หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

โปรแลคตินเป็นฮอร์โมน ที่สังเคราะห์จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า (Anterior lobe of pituitary) มีความสำคัญเกี่ยวกับการหลั่งน้ำนมทั้งในมนุษย์และสัตว์ โปรแลคตินมีอยู่หลายชื่อด้วยกัน เช่น lactogenic hormone, galactin หรือ mammotrophin. โปรแลคตินเป็นฮอร์โมนตัวแรก ที่มีการใช้หน่วยเป็น International unit (IU) โดยมีคำจำกัดความว่า 1 IU ของโปรแลคตินหมายถึง แอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) ของโปรแลคตินมาตรฐานหนัก 0.1 มิลลิกรัม

ในปี 1937 Lyons เป็นผู้เตรียมโปรแลคตินออกมาให้บริสุทธิ์ได้เป็นครั้งแรก โดยเตรียมจากต่อมใต้สมองของแกะ Li and Evans (1948) ได้สรุปผลการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ (physicochemical properties) พบว่าโปรแลคตินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25,000 มี isoelectric point เมื่อ pH เท่ากับ 5.73 และสามารถละลายในน้ำได้ในอัตราส่วน 0.102 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 7-8 °C.

ฮอร์โมนโปรแลคตินในคน เชื่อกันว่าทำให้ต่อมน้ำนมเจริญเติบโตและช่วยการหลั่งน้ำนม ในปี 1961 มีนักวิจัยสองกลุ่ม คือกลุ่มของ Chadwick, Folley and Gemzell และกลุ่มของ Ferguson and Wallace สามารถแยก human growth hormone (hGH) ออกมาได้บริสุทธิ์ และพบว่าฮอร์โมนที่แยกได้นี้ มีคุณสมบัติอินทรินสิคแลคโตเจนิค (intrinsic lactogenic activity) อยู่ด้วย ทำให้นักวิจัยเชื่อว่าจะต้องมีฮอร์โมนโปรแลคติน (hPRL) ปนอยู่กับ hGH เนื่องจาก hGH และhPRL เป็นเปปไทด์ฮอร์โมนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น โดยต่อมใต้สมองส่วนหน้าเหมือนกัน แต่ฮอร์โมนทั้งสองตัวมีคุณสมบัติต่างกัน ในปีเดียวกัน Wilhelmi พยายามแยกฮอร์โมน hPRL ออกจาก hGH แต่ไม่ประสบความสำเร็จ ต่อจากนั้นก็มีนักวิจัยพยายามที่จะแยกฮอร์โมนทั้งสองตัว

ออกจากกันโดยใช้วิธีต่าง ๆ ในปี 1970 Bewley and Li ได้รายงานถึงความพยายามในการแยกฮอร์โมนทั้งสองออกจากกัน แต่ก็ยังไม่ประสบความสำเร็จอีกเช่นเคย จนกระทั่งปีต่อมา Guyda and Friesen รายงานความสำเร็จในการแยกโปรแลคตินออกได้สำเร็จ ดังนั้นในปีเดียวกัน Lewis, Singh and Seavey ก็สามารถแยกโปรแลคตินออกได้ จากต่อมใต้สมองของคน (human pituitary gland) และในปี 1972 Hwang, Guyda and Friesen ก็พบความสำเร็จในการแยกโปรแลคตินของคนออกมาได้อย่างบริสุทธิ์เป็นครั้งแรก

