หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาเกี่ยวกับโพลีเอมีนไม่ค่อยกว้างขวางนัก เนื่องจากการพัฒนาวิธีวัดปริมาณโพลีเอมีนเป็นไปได้ค่อนข้างจำกัด การแยกและการวัดปริมาณโพลีเอมีนแต่ละตัวต้องใช้วิธีที่มีความไวสูงและเชื่อถือได้ เพราะโพลีเอมีนถึงแม้จะมีอยู่ทั่วไปแต่ในสภาวะปกติมีปริมาณค่อนข้างต่ำมาก ในช่วงเวลาหลายปีที่ผ่านมาได้มีผู้พยายามพัฒนาวิธีวัดปริมาณโพลีเอมีนที่เหมาะสม เช่น ฟลูโอโรเมทรี (fluorometry) (Kai และคณะ1979; Marton และ Lee, 1975) ธินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (Abe และ Samejima, 1975; Fleisher และ Russell, 1975) และ ไฮโวลเตท อีเล็คโตรโฟลีซีส (Russell และคณะ , 1971 ; Russell และ Levy, 1971) เป็นต้น แต่วิธีเหล่านี้มีความไวค่อนข้างต่ำและไม่ค่อยมีความจำเพาะ ในการวิจัยครั้งนี้จึงได้พยายามพัฒนาวิธีวัดปริมาณสเปอร์มิดีนเพื่อใช้วัดปริมาณในพลาสมาของสตรีที่เป็นโรคครรภ์ไข่ปลาอุกเปรียบเทียบกับสตรีตั้งครรภ์ปกติและสตรีปกติที่ไม่ได้ตั้งครรภ์ ซึ่งจะต้องเป็นวิธีที่มีความไวในช่วงพิโคโมลต่อมิลลิลิตรของพลาสมา วิธีต่าง ๆ ที่ใช้วัดปริมาณโพลีเอมีนที่มีอยู่ในปัจจุบันนี้ วิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์นับว่าเป็นวิธีที่มีความไวสูงที่สุด ซึ่งนอกจากจะเป็นวิธีที่มีความไวสูงแล้วยังเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว สามารถใช้วัดปริมาณครั้งละหลาย ๆ ตัวอย่างได้ การวิจัยครั้งนี้จึงได้พยายามพัฒนาวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ขึ้น เริ่มตั้งแต่การพัฒนาการสร้างแอนติซีรัมที่เหมาะสมสำหรับใช้ในเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ ซึ่งเท่าที่ผ่านมาผู้ที่สามารถพัฒนาวิธีนี้ได้สำเร็จมีเพียง ๒ รายเท่านั้นคือ Bartos และคณะ (1977) และ Chaisiri และคณะ (1980) ความยากของวิธีนี้อยู่ที่การสร้างแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะและมีความเหมาะสมสำหรับใช้ในเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

การสร้างแอนติบอดีต่อสารตัวหนึ่งให้ได้ไตเตอร์และความจำเพาะสูงขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความเป็นอิมมูโนเจนของแอนติเจนนั้น ๆ ชนิดของสัตว์ทดลอง วิธีที่ใช้ฉีดอิมมูโนเจนให้กับสัตว์ทดลอง ปริมาณอิมมูโนเจนที่ใช้ฉีด แอดจูแวนท์ที่ใช้ร่วมกับอิมมูโนเจน ช่วงเวลาของการฉีดอิมมูโนเจนซ้ำแต่ละครั้ง และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บแอนติซีรัมจากสัตว์ทดลอง (Playfair และคณะ,1974)

สารที่จะเป็นอิมมูโนเจนที่ดีควรมีขนาดของโมเลกุลใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 ดาลตัน ต้องเป็นสิ่งแปลกปลอมและมีโครงสร้างทางเคมีที่สลับซับซ้อน สเปอร์มิดีนมีคุณสมบัติเป็นเพียงแฮบเทน (hapten) ซึ่งเป็นสารที่ลำพังตัวของมันเองไม่สามารถจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีได้ แต่ถ้านำไปเกาะหรือควบคู่ (coupling) กับสารอื่นซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวนำ แล้วจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีได้ และแฮบเทนนั้นจะทำปฏิกิริยาเฉพาะกับแอนติบอดีนั้นได้ สเปอร์มิดีนมีขนาดของโมเลกุลเล็กมาก มีน้ำหนักโมเลกุลเพียง 145 ดาลตัน สามารถถูกขับออกจากร่างกายหรือถูกทำลายได้รวดเร็ว และโมเลกุลอยู่ในลักษณะเป็นเส้นตรงยาวไม่มีโครงสร้างทางเคมีที่สลับซับซ้อน การที่จะทำให้สเปอร์มิดีนเป็นอิมมูโนเจนที่ดีต้องนำไปคอนจูเกตกับสารอื่นที่มีคุณสมบัติเป็นอิมมูโนเจน เช่น โปรตีนบางชนิดซึ่งเรียกว่าโปรตีนตัวนำ ที่นิยมใช้ได้แก่ อัลบูมิน (albumin) ไทโรกลอบบูลิน (thyroglobulin) โอวาลบูมิน (ovalbumin) ฮีโมไซยานิน (hemocyanin) ไฟบริโนเจน (fibrinogen) และแกมมากลอบบูลิน (gammaglobulin) เป็นต้น (Vaitukaitis และคณะ, 1971; Skowsky และ Fisher, 1972; Parker; 1976) การวิจัยครั้งนี้ได้เลือกใช้อัลบูมินและไทโรกลอบบูลินของวัวเป็นโปรตีนตัวนำ เพราะโปรตีนทั้ง 2 ตัวนี้หาได้ง่าย มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ละลายน้ำได้ง่ายและมีหมู่คาร์บอกซิลิค (carboxylic group) หลายหมู่ที่สามารถเกาะกับหมู่อะมิโน (amino group) ของสเปอร์มิดีนได้ ได้ใช้คาร์บอไดอิมายเป็นตัวช่วยให้เกิดการเกาะกันระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิคของโปรตีนกับหมู่อะมิโนของสเปอร์มิดีนโดยพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) (Goodfriend และคณะ, 1964)

