ระดับโกรธออร์โมนในเด็กและวัยรุ่นไทยปกติ และที่เป็นโรคธาลัสซีเมีย

นางสาวศิริรัตน์ พลอยบุตร

005031

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
แผนกวิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2517

I 17476439

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์ .....ประธานกรรมการ

..... กรรมการ

..... กรรมการ

..... กรรมการ

อาจารย์ผู้ควบคุมงานวิจัย อาจารย์ แพทย์หญิง ดร. พัชรา วิสุตกุล

GROWTH HORMONE LEVEL IN NORMAL AND THALASSEMIC THAI CHILDREN AND ADOLESCENTS

Miss Sirirat Ploybutr

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1974

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ระดับโกรธฮอร์โมนในเด็ก และ วัยรุ่นไทยปกติ และที่เป็นโรค ธาลัสซีเมีย

ชื่อ นางสาวศิริรัตน์ พลอยบุตร แผนกวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2517

บทคัดย่อ

การหาปริมาณโกรธฮอร์โมนในพลาสมา ได้ทำกันมาเป็นเวลานาน เริ่มตั้งแต่การใช้ bioassay, haemagglutination inhibition test ตลอดจน immunoassay อื่นๆ จนถึง radioimmunoassay ซึ่งปัจจุบันวิธีหลังเป็นที่นิยมใช้กันมากที่สุด เนื่องจากทำได้รวดเร็ว และมีความไวในการวัดสูง ผลที่ได้จากการวัดโกรธฮอร์โมน ด้วยวิธี radio-immunoassay สามารถนำมาใช้ประกอบการวิเคราะห์โรค, การรักษาโรคได้ผลดี แต่สำหรับในประเทศไทย ยังทำกันเป็นส่วนน้อย

เนื่องจากโรคธาลัสซีเมีย เป็นโรคที่พบมากในประเทศไทย และมีอาการของการเจริญเติบโตช้าร่วมด้วยเป็นส่วนใหญ่ จึงควรที่จะทำการศึกษาหาปริมาณโกรธฮอร์โมน ว่ามีความผิดปกติหรือไม่ และจะเป็นสาเหตุแห่งการเจริญเติบโตช้าได้หรือไม่ ดังนั้นในการวิจัยนี้ จึงได้ทำการวัดปริมาณโกรธฮอร์โมนในผู้ป่วยด้วยโรคธาลัสซีเมีย เพื่อนำไปประกอบการวิเคราะห์การเกิดพยาธิสภาพของโรคนี้ โดยใช้วิธีกระตุ้นการหลั่งของโกรธฮอร์โมน ด้วยการฉีดอินซูลิน 0.15 หน่วย ต่อน้ำหนักร่างกายเป็นกิโลกรัม และนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับคนปกติ

โดยการทำการทดลองในคนปกติ13 คน และคนป่วยจำนวน 21 คน จากการทดลองผลปรากฏว่า ปริมาณน้ำตาลที่ลดลงจากเดิม ภายหลังการฉีดอินซูลิน คิดเป็นเปอร์เซนต์เฉลี่ยเท่ากับ 58.7 ± 14.3 และ 63.2 ± 12.7 ในคนปกติ และคนป่วยตามลำดับ เมื่อทำการวัดโกรธฮอร์โมนด้วยวิธี radioimmunoassay และทำการทดสอบความแม่นยำของวิธีที่ใช้โดยการหา percentage recovery ของการทดลอง พบว่ามีค่าเท่ากับ 92.0 ± 11.1, 101.0 ± 20.7และ 104.0 ± 22.4 เปอร์เซนต์ เมื่อเติมโกรธฮอร์โมนมาตรฐานลงในพลาสมาตัวอย่าง ให้มีค่าต่ำ, กลาง และ สูง ตามลำดับ

จากผลการทดลอง จึงได้แบ่งผู้ถูกทดลองเป็น 2 พวกคือ

พวกที่มีปริมาณ GH ที่ระดับ basal มีค่าต่ำ(ต่ำกว่า 6 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ในพวกนี้ก่อนทำการกระตุ้น มีค่า GH เฉลี่ยเท่ากับ 2.72 ± 1.77 และ 2.39 ± 1.44 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในคนปกติและคนป่วยตามลำดับ และภายหลังการกระตุ้นมีค่าเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 32.45 ± 22.52 และ 16.39 ± 10.5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในคนปกติและในคนป่วย ตามลำดับ ซึ่งในคนป่วยกลุ่มนี้มีการเจริญเติบโตของร่างกายเป็นปกติ 3 คน และช้ากว่าปกติ 7 คน

พวกที่มีปริมาณ GH ที่ระดับ basal มีค่าสูง(สูงกว่า 6 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ในพวกนี้ก่อนทำการกระตุ้น มีค่า GH เฉลี่ยเท่ากับ 17.98 ± 2.16 และ11.22 ± 5.56 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในคนปกติ และคนป่วยตามลำดับ และภายหลังการกระตุ้น มีค่าสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 30.0 ± 4.24 และ 41.25 ± 12.04 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในคนปกติและคนป่วยตามลำดับ ซึ่งในคนป่วยกลุ่มนี้มีการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ 2 คน และเป็นปกติ 2 คน

ในการทดลองนี้ ถือว่าผู้ที่มีความสามารถหลั่ง GH เพิ่มขึ้นจากระดับ basal ได้มากกว่า 6 นาโนกรัม/มิลลิลิตร(ภายหลังการกระตุ้น) จัดเป็นผู้ที่มีการสนองตอบต่อการกระตุ้น

จากคนป่วยจำนวน 21 คน มี 7 คนซึ่งมีปริมาณ GH ที่ basal ทั้งต่ำและสูง แต่ไม่มีการสนองตอบต่อการกระตุ้นโดยมีปริมาณ GH สูงสุด (ภายหลังการกระตุ้น) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.48 ± 2.46 นาโนกรัม/มิลลิลิตร คนป่วยกลุ่มนี้มีการเจริญเติบโตเป็นปกติ 2 คน และ ผิดปกติ 5 คน

จากผลของการทดลองที่ได้ สรุปได้ว่า ผู้ป่วยด้วยโรคธาลัสซีเมีย นั้นมีการสนองตอบของ GH rise ต่อการกระตุ้นด้วยอินซูลิน โดยแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือไม่รับสนองเลย และพวกที่รับสนอง แต่การรับสนองนั้น มีแนวโน้มที่ต่ำกว่า การรับสนองในกลุ่มคนปกติ การที่เป็นเช่นนี้ อาจเป็นผลโดยทางอ้อมจากการที่ต่อมพิทูอิตารี่ขาดอาหารและเลือดหล่อเลี้ยงที่เพียงพอ เนื่องจากผู้ป่วยทุกคนมีอาการโลหิตจางมาตั้งแต่เกิด หรืออาจจะเป็นผลจากการที่มี hemochromatosis เกิดขึ้นในต่อมพิทูอิตารี่ ทั้งสองสาเหตุนี้อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ต่อมพิทูอิตารี่ทำหน้าที่เสื่อมลง มีการสร้างและหลั่ง GH ลดลง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งในหลายสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตช้า สาเหตุอื่นๆที่น่า

ศึกษา ว่าจะมีแนวโน้มที่อาจเป็นสาเหตุของการเจริญเติบโตช้าในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ซึ่งอาจจะทำให้เนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ ขาด O_2 และอาหารโดยเฉพาะโปรตีน ทำให้การเจริญเติบโตโดยการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ๆเป็นไปไม่ได้ดี ทำให้ผู้ป่วยมีการเจริญเติบโตช้า

การศึกษาคุณลักษณะและสมบัติของ ^{125}I-HGH ภายหลังการ label เป็นเวลาต่างๆกัน พบว่าเมื่อเก็บ ^{125}I-HGH ไว้ที่ 4°ซ เป็นเวลานานๆ จะมีการรวมตัวจาก monomer ไปเป็น aggregated form มากขึ้น และในขณะเดียวกัน จะมีการสลายตัวของไอโอดีน(I_2)มากขึ้น ทำให้ความบริสุทธิ์ของ ^{125}I-HGH ลดลง โดยเปอร์เซนต์การรวมตัวของ ^{125}I-HGH กับแอนติบอดีต่อ HGH ลดลง แต่ถ้านำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ของ sephadex G - 100 จะทำให้ความบริสุทธิ์ของ ^{125}I-HGH สูงขึ้นได้ และจะได้เปอร์เซนต์การรวมตัวที่สูงและค่อนข้างคงที่ แม้ว่าจะเก็บไว้เป็นเวลายาวนานขึ้น (ภายใน 1 เดือน)

เพราะฉนั้นก่อนนำ ^{125}I-HGH มาทำการ assay ทุกครั้ง ควรนำมาทำให้บริสุทธิ์เสียก่อนโดยการผ่าน sephadex G- 100 column

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

Thesis Title Growth Hormone Level in Normal and Thalassemic Thai Children and Adolescents.

Name Miss Sirirat Ploybutr Department Biochemistry

Academic Year 1974

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

ABSTRACT

The incidences of growth retardation found in thalassemic patients which is a common disease in Thailand, lead to the question that whether the physical retardment of these patients is caused by inadequacy of growth hormone secretion or elses. To answer this question, study of growth hormone secretion from the pituitary was necessary. Previous reports on growth hormone secretion in these patients were very scarce and the informations obtained are still unclear.

Therefore, this experiment was planned to measure plasma growth hormone in 13 normal (control) subjects and in 21 thalassemic patients. The radioimmunoassay method, using double antibody technique was selected for the determination of plasma growth hormone in this experiment. The percentage of recovery tested were 92.0 ± 11.1 %, 101.0 ± 20.7 % and 104.0 ± 22.4 % (mean ± SD) at low, medium and high growth hormone values respectively.

The determination of growth hormone in normal subjects and patients was made at basal stage and after stimulation of growth hormone secretion with insulin injection (0.15 I.U./kg body weight) at interval of 30 minutes for two hours. All the subjects in the

control group and in the thalassemic patients respond to insulin injection by having reduced blood sugar down to 58.7 ± 14.3 % and 63.3 ± 12.7 % (mean ± SD) respectively. At this degree of hypoglycemia, it is adequate to stimulate growth hormone rise if the hypothalamus and pituitary are normal.

Basal plasma growth hormone level obtained was classified into 2 categories i.e. low basal level (lower than 6 ng/ml) and high basal level (higher than 6 ng/ml). The results showed that the low basal level in the control group and in the patients group were similar (2.72 ± 1.77 to 2.89 ± 1.24 ng/ml) but the high basal level in the control group is slightly higher than in the patients (17.98 ± 2.16 to 11.44 ± 5.18 ng/ml).

After stimulation of growth hormone secretion with insulin, more than 6 ng/ml of growth hormone rise from basal level was regarded as positive response indicating normal hypothalamic and pituitary function in growth hormone release. It is of particular interest that all the subjects in the control group showed positive response to insulin (their growth hormone peak were 32.45 ± 22.52 and 30.00 ± 4.24 ng/ml in the low and the high basal level group respectively), while 7 out of 21 of the patients did not respond at all to insulin induced hypoglycemia (their growth hormone peak were 6.48 ± 2.46 ng/ml)inwhich 2 have normal body development and the other 5 have stunted growth. The rest of the patients showed positive response (their growth hormone peak were 16.39 ± 10.15 and 41.25 ± 12.24 ng/ml in the low basal level and high basal level group, respectively) in which 5 have normal body development and the other 9 have stunted growth. When number

of folds of growth hormone rise from basal level were plotted graphically , it could be seen that the capacity of pituitary to increase growth hormone release infolds of all the responding patients seemed to be diminished compared to those of the normal subjects. The results indicated that there may be surely some limitation in pituitary function for growth hormone release in the thalassemic patients . However the evidence of stunted growth in thalassemic patients is previously known to have also more or less related to degree of anemia and type of severity of the disease. Thus the different degree of defect in growth hormone release in these patients is probably indirectly due to lacking of O_2 and food of the pituitary gland caused by different degree of anemia and various degree of low food intake. Another factor which could be interfering with pituitary function and altering growth hormone release is hemochromatosis. However, the data obtained in this experiment and in previous report on hemochromatosis are still not conclusive and needed to be studied further. Therefore the growth retardation of thalassemic patients may partly due to defect in growth hormone release and partly due to other factors.

In addition, studies on the characteristics of ^{125}I-HGH were made. Although the radioimmunoassay method of growth hormone have been popularly used since 1964 due to its high sensitivity and reliability, the reports on the changing characters of ^{125}I-HGH, one of the most important tool in radioimmunoassay, after being kept for a long time were very few. Then the experiment was planned to test the homogeniety by chromatography and the binding capacity

with antiserum of the ^{125}I-HGH kept at 4°C once a week for four weeks. The characteristics of the unpurified fraction was compared to the purified fraction (by sephadex G-100). The results revealed that the aggregation and degradation of the iodinated protein increased while the binding capacity decreased with the passing time toward the half life of the ^{125}I-HGH. However after purification with sephadex G-100 the binding percentage increased and more or less constant through the 4 weeks tested. Also the degree of the homogeniety of the purified fraction judged by column, paper and thin layer chromatography were apparently improved. Since the homogeniety and binding capacity are important for the reliability of the value of growth hormone measured, it should be noted that the ^{125}I-HGH should be purified before used every weeks.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้ ที่กรุณารับเป็นผู้ควบคุมการวิจัย ช่วยเหลือ และให้คำแนะนำ จนการวิจัยนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

อาจารย์แพทย์หญิงพัชรา วิสุทกุล
อาจารย์นายแพทย์สาธิต วรรณแสง
รองศาสตาจารย์กำจัด มงคลกุล
อาจารย์นายแพทย์ประเวศ วะสี
อาจารย์ ดร.วราพรรณ ด่านอุตรา
อาจารย์นายแพทย์สง่า ภู่ตระกูล

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์ดิถี จึงเจริญ หัวหน้าภาควิชาสรีรวิทยา และ ศาสตราจารย์นายแพทย์สนอง อูนากูล หัวหน้าภาควิชาชีวเคมี ที่กรุณาให้ใช้เครื่องมือ และ สถานที่ในการทำการทดลอง ตลอดรายงานนี้

และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย ที่ช่วยให้ทุนอุดหนุนการวิจัยนี้ และขอขอบคุณ National Institue of Health ที่กรุณาให้โกรธฮอร์โมนมาตรฐาน และ แอนติบอดีต่อ โกรธฮอร์โมน มาใช้ในรายงานนี้

สุดท้ายนี้ผู้เขียนขอขอบคุณ ผู้ป่วย และผู้ที่กรุณาสละเลือดเพื่อการทดลองในครั้งนี้

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ช
กิตติกรรมประกาศ	ฎ
รายการตารางประกอบ	ฐ
รายการรูปประกอบ	ฒ
บทนำ	1
วัสดุและวิธีดำเนินการทดลอง	
สารเคมีและเครื่องมือ	24
การเตรียมสารละลาย	28
วิธีวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือด	32
วิธีวัดปริมาณโกรธฮอร์โมนในพลาสมา	33
การศึกษา characteristics ของ labelled hormone	41
การคำนวณผล	43
ผลการทดลอง	
ผล iodination HGH ด้วย ^{125}I และการทำให้บริสุทธิ์	47
ผลการหา homogeniety ของ ^{125}I-HGH	48
ผลการทดลองทำ antibody titration curve	62
ผลการทดลองเมื่อเปลี่ยนค่าเวลาในการอินคิวเบท reaction mixture	64
ผลการหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือด	67
ผลการหาปริมาณโกรธฮอร์โมน ในคนปกติ และ ที่เป็นโรคอาลัสซีเมีย	73
ผลการหา percentage recovery ของการทดลอง	106
ผลการศึกษา characteristics ของ labelled hormone	107

หน้า

วิจารณ์ผลการทดลอง 140
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 150
บรรณานุกรม 154
ประวัติการศึกษา 172

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1.	แสดง activity ของโกรธฮอร์โมน ในสัตว์ species ต่างๆ.....	5
2.	แสดงผลการคำนวณหา specific activity และ percentage of iodination ของ ^{125}I-HGH.....	47
3.	แสดงผลการทำ antibody titration curve.....	62
4.	แสดงผลการทำกราฟมาตรฐานที่ได้จากการอินคิวเบทในเวลาต่างๆกัน...	64
5.ก	แสดงระดับน้ำตาลกลูโคสภายหลังการทำ insulin tolerance test ในคนปกติ.....	69
5.ข	แสดงระดับน้ำตาลกลูโคสภายหลังการทำ i sulin tolerance test ในคนป่วย.....	71
6.	แสดงระดับโกรธฮอร์โมนภายหลังการกระตุ้นด้วยการฉีดอินซูลินในคนปกติ	75
7.ก	แสดงระดับโกรธฮอร์โมนภายหลังการกระตุ้นด้วยการฉีดอินซูลินในคนป่วยที่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้น.....	77
7.ข	แสดงระดับโกรธฮอร์โมนภายหลังการกระตุ้นด้วยการฉีดอินซูลินในผู้ป่วยที่ไม่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้น.....	78
8.ก	แสดงผลการเปรียบเทียบเพื่อหาความแตกต่างทางสถิติ ระหว่างระดับโกรธฮอร์โมนในคนปกติกับคนปกติ.....	96
8.ข	แสดงผลการเปรียบเทียบเพื่อหาความแตกต่างทางสถิติ ระหว่างระดับโกรธฮอร์โมน ในคนป่วยกับคนป่วย.....	96
8.ค	แสดงผลการเปรียบเทียบเพื่อหาความแตกต่างทางสถิติ ระหว่างระดับโกรธฮอร์โมน ในคนปกติกับคนป่วย.....	97

ตารางที่			หน้า
9.		แสดงการเปรียบเทียบค่า GH ในคนปกติจาก ผู้ทดลองอื่น ๆ และจากรายงานนี้ (วัดด้วยวิธี RIA).....	98
10.	ก.	แสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการสนองตอบ ของการหลั่ง GH ต่อการกระตุ้นด้วยอินซูลินในคนปกติ.....	99
10.	ข.	แสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการสนองตอบ ของการหลั่ง GH ต่อการกระตุ้นด้วยอินซูลินในคนป่วย ... ธาลัสซีเมียที่มีการสนองตอบ	101
11.		แสดงผลการตรวจร่างกายในผู้ป่วยจำนวน 21 คน	102
12.		แสดงผลการตรวจทางห้องทดลองในผู้ป่วย จำนวน 21คน.....	103
13.	ก.	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจร่างกายผู้ป่วยกับผลจาก การตรวจทางห้องทดลอง	105
13.	ข.	ตารางสรุปผลการหาความสัมพันธ์จากตารางที่ 13 ก.....	106
14.		แสดงผลการหา percentage recovery ของการทดลอง....	106 ก
15.	ก.	แสดงเปอร์เซนต์การรวมตัวของ ^{125}I-HGH fraction ต่างๆกัน แอนติบอดี ภายหลังการ label แล้วเป็นเวลาต่าง ๆ กัน.....	137
15.	ข.	แสดงค่า assumed blank ของ ^{125}I-HGH fraction ต่าง ๆ..	138
15.	ค.	แสดงผลการเปรียบเทียบเปอร์เซนต์การรวมตัวของ ^{125}I-HGH fract$_n$ ต่าง ๆ กับ แอนติบอดีภายหลังการหัก assumed blank ออกแล้ว	139

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1.	แสดงสูตรโครงสร้างของ HGH	4
2.	แสดงหลักการแยก Ag^*-Ab complex (bound form) ออกจาก free Ag (free form) ด้วยวิธี double antibody technique	18
3. ก	แสดงการ iodinated HGH ครั้งที่ 1 และการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่าน sephadex G-50 column.....	49
3. ข	แสดงการ iodinate HGH ครั้งที่ 2 และการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่าน sephedex G-50 column.....	52
3. ค	แสดงการ iodinate HGH ครั้งที่ 3 และการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่าน sephadex G-50 column.....	55
3. ง	แสดงการ iodinate HGH ครั้งที่ 3 และการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่าน sephadex G-50 column.....	58
4. ก	แสดงการศึกษา homogeniety ของ ^{125}I-HGH โดยการทำ paper chromatography ภายหลังการ label ครั้งที่หนึ่ง..	50
4. ข	แสดงการศึกษา homogeniety ของ ^{125}I-HGH โดยการทำ paper chromatography ภายหลังการ label ครั้งที่สอง	53
5. ก	แสดงการศึกษา homogeniety ของ ^{125}I-HGH โดยการทำ thin layer chromatography ภายหลังการ label ครั้งที่สาม	56
5. ข	แสดงการศึกษา homogeniety ของ ^{125}I-HGH โดยการทำ thin layer chromatography ภายหลังการ label ครั้งที่สี่	59
6.	แสดงการทำ antibody titration curve.....	61
7.	แสดงกราฟมาตราฐานของ HGH เมื่อทำการทดลอง โดยใช้ระยะเวลาในการอินคิวเบทต่างๆกัน	63
8.	แสดงกราฟมาตราฐาน สำหรับการทำ RIA ของ HGH.....	65

รูปที่ หน้า

9. แสดงน้ำตาลกลูโคสในเลือด ภายหลังการทำ insulin tolerance test ในคนปกติ..... 68

10. แสดงน้ำตาลกลูโคสในเลือด ภายหลังการทำ insulin tolerance test ในคนป่วย..... 70

11.ก แสดงค่าเฉลี่ย(mean SD)ของระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของคนปกติ ภายหลังการฉีดอินซูลิน..... 72

11.ข แสดงค่าเฉลี่ย(mean SD)ของระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของคนป่วย ภายหลังการฉีดอินซูลิน..... 72

12. แสดงระดับโกรธฮอร์โมน ภายหลังการทำ insulin tolerance test ในคนปกติ..... 74

13. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 1..... 80

14. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 2..... 80

15. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 3..... 82

16. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 4..... 82

17. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 5..... 84

18. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 6..... 84

19. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 7..... 85

20. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 8..... 85

21. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 9..... 87

22. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 10..... 87

23. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 11..... 88

24. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 12..... 88

25. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 13..... 89

26. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 14..... 89

27. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 15..... 91

28. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 16..... 91

29. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 17..... 92

รูปที่ หน้า

30. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 18..... 94
31. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 19..... 94
32. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 20..... 95
33. แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส และ โกรธฮอร์โมน ในผู้ป่วยรายที่ 21..... 95
34. แสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการสนองตอบของการหลั่งโกรธฮอร์โมน ต่อการกระตุ้นด้วยอินซูลิน ในคนปกติ และ คนป่วยธาลัสซีเมีย..... 100
35. แสดงผลการ iodinate HGH ครั้งที่ 5 และการทำให้บริสุทธิ์..... 108
36. แสดงการศึกษา column chromatography ของ ^{125}I-HGH ภายหลัง label 1 อาทิตย์..... 109
37. แสดงการศึกษา column chromatography ของ ^{125}I-HGH ภายหลัง label 2 อาทิตย์..... 111
38. แสดงการศึกษา column chromatography ของ ^{125}I-HGH ภายหลัง label 3 อาทิตย์..... 113
39. แสดงการศึกษา column chromatography ของ ^{125}I-HGH ภายหลัง label 4 อาทิตย์..... 115
40. แสดงการศึกษา column chromatography ของ ^{125}I-HGH ภายหลัง label 5 อาทิตย์..... 117
41. แสดงการศึกษา column chromatography ของ ^{125}I-HGH ภายหลัง label 6 อาทิตย์..... 119
42. แสดงการทำ paper chromatography ของ ^{125}I-HGH ภายหลัง label 1 อาทิตย์..... 121
43. แสดงการทำ paper chromatography ของ ^{125}I-HGH ภายหลัง label 2 อาทิตย์..... 123
44. แสดงการทำ paper chromatography ของ ^{125}I-HGH ภายหลัง label 3 อาทิตย์..... 125