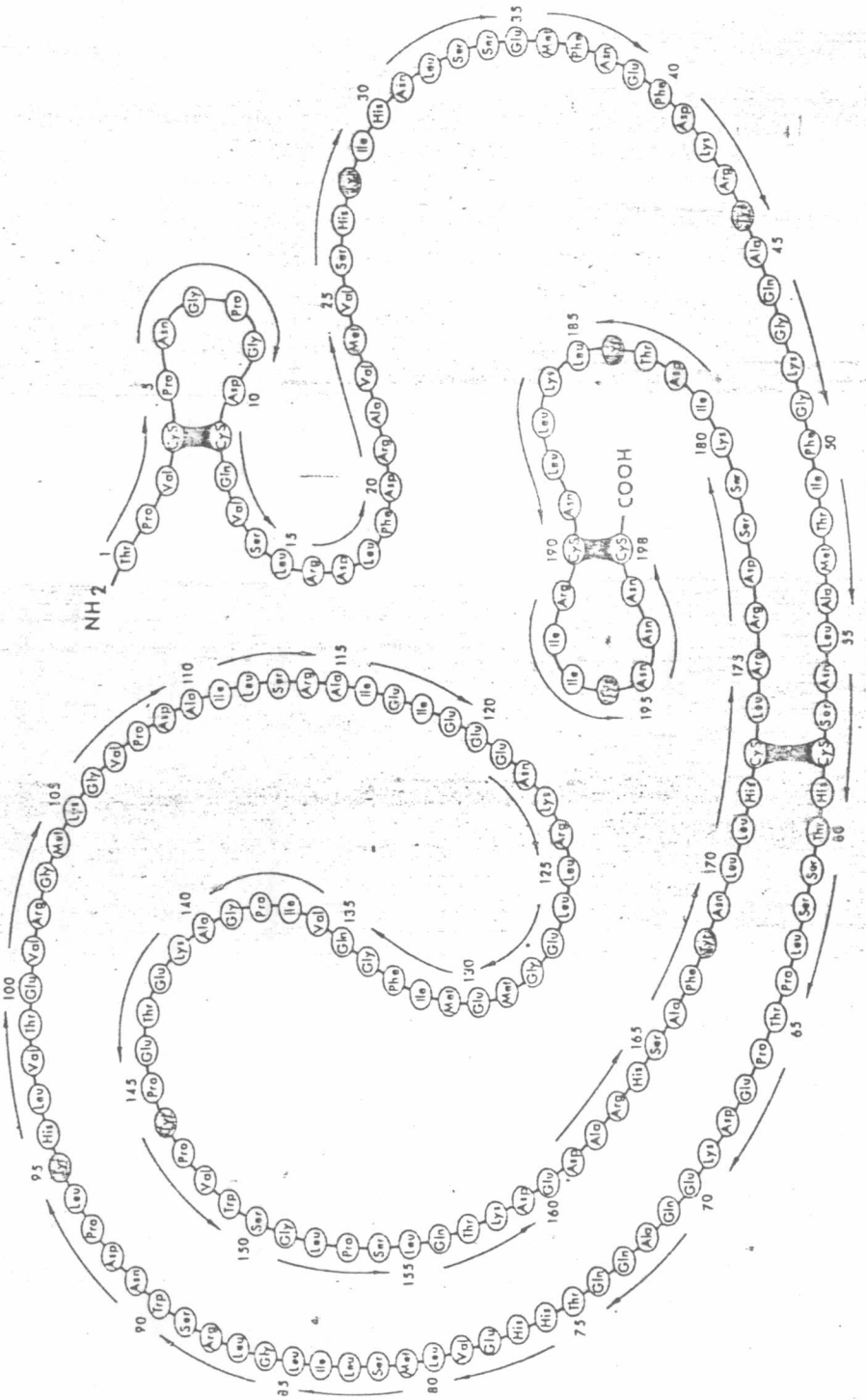
ในปี 1973 Naill และคนอื่น ๆ แสดงให้เห็นว่า hPRL เป็นโพลี่เปปไทด์เรียงตัวแถวเดียว (single polypeptide chain) เช่นเดียวกับโปรแลคตินที่ได้จากแกะ (ดูรูปที่ 1) แต่ต่างกันที่ hPRL มีแอมมิโนแอซิด leucine อยู่ที่แอมมิโนเทอร์มินอล (amino-terminal) ส่วนโปรแลคตินของแกะเป็นแอมมิโนแอซิด threonine นอกจากนี้ยังได้เปรียบเทียบการเรียงตัวของแอมิโนแอซิด (amino acid sequence) พบว่าแอมมิโนแอซิดตำแหน่งที่ 2 - 44 มีแอมมิโนแอซิดเหมือนกันในตำแหน่งที่ 2, 4, 5, 7, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 และ 44.

