

บทนำ

เบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่เกิดขึ้นเนื่องจากความผิดปกติของอินซูลิน (insulin) ทำให้ร่างกายมีเมแทบอลิซึม (metabolism) ผิดปกติทั้งในส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน เป็นโรคที่พบได้ทั่วโลก และมีแนวโน้มว่ามีอุบัติการณ์สูงขึ้น¹ สาเหตุการตายของผู้ป่วยมักเกิดจากภาวะแทรกซ้อน ซึ่งมีทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง พยาธิภาวะที่หลอดเลือด (angiopathy) เป็นภาวะแทรกซ้อนเรื้อรังที่สำคัญอย่างหนึ่ง อาจเกิดกับหลอดเลือดขนาดใหญ่ (macroangiopathy) หรือหลอดเลือดขนาดเล็ก เช่นหลอดเลือดฝอย (microangiopathy) ซึ่งในปัจจุบันยังไม่ทราบพยาธิกำเนิดที่แน่นอน แต่พบว่าเกิดจากปัจจัยหลายอย่าง (multifactorial) พบว่าการเสียสมดุลของกระบวนการห้ามเลือด (haemostatic balance) เป็นปัจจัยร่วมอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิด² โดยมีรายงานว่าพบภาวะที่มีการแข็งตัวของเลือดมากผิดปกติ (hypercoagulable state) ในผู้ป่วยเบาหวาน กล่าวคือ มีระดับของไฟบริโนเจน แฟกเตอร์ VIII vonWillebrand factor (vWF) และแฟกเตอร์ VII สูงกว่าปกติ³⁻⁵ เกล็ดเลือดมีการสร้าง prostaglandins และ/หรือมีการเกาะกลุ่มมากผิดปกติ^{6,7} แอ็กติวิตี (activity) ของแอนติทროมบิน III (antithrombin III; AT III) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการแข็งตัวของเลือดที่สำคัญของร่างกายต่ำกว่าปกติ⁸ นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับโปรตีนซี (protein C) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการแข็งตัวของเลือดอีกชนิดหนึ่ง ว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปเช่นเดียวกัน แต่ผลยังสรุปไม่ได้แน่นอนว่าเปลี่ยนแปลงไปอย่างไร กล่าวคือ Viganò และคณะ⁹ ศึกษาเกี่ยวกับปริมาณของโปรตีนซี ในผู้ป่วยเบาหวาน โดยตรวจวัดโปรตีนซีแอนติเจน ด้วยวิธี electroimmunoassay พบว่าโปรตีนซีแอนติเจนในผู้ป่วยทั้งกลุ่มที่มีและไม่มีพยาธิภาวะที่หลอดเลือดร่วมด้วย จะมีระดับสูงกว่าปกติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งคาดว่าอาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิภาวะที่หลอดเลือดของผู้ป่วย แต่ยังไม่สามารถอธิบายกลไกการเกิดได้ ส่วน Biondi และคณะ¹⁰ ศึกษาเกี่ยวกับแอ็กติวิตีของโปรตีนซี พบว่าแอ็กติวิตีในผู้ป่วยเบาหวานไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่าแอ็กติวิตีในกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานชนิด insulin dependent จะมีแนวโน้มสูงกว่าปกติ ซึ่งผลการศึกษาที่กล่าวมาแล้วไม่สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Vukovich และคณะ¹¹ และ Ceriello และคณะ¹² ที่พบว่าปริมาณและแอ็กติวิตีของโปรตีนซีในผู้ป่วยเบาหวานจะต่ำกว่าปกติ โดย Vukovich และคณะ ได้ตรวจวัดปริมาณของโปรตีนซีแอนติเจน ด้วยวิธี ELISA สำหรับ Ceriello และคณะ ได้ตรวจวัดทั้งปริมาณแอนติเจนและแอ็กติวิตีของโปรตีนซี โดยตรวจวัดโปรตีนซีแอนติเจนด้วยวิธี ELISA และตรวจวัดแอ็กติวิตีของโปรตีนซีโดยใช้สารที่สกัดได้จากพิษงู *Agkistrodon contortrix* เป็นตัวกระตุ้นโปรตีนซี ผลการศึกษาที่ไม่สอดคล้องกันเหล่านี้อาจเกิดจากวิธีการที่ใช้ในการตรวจวัดแตกต่างกัน รวมทั้งกลุ่มผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษาก็แตกต่างกัน ดังนั้นในการวิจัยครั้งจึงได้ศึกษาโปรตีนซีในผู้ป่วยเบาหวานโดยตรวจวัดปริมาณแอนติเจนของโปรตีนซีด้วยวิธี ELISA ซึ่งมีความไวมากกว่า วิธี electroimmunoassay และวัดแอ็กติวิตีของโปรตีนซีโดยใช้ซับสเตรตสังเคราะห์ (chromogenic substrate) หลังจากกระตุ้นโปรตีนซีด้วยสารที่สกัดได้จากพิษงู *Agkistrodon contortrix* แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้ระหว่างกลุ่ม

ผู้ป่วยเบาหวานที่มีและไม่มีพยาธิภาวะที่หลอดเลือด และกลุ่มคนปกติ ซึ่งผลที่ได้อาจใช้เป็นข้อมูล
พื้นฐานในการศึกษาพยาธิกำเนิดของการเกิดพยาธิภาวะที่หลอดเลือดในระดับลึกต่อไป

วัตถุประสงค์

ศึกษาปริมาณแอนติเจนและแอนติบอดีของโปรตีนซีในผู้ป่วยเบาหวานที่มีและไม่มีพยาธิ
ภาวะที่หลอดเลือดร่วมด้วยเปรียบเทียบกับคนปกติ

วิธีการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่าง แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ผู้ป่วยเบาหวานและคนปกติ

1.1 ผู้ป่วยเบาหวาน ได้แก่ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นเบาหวานตามหลักเกณฑ์ของ National Diabetes Data Group¹³ ในการวิจัยนี้แพทย์เป็นผู้คัดเลือกผู้ป่วย จำนวน 30 ราย เป็นผู้ป่วยที่ไม่มีพยาธิภาวะที่หลอดเลือด ซึ่งได้แก่ retinopathy 15 ราย เป็นผู้ชาย 5 ราย และผู้หญิง 10 ราย และมี retinopathy ร่วมด้วย จำนวน 15 ราย เป็นผู้ชาย 1 ราย และผู้หญิง 14 ราย โดยผู้ป่วยทั้ง 30 ราย จะได้รับการตรวจตา (funduscopy) โดยจักษุแพทย์ เพื่อวินิจฉัยภาวะ retinopathy นอกจากนี้ผู้ป่วยเหล่านี้จะต้องไม่มีโรคตับหรือภาวะไตล้มเหลวร่วมด้วย โดยแพทย์จะเป็นผู้วินิจฉัยจากอาการทางคลินิกและการตรวจร่างกาย แล้วส่งตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันการวินิจฉัย

1.2 คนปกติ ได้แก่ ผู้ที่มารับบริการตรวจสุขภาพประจำปีที่สถานบริการคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 15 ราย เป็นผู้ชาย 6 ราย และผู้หญิง 9 ราย ซึ่งได้รับการตรวจร่างกายจากแพทย์ว่ามีร่างกายสมบูรณ์ และสุขภาพแข็งแรง และยืนยันด้วยผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

กลุ่มผู้ป่วยเบาหวานและคนปกติมีอายุเฉลี่ยอยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน โดยอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยเบาหวานที่ไม่มี retinopathy เท่ากับ 53.3 ปี ($\bar{X} \pm SD = 53.3 \pm 7.6$) ผู้ป่วยที่มี retinopathy เท่ากับ 59.1 ปี ($\bar{X} \pm SD = 59.1 \pm 11.8$) และกลุ่มคนปกติเท่ากับ 50.9 ปี ($\bar{X} \pm SD = 50.9 \pm 8.6$)

2. การเจาะเก็บและเตรียมตัวอย่างเลือด ผู้ป่วยและคนปกติจะต้องอดอาหารก่อนการเจาะเลือดอย่างน้อย 12 ชั่วโมง โดยเจาะเลือดยอดจำนวน 15 มิลลิลิตร ดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.1 เจาะเลือด 9 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดพลาสติกที่มี 3.8 % โซเดียมเฮปารินเป็นสารกันเลือดแข็ง (ลดส่วนสารกันเลือดแข็ง : เลือด = 1:10) ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งหรือตู้เย็นในกรณีที่ไม่สามารถปั่นแยกได้ทันที หลังจากนั้นปั่นแยกเตรียมเป็นพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดน้อย (platelet poor plasma ; PPP) แบ่งใส่หลอดพลาสติกหลอดละประมาณ 1-1.5 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70°C . เพื่อรวบรวมไว้ทำการตรวจวัดปริมาณของโปรตีนซี แอนติเจน และแอลคัลลีน ก่อนทำการตรวจวัดจะต้องละลายพลาสมาที่อุณหภูมิ 37°C . อย่างรวดเร็ว และพลาสมาที่ละลายไปแล้ว 1 ครั้ง จะไม่นำมาตรวจวัดอีก

2.2 เจาะเลือด 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองพลาสติกที่ไม่มีสารกันเลือดแข็ง เมื่อเลือดแข็งตัว ปั่นแยกเตรียมซีรัมสำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิก เพื่อทดสอบหน้าที่ของตับและไต