รูปที่ หน้า

45. แสดงการทำ paper chromatography ของ ^{125}I-HGH ภายหลัง label 4 อาทิตย์ 127

46. แสดงการทำ paper chromatography ของ ^{125}I-HGH ภายหลัง label 5 อาทิตย์ 129

47. แสดงการทำ paper chromatography ของ ^{125}I-HGH ภายหลัง label 6 อาทิตย์ 131

48. แสดงการศึกษา thin layer chromatography ของ ^{125}I-HGH ภายหลัง label 1อาทิตย์ 133

49. แสดงการศึกษา thin layer chromatography ของ ^{125}I-HGH ภายหลัง label 2อาทิตย์ 135

บทนำ

ต่อมไร้ท่อ เป็นอวัยวะที่มีความสามารถหลั่งซีครีชั่นที่เรียกว่าฮอร์โมนออกมาเพื่อไปออกฤทธิ์ยังร่างกายส่วนต่าง ๆ โดยผ่านไปตามกระแสโลหิต ไม่ต้องอาศัยท่อนำส่งเหมือนเอคโซไครน์แกลนด์ จึงได้ชื่อว่าต่อมไร้ท่อ (เอ็นโดไครน์ แกลนด์ endocrine gland) ในจำนวนต่อมไร้ท่อทั้งหมดต่อม พิทูอิตารี่ (pituitary gland) จัดว่าเป็นต่อมไร้ท่อที่สำคัญต่อมหนึ่ง สามารถสร้างฮอร์โมนไปควบคุมการทำงานของต่อมไร้ท่ออื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตโดยปกติของมนุษย์

ต่อมพิทูอิตารี่ได้รับความสนใจมาตั้งแต่สมัยคริสตศตวรรษแรก ๆ โดย Gallen ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่ต่าง ๆ ของต่อมนี้ จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1895 Schaffer และ Oliver ได้พบว่าต่อมนี้มีคุณสมบัติที่จะหลั่งสารออกมาได้ นับแต่นั้นมาได้มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับต่อมนี้มากขึ้น มีผู้พยายามแยกต่อมนี้ออกจากสัตว์แต่พบว่าสัตว์ทดลองส่วนมากจะตายภายหลังที่ตัดต่อมออก ในปี ค.ศ. 1909 Aschner ได้ทำการแยกต่อมออกได้สำเร็จโดยที่สัตว์ทดลองไม่ตาย แต่พบว่าสัตว์ทดลองเกิดอาการแคระแกรนขึ้น (Smith, 1916; 1926) จึงมีความคิดว่าต่อมนี้ต้องมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของร่างกาย ในปี ค.ศ. 1921 Evans และ Long ได้พบว่า anterior lobe ของต่อมพิทูอิตารี่มีสารที่ควบคุมการเจริญเติบโตอยู่ โดยพบว่าถ้าเอาต่อมออกจะเกิดการแคระแกรน แต่ถ้าให้สารที่สกัดจากต่อมนั้นจะมีการเจริญเติบโตมากกว่าปกติ (giantism) เกิดขึ้น นับจากนั้นมาจึงมีผู้สนใจศึกษาผลของสารที่พบในต่อมพิทูอิตารี่ต่อเมตาบอลิสมของร่างกายมากขึ้นตามลำดับ

โกรธฮอร์โมน (growth hormone,GH) เป็นฮอร์โมนตัวหนึ่งที่สร้างจาก anterior lobe ของต่อมพิทูอิตารี่โดย orange acidophil cell (somatotroph) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 350 มิลลิไมครอน และภายในเซลมีgranule ซึ่งก็คือที่เก็บ GH นั่นเอง การทำงานของเซลนี้ในการสร้างและการหลั่ง GH อยู่ภายใต้อิทธิพลของระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system,CNS) โดยไฮโปธาลามัส (hypothalamus) ส่วน ventromedial nucleus (VMN) จะสร้างสาร

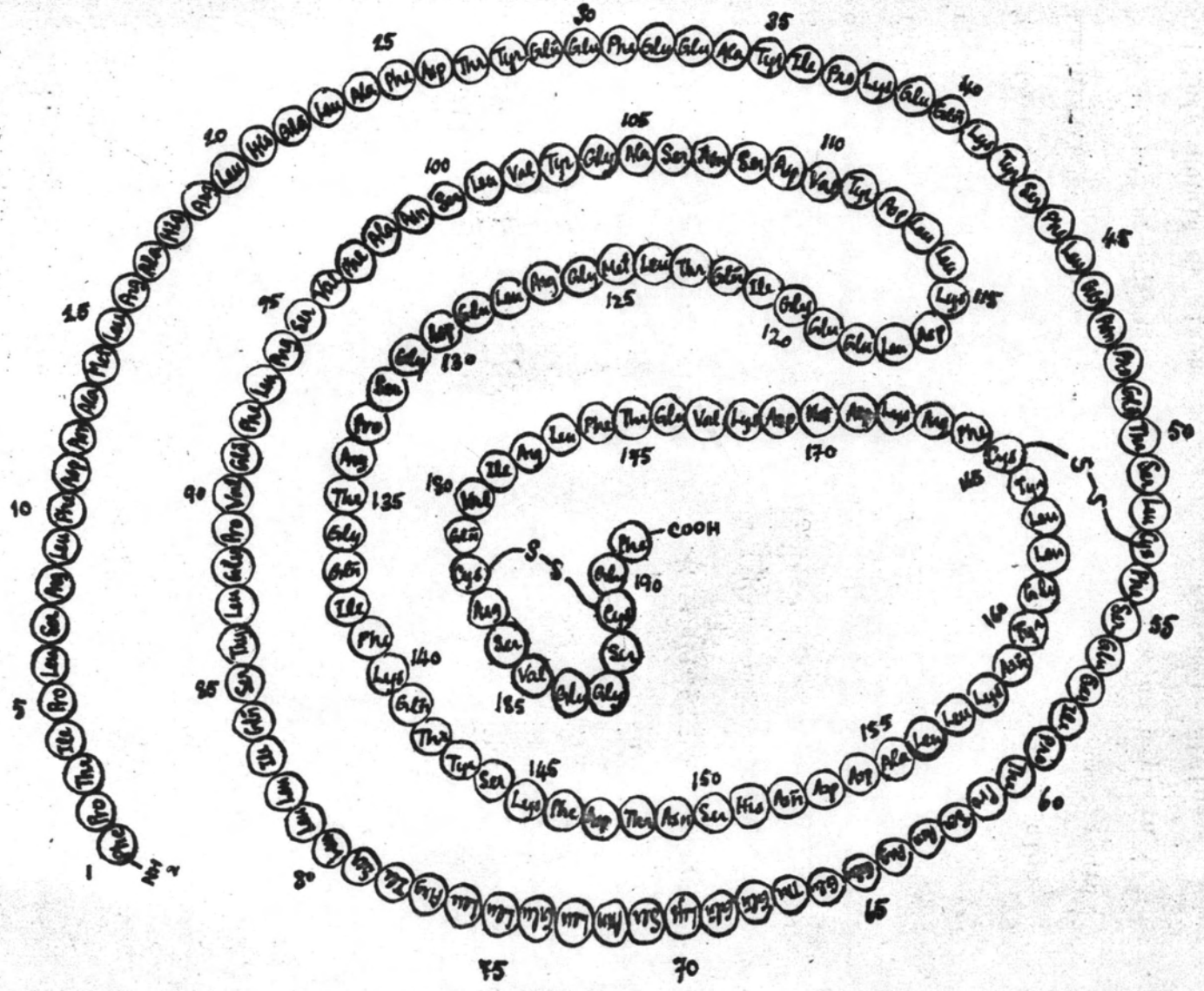
โปลิเปปไทด์ ซึ่งเป็น regulatory substance คือ growth hormone releasing factor หรือ growth hormone releasing hormone (GH-RF, GRF หรือ GH-RH) ส่งผ่านมาตาม hypophyseal portal system ไปกระตุ้นให้ acidophil cell สร้าง GH และหลั่ง GH ออกสู่กระแสโลหิต (Martini และ คณะ, 1968; Schally และ คณะ, 1968) ปัจจุบันมีผู้สกัด GRF จากไฮโปธาลามัสของสัตว์ต่าง ๆ รวมทั้งคนด้วย และพบว่ามีปฏิกริยาโดยตรงกับต่อมพิทูอิตารี่ในการกระตุ้นการหลั่ง GH (Deuben และ Meites, 1964; Ishida และ คณะ 1965; Schally และคณะ, 1967e; Muller และคณะ, 1967e และ Frohman และ คณะ, 1971) มีผู้ทำการสังเคราะห์สารที่คิดว่าเป็น GRF และนำมาทดลองในสัตว์พบว่าช่วยในการหลั่ง GH (Schally และ คณะ, 1972) จากการสกัด GRF พบว่าสารที่สกัดได้จากไฮโปธาลามัสมีส่วนของสารที่เรียกว่า growth hormone inhibiting factor (GIF) ปนอยู่ด้วย (Krulich และ คณะ, 1968) สารนี้มีความสามารถขัดขวางการหลั่ง GH ให้ชื่อว่า somatostatin พบว่าสารนี้สามารถขัดขวางการหลั่งของ GH เนื่องจากการทำ insulin induced hypoglycaemia ได้ (Schally และ คณะ 1974) ปัจจุบันมีผู้ทำการสังเคราะห์ GIF ขึ้นโดยเป็นสารพวกโปลิเปปไทด์ (tetradecapeptide) มีจำนวนกรดอะมิโน 14 ตัว เรียงตัวเป็นรูปวงแหวนโดยมีแขนซัลไฟด์เชื่อมระหว่างกรดอะมิโนตัวที่ 3 กับตัวที่ 14 และพบว่าสามารถขัดขวางการหลั่งของ GH ได้ทั้งในรูป monomer และ dimer (Coy และ คณะ, 1973) แต่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่า GIF สร้างมาจากไฮโปธาลามัสส่วนใด แต่พบว่ามีสะสมอยู่ในไฮโปธาลามัสน้อยกว่า GRF ในคนปกติ (Krulich และ คณะ, 1968)

การควบคุมการหลั่ง GH จากต่อมพิทูอิตารี่นอกจากอาศัย GRF และ GIF แล้วยังพบว่ามี auto-feedback mechanism หรือที่เรียกว่า negative feedback mechanism Krulich และคณะ (1966) พบว่าการให้ GH จากภายนอกจำนวนมากสามารถกดการสร้าง GH เนื่องมาจากการกระตุ้นของ GRF ได้ โดยตรวจพบว่าปริมาณ GH ในต่อมพิทูอิตารี่ลดลง Muller และ Pecile (1966) แสดงให้เห็นว่า GH จากภายนอกสามารถขัดขวางการเพิ่มการหลั่ง GH จากการทำ insulin induced hypoglycemia ได้โดยพบว่ามีการลดปริมาณ GH ในต่อมลงเช่นเดียวกัน Sawano และคณะ (1967) ยังพบอีกว่า การให้ GH เข้าไป