ปัจจุบันนี้ เป็นที่ทราบกันว่า hPRL มีบทบาททั้งในภาวะปกติและผิดปกติ มีนักวิจัยสนใจศึกษากันอย่างกว้างขวาง จึงควรทราบบทบาททั่ว ๆ ไปของโปรแลคตินในคนและสัตว์ ซึ่งพอสรุปได้ดังต่อไปนี้

1. การหลั่งน้ำนม (Lactation) Meites (1973) รายงานว่า hPRL มีบทบาทสำคัญต่อการหลั่งน้ำนม ในระยะต้นของการให้น้ำนมแก่ทารก และการดูดน้ำนมของทารก จะเป็นการกระตุ้นให้มีการหลั่งฮอร์โมนนี้ด้วย

2. การเจริญเติบโตของเต้านม (Mammary growth) Talwalker and Meites (1961) พบว่าโปรแลคตินมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเต้านม คือทำให้เกิด lobulo-aveolar growth ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ มีลักษณะ

รูปที่ 1 การเรียงตัวของแอมมิโนแอซิดของโมเลกุลของโปรแลคตินของแกะ (Ialow 1973)



เช่นเดียวกับการเจริญของเต้านม ในระยะสุดท้ายของการตั้งครรภ์

3. การเกิดเนื้องอกของเต้านม (Mammary tumorigenesis) Talwalker, Meites and Mizano (1964) พบว่าการเกิดเนื้องอกของเต้านมนั้น มิได้ขึ้นอยู่กับสารเคมีที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดมะเร็ง (chemical carcinogens) อย่างเดียว เนื้องอกของเต้านมจะเกิดขึ้นง่าย ก็ต่อเมื่อมีภาวะโปรแลคตินสูงร่วมด้วย ซึ่งในปี 1970 Welsch, Nagasawa and Meites ได้ทำการทดลองยืนยันเรื่องนี้อีกครั้ง

4. การกระตุ้นให้สร้าง corpus luteum Meites (1973) รายงานว่าโปรแลคตินจะทำงานร่วมกับ LH และ FSH เพียงอย่างหนึ่งอย่างใด หรือทั้งสองอย่าง ในการกระตุ้นรังไข่ให้เกิด ovarian luteal function ในสัตว์จำพวกหนู แต่โปรแลคตินไม่มีบทบาทการสร้าง corpus luteum ในคน

5. บทบาทของโปรแลคตินในเพศชาย Meites (1973) รายงานว่าโปรแลคตินทำงานร่วมกับฮอร์โมนแอนโดรเจน ช่วยทำให้ ventral and dorsolateral prostate เจริญเติบโตขึ้นได้ Bartsch, Horst, and Nehse (1977) พบว่า 15% ของชายที่เป็นมะเร็งของต่อมลูกหมาก จะมีปริมาณโปรแลคตินสูงมากขึ้นกว่าปกติ

6. บทบาทที่มีต่อสัตว์ที่ไม่ได้เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม โปรแลคตินมีบทบาทต่อ crop gland ของนกพิราป โดยกระตุ้นให้สร้าง epithelial cells ของ crop sac มากขึ้นอย่างรวดเร็ว

Frantz, Kleinberg and Noel (1972) รายงานว่า L-dopa มีฤทธิ์ต่อต้านการหลั่งโปรแลคติน ทำให้ปริมาณโปรแลคตินในเลือดลดลง จากการศึกษาของ Archer เกี่ยวกับฤทธิ์ของยาหลายชนิด ที่เป็นสาเหตุทำให้ปริมาณโปรแลคตินในเลือดสูง ได้สรุปไว้ในปี 1977 ว่ายากล่อมอารมณ์ (transquilizer) หลายชนิด ทำให้เกิดภาวะโปรแลคตินในเลือดสูง อาทิเช่น Meprobamate และยาจำพวก tricyclic anti-depressants นอกจากนี้ยังมียาชนิดอื่น ๆ อีกเช่น Amphetamine, Isoniazid และยา

ที่ใช้เป็นยาคุมกำเนิด (contraceptives) เช่น Eugynon^{R} ประกอบด้วย Norgestrel และ ethinyl oestradiol เป็นต้น

โปรแลคตินมีบทบาทสำคัญหลายประการ จึงอยู่ในความสนใจของนักวิจัยโดยทั่วไปอย่างแพร่หลาย ดังนั้นจึงพบว่ามีวิธีที่ใช้ตรวจหาโปรแลคตินมากมายหลายวิธี สามารถแบ่งวิธีการตรวจออกเป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ

1. Biological assay or Bioassay
2. Immunological assay

1. Biological assay วิธีการตรวจหาปริมาณแบบนี้ อาศัยคุณสมบัติของโปรแลคตินที่มีบทบาทต่อสัตว์ทดลอง ยังแบ่งออกได้อีก คือ

ก. Crop sac method เป็นวิธีตรวจที่อาศัยบทบาทของโปรแลคตินต่อ crop sac ของนกพิราป มีเทคนิคการทำต่างกันดังนี้

1) The crop weight method เป็นวิธีของ Riddle, Bate and Dykshorn (1933) โดยการฉีดโปรแลคตินเข้าเส้นเลือดดำ เป็นเวลาสี่วันติดต่อกัน วันที่ห้าให้ตัด crop sac มาชั่งน้ำหนัก

2) The "minimum stimulation" method เป็นวิธีของ McShan and Turner (1936) ทำโดยการฉีดโปรแลคตินเข้าใต้ผิวหนัง ภายหลังจากฉีดแล้ว 96 ชม. นำ crop sac มาส่องดูความหนาของ mucosa วิธีนี้ไม่ใช้เป็นแบบปริมาณวิเคราะห์

3) The local intradermal method เป็นวิธีของ Lyons and Page (1942) ตรวจหาปริมาณโปรแลคตินโดยการฉีดสารที่ต้องการตรวจ เข้า crop sac โดยตรง แล้วดูการเปลี่ยนแปลงของ basophil ใน cytoplasm.

ข. Mammary proliferation test เป็นวิธีของ Hadfield (1956, 1957) ดัดแปลงเพื่อใช้ตรวจหาโปรแลคตินในปัสสาวะของหญิงหมดประจำเดือน (postmenopausal

women) โดยดูการเปลี่ยนแปลงของ mammary epithelium ในลูกหนู mice เพศผู้

ค. Luteotrophic method เป็นวิธีของ Kovacic (1968) วิธีนี้ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ เนื่องจากมีความจำเพาะต่ำ เพราะฮอร์โมนหลายชนิดให้บทบาทเช่นเดียวกัน

ง. Lactational method เป็นวิธีที่ใช้สำหรับการตรวจหาปริมาณโปรแลคตินโดยการตรวจดูการผลิตน้ำนมในmammary gland ของกระต่ายหลังจากฉีดโปรแลคตินเข้าแบบ intraductal (Loraine, and Bell 1966)

2. Immunological assay เป็นวิธีตรวจหาปริมาณโปรแลคติน โดยอาศัยการทำปฏิกริยาระหว่างแอนตีเจน (antigen) และแอนตีบอดี (antibody)ได้มีผู้ใช้เทคนิคการตรวจด้วยวิธีนี้ หลายเทคนิคด้วยกันอาทิ เช่น

ก. Hemagglutination - inhibition technique (Levy and Sampliner 1961)

ข. Immunoprecipitation technique (Hayashida 1962)

ค. Immunodiffusion technique (Sinha และคนอื่น ๆ 1973)

ง. Radioimmunoassay technique

เนื่องจากวิธีการตรวจหาปริมาณโปรแลคติน โดยวิธีต่าง ๆดังกล่าวมาแล้วข้างต้น ยกเว้นเรดิโออิมมูโนแอสเส ส่วนใหญ่มักเป็นการตรวจได้เฉพาะคุณภาพ บางวิธีอาจตรวจได้ทั้งคุณภาพและปริมาณ แต่มักจะเป็นวิธีที่ค่อนข้างจะยุ่งยาก ใช้เวลาสำหรับการตรวจนาน บางวิธีไม่มีความจำเพาะ และความไวของการตรวจไม่สูงพอ สำหรับวิธีของเรดิโออิมมูโนแอสเส เป็นวิธีที่ทำง่าย สะดวก รวดเร็ว และมีความจำเพาะและความไวสูง ในปี 1967 Arai and Lee ได้ใช้วิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสตรวจหาปริมาณโปรแลค-

ตินในแพะและแกะ ส่วนการตรวจหาปริมาณโปรแลคตินในคน โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเส อย่างจริงจังนั้น เริ่มโดย Friesen and Guyda (1971); Jacobs, Mariz and Daughaday (1972); Sinha และคนอื่น ๆ (1973) และ Aubert และคนอื่น ๆ (1974)

วิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสเป็นวิธีแอสเสอาศัยหลักการ การแย่งการทำปฏิกริยาระหว่าง แอนตีเจนที่ต้องการหาปริมาณ(P) และแอนตีเจนชนิดเดียวกันกับที่ต้องการหาที่ได้ดัดแปลง(P*) กับแอนตีบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนตีเจนนั้น(Q) ทำให้ได้โมเลกุลผสมของแอนตีเจน-แอนตีบอดี (antigen-antibody complex, PQ และ P*Q) Ekins (1970,1974) อธิบายว่าปฏิกริยาที่เกิดขึ้น เป็นปฏิกริยากลับไปกลับมาได้ (reversible reaction) เมื่อปฏิกริยาอยู่ในสภาวะสมดุลย์ สามารถเขียนปฏิกริยาที่เกิดขึ้นเป็นสมการได้ดังนี้

$$P + P^* + Q \rightleftharpoons PQ + P^*Q$$

P และ P* เป็นแอนตีเจนที่ต้องการหาปริมาณและแอนตีเจนชนิดเดียวกันกับที่ต้องการหาที่ได้ดัดแปลก (free form)

Q เป็นแอนตีบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนตีเจน

PQ และ P*Q เป็นโมเลกุลผสมของแอนตีเจน-แอนตีบอดี (bound form)

จากสมการ เมื่อให้ P* และ Q มีความเข้มข้นคงที่ และให้ P เป็นตัวที่เข้าแย่งทำปฏิกริยากับ Q ถ้ามี P มากการเกิด PQ ก็มีมาก ทำให้การเกิด P*Q (bound form) ลดลงและมี P*(free form) ในหลอดทำปฏิกริยาเหลือมากขึ้น การกระจาย free form และ bound form นั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของ P การวัดปริมาณของ P ในสารตัวอย่างใด ๆ ทำได้โดยการเปรียบเทียบการกระจายของ free และ bound form เมื่อสารมาตรฐานชนิดเดียวกันที่ทราบปริมาณแน่นอน กับสารตัวอย่าง การติดตามการกระจายของ free และ bound form ทำได้จะต้องมีวิธีสำหรับแยก forms ทั้งสองออกจากกัน วิธีการที่ใช้แยกมีหลายวิธีด้วยกัน วิธีที่นิยมใช้ในการทำเรดิโออิมมูโนแอสเสสำหรับเปปไทด์

ธอร์โมนก็คือ **double antibody technique** เป็นวิธีที่ใช้แอนติบอดีตัวที่สองซึ่งเป็นแกมมาโกลบูลินสำหรับตกตะกอน **bound form** แล้วแยกออกจาก **free form** โดยการปั่นแยกส่วนที่ไม่ตกตะกอนออก

แต่เนื่องจากวิธีที่ใช้แอนติบอดีตัวที่สอง เป็นวิธีที่ต้องใช้เวลาในการทำนานและเสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ผงถ่านดูดซับ **free form** ซึ่งสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและใช้เวลาในการทำน้อยกว่า

ดังนั้นได้เลือกใช้ไอโอดีน-125 ในการติดสลากโปรแลคติน และทำการตรวจวัดปริมาณโปรแลคตินโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเส ใช้เทคนิคในการแยก **free form** ออกจาก **bound form** โดยใช้ผงถ่านดูดซับ **free form** วิธีนี้อาจจะมีประโยชน์ต่อวงการแพทย์ ซึ่งต้องการวิธีการตรวจที่เสียค่าใช้จ่ายน้อย และรวดเร็ว เพื่อนำไปใช้ในการวินิจฉัยและติดตามการรักษาโรค.