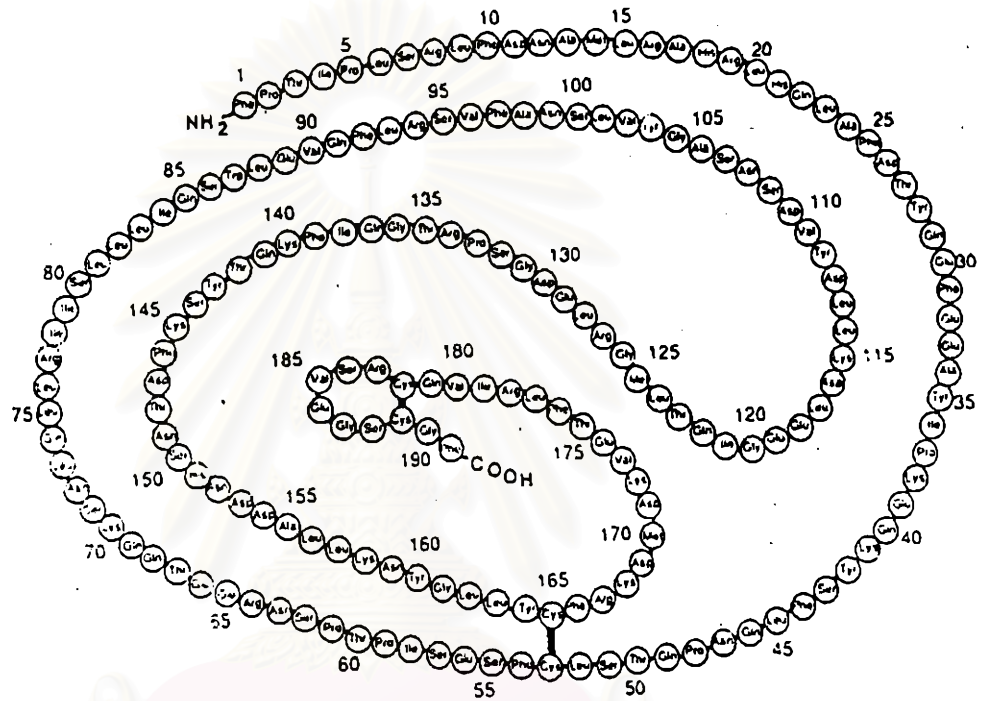


บทที่ 2

การตรวจสอบเอกสาร

โครงสร้างของฮอร์โมนเติบโต (Structure of Human Growth Hormone)

ฮอร์โมนเติบโตของมนุษย์ (human growth hormone; hGH หรือ somatotropin) เป็น globular protein ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 22 กิโลดาลตัน (kDa) ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว มีกรดอะมิโน 191 ตัว เชื่อมต่อกันด้วย 2 disulfide bridges และไม่มีส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต (รูปที่ 2.1) (Li และ Dixon, 1971) hGH ที่มาจากต่อมใต้สมองส่วนใหญ่จะมีน้ำหนักโมเลกุล 22 kDa แต่ก็พบว่ามีอีก 4 ชนิด นอกเหนือไปจากนี้คือ มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 45 kDa, 24 kDa (2 ชนิด) และ 20 kDa ตามลำดับ ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุล 45 kDa สามารถเปลี่ยนกลับไปเป็นชนิด 22 kDa ได้เมื่อได้รับ mercaptoethanol แต่จะพบได้ประมาณ 1% ของ hGH ที่แยกสารสกัดจากต่อมใต้สมอง (Frohman, Burek และ Stachura, 1972) ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุล 24 kDa เป็นผลมาจากการแตกตัวของชนิดที่มีน้ำหนัก 22 kDa ระหว่างกรดอะมิโนตัวที่ 139 และ 140 การทำลายพันธะเปปไทด์ จะทำให้โมเลกุลของ hGH เปลี่ยนไปเป็น 2 สาย ดังนั้นจึงทำให้โครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิเปลี่ยนไปด้วย จึงทำให้น้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น (Lewis และคณะ, 1980) ส่วนชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุล 24 kDa อีกชนิดหนึ่งนั้นจะอยู่ในรูป pre-hGH ที่ด้านปลายหมู่อะมิโน จะมี signal peptide ที่มีกรดอะมิโน 26 ตัว (น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2 kDa) signal นี้มีความสำคัญโดยตรงต่อการขนส่งโปรตีนที่สร้างขึ้นผ่านเยื่อหุ้ม RER (rough endoplasmic reticulum) ไปเก็บไว้ยัง cisternae (Lingappa และ Blobel, 1980) ชนิดสุดท้ายของ hGH ที่แปรเปลี่ยนไปพบได้ในต่อมใต้สมองส่วนหน้า มีน้ำหนักโมเลกุล 20 kDa และ 17.5 kDa ซึ่งจะต่างไปจากชนิดอื่นๆ คือมีการขาดหายไปกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 32 ถึง 46 หรือ แยกออก 3 ตามลำดับ ในระหว่างการสร้าง hGH-pre mRNA ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุล 20 kDa จะพบ 5-10% ของ hGH ทั้งหมดที่ได้จากต่อมใต้สมอง ส่วนชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุล 17.5 kDa จะพบน้อยมาก (Denoto, Moore และ Goodman, 1981) hGH ถูกสร้างขึ้นจาก somatotrophic cell ของต่อมใต้สมองส่วนหน้า ซึ่งมีประมาณ 40 - 50 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนเซลล์ทั้งหมดของต่อมใต้สมอง hGH นี้เป็นฮอร์โมนส่วนใหญ่ คิดเป็น 1-3% ของน้ำหนักต่อมใต้สมอง (Cryer และ Daughaday, 1977)



รูปที่ 2.1 แสดงลำดับกรดอะมิโนของ 22 kDa hGH

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัจจัยที่ควบคุมการสร้างและการหลั่ง hGH

