

The Role of Small Dense LDL in the Pathogenesis of Coronary Artery Disease

Raveenan Mingpakanee*

*Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology, Faculty of Allied Health Sciences,
Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*

Abstract

Low density lipoproteins (LDLs) are associated with coronary artery disease. LDLs consist of several subclasses, varying in sizes, compositions and densities. Their diameter is 18-25 nm and density range between 1.019-1.063 g/mL. LDL particles are classified into subclasses, comprising mainly large, buoyant LDL and small dense LDL particles. The small dense LDL is a strong risk factor for atherosclerosis. The metabolic origins of small dense LDL are delipidation of very low density lipoproteins (VLDL) and core lipids transfer between VLDL and LDL particles. VLDL serves as a cholesteryl ester acceptor from LDL, becoming a triglyceride-rich particles. Hydrolysis of triglyceride in LDL by hepatic lipase further reduces the size of LDL. The small dense LDL easily penetrates into the arterial wall and undergoes oxidation. Then, oxidized LDL is taken up by macrophage via scavenger receptors, and accumulates in arterial walls. Small dense LDL levels are elevated in atherosclerosis disorders, such as dyslipidemia, insulin resistance, type 2 diabetes and metabolic syndrome. There are various techniques currently available for small dense LDL measurement, but each method requires special equipment which is not generally available in routine laboratories. However, the small dense LDL levels can be estimated from the conventional lipid and lipoprotein parameters to assess risks of coronary artery disease.

Keywords: Small dense LDL, Coronary artery disease, Dyslipidemia, Type 2 diabetes

*Corresponding author E-mail address: mraveenan@gmail.com

Received: April 12, 2018

Revised: June 11, 2018

Accepted: October 1, 2018

บทบาทของ Small dense LDL ต่อการเกิดโรค หลอดเลือดหัวใจ

ระวีนันท์ มิ่งภักดิ์*

ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

ไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein; LDL) เป็นไลโปโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับโรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease) อนุภาค LDL มีความหลากหลายทั้งขนาด องค์ประกอบ และความหนาแน่น โดยอนุภาคมีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 18-25 นาโนเมตร และความหนาแน่นระหว่าง 1.019-1.063 g/mL ทำให้แบ่งได้เป็นกลุ่มย่อย (LDL subclass) โดยกลุ่มย่อยที่มีความสัมพันธ์กับโรคหลอดเลือดหัวใจมากที่สุด คือ small dense LDL ซึ่งเป็น LDL ที่มีขนาดเล็ก และความหนาแน่นสูง small dense LDL เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของ very low-density lipoprotein (VLDL) และการแลกเปลี่ยนไขมันแกนระหว่างอนุภาค VLDL กับ LDL หลังจากแลกเปลี่ยนไขมันแกน อนุภาค LDL จะกลายเป็น triglyceride-rich LDL หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการไลโปไลซิส ทำให้อนุภาค LDL มีขนาดเล็กลงและมีความหนาแน่นสูงขึ้น เรียกว่า small dense LDL ซึ่งมีขนาดเล็ก สามารถแทรกตัวเข้าสู่ผนังหลอดเลือดได้ง่าย แล้วถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ กลายเป็น oxidized LDL ซึ่งไม่สามารถจับกับ LDL receptor บนผิวเซลล์ แต่สามารถจับกับ scavenger receptor บนผิวเซลล์แมคโครฟาจ และถูกจับกิน ทำให้แมคโครฟาจกลายเป็นโฟมเซลล์ (foam cell) ภาวะหรือโรคที่ทำให้ระดับ small dense LDL สูงขึ้น ได้แก่ ภาวะดื้อต่ออินซูลินและโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง และกลุ่มอาการอ้วนลงพุง การตรวจระดับ small dense LDL เพื่อประเมินความเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดหัวใจยังไม่แพร่หลายในห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ เนื่องจากต้องอาศัยเครื่องมือและเทคนิคที่จำเพาะ แต่สามารถประมาณค่า small dense LDL จากค่าพารามิเตอร์ของไขมันและไลโปโปรตีนในเลือดที่ตรวจในห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ ซึ่งทำให้การประเมินความเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดหัวใจมีความแม่นยำขึ้น

คำสำคัญ: Small dense LDL โรคหลอดเลือดหัวใจ ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ โรคเบาหวานชนิดที่ 2

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: mraveenan@gmail.com

รับบทความ: 12 เมษายน 2561

แก้ไขบทความ: 11 มิถุนายน 2561

รับตีพิมพ์บทความ: 1 ตุลาคม 2561

บทนำ

โรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease) เป็นโรคเรื้อรังที่มีอัตราการเสียชีวิตสูงและมีค่าใช้จ่ายในการรักษาสูง จากสถิติของสำนักงานโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ในปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทยมีอัตราผู้ป่วยโรคหัวใจขาดเลือด 325,873 คน คิดเป็นอัตรา 501 คนต่อประชากร 100,000 คน⁽¹⁾ ซึ่งเพิ่มขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550 เป็นต้นมา National Cholesterol Education Program (NCEP) ได้แนะนำระดับไขมันในเลือดที่เหมาะสม คือ ระดับคอเลสเตอรอล (total cholesterol) ต่ำกว่า 200 mg/dL ระดับไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride, TG) ต่ำกว่า 150 mg/dL ระดับ LDL-cholesterol (LDL-C) ต่ำกว่า 100 mg/dL และระดับ HDL-cholesterol (HDL-C) สูงกว่า 40 mg/dL⁽²⁾ ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ ได้แก่ อายุ เพศ ความดันโลหิตสูง การสูบบุหรี่เป็นประจำ ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) และโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (type 2 diabetes) และ

ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia)⁽³⁾ ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ คือภาวะที่มีระดับไขมัน และ/หรือ ไลโปโปรตีนในเลือดสูงหรือต่ำกว่าเกณฑ์ที่เหมาะสม กล่าวคือ มีระดับคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และ LDL-C สูง แต่มีระดับ HDL-C ต่ำ⁽⁴⁾

Low density lipoprotein (LDL) เป็นสารโมเลกุลใหญ่ ประกอบด้วยไขมันและโปรตีน มีรูปร่างเป็นทรงกลม ด้านนอกประกอบด้วยฟอสโฟลิพิดส่วนใหญ่เป็นชนิดฟอสฟาไธดิลโคลีน และคอเลสเตอรอลอิสระ (free cholesterol) ซึ่งเป็นโมเลกุลไขมันชนิดมีขั้ว (polar lipids) มีโปรตีน (Apolipoprotein; Apo) ชนิด Apo B-100 แทรกอยู่ในชั้นฟอสโฟลิพิด ซึ่งอนุภาค LDL 1 โมเลกุล จะมี Apo B-100 เพียง 1 โมเลกุล ด้านในของอนุภาค LDL ประกอบด้วย ไขมันแกน (core lipids) ซึ่งเป็นคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ ประมาณ 1,600 โมเลกุล และไตรกลีเซอไรด์ประมาณ 170 โมเลกุล ซึ่งทั้ง 2 ชนิดเป็นโมเลกุลไขมันชนิดไม่มีขั้ว⁽⁵⁾ (Fig. 1)⁽⁶⁾ LDL เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของ very low-

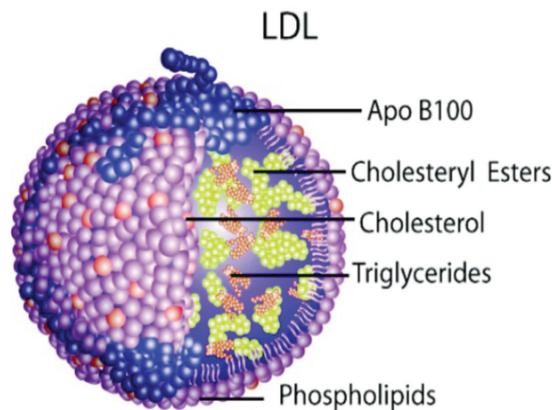


Fig. 1 LDL structure. The LDL is a spherical particle consisting of the cholesteryl ester, triglycerides, phospholipids, free cholesterol and apolipoprotein B-100. (Figure from: Willy Organic Chemistry)⁽⁶⁾

density lipoprotein (VLDL) ซึ่งเป็นไลโปโปรตีนที่มีไตรกลีเซอไรด์เป็นองค์ประกอบหลัก ทำหน้าที่ขนส่งไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือด ไตรกลีเซอไรด์ใน VLDL เมื่อถูกไฮโดรไลส์ด้วย lipoprotein lipase จะได้เป็น VLDL remnant หรือที่เรียกว่า intermediate-density lipoprotein (IDL) ไตรกลีเซอไรด์ในอนุภาค IDL จะถูกไฮโดรไลส์ด้วย hepatic lipase ทำให้มีขนาดเล็กลง กลายเป็นอนุภาค LDL ซึ่งมีคอเลสเตอรอลเป็นองค์ประกอบหลัก⁽⁷⁾ หน้าที่ของ LDL คือขนส่งคอเลสเตอรอลผ่านทางกระแสเลือดไปยังเซลล์ต่างๆ ทั่วร่างกาย LDL เข้าสู่เซลล์ผ่านทาง LDL-receptor โดย Apo B-100 บน LDL จับกับ LDL receptor บนผิวเซลล์แล้วนำเข้าสู่เซลล์ในรูปแบบ clathrin-coated pits การสังเคราะห์ LDL receptor ขึ้นกับระดับคอเลสเตอรอลภายในเซลล์ เมื่อคอเลสเตอรอลในเซลล์มีระดับลดลง เซลล์จะเพิ่มการสังเคราะห์ LDL receptor เพื่อนำคอเลสเตอรอลจาก LDL เข้าสู่เซลล์ แต่เมื่อระดับคอเลสเตอรอลในเซลล์สูงขึ้น เซลล์จะลดการสร้าง LDL receptor ทำให้เซลล์รับ LDL ได้ลดลง⁽⁸⁾

การจำแนก LDL subclass

อนุภาค LDL มีความหนาแน่น (density) ระหว่าง 1.019-1.063 g/mL มีขนาดอนุภาค ระหว่าง 18-25 nm^(9, 10) ทำให้แบ่งได้เป็นหลายกลุ่มย่อย (subclass) เทคนิคที่ใช้แยก LDL subclass มีหลายวิธี ซึ่งสามารถแยก LDL ออกตามขนาดอนุภาค หรือความหนาแน่น ถ้าใช้เทคนิค ultracentrifugation จะแยกอนุภาค LDL ได้เป็น 3 หรือ 4 subclasses ขึ้นกับเทคนิคที่ใช้แยก เช่น เทคนิค analytical ultracentrifugation จะแยก LDL ตาม flotation rate ได้เป็น 3 subclasses ได้แก่ LDL-I (S_f^0 0-7), LDL-II (S_f^0 7-12) และ LDL-III (S_f^0 12-20)⁽¹¹⁾ เทคนิค density gradient ultracentrifugation

(DGUC) แยก LDL ออกเป็น 3 subclasses ตามความหนาแน่นของอนุภาค ได้แก่ LDL-I (large, buoyant LDL; ความหนาแน่น = 1.025-1.034 g/mL), LDL-II (intermediate LDL; ความหนาแน่น = 1.034-1.044 g/mL) และ LDL-III (small dense LDL; ความหนาแน่น = 1.044-1.060 g/mL)⁽⁹⁾ เทคนิค DGUC อาจแยก LDL ได้ 4 subclasses ได้แก่ LDL-I (large buoyant LDL; ความหนาแน่น = 1.019-1.023 g/mL), LDL-II (intermediate LDL; ความหนาแน่น = 1.023-1.034 g/mL), LDL-III (small dense LDL; ความหนาแน่น = 1.034-1.044 g/mL) และ LDL-IV (very small LDL; ความหนาแน่น = 1.044-1.060 g/mL)⁽¹²⁾ เทคนิค gradient gel electrophoresis (GGE) แยก LDL ตามขนาดอนุภาค (size) แบ่งออกเป็น 4 subclasses หลัก ได้แก่ LDL-I มีขนาดอนุภาค ระหว่าง 26.5-28 nm, LDL-II มีขนาดอนุภาค ระหว่าง 25.5-26.4 nm, LDL-III สามารถแยกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ LDL-IIIA มีขนาดอนุภาค ระหว่าง 24.7-25.5 nm และ LDL-IIIB มีขนาดอนุภาคระหว่าง 24.2-24.6 nm, LDL-IV สามารถแยกได้ 2 กลุ่มย่อย คือ LDL-IVA มีขนาดอนุภาค ระหว่าง 23.1-24.1 nm และ LDL-IVB มีขนาดอนุภาคระหว่าง 22.0-23.2 nm⁽¹⁰⁾

ความสัมพันธ์ระหว่าง small dense LDL กับ การเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ

LDL เป็นสาเหตุของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ เนื่องจาก LDL มีขนาดเล็กสามารถแทรกตัวเข้าสู่ผนังหลอดเลือดชั้น intima แล้วถูกออกซิไดซ์ด้วยอนุมูลอิสระ กลายเป็น oxidized-LDL ซึ่งมีสมบัติต่างจาก normal LDL โดย oxidized-LDL ไม่สามารถจับกับ LDL-receptor บนผิวเซลล์ได้ แต่สามารถจับกับ acetyl-LDL receptor หรือ

scavenger receptor ซึ่งพบบนผิวเซลล์แมคโครฟาจ การรับ oxidized-LDL เข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจไม่มีการอิ่มตัว สามารถรับ oxidized-LDL ได้ไม่จำกัด จึงทำให้เซลล์แมคโครฟาจเต็มไปด้วยคอเลสเตอรอล และมีขนาดใหญ่ขึ้น เรียกว่า โฟมเซลล์ (foam cells, lipid-laden macrophage)⁽¹³⁾ สะสมในผนังหลอดเลือดทำให้มีลักษณะเป็นรอยขีดไขมัน เรียกว่า fatty streak ซึ่งเมื่อสะสมมากขึ้นทำให้ผนังหลอดเลือดหนาขึ้น กลายเป็นก้อนไขมันสะสมอยู่ภายในผนังหลอดเลือด (atheroma) ก้อนไขมันที่สะสมมากขึ้นจะทำให้ผนังหลอดเลือดด้านในบริเวณ fibrous plaque บางลงจนเกิดการปริแตก เกิดการกระตุ้นระบบการแข็งตัวของเลือด และการทำงานของเกล็ดเลือด ทำให้เกิดลิ่มเลือดอุดตันหลอดเลือดหัวใจ⁽¹⁴⁾ คุณสมบัติที่สำคัญของ oxidized-LDL ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ คือ 1) ทำให้เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ในกระแสเลือดเคลื่อนผ่านเข้าสู่ผนังหลอดเลือดได้ง่ายขึ้น และเจริญเป็นเซลล์แมคโครฟาจมาจับกิน oxidized-LDL และ 2) ทำให้เซลล์แมคโครฟาจคงอยู่ในผนังหลอดเลือดได้นานขึ้น ก่อให้เกิดโฟมเซลล์มากขึ้น⁽¹³⁾

เนื่องจากอนุภาค LDL มีความหลากหลายทั้งขนาดอนุภาคและความหนาแน่น คือ มีขนาดอนุภาคตั้งแต่ 18-25 nm และมีความหนาแน่นระหว่าง 1.019-1.063 g/mL^(9, 10) LDL ที่มีขนาดและความหนาแน่นต่างกัน จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจไม่เท่ากัน ในปี พ.ศ. 2531 Austin M A และคณะ⁽¹⁵⁾ ได้ศึกษา LDL subclass ในผู้ป่วยกล้ามเนื้อหัวใจตาย (myocardial infarction) เปรียบเทียบกับคนปกติด้วยวิธี gradient gel electrophoresis พบว่า LDL ที่แยกได้จากผู้ป่วยกล้ามเนื้อหัวใจตาย มีขนาดเล็กกว่าและมีความหนาแน่นสูงกว่า เรียกว่า small dense-LDL (sd-LDL) หรือ LDL pattern B (มีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 25.5

nm) ส่วน LDL ที่แยกได้จากคนปกติมีขนาดอนุภาคใหญ่กว่าและมีความหนาแน่นต่ำกว่า เรียกว่า large buoyant LDL หรือ pattern A (มีขนาดอนุภาคมากกว่า 25.5 nm) ในขณะที่ระดับ LDL-C ของทั้งสองกลุ่มไม่ต่างกัน ในปี พ.ศ. 2539 Gardner C D และคณะ ได้ศึกษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาค LDL ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease) พบว่า อนุภาค LDL ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจมีขนาดเล็กกว่าที่แยกได้จากกลุ่มควบคุมที่มีอายุ และเพศตรงกัน⁽¹⁶⁾ แสดงให้เห็นว่า small dense LDL มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ โดย small dense LDL กระตุ้นให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจได้เนื่องจาก 1) มีขนาดเล็ก แทรกตัวเข้าไปในผนังหลอดเลือดได้ง่าย 2) สามารถจับกับโปรตีนไอโกลแคนส์ ในผนังหลอดเลือดแดงได้ดี ทำให้อยู่ในผนังหลอดเลือดได้นาน 3) ถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย เนื่องจากอนุภาค small dense LDL มีปริมาณวิตามินอีต่ำ (วิตามินอีมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ) และ 4) small dense LDL จับกับ LDL-receptor ได้ไม่ดี จึงไม่ถูกนำเข้าสู่เซลล์และตกค้างอยู่ในกระแสเลือดได้นานขึ้น ทำให้มีโอกาสแทรกตัวเข้าไปในผนังหลอดเลือดได้ง่ายขึ้น⁽¹⁷⁾

กลไกการเกิด small dense-LDL

small dense-LDL เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของ VLDL ซึ่งอนุภาค VLDL แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ large VLDL (S_f 60-400) หรือ VLDL-I (triglyceride-rich VLDL) และ small VLDL (S_f 20-60) หรือ VLDL-II (triglyceride-poor VLDL) การสังเคราะห์อนุภาค VLDL ชนิดใดนั้นขึ้นกับปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในร่างกาย (triglyceride pool) แบ่งได้ 2 กรณีคือ^(18 - 20)

1. เมื่อระดับไตรกลีเซอไรด์ต่ำ ตับจะสังเคราะห์ VLDL-II เป็นหลัก ไตรกลีเซอไรด์ใน VLDL-II ถูกไฮโดรไลซ์ด้วย lipoprotein lipase กลายเป็น larger LDL

2. เมื่อระดับไตรกลีเซอไรด์สูง ตับจะสังเคราะห์ VLDL-I เป็นหลัก ซึ่งมีปริมาณไตรกลีเซอไรด์สูง ไตรกลีเซอไรด์ใน VLDL-I ถูกไฮโดรไลซ์ด้วย lipoprotein lipase ได้เป็น smaller LDL (Fig. 2)⁽²⁵⁾

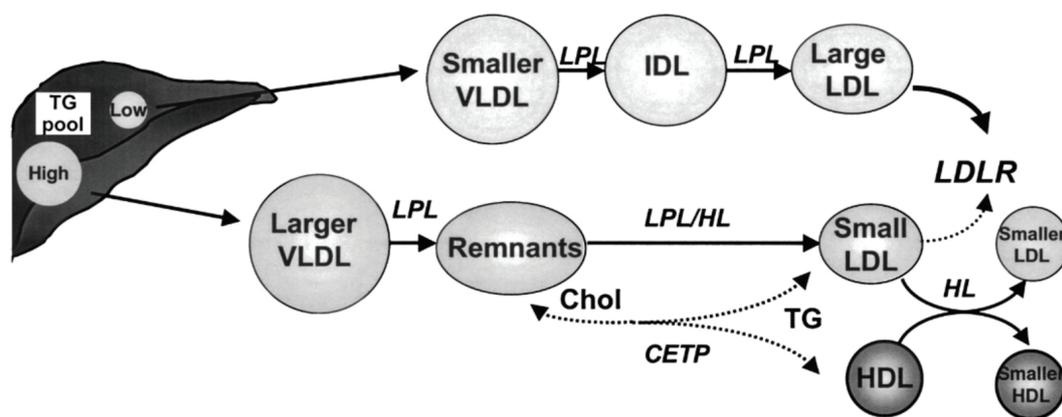


Fig. 2 The metabolic origin of small, dense LDL.

CETP, cholesteryl ester transfer protein; Chol, cholesterol; HL, hepatic lipase; HDLR, LDL receptor; LPL, lipoprotein lipase; TG, triglyceride. (Figure from: Krauss RM., 2004)⁽²⁵⁾

นอกจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของ VLDL precursor ที่ต่างกันจะทำให้เกิดอนุภาค LDL ที่ต่างกันแล้ว การแลกเปลี่ยนไขมันแแกนระหว่าง VLDL (triglyceride-rich lipoprotein) กับ LDL (cholesterol-rich lipoprotein) เป็นกระบวนการที่ส่งผลต่อขนาดอนุภาค LDL โดยโปรตีน cholesteryl ester transfer protein (CETP) ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายคอเลสเตอรอลในแแกนอนุภาค LDL แลกเปลี่ยนกับไตรกลีเซอไรด์ใน VLDL ในขั้นตอนนี้ออนุภาค VLDL กลายเป็น cholesterol-rich VLDL และอนุภาค LDL กลายเป็น triglyceride-rich LDL หลังจากนั้นไตรกลีเซอไรด์ในแแกน triglyceride-rich LDL ถูกไฮโดรไลซ์ด้วย hepatic lipase กลายเป็น lipid-poor, protein-rich LDL ซึ่งมีขนาดเล็กและ

มีความหนาแน่นสูง หรือที่เรียกว่า small dense LDL⁽²¹⁾ จากที่กล่าวข้างต้นอนุภาค VLDL แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ VLDL-I และ VLDL-II อนุภาค VLDL ทั้ง 2 ชนิดนี้จะอยู่ในกระแสเลือดได้นานต่างกัน โดย VLDL-I จะอยู่ในกระแสเลือดได้นานกว่า VLDL-II⁽²²⁾ ดังนั้น VLDL-I จึงมีโอกาสแลกเปลี่ยนไขมันแแกนกับ LDL ได้มากขึ้น⁽²³⁾ ทำให้อนุภาค LDL รับไตรกลีเซอไรด์ได้มากขึ้น หลังการแลกเปลี่ยนไขมันแแกน ไตรกลีเซอไรด์ในอนุภาค triglyceride-rich LDL จะถูกไฮโดรไลซ์ด้วย hepatic lipase ทำให้ไตรกลีเซอไรด์ในอนุภาคลดขนาดอนุภาคจึงเล็กลง ประกอบกับในอนุภาคมีสัดส่วนของโปรตีนมากกว่าไขมัน จึงทำให้อนุภาคมีความหนาแน่นสูง กลายเป็น small dense LDL^(21, 22)

ภาวะที่ส่งผลต่อระดับ small dense LDL

เนื่องจาก small dense LDL เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งเป็นผลจากความผิดปกติของระดับไลโปโปรตีนในเลือด ดังนั้นภาวะต่างๆ ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับไลโปโปรตีนหรือเมตาบอลิซึมของไขมันจะเหนี่ยวนำให้เกิด small dense LDL เพิ่มขึ้น ได้แก่ ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ ภาวะต่ออินซูลิน โรคเบาหวานชนิดที่ 2 และกลุ่มอาการอ้วนลงพุง (metabolic syndrome)

1. ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (Dyslipidemia)

ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ คือ ภาวะที่มีระดับไขมันหรือไลโปโปรตีนต่างไปจากเกณฑ์ปกติ คือ ไตรกลีเซอไรด์สูง และ/หรือระดับคอเลสเตอรอล และ/หรือ LDL-C สูง และ/หรือระดับ HDL-C ต่ำกว่าเกณฑ์⁽⁴⁾ ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ ในปี พ.ศ.

2533 Austin M A และคณะ ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ small dense LDL กับไขมันในเลือดชนิดอื่นๆ พบว่า ระดับ small dense LDL cholesterol มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับระดับไตรกลีเซอไรด์ และมีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับระดับ HDL-C แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง small dense LDL กับระดับคอเลสเตอรอล⁽²⁴⁾ เนื่องจากกลไกการเกิด small dense LDL เป็นการแลกเปลี่ยนไขมันแกนระหว่างอนุภาค VLDL กับ LDL และการสังเคราะห์ VLDL ขึ้นกับปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในร่างกาย ดังนั้นในผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงจึงสังเคราะห์ VLDL-I เป็นหลัก ทำให้ VLDL-I ซึ่งเป็น triglyceride-rich VLDL เกิดการแลกเปลี่ยนไขมันแกนกับ LDL มากขึ้น จึงเหนี่ยวนำให้เกิด small dense LDL มากขึ้นด้วย (Fig. 3) แม้ว่า LDL จะมีคอเลสเตอรอลเป็นองค์ประกอบหลัก แต่ระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

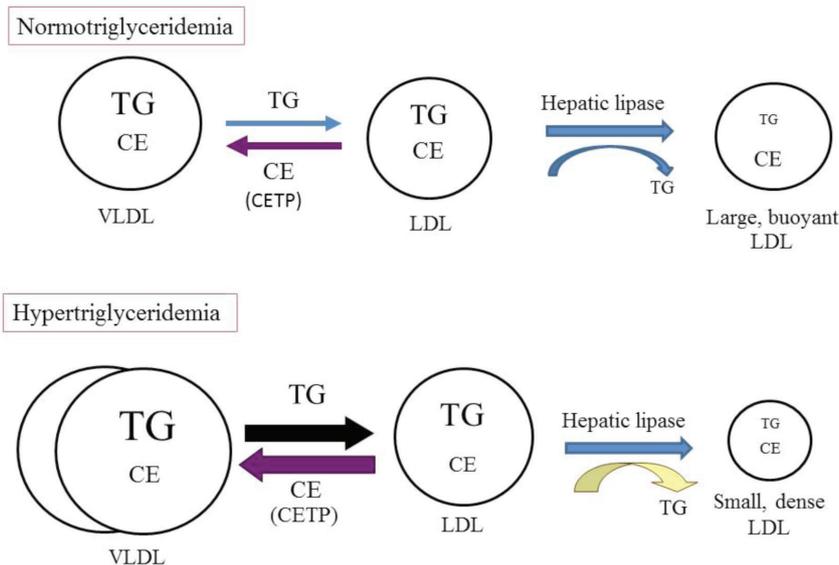


Fig. 3 The core lipid transfer between VLDL and LDL in Normotriglyceridemia and Hypertriglyceridemia TG, triglyceride; CE, cholesteryl ester; CETP, cholesteryl ester transfer protein. (Figure by author)

ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับ small dense LDL เนื่องจากกระบวนการเกิด small dense LDL เป็นกระบวนการแลกเปลี่ยนไขมันแแกนระหว่าง LDL กับ VLDL

2. ภาวะดื้อต่ออินซูลินและโรคเบาหวาน (Insulin Resistance and Diabetes Mellitus)

ภาวะดื้อต่ออินซูลิน เป็นภาวะที่เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์ไขมันและเซลล์ตับไม่สามารถนำกลูโคสเข้าไปใช้ในเซลล์ได้ทำให้มีระดับกลูโคสในเลือดสูง เมื่อไม่สามารถนำกลูโคสไปใช้ในเซลล์ ร่างกายจึงต้องนำกรดไขมันจากเนื้อเยื่ออดิโพสออกมาในกระแสเลือดเพื่อใช้เป็นพลังงาน เมื่อมีกรดไขมันเพิ่มขึ้น ตับจะสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์เพิ่มขึ้น โดยนำกรดไขมันเข้าเซลล์และรวมตัวกับกลีเซอรอลฟอสเฟตได้เป็นไตรกลีเซอไรด์เพื่อนำไปสังเคราะห์ VLDL เมื่อปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในตับมีมาก ร่างกายจะสังเคราะห์ VLDL-I มากขึ้น นอกจากนี้เอนไซม์ lipoprotein lipase มีแอกติวิตีลดลงทำให้อัตราการสลาย VLDL ลดลง VLDL จึงตกค้างอยู่ในกระแสเลือดนานขึ้น ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิด small dense LDL มากขึ้น ดังนั้นภาวะดื้อต่ออินซูลินในผู้ป่วยเบาหวานจึงมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจมากขึ้น^(3, 25) ในปี พ.ศ. 2557 Mingpakane R และคณะ ได้ศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิด small dense LDL ในหลอดทดลอง โดยใช้ VLDL ที่แยกได้จากกลุ่มตัวอย่าง 3 กลุ่ม คือ normal, hypertriglyceridemia with type 2 diabetes และ hypertriglyceridemia พบว่า VLDL ที่แยกได้จากกลุ่ม hypertriglyceridemia with type 2 diabetes สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด small dense LDL ที่มีขนาดอนุภาคเล็กกว่าที่ได้จากกลุ่ม hypertriglyceridemia⁽²⁶⁾ แสดงว่าผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 จะเหนี่ยวนำให้เกิด small dense LDL ที่มีขนาดเล็ก

กว่า นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2558 Kikkawa K และคณะ ได้ศึกษาระดับ small dense LDL ในกลุ่มคนปกติ กลุ่มตัวอย่างที่มีภาวะดื้อต่ออินซูลิน และกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่มีภาวะดื้อต่ออินซูลิน และกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานมีระดับ small dense LDL-C สูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ⁽²⁷⁾

นอกจากระดับไตรกลีเซอไรด์ที่เพิ่มขึ้นแล้ว ระดับ plasma glucose ที่สูงขึ้นจะทำให้เกิดกระบวนการ glycation ระหว่างโมเลกุลของกลูโคสกับโปรตีน ซึ่งปฏิกิริยา glycation มักเกิดขึ้นกับโปรตีนมากกว่าไขมัน อนุภาค LDL มี apoB เป็นองค์ประกอบ ดังนั้น จึงเกิดกระบวนการ glycation ระหว่าง glucose กับ apoB ได้เป็น glycated-apoB ในอนุภาค LDL⁽²⁸⁾ ในปี พ.ศ. 2535 Tames FJ และคณะ ได้ศึกษาระดับ glycated-apoB ในกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานกับกลุ่มคนปกติ พบว่า กลุ่มผู้ป่วยเบาหวานมีระดับ glycated-apoB ในซีรัมเฉลี่ย 9.4 mg/dL ในขณะที่กลุ่มคนปกติมีค่าเฉลี่ยเพียง 4.8 mg/dL⁽²⁹⁾ ในปี พ.ศ. 2544 Tomkin GH และคณะ ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง glycated-apoB ในพลาสมา กับ glycated-apoB ใน apoB containing lipoproteins ได้แก่ VLDL, intermediate density LDL (IDL) และ LDL พบว่า ระดับ glycated-apoB ในพลาสมา มีความสัมพันธ์กับระดับ glycated-apoB ใน LDL แสดงให้เห็นว่า apoB ใน LDL สามารถเกิดปฏิกิริยา glycation ได้มากกว่า เนื่องจาก VLDL และ IDL มีครึ่งชีวิต (half-life) ในกระแสเลือดสั้นกว่า LDL⁽³⁰⁾ ใน พ.ศ. 2552 Younis N และคณะ ได้ศึกษาการเกิด glycation ใน LDL subfractions ในหลอดทดลอง พบว่า small dense-LDL หรือ LDL-III (ความหนาแน่น = 1.044-1.063 g/mL) สามารถเกิด glycation ได้มากกว่า LDL-I และ LDL-II เนื่องจาก LDL-III มีสัดส่วนของ apoB ต่อ

ไขมันในอนุภาคสูง จึงทำให้มีการสัมผัสกับกลูโคส ได้มากกว่า LDL-I และ LDL-II⁽³¹⁾ Toma และคณะ ในปี พ.ศ. 2552 ได้ศึกษาผลของ glycated LDL ต่อ human endothelial cell ในเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่า glycated LDL เหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress เพิ่มขึ้น และมีการแสดงออกของ RAGE (receptor for advanced glycation end-product) ส่งผลต่อการทำงานของเซลล์ กระตุ้นการหลั่ง monocyte chemotactic factor-1 (MCP-1) ซึ่งเป็น pro-inflammatory molecule ทำให้ endothelial cell ทำงานผิดปกติ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผนังหลอดเลือด⁽³²⁾ ทำให้ผู้ป่วยเบาหวานมีความเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดหัวใจมากขึ้น

3. กลุ่มอาการอ้วนลงพุง (Metabolic Syndrome; MetS)

กลุ่มอาการอ้วนลงพุง คือ กลุ่มความผิดปกติทางเมตาบอลิซึมที่พบร่วมกันและเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ กลุ่มความผิดปกติ ได้แก่ ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ ความดันโลหิตสูง ระดับน้ำตาลในเลือดสูง น้ำหนักเกิน (body mass index; BMI มากกว่า 25 kg/m²) และอ้วนลงพุง ภาวะต่างๆ เหล่านี้จะก่อให้เกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และโรคหลอดเลือดหัวใจ⁽³³⁾ ซึ่งโรคเบาหวานและภาวะ hypertriglyceridemia จะทำให้ระดับ small dense-LDL เพิ่มสูงขึ้นดังที่ได้กล่าวไว้ในตอนต้น Srisawasdi P และคณะ (พ.ศ. 2558) ได้ศึกษา LDL subclass ในกลุ่มตัวอย่างที่มีภาวะ MetS ด้วยเทคนิค polyacrylamide tube gel electrophoresis ซึ่งแบ่ง LDL ได้เป็น 6 subclasses (LDL-I ถึง LDL-VI) แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 6 กลุ่ม โดยใช้เกณฑ์ของ National Cholesterol Education Program Panel III⁽²⁾ ตามพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้ คือ ความดันโลหิต สัดส่วนของร่างกาย (ขนาดรอบเอว,

body mass index; BMI) การวัดองค์ประกอบของร่างกาย (lean body mass, body fat mass และ % body fat mass) และ MetS score (1 ถึง 6) ในการแบ่งระดับของการมีภาวะ MetS ซึ่งประเมินจากพารามิเตอร์ ดังนี้ 1) ขนาดรอบเอว ผู้ชาย ≥ 90 เซนติเมตร และผู้หญิง ≥ 80 เซนติเมตร 2) ระดับไตรกลีเซอไรด์ ≥ 150 mg/dL, 3) HDL-C ผู้ชาย ≤ 40 mg/dL ผู้หญิง ≤ 50 mg/dL, 4) ความดันโลหิต $\geq 130/85$ mmHg หรือรับประทานยาลดความดันในเลือด 5) fasting plasma glucose ≥ 100 mg/dL, ให้คะแนนโดยนับจำนวนพารามิเตอร์ที่พบในแต่ละบุคคล จากการศึกษาพบว่าระดับ LDL-C ในแต่ละกลุ่มตัวอย่างไม่แตกต่างกัน แต่ LDL subclass LDL-III ถึง LDL-VI จะสูงขึ้นเมื่อกลุ่มตัวอย่างมี MetS score มากขึ้น นอกจากนี้ ขนาดอนุภาค LDL จะลดลงเมื่อกลุ่มตัวอย่างมี MetS score สูงขึ้น⁽³⁴⁾ Kikkawa K และคณะ (พ.ศ. 2558) ศึกษาเกี่ยวกับ small dense LDL ในกลุ่มคนปกติ กลุ่ม pre-MetS (คือ ผู้ที่มีภาวะอ้วนลงพุง และความดันโลหิตสูง หรือภาวะดื้อต่ออินซูลิน หรือ dyslipidemia อย่างใดอย่างหนึ่ง) และกลุ่ม MetS พบว่า กลุ่ม pre-MetS และกลุ่ม MetS มีระดับ small dense LDL-cholesterol สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ⁽²⁷⁾ งานวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าภาวะ MetS ทำให้มี small dense LDL เพิ่มสูงขึ้น

การวิเคราะห์ small dense LDL ทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจ small dense LDL ในห้องปฏิบัติการทางคลินิกยังไม่แพร่หลายเนื่องจากต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาสูง ปัจจุบันมีบริษัทผลิตชุดน้ำยาสำหรับตรวจระดับ small dense LDL แต่ยังไม่แพร่หลายในประเทศไทยเนื่องจากน้ำยาตรวจมีราคาสูงและต้องอาศัยเครื่องมืออัตโนมัติที่จำเพาะ วิธีการ

วิเคราะห์ small dense LDL ทางห้องปฏิบัติการทำได้ดังนี้

1. วิธี sequential ultracentrifugation เริ่มต้นโดยแยก triglyceride-rich lipoprotein (chylomicron, VLDL) ออกจากพลาสมา โดยปรับความหนาแน่นของพลาสมาที่ต้องการวิเคราะห์ให้เป็น 1.019 g/mL ปั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge (ระยะเวลาปั่นขึ้นกับความเร็วของเครื่องปั่น) เมื่อครบเวลา triglyceride-rich lipoprotein จะลอยอยู่ด้านบน ดูดส่วนบนทิ้ง นำสารละลายส่วนล่างมาปรับความหนาแน่นเป็น 1.048 g/mL ปั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge ส่วน large, buoyant LDL (ความหนาแน่น = 1.019-1.048 g/mL) จะลอยอยู่ด้านบน ดูดสารละลายส่วนบนเก็บไว้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณคอเลสเตอรอล นำสารละลายส่วนล่างมาปรับความหนาแน่นเป็น 1.063 g/mL นำไปปั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge อีกครั้งหนึ่ง เมื่อครบเวลา ดูดเก็บสารละลายส่วนบนซึ่งประกอบด้วย small dense LDL (ความหนาแน่น = 1.048-1.063 g/mL) นำ large, buoyant LDL และ small dense LDL วิเคราะห์ปริมาณคอเลสเตอรอล ด้วยวิธี enzymatic colorimetric method⁽³⁵⁾ วิธีนี้ไม่เหมาะกับห้องปฏิบัติการทางคลินิกเนื่องจากต้องอาศัยเครื่องมือพิเศษและใช้ระยะเวลานาน

2. วิธีตกตะกอน (precipitation method) โดยใช้ heparin-sodium salt และ $MgCl_2$ ซึ่งจะตกตะกอน apoB-containing LDL ที่มีความหนาแน่นอยู่ระหว่าง 1.044-1.063 g/mL หลังจากตกตะกอนแล้ว ปั่นแยกส่วนน้ำใส ซึ่งประกอบด้วย LDL ที่มีความหนาแน่น 1.044-1.063 g/mL และ HDL นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณ LDL-cholesterol ด้วยวิธี direct LDL ค่าที่ได้คือ ระดับ small dense-LDL cholesterol หากต้องการทราบปริมาณ apoB ใน small dense LDL สามารถนำส่วนน้ำใส

ไปหาปริมาณ apoB ด้วยวิธี immunoturbidometric assay วิธีนี้ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือพิเศษ และสามารถประยุกต์ใช้กับเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติได้⁽³⁶⁾ ปัจจุบันมีผู้ผลิตชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ small dense LDL-C (Direct) จำหน่าย

3. วิธี homogenous assay เนื่องจากอนุภาค LDL ประกอบด้วยไขมันแกนกลาง ล้อมรอบด้วยฟอสโฟลิพิด ซึ่ง large buoyant LDL มีฟอสโฟลิพิดชนิด sphingomyelin เป็นองค์ประกอบหลัก และ sphingomyelinase จะทำให้ sphingomyelin ที่อยู่บนผิวอนุภาค large buoyant LDL มารวมตัวกัน ทำให้แยกออกจาก small dense LDL ได้ หลังจากนั้นวิเคราะห์ปริมาณคอเลสเตอรอล แล้วรายงานเป็น small dense LDL-C⁽³⁷⁾

4. วิธี non-denaturing gradient gel electrophoresis (NGGE) วิธีนี้สามารถแยก LDL ได้ตามขนาดอนุภาค โดย LDL จะเคลื่อนที่ผ่าน polyacrylamide gel ที่มีความเข้มข้น 2%-16%⁽³⁸⁾ LDL ขนาดใหญ่จะวิ่งได้ระยะทางสั้นกว่า LDL ที่มีขนาดเล็ก วิธีนี้สามารถคำนวณขนาดอนุภาค LDL ได้โดยสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างขนาดอนุภาคของสารมาตรฐาน (standard) ซึ่งประกอบด้วย high molecular weight protein standard และ carboxylated polystyrene microspherebeads กับระยะทางที่เคลื่อนที่ได้ ค่าพิกัด R_f ของอนุภาค LDL เทียบกับกราฟมาตรฐาน⁽³⁹⁾ วิธีนี้ไม่สามารถรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของ small dense LDL ได้ ทราบเพียงลักษณะ particle size ของ LDL ว่าเป็น large buoyant LDL เป็นส่วนใหญ่ หรือ small dense LDL เป็นส่วนใหญ่

5. วิธี polyacrylamide tube gel electrophoresis ไลโฟโพรตีนเคลื่อนที่ผ่าน high-resolution 3% polyacrylamide gel ซึ่งบรรจุในหลอด นำซีรัมหรือ EDTA พลาสมาใส่ลงไป

polyacrylamide gel ซึ่งมี Sudan Black B ไลโปโปรตีนเคลื่อนที่จากด้านบนลงล่างตามขนาดอนุภาค ไลโปโปรตีนที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เป็นระยะทางไกลกว่าไลโปโปรตีนขนาดใหญ่ ไลโปโปรตีนจะติดสีของ Sudan Black B นำหลอดเจลไปสแกนด้วยเครื่อง densitometer และรายงานเป็นกราฟที่แสดง lipoprotein profile ข้อดีของวิธีนี้คือ ใช้สิ่งส่งตรวจน้อย (25 µL) สามารถวิเคราะห์ VLDL, LDL และ HDL subclasses และรายงานเป็นความเข้มข้นของ lipoprotein subclasses แต่ละชนิดในหน่วย mg/dL ได้ และสามารถรายงานผลได้ภายในระยะเวลา 3 ชั่วโมง⁽⁴⁰⁾ วิธีนี้มีการผลิตชุดน้ำยาสำเร็จรูปจำหน่ายพร้อมโปรแกรมเพื่อวิเคราะห์ lipoprotein subclass

6. การประมาณค่า small dense LDL ด้วยสมการ วิธีนี้จะใช้ค่าพารามิเตอร์ที่ตรวจในห้องปฏิบัติการทางคลินิกในการคำนวณ ได้แก่ ค่า non-HDL cholesterol ค่า LDL-cholesterol ที่ได้จากการคำนวณตามสมการของ Friedewald และ ค่า LDL-cholesterol ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยตรง⁽⁴¹⁾ วิธีนี้ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือพิเศษใดๆ ใช้ค่าพารามิเตอร์ของ plasma, lipid และ lipoprotein ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น สมการที่ใช้คำนวณปริมาณ small dense LDL คือ

$$\text{Small dense LDL (mg/dL)}^{(41)} = 0.580 (\text{non-HDL-C}) + 0.407(\text{dLDL-C}) - 0.719 (\text{cLDL-C}) - 12.05$$

โดยที่ dLDL-C คือ ค่า LDL-C ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยตรง

cLDL-C คือ ค่า LDL-C ที่ได้จากการคำนวณตามสมการของ Friedewald

บทสรุป

small dense LDL เป็นอนุภาค LDL กลุ่มย่อยที่มีความสำคัญในการก่อโรคหลอดเลือดหัวใจ การใช้ระดับ LDL cholesterol เพื่อประเมินความเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดหัวใจอาจไม่มีความแม่นยำพอ เนื่องจาก LDL แบ่งเป็นอนุภาคย่อยได้หลายกลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มมีความสำคัญต่อการเกิดโรคไม่เท่ากัน ดังนั้นการใช้ระดับ LDL cholesterol เพื่อประเมินความเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดหัวใจมีความจำเป็นต้องศึกษาประชากร LDL กลุ่มย่อย หากระดับ LDL cholesterol เท่ากัน แต่มีการกระจายตัวของ LDL กลุ่มย่อยไม่เหมือนกัน ก็จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจได้ไม่เท่ากัน ดังนั้น หากต้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์สามารถตรวจวัดระดับ small dense LDL ได้ จะทำให้การประเมินความเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดหัวใจมีความแม่นยำขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. จำนวนและอัตราผู้ป่วยในโรคไม่ติดต่อ ประจำปี ปฏิทิน 2558. สำนักโรคไม่ติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข. [cited 2017 Nov 28]. Available from <http://www.thaincd.com/2016>.
2. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. Circulation 2002; 106: 3143-3421.
3. Tsioufis C, Mantzouranis E, Kalos T, Konstantinidis D, Tousoulis D. Chapter 1.4 Risk factors of atherosclerosis: Pathophysiological mechanisms. In: Tousoulis D. editor. Coronary artery disease, from biology to clinical practice. United Kingdom: Academic Press; 2018. p. 43-66.

4. Fodor G. Primary prevention of CVD: Treating dyslipidemia. *Clinical evidence handbook* 2011; 83: 1207-8.
5. Hevonoja T, Pentikäinen MO, Hyvönen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488: 189-210.
6. Tjean WW. Willy Organic Chemistry. Chapter 5 Low Density Lipoprotein (LDL) [Home page on internet] [cited 2018 Mar 8]. Available from <https://www.willy-organic-chemistry-e-portfolio/cholesterol/5-low-density-lipoprotein>.
7. Havel RJ. The formation of LDL: Mechanisms and regulation. *J Lipid Res* 1984; 25: 1570-6.
8. Bhagavan NV, Ha CH. Chapter 18 Lipids III: Plasma lipoproteins. In: Bhagavan NV, and Ha CH, editors. *Essentials of medical biochemistry with clinical cases*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press; 2011. p. 225-39.
9. Griffin BA, Caslake MJ, Yip CB, Tait GW, Packard CJ, Shepherd J. Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation. *Atherosclerosis* 1990; 83: 59-67.
10. Williams PT, Vranizan KM, Krauss RM. Correlations of plasma lipoproteins with LDL subfractions by particle size in men and women. *J Lipid Res* 1992; 33: 765-74.
11. Krauss RM, Lindgren FT, Ray RM. Interrelationships among subgroups of serum lipoproteins in normal human subjects. *Clin Chim Acta* 1980; 104: 275-90.
12. Rizzo M, Berneis K. The Clinical relevance of low-density lipoproteins size modulation by statins. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006; 20: 205-17.
13. Durrington PN. Lipoprotein and their metabolism. In: Durrington PN, editor. *Hyperlipidemia: Diagnosis and management*. 2nd ed. Oxford: Butterworth Heinemann; 1995. p. 25-71.
14. Oikonomou E, Latsios G, Vogiatzi G, Tousoulis D. Chapter 1.3 Atherosclerotic plaque In: Tousoulis D, editor. *Coronary artery disease, from Biology to clinical practice*. United Kingdom: Academic Press; 2018. p. 31-42.
15. Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1988; 260: 1917-21.
16. Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM. Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *JAMA* 1996; 18; 276: 875-81.
17. Hirayama S, Miida T. Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 2012; 414: 215-24.

18. Pease RJ, Leiper JM. Regulating of hepatic apolipoproteins B-containing lipoprotein secretion. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7: 132-8.
19. Dixon JL, Ginsberg HN. Regulation of hepatic secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins: information from cultured liver cells. *J Lipid Res* 1993; 34: 167-79.
20. Tan CE, Foster L, Caslake MJ, *et al.* Relations between plasma lipids and post-heparin plasma lipases and VLDL and LDL subfraction patterns in normolipidemic men and women. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1839-48.
21. Deckelbaum RJ, Eisenberg S, Oschry Y, Butbul E, Sharon I, Olivecrona T. Reversible modification of human plasma low density lipoproteins toward triglyceride-rich precursors. *J Biol Chem* 1982; 257: 6509-17.
22. Packard CJ, Gaw A, Demant T, Shepherd JJ. Development and application of a multicompartmental model to study very low density lipoprotein subfraction metabolism. *J Lipid Res* 1995; 36: 172-87.
23. Granot E, Deckelbaum RJ, Eisenberg S, Oschry Y, Bengtsson-Olivecrona G. Core modification of human low-density lipoprotein by artificial triacylglycerol emulsion. *Bochim Biophys Acta* 1985; 833: 308-15.
24. Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM. Atherogenic lipoprotein phenotype: A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 1990; 82: 495-506.
25. Krauss RM. Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 1496-1504.
26. Mingpakanee R, Dahlan W. The influence of diabetic and non-diabetic very low density lipoproteins (VLDL) particles on the modification of Low density lipoproteins (LDL) particles. *J Chemical and Pharmaceutical Res* 2014; 6: 545-52.
27. Kikkawa K, Nakajima K, Shimomura Y, *et al.* Small dense LDL cholesterol measured by homogeneous assay in Japanese healthy controls, metabolic syndrome and diabetes patients with or without a fatty liver. *Clin Chim Acta* 2015; 438: 70-9.
28. Lyons TJ, Jenkins AJ. Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8: 174-80.
29. Tames FJ, Mackness MI, Arrol S, Laing I, Durrington PN. Non-enzymatic glycation of apolipoprotein B in the sera of diabetic and non-diabetic subjects. *Atherosclerosis* 1992; 93: 237-44.
30. Tomkin GH, Owens D. Abnormalities in apo B-containing lipoproteins in diabetes and atherosclerosis. *Diabetes Metab Res Rev* 2001; 17: 27-43.

31. Younis N, Charlton-Menys V, Sharma R, Soran H, Durrington PN. Glycation of LDL in non-diabetic people: Small dense LDL is preferentially glycated both *in vivo* and *in vitro*. *Atherosclerosis* 2009; 202: 162-8.
32. Toma L, Stancu CS, Botez GM, Sima AV, Simionescu M. Irreversible glycated LDL induce oxidative and inflammatory start in human endothelial cell; added effect of high glucose. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 877-82.
33. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, *et al.* Harmonizing the metabolic syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120: 1640-5.
34. Srisawasdi P, Vanavanan S, Rochanawutanon M, Kruthkul K, Kotani K, Kroll MH. Small-dense LDL/large-buoyant LDL ratio associates with the metabolic syndrome. *Clin Biochem* 2015; 48: 495-502.
35. Berg G, Muzzio ML, Wikinski R, Schreier L. A new approach to the quantitative measurement of dense LDL subfractions. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2004; 14: 73-80.
36. Hiroma T, Ito Y, Saegusa H, Yoshino G. A novel and simple method for quantification of small, dense LDL. *J Lipid Res* 2003; 44: 2193-201.
37. Ito Y, Fujimura M, Ohta M, Hirano T. Development of a homogeneous assay for measurement of small dense LDL cholesterol. *Clin Chem* 2011; 57: 57-65.
38. Rainwater DL. Electrophoretic separation of LDL and HDL subclasses. In: Ordovas JM., editor. *Lipoprotein protocols*. New Jersey: Human Press; 1998. p. 137-51.
39. Alabakovska SB, Todorova BB, Labudovic DD, Tosheska KN. Gradient gel electrophoretic separation of LDL and HDL subclasses on BioRad Mini Protean II and size phenotyping in healthy Macedonians. *Clin Chim Acta* 2002; 137: 119-23.
40. Hoefner DM, Hodel SD, O'Brien JF, *et al.* Development of a rapid, quantitative method for LDL subfractionation with use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System. *Clin Chem* 2001; 47: 266-74.
41. Srisawasdi P, Chaloeysup S, Teerajetgul Y, *et al.* Estimation of plasma small dense LDL cholesterol from classic lipid measures. *Am J Clin Pathol* 2011; 136: 20-9.