

(โลโก้ สกว.)

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาพยาธิสภาพผู้ป่วยเบาหวาน

โดย แพทย์หญิงสว่างจิต สุ่อมรรกุล

พฤษภาคม 2551

สัญญาเลขที่ TRG4880007

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาพยาธิสภาพผู้ป่วยเบาหวาน

โดย แพทย์หญิงสว่างจิต สุรอมรกุล

สังกัด ภาควิชาอายุรศาสตร์

วิทยาลัยแพทยศาสตร์กรุงเทพมหานครและวชิรพยาบาล

สนับสนุนโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ

1. อาสาสมัครทุกท่านที่เข้าร่วมการศึกษา
2. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
3. สมาคมต่อมไร้ท่อแห่งประเทศไทย
4. ศ.นพ.บุญส่ง องค์กรพัฒนกุล คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี
5. ผู้อำนวยการวิทยาลัยแพทยศาสตร์กรุงเทพมหานครและวชิรพยาบาล
6. หัวหน้าภาควิชาอายุรศาสตร์
7. หัวหน้าหน่วยต่อมไร้ท่อ
8. พยาบาลและเจ้าหน้าที่ หน่วยต่อมไร้ท่อ ภาควิชาอายุรศาสตร์
9. เจ้าหน้าที่เทคนิคการแพทย์
10. เกสัชกร ห้องผสมยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์กรุงเทพมหานครและวชิรพยาบาล

รหัสโครงการ TRG4880007
ชื่อโครงการ การศึกษาพยาธิสภาพผู้ป่วยเบาหวาน
ชื่อนักวิจัย แพทย์หญิงสว่างจิต สุรอมรกุล
ระยะเวลาโครงการ 1 มิถุนายน 2548 – 31 พฤษภาคม 2551
(ขอขยายเวลา 1 ปี เนื่องจากคลอดบุตร)

พยาธิสภาพของโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ประกอบด้วย ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ในกล้ามเนื้อ ตับ และเซลล์ไขมัน และความผิดปกติในการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน ผลิตอินซูลินไม่เพียงพอ การศึกษาส่วนใหญ่ในปัจจุบันจากทั่วโลก ยกเว้นประเทศไทย พบว่าผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ทางซีกโลกตะวันตกส่วนใหญ่มักมีความผิดปกติของภาวะดื้อต่ออินซูลิน มากกว่าภาวะขาดอินซูลิน ซึ่งลักษณะที่บ่งชี้ว่าผู้ป่วยมีภาวะดื้อต่ออินซูลิน ได้แก่ ภาวะน้ำหนักเกินหรืออ้วน ความดันโลหิตสูงและไขมันในเลือดสูง มีบางการศึกษาในประชากรชาวเอเชีย โดยเฉพาะชาวญี่ปุ่นและเกาหลีที่เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่า ภาวะดื้อต่ออินซูลินไม่เพียงพอ ทำให้ขาดอินซูลินมีบทบาทมากกว่าภาวะดื้อต่ออินซูลิน

ความชุกของโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในประเทศไทยเท่ากับร้อยละ 6.9 จากโครงการลงทะเบียนผู้ป่วยเบาหวานพบผู้ป่วยเบาหวานที่อ้วนร้อยละ 50 และไม่อ้วนร้อยละ 50 ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษาในประเทศไทยเพื่อให้ทราบแน่ชัดว่าในผู้ป่วยเบาหวานอ้วนและผอมมีพยาธิสภาพกำเนิดเป็นภาวะดื้อต่ออินซูลินหรือเป็นภาวะที่ตับอ่อนหลั่งอินซูลินไม่เพียงพอ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อดูพยาธิสภาพในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ของประเทศไทย โดยทำการศึกษาในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ผอมจำนวน 9 ราย อ้วนจำนวน 10 ราย และอาสาสมัครกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีประวัติครอบครัวเป็นโรคเบาหวาน ผอมและอ้วนอย่างละ 4 ราย ที่มีอายุและดัชนีมวลกายไม่ต่างกับผู้ป่วยเบาหวาน เพื่อเปรียบเทียบภาวะดื้อต่ออินซูลิน โดยวิธี euglycemic hyperinsulinemic clamp และความสามารถของตับอ่อนในการหลั่งอินซูลิน โดยวิธี hyperglycemic clamp ในผู้ป่วยแต่ละราย ผลการศึกษาพบว่า ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ทั้งผอมและอ้วนมีระดับน้ำตาลขณะอดอาหารใกล้เคียงกัน (FPG 133.4 ± 10.3 vs 143.6 ± 11.0 mg/dl) การควบคุมระดับน้ำตาลไม่ต่างกันเมื่อดูจากค่าเฉลี่ยน้ำตาลสะสม (HbA_{1c} 7.3 ± 0.3 vs 7.9 ± 0.3 mg%) ระยะเวลาการเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ใกล้เคียงกัน (46 ± 9 vs 43 ± 7 เดือน) แต่ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 อ้วนมีค่าความไวต่ออินซูลินต่ำกว่าผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ผอม (8.7 ± 1.3 and 16.5 ± 1.6 mg/fat free mass kg/min, $p < 0.001$). ขณะที่ค่าความไวต่ออินซูลินในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ผอมไม่ต่างกับอาสาสมัครกลุ่มควบคุมอ้วนและผอม (16.5 ± 1.6 , 24.1 ± 4.3 , 15.9 ± 4.0 mg/fat free mass kg/min) เมื่อคำนวณเป็นค่าดัชนีความไวต่ออินซูลิน ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 อ้วนมีค่าต่ำที่สุดในกลุ่ม ในการศึกษาความสามารถของตับอ่อนในการหลั่งอินซูลิน พบว่าผู้ที่อ้วนทั้งที่เป็นอาสาสมัครกลุ่มควบคุมและเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มีการหลั่งอินซูลินมากกว่าอาสาสมัครกลุ่มผอมทั้งกลุ่มควบคุมและเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โดยมีค่า fasting c-peptide

ตามลำดับคือ 0.66 ± 0.20 vs 0.47 ± 0.14 vs 0.27 ± 0.04 vs 0.13 ± 0.03 pmol/l, $p < 0.05$ การหลั่งอินซูลินในระยะที่ 1 คือช่วง 10 นาทีแรก และระยะที่ 2 คือ นาทีที่ 10 ถึง 120 ของการศึกษาพบว่า ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ผอมมีการหลั่งอินซูลินทั้ง 2 ระยะต่ำที่สุด ขณะที่อาสาสมัครกลุ่มควบคุมอ้วนมีการหลั่งอินซูลินที่สูงสุดทั้ง 2 ระยะ ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 อ้วน มีการหลั่งอินซูลินในระยะที่ 1 ลดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมแต่สามารถเพิ่มการหลั่งอินซูลินในระยะที่ 2 ขึ้นได้

สรุป ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 อ้วนมีภาวะดื้อต่ออินซูลินเป็นพยาธิสภาพที่สำคัญโดยที่การหลั่งอินซูลินลดลงมากในระยะที่ 1 แต่สามารถเพิ่มการหลั่งอินซูลินในระยะที่ 2 ได้ ขณะที่พยาธิสภาพหลักในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ผอมเป็นการหลั่งอินซูลินที่ลดลงมากทั้ง 2 ระยะ โดยที่ความไวต่ออินซูลินไม่ต่างกับอาสาสมัครกลุ่มควบคุม ดังนั้นการเลือกยาลดระดับน้ำตาลในการรักษาผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ทั้งอ้วนและผอม ควรพิจารณาถึงพยาธิสภาพหลักในผู้ป่วยเป็นสำคัญ

Project Code: TRG4880007
Project Title: Pathophysiology of type 2 diabetic patients
Investigator: Swangjit Sura-amornkul, MD.
E-mail Address: swangjits@yahoo.com
Project Period: June 1st, 2005 – May 31st, 2008

Type 2 diabetes mellitus is characterized by dual defects in insulin action and insulin secretion. Insulin resistance is underlined and leading for a while before the diagnosis of type 2 diabetes in high prevalence countries. Factors of insulin resistance consists of genetic, physical inactivity and obesity. It is noteworthy that most (>80%) type 2 diabetics in western countries are overweight and the increasing prevalence of diabetes parallels the rising prevalence of obesity (51). At beginning, pancreatic beta cell can secrete more insulin called compensatory hyperinsulinemia and maintain normal glucose level. When pancreatic exhausted and failure, it is the time to diagnose diabetes.

Prevalence of type 2 diabetes is around 6.9%. There are lean T2DM, obese T2DM (จปสท registry) Pathophysiology of type 2 diabetic patients have never been investigated. This is the first paper to study pathophysiology of lean and obese T2DM in Thai patients with the euglycemic hyperinsulinemic clamp technique for insulin resistance and the hyperglycemic clamp technique for insulin secretion. We conducted the 2 hour-hyperinsulinemic euglycemic (80 mU/m^2 per min) and 2 hour-hyperglycemic clamp in 9 lean and 10 obese patients with type 2 diabetes and 4 lean and 4 obese healthy control subjects with age and BMI matched on following week. Both lean and obese diabetes patients had the similar degree of glycemic control (FPG 133.4 ± 10.3 vs 143.6 ± 11.0 mg/dl, HbA_{1c} 7.3 ± 0.3 vs 7.9 ± 0.3 mg%). During the euglycemic hyperinsulinemic clamp, the insulin-stimulated state glucose disposal (Rd) of obese was lower than lean diabetes (9.9 ± 0.8 and 16.4 ± 1.7 mg/fat free mass kg/min, $p < 0.001$).

During the hyperglycemic clamp, the first phase insulin were blunted in both lean and obese diabetes subjected when compared to both lean and obese healthy control subjects. (73.6 ± 15.1 vs 110.4 ± 25.6 vs 264.2 ± 36.9 vs 632.3 ± 314.6 $\mu\text{IU/ml}$, $p < 0.05$ lean vs obese).

CONCLUSIONS: The obese diabetes subjects had significantly insulin resistance while the lean diabetes subjects had the major defect of insulin secretion. The impact would be on the mode of treatment, drug of choice to treat for correcting the pathophysiology underlined then and clinical guideline recommendation for treating both groups of diabetes.

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ ปี 2548

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

พยาธิสภาพของโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ประกอบด้วย ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ในกล้ามเนื้อ ตับ และเซลล์ไขมัน และความผิดปกติในการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน ผลิตอินซูลินไม่เพียงพอ การศึกษาส่วนใหญ่ในปัจจุบันจากทั่วโลก ยกเว้นประเทศไทย พบว่า ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ส่วนใหญ่จะมีภาวะดื้อต่ออินซูลินนำมาก่อน ซึ่งลักษณะที่บ่งชี้ถึงภาวะดื้อต่ออินซูลิน ได้แก่ ภาวะน้ำหนักเกินหรืออ้วน ความดันโลหิตสูงและไขมันในเลือดสูง แต่ในประเทศไทยพบผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ไม่อ้วนจำนวนหนึ่ง ซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดว่าในผู้ป่วยเบาหวานกลุ่มนี้มีพยาธิสภาพกำเนิดเป็นภาวะดื้อต่ออินซูลินหรือเป็นภาวะที่ตับอ่อนหลั่งอินซูลินไม่เพียงพอ

ในปัจจุบันระบบการรักษายาบาลของประเทศไทยกำลังจะมีการเปลี่ยนแปลงไปสู่ระบบการประกันสุขภาพ ด้วยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ยังขาดการศึกษาข้อมูลทางคลินิกและทางระบาดวิทยาว่า ผู้ป่วยโรคเบาหวานในประเทศไทยมีพยาธิกำเนิดโรคจากภาวะดื้อต่ออินซูลินหรือ ภาวะตับอ่อนผลิตอินซูลินไม่เพียงพอในสัดส่วนเท่าไร ในผู้ป่วยโรคเบาหวานที่ผอมอาจจะมีพยาธิสภาพที่ตับอ่อนไม่สามารถผลิตอินซูลินได้เพียงพอเด่นกว่าภาวะดื้อต่ออินซูลินที่แตกต่างจากข้อมูลการศึกษาในประเทศทางตะวันตก ทำให้การดำเนินโรคแตกต่างกัน ซึ่งความรู้ความเข้าใจที่ถูกต้องทางด้านพยาธิสภาพของโรคเบาหวานในประเทศไทยจะนำมาซึ่งข้อแนะนำการรักษาโรคเบาหวานได้ตรงพยาธิสภาพของโรค และมาตรฐานการรักษาที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพกับผู้ป่วยเบาหวานในประเทศไทย และค่าใช้จ่ายในการรักษายาบาลมีความคุ้มค่าสูงสุด เพื่อใช้ในการกำหนดทิศทางการพัฒนาระบบสาธารณสุขของประเทศ

2. วัตถุประสงค์

ศึกษาพยาธิสภาพของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในประเทศไทยว่าเป็นภาวะดื้อต่ออินซูลินหรือความผิดปกติในการหลั่งอินซูลิน

3. ระเบียบวิธีวิจัย

ผู้วิจัยจะเป็นผู้อธิบายวิธีการทำการศึกษาวิจัยถึงผลดี ผลเสีย และประโยชน์ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา ให้ผู้ป่วยทราบ เพื่อให้ผู้ป่วยเป็นผู้ตัดสินใจว่าจะยินยอมเข้าร่วมโครงการศึกษานี้หรือไม่ เมื่อผู้ป่วยยินยอมที่จะเข้าร่วมโครงการนี้ ผู้วิจัยจะให้ผู้ป่วยลงชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการในหนังสือให้ความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยไว้เพื่อเป็นหลักฐาน

3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากร คือ ผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2

กลุ่มตัวอย่าง คือ

1. ผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีอายุระหว่าง 18-70 ปี ดัชนีมวลกายน้อยกว่า 25
2. กลุ่มตัวอย่างเปรียบเทียบ คือ ผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงไม่เป็นโรคเบาหวาน อายุระหว่าง 18-70 ปี ดัชนีมวลกายน้อยกว่า 25
3. กลุ่มตัวอย่างเปรียบเทียบ คือ ผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงไม่เป็นโรคเบาหวาน อายุระหว่าง 18-70 ปี ดัชนีมวลกาย มากกว่า 25

เกณฑ์คัดเลือกผู้ป่วยเข้าร่วมโครงการ (Inclusion criteria)

1. ผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่รักษาด้วยการคุมอาหารและออกกำลังกายหรือรับการรักษาด้วยยาในกลุ่ม Biguanide, alpha glucosidase inhibitor และหยุดยาเป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ก่อนการศึกษาและเป็นผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง
2. ระดับน้ำตาลก่อนอาหารน้อยกว่า 180 mg% และ HbA1c น้อยกว่า 8 mg%

เกณฑ์คัดออก (Exclusion criteria)

1. ผู้ที่มีโรคหัวใจจากการวินิจฉัยโดยการทำการ cardiac catheterization หรือได้รับการรักษาด้วย intervention treatment ได้แก่ PTCA, CABG
2. ผู้ที่มีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ในตับ มากกว่า 3 เท่า
3. ผู้ที่มีระดับครีตินีน มากกว่า 3 mg/dl
4. ผู้ที่มี Electrolyte abnormalities

3.2 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

สิ่งที่ต้องการศึกษาคือ ระดับ insulin sensitivity และ insulin secretion ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 เปรียบเทียบกับผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงที่ผอม และอ้วน วิธีวัดที่เหมาะสมคือการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการศึกษาและคำนวณด้วยวิธี one-way analysis of variance ใน 3 กลุ่มนี้

กำหนดให้ระดับ insulin sensitivity และ insulin secretion ในผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงที่ผอมเท่ากับ 1.0 จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า ค่า standard deviation ของการศึกษาทั้ง 3 นี้ประมาณ 25% และเลือกใช้ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (alpha) = 0.01 เพื่อจะหาค่าความแตกต่างนอกเหนือ 99% จากค่าเฉลี่ยที่ตั้งไว้เท่ากับ 1.0 ในกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงที่ผอม เท่ากับ 0.75 ในกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงที่อ้วน และเท่ากับ 0.5 ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 จำนวนกลุ่มตัวอย่างในแต่ละกลุ่มจะเท่ากับ 11

(คำนวณโดย NQuery Advisor, Statistical Solutions, Inc. Boston, MA).

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

Screening tests ประกอบด้วย การซักประวัติ และตรวจร่างกายโดยละเอียด การตรวจทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้น ได้แก่ 12-lead resting EKG, CBC, FBS, Cr, LFT, HbA1c, lipid profile, OGTT

ผู้เข้าร่วมการศึกษาจะได้รับคำแนะนำให้รับประทานอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรต 200-250 กรัม เป็นเวลา 3 วันก่อนการศึกษา และดื่มน้ำและอาหารในคืนก่อนการศึกษาเป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมงและมารายงานตัวที่ศูนย์เบาหวาน เวลา 8.00 น. เป็นเวลา 3 วันเพื่อทำการการศึกษา ดังนี้

1. วันที่ 1 ทำการทดสอบ 2 h-75 grams Oral glucose tolerance test เก็บเลือด ตัวอย่างเพื่อส่งตรวจ plasma glucose, insulin, C-peptide และ FFA level ที่เวลา -5 และ 0 นาที ให้ดื่มน้ำตาล 75 กรัม ในน้ำ 300 ซีซี ภายใน 5 นาที และดูดเลือดเก็บ 10 ซีซี ที่ 30, 60, 90, และ 120 นาทีหลังการดื่มน้ำตาล 75 กรัม เพื่อส่งตรวจ plasma insulin, FFA concentrations

2. วันที่ 2 ทำการทดสอบ Hyperglycemic clamp เพื่อวัดการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน มีรายละเอียดการทดสอบดังนี้

เก็บเลือด ณ เวลา -5 และ 0 นาที จากนั้นฉีด glucose เพื่อเพิ่มค่า plasma glucose มากกว่าน้ำตาลก่อนอาหาร 125 mg/dl โดยคำนวณจากสูตร $0.3\text{g/kg bolus of D50}$ ที่เวลา 0 นาที และคงระดับ plasma glucose นี้ไว้ด้วยการปรับอัตราการให้ 20% glucose เป็นระยะ เป็นเวลา 120 นาที ในระหว่างนี้ มีการวัดระดับ plasma glucose concentration ทุก 5 นาทีโดยเครื่อง Beckman glucose analyser ข้างเตียง ดูดเลือดเก็บ 10 ซีซี ทุก 2 นาทีในช่วง 10 นาทีแรก และทุก 3 นาที ในช่วง 20 นาทีถัดไป และ ทุก 5 นาทีในช่วง 90 นาทีสุดท้ายเพื่อส่งตรวจ plasma insulin, C-peptide และ FFA concentrations

ทำการเก็บปัสสาวะก่อนเริ่มและสิ้นสุดการทดสอบ เพื่อวัด urinary glucose loss

3. วันที่ 3 ทำการทดสอบ Euglycemic hyperinsulinemic clamp เพื่อวัด Insulin sensitivity มีรายละเอียดการทดสอบดังนี้

ใส่ catheter ในเส้นเลือดของหลังมือข้างหนึ่ง และวางมือ ในกล่องควบคุมอุณหภูมิคงที่ที่ 55 องศาเซลเซียส (hot box) เพื่อให้เส้นเลือดขยายตัวและได้ arterialized blood เพื่อตรวจ plasma glucose ด้วยเครื่อง Beckman glucose analyser ข้างเตียง ตามวิธีมาตรฐาน เก็บเลือด ณ เวลา -5 และ 0 นาที และทุก 5 นาที ตลอดเวลา 120 นาทีที่ทำการทดสอบ

จากนั้นใส่ catheter ในเส้นเลือดของแขนด้านตรงข้าม เพื่อให้ 20% glucose ตลอดเวลา 120 นาที เพื่อควบคุมระดับ plasma glucose ไว้ที่เท่ากับระดับน้ำตาลก่อนอาหาร $\sim 5.0\text{ mmol/l}$

ที่เวลา 0 นาที เริ่มให้ insulin ด้วยวิธี prime-continuous infusion อัตราคงที่ โดยคำนวณจาก $80\text{ mU}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ body surface area เป็นเวลา 120 min ด้วยเครื่อง infusion pump

ดูดเลือดเก็บ 10 ซีซี ที่ -5, 0 นาที และทุก 15 นาทีตลอดเวลา 120 นาทีที่ทำการทดสอบ เพื่อส่งตรวจ plasma insulin, FFA concentrations

3.4 การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วย ได้แก่ อายุ เพศ น้ำหนัก ส่วนสูง และผลเลือดที่ได้จากการศึกษาที่ส่งตรวจโดยวิธีเฉพาะดังนี้

Plasma glucose concentration โดยวิธี glucose oxidase ด้วยเครื่อง Beckman Glucose Analyzer II (Fullerton, CA). Plasma insulin concentration วัดด้วยวิธี solid-phase ^{125}I -RIA

(Coat-A-Count, Diagnostic, Los Angeles, CA). Plasma C-peptide วัดด้วยวิธี specific RIA (C-peptide 125IRIA Kit, Incstar, Stillwater, MN). Plasma FFA concentration วัดด้วยวิธี enzymatic colorimetric method (WAKO NEFA, Richmondk, VA).

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจะเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการศึกษาและคำนวณด้วยวิธี one-way analysis of variance ใน 3 กลุ่มนี้

3.5 ความเสี่ยงและผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นกับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาพยาธิสภาพของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในประเทศไทยว่าเป็นภาวะดื้อต่ออินซูลินหรือความผิดปกติในการหลั่งอินซูลิน โดยวิธี 2 h-75 grams Oral glucose tolerance test, Hyperglycemic clamp และ Euglycemic hyperinsulinemic clamp ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานและยอมรับทั่วโลกสำหรับงานวิจัย ผู้ป่วยจะเสียเลือดในระหว่างการวิจัยเป็นปริมาณไม่เกิน 350 ซีซี เท่ากับปริมาณเลือดที่บริจาคโลหิต 1 ครั้ง ผู้ป่วยจะได้รับคำแนะนำให้งดการบริจาคโลหิตก่อนและหลังการศึกษาเป็นเวลา 3 เดือน

การศึกษานี้มีการใช้ insulin ซึ่งเป็นสารที่หลั่งโดยตับอ่อนในร่างกายและสารสังเคราะห์ Human insulin ซึ่งมีความบริสุทธิ์เช่นเดียวกับที่หลั่งในร่างกาย ซึ่งหลังการศึกษา Hyperglycemic clamp ผู้ป่วยจะหลั่ง insulin เพิ่มขึ้น และในการศึกษา Euglycemic hyperinsulinemic clamp จะใช้ Humulin R ซึ่งเป็น Human insulin ที่ออกฤทธิ์เร็วและหมดฤทธิ์ในเวลา 4-6 ชั่วโมง แม้ว่าในระหว่างการศึกษามีระดับ insulin ที่เพิ่มขึ้นแต่จะไม่เกิดอาการน้ำตาลในเลือดต่ำด้วยการให้ 20% Dextrose เพื่อตอบสนองต่อการออกฤทธิ์ของ insulin และยังมีการตรวจระดับน้ำตาลในเลือดทุก 5 นาทีในระหว่างการศึกษา นี้จะทำให้ผู้ป่วยมีความรู้สึกหิวและต้องการน้ำตาลมากขึ้น จะมีการจัดอาหารคาร์โบไฮเดรตสูงให้ผู้ป่วยรับประทานทันทีหลังเสร็จการศึกษา และตรวจระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในระดับเดียวกับน้ำตาลก่อนอาหารและผู้ป่วยไม่มีอาการน้ำตาลในเลือดต่ำจึงจะส่งผู้ป่วยกลับบ้าน

ผู้ป่วยจะได้รับคำแนะนำในการดูแลแผลในบริเวณที่ใส่ catheter ที่มือทั้ง 2 ข้าง สังเกตอาการปวด บวม แดง ร้อน และไข้ จากการติดเชื้อที่อาจจะเกิดขึ้นได้ และงดการสัมผัสน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผู้ป่วยจะได้รับเบอร์โทรศัพท์ที่สามารถติดต่อแพทย์ผู้ทำการศึกษาได้ตลอด 24 ชั่วโมงในกรณีที่ผู้ป่วยมีอาการผิดปกติที่เกี่ยวข้องจากการศึกษานี้

4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

พฤษภาคม 2548 - ตุลาคม 2548:	จัดเตรียมเครื่องมือวัสดุอุปกรณ์ในการทำวิจัย ฝึกอบรมพยาบาลผู้ช่วยทำวิจัย ประชาสัมพันธ์และคัดเลือกผู้ป่วยเพื่อเข้าโครงการ
พฤศจิกายน 2548 - เมษายน 2549:	เริ่มดำเนินการวิจัยตามโครงการ
พฤษภาคม 2549 - ตุลาคม 2549:	ดำเนินการวิจัยตามโครงการ
พฤศจิกายน 2549 - เมษายน 2550:	สรุปและวิเคราะห์ผลการวิจัย เตรียมเขียนผลงานเพื่อการตีพิมพ์

5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติในแต่ละปี

ปีที่ 2: ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: การศึกษาพยาธิสภาพผู้ป่วยเบาหวาน

Pathophysiology of type 2 diabetic patients

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Diabetes care ค่า impact factor 5.404

เพื่อทางานวิจัย

The euglycemic and hyperglycemic clamp to study insulin sensitivity and secretion in lean and obese Thai type 2 diabetic patients

American Diabetes Association and European study group of Diabetes consensus on Algorithm for the metabolic management of type 2 diabetes published on Diabetes Care 2006 (1). When type 2 diabetes patients diagnosed, they were suggested to start treatment with life style intervention and metformin. This postulated based on the majority of type 2 diabetics in western countries are overweight and the increasing prevalence of diabetes parallels the rising prevalence of obesity (2), leading to the term of diabetes. While the developing countries such as China (3), India (4) and Thailand (5), half of type 2 diabetics were lean, not obese, called lean type 2 diabetes. The pathophysiology might be different between lean and obese type 2 diabetes. The impact would be on the mode of treatment, drug of choice to treat for correcting the pathophysiology underlined then.

Type 2 diabetes mellitus is characterized by dual defects in insulin action and insulin secretion (6). Insulin resistance is underlined and leading for a while before the diagnosis of type 2 diabetes in most of high prevalence countries. Factors of insulin resistance consists of genetic, physical inactivity and obesity. At beginning, pancreatic beta cell can secrete more and more insulin called compensatory hyperinsulinemia and maintain normal glucose level. When pancreatic exhausted and failure, it is the time to diagnose diabetes. However there are substantial differences in the metabolic characteristics of lean and obese type 2 diabetes leading to alter clinical guideline or recommendation in treating type 2 diabetes.

In Thailand (5), prevalence of type 2 diabetes is around 6.9%. There are 50% obese type 2 diabetic patients. Pathophysiology of Thai type 2 diabetic patients have never been investigated. We are unaware of any studies in which insulin secretion and in vivo insulin action have actually been compared in lean and obese type 2 diabetes. This is the first paper to study pathogenesis of lean and obese type 2 diabetic in Thai patients with the euglycemic hyperinsulinemic clamp technique and hyperglycemic clamp technique. The present investigation was conducted to supply this information.

Research design and methods

Subjects Studies were conducted in 9 lean and 10 obese patients with type 2 diabetes and 4 lean and 4 obese healthy control subjects. For diabetes patients, eleven subjects had been taking a stable dose of monotherapy drug for at least 6 months before

study, and nine subjects were treated with diet alone. Patients who had received insulin, thiazolidinedione within the previous 12 months were excluded. All medications were discontinued at least 2 weeks before the patients were studied. Entry criteria included: age, stable body weight for at least 3 months before study and fasting plasma glucose (FPG) 7.0-14.5 mmol/l. Healthy control subjects were age-matched, BMI-matched to diabetes subjects. Healthy control subjects were excluded if they had family history of diabetes, were taking medication that disturbed glucose metabolism, or had abnormal glucose tolerance test based on American Diabetes Association 2004 criteria (7). Patients with type 2 diabetes were recruited from our Diabetes Centre. Patients were excluded if they had evidence of complications from their diabetes or significant underlying diseases other than hypertension and dyslipidemia. All patients were in good general health, without evidence of cardiac, hepatic, renal or other chronic diseases as determined by history, physical examination, screening blood tests and urinalysis. No subjects participated in any heavy exercise, and no subjects were taking any medications known to affect glucose metabolism. In the lean diabetes, the duration of diabetes was 3.9 ± 0.9 years (range 6 months to 8 years) and HbA_{1c} was 7.4 ± 0.4 %. In the obese diabetes, the duration of diabetes was 2.1 ± 0.5 years (range 4 months to 4 years) and HbA_{1c} was 7.9 ± 0.3 %. This study was approved by the ethic committee of Bangkok Metropolitan Administration medical college and Vajira hospital. All participants gave signed voluntary written informed consent before participation.

Study design Each subject underwent a hyperglycemic glucose clamp and an euglycemic hyperinsulinemic clamp (8). All consumed a weight-maintaining diet with 50% of total energy from carbohydrate, 30% from fat and 20% from protein. Both studies were started at 9:00 A.M. following a 12-h overnight fast. Each test was separated by at least 1 week and complete no later than 4 week apart.

Hyperglycemic clamp. Insulin secretion was assessed with a hyperglycemic clamp, as previously described. Briefly, after collection of baseline samples, plasma glucose was acutely raised and maintained (+5%) by 125 mg/dl above baseline for 120 min by periodic adjustment of a 20% dextrose infusion based on the negative feedback principle. Because the plasma glucose concentration is held constant, the glucose infusion rate is an index of glucose metabolism. Under these conditions of constant hyperglycemia, the plasma insulin response is biphasic with an early burst of insulin release during the first 6 min followed by a gradually progressive increase in plasma insulin concentration. Plasma samples were obtained every 2 min from 0 to 10 min (first phase insulin secretion) and every 5 min from

10 to 120 min (second phase insulin secretion). Subjects voided immediately before and at the end of the study for measurement of urinary glucose loss. The coefficient of variation (CV) of plasma glucose did not exceed 5% in any test.

Euglycemic hyperinsulinemic clamp. Insulin sensitivity was assessed with a 2-h euglycemic hyperinsulinemic ($80 \text{ mU}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$) clamp, as previously described. At 9:00 A.M., a catheter was placed retrogradely into a vein on the dorsum of the hand, which was then placed in a heated box (60°C). The second catheter was inserted into an antecubital vein on contralateral arm vein for a 20% dextrose infusion. Baseline arterialized venous blood samples for determination of plasma glucose, insulin and c-peptide concentration were drawn at -10, -5 and 0 min. At time zero, a prime-continuous infusion of human regular insulin (Humulin R: Eli Lilly, Indianapolis, IN USA) was started at a rate of $80 \text{ mU}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ and continued for 120 min. After the start of insulin, no glucose was infused until the plasma glucose concentration declined to 5.55 mmol/l, at which level it was maintained. During the insulin clamp, arterialized blood samples were collected every 5 min for plasma glucose determination and a 20% glucose infusion was adjusted, based upon the negative feedback principle, to maintain plasma glucose at approximately 5.55 mmol/l, which was reached within 60 minutes of the start of the insulin infusion in each subject. Under these steady-state conditions of euglycemia, the glucose infusion rate equals glucose uptake by all the tissues in the body and is therefore a measure of tissue sensitivity to exogenous insulin, called M-value. Blood sample for determination of plasma insulin were collected every 10 min of the last 30 minutes of the study. An insulin sensitivity index (M/I) was obtained by dividing the M-value ($\text{mg glucose taken up}\cdot\text{kg fat free mass}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) by the steady-state insulin value during the last 30 minutes of the clamp. Patients were fed at the conclusion of the study.

Waist circumference were measured in each subjects. Bioelectric impedance was measured using a machine from body composition (9). Lean body mass and percent body fat were calculated from impedance measurements as previously described. All values were corrected for lean body mass using the bioelectric impedance data.

Analytical determinations Plasma glucose was measured by the glucose oxidase method (Analox, London, U.K.). Plasma insulin and c-peptide levels were analyzed using the chemiluminescent enzyme immunoassay technique (Immulite 2000; Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA).

Calculations. During the hyperglycemic study, basal and steady-state (80-120 min) plasma glucose, insulin and C-peptide represent the mean of values drawn at 10-min intervals. The steady-state glucose infusion rate (hyper-M) during the hyperglycemic clamp represents the mean glucose infusion rate from 80 to 120 min, corrected for urinary glucose losses.

During the euglycemic hyperinsulinemic clamp study, basal and steady-state (80-120 min) plasma glucose and insulin represent the mean of values drawn at 10-min intervals. The steady-state glucose infusion rate (Eu-M value) during the euglycemic clamp represents the mean glucose infusion rate from 80 to 120 min, corrected for urinary glucose losses. The insulin sensitivity index (ISI) was derived from the euglycemic clamp data as previously described (10). Eu-M value was referred to the rate of total-body glucose disposal (R_d) implied to peripheral glucose uptake.

All results are presented as mean $\pm$ SEM. Differences between groups were compared using Student's t test for unpaired samples and repeated measures analysis of variance (ANOVA), as appropriate. $P < 0.05$ was considered significant in all analyses.

Results

The clinical data of the four groups were presented in Table 1. All subjects were age-sex matched. Obese subjects had a higher body mass index and waist circumference than lean subjects. The diabetic and non-diabetic obese groups had similar moderate degree of obesity. Both lean and obese diabetes patients had the similar degree of glycemic control (FPG 7.4 ± 0.6 vs 8.0 ± 0.6 mmol/l, HbA_{1c} 7.3 ± 0.3 vs 7.9 ± 0.3 mg%) and duration of diabetes (46 ± 9 vs 43 ± 7 months). The lean diabetes patients had better lipid profile than obese diabetes patients, less triglyceride (2.85 ± 0.30 vs 4.60 ± 0.65 mmol/l, $p < 0.05$), more HDL level (1.21 ± 0.07 vs 0.93 ± 0.05 mmol/l, $p < 0.05$).

During the 2-hour, $80 \text{ mU} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ euglycemic hyperinsulinemic clamp, the insulin levels during the clamp were in the same level, not different between all groups. The Eu-M value of obese diabetes was lower than lean diabetes (8.7 ± 1.3 and 16.5 ± 1.6 mg.fat free mass $\text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $p < 0.001$) and obese control (8.7 ± 1.3 vs 15.9 ± 4.0 mg.fat free mass $\text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $p < 0.05$). The M-value were not statistically significant different in lean diabetes, both lean and obese healthy control (16.5 ± 1.6 , 24.1 ± 4.3 , 15.9 ± 4.0 mg.fat free mass $\text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). When considered as insulin sensitivity index (M/I), the obese diabetes had decreased insulin sensitivity index.

Table 1: baseline clinical and metabolic characteristics

	Lean control (n = 4)	Obese control (n = 4)	Lean diabetes (n = 9)	Obese diabetes (n = 10)
Gender (M/F)	2/2	2/2	2/7	4/6
Age (years)	47.5 $\pm$ 6.2	44.7 $\pm$ 4.9	47.4 $\pm$ 3.7	48.1 $\pm$ 2.6
Duration of DM (month)			46 $\pm$ 9	43 $\pm$ 7
BMI (kg/m ²)	20.4 $\pm$ 0.6	33.7 $\pm$ 2.6	21.8 $\pm$ 0.7†	33.0 $\pm$ 2.9
WC (cm)	74.0 $\pm$ 4.0	96.7 $\pm$ 5.7	77.0 $\pm$ 3.1 †	98.0 $\pm$ 3.4
FPG (mmol/l)	5.4 $\pm$ 0.5	5.6 $\pm$ 0.2	7.4 $\pm$ 0.6	8.0 $\pm$ 0.6
HbA1c (mg%)	6.3 $\pm$ 0.07	6.2 $\pm$ 0.07	7.3 $\pm$ 0.3	7.9 $\pm$ 0.3
Creatinine (μ mol/l)	91.1 $\pm$ 4.4	88.4 $\pm$ 17.7	79.6 $\pm$ 5.3	91.1 $\pm$ 9.7
Cholesterol (mmol/l)	5.50 $\pm$ 0.36	5.02 $\pm$ 0.68	5.24 $\pm$ 0.40	5.25 $\pm$ 0.27
Triglyceride (mmol/l)	2.20 $\pm$ 0.25	2.45 $\pm$ 0.35	2.85 $\pm$ 0.30 ‡	4.60 $\pm$ 0.65
HDL (mmol/l)	1.68 $\pm$ 0.21	0.98 $\pm$ 0.09	1.21 $\pm$ 0.07 ‡	0.93 $\pm$ 0.05
Fat free mass	42.1 $\pm$ 2.3	49.9 $\pm$ 5.8	40.1 $\pm$ 3.1	45.5 $\pm$ 2.4

* p<0.05 control vs diabetes subjects, † p<0.01 lean vs obese diabetes, ‡ p<0.05 lean vs obese diabetes

Table 2: Euglycemic hyperinsulinemic clamp data

	Lean control (n = 4)	Obese control (n = 4)	Lean diabetes (n = 9)	Obese diabetes (n = 10)
Insulin level (pmol/l)	901 $\pm$ 107	936 $\pm$ 95	830 $\pm$ 95	743 $\pm$ 49
Eu – M value (mg/kg/min)	19.0 $\pm$ 4.1	9.2 $\pm$ 2.2*	11.5 $\pm$ 1.1 ‡	5.3 $\pm$ 0.5
Eu – M value (mg.kgFFM-1.min-1)	24.1 $\pm$ 4.3	15.9 $\pm$ 4.0 *	16.5 $\pm$ 1.6 ‡	8.7 $\pm$ 1.3
ISI (M/I*100)	17.8 $\pm$ 5.2	11.1 $\pm$ 3.2	15.0 $\pm$ 1.7 †	8.1 $\pm$ 0.7

Mean $\pm$ SEM. M = rate of glucose infusion. M/I = M value divided by the insulin value during clamp

* p<0.05 control vs diabetes subjects, † p<0.05 lean vs obese diabetes, ‡ p<0.01 lean vs obese diabetes

Obese control and diabetes had pronounced hyperinsulinemia with higher level of fasting c-peptide than lean control and diabetes (0.66 ± 0.20 vs 0.47 ± 0.14 vs 0.27 ± 0.04 vs 0.13 ± 0.03 pmol/l, $p < 0.05$ lean control and lean diabetes), without significant different on fasting insulin. During the hyperglycemic clamp, we obtained the first and second phase insulin and c-peptide secretory response data was shown in Figure 1 and 2. Both phases of insulin and c-peptide were significantly decreased in lean diabetes and significantly increased in obese control subjects. In obese diabetes the first phase response was significantly decreased but the second phase response was somewhat enhanced. Fasting c-peptide had better correlation with first and second phase insulin secretion.

Figure 1

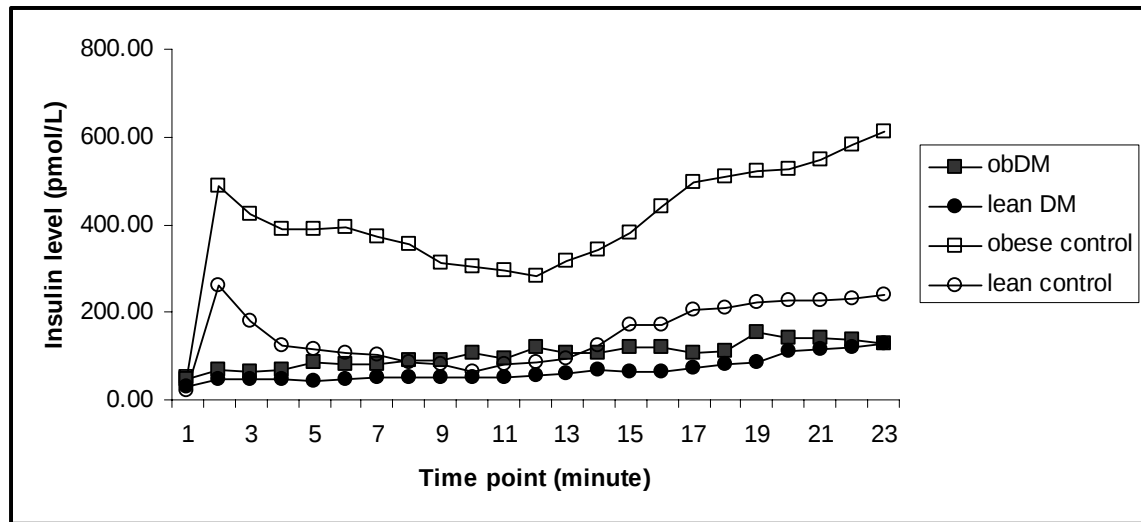


Figure 2

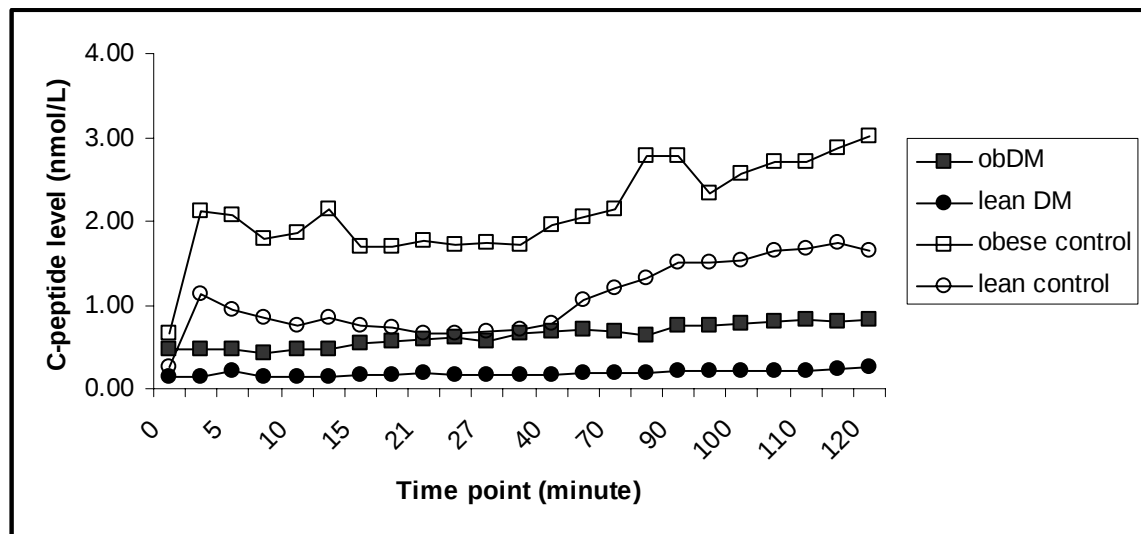


Table 3: hyperglycemic clamp data

	Lean control (n = 4)	Obese control (n = 4)	Lean diabetes (n = 9)	Obese diabetes (n = 10)
FPI (pmol/l)	21.2 ± 6.0	52.1 ± 27.0	29.4 ± 5.4	47.8 ± 8.4
Fasting c-peptide (nmol/l)	0.27 ± 0.04*	0.66 ± 0.20	0.13 ± 0.03 †	0.47 ± 0.14
First phase insulin (pmol/l)	1585.2 ± 221.4‡	3793.8 ± 1887.6*	441.6 ± 90.6	662.4 ± 153.6
Second phase insulin (pmol/l)	2762.7 ± 440.3*	7478.7 ± 3826*	1321.6 ± 272.8	2090.1 ± 478.0

Mean ± SEM. M = rate of glucose infusion. M/I = M value divided by the insulin value during clamp

* p<0.05 control vs diabetes subjects, † p<0.05 lean vs obese diabetes, ‡ p<0.01 control vs diabetes

Discussion

In this study we investigated insulin action with standard techniques, euglycemic clamp for insulin sensitivity and hyperglycemic clamp for insulin secretion. The results have shown the evidentially major defect of insulin resistance in obese diabetes, while the insulin secretion were the primarily defect in lean diabetes. This finding confirmed Arner P and et al found in non-obese diabetic elderly male subjects where peripheral insulin action is normal and the insulin secretory defect is the major cause of disease (11). Lean diabetes had almost the same insulin sensitivity when compared to lean and obese age and sex matched healthy control during the euglycemic clamp study, imply to there was no evidence of peripheral insulin resistance in lean diabetes. Our data concerning insulin resistance in lean diabetes subjects were differ from the previous study from USA., showing significant peripheral insulin resistance in nonobese and moderately obese with non-insulin-dependent diabetes mellitus (12). Waingot A and et al. have found both insulin resistance and decreased insulin response to glucose in lean type 2 diabetics with intravenous administration of glucose study (13).

While previous study from eastern countries, Korean lean elderly diabetes women were studied with oral glucose tolerance test for insulin secretion and sensitivity compared to normal glucose tolerant subjects (4). Lean elderly diabetes women have impaired oral

glucose-induced insulin secretion but have relatively preserved insulin sensitivity with the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR). Insulin resistance is not necessarily an essential component of Korean elderly lean diabetic women.

The obese diabetes had decreased the eu-M value and insulin sensitivity index imply to insulin resistance was the major defect of disease. These data are in consistent with numerous previous investigations (14, 15, 16, 17, 18).

As expected the obese control subjects with normal glucose tolerance had peripheral insulin resistance in combination with a compensatory hyperinsulinemia with high level of fasting c-peptide and first and second phase insulin secretion to keep euglycemic state (19, 20, 21, 22, 23, 24, 25).

This may have impact on National clinical guideline or recommendation in diabetic treatment especially, in lean type 2 diabetes patients who had primary defect on insulin secretion. Insulin secretagogues are the main treatment for the lean diabetes. While insulin sensitizer are the major treatment for the obese diabetes patients. Bring to the notice that the state of the art to treat diabetes patients in lean and obese characteristic should be the first consider and use with the proper treatment for correct the primary pathophysiology in Thai type 2 diabetic patients.

References

1. ADA EASD consensus. *Diabetes Care* 29:1963-1972, 2006
2. Diabetes Atlas 2006. 3rd ed. Produced by the International Diabetes Federation.
3. chinese
4. Kim J, Choi S, Kong B, Oh Y, Shinn S: Insulin secretion and sensitivity during oral glucose tolerance test in Korean lean elderly women. *J Korean Med Sci* 16:592-7, 2001
5. Rawdaree P, Ngarmukos C, Deerochanawong C, Suwanwalaikorn S, Chetthakul T, Krittiyawong S, Benjasuratwong Y, Bunnag P, Kosachunhanun N, Plengvidhya N, Leelawatana R, Prathipanawat T, Likitmaskul S, Mongkolsomlit S. Thailand diabetes registry (TDR) project: clinical status and long term vascular complications in diabetic patients. *J Med Assoc Thai* 89 (Suppl 1):S1-9, 2006
6. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes* 5: 117-269, 1997

7. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 27 (suppl 1): S5-10, 2004
8. DeFronzo R, Tobin J, Andres: Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 232: E214-E223, 1979
9. Deurenberg P, van der Kooy, Leenen R, Weststrate JA, Seidell JC: Sex and age specific prediction formulas for estimating body composition from bioelectrical impedance: a cross validation study. *Int J Obes* 15:17-25, 1990
10. Meneilly GS, Elliott T: Assessment of insulin sensitivity in older adults using the hyperglycemic clamp technique. *J Am Geriatr Soc* 46:88-91, 1998
11. Arner P, Pollare T, Lithell H. Different aetiologies of Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in obese and non-obese subjects. *Diabetologia* 34:483-487, 1991
12. Reaven G, Doberne L, Greenfield M: Comparison of insulin secretion and in vivo insulin action in nonobese and moderately obese individuals with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 31:382-384, 1982
13. Waingot A, Roovete A, Vranić M, Luft R, Efendić S: Insulin resistance and decreased insulin response to glucose in lean type 2 diabetics. *Endocrine Abstracts* 5:89, 2003
14. Meneilly GS, Elliott T: Metabolic alterations in middle-aged and elderly obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22:112-118, 1999
15. Gerich JE. Is insulin resistance the principal cause of type 2 diabetes? *Diabetes Obes Metab* 1:257-263, 1999
16. Ferrannini E, Natali A, Bell P, Cavallo-Perin P, Lalic N, Mingrone G. Insulin resistance and hypersecretion in obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *J Clin Invest* 100:1166-1173, 1997
17. Polonsky KS, Sturis J, Bell GI. Non-insulin-dependent diabetes mellitus - a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *N Engl J Med* 334: 777-783, 1996
18. Weyer C, Hanson RL, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. A high fasting plasma insulin concentration predicts type 2 diabetes independent of insulin resistance. Evidence for a pathogenic role of relative hyperinsulinemia. *Diabetes* 49: 2094-2101, 2000

19. Tripathy D, Carlsson A-L, Lehto M, Isomaa B, Tuomi T, Groop L. Insulin secretion and insulin sensitivity in diabetic subgroups: studies in the prediabetic and diabetic state. *Diabetologia* 43: 1476-1483, 2000
20. Eriksson J, Franssila-Kallunki A, Ekstrand A, Saloranta C, Widen E, Schalin C, Groop L. Early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *New Engl J Med* 321: 337-343, 1989
21. Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn RC. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* 340: 925-929, 1992
22. Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 1988-1992, 1993
23. Cerasi E. Insulin deficiency and insulin resistance in the pathogenesis of NIDDM: is a divorce possible? *Diabetologia* 38: 992-997, 1995
24. Reaven GM, Hollenbeck CB, Chen YDI. Relationship between glucose tolerance, insulin secretion, and insulin action in non-obese individuals with varying degrees of glucose tolerance. *Diabetologia* 32: 52-5, 1989
25. Davies MJ, Metcalfe J, Gray IP, Day JL, Hales CN. Insulin deficiency rather than hyperinsulinaemia in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Med* 10: 305-312, 1993
26. Chen K-W, Boyko EJ, Bergstrom RW, Leonetti DL, Newell-Morris L, Wahl PW, Fujimoto WY. Earlier appearance of impaired insulin secretion than of visceral adiposity in the pathogenesis of NIDDM. 5-year follow-up of initially nondiabetic Japanese-American men. *Diabetes Care* 18: 747-53, 1995

Output ที่ได้จากโครงการ

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

โครงการ: การศึกษาพยาธิสภาพผู้ป่วยเบาหวาน

สัญญาเลขที่ TRG4880007

- 1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ** กำลังอยู่ในระหว่างพิจารณาตอบรับ
- 2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์**

เชิงพาณิชย์ ไม่มี

เชิงนโยบาย การเลือกยาลดระดับน้ำตาลในการรักษาผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ทั้งอ้วนและผอม ควรพิจารณาถึงพยาธิสภาพหลักในผู้ป่วยเป็นสำคัญคือ ถ้าผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 อ้วนมีพยาธิสภาพหลักคือภาวะดื้อต่ออินซูลิน การใช้ยาลดระดับน้ำตาลในเลือดที่มีผลต่อการเพิ่มความไวต่ออินซูลิน จะเป็นการรักษาที่ตรงพยาธิสภาพผู้ป่วย ในขณะที่ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ผอมมีพยาธิสภาพหลักคือ ความบกพร่องในการหลั่งอินซูลิน การใช้ยาลดระดับน้ำตาลในเลือดที่มีผลกระตุ้นเพิ่มการหลั่งอินซูลินจะเป็นการใช้ยารักษาที่ตรงพยาธิสภาพผู้ป่วยที่สุด ซึ่งจะส่งผลเชิงนโยบายต่อคำแนะนำหรือแนวทางเวชปฏิบัติสำหรับโรคเบาหวานในประเทศไทย

เชิงสาธารณะ การเลือกใช้ยารักษาที่ตรงพยาธิสภาพผู้ป่วย จะทำให้ลดความสิ้นเปลืองในการใช้ยาลดระดับน้ำตาลในเลือดที่ไม่จำเป็น ประหยัดค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของประเทศ เป็นข้อมูลสำหรับสร้างมาตรฐานการรักษาที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพกับผู้ป่วยเบาหวานในประเทศไทย ส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลมีความคุ้มค่าสูงสุด และสามารถนำไปใช้ในการกำหนดทิศทางการพัฒนาระบบสาธารณสุขของประเทศต่อไป

เชิงวิชาการ

1. เป็นการสร้างนักวิจัยใหม่ และเป็นพื้นฐานในการทำวิจัยต่อไปในอนาคต
2. จัดทำคู่มือ clamp study สำหรับสถาบันที่สนใจจะทำการวิจัย clamp และคู่มือการใช้เครื่องวัดระดับน้ำตาล “คู่มือการใช้งานเครื่อง Analox GM9” (เอกสารในภาคผนวก)

- 3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ**

นำเสนอในงานประชุมประจำปีสมาคมต่อมไร้ท่อแห่งประเทศไทย 20-21 พฤศจิกายน 2551

ภาคผนวก

คู่มือ Clamp study

ภาวะดื้อต่ออินซูลิน

ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) คือภาวะที่เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์ไขมัน และ ตับ ตอบสนองต่ออินซูลินลดลงซึ่งหน้าที่หลักของอินซูลินที่กล้ามเนื้อและเซลล์ไขมันคือ ความสามารถของอินซูลินในการนำกลูโคสเข้าเซลล์และเปลี่ยนเป็นพลังงานในการดำรงชีวิต แต่ในผู้ที่มีภาวะดื้อต่ออินซูลินความสามารถของอินซูลินในการนำกลูโคสเข้าเซลล์นี้จะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับระดับอินซูลินที่เท่ากันในคนปกติที่ไม่มีประวัติคนในครอบครัวเป็นโรคเบาหวาน ในขณะที่หน้าที่ของอินซูลินที่ตับจะเป็นการควบคุมการสร้างกลูโคสจากตับให้อยู่ในระดับปกติที่ทำให้ค่าน้ำตาลในเลือดก่อนอาหารอยู่ในเกณฑ์ปกติ แต่ในผู้ที่มีภาวะดื้อต่ออินซูลิน ตับจะอยู่เหนือการควบคุมของอินซูลิน จะมีการสร้างกลูโคสจากตับในปริมาณที่มากขึ้น ทำให้สามารถตรวจพบค่าน้ำตาลในเลือดก่อนอาหารเริ่มสูงขึ้น คือมากกว่า 100 มก./ดล. แต่ไม่ถึงระดับที่ให้การวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวานคือต่ำกว่า 126 มก./ดล.

ภาวะดื้อต่ออินซูลิน มีสาเหตุจาก กรรมพันธุ์ มีความผิดปกติในระดับยีน และสาเหตุที่ได้รับมา ซึ่งเป็นสาเหตุที่พบมากขึ้นในปัจจุบัน คือ ภาวะอ้วนที่พบว่าเซลล์ไขมันที่เพิ่มขึ้นมาก และไปจับที่กล้ามเนื้อและตับ ทำให้ไม่ตอบสนองต่ออินซูลิน

นอกจากนี้ภาวะดื้อต่ออินซูลินยังเป็นลักษณะที่สำคัญของโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เพราะเป็นความผิดปกติที่นำมาก่อนการเกิดโรคเบาหวานเป็นเวลานานหลายปี ภาวะดื้อต่ออินซูลินเพียงอย่างเดียวจะไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของระดับน้ำตาลในเลือดตราบเท่าที่ร่างกายสามารถหลั่งอินซูลินได้มากพอ โดยที่มีระดับอินซูลินในเลือดสูงมากกว่าปกติ จนกระทั่งเมื่อตับอ่อนไม่สามารถหลั่งอินซูลินได้เพียงพอ ระดับน้ำตาลในเลือดจะเริ่มสูงขึ้น และให้การวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในที่สุด

นอกจากนี้ในบางโรค ได้แก่ โรคความดันโลหิตสูง โรคไขมันในเลือดผิดปกติ พบว่ามีภาวะดื้อต่ออินซูลินร่วมด้วย จึงเรียกรวมว่า เป็นกลุ่มความผิดปกติทางเมตาบอลิซึม (metabolic syndrome) หรือกลุ่มโรคอ้วนลงพุง ซึ่งภาวะเหล่านี้ล้วนเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดโรคหลอดเลือดแดง โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคหลอดเลือดหัวใจ โรคหลอดเลือดสมอง

เทคนิคและวิธีการ

ในปี 1979 DeFronzo และคณะ ได้ริเริ่มวิธี euglycemic insulin clamp technique เพื่อศึกษาและพัฒนาความรู้ทางด้านพยาธิสภาพโรคเบาหวานอย่างต่อเนื่องและใช้มาจนถึงปัจจุบัน โดยเป็นการศึกษาในภาวะปกติทางสรีรวิทยา ที่มีการควบคุมปัจจัยที่สำคัญคือ อินซูลินและกลูโคส และวัดปริมาณการนำกลูโคสไปใช้โดยเซลล์ทั่วร่างกาย (มักหมายถึงเซลล์กล้ามเนื้อลาย เพราะมีการนำกลูโคสไปใช้มากที่สุด 70-80%) ภายใต้ระดับอินซูลินที่คงที่ แสดงถึงการวัดความไวของเซลล์

ร่างกายในการตอบสนองต่ออินซูลิน ในกรณีที่มีความไวของเซลล์ร่างกายในการตอบสนองต่ออินซูลินลดลง เรียกว่ามีภาวะดื้อต่ออินซูลิน หรือวัดปริมาณอินซูลินที่หลั่งออกมาภายใต้สภาวะน้ำตาลในเลือดที่สูงขึ้นในปริมาณคงที่ (hyperglycemic clamp technique) เพื่อดูการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน

euglycemic insulin clamp technique เป็นวิธีการวัด insulin sensitivity ที่ถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานที่สุดในปัจจุบัน เนื่องจากการควบคุมปัจจัยที่สำคัญในระหว่างการศึกษา กล่าวคือ เป็นการควบคุมระดับอินซูลินให้คงที่เพื่อวัดการตอบสนองของร่างกายต่ออินซูลินในระดับคงที่ โดยให้ระดับน้ำตาลในเลือดอยู่ในระดับที่ clamp คือ หนึ่ง ที่ระดับน้ำตาลขณะอดอาหาร (fasting plasma glucose) ของผู้เข้าร่วมการศึกษา (subject) ซึ่งระดับอินซูลินสามารถควบคุมให้อยู่ได้ 3 ระดับคือ

1. physiologic level $20-40 \mu\text{U}/\text{m}^2$
2. pharmacologic level $80-160 \mu\text{U}/\text{m}^2$
3. suprapharmacologic level $320 \mu\text{U}/\text{m}^2$

มีรายละเอียดการทดสอบดังนี้

ใส่ catheter ในเส้นเลือดของหลังมือข้างหนึ่ง และวางมือ ในกล่องควบคุมอุณหภูมิคงที่ที่ 55°C (hot box) เพื่อให้เส้นเลือดขยายตัวและได้ arterialized blood เพื่อตรวจ plasma glucose ด้วยเครื่อง Beckman glucose analyser ข้างเตียง ตามวิธีมาตรฐาน เก็บเลือด ณ เวลา -5 และ 0 นาที และทุก 5 นาที ตลอดเวลา 120 นาที ที่ทำการทดสอบ

จากนั้นใส่ catheter ในเส้นเลือดของแขนด้านตรงข้าม เพื่อให้ 20% glucose ตลอดเวลา 120 นาที เพื่อควบคุมระดับ plasma glucose ไว้ที่เท่ากับระดับน้ำตาลก่อนอาหาร $\sim 5.0 \text{ mmol/l}$

ที่เวลา 0 นาที เริ่มให้ insulin ด้วยวิธี prime-continuous infusion อัตราคงที่ โดยคำนวณจาก $80 \text{ mU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ body surface area เป็นเวลา 120 min ด้วยเครื่อง infusion pump

ดูดเลือดเก็บ 8 ซีซี ที่ -5, 0 นาที และทุก 15 นาทีในช่วง 90 นาทีแรก และทุก 10 นาที ในช่วง 30 นาทีสุดท้าย เพื่อส่งตรวจ plasma insulin, C-peptide และ FFA concentrations และดูดเลือดเก็บ 1 ซีซี ทุก 5 นาที เพื่อวัดและรักษาระดับ glucose ให้คงที่

Hyperglycemic clamp เป็นการศึกษาที่มีการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้คงที่ โดยการฉีดกลูโคสเข้าทางเส้นเลือดดำ คำนวณปริมาณน้ำตาลที่ให้คือ 0.4 mg/kg และทำการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้คงที่มากกว่าค่าระดับน้ำตาลในเลือดขณะอดอาหาร 125 มก./ดล. ทำการดูดเลือดทุก 2-3 นาทีในช่วง 30 นาทีแรก เพื่อวัดการตอบสนองของตับอ่อนในการหลั่งอินซูลิน ซึ่งในคนปกติจะมีการหลั่งเป็น 2 peaks คือ first phase และ second phase ในขณะที่ผู้ป่วยเบาหวานจะมี blunt of first phase มีรายละเอียดการทดสอบดังนี้

เก็บเลือด ณ เวลา -5 และ 0 นาที จากนั้นฉีด glucose เพื่อเพิ่มค่า plasma glucose มากกว่าน้ำตาลก่อนอาหาร 125 mg/dl โดยคำนวณจากสูตร 0.3g/kg bolus of D50 ที่เวลา 0 นาที และคงระดับ plasma glucose นี้ไว้ด้วยการปรับอัตราการให้ 20% glucose เป็นระยะ เป็นเวลา 120

นาที ในระหว่างนี้ มีการวัดระดับ plasma glucose concentration โดยเครื่อง Beckman glucose analyser ข้างเตียง ดูดเลือดเก็บ 9 ซีซี ทุก 2 นาทีในช่วง 10 นาทีแรก และทุก 3 นาทีในช่วง 20 นาทีถัดไป และทุก 15 นาทีในช่วง 60 นาที และ ทุก 10 นาทีในช่วง 30 นาทีสุดท้ายเพื่อส่งตรวจ plasma glucose, plasma insulin, C-peptide และ FFA concentrations โดยในช่วง 90 นาทีสุดท้ายดูดเลือดเก็บ 1 ซีซี ทุก 5 นาที (ที่ไม่มีการดูดเลือดเก็บ) เพื่อวัดและรักษาระดับ glucose ให้คงที่

ทำการเก็บปัสสาวะก่อนเริ่มและสิ้นสุดการทดสอบ เพื่อวัด urinary glucose loss

ค่าที่วัดได้ เรียกว่า M value, glucose disposal rate, glucose metabolic rate มีหน่วยวัดเป็น mg/kg ซึ่งต่อหน่วยน้ำหนักนี้ อาจใช้เป็นน้ำหนักโดยรวม หรือเป็น lean body mass ซึ่งเป็นอัตราของกล้ามเนื้อในการใช้น้ำตาลเพื่อคงระดับน้ำตาลในเลือดให้คงที่

อุปกรณ์

1. เครื่อง Beckman glucose analyzer
2. กล่องควบคุมอุณหภูมิคงที่ที่ 55°C (hot box)
3. อุปกรณ์และวัสดุทางการแพทย์ที่ใช้ในระหว่างการศึกษา ได้แก่ สายน้ำเกลือ (IV set), intravenous catheter, extension tube, 3 ways, syringe 3-5-10 cc, syringe insulin
4. 20%Dextrose
5. Humulin R
6. 0.9% NaCl 100 และ 500 cc
7. infusion pump

ขั้นตอนการศึกษา

1. เตรียมผู้เข้าร่วมการศึกษา

ผู้เข้าร่วมการศึกษาควรรับประทานอาหารปกติหรือคงที่อย่างน้อย 3 วันก่อนเข้าทำการศึกษา และมีกิจกรรมปกติในชีวิตประจำวัน ควรหลีกเลี่ยงการออกกำลังกายอย่างหนัก ควรงดยาที่จะมีผลต่อความไวต่ออินซูลิน ได้แก่ steroid, beta blocker, diuretic, และควรมีสภาพทั่วไปแข็งแรงดี

2. คินก่อนการศึกษา

ผู้เข้าร่วมการศึกษาต้องงดอาหารและน้ำอย่างน้อย 12 ชั่วโมงก่อนทำการศึกษา เพื่อลดการรบกวนจากอาหาร

3. เข้าวันทำการการศึกษา

ผู้เข้าร่วมการศึกษาควรมีระดับน้ำตาลในเลือดน้อยกว่า 200 มก./ดล. เพื่อลดการรบกวนจากระดับน้ำตาลที่สูง ถ้าจำเป็นจะต้องทำการศึกษาคควรนำผู้เข้าร่วมการศึกษานอนโรงพยาบาลเพื่อลดหรือควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้ได้ตามเกณฑ์

ข้อควรระวัง

ในระหว่างการศึกษา ไม่ควรให้ระดับน้ำตาลในเลือดต่ำกว่า 60 มก./ดล. เพราะจะเป็นระดับน้ำตาลในเลือดที่ต่ำและมีการกระตุ้นฮอร์โมนในร่างกายเพื่อเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด ได้แก่ cortisol, glucagons ซึ่งฮอร์โมนเหล่านี้จะทำให้เกิด insulin resistance และมีผลต่อการวัดระดับ insulin sensitivity ที่ต้องการจะศึกษาได้

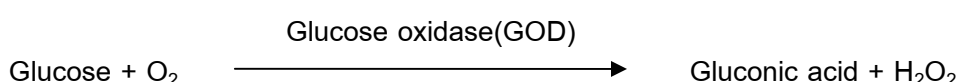
ข้อจำกัด

1. ไม่มี steady state ที่แท้จริง เพราะการตอบสนองของร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่กล้ามเนื้อ ซึ่งถือว่าเป็นอวัยวะในการออกฤทธิ์ของอินซูลิน 70-80% ในการออกฤทธิ์ของอินซูลิน ผ่าน insulin signaling pathway จะใช้เวลาในการกระตุ้นผ่าน ซึ่งกระบวนการนี้อาจเกิดหมุนเวียนสลับกันไป
2. เป็นวิธีหนึ่งในการศึกษาความไวต่ออินซูลินที่ใช้ทั้งแรงงาน เป็นทีม ได้แก่ แพทย์ผู้ทำการศึกษา ผู้ที่จะควบคุมเครื่องวัดระดับน้ำตาลในเลือด พยาบาล ทั้งหมดอย่างน้อย 2-3 คน ใช้เวลาและเครื่องมืออุปกรณ์ ซึ่งจัดให้เป็น special dynamic endocrine function test ได้ แต่ยังไม่มีการใช้ในเวชปฏิบัติทั่วไป มักเป็นเพียงวิธีใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น

คู่มือการใช้งานเครื่อง Analox GM9

หลักการวิเคราะห์

ตรวจวัดปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไปในปฏิกิริยาระหว่างสารละลายกลูโคสในตัวอย่างกับ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเกิดเป็นสารประกอบกลูโคนิก แอซิด และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังปฏิกิริยา

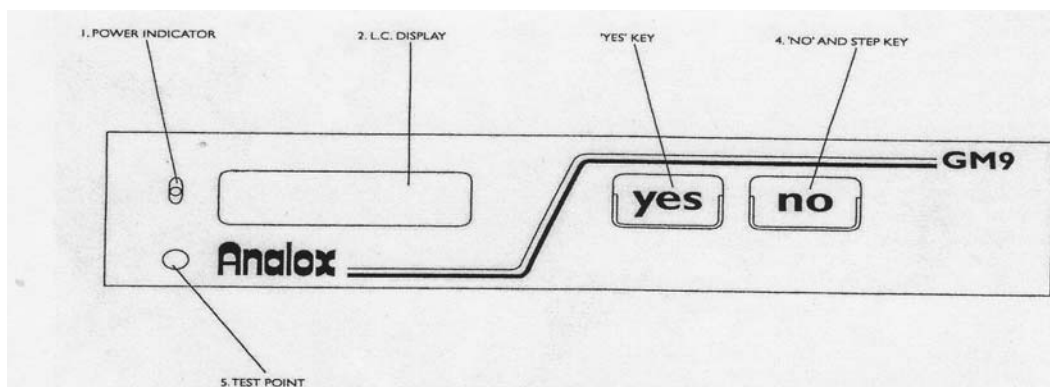


โดยปริมาณของออกซิเจนที่ใช้ไปในปฏิกิริยามีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสในตัวอย่าง

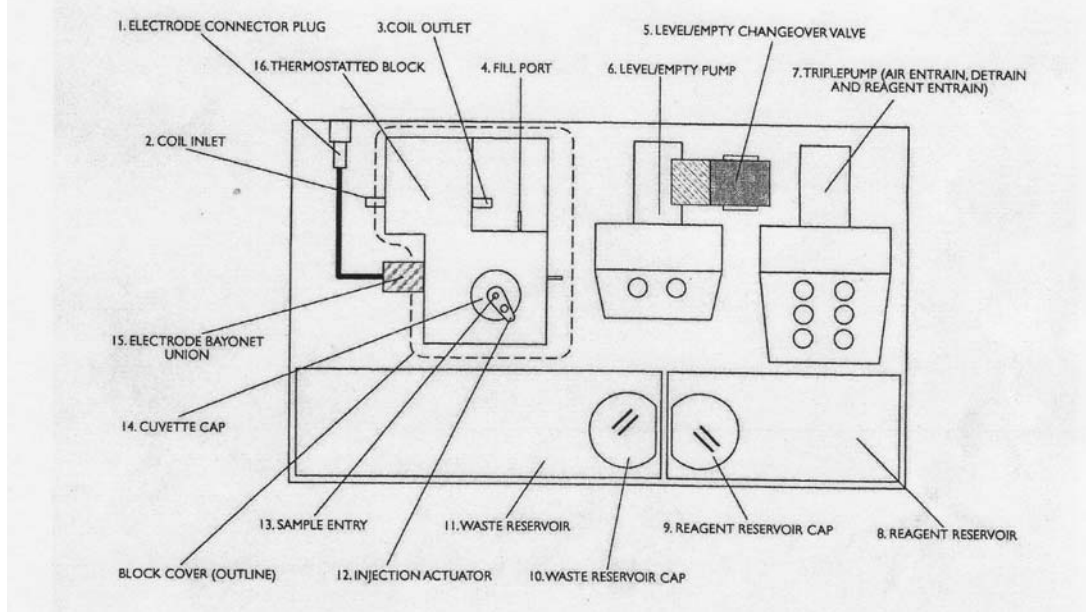
หลักการทำงานของเครื่อง Analox GM9

เครื่อง Analox GM 9 เป็นเครื่องตรวจวิเคราะห์น้ำตาลกึ่งอัตโนมัติชนิดเคลื่อนที่ได้(Portable glucose analyzer) ระบบการทำงานของเครื่องเป็นแบบการตรวจภาชนะนำกระแสของสารละลาย (Conductivity) ที่ขั้ว electrode ใช้เทคนิค Enzymatic oxygen rate ดังสมการข้างต้น อัตราเร็วในการอ่านผล 20 วินาทีต่อตัวอย่าง มีลักษณะการทำงานคือ เมื่อเครื่องพร้อมใช้งาน ดูดตัวอย่างพลาสมา ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ด้วยปิเปตชนิด positive displacement pipette ใส่ลงในเครื่อง เครื่องจะทำงานด้วยระบบ sensor ที่เรียกว่า Clark- type amperometric oxygen electrode บันทึกค่าที่อ่านได้บนแถบกระดาษอัตโนมัติภายใน 20 วินาที หรือสามารถใช้อุปกรณ์เสริม RS 232 port เพื่อบันทึกผ่านเครื่องคอมพิวเตอร์ก็ได้ เครื่อง Analox GM 9 สามารถตรวจวัดระดับกลูโคสได้ในตัวอย่างที่เป็นเลือดรวม (Whole blood), ซีรัม และพลาสมา นอกจากนี้ยังสามารถตรวจวัดในปัสสาวะได้ด้วย

การทำงานของเครื่องอาศัยการควบคุมด้วย Microprocessor โดยการกดปุ่มควบคุม YES/NO บนหน้าปัดซึ่งจะปรากฏเมนูคำสั่งให้เห็น ดังรูปที่ 3 ระบบการทำงานประกอบด้วย thermostat block(16) ที่ต่อเชื่อมกับ reaction chamber หรือ cuvette (ใต้ under cuvette cap 14) Oxygen electrode (15) อยู่ด้านซ้ายของ block ซึ่งถูกหุ้มด้วย bayonet union และต่อเชื่อมกับกระแสไฟฟ้าทาง Electronic circuitry plug(1) ในช่อง cuvette ด้านล่างจะถูกปิดด้วย removable cuvette cap(14) ซึ่งมีตัวยึด Hold Actuator(12) ติดอยู่ ภายในมี magnetic stirrer ตัวจิ๋ว ไวไฟสมตัวอย่างและมีมอเตอร์คอยควบคุมการหมุนอยู่ด้านใต้ของ block ภายใต้ block จะมี glass coil (2 และ 3) เพื่อคอยปรับสมดุลของสารละลายกับอากาศให้อยู่ที่อุณหภูมิของเครื่องในขณะที่ทำงานก่อนที่จะเข้าสู่ cuvette มีฉนวนพลาสติก(เส้นประ) ป้องกันความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นกับ block ตามภาพ pump(6) จะขับของเหลวออกจนหมด เพื่อส่งไปยัง cuvette โดยผ่าน valve(5) Pump(7) ประกอบด้วย สายส่งของเหลว 3 สาย ส่งไปยัง cuvette โดยผสมอากาศเข้าออกตามลำดับ ภาชนะบรรจุน้ำยา(8) และภาชนะจัดเก็บน้ำยาที่ใช้แล้ว (waste, 11) ถูกจัดวางอยู่ด้านหน้าของเครื่อง ดังรูปที่4

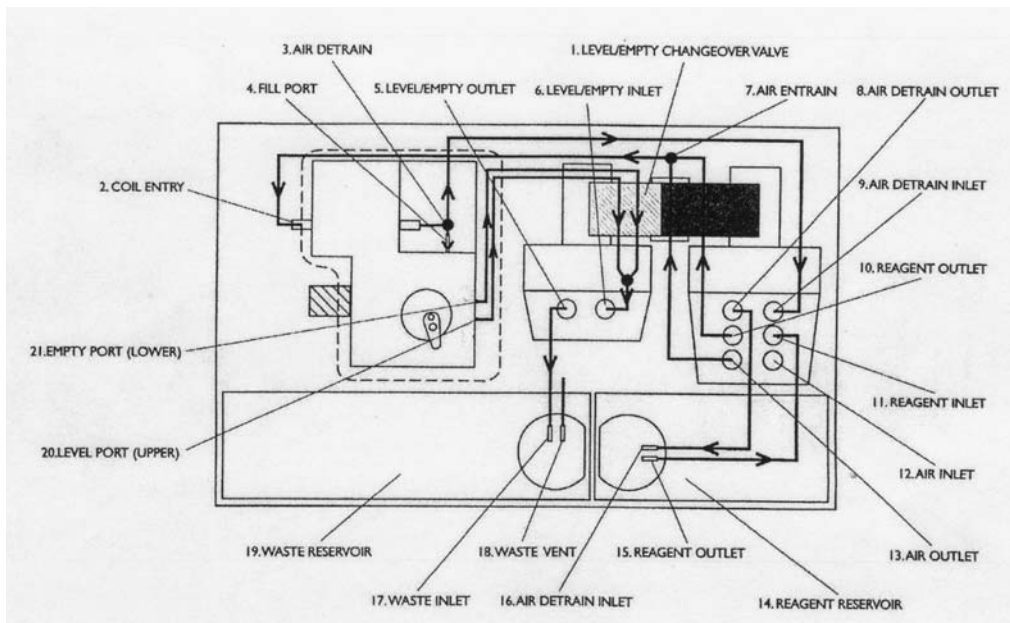


รูปที่ 3 แผงหน้าปัดควบคุม



รูปที่ 4 Thermostatted reaction system, pumps and reservoirs

การทำงานของ Fluid system ดังรูปที่ 5 เริ่มต้นโดย น้ำยาจากภาชนะบรรจุถูกขับผ่าน reagent pump inlet(11) และ outlet(10) ไปยัง air-entrain junction(7) อากาศถูกขับผ่าน inlet(12) และ outlet(13) ไปยัง junction(17) ซึ่งต่อเชื่อมกับน้ำยา การไหลของน้ำยา อากาศบางส่วนผ่านไป ยัง thermostat coil entry(2) เมื่อผ่านพัน coil อากาศจะถูกกักไว้ที่ junction(3) ปลดปล่อยให้น้ำยา เท่านั้นผ่านเข้าไปยัง cuvette ทาง fill port (4) junction(3) และ สายส่งต่างๆ ทั้งหมดจะถูกควบคุม อย่างมีประสิทธิภาพโดย thermostatted system ปริมาตรของของเหลว จะถูกส่งผ่านให้มากกว่า เล็กน้อย จากนั้นจะถูกกำจัดส่วนเกินทาง level port(21) ไปสู่ level/empty pump inlet(6) และ Outlet (5) แล้วปล่อยสู่ waste อากาศและน้ำยาที่ถูกกักไว้ถูกดึงกลับที่ junction(3) ผ่าน detrained pump inlet(9) และ outlet(8) เมื่อผ่านสู่ภาชนะบรรจุน้ำยาโดย outlet(16) ภายหลังปฏิกิริยาดำเนิน ไปพร้อมๆ กับการทำงานของ pump ใช้เวลาประมาณ 8 วินาที และขับน้ำยาออกจาก cuvette ผ่าน ทาง Port(20) สู่ empty pump(6) และ outlet(5) ไปยัง waste และเมื่อ empty pump หยุด triple pump เริ่มทำงาน changeover valve เริ่มเปิดให้น้ำยาเข้าสู่ระบบอีกครั้ง การทำงานของ triple pump ใช้เวลา 16 วินาที การทำงานของ level pump ใช้เวลา 21วินาที



รูปที่ 5 Fluid system

การทำงานของ PO2 electrode

PO2 electrode เป็นชนิด combined platinum and silver polarographic electrode ที่ ห่อหุ้มด้วยหลอดแก้วซึ่งบรรจุ phosphate buffer และ potassium chloride ไว้ภายใน และด้านนอก หุ้มด้วย เมมเบรนที่เป็น polypropylene หนา 20 ไมครอน มีลักษณะการทำงานคือ เมื่อกระแส 630 mV ผ่านสู่ platinum cathode จะไปทำให้ PO2 electrode ลดการนำออกซิเจนไปยังขั้ว cathode เมื่อใช้ไปนานวันเข้า ประสิทธิภาพการนำกระแสของ PO2 จะลดลง ดังนั้นเมื่อใดที่ electrode output สูงขึ้น (อ่านได้จากเมนูบนหน้าจอ) ต้องทำการเปลี่ยน membrane ก่อนทำการเปลี่ยน membrane ทุกครั้งต้องแน่ใจว่า cuvette ต้องไม่มีของเหลวบรรจุอยู่ (empty mode) วิธีการก็คือ หน้าเมนู เลือก EMPTY โดยใช้แป้น NO หรือ YES ซึ่งใช้เวลาให้ของเหลวไหลออก 8 วินาที โดย

หยุดการทำงานของ stirrer ภายในด้วย ถ้าหากไม่น้ำของเหลวออกจาก cuvette อาจทำความเสียหายให้กับ electrode components ได้ ภายหลังจากนำ electrode ใส่กลับคืนใน cuvette แล้ว กดเป็น YES จากหน้าจอ CYCLES? เพื่อเติมของเหลวกลับเข้าสู่ระบบอีกครั้ง

ข้อความที่แสดงบนจอเครื่อง ความหายและการปฏิบัติเมื่อเปิดเครื่อง

การปฏิบัติ	ข้อความ	ความหมาย
เปิดเครื่อง	Checking temperature glucose low temp mmol	อุณหภูมิขณะนั้นต่ำ ควรอุ่นเครื่อง ราว 10 – 20 นาที
	Glucose cycling cycle 1 - 4 mmol	เมื่อเครื่องพร้อมใช้งาน จะป้อน น้ำยาเข้าสู่ระบบ 4 รอบ
	Glucose uncal nn.n mmol	เตือนเพื่อทำการ Calibrate
เลือก Calibrate	Inject standard 8.0 STD nn.n mmol	
Inject 10 µl 8.0 mmol/L Glucose standard	Glucose reaction nn.n mmol	nn.n เปลี่ยนค่าสูงขึ้นจนถึง 8.0
	Repeat cal? 8.0 mmol	ต้องการที่จะทำซ้ำหรือไม่
Press YES	Wait to finish cycling	ถ้าเลือก yes เครื่องป้อนน้ำยาเข้า ระบบ
	Inject 8.0 STD 0.0 mmol	Inject standard เมื่อเครื่องแสดง 0.0
Inject 10 µl 8.0 mmol/L Glucose standard	Glucose reaction 0.0 mmol	ค่าจะแสดง 8.0 และพิมพ์
	Repeat CAL? 8.0 mmol	
Press No	Glucose cycling 8.0 mmol	มีข้อความแสดงว่ากำลังป้อนน้ำยา
	Glucose ready 0.0 mmol	เมื่อเครื่องพร้อม inject ตัวอย่าง
	Check Calb? YES/NO	หากทั้งเครื่องไว้ >1 ช.ม. ให้กด yes เครื่องจะป้อนน้ำยา 1 รอบ กด no เครื่องจะกลับสู่โหมด ready
Press No	Standby, continue?	กด NO เมื่อต้องการออกจาก โหมด Standby หน้าจอแสดงเมื่อ เครื่องไม่ถูกใช้งานนานกว่า 5 ช.ม.
	Glucose cycling Cycle 1 mmol	กำลังป้อนน้ำยา
Press YES	Glucose press YES to calibrate	

รายการการทำงานต่าง ๆ ที่แสดงบนจอเครื่อง ความหมายและการปฏิบัติ

การปฏิบัติ	ข้อความ	ความหมาย
	Glucose ready 0.0 mmol	
Press NO 1	Calibrate? YES/NO	กด YES เริ่มการ Calibrate
Press NO 2	Cycle? YES/NO	กด YES แสดงให้เลือก 1,2,4 หรือ 6 รอบของการป้อนน้ำยา
Press NO 3	ID ON/OFF YES/NO	กด YES บอกให้เครื่องพิมพ์ชื่อและหมายเลขของแต่ละตัวอย่าง
Press NO 4	Print time/date YES/NO	กด YES ตั้งเวลาและวันที่ กด NO ไม่เลือก
Press NO 5	Electrode O/P YES/NO	กด YES แสดง Electrode output และพิมพ์ทางเครื่องพิมพ์ กด NO ไม่เลือก
Press NO 6	Index reset YES/NO	กด YES เครื่องพิมพ์อ่านค่าเริ่มต้น
Press NO 7	Standby? YES/NO	กด YES ยอมให้เครื่อง Standby กด NO เครื่องพร้อมทำงาน
Press NO 8	Empty? YES/NO	กด YES เมื่อต้องการหยุดการทำงานของ stirrer และ cuvette
Press NO 9	Units conv YES/NO	กด YES เลือกหน่วยแสดงผล
Press NO 10	Set Cal Value? YES/NO	กด YES เพื่อเปลี่ยนค่ามาตรฐานตามต้องการ (กด YES เลื่อนหลัก กด NO เปลี่ยนตัวเลข)
Press NO 11	Set RS232 YES/NO	กด YES เพื่อเลือกค่า 300, ODD หรือ OFF กด NO ไม่เลือก
Press NO 12	Set time/date YES/NO	กด YES เลือกวันที่ และเวลา
Press NO 13	STATS YES/NO	กด YES เริ่มใช้สถิติ กด NO เพื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยเครื่องแสดง analyse stats, YES/NO กด YES
	Glucose ready 0.0 mmol	

รายการการทำงานเฉพาะที่แสดงบนจอเครื่อง ความหมายและการปฏิบัติที่เกิดขึ้นและไม่สามารถกดเป็น NO

	Check cal? YES/NO	จะปรากฏเมื่อใช้งาน > 60 นาทีและควรทำการ calibrate ใหม่
	Fluid level Fault cancel?	แสดงเตือนว่าไม่มีของเหลวผ่านเข้าสู่ level port เมื่อจบ cycle หรือเมื่อป้อนล้ากลืนเข้าสู่ระบบ กด YES เพื่อกลับสู่การทำงานปกติ และตรวจสอบสาเหตุ

ขั้นตอนการวิเคราะห์

สำหรับห้องปฏิบัติการ

1. การเตรียมวัสดุและอุปกรณ์การตรวจวัด

การเตรียมน้ำยา น้ำยาจากผู้ผลิตบรรจุขวดละ 250 มิลลิลิตร ก่อนใช้ควรนำน้ำยามาไว้ที่อุณหภูมิห้อง น้ำยามีอายุใช้งานนาน 15 เดือนเมื่อเก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส หรือ 3 เดือนที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมปิเปต ทองผู้ผลิตได้เตรียมปิเปต ยี่ห้อ Gilson ขนาด 10 ไมโครลิตร ชนิด positive displacement โดยมีลักษณะพิเศษที่ปลายหลอดทำด้วยพลาสติกสวมด้วย adaptor ที่ถอดเข้าออกได้ซึ่งสามารถตะได้พอดีกับช่องหยอดสารตัวอย่าง และส่งสัญญาณให้เครื่องทราบว่าเริ่มการหยด ตัวอย่าง ระยะห่างจากตัว adaptor ถึงปลายปิเปตเท่ากับ 24 มิลลิเมตร ส่วนปลายหลอดปิเปต แกนพลาสติก (piston) และ adaptor สามารถถอดล้างทำความสะอาด และนำกลับมาใช้ซ้ำได้

การเตรียมน้ำยามาตรฐาน (Standard solution) น้ำยาจากผู้ผลิตมีความเข้มข้นเท่ากับ 8.0 มิลลิโมลต่อลิตร ควรแบ่งเตรียมสำหรับใช้งาน (Working standard solution) โดยแบ่งใส่หลอดบรรจุขนาดเล็กแยกต่างหากจาก Stock standard

2. การเตรียมตัวอย่างตรวจ

สำหรับพลาสมา ควรใช้ Fluoride heparin หรือ Fluoride oxalate เป็นสารกันเลือดแข็ง แม้ว่าสาร Heparin และ EDTA สามารถใช้ได้แต่กลูโคสบางส่วนอาจถูกใช้ไปในกระบวนการของเม็ดเลือดแดง เนื่องจากเครื่องตรวจ Analox สามารถตรวจเลือดในปริมาณน้อย คือ 10 ไมโครลิตร และการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำอาจสิ้นเปลือง จึงนิยมที่จะเก็บเลือดใน Heparinized Micro-hematocrit tubes นำมาปั่นแล้วเก็บหยดพลาสมาที่ปลายด้านหนึ่งมาตรวจหา กลูโคส ในบางการศึกษาอาจต้องเตรียมหลอดเก็บเลือดเอง เนื่องจากความถี่ของการเจาะเลือดสูง จึงต้องทำการปรับปริมาตรเลือดให้เหมาะสมต่อการเก็บเลือดแต่ละครั้ง อย่างไรก็ตามที่ควรที่จะรักษาตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิต่ำๆ เพื่อไม่ให้เกิดขบวนการดังกล่าว

สำหรับเลือดรวม (whole blood) ควรเก็บตัวอย่างเลือดในหลอดเก็บเลือดชนิดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด heparin, fluoride และ nitrite ผสมรวมกัน และเตรียมสำเร็จรูปจากบริษัทผู้ผลิต (Analox capillary tubes, code GMRD-053/054) โดยให้มีปริมาตรเลือดประมาณ 50 ไมโครลิตร (กะประมาณครึ่งหลอดด้วยสายตา) ผสมเลือดโดยกลับหลอดไปมา เลือดจะมีสีเข้มขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อย ทิ้งไว้อย่างน้อย 3 นาทีก่อนทำการวิเคราะห์ โดยทั่วไปค่ากลูโคสที่ได้ต่ำกว่าค่าที่ได้จากพลาสมาประมาณ 7-28%

สำหรับปัสสาวะ โดยมากจะเป็นตัวอย่างปัสสาวะจากผู้ป่วยที่มีภาวะ glycouria ซึ่งมีค่ากลูโคสค่อนข้างสูง ต้องทำการปั่นเพื่อขจัดตะกอนที่อยู่ในตัวอย่างและควรทำการเจือจางปัสสาวะก่อนทำการวิเคราะห์

สำหรับสิ่งส่งตรวจอื่นๆ เช่น น้ำจากไขสันหลัง (CSF) น้ำลายหรือของเหลวชนิดอื่น ควรทำการปั่นขจัดตะกอนที่ปนมากับตัวอย่างก่อนเสมอ

3. การทำ Calibration

ใช้น้ำยามาตรฐานกลูโคส 8.0 มิลลิโมลต่อลิตรในสารละลายอิ่มตัวของ benzoic acid เป็นค่ามาตรฐาน ปริมาตรเลือดที่ใช้เท่ากับ 10 ไมโครลิตร จะให้ค่าที่ที่ยังคงอยู่บนเส้นตรงของกราฟมาตรฐานถึง 30.0 มิลลิโมลต่อลิตร

4. การ set up เครื่อง

นำน้ำยากลูโคสใส่ในภาชนะบรรจุน้ำยาที่ตัวเครื่อง (reagent reservoir) โดยน้ำยาควรตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและเขย่าผสมให้เข้ากันดีก่อนใช้ เพื่อให้การทำ calibration มีความแม่นยำมากขึ้น

เสียบปลั๊ก เปิดเครื่อง เครื่องจะแสดง “low temp” เมื่ออุณหภูมิของเครื่องพร้อมทำงาน เครื่องจะทำการป้อนน้ำยาอัตโนมัติ 4 รอบ ในขณะที่เครื่องทำการป้อนน้ำยาให้เปิดฝาครอบขึ้น เพื่อดูการไหลเวียนของน้ำยาจากสายต่างๆ ตรวจสอบ pumps ต่างๆ ว่าทำงานได้อย่างถูกต้อง

ตรวจสอบการไหลของน้ำยา โดยน้ำยาจะผ่านสาย reagent line ของ triple pump (central position, รูปที่ 5, 10) และส่งผ่านไปยัง Air entrain junction (รูปที่ 5, 7) ซึ่งจะเติม air เข้ามาตามสภาวะปกติ

เลือก “CYCLE” โดยกดปุ่ม NO หรือ YES บนแผงหน้าปัด เลือก 1 ในขณะที่ ‘empty’ phase จะสังเกตเห็นมีของเหลว วิ่งไปมาจาก empty port (รูปที่ 5, 21) ที่ด้านล่างขวาข้างๆ กับ cuvette block

ในขณะที่ fill pump กำลังทำงาน จะสังเกตเห็นของเหลวผสมกับอากาศวิ่งผ่านจากด้านซ้ายของ cuvette block (รูปที่ 5, 2) และไหลผ่านสายออกจาก block ทางด้านหลัง

เมื่อ fill pump หยุด level pump ยังคงทำงานต่อไปอีกราว 4 วินาที ซึ่งในเวลานี้จะสังเกตเห็นว่ามีของเหลวปริมาณเล็กน้อยไหลผ่านสายจาก cuvette level port (รูปที่ 5, 20) ถ้าหากไม่เห็นหมายถึงการเติมของเหลวใน cuvette อาจไม่เพียงพอ

ให้ถอด cuvette cap และ actuator ออก ส่องไฟฉายผ่านจะสังเกตเห็น stirrer (magnetic follower) หมุนอยู่ในส่วนล่างของ cuvette และหมุนต่อเนื่อง หากพบว่ามี การหมุนผิดปกติอาจมีสาเหตุจากมีสกปรก เช่น debris, clot, hairs หรืออื่นๆ ตกค้างอยู่ ให้สังเกตดูการหมุนของ stirrer เท่านั้น ไม่จำเป็นต้องเปิดดูตัวหมุนที่อยู่ใต้ cuvette ทำการเก็บ cuvette cap และ actuator เข้าที่เดิม

สามารถที่จะตั้ง “Standby” เมื่อไม่ต้องการใช้งาน และถ้ายังไม่ใช้งานเกินกว่า 2 ชั่วโมง เครื่องจะเปลี่ยนเป็นโหมด Standby โดยอัตโนมัติ

5. วิธีการวิเคราะห์

เริ่มทำการตรวจวิเคราะห์ โดยเปิดสวิตช์ บนหน้าจอก็จะปรากฏ checking temperature glucose low temp เครื่องจะใช้เวลาอุ่นเครื่องประมาณ 10-20 นาที ขึ้นกับสภาพอากาศในขณะปฏิบัติงาน

กดเมนู calibrate เพื่อวัดค่า standard โดยตั้งค่าไว้ที่ 8.0 มิลลิโมลต่อลิตร เครื่องจะทำงานโดยอัตโนมัติ และแสดงผลที่อ่านได้ และจะแสดงคำถาม accept cal? ให้กดแป้น YES หากไม่ยอมรับให้กดแป้น NO เครื่องจะถามต่อว่า repeat cal? ให้กดแป้น YES ทำการ inject ใหม่อีกครั้ง

แบ่ง working standard solution แยกจาก stock ในหลอดแบ่งเล็ก เพื่อใช้งานประจำวัน และเก็บไว้ที่ตู้เย็น

Inject standard 10 ไมโครลิตร โดยจุ่มปิเปตลงในเครื่องและกดปล่อยของเหลวขณะเดียวกับที่ adaptor สัมผัสกับ microswitch ค้างไว้ประมาณ 3 วินาทีก่อนดึงปิเปตกลับ อย่าลืมว่า ยังคงค้างการกดปล่อยของเหลวขณะดึงปิเปตกลับ นำปิเปตจุ่มลงในถ้วยล้างหมายเลข 1 กดปล่อยเพื่อล้าง 2-3 ครั้ง และจุ่มปิเปตลงในถ้วยล้างหมายเลข 2 ทำเช่นเดียวกัน ซับด้วยกระดาษซับ

Inject ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร อ่านผลได้ทันที ทำการล้างปิเปตตามข้อ 5.4

วัดค่า standard ทุกๆ ครั้งของการตรวจวิเคราะห์ 10 ตัวอย่าง เพื่อรักษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ ถ้าหากค่าที่วัดได้มีค่าเกินกว่า 30.0 มิลลิโมลต่อลิตร ควรลดปริมาณตัวอย่างลงเหลือ 5 ไมโครลิตร แล้วคูณค่าด้วย 2

ข้อควรระมัดระวัง

การทำงานของเครื่องเป็นแบบ Microprocessor control ดังนั้นผู้ปฏิบัติจึงต้องใช้คำสั่งจากแป้นควบคุม YES/NO ในการดำเนินงานในขั้นตอนการทำงานของเครื่องซึ่งปรากฏบนแผงหน้าปัดเท่านั้น

เอกสารอ้างอิง

1. DeFronzo RA. Tobin JD. and Andres R: Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. Am. J. Physiol. 237:E214-73, 1979.
2. Analox instruments GM9 analyser operation & maintenance manual version 4.01, London UK.