การหลั่ง hGH เข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิต ถูกควบคุมโดยฮอร์โมนจาก hypothalamus 2 ชนิดคือ human growth hormone releasing hormone (GHRH) หรือ somatotinin และ growth hormone inhibiting factor (GHIF) หรือ somatostatin (Wehrenberg และคณะ, 1982) การหลั่ง hGH ไปยังระบบไหลเวียนทั่วร่างกายนั้นจะถูกกระตุ้นโดย GHRH และเนื่องมาจากการหลั่งเป็นจังหวะของ hypothalamic GHRH จึงเป็นเหตุให้รูปแบบการหลั่งของ hGH เป็นจังหวะเช่นกัน (Grossman, Savage และ Besser, 1986) somatostatin เป็น neuropeptide ซึ่งมีผลไปยับยั้งการหลั่ง hGH ขณะที่ GHRH และ GHIF ต่างก็ถูกทำให้เปลี่ยนแปลงโดยผลกระทบจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม และทางชีวภาพ คือ ความเครียด การนอนหลับ ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia), สารเคมีต่างๆ (L-dopa, chlorpromazine) และฮอร์โมน (androgens, estrogens, hGH และ vasopressin) ซึ่งจะไปมีผลโดยตรงต่อระบบประสาทส่วนกลาง และ hypothalamus (Martin, 1973) ในกรณีที่เกิดจากการนอนหลับซึ่งถือว่าเป็นปัจจัยหลักของการกระตุ้นทางสรีรวิทยาที่ทำให้เกิดการหลั่ง hGH แต่จะถูกยับยั้งได้จาก α - adrenergic blocking agent ซึ่งได้แก่ phentolamine และการหลั่ง hGH นี้จะถูกกระตุ้นโดย α - adrenergic agonists เช่น clonidine เอสโตรเจน จะส่งเสริมให้มีการหลั่ง hGH และในเพศชายการตอบสนองต่อ hGH จะเพิ่มมากขึ้นในช่วงเข้าสู่วัยรุ่น เนื่องจากฮอร์โมนแอนโดรเจน

ระดับ hGH ที่สูงมากจะไปมีผลยับยั้งการหลั่ง hGH ซึ่งเรียกว่าเป็น "negative feedback" ในขณะเดียวกัน ภายใต้ระดับ IGF-1 ต่ำๆ เช่น มีภาวะทุพโภชนาการรุนแรง อาจไปมีผลทำให้เพิ่มการหลั่ง hGH ได้ (Phillips และ Vassilopoulou, 1980)

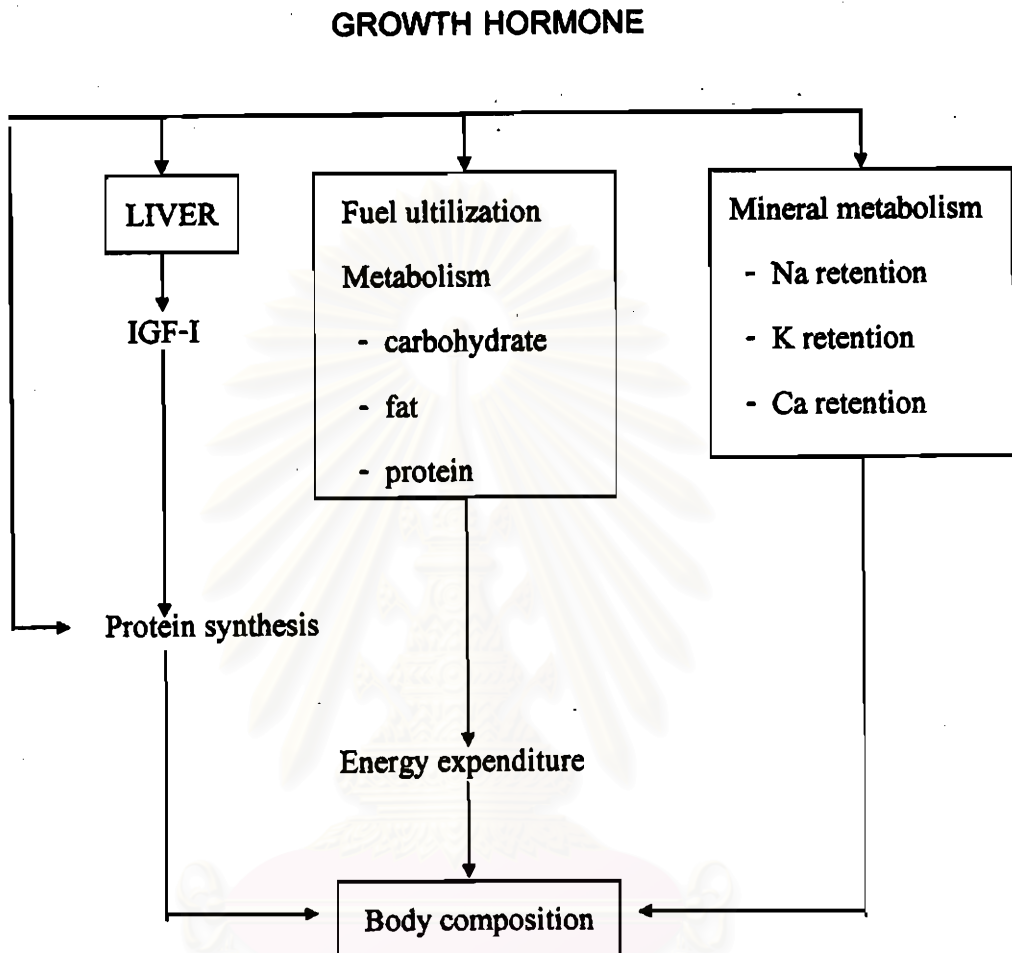
ความซับซ้อนในการเกิดปฏิสัมพันธ์ของหลายๆปัจจัยซึ่งควบคุมการสร้างและการหลั่ง hGH มีผลให้รูปแบบการหลั่ง hGH เป็นแบบจังหวะๆ หลังจาก 4 สัปดาห์แรกหลังคลอด ระดับของ hGH ในพลาสมาจะต่ำเกือบตลอด 24 ชั่วโมง การหลั่งเป็นจังหวะจะเกิดขึ้นเมื่อมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นทางสรีรวิทยาโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงเวลา 1 ชั่วโมง หลังการนอนหลับสนิท ในทำนองเดียวกันจังหวะของการหลั่งยังเกิดขึ้นเมื่อมีการออกกำลังกาย ความเครียด หรือการกินอาหารที่มีโปรตีนสูง เชื่อกันว่าการหลั่ง hGH เป็นจังหวะนี้มีบทบาทสำคัญต่อการกระตุ้นให้กระดูกมีการเจริญเติบโต และชักนำให้มีการสร้างโปรตีนและกล้ามเนื้อ (Devesa, Lima และ Tresguerrs, 1992) ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ hGH ในพลาสมา จากการติดตามตลอด 24 ชั่วโมง จะมีค่าประมาณ 2-4 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในผู้ใหญ่ ส่วนในเด็กและวัยรุ่นแรกๆจะมีค่า

ประมาณ 5-8 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และพบว่าค่าเฉลี่ยของการหลั่ง hGH ของชายหนุ่มตลอดช่วง 24 ชั่วโมง จะมีค่าประมาณ 1-2 มิลลิกรัม/วัน (Daughaday, 1985)

