บทที่ 6

สรุปและอภิปรายผลการศึกษา

ในการศึกษาความผิดปกติของยีน GH-1 ในครอบครัวผู้ป่วย IGHD โดยเลือกเก็บตัวอย่างเลือด จากผู้ป่วย 19 ราย ซึ่งมีอาการทางคลินิกบ่งชี้ว่าขาดฮอร์โมนเติบโต มีระดับ GH ในพลาสมาต่ำกว่า 7 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และพบว่าผู้ป่วยบางราย ไม่ตอบสนองต่อการให้ GH ทดแทน เนื่องจากมีการสร้าง anti - GH antibodies ตลอดจนได้เก็บตัวอย่างเลือดจาก พ่อ แม่ พี่และน้อง ของผู้ป่วยเองเท่าที่จะเก็บได้ เพื่อนำมาศึกษาลักษณะที่อาจถ่ายทอดทางพันธุกรรม รวมถึงเก็บตัวอย่างเลือดจากคนปกติซึ่งเป็นนักศึกษาแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ

จากการศึกษาการขาดหายไปของยีน GH–1 ทั้งขนาด 6.7, 7.0 และ 7.6 kb. ซึ่งถือว่าเป็นสาเหตุที่สำคัญของ IGHD IA โดยการเปรียบเทียบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1900 และ 1919 bp. เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด คือ *Sma* I, *Bgl* I และ *Hae* II ไม่พบว่าผู้ป่วยและสมาชิกในครอบครัวเหล่านี้มีการขาดหายไปของยีน GH –1 ทั้ง 3 ขนาดดังกล่าว นั่นก็หมายความว่าภาวะขาดฮอร์โมนเติบโตของผู้ป่วยที่ได้นำมาศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้มีสาเหตุมาจากการขาดหายไปของยีนทั้ง 3 แบบที่กล่าวข้างต้น (ดังรูปที่ 5.1 – 5.4) แต่จากการตรวจหา point mutation บริเวณอินทรอน 3 โดยการวิเคราะห์การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 258 bp. ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Fok* I (ดัดแปลงมาจาก รายงานของ Joy และคณะ, 1997) ในผู้ป่วยและสมาชิกในครอบครัวที่ได้นำมาศึกษาในครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเบสบริเวณอินทรอน 3 ที่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งตัดจำเพาะของเอ็นไซม์ *Fok* I (ดังรูปที่ด 5.5 - 5.6)

ดังนั้นจึงนำตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยและสมาชิกในครอบครัวมาศึกษาบริเวณที่มีลำดับเบสเปลี่ยนแปลง ด้วยวิธี dideoxy fingerprinting ตรวจกรองหาความผิดปกติของยีน GH-1 โดยอ่านผลจากรูปแบบของแถบดีเอ็นเอบนแผ่นฟิล์มเอ็กซเรย์เมื่อใช้ไพรเมอร์ต่างๆ กัน ที่ออกแบบมาให้สามารถตรวจกรองได้ทั้งยีน GH-1 พบว่ามี 1 ครอบครัว ที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ ต่างไปจากคนปกติเมื่อใช้ไพรเมอร์ GH # 41 และ GH # 47 อย่างชัดเจน (ดังรูปที่ 5.7-5.10) ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีความผิดปกติของเบสเกิดขึ้นแน่นอนในบริเวณไพรเมอร์ที่พบการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอนี้ หรือบริเวณที่อยู่ในไพรเมอร์ใกล้เคียง จึงนับได้ว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วในการที่จะใช้ตรวจหาบริเวณที่อาจมีความผิดปกติของเบสภายในยีนที่เราสนใจ แต่วิธีนี้ก็ยังมีข้อเสียคือต้องเสี่ยงกับการใช้ สารกัมมันตภาพรังสี

ในการหาลำดับเบสที่ผิดปกติโดยการทำ sequencing analysis ด้วยไพรเมอร์ ที่พบการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบแถบดีเอ็นเอจากการทำ ddF พบว่าในแอกซอนที่ 1 ทั้งครอบครัว มีการเปลี่ยนแปลงของเบส C⟶G transversion ในตำแหน่งที่ 5 (heterozygous) เหมือนกันหมด และในเบสตำแหน่งที่ 6 ของแอกซอน 1 เฉพาะในพ่อเท่านั้นที่มีการเปลี่ยนแปลงของเบส T⟶ C transition (heterozygous) ซึ่งในแม่กับลูกเบสตำแหน่งนี้จะเป็น T ปกติ และจากการใช้ไพรเมอร์ ตัวเดียวกันนี้ (GH # 41) ยังพบอีกว่าที่เบสตำแหน่งที่ 18 ของอินทรอน 1 ในครอบครัวเดียวกัน มีการเปลี่ยนแปลงของเบสต่างกันคือ ในพ่อจะเปลี่ยนจาก C⟶G-A heterozygous ส่วนในแม่กับลูกจะเปลี่ยนจาก C⟶ G transversion (heterozygous) (รูปที่ 5.11) นอกจากนี้ยังตรวจพบว่า มีการขาดหายไปของเบสตำแหน่งที่ 64 และ 65 (AT) ของอินทรอน 1 ทั้งพ่อ แม่ และ ลูก จากการสังเกตุผลของการหาลำดับเบสบริเวณแอกซอนและอินทรอน 1 พบว่าผู้ป่วยจะมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเหมือนแม่โดยตลอดและมีบางส่วนจะแตกต่างจากผู้ที่เป็นพ่ออย่างชัดเจน

ถึงแม้ว่าแอกซอน 1 จะมีนิวคลีโอไทด์เพียง 10 ตัว แต่ก็เป็นรหัสสำหรับการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็น leader sequence (โคดอนที่ –26 ถึง –24 และนิวคลีโอไทด์ตัวแรกของ โคดอนที่ – 23) ดังนั้นจึงเชื่อว่าการเปลี่ยนแปลงของเบสในตำแหน่งต่างๆ ในแอกซอนและอินทรอน 1 น่าจะมีผลต่อการสังเคราะห์ GH ที่สมบูรณ์ และเมื่อทำการหาลำดับเบสที่ผิดปกติด้วยไพรเมอร์ GH # 47 พบว่าเฉพาะผู้ที่เป็นแม่เท่านั้นมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสจาก T⟶A transversion (homozygous) ที่ตำแหน่งที่ 90 ของอินทรอน 4 (ดังรูปที่ 5.13) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทำ ddF แต่จะไม่พบความผิดปกติในพ่อและลูก ส่วนเมื่อใช้ไพรเมอร์ GH # 37 พบว่าในผู้ที่เป็นพ่อ มีการเปลี่ยนแปลงของเบส 2 ตำแหน่ง บริเวณอินทรอน 3 คือ ตำแหน่งที่ 17 T⟶ C transition (heterozygous) และตำแหน่งที่ 26 G ⟶ C transversion (heterozygous) (ดังรูปที่ 5.14) ซึ่งจะมีผลที่สอดคล้องกับรายงานต่างๆ ที่ผ่านมาคือ Cogan และคณะ (1995) ได้ศึกษาในผู้ป่วยชาวสวีเดน อเมริกาเหนือ และแอฟริกาใต้ พบว่ามีผู้ป่วยหลายรายที่มีการเปลี่ยนแปลงของเบสตัวแรกของ donor splice site ของอินทรอน 3 จาก G ⟶A transition ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้จะทำลาย donor splice site เกิดการกระโดดข้ามเบสของแอกซอน 3 จึงทำให้มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนตัวที่ 32 –71 ของ GH ที่สมบูรณ์ ยังพบอีกว่าผู้ป่วยบางรายมีการเปลี่ยนแปลงของเบสในตำแหน่งที่ 6 T⟶ C transition ในอินทรอน 3 ซึ่งจะมีผลเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงของเบสในตำแหน่งที่ 1 ดังที่กล่าวข้างต้น

Joy และคณะ (1997) พบการเปลี่ยนแปลงของเบสในตำแหน่งที่ 28 G ⟶A transition ในอินทรอน 3 ทำให้เกิดการ splicing ในรูปแบบที่ผิดปกติ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้อยู่ในบริเวณ XGGG repeats คือเปลี่ยนเป็น XGGA และเมื่อนำมาศึกษาการแสดง

ออกของยีน (gene expression) พบว่า การเปลี่ยนแปลงที่ XGGG repeats นี้ ทำให้เกิดปัญหาในการตัดต่อระหว่างอินทรอนและแอกซอน ในกระบวนการ posttranscription ของ pre-GH mRNA และจากรายงานที่กล่าวมาจะสนับสนุนผลของการศึกษาในครั้งนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปลี่ยนแปลงของเบสในอินทรอน 3 ของผู้ที่เป็นฟอ ที่ตำแหน่งที่ 17 (T ⟶ C) และตำแหน่งที่ 26 (G ⟶ C) ซึ่งเป็นบริเวณ XGGG repeats คือ เปลี่ยนเป็น XCGG จึงเชื่อมั่นว่าการเปลี่ยนแปลงของเบสทั้ง 2 ตำแหน่งนี้น่าจะมีผลต่อการ splicing บริเวณอินทรอน 3

แต่อย่างไรก็ดีการเปลี่ยนแปลงของเบสในบริเวณแอกซอน 1 อินทรอน 1 และอินทรอน 4 ที่พบจากการศึกษาครั้งนี้ก็อาจมีผลทำให้เกิดการสร้าง GH ได้อย่างไม่สมบูรณ์ ซึ่งจะยืนยันได้ก็ต่อเมื่อ นำดีเอ็นเอที่พบความผิดปกติของยีน GH-1 เหล่านี้ไปศึกษาเรื่อง gene expression ต่อในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต

ดังนั้นในการศึกษาและวิจัยครั้งนี้ผู้ป่วยที่มีภาวะขาดฮอร์โมนเติบโตไม่ได้มีสาเหตุมาจาก gene deletion แต่น่าจะมีสาเหตุมาจาก point mutation ของยีน GH-1 บริเวณ แอกซอน 1, อินทรอน 1, อินทรอน 3 และ อินทรอน 4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย