RADIOIMMUNOASSAY OF SERUM INSULIN AND ITS CLINICAL APPLICATION

สมพงษ์ จินายน พ.บ., M.Sc. *

ศรีสุดา สิตปรีชา พ.บ., M.Sc. **

พวงพยอม อารีวัฒนา วท.บ. เทคนิคการแพทย์ (รังสีเทคนิค) ***

Introduction :

การหาจำนวน Serum insulin ในคน โดยวิธี radioimmunoassay นั้น Yalow และ Berson ได้เริ่มใช้เมื่อปี ค.ศ. ๑๙๖๐[20] โดยใช้หลักของ radioisotope dilution, immunologic specificity และการแยก antibody bound insulin ออกจาก free insulin ด้วย separating agents

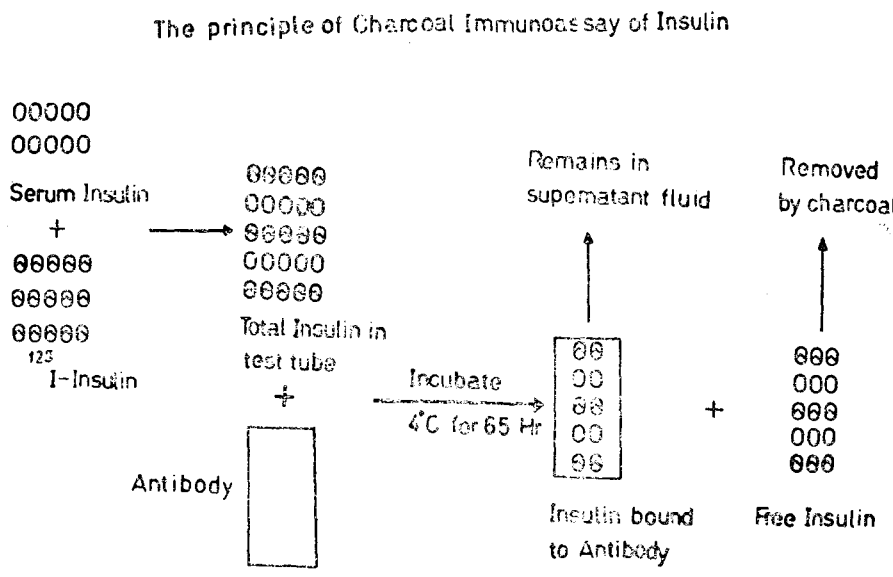
โดยอาศัยคุณสมบัติของ Unlabelled hormone (Insulin) ซึ่งมีอยู่ใน plasma หรือ serum จะแทนที่ (competition) labelled hormone (^{125}I – insulin) ในการที่จะรวมกับ insulin antibody ซึ่งมีจำนวนจำกัด การทำ assay ใช้ปริมาณของ antigen มากกว่า (antigen excess) antibody ซึ่งมีจำนวนจำกัด ดังนั้น จำนวน ^{125}I–insulin (ปริมาณคงที่) เพียงส่วนหนึ่งเท่านั้น จะรวมกับ antibody เป็น radioactive bound form (B) ส่วนที่เหลือจะคงอยู่เป็น radioactive free form (F) ถ้าเติม insulin ลงไป จะทำให้จำนวน ^{125}I–insulin antibody (B) ลดลง และเกิดการเปลี่ยนแปลงของ radioactive B/F ratio หรือ percent bound ซึ่งมีค่าต่าง ๆ ตามปริมาณของ standard insulin ที่เติมลงไป และนำมา plot เป็น standard curve ใช้สำหรับหาปริมาณของ Insulin จาก Unknown samples ได้

ปัจจุบันนี้ radioimmunoassay เป็นวิธีที่ง่าย มีความไวและแม่นยำในการหาจำนวน immunoreactive insulin (IRI) ใน blood แต่ค่าที่ได้นั้นไม่ใช่เป็นการวัด biological function ของ insulin ในร่างกาย

* แผนกวิชาเวชศาสตร์ชันสูตร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

** แผนกวิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

*** หน่วยเรดิโอไอโซโทป แผนกวิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย



รูปที่ ๑

ในรายงานนี้ได้เสนอวิธี radioimmunoassay ในการตรวจหาระดับของ Serum insulin ระยะ fasting ในคนปกติและในผู้ป่วยด้วยโรคเบาหวาน (maturity onset diabetes) รวมทั้งศึกษาถึงความสัมพันธ์ของระดับ serum insulin และ blood glucose ในระหว่างการทำ Oral glucose tolerance test ทั้งในคนปกติและในผู้ป่วยด้วยโรคเบาหวาน

Principle:

หลักของ Charcoal radioimmunoassay of insulin แสดงได้ดังนี้

1. $^{125}I-insulin + AB \rightleftharpoons (^{125}I-insulin-AB) + {}^{125}I-insulin$

2. $^{125}I-insulin + Insulin + AB \rightleftharpoons (^{125}I-insulin-AB) + (Insulin-AB) + {}^{125}I-insulin + Insulin$

Labelled insulin (antigen) จะรวมกับ antibody (AB) ได้เป็น ^{125}I—insulin—antibody complex เมื่อเติม Unlabelled insulin (antigen) ลงไปจะทำให้ radioactivity ของ ^{125}I—insulin—antibody complex ลดลง เนื่องจาก antibody มีจำนวนจำกัดและคงที่ และ ^{125}I—insulin และ Insulin สามารถที่จะรวมกับ antibody ได้

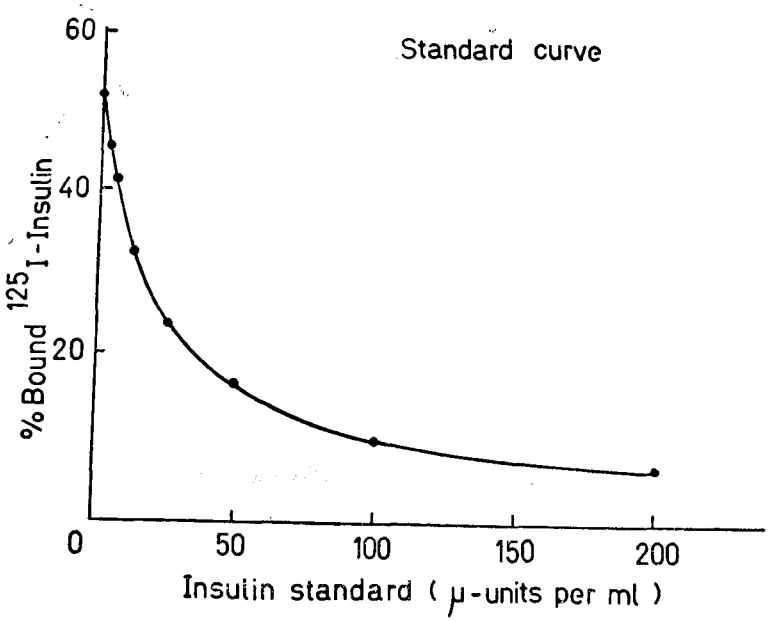
ใน assay system ประกอบด้วยขั้นการทดลองดังแสดงในรูปที่ ๑ ซึ่งได้ดัดแปลงมาจาก principle of charcoal immunoassay of insulin ของ Herbert, et al.[10]

เมื่อใส่ serum ที่ต้องการจะทราบระดับ insulin รวมกับ ^{125}I—insulin ซึ่งมีจำนวนคงที่ จะเป็นจำนวน insulin ทั้งหมดที่มีอยู่ใน test เมื่อเติม insulin antibody ซึ่งมีจำนวนจำกัดลงไป และ Incubate ที่ ๔°C ประมาณ ๖๕ ชั่วโมง ในภาวะเช่นนี้จะเกิดการแย่งที่ระหว่าง labelled และ unlabelled antigen ในการที่จะรวมกับ specific antibody ภายหลัง incubation ในส่วนผสมจะประกอบด้วยส่วนของ Insulin bound antibody และ Free insulin ซึ่งทั้งสองส่วนจะมีทั้ง labelled และ unlabelled insulin เป็นส่วนประกอบ จากนั้นแยก free insulin fraction ออกจากส่วนผสมโดยใช้ charcoal และนำมาปั่นแยกส่วน ของ charcoal ที่ absorbed free insulin ซึ่งจะอยู่ข้างใต้ ส่วน insulin ที่รวมกับ Antibody จะคงอยู่ใน supernatant ทำให้แยกส่วนทั้งสองออกจากกันได้ เมื่อนำแต่ละส่วนไปหา radioactivity ก็จะทราบจำนวนของ radioactive bound insulin (B) และ radioactive free insulin (F) นำค่าทั้งสองมาหา B/F ratio หรือ Percent bound แล้วนำไปเทียบค่าจาก Standard curve ก็จะทราบจำนวน Insulin ที่มีอยู่ใน Unknown sample ได้ ซึ่งมีหน่วยเป็น microunits per ml. serum or plasma

Standard curve เตรียมได้โดยใช้วิธีและหลักเดียวกัน คือใช้ human insulin ที่ทราบค่าแล้วในปริมาณต่าง ๆ กัน ใส่ลงแทน unknown sample และหาค่าของ radioactive B/F ratio หรือ percent bound ^{125}I—insulin ของแต่ละปริมาณ นำมาเขียนเป็น curve ไว้ ดังแสดงในรูปที่ ๒

Method.

A. Serum immunoreactive insulin (IRI) ที่ใช้ในรายงานนี้ได้ดัดแปลงจากวิธี charcoal assay of insulin ของ



รูปที่ ๒

Albino และ Ekins[1] ซึ่งใช้ reagents ดังนี้

๑. Guinea—pig antipork insulin antiserum (ได้รับจาก Dr. Ekins—institue of nuclear medicine, the Middlesex hospital Medical School, London) เก็บแต่ละส่วนไว้ที่ —๒๐°C ก่อนจะใช้ผสมด้วย phosphate albumin buffer เพื่อให้ได้ 1 : 200,000 หรือ 1 : 300,000 dilution.

๒. ^{125}I—Insulin (IM 38, Radiochemical center, Amersham, England) มี specific acitivity 5 microcuries per 0.1 microgram แบ่ง stock solution ไว้เป็นส่วน ๆ เก็บที่ —๒๐°C ก่อนจะใช้จึงผสมด้วย phosphate albumin buffer ให้ได้ปริมาณเท่ากับ ๒๐๐ pg/ml.

๓. Human insulin standard (M.R.C standard Lot 66/304, M.R.C., England) เก็บ stock solution ไว้ที่ —๒๐°C ก่อนจะใช้ผสมด้วย phosphate albumin buffer ให้มีความเข้มข้น ๒๐๐, ๑๐๐, ๕๐, ๒๕, ๑๒.๕, ๖.๒๕ และ ๓.๑๒๕ microunits per ml.

๔. Human serum albumin (20% v/w Poviet producten NU, Amsterdam)

๕. Phosphate albumin buffer pH 7.4, 0.05 M. เตรียม phosphate buffer เก็บไว้ที่ ๔°C ก่อนใช้เติม human serum albumin ให้มีความเข้มข้น ๐.๕ %.

๖. Norit A charcoal 50 mg/ml. in 0.5 % phosphate albumin buffer

๗. Samples ใช้ serum จากคนในภาวะ

a. Fasting state

b. Following 100 g. oral glucose load เลือดที่ได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิประมาณ ๒๐°C ๔—๖ ช.ม. แยกออก serum และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ — ๒๐°C จนกระทั่งนำมาใช้ในการทดลอง.

	Standards (ml.)	*Unknowns (ml.)*
1. Phosphate albumin buffer	0.6	0.6
2. Standard insulin dilutions	0.1	–
3. Test serum	–	0.1
4. Diluted ^{125}I–Insulin	0.1	0.1
5. Diluted antiserum	0.1	0.1

Control tubes ของ Standard ใส่ buffer 0.8 ml. และ ^{125}I—Insulin 0.1 ml.

ของ Unknown ใส่ buffer 0.7 ml. test serum 0.1 ml. และ ^{125}I—Insulin 0.1 ml.

Controls นี้ใช้สำหรับการแก้ Non—specific binding และ incubation damage ของสารไอโซโทป

ทุก ๆ Standards และ Unknowns ทำ assay ซ้ำสองครั้ง (Duplication) โดยใช้จำนวนและการเรียงลำดับการใส่ของ reagents ดังกล่าวแล้ว Mix ทุก tubes แล้ว incubate ที่ ๔°C เวลา ๖๕ ชั่วโมง แล้วเติม charcoal suspension 0.1 ml. ลงทุก tubes mix และตั้งทิ้งไว้ที่ ๔°C ๒ ชั่วโมง ปั่นแล้วแยก free (charcoal) และ bound (supernatant) fractions ออกจากกันแล้วนับ radioactivity ของแต่ละส่วนโดยใช้ Packard auto gamma scintillation counter แล้วคำนวนหา % ^{125}I—Insulin bound to antibody ของแต่ละ tube โดยใช้สูตร

$$\% \text{ Bound} = 100 \left(\frac{1}{x+1} - \frac{1}{y+1} \right)$$

x = observed free / bound ratio in the sample tube.

y = observed free / bound ratio in the corresponding control tube.

B. Blood glucose ตรวจโดยใช้ "Auto–analyzer" โดยวิธี Technicon ferricyanide reduction method

Materials:

กลุ่มคนปกติ

ได้ทำการศึกษาในคนปกติที่ไม่มี Endocrine diseases หรือโรคอื่น ๆ และไม่มีประวัติของการป่วยเป็นโรคเบาหวานในครอบครัว จำนวน ๕๒ ราย อายุระหว่าง ๑๖–๗๐ ปี น้ำหนักตัวระหว่าง ๔๕–๖๐ กิโลกรัม ได้ตรวจหาค่า Fasting blood glucose และ serum insulin

ได้ศึกษาค่าของ blood glucose และ serum insulin ภายหลังให้ ๑๐๐ g. oral glucose ในคนปกติ ๙ ราย ซึ่งมีอายุระหว่าง ๑๘–๓๕ ปี น้ำหนักตัว ๔๗–๕๘ กิโลกรัม โดยเจาะเลือดที่ระยะ Fasting, ๓๐, ๖๐, ๑๒๐ และ ๑๘๐ นาที ภายหลังให้ glucose

กลุ่มคนไข้โรคเบาหวาน

ได้ศึกษาในคนไข้โรคเบาหวานพวก maturity -- onset จำนวน ๑๗ ราย อายุระหว่าง ๓๔–๗๑ ปี น้ำหนักตัว ๔๕–๘๕ กิโลกรัม เป็นคนไข้ใหม่ซึ่งไม่เคยได้รับการรักษาด้วยวิธีคุมอาหาร หรือได้รับยา insulin หรือได้รับยาพวก oral hypoglycemic agent มาก่อนเลย ได้ตรวจหา Fasting blood glucose และ serum insulin

การศึกษา blood glucose และ serum insulin ในระหว่างการทำ ๑๐๐ g. oral glucose tolerance ในคนไข้เบาหวานจำนวน ๙ คน ซึ่งไม่เคยได้รับการรักษาด้วยวิธีดังกล่าวแล้ว อายุระหว่าง ๑๗–๖๑ ปี น้ำหนักตัว ๔๕–๘๕ กิโลกรัม โดยเจาะเลือดที่ระยะ Fasting, ๓๐, ๖๐, ๑๒๐ และ ๑๘๐ นาที ภายหลังให้ glucose และนำมาหาค่า blood glucose และ serum insulin

กลุ่มคนไข้เบาหวานที่ได้รับการรักษาด้วยยาพวก Sulfonylureas

คนไข้เบาหวาน ๕๒ ราย ที่ได้มารับการรักษาที่คลินิคโรคเบาหวานในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และได้รับการรักษาด้วยยา sulfonylureas เป็นระยะเวลาตั้งแต่ ๒ เดือน ถึง ๕ ปี ได้ตรวจเลือดหา Fasting blood glucose และ serum insulin

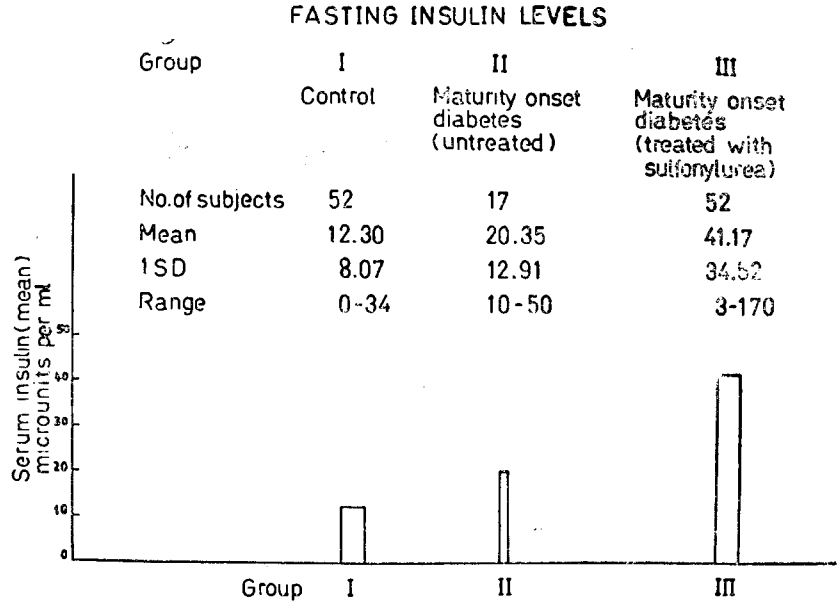
Results:

A. ค่าของ serum insulin ในระยะ fasting

๑. ในคนปกติ ค่าของ serum insulin 0.34 microunits/ml. ค่า mean 12.3 ± 8.07 microunits/ml.

๒. ในคนไข้เบาหวาน ค่าของ serum insulin 10—50 microunits/ml. ค่า mean 20.35 ± 12.91 microunits/ml.

๓. ในคนไข้เบาหวานที่ได้รับการรักษาด้วย Sulfonylurea ค่าของ serum insulin 3—170 microunits/ml. ค่า mean 41.17 ± 34.52 microunits/ml.



รูปที่ ๓

ค่าเปรียบเทียบของทั้ง ๓ พวกได้แสดงไว้ในรูปที่ ๓ ซึ่งพิจารณาแล้วจะเห็นว่าค่า mean fasting insulin ของ group II สูงกว่า group I เล็กน้อย แต่เมื่อนำค่าทั้งสองมาเปรียบเทียบกันทางสถิติ พบว่าไม่มีความสำคัญในความแตกต่าง ($P < 0.05$) ส่วนค่า mean fasting insulin ของ group III นั้นสูงกว่าของ group I และ group II อย่างชัดเจน และเมื่อเปรียบเทียบค่าเหล่านี้ทางสถิติ จะเห็นความสำคัญของความแตกต่าง

คือ ระหว่าง group III และ group I ($P < 0.001$) และระหว่าง group III และ group II ($P < 0.001$)

B. Insulin response ต่อ Glucose tolerance test

๑. ค่าของผล mean blood glucose และ serum insulin ของคนปกติจำนวน ๙ ราย ในระหว่างการทำ oral glucose tolerance test ดังแสดงในรูปที่ ๔ (เส้นไข่ปลาแสดงค่าของ blood glucose ส่วนเส้นทึบแสดงค่าของ serum insulin)

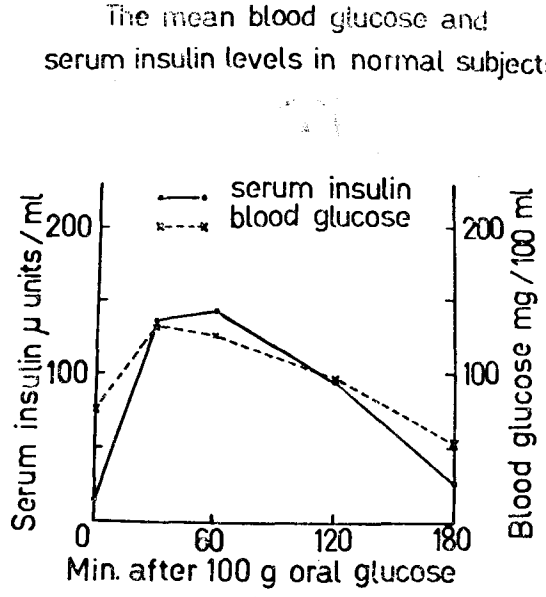
๒. ค่าของ serum insulin response ต่อ glycemic stimulation ในคนไข้เบาหวานมี ๓ แบบ (รูปที่ ๕)

๑. Flat response

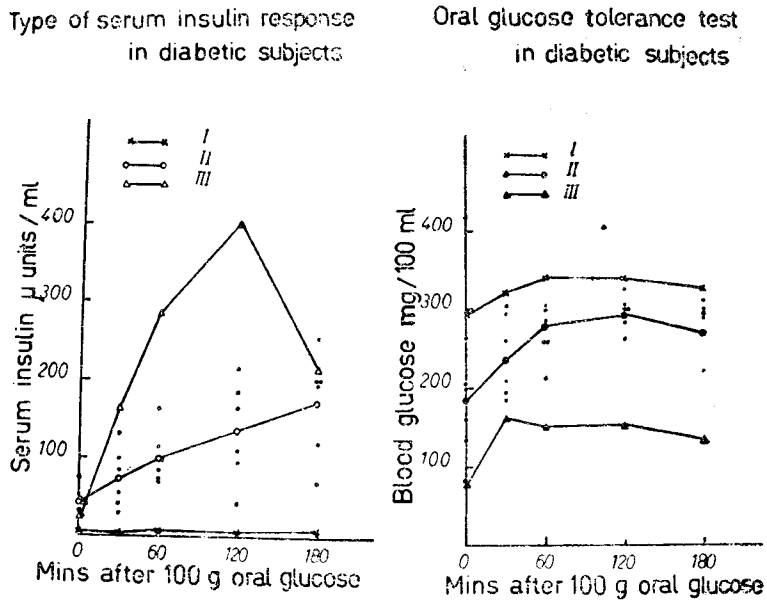
๒. Delayed response

๓. High response

การแบ่งเป็นแต่ละแบบนั้น อาศัยหลักของ Buchanan และ McKiddie[4] เมื่อเปรียบเทียบค่าของ glucose tolerance กับค่าของ serum insulin จะพบว่ามี inverse correlation คือ severe glucose intolerance correlate กับ flat insulin response และในทางตรงกันข้าม mild glucose intolerance correlate กับ high insulin response.



รูปที่ ๔



รูปที่ ๕

	Blood sugar *mg./100 ml. (mean)*	*Serum insulin* *microunits per ml. (mean)*
Fasting level	77	16
Following 100 g. oral glucose		
1/2 hr.	132	136
1 hr.	126	142
2 hr.	96	95
3 hr.	66	27

เห็นได้ว่าลักษณะของ insulin responsive curve จะเป็นแบบเดียวกันกับ blood glucose curve คือ ค่าสูงสุดของ insulin response อยู่ระหว่าง ๑/๒ และ ๑ ช.ม. และจะค่อย ๆ ลดลงจนถึงระดับ basal ในเวลา ๓ ช.ม. ซึ่งตรงกับผลงานที่ผู้อื่นได้ทำไว้ดังแสดงใน Table I.

Table I Range of insulin values in healthy subjects following glucose tolerance test

References	*Year.*	*No. of case*	*Doses of oral glucose*	*Range of insulin values (microunits per ml.) at*					
				0	*1/2 hr.*	*1 hr.*	*2 hr.*	*2 1/2 hr.*	*3 hr.*
1. Yalow and Berson[20]	1960	30	100 g.	0 – 66	39 – 294	18 – 342	21 – 223	–	–
2. Hales and Randle[8]	1963	5	50 g.	6 – 25	35 – 88	43 – 120	–	6 – 37	–
3. Hales and Randle[8]	1963	5	100 g.	10 – 27	45 – 320	20 – 100	–	6 – 27	–
4. Nikkilä, et al.[11]	1965	12	1 g./kg.	0 – 27	21 – 100	30 – 92	0 – 68	–	–
5. Welborn, et al.[19]	1966	45	50 g.	3 – 26	15 – 125	13 – 131	6 – 60	–	–
6. Our data	1971	9	100 g.	0 – 34	24 – 360	56 – 300	30 – 168	–	10 – 48

Discussion

การศึกษา serum insulin ในโรคเบาหวาน มีเหตุมาจาก active manifestation ของโรคเบาหวานกลับปกติเมื่อให้ Insulin ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะค้นคว้าเรื่อง serum insulin ในโรคเบาหวาน เพราะอาจจะทำให้ทราบถึงสาเหตุของโรคนี้

จากผลของการศึกษาพบว่าค่า serum insulin ในภาวะ fasting ของคนไข้เบาหวานไม่แตกต่าง กับค่า ของคนปกติในภาวะเดียวกัน ซึ่งสนับสนุนผลงานของผู้อื่น เช่น Yalow และ Berson[21] ดังนั้นการศึกษา serum insulin ในระยะ fasting นั้น ไม่ช่วยให้ทราบถึงความผิดปกติของ insulin ในคนไข้

เบาหวานแต่อย่างใด ความผิดปกติของ serum insulin ในคนไข้เบาหวานจะเห็นได้ภายหลังให้ glucose ซึ่งเป็น chief initiator ของ insulin[16] insulin response ต่อ glycemic stimulation มี variation ตั้งแต่ flat จนถึง high response ทั้งนี้เนื่องจาก clinical spectrum ของโรคเบาหวานนั้นกว้างมาก จาก maturity onset ซึ่งมี mild carbohydrate intolerance ถึง juvenile diabetes ซึ่งมี severecarbohydrate intolerance

การที่มี high insulin response นั้นอาจจะเนื่องจาก resistance ต่อ action ของ insulin ในโรคเบาหวานมักจะมีความผิดปกติของ glyceride metabolism จะมี fatty acid release จาก adipose tissues และกล้ามเนื้อมากขึ้น ซึ่งมี antagonized action ต่อ insulin[7] หรือ insulin ที่ตรวจหาได้นั้น physiologically inactive หรือเป็น abnormal insulin[6] อย่างไรก็ตามค่า serum insulin ใน maturity - onset diabetes จะต่ำเมื่อเทียบกับค่าของ associated blood glucose[14] ซึ่งแสดงว่ามี pancreatic failure.

เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่า delayed insulin response ต่อ glucose นั้น เป็นลักษณะเฉพาะของโรคเบาหวาน[9, 17, 20] และในการศึกษาครั้งนี้ก็สนับสนุนการ response แบบนี้อาจจะเนื่องจาก increase stimulatory threshold ของ β cell หรืออาจเกิดจากความผิดปกติในการสร้างหรือการหลั่งของ insulin อย่างไรก็ตาม Seltzer และ Allen[15] เชื่อว่าเกิดจาก biochemical inertia ของ β cell

Flat insulin response ใน Juvenile diabetes แสดง insulin deficiency ซึ่งตรงกับผลที่ Hales[9] และ Berson & Yalow[2] ได้ศึกษาไว้

Inverse correlation ระหว่าง insulin response และ glucose นั้น สนับสนุนผลงานของ Hales[9] และ Bagdade, et al.[3] ได้มีผู้อธิบายว่าเกิดจาก excessive stimulation ของ β cell อยู่นานในระยะ mild carbohydrate intolerance ทำให้มี exhaustion ของ β cell และเกิด severe - carbohydrate intolerance ในระยะหลัง[17] แต่ได้มีข้อแย้งโดยผลงานของ Cerasi[5] และ Pyke[13] ซึ่งพบว่ามี high insulin response ใน pre - diabetes

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่า serum insulin ในคนไข้เบาหวานภายหลังให้ยา sulfonylureas (Hypoglycemic agents) นั้น

จะสูงกว่าพวกที่ไม่ได้ยา ซึ่งตรงกับผลงานของ Pfeiffer, et al. & Vallance-Owen, et al.[12,18] และได้อธิบายว่า เนื่องจาก sulfonylureas ไปกระตุ้นการหลั่งของ insulin จาก β cell ให้มีมากขึ้น

Conclusion

Serum insulin response ต่อ oral glucose ในคนปกติจะสูงสุดในระหว่าง ½ ๑ ช.ม. และค่อย ๆ ลดลงจนถึงระดับ basal ในเวลา ๓ ช.ม.

ค่าของ serum insulin ของคนไข้เบาหวานในระยะ fasting ไม่แตกต่างกับค่าของคนปกติในภาวะเดียวกัน

Serum insulin ในคนไข้เบาหวานขณะทำ Oral glucose tolerance test นั้นมี ๓ แบบ คือ high insulin response, delayed response และ low response

Sulfonylureas ทำให้ระดับของ serum insulin สูงขึ้น

ขอขอบคุณ

ผู้รายงานขอขอบคุณ นายแพทย์วิชัย โปษยะจินดา หน่วยเรดิโอไอโซโทป แผนกรังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ-มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และสนับสนุนในการศึกษาครั้งนี้

References

1. Albino, J., and Ekins P.P., The Attainment of High Sensitivity and Precision in Radioimmunoassay techniques as Examplified in a Simple Assay of Serum Insulin. In vitro precedures with radioisotopes in medicine. Proc. of IAEA symposium P. 491. 1970

2. Berson, S.A., and Yalow, R.S., in Immunoassay of Hormones. Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology, London, Vol. 14, P. 182. 1962

3. Bagdade, J.D., Bierman, E.L., and Porte, D., J. Clin. Invest. 46 : 1549, 1967.

4. Buchanan, K.D., and Mc Kiddie, M.T., Diabetologia 3 : 400, 1967.

5. Cerasi, E., and Luft, R., Acta Endocr. 55 : 278, 1967.

6. Elliott, R.B., O'Brien, D., and Roy, C.C., Diabetes 14 : 780, 1965.

7. Hales, C.N., and Randle. P.J., Biochem. J. 88 : 137, 1963.

8. Hales, C.N., and Randle, P.J., Lancet 1 : 790, 1963.

9. Hales, C.N., in Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology, London, Vol. 15, p. 140 1964.

10. Herbert, V. Leu, K – S., Gottlieb, C.W., and Bleicher, S.J., J. Clin. Endocr. 25 : 1375, 1965.

11. Nikkilä, E.A., Miettinen T.A., Vesenne, M.R., and Pelkonen, R., Lancet 2 : 508, 1965.

12. Pfeiffer, E.F., Pfeiffer, M., and Ditschuniit, H., Ann. N.Y. Acad. Sci. 82 : 479, 1959.

13. Pyke, D.A., and Taylor, K.W., Brit. Med. J. 4 : 21, 1967.

14. Perley, M., and Kipnis, D.J., Clin. Invest. 46 : 1954, 1967.

15. Seltzer, H.S., and Allen, E.W., Diabetes 14 : 439, 1965.

16. Simpson, R.G., Benedetti, A., Karem, J.K., and Grodsky, G.M., Clin. Res. 14 : 288, 1966.

17. Seltzer, H.S., Allen, E.W., Herron, A.L., and Brennan, M.T., J. Clin. Invest. 46 : 323, 1967.

18. Vallance-Owen, J., Joplin, G.F., and Fraser, R., Lancet 2 : 584, 1959.

19. Welborn, T.A., Rubenstein, A.H., Haslam, R., and Fraser, R., Lancet 1 : 280, 1966.

20. Yalow, R.S., and Berson, S.A., J. Clin. Invest. 39 : 1157, 1960.

21. Yalow, R.S., and Berson, S.A., Diabetes 9 : 254, 1960.