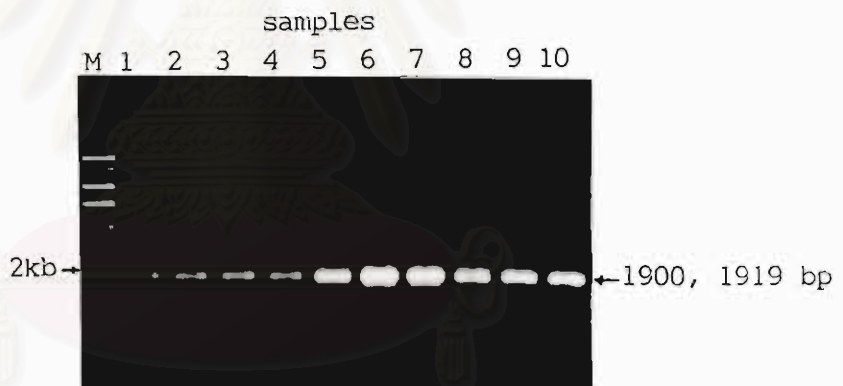


บทที่ 5

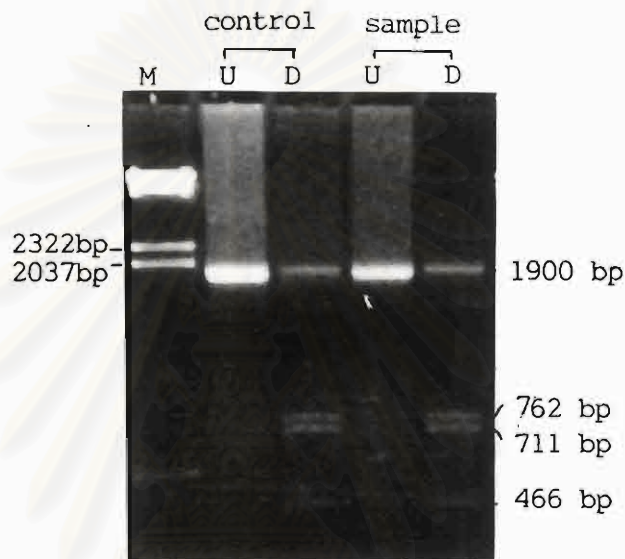
ผลการศึกษา

จากการศึกษาตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะขาดฮอร์โมนเติบโตที่มารับการรักษาในภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล โรงพยาบาลศิริราช และสมาชิกในครอบครัวรวมทั้งสิ้น 39 ราย ได้ผลดังนี้ คือ

1. ไม่พบการขาดหายไปของยีน GH-1 เมื่อศึกษาโดยวิธี PCR และ restriction enzyme analysis (ดังรูปที่ 5.1, 5.2, 5.3 และรูปที่ 5.4)

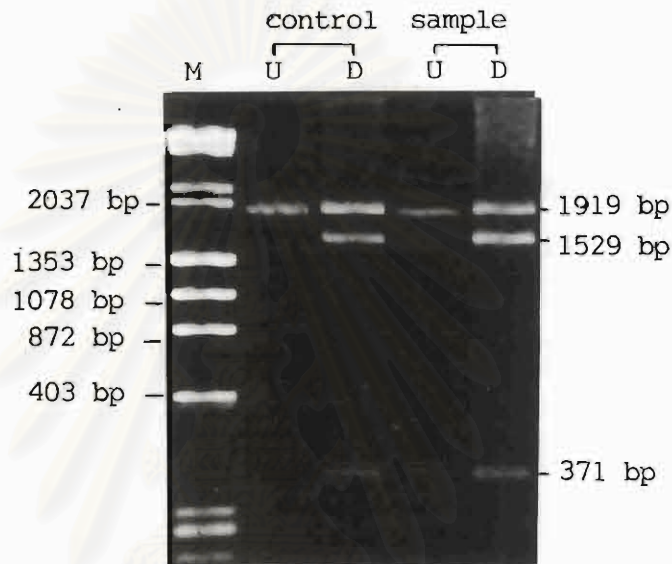


รูปที่ 5.1 แสดงแถบจีนส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 1900 และ 1919 bp. ซึ่งแยกด้วย 1% agarose gel electrophoresis และย่อยด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (M = 10 kb marker) จีนส่วนดีเอ็นเอขนาด 1900 และ 1919 bp นี้ได้จากการเพิ่มปริมาณส่วนที่เป็น flanking region ทั้ง 2 ข้างของยีน GH-1 โดยใช้ไพรเมอร์ GH #210 และ GH #211



รูปที่ 5.2 แสดงแถบจีนส่วนดีเอ็นเอ (1900, 1919 bp) ซึ่งถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Sma* I เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วย GHD กับคนปกติ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน (M= λ *Hind* III, U=undigested, D= digested)

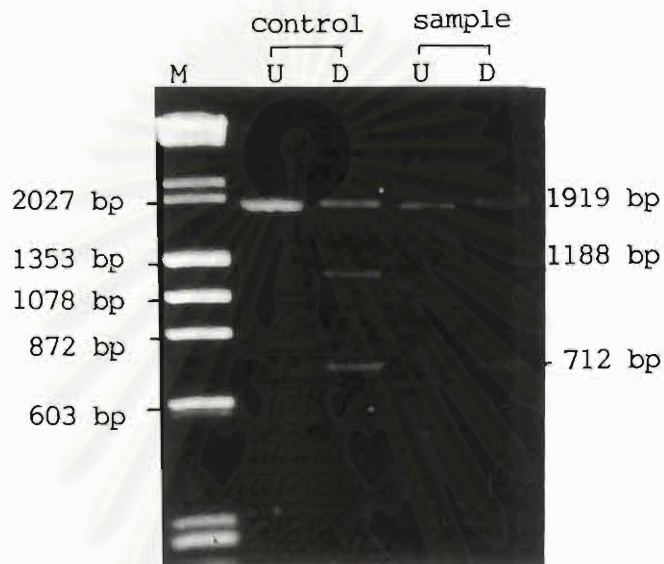
เมื่อนำจีนส่วนดีเอ็นเอขนาด 1900 และ 1919 bp. มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Sma* I .ในคนปกติจะได้จีนส่วนดีเอ็นเอขนาด 1900, 762, 711 และ 466 bp. ซึ่งเหมือนกับตัวอย่างที่นำมาศึกษา ถ้ามีการขาดหายไปของยีนขนาด 7.0 kb จะได้จีนส่วนดีเอ็นเอขนาด 762, 711 และ 466 bp. และถ้ามีการขาดหายไปของยีนขนาด 6.7 kb. จะได้จีนส่วนดีเอ็นเอขนาด 1472 และ 446 kb. ส่วนการขาดหายไปของยีนขนาด 7.6 kb. จะได้จีนส่วนดีเอ็นเอเพียงชิ้นเดียวคือขนาด 1900 bp. ซึ่งไม่พบในตัวอย่างที่นำมาศึกษา



รูปที่ 5.3

แสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (1900, 1919 bp) ซึ่งถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* II เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วย GHD กับคนปกติ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน (M = λ *Hind* III + ϕ x 174 RF *Hae* III, U = undigested, D = digested)

เมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1900 และ 1919 bp. มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* II. ในคนปกติจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1919, 1529, และ 371 bp. ซึ่งเหมือนกับตัวอย่างที่นำมาศึกษา ถ้ามีการขาดหายไปของยีนขนาด 7.0 kb และ 6.7 kb. จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพียงชิ้นเดียว คือ ขนาด 1919 และ 1918 bp ตามลำดับ และถ้ามีการขาดหายไปของยีนขนาด 7.6 kb. จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1529 และ 371 kb. ซึ่งไม่พบในตัวอย่างที่นำมาศึกษา



รูปที่ 5.4

แสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (1900, 1919 bp) ซึ่งถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วย GHD กับคนปกติ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน (M = λ Hind III + ϕ x 174 RF *Hae* III, U = undigested, D = digested)

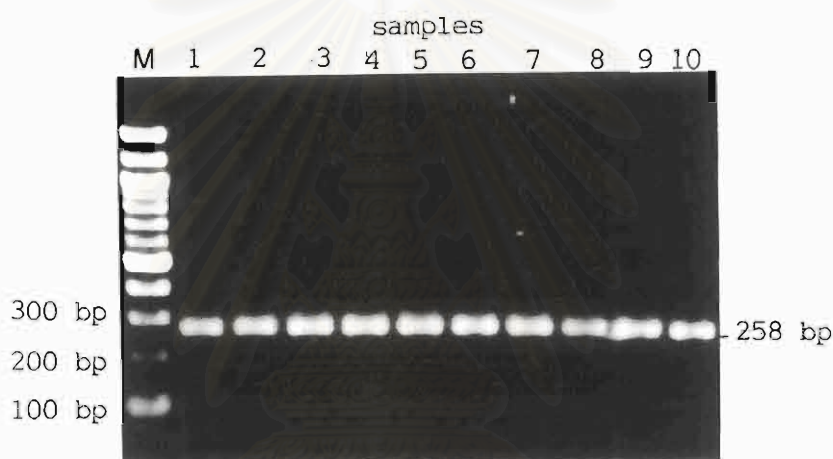
เมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1900 และ 1919 bp. มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I ในคนปกติจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1919, 1188 และ 712 bp. ซึ่งเหมือนกับตัวอย่างที่นำมาศึกษา ถ้ามีการขาดหายไปของยีนขนาด 7.0 kb. จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1919 bp. เพียงชิ้นเดียว แต่ถ้ามีการขาดหายไปของยีนขนาด 6.7 และ 7.6 kb. จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 1200 กับ 712 และ 1188 กับ 712 ตามลำดับ ซึ่งไม่พบในตัวอย่างที่นำมาศึกษา

จากการเปรียบเทียบรูปแบบของการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 1900 และ 1919 bp. ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณส่วน flanking regions ของยีน GH -1 ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Sma* I, *Hae* II และ *Bgl* I ระหว่างคนปกติกับผู้ป่วย GHD พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอ็นไซม์ทั้ง 3 ชนิด จึงมั่นใจได้ว่า ภาวะขาดฮอร์โมนเติบโตของผู้ป่วยเหล่านี้มิได้มีสาเหตุมาจากการขาดหายไปของยีนขนาด 7.0, 6.7 และ 7.6 kb.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

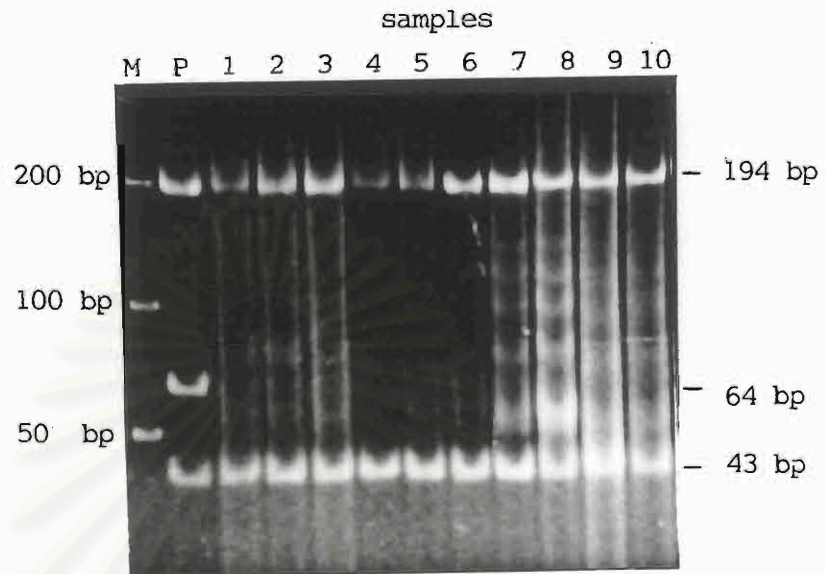
2. ไม่พบการเกิด point mutation บริเวณ อินทรอน 3 เมื่อศึกษาโดยวิธี PCR และ restriction enzyme analysis (ดังรูปที่ 5.5 และ 5.6)



รูปที่ 5.5 แสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 258 bp. ซึ่งแยกด้วย 2% agarose gel electrophoresis และเชื่อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

(M = 100 bp. Ladder)

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 258 bp. นี้ได้จากการเพิ่มปริมาณส่วนที่เป็น อินทรอน 3 โดยใช้ไพรเมอร์ GH# 16 และ GH# 35



รูปที่ 5.6

แสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 258 bp. เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ขนาดจำเพาะ *Fok I* แล้วแยกด้วย 15% polyacrylamide gel electrophoresis (M= marker, P = positive control)

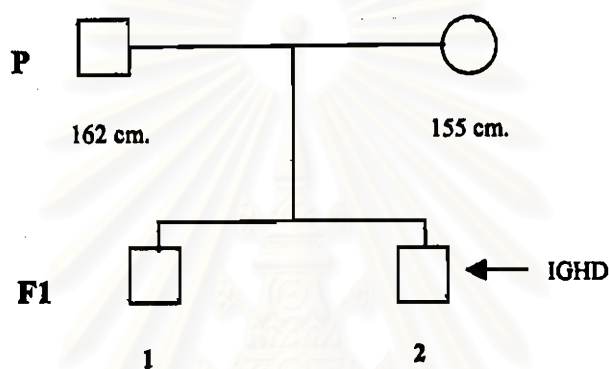
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 258 bp. ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณอินทรีน 3 เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Fok I* ในคนปกติ จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3 ขนาด คือ 194, 63 และ 21 bp. แต่ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงของเบสในตำแหน่งที่ 28 (G → A) ของอินทรีน 3 จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ขนาดคือ 194 และ 64 bp. แต่ถ้าการเปลี่ยนแปลงของเบสเป็นแบบ heterozygous จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 4 ขนาดคือ 194, 64, 43 และ 21 bp. ดังตัวอย่าง positive control ในรูป

(ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 21 bp. ไม่สามารถมองเห็นได้ในที่นี้)

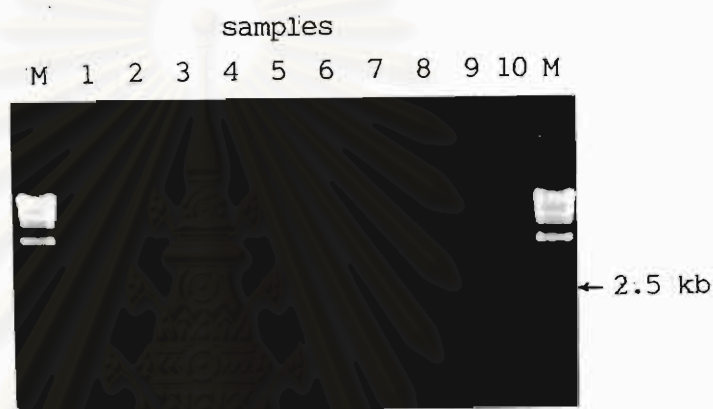
จากการพิจารณาแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของผู้ป่วยในภาพจะต่างจาก positive control โดยไม่พบชิ้นส่วนขนาด 64 bp. ดังนั้น ผู้ป่วยเหล่านี้จึงไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเบส ในตำแหน่งที่ 28 (G → A) ของอินทรีน 3

3. พบบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในยีน GH-1 เมื่อศึกษาโดยวิธี dideoxy fingerprinting (ddF)

จากการตรวจจรวงหาบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในยีน GH-1 โดยวิธี ddF พบว่ามี 1 ครอบครัว ซึ่งมีพงสาวลี ดังนี้ คือ

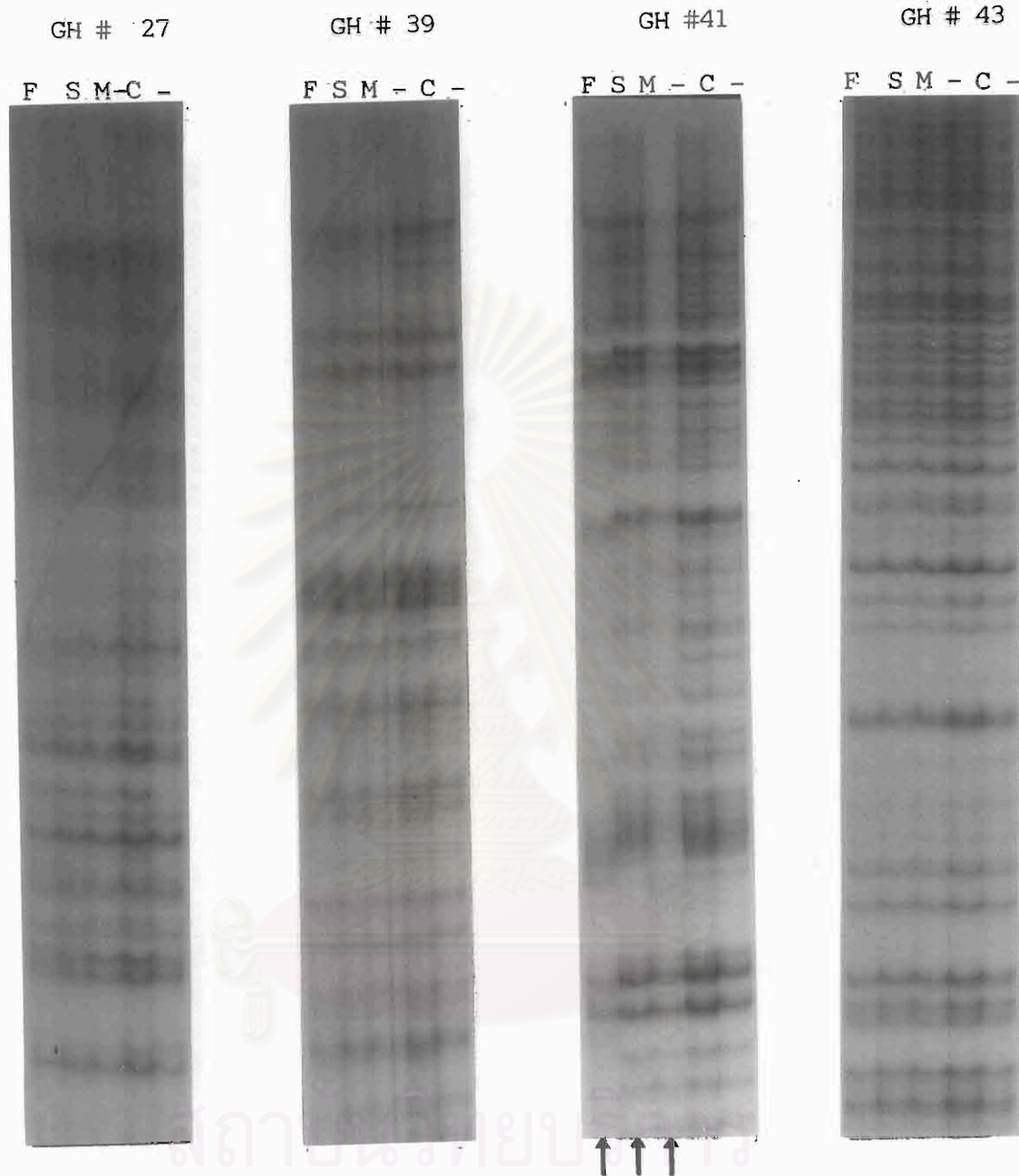


รูปที่ 5.7 แสดงพงสาวลีครอบครัวที่พบความผิดปกติของยีน GH-1 ซึ่งประกอบด้วย พ่อ, แม่ และลูกชาย 2 คน ลูกชายคนที่ 2 มีภาวะขาดฮอร์โมนเติบโต ที่ได้รับการบำบัดโดยการให้ GH ทดแทนแล้ว



รูปที่ 5.8 แสดงแถบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 2.6 kb. ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณ ยีน GH -1 โดยการทำให้ Nested PCR ด้วยไพรเมอร์ GH # 32 และ GH # 33 (M = marker)

พ่อ แม่ และลูกชายซึ่งมีภาวะขาด GH มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอของคนปกติจากการทำ ddF ดังรูป 5.9 และ 5.10

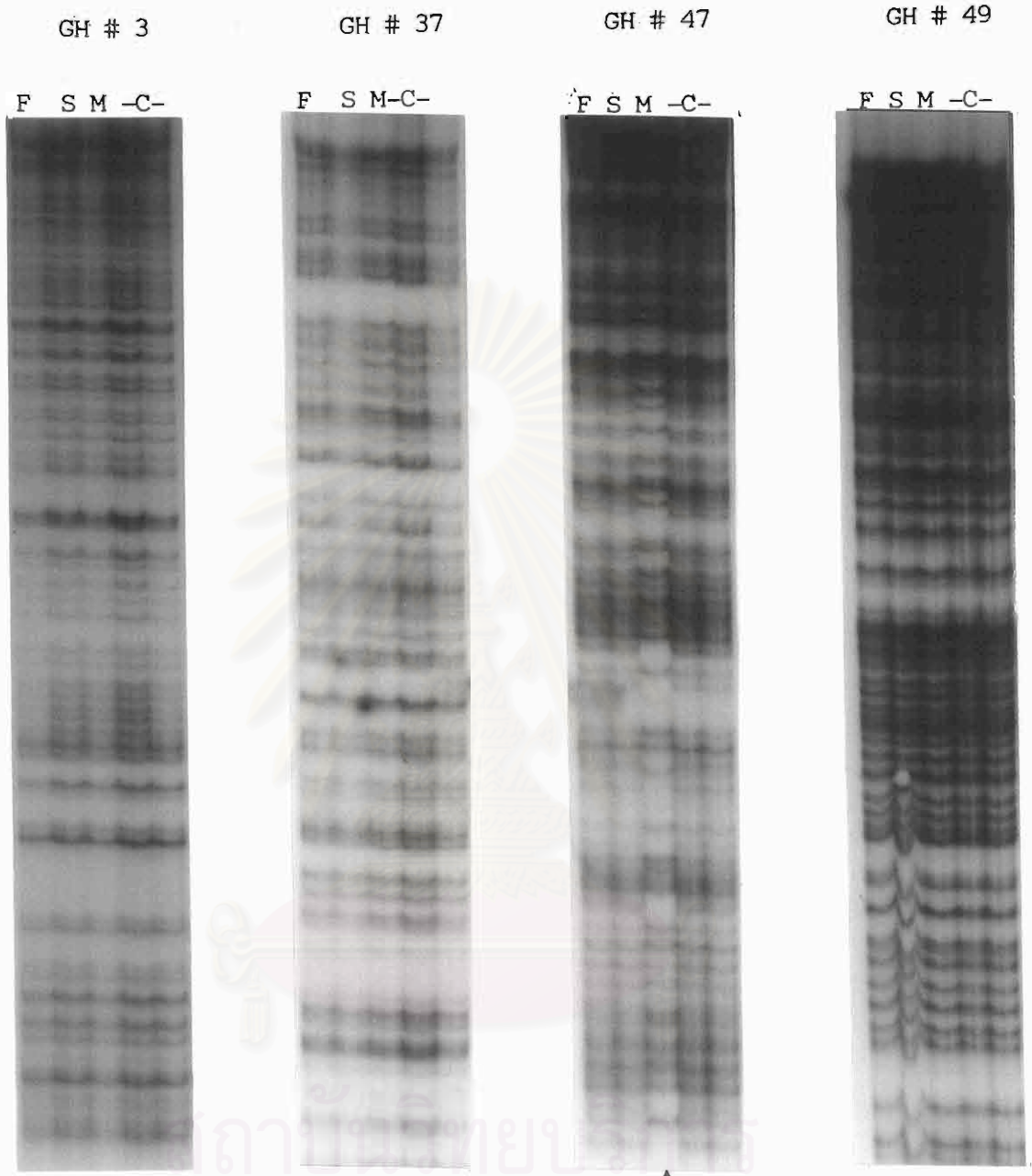


รูปที่ 5.9

แสดงผล ddF จากฟิล์มเอ็กซเรย์ของครอบครัวที่พบความผิดปกติเมื่อใช้
ไพรเมอร์ GH # 27, # 39, # 41 และ # 43 ตามลำดับ

(F = พ่อ, M = แม่, S = ผู้ป่วย, C = คนปกติ)

จากภาพจะเห็นว่าผล ddF เมื่อใช้ไพรเมอร์ GH # 41 ทั้งพ่อ, แม่ และ
ลูก จะมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ ทั้ง
2 คน (C) คือพบว่ามีการเคลื่อนของแถบดีเอ็นเอ ทำให้แถบดีเอ็นเอไม่ตรงกับ
คนปกติ



รูปที่ 5.10

แสดงผล ddF จากฟิล์มเอกซเรย์ของครอบครัวที่พบความผิดปกติเมื่อใช้
ไพรเมอร์ GH # 3, # 37, # 47 และ # 49 ตามลำดับ

(F = พ่อ, M = แม่, S = ผู้ป่วย, C = คนปกติ)

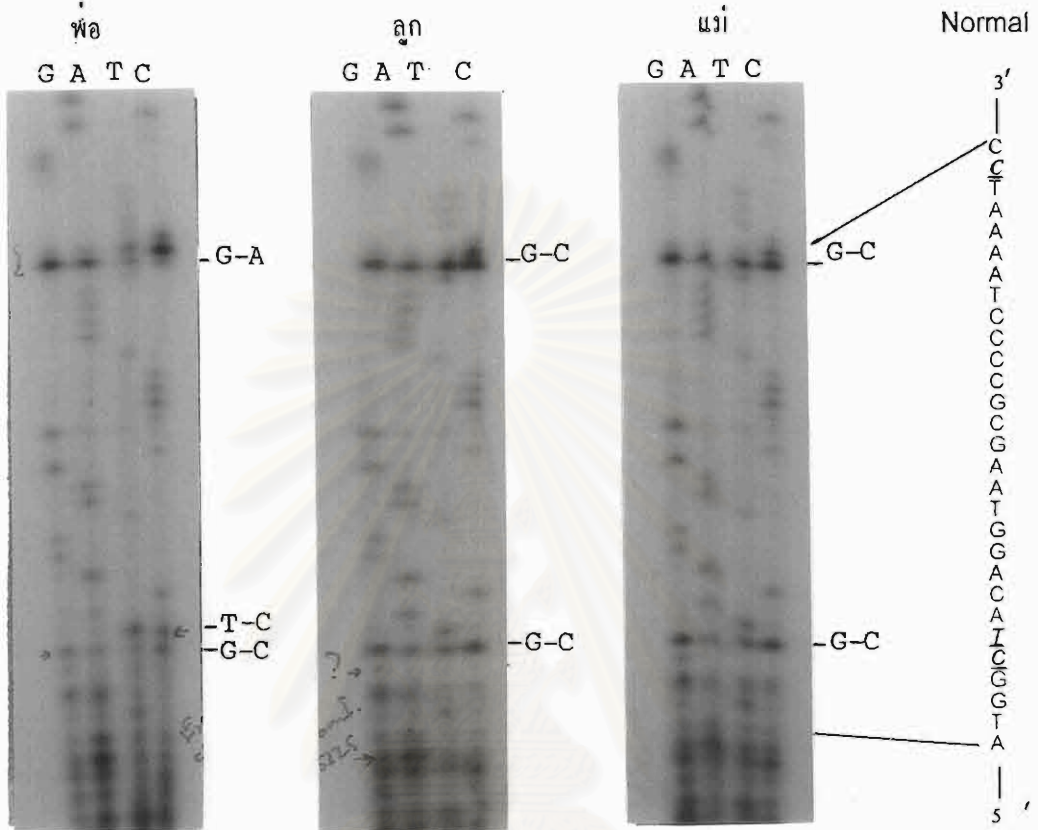
จากภาพจะเห็นว่าผล ddF เมื่อใช้ไพรเมอร์ GH # 47 ผู้ที่เป็นแม่ (M)
จะมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไปอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับ
คนปกติ ทั้ง 2 คน (C)

จากการทำ ddF ด้วยไพรเมอร์ GH # 41 และ # 47 ซึ่งใช้ตรวจกรองบริเวณแอกซอน 1 และ แอกซอน 4 ถึง อินทรอน 4 ตามลำดับ พบความผิดปกติของรูปแบบแถบดีเอ็นเอของบุคคลในครอบครัว จึงใช้เป็นแนวทางสำหรับการทำ sequencing ต่อไปได้ว่าความผิดปกติเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส น่าจะอยู่ในบริเวณ แอกซอน1, แอกซอน 4, อินทรอน 4 หรือ บริเวณใกล้เคียง ดังผลการวิเคราะห์ลำดับเบสในหัวข้อต่อไปนี้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. พบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส เมื่อศึกษาโดยวิธี sequencing analysis
(ดังรูปที่ 5.11- 5.14)



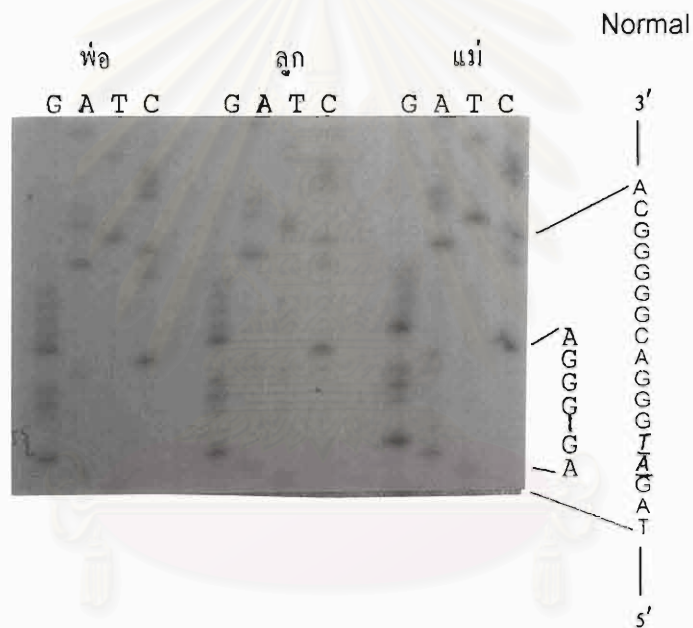
รูปที่ 5.11 แสดงผลการทำ sequencing analysis ของครอบครัวที่พบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในเอกซอน และอินทรอน 1 เมื่อใช้ไพรเมอร์ GH # 41 จากรูป มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสดังนี้
เอกซอนที่ 1

เบสดำแหน่งที่ 5 (5229) มีการเปลี่ยนแปลงเบสจาก C เป็น G แบบ heterozygous ทั้ง พ่อ แม่ และลูก

เบสดำแหน่งที่ 6 (5230) มีการเปลี่ยนแปลงเบสจาก T เป็น C แบบ heterozygous ในผู้ที่ เป็นพ่อ

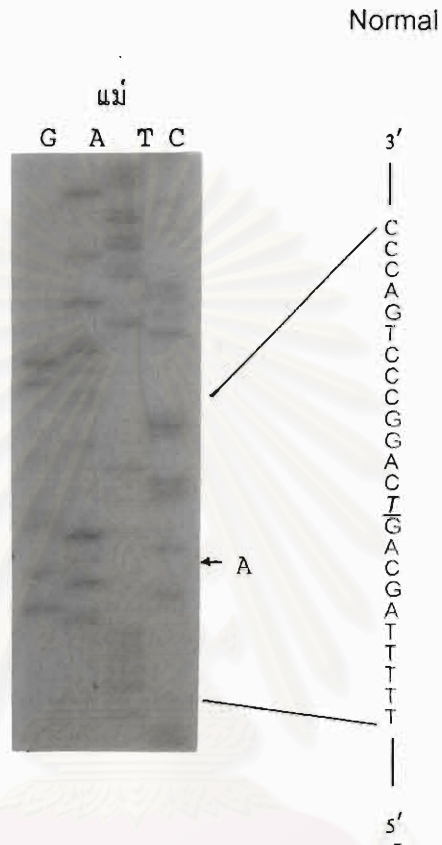
อินทรอน 1

เบสดำแหน่งที่ 18 (5252) ในผู้ที่ เป็นพ่อมีการเปลี่ยนแปลงจาก C → G-A heterozygous ส่วนใน แม่และลูก มีการเปลี่ยนแปลงเบสจาก C → G heterozygous



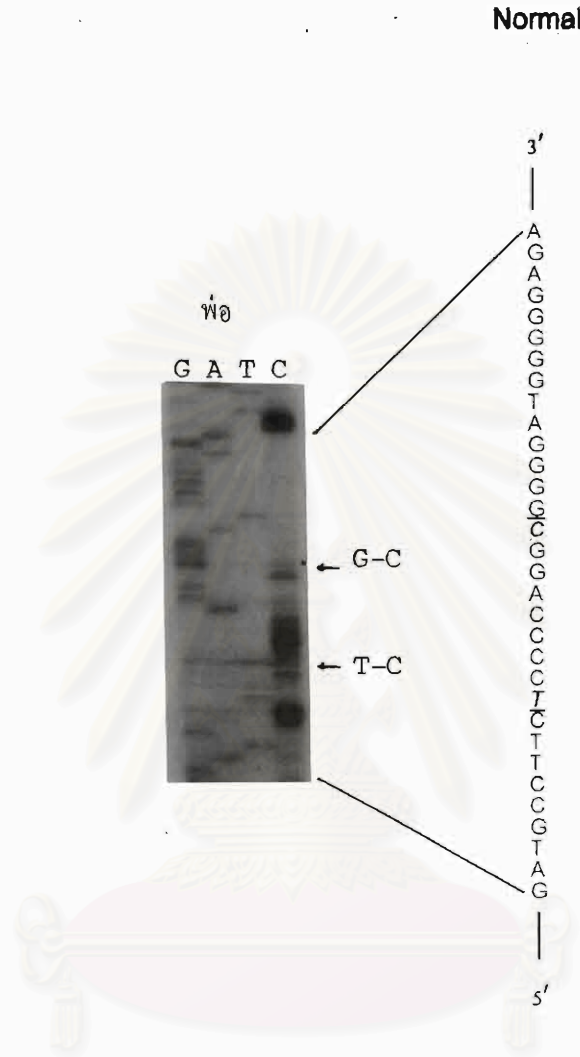
รูปที่ 5.12 แสดงผลการทำ sequencing analysis ของครอบครัวที่พบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในอินทรอน 1 เมื่อใช้ไพรเมอร์ GH # 41

จากรูป จะเห็นว่าทั้งพ่อ แม่ และลูก มีการขาดหายไปของเบส AT ตำแหน่งที่ 64 และ 65 (5298 -5299) ของอินทรอน 1 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ปกติ (Normal)



รูปที่ 5.13 แสดงผลการทำ sequencing analysis ของผู้ที่เป็นแม่ พบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบริเวณ อินทรอน 4 ตำแหน่งเบสที่ 90 (6331) จาก T → A แบบ homozygous

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.14

แสดงผลการทำ sequencing analysis ของผู้ที่เป็นพ่อ พบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส บริเวณอินทอรอน 3 เมื่อใช้ไพรเมอร์ GH # 37

จากรูปจะเห็นว่ามี การเปลี่ยนแปลงลำดับเบส 2 ตำแหน่งในอินทอรอน 3 คือ ตำแหน่งที่ 17 (T → C) และตำแหน่งที่ 26 (G → C) ซึ่งเป็นแบบ heterozygous ทั้ง 2 ตำแหน่ง