3. วิธีการทดสอบ

3.1 ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคส โดยใช้ Glucose analyzer

3.2 ตรวจวัด cholesterol, total protein, albumin, SGOT, SGPT, alkaline phosphatase, creatinin และ BUN โดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (CIBA-CORNING 550 EXPRESS)

3.3 ตรวจวัดโปรทรอมบินไทม์ (prothrombin time; PT) ในพลาสมาของคนปกติ และผู้ป่วย โดยใช้รีเอเจนต์ ThromborelS ผลิตภัณฑ์ของ Behring Diagnostics และตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์การแข็งตัวของพลาสมา Sarstedt Biomatic[®] 2000 Coagulometer

3.4 ตรวจวัดปริมาณของโปรตีนซีแอนติเจน ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Asserachrom[®] protein C ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ Diagnostic Stago หลักการของวิธีการตรวจวัดคือ เกลือบ solid phase ด้วย rabbit anti-human protein C antibody ทำปฏิกิริยากับโปรตีนซีในพลาสมา และตรวจวัดปริมาณโปรตีนซีในพลาสมา โดย rabbit-anti protein C ที่จับกับเอ็นไซม์ peroxidase ซึ่งเอ็นไซม์นี้ทำปฏิกิริยากับ ortho-phenylene diamine ที่มี H_2O_2 เกิดเป็นสารประกอบที่มีสี OD ที่ 492 nm เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณโปรตีนซีในพลาสมา

3.5 ตรวจวัดแอกติวิตีของโปรตีนซี โดยใช้ชุดทดสอบสังเคราะห์ ซึ่งเป็นน้ำยาสำเร็จรูป ORTHOKROME[®] protein C ผลิตภัณฑ์ของ Ortho Diagnostic System Inc ซึ่งใช้สารที่สกัดจากพิษงู *Aghistrodon contortrix* เป็นตัวกระตุ้นโปรตีนซี และตรวจวัดโดยใช้เครื่องวิเคราะห์การแข็งตัวของพลาสมา MLA Electra 900C Coagulometer

ผลการวิจัย

ระดับน้ำตาลในเลือดของคนปกติและผู้ป่วยเบาหวานทั้ง 2 กลุ่ม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.004$) (ตารางที่ 1) โดยระดับในผู้ป่วยสูงกว่าระดับในคนปกติ สำหรับผลการทดสอบทางเคมีเพื่อประเมินหน้าที่ของตับและไต พบว่าเฉพาะระดับของเอนไซม์ SGOT และ SGPT ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.04$ และ $p < 0.001$, ตามลำดับ) (ตารางที่ 1)

ค่าเฉลี่ยของระดับโปรตีนซีแอนติเจนในคนปกติ ผู้ป่วยเบาหวานที่ไม่มีพยาธิภาวะที่หลอดเลือดและผู้ป่วยเบาหวานที่มีพยาธิภาวะที่หลอดเลือดเท่ากับ 110.1, 135.8 และ 106.5% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) โดยระดับโปรตีนซีแอนติเจนในผู้ป่วยเบาหวานที่ไม่มีพยาธิภาวะที่หลอดเลือดสูงกว่าระดับในผู้ป่วยเบาหวานที่มีพยาธิภาวะที่หลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.038$) (รูปที่ 1)

ค่าเฉลี่ยของโปรตีนซีแอลบีวูตีในคนปกติ ผู้ป่วยเบาหวานที่ไม่มีพยาธิภาวะที่หลอดเลือดและผู้ป่วยเบาหวานที่มีพยาธิภาวะที่หลอดเลือด เท่ากับ 111.1, 156.7 และ 113.3% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) โดยค่าในผู้ป่วยเบาหวานที่ไม่มีพยาธิภาวะที่หลอดเลือดสูงกว่าค่าในคนปกติ และผู้ป่วยเบาหวานที่มีพยาธิภาวะที่หลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.004$ และ 0.032 ตามลำดับ) (รูปที่ 2)

บทวิจารณ์

ความผิดปกติของหลอดเลือดเป็นภาวะแทรกซ้อนที่เป็นสาเหตุของความพิการและการตายที่สำคัญอย่างหนึ่งในผู้ป่วยเบาหวาน โดยความผิดปกติของหลอดเลือดขนาดเล็กมีความจำเพาะต่อโรคเบาหวานมากกว่าความผิดปกติของหลอดเลือดขนาดใหญ่ ซึ่งความผิดปกติดังกล่าวนำไปสู่การเกิด retinopathy และ nephropathy ในผู้ป่วย¹⁵ ในปัจจุบันเชื่อว่าการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานเป็นระยะเวลานานมีความสัมพันธ์กับการเกิด retinopathy แต่ยังไม่ทราบพยาธิกำเนิดที่แน่ชัด เชื่อว่าความผิดปกติทางเคมีอันเนื่องมาจากภาวะ hyperglycemia อาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เอนโดทีเลียม (endothelial cell), blood haemodynamics และสมดุลระหว่างการแข็งตัวของเลือด (coagulation) และการละลายลิ่มเลือด (fibrinolysis)¹⁶

ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับระดับแอนติเจนและแอลคิตีวิตี้ของโปรตีนซีในผู้ป่วยเบาหวานที่มีและไม่มีพยาธิภาวะที่หลอดเลือดขนาดเล็ก ได้แก่ retinopathy และกลุ่มคนปกติ ซึ่งอาสาสมัครทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความผิดปกติในหน้าที่ของตับและไต โดยประเมินจากผลการทดสอบทางเคมี แม้ว่าระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT ในอาสาสมัครทั้ง 3 กลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ค่าดังกล่าวยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติ นอกจากนี้เมื่อประเมินจากค่าโปรทรอมบินไทม์ ซึ่งเป็นการทดสอบหนึ่งที่ยังชี้ถึงหน้าที่ของตับในการสังเคราะห์ปัจจัยการแข็งตัวของเลือดที่อาศัยวิตามินเคในการสังเคราะห์ พบว่าค่าดังกล่าวในอาสาสมัครอยู่ในช่วงค่าปกติและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ระดับโปรตีนซีแอนติเจนและแอลคิตีวิตี้ในผู้ป่วยเบาหวานที่ไม่มีพยาธิภาวะที่หลอดเลือดสูงกว่าผู้ป่วยที่มีพยาธิภาวะที่หลอดเลือดและคนปกติ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Vigano และคณะ⁹ ที่พบว่าระดับโปรตีนซีแอนติเจนในผู้ป่วยเบาหวานสูงกว่าคนปกติ และระดับที่สูงขึ้นไม่ได้เป็นผลจากการตอบสนองของร่างกายต่อการอักเสบอย่างเฉียบพลัน (acute phase reactant) แต่ในการศึกษาดังกล่าวไม่ได้ทำการตรวจวัดแอลคิตีวิตี้ของโปรตีนซี ผลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้อาจอธิบายได้ว่ามีภาวะการแข็งตัวของเลือดมากผิดปกติเกิดขึ้นในผู้ป่วยเบาหวานที่ไม่มีพยาธิภาวะที่หลอดเลือด และระดับโปรตีนซีแอนติเจนและแอลคิตีวิตี้ที่สูงขึ้นเป็นการทดแทน (compensate) ภาวะดังกล่าว และเมื่อร่างกายไม่สามารถทดแทนได้ ภาวะที่มีการแข็งตัวของเลือดมากผิดปกติร่วมกับปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องอาจนำไปสู่การเกิด retinopathy Almer และคณะ¹⁷ พบว่าผู้ป่วยเบาหวานที่มีระยะการดำเนินของโรค (duration) นานกว่า 10 ปี จะมีภาวะที่มีการแข็งตัวของเลือดมากผิดปกติร่วมด้วย และภาวะนี้เกี่ยวข้องกับการเกิด retinopathy ในผู้ป่วย และเมื่อเกิด retinopathy ขึ้นแล้ว ระดับโปรตีนซีอาจลดลงหรือปกติ ทั้งนี้ขึ้นกับว่าร่างกายอยู่ในภาวะ consumption coagulopathy หรือไม่ การวิจัยนี้พบว่าระดับโปรตีนซีแอนติเจนและแอลคิตีวิตี้ในผู้ป่วยที่มี retinopathy จะต่ำกว่าผู้ป่วยที่ไม่มี retinopathy แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มคนปกติ ซึ่งผลที่ได้สนับสนุนสมมติฐานดังกล่าว

อย่างไรก็ตามอาสาสมัครแต่ละกลุ่มที่ใช้ในการวิจัยนี้มีจำนวนค่อนข้างน้อย เนื่องจากมีข้อจำกัดทางด้านงบประมาณ หากมีการศึกษาในอาสาสมัครจำนวนมากขึ้น และยังคงได้ผลการวิจัยเช่นเดิม อาจกล่าวได้ว่าระดับโปรตีนซีทีสูงขึ้นในผู้ป่วยเบาหวานที่ไม่มี retinopathy อาจมีความสัมพันธ์กับการเกิด retinopathy และอาจเป็นกรณีบ่งชี้ที่ใช้ในการติดตามการเกิด retinopathy ในผู้ป่วยได้ และข้อสรุปดังกล่าวจะชัดเจนยิ่งขึ้นหากมีการศึกษาคิดตามผู้ป่วยแต่ละรายเป็นระยะๆ