



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* ซึ่ง
เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวานในเด็กทารก
(neonatal diabetes) และโรคระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ
จากระดับอินซูลินที่สูงตั้งแต่แรกเกิด
(congenital hyperinsulinism)

โดย

กัญญา ศุภปิติพร

วิจิต สุพรศิลป์ชัย

วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์

สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ

มิถุนายน 2555

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ป่วยและครอบครัวของผู้ป่วยที่ให้ความร่วมมือในการศึกษาวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณทีมแพทย์ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้การดูแลผู้ป่วยอย่างดี

ท้ายสุดนี้ ขอขอบพระคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุน และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ เช่น สถานที่ เงินทุน และเจ้าหน้าที่

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การเกิดโรคเบาหวานในเด็กทารก (neonatal diabetes) และ โรคระดับน้ำตาลในเลือดต่ำจากระดับอินซูลินที่สูงตั้งแต่แรกเกิด (congenital hyperinsulinism)

ชื่อผู้วิจัย พญ.ดร. กัญญา สุภปิณฑิร
 นพ.ดร. วิชิต สุพรศิลป์ชัย
 นพ. วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์
 นพ. สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ มิถุนายน 2555

บทคัดย่อ

ภาวะที่เด็กทารกมีน้ำตาลในเลือดสูงก่อนอายุ 6 เดือน (neonatal diabetes mellitus) ส่วนใหญ่เกิดการกลายพันธุ์ในยีนที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ ATP-dependent potassium channel ทำให้โปรตีนทำงานมากขึ้น ซึ่งทำให้เซลล์หลังอินซูลินได้ลดลง ยีนที่ทำหน้าที่สำคัญดังกล่าวคือ *KCNJ11* และ *ABCC8* ซึ่งควบคุม subunit ของ inwardly rectifying potassium channel (Kir 6.2) และ plasma membrane sulfonylurea receptor (SUR1) นอกจากนี้ การกลายพันธุ์ในยีนเดียวกันนี้ ทำให้เกิดโรคที่มีลักษณะอาการทางคลินิกที่ตรงกันข้ามกันได้ คือ โรค congenital hyperinsulinism การกลายพันธุ์นี้ทำให้โปรตีนทำงานได้น้อยลง ส่งผลให้เซลล์หลังอินซูลินเพิ่มขึ้น การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคทั้งสองนี้ ยังไม่เคยมีการรายงานในผู้ป่วยเด็กไทย การศึกษานี้ได้รวบรวมผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค neonatal diabetes mellitus และผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค congenital hyperinsulinism และทำการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* พบว่า ผู้ป่วยในกลุ่ม neonatal diabetes มีทั้งหมด 6 ราย โดยทุกรายเริ่มมีอาการที่อายุน้อยกว่า 6 เดือน มีผู้ป่วย 2 รายที่มีภาวะ diabetic ketoacidosis เมื่อแรกวินิจฉัย จำนวน 3 รายมีอาการที่เกิดจากน้ำตาลในเลือดสูง เช่น polyuria, polydipsia เป็นต้น ผลการตรวจการกลายพันธุ์ พบการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* 2 รายจากผู้ป่วยทั้งหมด 6 ราย คิดเป็นร้อยละ 33.3 ผู้ป่วยทั้ง 2 ราย สามารถให้การรักษาด้วยยาในกลุ่ม sulfonylurea เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลให้อยู่ในเกณฑ์ปกติได้ ผู้ป่วย 3 ใน 4 รายที่ไม่พบมีการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* ไม่ตอบสนองต่อยาในกลุ่ม sulfonylurea จำเป็นต้องได้รับการรักษาโดยใช้อินซูลิน สำหรับผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค congenital hyperinsulinism จากการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* ยังไม่พบการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* มีประโยชน์ในการวินิจฉัย neonatal diabetes มากกว่า congenital hyperinsulinism เนื่องจาก มีโอกาสพบถึงร้อยละ 30 และมีประโยชน์ต่อการวางแผนการรักษาและการให้การปรึกษาทางพันธุกรรม

Project Title Molecular characterization of *KCNJ11* responsible for neonatal diabetes and congenital hyperinsulinism

Name of the Investigators Kanya Suphapeetiporn
Vichit Supornsilchai
Vorasuk Shotelersuk
Suttipong Wacharasindhu

Year June 2012

Abstract

Neonatal diabetes mellitus (NDM) is characterized by uncontrolled hyperglycemia occurring during the first 6 months of life. The majority of NDM cases are caused by activating mutations in the genes encoding proteins involved in the ATP-dependent potassium channel causing a reduction in insulin secretion. *KCNJ11* and *ABCC8* encode the inwardly rectifying potassium channel (Kir6.2) and plasma membrane sulfonylurea receptor (SUR1), respectively. In addition, loss of function mutations in *KCNJ11* and *ABCC8* causing an unregulated insulin release has been demonstrated to cause an opposite phenotype, congenital hyperinsulinism, the most frequent cause of severe hypoglycemia in infants and children. There have been no studies investigating the genetic causes of both disorders in Thai individuals. Here, we described patients with clinical findings consistent with neonatal diabetes mellitus and patients with congenital hyperinsulinism and performed mutation analysis of *KCNJ11*. Of six patients with neonatal diabetes, all of them had the disease onset before six months of age. Two patients presented with diabetes ketoacidosis at first visit. Three patients had polydipsia and polyuria as a consequence of hyperglycemia. Of the six patients, two had heterozygous missense mutations in the *KCNJ11* gene, accounting for 33.3%. These two patients were successfully treated with oral sulfonylureas. Of the four patients without *KCNJ11* mutations, three required insulin therapy to control hyperglycemia. For patients with clinical features consistent with congenital hyperinsulinism, no disease-causing mutations of the *KCNJ11* gene have been found. In summary, mutation analysis of the *KCNJ11* gene for definite diagnosis of neonatal diagnosis is preferred as about 30% of cases are caused by this gene. In addition, it can lead to more appropriate disease management and genetic counseling.

สารบัญ (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)	ii
บทคัดย่อ (Abstracts)	
ภาษาไทย	iii
ภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ (Table of Contents)	v
รายการตารางประกอบ (List of Tables)	vi
รายการภาพประกอบ (List of Figures)	vii
บทนำ (Introduction)	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Survey of Related Literature)	3
วิธีการวิจัย (Procedure)	3
ผลการวิจัย (Result)	4
การอภิปรายผล (Discussion)	9
ข้อสรุป (Conclusion)	10
ข้อเสนอแนะ (Suggestion for further work)	11
เอกสารอ้างอิง (References)	12

เลขหมู่

เลขทะเบียน 015550

วัน, เดือน, ปี ๒๑ ต.ค. ๕๕

รายการตารางประกอบ (List of Tables)

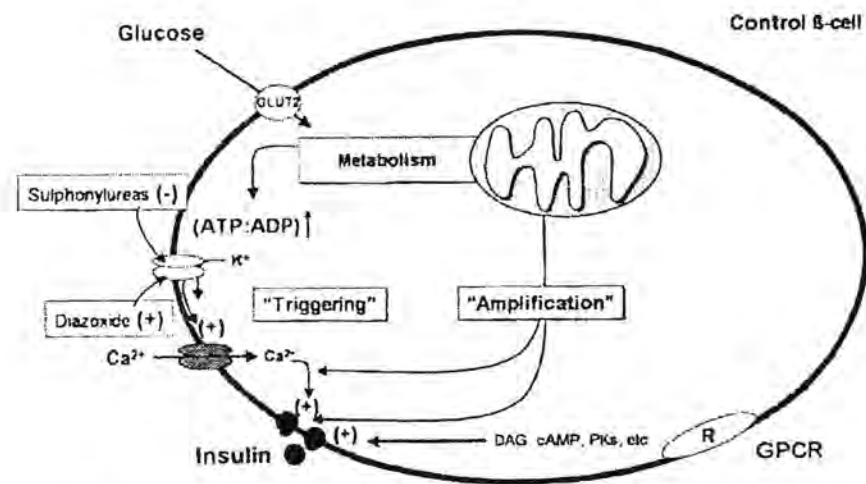
ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1	4
ตารางที่ 2	6
ตารางที่ 3	8
ตารางที่ 4	9

รายการภาพประกอบ (List of Figures)

ภาพ	หน้า
ภาพที่ 1	1
ภาพที่ 2	7

บทนำ (Introduction)

กลไกในการหลั่งอินซูลินจาก β -cell ของตับอ่อนหลังจากร่างกายได้รับกลูโคสแสดงในรูปที่ 1 กล่าวโดยสรุปดังนี้กลูโคสผ่านเข้า β -cell ทาง glucose transporter (Glut 2) และถูกเปลี่ยนเป็น ATP โดยเอนไซม์ glucokinase มีผลเพิ่มอัตราส่วนของ ATP/ADP ซึ่งต่อมาจะปิด KATP channel ทำให้ระดับโพแทสเซียมในเซลล์เพิ่มขึ้น มีผลทำให้เซลล์มีเมมเบรนเกิด depolarization กระตุ้นให้เกิดการ influx ของ calcium เข้ามาใน β -cell ทาง calcium channel เป็นผลให้เกิดการ exocytosis ของอินซูลินออกมาในกระแสเลือด



รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนการหลั่งอินซูลินจาก β cell ของตับอ่อน¹

Congenital hyperinsulinism คือโรคที่มีระดับน้ำตาลในเลือดต่ำจากอินซูลินในกระแสเลือดสูง ส่วนใหญ่เกิดเป็น sporadic ส่วนน้อยเกิดจากการกลายพันธุ์แบบ inactivation ของยีน *KCNJ11* และ *ABCC8* ซึ่งควบคุม subunit ของ inwardly rectifying potassium channel (Kir 6.2) และ plasma membrane sulfonylurea receptor (SUR1) ตามลำดับ² เวลาในการเกิดโรค (onset) อาจเป็นสัปดาห์ และเป็นได้ทั้ง transient หรือ permanent ผลทาง histology มีทั้งแบบ diffuse หรือ focal ถึงแม้ว่าจะมีรายงานการกลายพันธุ์ของยีนนี้จำนวนมากแต่ยังไม่พบความสัมพันธ์ของ genotype และ phenotype ที่ชัดเจน รวมทั้งตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยในกลุ่มประชากรทั่วไป³ โรคนี้เป็นโรคที่มีความหลากหลายทางด้านอาการแสดงทางคลินิก ลักษณะทางพันธุกรรม ลักษณะของเซลล์ตลอดจนการตอบสนองต่อการรักษา⁴

ข้อดีของการทราบการกลายพันธุ์คือ สามารถเลือกชนิดยาที่เหมาะสม เช่น diazoxide ซึ่งใช้ได้ผลดีในกรณีที่มีการกลายพันธุ์ของ KATP channel นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยพิจารณาทำ

pancreatectomy ได้ตั้งแต่ระยะแรกๆ⁵⁻⁶ ส่วนภาวะแทรกซ้อนของ hypoglycemia จากการกลายพันธุ์ของยีนนี้มีมาก โดยเฉพาะเรื่อง neurodevelopment เนื่องจากระดับน้ำตาลในกระแสเลือดมักต่ำก่อนข้างมากและการรักษาระดับให้ปกติคงที่ได้ยาก มีรายงานภาวะแทรกซ้อนระยะยาวของผู้ป่วยกลุ่มนี้ พบว่าถ้าได้รับการรักษาหรือไม่เหมาะสมจะทำให้เกิด hypotonia, fine and gross motor problems, mild cerebral palsy, speech problem และ learning problem ได้ นอกจากนี้ยังมีภาวะแทรกซ้อนจากการทำ pancreatectomy คือ diabetes mellitus ต้องได้รับการรักษาโดยการฉีดอินซูลินเป็นระยะเวลานานและเสี่ยงต่อภาวะแทรกซ้อนจากระดับน้ำตาลในเลือดสูงในระยะยาวได้

Neonatal diabetes เป็นโรคเบาหวานที่แสดงอาการในเด็กอายุน้อยกว่า 6 เดือน เกิดจากการกลายพันธุ์แบบ activation ของยีน *KCNJ11* และ *ABCC8* ซึ่งควบคุม subunit ของ inwardly rectifying potassium channel (Kir 6.2) และ plasma membrane sulfonylurea receptor (SUR1) ตามลำดับ โรคเบาหวานชนิดนี้อาจมีอาการแสดงแบบ transient หรือ permanent ก็ได้ มักมีอาการรุนแรงเช่น diabetic ketoacidosis (DKA) ตั้งแต่เริ่มแรกของการวินิจฉัย โรคนี้พบได้น้อยจึงไม่มีหลักฐานยืนยันแน่นอนที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของตำแหน่งของการกลายพันธุ์และอาการแสดงทางคลินิก ความสำคัญในการทราบการกลายพันธุ์ของยีนคือ โรคนี้สามารถรักษาระดับน้ำตาลในเลือดให้ปกติด้วยยารับประทานกลุ่ม sulfonylurea เช่น Glipizide ไม่ต้องรักษาด้วยการฉีดอินซูลินเหมือนโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ในเด็กทั่วไป

แต่อย่างไรก็ตามในระยะเวลา 2-3 ปีที่ผ่านมาการศึกษาถึงการดำเนินโรคในระยะยาวของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัย congenital hyperinsulinism ในวัยเด็กและมีปัญหาของ insulin resistance และเกิดเป็นโรคเบาหวานได้ตอนเป็นวัยรุ่นหรือผู้ใหญ่^{9,11} ซึ่งจากทุกรายงานสาเหตุเกิดจากการกลายพันธุ์ของ *ABCC8* ยังไม่มีรายงานการดำเนินโรคเช่นนี้ในการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11*

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* ในผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค neonatal diabetes และผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค congenital hyperinsulinism
2. เพื่อศึกษาถึงผลการตอบสนองต่อยา sulfonylurea ในผู้ป่วยที่เป็น neonatal diabetes และพบมีการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11*

การวิจัยสำหรับโครงการนี้จะครอบคลุมถึงการค้นหาการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* ในผู้ป่วยที่มีอาการและอาการแสดงที่เข้าได้กับภาวะ neonatal diabetes (เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ทำให้เพิ่มการทำงาน, activating mutations หรือ gain of function mutations) และผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค congenital hyperinsulinism (เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ทำให้สูญเสียการทำงาน,

inactivating mutations หรือ loss of function mutations) ทำให้การวินิจฉัยโรคหรือภาวะดังกล่าว เป็นไปได้อย่างถูกต้องมากขึ้น ซึ่งนำไปสู่การดูแลรักษาที่เหมาะสม รวมทั้งการให้คำปรึกษาทาง พันธุกรรมแก่ผู้ป่วยและสมาชิกอื่นๆ ในครอบครัว นอกจากนี้ การศึกษาวิจัยจะรวมถึงการ ตอบสนองต่อยาที่ให้ในผู้ป่วยที่พบเป็น neonatal diabetes ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าว

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Survey of Related Literature)

Congenital hyperinsulinism มีอุบัติการณ์ของโรคนี้แบบ sporadic ประมาณ 1:27,000-1:50,000 ของทารกแรกเกิดและอาจพบ 1:2,500 ในบางพื้นที่ ในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีนที่ พบบ่อยที่สุดและมีการรายงานเป็นยีนแรกคือ *ABCC8* ปัจจุบันมีรายงานการกลายพันธุ์ของยีนนี้ มากกว่า 150 ชนิด (<http://www.interscience.wiley.com/jpages/1059-7794/suppmat>) นอกจากนี้ ผู้ป่วยจำนวนหนึ่ง พบมีการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* การถ่ายทอดทางพันธุกรรมเป็นใน ลักษณะยีนด้อยบนออโตโซม (autosomal recessive) พบว่ามีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพแบบ ผิดปกติกระจายทั่วทั้งตับอ่อน (diffuse form) ต้องได้รับการรักษาโดยการผ่าตัด near total (95-98%) pancreatectomy ซึ่งส่งผลในระยะยาวจะมีความเสี่ยงสูงต่อการเป็นเบาหวาน มีเพียงบางรายงาน เท่านั้นที่มีการถ่ายทอดแบบ autosomal dominant¹²⁻¹⁴ ซึ่งจะมีอาการรุนแรงน้อยกว่า

Neonatal diabetes มีอุบัติการณ์ของโรคประมาณ 1:400,000 ของทารกแรกเกิดและอาจ พบสูงถึง 1:215,000 ในประเทศเชกโกสโลวาเกีย¹⁵ โดยประมาณร้อยละ 80 เกิดจากการกลาย พันธุ์ของยีน *KCNJ11* ในทางตรงกันข้ามกับ congenital hyperinsulinism¹⁶ การกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* ที่พบในผู้ป่วย ทำให้เพิ่มการทำงาน (activating mutations หรือ gain of function mutations) ทำให้เซลล์หลังอินซูลินได้ลดลง โรคเบาหวานชนิดนี้อาจมีอาการแสดงแบบ transient หรือ permanent ก็ได้ มักมีอาการรุนแรงเช่น diabetic ketoacidosis (DKA) ตั้งแต่เริ่มแรกของการ วินิจฉัย

วิธีการวิจัย (Procedure)

1. วิธีดำเนินการวิจัย

1.1 กลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุม

กลุ่มตัวอย่าง คือ ผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค neonatal diabetes mellitus และผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค congenital hyperinsulinism ซึ่งมารับการ ดูแลรักษาที่แผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ แต่ละครอบครัวจะได้รับการ

วิเคราะห์หึ่งสาวลี เพื่อหาสมาชิกครอบครัวที่อาจจะเป็นพาหะหรือมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรค

กลุ่มควบคุม คือ ผู้ที่ไม่เป็นโรสดังกล่าวและไม่มีประวัติสมาชิกอื่นๆในครอบครัวเป็นโรค ในกรณีที่พบมีการกลายพันธุ์ใหม่ของยีนดังกล่าวในผู้ป่วย จะมีการนำสารพันธุกรรม DNA จากกลุ่มควบคุมจำนวน 100 คน มาตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* เฉพาะตรงบริเวณที่พบการกลายพันธุ์ เป็นการยืนยันว่าการกลายพันธุ์ดังกล่าวสำคัญต่อการเกิดโรค ไม่ใช่ polymorphism

1.2 การยินยอมเข้าร่วมโครงการ

ใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยจะต้องได้รับจากผู้ป่วยหรือผู้ปกครอง

1.3 การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้เข้าร่วมการวิจัยใส่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง

1.4 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA)

Genomic DNA จะถูกสกัดจากเซลล์เม็ดเลือดขาว และวัดความเข้มข้นของ DNA เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

1.5 การเพิ่มปริมาณ DNA ส่วนที่ต้องการ โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

1.6 DNA sequencing ผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR (PCR products) จะถูกนำไปหาลำดับเบส

1.7 การวิเคราะห์หาค่าการกลายพันธุ์ (mutation analysis) โดยใช้โปรแกรม sequencer 4.2 demo version

ผลการวิจัย (Result)

ทีมผู้วิจัยได้รวบรวมผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค neonatal diabetes mellitus ซึ่งมารับการดูแลรักษาที่แผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ได้ 6 ครอบครัว ลักษณะทางคลินิกสรุปได้ดังในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยเด็กที่ได้รับการวินิจฉัยเบื้องต้นว่ามีภาวะเบาหวาน

	Case-1	Case-2	Case-3	Case-4	Case-5	Case-6
Characteristics						
Age	4 yr 3 mo	2 yr 11 mo	2 yr 4 mo	11 mo	11 mo	6 yr 10 mo
Gender	Female	Male	Female	Female	Female	Female

Gestation	Term	Term	Term	Term (twin A)	Term (twin B)	NA
Birth weight (grams)	2,800	3,180	2,120	1,150	1,200	2,500
Clinical findings						
Age of onset	3 mo	2 mo	1.5 mo	1 day	1 day	4 mo
Symptoms	DKA, seizure	Polyuria and polydipsia	Fever and diarrhea	hyperglycemia	hyperglycemia	DKA
Weight (kg)	5.10	5.20	4.30	1.15	1.20	5.18
Length (cm)	57	57	55	NA	NA	NA
Investigations						
Blood glucose (mg%)	785	High	898	330	400	801
HbA1c	10.6	7.8	5.4	NA	NA	7
C-peptide	NA	0.5	0.1	NA	NA	4.9

DKA, diabetic ketoacidosis; NA, not available

Neonatal diabetes เป็นโรคเบาหวานที่แสดงอาการในเด็กอายุน้อยกว่า 6 เดือน เกิดจากการกลายพันธุ์แบบ activation ของยีน *KCNJ11* และ *ABCC8* ซึ่งควบคุม subunit ของ inwardly rectifying potassium channel (Kir 6.2) และ plasma membrane sulfonylurea receptor (SUR1) ตามลำดับ โดยประมาณร้อยละ 80 เกิดจากการกลายพันธุ์ของ *KCNJ11*

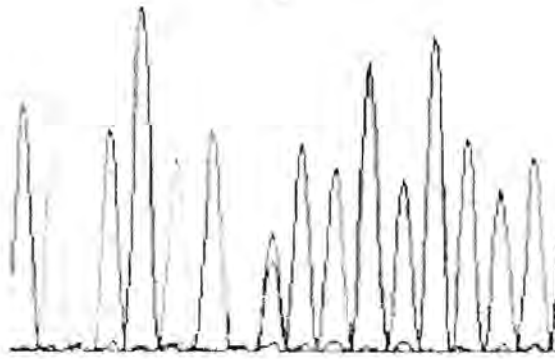
ผลการวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* ในผู้ป่วยเด็ก 6 รายที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค neonatal diabetes mellitus แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการกลายพันธุ์ที่พบในยีน *KCNJ11* ในผู้ป่วยเด็กที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค neonatal diabetes mellitus

Patient Mutation	Case-1	Case-2	Case-3	Case-4	Case-5	Case-6
c.67A>G (p.K23E) SNPs	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	A/G
c.570C>T (p.A190A) SNPs	C/T	T/T	T/T	T/T	T/T	C/T
c.601C>T (p.R201C) a known mutation	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
c.685G>A (p.E229K) a known mutation	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G	G/G
c.979G>A (p.V337I) SNPs	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	G/A

จากผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีน *KCNJ11* พบการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับโรคในผู้ป่วย 2 ราย ในจำนวนผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค neonatal diabetes mellitus ทั้งหมด 6 ราย การกลายพันธุ์ที่พบ ประกอบด้วยชนิด c.601C>T (p.R201C) ในผู้ป่วยรายที่ 1 (รูปที่ 2) และชนิด c.685G>A (p.E229K) ในผู้ป่วยรายที่ 3 ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่เคยมีรายงานมาก่อนในผู้ป่วยชนชาติอื่น สำหรับการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ชนิดอื่นซึ่งเป็น known polymorphism ได้แก่ c.67A>G (p.K23E), c.570C>T (p.A190A) และ c.979G>A (p.V337I) พบในผู้ป่วยทั้ง 6 ราย

c.601C>T (p.R201C)
 TCATGCTACGTGTGGGT
 T



รูปที่ 2 แสดงลักษณะการกลายพันธุ์ชนิด c.601C>T (p.R201C) ที่พบในยีน *KCNJ11*

นอกจากนี้ ยังพบว่า ผู้ป่วยที่พบมีการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* ทั้งผู้ป่วยรายที่ 1 และ 3 สามารถให้การรักษาด้วยยาในกลุ่ม sulfonylurea เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลให้อยู่ในเกณฑ์ปกติได้ สำหรับผู้ป่วยรายที่ 4, 5 และ 6 ซึ่งไม่พบมีการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* ไม่ตอบสนองต่อยาในกลุ่ม sulfonylurea จำเป็นต้องได้รับการรักษาโดยใช้อินซูลิน สำหรับผู้ป่วยรายที่ 2 ซึ่งไม่พบมีการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* แต่ตอบสนองได้ดีต่อยาในกลุ่ม sulfonylurea

ส่วนผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค congenital hyperinsulinism จำนวน 15 ราย แบ่งเป็นกลุ่มชนิด neonatal onset ซึ่งมีอาการแสดงภายใน 1 เดือนแรก จำนวน 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 47 และกลุ่มชนิด infantile onset ซึ่งมีอาการแสดงหลัง 1 เดือน จำนวน 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 53 ลักษณะอาการทางคลินิก สรุปได้ดังในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค congenital hyperinsulinism ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ชนิด neonatal onset และ ชนิด infantile onset

	Neonatal (N = 7)	Infantile (N = 8)	p-value
Age at onset (days) (Mean \pm SD)	2.88 \pm 5.03	116.25 \pm 71.15	N/A
Age at diagnosis (days) (Mean \pm SD)	38.29 \pm 52.84	182.5 \pm 113.89	N/A
Duration to diagnosis (days) (Mean \pm SD)	35.41 \pm 47.94	66.25 \pm 61.86	0.20
Birth weight (grams) (Mean \pm SD)	3905 \pm 925.45	3097.5 \pm 368.88	0.04
Seizure (%)	29	87.5	N/A
Cyanosis (%)	43	37.5	N/A
Lethargy/consciousness (%)	14	62.5	N/A

แสดงค่าเป็น mean \pm SD หรือเปอร์เซ็นต์และ p-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ: N/A. non applicable

สำหรับผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการและค่าสูงสุดของ glucose production rate (GPR) ที่ใช้ในการเพิ่มระดับน้ำตาล สรุปได้ดังในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงระดับอินซูลินและน้ำตาลในเลือดแรกวินิจฉัย ระดับน้ำตาลต่ำสุดและค่า GPR สูงสุดที่ให้อินผู้ป่วย

	Neonatal (Mean \pm SD)	Infantile (Mean \pm SD)	p-value
Insulin at diagnosis (μ U/L)	46.87 \pm 58.71	57.49 \pm 89	0.42
Blood sugar at diagnosis (mg/dL)	29.86 \pm 5.21	30.13 \pm 6.15	0.93
Lowest blood sugar	26.14 \pm 4.41	26.5 \pm 7.05	0.91
Max GPR	19.61 \pm 6.24	13 \pm 3.81	0.03

p-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จะเห็นได้ว่า ระดับฮอร์โมนอินซูลิน และระดับน้ำตาลในเลือดแรกวินิจฉัยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.42$ และ 0.93 ตามลำดับ) ในทั้ง 2 กลุ่ม

การรักษาพบว่า ต้องใช้ GPR สูงสุดในการที่จะทำให้คงระดับน้ำตาลได้ปกติในกลุ่ม neonatal onset คือ 19.61 ± 6.24 ขณะที่ในกลุ่ม infantile onset คือ 13 ± 3.81 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.03$)

สำหรับการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* ในผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค congenital hyperinsulinism ยังไม่พบการกลายพันธุ์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค

การอภิปรายผล (Discussion)

ผู้ป่วยในกลุ่ม neonatal diabetes มีทั้งหมด 6 ราย โดยทุกรายเริ่มมีอาการที่อายุน้อยกว่า 6 เดือนตามเกณฑ์การวินิจฉัย และลักษณะอาการและอาการแสดงเข้าได้กับ permanent neonatal diabetes ไม่มีลักษณะทางคลินิกของ DENT syndrome (developmental delay, epilepsy และ neonatal diabetes) ในผู้ป่วยจำนวน 6 ราย พบว่ามีเพียง 2 รายเท่านั้นที่มีภาวะ diabetic ketoacidosis เมื่อแรกวินิจฉัย จำนวน 3 รายมีอาการที่เกิดจากน้ำตาลในเลือดสูง เช่น polyuria, polydipsia เป็นต้น และ 1 รายตรวจพบโดยบังเอิญโดยที่ผู้ป่วยมารับการรักษาเนื่องจากมีไข้และถ่ายเหลว ผู้ป่วยร้อยละ 83.3 มีน้ำหนักแรกเกิดน้อยกว่า 2,500 กรัม การศึกษานี้ พบการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* 2 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 6 ราย คิดเป็นร้อยละ 33.3 เช่นเดียวกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ในชนชาติอื่นๆ ซึ่งพบการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* เป็นสาเหตุที่พบบ่อยที่สุดในผู้ป่วยที่มีลักษณะอาการเข้าได้กับ

permanent neonatal diabetes คือ ประมาณร้อยละ 30-50¹⁶⁻²⁰ นอกจากนี้ ประมาณร้อยละ 27²¹ เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *ABCC8* ดังนั้น มีความเป็นไปได้ว่า ผู้ป่วยอีก 4 รายที่ไม่พบมีการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* อาจจะมีการกลายพันธุ์ของยีน *ABCC8* ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไป ยังมีอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค แต่พบได้น้อยกว่าและสัมพันธ์กับกลุ่ม syndrome บางอย่าง เช่น pancreatic agenesis เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน insulin promoter factor-1 (*IPF-1*), Wolcott-Rallison syndrome เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *EIF2AK3*, X-linked neonatal diabetes and enteropathy and endocrinopathy (IPEX) จากการกลายพันธุ์ของยีน *FOXP3*, neonatal diabetes with cerebellar ataxia จากการกลายพันธุ์ของยีน *PTF1A*, neonatal diabetes with congenital hypothyroidism จากการกลายพันธุ์ของยีน *GLIS3* เนื่องจากผู้ป่วยที่อยู่ในการศึกษาไม่มีลักษณะของกลุ่มอาการดังกล่าวข้างต้นจึงมีโอกาสน้อยมากที่จะเกิดจากการกลายพันธุ์จากยีนเหล่านี้

ผู้ป่วยในกลุ่ม congenital hyperinsulinism ซึ่งเป็นภาวะที่มีระดับน้ำตาลในเลือดต่ำจากอินซูลินในกระแสเลือดสูง การศึกษานี้ พบผู้ป่วยจำนวน 15 รายที่มีลักษณะอาการเข้าได้กับ congenital hyperinsulinism อย่างไรก็ตาม จากการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* ในผู้ป่วยจำนวน 3 รายยังไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* จากการรายงานของ Verheul JC และคณะพบว่า ผู้ป่วย congenital hyperinsulinism จำนวน 15 ราย พบการกลายพันธุ์ของยีน *ABCC8* ร้อยละ 50, ยีน *KCNJ11* ร้อยละ 4.5, ยีน glucokinase (*GCK*) ร้อยละ 4.5 และยีน *GLUD1* ร้อยละ 9²² ดังนั้น จากข้อมูลดังกล่าว โอกาสที่จะพบการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* ในผู้ป่วยไทยอย่างน้อย 1 รายจาก 15 รายและถ้าตรวจการกลายพันธุ์ทั้ง 2 ยีน คือ *KCNJ11* และ *ABCC8* จะมีโอกาสพบถึงร้อยละ 50-80²³ นอกจากนี้ congenital hyperinsulinism อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนต่อไปนี้ซึ่งพบได้น้อยกว่า ได้แก่ glucokinase, glutamate dehydrogenase, the mitochondrial enzyme short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase เป็นต้น

ข้อสรุป (Conclusion)

การศึกษานี้ พบว่า การยืนยันการวินิจฉัยโดยการเริ่มต้นด้วยการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* มีประโยชน์ในการวินิจฉัย neonatal diabetes มากกว่า congenital hyperinsulinism เนื่องจาก มีโอกาสพบถึงร้อยละ 30 และมีประโยชน์ต่อการวางแผนการรักษา โดยผู้ป่วยที่พบมีการกลายพันธุ์ในยีน *KCNJ11* สามารถตอบสนองต่อการรักษาหรือระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยภาวะนี้สามารถควบคุมให้อยู่ในระดับที่ปกติได้ด้วยยาต้านปรมาณในกลุ่ม sulfonyluria เช่น glipizide ไม่จำเป็นต้องรักษาด้วยการฉีดอินซูลินเหมือนโรคเบาหวานชนิดที่ 1

สำหรับผู้ป่วยที่เป็น congenital hyperinsulinism นั้น พบการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* น้อยกว่ามาก การศึกษาต่อไป โดยการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น *ABCC8* อาจจะทำให้เข้าใจกลไกการเกิดโรคมมากขึ้น นำไปสู่การพัฒนายาที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

ข้อเสนอแนะ (Suggestion for further work)

สำหรับการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องในผู้ป่วย neonatal diabetes ถ้าไม่พบมีการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *ABCC8* เพิ่มเติมซึ่งพบได้บ่อยเป็นลำดับที่ 2 สามารถให้ได้การวินิจฉัยที่แน่นอนและมีประโยชน์ต่อการรักษาในระยะยาวเพื่อลดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวานได้

สำหรับการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องในผู้ป่วย congenital hyperinsulinism ถ้าไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *KCNJ11* การตรวจการกลายพันธุ์ของยีนอื่นๆ เช่น *ABCC8* อาจจะสามารถค้นหาปัจจัยทางพันธุกรรมของ congenital hyperinsulinism ได้

ผลการศึกษาที่ได้จากการวิจัยนี้ กลุ่มผู้วิจัยมีแผนที่จะเขียนบทความเพื่อเผยแพร่ในวารสารวิชาการหรือในการประชุมวิชาการต่อไป

เอกสารอ้างอิง (References)

1. Cosgrove KE, Shepherd RM, Fernandez EM, Natarajan A, Lindley KJ, Aynsley-Green A, Dunne MJ. Genetics and pathophysiology of hyperinsulinism in infancy. *Horm Res.* 2004; 61(6): 270-88.
2. Fernández-Marmiesse A, Salas A, Vega A, Fernández-Lorenzo JR, Barreiro J, Carracedo A. Mutation spectra of ABCC8 gene in Spanish patients with Hyperinsulinism of Infancy (HI). *Hum Mutat.* 2006; 27(2): 214.
3. Dunne MJ, Cosgrove KE, Shepherd RM, Aynsley-Green A, Lindley KJ. Hyperinsulinism in infancy: from basic science to clinical disease. *Physiol Rev.* 2004; 84(1): 239-75.
4. Darendeliler F, Bas F. Hyperinsulinism in infancy--genetic aspects. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2006 Aug;3 Suppl 3:521-6. Review. Erratum in: *Pediatr Endocrinol Rev.* 2007; 5(1): 470.
5. Darendeliler F, Fournet JC, Bas F, Junien C, Gross MS, Bundak R, Saka N, Günöz H. ABCC8 (SUR1) and KCNJ11 (KIR6.2) mutations in persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy and evaluation of different therapeutic measures. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2002; 15(7): 993-1000.
6. Taguchi T, Suita S, Ohkubo K, Ono J. Mutations in the sulfonylurea receptor gene in relation to the long-term outcome of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *J Pediatr Surg.* 2002; 37(4): 593-8.
7. Mazor-Aronovitch K, Gillis D, Lobel D, Hirsch HJ, Pinhas-Hamiel O, Modan-Moses D, Glaser B, Landau H. Long-term neurodevelopmental outcome in conservatively treated congenital hyperinsulinism. *Eur J Endocrinol.* 2007; 157(4): 491-7.

8. Patch AM, Flanagan SE, Boustred C, Hattersley AT, Ellard S. Mutations in the ABCC8 gene encoding the SUR1 subunit of the KATP channel cause transient neonatal diabetes, permanent neonatal diabetes or permanent diabetes diagnosed outside the neonatal period. *Diabetes Obes Metab.* 2007; 9 Suppl 2: 28-39.
9. Gussinyer M, Clemente M, Cebrián R, Yeste D, Albisu M, Carrascosa A. Glucose intolerance and diabetes are observed in the long-term follow-up of nonpancreatectomized patients with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy due to mutations in the ABCC8 gene. *Diabetes Care.* 2008; 31(6): 1257-9.
10. Abdulhadi-Atwan M, Bushmann J, Tornovsky-Babaey S, Perry A, Abu-Libdeh A, Glaser B, Shyng SL, Zangen DH. Novel de novo mutation in sulfonylurea receptor 1 presenting as hyperinsulinism in infancy followed by overt diabetes in early adolescence. *Diabetes.* 2008; 57(7): 1935-40.
11. Tarasov AI, Nicolson TJ, Riveline JP, Taneja TK, Baldwin SA, Baldwin JM, Charpentier G, Gautier JF, Froguel P, Vaxillaire M, Rutter GA. A rare mutation in ABCC8/SUR1 leading to altered ATP-sensitive K⁺ channel activity and beta-cell glucose sensing is associated with type 2 diabetes in adults. *Diabetes.* 2008; 57(6): 1595-604.
12. de Lonlay P, Giurgea I, Sempoux C, Touati G, Jaubert F, Rahier J, Ribeiro M, Brunelle F, Nihoul-Fékété C, Robert JJ, Saudubray JM, Stanley C, Bellanné-Chantelot C. Dominantly inherited hyperinsulinaemic hypoglycaemia. *J Inherit Metab Dis.* 2005; 28(3): 267-76.

13. Thornton PS, MacMullen C, Ganguly A, Ruchelli E, Steinkrauss L, Crane A, Aguilar-Bryan L, Stanley CA. Clinical and molecular characterization of a dominant form of congenital hyperinsulinism caused by a mutation in the high-affinity sulfonylurea receptor. *Diabetes*. 2003; 52(9): 2403-10.
14. Lin YW, MacMullen C, Ganguly A, Stanley CA, Shyng SL. A novel KCNJ11 mutation associated with congenital hyperinsulinism reduces the intrinsic open probability of beta-cell ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem*. 2006 ; 281(5): 3006-12.
15. Polak M, Shield J. Neonatal and very-early-onset diabetes mellitus. *Semin Neonatol*. 2004; 9(1): 59-65.
16. Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, Howard N, Srinivasan S, Silva JM, Molnes J, Edghill EL, Frayling TM, Temple IK, Mackay D, Shield JP, Sunnik Z, van Rhijn A, Wales JK, Clark P, Gorman S, Aisenberg J, Ellard S, Njolstad PR, Ashcroft FM, Hattersley AT. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med*. 2004; 350(18): 1838-49.
17. Sagen JV, Raeder H, Hathout E, Shehadeh N, Gudmundsson K, Baevre H, Abuelo D, Phornphutkul C, Molnes J, Bell GI, Gloyn AL, Hattersley AT, Molven A, Søvik O, Njolstad PR. Permanent neonatal diabetes due to mutations in KCNJ11 encoding Kir6.2: patient characteristics and initial response to sulfonylurea therapy. *Diabetes*. 2004; 53(10): 2713-8.

18. Vaxillaire M, Populaire C, Busiah K, Cavé H, Gloyn AL, Hattersley AT, Czernichow P, Froguel P, Polak M. Kir6.2 mutations are a common cause of permanent neonatal diabetes in a large cohort of French patients. *Diabetes*. 2004; 53(10): 2719-22.
19. Massa O, Iafusco D, D'Amato E, Gloyn AL, Hattersley AT, Pasquino B, Tonini G, Dammacco F, Zanette G, Meschi F, Porzio O, Bottazzo G, Crinó A, Lorini R, Cerutti F, Vanelli M, Barbetti F; Early Onset Diabetes Study Group of the Italian Society of Pediatric Endocrinology and Diabetology. KCNJ11 activating mutations in Italian patients with permanent neonatal diabetes. *Hum Mutat*. 2005; 25(1): 22-7.
20. Flanagan SE, Edghill EL, Gloyn AL, Ellard S, Hattersley AT. Mutations in KCNJ11, which encodes Kir6.2, are a common cause of diabetes diagnosed in the first 6 months of life, with the phenotype determined by genotype. *Diabetologia*. 2006; 49(6): 1190-7.
21. Ellard S, Flanagan SE, Girard CA, Patch AM, Harries LW, Parrish A, Edghill EL, Mackay DJ, Proks P, Shimomura K, Haberland H, Carson DJ, Shield JP, Hattersley AT, Ashcroft FM. Permanent neonatal diabetes caused by dominant, recessive, or compound heterozygous SUR1 mutations with opposite functional effects. *Am J Hum Genet*. 2007; 81(2): 375-82.
22. Verheul JC, Ris-Stalpers C, Bikker H, Bakker-van Waarde WM, Noordam C. Congenital hyperinsulinism in the north-east Netherlands. Clinical features and DNA diagnostics in 22 children. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 2011; 155(32): A3343.

23. Park SE, Flanagan SE, Hussain K, Ellard S, Shin CH, Yang SW. Characterization of ABCC8 and KCNJ11 gene mutations and phenotypes in Korean patients with congenital hyperinsulinism. *Eur J Endocrinol.* 2011; 164(6): 919-26.