การวัดระดับซีรั่มกลีเซอรอลโดย enzyme kinetic method*

สมพงษ์ จินายน**
ชูจิตร เปล่งวิทยา***

Serum glycerol concentrations were estimated by an enzyme kinetic method. The coefficient of variation of 15 duplicate assays is 5.32%, indicating an acceptable precision of the test. The validity of the assay was assessed by measuring the fasting glycerol level in the sera of 24 Thai healthy adults and of 20 maturity onset diabetics. The diabetic group had significantly higher basal glycerol concentrations in comparison with the former (157 ± 63 vs 77 ± 20 micromoles/ litre, $P < 0.001$).

Therefore, this method for assaying serum glycerol is an assured one. The serum glycerol level is a parameter for the indirect measurement of lipolysis of triglycerides in the adipose tissue, which reflects the mobilization of fat from the depot. The production and removal of glycerol in the circulation have also been stated.

กลีเซอรอลรูปอิสระ (free glycerol) ที่อยู่ในพลาสม่านั้นเป็นสารซึ่งส่วนใหญ่ได้มาจากการย่อยสลายตัวของสารไขมันในเนื้อเยื่อไขมัน (lipolysis of triglycerides in adipose tissue) และกระบวนการนี้เกิดโดยปฏิกริยาของ enzyme lipases[10] การวัดระดับพลาสม่าหรือซีรั่มกลีเซอรอลเป็นการตรวจโดยทางอ้อมวิธีหนึ่ง สำหรับแสดงถึงภาวะการย่อยสลายไขมันที่เกิดขึ้นในเซลล์ของเนื้อเยื่อไขมัน[2,7] ทั้งนี้เพราะผลของการศึกษาในหลอดทดลอง (in

* ส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยที่ได้รับทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ ปี พ.ศ. 2522
** ภาควิชาเวชศาสตร์ชันสูตร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
*** ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

vitro) แสดงว่าเซลล์ไขมันสามารถปล่อย (release) สารกลีเซอรอลออกนอกเซลล์[18] และปริมาณกลีเซอรอลต่อจำนวนเซลล์ไขมันใน incubation medium เป็นเครื่องชี้ที่แม่นยำสำหรับแสดงอัตราการย่อยสลายตัวของสารไขมันในเนื้อเยื่อไขมัน[8] อีกประการหนึ่งกลีเซอรอลในซีรั่มอาจได้มาจากกระบวนการขนย้ายพลาสม่า triglycerides ที่อยู่ใน lipoprotein–complexes ออกนอกกระแสโลหิตและเข้าสู่เซลล์ไขมันหรือกล้ามเนื้อ โดยมี enzyme lipoprotein lipase[13,14] ช่วยการย่อยสลายพลาสม่า triglycerides อย่างไรก็ตามระดับกลีเซอรอลในซีรั่มของคนสุขภาพปกติซึ่งตรวจภายหลังงดอาหาร 12 ชั่วโมง มีปริมาณน้อย คือ เท่ากับ 48 ± 8 micromoles/litre[8] ทั้งนี้เพราะเป็นผลลัพธ์ระหว่างอัตราการสร้าง (production rate)[4] และปริมาณที่ถูกเปลี่ยนแปลง (metabolized) ไปโดยเซลล์ของตับและไต[12] และโดยเม็ดโลหิตขาว[16] ในเซลล์ดังกล่าวแล้วกลีเซอรอลถูกเปลี่ยนไปเป็น glycerol phosphate ซึ่งเป็นสารที่เซลล์ใช้สร้าง glucose หรือ triglycerides หรือ phospholipids และกลีเซอรอลยังถูก oxidized เป็น CO_2 ด้วย[5,15,16] ระดับซีรั่มกลีเซอรอลสูงขึ้นในภาวะที่มีการเพิ่มอัตราการย่อยสารไขมันในเนื้อเยื่อไขมัน เช่น ในกรณีที่คนงดอาหารเป็นเวลานาน[6] หรือในการที่เนื้อเยื่อไขมันเกิดภาวะต่อต้านฤทธิ์ของฮอร์โมนอินซูลิน (insulin resistance)[7] และปริมาณกลีเซอรอลในซีรั่มสูงขึ้นเมื่อมีสาเหตุที่ทำให้การใช้สารกลีเซอรอลในร่างกายลดลง เช่น ในโรคทางพันธุกรรมที่มีการขาด enzyme glycerokinase ซึ่งทำหน้าที่ช่วยปฏิกริยา phosphorylation ของกลีเซอรอล[16]