ในร่างกายจากภายนอกสามารถกดการเพิ่มขึ้นของ GH ในเลือดหลังจากการกระตุ้นด้วยGRF ได้ ในขณะที่ยากดระบบประสาทส่วนกลาง (CNS depressants) และเดกซะเมธาโซน (dexamethasone) ไม่สามารถกดได้ แสดงว่า GH ในพลาสมามีส่วนในการควบคุมการหลั่งและการสร้าง GH ได้โดยทางตรงและทางอ้อม และแสดงว่าการควบคุมการหลั่งของ GH นั้นมี negative feedback mechanism มาเกี่ยวข้องด้วยอย่างแน่นอน แต่จะมีผลที่ต่อมพิทูอิตารี่ หรือที่ไฮโปธาลามัสนั้นยังไม่ทราบชัด และผลที่เกิดขึ้นนี้เนื่องมาจาก GH เอง หรืออาจมาจากผลต่อเมตาบอลิสมของGH นั้นก็ได้

คุณสมบัติของGH

โกรธฮอร์โมนของคน (HGH) เป็นโปรตีนที่เป็นโปลิเปปไทด์สายเดียว (single chain) มีน้ำหนักโมเลกุล 22128 ประกอบด้วยกรดอะมิโน191 ตัว ภายในสายโปลิ-เปปไทด์มีแขนไดซัลไฟด์ (intradisulphide bridge) เชื่อมอยู่ 2 ตำแหน่ง คือที่กรดอะมิโนตัวที่53 กับ 165 และ 182 กับ 189 (ดังรูปที่ 1) และมีphenylalanine (Phe) เป็นทั้ง C และN-terminal ของโมเลกุล(Li และDixon,1969; Li และคณะ1971; Niall และ คณะ,1972 และBewley และคณะ,1972) มีisoelectric point (pI) ประมาณ4.9 มี sediment coefficient เท่ากับ 2.18 (Li, 1968) HGH ยังมีคุณสมบัติเป็น lactogenic hormone อีกด้วยเนื่องจากมีคุณสมบัติทางชีวภาพหลายอย่างเหมือน prolactin (Lyon และ คณะ,1961; Hayashida, 1962 ab; Li, 1962; Hayashida, 1962b และBerson และ Yalow,1964) ต่อมาได้มีผู้พบสารที่มี growth promoting activity และ lactogenic adtivity ในรก (Kaplan และ Grumbach,1964;Ito และ Higashi, 1961และJosimovich และ Mac Laren,1962)จึงให้ชื่อว่า human chorionic somatomammotropin (HCS) หรือ human placental lactogen(HPL)



รูปที่ 1 Amino Acid Sequences of Human Growth Hormone จาก Dayhoff M.O. (1974)

มีผู้พบว่า HGH ในพลาสมาซึ่งมีต้นตอมาจากต่อมพิทูอิตารี่มีอยู่ 2 แบบ คือ 'big HGH' และ 'little HGH' โดยที่ 'little HGH' จะมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 'big HGH' ประมาณ 2 เท่า และถ้าเก็บไว้เป็นเวลานานๆ 'big HGH' จะเปลี่ยนไปเป็น 'little HGH' ได้ HGH ทั้ง 2 แบบมีความสามารถที่จะทำปฏิกริยากับ guineapig anti HGH serum ได้เหมือนกัน (Gorden และ คณะ, 1973)

HGH เป็นฮอร์โมนที่แตกต่างไปจากฮอร์โมนอื่นๆ คือมีคุณสมบัติเป็น species specific กล่าวคือ GH จากสัตว์ species ต่ำ จะไม่แสดงฤทธิ์ในสัตว์ชั้นสูงกว่า แต่ GH จากสัตว์ species สูงสามารถแสดงฤทธิ์ได้ในสัตว์ species เดียวกัน หรือต่ำกว่าทุกชนิด ดังนั้น HGH ซึ่งได้จากสัตว์ species สูงจึงแสดงฤทธิ์ได้ในสัตว์ทุกชนิด แต่มนุษย์จะมีการตอบสนองต่อโกรธฮอร์โมนที่มาจากพวก primate เท่านั้น (Li และคณะ, 1959)

ตารางที่ 1 แสดง activity ของโกรธฮอร์โมน ในสัตว์ species ต่างๆ (Gray and Bacharach, 1967)

โกรธฮอร์โมนจาก	กระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตใน				
	ปลา	นก	หนู	ลิง	คน
ปลา	+		-		
สัตว์เลื้อยคลาน			+		
กบ			+		
นก		+	+		
วัว	+	-	+	-	-
แกะ	+		+		-
หมู	+		+	-	-
ปลาวาฬ			+		-
ลิง	+		+	+	+
คน	+		+	+	+

หอสมุดกลาง

โมเลกุลทั้งหมดของโกรธฮอร์โมน (whole chain) ไม่จำเป็นสำหรับการแสดงฤทธิ์ของมัน ทั้งนี้พบว่าจะใช้เอ็นซัยม์ไคโมทริปซิน(chymotrypsin) ย่อยโมเลกุลไปถึง 10% ก็ยังคงแสดงฤทธิ์ได้(Li และคณะ,1956) และถ้าใช้เอ็นซัยม์เปปซิน(pepsin) ย่อย จะย่อยได้ถึง 40 % โดยไม่สูญเสียฤทธิ์ไป(Li, 1956; 1962) แสดงว่าส่วนที่แสดงฤทธิ์นั้นต้องเป็น core part ของโมเลกุล ซึ่งจัดว่าเป็นส่วนสำคัญของโมเลกุล

ในการศึกษาผลของโกรธฮอร์โมนต่อเมตาบอลิสมนั้น ในตอนแรกศึกษาจากสารที่สกัดได้จาก anterior lobe ของต่อมพิทูอิตารี่(crude extract)เท่านั้น ต่อมาเมื่อมีการแยกโกรธฮอร์โมนออกจากต่อมได้อย่างบริสุทธิ์(highly purified HGH) (Li และคณะ, 1945; Wilhelmiและคณะ, 1948; Liและ Papkoff, 1956; Li และคณะ,1962) แล้วจึงได้มีการใช้ฮอร์โมนบริสุทธิ์มาศึกษาอย่างกว้างขวาง โดยใช้ HGH บริสุทธิ์ซึ่งแยกจาก anterior lobe ของต่อมพิทูอิตารี่(Lewis และ Brink, 1958; Wallace และ Furguson, 1961; Reisfeld และคณะ,1963) โดยใช้วิธีของ Raben(1956, 1957) มาทำการศึกษา นอกจากนี้กลุ่มของ Li ยังได้ทำการสังเคราะห์ HGH ขึ้นโดยมีความสามารถในการทำงานเพียง 10%ของ HGH ธรรมชาติอีกด้วย(Li, 1972 a; 1972b) แต่ยังมีปริมาณไม่มากพอที่จะใช้ในงานทั่วๆไป

<u>คุณสมบัติทางชีวภาพ</u> (biological activity)

1. <u>ผลต่อการเจริญเติบโต</u> (effect on growth and development) HGH ช่วยทำให้เกิดการสร้างกระดูกอ่อน(cartilage) โดยการกระตุ้น ossification ของ ectochondral bone หรือ persistant cartilagenous plate(Silberberg, 1935; 1936; Silberberg และ Silberberg, 1936; 1937) ช่วยเพิ่มความกว้าง ยาว และหนาของ epiphysis ทำให้มีการเจริญเติบโตของฟัน และกระดูก นอกจากนี้ ยังเร่งให้มีการเจริญเติบโตของ soft tissue เช่น กล้ามเนื้อ, viscera และ connective tissue โดยการเพิ่มขนาด น้ำหนักและจำนวนเซล ให้มากขึ้น

2. <u>ผลต่อเมตาบอลิสมของร่างกาย</u> (metabolic effect) HGH ช่วยทำให้ร่างกายมีการเจริญเติบโตขึ้น โดยมีผลต่อเมตาบอลิสมของร่างกาย ดังนี้ คือ

2.1. เมตาบอลิสมของโปรตีน พบว่าโกรธฮอร์โมนทำให้มี nitrogen retention (Lee และ Schaffer, 1934; Young, 1945; Li และ Evans, 1948) โดยการเพิ่มปริมาณโปรตีน(Li และ Evans, 1948) ลด non protein nitrogen(NPN) (Teel และ Watkins, 1929; Gaebler, 1933). ลดปริมาณกรดอะมิโนในเลือด (Li และ Evans, 1948) ลด urinary nitrogen(Teel และ Cushing, 1930; Gaebler, 1933) ลดการขับออกของ nitrogen (Li และ Schaffer, 1934) นอกจากนี้ HGH ยังมีผลต่อการสร้างโปรตีนจากกรดอะมิโนด้วย โดยมีการลดการปล่อยกรดอะมิโนอิสระออกจากเนื้อเยื่อมาสู่เลือด (Frame และคณะ, 1946) เพิ่มการส่งกรดอะมิโนเข้าสู่เซลเพื่อสร้างโปรตีน(Noall และ คณะ, 1957; Kostyo และ คณะ, 1959; Reiss และ คณะ, 1959; Riggs และ คณะ, 1960) และเพิ่มอัตราการ incorporate ของกรดอะมิโนเพื่อสร้างสารโปรตีน (Kostyo และ คณะ, 1959; Manchester และคณะ, 1959)

2.2. เมตาบอลิสมของคาร์โบไฮเดรท พบว่าถ้าตัดต่อมพิทูอิตารี่ออก ร่างกายจะมีความไวต่ออินซูลิน(insulin) ลดลง และพบว่าถ้าให้โกรธฮอร์โมน จะเพิ่มความต้านทานต่ออินซูลิน (Beck และคณะ, 1957) พบว่า HGH สามารถทำให้มีระดับน้ำตาลในเลือดสูง และเกิดโรคเบาหวาน(diabetes)ได้ในสัตว์(Evans และคณะ, 1932; Baumann และ Marine, 1932; Young, 1937; Cote และคณะ, 1949; Campbell และคณะ, 1950) จึงนับว่าโกรธฮอร์โมนมี diabetogenic effect (Young, 1953)

2.3. เมตาบอลิสมของสารไขมัน โกรธฮอร์โมนสามารถลดปริมาณไขมันในร่างกายลง(Li และ Evans, 1948) โดยมีการเคลื่อนของไขมันจาก depot fat ไปยังตับ(Lee และ Schaffer, 1934; Schoenheimer และ Rittenberg, 1935; 1936 Schaffer และ Lee, 1935) และเพิ่มการออกซิไดส์ของไขมันทำให้ respiratory quotient (R.Q.)ลดลง(Greenbaum, 1953) มีการสร้างกรดไขมันน้อยลง และเพิ่ม non esterified fatty acid ในเลือดมากขึ้น(Brady และ Gurin, 1950) นอกจากนี้โกรธฮอร์โมนยังมี ketonemic effect (Mirsky, 1936) โดยทำให้มีการเพิ่ม ketone bodies ในเลือดจากการสลายตัวของไขมัน และพบว่ามีการสร้าง acetoacetic acid มากกว่าการใช้(Chaikoff และ Soskin, 1928)

2.4. เมตาบอลิสมของเกลือแร่ โกรธฮอร์โมนทำให้เกิด mineral retention เช่น Na, K, P, Ca, Mg และ Cl ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของร่างกาย ทำให้มี water retention เกิดขึ้นภายหลังด้วย(Beck และคณะ, 1957; Biglieri และคณะ, 1961) จากการเพิ่มในจำนวนของ soft tissue, bone matrix, เกลือแร่รวมกับความตั้งของน้ำ จะทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น นอกจากนี้มีการเพิ่ม inorganic phosphate ในพลาสมาด้วย(Li และ Evans, 1948) และเพิ่ม alkali phosphataseในเลือดด้วย

ปริมาณ HGH ในเลือด

การหลั่ง HGH ออกมาสู่กระแสโลหิตนั้น เป็นแบบ diurnal variation คือในตลอดวันจะมีค่าสูงต่ำสลับกันไปมา และพบว่าจะมีค่าต่ำมากภายหลังการกินอาหาร และต่อจากนั้น 3ถึง 4ชั่วโมง จึงจะมีค่าสูงขึ้น(Hunter และคณะ, 1966; Hunter และ Rigal 1966) ทั้งนี้เพราะเมื่อพลังงานจากภายนอก(อาหาร)หมดลง เมื่อร่างกายต้องการพลังงานก็ต้องได้มาจากพลังงานที่สะสมไว้ ดังนั้น HGH จึงถูกหลั่งออกมาเพื่อช่วยในการเคลื่อนไขมันออกมาจาก depot fat เพราะฉะนั้นหน้าที่ของ HGH ที่เกี่ยวกับเมตาบอลิสมนั้น เข้าใจว่ามันมีหน้าที่เป็นตัวหาพลังงานมาใช้ ในเวลาที่ร่างกายขาดพลังงาน โดยนำสารที่สะสมไว้ในร่างกายออกมาใช้

HGH มีอัตราการหลั่งโดยเฉลี่ยไม่จำกัดอายุประมาณ 388 ไมโครกรัม ต่อวัน (Alford และคณะ,1973) โดยขณะที่นอนหลับมีค่า 28.5 $\pm$25 ไมโครกรัมต่อชั่วโมง และในเวลากลางวันมีค่า 10.0 $\pm$ 1.6ไมโครกรัมต่อชั่วโมง

half life ของ HGH ประมาณ 20-30 นาที(Utiger และคณะ, 1962; Hunter และ Greenwood, 1964; Tanner, 1972)

การหลั่งของ HGH นี้พบว่าไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีความเชื่อถือได้ทางสถิติ กับอายุและเพศ(Greenwood และคณะ, 1966) แต่พบว่าระดับ HGH ในเด็กจะมีค่าสูงกว่าในผู้ใหญ่(Hunter และ Greenwood, 1962; 1964; Hunter และ คณะ, 1966b; Hunter และ Rigal, 1966) คงจะเป็นเพราะเด็กต้องการฮอร์โมนเพื่อนำมาใช้ในการเจริญเติบโตมากกว่าผู้ใหญ่

ค่าปกติ

ในทารก(cord blood)	66 ± 72.7นก./มล.	(Cornblath และคณะ, 1965)
อายุ 4-8 อาทิตย์	16 ± 12.8นก./มล.	
อายุต่ำกว่า 1 ปี	18.6± 12.5นก./มล.	(Hunter และ Greenwood,1964)
ในเด็กและในวัยรุ่น	10.83 ± 11.6นก./มล.	(Greenwood และคณะ,1964)
ในผู้ใหญ่	0.55 ± 0.68นก./มล.	(Hunter และGreenwood,1964)
ในผู้ชาย	0.27 ± 0.14นก./มล.	(Unger และคณะ,1965)
ในผู้หญิง	4.91 ± 3.32นก./มล.	(Unger และคณะ,1965)

การกระตุ้นการหลั่ง HGH

เนื่องจากปริมาณ HGH ตามปกติ(basal HGH level) มีค่าต่ำและมีช่วงกว้างมาก การตรวจหาค่า basal อย่างเดียวช่วยในการวิเคราะห์โรค และภาวะผิดปกติต่างๆ ได้ไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงมีผู้ค้นหาวิธีกระตุ้นให้เกิดการหลั่งของ HGH เพิ่มขึ้น ซึ่งมีหลายวิธีด้วยกันคือ

1. จัดเป็น provocative test ซึ่งสามารถใช้เป็น pituitary function test ได้ สารกระตุ้นมีหลายชนิดคือ

1.1.การใช้อินซูลินกระตุ้นทำให้เกิดน้ำตาลในเลือดต่ำลง(insulin induced hypoglycemia) ภาวะไฮโปไกลซีเมียนี้จะกระตุ้นให้มีการหลั่ง HGH ออกมามากขึ้น (Roth และคณะ,1963a) พบว่าผลการตอบสนองที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทั้งในชายและหญิงปกติ และการสนองตอบต่อวิธีนี้จะลดลงในรายที่มีความผิดปกติในการสร้างและการหลั่ง HGH ของ anterior pituitary วิธีนี้ใช้กันมากที่สุด แต่มีอันตรายมากเพราะอาจเกิดภาวะไฮโปไกลซีเมียได้รุนแรงมาก ต้องพร้อมที่จะแก้ไขเหตุการณ์ได้ทันที

1.2.การให้อาร์จินีน(arginine) (Merimee และคณะ, 1965; Rabinowitz และคณะ, 1966)

1.3. การให้วาโซเปรสซิน(vasopreesin) (Heidingsfelder และ Blackard, 1968; Gangliardino และคณะ, 1968)

1.4. การให้โบวริล(bovril) (Jackson และคณะ, 1968) เป็นวิธีที่ง่ายและไม่ต้องเสี่ยงอันตรายมาก

1.5. การให้กลูคากอน(glucagon) (Mitchell และคณะ, 1969)

1.6. การให้แอลโดปา(L-dopa) (Cavagnini และคณะ, 1972) วิธีนี้ไม่เป็นอันตราย และเริ่มใช้กันมากในระยะหลังปี ค.ศ. 1972 เป็นต้นมา

ในการทำ provocative test นั้นใช้ถูการทำงานของต่อมพิทูอิตารี่ด้วยว่า มีความสามารถที่จะปล่อยโกรธฮอร์โมนออกมาได้หรือไม่ และ มากน้อยอย่างไร จากรายงานของ Eddy(1974) ได้รวบรวมไว้ว่า ในกลุ่มคนปกติจำนวน 20 คน ในแต่ละคนได้ทำการกระตุ้นการปล่อยโกรธฮอร์โมน โดยใช้สาร 5 ชนิด เป็นตัวกระตุ้นพบว่า

จะมีการสนองตอบต่อแอลโดปา	19 คน	เท่ากับ	95 %
" อินซูลิน	18 คน	เท่ากับ	90 %
" อาร์จินีน	16 คน	เท่ากับ	80 %
" วาโซเปรสซิน	12 คน	เท่ากับ	60 %
" กลูคากอน	11 คน	เท่ากับ	55 %

แสดงว่าการใช้แอลโดปา และ อินซูลิน เป็นตัวกระตุ้นนั้นจะให้ผลที่เชื่อถือได้ แต่การใช้แอลโดปาปลอดภัยกว่าการใช้อินซูลิน แต่ที่เลือกใช้อินซูลินในการทดลองนี้ เพราะในขณะที่เริ่มทำการศึกษานั้น แอลโดปายังอยู่ในขั้นทดลอง

2. เป็น energy feedback control mechanism เช่นการออกกำลังกาย (Buckler, 1969) โดยการออกกำลัง พลังงานที่มีอยู่ในร่างกายจะน้อยลง จะมี HGH หลั่งเพิ่มมากขึ้น เพื่อมาช่วยในการนำไขมันออกมาสร้างพลังงานให้แก่ร่างกาย

3. การมี stress induced เช่นการอดอาหาร (Roth และคณะ, 1963a) และการมีความเครียด(Greenwood และ Landon, 1966b) จะทำให้มีการหลั่ง HGH เพิ่มขึ้น การเพิ่มของโกรธฮอร์โมน จะถูกกดเมื่อให้กลูโคส(Roth และคณะ, 1964)

การหาปริมาณของHGH

1. Bioassay การวัดนี้อาศัยคุณสมบัติทางชีวภาพของโกรธฮอร์โมน ที่ทำให้เกิดการเจริญเติบโต การวัดแบบนี้มีหลายวิธี แต่ที่นิยมกันมีดังนี้

1.1. การเพิ่มน้ำหนักในหนูปกติ (อายุ 6 เดือนซึ่งเป็นระยะที่จะมีการเจริญเติบโตเกือบคงที่) (increase in weight in plateaued rats) วิธีนี้ Evans และ Simpson(1931) ได้นำมาใช้ในการหาปริมาณโกรธฮอร์โมน วิธีนี้มีความไวของการวัด(sensitivity) น้อยจึงไม่นิยมทำกัน

1.2. การเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตในหนูที่ทำไฮโปไฟเซกโตมี(ตัดต่อมพิทูอิตารี่) (increase growth rate in hypophysectomized rats) Marx และคณะ(1942) ได้นำวิธีของ Evans และ Simpson (1941) มาใช้โดยทำการทดลองในหนูที่ยังไม่โตเต็มที่(อายุ 4อาทิตย์) และทำไฮโปไฟเซกโตมีแล้ว ทำการฉีดโกรธฮอร์โมนให้หนู แล้วดูผลจากการเพิ่มน้ำหนักตัวหนู แต่วิธีนี้พบว่าทำได้ยาก และมีความไวของการวัดน้อย(Greenspan และ คณะ, 1950)

1.3. เพิ่มความยาวของหางในหนูที่ทำไฮโปไฟเซกโตมี (increase tail length in hypophysectomized rats) วิธีนี้เริ่มใช้โดย Freud และ Levie(1938) และ Dingemanse และคณะ (1948) แต่พบว่ามีความจำเพาะ(specificity)ต่ำ จนกระทั่งปี ค.ศ. 1963 De Groot ได้ปรับปรุงวิธีนี้โดยนำ thyroxine ซึ่งมี synergistic effect มารวมด้วย

1.4. Tibia test เป็น bioassay ที่นิยมใช้กันมากที่สุดวิธีหนึ่งในอดีตและปัจจุบัน ในปี ค.ศ. 1923 Dott และFraser ได้พบว่าในสุนัขและแมว ที่ทำไฮโปไฟเซกโตมีแล้วนั้น epiphysis จะหยุดเจริญเติบโต ต่อมาในปี ค.ศ.1941 Kibrick และคณะ พบว่า เมื่อให้โกรธฮอร์โมนแก่หนูที่ทำไฮโปไฟเซกโตมีแล้ว ในขนาดที่ไม่สามารถเพิ่มน้ำหนักตัวได้นั้น epiphyseal cartilage จะมีขนาดกว้างขึ้น จากนั้นในปี ค.ศ.1943 Evansและคณะ จึงได้ใช้วิธีนี้เป็น bioassay และมีผู้นิยมใช้กันมาก แต่ความไวในการวัดของวิธีนี้ก็ยังไม่สูงพอ นอกจากนี้วิธีการทำยังประกอบด้วยขบวนการที่ต้องใช้เวลานาน ไม่สดวกรวดเร็วพอที่จะนำมาศึกษาทางด้านคลีนิค และงานประจำวันได้

หอสมุดกลาง

2. Immunoassay การวัดวิธีนี้อาศัยหลักที่ว่าฮอร์โมนที่เป็นโปรตีนมีความสามารถที่จะทำให้เกิดการสร้างแอนติบอดี(antibody, Ab) ต่อตัวฮอร์โมนนั้นเองได้ในสัตว์บางชนิด HGH ก็พบว่ามีความสามารถที่จะชักนำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อตัวมันเองได้(Ferguson และ Boyden, 1953) จากการค้นพบนี้ จึงมีผู้นำไป apply ใช้ในการวัดหาปริมาณโกรธฮอร์โมนกันมากขึ้น ซึ่งทำได้หลายวิธีดังนี้คือ

2.1. Haemagglutination inhibition test ในปี ค.ศ.1958 Read และ Stone ได้คิดวิธีหาปริมาณ HGH โดยใช้เซลเม็ดเลือดแดง(ซึ่งนำมาล้างด้วย tannic acid ก่อนแล้วจึง coat เซลนั้นด้วย HGH) มาทำปฏิกริยา agglutination กับแอนติบอดีต่อ HGH จะมี complex เกิดขึ้น ถ้าต้องการหาปริมาณ HGH ในเลือดก็นำไปทำ competitive inhibition reaction กับเซลเม็ดเลือดแดง และแอนติบอดีต่อ HGH นั้นแล้วดูการตกตะกอนที่เกิดขึ้นจากการเกิด agglutination ที่ก้นหลอดทดลอง เทียบกับฮอร์โมนมาตรฐาน ผลที่ได้ขึ้นกับความสมดุลย์ระหว่างการมี agglutination และการไม่มี agglutination ของเซลเม็ดเลือดแดง ได้มีผู้นำวิธีนี้ไปใช้ในการหาปริมาณ HGH ในด้านการแพทย์กันมากมาย เช่น Read และ Bryan (1960) แต่มีปัญหาเนื่องจากมี non specific inhibition ซึ่งเกิดจากโปรตีนในซีรั่ม ซึ่งไม่ใช่ HGH ทั้งนี้เนื่องมาจากการใช้ซีรั่มที่ไม่ได้สกัดก่อน ต่อมาพบว่า ถ้าสกัดซีรั่มด้วยวิธี acid acetone ก่อนทำการ assay พบว่า non specific inhibition หมดไป(Dominguez และ Pearson, 1962)

2.2. Precipitin test Li และ คณะ (1960)

2.3. Precipitin with ^{131}I labelled antibody Greenspan และ คณะ (1962)

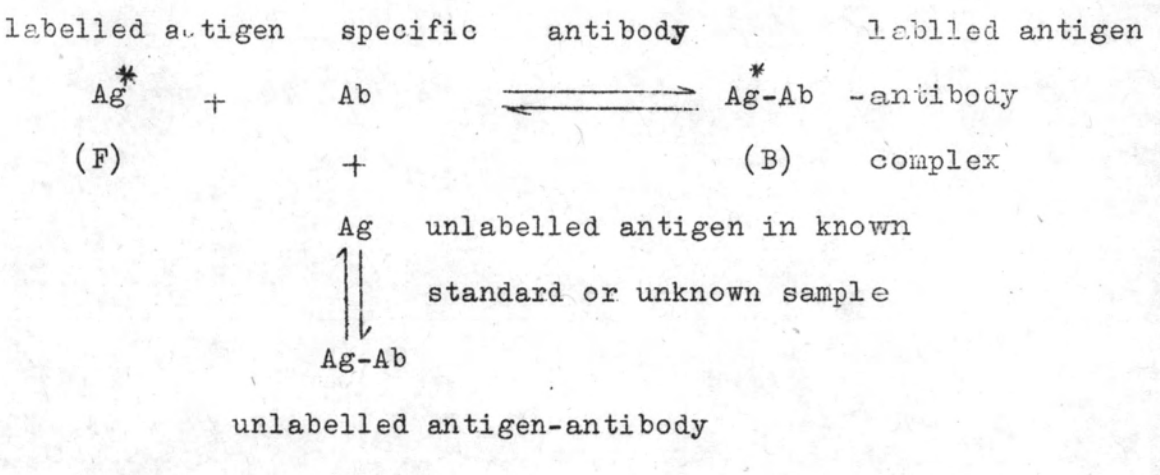
2.4. Complement fixation test Trenkle และ คณะ (1961)

ทั้ง 3 วิธีหลังนี้แม้จะไม่มีปัญหาเนื่องจาก non specific inhibition ในซีรั่ม แต่ก็มีความไวในการวัดต่ำจึงไม่ค่อยนิยมใช้

3. Radioimmunoassay (RIA) ในปี 1960 Yalow และ Berson ได้รายงานถึงวิธี RIA ในการใช้วัดปริมาณอินซูลินในเลือด โดยสามารถวัดได้ แม้ในปริมาณที่ต่ำ ถึงจำนวน 1 ไมโครยูนิต ของอินซูลิน จากนั้นก็มีผู้นิยมใช้วิธี RIA ในการหาปริมาณฮอร์โมนที่เป็นโปรตีนกันมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากข้อดีของวิธี RIA คือ เป็นวิธีที่มีความไวในการวัดสูง มีความแม่นยำ (accuracy)สูง โดยผลที่วัดได้จากวิธีนี้เชื่อถือได้ โดยดูจาก percentage recovery(Jackson และ คณะ,1968) และมีความจำเพาะ (specificity)สูง เพราะแอนติบอดีที่ใช้ควรจะต้องมีความจำเพาะต่อแอนติเจนตัวเดียวเท่านั้น ไม่ควรมีปฏิกริยากับแอนติเจนตัวอื่นๆอีก และวิธีนี้สามารถทำได้ภายในเวลารวดเร็ว และสามารถทำในตัวอย่างจำนวนมากๆได้ในแต่ละครั้ง ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ต้องการในการวัดปริมาณสาร แต่ก็มีข้อเสียเนื่องจาก ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง และผู้ทำที่มีประสิทธิภาพดี

แต่การหาปริมาณ HGH ด้วยวิธี RIA นั้นไม่สามารถบอกได้ถึงคุณสมบัติทางชีวภาพ (biological activity) เนื่องจากการทำ immunoassay หรือ RIA นั้นขึ้นกับคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารที่ใช้ในขบวนการสร้างอิมมูน และผลที่วัดได้เป็นผลที่บอกถึงปฏิกริยาทางอิมมูนของสาร ไม่ใช่ผลจากคุณสมบัติทางชีวภาพ และยังไม่มีใครพิสูจน์ได้ว่าคุณสมบัติทางชีวภาพนั้น เท่ากัน หรือเหมือนกันกับการแสดงฤทธิ์ทางอิมมูน(immunological activity) (Muller และ คณะ,1972)

หลักการของ RIA มีดังนี้



หลักการของวิธี RIA นั้น คือการให้ฮอร์โมนที่ไม่ได้ label (unlabelled hormone หรือ Ag) และฮอร์โมนที่ label แล้ว (labelled hormone หรือ Ag^*) ทำปฏิกริยา competitive inhibition ซึ่งกันและกัน เพื่อแย่ง antibody binding sites ในอณูของแอนติบอดี (Ab) ต่อฮอร์โมนนั้น ซึ่งปฏิกริยานี้ถ้าจำนวน Ab และจำนวน Ag^* นั้นมีค่าคงที่ ปริมาณของ Ag ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณการรวมตัวของ Ag^* กับ Ab ลดลง เกิดฮอร์โมนอิสระที่ label แล้ว (free Ag^*)มากขึ้น และจำนวนฮอร์โมนอิสระที่ label แล้วนี้จะเป็นสัดส่วนกลับกับปริมาณฮอร์โมนที่ไม่ได้ label (Ag) ที่ใช้ในการทำปฏิกริยา กล่าวคือถ้าปริมาณฮอร์โมนที่ไม่ได้ label (Ag = standard หรือ unknown) ในการทดลองมากการรวมตัวของ Ag^* กับ Ab (เป็น Ag^*-Ab complex) ก็จะลดลงเพราะถูกแทนที่ด้วย Ag หมด และ vice versa การวัดปริมาณฮอร์โมนในตัวอย่างที่ไม่ทราบค่าใช้การเปรียบเทียบระดับความสามารถของการเกิดปฏิกริยา competitive inhibition กับฮอร์โมนมาตรฐานที่ทราบค่าเป็นหลัก ทั้งนี้ต้องกำหนดปริมาณของ Ag^* และ Ab ต่อฮอร์โมนนั้นให้คงที่เสมอ

ในการทำ RIA นั้นสภาวะที่เหมาะสม (optimum condition) เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเกิดปฏิกริยาสูงสุด และการทำให้ dose response curve หรือกราฟมาตรฐานมีเปอร์เซนต์การรวมตัว (% binding ระหว่าง Ag^* กับ Ab)สูง และมีความชันสูง นอกจากนี้ยังทำให้มีความไวในการวัด (sensitivity)สูงด้วย

การที่จะได้กราฟเช่นนี้ได้ต้องมีความเข้มข้นของสารที่นำมาทำปฏิกริยาแต่ละตัวที่เหมาะสมซึ่งการคำนวณต้องอาศัยหลักจาก law of mass action

$$Ab + Ag \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} Ab\text{-}Ag$$

005034

$$K = \frac{[Ab\text{-}Ag]}{[Ab].[Ag]} = \frac{k_1}{k_2}$$

$$[Ab] = [Ab^{\circ} - AgAb]$$

$$[Ag] = [Ag^{\circ} - AgAb]$$

$$B/F = [AgAb]/[Ag]$$

หรือ $B/F = K([Ab^{\circ}] - B)$

เมื่อ B = ความเข้มข้นของ bound form

F = " free form

K = equilibrium constant

$[Ab^{\circ}]$ = molar concentration ของ antibody binding sites

ถ้าให้ b เป็น fraction ของ bound form

$\therefore B = b[H]$

เมื่อ $[H]$ = total concentration ของ hormone

$$B/F = b/(1-b)$$

หรือ $= K([Ab^{\circ}] - b[H])$

จะเห็นว่า B/F จะลดลงถ้า $[H]$ มีค่าสูงขึ้น ถ้า $[H] = [Ab^{\circ}]$ จะได้ $B/F = 1$ คือมีเปอร์เซนต์การรวมตัวสูงถึง 50 % แต่ความไวของการวัดขึ้นกับค่า K โดย K จะมีค่ามากเมื่อ Ag* ที่ใช้มีค่าต่ำ และ Ab ที่ใช้มีความเข้มข้นต่ำเช่นที่ B/F = 0.5 ที่อัตราส่วนนี้จำนวนฮอร์โมนที่รวมกับแอนติบอดีนั้นจะมีปริมาณพอเหมาะไม่มากหรือน้อยเกินไปจะทำให้ความไวของการวัดสูง

จากการเปลี่ยนค่า $[H]$ ให้สูงขึ้นเรื่อย ๆ เปอร์เซนต์การรวมตัว และ B/F จะมีค่าลดลง เมื่อนำไปเขียนกราฟระหว่าง log ของความเข้มข้นของ Ag กับ B/F

หรือกับเปอร์เซ็นต์การรวมตัว จะได้กราฟมาตรฐานที่มีความชัน และความไวในการวัดสูงซึ่งสามารถใช้อ่านค่าฮอร์โมนจากพลาสมาตัวอย่างได้ และค่าที่อ่านได้จะอยู่ในช่วงที่มีความแม่นยำที่สุด

การทำ RIA ของฮอร์โมนที่เป็นโปรตีน ต้องมีหลักดังนี้

1. radioactively labelled hormone (Ag^*) และ unlabelled hormone (Ag) ให้ปฏิกริยาแบบเดียวกัน

2. ฮอร์โมนในพลาสมามีคุณสมบัติทางเคมีเหมือนกับฮอร์โมนมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบ

3. ต้องรักษาระดับความเข้มข้นของ Ag^* ให้น้อยที่สุดเท่าที่จะทำได้ เพื่อลดการทำลายฮอร์โมนเนื่องจากสารไอโอดีนลง จึงต้องใช้ Ag^* ที่มี specific activity สูง

4. โมเลกุลของฮอร์โมนที่จะทำการ assay ต้องมีความสามารถที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อตัวเองโดยเฉพาะได้ (specific antibody)

5. การ label ฮอร์โมนต้องไม่ทำลายความเป็นแอนติเจน (antigenicity) ของฮอร์โมนนั้น ๆ

6. ภายหลังจากการ label ฮอร์โมนนั้นแล้ว จะต้องได้รูปที่บริสุทธิ์ซึ่งมีทั้ง radioactively และ antigenicity อยู่รวมกัน

7. สามารถแยก antigen-antibody complex(Ag^*-Ab)ออกจาก Ag^* อิสระได้ เพราะจำนวนของ Ag^* ทั้งในรูปอิสระและรูปที่ถูกรวมตัวอยู่ในสภาพของ Ag^*-Ab complex (bound form) สามารถนำไปคำนวณหาปริมาณของ Ag (standard หรือ unknown)ได้

ในการ assay นั้นส่วนสำคัญอีกส่วนหนึ่ง คือการแยก Ag^*-Ab complex (B) ออกจาก Ag^*รูปอิสระ (free form, F) เพื่อนำมาคำนวณหาอัตราส่วนระหว่าง B กับF และเปอร์เซนต์การรวมตัวของAg^* กับ Ab ได้มีผู้คิดค้นวิธีการแยกทั้ง 2 รูปนี้ออกจากกัน ปัจจุบันมีหลายวิธี คือ

1. อาศัยความแตกต่างของการเคลื่อนที่ระหว่าง B และF โดยวิธี

ก. Paper chromatoelectrophoresis (Yalow และ Berson,1960)

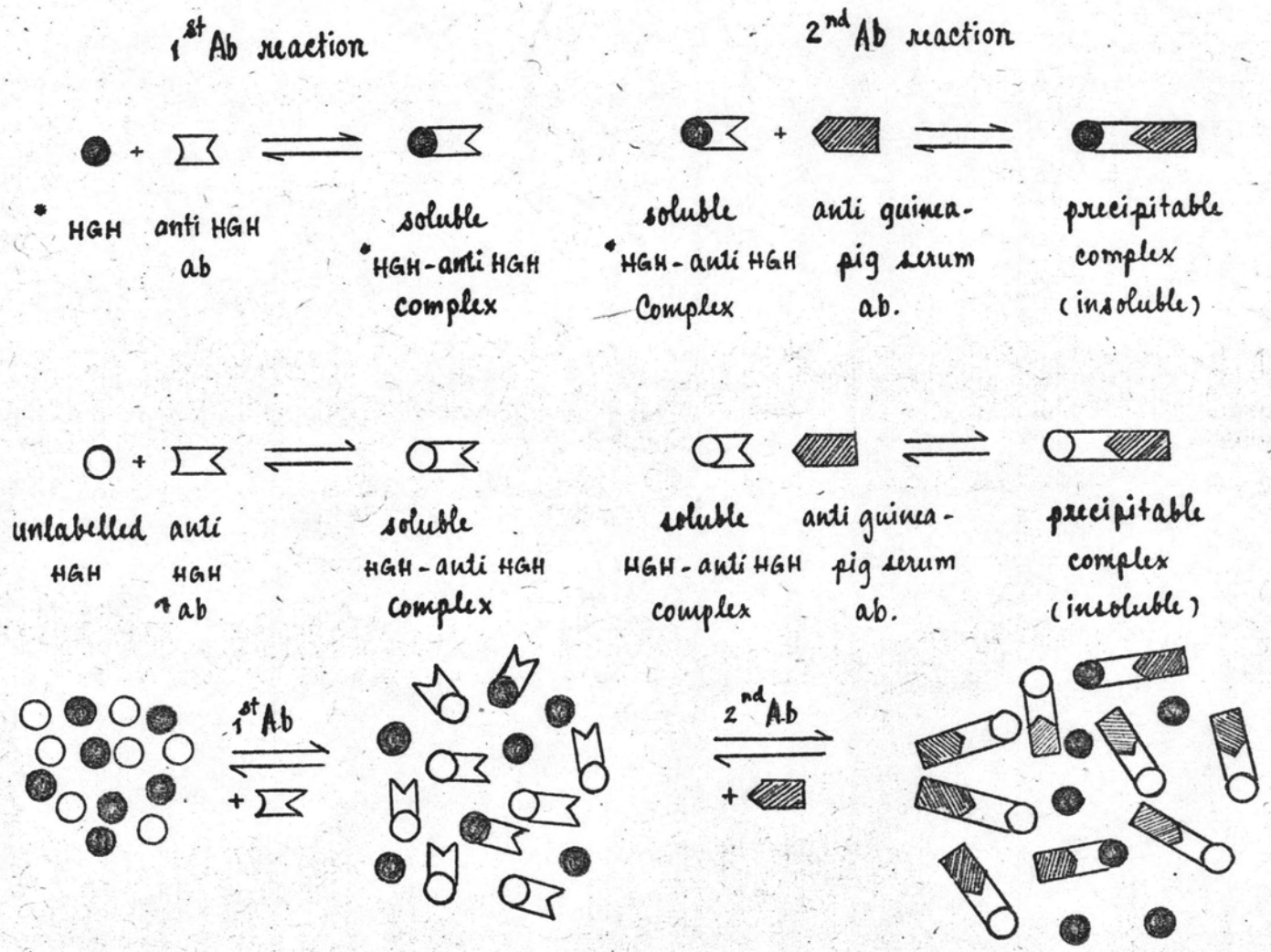
ข. Gel filtration polyacrylamide gel electrophoresis (Fitschen,1964)

2. Adsorption methods โดยใช้ :-

ก. Charcoal (Herbert และคณะ, 1965; Lau และ คณะ, 1965) วิธีนี้ปัจจุบันเป็นที่นิยมมาก เพราะมีราคาถูก

ข. Silicate เช่น talc (Rosselein และคณะ, 1966)

3. Double antibody technique Utiger และ คณะ,(1962) ได้เริ่มใช้วิธีนี้ในการทำ RIA ของ HGH โดยมีหลักการ (ดังแสดงในรูปที่ 2) ดังนี้ คือ ทำการตกตะกอน soluble primary reaction product ซึ่งประกอบด้วย Ag*-Ab และ Ag-Ab ด้วยการเติมแอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody คือ anti gamma globulin) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น Ab ต่อ Ab ตัวแรก (primary Ab ซึ่งอยู่ใน Ag*-Ab และ Ag-Ab complexes และ primary Ab นี้มี gamma globulin อยู่กายในโมเลกุล ซึ่งจะทำหน้าที่เสมือนเป็น Ag) ลงไป Anti gamma globulin) จะไปรวมตัวกับ gamma globulin ใน Ag*-Ab และ Ag-Ab complex ซึ่งจะทำให้เกิด insoluble immune complex ขึ้น สามารถแยกออกจาก soluble free antigen ได้ โดยวิธีการเซนตริฟิวจ์ (centrifugation) วิธีนี้ Skom และ Talmage (1958) ได้เป็นผู้ค้นพบในปฏิกริยาการแยก bound form ของอินซูลิน ออกจากพลาสมา จากการค้นพบนี้ Utiger และ คณะ จึงนำมาใช้ในวิธี RIA ของHGH ในปี 1962 และในปี 1963 Morgan และLazarow จึงได้นำมาใช้ในการทำ RIA ของอินซูลิน วิธีนี้เป็นที่นิยมใช้กันมากแม้ว่าจะมีราคาแพง แต่มีความจำเพาะสูง ทำได้ง่าย และสดวกรวดเร็ว

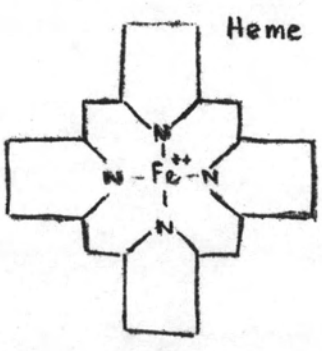


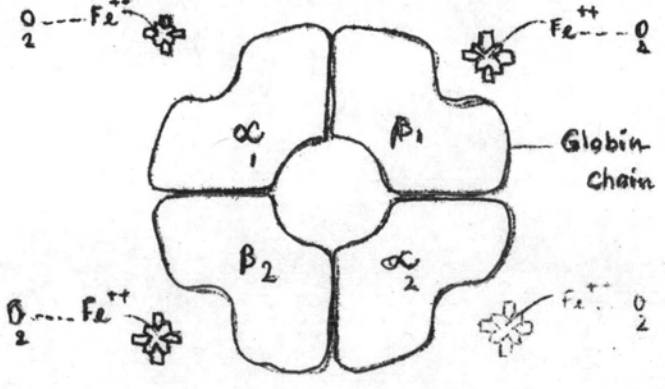
รูปที่ 2 **แสดงหลักการแยก** Ag*-Ab complex (bound form) **ออกจาก** free Ag (free form) **ด้วยวิธี** double antibody technique

การวัดปริมาณ HGH ในพลาสมาด้วยวิธี RIA นี้ ปัจจุบันเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด ทั้งงานวิเคราะห์ประจำวันและงานค้นคว้า ทั้งนี้เพราะความไวของการวัดของวิธีนี้สูงมาก กล่าวคือสามารถวัดปริมาณ HGH ได้ถึงค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.5นก/มล. และวิธีนี้สามารถทำได้ทุกแห่งโดยมีสภาวะคงที่ และมีความจำเพาะสูง เนื่องจากเป็นปฏิกริยาที่อาศัยการแสดงฤทธิ์ทางอิมมูน จึงมีผู้นิยมใช้ศึกษาในทางการแพทย์มาก เพื่อวัดหาปริมาณฮอร์โมนในผู้ป่วยด้วยโรคต่าง ๆ ที่ HGH มีส่วนเกี่ยวข้องด้วย และใช้ปริมาณ HGH มาประกอบการวิเคราะห์โรค ส่วนมากมักใช้การวัดปริมาณฮอร์โมนในพลาสมา ภายหลังการกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นต่าง ๆ เป็นวิธีที่ช่วยบอกถึงการทำงานหรือหน้าที่และประสิทธิภาพของต่อมพิทูอิตารี่ของผู้ป่วยที่คิดว่าอาจมีหน้าที่ของต่อมพิทูอิตารี่เสียไป ในจำนวนโรคต่าง ๆ ที่นำมาศึกษากันนั้น ส่วนใหญ่จะเป็นโรคที่พบว่ามีการเจริญเติบโตช้าร่วมด้วยเสมอ และจากการวัดระดับ HGH ก่อนและหลังการกระตุ้นจะบอกได้ว่าการเจริญเติบโตช้านั้นเกิดจากการไม่ทำงานของต่อมพิทูอิตารี่หรือเป็นเพราะมีความผิดปกติที่ส่วนอื่นของร่างกาย จากผลของการศึกษานี้อาจจะนำมาช่วยในการรักษาผู้ป่วยที่มีการเจริญเติบโตช้าเพราะขาด HGH ได้

<u>ธาลัสซีเมีย</u> (Thalassemia)

ในปัจจุบันนี้ โรคเลือดที่เป็นทางกรรมพันธุ์ สำหรับในประเทศไทย ที่ตรวจพบว่าเป็นกันมาก คือ ธาลัสซีเมีย โรคนี้เกิดจากมีการสร้างสารฮีโมโกลบิน (haemoglobin, Hb) ในร่างกายผิดปกติไปจากธรรมดา กล่าวคือมีการสร้างสาร Hb ลดน้อยลง ตามปกติมนุษย์มี Hb ในเลือดเป็นตัวพาออกซิเจน (O_2)จากปอด ไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกายทางกระแสโลหิต ปกติจะมี Hb กระจายอยู่ในเลือดทั่วร่างกาย โมเลกุลของ Hb ประกอบด้วย 2 ส่วนคือส่วนที่เป็นโปรตีน เรียกกลอบิน (globin) และส่วนที่เป็นวงแหวนของพอไฟริน (porphyrin ring) เรียก ฮีม (heme)





โมเลกุลของฮีมจะต้องมีอนุของเหล็ก(ferrus) อยู่กลางโมเลกุล เป็นตัวจับออกซิเจนไว้ และเป็นตัวยึดฮีมไว้กับสายกลอบิน ฮีม 1 ตัวจะจับกับสายกลอบินได้ 1 สาย ซึ่งสายกลอบินนี้แบ่งได้อย่างน้อยเป็น 5 ชนิด คือ สายแอลฟ่า(alpha, α) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 141ตัว สายเบต้า(beta, β) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 146ตัว สายเดลต้า(delta, δ)ประกอบด้วยกรดอะมิโน 146ตัว และสายเอปซิลอน(epsilon, ε) ซึ่งยังไม่ทราบจำนวนกรดอะมิโนที่แน่นอน แต่ต่างจากสาย α, β, γ และ δ อย่างชัดเจน

โมเลกุลของฮีโมโกลบิน จะเป็น tetramer คือประกอบด้วยสายโปลิเปปไทด์ 4 สาย แต่ละสายจะทำหน้าที่ห่อหุ้มฮีมให้อยู่ในรูปเฟอรัสไอออน เพื่อที่จะได้จับกับ O_2 ที่ปอดได้ และส่ง O_2 ให้แก่เนื้อเยื่อต่างๆได้ โดยรับ CO_2 กลับมาแทน

การสร้างสายโปลิเปปไทด์ทั้ง 5 ชนิดนั้น ร่างกายจะสร้างขึ้นในเวลาต่างกัน กล่าวคือเมื่อยังเป็น embryo อายุ 1 เดือน ร่างกายจะสร้างแต่สาย ε เท่านั้น ดังนั้นระยะนี้ Hb จะเป็นชนิด ε_4 เรียก <u>Gower I</u> เมื่ออายุ 2 เดือน สาย ε จะหายไป ร่างกายจะเริ่มสร้างสาย α และสร้างต่อไปตลอดชีวิต ในระยะนี้ร่างกายจะสร้างสาย γ ขึ้นด้วย ดังนั้น Hb ในระยะนี้จะเป็น $\alpha_2\gamma_2$ เรียก <u>Hb F</u> เมื่อทารกในครรภ์มีอายุประมาณ 3-4 เดือน Hb Fจะน้อยลง เนื่องจากการสร้างสาย γ ลดลง ในขณะเดียวกันจะมีการสร้างสาย β เพิ่มขึ้น ดังนั้นชนิดของ Hb ตอนนี้ จึงมีทั้ง F และ $A_1(\alpha_2\beta_2)$

เมื่อเกิดเด็กจะมี Hb Fเป็นส่วนใหญ่(75-80 %) ในระยะนี้จะมีการสร้างสาย δ ขึ้นแต่น้อยมาก Hb A_2หรือ $\alpha_2\delta_2$ จะมีเพียงพอพบได้เมื่อแรกเกิด และเพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 2-3 % เมื่ออายุได้ 6 เดือน และจะคงระดับนี้ไปตลอดชีวิต

ในผู้ใหญ่ควรพบ Hb 3 ชนิด คือ

Hb A_1 ประมาณ 97 %

Hb A_2 ประมาณ 2-3 %

Hb F $<$ 1 %

การเกิดโรคเกี่ยวกับฮีโมโกลบินผิดปกติ(abnormal Hb) แบ่งได้เป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ

1. ผิดปกติในคุณภาพของHb คือโครงสร้างปฐมภูมิของโมเลกุลผิดไป เช่น การเกิด sickle cell anemia เป็นต้น

2. ผิดปกติในปริมาณของHb คือมีการสร้างHb น้อยลง เรียกโรคที่เกิดนี้ว่า ธาลัสซีเมีย(thalassemia)

โรคธาลัสซีเมีย เป็นโรคที่เกิดขึ้นเนื่องจากมี gene ผิดปกติ ทำให้การสร้างสายกลอบินลดลง หรือสร้างไม่ได้เลย เม็ดเลือดแดงในธาลัสซีเมียมีขนาดเล็ก และติดสีน้อย(hypochromic microcytic red cell)

<u>ชนิดของธาลัสซีเมีย</u>

ถ้าแบ่งตามการสร้างสายกลอบิน จะแบ่งธาลัสซีเมีย ได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. α thalassemia จะมีการสร้างสาย ลดน้อยลง ซึ่งแบ่ง gene ได้เป็น 2 ชนิด คือ

ก. Thalassemia$_1$ (classical thalassemia)

ข. Thalassemia$_2$ (mild thalassemia)

เนื่องจากมีการสร้างสาย α น้อยลง ดังนั้นชนิดของ Hb ก็เปลี่ยนไปด้วย คือจะพบ β_4 เรียก <u>Hb H</u> ซึ่งเราจะตรวจพบได้ โดยพบว่ามี inclusion bodies อยู่ในเซลเม็ดเลือดแดง นอกจากนี้อาจมี Hb ชนิด δ_4 เกิดขึ้นด้วย สำหรับในเด็กอาจมี Hb ชนิด γ_4 เรียก Bart เกิดขึ้น

2. β thalassemia จะมีการสร้างสาย β ลดน้อยลง ดังนั้นชนิดของ Hb จะเปลี่ยนไป คือจะพบ α_4 เกิดขึ้นเป็น inclusion bodies ในเม็ดเลือดแดง ซึ่งจะถูกทำลายในไขกระดูกเกือบหมด นอกจากนี้ยังพบว่า Hb A_2 จะสูงขึ้นเนื่องจากมี $\alpha_2\delta_2$ และ Hb F ก็สูงขึ้นด้วย เพราะมี $\alpha_2\gamma_2$ แต่ Hb A_1 จะลดลง เพราะ $\alpha_2\beta_2$ น้อยลง

นอกจากนี้ยังแบ่งธาลัสซีเมียตามชนิดของ gene ได้เป็น

1. Heterozygote คือเป็น carrier โดยมี gene ผิดปกติเพียงตัวเดียว เช่น α thal trait หรือ β thal trait เป็นต้น

2. Homozygote คือมี gene ผิดปกติชนิดเดียวกัน 2 gene ทำให้ไม่สามารถสร้างสายกลอบินนั้นได้เลย เช่น α thal$_1$/ α thal$_1$ เรียก Hb Barts hydrop fetalis และ β thal/β thal เรียก β thal major เป็นต้น

3. Double heterozygote คือพวกที่มี gene ที่ผิดปกติ 2 gene แต่ต่างชนิดกัน ซึ่งแบ่งต่อไปได้อีกเป็น

ก. Interaction คือพวกที่มี gene ผิดปกติทั้ง 2 gene นั้นมีปฏิกริยาต่อกันได้ เช่นการเป็นธาลัสซีเมียกับการมี Hb ที่ผิดปกติ ซึ่งมีความผิดปกติบนสายกลอบินเดียวกับธาลัสซีเมีย เช่นมีการสร้างสาย β น้อยลงในขณะที่มี Hb เป็นชนิด Hb E ซึ่งมีสาย β ผิดปกติ โรคที่เกิดเช่นนี้เรียกว่า β-thalassemia / Hb E

ข. Non interaction คือพวกที่มี gene ผิดปกติทั้ง 2 gene นั้นไม่มีปฏิกริยาต่อกัน เช่น β thal และ Hb E จะไม่มีอาการรุนแรง เพราะ Hb E มีความผิดปกติบนสาย β จึงไม่มีปฏิกริยากับการสร้างสาย α น้อยลง

อาการของธาลัสซีเมีย

ทางคลีนิคแบ่งผู้ป่วยด้วยโรคนี้เป็น

Non diseased form คือพวกที่มีสุขภาพดี ไม่แสดงอาการของโรคจนเห็นเด่นชัด ได้แก่พวกที่เป็น carrier

Diseased form มีการแสดงอาการของโรคให้เห็นชัดเจน อาการที่อาจพบได้ทางคลีนิคคือ

1. มี anemia, jaundice และ hepatosplenomegaly

2. เนื่องจากมีการทำลายเซลเม็ดเลือดแดงสูง ดังนั้นการสร้างเฉพาะในไขกระดูกไม่พอ จึงมีการสร้างภายนอกไขกระดูก(extramedullary hemopoiesis) การสร้างเม็ดเลือดแดงตาม long bone และ flat bone ทำให้กระดูกเกิดความผิดปกติ มีโหนกแก้มนูน ตาห่าง จมูกแบน กระโหลกหนา มี mongoloid facies นอกจากนี้มี osteoporosis ทำให้กระดูกแขนและขาบาง

3. มี secondary sexual charactors บกพร่อง และมี retarded growth ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากการมี hemochromatosis (ภาวะที่มีเหล็กสะสมมากเกินไปในเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกาย ร่วมด้วยการเกิดมีไฟโบรสิส(fibrosis)ในอวัยวะต่างๆที่มีเหล็กมากเกินไปนั้น และทำให้อวัยวะเกิดการเสียหายจนเสื่อมหน้าที่ลงด้วย)ใน anterior pituitary gland ทำให้การทำงานในการหลั่ง gonadotropins และ HGH ของต่อมพิทูอิตารี่เสียไป

4. ภายหลังการติดเชื้อ(infection) จะมีการแตกสลายของเม็ดเลือดสูง ทำให้มีอาการของโรครุนแรงขึ้น

เนื่องจากธาลัสซีเมียเป็นโรคที่พบมากในเมืองไทย โดยมีอุบัติการสูงมาก โดยเฉพาะ β-thalassemia/Hb E จะพบได้มากถึง 16 คน ในจำนวนประชากรหนึ่งหมื่นคน(ประเวศ วะสี, 2511) ทั้งนี้เพราะเป็นโรคทางกรรมพันธุ์ ผู้ป่วยด้วยโรคนี้นอกจากมีอาการดังกล่าวแล้วจะมีอาการผิดปกติทางโรคเกี่ยวกับต่อมไร้ท่อ(endocrine gland)(Weatherall, 1965) และการหลั่งฮอร์โมนด้วย ซึ่งอาจเกิดจาก hemochromatosis มีการเจริญเติบโตช้าจากการ X-ray กระโหลกศีรษะ และกระดูก พบว่าอายุกระดูกต่ำกว่าอายุจริง รวมทั้งมีการเจริญของอวัยวะเพศช้ากว่าปกติ หรืออาจไม่มีเลย ซึ่งอาการเหล่านี้ทำให้น่าสนใจที่จะทำการศึกษา เกี่ยวกับการสร้างและการหลั่งของฮอร์โมนต่างๆ โดยเฉพาะ HGH ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการเฉพาะเหล่านี้ได้ จึงได้ทำการศึกษาระดับของ HGH ในผู้ป่วยโรคนี้ เพื่อจะวิเคราะห์ว่า HGH มีส่วนในการเกิดการเจริญเติบโตช้าในโรคธาลัสซีเมียหรือไม่ ซึ่งถ้าทราบผลแล้วอาจจะนำผลนี้ไปช่วยในการวิเคราะห์โรค และการรักษาพยาบาลคนป่วยเหล่านั้นให้มีการเจริญเติบโตมากขึ้นกว่าเดิม หรือเท่าคนปกติ เพื่อช่วยให้เขาสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ยาวนานใกล้เคียงกับคนปกติมากที่สุด