ในการเตรียมคอนจูเกตระหว่างสเปอร์มิดีนกับอัลบูมินหรือไทโรกลอบบูลิน จำนวนโมเลกุลของสเปอร์มิดีนที่เกาะกับโปรตีน 1 โมเลกุลเรียกว่า อินคอร์โพเรชันโมลาร์เรโช (incorporation molar ratio) เมื่อเปลี่ยนอัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของสารตั้งต้นที่ใช้ ซึ่งได้แก่สเปอร์มิดีน โปรตีนตัวนำและคาร์บอไดอิมาย ต่าง ๆ กัน พบว่าถ้าใช้สเปอร์มิดีนกับคาร์บอไดอิมายน้อยจะได้อินคอร์โพเรชันโมลาร์เรโชต่ำ แต่ถ้าใช้คาร์บอไดอิมายหรือสเปอร์มิดีนมากขึ้นจะได้อินคอร์โพเรชันโมลาร์เรโชสูงขึ้น การใช้จำนวนโมเลกุลของสเปอร์มิดีนมาก ๆ ย่อมเป็นการเพิ่มโอกาสให้สเปอร์มิดีนเข้าเกาะกับโปรตีนได้มากยิ่งขึ้น แต่บางครั้งการใช้สเปอร์มิดีนมากเกินไปก็เป็นการสูญเสียโดยไม่จำเป็น เช่น ปริมาณสเปอร์มิดีน 1,000 โมเลกุลก็เพียงพอสำหรับใช้ในการคอนจูเกตกับอัลบูมิน 1 โมเลกุล เนื่องจากการใช้

สเปอร์มิดีนมากกว่านี้ไม่ทำให้มีจำนวนโมเลกุลของสเปอร์มิดีนเกาะกับอัลบูมินเพิ่มขึ้น Skowsky และ Fisher (1972) ได้เตรียมคอนจูเกตระหว่างไลซีนวาโสเพรสซิน (lysine vasopressin) กับอัลบูมินของวัว โดยใช้อัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของสารตั้งต้น (ไลซีน-วาโสเพรสซิน อัลบูมินและคาร์บอไดอิมาย) เป็น 200:1:500 ได้อินคอร์โพเรชันโมลาร์เรโชประมาณ 2 ถึง 3 แต่ถ้าเตรียมคอนจูเกตระหว่างไลซีนวาโสเพรสซินกับอัลบูมินของคน โดยวิธีเดียวกันแต่ใช้อัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของสารตั้งต้นเป็น 50:1:500 จะได้อินคอร์-โพเรชันโมลาร์เรโชอยู่ในช่วง 45 ถึง 60 ดังนั้นจะเห็นว่าการเปลี่ยนอัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของสารตั้งต้นที่ใช้เตรียมคอนจูเกตเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ได้อินคอร์โพเรชันโมลาร์เรโชต่าง ๆ กัน

การเตรียมคอนจูเกตระหว่างสเปอร์มิดีนกับอัลบูมินและสเปอร์มิดีนกับไทโรกลอบ-บูลิน ได้ค่าอินคอร์โพเรชันโมลาร์เรโชแตกต่างกันมาก คอนจูเกตระหว่างสเปอร์มิดีนกับอัลบูมินมีค่าอินคอร์โพเรชันโมลาร์เรโชสูงที่สุดคือ 32 อัลบูมินมีหมู่คาร์บอกซิลิคอยู่ประมาณ 118 หมู่ (Skowsky และ Fisher, 1972) นั่นคือประมาณร้อยละ 27 ของหมู่คาร์บอกซิลิคของอัลบูมินมีสเปอร์มิดีนเข้าไปเกาะ ส่วนคอนจูเกตระหว่างสเปอร์มิดีนกับไทโรกลอบบูลินมีค่าอินคอร์โพเรชันโมลาร์เรโชสูงที่สุดคือ 601 ไทโรกลอบบูลินมีหมู่คาร์บอกซิลิคอยู่ประมาณ 1,100 หมู่ (Skowsky และ Fisher, 1972) นั่นคือประมาณร้อยละ 54 ของหมู่คาร์บอก-ซิลิคของไทโรกลอบบูลินมีสเปอร์มิดีนเข้าไปเกาะ การที่คอนจูเกตที่เตรียมได้มีอินคอร์โพเรชันโมลาร์เรโชแตกต่างกันเช่นนี้ อาจเนื่องมาจากไทโรกลอบบูลินมีขนาดของโมเลกุลใหญ่กว่าอัลบูลินประมาณเกือบ 10 เท่า และมีหมู่คาร์บอกซิลิคมากกว่า ดังนั้นไทโรกลอบบูลินย่อมมีโอกาสถูกสเปอร์มิดีนเข้าไปเกาะได้มากกว่าอัลบูมิน ถ้าเปรียบเทียบร้อยละของหมู่คาร์บอก-ซิลิคของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดที่มีสเปอร์มิดีนเข้าไปเกาะจะเห็นว่าต่างกันประมาณ 2 เท่า การที่สเปอร์มิดีนเข้าเกาะกับหมู่คาร์บอกซิลิคของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดไม่ได้หมดทุกหมู่ อาจเนื่องจากทั้งอัลบูมินและไทโรกลอบบูลินเป็นโปรตีนลักษณะก้อน (globular protein) ดังนั้นอาจจะมีหมู่คาร์บอกซิลิคบางส่วนเท่านั้นที่อยู่บริเวณที่สเปอร์มิดีนจะเข้าไปเกาะได้ เช่น บริเวณผิวนอกของโมเลกุลของโปรตีน อีกจำนวนหนึ่งอาจซ่อนอยู่ภายในโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) ของโปรตีนนั้น Chaisiri และคณะ (1980) ได้เตรียมคอนจูเกตระหว่างสเปอร์มิดีนกับอัลบูมินโดยวิธีเดียวกันนี้ โดยใช้อัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของสารตั้งต้น (สเปอร์-มิดีน อัลบูมินและคาร์บอไดอิมาย) เป็น 440:1:50 ได้สเปอร์มิดีนคอนจูเกตที่มีอินคอร์โพเรชัน

โมลาร์เรโซสูงถึง 46 การวิจัยครั้งนี้ได้ทดลองใช้อัตราส่วนเดียวกันแต่ปรากฏว่าได้อินคอร์-โพเรชันโมลาร์เรโซเพียง 6

การที่มีแฮบเทนคอนจูเกตอยู่กับโปรตีนตัวนำ แฮบเทนจะเปรียบเสมือนแอนติเจนิค-ดีเทอร์มิแนนท์(antigenic determinant) อีกชนิดหนึ่งของโปรตีนชนิดนั้น การสร้างแอนติ-บอดีต่อแฮบเทนซึ่งเกาะอยู่บนโปรตีนตัวนำต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของทีและบีลิมโฟไซท์ (T and B lymphocytes co-operation) โดยที่ทีลิมโฟไซท์จะรับรู้ (reconize) และตอบสนองต่อดีเทอร์มิแนนท์ของโปรตีนตัวนำ จากนั้นทีลิมโฟไซท์จะช่วยบีลิมโฟไซท์ในการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแฮบเทน วิธีการที่ทีและบีลิมโฟไซท์ทำงานร่วมกันมีผู้อธิบายไว้หลายทฤษฎี เช่น ทีลิมโฟไซท์จะปล่อยไมโตเจนิคแฟคเตอร์ (mitogenic factor) ไปกระตุ้นบีลิมโฟไซท์ให้สร้างแอนติบอดี เป็นต้น (Roitt, 1977) ดังนั้นการเลือกใช้โปรตีนตัวนำจึงมีความสำคัญ แฮบเทนบางตัวมีความจำเพาะสำหรับโปรตีนตัวนำบางตัวเท่านั้น เช่น ไลซีนวาโสเพรสซินและพาราไทรอยด์ฮอร์โมน (parathyroid hormone) ต้องคอนจูเกตกับไทโรกลอบบูลินจึงจะกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีได้ แต่ถ้าคอนจูเกตกับโปรตีนตัวอื่นเช่น อัลบูมิน โอวาลบูมิน หรือโพลีเมอร์ของกรดอะมิโนต่าง ๆ จะไม่กระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดี (Skowsky และ Fisher, 1972) นอกจากนี้คุณสมบัติในการเป็นอิมมูโนเจนของโปรตีนตัวนำก็มีความจำเป็น พบว่าถ้าฉีดสัตว์ทดลองด้วยแฮบเทนที่คอนจูเกตกับโปรตีนที่มีอยู่ในร่างกายของสัตว์ทดลองชนิดนั้น สัตว์ทดลองจะไม่สร้างแอนติบอดีต่อแฮบเทน (Roitt, 1977)

แฮบเทนคอนจูเกตแต่ละชนิดที่สามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีได้นั้น มักจะมีอินคอร์โพเรชันโมลาร์เรโซแตกต่างกัน บางคอนจูเกตมีแฮบเทนเกาะอยู่กับโปรตีนตัวนำเพียงไม่กี่โมเลกุลก็สามารถกระตุ้นสัตว์ทดลองให้สร้างแอนติบอดีได้ แต่บางคอนจูเกตต้องมีแฮบเทนเกาะอยู่กับโปรตีนตัวนำหลายโมเลกุลจึงจะกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีได้ เช่น Jaffe และคณะ (1971) ใช้คอนจูเกตที่มีโพรสตาแกลนดิน (prostaglandin) เพียง 3 โมเลกุลเกาะกับอัลบูมินของคน 1 โมเลกุลก็สามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีต่อโพรสตาแกลนดินได้ไตเตอร์สูงถึง 10,000 แต่ Chaisiri และคณะ (1980) ต้องใช้คอน-จูเกตที่มีสเปอร์มิดีนถึง 46 โมเลกุลเกาะกับอัลบูมิน 1 โมเลกุลจึงจะกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีต่อสเปอร์มิดีนที่มีไตเตอร์ 1,000 ได้ หรือ Skowsky และ Fisher (1972) ใช้คอนจูเกตที่มีไลซีนวาโสเพรสซิน 40 ถึง 60 โมเลกุลเกาะกับไทโรกลอบบูลิน 1 โมเลกุลก็สามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีต่อไลซีนวาโสเพรสซินที่มีไตเตอร์สูงกว่า 50,000 ได้ แต่ Bartos และคณะ (1975) ต้องใช้คอนจูเกตที่มีสเปอร์มีนถึง 131 โมเลกุลเกาะกับไทโรกลอบบูลิน 1 โมเลกุลจึงจะสามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนตอบอดีต่อสเปอร์มีนได้

และมีไตเตอร์เพียง 900 แสดงให้เห็นว่าการที่จะสร้างแอนติบอดีได้นั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลของแฮบเทนที่เกาะกับโปรตีนตัวนำ แต่น่าจะขึ้นอยู่กับอิมมูโนเจนิคซิตี (immunogenicity) ของคอนจูเกตนั้น ๆ มากกว่า สำหรับการวิจัยครั้งนี้ได้สร้างแอนติบอดีต่อสเปอร์มิดีนโดยฉีดกระต่ายด้วยคอนจูเกตที่มีสเปอร์มิดีน 26 โมเลกุลเกาะกับอัลบูมิน 1 โมเลกุล กระต่ายสามารถสร้างแอนติสเปอร์มิดีนได้ไตเตอร์สูงสุด 100 แต่ถ้าฉีดกระต่ายด้วยคอนจูเกตที่มีสเปอร์มิดีน 506 โมเลกุลเกาะกับไทโรกลอบบูลิน 1 โมเลกุลพบว่ากระต่ายสร้างแอนติสเปอร์มิดีนได้ไตเตอร์ต่ำกว่า แสดงให้เห็นว่าโปรตีนตัวนำที่ใช้ก็มีความสำคัญต่อการสร้างแอนติบอดีเช่นเดียวกับที่ Skowsky และ Fisher (1972) เคยศึกษามาก่อน

