ผลของซีรั่มจากผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่มีการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตระยะยาวต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง

นางสาวรัตติพร วุ่นสุวรรณ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF SERA FROM PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE INTERVENED BY LONG-TERM LIFESTYLE MODIFICATION ON HUMAN CORONARY ARTERY ENDOTHELIAL CELLS

Miss Rattiporn Wunsuwan

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของซีรั่มจากผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่มีการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตระยะยาวต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง
โดย	นางสาวรัตติพร วุ่นสุวรรณ
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. อัชฌาสัย ศิริตันติกร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์อดิศร ภัทราดูลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. อัชฌาสัย ศิริตันติกร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัลยา ธเนศพงศ์ธรรม)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รัตติพร วุ่นสุวรรณ : ผลของซีรั่มจากผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่มีการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตระยะยาวต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง. (Effect of sera from patients with coronary artery disease intervened by long-term lifestyle modification on human coronary artery endothelial cells) **อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ. ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร. อัชฌาสัย ศิริตันติกร** 74 หน้า.

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับของไขมันในเลือด และระดับของ oxidative damage products ในซีรั่ม และผลของซีรั่มดังกล่าวต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดงของหัวใจ (human coronary artery endothelial cell, HCAEC) โดยการวัดเซลล์มีชีวิตและระดับของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยศึกษาในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบทั้งหมด 30 คน แบ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับการรักษาแบบปกติ (กลุ่ม UC) และกลุ่มที่เข้าร่วมโปรแกรมปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต (กลุ่ม LM) กลุ่มละ 15 คน และในกลุ่มคนปกติ 7 คน ทำการวิเคราะห์ระดับไขมันในเลือด ระดับของ oxLDL และ protein carbonyl ในซีรั่ม ที่ baseline 6 เดือน และ 12 เดือน และนำซีรั่มดังกล่าวมาทดสอบในเซลล์ HCAEC แล้วตรวจวัดเซลล์มีชีวิตด้วยวิธี MTT colorimetric assay และวัดระดับของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยวัดแสงฟลูออเรสเซนต์ของสาร DCF จากผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยกลุ่ม LM มีระดับไขมันในเลือด ระดับของ oxLDL และ protein carbonyl ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังจากเข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต 6 เดือน และพบว่าลดลงมาใกล้เคียงกับกลุ่มคนปกติ ในขณะที่เพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยกลุ่ม UC แต่ที่ 12 เดือนไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับ baseline ทั้งสองกลุ่มยกเว้นระดับ protein carbonyl ในผู้ป่วยกลุ่ม UC ที่เพิ่มสูงขึ้นจาก baseline และระดับ HDL-C ลดลงจาก baseline อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการทดสอบผลของซีรั่มที่ได้จากผู้ป่วยในเซลล์ HCAEC พบว่าร้อยละของเซลล์มีชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อ incubated ด้วยซีรั่มจากผู้ป่วยกลุ่ม LM ที่ 6 เดือน แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติที่ 12 เดือน การวิเคราะห์ระดับของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ พบว่าเมื่อ incubated ซีรั่มที่ 6 เดือนของผู้ป่วยกลุ่ม LM ระดับของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ลดลงจาก baseline แต่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยกลุ่ม UC เมื่อ incubated ซีรั่มที่ 12 เดือนของทั้งสองกลุ่ม พบว่าระดับของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ไม่แตกต่างทางสถิติจาก baseline จากผลสรุปได้ว่าการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตสามารถลดระดับของ oxidative damage products ในเลือดของผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบได้ ชี้ให้เห็นว่า oxidative stress ลดลง ส่งผลดีต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดงของหัวใจทั้งในแง่ของการมีชีวิตอยู่เพิ่มขึ้นและมีการสร้างอนุมูลอิสระภายในเซลล์ลดลง

ภาควิชา ชีวเคมี	ลายมือชื่อนิสิต รัตติพร วุ่นสุวรรณ
สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์	ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์
ปีการศึกษา 2551	ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อัชฌาสัย ศิริตันติกร

5074820930 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS : CORONARY ARTERY DISEASE / LIFESTYLE MODIFICATION / OXIDATIVE STRESS / OXIDIZED LOW DENSITY LIPOPROTEIN / HUMAN CORONARY ARTERY ENDOTHELIAL CELL

RATTIPORN WUNSUWAN : EFFECT OF SERA FROM PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE INTERVENED BY LONG-TERM LIFESTYLE MODIFICATION ON HUMAN CORONARY ARTERY ENDOTHELIAL CELLS. ADVISOR : PROF. PIYARATANA TOSUKHOWONG, CO-ADVISOR: ATCHASAI SIRITANTIKORN, PH.D., 74 pp.

Lifestyle modification (LM) programs are intended to stabilize or promote the remission of coronary artery disease (CAD). The purpose of this study was to examine the effects of LM program on oxidative stress marker in CAD patients and study on an *in vitro* effect of sera obtained from the LM-intervened patients on endothelial cells. A total of 30 patients were recruited and randomized into two group, experimental group (n=15) and usual care control group (n=15) and were followed for 12 months. Levels of lipid profiles, oxidized LDL and protein carbonyl were determined in the collected blood specimens from patients at baseline, 6 months and 12 months. Using patient sera and human coronary artery endothelial cells (HCAECs) culture, we measured cell viability by MTT colorimetric assay. After 6 months, serum lipid (cholesterol and triglyceride) levels were significantly decreased in LM group but they did not improve after 12 months of intervention. After 6 months of intervention, oxidized LDL and protein carbonyl levels significantly decrease in LM group but no significant changed at 12 months. In vitro, MTT assay indicated that HCAEC cell viability increased by sera from patients in experimental group after intervention. Fluorometric detection of hydrogen peroxide production significantly decreased after 6 months of intervention in LM group whereas significantly increased in UC group but no significant changed at 12 months in both groups. These findings indicate that lifestyle modification program decreases oxidative stress and increases endothelial cell viability in the patients with CAD. It is strongly recommended as an efficient strategy to decrease the risk of cardiovascular development.

Department : Biochemistry Student's Signature Rattiporn Wunsuwan

Field of Study : Medical Biochemistry Advisor's Signature Piyaratana Tosukhowong

Academic Year : 2008 Co-Advisor's Signature Atchasai Siritantikorn

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถเสร็จลุล่วงไปได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลายฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์ ทั้งให้คำแนะนำ ให้คำสั่งสอน ตั้งแต่การรวบรวมข้อมูล การทดลอง การทำรูปเล่ม และการนำเสนอ อาจารย์ ดร. อัชฌาสัย ศิริตันติกรอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ช่วยเหลือทั้งวิธีการทดลอง ให้คำปรึกษา และให้ข้อแนะนำที่มีประโยชน์มาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก ที่ยินดีเป็นประธานสอบ และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัลยา ธเนศพงศ์ธรรม ที่ได้สอนวิธีการเลี้ยงเซลล์อย่างใกล้ชิด เอื้อเฟื้อให้ใช้ห้องทดลองและอุปกรณ์ต่างๆ และยินดีเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ท่านอื่นๆ ทั้งในและนอกภาควิชาชีวเคมีที่ช่วยประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ เพื่อเตรียมความพร้อมในการทำวิทยานิพนธ์อย่างมีคุณภาพ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือรอบด้าน เช่น การออกจดหมาย การจัดงาน การจักทำเอกสาร การเตรียมสถานที่ การเบิกใช้สิ่งของต่างๆ เป็นต้น

ขอขอบพระคุณทุนการศึกษาระหว่างเรียนจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่ ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา

ขอขอบคุณคุณเอมอร แสงศิริ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บรวบรวมข้อมูลและให้คำแนะนำในหลายๆ เรื่อง ขอบคุณนางสาวลัดดา มีสุข ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือวัดแสงฟลูออเรสเซนต์

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดา ที่เป็นผู้อุปการะในทุกๆ ด้านของชีวิต ขอบคุณญาติพี่น้อง เพื่อนๆ ระดับปริญญาตรี ปริญญาโท และน้องๆ ในห้องทดลองทุกคน ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

คำย่อ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

ขอบเขตของการวิจัย..... 3

ข้อตกลงเบื้องต้น..... 4

ข้อจำกัดของการวิจัย..... 4

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย..... 4

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 5

วิธีดำเนินการวิจัย..... 5

กรอบแนวคิดวิจัย..... 6

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย 6

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 7

โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ..... 7

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress)..... 8

การบทบาทหน้าที่ของเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cell function)..... 11

กลไกที่ทำให้เกิดการสูญเสียหน้าที่ของเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial dysfunction)..... 12

การปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตสำหรับผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ.... 14

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 17

ประชากร……..…….....….. 17
เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย…….……..... 19
การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ……..…….....….. 21
การเก็บรวบรวมข้อมูล……..... 25
การวิเคราะห์ข้อมูล……..... 25
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 27
กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา…….....…..……..... 27
ผลของค่าดัชนีมวลกาย (BMI)……..... 29
ผลการวิเคราะห์ระดับไขมันในเลือด..... 30
ผลการวิเคราะห์ระดับ oxLDL ในซีรั่ม……..... 34
ผลการวิเคราะห์ระดับ protein carbonyl ในซีรั่ม…….....….. 37
ผลการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability)…….....…..…. 39
ผลการศึกษาระดับของ ROS production……..... 40
ผลจากแบบสอบถามเกี่ยวกับการออกกำลังกาย……..... 41
ความสัมพันธ์ของข้อมูลที่ baseline ของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม..... 42
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย…….....……..... 45
รายการอ้างอิง……..……..... 51
ภาคผนวก..... 56
ก. การเตรียมสารเคมี……..... 57
ข. กราฟของสารละลาย oxLDL มาตรฐาน……..... 60
ค. เอกสารชี้แจงข้อมูล/คำแนะนำแก่ผู้เข้าร่วมโครงการ……..... 61
ง. ตัวอย่างใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย……..... 67
จ. ผลงานวิทยานิพนธ์ที่ได้นำเสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติ The 2nd Biochemistry and Molecular Biology Conference 2009: Biochemistry and Molecular Biology for Regional Sustainable Development……..... 69
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์…….....……..... 74

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (inclusion criteria)……	17
2	เกณฑ์การคัดออกจากการศึกษา (exclusion criteria)……	18
3	เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย……..….	14
4	แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม.....……..….	28
5	ผลการวิเคราะห์ระดับไขมันในเลือดของผู้ป่วยกลุ่ม UC เปรียบเทียบที่ baseline และที่ 6 เดือน……	33
6	ผลการวิเคราะห์ระดับไขมันในเลือดของผู้ป่วยกลุ่ม LM เปรียบเทียบที่ baseline และที่ 6 เดือน……	33
7	ผลการวิเคราะห์ระดับไขมันในเลือดของผู้ป่วยกลุ่ม UC เปรียบเทียบที่ baseline และที่ 12 เดือน……	33
8	ผลการวิเคราะห์ระดับไขมันในเลือดของผู้ป่วยกลุ่ม LM เปรียบเทียบที่ baseline และที่ 12 เดือน……..	34
9	ผลการวิเคราะห์ oxidative damage products ในซีรั่มของผู้ป่วยกลุ่ม UC เปรียบเทียบที่ baseline และที่ 6 เดือน……..	35
10	ผลการวิเคราะห์ oxidative damage products ในซีรั่มของผู้ป่วยกลุ่ม LM เปรียบเทียบที่ baseline และที่ 6 เดือน……..	36
11	ผลการวิเคราะห์ oxidative damage products ในซีรั่มของผู้ป่วยกลุ่ม UC เปรียบเทียบที่ baseline และที่ 12 เดือน……..	36
12	ผลการวิเคราะห์ oxidative damage products ในซีรั่มของผู้ป่วยกลุ่ม LM เปรียบเทียบที่ baseline และที่ 12 เดือน……..	36

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงพยาธิสภาพของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ.....	8
2	แสดงกลไกการเกิด oxLDL……	9
3	รูปที่ 3 แสดงกลไกการเกิด protein carbonyl และปฏิกิริยาระหว่าง protein carbonyl กับ 2,4 dinitrophenylhydrazine (DNPH)……..	10
4	แสดงกลไกที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ในการเปลี่ยนสาร 2´,7´-dichloro-dihydrofluorescin diacetate (DCFH-DA) ได้เป็นสารฟลูออเรสเซนต์ 2,7-dichlorofluorescein (DCF)……	11
5	แสดงผนัง 3 ชั้นที่เป็นองค์ประกอบของหลอดเลือด……..	12
6	กลไกการทำงานของ oxLDL ผ่านตัวรับเฉพาะที่ชื่อว่า LOX-1……	13
7	แสดงค่าดัชนีมวลกายของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มที่ baseline 6 เดือน และ 12 เดือน……..	29
8	แสดงระดับ total cholesterol ในเลือดของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม ที่ baseline 6 เดือน และ 12 เดือน……	31
9	Box-Whisker plot และค่า median ของระดับของ triglyceride ในซีรั่มของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม ที่ baseline 6 เดือน และ 12 เดือน……..……..	31
10	แสดงระดับ HDL-cholesterol ในเลือดของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม ที่ baseline, 6 เดือน และ 12 เดือน…….……	32
11	แสดงระดับ LDL-cholesterol ในเลือดของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม ที่ baseline 6 เดือน และ 12 เดือน……	32
12	Box-Whisker plot และค่า median ของระดับของ oxLDL ในซีรั่มของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มที่ baseline 6 เดือน และ 12 เดือน…..……..	35
13	Box-Whisker plot และค่า median ของระดับของ protein carbonyl ในซีรั่มของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม ที่ baseline 6 เดือน และ 12 เดือน……..……	38
14	% cell viability ของเซลล์ HCAEC หลังจาก incubated ด้วยซีรั่มของกลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่ม แล้วทดสอบโดยวิธี MTT colorimetric assay……..	39
15	ระดับของ ROS production ในเซลล์ HCAEC แสดงโดยค่า DCF fluorescence (% of healthy control)……	40

16 แสดงค่าเฉลี่ยความถี่ในการออกกำลังกายต่อสัปดาห์ของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม..... 41
17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ oxLDL และ total cholesterol ของกลุ่มผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม ที่ baseline..... 42
18 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ oxLDL และ triglyceride ของกลุ่มผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม ที่ baseline..... 43
19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ oxLDL และ LDL cholesterol ของกลุ่มผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม ที่ baseline..... 43
20 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ oxLDL และความถี่ในการออกกำลังกายของกลุ่มผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม ที่ baseline..... 44

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

CAD	Coronary artery disease
HCAEC	Human coronary artery endothelial cell
OxLDL	Oxidized low density lipoprotein
ROS	Reactive oxygen species
LOX-1	Lectin-like receptor for oxLDL
NOS	Nitric oxide synthase
NO	Nitric oxide
ADMA	Asymmetric dimethylarginine
DDAH	Dimethylarginine dimethylaminohydrolase
DCFH-DA	2´,7´-dichloro-dihydrofluorescein diacetate
DCFH	2´,7´-dichloro-dihydrofluorescein
DCF	2´,7´-dichlorofluorescein
TC	Total cholesterol
TG	Triglycerides
HDL-C	High density lipoprotein cholesterol
LDL-C	Low density lipoprotein cholesterol
UC	Usual care
LM	Lifestyle modification

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (coronary artery disease, CAD) เป็นโรคเรื้อรังที่พบบ่อยในผู้สูงอายุ มีอัตราความชุกสูงและเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งในประเทศต่างๆ ทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศสหรัฐอเมริกา และสำหรับประเทศไทยอัตราตายจากกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือดติดอันดับ 1 ใน 3 มาโดยตลอด สำหรับจำนวนของผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตจากโรคหลอดเลือดหัวใจตีบนั้นมีเพิ่มสูงขึ้นทุกปี [1,2] โรคหลอดเลือดหัวใจตีบเป็น multifactor disease ซึ่งปัจจัยเสี่ยงที่เป็นสาเหตุของโรคอาจเป็นได้ทั้งพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ครอบครัวมีประวัติเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจตีบก่อนวัยอันควร ระดับไขมันในเลือดสูงทั้งคอเลสเตอรอล (cholesterol) และไขมันแอลดีแอล (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคอ้วน ความเครียด การสูบบุหรี่ ขาดการออกกำลังกาย และภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นต้น

กลไกการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบเริ่มจากมีไขมันโดยเฉพาะ LDL ในกระแสเลือดมาเกาะจับผนังหลอดเลือดแล้วข้ามผ่านเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) ซึ่งบุอยู่ด้านในสุดของหลอดเลือด เข้าไปในชั้นอินทิมา (intima) ต่อมา LDL จะถูกออกซิไดซ์โดยสารอนุมูลอิสระ (free radical) หรืออนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไว (reactive oxygen species, ROS) ได้เป็น oxidized LDL (oxLDL) ซึ่งจะชักนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเคลื่อนที่มาจับกิน oxLDL เกิดเป็น foam cell (เซลล์เม็ดเลือดขาวที่มี oxLDL อยู่เต็มภายในเซลล์) ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ matrix metalloproteinase (MMP) กระตุ้นให้หลอดเลือดอักเสบ foam cell จำนวนหนึ่งจะตายแล้วทับถมกันอยู่ใต้เซลล์บุผนังหลอดเลือด ทำให้กลายเป็นส่วนหนึ่งของพลาก (plaque) ซึ่งการเกิด plaque เป็นขั้นตอนที่ดำเนินไปอย่างช้าๆ เป็นผลมาจากการเจริญเติบโตของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบพร้อมกับการหลั่ง fibrous element ส่วนเซลล์บุผนังหลอดเลือดจะหลั่งสารต่าง ๆ ออกมาขณะเกิดกระบวนการ atherosclerosis เช่น intercellular cell adhesion molecule (ICAM) vascular cell adhesion molecule (VCAM) monocyte chemoattractant protein (MCP) macrophage colony stimulating factor (M-CSF) tumor necrotizing factor (TNF) และ MMP เป็นต้น แล้วสารเหล่านี้จะชักนำให้เม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะ monocytes เข้ามารวมกันและจะถูกกระตุ้นให้เจริญไปเป็น macrophages ส่งเสริมให้ plaque นี้ขยายใหญ่และลุกลามเข้าไปทางด้านในของหลอดเลือด ทำให้หลอดเลือดอุดตันในที่สุด อาจมีการปริแตกของผนังหลอดเลือดและกระตุ้นให้เกิดลิ่มเลือดบริเวณนั้น [3]

OxLDL ที่เกิดขึ้นนั้นจะเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้เกิด endothelial dysfunction โดย oxLDL จับกับ specific receptor ที่ชื่อว่า lectin-like receptor for oxLDL (LOX-1) ที่อยู่บน endothelial cell membrane แล้ว LOX-1 ไปกระตุ้นการทำงานของ NADPH oxidase ทำให้มีการสร้าง ROS ในเซลล์เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis หรือแบบ necrosis [4] นอกจากนี้ ROS ยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด endothelial dysfunction ได้ เนื่องจาก ROS สามารถเพิ่มระดับของสารชื่อ asymmetric dimethylarginine (ADMA) ให้สูงขึ้นมากภายใน endothelial cell ซึ่ง ADMA มีบทบาทเป็นตัวยังยั้งการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) ทำให้ระดับของ nitric oxide (NO) ลดลง มีผลทำให้การทำงานของ endothelial cell เสียไป [5,6]

จากการศึกษาพบว่าการรักษาผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบให้มีประสิทธิภาพต้องทำควบคู่กัน ทั้งการรักษาด้วยยาและการสร้างเสริมสุขภาพด้วยการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต (lifestyle modification) เพื่อเพิ่มคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย ซึ่งการสร้างเสริมสุขภาพผู้ป่วยเพื่อให้มีพลังอำนาจ (empowerment) ในการดูแลตนเอง (self-monitoring) อย่างเคร่งครัดด้วยการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการดำเนินชีวิต ทั้งร่างกาย จิตใจและสังคม โดยการให้ความรู้เกี่ยวกับโรค อาการการแสดงของโรคและการใช้ยา ที่สามารถปรึกษาแพทย์ได้ การให้ความรู้เกี่ยวกับการบริโภคอาหาร คำแนะนำการออกกำลังกายที่เหมาะสมและสม่ำเสมอ ร่วมกับการฝึกปฏิบัติการจัดการกับความเครียด การเข้ากลุ่มย่อยและให้คำปรึกษา (group support) จากแพทย์และบุคลากรทางการแพทย์เป็นระยะๆ ทำให้เกิดการพัฒนาความสามารถในการดูแลตนเองของผู้ป่วย ทั้งด้านความคิด ความมั่นใจ การฟื้นฟูการทำงานของหัวใจ และส่งผลให้สามารถสร้างเสริมสุขภาพของตนเองให้ดีขึ้นได้ จากรายงานของ Ornish และคณะ [7] พบว่าการฝึกจัดการกับความเครียดโดยใช้โยคะและการสร้างจินตภาพ รวมถึงการมีกิจกรรมกลุ่มร่วมกัน ร่วมด้วยการควบคุมอาหารและออกกำลังกายปานกลาง เป็นระยะเวลา 1 ปี สามารถทำให้การตีบแคบของหลอดเลือดหัวใจลด 1.75% และ LDL cholesterol ในเลือดลดลง 40% เมื่อศึกษาต่อไปจนครบ 5 ปี พบว่าการตีบแคบลดลงถึง 3.1% และ LDL-C ยังลดไปจากค่าเดิมที่ 1 ปี อีก 20% นอกจากนี้ยังพบว่าช่วยลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจได้ โดยทำให้ระดับ serum lipoprotein profile, ความดันโลหิตและระดับน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม [8-10] และต่อมาในปี 2546 คณะวิจัยของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ [11] ได้ศึกษาถึงประสิทธิผลของการเปลี่ยนแปลงการดำเนินชีวิตต่อปัจจัยเสี่ยงของโรคหลอดเลือดหัวใจ ในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบคงที่ ผลการวิจัยพบว่า โปรแกรมการส่งเสริมการดูแลตนเอง โดยการ

ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการดำรงชีวิต ทำให้ระดับ antioxidants ในเลือด (กลูตาไธโอนและวิตามินซี) เพิ่มมากขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งเป็นผลให้ oxidative stress ลดลง

จากผลการศึกษาข้างต้นผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าระดับของไขมันในเลือด (lipid profiles) และ oxidative damage products ของผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่เข้าร่วมโปรแกรมการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตจะมีระดับที่ดีขึ้นเทียบเท่ากับคนปกติ การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับของไขมันในเลือด และระดับของ oxidative stress ในซีรั่ม และศึกษาผลของซีรั่มนั้นต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดงของหัวใจ (human coronary artery endothelial cell, HCAEC) โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มคนปกติ กลุ่มผู้ป่วยทั้งที่เข้าและไม่เข้าโปรแกรม และเปรียบเทียบผลของการเข้าโปรแกรมต่อการทำงานของเซลล์ดังกล่าว โดยการตรวจวัดเซลล์มีชีวิตด้วยวิธี MTT colorimetric assay และวัดระดับของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ (intracellular ROS production) ผลการศึกษานี้จะทำให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่างการปรับเปลี่ยนการดำเนินชีวิตและเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง ซึ่งหากผลการศึกษานี้พบว่าการปรับเปลี่ยนการดำเนินชีวิตส่งผลดีต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดงจริง ก็จะเป็นหลักฐานการยืนยันในระดับเซลล์สำหรับการนำโปรแกรมนี้ไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและปรับเปลี่ยนรูปแบบการรักษาผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาระดับของไขมันในเลือด (lipid profiles) และ oxidative damage products ในซีรั่ม ของผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบกลุ่มที่เข้าและไม่เข้าโปรแกรม และเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ
2. เพื่อศึกษาผลของซีรั่มต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง ในแง่ของการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ และ ROS production โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มคนปกติและผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ
3. เพื่อศึกษาผลของซีรั่มต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง ในแง่ของการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ และ ROS production โดยเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบกลุ่มที่เข้าและไม่เข้าโปรแกรม

ขอบเขตของการวิจัย

1. ผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่ได้รับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาดไทย ซึ่งยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจตลอดระยะเวลาของการศึกษาวิจัย

2. กลุ่มคนปกติ (healthy control) เป็นเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่ไม่มีประวัติการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ และปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำตามมาตรฐานของการทดสอบเครื่องมือนั้นๆ
2. ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจ ตลอดระยะเวลาของการศึกษาวิจัย โดยมีการลงลายมือชื่อเป็นลายลักษณ์อักษรในใบยินยอม ภายหลังได้รับการชี้แจงให้ทราบรายละเอียดในทุกด้าน รวมถึงความเสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้น และผู้ป่วยสามารถถอนตัวออกจากโครงการได้ทุกเวลาตลอดการดำเนินโครงการศึกษาวิจัย
3. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย เป็นผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ ที่มารับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

ข้อจำกัดของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาระยะยาว ผู้ป่วยที่ไม่สามารถเข้าร่วมโครงการได้ครบตามกำหนดเวลาจะถูกคัดออก

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. Coronary artery disease เป็นโรคที่เกิดการตีบตันของหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงหัวใจ มีสาเหตุส่วนใหญ่มาจากการแข็งตัวของหลอดเลือด ซึ่งเกิดจากความเสื่อมของหลอดเลือดหัวใจ ถ้ามีการตีบมากจะทำให้กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (myocardial ischemia) และจะมีอาการเจ็บหน้าอก (angina pectoris) เมื่อหัวใจทำงานเพิ่มขึ้น
2. Endothelial dysfunction เซลล์บุผนังหลอดเลือดสูญเสียการทำหน้าที่ไป
3. Lifestyle modification การปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต ทั้งร่างกาย จิตใจ และสังคม เพื่อลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ โดยมีการให้ความรู้ในการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต ดังนี้
   3.1. ความรู้เกี่ยวกับอาหาร โดยให้รับประทานอาหารไขมันต่ำ เน้นการเลือกรับประทานผัก ผลไม้
   3.2. ให้ความรู้ คำแนะนำการออกกำลังกายที่มีประสิทธิภาพ โดยการออกกำลังกายแบบ aerobic exercise เน้นการเดิน

3.3. ให้ความรู้ ร่วมกับการฝึกปฏิบัติการจัดการกับความเครียด โดยใช้การฝึกปฏิบัติการหายใจ ร่วมกับการฝึกผ่อนคลายความเครียด (progressive relaxation) และการสร้างจินตภาพ (imagery)

3.4. การจัดกลุ่มสนทนาร่วมกัน (group support) เพื่อให้คำปรึกษา คำแนะนำ แลกเปลี่ยนความคิดเห็น รวมทั้งทราบปัญหาและช่วยกันแก้ไขปัญหาให้แก่ผู้ป่วย เพื่อเสริมสร้างพลังอำนาจ (empowerment) ในการปฏิบัติตามโปรแกรมการเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต

3.5. ส่งเสริม และสร้างทักษะในการดูแลตนเอง (self-monitoring) การฝึกสอนผู้ป่วยในการ วัด บันทึก และประเมินสุขภาพของตนเอง ได้แก่ การชั่งน้ำหนัก การคำนวณภาวะอ้วน การจับชีพจรเพื่อให้การออกกำลังกายถึงเป้าหมายที่ต้องการ เป็นต้น

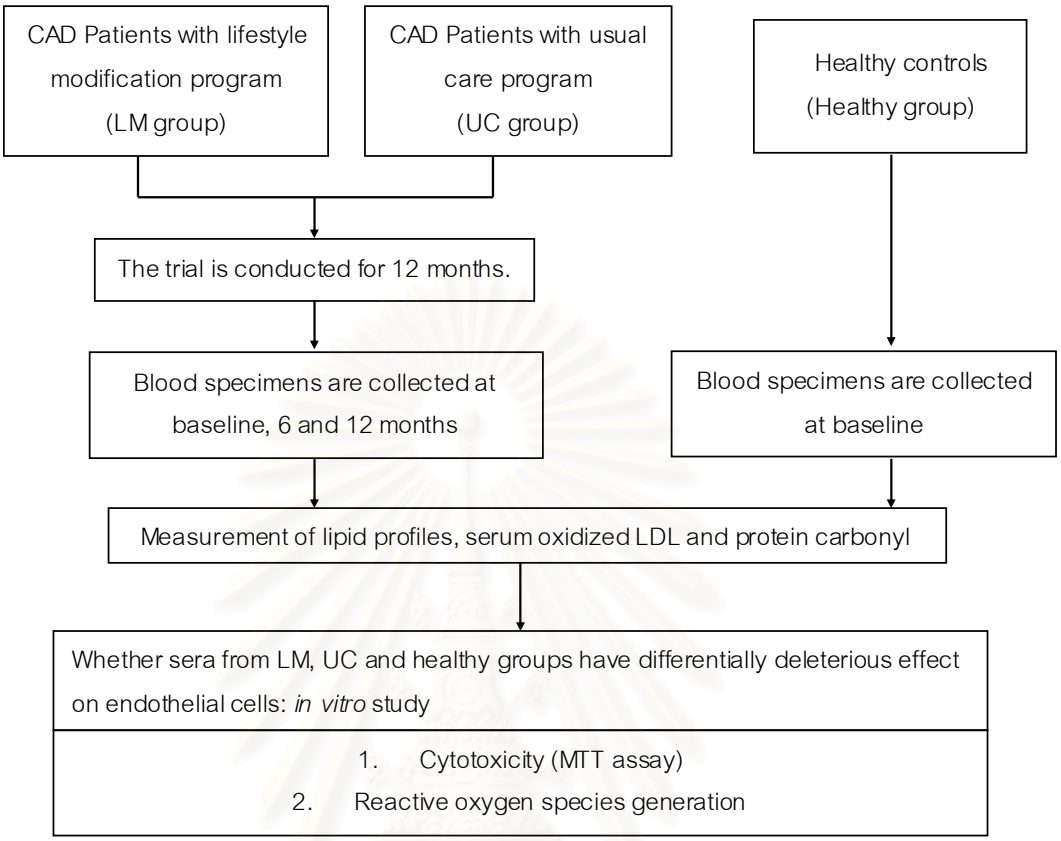
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างการปรับเปลี่ยนการดำเนินชีวิตและเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง
2. เป็นหลักฐานการยืนยันในระดับโมเลกุลสำหรับการนำโปรแกรมนี้ไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มคนปกติจำนวน 7 ราย กลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่เข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนการดำเนินชีวิต จำนวน 15 ราย และกลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่ไม่ได้เข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนการดำเนินชีวิต จำนวน 15 ราย การศึกษาครั้งนี้ได้นำตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมาจากโครงการดังกล่าว เพื่อทำการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตรวจวัดระดับของไขมันในเลือด ตรวจวัดระดับของ oxLDL ในซีรั่มโดยใช้วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และตรวจวัดระดับของ protein carbonyl ในซีรั่มโดยใช้วิธี colorimetric assay และนำซีรั่มดังกล่าวมาทำการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง HCAEC เพื่อวัดผลของซีรั่มที่มีต่อการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) โดยวิธี MTT colorimetric assay และวัดระดับของ ROS production ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ดังกล่าว โดยวิธี 2′,7′-dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescence assay

กรอบแนวคิดวิจัย (Conceptual framework)



ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ดำเนินการทดลอง รวมรวมข้อมูล และวิเคราะห์ผลการทดลองจนเสร็จสมบูรณ์
2. จัดทำ proceeding ภาษาอังกฤษฉบับเต็ม (บางส่วนของผลงานวิทยานิพนธ์) เพื่อนำไปเสนอในการประชุมสัมมนาทางวิชาการ
3. จัดทำนิพนธ์ต้นฉบับภาษาอังกฤษ เพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

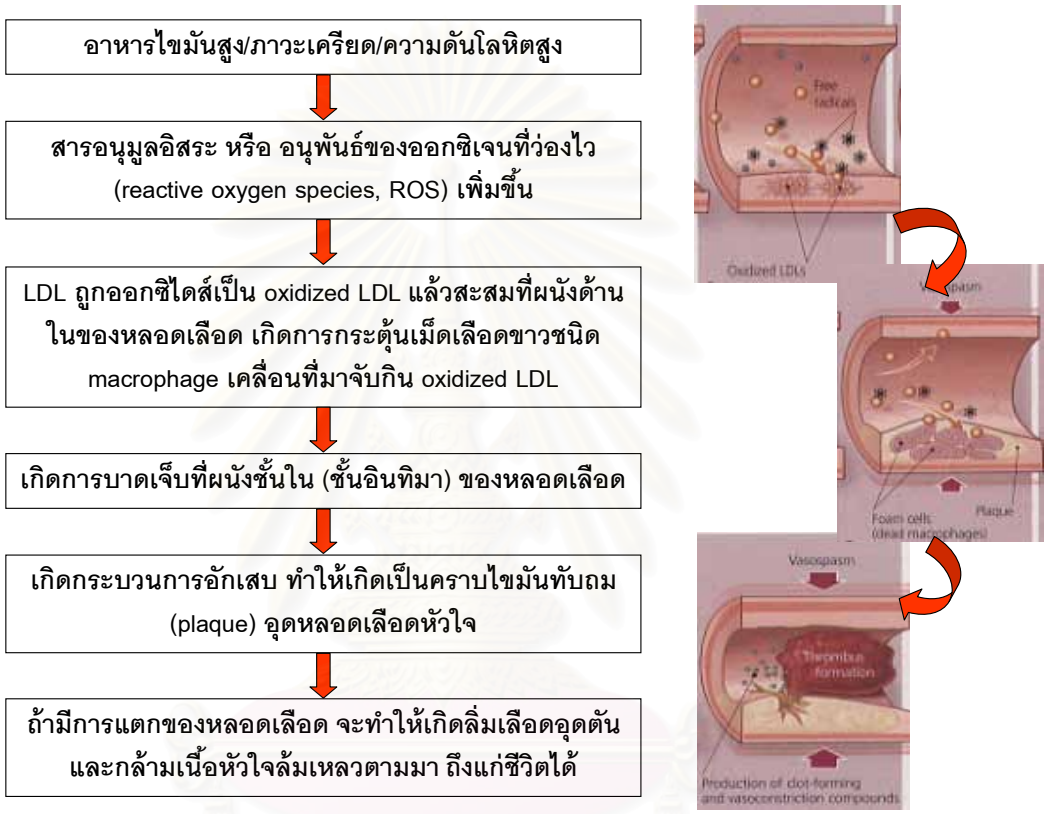
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ

โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ เป็นโรคเรื้อรังที่พบบ่อยในผู้สูงอายุและเป็นสาเหตุการตายในประเทศต่างๆ ทั่วโลก และจากรายงานสถานการณ์ความรุนแรงของโรคหัวใจและหลอดเลือดทั่วโลก พบว่าประชากรเสียชีวิตด้วยโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular diseases) ในปี 2545 จำนวน 16.73 ล้านคน [12] สำหรับประเทศไทยอัตราตายจากกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือดจะติดอันดับ 1 ใน 3 มาโดยตลอด สำหรับจำนวนของผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตจากโรคหลอดเลือดหัวใจตีบนั้นมีเพิ่มสูงขึ้นทุกปี [1,2] ในปี 2550 มีผู้ป่วยจากโรคโรคหัวใจขาดเลือด เป็นจำนวน 149,510 คน [1] สำหรับผู้เสียชีวิตจากโรคหัวใจขาดเลือด ในปี 2550 มีจำนวน 11,053 คน [2] ซึ่งปัจจัยเสี่ยงที่เป็นสาเหตุของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ อาจเป็นได้ทั้งพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ครอบครัวมีประวัติเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจตีบและเสียชีวิตก่อนวัยอันควร ระดับไขมันในเลือดสูงทั้งคอเลสเตอรอล และ LDL-C โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคอ้วน ความเครียด การสูบบุหรี่ ภาวะขาดการออกกำลังกาย และ oxidative stress เป็นต้น

โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ เป็นภาวะที่มีการตีบตันของหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงหัวใจ มีสาเหตุส่วนใหญ่มาจากการแข็งตัวของหลอดเลือด (atherosclerosis) ซึ่งเกิดเมื่อมีปัจจัยเสี่ยงหลายประการร่วมกัน โดยในกระแสเลือดมีปริมาณไขมันมาก แรงดันในหลอดเลือดสูงจะมีแรงกระทำต่อผนังหลอดเลือด ทำให้เซลล์บุผนังหลอดเลือดถูกทำลายหรือทำงานผิดปกติ ไขมันในกระแสเลือดโดยเฉพาะ LDL-C จะแทรกผ่านเซลล์บุผนังหลอดเลือด เข้าสู่ชั้นในของหลอดเลือด และ LDL-C จะถูกออกซิไดซ์ เป็น oxLDL ซึ่งจะชักนำให้เม็ดเลือดขาวที่ไหลเวียนมาเกาะติดผนังหลอดเลือด แทรกผ่านเข้าสู่ผนังหลอดเลือด แล้วเม็ดเลือดขาวนี้จะทำหน้าที่เก็บกิน oxLDL กลายเป็นเซลล์ที่มีลักษณะเฉพาะคือ มีไขมันในเซลล์ เรียกว่า foam cell โดย foam cell ที่ตายจะทับถมกันอยู่ใต้เซลล์บุผนังหลอดเลือด กลายเป็นส่วนหนึ่งของ plaque ซึ่งการเกิด plaque เป็นขั้นตอนที่ดำเนินไปอย่างช้าๆ เป็นผลมาจากการเจริญเติบโตของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบพร้อมกับการหลั่ง fibrous element ส่วนเซลล์บุผนังหลอดเลือดจะหลั่งสารต่างๆ ออกมาขณะเกิดกระบวนการ atherosclerosis เช่น ICAM VCAM MCP M-CSF MMP และ TNF เป็นต้น แล้วสารเหล่านี้จะชักนำให้เม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะ monocytes เข้ามารวมกันและจะถูกกระตุ้นให้เจริญไปเป็น macrophages ส่งเสริมให้ plaque นี้ขยายใหญ่และลุกลามเข้าไปทางด้านในของหลอดเลือด ทำให้หลอดเลือดอุดตันในที่สุด ถ้าเส้นเลือดหัวใจมีการอุดตันมากกว่า 80% ก็จะเกิดอาการแน่น

หน้าอก แบบ angina ขณะที่ออกกำลัง นอกจากนี้หลอดเลือดอุดตันยังก่อให้เกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายแบบเฉียบพลันจากการขาดเลือดไปหล่อเลี้ยง ที่เรียกว่า acute myocardial infarction อันตรายถึงขั้นเสียชีวิตส่วนใหญ่เกิดเนื่องจากมีการแตกของ plaque ตรง fibrous cap ชักนำร่างกายตอบสนองโดยเกิดก้อน thrombus ไปอุดตันหลอดเลือด หากไปอุดตันที่สมอง ก็จะทำให้เกิด stroke คือ ขาดเลือดไปเลี้ยงสมอง



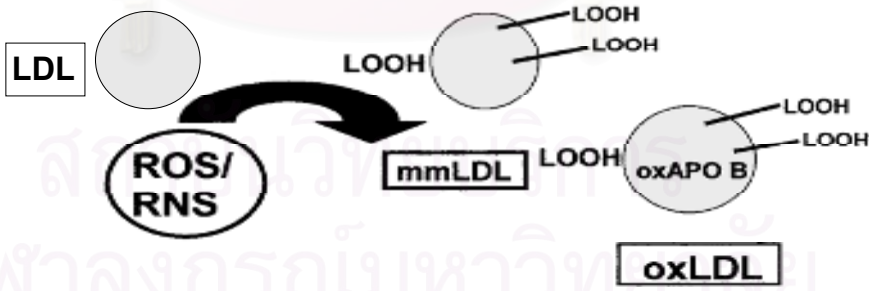
รูปที่ 1 แสดงพยาธิสภาพของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress)

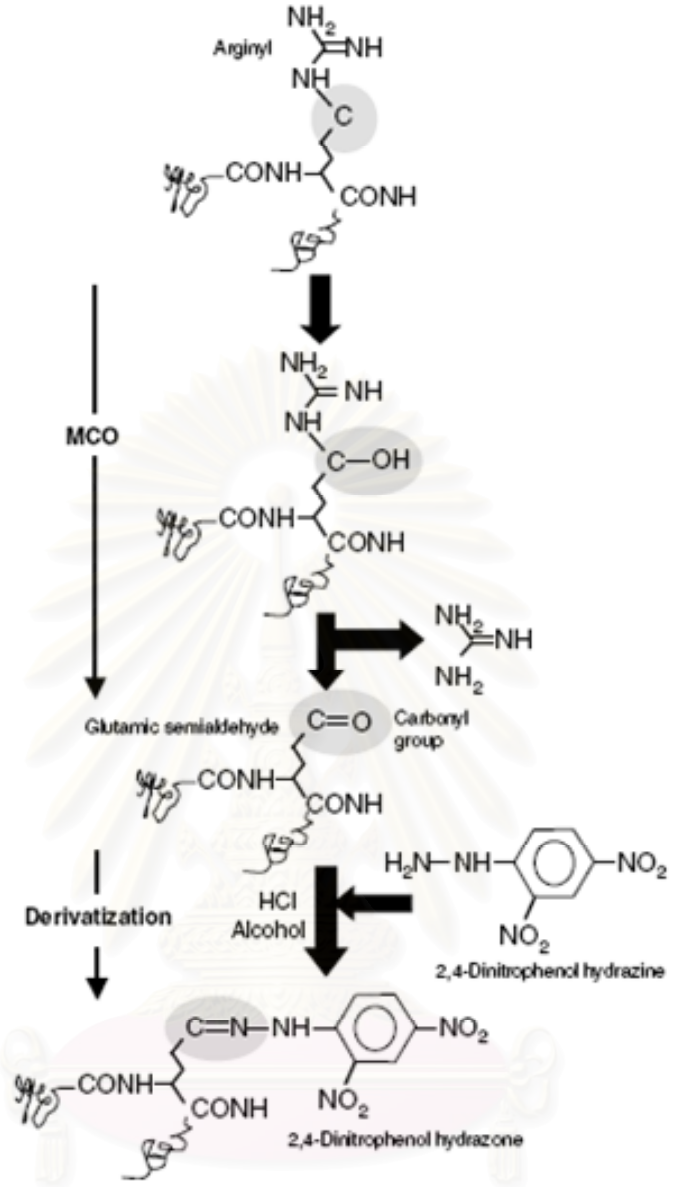
ในสภาวะปกติกระบวนการสร้างพลังงานจากสารอาหารที่บริโภค จำเป็นต้องใช้ออกซิเจน ทำให้มีการสร้างสารอนุมูลอิสระ (oxidants) ที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน (ROS) ได้แก่ superoxide anion (O_2^-) hydroxyradical (OH^-) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) เป็นต้น ซึ่งเป็นอันตรายต่อสารชีวโมเลกุล (ไขมัน โปรตีน กรดนิวคลีอิก) และเซลล์ เนื่องจากสร้างสารอนุมูลอิสระมีอิเล็กตรอนที่ขาดคู่ ทำให้ไม่คงตัวสามารถเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นหรือเซลล์ข้างเคียงได้ ทำให้เกิดความเสื่อมของเซลล์ หรือการตายของเซลล์ แต่ในสภาวะปกติร่างกายมีกระบวนการที่จะทำลายหรือยับยั้งความเป็นพิษของสารอนุมูลอิสระเหล่านี้ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม โดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) หรือสารกำจัดอนุมูลอิสระ (ROS scavenger) หลายชนิดทั้งที่

ร่างกายสร้างขึ้นเอง เช่น กลูตาไธโอน (glutathione) และได้รับจากภายนอก เช่น วิตามินอี วิตามินซี เบต้าแคโรทีน (β-carotein) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นต้น แต่ในภาวะที่เกิดพยาธิสภาพของเซลล์หรือเกิดโรคบางชนิด หน้าที่ป้องกันหรือยับยั้งสารอนุมูลอิสระเหล่านี้จะเสียไป เกิดสภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระมากเกินกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจะต้านหรือป้องกันได้ จนส่งผลให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ซึ่งเรียกภาวะนี้ว่า ภาวะเครียดจากการออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญในการเสื่อมของหลอดเลือดและเซลล์บุผิวของหลอดเลือด การอักเสบ และการเกิดโรคเรื้อรังหลายชนิด อาทิเช่น ความชรา (aging) หรือโรคอื่นๆ ในผู้สูงอายุ เช่น โรคเส้นเลือดตีบตัน โรคหัวใจ โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคไต โรคนิ่ว เป็นต้น มีรายงานการศึกษาทั้งผลของการให้หรือเสริมอาหาร ผักและผลไม้ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง พบว่ามีประโยชน์ในการป้องกันไม่ให้ LDL ถูกออกซิไดซ์ ลดการเกิด plaque ลดปัจจัยเสี่ยงของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ และลดอัตราการเสียชีวิตจากโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ

ตัวบ่งชี้ (marker) ในการตรวจวัด oxidative stress มีหลายตัว ที่สนใจได้แก่ oxLDL และ protein carbonyl ซึ่ง oxLDL เป็น oxidative damage product ของไขมันเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL โดย ROS ซึ่งทั้งไขมันและโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ LDL จะถูกออกซิไดส์ไป (รูปที่ 2) และ protein carbonyl เป็น oxidative damage product ของโปรตีน เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ protein โดย ROS ซึ่งการเกิดหมู่คาร์บอนิลนี้จะเกิดจากปฏิกิริยา direct catalyzed oxidative (MCO) ที่ side chain ของกรดอะมิโน proline arginine lysine และ threonine [13, 14] (รูปที่ 3)



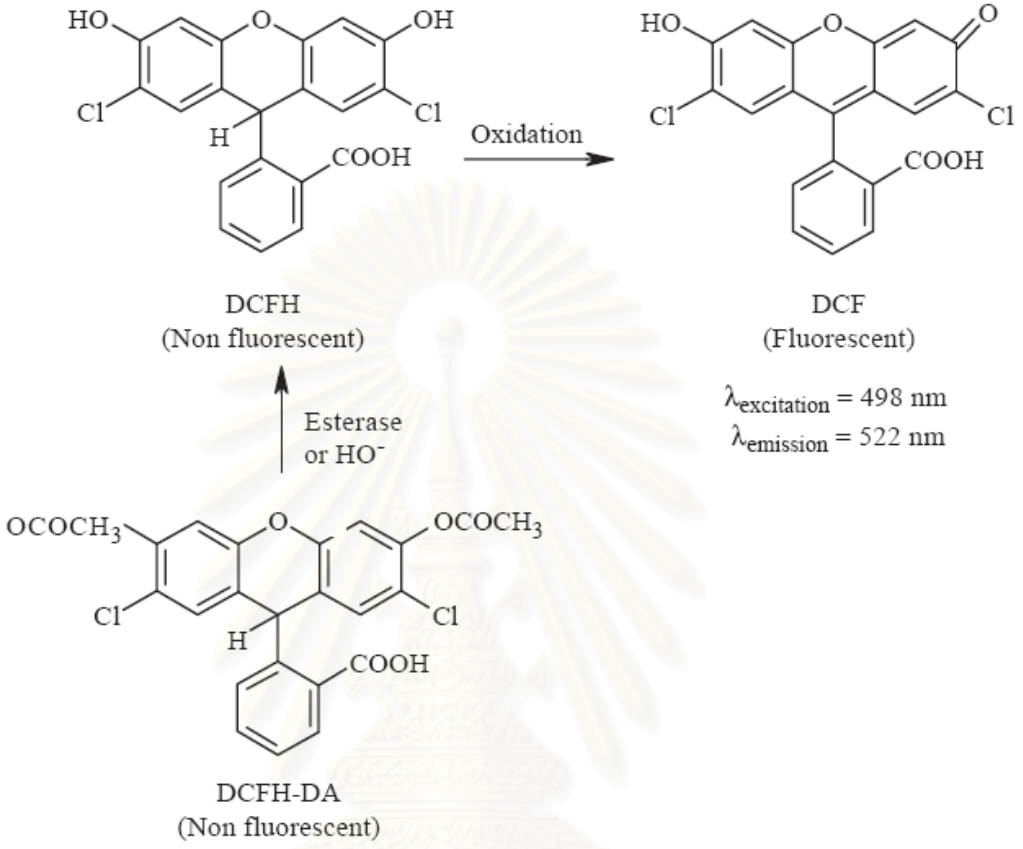
รูปที่ 2 แสดงกลไกการเกิด oxLDL



รูปที่ 3 แสดงกลไกการเกิด protein carbonyl และปฏิกิริยาระหว่าง protein carbonyl กับ 2,4 dinitrophenylhydrazine (DNPH) [14]

นอกจากนี้ยังสามารถวัดระดับของ ROS ภายในเซลล์ต่างๆ ได้หลายเซลล์ รวมทั้งเซลล์บุหลอดเลือดด้วย โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 2´,7´-dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) โดย ROS ได้เป็นสาร 2,7-dichlorofluorescein (DCF) ซึ่งเป็นสารฟลูออเรสเซ็นต์ ROS ที่สามารถออกซิไดส์ DCFH ได้ นั้นมีหลายตัว แต่ที่สำคัญคือ hydrogen peroxide [14] DCFH-DA เป็นสาร non polar สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในเซลล์ได้ เมื่อผ่านเข้าเซลล์แล้ว DCFH-DA จะถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์ esterases ภายในเซลล์ ได้เป็น DCFH ซึ่งเป็นสาร polar และจะติดอยู่ภายในเซลล์ เมื่อ DCFH ถูกออกซิไดซ์โดย ROS ภายในเซลล์ กลายเป็นสาร

DCF ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารฟลูออเรสเซนต์ การวัดแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นจากสาร DCF จึงใช้เป็นดรรชนีวัดปริมาณ ROS ภายในเซลล์ (รูปที่ 4)



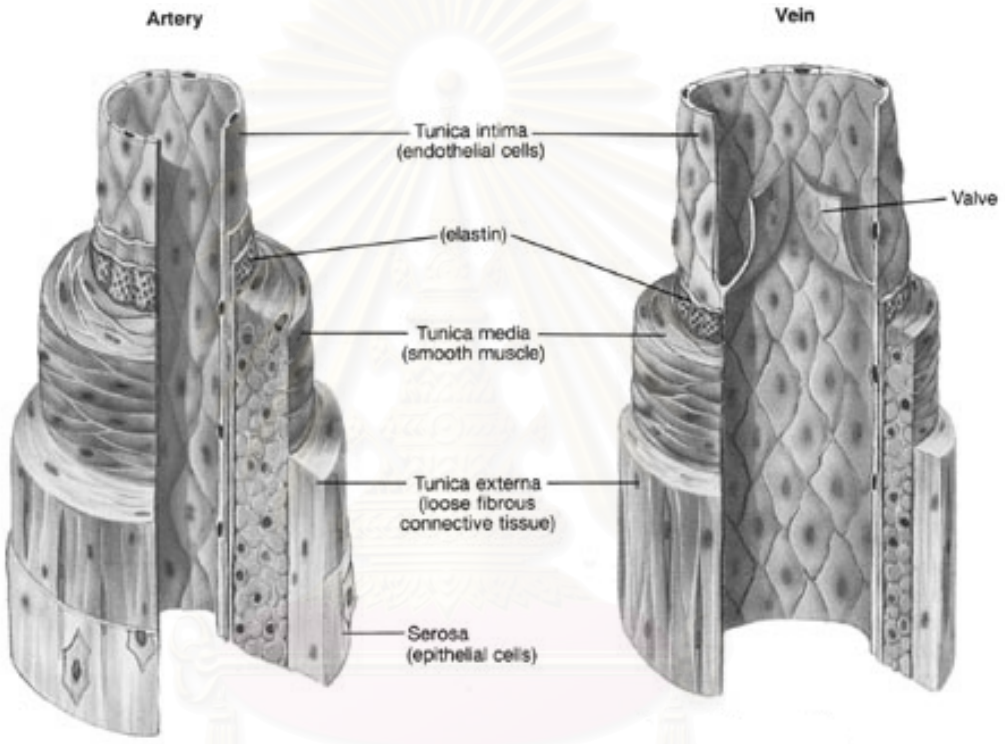
รูปที่ 4 แสดงกลไกที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ในการเปลี่ยนสาร 2′,7′-dichloro-dihydrofluorescin diacetate (DCFH-DA) ได้เป็นสารฟลูออเรสเซนต์ 2,7-dichlorofluorescein (DCF) [15]

บทบาทหน้าที่ของเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cell function)

หลอดเลือดประกอบด้วยผนัง 3 ชั้น ชั้นที่มีส่วนสำคัญที่สุด คือผนังชั้นใน (intima) ซึ่งประกอบด้วย เซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) มีลักษณะเป็นเซลล์ชั้นเดียวเรียงต่อกันบุรอบภายในหลอดเลือด (รูปที่ 5)

ลักษณะรูปร่างของเซลล์บุผนังหลอดเลือดจะเปลี่ยนแปลงตามหน้าที่ ซึ่งมีอยู่หลายประการ ได้แก่ เป็นตัวควบคุมคุณสมบัติในการซึมเคลื่อนที่ผ่าน (permeability) ของน้ำ สารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ ฮอร์โมนและเม็ดเลือดขาวจากเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อ ทำหน้าที่ป้องกันการเกาะของเกล็ดเลือด และป้องกันการเจริญหรือการเคลื่อนที่ผิดปกติของเซลล์กล้ามเนื้อที่จะทำให้หลอดเลือดตีบลง เป็นแหล่งการสร้าง cytokines ด้วย นอกจากนี้เซลล์บุผนังหลอดเลือดยังทำหน้าที่

ควบคุมสมดุลของร่างกาย โดยสร้างสารหลายชนิด เช่น NO เป็นสารที่ทำให้หลอดเลือดขยายตัว และ angiotensin II เป็นสารที่ทำให้หลอดเลือดหดตัว เป็นต้น ถ้าเซลล์บุผนังหลอดเลือดไม่สามารถทำหน้าที่เหล่านี้ได้ตามปกติ เมื่อมีปัจจัยเสริมบางประการอาจจะก่อให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจได้ เนื่องจากการสูญเสียหน้าที่ของเซลล์บุผนังหลอดเลือด เป็นการขั้นตอนแรกของการเกิด atherosclerosis ซึ่งมีปัจจัยเสี่ยงอีกหลายประเภทที่มีผลต่อการทำงานของเซลล์บุผนังหลอดเลือด ทั้งไขมันและน้ำตาลในเลือดสูง angiotensin II catecholamine homocysteine ความเครียดและการสูบบุหรี่ เป็นต้น

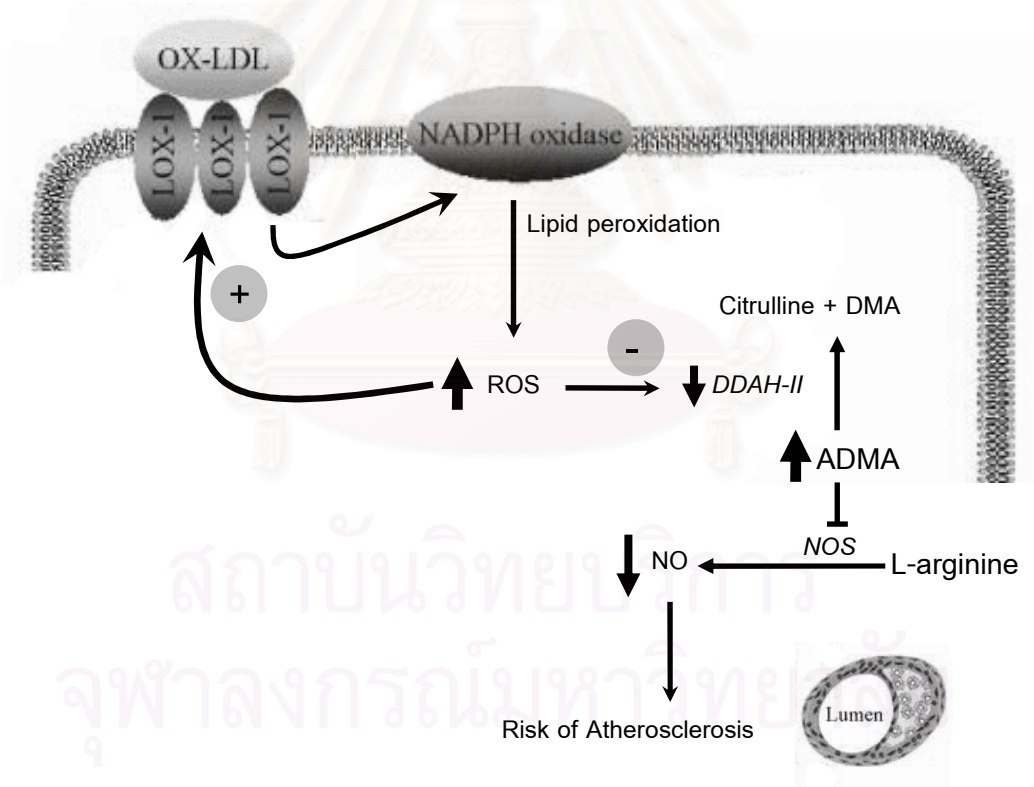


รูปที่ 5 แสดงผนัง 3 ชั้นที่เป็นองค์ประกอบของหลอดเลือด [16]

กลไกที่ทำให้เกิดการสูญเสียหน้าที่ของเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial dysfunction)

สาเหตุที่ทำให้เซลล์บุผนังหลอดเลือดสูญเสียหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขยายตัวของหลอดเลือดไป คือ มีการสร้างสารที่ทำให้หลอดเลือดหดตัวมากเกินไป และ/หรือ สร้างสารที่ทำให้หลอดเลือดขยายตัวน้อยเกินไป ซึ่งเกิดได้จากหลายปัจจัยแต่ที่สำคัญคือเมื่อเกิด oxidative stress ขึ้น เนื่องจาก ROS ออกซิไดส์ LDL-C ได้เป็น oxLDL แล้ว oxLDL จะทำให้ระดับของ NO ลดลง [17] โดยการลดการแสดงออกของ endothelial NOS (eNOS) mRNA [18] ผลที่ได้รับคือ การขยายตัวของหลอดเลือดลดลง มีเกล็ดเลือดมาเกาะเพิ่มขึ้น และเกิด atherosclerosis เพิ่มมากขึ้น

oxLDL จะทำงานโดยการจับกับ specific receptor ที่ชื่อ LOX-1 ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์บุผนังหลอดเลือด มีรายงานการศึกษาว่า oxLDL สามารถเพิ่มการแสดงออกของ LOX-1 mRNA ได้ [18,19] ROS ในผนังหลอดเลือดจะถูกสร้างจาก NAD(P)H oxidase, eNOS, xanthine oxidase เป็นต้น [20] แล้วเมื่อ LOX-1 ไปกระตุ้นการทำงานของ NADPH oxidase ก็จะยิ่งทำให้มีการสร้าง ROS ในเซลล์เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis [19] นอกจากนี้ ROS ยังส่งผลต่อระบบ DDAH/ADMA/NOS โดย ROS ทำให้การทำงานของเอนไซม์ dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) ลดลง ซึ่งเอนไซม์นี้มีบทบาทในการสลายสาร ADMA ได้เป็น L-citrulline และ dimethylamine (DMA) ดังนั้นเมื่อเอนไซม์ DDAH ทำงานได้ลดลง สาร ADMA จึงมีระดับสูงขึ้นภายในเซลล์บุผนังหลอดเลือด โดย ADMA มีบทบาทเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NOS ทำให้ระดับของ NO ลดลง และจากการศึกษาแบบ in vitro เมื่อให้เซลล์ HUVEC ขาด NO จากการเหนี่ยวนำของ ADMA พบว่า ระดับของ LOX-1 สูงขึ้นทั้ง mRNA และโปรตีน จึงส่งผลให้ oxLDL สะสมมากขึ้นในเซลล์บุผนังหลอดเลือด [21]



รูปที่ 6 กลไกการทำงานของ oxLDL ผ่านตัวรับเฉพาะที่ชื่อว่า LOX-1 ซึ่งอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์บุผนังหลอดเลือด กระตุ้นการทำงานของ NADPH oxidase ทำให้ระดับของ ROS ในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลต่อ DDAH/ADMA/NOS pathway

การปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตสำหรับผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ

การรักษาผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรค ได้แก่ การรักษาด้วยยาตามความผิดปกติที่ตรวจพบ โดยเฉพาะในกลุ่ม chronic stable angina เช่น การให้ยาลดคอเลสเตอรอลในผู้ป่วยที่มีคอเลสเตอรอลสูงจากกรรมพันธุ์ เป็นต้น โดยยากลุ่มหลักที่ใช้ได้แก่ lipid-lowering agent beta-blocker ACE inhibitor Ca channel blocker nitrate และแอสไพริน เป็นต้น สำหรับกลุ่ม acute coronary syndrome ยังมีการใช้ยา antithrombotic agent เช่น GP IIb / IIIa inhibitor และ thrombolysis, การใช้สายสวนขยายหลอดเลือดหัวใจ ซึ่งอาจเป็นballoon angioplasty หรือใส่ stent ส่วนมากทำได้เฉพาะในรายที่เส้นเลือดมีการตีบเฉพาะจุดอย่างชัดเจน และตีบมากกว่า 50% ขึ้นไป หรือการรักษาโดยการผ่าตัดต่อเส้นเลือดหัวใจใช้ในกรณีที่มีการตีบของเส้นเลือดหัวใจมาก ทำให้อาการเจ็บแน่นหน้าอกดีขึ้นและเพิ่มอัตราการรอดชีวิตมากขึ้น [22]

ต่อมาพบว่าการรักษาผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบให้มีประสิทธิภาพต้องทำการรักษาด้วยยาและสร้างเสริมสุขภาพด้วยการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต เพื่อเพิ่มคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยควบคู่กัน การปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต เป็นวิธีหนึ่งในป้องกันรักษาและฟื้นฟูโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ ประกอบด้วยการให้ความรู้เกี่ยวกับการเลือกรับประทานอาหารไขมันต่ำ เน้นการบริโภคผักและผลไม้, ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการออกกำลังกาย, การจัดการกับความเครียดการสร้างจินตภาพ (relaxation and imagery technique) และการจัดกลุ่มให้คำปรึกษา แนะนำ และแก้ปัญหาเกี่ยวกับการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตต่างๆ เป็นการเสริมสร้างความมั่นใจในการปฏิบัติ จากรายงานของ Ornish และคณะ [7] พบว่าการฝึกจัดการกับความเครียดโดยใช้โยคะและการสร้างจินตภาพ รวมถึงการมีกิจกรรมกลุ่มร่วมกัน ร่วมด้วยการควบคุมอาหารและออกกำลังกายปานกลาง เป็นระยะเวลา 1 ปี สามารถทำให้การตีบแคบของหลอดเลือดหัวใจลด 1.75% และ LDL-C ในเลือดลดลง 40% เมื่อศึกษาต่อไปจนครบ 5 ปี พบว่าการตีบแคบลดลงถึง 3.1% และ LDL-C ยังลดไปจากค่าเดิมที่ 1 ปี อีก 20% นอกจากนี้ยังพบว่าช่วยลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจได้ โดยทำให้ระดับ serum lipoprotein profile, ความดันโลหิตและระดับน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และจากการศึกษาของ Manchanda และคณะ [23] ถึงผลของวิถีชีวิตแบบโยคะ (ฝึกโยคะ, ควบคุมอาหาร และการออกกำลังกาย) ในการเปลี่ยนแปลงโรคหลอดเลือดหัวใจ ผู้ป่วยเพศชาย ที่เข้าร่วมการทดลอง 42 ราย โดยการสุ่มเข้าร่วมกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม กลุ่มละ 21 ราย โดยกลุ่มทดลองเป็นกลุ่มที่เข้าโปรแกรมวิถีชีวิตแบบโยคะ จากการติดตามเป็นเวลา 1 ปี พบว่า กลุ่มโยคะสามารถลดจำนวนครั้งของการเจ็บหน้าอก,ความสามารถในการออกกำลังกาย

เพิ่มขึ้น, น้ำหนักตัวและปริมาณไขมันในเลือด (LDL-C, ไตรกลีเซอร์ไรด์) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และจากการฉีดสีหลอดเลือดหัวใจ พบว่าการตีบตีนของหลอดเลือดกลุ่มโยคะเปรียบเทียบกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสนับสนุนแนวคิดการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตที่สามารถป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจได้

สอดคล้องกับคณะวิจัยของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ [11,24] ได้ศึกษาประสิทธิผลของการเปลี่ยนแปลงการดำเนินชีวิตต่อปัจจัยเสี่ยงของโรคหลอดเลือดหัวใจในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบคงที่โดยไม่ใช้ยาลดไขมัน เป็นระยะเวลา 4 เดือน ผลการวิจัยพบว่าโปรแกรมการส่งเสริมการดูแลตนเอง โดยการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการดำรงชีวิต ได้แก่ การบริโภคอาหารที่มีไขมันน้อยกว่าร้อยละ 10 ของพลังงานทั้งหมด การบริโภคผักและผลไม้ให้หลากหลายเพิ่มขึ้นและเลือกผลไม้ที่มีปริมาณน้ำตาลต่ำแต่มีใยอาหารสูง การออกกำลังกายแบบโยคะและการผ่อนคลายกล้ามเนื้อและการสร้างจินตภาพ รวมทั้งการจดบันทึก เพื่อลดความเครียด สามารถทำให้น้ำหนักตัวของกลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบลดลงและมีระดับ antioxidants ในเลือด (กลูตาไธโอนและวิตามินซี) เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นผลให้ oxidative stress ลดลง แต่ระดับไขมันในเลือด คือ คอเลสเตอรอล ในกลุ่มทดลองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เนื่องจากการงดยาลดไขมันโดยสิ้นเชิง อาจสร้างคอเลสเตอรอลภายในร่างกายมากเอง ส่วนคะแนนคุณภาพชีวิตมีการเปลี่ยนแปลงดีขึ้น แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า การให้ความรู้โดยผ่านสื่อการสอนและวิธีปฏิบัติ รวมทั้งการให้การสนับสนุนอย่างต่อเนื่อง มีผลช่วยลดน้ำหนักตัวในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจที่น้ำหนักเกิน และอ้วน นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงการดำเนินชีวิตต่อ atherogenic lipids และ endothelial cell adhesion molecules ในคนอายุ 18-35 ปี ที่ครอบครัวมีประวัติของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ พบว่าในคนที่ได้เปลี่ยนแปลงการดำเนินชีวิต 8 เดือนมีระดับของ LDL-C ($p=0.007$), oxLDL ($p=0.03$) และ E-selectin ($p=0.02$) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม [25]

จากผลการศึกษาข้างต้นผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าระดับของไขมันในเลือด (lipid profiles) และ oxidative damage products ของผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่เข้าร่วมโปรแกรมการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตจะมีระดับที่ดีขึ้นเทียบเท่ากับคนปกติ การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับของไขมันในเลือด และระดับของ oxidative stress ในซีรั่ม และศึกษาผลของซีรั่มนั้นต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มคนปกติ

กลุ่มผู้ป่วยทั้งที่เข้าและไม่เข้าโปรแกรม และเปรียบเทียบผลของการเข้าโปรแกรมต่อการทำงานของเซลล์ดังกล่าว โดยการตรวจวัดเซลล์มีชีวิตด้วยวิธี MTT colorimetric assay และวัดระดับของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ (intracellular ROS production) ผลการศึกษานี้จะทำให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่างการปรับเปลี่ยนการดำเนินชีวิตและเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง ซึ่งหากผลการศึกษานี้พบว่าการปรับเปลี่ยนการดำเนินชีวิตส่งผลดีต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดงจริง ก็จะเป็นหลักฐานการยืนยันในระดับเซลล์สำหรับการนำโปรแกรมนี้ไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและปรับเปลี่ยนรูปแบบการรักษาผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจได้ในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

ประชากรเป้าหมาย (target population)

ผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ และประชากรสุขภาพดีทั่วไป

ประชากรตัวอย่าง (sample population)

ผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่มารับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่มีสุขภาพดี ซึ่งยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจตลอดระยะเวลาของการศึกษาวิจัย

ตารางที่ 1 เกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (inclusion criteria)

กลุ่มผู้ป่วยหลอดเลือดหัวใจตีบ	กลุ่มคนปกติ
1. ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ 2. เพศชาย หรือหญิง อายุมากกว่า 20 ปี 3. ผู้ป่วยมีอาการเจ็บหน้าอก แบบคงที่ (stable angina pectoris) ซึ่งแบ่งตาม Canadian Cardiovascular Society (CSS) อยู่ในระดับ 1-3	1. มีอายุมากกว่า 30 ปี 2. ตรวจสุขภาพประจำปี 3. สุขภาพแข็งแรง 4. ระดับของไขมันในเลือดอยู่ในเกณฑ์ปกติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 เกณฑ์การคัดออกจากการศึกษา (exclusion criteria)

กลุ่มผู้ป่วยหลอดเลือดหัวใจตีบ	กลุ่มคนปกติ
1. ผู้ป่วยมีอาการของ acute coronary syndrome ภายใน 6 สัปดาห์ 2. ผู้ป่วยมีหลอดเลือดหัวใจตีบที่ left main 3. ผู้ป่วยมีค่าความดันซิสโทลิกมากกว่า 180 มิลลิเมตรปรอท และมีค่าความดันไดแอสโทลิกมากกว่า 110 มิลลิเมตรปรอท 4. ผู้ป่วยมีค่า left ventricular ejection fraction น้อยกว่า 25%	1. ปัจจุบันต้องไม่ป่วยเป็นโรค ดังต่อไปนี้ คือ โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคตับ โรคไต หรือโรคมะเร็ง

ขนาดประชากรตัวอย่าง (sample size)

จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องพบว่า การศึกษาผลของการปรับเปลี่ยนการดำเนินชีวิตต่อระดับของ ROS production ภายในเซลล์ HCAEC ในหลอดทดลอง ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน จึงกำหนดเบื้องต้น กลุ่มละ 5 คน สำหรับการศึกษาครั้งนี้ ดังนั้นจึงมีจำนวนตัวอย่างทั้งหมด โดยแบ่งตามกลุ่มได้ดังนี้

1. ซีรั่มจากผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่เข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต ร่วมกับการรักษาแบบปกติ (lifestyle modification (LM) group) จำนวน 15 ตัวอย่าง
2. ซีรั่มจากผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่ได้รับการรักษาแบบปกติเพียงอย่างเดียว ไม่ได้เข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนพฤติกรรม (usual care (UC) group) จำนวน 15 ตัวอย่าง
3. ซีรั่มจากกลุ่มควบคุม เป็นคนสุขภาพดี (healthy control) จำนวน 7 ตัวอย่าง

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3 เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ (Equipments)	**ผลิตภัณฑ์ของ** (Product of)
1) กล้องจุลทรรศน์	Olympus
2) ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 และ 75 cm^2 (Tissue culture flasks 25 and 75 cm^2)	CORNING, New York, USA HICLAVE
3) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)	HVE-25, Dublin, Ireland
4) เครื่องชั่ง	SARTORIUS, Gottingen, Germany
5) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	METTLER TOLEDO, Ohio, USA
6) Autopipette ขนาด 10, 20, 100, 200, 1000 ไมโครลิตร และ tips	BIO-RAD, California, USA
7) ตู้บ่ม 37°C 5% CO_2 (CO_2 incubator)	ESCO, Singapore
8) ตู้ปลอดเชื้อ (Class II biohazard safety cabinet)	Thermo Fisher Scientific, Ohio, USA
9) ตู้อบ (Hot air oven)	MEMMERT, Schwabach, Germany
10) หลอดเก็บแช่แข็งเซลล์ (Cryotube)	CORNING, New York, USA
11) Centrifuge tubes	CORNING, New York, USA
12) ถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (Tissue culture plate 96 well)	CORNING, New York, USA
13) Forcep	-
14) Glassware	-
15) Low speed centrifuge	KOKUSAN, Japan
16) Microtube	-
17) Microplate reader	-
18) Fluorescence plate reader	Beckman Coulter, Inc, California, USA
19) Protective and sanitary items	-
20) Plate shaker	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

21) Refrigerators and deep freezers	-
22) Transsonic TP 690	Elma, Germany

เครื่องมือ (Equipments) (ต่อ)	**ผลิตภัณฑ์ของ (Product of) (ต่อ)**
23) Vortex mixer	VORTEX-2 GENIE, Massachusetts, USA
24) Water baths	GFL, Burgwedel, Germany

สารเคมี	**ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)**
1) 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany
2) 6-carboxy-2´,7´-dichloro-dihydrofluorescein diacetate	Molecular probes
3) 95%Ethanol	MERCK, Darmstadt, Germany
4) Absolute ethanol	MERCK, Darmstadt, Germany
5) Dinitrophenylhydrazine (DNPH)	Riedel-de Haën, Hannover, Germany
6) DMSO (Dimethyl sulfoxide)	CARLO ERBA, Italy
7) Ethyl acetate	BDH, England
8) Guanidine hydrochloride (GdmCl)	USB corporation, Ohio, USA
9) Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAECs)	Lonza Walkersville, Inc., USA
10) Hydrochloric acid (HCl)	BDH, England
11) Microvascular endothelial growth medium	Lonza Walkersville, Inc., USA
12) Penicillin-Streptomycin solution	Hyclone Laboratories,Inc., Utah, USA
13) Potassium chloride	BAKER, New Jersy, USA
14) Potassium phosphate, monobasic	BAKER, New Jersy, USA
15) Sodium chloride	USB corporation, Ohio, USA
16) Sodium phosphate, dibasic	BAKER, New Jersy, USA
17) Trichloroacetic acid (TCA)	BDH, England
18) Trypsin/ EDTA	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany
19) Trypan blue	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

การศึกษาครั้งนี้จะทำการวัดระดับไขมันในเลือด และวัดระดับของ oxLDL และ protein carbonyl ในซีรั่มของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม และนำซีรั่มดังกล่าวมาทำการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อวัดผลของซีรั่มที่มีต่อการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) และวัดระดับของ ROS production ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์

การเก็บตัวอย่างเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบและกลุ่มควบคุม ทำโดยการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณท้องแขนด้วยชุดอุปกรณ์เจาะเลือด ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างซีรั่มโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บซีรั่มที่ได้ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส ก่อนการวิเคราะห์

1. **การตรวจวัดระดับของ oxLDL ในซีรั่ม**

ปริมาณ oxLDL ในซีรั่มตรวจวัดโดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป ใช้หลักการ ELISA (Mercodia, Uppsala, Sweden) ซึ่ง oxLDL ตรวจสอบด้วย peroxidase-conjugated anti-apolipoprotein B antibody มีวิธีการโดยย่อ คือ เจือจางซีรั่มด้วย sample buffer 1:6561 เท่า นำซีรั่มที่เจือจางแล้วปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ลงใน ELISA plate ที่เคลือบด้วย specific murine monoclonal antibody (mAb-4E6) แล้วเติม primary antibody ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไป incubate บนเครื่องเขย่า (plate shaker) ที่อุณหภูมิห้อง (18-25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย wash buffer 6 ครั้ง ดูด wash buffer ทิ้งจนหมด เติม enzyme conjugate solution (peroxidase conjugated anti-human apolipoprotein B antibody) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไป incubate บนเครื่องเขย่า (plate shaker) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย wash buffer อีก 6 ครั้ง ดูด wash buffer ทิ้งจนหมด เติม 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ไม่ต้องเขย่า จะเกิดสีฟ้าอ่อน หยุดปฏิกิริยาด้วยกรด (stop solution) จะทำให้เกิดสีเหลือง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง plate reader ปริมาณ oxLDL ในซีรั่มคำนวณจากกราฟของสารละลาย oxLDL มาตรฐาน

2. **การตรวจวัดระดับของ protein carbonyl ในซีรั่ม**

ปริมาณ protein carbonyl ในซีรั่ม สามารถตรวจได้โดยวิธี spectrophotometric DNPH assay ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Levine RL. และคณะ [13] มีวิธีการทำ คือ เจือ

จางซีรั่มด้วย phosphate buffer saline (PBS) 20 เท่า โดยดูดซีรั่ม 30 ไมโครลิตร ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี PBS อยู่ 570 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสด้านบน 250 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ แล้วเติม DNPH ลงไป 1 มิลลิลิตร ส่วนหลอด blank ของแต่ละตัวอย่างซีรั่ม เติม 2N HCl ลงไปแทน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (OD_1) โดยวัดเฉพาะหลอด blank เท่านั้น และใช้ 2N HCl ปรับค่าการอ่านเริ่มต้นเป็นศูนย์ เพื่อวัดความเข้มข้นของโปรตีนก่อนการทดลอง (C_1) แล้วนำทุกหลอดไป incubated ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 45 นาที โดยเขย่าเป็นระยะๆ เติม 20% TCA ที่แช่เย็นไว้ ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ลงไปทุกหลอด วางหลอดไว้บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วย ethanol : ethyl acetate 3 ครั้ง ครั้งละ 2.5 มิลลิลิตร แล้วเติม GdmCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไป sonicated เป็นเวลา 10 นาที เพื่อละลายตะกอน ถ้าตะกอนละลายไม่หมด ให้นำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อตกตะกอน แล้วนำส่วนใสด้านบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (OD_2) เฉพาะหลอด blank เท่านั้น ใช้ GdmCl ปรับค่าการอ่านเริ่มต้นเป็นศูนย์ เพื่อวัดความเข้มข้นของโปรตีนหลังการทดลอง (C_2) แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 375 นาโนเมตร (OD_{test}) โดยใช้ blank ของแต่ละตัวอย่างปรับค่าการอ่านเริ่มต้นเป็นศูนย์ ปริมาณ protein carbonyl ในซีรั่มรายงานในหน่วยนาโนโมลต่อมิลิกรัมของโปรตีน (nmol/mg protein)

การคำนวณปริมาณ Protein carbonyl ในซีรั่ม

$$\text{Protein carbonyl (nmol/ml)} = OD_{test} \times 45.45$$

$$\text{Protein concentration (mg/ml)} = (C_1/ OD_1) / (C_2/ OD_2)$$

$$\text{Protein carbonyl (nmol/mg protein)} = [\text{Protein carbonyl (nmol/ml)}] \times [\text{Protein concentration (mg/ml)}]$$

3. **การเลี้ยงเซลล์ Human coronary artery endothelial cell (HCAEC)**

นำเซลล์ HCAECs (Clonetics Corp., USA) ซึ่งแช่แข็งอยู่ในไนโตรเจนเหลวหรือในตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส ออกมาเลี้ยง โดยแช่หลอดเก็บเซลล์ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รอจนน้ำแข็งละลายหมด แล้วดูดเซลล์ใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่มีอาหาร microvascular endothelial growth medium 5

มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย endothelial cell basal medium 500 มิลลิลิตร, human recombinant epidermal growth factor 5 นาโนกรัม, hydrocortisone 5 มิลลิกรัม, gentamycin 25 มิลลิกรัม, amphotericin B 25 มิลลิกรัม, bovine brain extract 6 มิลลิกรัม, fetal bovine serum (FBS) 25 มิลลิลิตร และ penicillin/streptomycin 100U/มิลลิลิตร ซึ่ง incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 ไว้ก่อนแล้วอย่างน้อย 30 นาที โดยเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นที่ 5000 เซลล์/มิลลิลิตร ของอาหาร เลี้ยงเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 แล้ววันต่อมาเปลี่ยนอาหาร หลังจากนั้นเปลี่ยนวันเว้นวัน นาน 14 วัน เมื่อเซลล์เจริญหนาแน่นในขวด ทำการ subculture ด้วยวิธี trypsinization โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในขวดทิ้ง ล้างด้วย PBS 1 ครั้ง แล้วดูดทิ้ง เติม 0.25% trypsin + 0.1% EDTA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไป incubated ที่ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 นาที ดูด trypsin ทิ้ง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในขวดปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์และชะเซลล์ให้หลุดออกจากขวด ดูดเซลล์ใส่หลอด centrifuge นำไปปั่นแยกเซลล์ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารใหม่ลงในหลอด ใช้ปิเปตดูดเซลล์ขึ้นลงเบาๆ ดูดเซลล์ใส่ขวดใหม่ เพิ่มจำนวนขวด หรือนำไปใช้ทดสอบ หรือนำกลับไปเก็บแช่แข็งในตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส

การเก็บเซลล์แช่แข็งในตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส ทำโดยการนำเซลล์ที่ได้หลังจากการ trypsinization ไปปั่นแยกเซลล์ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติมอาหารสำหรับเก็บแช่แข็งเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 80%, FBS 10% และ DMSO 10% ดูดใส่ใน cryotube แล้วเก็บในกล่องสำหรับแช่แข็งเซลล์ที่ -80 องศาเซลเซียส 1 วัน จึงนำกล่องออกไป

การทดสอบผลของซีรั่มที่มีต่อเซลล์ทำโดยนำ HCAECs ไม่เกินรุ่นที่แปดมาเลี้ยงใน 96-well plates ที่มีอาหาร complete medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ว treated ด้วย complete medium ที่มีซีรั่มที่ต้องการทดสอบ ทั้งจากผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่เข้าร่วมโปรแกรมการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต ผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่ได้รับการรักษาแบบปกติเพียงอย่างเดียวไม่ได้เข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนพฤติกรรม และซีรั่มจากกลุ่มคนปกติ เป็นคนสุขภาพดี

4. **การทดสอบการทำลายเซลล์ (cytotoxicity) ของซีรั่ม โดยวิธี MTT colorimetric assay**

การทดสอบการทำลายเซลล์ (cytotoxicity) โดยวิธี MTT colorimetric assay เป็นวิธีการตรวจสอบการมีชีวิตและการเจริญของเซลล์ โดยดูผลการทำงานของ

เอนไซม์ succinate dehydrogenase ใน cytochrome b และ c จากไมโทคอนเดรีย ย่อยสลายสาร tetrazolium salt MTT ซึ่งเป็นสารที่ละลายในน้ำ ทำให้เกิดสาร formazan ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกสีม่วง สารนี้ละลายใน organic solvent ตรวจวัดสีด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 570 นาโนเมตร และใช้ความยาวคลื่นอ้างอิง (reference wavelength) ที่ 600 นาโนเมตร มีขั้นตอนโดยย่อ คือ นำเซลล์ HCAECs มาเลี้ยงใน 96-well plates (3.5×10^3 เซลล์ต่อ100 ไมโครลิตรต่อหลุม) ที่มี complete medium ที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะกับพื้นผิวของถาดเลี้ยงเซลล์ ดูดอาหารเดิมทิ้ง เติม 100 ไมโครลิตร complete medium ที่มี 20% serum ของกลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่ม แทน FBS ยกเว้นหลุมควบคุม แล้ว incubated ที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดูดอาหารเดิมทิ้ง เติม 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร MTT ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้ว incubated ที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดูดอาหารเดิมทิ้ง เติม DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ 570 นาโนเมตร และใช้ความยาวคลื่นอ้างอิง (reference wavelength) ที่ 600 นาโนเมตร

การคำนวณหา % cell survival

$$\% \text{ cell survival} = (OD_{test} \times 100) / OD_{control}$$

OD_{test} = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่ตัวอย่างซีรั่ม

$OD_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่ FBS ที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

5. **การตรวจวัดระดับของ ROS production ในเซลล์ โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DCFH-DA**

ปริมาณของ ROS production ในเซลล์ โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DCFH-DA โดย ROS ซึ่งจะทำให้เกิดสารฟลูออเรสเซนต์ คือ DCF DCFH-DA เป็นสาร non polar สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในเซลล์ได้ เมื่อผ่านเข้าเซลล์แล้ว DCFH-DA จะถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์ esterases ภายในเซลล์ ได้เป็น DCFH ซึ่งเป็นสาร polar และจะติดอยู่ภายในเซลล์ เมื่อ DCFH ถูกออกซิไดซ์โดย ROS ภายในเซลล์ กลายเป็นสาร DCF ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารฟลูออเรสเซนต์ การวัดแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นจากสาร DCF จึงใช้เป็นดรรชนีวัดปริมาณ ROS ภายในเซลล์ มีขั้นตอนโดยย่อ คือ นำเซลล์ HCAECs มาเลี้ยงใน 96-well plates ที่มี complete medium เป็นเวลา

24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะกับพื้นผิวของถาดเลี้ยงเซลล์ ดูด medium เดิมทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS เติม 100 ไมโครโมลาร์ DCFH-DA ลงไปทุกหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้ว incubated ที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2/ 95% air เป็นเวลา 30 นาที ดูด DCHF-DA ที่อยู่นอกเซลล์ทิ้ง แล้วล้างด้วย PBS 2 ครั้งเติม 100 ไมโครลิตร complete medium ที่มี 20% serum ของกลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่ม แทน FBS แล้ว incubated เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดระดับ fluorescence intensity ในแต่ละหลุม โดยใช้เครื่อง fluorescence plate reader ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยวัดที่ความยาวคลื่น excitation 485 nm และ emission 535 nm ระดับของ ROS production ในเซลล์ รายงานเป็นค่า DCF fluorescence เทียบจากกลุ่มคนปกติ โดยให้ค่าเฉลี่ยของค่า relative fluorescence unit (RFU) ที่ได้จากการวัดแสงฟลูออเรสเซนต์ของสาร DCF ในเซลล์ที่ incubated ด้วยซีรั่มของคนปกติเป็น 100 %

การเก็บรวบรวมข้อมูล

ผู้วิจัยจะทำการเก็บรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องจากอาสาสมัครทั้งหมด และบันทึกไว้ในเครื่องคอมพิวเตอร์ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์และสรุปผลวิจัย

การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) เป็นสถิติที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรวบรวมข้อมูลและการนำเสนอข้อมูล ซึ่งจะแสดงข้อมูลค่าเฉลี่ย (mean) หรือ median และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) โดยนำเสนอในรูปของกราฟหรือตาราง

สถิติเชิงอนุมาน (inferential statistics) เป็นสถิติที่ใช้สรุปผลของประชากร โดยศึกษาจากตัวอย่างที่สุ่มมาเป็นตัวแทน การเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลจะใช้สถิติทดสอบดังต่อไปนี้

- Two-samples t-test ใช้สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ของ 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน
- Paired t-test แสดงความแตกต่างระหว่างก่อน และหลังเข้าร่วมโปรแกรมฯ ภายในกลุ่มเดียวกัน
- One way ANOVA test ใช้เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่มีมากกว่า 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน
- Pearson's correlation test หรือ Spearman's rank correlation test ใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่อเนื่อง 2 ตัวแปร

หากการกระจายตัวของข้อมูลไม่ตรงตามข้อตกลงเบื้องต้น (assumptions) ของ parametric tests ที่กล่าวมาข้างต้น จะใช้ non-parametric tests ที่เหมาะสมแทน

- Mann-Whitney test ใช้สำหรับเปรียบเทียบความแตกต่างของ 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน
- Wilcoxon signed ranks test ใช้สำหรับเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างก่อนและหลังเข้าร่วมโปรแกรมฯ ภายในกลุ่มเดียวกัน

โปรแกรมทางสถิติที่ใช้ คือ SPSS เวอร์ชัน 15.0 กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

<u>กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา</u>

การศึกษานี้มีกลุ่มประชากรตัวอย่าง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่ไม่ได้เข้าโปรแกรมปรับเปลี่ยนการดำเนินชีวิตแต่ได้รับการรักษาตามปกติ (กลุ่ม UC) 15 คน กลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่เข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต (กลุ่ม LM) 15 คน และกลุ่มคนปกติ 7 คน

ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบทั้งสองกลุ่มได้แสดงและเปรียบเทียบไว้ในตารางที่ 4;

1. เพศ

ผู้ป่วยกลุ่ม UC มีเพศชาย 11 คน คิดเป็น 73.33 % ผู้ป่วยกลุ่ม LM มีเพศชาย 14 คน คิดเป็น 93.33 %

2. อายุ

ผู้ป่วยกลุ่ม UC มีอายุเฉลี่ย 60.73 ± 8.37 ปี ผู้ป่วยกลุ่ม LM มีอายุเฉลี่ย 66.00 ± 7.06 ปี อายุของทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ

3. ดัชนีมวลกาย (body mass index; BMI)

ค่า BMI ของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยผู้ป่วยกลุ่ม LM มี BMI 25.45 ± 1.53 กิโลกรัม/เมตร^2 ผู้ป่วยกลุ่ม UC มี BMI 25.28 ± 2.56 กิโลกรัม/เมตร^2

4. ความดันเลือด (blood pressure)

ค่าความดันเลือดของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติทั้งความดันซิสโทลิก (systolic blood pressure; SBP) และความดันไดแอสโทลิก (diastolic blood pressure; DBP) โดยผู้ป่วยกลุ่ม LM มีความดัน SBP 134.93 ± 14.81 มิลลิเมตรของปรอท ความดัน DBP 78.20 ± 8.62 มิลลิเมตรของปรอท ส่วนผู้ป่วยกลุ่ม UC มีความดัน SBP 137.07 ± 19.80 มิลลิเมตรของปรอท ความดัน DBP 79.67 ± 11.34 มิลลิเมตรของปรอท

5. ระดับไขมันในเลือด (lipid profiles)

ระดับไขมันในเลือดของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มพบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทั้งระดับ total cholesterol (TC) triglycerides (TG) high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) และ low density lipoprotein cholesterol (LDL-C)

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม (mean ± SD)

	Group		
	UC	LM	P-value*
จำนวนผู้ป่วย (คน)	15	15	
อายุ (ปี)	60.73 ± 8.37	66.00 ± 7.06	0.079
BMI (kg/m^2)	25.28 ± 2.56	25.45 ± 1.53	0.824
SBP (mmHg)	137.07 ± 19.80	134.93 ± 14.81	0.741
DBP (mmHg)	79.67 ± 11.34	78.20 ± 8.62	0.693
TC (mg/dl)	164.07 ± 22.77	176.13 ± 33.41	0.258
TG (mg/dl)	113.20 ± 41.23	133.73 ± 49.23	0.226
HDL-C (mg/dl)	55.40 ± 12.57	50.67 ± 7.97	0.228
LDL-C (mg/dl)	86.03 ± 18.89	98.72 ± 27.12	0.148

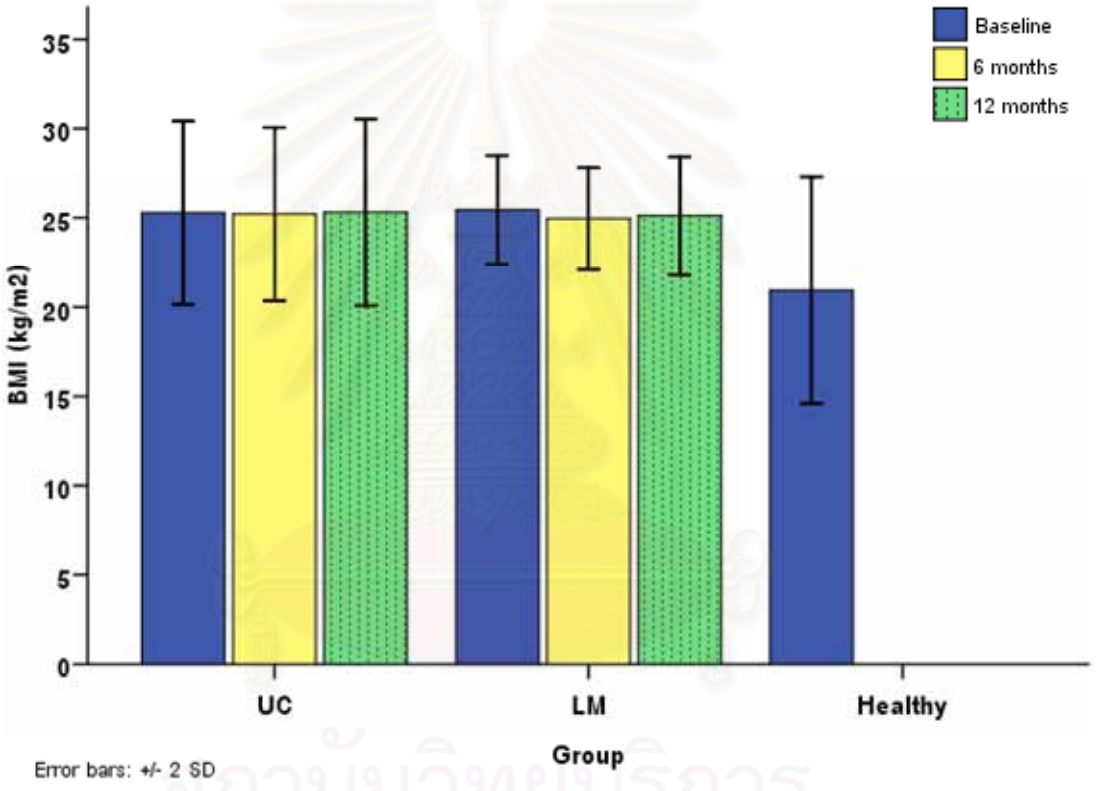
* ค่า P-value จากการวิเคราะห์สถิติโดยวิธี Student's *t*-test เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม

ตัวย่อ: BMI; body mass index, SBP; systolic blood pressure, DBP; diastolic blood pressure, TC; total cholesterol, TG; triglycerides, HDL-C; high density lipoprotein cholesterol, LDL-C; low density lipoprotein cholesterol

นอกจากกลุ่มผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มแล้วการศึกษาครั้งนี้ยังได้ศึกษากลุ่มคนปกติด้วย เพื่อใช้เป็นค่าเปรียบเทียบแทนคนปกติ ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มคนปกติ ได้แก่ กลุ่มคนปกติมีเพศชาย 1 คน คิดเป็น 14.26 % มีอายุเฉลี่ย 52.20 ± 7.97 ปี มีค่า BMI 19.93 ± 3.17 กิโลกรัม/เมตร^2

ผลของค่าดัชนีมวลกาย (BMI)

ค่า BMI ของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มที่ baseline 6 เดือน และ 12 เดือน แสดงในรูปที่ 7 จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมีค่า BMI เปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อยจาก baseline โดยไม่พบความแตกต่างทางสถิติ โดยผู้ป่วยกลุ่ม UC มีค่า BMI ที่ baseline เท่ากับ 25.28 ± 2.56 กิโลกรัม/เมตร^2 ที่ 6 เดือน ค่า BMI เท่ากับ 25.22 ± 2.43 กิโลกรัม/เมตร^2 และที่ 12 เดือน ค่า BMI เท่ากับ 25.30 ± 2.63 กิโลกรัม/เมตร^2 ส่วนผู้ป่วยกลุ่ม LM ที่ baseline มีค่า BMI เท่ากับ 25.45 ± 1.53 กิโลกรัม/เมตร^2 ที่ 6 เดือน ค่า BMI เท่ากับ 24.96 ± 1.43 กิโลกรัม/เมตร^2 และที่ 12 เดือน ค่า BMI เท่ากับ 25.11 ± 1.64 กิโลกรัม/เมตร^2



รูปที่ 7 แสดงค่าดัชนีมวลกายของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มที่ baseline 6 เดือน และ 12 เดือน

ผลการวิเคราะห์ระดับไขมันในเลือด (lipid profiles)

ผลที่ 6 เดือน

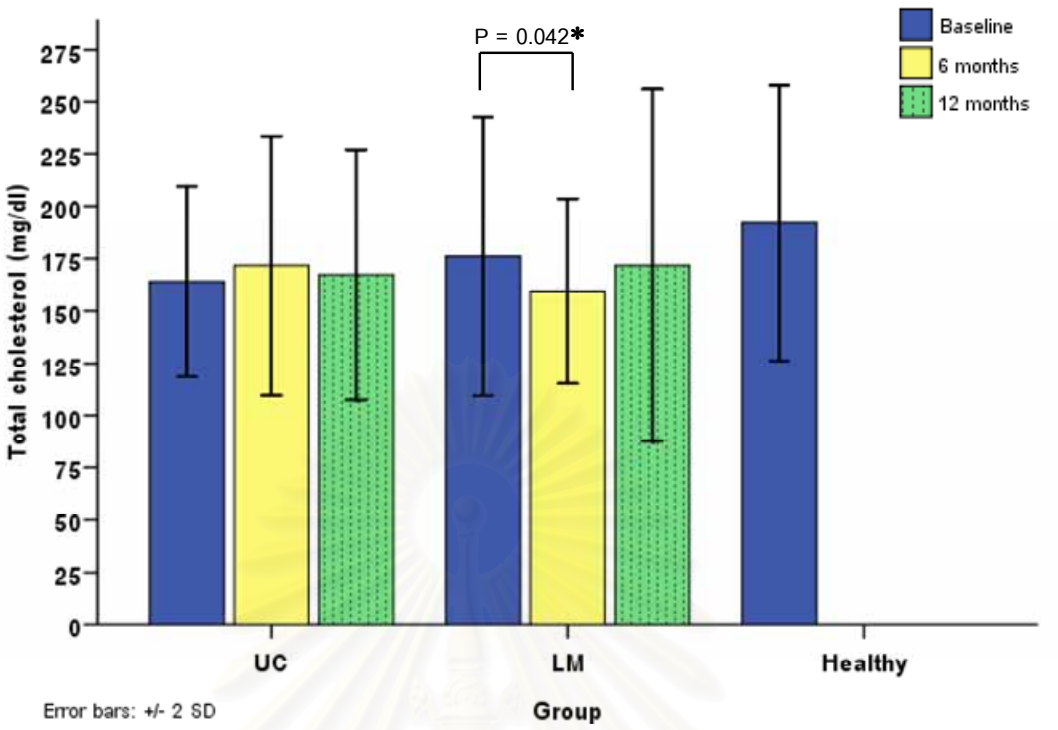
ผลการวิเคราะห์ระดับไขมันในเลือด (รูปที่ 8) พบว่าผู้ป่วยกลุ่ม UC มีระดับของไขมันที่ 6 เดือน เพิ่มขึ้นจาก baseline ทั้งระดับ TC และ LDL-C แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยค่า TC เพิ่มขึ้นจาก 164.07 ± 22.77 เป็น 171.73 ± 31.06 เพิ่มขึ้นจากเดิม 4.67 % และมีค่า LDL-C เพิ่มขึ้นจาก 86.03 ± 18.89 เป็น 91.09 ± 24.13 เพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 6 % ส่วน TG เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.033) จาก 113.20 ± 41.23 เป็น 145.53 ± 59.09 เพิ่มขึ้นจากเดิม 28.56 % และพบว่าระดับของ HDL-C ลดลงจาก 55.40 ± 12.57 เป็น 51.53 ± 13.63 คือลดลงไปประมาณ 7 % (ตารางที่ 5)

ส่วนผู้ป่วยกลุ่ม LM ผู้ป่วยมีระดับของ TC และ TG ที่ 6 เดือนลดลงจาก baseline อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย TC ลดลงจาก 176.13 ± 33.41 เป็น 159.47 ± 22.10 (p=0.042) คือลดลงไปประมาณ 9.5 % ค่า TG ลดลงจาก 133.73 ± 49.23 เป็น 108.13 ± 39.32 (p=0.010) ลดลงจากเดิม 19 % ส่วน LDL-C ลดลงจาก baseline เช่นกันแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยค่า LDL-C ลดลงจาก 98.72 ± 27.12 เป็น 86.84 ± 21.39 ลดลงจากเดิมประมาณ 12 % ส่วนระดับของ HDL-C เพิ่มขึ้นจาก 50.67 ± 7.97 เป็น 51.00 ± 7.86 คือเพิ่มขึ้น 0.65 % (ตารางที่ 6)

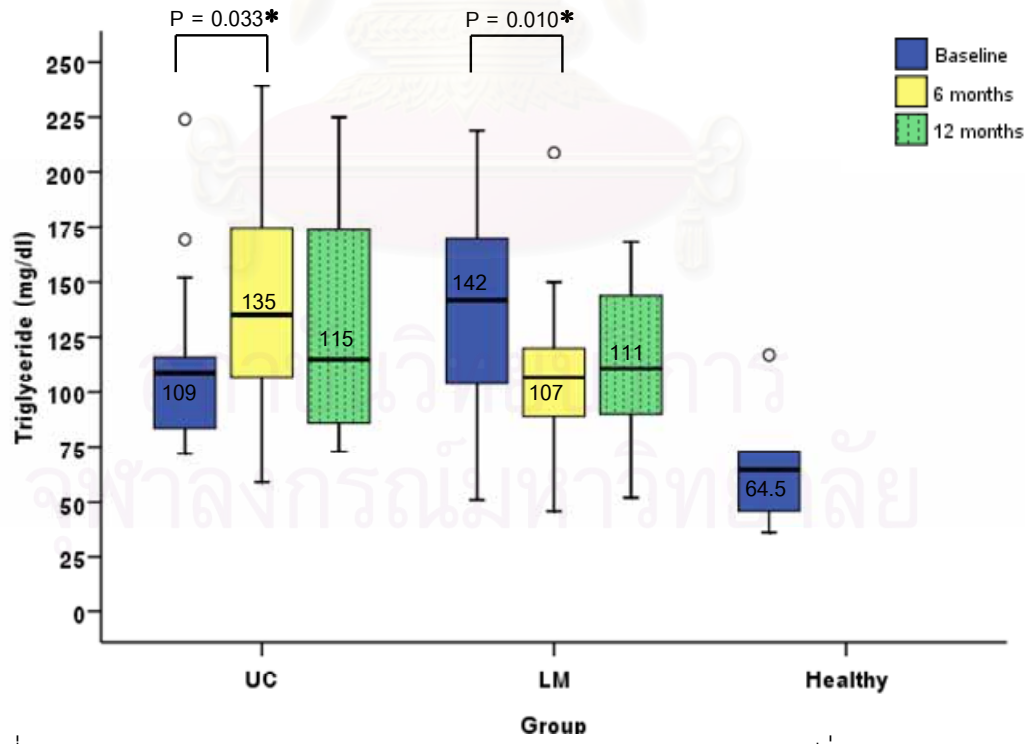
ผลที่ 12 เดือน

ผลการวิเคราะห์ระดับไขมันในเลือดที่ 12 เดือน คล้ายกับผลที่ 6 เดือน โดยพบว่าผู้ป่วยกลุ่ม UC มีระดับของ TC TG และ LDL-C เพิ่มขึ้นจาก baseline แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยค่า TC เพิ่มขึ้นเป็น 167.27 ± 29.87 เพิ่มขึ้นจากเดิม 1.95 % และมีค่า TG เพิ่มขึ้นเป็น 131.40 ± 48.60 เพิ่มขึ้นจากเดิม 16.08 % ส่วนค่า LDL-C เพิ่มขึ้นเป็น 91.12 ± 23.45 เพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 6 % แต่พบว่าระดับของ HDL-C ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.006) โดยลดลง เป็น 49.87 ± 9.16 คือลดลงไปประมาณ 10 % (ตารางที่ 7)

