คณะสหเวชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รายงานวิจัยงบประมาณแผ่นดินปี พ.ศ. 2540
เรื่อง

การเสริมเมมเบรนของเซลล์เกล็ดเลือดที่มีกรดไขมันโอเมก้าสามเพื่อวัตถุประสงค์พิเศษทางงานธนาคารโลหิต

(Enrichment of Platelet Membranes with Omega-3 Fatty Acid Containing Phospholipids for Special Purpose in Blood Transfusion Medicine)

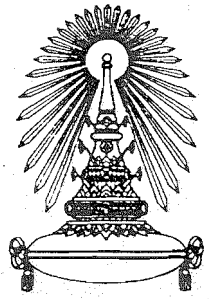
โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.วินัย ดะห์ลัน

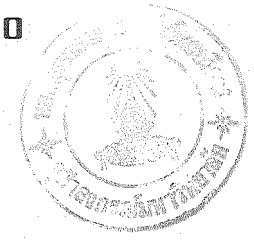
ศูนย์วิจัยไขมันและน้ำมัน
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กันยายน 2541

จฬ
สว 15
010429



คณะสหเวชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รายงานวิจัยงบประมาณแผ่นดินปี พ.ศ. 2540
เรื่อง



การเสริมเมมเบรนของเซลล์เกล็ดเลือดที่มีกรดไขมันโอเมก้าสามเพื่อวัตถุประสงค์พิเศษทางงานธนาคารโลหิต

(Enrichment of Platelet Membranes with Omega-3 Fatty Acid Containing Phospholipids for Special Purpose in Blood Transfusion Medicine)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.วินัย ดะห์ลัน

ศูนย์วิจัยไขมันและน้ำมัน
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
กันยายน 2541

I19691531 - 8 S.A. 2545

การเสริมเมมเบรนของเซลล์เกล็ดเลือดที่มีกรดไขมันโอเมก้าสามเพื่อวัตถุประสงค์พิเศษทางงานธนาคารโลหิต

(Enrichment of Platelet Membranes with Omega-3 Fatty Acid Containing Phospholipids for Special Purpose in Blood Transfusion Medicine)

หัวหน้าโครงการวิจัย

ร.ศ.ดร.วินัย ดะห์ลัน	ศูนย์วิจัยไขมันและน้ำมัน คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ร่วมวิจัย

อ.สุพันธิตรา ชาญประเสริฐ	คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ภญ.อรุณรัตน์ จันทนขจรฟุ้ง	ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
ภญ.มานิดา ฉายเพชรากร	ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
น.ส.โสภณา จาตนิลพันธ์	หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
น.ส.พิมพ์พร อินนพคุณ	หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ.ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล	ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ และ สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ จส
ฉ. 15
เลขทะเบียน 010429
วัน.เดือน.ปี 24 เม.ย 44

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ดำเนินงานด้านการทดลองและการวิเคราะห์ด้านชีวเคมีที่ศูนย์วิจัยไขมันและน้ำมัน และหน่วยวิจัยชีวเคมีลิพิด คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การจัดเตรียมตัวอย่างเกล็ดเลือด เม็ดเลือดแดงและพลาสม่าทำขึ้นที่ศูนย์บริการโลหิต สภากาชาดไทย การจัดเตรียมวัตถุดิบและการจัดเตรียมเลซิทินบางส่วนทำที่หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์

งานส่วนสำคัญคือการจัดเตรียมเกล็ดเลือด สำเร็จลุล่วงลงด้วยการทุ่มเทใส่ใจของบุคคลากรแห่งศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ได้แก่ นางประมวล เวพาสยนันท์ และนางทองหยิบ นาคแดง

ดร.อรวรรณ ภู่ชัยวัฒนานนท์ แห่งภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ฝึกอบรมนิสิตที่ปฏิบัติงานในโครงการวิจัย

นิสิตระดับปริญญาตรีหลักสูตรเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ ได้แก่ น.ส.พรสิริ วรรณดิลก น.ส.สุชชนา แทบประสิทธิ์ น.ส.สุวาณี อรุณกาญจนา นายสมคิด จารุวัฒนวงศ์ น.ส.ภัทรพร รอดเข็ม และ น.ส.เมธาวี ทองดี ช่วยงานวิเคราะห์ทางชีวเคมีบางส่วน

สำนักงบประมาณอนุมัติงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2540 ให้แก่งานวิจัยชิ้นนี้ผ่านคณะสหเวชศาสตร์ ผศ.ดร.ปิยพร ณ นคร คณบดีให้การสนับสนุนมาโดยตลอด ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดเอื้อเฟื้อด้านสถานที่ อุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์บางส่วน ผู้บริหารและเจ้าหน้าที่สำนักงานเลขานุการของคณะสหเวชศาสตร์ให้ความช่วยเหลือด้านการจัดการ

ฝ่ายวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สนับสนุนงบประมาณบางส่วนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของการจัดตั้งศูนย์วิจัยไขมันและน้ำมัน คณะสหเวชศาสตร์ อันเป็นรากฐานสำคัญที่ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้เกิดขึ้นได้

บุคคลและหน่วยงานที่เอ่ยนามและที่ยังมิได้เอ่ยนามอีกบางส่วนต่างมีส่วนเกี่ยวข้องกับความสำเร็จของโครงการวิจัยชิ้นนี้โดยถ้วนทั่ว คณะผู้วิจัยขอขอบคุณอย่างยิ่งมา ณ ที่นี้

คณะผู้ทำวิจัย

กันยายน 2541

การเสริมเมมเบรนของเซลล์เกล็ดเลือดที่มีกรดไขมันโอเมก้าสามเพื่อวัตถุประสงค์พิเศษทางงานธนาคารโลหิต

(Enrichment of Platelet Membranes with Omega-3 Fatty Acid Containing Phospholipids for Special Purpose in Blood Transfusion Medicine)

วินัย ดะห์ลัน[1], สุพันธิตรา ชาญประเสริฐ[1], อรุณรัตน์ จันทนขจรฟุ้ง[2], มานิดา ฉายเพชรากร[3], โสภณา จาตนิลพันธ์[1], พิมพ์พร อินนพคุณ[1], สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล[3]

[1]ศูนย์วิจัยไขมันและน้ำมัน คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย [2]ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย และ [3]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความเป็นมา กรดไขมันโอเมก้า 3 (n-3 PUFA) ช่วยลดอุบัติการณ์เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด โดยการเข้าไปแทนที่กรดไขมันโอเมก้า 6 (n-6 PUFA) บนฟอสโฟลิปิด (PL) ของเมมเบรนเกล็ดเลือด ทำให้สัดส่วน n-3/n-6 PUFA บนเมมเบรนเปลี่ยนแปลงส่งผลต่อการสร้างพรอสตาแกลนดิน

วัตถุประสงค์ เพื่อหาวิธีการเพิ่มสัดส่วน n-3/n-6 PUFA บนเมมเบรนของเกล็ดเลือดโดยแช่เกล็ดเลือดของคนปกติในอิมัลชันไขมันเตรียมจากปลาป่นซึ่งเป็นชนิดที่มี n-3 PUFA สูงใน PL

วิธีการ นำปลาป่นชนิดต่างๆมาศึกษาปริมาณ n-3 PUFA ใน PL จากนั้นนำ PL เตรียมเป็นอิมัลชันไขมัน (FM-LRFE) นำเกล็ดเลือดเข้มข้นที่มีจำนวนเซลล์ 1.86 $\times 10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรแช่กับ FM-LRFE ที่ความเข้มข้นของ PL 0, 100, 300 และ 600 mg/dl เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ 22 องศาเซลเซียส ทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการแช่และตรวจสอบกรดไขมันที่เปลี่ยนแปลงบนเมมเบรนของเกล็ดเลือด

ผลการทดลอง การแช่เกล็ดเลือดกับ FM-LRFE ที่ระดับ 600 mg PL/dlในภาวะไม่มีพลาสม่าสัดส่วนของ n-3/n-6 PUFA ของเกล็ดเลือดมีค่าเพิ่มขึ้นมากกว่าภาวะที่มีพลาสมา 1.8 เท่า กรดไขมันที่เปลี่ยนแปลงคงสภาพอยู่ได้ไม่น้อยกว่า 5 ชั่วโมง การแช่กับ FM-LRFE ความเข้มข้นต่างๆ สัดส่วนของ n-3/n-6 PUFA เพิ่มขึ้นตามตามสมการ $Y= 0.16 + 3E\text{-}04X$, $p<0.001$ เมื่อ X เป็นค่าความเข้มข้นของ PL ใน FM-LRFE และ Y คือสัดส่วนของ n-3/n-6 PUFA ที่ความเข้มข้น FM-LRFE 600 mg PL/dl สัดส่วน n-3/n-6 PUFA สูงขึ้น 2.43 เท่า n-3 PUFA สูงขึ้น 2.15 เท่าขณะที่ n-6 PUFA ลดลง 0.89 เท่า

สรุปผลการทดลอง องค์ประกอบของ PUFA บนเมมเบรนของเกล็ดเลือดหรือ n-3/n-6 PUFA สามารถปรับเปลี่ยนได้ FM-LRFE ทำหน้าที่เป็นตัวจ่าย n-3 PUFA ให้กับ PL ของเกล็ดเลือด สัดส่วนของ n-3/n-6 PUFA ที่เพิ่มขึ้นบนเมมเบรนของเกล็ดเลือดคาดว่าจะมีประโยชน์ต่อการสร้างสารพรอสตาแกลนดินชนิดต่างๆส่งผลยับยั้งการเกิดลิ่มเลือดอันเป็นผลดีต่อการป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด

บทนำ

ความเป็นมา

โรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular disease, CVD) เป็นปัญหาทางสุขภาพที่สำคัญของประเทศไทยและประเทศอื่นทั่วโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศตะวันตก ในกรณีของประเทศไทย โรคนี้เป็นสาเหตุ การตายอันดับ 1 ต่อเนื่องกันมาเป็นเวลาหลายปี นอกจากนี้ยังนับเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการป่วย ทรมาน พิการ อัมพาต สร้างปัญหาทางสุขภาพขึ้นมากมาย บั่นทอนประสิทธิภาพ ทรัพยากรมนุษย์และสังคมต้องสูญเสียทรัพย์สินเพื่อการรักษาพยาบาลเป็นจำนวนเงินมากมายในแต่ละปี

CVD เกิดขึ้นจากหลายสาเหตุ ในบรรดาสาเหตุเหล่านั้นการมีภาวะโภชนาการเกินนับเป็นสาเหตุอันดับต้น การเกิดโรค CVD มาจาก 2 กลไกหลักคือการจับตัวสะสมกันของไขมันตามผนังหลอดเลือด (atherogenesis) และการรวมตัวกันเกิดลิ่มเลือด (thrombogenesis) กลไกแรกเป็นเหตุให้หลอดเลือดเกิดการตีบตัน ในขณะที่กลไกที่สองนอกจากจะเป็นเร่งกลไกแรกแล้วยังทำให้เกิดการอุดตันอย่างเฉียบพลันของหลอดเลือด หากการอุดตันเกิดขึ้นในบริเวณหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงสมองจะก่อให้เกิดภาวะเลือดหยุดการเลี้ยงสมอง (stroke) เป็นผลให้เกิดการพิการหรืออัมพาตขึ้นได้ หากการอุดตันเกิดขึ้นที่บริเวณหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงหัวใจจะทำให้เกิดอาการกล้ามเนื้อหัวใจตาย (myocardial infarction) หรือหัวใจล้มเหลว (BNFTF 1994) การป้องกันและรักษา CVD ทำได้โดยยับยั้งหรือลดการเกิด 2 กลไกหรือลดเพียงกลไกใดกลไกหนึ่งที่กล่าวถึงข้างต้น

สารอาหารจำนวนหนึ่งช่วยลดความเสี่ยงของ CVD ได้ สารอาหารสองชนิดในจำนวนนั้นคือ กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงชนิดโอเมก้า 3 (omega-3 polyunsaturated fatty acid, n-3 PUFA) และเลซิทิน (lecithins) (BNFTF, 1994) บทบาทหนึ่งของ n-3 PUFA ในการช่วยลดความเสี่ยงของการเกิด CVD คือมันช่วยลด thrombogenesis โดยผลของพรอสตาแกลนดินกลุ่ม E_3 (PGE_3) ซึ่งสร้างขึ้นจาก n-3 PUFA ตัวหนึ่งคือ eicosapentaenoic acid (EPA) หรือ C20:5 n-3 นอกจากนี้ n-3 PUFA อีกตัวหนึ่งคือ docosahexaenoic acid (DHA) หรือ C22:6 n-3 และเลซิทินต่างแสดงบทบาทเสริมทางด้านอื่นช่วยทำให้การเกิด CVD ลดลง (Simopoulos 1997) การที่ n-3 PUFA และเลซิทินจะทำหน้าที่ป้องกันความเสี่ยงต่อ CVD ได้เต็มประสิทธิภาพ ทั้งกรดไขมันและเลซิทินจะต้องอยู่บนเมมเบรนของเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์เกล็ดเลือด โดยเป็นที่รับรู้กันว่า n-3 PUFA ที่เป็นต้นตอการสร้าง PGE_3 ถูกปลดปล่อยออกมาจากฟอสโฟลิปิด (PL) บนเมมเบรนของเกล็ดเลือด นอกจากนี้เกล็ดเลือดยังทำหน้าที่แจกจ่ายเลซิทินและกรดไขมันอื่นๆ ให้แก่ เซลล์เลือด/เนื้อเยื่อ/ไลโปโปรตีนต่างๆได้ การมี n-3 PUFA บนเมมเบรนจึงสร้างประโยชน์แก่ร่างกาย การเสริม n-3 PUFA บนเมมเบรนของเกล็ดเลือดทำได้โดยวิธีการรับประทาน n-3 PUFA เป็นระยะเวลายาวนาน หากมี

วิธีการใดที่จะเสริมกรดดังกล่าวได้โดยตรงบนเมมเบรนเกล็ดเลือดย่อมลดระยะเวลาลงอันจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยอย่างมหาศาล

กรดไขมัน n-3 PUFA ช่วยลดความเสี่ยงของอุบัติการณ์เกิด CVD ในประชากรหลายกลุ่ม เช่น ชาวเอสกิโมและญี่ปุ่น (Simopoulos, 1997; BNFTF, 1994; Dahlan et al., 1996) กลไกที่ n-3 PUFA ช่วยลดอุบัติการณ์เกิด CVD อธิบายได้ทั้งการช่วยลดการสะสมไขมันบนผนังหลอดเลือด (atherogenesis) และการจับตัวเป็นลิ่มเลือด (thrombogenesis) ซึ่งต่างเป็นกลไกหลักที่ทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด ในกรณีของกลไกแรก n-3 PUFA ยับยั้งการสังเคราะห์ไขมันไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides, TG) และอะโปโปรตีน B_{100} (apo B_{100}) ทำให้ไลโปโปรตีนชนิด very low density liporpotein (VLDL) ลดปริมาณลงในกระแสเลือด (BNFTF, 1994) Simopoulos (1991, 1997) ได้สรุปบทบาทของ n-3 PUFAในกลไก thrombogenesis ไว้ดังนี้ 1) ลดการสร้าง PGE_2 และทรอมบ็อกเซน A_2 (thromboxane A_2, TXA_2) ซึ่งเป็นสารที่ลดการจับตัวกันของเกล็ดเลือด 2) เพิ่ม TXA_3 ซึ่งมีส่วนร่วมต่อการจับตัวของเกล็ดเลือดค่อนข้างน้อย นอกจากนี้ยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างสารอนุพันธ์ของพรอสตาแกลนดินอีกหลายชนิด นำไปสู่ผลของการลดการจับตัวกันของเกล็ดเลือด ผลที่ติดตามมาคือความเสี่ยงต่อการเกิด CVD ลดลงในกลุ่มผู้ที่รับประทาน n-3 PUFA ซึ่งมีมากในปลาทะเลและสัตว์ทะเลเป็นประจำ

