บทที่ 1

บทนำ

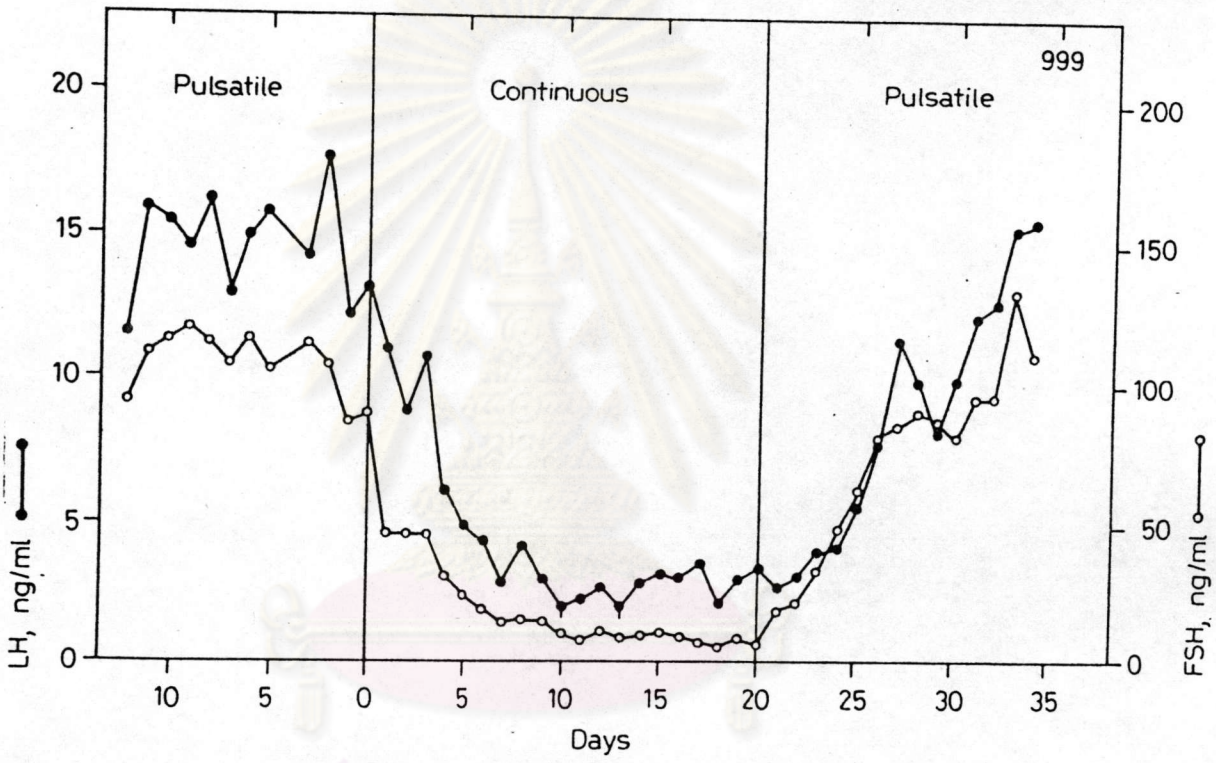
ในปี ค.ศ. 1971 Schally , Kastin และ Arimura และคณะได้ค้นพบโกนาโดโทรปินรีลีสซิ่ง ฮอร์โมน (Gonadotropin Releasing Hormone) หรือ GnRH และต่อมาก็สามารถหาโครงสร้างโมเลกุลของฮอร์โมนนี้ได้ ทันทีที่มีการค้นพบ GnRH ได้มีการนำฮอร์โมนนี้มาใช้สำหรับชักนำให้ไข่ตก โดยในปี ค.ศ. 1971 Kastin และคณะได้ใช้ GnRH เพื่อชักนำให้ไข่ตกในผู้ป่วย พบว่าสามารถทำให้มีไข่ตกและตั้งครรภ์ได้ แต่ผลสำเร็จของการรักษาส่วนใหญ่ยังต่ำ ความสนใจเกี่ยวกับการนำ GnRH ไปใช้ในการชักนำให้ไข่ตกจึงลดน้อยลง จนกระทั่งปี ค.ศ. 1980 Knobil ได้แสดงให้เห็นว่าการหลั่งของ GnRH ตามปกติที่เป็นจังหวะ (pulsatile) มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการหลั่งโกนาโดโทรปิน (LH, FSH) ของต่อมใต้สมองส่วนหน้า (รูปที่ 1) ทำให้มีการนำฮอร์โมนนี้มาใช้รักษาผู้ป่วยได้อย่างถูกวิธี ผลสำเร็จของการรักษาจึงดีขึ้นมาก ความสนใจเกี่ยวกับการชักนำให้ไข่ตกด้วย GnRH จึงกลับมาอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นมาก็มีการศึกษาเกี่ยวกับการให้ GnRH แบบเป็นจังหวะเป็นจำนวนมากในหลายประเทศ ซึ่งก็ยืนยันประสิทธิผลของ GnRH ในการชักนำให้ไข่ตก ต่อมานักวิทยาศาสตร์ได้พยายามสังเคราะห์ GnRH analogs เพื่อที่จะให้ได้โมเลกุลที่มีประสิทธิภาพสูง และมีอายุการทำงานนานกว่า GnRH ในสภาวะปกติ เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาและรักษาผู้ป่วยทั้งในด้านการส่งเสริมและการยับยั้งการเจริญพันธุ์

ในปัจจุบันก็ยังมีการนำ GnRH analogs มาเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางส่วน เพื่อปรับปรุงให้ได้ GnRH analog ที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

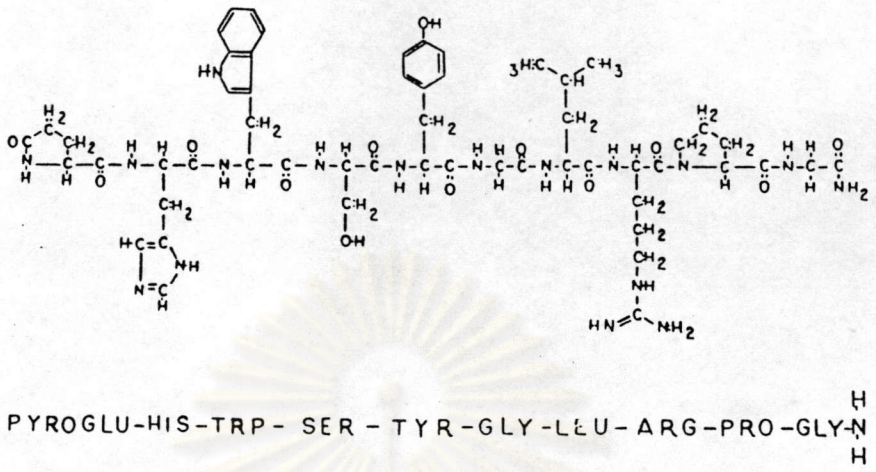
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>โครงสร้างและหน้าที่ของ GnRH</u>

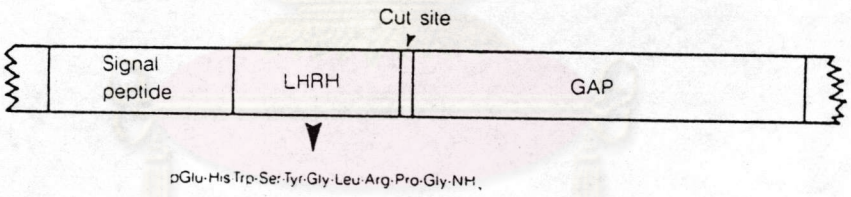
GnRH เป็นโปรตีนฮอร์โมนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 10 ตัวคือ Pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2 (Schally Kastin and Arimura 1971) (รูปที่ 2) ในกระบวนการสังเคราะห์ GnRH นั้น GnRH จะอยู่ใน ซี-ดีเอ็นเอ นิวคลีโอไทด์ ซีเควนซ์ ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 92 ตัวโดยแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ซิกแนล เปปไทด์, GnRH และ GnRH แอสโซซิเอต เปปไทด์ (GAP) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 56 ตัว (Fraser, 1988) (รูปที่ 3) GnRH ถูกสร้างที่อาร์คิวเอท นิวเคลียส บริเวณมีเดียนอีมิเน้นซ์ ที่สมองส่วนไฮโปทาลามัส (Hypothalamus) หลังไปยังเส้นเลือดไฮโปไฟเซียลพอร์ทัลและต่อไปยังต่อมใต้สมองส่วนหน้า (Clarke and Cummins, 1982)



รูปที่ 1 การศึกษาในสัตว์ทดลองที่ arcuate nucleus ถูกทำลายไปจนมีระดับ LH และ FSH ต่ำ ภายหลังเมื่อให้ GnRH แบบเป็นจังหวะทุก ๆ 60 นาที พบว่า จะมีการหลั่งของ LH และ FSH จากต่อมใต้สมองเป็นปกติ แต่เมื่อให้ GnRH อย่างต่อเนื่องระดับ LH และ FSH จะลดลง (Knobil, 1980)



รูปที่ 2 โครงสร้างของ GnRH (Schally, Kastin and Arimura 1971)



รูปที่ 3 ซี-ดีเอ็นเอ นิวคลีโอไทด์ ซีเควนซ์ (Fraser, 1988)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้าที่ของ GnRH คือ การควบคุมการหลั่งลูทิไนซ์ซิ่งฮอร์โมน (LH) และฟอลลิเคิล สติมมูเลทิ่ง ฮอร์โมน (FSH) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า (Schally et al., 1971)

<u>สรีรวิทยาการหลั่งของ GnRH</u>

GnRH มีการหลั่งแบบเป็นจังหวะและค่อนข้างต่อเนื่องจากมีเดียน อีมิเน้นซ์ (Mecann, 1962) ไปยังไฮโปไฟเซียล พอร์ทัล เวซเซลซ์ (hypophysial portal vessels) เราไม่สามารถตรวจวัดระดับ GnRH ในบริเวณระบบหมุนเวียนเลือดรอบนอกได้ เพราะมีปริมาณน้อยและมีระยะครึ่งชีวิตสั้น (Pimstone et al., 1977) และปริมาณ GnRH ที่ไฮโปไฟเซียล พอร์ทัล เวซเซลซ์ นั้นมีจำนวนจำกัด ดังนั้นถ้าจะดูสรีรวิทยาการหลั่ง GnRH จะต้องไปตรวจวัดการตอบสนองของต่อมใต้สมองด้วยการวัดระดับ LH โดยการเก็บตัวอย่างเลือดทุก ๆ 10-15 นาที ต่อมามีการศึกษาในแกะ โดย Clarke และ Cummins (1982) พบว่า peaks ของ GnRH ที่พอร์ทัลและ LH ที่จูกิวลาร์เวนส์ มีความสัมพันธ์ในแต่ละจังหวะการหลั่งของ LH ในซีรัม (Clayton, 1987) ความถี่ห่างและจำนวนของ GnRH ที่ตรวจพบในกระแสเลือดจะเปลี่ยนไปตามรอบระดู โดยในระยะใกล้ไข่ตกนั้น GnRH จะหลั่งถี่ขึ้นและมีจำนวนมากขึ้น (Elkind-Hirsch et al., 1984) ระยะถี่ห่างและขนาดของ GnRH pulse มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการหลั่งของ LH และ FSH Knobil (1980) ได้แสดงให้เห็นโดยการให้ GnRH ในลิงที่อาร์คิวเอท นิวเคลียส ถูกทำลายไป ซึ่งจะมีระดับ LH และ FSH ต่ำลง หากให้ GnRH แบบเป็นจังหวะแล้วจะพบว่า ต่อมใต้สมองสามารถหลั่งโกนาโดโทรปินได้ แต่ถ้าให้ GnRH อย่างต่อเนื่องในอัตราต่าง ๆ กัน จะได้ผลตรงข้ามคือ ไม่สามารถทำให้ต่อมใต้สมองหลั่งโกนาโดโทรปินออกมาได้ LH และ FSH ที่หลั่งจากต่อมใต้สมองจะมีการหลั่งแบบเป็นจังหวะเช่นเดียวกัน (Carmel, Araki and Ferin 1976) ขณะที่การหลั่งของ GnRH แบบเป็นจังหวะมีความสำคัญต่อการหลั่งโกนาโดโทรปินจากต่อมใต้สมอง แต่การหลั่งของ LH และ FSH ซึ่งโดยธรรมชาติจะหลั่งแบบเป็นจังหวะนั้นอาจเป็นสิ่งไม่จำเป็นสำหรับการทำงานของรังไข่ รังไข่จะสามารถตอบสนองต่อการรักษาด้วยโกนาโดโทรปินที่ออกฤทธิ์อยู่นานได้โดยไม่ได้ให้แบบเป็นจังหวะ (Thorner and Wakat, 1987) ระยะเวลาระหว่างการหลั่งของ LH แต่ละครั้งในผู้หญิงที่มีรอบระดูปกติจะแตกต่างกันไปตามเวลาต่าง ๆ ของรอบระดู ในระยะก่อนไข่ตกจะมีการหลั่งของ LH บ่อย แต่ภายหลังไข่ตกแล้วการหลั่งของ LH จะห่างออกเป็นทุก 4 ถึง 6 ชั่วโมงโดยประมาณ (Crowley et al., 1984)

กลไกการออกฤทธิ์

GnRH ที่หลั่งมาจากไฮโปทาลามัสส่วนใหญ่จะออกฤทธิ์ที่ต่อมใต้สมองส่วนหน้า ต่อมใต้สมองจะมีโกนาโดโทรพซึ่งเป็นเซลล์ที่สร้างและหลั่งโกนาโดโทรปิน ในแต่ละโกนาโด-โทรพจะมีรีเซฟเตอร์สำหรับ GnRH (Hazum and Conn, 1988)

กลไกการออกฤทธิ์ของ GnRH ต่อต่อมใต้สมองในการหลั่งโกนาโดโทรปินมีดังนี้คือ GnRH จะจับกับรีเซฟเตอร์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของโกนาโดโทรพรวมตัวเป็นฮอร์โมน-รีเซฟเตอร์คอมเพลกส์แล้วจะถูกนำเข้าไปในเซลล์ โดยมีโปรตีน จี 1 ช่วยทำให้กระบวนการนี้เกิดเร็วขึ้น หลังจากเข้าสู่เซลล์แล้วจะมีการกระตุ้นฟอสโฟไดเอสเตอเรสและฟอสโฟอินออซิทอล เพื่อให้ไปกระตุ้นโปรตีนไคเนสซี ขั้นตอนนี้ต้องอาศัยแคลเซียมอิออนจากภายนอกเซลล์เข้าช่วย การกระตุ้นโปรตีนไคเนสซีจะมีผลทำให้เกิดกระบวนการฟอสโฟรีเลชั่นของโปรตีนกลุ่มหนึ่งภายในเซลล์ ทำให้มีการสังเคราะห์โกนาโดโทรปินเกิดขึ้น ส่วนขั้นตอนการหลั่งโกนาโดโทรปินนั้น แคลเซียมอิออนจากภายนอกเซลล์จะไปกระตุ้นคัลโมดูลิน การกระตุ้นคัลโมดูลินนี้ทำให้เกิดการจับกับโปรตีน ซึ่งมีผลทำให้เกิดการหลั่งของโกนาโดโทรปิน (Huckle and Conn, 1988)

โกนาโดโทรปินที่หลั่งออกมาจะไปควบคุมการทำงานของอวัยวะสืบพันธุ์ (Hazum and Conn, 1988) นอกจากนี้ยังพบว่า GnRH สามารถออกฤทธิ์โดยตรงต่อรังไข่ โดยมีการพบรีเซฟเตอร์ของ GnRH ที่เซลล์แกรนูโลซาและทีคา ตลอดจนเซลล์ของคอร์ปัสลูเทียม GnRH จะยับยั้งการสร้างเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนจากเซลล์แกรนูโลซา GnRH มีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของไข่ ทำให้ไข่เกิดการแบ่งไมโอซิสอีกครั้งหนึ่ง ในระยะที่ใกล้ไข่ตก หลังจากหยุดพักไปเป็นระยะเวลานาน GnRH ยังอาจมีผลต่อมดลูกโดยตรง โดยอาจกระตุ้นหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของมดลูก ทั้งนี้ขึ้นกับขนาดและวิธีให้ GnRH (Hseuch and Jones, 1981) GnRH ไม่เพียงแต่ทำให้มีการหลั่งของโกนาโดโทรปินเท่านั้น แต่จะมีส่วนสำคัญในการสังเคราะห์ฮอร์โมนเหล่านี้ด้วย Liu และ Jackson (1978) ศึกษาในหนูพบว่า GnRH มีส่วนกระตุ้นการเพิ่มคาร์โบไฮเดรท เข้าไปในโมเลกุลของโกนาโดโทรปิน

GnRH analogs

ในปัจจุบันนี้ได้มีการสังเคราะห์ GnRH analogs ขึ้นมากมาย ซึ่งส่วนใหญ่จะมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่งที่ 6 GnRH analogs ส่วนใหญ่จะมีกรดอะมิโนทั้งหมด 9 ตัว ส่วนตำแหน่งที่ 10 ที่เป็นไกลซีนจะถูกแทนที่ด้วยเอธิลลาไม (Mclachlan, Healy and Burage 1986) การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของกรดอะมิโนแบบนี้ ทำให้ GnRH analogs ดังกล่าวมีสมบัติใหม่ คือ เพิ่มประสิทธิภาพในการจับกับรีเซฟเตอร์ที่ต่อมใต้สมอง (Loumaye, Naor and Catt

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1982) และเพิ่มการต่อต้านการทำลายกรดอะมิโนโดยเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนได้ (Swift and Crighton, 1979) GnRH เมื่อหลั่งมาในกระแสเลือดจะมีระยะครึ่งชีวิตสั้น ประมาณ 5.5 ถึง 8 นาที (Pimstone et al., 1977) หากพิจารณาถึงลักษณะโมเลกุลของ GnRH แล้ว จะพบว่าฮอร์โมนนี้น่าจะมีระยะครึ่งชีวิตยาว เนื่องจากกรดเพียวโรกลูตามิกที่ปลายโมเลกุลจะป้องกันการสลายตัวของสารนี้จากอะมิโนเปปติเดส และเอไมด์จะป้องกันหมู่คาร์บอกซิลจากการสลายโดยคาร์บอกซีเปปติเดส และเอไมด์จะป้องกันหมู่คาร์บอกซิลจากการสลายโดยคาร์บอกซีเปปติเดส แต่ GnRH ที่หลั่งออกมาจากไฮโปทาลามัสตามธรรมชาติจะมีระยะครึ่งชีวิตสั้น ทั้งนี้เพราะถูกทำลายอย่างรวดเร็วที่ตำแหน่ง Gly (6) และ Leu (7) โดยเอนโดเปปติเดสในสมอง (Koch, Baram and chobsieng 1974) เพราะฉะนั้นถ้ามีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 2 และ 3 จะได้สารที่มีรูปร่างคล้าย GnRH แต่ขาดคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต่อต่อมใต้สมอง และจะลดการทำงานของ GnRH โดยการแย่งจับกับรีเซฟเตอร์ของ GnRH ที่ต่อมใต้สมอง (Loumaye, Naor and Catt 1982) แต่ถ้าเปลี่ยนแปลง GnRH ที่ตำแหน่ง 6 และ 10 จะมีผลทำให้ GnRH ถูกทำลายช้าลงและจับกับรีเซฟเตอร์ได้ดี จึงออกฤทธิ์ได้นานขึ้น (Mclachlan, Healy and Burger 1986)

การเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของ GnRH ที่ตำแหน่ง 10 โดยทดแทนด้วยเอธิลลาไมด์ ($NE\text{-}CH_2CH_3$) จะทำให้ออกฤทธิ์ได้แรงเพิ่มขึ้น 5 เท่า (Fujino et al., 1972) ส่วนการทดแทน Gly ที่ตำแหน่งที่ 6 โดย D-Ala จะทำให้ GnRH analogs ออกฤทธิ์แรงกว่า GnRH ตามธรรมชาติ 3 ถึง 5 เท่า (Monahan et al., 1973) ดังนั้นหากมีการเปลี่ยนแปลงทั้งตำแหน่งที่ 6 และ 10 จะได้ GnRH analogs สามารถจับกับรีเซฟเตอร์ของ GnRH ที่ต่อมใต้สมองได้ดียิ่งขึ้น และมีความทนทานต่อเอนไซม์ต่าง ๆ ทำให้สามารถออกฤทธิ์ได้แรงกว่า GnRH ปกติถึง 15 เท่า (Coy et al., 1974) จากการประเมินฤทธิ์ของสารเหล่านี้บางตัวโดยอาศัยการยับยั้งอีสตรัสไซเคิลในสัตว์ทดลองพบว่าบูเซอรีลิน (ชื่อทางการค้าคือ suprefact) ออกฤทธิ์แรงกว่า GnRH ปกติถึง 100 เท่า (Mclachlan, Healy and Burger, 1986) ภายหลังการให้ GnRH ทันที ต่อมใต้สมองจะถูกกระตุ้นให้หลั่ง LH และ FSH มากขึ้นในระยะแรกเท่านั้น แต่ต่อมาการหลั่งฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองจะลดลง (Mclachlan et al., 1986)

<u>การหาฤทธิ์ของ GnRH ในการกระตุ้นการหลั่ง LH</u>

โดยใช้วิธีของ Ramirez และ McCann (1963) คือ ใช้หนูที่ตัดรังไข่ออกเป็นเวลา 1 เดือน ทำให้ LH มีการหลั่งเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากขาดการควบคุมแบบย้อนกลับเชิงลบ คือ เอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน ต่อมาจึงฉีดเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนเข้าไป เพื่อทำให้ระดับของ

LH ลดต่ำลง ทิ้งไว้ 3 วันแล้วฉีด GnRH analogs ซึ่งทำให้ระดับ LH เพิ่มขึ้นตามขนาดของ GnRH ที่ฉีดเข้าไป

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า GnRH analogs ที่มีการเปลี่ยนโมเลกุลในตำแหน่งที่ 10 เป็นเอธิลลาไมด์ จะทำให้ได้ GnRH analogs ที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์มากกว่า GnRH

สำหรับในการวิจัยครั้งนี้ เป็นการวิจัยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง LH ระหว่าง GnRH analogs ที่มีตำแหน่งที่เป็น D-Ala^{6} เหมือนกัน แต่ต่างกันที่ตำแหน่งสุดท้าย Pro^{9}- Gly NH_2 (ซึ่งเป็นปลายของ GnRH ปกติ) และ Pro^{9} ithylamide และ Pro^{9} diethylamide คือ D-Ala^{6} GnRH, D-Ala^{6} Pro^{9} ethylamide GnRH และ D-Ala^{6} Pro^{9} diethylamide GnRH ซึ่งเป็น GnRH analogs ที่สังเคราะห์ขึ้นโดย รศ.ดร. สุกัญญา วีรวัฒนะกุมพะ

<u>วัตถุประสงค์ของการวิจัย</u>

เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ GnRH analogs ชนิด D-Ala^{6} GnRH, D-Ala^{6} Pro^{9} ethylamide GnRH และ D-Ala^{6} Pro^{9} diethylamide GnRH ในการกระตุ้นการหลั่ง LH จากต่อมใต้สมองส่วนหน้าของหนูแรท

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย