اندازه‌گیری و تغییرات غلظت HDL سرم در مردان و زنان

دکتر محمود دوستی
گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه

امروزه بیماریهای قلبی عروقی بین ۴۰ ـ ۳۰ درصد از کلیه مرگ و میرها را در جوامع صنعتی و شهری به خود اختصاص داده و در رتبه اول قرار داشته، به طوری که بیماریهایی همچون سرطانهای مختلف، دیابت و ... که حدود ۲۵ ـ ۲۰ درصد مرگ و میر را تشکیل می‌دهند در مراتب بعدی قرار دارند (۱ و ۲).

لذا مطالعات بسیار زیادی در زمینه‌های مختلف منجمله بیوشیمی بیماریهای قلبی عروقی صورت گرفته یا در حال انجام است. از نتایج حاصل دریافته‌اند که لیپید ایجاد کننده این

بیماریها، کلسترول استریفته حجیم، هتروسیلیک و شدیداً آب گریز می‌باشد. کلسترول موجود در خون که از دو منشاء غذایی (اگزوژن) و داخلی (آندوژن) تهیه می‌گردد، بوسیله لیپوپروتئین‌های مختلف نظیر LDL [1] یا لیپوپروتئین سبک و HDL [2] یا لیپوپروتئین سنگین مسیر رفت و برگشت خود را به کبد صورت می‌دهد (۳ و ۴).

مطالعات اپیدمیولوژیک انجام شده بر روی بیماران مبتلا به آترواسکلروز افزایش معنی‌داری در کلسترول ـ LDL و کاهش معنی‌داری در کلسترول ـ HDL خون این بیماران را نشان می‌دهد (۵). لذا اندازه‌گیری کلسترول ـ HDL باید به صورت یک آزمایش روتین به خصوص در سنین میانسالی که خطر ابتلاء به بیماریهای قلبی عروقی در اثر عوامل مختلف (فشار خون، افزایش لیپیدهای خون، اضطراب، سن، جنس، سیگار، عوامل ارثی، بیماریهای ثانویه همچون دیابت، بیماریهای کلیوی و ...) زیادتر است، انجام گیرد.

مطالعات تجربی نشان داده است که غلظت کلسترول ـ HDL در زنان بعد از بلوغ و قبل از یائسگی به علت وجود استروژن‌ها افزایش معنی‌داری نسبت به مردان در همان شرایط دارد (۶).

در این مطالعه، به جداسازی HDL موجود در سرم افراد طبیعی بوسیله روش رسوبی (۷ و ۸) و سپس اندازه‌گیری کلسترول موجود در آن (۹)، بدست آوردن روشی ارزان، ساده، سریع و قابل اطمینان برای جداسازی HDL سرم و بررسی کلسترول ـ HDL سرم (۱۰)، و نیز تعیین غلظت کلسترول ـ HDL سرم (۱۱) در دو جنس مذکر و مونث در شرایط سلامت پرداخته شده است.

نمونه‌ها

خون افراد مورد مطالعه بدون ماده ضد انعقاد، پس از یک شب (۱۴ ـ ۱۲ ساعت) ناشتا گرفته شده، و پس از انعقاد، با سانتریفوژ به مدت ۱۰ ـ ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه، سرم جدا می‌گردد. نباید نمونه خون تام بمدت طولانی در حرارت آزمایشگاه باقی بماند، چون در حرارت آزمایشگاه لیپیدهای موجود در خون که باید اندازه‌گیری شوند بین لیپوپروتئین‌های مختلف مبادله شده و تغییرات کیفی و کمّی به صورت مصنوعی بوجود می‌آید. لذا اگر آزمایش باید در زمان دیرتری صورت گیرد، پس از جداسازی سرم از خون تام می‌توان آن را چند روز در ۴ درجه سانتی‌گراد (یخچال) نگهداری کرده، و سپس آزمایشات مورد نظر را بر روی آن انجام داد. اگر سرم در ۱۵ ـ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود حداکثر تا ۱۸ هفته تغییراتی در لیپیدهای موجود در خون حاصل نمی‌شود.

«مطالعات تجربی نشان داده است که غلظت کلسترول ـ HDL در زنان بعد از بلوغ و قبل از یائسگی به علت وجود استروژن‌ها افزایش معنی‌داری نسبت به مردان در همان شرایط دارد.»

در این مطالعه ۵۱ نفر مرد سالم (سن ۳۰ ـ ۱۰ سال) و ۳۲ نفر زن سالم (سن ۱۰ ± ۳۰ سال) مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. افراد مورد

مطالعه به دو گروه مذکر و مونث تقسیم شده و بررسی تغییرات در هر ۱۰ سال انجام شده است. منظور از افراد سالم افرادی هستند که در آنها علائم بالینی و پاراکلینیکی خاصی مشاهده نگردیده بود. زنان مورد مطالعه از قرصهای ضد بارداری استفاده نمی‌کردند (۱۲).

روشها

HDL سرم افراد مورد مطالعه به وسیله روش رسوبی از بقیه لیپوپروتئینهای سرم جدا گردید (۱۳) و برای اینکار از پلی آنیونی همچون فسفوتنگستات سدیم (۴ درصد) به همراه فلز دو ظرفیتی نظیر منیزیم (به صورت کلرید منیزیم ۲ mol/l) استفاده شد.

برای اینکه عمل جداسازی HDL سرم در شرایط مناسب صورت گیرد، باید عمل جداسازی که به وسیله سانتریفوژ انجام می‌شود در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد باشد. چون در اثر افزایش سرعت سانتریفوژ، حرارت محیط نیز افزایش یافته و تغییرات کمّی و کیفی در متابولیسم لیپیدها و لیپوپروتئینهای سرم حاصل شده و در نتیجه نتایج حاصل حقیقی نخواهند بود، لذا باید با سانتریفوژ یخچال‌دار عمل جداسازی HDL انجام گردد (در صورت عدم وجود سانتریفوژ یخچال‌دار می‌توان از Cold Room استفاده کرد).

در صورت امکان، برای اطمینان از عمل جداسازی HDL، بهتر است با دانسیتومتر، وزن مخصوص HDL جدا شده اندازه‌گیری شود، چون اساس جداسازی لیپوپروتئینهای سرم ($Chy^{(۳)}$ ، $VLDL^{(۴)}$ ، LDL و HDL) در روش رسوبی بر حسب وزن مخصوص آنها می‌باشد.

مطالعات اپیدمیولوژیک انجام شده بر روی بیماران مبتلا به آترواسکلروز، افزایش معنی‌داری در کلسترول ـ LDL و کاهش معنی‌داری در کلسترول ـ HDL خون این بیماران را نشان می‌دهد.

پلی آنیونها (نظیر فسفوتنگستات سدیم، سولفات هپارین، سولفات دکستران، پلی اتیلن گلیکول و کونکاناوالین آ) به همراه فلزات دو ظرفیتی (همچون منگنز، منیزیم و کلسیم) لیپوپروتئین‌های سبک (VLDL و LDL) که مقدار لیپیدهای آنها نسبت به مقدار پروتئین‌های آنها زیادتر است و دارای وزن مخصوص کمی است (۱/۰۶۳ g/ml ـ ۰/۹۶) را رسوب داده و لیپوپروتئین سنگین (HDL) که وزن مخصوص زیادی (۱/۲۱ g/ml ـ ۱/۰۶۳) دارند، صاف شده و در قسمت فوقانی لولهٔ سانتریفوژ قرار گرفته و قابل جدا شدن می‌باشد (۱۳). بر روی جزء صاف شده (HDL) می‌توان اندازه‌گیری کلسترول تام، فسفولیپیدها، تری گلیسریدها و آپولیپوپروتئین‌های مختلف (A , B , C , E) را انجام داد.

در این مطالعه، روش جداسازی HDL سرم به قرار زیر بوده است (۷ و ۸):

سرم	۲ میلی‌لیتر
مخلوط فسفو تنگستات سدیم	۲۰۰ میکرولیتر

۴۰ گرم اسید فسفوتنگستیک را در یک لیتر از

مخلوطی از سود (۱ مول در لیتر) و آب مقطر (۱۶ حجم از سود به علاوه ۸۴ حجم از آب مقطر) قرار داده، مخلوط نموده و استفاده می‌شود.

کلرید منیزیم ۵۰ میکرولیتر
کلرید منیزیم مورد استفاده، باید ۲ مول در لیتر باشد.

پس از اضافه کردن ترکیبات فوق، با استفاده از دستگاه مخلوط کن الکتریکی نمونه کاملاً مخلوط می‌شود تا واکنش به صورت کامل انجام گیرد. در نهایت، نمونه فوق بوسیلهٔ سانتریفوژ یخچال‌دار به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه، HDL سرم از مابقی لیپوپروتئین‌های سرم (VLDL و LDL) جدا می‌گردد.

بر روی صاف شدهٔ حاوی HDL، می‌توان فسفولیپیدها، تری گلیسریدها، کلسترول تام (مجموع کلسترول آزاد و استریفیه) و آپولیپوپروتئین‌های مختلف (A , B , C , E) به وسیله روشهای مختلف اندازه گیری نمود. در این مطالعه، بر روی صاف شده با استفاده از کلریمتری لیبرمن، بورشارد با طول موج ۶۲۰ نانومتر کلسترول موجود در HDL بر حسب میلی‌گرم در دسی‌لیتر (mg/dl) اندازه‌گیری گردید (۱۴).

نتایج

اندازه‌گیری کلسترول ـ HDL سرم (HDL-C) بر روی دو گروه ۵۱ نفر مرد سالم و ۳۲ نفر زن سالم ۲۰ تا ۴۰ ساله، انجام گرفت. باید متذکر شد که افراد مورد مطالعه از لحاظ جنس و سن (دو گروه ۲۹ ـ ۲۰ سال و ۴۰ ـ ۳۰ سال) به چهار گروه تقسیم گردیدند. نتایج حاصل به قرار زیر است:

الف ـ تغییرات غلظت کلسترول ـ HDL (HDL - C) در مردان و زنان بر حسب سن (جدول ۱).

غلظت HDL-C (۴۵/۳ ± ۱۰/۷ mg/dl) در مردان در سن بین ۲۹ ـ ۲۰ سال (۱۸ نفر) در مقایسه با غلظت HDL - C (۴۶/۱ ± ۱۱/۳ mg/dl) در سن بین ۴۰ ـ ۳۰ سال (۳۳ نفر) هیچگونه اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌گردد. همچنین غلظت HDL-C در زنان (۵۳/۲ ± ۱۲/۲ mg/dl) در سن ۲۹ ـ ۲۰ سال (۱۰ نفر) در مقایسه با غلظت HDL-C (۵۵/۶ ± ۱۲/۹ mg/dl) همان جنس در سن بین ۴۰ ـ ۳۰ سال (۲۲ نفر) اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

ب ـ تغییرات غلظت کلسترول ـ HDL (HDL - C) در مردان و زنان بر حسب جنس (جدول ۲).

نتایج نشان می‌دهد که غلظت HDL - C (۴۵/۳ ± ۱۰/۷ mg/dl) در گروه سنی ۲۹ ـ ۲۰ سال در مردان (۱۸ نفر) در مقایسه با غلظت HDL - C در همان گروه سنی (۱۰ نفر) در زنان (۵۳/۲ ± ۱۲/۲ mg/dl) اختلاف معنی‌دار ($P < ۰/۰۰۱$) یعنی کاهش حدود ۲۰ درصد در مردان نسبت به زنان وجود دارد. همچنین غلظت HDL - C (۴۶/۱ ± ۱۱/۳ mg/dl) در گروه سنی ۴۰ ـ ۳۰ سال در مردان (۳۳ نفر) در مقایسه با غلظت HDL - C در همان گروه سنی (۲۲ نفر) در زنان (۵۵/۶ ± ۱۲/۹ mg/dl) کاهش حدود ۲۰ درصد و اختلاف معنی‌دار ($P < ۰/۰۰۱$) دیده می‌شود.

جنس / سن سال	مردان		زنان		P
	تعداد (نفر)	HDL - C (mg/dl)	تعداد (نفر)	HDL - C (mg/dl)	
۲۰-۲۹	۱۸	۴۵/۳ ± ۱۰/۷	۱۰	۵۳/۲ ± ۱۲/۲	<۰/۰۰۱
۳۰-۴۰	۳۳	۴۶/۱ ± ۱۱/۳	۲۲	۵۵/۶ ± ۱۲/۹	<۰/۰۰۱

جدول ۱ـ تغییرات غلظت کلسترول - HDL (HDL - C) در مردان و زنان بر حسب جنس

بحث و نتیجه گیری

نشان داده شده که خطر پیشرفت بیماریهای قلبی عروقی (مثل آترواسکلروز) رابطه مستقیم با غلظت سرمی لیپوپروتئین سبک (LDL) و رابطه عکس با غلظت سرمی لیپوپروتئین سنگین (HDL) دارد (۱۵ و ۱۶).

تحقیقات پاتولوژی و بیوشیمیایی انجام شده بر روی پلاک آترووم مبتلایان به آترواسکلروز نشان داده است که ترکیب اصلی تشکیل دهنده پلاک آترووم کلسترول (استریفیه) می‌باشد. با بررسی‌های انجام شده بر روی کلسترول، دریافته‌اند که کلسترول در سلولهای مختلف (عمدتاً در کبد) سنتز شده و به علت ساختمان آب گریز که دارد به تنهایی نمی‌تواند وارد جریان خون گردد، لذا در جریان خون بوسیله LDL به بافتهای هدف (بافتهای محیطی عمدتاً بافت چربی و ماهیچه‌ای) منتقل می‌گردد. لذا LDL در قرار دادن کلسترول خون در بافتهای مختلف (عمدتاً بافت ماهیچه‌ای قلب) نقش مهمی را ایفاء می‌کند (۱۷). بهر علتی (ارثی و یا اکتسابی) غلظت سرمی کلسترول LDL (LDL - C) افزایش یابد، پلاک آترووم پیشرفت کرده و در نهایت انسداد عروق را سبب می‌شود. بدین علت آنرا فاکتور خطر بیماریهای قلبی عروقی نامیده‌اند.

«نشان داده شده که خطر پیشرفت بیماریهای قلبی و عروقی مثل آترواسکلروز رابطه مستقیم با غلظت سرمی لیپوپروتئین سبک (LDL) و رابطه عکس با غلظت سرمی لیپوپروتئین سنگین (HDL) دارد.»

در حالتهای پاتولوژیک که دیوارهٔ عروق ضایعه دیده و زخم شده است، LDL مقداری بیش از حد طبیعی کلسترول خون را در سلولهای عروق خونی (به خصوص بافت ماهیچه‌ای صاف قلب) قرار داده و لذا در ایجاد پلاک آترووم وارد شده و به عنوان عامل خطر آتروسکلروز بسیار مهمی شناخته شده است (۱۸).

نکته قابل توجه این است که کلسترول بافتهای محیطی (عمدتاً بافت ماهیچه‌ای) باید به کبد منتقل شده تا کاتابولیزه گردند. نقش انتقال معکوس کلسترول از بافتهای محیطی به کبد را HDL خون به عهده دارد. یعنی HDL خون می‌تواند کلسترول انتقال یافته با LDL به بافتهای محیطی را برداشت نموده و به کبد منتقل کرده و در تشکیل نمکهای صفراوی استفاده نماید. در نتیجه HDL را که نقش دفعی مقداری از کلسترول خون به عهده داشته و عکس LDL عمل می‌نماید، عامل ضد خطر آترواسکلروز (Anti-Risk-Factor) گویند (۴، ۵ و ۱۹).

پس می‌توان چنین نتیجه گرفت که کلسترول موجود در LDL (LDL - C) یک کلسترول مضر، و کلسترول موجود در HDL (HDL - C) یک کلسترول مفید می‌باشد (۱).

بیوسنتز HDL در سلولهای کبد صورت گرفته و بوسیله آنزیم تری گلیسرید لیپاز کبدی (TGLH) فعال می‌گردد. این آنزیم بوسیله استروژنها تحریک شده و در نتیجه بیوسنتز کبدی HDL افزایش می‌یابد. در نتیجه زنان به طور نسبی در مقابل بیماریهای قلبی عروقی بعد از بلوغ و قبل از یائسگی مقاوم می‌باشند (۶).

زیرنویس:

1. Low - Density - Lipoproteins
2. High - Density - Lipoproteins
3. Chylomicrons
4. Very - Low - Density - Lipoproteins

منابع:

1. Kovanen T. Le Controle de Cholesterol. La Recherche 16 (172): 1472 - 1480, 1985.
2. Castelli WP. et al. Incidence of Coronary heart disease and lipoprotein Cholesterol Levels. JAMA. 256: 2835 - 2838, 1986.
3. Kritchevsky D. Cholesterol Vehicle in experimental atherosclerosis. Arch Patho Lab Med. 112: 1041 - 1044, 1988.
4. Fruchart. J. C. et al Apolipoprotein A - Containing Lipoprotein Particales: Physiological - role, quantification and Clinical Significance. Clin. Chem. 38/6, 793 - 797, 1992.
5. Fruchart. JC. LDL et atherogenese: nouveaux Concepts. Sem Hop, Paris 65 (3) 91-95, 1989.
6. Miller N E. Why does Plasma LDL Concentration in adults increase With age? Lancent i: 263 - 267, 1984.
7. Moulin S. et. al Le Cholesterol - HDL, methodes de dosage et Variations. Acta Clinica Belgica 36 (5): 249-258, 1981.
8. Simpson H S. et al. HDL Subfractions as measured by differential polyanionic Precipitation and rate zonal ultracentrifugation. Clin Chem. 28 (10): 2040 - 2043, 1982.
9. NG R H. et al. Direct measurement of HDL - Cholesterol by the reflotron assay With no manual Precipitation Step. Clin Chem. 37(3): 435-437, 1991.
10. Burstein M. et al. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions J. of lipid research. 11: 583-595, 1970.
11. Russ E M. et al. Protein - Lipid relationships in human Plasma in normal individuals. Am J Med. 11: 468-479, 1951.
12. Fahreus L. et al. L - norgestrel and progesterone have different influence on plasma lipoproteins. Eur J Clin. investigation. 13: 447-453, 1983.
13. Lopes - Virella MF. et al. Cholesterol determination in HDL Separated by three different - methods. Clin Chem. 23(5): 882-884, 1977.
14. Burke R W. et al. Mechanisms of Liebermann - Burchard and zak Color Reaction - Clin Chem. 20(7): 794-801, 1274.
15. Rossouw J E. et al. The Value of Lowering Cholesterol after myocardial infarction. N Engl J Med, 323: 1112-1119, 1990.
16. Moss A J. et al. Prognosis and management after a first myocardial infarction. N Engl J Med, 322: 743-753, 1990.
17. Brown M S. et al. A receptor - mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science, 232: 34-47, 1986.
18. Nestel P J. New Lipoprotein Profiles and Coronary heart disease. Circulation, 82: 649 - 951, 1990.
19. Brown M S. et al. How LDL receptors influence Cholesterol and atherosclerosis. Sci. Am, 251: 58 - 66, 1984.