กรดไขมัน n-3 PUFA ที่ทำหน้าที่ข้างต้นเป็นกรดไขมันที่อยู่บน PL ของเมมเบรนของเซลล์ และเซลล์ที่สำคัญที่ทำหน้าที่นี้คือเกล็ดเลือด (platelet) ซึ่งเป็นเซลล์เลือดชนิดหนึ่งที่แสดงบทบาทในการห้ามเลือดหลายประการ การแข็งตัวของเลือดเป็นประโยชน์ต่อชีวิต อย่างไรก็ตามการจับตัวกันของเกล็ดเลือดในหลอดเลือดกลับเป็นกลไกหนึ่งที่เร่งให้เกิด CVD การลดการทำหน้าที่ของเกล็ดเลือดจึงเป็นวิธีการหนึ่งในการลดความเสี่ยงของ CVD วิธีการที่เป็นที่รู้จักกันคือการใช้ n-3 PUFA เข้าไปแทนที่ n-6 PUFA บนเมมเบรนของเกล็ดเลือด n-6 PUFA ตัวสำคัญคือ linoleic acid (LA) หรือ C18:2 n-6 และ arachidonic acid (AA) หรือ C20:4 n-6 มีในปริมาณสูงบนเมมเบรนของเกล็ดเลือด หากร่างกายได้รับ n-3 PUFA เป็นประจำ n-3 PUFA จะเข้าไปแทนที่ n-6 PUFA บนผนังเกล็ดเลือด (Dahlan et al., 1996) ส่งผลให้การสร้างสาร eicosanoids เปลี่ยนแปลงไป สัดส่วนของ E_3/E_2 มีค่าสูงขึ้นซึ่งทำให้การรวมตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) ช้าลง เป็นผลดีต่อการป้องกันและรักษา CVD (Broekman et al., 1976; Grimminger et al., 1996)

การศึกษาของ Dyerberg และคณะพบความเกี่ยวข้องระหว่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวบนผนังเมมเบรนของเกล็ดเลือดกับการแข็งตัวของเลือดอย่างน่าสนใจคือเกล็ดเลือดของชาวเอสกิโมมีสัดส่วน n-3 PUFA ในปริมาณสูง ขณะที่เกล็ดเลือดของชาวเดนมาร์คมี n-6 PUFA ค่อนข้างสูงซึ่งเป็นเหตุผลหนึ่งในการอธิบายว่าเหตุใดชาวเอสกิโมจึงมีอุบัติการณ์เกิด CVD ต่ำกว่าชาวเดนมาร์ค (Bang et al., 1976; Dyerberg et al.,

1978; Dyerberg, 1986) เซลล์เลือดทุกชนิดมีครึ่งชีวิตไม่ยืนยาวนัก ขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงของลิพิดบนเมมเบรนโดยตลอดชั่วอายุของมัน ทั้งนี้โดยการแลกเปลี่ยนกรดไขมันและฟอสโฟลิปิดระหว่างเมมเบรนของเซลล์เลือดกับไลโปโปรตีนในเลือดและกรดไขมันอิสระ (Dahlan, 1989; Dahlan, 1995; Dahlan et al., 1996) การศึกษาของผู้วิจัยพบว่าไลโปโซมของ PL สามารถทำหน้าที่ส่งผ่านลิพิดและกรดไขมันให้กับเซลล์เลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ การเปลี่ยนโครงสร้างของกรดไขมันบนเมมเบรนเซลล์เลือดจึงสามารถทำได้โดยการใช้ไลโปโซม (Dahlan et al., 1997) ผู้วิจัยรายงานไว้เมื่อปี 2535 ว่าเมื่อทำการหยดอิมัลชันไขมันเข้าสู่กระแสเลือด เมมเบรนของเซลล์เม็ดเลือดแดงเปลี่ยนแปลงโครงสร้างลิพิดไปดังนี้ คอเลสเตอรอลลดต่ำลงและฟอสโฟลิปิดมีระดับสูงขึ้น เหตุผลที่ทำให้เมมเบรนเปลี่ยนแปลงไปดังกล่าวอธิบายได้จากการปรากฏของ ไลโปโซมในอิมัลชันไขมันในปริมาณที่สูง (Dahlan et al., 1992a) ในปีเดียวกันผู้วิจัยรายงานถึงการให้สารอิมลชันไขมันชนิดที่มี linoleic acid (LA) สูงในผู้ป่วยด้วยโรค Inflammatory bowel disease ที่ได้รับอาหารทั้งหมดทางหลอดเลือดดำ (total parenteral nutrition, TPN) จำนวน 5 คนเป็นเวลานาน 3 เดือน ปรากฏว่า เมมเบรนของเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยมี LA สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ขณะที่กรดไขมัน arachidonic (AA) และ DHA ลดปริมาณลง แสดงให้เห็นว่า LA สามารถเข้าไปแทนที่ AA และ DHA บนเมมเบรนได้ (Dahlan et al., 1992b) ต่อมาผู้วิจัยทำการทดสอบศักยภาพของไลโปโซมที่มี n-3 PUFA ใน PL ปริมาณสูงที่มีต่อความคงตัวของเมมเบรนเซลล์เม็ดเลือดแดง พบว่าเมมเบรนรักษาคอเลสเตอรอลได้ดีกว่าการใช้ไลโปโซมของเลซิทินจากไข่ไก่และถั่วเหลือง ขณะเดียวกันยังพบการส่งผ่านกรดไขมันระหว่างไลโปโซมและเซลล์เลือดเกิดขึ้นได้แม้ไม่มีการแลกเปลี่ยนลิพิด (Dahlan et al., 1995) จากข้อมูลที่มีอยู่ทั้งหมดทำให้ผู้วิจัยทำการศึกษาแนวทางการเปลี่ยนแปลงกรดไขมัน m-3 PUFA และ n-6 PUFA บน PL ของเมมเบรนของเกล็ดเลือดโดยใช้ไลโปโซมทำหน้าที่เป็นตัวพากรดไขมันจ่ายให้แก่เมมเบรนของเซลล์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาปริมาณและคุณภาพของเลซิทินที่สกัดได้จากผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำคือปลาป่น นำเลซิทินที่ได้ไปเตรียมไลโปโซมหรืออิมัลชันไขมันที่มี เลซิทินชนิดกรดไขมันโอเมก้าสามปริมาณสูงเป็นอิมัลซิฟายเออร์ (emulsifier)
2. ศึกษาระยะเวลาและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิพิดระหว่างเกล็ดเลือดและไลโปโซมหรืออิมัลชันไขมัน
3. ศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างลิพิดของเมมเบรนของเซลล์เกล็ดเลือดโดยใช้ไลโปโซมเป็นตัวกลางพากรดไขมันและฟอสโฟลิปิดสู่ เซลล์ อันเป็นแนวทางในการเพิ่มสัดส่วนของ n-3 PUFA ทั้งชนิด EPA และ DHA บนเมมเบรนของเกล็ดเลือด

4. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของลิพิดและกรดไขมันชนิดต่างๆภายหลังการแช่เกล็ดเลือดกับอิมัลชันไขมันที่มีเลซิทินชนิดโอเมก้า 3 สูง

นำข้อมูลไปใช้ศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาเกล็ดเลือดที่มีกรดไขมันโอเมก้าสามปริมาณสูงเพื่อใช้ในงานทางธนาคารโลหิต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เทคนิคและวิธีการวิจัย

การจัดเตรียมวัสดุอุปกรณ์

ปลาป่น

การเตรียมเลซิทินที่มีกรดไขมันโอเมก้า 3 ในปริมาณสูงจัดเตรียมโดยใช้ปลาป่นเป็นวัตถุดิบ ดังที่รายงานไว้แล้วในรายงานอื่น (Dahlan et al., 1996) ปลาป่นที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นปลาป่นนำเข้าจากประเทศเดนมาร์ค (Danish fishmeal หรือ DFM) สั่งซื้อผ่านบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ และปลาป่นไทยหรือปลาป่นท้องถิ่น (Local fishmeal หรือ LFM) สั่งซื้อจากโรงงานเสรีบ้านเพ จังหวัดระยอง ปลาป่นประเภทหลังนี้มีทั้งหมด 4 เกรด คือ 1-4

เกล็ดเลือด

ตัวอย่างเกล็ดเลือดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเกล็ดเลือดที่แยกจากเลือดของอาสาสมัครที่บริจาคโลหิตผ่านศูนย์บริการโลหิต สภากาชาดไทย อาสาสมัครทุกคนเป็นคนปกติ สุขภาพแข็งแรง มีน้ำหนักตัวไม่น้อยกว่า 45 กิโลกรัม อายุระหว่าง 17-60 ปี ไม่รับประทานยาประเภท anticoagulants, antiplatelet agents, non-steroidal antiinflammatory drugs หรือ aspirin หากเป็นสตรีต้องไม่อยู่ระหว่างมีประจำเดือนหรือมีครรภ์ โลหิตปลอดจากเชื้อโรคที่ติดต่อผ่านทางโลหิต เช่น Hepatitic virus, HIV, malaria ในระหว่าง 3 ปี อาสาสมัครมีจำนวนทั้งสิ้น 122 คน เป็นชาย 100 คน หญิง 22 คน มีหมู่เลือด A, AB, B และ O จำนวน 6, 8, 97 และ 11 คนตามลำดับ

สารเคมีและเครื่องแก้ว

สารเคมีและเครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลองอยู่ที่ศูนย์วิจัยไขมันและน้ำมัน คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เครื่องแก้วที่สำคัญเช่นหลอดแก้ว Borosilicate test tube พร้อมจุกเกลียวปิดชนิด Teflon lining ที่ใช้ในการเตรียมวิเคราะห์กรดไขมันต้องทำการตรวจสอบก่อนว่าเมื่อปิดฝาแน่นสนิทแล้วไม่มีการรั่วซึมใดๆของสารภายในหากเกิดรอยรั่วใดๆให้ทิ้งหรือระงับการใช้เครื่องแก้วเหล่านั้นทันที ทั้งนี้เนื่องจากรอยรั่วที่เกิดขึ้นจะทำให้การวิเคราะห์สัดส่วนของกรดไขมันเกิดปัญหา กรดไขมันแต่ละตัวมีจุดเดือดไม่เท่ากัน การสูญเสียกรดไขมันหากเกิดขึ้นระหว่างการเตรียม methylation รอยรั่วอาจทำให้กรดไขมันสูญเสียออกไปอย่างไม่ได้สัดส่วนกันสร้างปัญหาต่อการแปลผล เครื่องแก้วทุกชิ้นที่ใช้ในการทดลองผ่านการล้างด้วยกรดและชะล้างสองครั้งด้วยสารละลาย dichloromethane-methanol (2:1, v/v) และเป่าให้แห้งก่อนที่จะนำมาใช้ทุกครั้ง

สารเคมีโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารมาตรฐานของกรดไขมันและลิพิดทุกตัวเป็นสารเคมีจากบริษัท Sigma (St- Louis, MO, USA) กรดไขมันมาตรฐานที่ใช้อยู่ในสองรูปแบบคือกรดไขมันอิสระ (FA) และในรูปของเมธิลเอสเตอร์ (FAME) สารมาตรฐานอินเทอนัล (internal standard) ที่ใช้ในการทดลอง คือ C15, C17, C19, คอเลสเตอริลเอสเตอร์ชนิด C-15 (CE-C15), ไตรกลีเซอไรด์ชนิด C15 (TG-C15) ฟอสโฟลิปิดชนิด C15 (PL-C15) การเตรียมกรดไขมันทั้งในส่วนของกรดไขมันมาตรฐานในรูปของ C15, CE-C15, TG-C15, PL-C15 และในส่วนของกรดไขมันในตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas chromatograph ต้องผ่านกระบวนการเปลี่ยนกรดไขมันให้อยู่ในรูปของเอสเตอร์โดย transesterification ใช้สาร acetylchloride เป็นตัวทำปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิคของ Lepage และ Roy (1984) สารละลายอินทรีย์ทุกตัวที่ใช้ในงานวิจัยจะผ่านกระบวนการกลั่นซ้ำเพื่อลดปัญหาของสารปนเปื้อนโดยกลั่นที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส โดยใช้ rotary evaporator ของ Buchi Labortechnik AG. Flawil ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ ทำการเติมสารกันหืนได้แก่ BHT ในสารละลายอินทรีย์ทุกตัวให้มีความเข้มข้นของ BHT ในสารละลายอินทรีย์ 5 mg/dl ในกรณีที่ใช้สารอินทรีย์นั้นในกระบวนการทั่วไป หากเป็นสารอินทรีย์ที่ใช้ในงาน thin-layer chromatography (TLC) เติมให้ได้ความเข้มข้น 50 mg/dl (Philips and Dodge, 1967)

แผ่น TLC ที่ใช้ในงานวิเคราะห์ทุกแผ่นผ่านการทำความสะอาดก่อนโดยการแช่ในสารละลาย dichloromethane-methanol (2:1, v/v) ให้สารละลายชะสารปนเปื้อนที่อาจมีอยู่กระทั่งวิ่งขึ้นไปที่ขอบแผ่นจากนั้นจึงทำการชะออกโดยการแช่ปลายในสารละลาย dichloromethane-methanol ทำการล้างเช่นนี้สองครั้งก่อนที่จะอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสในเวลา 30 นาที จึงจะนำไปใช้ สารอินทรีย์บางชนิดเป็นอันตรายต่อสุขภาพในกรณีเช่นนี้ให้ใช้ toluene แทน benzene และใช้ dichloromethane แทน chloroform ซึ่งสารอินทรีย์ที่ถูกทดแทนทั้งสองชนิดจัดเป็นสารก่อมะเร็งจึงเลี่ยงการใช้

เครื่องมือวิทยาศาสตร์

เครื่องมือทุกชิ้นติดตั้งอยู่ที่ศูนย์วิจัยไขมันและน้ำมัน คณะสหเวชศาสตร์ ได้แก่

1 . Gas Chromatograph 8000 series , Fisons Instruments, Italy

2. Rotary evaporator , model R −114 Buchi , Switzerland

3. Nitrogen evaporator / heater / stirring module , Pierce, IL, USA

4. Sandbath, Gerhardt, Bonn, Germany

5. Spectrophotometer UV −1201, Shimadzu, Tokyo, Japan

6. Vacuum system, model B −169 Buchi, Switzerland

7. Electronic balance with 3 digits, Scaltec SBA 41, Germany

8. Electronic balance with 4 digits, Mettler Toledo, Germany

9. Shaking water bath, model GFL 1083, GFL, Germany
10. Suction pump, model 809 N Kataspir, Medel Italiano, Parma, Italy
11. Refrigerated centrifuge, Hitashi, himac CF7D2, Japan
12. Centrifuge, Kokusan H 11 n series, Tokyo, Japan
13. Water bath, model 83, Thelco, Chicago, IL, USA
14. Hot air oven, Thelco, GCA / Precision Scientific Group, IL, USA
15. Suction pump, model 523-U4-G21DX, MI, USA
16. Ultra sonic bath, Decon FS 400 b, UK
17. Magnetic stirrer, model 815359, INK Laboratechnik, Germany
18. Farma Bio-freezer (Farma Scientific, Marietta, Ohio, USA.)
19. TLC plate scraping system (ประดิษฐ์ขึ้นเอง)

การเตรียมไลโปโซมที่มีกรดไขมันโอเมก้า 3 ปริมาณสูง

การสกัดไขมันออกจากวัตถุดิบ

ปลาป่นมีไขมันประมาณ 5-15% การสกัดไขมันโดยใช้หลักการของ Bligh และ Dryer (1959) ใช้ dichloromethane และ methanol เป็นสารละลายอินทรีย์หลัก ทำการอบปลาป่นที่ความร้อน 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 30 นาทีก่อนทำการสกัดทั้งนี้เพื่อทำลายเอนไซม์ที่อาจทำงานอยู่ภายในปลาป่น ทำการสกัดสามครั้งโดยเทคนิคเดียวกันเพื่อให้ได้ปริมาณไขมันออกมามากที่สุดโดยการสกัดปลาป่นครั้งแรกหนึ่งครั้ง ทำการกรองด้วยกระดาษกรองจากนั้นนำกากปลาป่นที่ได้จากการกรองมาทำการสกัดอีกสองครั้ง นำสารละลายอินทรีย์ที่ได้จากการสกัดทั้งสามครั้งรวมเข้าด้วยกันแล้วระเหยสารละลายอินทรีย์ออกภายใต้สภาพความดันต่ำด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ความร้อน 40 องศาเซลเซียส ไขมันที่ละลายอยู่ในสารละลายอินทรีย์จะเหลือค้างอยู่นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสจนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่ ชั่งและบันทึกน้ำหนักทุกครั้ง ไขมันที่สกัดได้ด้วยเทคนิคนี้จัดให้เป็นไขมันทั้งหมด (total fat) ที่พบในปลาป่น การเก็บไขมันทำโดยการเก็บภายใต้ก๊าซไนโตรเจนที่ไร้ออกซิเจน (oxygen-free nitrogen) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสโดยใช้ตู้เย็น Farma Bio-freezer (Farma Scientific, Marietta, Ohio, USA.)

ไขมันที่สกัดได้นี้นำไปวิเคราะห์

1 . Crude fat content โดยการชั่งน้ำหนัก

2. Class or profile of lipids โดยการนำไขมันไปแยกด้วยเทคนิค TLC ใช้สารละลายอินทรีย์ n-hexane-diethyl ether และ glacial acetic acid ตามเทคนิคมาตรฐาน (Dahlan 1989)

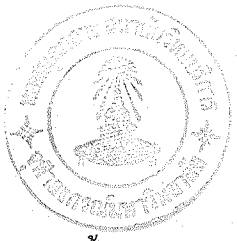
3. Content and composition of fatty acids in: total fats; triglycerides (TG); phospholipids (PL) ทำภายหลังการแยกลิพิดด้วยเทคนิค TLC ขูด powder ของ silica ออกจากแผ่นโดยใช้ TLC scraping system holder ที่ประดิษฐ์ขึ้น ทำการเปลี่ยนกรดไขมันที่อยู่ในแต่ละ subclass ของลิพิดให้เป็น methyl estersของกรดไขมันอิสระ (FAME) โดยใช้เทคนิคของ Lepage and Roy (1984) โดยใช้ acetylchloride จากนั้นวิเคราะห์ FAME โดยใช้เทคนิค GLC

4. Lecithin content วิเคราะห์ในรูปของ phosphorus content จากนั้นจึงคำนวณกลับเป็น PL หรือเลซิทิน การวิเคราะห์ทำโดยตรงจากไขมันที่สกัดได้โดยใช้เทคนิคทางเคมี Fisk-Subbarow reagent reaction โดยเทคนิคของ Bartlette (1959) ที่ปรับปรุงขึ้นใหม่ (Dahlan 1989)

5. Subclasses of PL ทำการวิเคราะห์โดยตรงจากไขมันที่สกัดได้โดยใช้เทคนิค two-dimensional TLC เริ่มต้นโดยการละลายไขมันด้วยสารละลาย dichloromethane-methanol ที่มี BHT ละลายอยู่ที่ความเข้มข้น 50 mg/l จากนั้นหยอดสารละลายลงบนแผ่น TLC เป่าให้แห้งด้วย hot air drier จากนั้นจึงนำไปแยกด้วยเทคนิคของ two-dimensional TLC ใช้สารละลายผสม dichloromethane-methanol-25% ammonia-distilled water เป็นระบบแรก และ dichloromethane-methanol-glacial acetic acid-distilled water เป็นระบบที่สอง โดยเทคนิคที่ปรับปรุงขึ้น (Dahlan 1989) ภายหลังจากขูด siliga ของแต่ละชั้นของ PL ออกจากแผ่นแล้วนำเอา PL แต่ละหมู่ที่สกัดแยกออกมาได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัส (phosphorus content) โดยเทคนิคของ Bartlette (1959) คำนวณปริมาณฟอสฟอรัสกลับเป็นฟอสโฟลิปิด

การวิเคราะห์กรดไขมัน

องค์ประกอบของกรดไขมันที่มีอยู่ในไขมันที่สกัดได้ (crude fat) ใน TG และ PL ทำได้โดยเทคนิคดังต่อไปนี้ นำเอาตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์กรดไขมัน ทั้งที่อยู่ในรูปของไขมันหรือในรูปของลิพิดที่ปนอยู่ใน silica powder จากแผ่น TLC มาทำการ hydrolyze เปลี่ยนให้กรดไขมันอยู่ในรูปของ free acid จากนั้นเปลี่ยนเป็น FAME ทั้งหมดนี้ทำโดยเทคนิคของ Lepage and Roy (1984) จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วย GLC โดยใช้ Fison 8000 series GC ติดตั้ง flame ionization detector ใช้คอลัมน์ capillary ความยาว 30 เมตร internal diameter 0.32 mm เคลือบหนา 0.25 micro-m ด้วย DB-23 P/N 123-2332 (J&W Scientific, USA) ใช้ split ratio 1:10 ใช้ helium เป็น carrier gas ตั้งอุณหภูมิ injection port ที่ 250 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ detector port ที่ 300 องศาเซลเซียส การจัดตั้งโปรแกรมของ oven ทำดังนี้ เริ่มต้นที่ 80 องศาเซลเซียสขณะฉีดตัวอย่างที่ละลายในเฮกเซน จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นถึง



180 องศา ด้วยความเร็ว 10 องศา/นาที ปล่อยให้อยู่ที่อุณหภูมินั้น 15 นาที จากนั้นปรับให้อุณหภูมิวิ่งไปที่ 220 องศาเซลเซียสที่ความเร็ว 4 องศา/นาที ปล่อยไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าว 15 นาที การคำนวณปริมาณกรดไขมันทำโดยเครื่อง integrator โดยใช้โปรแกรมของ GC

การสกัดเลซิทินจากปลาป่น

การสกัดเลซิทินจากปลาป่นได้เคยเขียนไว้แล้วในหลายสถานที่ (Dahlan 1995, Dahlan et al., 1996) สามารถนำมาสรุปได้ดังต่อไปนี้ นำตัวอย่างปลาป่นที่เตรียมไว้มาอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสนาน 30 นาทีเพื่อลดความชื้นและทำลายเอนไซม์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ไลเปสที่อาจจะยังทำงานอยู่ เมื่ออบแล้วจากนั้นนำไปสกัดด้วย acetone สองครั้ง กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง จากนั้นจึงระเหย acetone ออก ไขมันที่ได้ส่วนนี้ประกอบด้วย TG เป็นหลัก นำเอาตะกอนปลาป่นที่ผ่านการสกัด TG ออกแล้วบางส่วนไปสกัดด้วย methanol หรือ ethanol จากนั้นนำเอาตะกอนไปสกัดต่อด้วย hexane รวม hexane และ methanol หรือ ethanol เข้าด้วยกันทำการระเหยสารละลายอินทรีย์ออกจะได้เลซิทินเป็นยางเหนียวอยู่ที่ก้นขวด ทำการชั่งปริมาณเลซิทินที่ได้แล้วบันทึกข้อมูลไว้ นำเลซิทินที่สกัดได้ไปวิเคราะห์หาคุณสมบัติของลิพิด ได้แก่

1. Fatty acid composition ใน crude lecithin
2. Phosphorus content ใน crude lecithin
3. Lipid subclasses: TG และ PL
4. PL subclasses
5. Fatty acid composition ใน TG และ PL

โดยเทคนิคที่บรรยายไว้แล้วข้างต้น

การเตรียมอิมัลชันไขมัน FM-LRFE

เลซิทินที่สกัดได้จากปลาป่นเมื่อทำการตรวจสอบพบว่าประกอบไปด้วยส่วนของ TG และ PL ในสัดส่วน PL:TG, 1:3 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) หรือมี PL 25% ของน้ำหนัก นำเอาเลซิทินที่สกัดได้นี้มาเตรียมเป็นอิมัชันไขมันหรือไลโปโซมที่มีเลซิทินในสัดส่วนสูงหรือเรียกในการทดลองครั้งนี้ว่า fishmeal-lecithin rich fat emulsion (FM-LRFE) ให้มีสัดส่วน PL:TG อยู่ในช่วง 0.3-0.4 โดยใช้เทคนิค physical dispersion (New, 1994) สรุปวิธีการได้ดังนี้คือ เตรียม stock FM-LRFE ความเข้มข้นของ PL ในสารละลายเท่ากับ 1.2 g/dl โดยการเขย่าเลซิทินที่เตรียมไว้ในสารละลาย normal saline solution (NSS) อย่างรุนแรงใช้เวลา 30 นาที หรือจนกระทั่งเกิดอิมัลชันขาวอมเหลืองขุ่นโดยไม่มีพาร์ติเคิลใดๆ ให้เห็น นำเอาอิมัลชันเทลงในขวด polypropylene screw cap เติมก๊าซไนโตรเจนที่ปราศจากอ็อกซิเจนลงในขวดจากนั้นทำการปิดฝาให้สนิท เก็บไว้อย่างดีภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อิมัลชันที่เตรียม

ได้นี้สามารถเก็บไว้โดยไม่มีการแยกชั้นระหว่างน้ำและลิพิดนานกว่า 72 ชั่วโมง เมื่อต้องการทำการทดลองให้นำเอาอิมัลชัน stock มาทำการเจือจางด้วย NSS ให้ได้ความเข้มข้นของ PL ที่ 100, 300, 600 mg PL/dl

การเตรียมเกล็ดเลือด

เกล็ดเลือดเตรียมขึ้นภายหลังอาสาสมัครบริจาคโลหิตในเวลาไม่เกิน 6 ชั่วโมง การแยกเกล็ดเลือดทำขึ้นภายใต้อุณหภูมิไม่สูงกว่า 22 องศาเซลเซียส ขั้นตอนแรก ทำการปั่นแยกโลหิตด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ Heraeus 6000i ที่ความเร็ว 2,490 rpm ใช้เวลา 4 นาที เพื่อแยกพลาสม่าที่มีเกล็ดเลือดสูงหรือ platelet-rich plasma (PRP) ออกจากกัน จากนั้นนำ PRP ที่แยกได้มาปั่นที่ความเร็ว 3,420 rpm ใช้เวลา 6 นาที PRP ถูกแยกเป็นสองส่วนคือพลาสม่าที่มีเกล็ดเลือดต่ำหรือ platelet-poor plasma (PPP) และเกล็ดเลือดเข้มข้นหรือ platelet concentrate (PC) แยกส่วนของ PPP ออกจาก PC จากนั้นจึงนำเอาวนของ PC ไปใช้ในการทดลอง โดยเจือจาง PC ลง 10 เท่าด้วย Isoton T balanced electrolyte solution (Gee Chang Hong Centre, Hong Kong) จากนั้นจึงนำไปนับปริมาณเม็ดโลหิตขาวและจำนวนเกล็ดเลือดโดยใช้เครื่อง Coulter, Model T-540 นำเกล็ดเลือดที่ได้ไปใช้ในการทดลองทันที

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการแช่เกล็ดเลือดใน FM-LRFE

ผลของพลาสม่า

การทดลองนี้เพื่อตรวจสอบการใช้พลาสม่าโดยเฉพาะอย่างยิ่งพลาสม่าของคนๆเดียวกัน (autologous) ว่ามีความจำเป็นต่อการแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่าง FM-PLFE และเกล็ดเลือดมากน้อยเพียงใด ทำการศึกษาโดยนำเกล็ดเลือดความเข้มข้น $1.86x10^9$ cells/cm^3 ใส่ลงใน graduated polypropylene tube ล้าง 3 ครั้งโดยใช้ phosphate buffer pH 7.4 ปั่นด้วยเซ็นตริฟิวจ์ความเร็ว 1,500-3,000 rpm 3 นาที อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส (Refrigerated centrifuge, Hitashi, himac CF7D2, Japan) แยกพลาสม่าออกจากเกล็ดเลือดโดยการดูดด้วย suction pump เกล็ดเลือดที่ได้เป็นเกล็ดเลือดที่ปราศจากพลาสม่า นำเอาเกล็ดเลือดนี้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

การแช่ในภาวะไร้พลาสม่า:- เติม FM-LRFE ความเข้มข้น 100, 300, 600 mg PL/dl ลงบน pellet ของเกล็ดเลือดจากนั้นเขย่าเบาๆให้เกล็ดเลือดแขวนลอยในอิมัลชัน เตรียมแต่ละความเข้มข้น 5 ซ้ำ ระหว่างการแช่ให้เขย่าส่วนผสมเป็นระยะโดยการพลิกหลอดกลับไปมา แช่ในอุณหภูมิ 22 องศาตลอดการทดลอง เมื่อครบกำหนด 1 ชม. จากนั้นทำการแยก FM-LRFE ออกจากเกล็ดเลือดโดยการเซ็นตริฟิวจ์ที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเกล็ดเลือดด้วย NSS ที่เย็น 3 ครั้ง ในกรณีที่เกิดความไม่มั่นใจเรื่องการปนเปื้อนของ FM-LRFE ในเกล็ดเลือด อาจทำการล้างด้วย 1.055 KBr density

solution 3 ครั้งและล้างด้วย NSS 1 ครั้ง เกล็ดเลือดที่ผ่านการล้างทำการตรวจสอบโดยใช้ TG เป็นดัชนี ไม่พบ FM-LRFE ปนเปื้อน นำเอาเกล็ดเลือดที่ผ่านการแช่กับ FM-LRFE ไปทำการศึกษาปริมาณลิพิดและกรดไขมันต่อไป ในกรณีของ Blank ใช้เกล็ดเลือดที่แช่กับ NSS ในสภาพเดียวกัน โดยพิจารณาให้ความเข้มข้นของสารละลายเป็น 0 mg PL/dl

การแช่ในภาวะมีพลาสม่า:- เริ่มด้วยการเตรียม FM-LRFE ที่ความเข้มข้น 100, 300, 600 mg PL/dl โดยใช้พลาสม่าของอาสาสมัครแต่ละคนเป็น diluent (autologous plasma) ทำการแช่ FM-LRFE กับเกล็ดเลือดโดยใช้วิธีการเดียวกับการแช่ในภาวะไร้พลาสม่า การแยกเกล็ดเลือดออกจาก FM-LRFE ใช้วิธีการเดียวกันกับภาวะไร้พลาสม่าเช่นเดียวกัน นำเอาเกล็ดเลือดที่ได้ไปทำการวิเคราะห์และเปรียบเทียบผลระหว่างภาวะไร้พลาสม่าและมีพลาสม่า

ความคงตัวของกรดไขมันในเมมเบรนภายหลังการแช่

การศึกษานี้เพื่อตรวจสอบว่ากรดไขมันที่เปลี่ยนแปลงไปภายหลังการแช่เกล็ดเลือดใน FM-LRFE มีความคงตัวบนเมมเบรนของเกล็ดเลือดเพียงใดภายหลังจากแยก FM-LRFE ออกจากเกล็ดเลือดแล้ว ทำการทดลองโดยนำเกล็ดเลือดแช่กับ FM-LRFE ความเข้มข้น 600 mg PL/dl เป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เมื่อทำการล้างเกล็ดเลือดแล้วทำการแช่เกล็ดเลือดใน NSS เป็นเวลา 1, 3, 5 ชม. ล้างเกล็ดเลือด 3 ครั้งด้วย NSS ที่เย็น จากนั้นจึงนำเอาเกล็ดเลือดไปทำการวิเคราะห์ลิพิดและกรดไขมันตามเทคนิคดังที่ได้กล่าวถึงข้างต้น

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันบนผนังเกล็ดเลือดภายหลังการแช่กับ FM-LRFE

ทำการแช่เกล็ดเลือดความเข้มข้น 1.86×10^9 cells/cm^3 ในอิมัลชันไขมันความเข้มข้น PL 0, 100, 300, 600 mg/dl ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชม. ในภาวะที่ไม่มีพลาสม่า แยกเกล็ดเลือดออกจากอิมัลชันไขมัน ทำการวิเคราะห์ปริมาณและสัดส่วนของกรดไขมัน ทั้งหมดนี้ด้วยวิธีการที่ได้บรรยายมาแล้วข้างต้น

สถิติที่ใช้

ผลการทดลองแสดงในรูปของ Mean±S.D. การคำนวณค่านัยสำคัญทางสถิติของความแตกต่างใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) with Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรม SAS (Statistical Analysis System) ตัวอักษร a, b, c, และ d ที่แสดงไว้เหนือตัวเลขในตารางหรือรูปภาพแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม อักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยกำหนดความแตกต่างไว้ที่ $p<0.05$ อักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีค่าความแตกต่างกันทางสถิติ การคำนวณค่า coefficient of determination (r^2), slope และ Y-intercept ที่แสดง

ในสมการทำโดย regression analysis โดยใช้ Microsoft Excel version 5.0 for Windows จากนั้นทำการคำนวณค่าสหสัมพันธ์ (correlation, r) และ p

ผลการทดลอง

การคัดเลือกปลาป่นที่มีเลซิทินชนิดโอเมก้า 3 สูง

การศึกษาเริ่มต้นด้วยการคัดเลือกวัตถุดิบคือปลาป่นจากผลิตภัณฑ์ภายในประเทศและต่างประเทศ ปลาป่นในประเทศทั้งหมดเป็นปลาป่นจากโรงงานเสรีบ้านเพ จังหวัดระยอง โดยการอนุเคราะห์จากภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ ซึ่งมีปลาป่นเกรดต่างๆให้ได้ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือปลาป่นเกรด 1, 2, 3 และ 4 ปลาป่นทั้ง 4 เกรดต่างกันที่ ปริมาณโปรตีน ในการทดลองนี้มีการนำปลาป่นเดนมาร์คมาใช้เพื่อเปรียบเทียบกับปลาป่นในประเทศซึ่งปลาป่นกลุ่มแรกมักได้รับการยอมรับจากเกษตรกรว่ามีคุณภาพสูงกว่า จากผลการตรวจสอบโดย proximate analysis ไม่พบว่าปลาป่นจากต่างประเทศมีคุณสมบัติดีกว่า จาก**ตาราง 1** เห็นได้ว่าปลาป่นไทยเกรด 1 มีโปรตีนสูงถึง 69.52 % เมื่อเทียบกับปลาป่นเดนมาร์ค ปลาป่นไทยเกรด 1 และ 2 มีโปรตีนสูงกว่าเล็กน้อย อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจากสีของปลาป่นพบว่าปลาป่นเดนมาร์คมีสีออกเหลืองทอง ขณะที่ปลาป่นไทยมีสีคล้ำกว่าอาจเป็นเพราะมีการปนเปื้อนจากเศษวัตถุในปริมาณสูงกว่าซึ่งไม่ได้แสดงผลไว้ในที่นี้

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ต้องการทดสอบไขมันจากปลาป่น ดังนั้นปริมาณโปรตีนซึ่งเป็นตัวกำหนดราคาปลาป่นจึงไม่มีความสำคัญมากนัก จากตาราง 1 จะเห็นว่าปลาป่นไทยเกือบทุกเกรดยกเว้นเกรด 3 มีปริมาณไขมันสูงกว่าปลาป่นจากเดนมาร์ค ทั้งนี้เนื่องจากผู้ผลิตปลาป่นไทยไม่นิยมทำการแยกไขมันออกหรือไม่ทำการลดปริมาณไขมันจากปลาป่นอันเป็นผลจากประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ฉบับที่ 8 พ.ศ.2538 ที่ได้ตัดการกำหนดปริมาณไขมันออกจากการกำหนดคุณภาพปลาป่นชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 ที่ใช้ในการเตรียมอาหารสัตว์ซึ่งแต่เดิมเคยกำหนดไว้ที่ ไขมันไม่มากกว่าร้อยละ 10

ตาราง 1 เป็นผลจากการวิเคราะห์โดยผู้ผลิต ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจสอบปริมาณไขมันในปลาป่นทุกเกรดเพื่อยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง โดยตรวจสอบที่ศูนย์วิจัยไขมันและน้ำมัน ผลที่ได้ มีค่าแตกต่างออกไปจากการวิเคราะห์โดยโรงงาน จาก**ตาราง 2** จะเห็นว่าไขมันที่พบในปลาป่นทุกเกรดรวมถึงปลาป่นจากเดนมาร์คมีปริมาณตั้งแต่ 11.23-13.91% ขณะเดียวกันยังพบด้วยว่าเลซิทินที่มีในปลาป่นทุกเกรดอยู่ในระดับ 0.99-1.99 กรัมต่อปลาป่น 100 กรัม ซึ่งเป็นปริมาณไม่น้อย เมื่อทำการสกัดไขมันทั้งหมดออกจากปลาป่น ยังพบอีกว่าเลซิทินที่ปนอยู่ในน้ำมันมีปริมาณ 8.86-14.3 กรัม/น้ำมัน 100 กรัม และการตรวจสอบกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกลุ่มโอเมก้า 3 ตัวสำคัญคือ DHA ที่พบในเลซิทินมีสูงถึง 19.6-28.3% ของกรดไขมันทั้งหมด จากตาราง 2 สามารถสรุปได้ว่า ปลาป่นทั้งของไทยและเดนมาร์คที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นแหล่งของไขมันโดยเฉพาะอย่างยิ่งเลซิทินที่พบว่าเป็นเลซิทินที่มีกรดไขมันโอ

เมก้า 3 ในปริมาณสูง อันเป็นการยืนยันผลจากการที่ได้เคยทำการศึกษามาก่อนหน้านี้แล้ว (Dahlan et al., 1996) ในการทดลองครั้งนี้เลือกใช้ปลาป่นเดนมาร์คเป็นแหล่งของวัตถุดิบเนื่องจากปลาป่นเดนมาร์คมี DHA ในปริมาณสูงที่สุด และต่างกว่า DHA ในปลาป่นไทยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมี DHA 28.3% เทียบกับ 19.6-22.6% ในปลาป่นไทย นอกจากนี้ในตาราง 3 เมื่อตรวจสอบกรดไขมันตัวอื่นๆพบว่าปลาป่นเดนมาร์คมีกรดไขมันอิ่มตัว (SFA) ต่ำกว่า มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (PUFA) มากกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกลุ่มโอเมก้า 3 (n-3 PUFA) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ไม่พบนัยสำคัญอย่างเด่นชัดกับปลาป่นไทยทุกเกรด ในกรณีขององค์ประกอบของฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆ ที่พบในเลซิทินจากปลาป่นเทียบระหว่างปลาป่นเดนมาร์คและปลาป่นไทย ไม่พบความแตกต่างระหว่างชั้นของฟอสโฟลิปิด (ตาราง 4) ปลาป่นมีสัดส่วนของ phosphatidylcholine (PC) สูงที่สุดคือ 48-52% มี phosphatidylethanolamine (PE) 8.8-10.1% ขณะที่มี sphingomyelin (SM) 12.8-15.8%

ตาราง 5 เปรียบเทียบกรดไขมันที่พบในฟอสโฟลิปิดของปลาป่นเดนมาร์คกับปลาป่นไทยเกรดที่ดีที่สุดคือเกรด 1 ปลาป่นเดนมาร์คมีกรดไขมันตัวสำคัญคือ DHA สูงกว่าปลาป่นไทยเกรด 1 นอกจากนี้ปลาป่นเดนมาร์คยังมีสัดส่วน n-3/n-6 PUFA สูงกว่าปลาป่นไทยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (6.8 เทียบกับ 4.8, $p<0.05$) นอกเหนือจากการมี DHA ในส่วนของ PL ในปริมาณสูงแล้ว DHA ในส่วนของ TG ที่ปนอยู่ในเลซิทินที่สกัดได้จากปลาป่น ยังพบอีกว่ามี DHA ในปริมาณสูงเช่นเดียวกัน เมื่อพิจารณากรดไขมันในส่วนของ TG เปรียบเทียบกับส่วนของ PL (ตาราง 6) พบว่า DHA ใน TG มีปริมาณต่ำกว่าในฟอสโฟลิปิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้ EPA ยังมีสูงกว่าเช่นเดียวกัน เป็นผลทำให้ n-3 ใน PL มีสัดส่วนสูงกว่าใน TG (ตาราง 7) (38.5 เทียบกับ 27.9) ในทางตรงข้ามฟอสโฟลิปิดในเลซิทินมี monoenes ต่ำกว่า (16.4 เทียบกับ 22.0)

สรุปผลของการคัดเลือกวัตถุดิบที่จะนำมาใช้เตรียมเลซิทินที่มีกรดไขมันโอเมก้า 3 สูง การทดลองครั้งนี้เลือกปลาป่นเดนมาร์คมาใช้ในการทดลองเนื่องจากมีองค์ประกอบของกรดไขมันโอเมก้า 3 ตามที่ต้องการ อย่างไรก็ตามในการพัฒนาเชิงอุตสาหกรรมจริงสามารถใช้ปลาป่นไทยทดแทนได้ เนื่องจากปลาป่นไทยมีกรดไขมันโอเมก้า 3 ตลอดจนไขมันรวมในปริมาณสูง ทั้งนี้โดยต้องหาหนทางลดการปนเปื้อนที่อาจมีขึ้นลงด้วย

ตาราง 1 องค์ประกอบของสารอาหารหลัก ความชื้นและเถ้าโดยประมาณ

องค์ประกอบ	ปลาป่น	ปลาป่นไทย			
	เดนมาร์ค	1	2	3	4
โปรตีน	64.55	69.52	68.58	63.20	60.16
ไขมัน	8.08	11.05	11.34	7.96	17.86
ความชื้น	7.52	6.39	4.12	8.32	7.16
เถ้า	15.60	14.98	13.14	17.86	19.85

ทำการวิเคราะห์สองครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย หน่วยเป็น g/100 g

ตาราง 2 ปริมาณไขมัน, เลซิทินและกรดไขมัน DHA ที่พบในปลาป่น

ปลาป่น	ปริมาณไขมัน (g/100 g)		เลซิทินในน้ำมัน (g/100 g)	% DHA ในกรดไขมันของ เลซิทิน
	ทั้งหมด	เลซิทิน		
ปลาป่นเดนมาร์ค	11.4	1.10	10.2	28.3
ปลาป่นไทย 1	13.91	1.99	14.3	22.2
ปบาป่นไทย 2	13.12	1.64	12.54	19.6
ปลาป่นไทย 3	11.58	1.11	9.58	22.6
ปลาป่นไทย 4	11.23	0.99	8.86	20.5

ปริมาณคือค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ 3 ครั้ง

I1969153

ตาราง 3 องค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในเลซิทินของปลาป่นชนิดต่างๆที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดคิดเป็น g/100 g กรดไขมัน

Phospholipid Fatty Acids	ปลาป่นเดนมาร์ค	ปลาป่นไทย			
		1	2	3	4
SFA	32.7±0.8	44.6±0.3	47.9±0.8	40.3±0.1	44.0±3.0
MUFA	16.4±0.6	16.3±0.1	15.9±0.1	17.0±0.1	17.8±0.8
PUFA	44.2±0.9^{a}	34.0±0.5^{a}	29.6±0.9^{b}	35.6±0.3^{a}	31.8±1.8^{a}
EPA	7.9±0.2^{a}	4.4±0.1^{b}	4.3±0.1^{b}	7.2±0.0^{a}	6.0±0.3^{b}
DHA	28.3±0.9^{a}	22.2±0.4^{b}	19.6±0.7^{b}	22.6±0.2^{c}	20.5±0.7^{b}
n-3	38.5±0.9^{a}	28.1±0.4^{a,b}	25.3±0.8^{b}	31.6±1.8^{a}	28.0±1.7^{a,b}
n-6	5.7±0.2^{a}	5.9±0.1^{a}	4.4±0.1^{a,b}	4.0±0.1^{a,b}	3.8±0.2^{b}
n-3/n-6	6.8±0.1^{a}	4.8±0.0^{b}	5.8±0.1^{a,b}	7.9±0.3^{a}	7.3±0.3^{a}

ค่าที่แสดงคือ mean±SD จากการวิเคราะห์ 5 ครั้ง

อักษรที่แสดงเหนือตัวเลขหากเป็นอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

SFA, saturated fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid

ตาราง 4 องค์ประกอบของฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆที่พบในเลซิทินของปลาป่น ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ คิดเป็น mole/100 mole PL

Phospholipid Subclasses	ปลาป่น เดนมาร์ค	ปลาป่นไทย			
		1	2	3	4
PA	2.12	2.83	2.40	1.18	1.91
PE	8.77	10.14	8.50	9.94	9.69
PC	52.32	51.15	48.15	48.00	52.32
PS+PI	3.65	5.78	3.38	5.91	6.04
SM	12.77	15.36	12.40	15.84	14.04
LPC	3.31	3.82	8.90	3.34	0.00
Others	17.06	10.92	16.27	15.76	16.00
Total choline	68.40	70.33	69.45	67.18	66.36

ค่าที่แสดงคือ mean จากการวิเคราะห์ 2 ครั้ง

PA, Phosphatidic acid; PE, Phosphatidyl ethanolamine; PC, Phosphatidylcholine; PS, Phosphatidylserine; PI, Phosphatidylinositol; SM, Sphingomyelin; LPC, Lysophosphatidylcholine; Total choline, PC + SM + LPC

ตาราง 5 ชนิดของกรดไขมันที่พบในฟอสโฟลิปิด (Phospholipid fatty acids) ของเลซิทินจากปลาป่น (g/100 g total fatty acids)

Phospholipid Fatty Acid	ปลาป่น	
	เดนมาร์ค	ไทย เกรด 1
Saturated	32.73 ± 0.75[b]	43.56 ± 0.32[a]
Monoenes	16.37 ± 0.64	16.27 ± 0.10
Polyenes	44.18 ± 0.93[a]	33.97 ± 0.50[b]
EPA	7.85 ± 0.24[a]	4.44 ± 0.07[b]
DHA	28.32 ± 0.73[a]	22.16 ± 0.43[b]
n-3	38.49 ± 0.87[a]	28.10 ± 0.41[b]
n-6	5.69 ± 0.19	5.87 ± 0.10
n-3 / n-6	6.76 ± 0.09[a]	4.79 ± 0.03[b]

แสดงผลในรูป Mean ± S.D. ของการวิเคราะห์ 3 ครั้ง

ความแตกต่างทางสถิติพิจารณาที่อักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกัน ($p<0.05$).

ตาราง 6 องค์ประกอบของกรดไขมันชนิดต่างๆที่พบในเลซิทินที่สกัดได้จากปลาป่นเดนมาร์ค แยกเป็นส่วนของฟอสโฟลิปิดและไตรกลีเซอไรด์ (g/100 g total fatty acids)

กรดไขมัน	เลซิทินของปลาป่นเดนมาร์ค		
	เลซิทินทั้งหมด	TG fraction	PL fraction
C 14:0	4.94 ± 0.21	6.18 ± 0.50[a]	1.93 ± 0.18[b]
C 16:0	24.40 ± 0.52	25.17 ± 0.83[a]	21.55 ± 0.67[b]
C 16:1 n-7	4.36 ± 0.17	5.33 ± 0.21[a]	1.85 ± 0.12[b]
C 18:0	8.18 ± 0.16	6.82 ± 0.23[b]	9.25 ± 0.19[a]
C 18:1 n-9	11.49 ± 0.47	12.78 ± 0.74[a]	9.80 ± 0.57[b]
C 18:1 n-7	2.96 ± 0.15	2.56 ± 0.14[b]	2.99 ± 0.21[a]
C 18:2 n-6	2.12 ± 0.04	2.55 ± 0.09[a]	1.97 ± 0.06[b]
C 18:3 n-3	1.03 ± 0.05	1.48 ± 0.06[a]	0.47 ± 0.07[b]
C 20:4 n-6	2.93 ± 0.25	2.41 ± 0.30[b]	3.72 ± 0.29[a]
C 20:5 n-3	7.51 ± 0.36	7.32 ± 0.13[b]	7.85 ± 0.24[a]
C 22:5 n-3	1.66 ± 0.11	1.52 ± 0.13[b]	1.85 ± 0.22[a]
C 22:6 n-3	21.68 ± 0.65	17.56 ± 0.96[b]	28.32 ± 0.73[a]
C 24:1	1.57 ± 0.09	1.34 ± 0.14[b]	1.73 ± 0.11[a]
Others	5.17 ± 0.36	6.98 ± 0.76[a]	6.72 ± 0.44[b]

แสดงผลในรูป Mean ± S.D. ของการวิเคราะห์ 3 ครั้ง

ความแตกต่างทางสถิติพิจารณาที่อักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกัน ($p<0.05$).

ตาราง 7 ผลรวมของกรดไขมันจากตาราง 11 โดยเป็นหมวดหมู่ saturated, monoenes, polyenes แยกเป็น n-3, n-6 และสัดส่วนของ n-3/n-6 (g/100 g total fatty acids)

กรดไขมัน	เลซิตินของปลาป่นเดนมาร์ค		
	เลซิตินทั้งหมด	TG fraction	PL fraction
Saturated	37.52 ± 0.63	38.17 ± 0.97	32.73 ± 0.75
Monoenes	20.38 ± 0.48	22.01 ± 0.83	16.37 ± 0.64
Polyenes	36.93 ± 0.77	32.84 ± 1.15	44.18 ± 0.93
n-3	31.88 ± 0.75	27.88 ± 1.07	38.49 ± 0.87
n-6	5.05 ± 0.31	4.96 ± 0.25	5.69 ± 0.19
n-3/n-6	6.31 ± 0.08	5.62 ± 0.15	6.76 ± 0.09

พลสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เกล็ดเลือด

ตาราง 8 แสดงคุณสมบัติของโลหิต และปริมาณเม็ดโลหิตชนิดต่างๆ โดยแยกเป็นชายและหญิง ได้ข้อสรุปว่าชายและหญิงมีองค์ประกอบของโลหิตที่ไม่แตกต่างกัน และเมื่อแบ่งแยกกลุ่มตามหมู่โลหิต **(ตาราง 9)** ไม่พบความแตกต่างในจำนวนของเม็ดโลหิตชนิดต่างๆเช่นเดียวกัน ดังนั้นในการนำโลหิตจากอาสาสมัครมาเพื่อใช้ในการศึกษสวิจัยครั้งนี้จึงคัดเลือกจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพร่างกายแข็งแรง โดยมิได้แยกเพศหรือหมู่เลือด

ตาราง 8 คุณสมบัติของโลหิต ชนิดและจำนวนของเม็ดโลหิตที่ได้จากการบริจาคของอาสาสมัคร

เพศ	n	ปริมาตร (ml)	Sp.gr.	RBC (10^6/mm^3)	WBC (10^3/mm^3)	PLT (10^3/mm^3)
ช	100	49.69 ± 3.57	1.03 ± 0.00	0.01 ± 0.03	0.42 ± 0.29	1822.00 ± 610.25
ญ	22	49.71 ± 3.23	1.03 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.49 ± 0.35	1890.50 ± 741.54

ผลแสดงในรูป Mean ± S.D.

n หมายถึงจำนวนอาสาสมัคร

RBC, เม็ดโลหิตแดง; WBC, เม็ดโลหิตขาว; PLT, เกล็ดเลือด

ตาราง 9 ความเข้มข้นของเม็ดโลหิตของอาสาสมัครแยกตามหมู่โลหิต (A, AB, B, และ O)

หมู่โลหิต	n	ปริมาตร (ml)	Sp.gr.	RBC (10^6/mm^3)	WBC (10^3/mm^3)	PLT (10^3/mm^3)
A	6	50.01 ± 1.87	1.03 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.57± 0.33	1831.17 ± 290.23
AB	8	48.96 ± 2.02	1.03 ± 0.00	0.00 ± 0.01	0.49 ± 0.24	1880.12 ± 602.36
B	97	49.81 ± 3.82	1.03 ± 0.00	0.01 ± 0.03	0.40 ± 0.25	1850.54 ± 620.41
O	11	49.07 ± 1.56	1.03 ± 0.00	0.00 ± 0.01	0.59 ± 0.45	1851.63 ± 472.29

ผลแสดงในรูป Mean ± S.D.

n หมายถึงจำนวนอาสาสมัคร

RBC, เม็ดโลหิตแดง; WBC, เม็ดโลหิตขาว; PLT, เกล็ดเลือด

ไลโปโซมและคุณสมบัติกรดไขมัน

การเตรียมไลโปโซมหรืออิมัลชันไขมันทำโดยใช้วิธีสกัดเลซิทินจากปลาป่นโดยใช้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นที่ศูนย์วิจัยไขมันและน้ำมัน คณะสหเวชศาสตร์ ในการทดลองครั้งนี้ทำการสกัดโดยใช้สารละลายอินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ acetone, methanol และ n-hexane ตามลำดับ การนำเอาสารละลายอินทรีย์ชนิดโพลาร์เข้ามาร่วมด้วยในกระบวนการสกัดทำให้ได้ปริมาณเลซิทินสูงขึ้นมาก (1-2 กรัม/ปลาป่น 100 กรัม)

นำเลซิทินจากปลาป่นเดนมาร์คเตรียมเป็นอิมัลชันไขมัน (หรืออาจเรียกว่าไลโปโซมเนื่องจากมีสัดส่วน PL สูง) ทำการตรวจสอบองค์ประกอบของกรดไขมันที่อยู่ในแกนกลางของพาร์ติเคิล (TG) และผิวด้านนอกที่ห่อหุ้ม (PL) เห็นได้ว่าปริมาณ DHA บริเวณผิวมีสูงกว่า DHA ในแกนกลาง (TG) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (28.3 เทียบกับ 17.6) (ตาราง 10) และมีกรดไขมันโอเมก้า 3 รวมมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (38.5 เทียบกับ 27.9 ใน ตาราง 11)

ตาราง 10 องค์ประกอบกรดไขมันใน FM-LRFE แยกเป็นกรดไขมันทั้งหมดและในส่วนของ TG และ PL (g/100 g total fatty acids) เมื่อสัดส่วนของ PL:TG เท่ากับ 1:3

กรดไขมัน	FM-LRFE		
	ทั้งหมด	TG fraction	LE fraction
C 14:0	4.94 ± 0.21	6.18 ± 0.50	1.93 ± 0.18
C 16:0	24.40 ± 0.52	25.17 ± 0.83	21.55 ± 0.67
C 16:1 n-7	4.36 ± 0.17	5.33 ± 0.21	1.85 ± 0.12
C 18:0	8.18 ± 0.16	6.82 ± 0.23	9.25 ± 0.19
C 18:1 n-9	11.49 ± 0.47	12.78 ± 0.74	9.80 ± 0.57
C 18:1 n-7	2.96 ± 0.15	2.56 ± 0.14	2.99 ± 0.21
C 18:2 n-6	2.12 ± 0.04	2.55 ± 0.09	1.97 ± 0.06
C 18:3 n-3	1.03 ± 0.05	1.48 ± 0.06	0.47 ± 0.07
C 20:4 n-6	2.93 ± 0.25	2.41 ± 0.30	3.72 ± 0.29
C 20:5 n-3	7.51 ± 0.36	7.32 ± 0.13	7.85 ± 0.24
C 22:6 n-3	21.68 ± 0.65[a,b]	17.56 ± 0.96[a]	28.32 ± 0.73[b]
C 24:0	1.66 ± 0.11	1.52 ± 0.13	1.85 ± 0.22
C 24:1	1.57 ± 0.09	1.34 ± 0.14	1.73 ± 0.11
Others	5.17 ± 0.36	6.98 ± 0.76	6.72 ± 0.44

ผลแสดงในรูปของ Mean ± S.D. จากการวิเคราะห์ 3 ครั้ง

ตาราง 11 ผลรวมของกรดไขมันจากตาราง 11 โดยเป็นหมวดหมู่ saturated, monoenes, polyenes แยกเป็น n-3, n-6 และสัดส่วนของ n-3/n-6 (g/100 g total fatty acids)

กรดไขมัน	FM-LRFE		
	ทั้งหมด	TG fraction	PL fraction
SAFA	37.52 ± 0.63	38.17 ± 0.97	32.73 ± 0.75
MUFA	20.38 ± 0.48	22.01 ± 0.83	16.37 ± 0.64
PUFA	36.93 ± 0.77	32.84 ± 1.15	44.18 ± 0.93
PUFA/MUFA	1.81 ± 0.01	1.49 ± 0.01	2.70 ± 0.01
n-3	31.88 ± 0.75[a,b]	27.88 ± 1.07[a]	38.49 ± 0.87[b]
n-6	5.05 ± 0.31	4.96 ± 0.25	5.69 ± 0.19
n-3/n-6	6.31 ± 0.08	5.62 ± 0.15	6.76 ± 0.09

การตรวจสอบภาวะที่เหมาะสมของการแช่ (incubation)

การเตรียมสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแช่หรือ incubation เริ่มต้นโดยการทดสอบผลของการใช้พลาสม่าต่อการแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างอิมัลชันไขมันและเกล็ดเลือด ทำการแช่เกล็ดเลือดที่ผ่านการล้างมาแล้วในอิมัลชันไขมันที่ความเข้มข้นของ PL 600 mg/dl เป็นเวลา 1 ชม. อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส การเตรียมอิมัลชันไขมันโดยใช้ NSS เป็นตัวกลาง (ไม่มีพลาสม่า) และใช้พลาสม่าเป็นตัวกลาง (มีพลาสม่า) พลาสม่าที่ใช้เป็นพลาสม่าของอาสาสมัคร (aotologous plasma) ผลการทดลองแสดงไว้ในตาราง 12

เมื่อพิจารณาเฉพาะกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงได้แก่ EPA, DHA เห็นว่าในภาวะที่ไม่มีพลาสม่า การแลกเปลี่ยน EPA, DHA จากอิมัลชันไขมันสู่เกล็ดเลือดมีมากกว่า (สูงขึ้นถึงระดับ 1.33 และ 5.82 ในภาวะที่ไม่มีพลาสม่าเปรียบเทียบกับ 0.65 และ 3.20 ในภาวะที่มีพลาสม่า สำหรับ EPA และ DHA ตามลำดับ) สัดส่วนของ n-3/n-6 ในภาวะไม่มีพลาสม่าสูงกว่าภาวะที่มีพลาสม่าอย่างมีนัยสำคัญ (0.34 เปรียบเทียบกับ 0.19) การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนนี้ ภาวะไม่มีพลาสม่ามีค่าสูงกว่าภาวะมีพลาสม่าถึง 4 เท่า (0.20 เทียบกับ 0.05 ในตาราง 13) ตาราง 13 แสดงถึงค่าการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันที่เกิดขึ้นจริงโดยการหักค่า baseline หรือที่ความเข้มข้น PL 0 mg/dl เห็นได้ว่าในภาวะไม่มีพลาสม่า DHA มีค่าเพิ่มขึ้น 3.35 เทียบกับในภาวะไม่มีพลาสม่ามีค่าเพิ่มขึ้นเพียง 0.76 กรดไขมันโอเมก้า 3 โดยรวมสูงขึ้น 4.45 ในภาวะไม่มีพลาสม่าเทียบกับ 1.12 ในภาวะมีพลาสม่า หรือสูงขึ้นเกือบ 4 เท่า

อีกคำถามหนึ่งที่การศึกษาวิจัยครั้งนี้ต้องการตอบคือภายหลังการแช่แล้วการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจะคงตัวอยู่นานหรือไม่หรือเป็นเพียงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเพียงชั่วคราว การตรวจสอบทำโดยการแยกอิมัลชันไขมันออกจากเกล็ดเลือด ทำการล้างเกล็ดเลือดแล้วแช่ทิ้งไว้ใน NSS เป็นเวลานาน 5 ชั่วโมง หากการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นชั่วคราว เช่น อาจเกิดจากการมีอิมัลชันจำนวนหนึ่งจับที่ผิวของเกล็ดเลือดแล้วหลุดออก การเปลี่ยนแปลงย่อมลดหรือสิ้นสุดลงและสภาพกรดไขมันของเกล็ดเลือดย่อมกลับคืนสู่สภาพเดิม ในการตรวจสอบนี้ทำโดยการแช่อิมัลชันไขมันกับเกล็ดเลือดที่ความเข้มข้นของ PL ที่ 600 mg/dl เป็นเวลา 1 ชม.จากนั้นแยกอิมัลชันไขมันออก ทำการวิเคราะห์กรดไขมันของเกล็ดเลือดเมื่อทำการแช่เกล็ดเลือดที่ล้างแล้วไว้ใน NSS เป็นเวลา 0 (หมายถึงการวิเคราะห์ทันทีเมื่อล้างเกล็ดเลือดแล้ว) 1, 3 และ 5 ชม. ผลแสดงไว้ตามตาราง 14

ภายหลังการแช่เกล็ดเลือดไว้ในอิมัลชันไขมันที่ความเข้มข้น 600 mg PL/dl กรดไขมันของเกล็ดเลือดมีค่าเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน (จะบรรยายผลในตารางต่อไป) โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม control ซึ่งแช่เกล็ดเลือดไว้ใน NSS ตั้งแต่เริ่มต้นหรือที่ความเข้มข้นอิมัลชันไขมันเท่ากับ 0 mg/dl กับที่

ระดับ 0 ชม. อย่างไรก็ตาม ภายหลังการแยกอิมัลชันไขมันออกจากเกล็ดเลือดแล้วทำการแช่เกล็ดเลือดไว้ใน NSS เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 1-5 ชม. จะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นยังคงสภาพไม่เปลี่ยนแปลง กรดไขมัน DHA ที่เพิ่มขึ้นจาก 2.46 เป็น 5.94 ยังคงสภาพที่สูงในระดับนั้นโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือที่ 5.93, 5.90, 5.89 ภายหลังแช่ไว้ใน NSS 1, 3 และ 5 ชม. ตามลำดับ กรณีของกรดไขมันอื่นก็ปรากฏผลเป็นเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัดส่วนกรดไขมัน n-3/n-6 คงสภาพที่ 0.34 โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง

โดยสรุปคือการทดลองครั้งนี้ได้จัดภาวะของการแช่เพื่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนกรดไขมันโอเมก้า 3 จากอิมัลชันไขมันสู่เซลล์เกล็ดเลือดในปริมาณที่สูงที่สุดคือการใช้ความเข้มข้นของ PL ปรับเปลี่ยนตั้งแต่ 100 ถึง 600 mg/dl ทั้งนี้โดยทำการแช่ในภาวะที่ไม่มีพลาสม่า ภายหลังการแยกอิมัลชันไขมันออกจากเกล็ดเลือดแล้ว สามารถนำเอาเกล็ดเลือดไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันได้ในทันทีโดยไม่มีความจำเป็นต้องแช่เกล็ดเลือดไว้ใน NSS ต่อ

ตาราง 12 กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (PUFA, g/100 g total PLT-FA) ที่พบในเกล็ดเลือดภายหลังการแช่กับอิมัลชันไขมัน FM-LRFE ความเข้มข้น 600 mg PL/dl ที่อุณหภูมิ 22 °C เป็นเวลา 1 ชม. ในภาวะที่มี (with plasma) และไม่มีพลาสม่า (without plasma)

PLT-FA	FM-LRFE	
	with plasma	without plasma
EPA	0.65 ± 0.14	1.33 ± 0.13
DHA	3.20 ± 0.32	5.82 ± 0.30
LA	5.44 ± 0.48	5.33 ± 0.45
AA	20.89 ± 0.36	19.20 ± 0.32
n-3	4.90 ± 0.29	8.31 ± 0.37
n-6	26.33 ± 0.69	24.53 ± 0.42
n-3/n-6	0.19 ± 0.02[a]	0.34 ± 0.01[b]

ผลของการแช่ในพลาสม่าเป็นค่าจากการทำซ้ำ 3 ครั้ง
ขณะที่การแช่ในภาวะไม่มีพลาสม่าเป็นผลจากการการทำซ้ำ 5 ครั้ง.

ตาราง 13 การเปลี่ยนแปลงกรดไขมันบนเกล็ดเลือด (PLT-FA) ภายหลังการแช่กับ FM-LRFE ที่ความเข้มข้น 600 mg PL/dl โดยหักลบออกจากค่าที่ 0 mg PL/dl โดยเปรียบเทียบระหว่างเกล็ดเลือดที่แช่กับ FM-LRFE ในภาวะที่มีและไม่มีพลาสม่า

PLT-FA	FM-LRFE	
	with plasma	without plasma
Saturated	1.24 ± 0.29	1.25 ± 0.30
Monoenes	-0.77 ± 0.42	-1.07 ± 0.49
Polyenes	-0.27 ± 0.38	1.46 ± 0.36
LA	-0.27 ± 0.10	-0.30 ± 0.13
AA	-1.12 ± 0.26	-2.70 ± 0.28
EPA	0.24 ± 0.08	0.89 ± 0.09
DHA	0.76 ± 0.31	3.35 ± 0.34
n-3	1.12 ± 0.38	4.45 ± 0.42
n-6	-1.39 ± 0.30	-3.00 ± 0.27
n-3/n-6	0.05 ± 0.01	0.20 ± 0.02

ผลที่ได้มาจากการหักลบของ PLT-FA ที่ 600 mgPL/dl จากที่ 0 mgPL/dl

ตาราง 14 กรดไขมันในเกล็ดเลือด (g/100g total PLT-FA) ภายหลังทิ้งไว้ใน NSS 0, 1, 3, และ 5 ชม. โดยก่อนหน้านี้เซลล์ผ่านการแช่ใน FM-LRFE เป็นเวลา 1 ชม. ที่ 22°C ที่ความเข้มข้นของเลซิทิน 600mg PL/dl

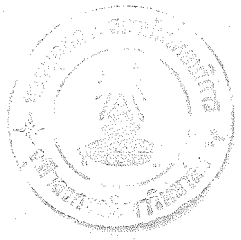
PLT-FA	FM-LRFE				
	Control	0 h	1 h	3 h	5 h
C 14:0	0.28 ± 0.07	0.69 ± 0.08	0.64 ± 0.07	0.66 ± 0.07	0.64 ± 0.07
C 15:1	3.20 ± 0.22	2.73 ± 0.23	2.70 ± 0.25	2.63 ± 0.24	2.69 ± 0.22
C 16:0	16.65 ± 0.82	18.84 ± 0.91	18.94 ± 0.89	18.81 ± 0.82	18.84 ± 0.97
C 16:1n-7	0.24 ± 0.04	0.50 ± 0.05	0.51 ± 0.06	0.50 ± 0.06	0.52 ± 0.05
C 18:0	17.01 ± 0.23	16.87 ± 0.27	16.92 ± 0.31	16.86 ± 0.35	16.84 ± 0.27
C 18:1n-9	13.21 ± 0.71	12.51 ± 0.65	12.59 ± 0.74	12.65 ± 0.72	12.60 ± 0.68
C 18:1n-7	0.81 ± 0.11	1.17 ± 0.13	1.21 ± 0.13	1.25 ± 0.12	1.15 ± 0.11
C 18:2n-6	5.63 ± 0.38	5.35 ± 0.41	5.32 ± 0.44	5.28 ± 0.42	5.34 ± 0.36
C 18:3n-3	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.01
C 20:0	1.60 ± 0.21	1.31 ± 0.25	1.26 ± 0.24	1.30 ± 0.26	1.33 ± 0.31
C 20:4n-6	21.96 ± 0.51	19.45 ± 0.47	19.46 ± 0.36	19.48 ± 0.44	19.46 ± 0.56
C 20:5n-3	0.41 ± 0.11	1 .35 ± 0.12	1.34 ± 0.13	1.36 ± 0.12	1.33 ± 0.13
C 21:0	1.11 ± 0.11	1.04 ± 0.14	1.05 ± 0.10	1.03 ± 0.12	1.04 ± 0.14
C 22:0	2.56 ± 0.31	1.97 ± 0.36	1.97 ± 0.33	1.98 ± 0.27	2.00 ± 0.25
C 22:5n-3	0.90 ± 0.07	1.06 ± 0.04	1.05 ± 0.08	1.06 ± 0.05	1.06 ± 0.07
C 22:6n-3	2.46 ± 0.28	5.94 ± 0.32	5.93 ± 0.30	5.90 ± 0.24	5.89 ± 0.35
C 24:0	1.93 ± 0.05	1.47 ± 0.08	1.52 ± 0.06	1.53 ± 0.09	1.50 ± 0.08
C 24:1	1.90 ± 0.12	1.55 ± 0.14	1.59 ± 0.15	1.56 ± 0.13	1.54 ± 0.11
Others	8.08 ± 0.46	6.09 ± 0.62	5.89 ± 0.70	6.04 ± 0.53	6.13 ± 0.77
n-3	3.83 ± 0.33	8.46 ± 0.37	8.43 ± 0.33	8.44 ± 0.30	8.38 ± 0.43
n-6	27.59 ± 0.62	24.80 ± 0.57	24.78 ± 0.71	24.76 ± 0.83	24.80 ± 0.76
n-3/n-6	0.14 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.01

แสดงผลเป็นค่า Mean ± S.D. ของการวิเคราะห์ 3 ครั้ง

การแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างอิมัลชันไขมันและเกล็ดเลือด

การเพิ่มสัดส่วนของกรดไขมันโอเมก้า 3 บนเมมเบรนของเกล็ดเลือดทำโดยการแช่เกล็ดเลือดกับอิมัลชันไขมันความเข้มข้นของ PL ระดับต่างๆตั้งแต่ 0-600 mg/dl เป็นเวลา 1 ชม. ในภาวะที่ไม่มีพลาสม่าและทำการวิเคราะห์กรดไขมันในทันทีโดยไม่มีการแช่เกล็ดเลือดที่แยกอิมัลชันไขมันแล้วทิ้งค้างไว้ใน NSS ผลของการแช่ในอิมัลชันไขมันทำให้เกล็ดเลือดรับกรดไขมันโดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมัน DHA ที่มีปริมาณสูงในอิมัลชันไขมัน ผลของการเปลี่ยนแปลงแสดงไว้ในตาราง 15

การแช่เกล็ดเลือดไว้ในอิมัลชันไขมันเป็นเวลา 1 ชม. ทำให้เมมเบรนของเกล็ดเลือดมีกรดไขมันอิ่มตัวคือ C14:0, C16:0 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ดูค่า p จากตาราง) ขณะที่กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกลุ่มโอเมก้า 6 ได้แก่ C20:4n-6 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.001$) เมื่อพิจารณากรดไขมันโอเมก้า 3 ซึ่งเป็นกรดไขมันที่เป็นวัตถุประสงค์หลักของการทดลองพบว่า C20:5n-3 และ C22:6n-3 หรือ EPA และ DHA มีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เป็นผลให้ผลรวมของ n-3 รวมมีค่าสูงขึ้นตามความเข้มข้นของ PL ที่เพิ่มขึ้น (ตาราง 16) และสัดส่วนระหว่าง n-3/n-6 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการหาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์กรดไขมันแต่ละตัวกับค่าความเข้มข้นของ PL ที่แช่กับเกล็ดเลือด ดังแสดงใน ตาราง 17 จะพบว่า การเปลี่ยนแปลงของ PUFA, alpha-linolenic acid, EPA, DHA, n-3, arachidonic acid (AA), n-6 และ n-3/n-6 บนเมมเบรนของเกล็ดเลือดมีสหสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ PL ที่ใช้ ($p<0.01$-0.001) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของกรดไขมันโอเมก้า 3 คือ EPA และ DHA มีสหสัมพันธ์สูงที่สุด ($r = 0.93$ และ 0.64 สำหรับ EPA, DHA ตามลำดับ)



ตาราง 15 กรดไขมันที่พบในเกล็ดเลือดแสดงค่าเป็น g/100 g total PLT-FA ภายหลังการแช่ใน FM-LRFE ที่ 22°C เป็นเวลา 1 ชม. ความเข้มข้นของฟอสโฟลิปิด 0, 100, 300 และ 600 mg/dl

PLT-FA	FM-LRFE				
	0 mg/dl	100 mg/dl	300 mg/dl	600 mg/dl	P-value
C 14:0	0.29 ± 0.06^{c}	0.40 ± 0.08^{b}	0.59 ± 0.09^{a}	0.63 ± 0.07^{a}	0.00
C 15:0	3.19 ± 0.25^{a}	2.96 ± 0.24^{a}	2.63 ± 0.23^{b}	2.57 ± 0.21^{b}	0.00
C 16:0	16.30 ± 0.85^{b}	17.61 ± 1.33^{a,b}	18.48 ± 1.25^{a}	18.74 ± 0.82^{a}	0.01
C 16:1 n-7	0.23 ± 0.05^{b}	0.29 ± 0.05^{b}	0.42 ± 0.06^{a}	0.49 ± 0.06^{a}	0.00
C 18:0	17.11 ± 0.35^{a}	17.25 ± 0.21^{a}	16.63 ± 0.39^{b}	16.92 ± 0.21^{a,b}	0.02
C 18:1 n-9	13.12 ± 0.74	12.98 ± 0.73	12.58 ± 0.65	12.50 ± 0.73	0.28
C 18:1 n-7	0.81 ± 0.16^{b}	0.92 ± 0.13^{a,b}	1.06 ± 0.11^{a}	1.09 ± 0.12^{a}	0.01
C 18:2 n-6	5.63 ± 0.41	5.41 ± 0.42	5.33 ± 0.38	5.33 ± 0.45	0.48
C 18:3 n-3	0.06 ± 0.01^{b}	0.06 ± 0.02^{b}	0.08 ± 0.01^{a}	0.10 ± 0.01^{a}	0.00
C 20:0	1.64 ± 0.32	1.46 ± 0.29	1.46 ± 0.41	1.37 ± 0.25	0.60
C 20:4 n-6	21.90 ± 0.44^{a}	20.72 ± 0.68^{b}	19.65 ± 0.29^{c}	19.20 ± 0.32^{c}	0.00
C 20:5 n-3	0.44 ± 0.11^{d}	0.71 ± 0.12^{c}	0.99 ± 0.15^{b}	1.33 ± 0.13^{a}	0.00
C 21:0	1.13 ± 0.18	1.06 ± 0.16	1.04 ± 0.12	1.04 ± 0.15	0.72
C 22:0	2.75 ± 0.28^{a}	2.49 ± 0.31^{a,b}	2.26 ± 0.35^{b}	2.16 ± 0.33^{b}	0.05
C 22:5 n-3	0.89 ± 0.09^{c}	0.95 ± 0.07^{b,c}	0.99 ± 0.04^{b}	1.06 ± 0.06^{a}	0.01
C 22:6 n-3	2.47 ± 0.23^{d}	3.59 ± 0.37^{c}	4.98 ± 0.39^{b}	5.82 ± 0.30^{a}	0.00
C 24:0	1.85 ± 0.05^{a}	1.65 ± 0.06^{b}	1.49 ± 0.10^{c}	1.46 ± 0.10^{c}	0.00
C 24:1	1.92 ± 0.25^{a}	1.80 ± 0.15^{a,b}	1.68 ± 0.20^{a,b}	1.55 ± 0.12^{b}	0.04
Others	8.28 ± 0.40^{a}	7.73 ± 0.89^{b}	7.67 ± 0.33^{b}	6.64 ± 0.76^{c}	0.01

แสดงผลในรูป Mean ± S.D. ของการทำซ้ำและวิเคราะห์ 5 ครั้ง

อักษรที่ต่างกันเหนือตัวเลขแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตาราง 16 องค์ประกอบของกรดไขมันอิ่มตัว และไม่อิ่มตัว (g/100g total PLT-FA) ในเกล็ดเลือด ภายหลังการแช่กับ FM-LR FE ที่ 22°C เป็นเวลา 1 ชม. ที่ความเข้มข้นของฟอสโฟลิปิดจากอิมัลชันไขมัน 0, 100, 300 และ 600 mg/dl

กรดไขมัน	FM-LRFE			
	0 mg/dl	100 mg/dl	300 mg/dl	600 mg/dl
SAFA	41.07 ± 0.80	41.91 ± 1.04	41.93 ± 1.11	42.32 ± 0.58
MUFA	19.27 ± 1.26	18.94 ± 1.11	18.38 ± 1.09	18.20 ± 1.12
PUFA	31.38 ± 0.86	31.43 ± 1.08	32.02 ± 0.86	32.84 ± 0.83
LA	5.63 ± 0.40	5.41 ± 0.42	5.33 ± 0.38	5.33 ± 0.45
AA	21.90 ± 0.44^{a}	20.72 ± 0.68^{b}	19.65 ± 0.29^{c}	19.20 ± 0.32^{c}
EPA	0.44 ± 0.11^{d}	0.71 ± 0.12^{c}	0.99 ± 0.15^{b}	1.33 ± 0.13^{a}
DHA	2.47 ± 0.23^{d}	3.59 ± 0.37^{c}	4.98 ± 0.39^{b}	5.82 ± 0.30^{a}
n-3	3.86 ± 0.29^{d}	5.30 ± 0.45^{c}	7.04 ± 0.48^{b}	8.31 ± 0.37^{a}
n-6	27.53 ± 0.64^{a}	26.13 ± 0.83^{b}	24.98 ± 0.64^{c}	24.53 ± 0.42^{c}
n-3/n-6	0.14 ± 0.01^{d}	0.20 ± 0.02^{c}	0.28 ± 0.02^{b}	0.34 ± 0.01^{a}

แสดงผลในรูป Mean ± S.D. ของการทำซ้ำและวิเคราะห์ 5 ครั้ง

อักษรที่ต่างกันเหนือตัวเลขแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตาราง 17 สมการแสดงสหสัมพันธ์ (r) ค่า t และ p ระหว่างเปอร์เซ็นต์กรดไขมัน (Y) ภายหลังการแช่ในอิมัลชัน FM-LRFE ความเข้มข้นต่างๆกัน (X)

กรดไขมัน	FM-LRFE				
	สมการ	r	df	t	p-value
SAFA	Y=41.3848+0.0017X	0.4170	18	1.9468	NS
MUFA	Y=19.1363-0.0018X	0.3626	18	1.6504	NS
PUFA	Y=31.2642+0.0028X	0.5794	18	3.0161	<0.010
ALA	Y=0.0553+7.6E-05X	0.8094	18	5.8483	<0.001
EPA	Y=0.5080+0.0014X	0.9319	18	10.8994	<0.001
DHA	Y=2.8702+0.0054X	0.9360	18	11.2771	<0.001
n-3	Y=4.1335+0.0075X	0.9455	18	12.3112	<0.001
LA	Y=5.5264-0.0004X	0.2406	18	1.0516	NS
AA	Y=21.4172-0.0042X	0.8578	18	7.0776	<0.001
n-6	Y=26.9436-0.0046X	0.8135	18	5.9336	<0.001
n-3/n-6	Y=0.1593+0.0003X	0.9522	18	13.2250	<0.001

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

โรคหัวใจและหลอดเลือด หรือ Cardiovascular disease (CVD) เป็นโรคที่ก่อให้เกิดการเจ็บและตายมากที่สุดโรคหนึ่งไม่เฉพาะในสังคมไทยเท่านั้นแต่รวมถึงสังคมทั่วไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสังคมของชาติพัฒนา โรคหัวใจและหลอดเลือดก่อให้เกิดผลกระทบต่อรายได้ ค่าใช้จ่ายทางด้านการรักษาในและภายนอกโรงพยาบาล การใช้ยา ซึ่งต่างส่งผลเสียต่อสภาพเศรษฐกิจและสังคมทั้งสิ้น แต่เดิมการป้องกันโรคหัวใจเน้นไปทางด้านการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดของผู้ป่วย มีการใช้กรดไขมันโอเมก้า 6 จากน้ำมันพืชเป็นหลักเนื่องจากเคยเชื่อกันในอดีตว่ากรดไขมันเหล่านี้สามารถลดคอเลสเตอรอลในเลือดได้ ปัจจุบันความเข้าใจในกลไกการเกิด CVD เป็นที่รับรู้กันมากขึ้น การให้กรดไขมันโอเมก้า 6 ในปริมาณมากนอกจากจะไม่ให้ผลดีดังที่เคยเข้าใจยังอาจสร้างปัญหาได้ เช่น การลดระดับ HDL ในกรณีที่มีการให้กรดไขมันโอเมก้า 6 ปริมาณมากร้อยละ 12 ของพลังงานที่ได้รับต่อวัน (BNFTF, 1994) นอกจากนี้พรอสตาแกลนดินที่ได้มาจากกรดไขมันโอเมก้า 6 ยังมีคุณสมบัติเป็น proatherogenic และ prothrombogenic ส่งผลให้เกิดการเร่งการเกิดโรคหัวใจ (Grimminger et al, 1995) ขณะนี้ความสนใจในเรื่องของกรดไขมันโอเมก้า 3 มีมากขึ้น กรดไขมัน EPA, DHA มีผลต่อ atherogenesis, inflammation, thrombus formation, gene expression, และ cell-to-cell communication กลไกที่เอื้อประโยชน์เหล่านี้ส่งผลให้กรดไขมันโอเมก้า 3 ช่วยลดอุบัติการณ์เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (BNFTF, 1994)