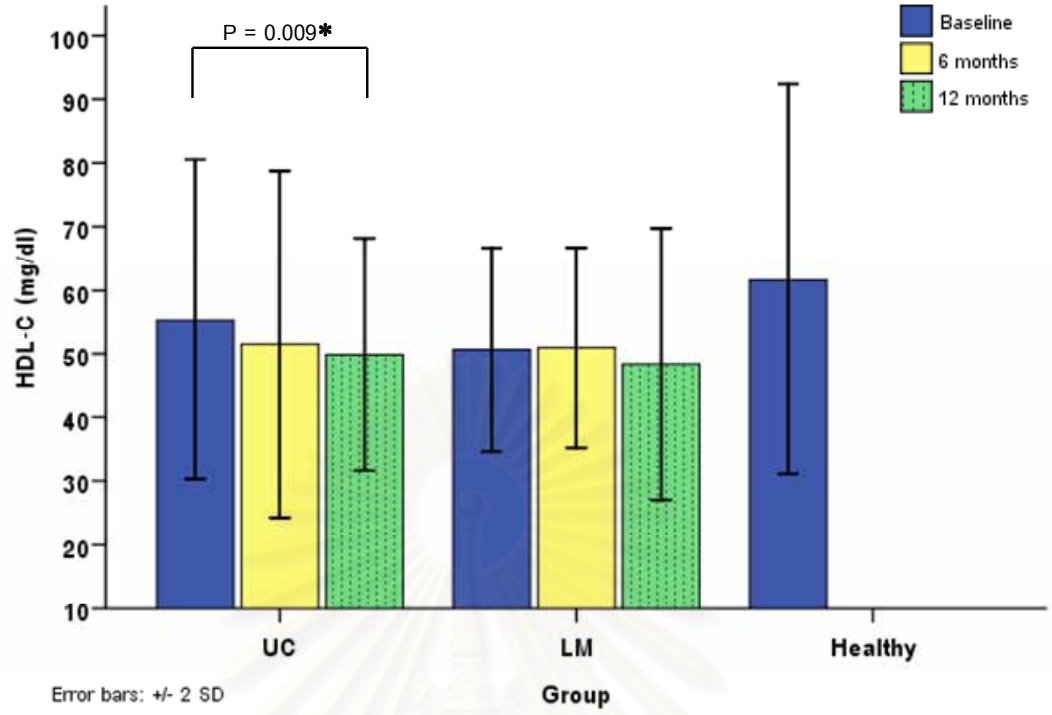
ส่วนผู้ป่วยกลุ่ม LM ผู้ป่วยมีระดับไขมันในเลือดที่ 12 เดือนลดลงจาก baseline ทั้ง TC, TG HDL-C และ LDL-C แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดย TC ลดลงเป็น 171.73 ± 42.11 ลดลงไป 2.5 % และค่า TG ลดลงเป็น 130.60 ± 71.61 ซึ่งลดลงจากเดิม 2.34 % ค่า LDL-C ลดลงเป็น 97.21 ± 35.20 ลดลงจากเดิมประมาณ 1.53 % ส่วนระดับของ HDL-C ลดลงเป็น 48.40 ± 10.68 คือลดลงไป 4.47 % (ตารางที่ 8)



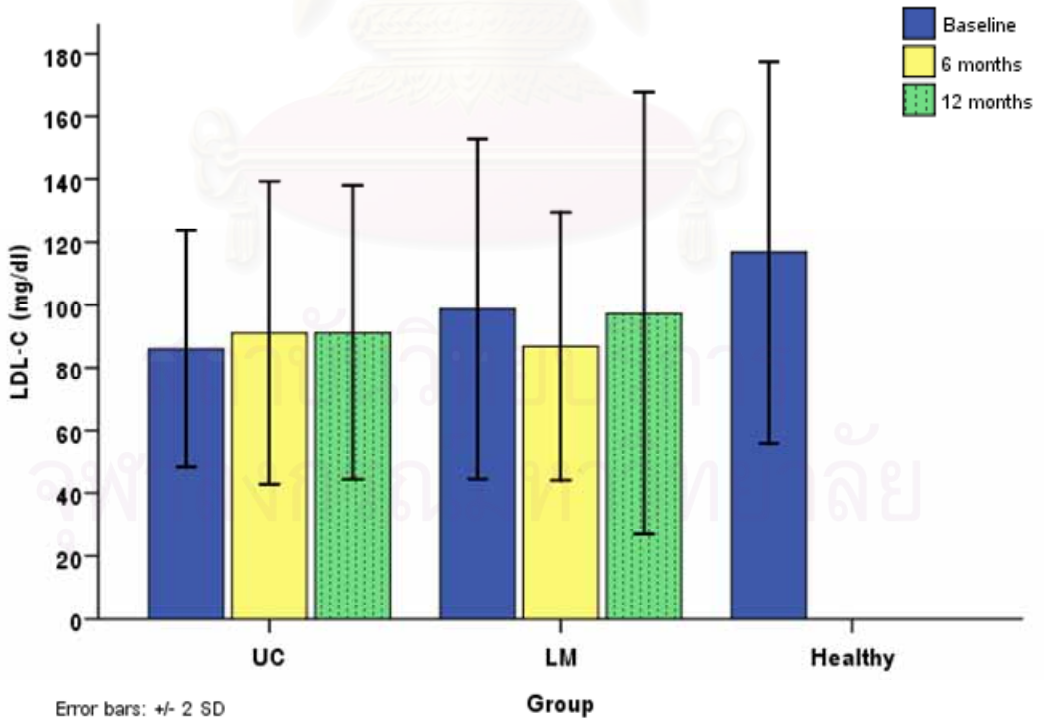
รูปที่ 8 แสดงระดับ total cholesterol ในเลือดของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มที่ baseline 6 เดือน และ 12 เดือน (*p < 0.05, paired t-test ก่อนและหลังเข้าโปรแกรม)



รูปที่ 9 Box-Whisker plot และค่า median ของระดับของ triglyceride ในซีรั่มของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มที่ baseline 6 เดือน และ 12 เดือน (*p < 0.05, Wilcoxson test ก่อนและหลังเข้าโปรแกรม)



รูปที่ 10 แสดงระดับ HDL-cholesterol ในเลือดของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มที่ baseline 6 เดือน และ 12 เดือน (*p < 0.05, paired t-test ก่อนและหลังเข้าโปรแกรม)



รูปที่ 11 แสดงระดับ LDL-cholesterol ในเลือดของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มที่ baseline 6 เดือน และ 12 เดือน (*p < 0.05, paired t-test ก่อนและหลังเข้าโปรแกรม)

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ระดับไขมันในเลือดของผู้ป่วยกลุ่ม UC เปรียบเทียบที่ baseline และที่ 6 เดือน (mean ± SD)

	UC group (n=15)			
	Baseline	6 months	% difference	*P* value
TC (mg/dl)	164.07 ± 22.77	171.73 ± 31.06	4.67	0.261
TG (mg/dl)	113.20 ± 41.23	145.53 ± 59.09	28.56	0.033*
HDL-C (mg/dl)	55.40 ± 12.57	51.53 ± 13.63	-6.98	0.124
LDL-C (mg/dl)	86.03 ± 18.89	91.09 ± 24.13	5.89	0.435

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ระดับไขมันในเลือดของผู้ป่วยกลุ่ม LM เปรียบเทียบที่ baseline และที่ 6 เดือน (mean ± SD)

	LM group (n=15)			
	Baseline	6 months	% difference	*P* value
TC (mg/dl)	176.13 ± 33.41	159.47 ± 22.10	-9.46	0.042*
TG (mg/dl)	133.73 ± 49.23	108.13 ± 39.32	-19.14	0.010*
HDL-C (mg/dl)	50.67 ± 7.97	51.00 ± 7.86	0.65	0.828
LDL-C (mg/dl)	98.72 ± 27.12	86.84 ± 21.39	-12.03	0.061

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ระดับไขมันในเลือดของผู้ป่วยกลุ่ม UC เปรียบเทียบที่ baseline และที่ 12 เดือน (mean ± SD)

	UC group (n=15)			
	Baseline	12 months	% difference	*P* value
TC (mg/dl)	164.07 ± 22.77	167.27 ± 29.87	1.95	0.865
TG (mg/dl)	113.20 ± 41.23	131.40 ± 48.60	16.08	0.065
HDL-C (mg/dl)	55.40 ± 12.57	49.87 ± 9.16	-9.99	0.006*
LDL-C (mg/dl)	86.03 ± 18.89	91.12 ± 23.45	5.92	0.650

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ระดับไขมันในเลือดของผู้ป่วยกลุ่ม LM เปรียบเทียบที่ baseline และที่ 12 เดือน (mean ± SD)

	LM group (n=15)			
	Baseline	12 months	% difference	*P* value
TC (mg/dl)	176.13 ± 33.41	171.73 ± 42.11	-2.50	0.319
TG (mg/dl)	133.73 ± 49.23	130.60 ± 71.61	-2.34	0.82
HDL-C (mg/dl)	50.67 ± 7.97	48.40 ± 10.68	-4.47	0.221
LDL-C (mg/dl)	98.72 ± 27.12	97.21 ± 35.20	-1.53	0.532

ผลการวิเคราะห์ระดับ oxLDL ในซีรั่ม

ระดับ oxLDL ของกลุ่มคนปกติเท่ากับ 32.66 ±1.27 และพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบระดับ oxLDL ของทั้งสามกลุ่ม ที่ baseline (ANOVA test; p=0.444) 6 เดือน (ANOVA test; p=0.171) และ 12 เดือน (ANOVA test; p=0.154) (รูปที่ 12)

ผลที่ 6 เดือน

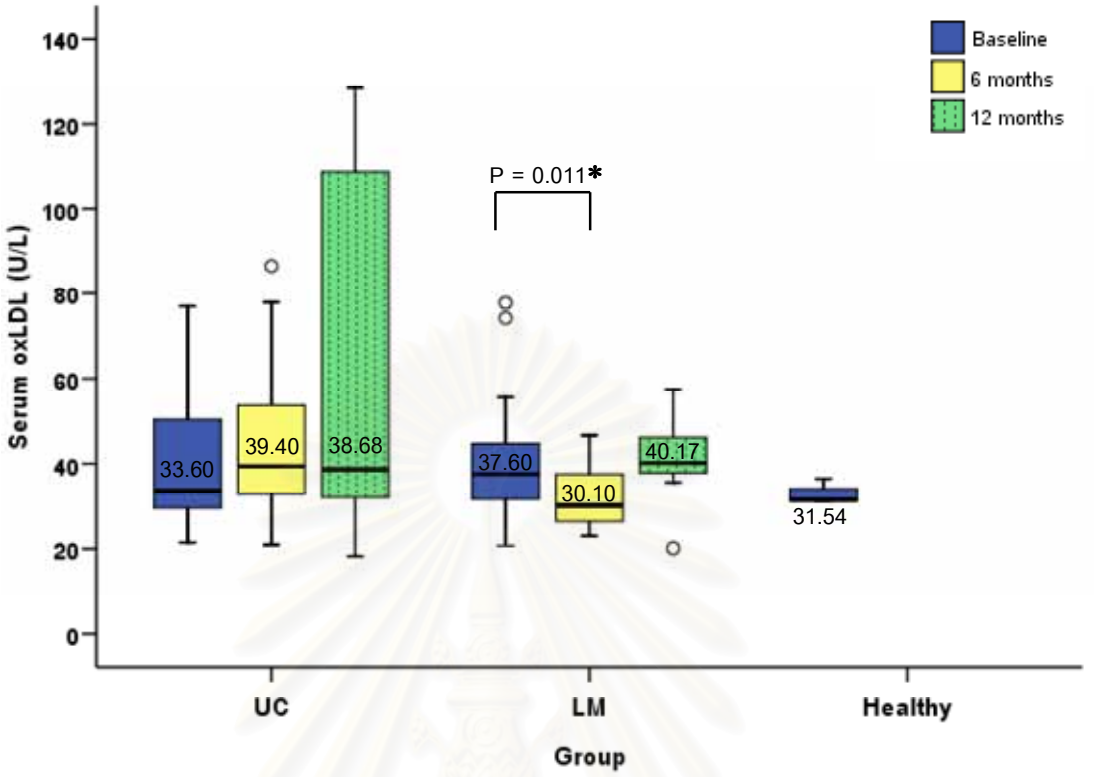
ผลการวิเคราะห์ปริมาณ oxLDL ในซีรั่มโดยใช้หลักการ ELISA พบว่าผู้ป่วยกลุ่ม UC มีระดับของ oxLDL เพิ่มขึ้นจาก baseline ประมาณ10 % โดยระดับของ oxLDL ที่ baseline มีค่าเท่ากับ 41.56 ± 17.95 และที่ 6 เดือนมีค่าเท่ากับ 45.66 ± 20.18 (ตารางที่ 9)

ส่วนผู้ป่วยกลุ่ม LM มีระดับของ oxLDL ลดน้อยลงจาก baseline อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.011) โดยที่ baseline มีค่าเท่ากับ 40.87 ± 16.90 และที่ 6 เดือนมีค่าเท่ากับ 32.47 ± 7.73 ลดลงจากเดิมประมาณ 20 % (ตารางที่ 10) ซึ่งลดลงมามีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มคนปกติ

ผลที่ 12 เดือน

ผู้ป่วยกลุ่ม UC มีระดับของ oxLDL ที่ 12 เดือน เพิ่มขึ้นจาก baseline ประมาณ 26% โดยค่าเฉลี่ยของ oxLDL มีค่าเท่ากับ 52.41 ± 28.24 (ตารางที่ 11)

ส่วนผู้ป่วยกลุ่ม LM group มีระดับของ oxLDL ใกล้เคียงกับ baseline โดยค่าเฉลี่ยของ oxLDL ของผู้ป่วยกลุ่มนี้ที่ 12 เดือน มีค่าเท่ากับ 40.67 ± 8.57 (ตารางที่ 12)



รูปที่ 12 Box-Whisker plot และค่า median ของระดับของ oxLDL ในซีรั่มของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มที่ baseline, 6 เดือน และ 12 เดือน (*p < 0.05, Wilcoxson test ก่อนและหลังเข้าโปรแกรม)

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์ระดับของ oxidative damage products ในซีรั่มของผู้ป่วยกลุ่ม UC เปรียบเทียบที่ baseline และที่ 6 เดือน (mean ± SD)

	UC group (n=15)			
	Baseline	6 months	% difference	*P* value
oxLDL (U/L)	41.56 ± 17.95	45.66 ± 20.18	10.03	0.334
Protein carbonyl (nmol/mg)	0.64 ± 0.51	0.72 ± 0.38	11.93	0.293

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ระดับของ oxidative damage products ในซีรั่มของผู้ป่วยกลุ่ม LM เปรียบเทียบที่ baseline และที่ 6 เดือน (mean ± SD)

	LM group (n=15)			
	Baseline	6 months	% difference	*P* value
oxLDL (U/L)	40.87 ± 16.90	32.47 ± 7.73	-20.53	0.011*
Protein carbonyl (nmol/mg)	0.64 ± 0.36	0.47 ± 0.28	-26.23	0.036*

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์ระดับของ oxidative damage products ในซีรั่มของผู้ป่วยกลุ่ม UC เปรียบเทียบที่ baseline และที่ 12 เดือน (mean ± SD)

	UC group (n=15)			
	Baseline	12 months	% difference	*P* value
oxLDL (U/L)	41.56 ± 17.95	52.41 ± 28.24	26.14	0.241
Protein carbonyl (nmol/mg)	0.64 ± 0.51	1.02 ± 0.58	58.82	0.031*

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ระดับของ oxidative damage products ในซีรั่มของผู้ป่วยกลุ่ม LM เปรียบเทียบที่ baseline และที่ 12 เดือน (mean ± SD)

	LM group (n=15)			
	Baseline	12 months	% difference	*P* value
oxLDL (U/L)	40.87 ± 16.90	40.67 ± 8.57	-0.48	0.46
Protein carbonyl (nmol/mg)	0.64 ± 0.36	0.47 ± 0.42	-25.18	0.181

ผลการวิเคราะห์ระดับ protein carbonyl ในซีรั่ม

ระดับ protein carbonyl ในซีรั่มของกลุ่มคนปกติเท่ากับ 32.66 ±1.27 และพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบระดับ protein carbonyl ของทั้งสามกลุ่ม ที่ baseline (ANOVA test; p=0.476) และ 6 เดือน (ANOVA test; p=0.054) แต่พบว่าที่ 12 เดือน ระดับ protein carbonyl ของผู้ป่วยกลุ่ม UC แตกต่างจากกลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ANOVA test; p=0.004, Bonferroni test; p=0.027) (รูปที่ 13)

ผลที่ 6 เดือน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ protein carbonyl ในซีรั่ม โดยวิธี spectrophotometric DNPH assay พบว่าผู้ป่วยกลุ่ม UC group ที่ 6 เดือน มีระดับของ protein carbonyl เพิ่มขึ้นจาก baseline ประมาณ 12 % โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.64 ± 0.51 nmol/mg protein และที่ 6 เดือนมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.72 ± 0.38 nmol/mg protein (ตารางที่ 9)

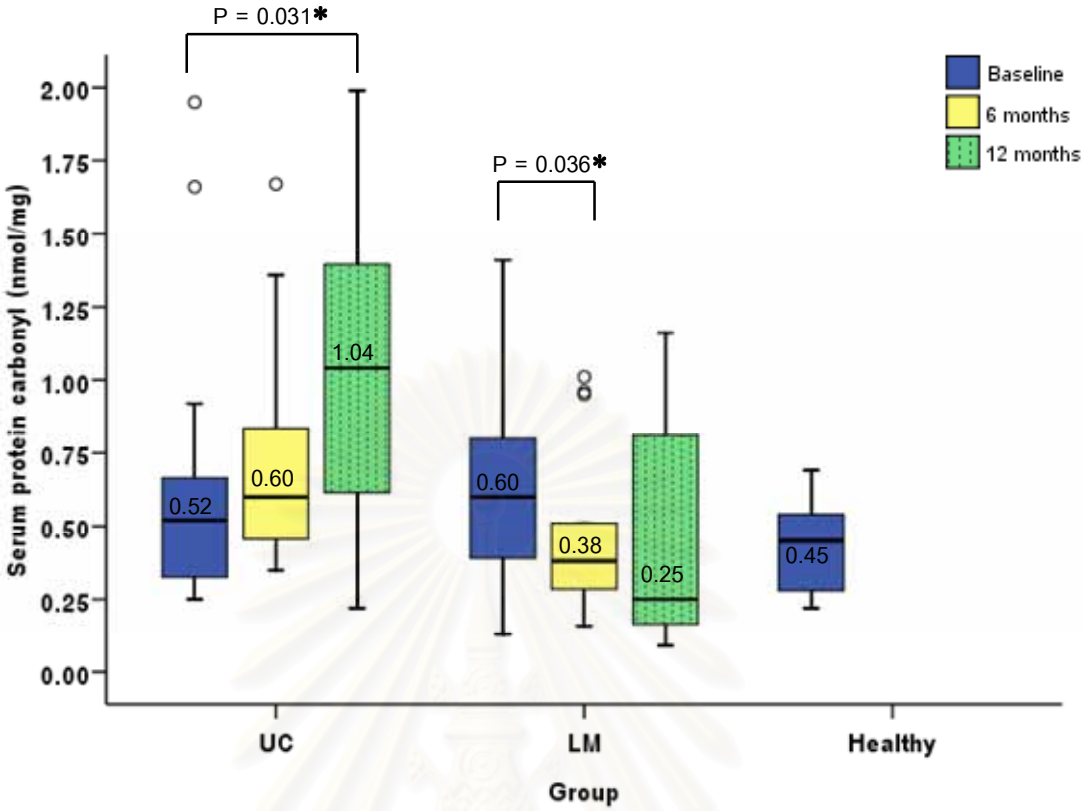
ผู้ป่วยกลุ่ม LM ที่ 6 เดือนมีระดับของ protein carbonyl ลดลงจาก baseline อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.036) โดยค่าเฉลี่ยของ protein carbonyl ของผู้ป่วยกลุ่มนี้ที่ baseline มีค่าเท่ากับ 0.64 ± 0.36 nmol/mg protein และที่ 6 เดือนมีค่าเท่ากับ 0.47 ± 0.28 nmol/mg protein (ตารางที่ 10)

ผลที่ 12 เดือน

ผู้ป่วยกลุ่ม UC มีระดับของ protein carbonyl ในซีรั่มเพิ่มขึ้นจาก baseline อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.031) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.02 ± 0.58 nmol/mg protein (ตารางที่ 11)

ผู้ป่วยกลุ่ม LM group มีระดับของ protein carbonyl ลดลงจาก baseline ประมาณ 25% โดยมีค่าเฉลี่ยของ protein carbonyl เท่ากับ 0.47 ± 0.42 nmol/mg protein (ตารางที่ 12)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 Box-Whisker plot และค่า median ของระดับของ protein carbonyl ในซีรั่มของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มที่ baseline 6 เดือน และ 12 เดือน (*$p < 0.05$, Wilcoxson test ก่อนและหลังเข้าโปรแกรม)

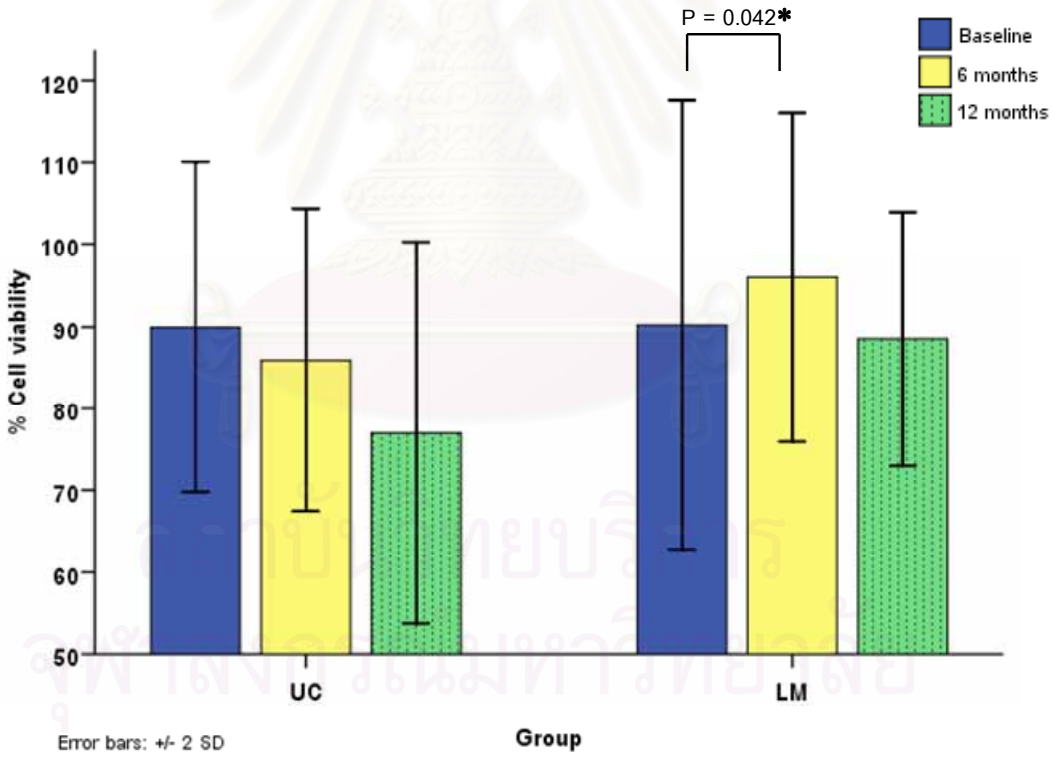
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability)

จากการทดสอบผลของซีรั่มที่มีต่อเซลล์ HCAECs ด้วยวิธี MTT colorimetric assay แล้วนำค่ามาคำนวณหา % cell viability โดยเทียบให้เซลล์ที่ incubated ด้วย ซีรั่มของคนปกติ มีค่าเท่ากับ 100% ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 14

เมื่อ incubated ด้วยซีรั่มที่ 6 เดือนของผู้ป่วยกลุ่ม UC พบว่า % cell viability ลดลงจาก baseline โดยลดจาก 89.96 ± 10.07 เป็น 85.86 ± 9.22 และลดลงไปอีกเมื่อ incubated ด้วยซีรั่มที่ 12 เดือน (77.03 ± 11.61) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ จากผลแสดงว่าซีรั่มเป็นพิษ (cytotoxicity) ต่อเซลล์ HCAECs เพิ่มมากขึ้น

ส่วนผู้ป่วยกลุ่ม LM เมื่อ incubated ด้วยซีรั่มที่ 6 เดือน % cell viability เพิ่มขึ้นจาก baseline อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.042) โดยเพิ่มจาก 90.24 ± 13.70 เป็น 95.98 ± 9.98 และลดลงไปเล็กน้อยเมื่อ incubated ด้วยซีรั่มที่ 12 เดือน (88.48 ± 7.69) จากผลแสดงว่าซีรั่มเป็นพิษ (cytotoxicity) ต่อเซลล์ HCAECs ลดลง



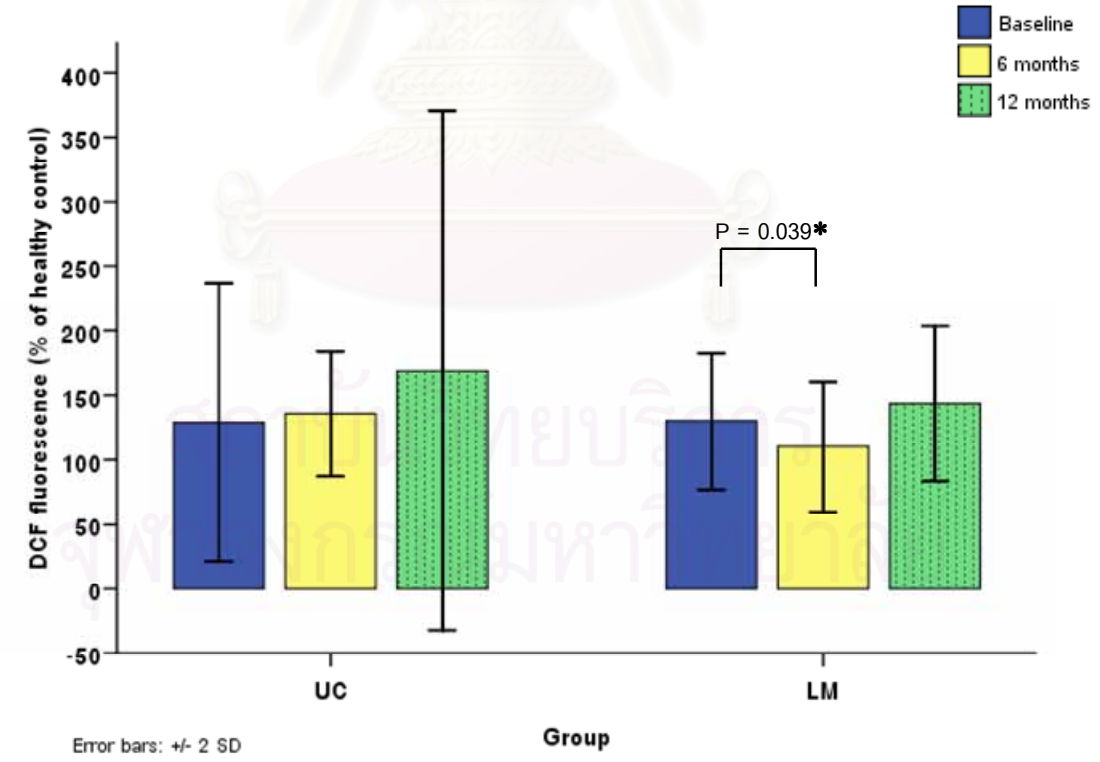
รูปที่ 14 % cell viability ของเซลล์ HCAEC หลังจาก incubated ด้วยซีรั่มของกลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่ม แล้วทดสอบโดยวิธี MTT colorimetric assay (*p < 0.05, paired t-test ก่อนและหลังเข้าโปรแกรม)

ผลการศึกษาระดับของ ROS production

ผลการวิเคราะห์ปริมาณของ ROS production ในเซลล์ HCAECs โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DCFH-DA โดย ROS ซึ่งจะทำให้เกิดสารฟลูออเรสเซนต์ คือ DCF ดังนั้นผลที่ได้จะชี้วัดระดับของ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยจะแสดงผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์เทียบจากกลุ่มคนปกติ แสดงดังรูปที่ 15

ผู้ป่วยกลุ่ม UC มี DCF fluorescence (% of healthy control) ที่ 6 เดือนเพิ่มขึ้นจาก baseline แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยเพิ่มจาก 129.01 ± 53.82 เป็น 135.76 ± 24.27 และที่ 12 เดือน เพิ่มขึ้นเป็น 169.19 ± 100.64 จากผลแสดงว่ามีการสร้าง ROS เพิ่มมากขึ้นภายในเซลล์ HCAECs

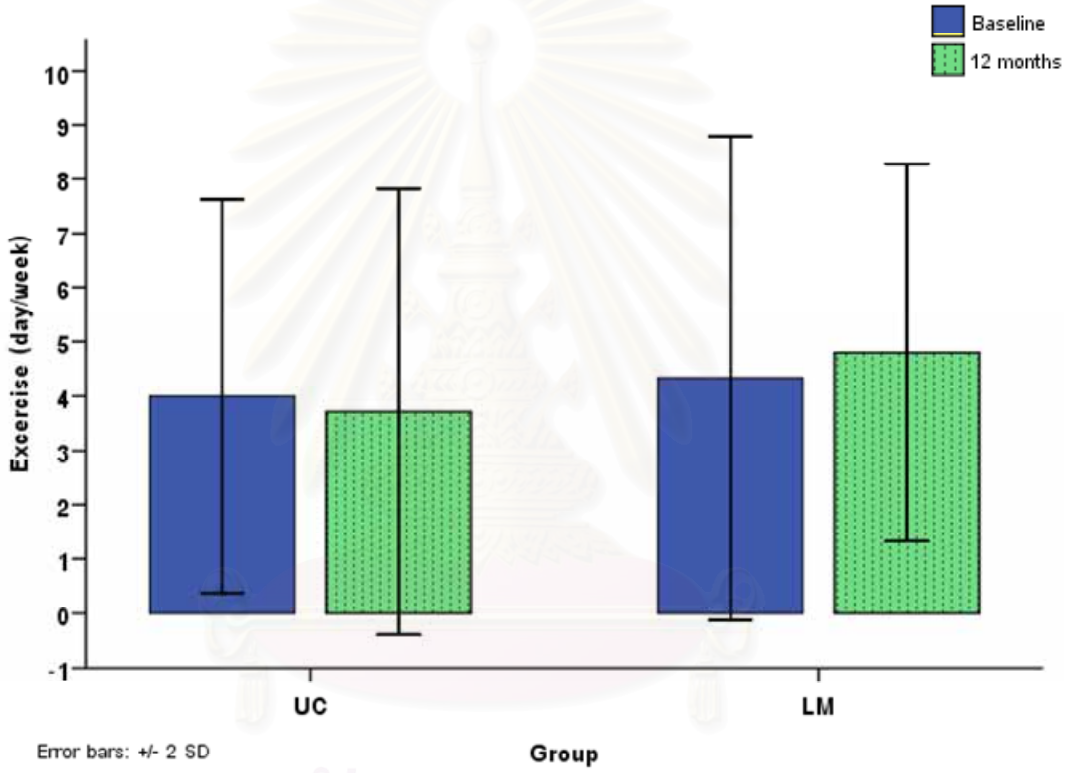
ส่วนผู้ป่วยกลุ่ม LM มี DCF fluorescence (% of healthy control) ที่ 6 เดือนลดลงจาก baseline อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.039) โดยลดจาก 130.06 ± 26.45 เป็น 110.07 ± 25.04 แต่ที่ 12 เดือน เพิ่มขึ้นเป็น 143.46 ± 29.90 จากผลแสดงว่ามีการสร้าง ROS ลดลงหลังจากเข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนการดำเนินชีวิต



รูปที่ 15 ระดับของ ROS production ในเซลล์ HCAEC แสดงโดยค่า DCF fluorescence (% of healthy control) (*p < 0.05, paired t-test ก่อนและหลังเข้าโปรแกรม)

ผลจากแบบสอบถามเกี่ยวกับการออกกำลังกาย

จากการศึกษาจากแบบสอบถามของผู้ป่วย พบว่า ผู้ป่วยกลุ่ม UC ออกกำลังกายลดลงจาก baseline แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยก่อนการศึกษาออกกำลังกายเฉลี่ยสัปดาห์ละ 3.93 ± 2.05 วัน และหลังการศึกษาออกกำลังกายเฉลี่ยสัปดาห์ละ 3.71 ± 1.86 วัน ส่วนผู้ป่วยกลุ่ม LM ออกกำลังกายเพิ่มขึ้นจาก baseline แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยก่อนการศึกษาออกกำลังกายเฉลี่ยสัปดาห์ละ 4.33 ± 2.23 วัน และหลังการศึกษาออกกำลังกายเฉลี่ยสัปดาห์ละ 4.80 ± 1.74 วัน (รูปที่ 16)

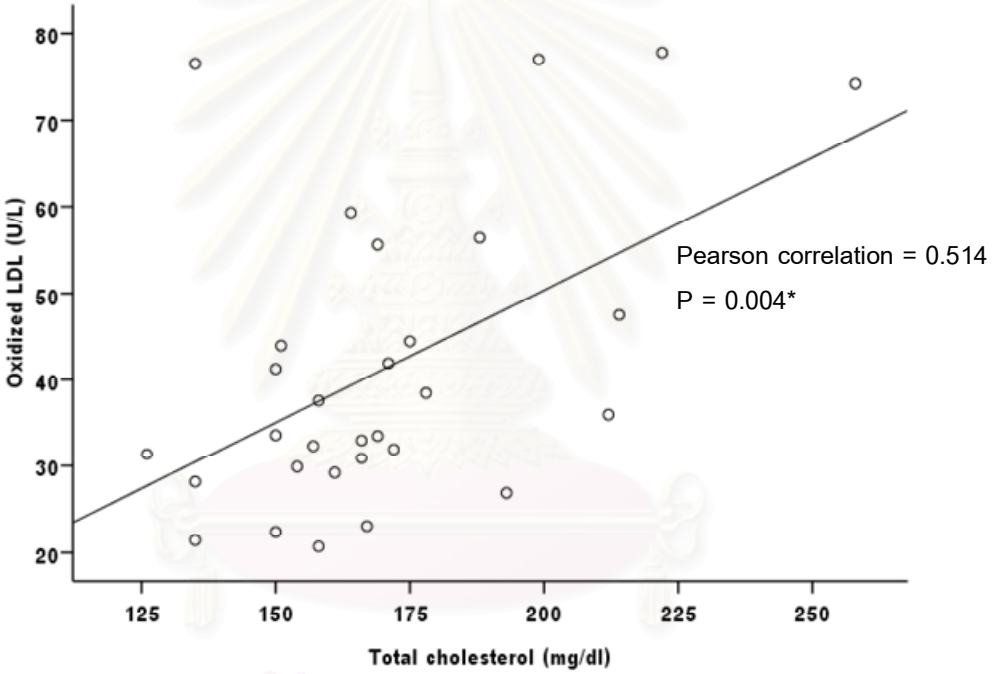


รูปที่ 16 แสดงค่าเฉลี่ยความถี่ในการออกกำลังกายต่อสัปดาห์ของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

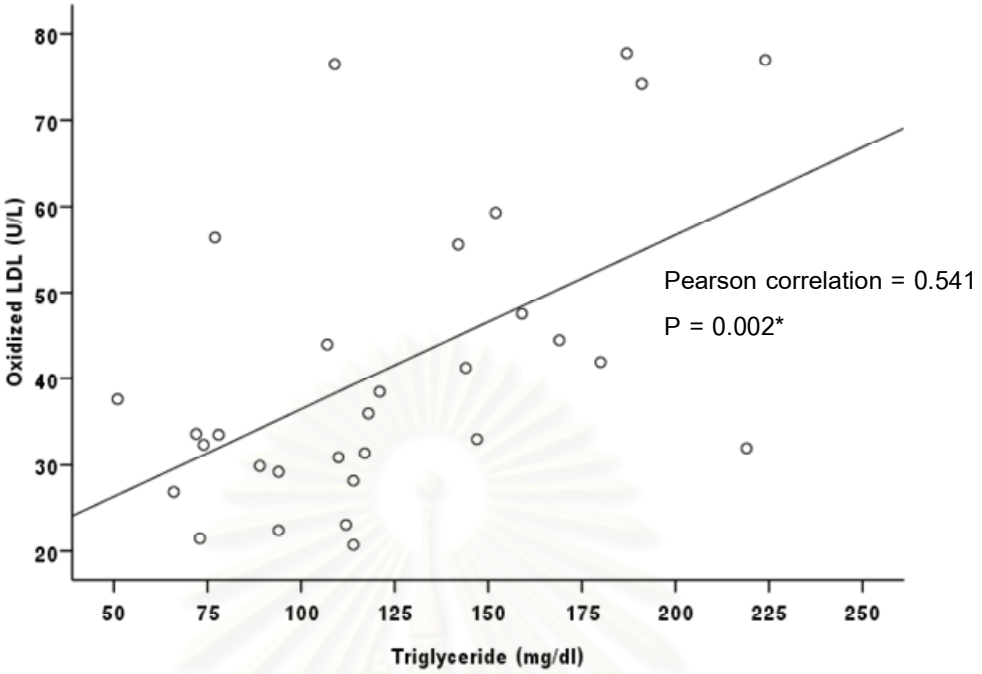
<u>ความสัมพันธ์ของข้อมูลที่ baseline ของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม</u>

จากการศึกษาพบว่าระดับ total cholesterol สัมพันธ์กับระดับของ oxLDL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.004) โดยมีค่า Pearson correlation เท่ากับ 0.514 (รูปที่ 17) นอกจากนี้ระดับของ oxLDL ยังสัมพันธ์กับระดับ triglyceride LDL-C และความถี่ในการออกกำลังกาย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.002 p=0.006 และ p=0.008 ตามลำดับ) โดยค่า Pearson correlation ระหว่างระดับของ oxLDL และระดับ triglyceride เท่ากับ 0.541 (รูปที่ 18) ค่า Pearson correlation ระหว่างระดับของ oxLDL และระดับ LDL-C เท่ากับ 0.494 (รูปที่ 19) และค่า Pearson correlation ระหว่างระดับของ oxLDL และความถี่ในการออกกำลังกาย เท่ากับ -0.477 (รูปที่ 20)

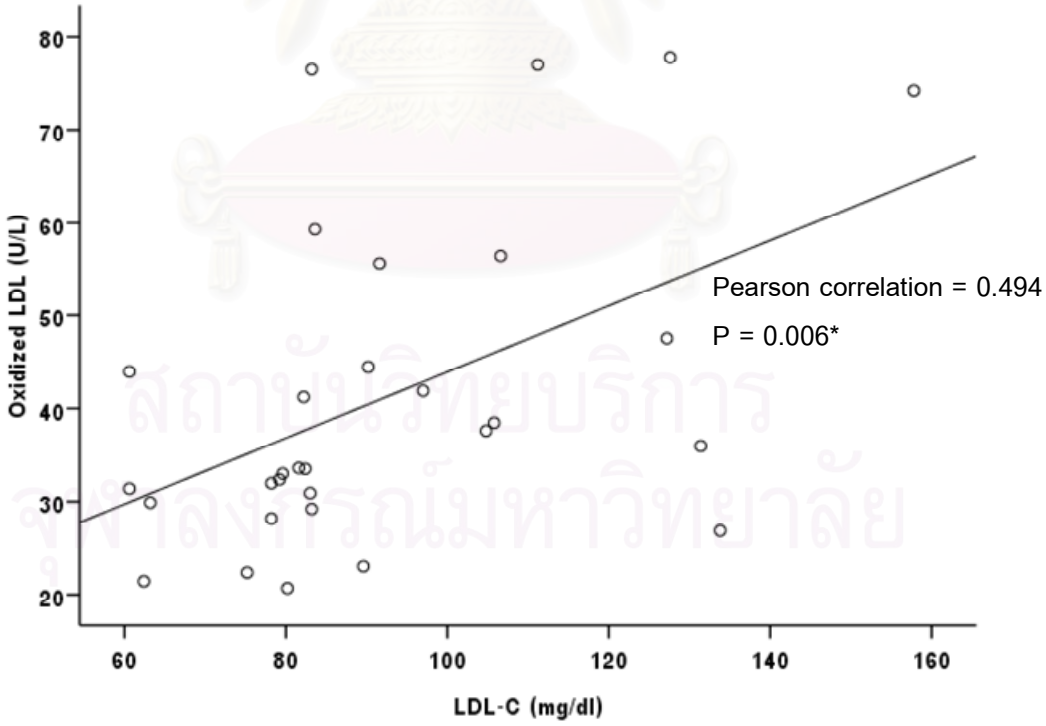


รูปที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ oxLDL และ total cholesterol ของกลุ่มผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม ที่ baseline

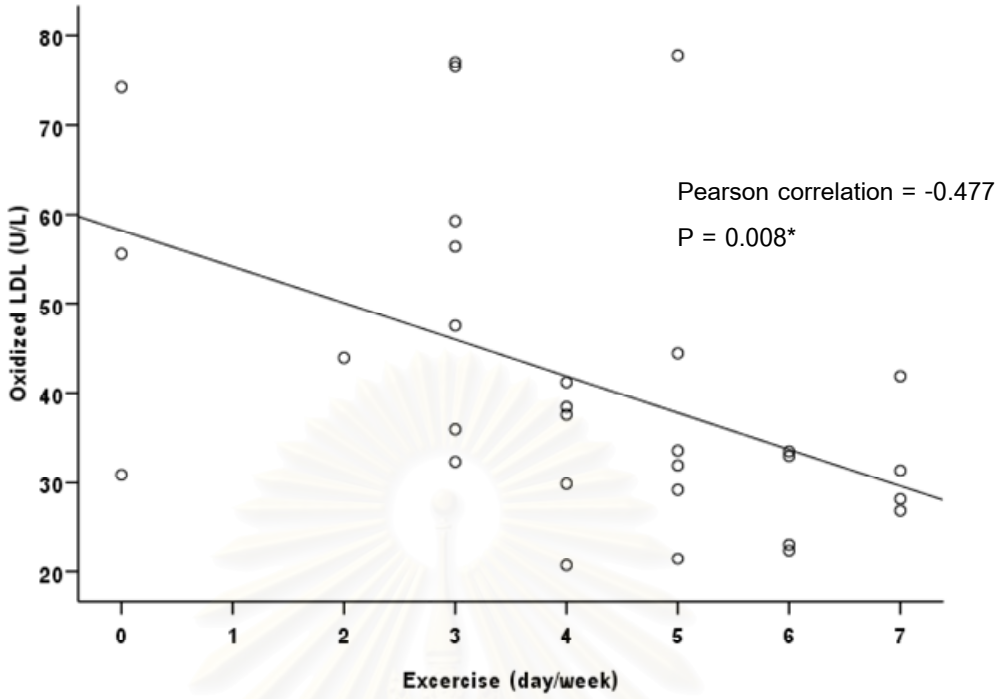
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 18 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ oxLDL และ triglyceride ของกลุ่มผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม ที่ baseline



รูปที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ oxLDL และ LDL cholesterol ของกลุ่มผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม ที่ baseline



รูปที่ 20 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ oxLDL และความถี่ในการออกกำลังกายของกลุ่มผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม ที่ baseline

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับไขมันในเลือดและระดับของ oxidative damage products ในซีรั่ม โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มคนปกติ กลุ่มผู้ป่วยทั้งที่เข้าและไม่เข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนการดำเนินชีวิต และศึกษาผลของซีรั่มนั้นที่มีต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง โดยการตรวจวัดเซลล์มีชีวิต และระดับของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์

งานวิจัยนี้ศึกษาในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ 30 ราย แบ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับการรักษาแบบปกติ (UC group) และกลุ่มที่เข้าร่วมโปรแกรมปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต (LM group) กลุ่มละ 15 ราย และคนปกติ 7 ราย ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบทั้งสองกลุ่มที่เข้าร่วมศึกษาพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของข้อมูลที่ baseline ของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม พบว่าระดับของ oxLDL สัมพันธ์กับระดับ total cholesterol triglyceride LDL-C และความถี่ในการออกกำลังกาย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 17-20)

ผลการวิเคราะห์ค่า BMI ของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มที่ baseline 6 เดือน และ 12 เดือน แสดงในรูปที่ 7 จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมีค่า BMI เปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อยจาก baseline โดยไม่พบความแตกต่างทางสถิติ

ผลการศึกษาระดับของไขมันในเลือด พบว่าผู้ป่วยกลุ่ม LM มีระดับของ TC TG และ LDL-C ลดลง หลังจากเข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต 12 เดือน แต่ HDL-C ที่ 6 เดือน เพิ่มขึ้นจาก baseline เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และที่ 12 เดือน กลับลดลงจาก baseline ส่วนผู้ป่วยกลุ่ม UC มีระดับของ TC TG และ LDL-C เพิ่มขึ้น และมี HDL-C ลดลงจาก baseline ทั้งที่ 6 เดือนและ 12 เดือน (รูปที่ 8-11)

ผลการศึกษาระดับของ oxidative damage products ในซีรั่ม โดยการวัดระดับของ oxLDL (รูปที่ 12) และ protein carbonyl (รูปที่ 13) พบว่าผู้ป่วยกลุ่ม LM มีระดับของ oxLDL และ protein carbonyl ลดลงหลังจากเข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต แต่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยกลุ่ม UC จากผลแสดงให้เห็นว่าระดับของ oxidative stress ลดลงหลังจากเข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต

การทดสอบผลของซีรั่มในเซลล์ HCAEC โดยการตรวจวัดเซลล์มีชีวิต ด้วยวิธี MTT assay เมื่อ incubated ด้วยซีรั่มของผู้ป่วยกลุ่ม LM พบว่าร้อยละของเซลล์มีชีวิตเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบผลที่ baseline แต่ลดลงในผู้ป่วยกลุ่ม UC (รูปที่ 14) แสดงว่าซีรั่มเป็นพิษ (cytotoxicity) ต่อเซลล์ HCAECs ลดลง

การวิเคราะห์ระดับของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จากการวัดการฟลูออเรสเซนต์ของสาร DCF พบว่าเมื่อ incubated ด้วยซีรั่มของผู้ป่วยกลุ่ม LM พบว่าระดับของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ลดลงจาก baseline แต่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยกลุ่ม UC (รูปที่ 15)

จากการวิเคราะห์แบบสอบถามของผู้ป่วย พบว่าผู้ป่วยกลุ่ม UC ออกกำลังกายลดลงจาก baseline แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนผู้ป่วยกลุ่ม LM ออกกำลังกายเพิ่มขึ้นจาก baseline แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (รูปที่ 16)

จากผลสรุปได้ว่าโปรแกรมปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตสามารถลดระดับ oxidative damage products ในเลือดของผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบและระดับของอนุมูลอิสระภายในเซลล์บุผนังหลอดเลือดลงได้ และลดความเป็นพิษต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดลงด้วย

อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาผลของการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตระยะยาว ต่อระดับของไขมันในเลือด และระดับของ oxidative damage products ในซีรั่ม และศึกษาผลของซีรั่มนั้นต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มคนปกติ กลุ่มผู้ป่วยทั้งที่เข้าและไม่เข้าโปรแกรม และเปรียบเทียบผลของการเข้าโปรแกรมต่อการทำงานของเซลล์ดังกล่าว โดยดูผลที่ 6 เดือน และ 12 เดือน พบว่าหลังจากผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบเข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตเป็นระยะเวลา 6 เดือน ระดับของไขมันในเลือด และระดับของ oxidative stress ในซีรั่ม ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบกับก่อนเข้าโปรแกรม แต่หลังจากเข้าโปรแกรมครบ 12 เดือน ระดับของไขมันในเลือด และระดับของ oxidative damage products ในซีรั่ม กลับเพิ่มสูงขึ้นมาจากระดับที่วัดได้ที่ 6 เดือน และถึงแม้ว่าจะมีระดับต่ำกว่าก่อนเข้าโปรแกรมก็ตาม แต่ก็ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก 6 เดือนแรกมีการนัดพบผู้ป่วยถี่กว่า 6 เดือนหลัง ซึ่งเป็นจุดประสงค์หนึ่งของการศึกษาเพื่อดูว่าถ้าไม่ได้รับการกระตุ้นจากแพทย์และพยาบาล ผู้ป่วยจะสามารถปฏิบัติตนตามโปรแกรมได้ดีพอหรือไม่ จากผลชี้ให้เห็นว่าผลที่เดือน 6 เดือน ดีกว่าที่ 12 เดือน แสดงว่า 6 เดือนแรกผู้ป่วยปฏิบัติตนตามโปรแกรมได้ดีกว่า 6 เดือนหลัง

ผลการศึกษาระดับของไขมันในเลือด พบว่าผู้ป่วยกลุ่ม LM มีระดับของ TC TG และ LDL-C ลดลง หลังจากเข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต 12 เดือน แต่ HDL-C ที่ 6 เดือน เพิ่มขึ้นจาก baseline เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และที่ 12 เดือน กลับลดลงจาก baseline ส่วนผู้ป่วยกลุ่ม UC มีระดับของ TC TG และ LDL-C เพิ่มขึ้น และมี HDL-C ลดลงจาก baseline ทั้งที่ 6 เดือนและ 12 เดือน สอดคล้องกับการศึกษาของ Bo และคณะ [26] ที่ได้ศึกษาผลของโปรแกรมการปรับเปลี่ยนการดำเนินชีวิตระยะเวลา 1 ปีต่อความผิดปกติทางเมแทบอลิซึม (metabolic abnormalities) ในกลุ่มคนที่มีภาวะ metabolic syndrome จำนวน 375 คน พบว่าน้ำหนักตัว waist circumference ความดันเลือด ระดับ high-sensitivity C-reactive protein ระดับของ triglyceride และความผิดปกติที่ก่อให้เกิด metabolic syndrome นั้นลดลงในกลุ่มคนที่เข้าโปรแกรม และเพิ่มขึ้นในกลุ่มควบคุม โดยพบว่าการปรับเปลี่ยนการดำเนินชีวิตสามารถลด metabolic syndrome (odds ratio [OR]=0.28; 95% CI 0.18–0.44), ลดสัดส่วนของการเกิด central obesity (OR=0.33; 0.20–0.56) และ hypertriglyceridemia (OR=0.48; 0.31–0.75) และลดอัตราการเกิดโรคเบาหวาน (OR=0.23; 0.06–0.85) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลศึกษา oxidative damage products ในซีรั่ม ซึ่งเป็นผลมาจากการออกซิไดซ์โดย ROS พบว่าผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบกลุ่มที่เข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนการดำเนินชีวิตมีระดับของ oxLDL และ protein carbonyl ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังจากเข้าโปรแกรม แสดงว่าระดับของ ROS ในเลือดของผู้ป่วยลดลงหลังจากเข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนการดำเนินชีวิต ซึ่งผลที่ได้เป็นไปในทางเดียวกับการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงการดำเนินชีวิตต่อ atherogenic lipids และ endothelial cell adhesion molecules ในคนอายุ 18-35 ปี ที่ครอบครัวมีประวัติของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ พบว่าในคนที่ได้เปลี่ยนแปลงการดำเนินชีวิต 8 เดือนมีระดับของ LDL (p=0.007) และ oxLDL (p=0.03) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม [25]

การเปลี่ยนแปลงแบบแผนการดำเนินชีวิตนอกจากจะลด ROS ในเลือดได้แล้ว จากรายงานการศึกษาของ Jatuporn และคณะ [11] พบว่าการเปลี่ยนแปลงแบบแผนการดำเนินชีวิตยังทำให้มีระดับของ antioxidants ในเลือดเพิ่มสูงขึ้นด้วย โดยได้มีการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิผลของการเปลี่ยนแปลงแบบแผนการดำเนินชีวิตต่อปัจจัยเสี่ยงของโรคหลอดเลือดหัวใจในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบคงที่โดยไม่ใช้ยาลดไขมัน เป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่าโปรแกรมการส่งเสริมการดูแลตนเอง โดยการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการดำรงชีวิต ได้แก่ การบริโภคอาหารที่มีไขมันน้อยกว่าร้อยละ 10 ของพลังงานทั้งหมด การบริโภคผักและผลไม้ให้หลากหลายเพิ่มขึ้น และเลือกผลไม้ที่มีปริมาณน้ำตาลต่ำแต่มีใยอาหารสูง การออกกำลังกายแบบโยคะ การผ่อนคลาย

กล้ามเนื้อและการสร้างจินตภาพ เพื่อลดความเครียด รวมทั้งการจดบันทึก สามารถทำให้น้ำหนักตัวของกลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบลดลงและมีระดับ antioxidants ในเลือด (กลูตาไธโอนและวิตามินซี) เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นผลให้ oxidative stress ลดลง

การศึกษาของ Holvoet และคณะ [27] ถึงความสัมพันธ์ของ oxLDL กับระดับของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ พบว่าระดับของ oxLDL ในเลือดมีความสัมพันธ์กับขนาดของการตีบของหลอดเลือดแดงโคโรนารีในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดหัวใจ และอาจจะใช้การตรวจวัดระดับของ oxLDL เป็นตัวชี้วัดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบได้อีกด้วย และจากการศึกษาของ Ehara และคณะ [28] เกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ oxLDL และระดับความรุนแรงของอาการของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ พบว่าระดับของ oxLDL ความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของอาการของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ โดย acute myocardial infarction มีระดับของ oxLDL สูงกว่า unstable angina pectoris และ stable angina pectoris แสดงว่าระดับของ oxLDL จะสัมพันธ์กับ plaque instability จากการศึกษาทั้งสองสามารถสรุปผลของการศึกษาครั้งนี้ได้ว่าระดับ oxLDL ที่ลดลงหลังจากเข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตอาจจะทำให้ระดับความรุนแรงของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบนั้นลดลงไปด้วย หรืออาจจะไม่เพิ่มขึ้นไปจากเดิม

การศึกษาในครั้งนี้พบว่า % cell viability ของเซลล์ HCAECs เพิ่มขึ้นหลังจาก incubated ด้วยซีรั่มของผู้ป่วยหลังเข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต เมื่อเปรียบเทียบกับผลก่อนเข้าโปรแกรม ในขณะที่มี % cell viability ลดลงในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาแบบประคับประคองปกติ แสดงว่าซีรั่มของผู้ป่วยหลังเข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตเป็นพิษ (cytotoxicity) ต่อเซลล์ HCAECs ลดลง

ได้มีการศึกษาผลของซีรั่มหลังจากเข้าโปรแกรมปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก ซึ่งเป็นการศึกษาของ Ornish และคณะ [29] ที่ได้ศึกษาผลของการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตอย่างเคร่งครัดในผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก ต่อระดับของ prostate specific antigen (PSA), ระดับของการเปลี่ยนแปลงการดำเนินชีวิต และศึกษาการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก LNCaP หลังจาก incubated ด้วยซีรั่มของผู้ป่วยก่อนและหลังเข้าโปรแกรม พบว่า PSA ลดลง 4% ในกลุ่มผู้ป่วยที่เข้าโปรแกรม แต่เพิ่มขึ้น 6% ในกลุ่ม ($p = 0.016$) และเมื่อ incubated เซลล์ด้วยซีรั่มจากกลุ่มผู้ป่วยที่เข้าโปรแกรม การเจริญของเซลล์ LNCaP ถูกยับยั้งมากกว่ากลุ่มควบคุมเกือบ 8 เท่า (ผู้ป่วยที่เข้าโปรแกรมยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ 70% และกลุ่มควบคุมยับยั้งได้เพียง 9%, $p =0.001$) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลง

ของระดับ PSA และการเจริญของเซลล์ LNCaP ยังสัมพันธ์กับดีกรีของการเปลี่ยนแปลงการดำเนินชีวิตด้วย

จากการศึกษาของ Roberts และคณะ [30] ถึงผลของการปรับเปลี่ยนการรับประทานอาหาร ร่วมกับการออกกำลังกายที่มีต่อ oxidative stress inflammation MMP-9 และ monocyte chemotactic activity ในผู้ชายอ้วนที่มีปัจจัยของภาวะ metabolic syndrome พบว่า BMI ระดับไขมันในเลือด (TC TG HDL-C และ LDL-C) insulin myeloperoxidase 8-isoprostaglandin $F_{2\alpha}$ C-reactive protein soluble ICAM-1 soluble P-selectin macrophage inflammatory protein-1_{α} และ matrix metalloproteinase-9 ลดลงหลังจากเข้าโปรแกรม 3 สัปดาห์ และมีการศึกษาในหลอดทดลอง ในเซลล์ human aortic endothelial cells (HAEC) พบว่า ซีรั่มที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างสามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ cellular VCAM-1และมีการสร้าง monocyte chemotactic protein-1 production และมี superoxide และ hydrogen peroxide production ลดลง โดยการตรวจวัดดูการฟลูออเรสเซนต์ของสาร DCF หลังจาก incubated ด้วยซีรั่ม และมี nitric oxide (NO) เพิ่มขึ้นหลังจากการปรับเปลี่ยนการดำเนินชีวิต

นอกจากนี้ Roberts และคณะ [31] ยังได้ศึกษาในผู้ป่วยชายที่เป็นโรคเบาหวาน พบว่าการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตอย่างเคร่งครัด โดยรับประทานอาหารที่มีเส้นใยสูงและอาหารที่มีไขมันต่ำ ร่วมกับการออกกำลังกายสามารถลด oxidative stress inflammation และ monocyte-endothelial interaction ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบได้ โดยมีการวัด hydrogen peroxide production ภายในเซลล์ HAEC หลังจาก incubated ด้วยซีรั่มของผู้ป่วยแล้วตรวจวัดโดยดูการฟลูออเรสเซนต์ของสาร DCF พบว่า hydrogen peroxide formation ในเซลล์ลดลงหลังจากการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต ซึ่งการศึกษาของ Roberts และคณะ ทั้งในผู้ป่วยโรคเบาหวานและ metabolic syndromeสอดคล้องกับการศึกษาของเรา ว่าปริมาณของ ROS production ในเซลล์ HCAECs ลดลงหลังจากการ incubated ด้วยซีรั่มของผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่เข้าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต ส่วนผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาแบบประคับประคองปกตินั้นมี ROS production เพิ่มขึ้น

ผลการศึกษาระดับของ oxLDL และ ROS production ค่อนข้างไปในแนวทางเดียวกัน คือ มีระดับลดลงหลังจากเข้าโปรแกรมปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต ถึงแม้ว่าจะไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติก็ตาม จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า oxLDL สามารถเหนี่ยวนำ reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็น second messenger ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis

ให้เกิดขึ้นได้ในเซลล์ต่างๆ หลายชนิดรวมทั้งเซลล์บุผนังหลอดเลือดด้วย [32, 33] การศึกษาของ Chen และคณะ [34] เกี่ยวกับบทบาทของ oxLDL ที่มีต่อการตายของเซลล์แบบ necrotic และ apoptotic นั้น พบว่า oxLDL เหนี่ยวนำให้เซลล์บุผนังหลอดเลือดเกิด apoptosis ผ่าน specific receptor ที่ชื่อว่า lectin-like receptor for oxLDL (LOX-1) ได้และอาจเกี่ยวข้องกับ ROS production และ NADPH oxidase และมีการศึกษาว่า oxLDL เป็นพิษต่อเซลล์ สามารถทำให้เกิด endothelial dysfunction โดย oxLDL จับกับ LOX-1 ที่อยู่บน endothelial cell membrane แล้ว LOX-1 ไปกระตุ้นการทำงานของ NADPH oxidase ทำให้มีการสร้าง ROS ในเซลล์เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis หรือแบบ necrosis [4]

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าโปรแกรมการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตสามารถลดระดับของ oxidative damage products ในเลือดของผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบได้ ชี้ให้เห็นว่า oxidative stress ลดลง จึงส่งผลดีต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดงทั้งในแง่ของการมีชีวิตอยู่เพิ่มขึ้นและมีการสร้างอนุมูลอิสระภายในเซลล์ลดลง

ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาทำให้ทราบว่าชีรั่มของผู้ป่วยโรคหลอดลเอดหัวใจตีบมีผลต่อระดับของ ROS ในเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง แต่การศึกษาครั้งนี้ยังไม่ได้ศึกษากลไกที่ทำให้เกิดผลดังกล่าว ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าผลดังกล่าวน่าจะมาจากบทบาทของ oxLDL ดังนั้นควรจะศึกษาการตรวจการแสดงออกของ LOX-1 ซึ่งเป็นตัวรับเฉพาะของ oxLDL ที่เยื่อหุ้มเซลล์บุผนังหลอดเลือด และตรวจประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์บุผนังหลอดเลือด โดยการตรวจวัดการแสดงออกของเอนไซม์ nitric oxide synthase หรือปริมาณของ nitric oxide

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

[1] สาธารณสุข, กระทรวง. กรมควบคุมโรค. สำนักโรคไม่ติดต่อ. 2551. จำนวนและอัตราผู้ป่วยในโรคหลอดเลือดหัวใจขาดเลือด พ.ศ. 2544-2549 [online]. แหล่งที่มา: http://ncd.ddc.moph.go.th/ncd%20web1/Cncd/data/bureau/database-bureau/table11.xls [30 กันยายน 2551]

[2] สาธารณสุข, กระทรวง. กรมควบคุมโรค. สำนักโรคไม่ติดต่อ. 2551. จำนวนและอัตราการตายในโรคหลอดเลือดหัวใจขาดเลือด พ.ศ. 2544-2549 [online]. แหล่งที่มา: http://ncd.ddc.moph.go.th/ncd%20web1/Cncd/data/bureau/database-bureau/table06.xls [30 กันยายน 2551]

[3] Hansson, G. K., and Libby, P. 2006. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. Nature Reviews Immunology 6: 508-519.

[4] Galle, J., Hansen-Hagge, T., Christoph, W., and Seibold, S. 2006. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. Atherosclerosis 185: 219-226.

[5] Esper, R. J., Nordaby, R. A., Vilarino, J. O., Paragano, A., Cacharron, J. L., and Machado, R. A. 2006. Endothelial dysfunctin: a comprehensive appraisal. Cardiovascular Diabetology 5, 4: 1-18.

[6] Feletou, M., and Vanhoutte, P. M. 2006. Endothelial dysfunctin: a multifaceted disorder. Am J Physiol Heart Circ Physiol 291: H985-H1002.

[7] Ornish, D., Scherwitz, L. W., Billings, J. H., Gould, K. L., Merritt, T. A., Sparler, S., Armstrong, W. T., Ports, T. A., Kirkeeide, R. L., Hogeboom, C., and Brand, R. J. 1998. Intensive lifestyle changes for reversal of coronary heart disease. JAMA 280: 2001-2007.

[8] Bharshankar, J. R., Bharshankar, R. N., Deshpande, V. N., Kaore, S. B., and Gosavi, G. B. 2003. Effect of yoga on cardiovascular system in subjects above 40 years. Indian J Physiol Pharmacol 47, 2: 202-206.

[9] Bijlani, R. L., Vempati, R. P., Yadav, R. K., Ray, R. B., Gupta, V., Sharma, R., Mehta, N., and Mahapatra, S. C. 2005. A brief but comprehensive lifestyle education program based on yoga reduces risk factors for

cardiovascular disease and diabetes mellitus. J Altern Complement Med 11, 2: 267-264.

[10] Singh, S., Malhotra, V., Singh, K. P., Madhu, S. V., and Tandon, O. P. 2004. Role of yoga in modifying certain cardiovascular functions in type 2 diabetic patients. J Assoc Physicians India 52: 203-206.

[11] Jatuporn, S., Sanwataroj, S., Saengsiri, A., Rattanapruks, S., Srimahachota, S., and Tosukhowong, P. 2003. Short-term effects of an intensive lifestyle modification program on lipid peroxidation and antioxidant system in patients with coronary artery disease. Clinical Hemorheology and Microcirculation 29: 429-436.

[12] World Health Organization. 2004. Revised Global Burden of Disease (GBD) 2002 estimates [online]. Available from: http://www.who.int/healthinfo/statistics/gbdwhoregionmortality2002.xls [2008,September 30]

[13] Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., and Shacter, E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods Enzymol 233: 346–357.

[14] Nyström, T. 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. The EMBO Journal 24: 1311-1317.

[15] Gomes, A., Fernandes, E., and Lima, J. L. F. C. 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. J. Biochem. Biophys. Methods 65: 45–80.

[16] Fox, S. I. (1993). Human physiology. 4th ed. Dubuque Iowa: WCB.

[17] Ma, F. X., Zhou, B., Chen, Z., Ren, Q., Lu, S. H., Sawamura, T. and Han, Z. C. 2006. Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cells by regulation of endothelial nitric oxide synthase. Journal of Lipid Research 47: 1227-1237.

[18] Li, D. Y., and Mehta, J. L. 2000. Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells evidence from use of antisense LOX-1

mRNA and chemical inhibitors. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20: 1116-1122.

[19] Sydow, K., and Munzel, T. 2003. ADMA and oxidative stress. Atherosclerosis Supplements 4: 41-51.

[20] Smirnova, V., Sawamura, T., and Goligorsky, M. S. 2004. Upregulation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in endothelial cells by nitric oxide deficiency. Am J Physiol Renal Physiol 287: F25–F32.

[21] Keogh, J. B., Brinkworth, G. D., and Clifton, P. M. 2007. Effects of weight loss on a low-carbohydrate diet on flow-mediated dilatation, adhesion molecules and adiponectin. British Journal of Nutrition 98: 852–859.

[22] เสรี สิงหถนัดกิจ และวิภูษิต แต้สมบัติ. 2547. Off-pump coronary artery bypass surgery [online]. แหล่งที่มา: http://www.md.chula.ac.th/surgery/collective/pdf/20041111.pdf [15 กันยายน 2551]

[23] Manchanda, S. C., Narang, R., Reddy, K. S, Sachdeva, U., Prabhakaran, D., Dharmanand, S., Rajani, M., and Bijlani, R. 2000. Retardation of coronary atherosclerosis with yoga lifestyle intervention. The Journal of the Associations of Physicians of India 48: 687-94.

[24] Aem-orn Saengsiri. 2003. The effects of a self-care promotion program on quality of life and reduction of risk factors of coronary heart disease patients. Master's thesis. Nursing science (Adult Nursing), Graduate studies, Mahidol University.

[25] Tonstad, S., Sundfør, T., and Seljeflot, I. 2005. Effect of lifestyle changes on atherogenic lipids and endothelial cell adhesion molecules in young adults with familial premature coronary heart disease. The American journal of cardiology 95, 10: 1187-1191.

[26] Bo, S., Ciccone, G., Baldi, C., Benini, L., Dusio, F., Forastiere, G., Lucia, C., Nuti, C., Durazzo, M., Cassader, M., Gentile, L., and Pagano, G. 2007. Effectiveness of a lifestyle intervention on metabolic syndrome. A randomized controlled trial. J Gen Intern Med 22, 12: 1695–703.

[27] Holvoet, P., Stassen, J. M., Cleemput, J. V., Collen, D., and Vanhaecke, J. 1998. Oxidized low density lipoproteins in patients with transplant-associated coronary artery disease. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18: 100-107.

[28] Ehara, S., Ueda, M., Naruko, T., Haze, K., Itoh, A., Otsuka, M., Komatsu, R., Matsuo, T., Itabe, H., Takano, T., Tsukamoto, Y., Yoshiyama, M., Takeuchi, K., Yoshikawa, J., and Becker, A. E. 2001. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 103: 1955-1960.

[29] Ornish, D., Weidner, G., Fair, W. R., Marlin, R., Pettengill, E. B., Raisin, C. J., Dunn-Emke, S., Crutchfield, L., Jacobs, F. N., Barnard, R. J., Aronson, W. J., Mccormac, P., Mcknight, D. J., Fein, J. D., Dnistrian, A. M., Weinstein, J., Ngo, T. H., Mendell, N. R., and Carrol, P. R. 2005. Intensive lifestyle changes may affect the progression of prostate cancer. The Journal of Urology 174: 1065–1070.

[30] Roberts, C. K., Won, D., Pruthi, S., Kurtovic, S., Sindhu, R. K., Vaziri, N. D., and Barnard, R. J. 2005. Effect of a short-term diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation, MMP-9, and monocyte chemotactic activity in men with metabolic syndrome factors. J Appl Physiol 100: 1657–1665.

[31] Roberts, C. K., Won, D., Pruthi, S., Lin, S. S., and Barnard, R. J. 2006. Effect of a diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation and monocyte adhesion in diabetic men. Diabetes Research and Clinical Practice 73: 249–259.

[32] Salvayre, R., Auge, N., Benoist, H., and Negre-Salvayre, A. 2002. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. Biochimica et Biophysica Acta 1585: 213– 221.

[33] Norata, G. D., Tonti, L., Roma, P., and Catapano, A. L. 2002. Apoptosis and proliferation of endothelial cells in early atherosclerotic lesions: possible role of oxidised LDL. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 12: 297–305.

[34] Chen, X., Xun, K., Wu, Q., Zhang, T., Shi, J., and Du, G. 2007. Oxidized low density lipoprotein receptor-1 mediates oxidized low density lipoprotein-

induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: Role of reactive oxygen species. Vascular Pharmacology 47: 1–9.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมีในการตรวจวัดระดับของ Protein carbonyl ในซีรั่ม

1. **Phosphate buffer saline** (1X PBS) (10 mM sodium phosphate, dibasic (Na_2HPO_4), pH 7.4 และ 0.14 M sodium chloride (NaCl))
   1.1.ชั่ง Na_2HPO_4 (MW=141.982) 1.42 g และ NaCl (MW=58.44) 8.18 g
   1.2.ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml
   1.3.ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ 1000 ml

2. **Trichloroacetic acid** (20% TCA)
   2.1.เติม TCA 200 ml ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml

3. **Dinitrophenylhydrazine** (DNPH) (10 mM DNPH ใน 2N hydrochloric acid (HCl))
   3.1.เติม HCl 41.25 ml ในน้ำกลั่น 500 ml
   3.2.ชั่ง DNPH (MW=198.14) 0.991 g ละลายใน HCl ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1

4. **Ethanol:Ethyl acetate** (1:1)
   4.1.ผสม 95% ethanol 500 ml กับ ethyl acetate 500 ml ให้เข้ากัน

5. **Guanidine hydrochloride** (GdmCl) (6 M GdmCl และ 0.5 M potassium phosphate, monobasic (KH_2PO_4), pH2.5)
   5.1.ชั่ง KH_2PO_4 (MW=136.092) 34.023 g และ GdmCl (MW=95.53) 286.6 g
   5.2.ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 300 ml
   5.3.ปรับ pH ให้ได้ 2.5 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 ml

การเตรียมสารเคมีในการเพาะเลี้ยงเซลล์ HCAECs

1. **Microvascular endothelial growth medium**
   1.1. ใส่ 5 ng human recombinant epidermal growth factor 0.5 ml ลงไปในขวดที่มี endothelial cell basal medium อยู่ 500 ml
   1.2. ใส่ 5 mg hydrocortisone ลงไป 0.5 ml
   1.3. ใส่ 25 mg gentamycin และ amphotericin B ลงไป 0.5 ml
   1.4. ใส่ 6 mg bovine brain extract ลงไป 2 ml
   1.5. ใส่ fetal bovine serum (FBS) ลงไป 25 ml
   1.6. ใส่ 100U/ml penicillin/streptomycin ลงไป 5 ml

2. **Phosphate buffer saline** (1X PBS) (10 mM sodium phosphate, dibasic (Na_2HPO_4), pH 7.4 และ 0.14 M sodium chloride (NaCl))
   2.1. ชั่ง Na_2HPO_4 (MW=141.982) 1.42 g และ NaCl (MW=58.44) 8.18 g
   2.2. ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml
   2.3. ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ 1000 ml

การเตรียมสารเคมีในการทดสอบการทำลายเซลล์ (cytotoxicity) **ของซีรั่ม โดยวิธี** MTT colorimetric assay

1. **MTT solution**
   1.1. เตรียม stock solution 5 mg/ml MTT solution
      1.1.1. ชั่ง MTT 50 mg แล้วละลายใน PBS 10 ml
      1.1.2. แบ่งใส่หลอดขนาดเล็กหลอดละ 1 ml แล้วเก็บที่ 4°C ได้นาน 1 เดือน
   1.2. เตรียม working solution 0.5 mg/ml MTT solution
      1.2.1. นำ stock solution 5 mg/ml MTT solution ที่ 4°C มา 1 ml แล้วใส่ในหลอดที่มี serum free medium อยู่ 9 ml ผสมให้เข้ากัน

การเตรียมสารเคมีในการตรวจวัดระดับของ ROS Production ในเซลล์

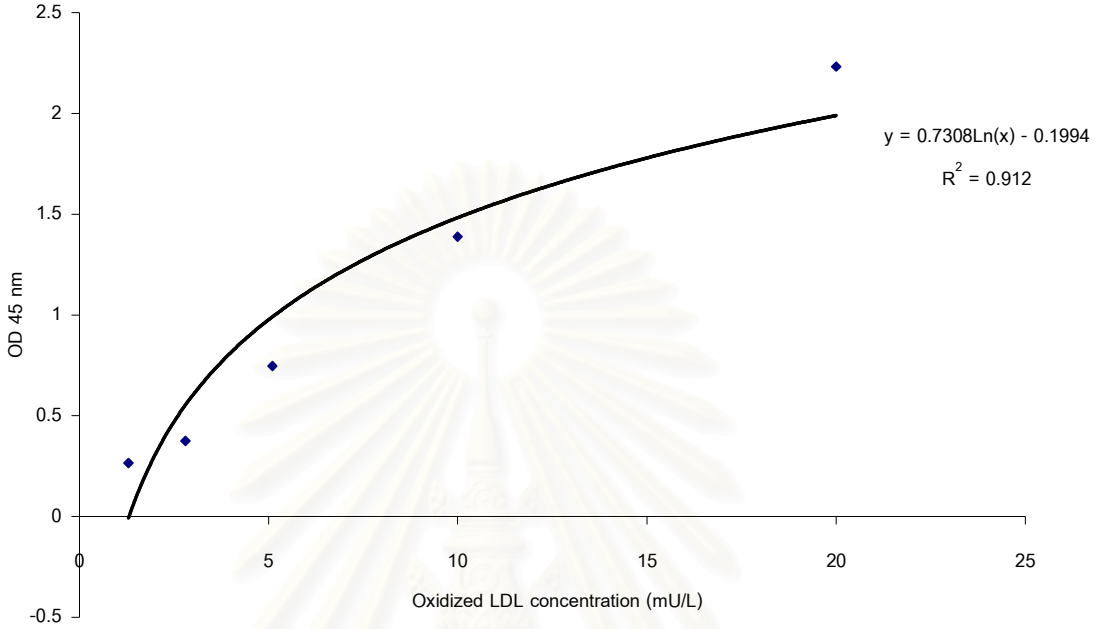
1. **Phosphate buffer saline** (1X PBS) (10 mM sodium phosphate, dibasic (Na_2HPO_4), pH 7.4 และ 0.14 M sodium chloride (NaCl))
   1.1. ชั่ง Na_2HPO_4 (MW=141.982) 1.42 g และ NaCl (MW=58.44) 8.18 g
   1.2. ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml
   1.3. ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ 1000 ml

2. **6-carboxy-2′,7′-dichloro-dihydrofluorescein diacetate** (DCFH-DA) solution
   2.1. เตรียม stock solution 1 M DCFH-DA
      2.1.1. ชั่ง DCFH-DA (MW: 675.43) 5 mg
      2.1.2. เติม DMSO 7.4 ml ละลายให้เข้ากัน
      2.1.3. แบ่งใส่หลอดขนาดเล็กหลอดละ 1 ml แล้วเก็บที่ -20°C
   2.2. เตรียม working solution 0.1 M DCFH-DA
      2.2.1. นำ stock solution 1 M DCFH-DA ที่เก็บไว้ที่ -20°C มาตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย
      2.2.2. เติม stock solution 1 M DCFH-DAลงในหลอดที่มี complete medium อยู่ 9 ml แล้วผสมให้เข้ากัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

กราฟของสารละลาย oxLDL มาตรฐาน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค
เอกสารชี้แจงข้อมูล/คำแนะนำแก่ผู้เข้าร่วมโครงการ
(Information sheet for research volunteer)

ชื่อโครงการ ผลของซีรั่มจากผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่มีการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตระยะยาวต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง
(Effect of sera from patients with coronary artery disease intervened by long-term lifestyle modification on human coronary artery endothelial cells)

ชื่อผู้วิจัย

นางสาวรัตติพร วุ่นสุวรรณ	ผู้วิจัย
ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์	อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย
อาจารย์ ดร. อัชฌาสัย ศิริตันติกร	อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยร่วม
รองศาสตราจารย์นายแพทย์ สุพจน์ ศรีมหาโชตะ	อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยร่วม

ผู้ดูแลที่ติดต่อได้

1. ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 0-2256-4482(ที่ทำงาน)
2. อาจารย์ ดร. อัชฌาสัย ศิริตันติกร ภาควิชาเวชศาสตร์ชันสูตร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 0-2256-4136 (ที่ทำงาน)
3. รองศาสตราจารย์นายแพทย์ สุพจน์ ศรีมหาโชตะ หน่วยโรคหัวใจ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 0-2256-4297 ต่อ 200 (ที่ทำงาน)
4. นางสาวรัตติพร วุ่นสุวรรณ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 08-5157-6039, 0-2256-4482 (ที่ทำงาน)

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่แสดงข้อมูลเพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจของท่านในการเข้าร่วมการศึกษาวิจัย อย่างไรก็ตามก่อนที่ท่านตกลงเข้าร่วมการศึกษาดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างละเอียดเพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใด ๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของผู้ทำวิจัย หรือผู้ร่วมในโครงการวิจัยซึ่งจะเป็น

ผู้สามารถให้ความกระจ่างแก่ท่านได้ ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านเซ็นชื่อยินยอมในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

ความเป็นมาของโครงการ

โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ เป็นโรคเรื้อรังที่พบบ่อยในผู้สูงอายุและเป็นสาเหตุการตายในอันดับต้นๆในประเทศต่างๆ ทั่วโลกและสำหรับประเทศไทยอัตราตายจากกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือดติดอันดับ 1 ใน 3 มาโดยตลอด ที่สำคัญได้แก่ โรคหัวใจหลอดเลือดหัวใจตีบ โรคหัวใจล้มเหลว โรคหลอดเลือดสมอง ปัจจัยเสี่ยงที่เป็นสาเหตุของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ อาจเป็นได้ทั้งพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ครอบครัวมีประวัติเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจตีบและเสียชีวิตก่อนวัยอันควร, ระดับไขมันในเลือดสูงทั้งโคเลสเตอรอล และไขมันไม่ดีที่เรียกว่าแอลดีแอล, นอกจากนี้ยังมีปัจจัยเสี่ยงอื่นๆ เช่น โรคความดันโลหิตสูง, โรคเบาหวาน, โรคอ้วน, ความเครียด, การสูบบุหรี่, ขาดการออกกำลังกาย และภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

หลายงานวิจัยระบุว่าการรักษาผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่มีประสิทธิภาพจะต้องทำทั้งการรักษาด้วยยา และการสร้างเสริมสุขภาพด้วยการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตควบคู่กันไป ซึ่งการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต สามารถทำได้ดังนี้ คือ การรับประทานอาหารไขมันต่ำเน้นการเลือกรับประทานผัก ผลไม้, การออกกำลังกายแบบ โดยเน้นการเดินเป็นหลัก, การฝึกปฏิบัติการจัดการกับความเครียด โดยใช้การฝึกปฏิบัติโยคะอาสนะ และการหายใจ ร่วมกับการฝึกผ่อนคลายความเครียดและการสร้างจินตภาพ, และมีการจัดกลุ่มสนทนาร่วมกันเพื่อแลกเปลี่ยนความคิดเห็น ให้คำปรึกษา คำแนะนำ รวมทั้งทราบปัญหาและช่วยกันแก้ไขปัญหาให้แก่ผู้ป่วย เพื่อเสริมสร้างพลังอำนาจในการปฏิบัติตามโปรแกรมการเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต

จากผลการศึกษาของคณะวิจัยโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในปี 2551 พบว่าผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่เข้าโปรแกรมปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตระยะเวลา 6 เดือน มีระดับของโคเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอร์ไรด์ และไขมันชนิดออกซิไดส์แอลดีแอลลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่ไม่ได้เข้าโปรแกรม แสดงว่าโปรแกรมปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตสามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบได้ดี

จากผลการวิจัยดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานว่าประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่เข้าร่วมโปรแกรมปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต น่าจะสูงขึ้นเทียบเท่ากับคนปกติ เพื่อพิสูจน์สมมติฐานนี้คณะวิจัยจึงออกแบบ

การศึกษาในหลอดทดลอง มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของซีรั่มต่อการทำงานของเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง โดยเปรียบเทียบระหว่างซีรั่มจากกลุ่มคนปกติ กลุ่มผู้ป่วยทั้งที่เข้าและไม่เข้าโปรแกรมดังกล่าว

ผลการศึกษานี้จะทำให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่างการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตและการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง ซึ่งหากผลการศึกษานี้พบว่าการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตส่งผลดีต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดงจริง ก็จะเป็นหลักฐานการยืนยันในระดับโมเลกุลสำหรับการนำโปรแกรมนี้ไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและปรับเปลี่ยนรูปแบบการรักษาผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาผลของซีรั่มต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มคนปกติและผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ และเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบกลุ่มที่เข้าและไม่เข้าโปรแกรมปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิต

ส่วนที่ 1 เอกสารชี้แจงข้อมูล/คำแนะนำสำหรับผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ
วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

1. ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่ใช้โครงการศึกษาวิจัยนี้ทั้งหมดได้มาจากโครงการวิจัยเรื่อง “ผลของการสร้างเสริมสุขภาพผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจโดยใช้โปรแกรมปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตอย่างเคร่งครัดต่อคุณภาพชีวิต และการเปลี่ยนแปลงของความเครียดจากออกซิเดชั่น”
2. การนำตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบมาจากโครงการวิจัยดังกล่าวก่อนหน้านี้ ต้องได้รับความยินยอมจากผู้ป่วยหลังจากที่ได้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัยและได้ลงนามในหนังสือยินยอมเป็นที่เรียบร้อย
3. การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ หาปริมาณสารที่เป็นตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและตัวบ่งชี้ของการอักเสบในซีรั่ม และนำซีรั่มไปทำการทดลองในเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง

ส่วนที่ 2 เอกสารชี้แจงข้อมูล/คำแนะนำสำหรับคนปกติ
วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

1. การขอตัวอย่างเลือดจากคนปกติ ต้องได้รับความยินยอมหลังจากได้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัยและได้ลงนามในหนังสือยินยอมเป็นที่เรียบร้อย
2. วิธีเก็บตัวอย่างเลือด

   ทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณท้องแขนด้วยชุดอุปกรณ์เจาะเลือดปริมาณ 5 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างซีรั่มโดยการปั่นแยกส่วนของซีรั่ม เก็บที่ -80°C ก่อนการวิเคราะห์
3. การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ หาปริมาณสารที่เป็นตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและตัวบ่งชี้ของการอักเสบในซีรั่ม และนำซีรั่มไปทำการทดลองในเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด

ท่านมีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ช้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน

ท่านอาจเกิดอาการข้างเคียงหรือความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ ซึ่งอาการข้างเคียงเหล่านี้เป็นอาการที่ไม่เคยพบมาก่อน เพื่อความปลอดภัยของท่าน ควรแจ้งผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อมีความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา
หากมีการค้นพบข้อมูลใหม่ ๆ ที่อาจมีผลต่อความปลอดภัยของท่านในระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัยผู้ทำวิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบทันที

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

1. ท่านจะได้รับการประเมินตัวบ่งชี้สารที่เป็นตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและตัวบ่งชี้ของการอักเสบ
2. ท่านจะได้รับการประเมินการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ

3. ท่านจะได้ทราบถึงกลไกในการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบในระดับโมเลกุล รวมทั้งวิธีการในการรักษาโรคหลอดเลือดหัวใจตีบและวิธีการป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบจากผู้เชี่ยวชาญ

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นในโครงการวิจัย

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย และพิสูจน์ได้ว่าท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้วผู้สนับสนุนโครงการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบต่อค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถติดต่อกับผู้ทำวิจัย คือ นางสาวรัตติพร วุ่นสุวรรณ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 08-5157-6039 (มือถือ), 0-2256-4482 (ที่ทำงาน) ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

การปกป้องรักษาข้อมูลของอาสาสมัคร

ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวของท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัย

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

จากการลงนามยินยอมของท่าน ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้ร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

6. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลเสียใด ๆ ทั้งสิ้น
7. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
8. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านมีข้อสงสัยทางด้านจริยธรรมการวิจัยในคน สามารถติดต่อได้ที่ สำนักงานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ตึกอานันทมหิดลชั้น 3 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

.....

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง
ตัวอย่างใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย

ใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย (Consent form)

การวิจัยเรื่อง ผลของซีรั่มจากผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่มีการปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตระยะยาวต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดง
(Effect of sera from patients with coronary artery disease intervened by long-term lifestyle modification on human coronary artery endothelial cells)

วันที่ให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด และมีความเข้าใจดีแล้ว ซึ่งผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่างๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจ ไม่ปิดบัง ซ่อนเร้น จนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้ การบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคที่ข้าพเจ้าพึงจะได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูล เฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย การเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกระทำได้เฉพาะกรณีจำเป็นด้วยเหตุผลทางวิชาการเท่านั้นและจะต้องได้รับคำยินยอมจากข้าพเจ้าเป็นลายลักษณ์อักษร

ข้าพเจ้ายินยอมให้นำตัวอย่างเลือดของข้าพเจ้าที่ได้เจาะไว้ในขณะที่ข้าพเจ้าเข้าร่วมโครงการวิจัยเรื่อง “ผลของการสร้างเสริมสุขภาพผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจโดยใช้โปรแกรมปรับเปลี่ยนแบบแผนการดำเนินชีวิตอย่างเคร่งครัดต่อคุณภาพชีวิต และการเปลี่ยนแปลงของความเครียดจากออกซิเดชั่น” เพื่อนำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ผู้วิจัยรับรองว่าหากเกิดอันตรายใดๆ จากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการรักษาพยาบาล โดยไม่คิดมูลค่า และจะได้รับการชดเชยรายได้ที่สูญเสียไประหว่างการรักษาพยาบาลดังกล่าว ตลอดจนเงินทดแทนความพิการที่อาจเกิดขึ้นตามความเหมาะสม

ผู้วิจัยรับรองว่าจะใช้ตัวอย่างเลือดของข้าพเจ้าอย่างเป็นประโยชน์ที่สุด และใช้เฉพาะในโครงการวิจัยนี้เท่านั้น กรณีมีตัวอย่าง อาร์เอ็นเอ (RNA) และดีเอ็นเอ (DNA) เหลือจากการวิจัยและต้องการใช้ในการวิจัยอื่นผู้วิจัยจะต้องแจ้งให้ข้าพเจ้าทราบพร้อมทั้งได้รับคำยินยอมจากข้าพเจ้าก่อนจึงจะใช้ตัวอย่างเลือดในโครงการวิจัยอื่นได้

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นแล้วและมีความเข้าใจดีทุกประการ และได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลงนาม.....ผู้ยินยอม

(.....)

ลงนาม.....พยาน

(.....)

ลงนาม.....ผู้ทำวิจัย

(.....)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

ผลงานวิทยานิพนธ์ที่ได้นำเสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติ The 2nd Biochemistry and Molecular Biology Conference 2009: Biochemistry and Molecular Biology for Regional Sustainable Development

Poster 111

EFFECT OF A SHORT-TERM LIFESTYLE MODIFICATION PROGRAM ON OXIDATIVE STRESS, INFLAMMATION AND ENDOTHELIAL CELL VIABILITY IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE

Rattiporn Wunsuwan[1], Atchasai Siritantikorn[2], Suphot Srimahachota[3], Aem-orn Saensiri[3], and Piyaratana Tosukhowong[1]

[1]Department of Biochemistry; [2]Department of Laboratory Medicine; [3]Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

The purpose of this study was designed to examine the effects of lifestyle modification (LM) program on oxidative stress and inflammation marker in CAD patients and study on an *in vitro* effect of sera obtained from the LM-intervened patients on endothelial cells. A total of 30 patients were recruited and randomized into two group, experimental group (n=15) and usual care control group (n=15) and were followed for 6 months. The experimental group patients were prescribed a LM program that comprised dietary advice on low-fat diets, high antioxidant and fiber intakes, aerobic exercise, stress management and group support. Levels of oxidized LDL, protein carbonyl and adiponectin were determined in the collected blood specimens from patients at baseline and 6 months. Using patient sera and human coronary artery endothelial cell (HCAEC) culture, we measured cell viability by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay. After 6 months of intervention, oxidized LDL and protein carbonyl levels significantly decrease in experimental group. There was no significant change in adiponectin in both groups. In vitro, MTT assay indicated that HCAEC cell viability increased by sera from patients in experimental group after intervention. These findings indicate that lifestyle modification program decreases oxidative stress and increases endothelial cell viability in the patients with CAD. It is strongly recommended as an efficient strategy to decrease the risk of cardiovascular development.

Keywords: coronary artery disease, lifestyle modification, oxidized low-density lipoprotein (oxLDL), human coronary artery endothelial cell (HCAEC), cell viability

Introduction

Coronary artery disease (CAD) is one of the most common and critical disease in worldwide. Many risk factors were found, such as oxidative stress and inflammation that are thought to play roles in the development of CAD. The oxidation of LDL by free radicals plays a central role in the formation, progression and rupture of atherosclerotic plaques (Steinburg 1997). The level of oxidized low density lipoprotein (oxLDL) increases in CAD patients and serves as an independent predictor for future cardiac events in these patients (Shimada et al. 2004). Adiponectin is one hormone produced by adipocytes. Its primarily beneficial properties are in relation to insulin sensitivity, inflammation, and atherogenesis. In contrast with the plasma concentrations of other adipokines, those of adiponectin have been found to be lower in subjects with obesity, type 2 diabetes mellitus, and

coronary heart disease than in healthy control subjects (Arita et al. 1999; Hotta et al. 2000; Weyer et al. 2001).

A decade ago, alternative treatment was introduced as a combination therapy to these CAD patients in order to reduce mortality rate and improve quality life. Basically, this treatment concerned about lifestyle modification with the management of risk factors, such as diet control, optimal exercise session, weight reduction and stress management. Several studies indicate that lifestyle intervention can reduce metabolic CAD risk factors in men with diabetes (Roberts et al. 2006), in obese persons (Esposito et al. 2003), in HIV-infected patients with metabolic syndrome (Jatuporn et al. 2003). We previously studied that short-term intensive lifestyle modification program without lipid-lowering drugs increased circulating antioxidants and reduced oxidative stress in patients with CAD (Mather et al. 2008).The aim of this study was to evaluate the short-term effects of LM program on oxidative stress and inflammation marker in CAD patients and study on an in vitro effect of sera obtained from the LM-intervened patients on endothelial cells.

Materials & Methods

The study protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. Written informed consents were obtained from all subjects. Thirty patients with CAD from King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand were recruited in this study and randomized into two groups. All of patients had an angiographically confirmed diagnosis of CAD without prior therapeutic intervention by angioplasty or coronary artery bypass surgery. Patients were excluded if they had any acute coronary syndrome and severe hypertension. The control group participated in all assessments and received ongoing usual care from their physicians. The experimental group patients were prescribed an intensive lifestyle program that included a 10%-fat vegetarian diet, moderate aerobic exercise (walking 30 minutes 6 days weekly), stress management techniques (breathing, imagery and progressive relaxation for a total of 60 minutes daily), smoking cessation, and participation in group support to enhance adherence to the intervention. The program was implemented in 6 months.

At baseline, and 6 months follow-up, all patients completed a questionnaire and weight, waist circumference, and blood pressure were measured. The body mass index (BMI) was calculated as weight (kg)/height (m^2). Blood samples were obtained from each patient after overnight fasts. Serum was separated by centrifugation at 2500g for 10 minutes and stored at -80°C until analyzed. Serum concentration of oxidized LDL level was measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Mercodia AB, Uppsala, Sweden). Protein carbonyls were measured using ELISA kit (Biocell Corporation, New Zealand).

Human coronary artery endothelial cells (HCAECs, Clonetics Corp, San Diego, CA) were cultured in endothelial culture medium (EBM-EGM-MV; Clonetics, San Diego, CA) in a 25-cm^2 flask. They were maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 and 95% air at 37°C. Cells were collected using 0.25% Trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). HCAECs were seeded in a 96-well plate and grown overnight for adequate attachment. On the following day, after removing the medium, the cells were incubated with medium containing pre- and post-intervention sera of patients in both groups for 3 hours before the addition of a chromogenic dye, MTT. The dye was converted by the mitochondrial succinate dehydrogenase in viable cells. Then, the culture plate was incubated at 37°C in a

humidified incubator with an atmosphere of 95% air and 5% CO_2. After 2 hours of incubation, the medium in the 96-well plates was removed and 100 µl of DMSO was added to each well, and mixed thoroughly to dissolve the formazan crystals. Absorbance was measured by using an ELISA plate reader at 570 nm.
The results are presented as a mean±standard deviation. Comparisons were analyzed by unpaired t-tests or matched paired t-tests as appropriate. oxLDL, protein carbonyl and adiponectin pre- and post-intervention values were compared using matched paired Wilcoxon signed-rank tests for non-parametric data.

Results & Discussions

All 30 participants completed the study and both questionnaires. Analysis of clinical and laboratory baseline characteristics revealed no significant difference between groups (Table 1).
This study aimed to determine the short-term effect of LM program in order to reduce oxidation of lipids and proteins and inflammation in patients with CAD. We found that LM program can improve oxLDL and protein carbonyl. After the 6-month intervention, there were significantly decrease in serum oxLDL and protein carbonyls in the experimental group but not significantly change in the control group (Table 2). These findings support the recommendation of our previous study that short-term intensive lifestyle modification program increased circulating antioxidants and reduced oxidative stress in patients with CAD (Mather et al. 2008).

Table 1 Baseline characteristics of patients (Data represent mean ± standard deviation or number of patients.)

Characteristics	Control Group	Experimental Group
Male/female	11/4	13/2
Age (years)	60.73±8.37	66.00±7.06
BMI (kg/m^2)	25.29±2.57	25.45±1.53
oxLDL (U/L)	40.63±17.49	40.86±16.91
Protein carbonyl (nmol/mg)	0.64±0.51	0.64±0.36
Adiponectin (ug/ml)	5.16±1.93	5.87±2.83

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 2 Levels of BMI, oxLDL, protein carbonyl and adiponectin at baseline and 6 months in the lifestyle modification program in the control and experimental groups

	Control group		Experimental group	
	baseline	At 6 months	baseline	At 6 months
BMI (kg/m^2)	25.29±2.57	25.22±2.43	25.45±1.53	24.96±1.43
oxLDL (U/L)	40.63±17.49	45.68±20.18	40.86±16.91	32.47±7.72*
Protein carbonyl (nmol/mg)	0.64±0.51	0.72±0.38	0.64±0.36	0.47±0.28*
Adiponectin (ug/ml)	5.16±1.93	5.04±1.92	5.87±2.83	5.29±2.21

*p<0.05, p-values were determined by Student's paired t-test or matched paired Wilcoxon test for differences from baseline

In this study, we found that level of adiponectin was no significant change in both groups after the 6-month intervention. Serum adiponectin correlates to body weight. From our study, body mass index (BMI) of patients in both groups was no change after intervention, which confirms the findings in other studies (Li et al. 1998).
Furthermore, we study on an in vitro effect of sera obtained from the LM-intervened patients on endothelial cells. We added sera to cultured HCAEC for 3 h and measured cell viability by MTT colorimetric assay. The percent cell viability in experimental group was increased after intervention (77.74±5.46 and 80.03±4.79 for pre-intervention and post-intervention, respectively) whereas sera from patients in the control group resulted in lower cell viability at the end of the program (83.08±7.82 and 77.55±11.26 for pre-intervention and post-intervention, respectively) (Figure 1). These results correlate with serum oxidative stress levels. Previous studies showed that oxidative stress involves apoptosis and ox-LDL can induces apoptosis in cultured HCAEC. Thus, these finding indicate that circulating oxLDL may affect to endothelial cell viability.

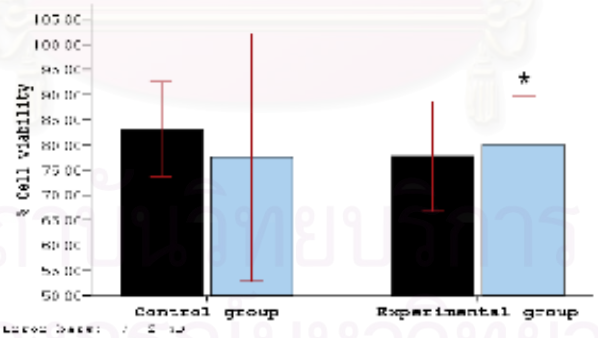


Figure 1 Cell viability assessed by MTT colorimetric method. Results are presented as mean of % cell viability. Black bars are the data at baseline and blue bars are the data at 6 months of the study. *p<0.05 by Student's paired t-test.

Conclusions

Our results indicate that lifestyle modification program decreases oxidative stress and increases endothelial cell viability in the patients with CAD. It is strongly recommended as an efficient strategy to decrease the risk of cardiovascular development.

Acknowledgement

We thank Biochemistry and Molecular Biology of Metabolic Disease Research Unit (BMD-RU), Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

References

1. Steinburg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. J. Biol. Chem. 1997; 272: 20963-6.
2. Shimada, K., H. Mokuno, E. Matsunaga, T. Miyazaki, K. Sumiyoshi, K. Miyauchi, and H. Daida. Circulating oxidized low-density lipoprotein is an independent predictor for cardiac event in patients with coronary artery disease. Atherosclerosis 2004; 174: 343-347.
3. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical decrease of an adiposespecific protein, adiponectin, in obesity. Biochem Biophys Res Commun 1999; 257: 79-83.
4. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 1595-9.
5. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 1930 -5.
6. Roberts CK, Won D, Pruthi S, Lin SS, Barnard RJ. Effect of a diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation and monocyte adhesion in diabetic men. Diabetes Research and Clinical Practice 2006; 73: 249-259.
7. Esposito K, Pontillo A, Palo CD, Giugliano G, Masella M, Marfella R, Giugliano D. Effect of Weight Loss and Lifestyle Changes on Vascular Inflammatory Markers in Obese Women: A Randomized Trial. JAMA. 2003; 289: 1799-1804.
8. Fitch KV, Anderson EJ, Hubbard JL, Carpenter SJ, Waddell WR, Caliendo AM, Grinspoon SK. Effects of a lifestyle modification program in HIV-infected patients with the metabolic syndrome. AIDS 2006; 20: 1843-1850.
9. Jatuporn S, Sangwatanaroj S, Saengsiri A, Rattanapruks S, Srimahachota S, Uthayachalerm W, Kuanoon W, Panpakdee O, Tangkijvanich P, Tosukhowong P. Short-term effects of an intensive lifestyle modification program on lipid peroxidation and antioxidant systems in patients with coronary artery disease. Clinical Hemorheology and Microcirculation 2003; 29: 429-436.
10. Mather KJ, Funahashi T, Matsuzawa Y, Edelstein S, Bray GA,.Kahn SE, Crandall J, Marcovina S, Goldstein B, Goldberg R. Adiponectin, Change in Adiponectin, and Progression to Diabetes in the Diabetes Prevention Program. Diabetes 2008; 57: 980-986.
11. Li DY, YANG B, Mehta JL. Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas. Am J Physiol Heart Circ Physiol 1998; 275: 568-576.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวรัตติพร วุ่นสุวรรณ
วัน เดือน ปีเกิด	20 กรกฎาคม พ.ศ.2526
สถานที่เกิด	นครศรีธรรมราช
วุฒิการศึกษา	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับสอง) สาขาชีววิทยา ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อปี พ.ศ.2548
ประสบการณ์การทำงาน	พนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่เดือนกันยายน พ.ศ.2548 ถึง เดือนมิถุนายน พ.ศ.2550
ผลงานทางวิชาการที่ตีพิมพ์	Boonla, C., Wunsuwan, R., Tungsanga, K., Tosukhowong, P. 2007. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine is elevated in patients with nephrolithiasis. Urological Research 35, 4: 185-191. Honglertsakul, C., Opanuraks, J., Kittikowit, W., Boonla, C., Wunsuwan, R., Tosukhowong, P. 2007. Excretions of Oxidative Stress Biomarkers and Sialic Acid Associated with Severity of Bladder Tumors. The THAI Journal of SURGERY 28: 133-137.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย