

XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG AXIT BÉO TỰ DO TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI BÌNH THƯỜNG VÀ BỆNH NHÂN ĐÁI THÁO ĐƯỜNG TYP 2 BẰNG SẮC KÝ KHÍ KHỐI PHỔ
TRINH MINH VIỆT, LẠI VĂN HÒA, NGUYỄN QUỐC CHIẾN
Viện 69, BTL Bảo vệ Lăng Chủ tịch Hồ Chí Minh
NGUYỄN GIA BÌNH, PHẠM THỊ MINH HUYỀN
Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

TÓM TẮT

Axit béo tự do (FFA- free fatty acids) là chỉ số quan trọng đánh giá các bất thường trong chuyển hóa lipid ở bệnh nhân đái tháo đường typ 2 (ĐTĐT2). Một số nghiên cứu cho thấy thành phần và nồng độ của chúng trong huyết tương ảnh hưởng tới độ nhạy của tế bào với insulin và làm giảm khả năng dung nạp glucose qua các chất trung gian. Nghiên cứu của chúng tôi bước đầu đánh giá những thay đổi về thành phần các FFA trong huyết tương ở một nhóm bệnh nhân ĐTĐT2 so với nhóm người bình thường, đồng thời làm tiền đề các nghiên cứu tiếp theo về rối loạn chuyển hóa lipid và axit béo.

SUMMARY

FFA-free fatty acids are important index for abnormalities of lipid metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. Some studies suggested that the composition and concentration of plasma FFAs influenced insulin sensitivity and mediated impaired glucose tolerance. In this research, we initially evaluate the change in the composition of plasma FFAs in a group of patients compared to a

control group and outline further studies on lipid metabolism and fatty acids.

Keywords: diabetes mellitus (T2DM), free fatty acid (FFA), plasma.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Các bất thường về lipid đã được chứng minh có vai trò quan trọng trong bệnh sinh của rất nhiều bệnh, bao gồm đái tháo đường, xơ vữa động mạch, béo phì và bệnh Alzheimer [3]. Lipid là thành phần tạo màng tế bào, cung cấp năng lượng cho các quá trình sinh học và ngày nay còn được coi là kho dự trữ tiền chất của các chất truyền tin thứ 2. ĐTĐT2 là bệnh rối loạn chuyển hóa lipid điển hình [10]. axit béo tự do (FFA) là chỉ số quan trọng đánh giá các bất thường trong chuyển hóa lipid ở bệnh nhân ĐTĐT2. Đặc biệt, một số nghiên cứu cho rằng thành phần và nồng độ FFA trong huyết tương ảnh hưởng đến độ nhạy với insulin và giảm khả năng dung nạp glucose qua các chất trung gian [1]. Trong phạm vi nhất định, có thể coi FFA là các đích hóa được trong điều trị ĐTĐT2. Vì vậy, nghiên cứu một cách hệ thống về FFA trong huyết tương người là một vấn đề hết sức cần thiết. Gần đây

đã có báo cáo cho thấy có sự khác biệt rõ ràng về FFA toàn phần trong huyết tương bệnh nhân ĐTĐT2 và người bình thường [4]. Người ta cũng chỉ ra rằng có một số axit béo liên quan chặt chẽ hơn với ĐTĐT2. Nhưng ở Việt Nam, cho đến nay chưa có một báo cáo nghiên cứu toàn diện nào về phân tích định tính và định lượng FFA trong huyết tương bệnh nhân ĐTĐT2 cũng như ở người bình thường.

Chúng tôi sử dụng sắc ký khí - khối phổ để phân tích các thành phần FFA, vì cho đến nay nó vẫn được coi là công cụ tốt nhất trong phân tích các axit béo

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng.

Mẫu nghiên cứu là huyết tương tách từ máu lấy lúc đói của hai nhóm: Nhóm bệnh nhân ĐTĐT2 (n=30) và nhóm người bình thường (n=30). Tất cả đều lấy tại khoa Hóa sinh- Bệnh viện Trung ương Quân đội 108. Bệnh nhân ĐTĐT2 được chẩn đoán theo tiêu chuẩn của ADA năm 1997 (Đường huyết lúc đói > 7,0 mmol/l). Một số đặc điểm của hai nhóm được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1: Một số đặc điểm của hai nhóm nghiên cứu

	Người bình thường	Bệnh nhân ĐTĐT2
Tuổi (năm)	55,7 ± 5,6	56,3 ± 5,3
Nam (người)	15	13
Nữ (người)	15	17
Glucose máu lúc đói (mmol/L)	3,9–6,4	7,0-13,7

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Chiết axit béo và tạo dẫn xuất methyl este các axit béo tự do

Mẫu máu (chống đông bằng EDTA_Na) được ly tâm ngay 3000 xg trong 10 phút để tách huyết tương sang một ống eppendorf sạch và bảo quản ở -80 độ C tới khi phân tích. Chiết lipid theo phương pháp Folch có thay đổi, tóm tắt như sau:

Lấy 200 μ L huyết tương rồi thêm 2 mL hỗn hợp Folch (chloroform/metanol/nước theo tỷ lệ 3/1/0,8 (v/v)), lắc kỹ trong 5 phút, ly tâm 3000 xg trong 5 phút, rồi chiết lấy pha hữu cơ sang lọ thủy tinh sạch, chiết lặp lại 2 lần tương tự. Thu gộp toàn bộ dịch chiết và thổi khô dưới dòng khí N₂ ở nhiệt độ phòng. Sau đó thêm 50 μ L metanol và 1,5 mL diazometan để este hóa axit béo tự do trong 15 phút. Thổi khô dưới dòng khí N₂ ở nhiệt độ phòng. Hòa tan mẫu phần thu được trong 200 μ L diclorometan làm mẫu cho phân tích sắc ký khí khối phổ.

2.2. Phân tích GC-MS

Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng hệ thống sắc ký khí-khối phổ Thermo Scientific ITQ 900™ GC/MS,

phân tích trên cột TRACE TR-FAME GC (dài 30 m, ID 0,25 mm, film 0,1 μ m). Nhiệt độ lò cột được đặt theo chu trình đã được khảo sát, bắt đầu từ 110°C (giữ 3 phút), tăng 3°C/phút tới 230°C, tiếp theo tăng 15°C/phút tới 250°C, sau đó giữ 15 phút ở 250°C. Nhiệt độ buồng bơm mẫu đặt ở 250°C. Sử dụng helium làm khí mang, tốc độ dòng hằng định 1,0 ml/phút. Bơm 1 μ L mẫu, chế độ chia dòng (split), tỷ lệ 1:10.

2.3. Xác định axit béo tự do

Các FFA được xác định theo tính chất không phản ứng với các axit béo đã este hóa của diazometan. Các FAME được xác định theo sắc đồ, phổ đồ của mẫu chuẩn (hỗn hợp 37 axit béo methyl este của Sigma) và thư viện phổ Wiley với khoảng 870.000 chất.

Khi xác định được các FAME, ta định lượng chúng bằng cách xây dựng đường chuẩn theo diện tích peak rồi tính ra kết quả của từng axit béo trên phần mềm Qual browser của Xcalibur. Các kết quả được xử lý thống kê, so sánh các kết quả bằng t-test.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Phân tích GC-MS trong huyết tương bệnh nhân ĐTĐT2 và người bình thường đã định tính và định lượng được 17 axit béo tự do.

Kết quả thu được cho thấy các FFA trong huyết tương tách ra phù hợp với quy luật đã biết về sắc ký khí và khối phổ của các FAME như sau:

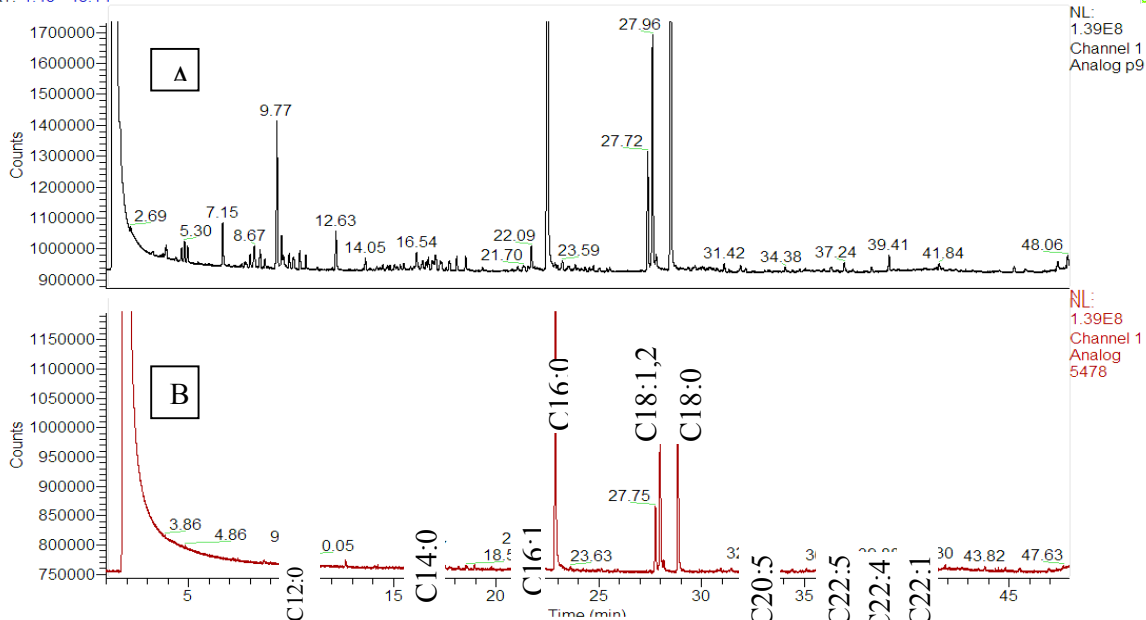
Các FAME được giải ra theo độ dài của chuỗi carbon, độ bão hòa và vị trí của liên kết đôi đầu tiên. FAME bão hòa có mạch ngắn thì được giải ra trước. Với FAME không bão hòa có cùng số carbon, không bão hòa đa, không bão hòa đôi, FAME không bão hòa đơn được giải ra lần lượt theo số lượng các liên kết đôi.

2) FAME bão hòa, không bão hòa đơn, không bão hòa đôi và không bão hòa đa có thể được phân biệt nhờ các ion phân tử và một số ion đặc trưng của phổ khối.

+ FAME bão hòa có các ion đặc trưng là m/z = 55, 74, 87, 143 và ion cơ bản là m/z=74. FAME không bão hòa đơn có các ion đặc trưng là m/z=41, 55, 69, 74, 83, 97 và ion cơ bản là m/z 55. FAME không bão hòa đôi có các ion đặc trưng là m/z=41, 55, 67, 81, 95, 107 và ion cơ bản m/z=67. FAME không bão hòa đa có các ion đặc trưng là m/z=41, 55, 67, 79, 95, 108, 150 và ion cơ bản là m/z=79.

+ Các FAME không bão hòa đa có một số ion chính dùng để xác định vị trí của liên kết đôi đầu được tính từ đầu methyl của chuỗi carbon (thường được gọi bằng 'n'). Đặc biệt, các ion m/z=108 và 150 là những ion chìa khóa để phân biệt 'n-3' và 'n-6' của các FAME không bão hòa đa [8].

RT: 1.48 - 48.14



Hình 1: Sắc đồ các FFA trong huyết tương bệnh nhân đái tháo đường typ 2 (hình A) và người bình thường hình B)

Kết quả xác định FFA trong huyết tương (bảng 2) cho thấy:

Tổng hàm lượng FAA trong huyết tương ở bệnh ĐTĐT2 cao hơn rõ ràng so với ở người bình thường ($p < 0,05$).

Thành phần axit béo tự do trong huyết tương xét theo hai nhóm axit béo bão hòa và axit béo không bão hòa đã thấy: axit lauric (C12:0), myristic (C14:0), palmitic (C16:0) và stearic (C18:0) trong huyết tương bệnh nhân ĐTĐT2 cao hơn rõ ràng so với nhóm người bình thường ($p < 0,05$). Ngược lại, các axit béo không bão hòa oleic (C18:1n-9), linoleic (C18:2n-6), eicosenoic (C20:1n-9), eicosapentaenoic (C20:5n-3), erucic (C22:1n-9), docosahexaenoic (C22:6n-3) lại giảm thấp hơn so với người bình thường ($p < 0,05$).

Tổng hàm lượng axit béo tự do trong huyết tương bệnh nhân ĐTĐT2 cao hơn người bình thường cho thấy, rối loạn chuyển hóa glucose có thể liên quan tới những bất thường trong chuyển hóa lipid và axit béo trong huyết tương [4].

Tổng lượng FFA ở nhóm bệnh nhân ĐTĐT2 cao hơn người bình thường chủ yếu do thành phần axit béo bão hòa. axit béo bão hòa có hàm lượng cao trong huyết tương có thể là nguyên nhân làm tăng các bệnh như tiểu đường, đột quỵ, ung thư, viêm khớp, alzheimer... Vì vậy, chúng được xem là nhóm chất béo không có lợi cho cơ thể. Nhóm axit béo không bão hòa được xem là nhóm chất béo có lợi cho cơ thể. Axit béo tốt nhất cho sức khỏe là axit béo không bão hòa đơn, kế tiếp là axit béo không bão hòa đa (J. Lunn and H. E. Theobald 2006). Chúng có tác dụng tăng hàm lượng cholesterol có lợi HDL-C cho cơ thể, giảm cholesterol LDL-C có hại. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù

hợp với những quan điểm đã được công nhận nói trên.

Bảng 2: Hàm lượng FFA trong huyết tương người bình thường và bệnh nhân ĐTĐT2 (mg/L; X \pm SD, n=30)

ST T	Axit béo	Người bình thường		Bệnh nhân ĐTĐT2		p
		Hàm lượng	Tỷ lệ ^a , %	Hàm lượng	Tỷ lệ ^a , %	
1	C12:0	0,7 \pm 0,2	0,36	1,6 \pm 0,5	0,67	<0,05
2	C14:0	2,2 \pm 0,6	1,13	3,3 \pm 0,7	1,39	<0,05
3	C15:0	0,8 \pm 0,2	0,39	0,5 \pm 0,1	0,19	<0,05
4	C16:1n-9	0,7 \pm 0,2	0,34	0,8 \pm 0,3	0,36	<0,05
5	C16:1n-7	4,4 \pm 1,7	2,20	3,1 \pm 0,8	1,32	<0,05
6	C16:0	91,7 \pm 16,3	46,43	123,1 \pm 23,3	52,32	<0,05
7	C18:2n-6t	18,1 \pm 4,6	9,18	10,5 \pm 3,3	4,44	<0,05
8	C18:n-9c	31,1 \pm 7,4	15,75	19,3 \pm 5,9	8,19	<0,05
9	C18:1n-9t	2,3 \pm 0,5	1,16	1,3 \pm 0,3	0,57	<0,05
10	C18:0	40,5 \pm 7,1	20,50	65,9 \pm 14,5	28,03	<0,05
11	C20:5n-3	1,5 \pm 0,4	0,77	1,2 \pm 0,2	0,51	<0,05
12	C20:1n-9	0,4 \pm 0,1	0,22	0,9 \pm 0,3	0,37	<0,05
13	C20:0	0,4 \pm 0,1	0,20	0,2 \pm 0,1	0,10	<0,05

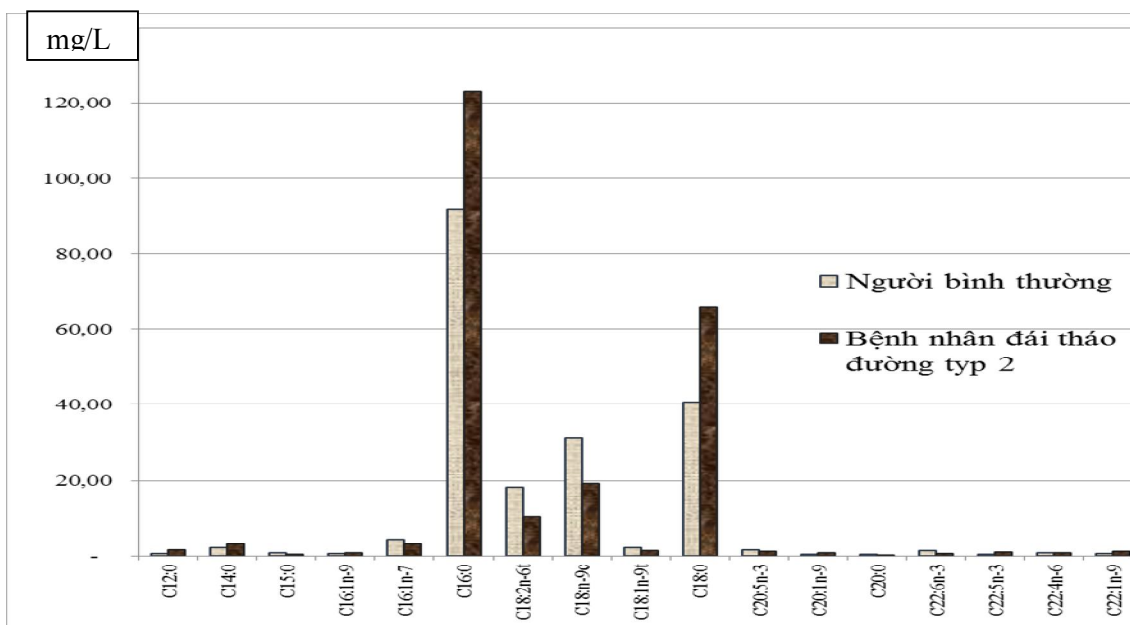
14	C22:6n-3	1,4 ± 0,4	0,72	0,6 ± 0,2	0,26	<0,05
15	C22:5n-3	0,5 ± 0,2	0,25	1,1 ± 0,3	0,46	<0,05
16	C22:4n-6	0,9 ± 0,2	0,46	0,8 ± 0,3	0,33	>0,05
17	C22:1n-9	0,6 ± 0,2	0,32	1,1 ± 0,3	0,48	<0,05
	Tổng lượng FFA	197,6 ± 40,3	100%	235,2 ± 51,1	100%	<0,05

^a: Tỷ lệ (%) so với tổng lượng axit béo tự do xác định được trong huyết tương.

Mặt khác, một số nghiên cứu đã chứng minh rằng độ dài của các axit béo có vai trò quan trọng cho sự trao đổi năng lượng và độ nhạy cảm của tế bào với insulin. Đặc biệt, một số tác giả đã báo cáo về một enzym xúc tác chuyển palmitat thành stearat, đóng vai trò chính trong hiện tượng kháng insulin [7, 9]. Thí nghiệm của họ đã chứng minh rằng việc chuyển đổi palmitat thành stearat là một bước then chốt cho sự

xuất hiện kháng insulin. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với những báo cáo đó. Với tỷ lệ C18:0/C16:0 tăng cao ở nhóm bệnh nhân ĐTĐT2 (0,54 ở nhóm bệnh nhân ĐTĐT2 và 0,44 ở người bình thường).

Kết quả thu được ở biểu đồ 1 cũng cho thấy, Hàm lượng axit oleic trong huyết tương của người bình thường cao hơn ở bệnh nhân ĐTĐT2. Điều này phù hợp với các báo cáo trước đây rằng độ nhạy cảm của các tế bào với insulin ở bệnh nhân ĐTĐT2 có thể được cải thiện khi chuyển từ chế độ ăn giàu cacbonhydrat sang chế độ giàu axit béo không bão hòa đơn có năng lượng tương đương. Madigan và cộng sự chứng minh rằng thay đổi chế độ ăn uống từ axit linoleic sang axit oleic dẫn đến sự thay đổi tỷ lệ lipoprotein tỷ trọng thấp (LDL) và lipoprotein tỷ trọng cao (HDL) trên bệnh nhân ĐTĐT2. Vì vậy, axit oleic được xem như một mắt xích then chốt trong rối loạn chuyển hóa và chế độ ăn hợp lý của bệnh nhân.



Biểu đồ 1: Hàm lượng axit béo tự do trong huyết tương ở hai nhóm nghiên cứu

Axit béo không bão hòa đa n-3 (n-3 PUFAs) đóng vai trò sinh học quan trọng đối với người khỏe và người bệnh. Những nghiên cứu gần đây, đã chứng minh n-3 PUFAs có tác dụng kháng viêm, chống xơ vữa động mạch, làm hạ huyết áp và làm giảm tác dụng của triglycerid [2, 5]. Axit α -linolenic (C18:3n-3), là axit béo thiết yếu quan trọng nhất mà chỉ được cung cấp từ chế độ ăn uống. Hơn nữa, nó còn là chất nền để tổng hợp ra 2 axit béo không bão hòa đa n-3 quan trọng, axit eicosapentaenoic (EPA C20:5n-3) và axit docosahexaenoic (DHA C22:6n-3), rất quan trọng cho sự chuyển hóa năng lượng và độ nhạy của tế bào với insulin (Sinclair et al., 2002). Axit α -linolenic được nói dài mạch và khử bão hòa tạo thành EPA là tiền chất

của các eicosanoid chống viêm. Một số nghiên cứu cho thấy EPA ức chế interleukin 1 α (IL-1 α), yếu tố hoại tử khối u (TNF α) và interleukin-6 (IL-6) có vai trò quan trọng trong bệnh sinh ĐTĐT2 và biến chứng của nó (Ferrucci et al., 2006; Simopoulos, 2006). Nghiên cứu hiện tại của chúng tôi cho thấy hàm lượng DHA trên bệnh nhân ĐTĐT2 thấp hơn người bình thường, có thể là nguyên nhân làm giảm độ nhạy của tế bào với insulin ở bệnh nhân đái tháo đường, phù hợp với các nhận định trước đây.

Bảng 4: Hàm lượng cholesterol và triglycerid trong huyết tương của hai nhóm.

Chỉ số	Người bình thường	Bệnh nhân ĐTĐT 2
Tổng lượng FFA (mg/L)	197,6 ± 40,3	235,2 ± 51,1
Cholesterol (mmol/L)	2,9 - 5,2	6,6 ± 0,9
Triglycerid (mmol/L)	0,8 - 2,3	3,2 ± 1,3

Mặt khác, nhóm bệnh nhân ĐTĐT2 có hàm lượng cholesterol nằm trong khoảng 6,6±0,9 mmol/L, cao hơn rõ ràng so với người bình thường (bảng 4). Đã thấy hàm lượng cholesterol huyết tương ở nhóm bệnh nhân đái tháo đường có tương quan thuận với hàm lượng một số axit béo bão hòa: lauric (r = 0,34), myristic (r = 0,45), palmitic (r = 0,30) và cũng có tương quan thuận với axit eicosapentaenoic (r = 0,56); với các axit béo khác thì chưa thấy có tương quan rõ rệt, có thể do số lượng mẫu nghiên cứu còn nhỏ. Hàm lượng triglycerid có tương quan thuận với hàm lượng axit palmitic (r = 0,41) và stearic (r = 0,50). Tỷ lệ axit béo bão hòa cao trong máu được xem là không tốt bởi nó làm tăng lượng LDL-cholesterol trong máu và làm giảm hấp thu LDL-cholesterol ở gan, lượng LDL dư thừa trong máu sẽ bám vào thành mạch và dẫn tới hình thành các mảng xơ vữa động mạch.

KẾT LUẬN

Bảng sắc ký khí khối phổ đã xác định được 17 axit béo tự do trong huyết tương bệnh nhân đái tháo đường typ 2 và người bình thường; với tổng hàm lượng lần lượt là 235,2 ± 51,1 và 197,6 ± 40,3 mg/l; trong đó các axit: palmitic, stearic, oleic, linoleic, myristic và lauric chiếm trên 96% tổng lượng axit béo tự do ở cả hai nhóm.

Bệnh nhân đái tháo đường typ 2 có hàm lượng các axit béo bão hòa (82,5%) trong huyết tương cao hơn so với người bình thường (76,5%); tổng lượng axit béo không bão hòa (17,5%) thấp hơn so với người bình thường (31,7%). Tỷ lệ stearic/palmitic trong huyết ở nhóm bệnh nhân đái tháo đường typ 2 (0,54) cao hơn ở người bình thường (0,44).

Hàm lượng một số axit béo tự do trong huyết tương bệnh nhân đái tháo đường typ 2 có tương quan

thuận vừa phải với hàm lượng triglycerid và cholesterol.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bergman R. N., & Ader M. (2000), Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 11: 351–356.
2. Geleijnse J. M., Giltay E. J., Grobbee D. E., Donders A. R. T., & Kok F. J. (2002), Blood pressure response to fish oil supplementation: Metaregression analysis of randomized trials, *Journal of Hypertension*, 20: 1493–1499.
3. Helms B., & van Meer G. (2006), Lipidome and disease. *FEBS Letters*, 580: 5429.
4. Lapolla A., Sartore G., della Rovere G. R., et al. (2006), Plasma fatty acids and lipoproteins in type 2 diabetic patients. *Diabetes- Metabolism Research and Reviews*, 22: 226–231.
5. Lee T. H., Hoover R. L., Williams J. D., et al. (1985), Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *New England Journal of Medicine*, 312: 1217–1224.
6. Matsuzaka T., Shimano H., Yahagi N., et al. (2002), Cloning and characterization of a mammalian fatty acyl-CoA elongase as lipogenic enzyme regulated by SREBPs. *Journal of Lipid Research*, 43: 911–920.
7. Matsuzaka T., Shimano H., Yahagi N., et al. (2007), Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance. *Nature Medicine*, 13: 1193–1202.
8. Mjos S. A., & Grahl-Nielsen O. (2006), Prediction of gas chromatographic retention of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography A*, 1110: 171–180.
9. Moon Y. A., Shah N. A., Mohapatra S., Warrington J. A., & Horton J. D. (2001), Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 45358–45366.
10. Stumvoll M., Goldstein B. J., & van Haeften T. W. (2005), Type 2diabetes: Principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*, 365: 1333–1346.