ความสนใจในเรื่องของกรดไขมันโอเมก้า 3 เริ่มต้นจากการศึกษาทางระบาดวิทยาในคนเอสกิโมในเกาะกรีนแลนด์โดย Bang และ Dyerberg (1971) นักวิจัยกลุ่มนี้พบว่าคนเอสกิโมมี total cholesterol, TG, LDL, very low density lipoproteins (VLDL) ในพลาสม่าค่อนข้างต่ำ ขณะที่มี HDL สูงเมื่อเทียบกับคนเดนมาร์ค ประชากรทั้งสองกลุ่มต่างรับประทานไขมันในอาหารในสัดส่วนที่สูง สิ่งที่น่าสนใจคือคนเอสกิโมมีอุบัติการณ์เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดต่ำมาก ในขณะที่คนเดนมาร์คเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดสูง เหตุผลที่ใช้อธิบายคือคนเอสกิโมรับประทานไขมันจากปลาทะเลที่มีสัดส่วนของกรดไขมันโอเมก้า 3 สูง (Simopoulos, 1997)

นอกจากคนเอสกิโมในกรีนแลนด์แล้วยังมีรายงานเกี่ยวกับเรื่องคนเอสกิโมมีปัญหาโรคหัวใจและหลอดเลือดต่ำในเขตอลาสก้าของสหรัฐอเมริกาด้วย (BNFTF, 1994) ในขณะเดียวกันการศึกษาในชาวญี่ปุ่นซึ่งเป็นประชากรที่รับประทานปลาทะเลต่ำกว่าคนเอสกิโมแต่ยังถือว่าบริโภคปลาในระดับกลางพบว่าประชากรที่เป็นชาวประมงมีอุบัติการณ์ของโรคหัวใจและหลอดเลือดต่ำกว่าประชากรที่อาศัยลึกเข้าไปในแผ่นดิน (BNFTF, 1994) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในประชากรกลุ่มอื่นที่ต่างให้ข้อสรุปตรงกันว่ากรดไขมันโอเมก้า 3 ให้ผลดีต่อการป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด

กรดไขมันโอเมก้า 3 ป้องกันอุบัติการณ์การเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดด้วยหลายกลไก (Connor, 1997) EPA และ DHA ซึ่งเป็นกรดไขมันโอเมก้า 3 ตัวสำคัญที่พบมากในปลาทะเลหลายชนิดแสดงฤทธิ์เป็น strong antiarrhythmic action ต่อหัวใจ กรดไขมันทั้งสองตัวนี้ป้องกันการพัฒนาของ ventricular fibrillation ในสัตว์ทดลองได้ การรับประทานปลาทะเล 1-2 มื้อใหญ่ต่อสัปดาห์สามารถป้องกันผู้ป่วยโรคหัวใจให้รอดพ้นจากการตายอย่างฉับพลัน (Stansby, 1990) นอกจากนี้ยังมีรายงานด้วยว่าผู้ไม่รับประทานปลาแต่รับประทานน้ำมันปลา 1-2 แคปซูลต่อวันสามารถป้องกันโรคหัวใจได้เช่นเดียวกัน (Burr et al., 1989) กรดไขมันโอเมก้า 3 จึงช่วยยับยั้งการหยุดของหัวใจได้ในกรณีของผู้ป่วยด้วยโรคหัวใจและหลอดเลือด ผลทางด้านantiarrhythmic ของกรดไขมันโอเมก้า 3 เหล่านี้เกี่ยวข้องกับ ventricular fibrillation นั่นเอง (Connor, 1997)

กลไกของกรดไขมันโอเมก้า 3 ในการป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือดทั้งทางด้านการป้องกัน atherogenesis และ thrombogenesis สามารถอธิบายได้ด้วยปริมาณของกรดไขมันโอเมก้า 3 บนเมมเบรนของเกล็ดเลือด การรับประทานกรดไขมันโอเมก้า 3 ในอาหารทำให้กรดไขมันเหล่านี้เข้าไปสะสมบนผนังของเกล็ดเลือดและเซลล์เลือดอื่นๆได้ทีละน้อย (Schmidt and Dyerberg, 1994) การที่เกล็ดเลือดมีกรดไขมันโอเมก้า 3 สัดส่วนที่สูงนอกจากจะเป็นแหล่งสร้างพรอสตาแกลนดินที่ลดการเกิดลิ่มเลือดและกลไกอื่นที่เร่งภาวะของโรคหัวใจและหลอดเลือดแล้ว มันยังเข้าไปแทนที่กรดอะรัคชิโดนิกทำให้การเกิด proaggretory TXA_2 ลดลง (von Schacky et al., 1985) การปรากฏ n-3 PUFA บนเมมเบรนของเกล็ดเลือดจึงถูกพิจารณาให้เป็นหนึ่งในกลไกสำคัญในการป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด (Tremoli et al.., 1995; Vlasic et al., 1993)

ผู้ที่มีกรดไขมันโอเมก้า 3 ในเลือดปริมาณสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งบนผนังเซลล์มีผลทำให้การจับตัวของเกล็ดเลือดลดลง (Goodnight et al., 1981; Terano et al., 1983) เกล็ดเลือดเมื่อมีกรดไขมันโอเมก้า 3 มากการจับตัวกันจะยิ่งช้าลง (BNFTF, 1994) ซึ่งรับรู้กันดีว่าปัญหาการจับตัวกันได้ง่ายของเกล็ดเลือดนี้เองที่ก่อให้เกิดปัญหาลิ่มเลือดเข้าไปอุดตันบริเวณหลอดเลือดตีบของเส้นเลือดหัวใจ ทำให้เกิดปัญหาหัวใจวาย กล้ามเนื้อหัวใจตาย หรือหากเกิดที่บริเวณหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงสมองย่อมก่อให้เกิดภาวะหลอดเลือดสมองอุดตันเฉียบพลันจนเกิดการตายและพิการได้ การให้รับประทานกรดไขมันโอเมก้า 3 ในปริมาณน้อยกว่า 4 g/day จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดไขมันโอเมก้า 3 บนเมมเบรนของเซลล์เลือดได้ช้า การเสริมกรดไขมันโอเมก้า 3 ในปริมาณต่ำจะมีผลอย่างไรต่อการจับตัวของเกล็ดเลือดจึงจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาเพื่อหาข้อมูลขณะเดียวกันการรับประทาน n-3 PUFA ในปริมาณมากก็ไม่จำเป็นว่าจะทำให้กรดไขมันกลุ่มนี้บนเมมเบรนของเกล็ดเลือดสูงขึ้นมากเสมอไป นอกจากกรดไขมันโอเมก้า 3 บนเกล็ดเลือดจะเกี่ยวข้องกับการทำงานของเกล็ดเลือดเองแล้วมันอาจจะส่งผลไปถึงการทำงานของอวัยวะและเซลล์อื่นๆได้ด้วย ดังเช่น การ

ทำงานของเซลล์สมอง (Rao et al., 1996a; Vecino et al., 1996) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของ n-3 PUFA บนเมมเบรนของเกล็ดเลือดจึงให้ประโยชน์ค่อนข้างกว้าง

การเพิ่มสัดส่วนของกรดไขมันโอเมก้า 3 บนเมมเบรนของเกล็ดเลือดและเซลล์ทั่วไปทำได้โดยการรับประทานอาหารที่มีกรดไขมันโอเมก้า 3 ปริมาณสูงเป็นเวลานานต่อเนื่องกันเป็นเวลานานพอสมควร (Sanikorski et al.,1996; Leece and Allman., 1996; Handerson et al.., 1994) Dougherty et al. (1987) ทำการศึกษาในประชากรชนบทของสามประเทศ พบว่ากรดไขมันบน PL ของเมมเบรนของเซลล์สัมพันธ์กับกรดไขมันที่พบในอาหารแสดงว่าไขมันจากอาหารสามารถเข้าสู่เมมเบรนของเซลล์ได้ โดยพบว่าหากรับประทานกรดไขมันชนิดใดมาก กรดไขมันตัวนั้นจะไปปรากฏบนเมมเบรนได้มาก Greenwood et al. (1989) รายงานถึงการให้อาหารแก่หนูประกอบด้วย 20% ไขมันที่มาจากการผสมไขมันชนิดต่างๆทำให้ n-6/n-3 fatty acid ratios มีค่าแตกต่างกันตั้งแต่ 1.8 ถึง 165 เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ เขาพบ 22-carbon fatty acids ในสมองของหนู แสดงให้เห็นว่าการนำกรดไขมันจากอาหารผ่านเข้าไปเป็นองค์ประกอบของสมองใช้เวลายาวนาน 8 สัปดาห์ เทียบเท่ากับเวลา 8 ปีในมนุษย์ Ferrier et al. (1995) เสริมอาหารแก่อาสาสมัครด้วยไข่ที่มีกรดไขมัน ALA และ DHA ซึ่งเป็นกรดไขมันโอเมก้า 3 ในปริมาณสูงเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ พบว่า total n-3 PUFA และ n-3/n-6 PUFA ratio ของเกล็ดเลือดเพิ่มสูงขึ้น แสดงว่ากรดไขมันโอเมก้า 3 จากอาหารผ่านเข้าสู่เกล็ดเลือดได้โดยใช้เวลาประมาณ 2 สัปดาห์

ผู้วิจัยเคยรายงานการเปลี่ยนแปลงลิพิดบนเซลล์เลือดในเวลาที่สั้นกว่านี้ (Dahlan et al., 1992a, 1992b) ดังเช่น การให้อิมัลชันไขมันทางหลอดเลือดดำในมนุษย์ที่ความเร็วของการหยด TG เท่ากับ 0.3 g/kg.น้ำหนักตัว/h เป็นเวลานาน 6 ชม. ส่งผลให้คอเลสเตอรอลอิสระบนเซลล์เม็ดเลือดแดงลดลงขณะที่ PL เพิ่มสูงขึ้น (Dahlan et al., 1992a) นอกจากนี้การให้อิมัลชันไขมันที่มีกรดไขมันโอเมก้า 6 ปริมาณสูงทางหลอดเลือดดำในผู้ป่วยเป็นเวลานาน 3 เดือนมีผลทำให้กรดไขมันโอเมก้า 6 บนผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงสูงขึ้นขณะที่กรดไขมันโอเมก้า 3 เช่น DHA ลดลง (Dahlan et al., 1992b) การศึกษาเรื่องแรกจะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นผลมาจากไลโปโซมที่มีอยู่ในอิมัลชันไขมัน พาร์ติเคิลเหล่านี้มีสัดส่วน PL/TG สูง ขณะที่การศึกษาเรื่องหลังเป็นผลจากพาร์ติเคิลของอิมัลชันไขมันเองซึ่งมีสัดส่วนของ PL/TG ต่ำกว่าจึงใช้เวลานานกว่า

ผู้วิจัยเตรียมอิมัลชันไขมันและไลโปโซมที่มีกรดไขมันโอเมก้า 3 ในปริมาณสูงโดยใช้ปลาป่นเป็นแหล่งวัตถุดิบ (Dahlan, 1995; Dahlan et al., 1996) ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เราได้ร่นระยะเวลาที่จะเหนี่ยวนำให้เกล็ดเลือดเกิดการเปลี่ยนแปลงกรดไขมันโดยการใช้อิมัลชันไขมันหรือไลโปโซมเป็นตัวนำเอา n-3 PUFA จ่ายโดยตรงให้แก่เซลล์ การทดลองจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจะใช้ประโยชน์จากอิมัลชันไขมันที่มี PL/TG สูงในการเพิ่มกรดไขมันโอเมก้า 3 บนผนังเกล็ดเลือด โดย

ปกติการศึกษาเกล็ดเลือดเป็นเรื่องที่อาจสร้างปัญหาได้ง่าย มีความยุ่งยากสูง เนื่องจากเกล็ดเลือดที่แยกออกมาจากเลือดจับตัวกันได้ง่าย ในกรณีนี้ทางศูนย์บริการโลหิต สภากาชาดไทยมีประสบการณ์ยาวนานในการทำงานกับเกล็ดเลือดโดยไม่ทำให้เกิดการจับตัวกันได้ง่าย การเขย่าอย่างสม่ำเสมอ การควบคุมอุณหภูมิต่างเป็นเทคนิคที่จะต้องใส่ใจให้มากหากจะป้องกันการจับตัวกันของเกล็ดเลือด Hawker et al. (1996) ทดลองใช้ PGE_1 เป็นสาร antiaggregatory substances ในการเตรียมเกล็ดเลือด เนื่องจากพบว่า PGE_1 ช่วยทำให้เกล็ดเลือดหลุดออกจากการจับตัวกันได้ อย่างไรก็ตาม การทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาเซลล์เกล็ดเลือดที่เตรียมขึ้นใหม่ การระมัดระวังและใช้ประสบการณ์ทำงานกับเกล็ดเลือดจึงให้ผลได้เป็นที่น่าพอใจโดยไม่จำเป็นต้องเติมสารป้องกันเกล็ดเลือดจับตัวอีก

อาสาสมัครที่บริจาคโลหิตเพื่อใช้ในการเตรียมเกล็ดเลือดมีทั้งสิ้น 122 คน ส่วนใหญ่เป็นชาย อย่างไรก็ตามเพศไม่มีผลต่อชนิดและปริมาณของเกล็ดเลือด นอกจากนี้ยังไม่พบว่าหมู่เลือดจะให้ผลใดๆต่อการเตรียมเกล็ดเลือด เมื่อเตรียมเกล็ดเลือดได้แล้วจึงนำเกล็ดเลือดไปใช้ทำการทดลองด้วยวิธีการสุ่ม ขณะเดียวกันอิมัลชันไขมันที่ใช้ในการทดลองได้รับจากการเตรียมขึ้นใหม่เช่นเดียวกัน จากประสบการณ์ทำให้คณะของเราทราบว่าปลาป่นเป็นแหล่งที่ดีของเลซิทินที่มีกรดไขมันโอเมก้า 3 ในปริมาณสูง (Dahlan, 1996) และกรดไขมันโอเมก้า 3 เหล่านี้ปรากฏอยู่ในส่วนของ PL เมื่อจัดเตรียมเป็นอิมัลชันไขมันกรดไขมันโอเมก้า 3 จึงมีความพร้อมสูงในการแลกเปลี่ยนกับเซลล์ภายนอก (Dahlan et al., 1997; Chatnilbandhu, 1996) ในการทดลองครั้งนี้เราใช้ปลาป่นจากเดนมาร์คเป็นแหล่งของเลซิทินที่มีลักษณะพิเศษนั่นคือมีกรดไขมในโอเมก้า 3 ปริมาณสูงจึงได้คัดเลือกปลาป่นเดนมาร์คเป็นวัตถุดิบในการเตรียมเลซิทิน

นอกเหนือจากปริมาณของเลซิทินแล้ว ชนิดของ PL ในเลซิทินยังมีความสำคัญต่อกลไกการทำงานของเซลล์เช่นเดียวกัน Zerouga et al. (1996) เพาะเลี้ยงเซลล์ T27A ในมีเดียที่เสริม DHA เขาพบว่า DHA สามารถผ่านเข้าไปสะสมในเมมเบรนได้อย่างรวดเร็วโดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของ PL ชนิด phosphatidylethanolamine (PE) ขณะที่เข้าสู่ฟอสโฟลิปิดชนิด phosphatidylcholine (PhC) ได้ช้าและน้อยกว่า นอกจากนี้เขายังพบด้วยว่าพาร์ติเคิลของ DHA-containing PhC มีผลลด cell viability ในลักษณะที่สัมพันธ์กับความเข้มข้น ขณะที่ PE-containing vesicles มีผลน้อยกว่าแม้ว่ามันจะมี fusogenic มากกว่าก็ตามที สิ่งที่งานวิจัยของเขาตอบคือการแปรเปลี่ยนกรดไขมันที่เกิดขึ้นบนเมมเบรนขึ้นกับชนิดของกรดไขมันและชนิดของ PL นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ในลักษณะที่แตกต่างกันซึ่งเรื่องนี้จำเป็นที่จะต้องศึกษาต่อไป

ปัจจุบันการให้อิมัลชันไขมันที่มีน้ำมันปลาเป็นองค์ประกอบได้รับความสนใจมากขึ้น Grimminger et al. (1996) ทำการทดลองพบว่าเมื่อให้อิมัลชันไขมันที่มีน้ำมันปลาเป็นองค์ประกอบ

ในหนูทดลอง ลักษณะกรดไขมันและการสร้าง lipid mediators ในพลาสม่าเปลี่ยนแปลงไป ทั้งยืดอายุของหนูที่ถูกผ่าตัดเปลี่ยนหัวใจทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับอิมัลชันไขมันชนิดโอเมก้า 6 ในการศึกษาของเรา FM-LRFE มีปริมาณ DHA ในส่วนของ PL ค่อนข้างสูงโดยมีอยู่สูงถึง 28% กรดไขมันเหล่านี้ส่วนใหญ่อยู่ในส่วนของ PhC-DHA ดังได้อ้างไว้ในการศึกษาในอดีต (Dahlan et al., 1995) จึงเป็นไปได้ค่อนข้างมากว่าการเปลี่ยนแปลงของ DHA เกิดขึ้นที่บริเวณ PhC เป็นหลัก อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้มิได้ให้รายละเอียดว่าการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นที่ PL กลุ่มใด

Bayon และคณะได้สาธิตให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงกรดไขมันบนเมมเบรนของเกล็ดเลือดเกิดขึ้นได้โดยการช่วยเหลือของ nonspecific และ specific lipid transfer proteins (Bayon et al., 1995a) ในการศึกษาของเราเมื่อทดลองใช้พลาสม่าซึ่งแน่นอนย่อมมีโปรตีนบางชนิดปนอยู่กลับพบว่าการแลกเปลี่ยนกรดไขมันถูกจำกัด แต่หากให้อิมัลชันไขมันได้สัมผัสกับเซลล์โดยตรงในภาวะที่ไร้พลาสม่า การแลกเปลี่ยนกลับเกิดขึ้นได้สะดวกและรวดเร็วกว่า ปรากฏการณ์นี้อาจสืบเนื่องมาจากโปรตีนบางชนิดในพลาสม่าช่วยอำนวยความสะดวกในการแลกเปลี่ยนกรดไขมันได้ อย่างไรก็ตามยังมีโปรตีนและเอนไซม์หลายชนิดที่ทำให้การแลกเปลี่ยนเกิดขึ้นได้ยาก สรุปโดยรวมแล้วเหตุที่การแช่ในภาวะที่มีพลาสม่าเซลล์เปลี่ยนแปลงกรดไขมันน้อยก็เพราะเซลล์พยายามรักษาสภาพเดิมของมันไว้ให้ได้นานที่สุดโดยได้รับความช่วยเหลือจากโปรตีนหลายกลุ่มในพลาสม่า สิ่งนี้เป็นคำอธิบายได้ด้วยว่าเหตุใดในสภาพความเป็นจรองที่เกิดขึ้นในร่างกาย การแปรเปลี่ยนของเซลล์แม้จะเกิดขึ้นแต่ก็อยู่ในวงที่จำกัด (Dahlan, 1989)

การแลกเปลี่ยนกรดไขมันจากพาร์ติเคิลของอิมัลชันไขมันสู่เมมเบรนของเกล็ดเลือดใช้กลไกใดหรือไม่ยังไม่เป็นที่ทราบกันดีนัก เป็นไปได้ว่าเกล็ดเลือดมี receptor ที่สามารถจับกับพาร์ติเคิลของอิมัลชันไขมันทำให้กรดไขมันบนเมมเบรนเปลี่ยนแปลงไป Carpentier et al. (1997) ให้อิมัลชันไขมันที่มี MCT, น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันปลาเป็นองค์ประกอบ พบว่า TG ถูกขจัดออกจากกระแสเลือดได้รวดเร็ว แสดงว่าพาร์ติเคิลของอิมัลชันไขมันถูกขจัดออกได้เร็ว ขณะเดียวกันพบว่าเรมแนนท์หรือส่วนที่เหลือของอิมีลชันหากประกอบไปด้วยกรดไขมันโอเมก้า 3 ในปริมาณสูงมันจะถูกเซลล์บางชนิดจับไว้ ส่งผลให้กรดไขมันกลุ่มนี้เพิ่มขึ้นบนเมมเบรนของเซลล์ได้รวดเร็ว (ประมาณ 6 ชม.) คำอธิบายนี้สามารถนำมาใช้อธิบายผลการทดลองของเราในครั้งนี้เนื่องจาก อิมัลชันไขมัน FM-LRFE เป็นชนิดที่มีกรดไขมันโอเมก้า 3 สูงจึงถูกจับไว้ได้ด้วยเมมเบรนของเซลล์เกล็ดเลือด

การศึกษาของเราครั้งนี้พบว่ากรดไขมันโอเมก้า 3 ของเกล็ดเลือดเพิ่มสูงขึ้นภายหลังการแช่เซลล์ด้วยอิมัลชันไขมันที่มี PL สัดส่วนสูง ในการศึกษาของเราครั้งนี้นับเป็นครั้งแรกที่เราสามารถสาธิตให้เห็นได้ว่าในกรณีการแช่อิมัลชันไขมันกับเกล็ดเลือด มีลิพิด 2 ชนิดจากพาร์ติเคิลอิมัลชันไขมันที่สัมผัสกับเซลล์ นั่นคือส่วนของเปลือกอิมัลชันอันได้แก่ PL และส่วนของ TG ซึ่งอยู่ภายใน

แกนกลางของพาร์ติเคิล โดยส่วนที่เกิดการแลกเปลี่ยนเป็นส่วนของ PL โดยไม่มี TG เข้ามาเกี่ยวข้อง ทั้งนี้โดยกรดไขมันที่มีปริมาณสูงในส่วนของ TG เช่น C18:1 n-9 ส่งผลเปลี่ยนแปลงบนเมมเบรนของเกล็ดเลือดได้ค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้ก็ด้วยข้อเท็จจริงที่ว่าการแลกเปลี่ยนลิพิดที่อยู่ในส่วนของ TG หากจะเกิดขึ้นจำเป็นต้องใช้เอนไซม์บางชนิด เช่น CETP (Dahlan, 1989)

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ได้สาธิตให้เห็นว่าสัดส่วนของกรดไขมันโอเมก้า 3 บนเมมเบรนเกล็ดเลือดสามารถทำให้เพิ่มขึ้นได้โดยวิธีการแช่เกล็ดเลือดในห้วงเวลาสั้นๆกับอิมัลชันไขมันที่มีเลซิทินชนิดกรดไขมันโอเมก้า 3 สูง ประโยชน์ของเกล็ดเลือดที่มีสัดส่วนกรดไขมันโอเมก้า 3 สูงขึ้นมีอยู่หลายประการดังที่อธิบายไว้แล้วข้างต้น ผลการศึกษาทำให้สามารถคาดการณ์ไว้ว่าการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบกรดไขมันจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงหน้าที่การทำงานของเกล็ดเลือดในลักษณะที่เสริมกลไกการป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด ปัจจุบัน การเตรียมเกล็ดเลือดในงานทางด้านธนาคารโลหิตมีความจำเป็นมากขึ้นเพื่อเสริมเกล็ดเลือดให้แก่ผู้ป่วยที่ต้องการเกล็ดเลือด สิ่งที่น่าสนใจคือเกล็ดเลือดที่จะให้กลับคืนแก่ผู้ป่วยหากได้รับการปรุงแต่งสภาพกรดไขมันบนเมมเบรนในลักษณะที่เอื้อต่อการป้องกันโรคจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยหรือไม่ เรื่องนี้จำเป็นที่จะต้องได้รับการศึกษาวิจัยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Bang, H. O., Dyerberg, J., Horne, N. 1976. The composition of food comsumed by Greenland Eokimos. Acta Med. Scand. 200: 69-73.

Bartlett, G.R. 1958. Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem. 234: 466-468.

Bayon, Y., Cruset, M., Daveloose, D., Guerbette, F., Chirouze, V., Viret, J., Kader,J.C., and Lagarde, M. 1995. Effect of specific phospholipid molecular species incorporated in human platelet membranes on thromboxane A2/prostaglandin H2 receptors. J. Lipid Res. 36(1): 47-56.

Bligh, E.G., and Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can.J.Biochem. Physiol. 37: 911-917.

British Nutrition Foundation Task Force (BNFTF) 1994. Unsaturated Fatty Acids. Nutritional and Physiological Significance, London: Chapman&Hall.

Broekman, M.J., Handin, R.I., Derksen, A,., and Cohen, P. 1976. Distribution of phospholipids, fatty acids, and platelet factor 3 activity among subcellular fractions of human platelets. Blood 47(6): 963-971.

Burr, M. L., Gilbert, J.F., Holiday, R.M. 1989. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (Dart). Lancet 2: 756-761.

Carpentier, Y.A., Simoens, C., Siderova, V., el Nakadi , I., Vanweyenberg, V., Eggerickx, D., and Deckelbaum, R.J. 1997. Recent developments in lipid emulsions:relevance to intensive care. Nutrition 13: 73s-78s.

Chatnibandhu, S. 1996. Fish meal-derived lecithin-rich fat emulsion and its application as a supplier of omega-3 polyunsaturated fatty acids to blood cell. M.S. dissertation Chulalongkorn University Thailand.

Conner, W.E. 1997. Do the n-3 fatty acids from fish prevent deaths from cardiovascular disease. Am. J. Clin.Nutr. 66: 188-189.

Dahlan, W. 1989. Intravenous infusion of triacylglycerol-phospholipid complexes in man: effects on fatty acid pattern of plasma and on erythrocyte membrane lipid composition. Ph.D. dissertation, Universite Libre De Bruxelles.

Dahlan, W., Richelle, M., Kulapongse, S., Rossle, C., Deckelbaum, R.J., and Carpentier, Y.A. 1992(a). Modification of erythrocyte membrane lipid composition induced by a single intravenous infusion of phospholipid-triacylglycerol emulsions in man. Clin. Nutr. 11: 255-261.

Dahlan, W., Richelle, M., Kulapongse, S., Rossle, C., Deckelbaum, R.J., and Carpentier, Y.A. 1992(b). Effects of essential fatty acid contents of lipid emulsions on erythrocyte polyunsaturated fatty acid composition in patients on long-term parenteral nutrition. Clin.Nutr. 11: 262-268.

Dahlan, W. 1995. Utilization of fish meal-derived licithins as emulsifier for preparing mixed soya oil-fish oil emulsion. Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function and Applications: Proceeding of the 11th FAOBMB Symposium, Nov. 15-18 1994, pp.595-601. Thailand.

Dahlan, W., Chatnilbandhu, S., na-Nagara, B., and Carpentier, Y.A. 1996. Fish meal lecithin as alternative precursor of docosahexaenoate and choline. Biomed. Environ. Sci. 9: 263-268.

Dahlan, W., Chatnilbandhu, S., Piyatiratitivorakul, S., and na-Nagara, B. 1997. Bousting omega-3 fatty acid content to intact blood cells by brief interactive contact with liposomes of fish meal lecithin. In: Proceedings of Chulalongkorn University 80 th Anniversary Research Conference, Oct. 15-17, 1997., pp. 769-783. Thailand.

Dougherty, R.M., Galli, B.C. Ferro-Luzzi, A., and Iacono, J.M. 1987. Lipid and phospholipid fatty acid composition of plasma, red blood cell, and platelets and how they are affected by dietary lipids: a study of normal subjects from Italy, Finland, and the USA. Am. J. Clin.Nutr. 45: 443-455.

Dyerberg J., Bang, H.O., Stofferson, E., Moncada, S. and Vane, J.R. 1978. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis. Lancet 2: 117-119.

Dyerberg J. 1986. Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. Nutr. Rev. 44(4): 125-134.

Ferrier, L.K., Caston, L.J., Leeso, S., Squires, J., Weaver, B.J., and Holub, B.J. 1995. Alpha-Linolenic acid and docosahexaenoic acid-enriched eggs from hens fed flaxseed: influence on blood lipids and platelet phospholipid fatty acids in humans. Am. J. Clin. Nutr. 62(1): 81-86.

Goodnight, S.H.Jr., Harris, w.s., Conner, W.E. 1981. The effects of dietary omega-3 fatty acids upon platelet composition and function in man: a prospective, controlled study. Blood 58: 880-885.

Greenwood, C.E., McGee, C.D., and Dyer, J.R. 1989. Influence of dictary fat on brain membrane phospholipid fatty acid composition and neuronal function in mature rates. Nutrition 5(4): 278-281.

Grimminger, F., Grimm, H., Fuhrer, D., Papavassilis, C., Lindermann, G., Blecher, C., Mayer, K., and Seeger, W. 1996. ω-3 lipid infusion in a heart allotransplant model: shift in fatty acid and lipid mediator profiles and prolongation of transplant survival. Circulation 93: 365-371.

Grimminger, F., Mayer, K., Walmrath, D.,Schlutzer, E., and Seeger. W. 1995. Omega-3 fatty acids and imflammatory diseases. In:, L. Cynober, P.Furst, P. Lawin (eds.), Pharmacological Nutrition Immune Nutrition, pp.116-121. Munich. W. Zuckschwerd & Verlag.

Handerson, W. R. Jr., Astley, S.J., McCready, M..M., Kushmerick, P., Casey, S., Becker, J.W., and Ramsey B.W. 1994. Oral absorption of omega-3 fatty acids in patients with cystic fibrosis who have pancreatic insufficiency and in healthy control subjects. J. Pediatr. 124(3): 400-408.

Hawker, R.J., Turner, V.S., and Mitchell, S.G.1996. Use of prostaglandin E1 during preparation of platelet concentrates. Transfus Med. 6(3): 249-254.

Leece, E.A.,and Allman, M.A. 1996. The relationships between dietary alpha-linolenic:linoleic acid and rat platelet eicosapentaenoic and arachidonic acids. Br. J. Nutr. 76(3): 447-452.

Lepage, G., and Roy, C.C. 1984. Improved recovery of fatty acid through direct tranesterification without prior extraction or purification. J. Lipid Res. 25: 1391-1396.

New, R.R.C. 1994. Preparation of liposomes. In: R.R.C. New (ed.), Liposomes: A practical Approach, pp. 33-104. New York: IRL Press.

Phillips, G.B., and Dodge, J.T. 1967. Composition of phospholipids and of phospholipid fatty acids human plasma. J. Lipid Res. 8: 676-681.

Rao, G.H., Peller, J.D., Knopman, D.S., and White, J.G. 1996. Physiology and function of platelets from patients wiht Alzheimer's disease. Indian J. Physiol. Pharmacol. 40(1): 5-14.

Sanikorski, A.J., Sinclair, A.J. and Hamazaki, T.1996. Platelet and aorta arachidonic and eicosapentaenoic acid levels and in vitro eicosanoid production in rats fed high-fat diets. Lipids. 31(7): 729-735.

Schmidt, E.B., and Dyerberg, J. 1994. Omega-3 fatty acids: current status in cardiovascular medicine. Drugs 47(3): 405-424.

Simopoulos, A.P. 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. Am. J. Clin. Nutr. 54: 438-463.

Simopoulos, A.P. 1997. Ω-3 fatty acids in the prevention-management of cardiovascular disease. Can. J. Physiol. Pharmacol. 75: 234-239.

Stansby, M.E. 1990. Deterioration. In : M.E. Stansby (ed.) , Fish Oils in Nutrition , pp.120-140. New York : van Nostrand Reinhold.

Terano, T., Hirai, A.,Hamazaki, T. 1983. Effect of oral administration of highly purified eicosapentaenoic acid on platelet function, blood viscosity and red cell deformability in healthy human subjects. Atherosclerosis 46: 321-331.

Tremoli, E., Maderna, P., Marangoni, F., Colli, S., and Galli, C. 1995. Prolonged inhibition of platelet aggregation after n-3 fatty acid ethyl ester ingestion by healthy volunteers. Am.J.Clin.Nutr. 61: 607-613.

Vecino, A.M., Alvarez-Cermeno, J.C., Jimenez-Huete, A., Navarro, J.L., and Cesar, J.M. 1996. Lipid composition of platelets in patients suffering from migraine without aura. Headache 36(7):440-441.

Vlasic, N., Medow, M.S., Schwarz, S.M., Pritchard, KA Jr., Stemerman, M.R.1993. Lipid fluidity modulates platelet aggregation and agglutination in vitro. Life Sci. 53(13): 1053-1060.

von Schacky, C., Fischer, S., Weber, P. C. 1985. Long term effects of dietary marine n-3 fatty acids upon plasma and cellular lipids, platelet function, and eicosanoid formation in humans. J. Clin. Invest. 76:1626-1631.

Zerouga, M., Stillwell, W., Stone, J., Powner, A., and Jenski, L.J. 1996. Phospholipid class as a determinant in docosahexaenoic acid's effect on tumor cell viability. Anticancer Res. 16(5a): 2863-2868.