธีหนึ่งในการศึกษาเกี่ยวกับไขมัน

สุนีย์ ธีระศักดิ์ศิลป์*
วิโรจน์ ไววานิชกิจ*

Theerasaksilp S, Wiwanitkit V. Lipoprotein-cholesterol electrophoresis: another method for lipid studying. Chula Med J 2000 Mar; 44(3): 155 - 61

Different forms of lipoprotein cholesterol relate to many lipid disorders causing diseases especially coronary heart disease. Several methods for detection of lipoprotein have been used such as ultracentrifugation, electrophoresis and chemical precipitation methods. Most clinical laboratories are used to the chemical method, which is composed of not so many steps procedure. However, it can not differentiate different forms of blood cholesterol. On the other hand, electrophoresis of serum lipoprotein can be used to determine each forms of cholesterol, which is in different type of lipoproteins. The application of this technique augments the use of lipid profile in medical practice.

Key words : *Lipoprotein, Electrophoresis.*

Reprint request: Theerasaksilp S, Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. November 5, 1999.

*ภาควิชาเวชศาสตร์ชันสูตร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัจจุบันมีความผิดปกติหลายอย่างที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของ lipoprotein เช่น โรคไขมันในเลือดสูง (hyperlipoproteinemia) และโรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary disease) เป็นต้น ทั้งนี้ความสำคัญของการตรวจ lipoprotein เหล่านี้คือ การพยากรณ์โรค (predictive) และการวินิจฉัย (diagnosis) ในปัจจุบันนี้การตรวจคัดกรองเกี่ยวกับไขมัน (lipid profile) ที่แนะนำ [1] ได้แก่ การตรวจวัดระดับ Cholesterol โดยรวม, การตรวจวัดระดับ triglyceride, การตรวจวัด High density lipoportien (HDL)

ปัจจุบันมีหลายวิธีที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมาเพื่อการตรวจหา lipoprotein ซึ่งในบทความนี้จะได้อภิปรายถึงการตรวจด้วยวิธีการแยกด้วยไฟฟ้าซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับไขมัน

หลักการเบื้องต้นในการตรวจวัด lipoprotein

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วเกี่ยวกับความสำคัญของการตรวจ lipoprotein ทั้งนี้ lipoprotein ที่จัดได้ว่ามีความสำคัญและจำเป็นจะต้องตรวจได้แก่ High density lipoportien (HDL) และ Low density lipoportien (LDL) นั่นเองการตรวจวัดระดับ LDLนั้นสามารถกระทำได้โดยการวัดปริมาณองค์ประกอบหลักคือ Apolipoprotein B 100 หรือ Apo B ซึ่งทำได้โดยวิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immuno-assay) ทั้งนี้ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการตรวจ LDL อย่างมาก โดยมีการพัฒนาวิธีการตรวจใหม่ที่มีความแม่นยำมากขึ้นที่เรียกว่าวิธี beta quantification[2] ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้หลักการของการปั่นแยกด้วยความเร็วสูง (ultracentri-fugation) ร่วมกับการตกตะกอนทางเคมี (chemical precipitation) ด้วยวิธีการนี้สามารถทำให้ตรวจวัด lipoprotein little a หรือ Lp(a)[3-4] ซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนน้อยของ LDL ได้ด้วยทำให้ได้ค่าที่ถูกต้องยิ่งขึ้น สำหรับกรณีของ HDL นั้นนอกจากการตรวจโดยการปั่นแยกแล้วปัจจุบันยังมีการตรวจด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาเพื่อหาระดับของ Apo A ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ HDL ด้วย การตรวจด้วยวิธีนี้ทำให้ลดความแปรผันที่เกิดขึ้นในการปั่นแยกได้

สำหรับ lipoprotein ที่เป็นกลุ่ม triglyceride นั้นมิได้ทำการตรวจคัดกรองโดยทั่วไปเนื่องจากจากการศึกษาทางระบาดวิทยาไม่พบความสัมพันธ์ของ lipoprotien กลุ่มนี้กับการเกิดโรคของเส้นเลือดหัวใจอย่างเด่นชัด

ในการตรวจวัดระดับ lipoprotein ต่าง ๆ นั้นนอกจากวิธีมาตรฐานทางเคมีดังที่ได้กล่าวมาแล้วยังมีวิธีการอื่น ๆ อีก ในกรณีของ LDLนั้นนิยมใช้การคำนวณจากสูตร Friedewald ซึ่งวิธีนี้มีความผิดพลาดมาก แม้จะมีรายงานการดัดแปลงสูตรหลายๆสูตร[5-6] ก็ตาม ส่วนวิธีการแยกด้วยไฟฟ้า (electrophoresis)[7-8] นั้นเป็นวิธีการที่สามารถแยก lipoprotein ชนิดต่าง ๆ ได้ทั้งที่เป็นกลุ่ม Cholesterol และ triglyceride ในการแยกเพียงครั้งเดียวทั้งยังสามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคและพยากรณ์โรคจากการสังเกตลักษณะ (pattern) ที่ได้จากการแยกด้วยไฟฟ้าได้ด้วย วิธีการนี้จึงจัดได้ว่าเป็นทางเลือกสำหรับการศึกษาเกี่ยวกับไขมันที่น่าสนใจในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้สะดวกสามารถศึกษา lipoprotein ได้หลายชนิดในการตรวจเพียงครั้งเดียว จึงพบความแปรผันได้น้อยกว่าการศึกษา lipoprotein ทางเคมีคลินิกทีละชนิด และการตรวจชนิดนี้สามารถทำการตรวจตัวอย่างได้หลายตัวอย่างในการตรวจเพียงครั้งเดียวจึงทำให้ประหยัดกว่าการตรวจด้วยวิธีทางเคมีคลินิกที่ต้องตรวจหา lipoprotein แต่ละชนิดทีละ 1 ตัวอย่าง

การเก็บและการส่งสิ่งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ

สิ่งส่งตรวจสำหรับการตรวจหาระดับ ของ Lipoprotein ได้แก่ เลือด โดยการเก็บสิ่งส่งตรวจทำได้โดยการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำ แนะนำให้เจาะเลือดใส่หลอดที่ไม่ใส่สารกันเลือดแข็งปริมาณ 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ควรส่งเลือดที่เจาะได้ (fresh specimen) แก่ห้องปฏิบัติการทันที หากไม่สามารถทำการส่งตรวจได้ทันที ให้เก็บไว้ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ 2 ถึง 6 องศาเซลเซียส วิธีนี้สามารถเก็บไว้ได้ 4 วัน แต่ห้ามแช่แข็งตัวอย่างเลือดเนื่องจากจะทำให้มีเกิดการสลายตัวของ lipoprotein บางชนิดได้

สำหรับการเตรียมผู้ป่วยนั้นไม่จำเป็นจะต้องงดอาหาร (fasting)[9] เนื่องจากอาหารไม่ส่งผลให้เกิดความ-

แปรปรวนต่อผลการตรวจวิเคราะห์ lipoprotien (แต่อย่างไรก็ตามในกรณีที่จะทำ lipid profile ด้วยวิธีทางเคมีคลินิกเพื่อหาระดับไขมันชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย จำเป็นต้องงดอาหาร) ทั้งนี้สิ่งที่ส่งผลต่อการตรวจที่พึงระลึกไว้คือ การได้รับยาต่าง ๆ โดยเฉพาะการได้รับ heparin ทางเส้นเลือด ซึ่งในกรณีนี้จะทำให้ตรวจวัดได้ระดับ lipoprotein ชนิด beta สูงกว่าปกติ

การตรวจและการแปลผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

เนื่องจาก lipoprotien จัดว่าเป็นโปรตีนในเลือดชนิดหนึ่งดังนั้นจึงสามารถแยกได้ด้วยวิธีการแยกด้วยไฟฟ้าเช่นเดียวกับการแยกโปรตีนในเลือดด้วยไฟฟ้าโดยทั่วไป ทั้งนี้แม้ว่าการตรวจเพื่อแยก lipoprotein ด้วยไฟฟ้านั้นสามารถกระทำได้หลายวิธี แต่ในปัจจุบันนั้นนิยมใช้วิธีการแยก lipoprotein ด้วยไฟฟ้าโดยใช้ตัวกลางค้ำจุนชนิด agarose[7,10-11] โดยวิธีการนี้ใช้ตัวอย่างเลือดเพียง 10 ไมโครลิตรเท่านั้น โดยใช้หลักการ fluorometric และ colorimetric ในการทำให้สามารถมองเห็นแถบของ lipoprotein ที่แยกได้ทั้งนี้พึงระลึกไว้เสมอว่าการตรวจหาระดับ lipoprotein นั้นจะไม่สามารถแปลผลการตรวจได้ถ้าไม่ตรวจหาระดับ Cholesterol โดยรวมด้วย

สำหรับการตรวจด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดในด้านระดับวิกฤตของความเจือจาง (dilution threshold) ซึ่งอยู่ที่ระดับ Cholesterol โดยรวมประมาณ 400 มิลลิกรัม/เดซิลิตร[11] ดังนั้นหากพบว่า cholesterol โดยรวมสูงกว่าระดับดังกล่าวจำเป็นจะต้องทำการเจือจางก่อนทำการตรวจวิเคราะห์

การแปลผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการจำเป็นจะต้องทราบค่าระดับ Cholesterol โดยรวม[12] (ตารางที่ 1) ซึ่งจะมีความแตกต่างกันตามเพศ อายุ และ เชื้อชาติด้วย สำหรับค่าระดับของ lipoprotein แต่ละชนิด (ตารางที่ 2) นั้นจะมีค่ามากน้อยแตกต่างกันไป

lipoprotein ที่สามารถตรวจพบได้จากการแยกด้วยไฟฟ้า[11]

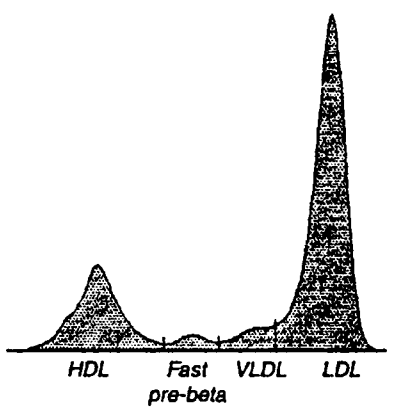
จากตัวอย่างเลือดจากคนปกติเมื่อมาแยกหา lipoprotein ด้วยวิธีการแยกด้วยไฟฟ้า (electrophoresis)[8] จะสามารถแยก lipoprotein ออกมาเป็นแถบ (band) ได้ (รูปที่ 1) โดยlipoprotein ที่เป็นที่รู้จักในปัจจุบันที่พบได้ในแต่ละแถบจากการแยกด้วยไฟฟ้าจะเป็นดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1. แสดงค่าปกติของระดับ cholesterol โดยรวมและระดับ cholesterol องค์ประกอบชนิดต่าง ๆ[11]

กลุ่มอายุ	ระดับ (mmol/l)
1. total cholesterol	
• ≤ 2 เดือน	1.3 - 4.4
• 2 - 12 เดือน	1.6 - 4.9
• ≥ 1 ปี	2.8 - 6.0
2. HDL cholesterol	> 0.9
3. LDL cholesterol	< 4.0

ตารางที่ 2. แสดงค่าปกติของ lipoprotein ที่ได้จากการแยกด้วยไฟฟ้า

Lipoprotein	ค่าปกติ
1. Alpha	11.8 - 45.4 %
2. Pre beta	0.0 - 12.9 %
3. Fast pre beta + beta	48.4 - 86.8 %



รูปที่ 1. แสดงกราฟของ lipoprotein-cholesterol ที่ได้จาก densitometer

1. แถบที่สามารถพบได้ในทุกตัวอย่าง

• แถบ alpha เป็นแถบ lipoprotein ที่เคลื่อนที่ได้เร็วที่สุดเมื่อทำการแยกด้วยไฟฟ้า (fast electrophoretic mobility) โดยจะอยู่ไปทางด้านขั้วบวก (anode) มากที่สุด lipoprotein ชนิดนี้คือกลุ่ม high density lipoprotein นั่นเอง

• แถบ pre beta เป็นแถบ lipoprotein ที่อยู่ต่อจาก แถบ alpha lipoprotein ชนิดนี้คือ กลุ่ม very low density lipoprotein (VLDL) นั่นเอง

• แถบ beta เป็นแถบ lipoprotein ที่อยู่ต่อจากแถบ pre beta lipoprotein ชนิดนี้คือ กลุ่ม low density lipoprotein (LDL)นั่นเอง

2. แถบที่สามารถพบได้บางตัวอย่าง

• แถบ fast pre beta เป็นแถบ lipoprotein ที่เคลื่อนที่ได้ช้ากว่าแถบ alpha แต่เร็วกว่า แถบ pre beta หากตรวจพบ lipoprotein ชนิดนี้ให้คิดเสมือนว่าเป็นกลุ่ม low density lipoprotein (LDL) แต่ทั้งนี้ไม่อาจสรุปว่าเป็น lipoprotein little a

• แถบ slow pre beta เป็นแถบ lipoprotein ที่เคลื่อนที่ได้ช้ากว่าแถบ pre beta แต่เร็วกว่า beta lipoprotein ชนิดนี้คือ กลุ่ม lipoprotein remnant ต่าง ๆ นั่นเอง

• แถบที่ตำแหน่งจุดเริ่มต้น เป็นแถบที่แสดงถึง chylomicron

ทั้งนี้พึงระลึกว่าการตรวจแต่เพียงระดับของ lipoprotein แต่ละชนิดอย่างเดียวไม่เพียงพอในการวินิจฉัย จำเป็นจะต้องตรวจระดับของ cholesterol โดยรวมและระดับของ triglyceride ด้วย

การประยุกต์ประโยชน์จากการตรวจ lipoprotein

เนื่องจากคุณสมบัติของ lipoprotein ดังที่กล่าวมาแล้วจึงมีการนำการตรวจ lipoprotein มาประยุกต์ใช้ในทางคลินิกหลายประการ เช่น การใช้เป็นเครื่องมือในการคัดกรองโรค การใช้เป็นเครื่องมือในการวินิจฉัยแยกโรค การใช้เป็นเครื่องมือในการติดตามผลการรักษา และพยากรณ์โรค

ก. ในด้านหทัยวิทยา[9]

การใช้ประโยชน์จากการตรวจหา lipoprotein ในทางด้านหทัยวิทยา (Cardiology) เป็นประเด็นที่ใช้กันมาก โดยนิยมส่งตรวจเพื่อเป็น cardiac marker ส่วนหนึ่งในการพยากรณ์โรคเส้นเลือดหัวใจ โดยมีการกำหนดค่าของไขมันชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการตัดสินใจดูแลรักษาโรคเป็นสากลตามหลักการของ national cholesterol educational program (NCEP) (ตารางที่ 3) โดยจะต้องพิจารณาร่วมกับปัจจัยเสี่ยง (risk factor) ต่าง ๆ คือ อายุ (เพศชายตั้งแต่ 45 ปี ขึ้นไป เพศหญิงตั้งแต่ 55 ปีขึ้นไป), ประวัติโรคเส้นเลือดหัวใจในครอบครัว, การสูบบุหรี่, ความดันโลหิตสูง และ เบาหวาน

ข. ในด้านการครองธาตุของไขมัน (fat metabolism)

การตรวจวัดระดับของ lipoprotein แต่ละชนิดนับว่ามีประโยชน์มากในการวินิจฉัยแยกชนิดของภาวะไขมันในเลือดสูง (hyperlipoproteinemia)[13-14] (ตารางที่ 4) ทั้งนี้สาเหตุที่จำเป็นต้องแยกแยะเนื่องจากพยาธิกำเนิดและวิธีการรักษาสำหรับแต่ละชนิดล้วนแตกต่างกัน การตรวจด้วยวิธีทางเคมีตามปกติไม่อาจจะบ่งบอกถึงชนิดของ lipoprotein ที่ผิดปกติได้อย่างละเอียด

ค. ในด้านวิทยาโรคไต (nephrology)

สำหรับโรคไตกลุ่มที่มีความเกี่ยวข้องกับ lipoprotein มากที่สุดได้แก่ กลุ่ม nephrotic syndrome[15] การตรวจแยกชนิด lipoprotein มีประโยชน์ในการแบ่งระยะของโรค โรคในระยะเริ่มแรกจะตรวจพบ lipoprotein ชนิด LDL ในเลือดสูง ส่วนในระยะหลังจะตรวจพบ lipoprotein ชนิด LDL และ VLDL สูงร่วมกัน 2 ชนิด

แนวโน้มในการตรวจหา lipoprotein ในปัจจุบัน

ปัจจุบันการตรวจหา lipoprotein จัดว่าเป็นการตรวจทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่มีประโยชน์ ใช้กันอย่างแพร่หลายการตรวจดังกล่าวทำให้สามารถใช้ประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัย และ พยากรณ์โรคได้อย่าง กว้างขวาง

ตารางที่ 3. แสดงค่าปกติของไขมันที่ใช้เป็นเกณฑ์ทางหทัยวิทยาตามคำแนะนำของ National Cholesterol Educational Program

ไขมัน	ระดับ (mg/dL)	
1. total cholesterol		
• desirable	< 200	
• borderline high	200 - 239	
• high	≥ 240	
2. HDL cholesterol		
• low	< 35	
• protective	> 60	
3. triglyceride		
• desirable	< 250	
• borderline	250 - 500	
• elevated	500 - 1000	
• sever elevated, pancreatitis	> 1000	
4. LDL cholesterol	initiation	goal
4.1 diet therapy		
• without CHD and fewer than 2 risk factor	≥160	≥ 160
• without CHD and with 2 or more risk factors	≥130	≥130
• with CHD	> 100	≤100
4.2 drug therapy		
• without CHD and fewer than 2 risk factor	≥ 190	< 160
• without CHD and with 2 or more risk factors	< 160	< 130
• with CHD	< 130	≤ 100

ตารางที่ 4. แสดงความผิดปกติ hyperlipoproteinemia ชนิดต่าง ๆ

Type	Abnormality	Abnormal high Lipoprotien	Glucose tolerance	Fat tolerance	Example of diseases
1	Fat induced hyperlipidemia	Chylomicron	Abnormal	Normal	Lipoprotien lipase deficiency
2a	Hyperbetalipoproteinemia	LDL	Normal	Normal	Early nephrotic syndrome
2b	Hyperbetalipoproteinemia	LDL, VLDL	Normal	Normal	Late nephrotic syndrome
3	Broad beta disease	Remnant, IDL	Abnormal	Abnormal	Apoprotein E III deficiency
4	Endogenous hyperlipidemia	VLDL	Normal	Abnormal	DM, alcohol, oral contraceptive
5	Mixed hyperlipiedemia	VLDL, Chylomicron	Abnormal	Abnormal	Mixed disorder