หน้าที่ของ hGH (Functional Properties of hGH)

hGH จะส่งเสริมการเจริญในระยะหลังคลอด โดยจะส่งผลหลายอย่างต่อเนื้อเยื่อ และโครงสร้างของร่างกาย โดยเฉพาะการเกิดเมตาบอลิซึมของเซลล์เกือบทั้งหมด กระบวนการในการออกฤทธิ์ของ hGH จะมีทั้งทางตรงและทางอ้อม ในทางตรง hGH จะแสดงออกโดยการจับกับ hGH receptors ของเซลล์โดยตรง ได้มีการวิจัยพบว่า hGH receptor ที่เนื้อเยื่อมนุษย์มีมากน้อยต่างกัน อวัยวะที่มี hGH receptors มากที่สุด ได้แก่ ตับ รองลงไปตามลำดับ คือ หัวใจ ไต ลำไส้ ปอด กล้ามเนื้อ ตับอ่อน สมอง ต่อมเพศ ม้าม ธัยมัส เซลล์สร้างเม็ดเลือดแดง และกระดูกอ่อน ในทางอ้อม hGH จะแสดงออกโดยผ่าน Insulin-like growth factors (IGFs) ซึ่งถูกเรียกว่า somatomedins (Phillips และ Vassilopoulou, 1980) IGF-I หรือที่เรียกว่า Somatomedin C ขึ้นกับระดับของ hGH ในระบบไหลเวียน IGF-I มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 7,649 Da ประกอบด้วยกรดอะมิโน 70 ตัว มี 3 disulfide bonds ที่ผ่านมาจะคิดว่าตับเป็นแหล่งแรกที่สร้าง IGF-I แต่ในปัจจุบันพบว่า IGF-I ถูกสร้างมาจากเนื้อเยื่อหลายชนิด ส่วน IGF-II จะไม่ค่อยขึ้นอยู่กับระดับของ hGH (Daughaday และ Rotwein, 1989) ลำดับโปรตีนของ IGF-I และ IGF-II จะคล้ายกับ proinsulin การสร้าง IGFs ไม่จำเป็นต้องใช้ hGH, อินซูลิน เทสโทสเตอโรน หรือไฮดรอกซิิน ได้เคยมีการทดลองกับ somatic และ cartilage พบว่าสามารถใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตได้เทียบเท่า hGH (Underwood และ D' Ercole, 1984) การควบคุมระดับของ IGF-I เป็นกระบวนการที่ซับซ้อน โดยถูกกระตุ้นจาก hGH, human chorionic somatomammotropin (hCS), human prolactin (hPRL), steroid hormones (รวมถึง glucocorticoids, estrogen และ androgen), thyroid hormones และ insulin และยังขึ้นอยู่กับภาวะโภชนาการ และภาวะของโรคอีกด้วย (Rosenfeld และคณะ, 1986) ดังแสดงในรูป 2.2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.2 แผนภูมิแสดงฤทธิ์ของ hGH ต่อ metabolism และ body composition

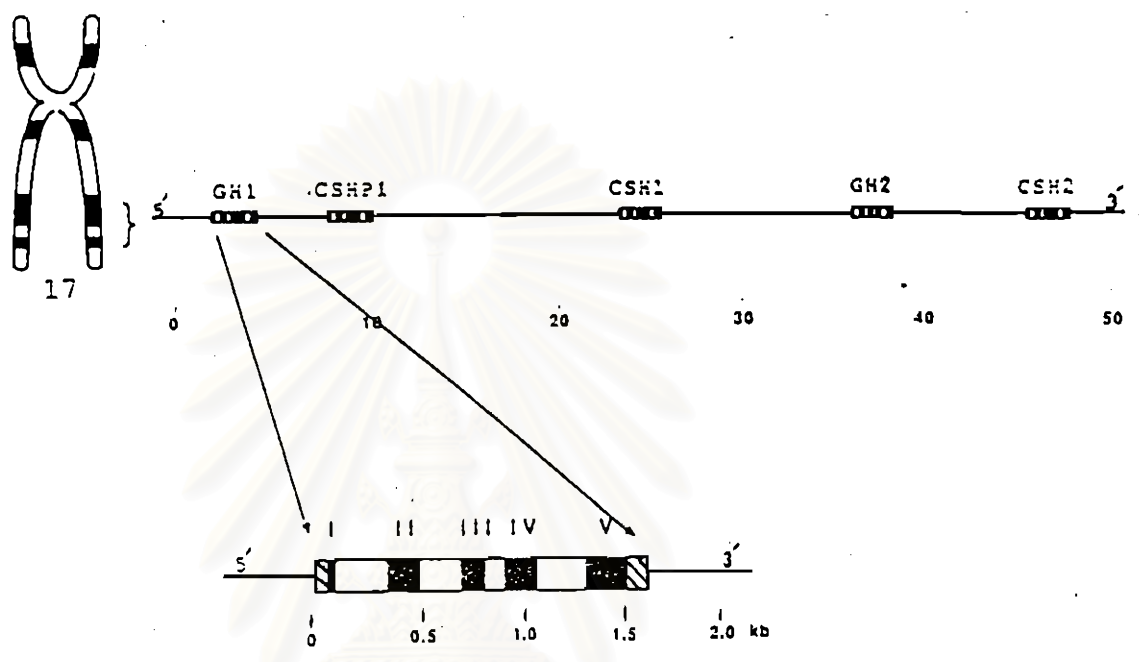
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงสร้างยีน hGH (hGH gene structure)

ยีน hGH มีความยาวประมาณ 50 กิโลเบส (kb) อยู่บนโครโมโซมที่ 17 (17q 22 - q24) กลุ่มของยีน hGH (hGH gene cluster) ประกอบด้วย 5 loci เรียงตามลำดับดังนี้คือ 5' - GH1 - CSHP1 - CSH1 - GH2 - CSH2 - 3' (รูปที่ 2.3) ยีน GH-1 จะควบคุมการสร้าง hGH ส่วน GH-2 ควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีกรดอะมิโน ต่างจาก hGH 13 ตัว ยีน CSH-1 และยีน CSH-2 จะควบคุมการสร้าง hCS แต่ยีน CSHP-1 จะควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนต่างจาก hCS 13 ตัว (Phillips และคณะ, 1982)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GH-1, CSHP-1, CSH-1, GH-2 และ CSH-2 จะแตกต่างกันออกไป เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco RI* จะได้ยีน GH-1 และ GH-2 มีความยาว 2.6 kb ยีน CSH-1 และ CSH-2 ยาว 2.9 kb และยีน CSHP-1 ยาว 9.5 kb ทั้ง 5 ยีน ต่างก็ประกอบไปด้วย 5 แอ็กซอน โดยมีอินทรอนขนาดเล็กกันอยู่ และมี immediate flanking, intervening และ coding sequences เหมือนกันประมาณ 92-98 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นในยีน CSHP-1 (Miller และ Eberhardt, 1983)

ยีน GH-1, GH-2, CSH-1, CSH-2 และ CSHP-1 มี promotor sequences CATAAA และ TATAAA อยู่ที่เบสตำแหน่งที่ 85 และ 30 ตามลำดับ upstream จากปลาย 5' - transcription initiation sites และมี AATAAA อยู่ที่เบสตำแหน่งที่ 20 upstream จากปลาย poly A 4 ยีนแรก จะควบคุมการสร้างกรดอะมิโน 217 ตัว แต่โปรตีนที่สร้างจาก CSHP-1 ยังไม่ทราบความยาวที่แน่นอน เพราะยังไม่พบว่ายีนนี้มี transcription หรือทำหน้าที่ใด ๆ (Hirt และคณะ, 1987) โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 217 ตัว แต่ละชนิดจะมีการเพิ่มกรดอะมิโนอีก 26 ตัว บริเวณ N-terminal ประกอบกันขึ้นเป็น signal peptide หรือ leader sequence ซึ่งมีความสำคัญในการขนส่งผ่านเนื้อเยื่อของ RER และในช่วงที่เกิดการขนส่งนี้ signal peptides จะถูกตัดออกจาก 24 kDa prehormones เพื่อกลายเป็น mature hormones ที่มีกรดอะมิโน 191 ตัว (22 kDa) (Lingappa และ Blobel, 1980)



รูปที่ 2.3 แสดง hGH gene cluster และตำแหน่งบนโครโมโซมแท่งที่ 17

(■ = exons, □ = introns และ ▨ = nontranslated sequence)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ยีน GH-1 ประกอบไปด้วย 5 แอ็กซอน และ 4 อินทรอน อินทรอนที่ 1, 2, 3 และ 4 มีความยาว 256, 209, 93 และ 253 bp ตามลำดับ แต่ละอินทรอนจะมีปลาย 5' - GT และ 3' - AG เหมือนกับใน intervening sequences ของยูคาริโอททั่วไป แอ็กซอนที่ 1 ประกอบด้วย 5' - untranslated sequence มีความยาว 60 bp ตั้งแต่ codons - 26 ถึง codons ที่ -24 และนิวคลีโอไทด์ตัวแรกของ codons ที่ -23 (codons -26 ถึง -1 จะ encode กรดอะมิโน 26 ตัวของ leader sequence ซึ่งมี codons -26 encode methionine ตัวแรก) แอ็กซอนที่ 2 จะ encode signal peptide ส่วนที่เหลือ และกรดอะมิโนในตัวที่ 1 ถึง 32 ของ mature hGH แอ็กซอนที่ 3, 4 และ 5 จะ encode กรดอะมิโนในตัวที่ 32 ถึง 71, 72 ถึง 126 และ 127 ถึง 191 ตามลำดับ และแอ็กซอนที่ 5 ยังรวมไปถึง 3' - flanking sequence อีก 112 bp ซึ่งจะสิ้นสุดที่ปลาย poly A (Hirt และคณะ, 1987)

ในการถอดรหัสของยีน GH-1, GH-2, CSH-1 และ CSH-2 ครั้งแรกจะได้รับความยาว 1,650 นิวคลีโอไทด์ ในกรณีของยีน CSH-1 และ CSH-2 เคยมีรายงานว่าจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสต่างกัน จุดเริ่มต้นของการถอดรหัสส่วนใหญ่จะอยู่ที่เบสตำแหน่งที่ 36 downstream จาก TATAAA และพบว่ามีประมาณ 5% ที่จุดเริ่มต้นของการถอดรหัสอยู่ที่เบสตำแหน่งที่ 30 downstream จาก CATAAA หรือเบสตำแหน่งที่ 55 upstream จาก TATAAA

hGH จะถูกสร้างและหลังจากต่อมาได้สมองส่วนหน้า ภายใต้ระบบการควบคุมที่สลับซับซ้อน ในระดับของการถอดรหัสเพื่อสังเคราะห์ hGH จะถูกทำให้เพิ่มขึ้นได้โดย thyroid hormone, glucocorticoids และ GHRH thyroid hormone receptor complex จะจับกับยีน GH-1 บริเวณเบสที่ -290 ถึง -129 upstream จาก transcription initiation site (Barlow และคณะ, 1986) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของ thyroid hormone ต่อ GH-1 โครมาติน ซึ่งจะทำให้เกิดการถอดรหัสได้ 4 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งที่ 1 จะอยู่ที่ 1,000 bp upstream จาก GH-1 promotor ตำแหน่งที่ 3 จะอยู่ในช่วง 200 เบสแรก upstream จากจุดที่เกิดการถอดรหัสเดิม ตำแหน่งที่ 2 จะอยู่ในบริเวณ TATA sequence และตำแหน่งที่ 4 จะอยู่ในอินทรอนแรก (Nyborg และ Spindler, 1986) ส่วน glucocorticoid receptor complexes มักจะจับกับยีน GH-1 บริเวณใกล้ๆ กับ 5' - flanking sequences และบริเวณอินทรอนแรก ผลที่เกิดจาก thyroid และ glucocorticoid hormones นั้นพบว่าไม่ขึ้นแก่กัน หรือไม่อาศัยกันและกันเลย ในทำนองเดียวกัน การชักนำให้เกิดการถอดรหัสของยีน GH-1 นั้น glucocorticoid อาจมีส่วนในการส่งเสริมการแสดงออกของยีน โดยผ่านทาง การเพิ่มความเสถียรของ mRNA (Paek และ Axel, 1987)

การขาดฮอร์โมนเติบโต (Growth hormone deficiency; GHD)

ผู้ป่วยที่ขาดฮอร์โมนเติบโต (GHD) ส่วนมากจะมีลำตัวที่ขี้วันและเตี้ย มักพบว่าคนเหล่านี้มักจะมีใบหน้าอ่อนกว่าวัย และมีระดับเสียงสูง (high - pitched) ในเพศชายจะพบว่ามียวัยวะเพศขนาดเล็ก (small genitalia) ซึ่งจะสัมพันธ์กับความบกพร่องของฮอร์โมนอื่นๆ ที่ผลิตจากต่อมใต้สมอง การวินิจฉัย GHD ต้องอาศัยน้ำหนักตัว ส่วนสูง รูปร่างของบิดา-มารดา ที่น้องร่วมสายโลหิต อายุของบุคคลเหล่านี้เมื่อเริ่มเข้าสู่วัยรุ่น อัตราการเจริญเติบโตตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ลักษณะรูปร่าง เกณฑ์อายุกระดูก และการตรวจร่างกายโดยละเอียด

ยังไม่มีวิธีการใดหรือการทดสอบจากห้องปฏิบัติการใดเลย ที่สามารถยืนยันถึงความแน่นอนของการแสดงออก หรือไม่แสดงออกของ GHD การทดสอบส่วนใหญ่จะใช้การวัดหาระดับของ GH โดยวิธี Radioimmunoassay (RIA) เนื่องจากระดับของ GH จะมีค่าต่ำตลอดช่วงระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้การสุ่มตัวอย่างเลือดเพียงตัวอย่างเดียวจะไม่เป็นผล ด้วยเหตุนี้การทดสอบโดยการกระตุ้นให้มีการหลั่ง GH จึงมีประโยชน์มาก ซึ่งอาจกระตุ้นโดยใช้การออกกำลังกาย, L-dopa, insulin หรือ arginine ถ้าทดสอบโดยการกระตุ้น 2 หรือมากกว่า 2 แบบ ยังไม่เพียงพอต่อการตอบสนองของการหลั่ง GH (ระดับ GH ในพลาสมาน้อยกว่า 7 ng/ml) จะถือว่าเป็น GHD ถ้าระดับ GH มีค่าอยู่ระหว่าง 7-15 ng/ml จัดเป็น partial deficiency และถ้ามากกว่า 15 ng/ml ถือว่าไม่บกพร่อง (Milner และ Burns, 1982)

เด็กที่ขาด GH มักจะเตี้ย มีสัดส่วนสมอายุ อาจเจริญเติบโตช้าตั้งแต่เกิดหรือช่วงวัยเด็กก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นกับสาเหตุและความรุนแรงของการขาด GH

ในปัจจุบันยังไม่มี การสำรวจถึงอุบัติการณ์ของ GHD ในประเทศไทย แต่มีผู้รายงานถึงความถี่ของการเกิด GHD ในประเทศอังกฤษพบว่า มีประมาณ 1:4,000 ถึง 1:10,000 (Vimpani และคณะ, 1977) ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักไม่ทราบสาเหตุ หรืออาจเกิดจากความผิดปกติหรืออันตรายที่บริเวณฮัยโปธาลามัส และต่อมพิทูอิทารี เช่น septo - optic dysplasia, head trauma, meningitis, cranial tumors, cranial irradiation, cerebral edema, congenital infections, histiocytosis X, chromosome anomalies เป็นต้น ในกรณีที่มิประวัติการแต่งงานในเครือญาติ หรือมีเด็กที่ขาด GH มากกว่าหนึ่งคนในครอบครัว ควรนึกถึงสาเหตุทางพันธุกรรม

การขาดฮอร์โมนเติบโตที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรม (hereditary growth hormone deficiency)

GHD มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ทั้งแบบ autosomal recessive, autosomal dominant และ X - linked recessive จากการศึกษาด้าน molecular biology ทำให้ทราบถึง molecular defects ของ ยีน GH ยีน Pit-1 และ ยีน GH receptor ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1. เกิดจากความผิดปกติทางโครงสร้างของยีน GH ได้แก่ การขาดหายไปของยีน (gene deletion) และการเกิด point mutation
2. เกิดจากความผิดปกติของยีนอื่นที่ไม่ใช่ยีน GH เช่น
 - 2.1 เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสในยีน growth hormone releasing hormone
 - 2.2 เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสใน transacting factor Pit-1 gene
 - 2.3 เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสยีนในที่มีผลต่อการตอบสนองของ GH receptor

Isolated Growth Hormone Deficiency (IGHD)

โรคขาดฮอร์โมนเติบโตกลุ่มที่มีชื่อว่า Isolated growth hormone deficiency (IGHD) ส่วนใหญ่เกิดจากการขาดหายไป หรือเกิด mutation ของยีน GH (Phillip III และคณะ, 1981) สามารถแบ่งได้เป็น 4 ชนิด ตามรูปแบบของการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ระดับการหลั่ง GH และการตอบสนองต่อการให้ GH ทดแทนจากภายนอก ดังจะเห็นได้จากตารางที่ 2.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 การจำแนกชนิดของ Isolated growth hormone deficiency

AR = autosomal recessive, AD = autosomal dominant

Disorder	Mode	DNA	Protein	Cell/organ
IGHD IA	AR	Deletions, frameshift, and non-sense mutations	GH absent	Absence of GH cause severe dwarfism. Patients often produce anti-GH antibodies when given GH
IGHD IB	AR	Splice site mutation	GH deficiency	Deficiency of GH causes dwarfism. Patients usually respond well to exogenous GH.
IGHD II	AD	Splice site mutation	GH deficiency	Deficiency of GH causes dwarfism. Patients usually respond well to exogenous GH.
IGHD III	X linked	Unknown	GH deficiency	Deficiency of GH causes dwarfism. Some also have hypogammaglobulinemia. Patients usually respond well to exogenous GH

Isolated GHD type IA (IGHD IA)

ผู้ป่วยเหล่านี้มี mutation หรือ deletion ของยีน GH-1 มีรูปร่างเล็กสั้นเมื่อแรกเกิด มักแสดงอาการน้ำตาลในเลือดต่ำ ถ้าเป็นชายจะมีอวัยวะเพศเล็ก การเจริญเติบโตจะช้าอย่างเห็นได้ชัดตั้งแต่อายุ 6 เดือน เป็นต้นไป ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีลำตัวสั้น ศีรษะโหนกกว้าง จมูกเล็ก โคนสั้นจมูกหักลง ลักษณะใบหน้าดังกล่าวคล้ายใบหน้าเด็ก Laron syndrome และ Pit-1 gene disorder การตรวจฮอร์โมนพบว่าเสริม GH ต่ำวัดไม่ได้ และเสริม IGF-I ก็มีค่าต่ำด้วย เมื่อได้รับ GH จากภายนอก เด็กจะตอบสนองเป็นปกติในระยะแรก ต่อมามีการสร้าง anti-GH antibody ทำให้ไม่มีการตอบสนองต่อ GH ในที่สุด (Illig และคณะ, 1971) เป็นที่น่าสนใจว่าผู้ป่วยที่มีการขาดหายไปของยีน GH-1 ขนาด 7.6 kb สามารถสนองตอบต่อ GH ได้ค่อนข้างดี โดยมี anti-GH antibody ไม่สูงนัก ส่วนผู้ป่วยที่มีการขาดหายไปของยีน GH-1 ขนาด 6.7 kb มักจะมีการสร้าง anti-GH antibody ได้สูง

มีรายงานเกี่ยวกับ prevalence ของ IGHD type IA Parks และคณะ (1989) พบว่าผู้ป่วย IGHD ชาวฮิว 5 คน จาก 13 คน (38%) มี GH-I gene deletion Kamijo และคณะ (1992) พบผู้ป่วย IGHD ชาวจีน 3 คน จากทั้งหมด 26 คน (12%) มี GH-I gene mutation Mullis และคณะ (1992) รายงาน prevalence ของ GH-1 gene deletion 3 คน (9%) จากผู้ป่วย IGHD ชาวยุโรปตอนเหนือ 32 คน, 3 คน (14%) จากผู้ป่วย IGHD ชาวเมดิเตอร์เรเนียน 22 คน และ 4 คน (17%) จากผู้ป่วย IGHD ชาวตุรกี 24 คน โดยทุกครอบครัวมีประวัติการแต่งงานในเครือญาติ การรักษาที่น่าจะให้ผลดีกับผู้ป่วยกลุ่มนี้ ได้แก่ การใช้ Synthetic IGF-I Nishi และคณะ (1993) ได้รายงานไว้ว่าการใช้ IGF-I กับผู้ป่วย IGHD type IA (6.7 kb deletion) ที่ไม่ตอบสนองต่อ GH และมี anti-GH antibodies ในระดับสูง พบว่าได้ผลดีต่อผู้ป่วยโดยทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น และ anti-GH antibodies มีระดับลดลง

Isolated GHD type IB (IGHD IB)

IGHD IB เป็น IGHD ที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ autosomal recessive ชนิดที่ 2 ความบกพร่องของ GH ชนิดนี้สามารถหลั่ง GH ได้เมื่อมีการกระตุ้น ซึ่งจะแตกต่างจาก IGHD IA ที่ไม่สามารถหลั่ง GH ได้

ผู้ป่วย IGHD IB แม้ว่าจะมีระดับ GH ที่ต่ำ แต่ก็สามารถตรวจวัดได้ และไม่มีการสร้าง anti-GH antibodies จึงตอบสนองได้ดีต่อการรักษาด้วย GH จากรายงานการศึกษาในผู้ป่วย IGHD IB ไม่พบว่ามีการเกิด GH-1 gene deletion แต่พบว่ามีการเกิด point mutation บริเวณ GH-1 gene ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิด IGHD IB รวมทั้งพบว่ามีการเกิด mutation บริเวณ locus อื่น ซึ่งไปมีผลต่อการสร้างและหลั่ง GHRH หรือไปมีผลต่อการเจริญของ somatotropic cell (Phillip และคณะ, 1982)

Cogan และคณะ (1993) ได้ศึกษาโดยวิธี DNA sequence analysis พบว่าในครอบครัวชาวซาอุดีอาระเบียที่มีความผิดปกติแบบ IGHD IB เกิดจาก mutation ของ นิวคลีโอไทด์ G→C (transversion) ที่บริเวณเบสตัวแรกของ donor splice site ของ อินทรอน 4 ซึ่งจะส่งผลต่อการเกิด splicing ของ GH-1 mRNA

Miller-Davis และคณะ (1993) พบว่ามีการเกิด mutation G→T ที่เบสเดียวกันของ donor splice site ในอินทรอน 4 ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิด IGHD IB เช่นกัน

Isolated GHD type II (IGHD II)

IGHD II เป็นความบกพร่องทางพันธุกรรมที่มีการถ่ายทอดแบบ autosomal dominant ความรุนแรงของ GHD จะขึ้นอยู่กับกรรมพันธุ์ ผู้ป่วยเหล่านี้มีแนวโน้มที่จะเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) แต่จะมีการตอบสนองได้ดีเมื่อมีการให้ GH ทดแทน

Cogan และคณะ (1993) ได้ศึกษาความผิดปกติของยีน GH-1 ที่ทำให้เกิด IGHD III โดยการวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสดำแหน่งที่ 6 บริเวณ donor splice site ของอินทรอน 3 ซึ่งส่งผลให้เกิด exon skipping หรือ เกิดการขาดหายไปของแอกซอน 3 และ cysteine (กรดอะมิโนตัวที่ 53) ซึ่งมีความสำคัญต่อการเกิด disulfide bond ภายในโมเลกุล ทำให้ GH protein ที่ได้เหลือเพียงส่วนที่เป็นแอกซอน 4, 5 และ signal peptide ซึ่งมีความสำคัญต่อการขนส่งไปยัง secretory granules และการที่มีทั้ง GH ที่ปกติ และ mutant อยู่ใน granules อาจเป็นไปได้ว่าการสร้าง disulfide bridges ภายในโมเลกุลจะไปยับยั้งการแสดงออกของโมเลกุล GH ปกติ

Isolated GHD type III (IGHD III)

IGHD III เป็นความบกพร่องทางพันธุกรรมที่มีการถ่ายทอดแบบ x-linked recessive จากการรายงานพบว่า ผู้ป่วย IGHD III ที่เป็นชายจะเกิดภาวะ hypogammaglobulinemia (มีความบกพร่องของ IgG, IgA, IgM และ IgE) และเมื่อทดสอบด้วยการกระตุ้นหลายๆ วิธี มีการตอบสนองโดยการหลั่ง GH ระดับไม่เกิน 5 ng/ml (Fleisher และคณะ, 1980) และมีผู้ป่วยรายหนึ่งซึ่งอยู่ระหว่างการรักษาด้วยการให้ GH ทดแทน พบว่ามีการสร้าง B lymphocytes ขึ้นมาในระบบไหลเวียน ในระดับที่สูงพอๆ กับ IgA, IgM และ IgE ซึ่งแตกต่างจากผู้ป่วย GHD แบบอื่นๆ เหตุผลดังกล่าวจึงน่าจะเป็นจริงที่ว่า IGHD III มีสาเหตุมาจาก mutation (หรือ deletion) ของโครโมโซม x ที่ประกอบด้วย 2 loci โดยมี 1 loci ที่จำเป็นต่อการสร้าง immunoglobulin และอีก 1 loci จำเป็นต่อการแสดงออกของ GH (Rapaport และ คณะ, 1986)

การศึกษาระดับอนุพันศาสตร์ในกลุ่มผู้ป่วย IGHD

ความผิดปกติของยีน GH-1 อันเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด IGHD สามารถจำแนกออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

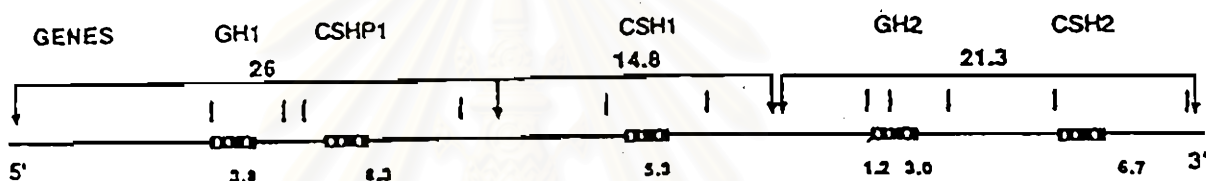
1. เกิดการขาดหายไปของยีนขนาดใหญ่ (large deletion)
2. เกิดจากการขาดหายไปของยีนขนาดเล็ก (small deletion) หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงเบส เพียงตำแหน่งเดียว (single base mutation)

Large Deletion

การขาดหายไปของยีน GH-1 ได้มีรายงานครั้งแรกโดย Illig (1970) จากการวิเคราะห์โดยวิธี Southern blotting ตัวอย่างดีเอ็นเอ จะถูกตัดโดยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ Bam HI และ Hind III จะให้ยีน GH-1 ปกติขนาด 3.8 kb และขนาด 26 kb ดังรูปที่ 2.4

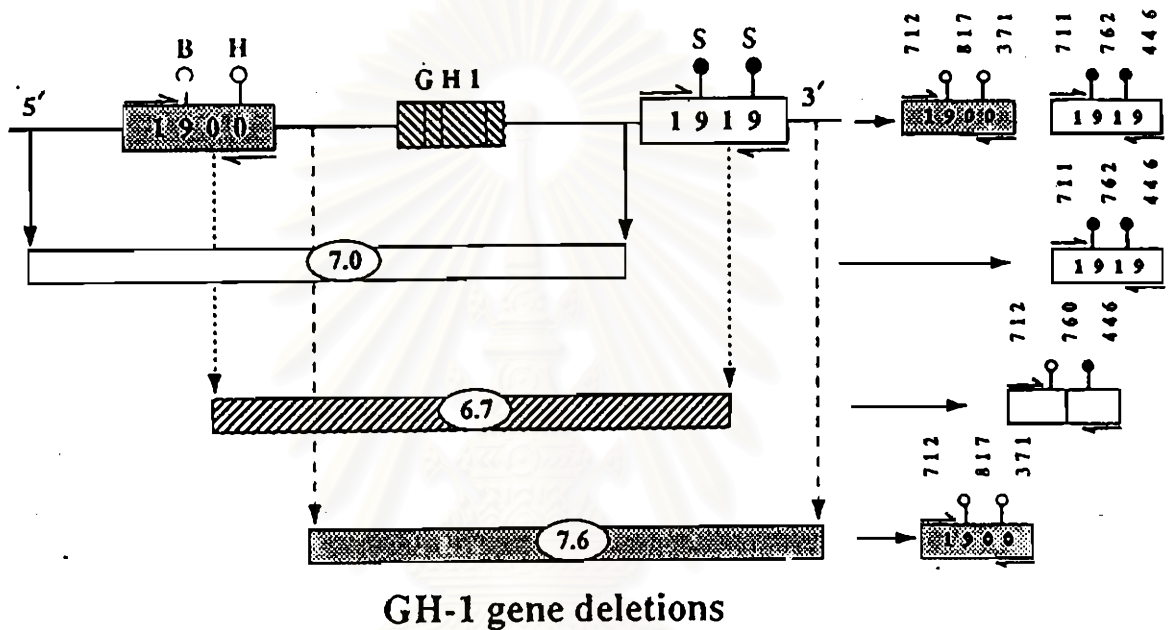
จากการศึกษาความผิดปกติของยีน GH-1 ด้วยวิธี Southern blot analysis ที่ผ่านมา พบว่าการขาดหายไปของยีน GH-1 ส่วนใหญ่จะมีขนาด 6.7, 7.0 และ 7.6 kb (ประมาณ 75% เป็นแบบ 6.7 kb) และจากการวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่า การขาดหายไปของยีน GH-1 จะเกี่ยวข้องกับส่วน flanking region ของยีน GH-1 (Vnencak - Jones, Phillips และ De-fen, 1990) ในปี 1991 จะได้มีการนำเทคนิคการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain

reaction; PCR) มาใช้ในการวิเคราะห์หาการขาดหายไปของยีน GH-1 (Kamijo และ Phillips, 1992) ซึ่งสะดวกและรวดเร็วกว่าการทำ Southern blot หลักการของ PCR คือการใช้ไพรเมอร์เพียงคู่เดียว ในการเพิ่มปริมาณส่วนที่เป็น flanking-region ทั้งด้านซ้ายและขวาของยีน GH-1 แล้วใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะอย่างเช่น *Sma* I *Hae* II และ *Bgl* I ในการบอกความแตกต่างระหว่าง regions ทั้งสองตำแหน่งได้ (Mullis และ Brickell, 1992) (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.4 แสดงตำแหน่งการตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Bam* HI บน growth hormone gene cluster

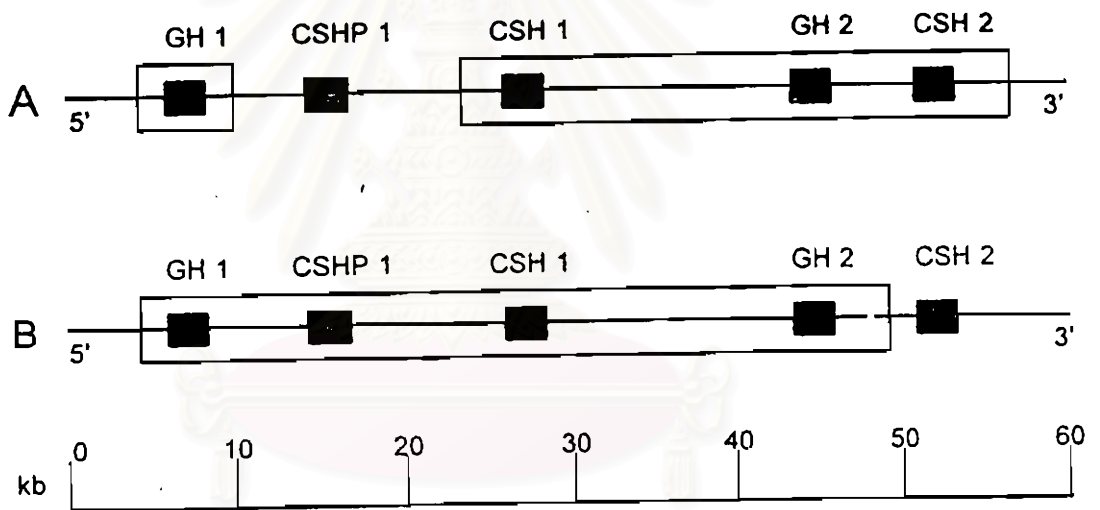
ตำแหน่งที่ตัดด้วย *Hind* III แสดงโดยใช้ลูกศร ส่วนตำแหน่งที่ตัดด้วย *Bam* HI แสดงโดยใช้เส้นตรง เมื่อ GH gene cluster ถูกตัดด้วย *Bam* HI จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ตามลำดับดังนี้คือ 8.3 kb (CSHP-1), 6.7 kb (CSH-2), 5.3 kb (CSH-1), 3.8 kb (GH-1), 3.0 และ 1.2 kb (GH-2) และเมื่อตัดด้วย *Hind* III จะได้ชิ้นส่วนขนาด 26 kb (GH-1 และ CSHP-1), 14.8 kb (CSH-1) และ 21.3 kb (GH-2 และ CSH-2) ตามลำดับ



รูปที่ 2.5 แสดงขนาดของ flanking region ของยีน GH-1 ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR และการขาดหายไปของยีนขนาดต่างๆ

ลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันระหว่าง 2 flanking region ของยีน GH-1 (ซ้าย-ขวา) สามารถเพิ่มปริมาณได้โดยใช้ไพรเมอร์เพียง 1 คู่ การขาดหายไปของยีนขนาด 7.0 kb จะไม่มีส่วนที่เป็นยีน GH-1 และ ชิ้นส่วนขนาด 1900 bp (ด้านซ้าย) การขาดหายไปของยีนขนาด 7.6 จะไม่มีส่วนที่เป็นยีน GH-1 และ ชิ้นส่วนขนาด 1919 bp (ด้านขวา) และการขาดหายไปของยีนขนาด 6.7 kb จะไม่มีส่วนที่เป็นยีน GH-1 และ บางส่วนของทั้งสอง flanking region จึงทำให้เกิดชิ้นส่วนใหม่ขนาด 1472 bp (B = *Bgl* I, H = *Hae* II และ S = *Sma* I)

ถึงแม้ว่าการใช้เทคนิค PCR ในการวิเคราะห์หาการเกิด deletion บริเวณ flanking regions จะสะดวก รวดเร็ว และปลอดภัยจากสารกัมมันตภาพรังสี แต่วิธีการนี้ก็ไม่สามารถใช้ได้กับการเกิด deletion ที่มีขนาดเล็กกว่าหรือใหญ่กว่า 7 kb Goossens และคณะ (1986) ได้รายงานถึงการเกิด deletion ของกลุ่มยีน GH ซึ่งยีนที่หายไปประกอบด้วย GH-1, CSH-1, GH-2 และ CSH-2 ต่อมา Akinci และคณะ (1992) ได้รายงานถึงการเกิด deletion ขนาดใหญ่ในเด็กชาว Kurdish โดยยีนที่หายไปเริ่มตั้งแต่ GH-1, CSHP-1, CSH-1 และ GH-2 เหลือเพียงยีน CSH-2 ทางด้านขวาเพียงยีนเดียว ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 แสดงการขาดหายไปของยีนขนาดใหญ่ ซึ่งไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยวิธี PCR

A: การเกิด deletion ของยีน GH-1, CSH-1, GH-2 และ CSH-2

B: การเกิด deletion ขนาด 45 kb ที่ประกอบด้วยยีน GH-1, CSHP-1, CSH-1 และ GH-2

Small deletion และ single - base mutation

จากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความผิดปกติของยีน GH-1 ของผู้วิจัยหลายๆกลุ่ม ต่างก็ได้ ออกแบบไพรเมอร์ที่จะนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน GH-1 เพื่อตรวจจรรยาความผิดปกติของ เบส หรือการขาดหายไปของยีนเพียงช่วงสั้นๆ

Duquesnoy และคณะ (1990) ได้รายงานถึงการเกิด deletion แบบ heterozygous ใน ผู้ป่วย IGHD จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี southern blot เขาพบว่ามี การขาดหายไปของยีนขนาด 6.7 kb และเมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสก็พบว่ามี การขาดหายไปของเบส 1 ตัว ในตำแหน่งที่เป็นรหัสของ cytosine จึงทำให้เกิด frameshift ของรหัสในการสังเคราะห์โปรตีน จึงไม่สามารถสร้างโปรตีนจาก GH-1 ที่สมบูรณ์ได้ ต่อมา Igarashi และคณะ (1993) ได้พบว่าการขาดหายไปของเบส 2 ตัว ในแอกซอน 3 ส่งผลให้เกิด stop codon ในแอกซอนถัดไป (codon 32)

Cogan และคณะ (1993) ได้ศึกษาความผิดปกติของยีน GH-1 ในครอบครัวชาวตุรกี ได้พบว่ามี การเปลี่ยนแปลงของเบสจาก G→A ซึ่งเป็นรหัสของ tryptophan โคดอนที่ 20 (TGG) กลายเป็น stop codon (TGA) จึงทำให้ไม่สามารถสร้าง GH-1 mRNA ที่สมบูรณ์ได้

Wang และคณะ (1994) ได้รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของเบสในตำแหน่งที่ -1, 3, 16 และ 25 พบว่าการเปลี่ยนแปลงของเบสในตำแหน่งที่ -1 (A→C) และ 3 (G→C) จะมีผลกระทบ ต่อจุดเริ่มต้นของการ transcription และ การเติม 5' cap ซึ่งจะรบกวนการสังเคราะห์โปรตีน ของ GH

Binder และ Ranke (1995) ได้พบ fragments สั้นๆ 3 ขนาด ซึ่งเกิดมาจากความผิดปกติ ในการ splicing ของยีน GH-1 ในระหว่างการ transcription ชนิดแรก จะมีการขาดหายไปของเบส 45 ตัวในแอกซอน 3 ชนิดที่ 2 จะมีการขาดหายไปของแอกซอน 3 ทั้งหมด และชนิดที่ 3 มีการขาดหายไปของทั้งแอกซอน 3 และ 4 ซึ่งความผิดปกติเหล่านี้เกิดเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของเบสตัวแรก G→C transversion บริเวณ donor splice site ของอินทรอน 3 ต่อมา Cogan และคณะ (1995) ได้ศึกษาในผู้ป่วยชาวสวีเดน, อเมริกาเหนือและแอฟริกาใต้ พบการเปลี่ยนแปลงของเบสตัวแรก G→A transitions บริเวณ donor splice site ของอินทรอน 3 การเกิด mutation แบบนี้จะทำลาย intron 3 donor splice site เกิดการกระโดดข้าม แอกซอน 3 ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนจาก mutant GH mRNA จึงได้ GH ที่ไม่สมบูรณ์ เนื่องมาจากขาดกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 32-71