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ คือ การตรวจสอบความแม่นยำ (precision) และความเชื่อถือได้ (validity) ของการวัดซีรั่มกลีเซอรอล ซึ่งทำที่ภาวะแวดล้อมของห้องปฏิบัติการภาควิชาเวชศาสตร์ชันสูตร โดยวิธี enzyme kinetic method ทั้งนี้เพื่อนำวิธีดังกล่าวมาใช้เป็น parameter อย่างหนึ่งสำหรับการศึกษากลวิธานของปฏิกริยาร่วมระหว่างยา sulfonylurea กับ clofibrate ที่อาจมีผลช่วยลดระดับกลูโคสในพลาสม่าของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิด maturity onset การศึกษาถึงความแม่นยำนั้นใช้หลักการของการควบคุมคุณภาพทางเคมีคลินิค ส่วนการทดสอบเกี่ยวกับความเชื่อถือได้นั้นทำโดยวัดระดับกลีเซอรอลในซีรั่มของกลุ่มคนสุขภาพปกติและกลุ่มผู้ป่วยเบาหวาน

วัสดุและวิธีการ

1. การวัดระดับซีรั่มกลีเซอรอล ใช้เคมีภัณฑ์ของบริษัท Boehringer Mannheim GmbH, Germany คือ Test–combination : Triglycerides (neutral fat) Cat. No. 125032 for 3 × 17 tests เป็นน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับหาปริมาณของ triglycerides หรือ glycerol แต่เมื่อทำการวิเคราะห์โดยงดขั้นตอน การ saponification ด้วย potassium hydroxide ก็จะได้เฉพาะปริมาณของ free glycerol ในซีรั่มตัวอย่างเท่านั้น เพราะว่า triglycerides ยังคงสภาพเดิมอยู่จึงไม่ทำปฏิกริยากับ enzymes.

หลักการของวิธีทดสอบซีรั่มกลีเซอรอล โดยวิธี enzyme kinetic assay มีดังนี้

1. glycerol (in serum) + ATP $\xrightarrow{\text{glycerokinase}}$ glycerol–3 phosphate + ADP
2. ADP + phosphoenol pyruvate $\xrightarrow{\text{pyruvate kinase}}$ pyruvate + ATP
3. pyruvate + $NADH_2$ $\xrightarrow{\text{lactate dehydrogenase}}$ lactate + NAD

วัดผลลัพธ์ของการเปลี่ยนแปลง optical density ที่คลื่นแสง 340 nm โดยใช้ Beckman spectrophotometer Model 26 ซึ่งมีมาตรสำหรับอ่านได้ทันทีและมีเครื่องบันทึกการเปลี่ยนแปลงของปฏิกริยาด้วย

2. กลุ่มคนที่มีสุขภาพปกติ จำนวน 24 ราย ทั้งหมดเป็นนิสิตแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ (ชาย 18 คน และหญิง 6 คน) ซึ่งมี Clinical data ดังแสดงในตารางที่ 1

3. กลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวาน (maturity onset diabetics) จำนวน 20 ราย เป็นคนไข้ที่มารับการตรวจที่คลินิคผู้ป่วยโรคเบาหวานของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และยังไม่เคยได้รับการรักษาโรคเบาหวานมาก่อน (ชาย 4 คน หญิง 16 คน) ดังมี Clinical data ในตารางที่ 1

4. เจาะเลือดจากหลอดโลหิตดำของผู้ถูกทดสอบทั้งสองกลุ่มหลังจากงดอาหาร 12 ชม. สำหรับการวิเคราะห์หาระดับ glycerol และ glucose

ตารางที่ 1 Clinical data*

	Age (yr)	IBW** (%)	Basal concentration of Plasma glucose (mg/dl)
I คนสุขภาพปกติ	23 ± 2	87 ± 11	83 ± 7
II ผู้ป่วยโรคเบาหวาน	50 ± 10	116 ± 20***	191 ± 39***

* ตัวเลขคือค่า mean ± 1 SD

** Ideal body weight คำนวณจากตารางน้ำหนักมาตรฐาน[17]

*** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ

ผล 1. จากการทดลองพบว่าวิธีวัดระดับซีรั่มกลีเซอรอลมีความแม่นยำ คือมีค่า coefficient of variation (CV) of duplicate assay เท่ากับ 5.32 %

2. การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์ทำโดยวัดระดับกลีเซอรอลในซีรั่มของคนปกติและผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Basal concentrations of serum glycerol (micromoles/litre) in healthy subjects and in diabetics.

	Healthy subjects	Maturity onset diabetics
number	24	20
range	46 to 130	68 to 260
mean ± SD	77 ± 20	157 ± 63*
CV %	26	40
SEM	4	14

* $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ

3. ในผู้ป่วยเบาหวาน ซึ่งได้รับการตรวจเลือดหลังงดอาหาร 12 ชั่วโมง ค่าซีรั่มกลีเซอรอลไม่มีความสัมพันธ์กับพลาสม่ากลูโคส ($r = -0.269$, NS) หรือกับค่าเปอร์เซ็นต์ ideal body weight ($r = 0.091$, NS)

วิจารณ์

การวัดหาระดับกลีเซอรอลในซีรั่มโดยวิธี enzyme kinetic method มีความแม่นยำดี เพราะว่าเมื่อทำการวิเคราะห์ซีรั่มตัวอย่างซ้ำ 2 ครั้ง จำนวน 15 การทดลองซึ่งทำการทดสอบต่างวันกันพบว่ามีค่า CV ต่ำคือเท่ากับ 5.32% และเมื่อนำวิธีวัดกลีเซอรอลดังกล่าวมาทดสอบความเชื่อถือได้ (validity of test) โดยวัดระดับกลีเซอรอลในซีรั่มของคนสุขภาพปกติ (ตารางที่ 1 และ 2) ได้ค่าเท่ากับ 77 ± 20 micromoles/litre ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับค่าที่ได้มีผู้รายงานไว้คือ 48 ± 8 [8] และ 55 ± 14[7] และ 62 ± 27[2] อีกประการหนึ่งระดับกลีเซลรอลในซีรั่มของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิด maturity onset เท่ากับ 157 ± 63 micromoles/litre ซึ่งสูงกว่าค่าที่พบในคนสุขภาพปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติผู้ป่วยเบาหวานนั้นมีแนวโน้มที่อาจมีระดับซีรั่มกลีเซอรอลสูงกว่าที่พบในกลุ่มคนสุขภาพปกติได้ ทั้งนี้เพราะอัตราการย่อยสลายของสารไขมันในเนื้อเยื่อไขมันอาจเพิ่มขึ้น ข้อสนับสนุนคือในภาวะปกติฮอร์โมนอินซูลินมีฤทธิ์ในการลดภาวะการย่อยสลาย (antilipolytic effects) ของสาร triglycerides[11] ดังผลการศึกษาเนื้อเยื่อไขมันในหลอดทดลอง อินซูลินลดปริมาณกลีเซอรอลที่ปล่อยออกจากเซลล์เข้าสู่ incubation medium[11] และการที่ร่างกายเกิดภาวะต้านทานต่อฤทธิ์ของอินซูลิน (insulin resistance) ทำให้มีการเพิ่มระดับกลีเซอรอลในซีรั่ม[7] ความแตกต่างในระดับซีรั่มกลีเซอรอลระหว่างกลุ่มคนสุขภาพปกติและกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานที่พบในรายงานนี้ อาจจะแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในกลุ่มผู้ป่วยหรือเนื่องจากสาเหตุอื่น เช่นความแตกต่างกันในด้านปัจจัยพื้นฐานของทั้งสองกลุ่มทดลอง ในคนสุขภาพปกติมีอายุโดยเฉลี่ยต่ำกว่าผู้ป่วยโรคเบาหวาน แต่ในปัจจุบันไม่มีรายงานที่แสดงว่าระดับซีรั่มกลีเซอรอลเปลี่ยนแปลงตาม อายุ หรือเพศ จึงไม่ทราบว่าอายุหรือเพศที่แตกต่างกันจะทำให้ปริมาณกลีเซอรอลของผู้ถูกทดสอบทั้งสองกลุ่มต่างกัน นอกจากนั้นน้ำหนักตัวโดยเฉลี่ยของกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานค่อนข้างสูงกว่าของกลุ่มคนสุขภาพปกติ ความแตกต่างประการหลังนี้อาจเป็นเหตุอย่างหนึ่งที่ทำให้กลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานมีค่ากลีเซอรอลในซีรั่มสูงกว่ากลุ่มคนสุขภาพปกติ (ตรวจที่ภาวะพื้นฐาน) ดังเช่นที่ Bagdade และคณะ[2] ได้พบว่าปริมาณกลีเซอรอลในซีรั่มของผู้ป่วยโรคเบาหวานเพิ่มขึ้นเฉพาะในกรณีที่ผู้ป่วยมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น (obese diabetic subjects) เท่านั้นและระดับซีรั่มกลีเซอรอลมีความสัมพันธ์โดยตรงกับน้ำหนักตัวของผู้ถูกทดสอบทั้งหมด ซึ่งประกอบด้วยคนสุขภาพ

ปกติและผู้ป่วยโรคเบาหวาน ($r = 0.36$, $P < 0.02$, $n = 49$)[2] แต่จากผลการศึกษาครั้งนี้ ระดับซีรั่มกลีเซอรอลไม่มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักตัวของผู้ถูกทดสอบ ทั้งในกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานและกลุ่มคนสุขภาพปกติ หรือทั้งสองกลุ่มรวมกัน ($r = 0.087$, NS, $n = 44$) อาจเพราะว่าผู้ป่วยโรคเบาหวานที่ศึกษาครั้งนี้บางคนมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นจากเกณฑ์ปกติไม่มากนัก ในการศึกษานี้ยังพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานระดับซีรั่มกลีเซอรอลไม่มีความสัมพันธ์กับพลาสม่ากลูโคส ซึ่งผลที่ได้นี้ตรงกับรายงานของ Bagdade และคณะ[2] ที่แสดงว่าระดับพื้นฐานของกลีเซอรอลในซีรั่มไม่มีความสัมพันธ์กับความผิดปกติในเมตาบอลิสมของคาร์โบไฮเดรท นอกจากผู้ป่วยด้วยโรคเบาหวานที่มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นจึงพบความสัมพันธ์ ความอ้วนจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับกลีเซอรอลในซีรั่ม ในคนอ้วนมีการเพิ่มอัตราของการ turnover ของพลาสม่ากลีเซอรอล[4] นอกจากนั้นจากการศึกษาในหลอดทดลองเซลล์ไขมันที่มีขนาดเพิ่มขึ้นมีอัตราของการย่อยสลายไขมันสูงกว่าที่พบในเซลล์ไขมันขนาดเล็กกว่า[9]

ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานมีอัตราการย่อยสลายไขมันสูงกว่ากลุ่มคนสุขภาพปกติ แต่ไม่สามารถชี้บอกได้ว่าการสลายตัวของ triglycerides ในเซลล์ไขมันที่เพิ่มขึ้นนี้เป็นผลสืบเนื่องมาจากความบกพร่องในการออกฤทธิ์ของอินซูลิน หรือซีรั่มกลีเซอรอลสูงขึ้นนี้เพราะเซลล์ไขมันของผู้ป่วยมีขนาดเพิ่มขึ้น ดังนั้นการวัดระดับซีรั่มอินซูลิน และการศึกษาเมตาบอลิสมของชิ้นเนื้อไขมันที่ได้จากผู้ป่วยในหลอดทดลองอาจช่วยตอบปัญหานี้ได้ แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ต้องการที่จะศึกษาความแม่นยำของเทคนิคการวิเคราะห์ซีรั่มกลีเซอรอล และความเชื่อถือได้ (validity) ของวิธีการซึ่งทำโดยการวัดระดับซีรั่มกลีเซอรอลในคนสุขภาพปกติและผู้ป่วยโรคเบาหวาน และเปรียบเทียบผลที่ได้กับรายงานอื่น รวมทั้งพิจารณาถึงความน่าจะเป็นไปได้ของผลที่ได้ด้วย การวัดระดับกลีเซอรอลในซีรั่มเป็นวิธีการทางอ้อมที่แสดงถึงอัตราการย่อยสลายสารไขมันในเนื้อเยื่อไขมันได้[2,7] แต่ไม่ช่วยในการวินิจฉัยโรคเบาหวาน เทคนิคของวิธีวัดก็มีความแม่นยำดังกล่าวแล้วข้างต้น และควรเชื่อถือได้เพราะสามารถแยกระหว่างความปกติและความผิดปกติได้ การศึกษาอัตราการย่อยสลายไขมันอาจใช้ระดับ free fatty acids ในซีรั่มก็ได้ เพราะเป็นผลิตผลจากการสลายตัวของ triglycerides เช่นเดียวกับกลีเซอรอล[1] แต่ว่า free fatty acids ที่เกิดขึ้นในเซลล์ไขมันนั้น ส่วนหนึ่งถูกใช้

สำหรับสร้าง triglycerides ในเซลล์อีก (rees-terification) ดังนั้นปริมาณกลีเซอรอลใน incubation medium จึงเป็นเครื่องชี้ถึงภาวะการย่อยสลายของสารไขมันในเนื้อเยื่อไขมันได้ดีกว่า[3,18] เช่นเดียวกับระดับซีรั่มกลีเซอรอล[2,7] ผู้รายงานจึงใช้ระดับซีรั่มกลีเซอรอล สำหรับศึกษาการเปลี่ยนแปลงอัตราย่อยสลายสารไขมันในเนื้อเยื่อไขมันของผู้ป่วยโรคเบาหวานก่อนและหลังการรักษาด้วยยา sulfonylurea ร่วมกับ clofibrate เพื่อศึกษาปฏิกริยาร่วมระหว่างยาทั้งสองชนิดที่อาจช่วยลดระดับกลูโคสในพลาสม่า

เอกสารอ้างอิง

1. สมพงษ์ จินายน Human adipose tissue : การศึกษาเนื้อเยื่อไขมันในหลอดทดลอง จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2522 เมษายน ; 23(2) : 153-172
2. Bagdade JD. Porte D.Jr., Bierman EL. The interaction of diabetes and obesity on the regulation of fat mobilization in man. Diabetes 1969 Nov; 18(11): 759-772
3. Björntorp P, Östman J. Human adipose tissue. Dynamic and regulation. In: Advances in Metabolic Disorder. vol 5. Levine R, Luft R, eds. New York: Academic Press, 1971, 277-327
4. Bortz WM, Paul P, Haff AC, Holmes WL. Glycerol turnover and oxidation in man. J Clin Invest 1972 June; 51(6): 1537-1546
5. Bublitz C, Kennedy EP. Synthesis of phosphatides in isolated mitochondria. III. the enzymatic phosphorylation of glycerol. J Biol Chem 1954; 211: 951-961
6. Cahill GF. Jr., Herrera MG, Morgan AP, Soeldner JS, Steinke J, Levy PL. Hormonefuel interrelationships during fasting. J Clin Invest 1966 Nov; 45(11): 1751-1769
7. Chinayon S, Goldrick RB. Effects of overfeeding on carbohydrate tolerance, insulin secretion, esterification and lipolysis in healthy subjects. Horm Metab Res 1978 May; 10(3): 182-186
8. Goldrick RB. Havenstein N, Carroll KF. Reardon M. Effects of overfeeding on lipid and carbohydrate metabolism in lean young adults. Metabolism 1972 Aug; 21(8): 761-770
9. Goldrick RB, Mc Loughlin GM. Lipolysis and lipogenesis from glucose in human fat cells of different sizes. Effects of insulin, epinephrine and theophylline. J Clin Invest 1970 June; 49(6): 1213-1223

10. Khoo JC. Aquino AA, Steinberg D. The mechanism of activation of hormone sensitive lipase in human adipose tissue. J Clin Invest 1974 April; 53(4): 1124-1131

11. Östman J, Backman L, Hallberg D. Cell size and the antilipolytic effect of insulin in human subcutaneous adipose tissue. Diabetologia 1975 April; 11(2): 159-164

12. Owen OE, Felig P, Morgan AP, Wahren J, Cahill GF. Jr. Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. J Clin Invest 1969 March; 48(3): 574-583

13. Persson B, Schröder G, Hood B. Lipoprotein lipase activity in human adipose tissue : assay methods. Relations to the serum triglyceride level in a normolipidemic population. The effect of ethyl chlorophenoxy isobutyrate. Atherosclerosis 1972. 16(1): 37-49

14. Pykälisto OJ, Smith PH, Brunzell JD. Determinants of human adipose tissue liporotein lipase. Effect of diabetes and obesity on basal-and diet-induced activity. J. Clin Invest 1975 Nov; 56(5): 1108-1117

15. Rognstad R, Clark DG, Katz J. Pathways of glyceride-glycerol synthesis. Biochem J 1974 May; 140(2): 249-251

16. Rose CI, Haines DSM. Familial hyperglycerolemia. J Clin Invest 1978 Jan; 61(1): 163-170

17. Society of Actuaries (Ed) Chicago : Build and blood pressure study. 1959; 1 : 16

18. Vaughn M. The production and release of glycerol by adipose tisue incubated in vitro. J Biol Chem 1962 Nov; 237 : 3354-3358