โดยเฉพาะโรคเส้นเลือดหัวใจและโรคไขมันในเลือดสูง ถึงแม้ว่าจะมีวิธีการตรวจที่ทันสมัยหลายวิธีในปัจจุบันก็ตาม การตรวจหา lipoprotein ด้วยวิธีการแยกด้วยไฟฟ้ายังคงเป็นวิธีที่ทำได้สะดวกและประหยัด ใช้เวลาไม่มาก สามารถให้รายละเอียดได้มากกว่าการตรวจด้วยวิธีทางเคมีคลินิกตามปกติและหากส่งตรวจเป็นจำนวนมากจะสามารถลดต้นทุนในการส่งตรวจต่อการทดสอบ สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นการตรวจพื้นฐานได้ การตรวจนี้จึงสามารถใช้ประโยชน์ในการเป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยและการพยากรณ์โรคที่ดี จัดเป็นการตรวจที่มีประโยชน์และเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการศึกษาเกี่ยวกับไขมัน

อ้างอิง

1. Wiwanitkit V. Abnormal laboratory results as presentation in screening test. Chula Med J 1998 Dec; 42(12): 1059 - 67
2. Belcher JD, McNamara JR, Grinstead GF, Rifai N, Warnick GR, Bachorik P, Frantz Jr I. Measurement of low density lipoprotein cholesterol concentration. In: Rifai N, Warnick GR, eds. Methods for Clinical Laboratory Measurement of Lipid And Lipoprotein Risk factors. Washington D.C.: AACC Press, 1991: 75 - 86
3. Utermann G. The mysteries of lipoprotein(a).Science 1989 Nov 17; 246(4932): 904 -10
4. Loscalzo J. Lipoprotein(a) a unique risk factor for atherothrombotic disease. Arteriosclerosis 1990 Sep -Oct; 10(5): 672 - 9
5. DeLong DM, DeLong ER, Wood PD, Lippel K, Rifkind BM. A comparison of methods for the estiamtion of plasma very low-density lipoprotein cholesterol. The lipid Reasearch Clinics Prevalence Study. JAMA 1986 Nov 7; 256(1): 2372 - 7
6. Roa A, Parker AH, el-Sheroni NA, Babelly MM. Calculation of low-density lipoprotein cholesterol with use of triglyceride/ cholesterol ratios in lipoproteins compares with other calculation methods. Clin Chem 1988 Dec; 34(12): 2532-4
7. Papadopoulos NM. Hyperlipoproteinemia phenotype determination by agarose gel electrophoresis updated. Clin Chem 1978 Feb; 24(2): 227 - 9
8. Warnick GR, Nguyen T, Bergelin RO, Wahl PW, Albers JJ. Lipoprotien quantification: an electrophoretic method compared with the Lipid Research Clinics method. Clin Chem 1982 Oct; 28(10): 2116 - 20
9. Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, McNamara PM. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart diseases. The Framingham study. Ann Intern Med 1971 Jan; 74(1): 1 - 12
10. Conlon DR, Blankstein LA, Pasakarnis PA, Stienberg CM, D'Amelio JE. Quantitative determination of high-density lipoprotein by agarose gel electrophoresis. Clin Chem 1979 Nov; 25(11): 1965 - 9
11. Aufenarger J. Analytical procedures. In: Aufenarger J, ed. Lipoprotein. 1st ed. Mannheim: Boehringer, 1997 : 62 - 71
12. Heil W, Koberstein R, Zawta B. Reference Range. In: Heil W, Koberstein R, Zawta B, eds. Reference Ranges for Adults and Children Pre-Analytical Considerations. 2nd ed. Mannheim: Boehringer, 1997: 14 - 118
13. Landschulz WL. Disorder of lipid metabolism. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, eds. Harrison's Principle of Internal Medicine. 13th ed. Singapore:McGRaw-Hill, 1994: 677 - 82

14. Krupp MA, Sweet NJ, Jawetz E, Biglieri EG, Roe RL. Chemical analysis of blood & uirne. In: Krupp MA, Sweet NJ, Jawetz E, Biglieri EG, Roe RL, eds. Physician's Handbook. 18th ed. Teipei: Meiya, 1976: 200 - 38

15. Wilson JD. Glomerular disease. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, eds. Harrison's Principle of Internal Medicine. 13th ed. Singapore: McGRaw-Hill, 1994: 461 - 8