สัตว์ทดลองที่นิยมใช้ผลิตแอนติบอดีได้แก่ กระต่าย หนูตะเภา แพะ แกะ และม้า แต่ที่นิยมใช้กันมากได้แก่ กระต่ายและหนูตะเภา เนื่องจากทั้งกระต่ายและหนูตะเภามีขนาดเล็กง่ายต่อการเลี้ยงดู การฉีดกระตุ้น (immunize) และการเจาะเลือด (Parker, 1976) Bartos และคณะ (1975) สร้างแอนติสเปอร์มีนได้โดยใช้กระต่ายและม้า ส่วน Chaisiri และคณะ (1979) สร้างแอนติสเปอร์มีนได้โดยใช้กระต่าย และสร้างแอนติสเปอร์มิดีนได้โดยใช้หนูตะเภาเป็นสัตว์ทดลอง (Chaisiri และคณะ, 1980) การวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้กระต่ายและหนูตะเภาเป็นสัตว์ทดลองสำหรับสร้างแอนติสเปอร์มิดีน สำหรับแพะและแกะซึ่งจัดอยู่ในประเภทสัตว์เคี้ยวเอื้อง (ruminant animal) ไม่สามารถนำมาใช้ผลิตแอนติบอดีต่อโพลีเอมีนได้ เพราะในพลาสมาของสัตว์พวกนี้มีโพลีเอมีนออกซิเดส (polyamine oxidase) ปริมาณสูงมาก (Blaschko และ Hawes, 1959; Blaschko และคณะ,1959)

จากการวิจัยครั้งนี้ปรากฏว่าทั้งกระต่ายและหนูตะเภาสามารถสร้างแอนติสเปอร์มิดีนได้แต่มีปริมาณค่อนข้างต่ำ กระต่ายสามารถสร้างได้ดีกว่าหนูตะเภา กระต่ายที่ฉีดด้วยสเปอร์มิดีนคอนจูเกตทั้งหมด 9 ตัว สามารถสร้างแอนติสเปอร์มิดีนและหาไตเตอร์ได้มีถึง 8 ตัวหรือประมาณร้อยละ 89 ส่วนหนูตะเภาที่ฉีดด้วยสเปอร์มิดีนคอนจูเกตทั้งหมด 55 ตัว สามารถสร้างแอนติสเปอร์มิดีนและหาไตเตอร์ได้มีเพียง 14 ตัวหรือประมาณร้อยละ 25 เท่านั้น และไตเตอร์ที่ได้ส่วนใหญ่จะต่ำกว่าที่กระต่ายสร้างได้ ยกเว้นหนูตะเภา Gp31 สัตว์ทดลองบางตัวที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ซื้อมาจากต่างพ่อแม่กัน เนื่องจากในการวิจัยครั้งนี้ไม่ได้ผสมพันธุ์และขยายพันธุ์เอง สัตว์ทดลองแต่ละตัวจึงมีพันธุกรรมแตกต่างกัน ทำให้สัตว์ทดลองมีความสามารถสร้างแอนติบอดีได้แตกต่างกันด้วย ในกรณีที่แอนติสเปอร์มิดีนที่สร้างได้มีไตเตอร์ต่ำ จะต้องใช้แอนติซีรัมปริมาณมากจึงจะเพียงพอสำหรับเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ ดังนั้นการใช้กระต่ายสำหรับ

สร้างแอนติบอดีจึงดีกว่าการใช้หนูตะเภาเพราะกระต่ายให้ซีรัมมากกว่า

Bartos และคณะ (1975) กับ Chaisiri และคณะ (1979) ได้ทดลองใช้กระต่ายขาวพันธุ์นิวซีแลนด์ (New Zealand White rabbit) สำหรับสร้างแอนติสเปอร์มีน ส่วน Chaisiri และคณะ (1980) ใช้หนูตะเภาพันธุ์ดันกินฮาร์ดเลย์ (Dunkin Hartley guinea pig) สำหรับสร้างแอนติสเปอร์มิดีนและได้ไตเตอร์สูงกว่าการวิจัยครั้งนี้ถึง 10 เท่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของพันธุ์สัตว์ทดลองที่ใช้ เพราะในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้กระต่ายและหนูตะเภาพันธุ์พื้นเมืองในประเทศไทย

สำหรับการสร้างแอนติสเปอร์มิดีนในกระต่าย มีข้อน่าสังเกตว่ากระต่ายที่สร้างแอนติสเปอร์มิดีนได้ในระยะแรก (ประมาณ 10 สัปดาห์หลังจากฉีดครั้งแรก) และมีไตเตอร์สูงพอสมควร เมื่อฉีดกระตุ้นต่อไปจะสร้างแอนติสเปอร์มิดีนได้อีกช่วงระยะเวลาหนึ่ง (กระต่าย Rb1 และ Rb3) แต่กระต่ายที่ไม่สามารถสร้างแอนติสเปอร์มิดีนหรือสร้างได้ปริมาณต่ำมากในระยะแรก เมื่อฉีดกระตุ้นต่อไปจะไม่สามารถสร้างได้เพิ่มขึ้นและบางครั้งกลับมีปริมาณลดลงจนหาไตเตอร์ไม่ได้ (กระต่าย Rb4, Rb7 และ Rb9) ดังนั้นการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองพวกที่ไม่มีหรือมีการตอบสนองในระยะแรกน้อยต่อไปเรื่อย ๆ จึงไม่ได้ผล เป็นการสิ้นเปลืองเวลาและคอนจูเกตที่ใช้ฉีด

การฉีดแอนติเจนให้กับสัตว์ทดลองมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ อุ้งเท้า ใต้ผิวหนัง ต่อมน้ำเหลือง และเส้นเลือด เป็นต้น (Playfair และคณะ, 1974) การวิจัยครั้งนี้ได้ใช้วิธีการฉีดเข้าใต้ผิวหนังด้านหลังหลาย ๆ จุด (intradermal multiple sites injection) ซึ่งเป็นวิธีที่ทำให้ได้แอนติบอดีเร็วและมีความจำเพาะสูงวิธีหนึ่ง (Vaitukaitis และคณะ, 1971) นอกจากนี้ยังมีวิธีการอีกแบบหนึ่งที่ทำให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีได้ดีขึ้นคือ วิธีมาโครฟาจฮาร์เวสติงเทคนิค (macrophage harvesting technique) (Johnston, 1972) เทคนิคนี้ได้มีผู้นำมาใช้สำหรับสร้างแอนติสเปอร์มีนในกระต่ายและประสบผลสำเร็จมาแล้ว (Bartos และคณะ, 1975; Chaisiri และคณะ, 1979)

การวิจัยครั้งนี้ได้ทดลองใช้ทั้งคอมพลีทและอินคอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์ (complete and incomplete Freund's adjuvants) ผสมกับสเปอร์มิดีนคอนจูเกตเพื่อทำให้เป็นอิมัลชัน แอดจูแวนท์จะช่วยให้สเปอร์มิดีนคอนจูเกตกระจายออกจากตำแหน่งที่ฉีดอย่างช้า ๆ ทำให้มีสเปอร์มิดีนคอนจูเกตอยู่ในร่างกายของสัตว์ทดลองได้เป็นเวลานานเป็นการลด

อัตราการฉีดซ้ำ เพราะแอนติเจนที่ผสมแอดจูแวนท์จะอยู่ที่ตำแหน่งที่ฉีดได้นาน 7 ถึง 10 วัน และการใช้คอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์ซึ่งมีไมโคแบคทีเรีย (mycobacteria) ผสมอยู่ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียพวกนี้จะกระตุ้นให้เซลล์มาโครฟาจ (macrophage) มาจับสเปอร์มิดีนคอนจูเกตได้มากขึ้น เป็นการเร่งให้เกิดการสร้างแอนติบอดี (WHO Scientific Group, 1976) ในการวิจัยครั้งนี้ปรากฏว่าการฉีดซ้ำด้วยสเปอร์มิดีนคอนจูเกตที่ผสมคอมพลีทหรืออิน-คอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์ ให้ผลไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามการใช้อินคอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์ จะไม่ทำให้เกิดการอักเสบของแผลมากเท่าการใช้คอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์ เนื่องจากอินคอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์ไม่มีไมโคแบคทีเรียผสมอยู่

การสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนบางชนิด สัตว์ทดลองสามารถสร้างแอนติบอดีได้หลังจากฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนเพียงครั้งเดียวและมีไตเตอร์สูงด้วย เช่น การสร้างแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโคริโอนิคโกนาโดโทรฟิน (chorionic gonadotriphin) โดยฉีดกระต่ายด้วยหน่วยย่อยเบตา (β subunit) ของฮอร์โมนนี้ กระต่ายก็สามารถสร้างแอนติบอดีที่มีไตเตอร์สูงถึง 10,000 ได้ ภายในเวลาเพียง 35 วัน (Vaitukaitis และคณะ, 1971) แต่การสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนบางชนิดจะต้องฉีดกระตุ้นซ้ำหลาย ๆ ครั้งด้วยระยะเวลาต่าง ๆ กัน สัตว์ทดลองจึงจะสร้างแอนติบอดีที่มีไตเตอร์สูงได้ เช่น การสร้างแอนติบอดีต่อเอสตราไดออล (estradiol) จะต้องฉีดซ้ำทุกสัปดาห์ 6 ครั้ง และฉีดซ้ำทุกเดือนอีกถึง 11 ครั้ง สัตว์ทดลองจึงจะสร้างแอนติบอดีที่มีไตเตอร์สูง 100,000 ได้ (Parker, 1976) สำหรับการสร้างแอนติบอดีต่อสเปอร์มิดีนในครั้งนี้ แม้จะฉีดกระตุ้นเป็นเวลานาน (ประมาณ 11 เดือน) กระต่ายก็ไม่สามารถสร้างแอนติสเปอร์มิดีนได้เพิ่มขึ้น

ในการวิจัยครั้งนี้กระต่ายทุกตัวจะสร้างแอนติสเปอร์มิดีนได้สูงสุดหลังการฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ประมาณ 2 สัปดาห์หรือหลังการฉีดครั้งแรกประมาณ 6 ถึง 10 สัปดาห์ ส่วนหนูตะเภาที่ฉีดซ้ำเกินกว่า 2 ครั้ง (กลุ่มที่ 1 และ 2) มีเพียงประมาณร้อยละ 7 ของหนูตะเภาทั้งหมดที่ตอบสนองและสร้างแอนติสเปอร์มิดีน เมื่อเปรียบเทียบกับหนูตะเภาที่ฉีดซ้ำเพียง 2 ครั้ง (กลุ่มที่ 3, 4 และ 5) ปรากฏว่ามีประมาณร้อยละ 32 ของหนูตะเภาทั้งหมดที่ตอบสนองและสร้างแอนติสเปอร์มิดีนได้ อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้ว่าหนูตะเภาแต่ละกลุ่มจะสร้างแอนติสเปอร์มิดีนได้ปริมาณสูงสุดหลังการฉีดซ้ำครั้งที่ 2 เช่นเดียวกับกระต่ายหรือไม่ เนื่องจากไม่สามารถเจาะเลือดหนูตะเภามาหาไตเตอร์ได้ทุกครั้งหลังจากการฉีดซ้ำแต่ละครั้ง

จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแอนติบอดีต่อแฮบเทนมักจะมีค่า Ka อยู่ในช่วง $5x10^4$ ถึง $1x10^{11}$ ลิตรต่อโมลซึ่งขึ้นกับลักษณะโครงสร้างทางเคมีของพวกแฮบเทน แอนติบอดีต่อแฮบ-เทนที่มีค่าKa สูงมักได้มาจากแฮบเทนที่มีโมเลกุลเป็นไฮโดรโฟบิค (hydrophobic molecule) เช่น ไดจิโตซิน (digitoxin) เป็นต้น (Parker, 1976) สำหรับแอนติสเปอร์มิดีนที่เตรียมได้ครั้งนี้มีค่า Ka เท่ากับ $1.43x10^7$ ลิตรต่อโมล ซึ่งต่ำกว่าที่ Chaisiri และคณะ (1980) เตรียมได้ (Ka เท่ากับ $3.4x10^8$ ลิตรต่อโมล) ประมาณ 23 เท่า ค่า Ka ของแอนติบอดีจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความไวของวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ ดังนั้นแอนติบอดีที่มีค่า Ka อยู่ในช่วง 10^4 ถึง 10^6 ลิตรต่อโมลจึงไม่นิยมใช้สำหรับเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ เนื่องจากจะทำให้ความไวและความแม่นยำของวิธีวัดไม่เหมาะที่จะใช้วัดสารที่มีปริมาณน้อย ๆ ค่า Ka ของแอนติสเปอร์มิดีนที่ได้ครั้งนี้ยังอยู่ในช่วงที่สามารถนำมาใช้ในเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ได้คือ มีค่าอยู่ในช่วง 10^7 ถึง 10^{12} ลิตรต่อโมล ซึ่งเป็นค่า Ka ที่ทำให้วิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์มีความไวและความแม่นยำสูง (Parker,1976)

แอนติสเปอร์มิดีนที่สร้างได้มีปฏิกิริยาข้ามชนิดกับพูเทรสซีนสูงที่สุดเช่นเดียวกับแอนติ-สเปอร์มิดีนที่ Chaisiri และคณะ (1980) สร้างได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับแอนติสเปอร์มีนพบว่าจะมีปฏิกิริยาข้ามชนิดสูงสุดกับสเปอร์มิดีน (Bartos และคณะ, 1975; Chaisiri และคณะ ,1979) เมื่อพิจารณาดูโครงสร้างของโพลีเอมีนทั้ง 2 ชนิดนี้ประกอบกับผลการเกิดปฏิกิริยาข้ามชนิดกันคือ แอนติสเปอร์มิดีนมีปฏิกิริยาข้ามชนิดสูงสุดกับพูเทรสซีนและแอนติ-สเปอร์มีนมีปฏิกิริยาข้ามชนิดสูงสุดกับสเปอร์มิดีน ทำให้สันนิษฐานว่าการคอนจูเกตระหว่างสเปอร์มิดีนหรือสเปอร์มีนกับโปรตีนตัวนำ หมู่อะมิโนอิสระที่ใช้คอนจูเกตกับโปรตีนน่าจะเป็นหมู่โพรพิลลามีน (propylamine group) แอนติสเปอร์มิดีนที่ได้ครั้งนี้มีความจำเพาะน้อยกว่าที่ Chaisiri และคณะ (1980) เตรียมได้ อาจเป็นเพราะแอนติซีรัมที่ใช้ในการวิจัยนี้ส่วนใหญ่เป็นแอนติซีรัมที่ได้หลังจากการฉีดครั้งแรกประมาณ 22 ถึง 30 สัปดาห์ ส่วนแอนติซีรัมที่ Chaisiri และคณะใช้นั้นได้หลังจากการฉีดครั้งแรกประมาณ 6 ถึง 8 สัปดาห์ แอนติบอดีที่ได้หลังจากการฉีดซ้ำมาเป็นเวลานานมักจะมีปฏิกิริยาข้ามชนิดสูงกว่าแอนติบอดีที่ได้หลังการฉีดซ้ำครั้งแรก ๆ (Walker และคณะ ,1973)

การที่แอนติเจนกับแอนติบอดีจะทำปฏิกิริยากันได้มากที่สุดขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ใช้ ความเป็นกรดเป็นด่าง ความเข้มข้นของไอออนแต่ละตัว (ionic strength) และระยะเวลาของการอินคิวเบท เป็นต้น สำหรับวิธีเรดิโอ-

อิมมูโนแอสเสย์ที่พัฒนาได้นี้ เมื่อศึกษาเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการอินคิวเบท พบว่า 4 ชั่วโมงเป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดเพราะให้ค่าร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดีในหลอดที่ไม่มีสเปอร์มิดีนมาตรฐาน (zero standard tube) สูงกว่าการอินคิวเบทที่ระยะเวลาอื่น ๆ ที่ได้ทดลอง และมีร้อยละของการลดของกราฟมาตรฐานสเปอร์มิดีนสูงด้วย การอินคิวเบท 4 ชั่วโมงยังเป็นเวลาที่เหมาะสำหรับทำการทดลองที่ต้องการให้เสร็จสิ้นภายใน 1 วันโดยไม่ต้องรีบเร่ง ส่วนการอินคิวเบทเพียง 2 ชั่วโมงจะให้ค่าร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดี (ในหลอดที่ไม่มีสเปอร์มิดีนมาตรฐาน) ต่ำกว่าการอินคิวเบท 18 ชั่วโมง อาจเนื่องจากเป็นเวลาที่ยังไม่ถึงสมดุลย์ของการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี และเวลา 2 ชั่วโมงน้อยเกินไป ไม่สะดวกสำหรับการทดลองที่ทำการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนครั้งละหลาย ๆ ตัวอย่าง ส่วนการอินคิวเบท 18 และ 24 ชั่วโมงอาจเป็นเวลาที่นานเกินไป สารประกอบเชิง-ซ้อนแอนติเจน-แอนติบอดีอาจไม่เสถียรพอ และการใช้เวลาอินคิวเบทนาน ๆ ทำให้ไม่สามารถทำการทดลองให้เสร็จสิ้นภายใน 1 วันได้

เมื่อใช้ปริมาตรในขณะอินคิวเบท 0.5 มิลลิลิตรจะทำให้สเปอร์มิดีนติดสลากและแอนติบอดีมีความเข้มข้นมากกว่าเมื่อใช้ปริมาตรในขณะอินคิวเบท 1.0 มิลลิลิตรเท่าตัว พบว่าการใช้ปริมาตรในขณะอินคิวเบท 1.0 มิลลิลิตร จะให้ร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดี (ในหลอดที่ไม่มีสเปอร์มิดีนมาตรฐาน) สูงกว่าการใช้ปริมาตรในขณะอินคิวเบท 0.5 มิลลิลิตรเพียงเล็กน้อย ส่วนร้อยละของการลดของกราฟมาตรฐานสเปอร์มิดีนมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าความแตกต่างของความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนติดสลากและแอนติบอดีเพียงหนึ่งเท่าตัวไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการจับกันระหว่างสเปอร์มิดีนติดสลากกับแอนติบอดีมากนัก

จุดประสงค์ที่สำคัญของการพัฒนาวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ คือ ต้องการที่จะนำวิธีที่พัฒนาได้นี้มาวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาซึ่งมีปริมาณต่ำอยู่ในช่วง 200 ถึง 400 พิโคโมลต่อมิลลิลิตรของพลาสมา วิธีที่พัฒนาได้นี้มีความไว 17.9 พิโคโมลต่อมิลลิลิตรของพลาสมา ซึ่งความไวขนาดนี้สูงพอที่จะใช้วัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาได้โดยใช้ปริมาตรของพลาสมาเพียง 100 ไมโครลิตร ซึ่งนับว่าเป็นปริมาตรที่เหมาะสมไม่สิ้นเปลืองตัวอย่างพลาสมามากและทำให้การตวงวัดปริมาตรพลาสมามีความแม่นยำพอใช้ Chaisiri และคณะ (1980) ได้พัฒนาวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์เพื่อใช้วัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาเช่นเดียวกันได้ความไวของวิธีสูงถึง 2.25 พิโคโมลต่อมิลลิลิตรของพลาสมา การที่ Chaisiri และคณะได้ความไวของวิธีวัดสูงกว่าอาจเนื่องจากแอนติสเปอร์มิดีนของ Chaisiri และคณะมีค่า Ka มากกว่าและใช้

สเปอร์มิดีนติดสลากที่มีสเปคซิฟิคแอคติวิตี (Specific activity) สูงกว่าด้วย การใช้สเปอร์มิดีนติดสลากปริมาณน้อยจะช่วยเพิ่มความไวของวิธีวัด (Skelly และคณะ 1973) แต่สารติดสลากที่มีสเปคซิฟิคแอคติวิตีสูง ๆ มักจะมีการเสื่อมสลายได้เร็ว (rapid decomposition) (Evans, 1966) นอกจากนี้ความไวของวิธีวัดขึ้นอยู่กับความแม่นยำในการวัดด้วย ถ้าความแม่นยำในการวัดสูงค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนจะต่ำทำให้ความไวของวิธีวัดสูง

สำหรับการศึกษารีคอบเวอรีของการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนมาตรฐานที่เติมลงไปในพลาสมาโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ พบว่าปริมาณสเปอร์มิดีนที่เติมลงไปกับปริมาณที่วัดได้มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ใกล้เคียง 1 คือมีค่าเป็น 0.976 แสดงว่าการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถวัดได้ใกล้เคียงกับที่มีอยู่จริง นอกจากนั้นได้ทำการศึกษาพาราลเรลลิซึมระหว่างตัวอย่างพลาสมาที่ทำให้เจือจางเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน เนื่องจากคาดหมายว่าตัวอย่างพลาสมาของสตรีตั้งครรภ์ปกติและสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกอาจมีปริมาณสเปอร์มิดีนสูง ดังนั้นในการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาจึงอาจจำเป็นต้องมีการเจือจางพลาสมาก่อน จากการศึกษาปรากฏว่าการเจือจางพลาสมาถึง 8 เท่าไม่มีผลต่อการวัดปริมาณสเปอร์มิดีน และเป็นการแสดงว่าในตัวอย่างพลาสมาไม่มีสารรบกวนการรวมตัวกันระหว่างสเปอร์มิดีนกับแอนติสเปอร์มิดีน

ความแม่นยำของการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนที่มีความเข้มข้นในพลาสมาเป็น 64.9 และ 255 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของพลาสมาในการทดลองเดียวกัน เป็นที่น่าพอใจคือได้ร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ในช่วงที่ยอมรับ (3 ถึง 8) คือมีค่าเป็น 6.92 และ 7.56 ตามลำดับ แต่ที่ความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนต่ำ ๆ คือ 15.8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของพลาสมาร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนมีค่าค่อนข้างสูงคือ 13.4 แสดงว่าการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนที่ความเข้มข้นน้อยมีความแม่นยำค่อนข้างต่ำ ส่วนความแม่นยำของการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนที่มีความเข้มข้นในพลาสมาเป็น 13.5, 58.2 และ 294 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของพลาสมาในต่างการทดลองและต่างวันกันให้ผลพอใช้ได้ ได้ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ในช่วงที่ยอมรับ (8 ถึง 20) คือมีค่าเป็น 13.8, 11.5 และ 10.6 ตามลำดับ ความแม่นยำของวิธีวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาที่พัฒนาได้นี้ใกล้เคียงกับวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ของ Chaisiri และคณะ (1980)

ความแม่นยำของการวัดปริมาณของสารโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น การเปลี่ยนแปลงของสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง ความเป็นกรดเป็นด่างและความเข้มข้นของไอออนแต่ละตัว (Parker, 1976) ในการวิจัยนี้ได้ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมใหม่ ๆ หรือมีอายุไม่เกิน 7 วัน สารละลายสเปอร์มิดีนมาตรฐานต้องเตรียมให้มากพอสำหรับใช้ได้จนสิ้นสุดการวิจัย นอกจากนั้นได้มีการควบคุมให้การทดลองเหมือนกันทุกครั้ง เช่น ลำดับของการเติมสารละลาย และระยะเวลาที่ให้ผงถ่านดูดซับสเปอร์มิดีนอิสระเป็นต้น

การควบคุมคุณภาพ (quality control)ของการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์นี้ ทำได้โดยการควบคุมความแม่นยำของวิธีวัด โดยในแต่ละการทดลองได้วัดปริมาณของสเปอร์มิดีนในตัวอย่างพลาสมารวม (pool plasma) ที่มีความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนต่ำ, กลาง และสูงด้วยทุกครั้ง แต่ละตัวอย่างดังกล่าวจะต้องวัดได้ความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนอยู่ในช่วงของค่าเฉลี่ย ±2 เท่าของความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±2SD) ถ้าหากค่าสเปอร์มิดีนที่วัดได้อยู่เกินช่วงนี้ถือว่าการทดลองครั้งนั้นใช้ไม่ได้ (Challand และคณะ 1974)

การแยกสารประกอบเชิงซ้อนแอนติเจน-แอนติบอดีออกจากแอนติเจนอิสระ ทำได้หลายวิธี เช่น การตกตะกอนสารประกอบเชิงซ้อนแอนติเจน-แอนติบอดีด้วยสารเคมีหรือแอนติบอดีตัวที่สอง (second antibody) การแยกโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล การทำให้สารประกอบเชิงซ้อนแอนติเจน-แอนติบอดีถูกดูดซึมอยู่ที่ผิวของของแข็ง และการดูดซึมแอนติเจนอิสระด้วยตัวดูดซึม เช่น ผงถ่าน เป็นต้น (Ratcliffe, 1974) การวิจัยครั้งนี้ได้ใช้วิธีการแยกสารประกอบเชิงซ้อนแอนติเจน-แอนติบอดีออกจากแอนติเจนอิสระโดยใช้ผงถ่านเป็นตัวดูดซับ แต่ได้เคลือบด้วยเด็กซ์แตรนซึ่งจะช่วยลดการดูดซับพวกโปรตีนทำให้ดูดซับสเปอร์มิดีนอิสระได้เป็นส่วนใหญ่ (Bionoux และ Odell, 1973) การที่เลือกใช้ผงถ่านเพราะราคาถูกทำได้ง่าย สะดวกและรวดเร็ว แต่มีข้อเสียคือถ้าให้ผงถ่านดูดซับแอนติเจนอิสระนานเกินไปแอนติเจนที่เกาะอยู่กับแอนติบอดีบางส่วนอาจแตกตัวออกมาและถูกดูดซับไปด้วย เนื่องจากปฏิกิริยาของการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเป็นปฏิกิริยาผันกลับ ดังนั้นการเติมผงถ่านจึงต้องทำโดยรวดเร็วเพื่อให้ระยะเวลาที่ผงถ่านดูดซับแอนติเจนอิสระในหลอดแรกกับหลอดสุดท้ายแตกต่างกันน้อยที่สุด

ในเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงมีปริมาณโพลีเอมีนสูงกว่าในน้ำเลือดมาก (Cohen และคณะ , 1976 ; Cooper และคณะ, 1976) ดังนั้นการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในตัวอย่างที่เป็นพลาสมาจึงมีข้อดีกว่าการใช้ซีรัม เนื่องจากเม็ดเลือดมีโอกาสแตกถ้าการเก็บตัวอย่างซีรัมไม่ดี แต่การใช้พลาสมาซึ่งใส่สารกันเลือดแข็งตัว สารพวกนี้จะช่วยให้ผนังเซลล์ของเม็ดเลือดมีความคงทนไม่แตกง่ายและการใช้พลาสมาสามารถแยกเม็ดเลือดออกจากน้ำเลือดได้เร็ว (Russell, 1977b) ในการเตรียมพลาสมาได้เลือกใช้ เอททิลีนไดเอมีนเตตระอะซีเตต (ethylene diamine-tetraacetate, EDTA) เป็นสารกันเลือดแข็งตัว เพราะไม่ทำให้พลาสมาเจือจางเหมือนกับการใช้แอบพารินหรือซิเตรต และได้ทำการทดสอบแล้วว่าไม่รบกวนต่อการทำเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) พลาสมาที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงจะไม่นำมาใช้ในการทดลองเพราะจะทำให้ได้ค่าสเปอร์มิดีนในพลาสมาสูงกว่าที่มีอยู่จริง

วิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ที่พัฒนาได้แล้วนี้ ได้นำมาใช้วัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีปกติที่ไม่ตั้งครรภ์ สตรีตั้งครรภ์ปกติและสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุก ปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีปกติที่ไม่ตั้งครรภ์และไม่อยู่ในระยะที่กำลังมีประจำเดือนจำนวน 50 ราย อายุระหว่าง 17 ถึง 53 ปีมีค่าเป็น 54.0±14.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของพลาสมาหรือ 0.37±0.097 นาโนโมลต่อมิลลิลิตรของพลาสมา ซึ่งได้ค่าสูงกว่าที่ Russell และคณะ (1978) เคยรายงานไว้ซึ่งวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีปกติ 10 รายโดยวิธีอะมิโนแอซิดอะนาไลส์เซอร์ได้ค่าเป็น 0.29±0.01 นาโนโมลต่อมิลลิลิตรของพลาสมา และ Chaisiri และคณะ (1980) วัดในสตรีปกติ 98 รายอายุระหว่าง 17 ถึง 74 ปีโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ได้ค่าเป็น 0.201±0.117 นาโนโมลต่อมิลลิลิตรของพลาสมา ความแตกต่างนี้อาจเนื่องมาจากพลาสมาที่ใช้ศึกษามาจากกลุ่มประชากรที่แตกต่างกัน หรือวิธีที่ใช้วัดปริมาณสเปอร์มิดีนต่างกันซึ่งย่อมมีความแม่นยำและความถูกต้องของการวัดแตกต่างกันด้วย เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของสเปอร์มิดีนที่ได้จากการวัดโดยใช้วิธีเดียวกัน เช่น วิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ การวิจัยครั้งนี้วัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีปกติได้สูงกว่าที่ Chaisiri และคณะ (1980) เคยรายงานไว้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแอนติสเปอร์มิดีนที่ใช้มีปฏิกิริยาข้ามชนิดกับพูเทรสซีนและสเปอร์มีนสูงกว่าแอนติสเปอร์มิดีนที่ Chaisiri และคณะใช้ประมาณ 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ปริมาณสเปอร์มิดีนที่วัดได้ครั้งนี้มีค่าใกล้เคียงกับที่ Bartos และคณะ (1977) เคยวัดในชายปกติ 5 รายโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ ซึ่งมีค่าเป็น 0.39±0.057 นาโนโมลต่อมิลลิลิตรของซีรัม และใกล้เคียงกับที่ได้จากการวัดโดยวิธีไฮเพรสเซอร์ลิควิดโครมาโต-

กราฟฟีและอะมิโนแอซิดอะนาไลส์เซอร์ Nishioka และ Romsdahl (1974) วัดในคนปกติ 10 รายโดยวิธีไฮเพรสเซอร์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี ได้ค่าเป็น 0.33±0.09 นาโนโมลต่อมิลลิลิตรของซีรัม Marton และคณะ (1973) วัดในคนปกติ 10 รายโดยวิธีอะมิโนแอซิดอะนาไลส์เซอร์ ได้ค่าเป็น 0.32±0.07 นาโนโมลต่อมิลลิลิตรของซีรัม การที่นำปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมามาเปรียบเทียบกับในซีรัมได้ เนื่องจาก Russell และ Russell (1975) เคยเปรียบเทียบปริมาณโพลีเอมีนในซีรัมและพลาสมาแล้ว พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน

ส่วนในพลาสมาของสตรีตั้งครรภ์ปกติจำนวน 144 รายที่มีอายุครรภ์ 5 ถึง 36 สัปดาห์ มีค่าเฉลี่ยของปริมาณสเปอร์มิดีนไม่แตกต่างจากสตรีปกติที่ไม่ได้ตั้งครรภ์อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับ Russell และคณะ (1978) ที่ศึกษาในสตรีตั้งครรภ์ปกติ 15 รายที่มีอายุครรภ์ 16 ถึง 38 สัปดาห์ แต่เขาพบว่าปริมาณพูเทรสซีนและสเปอร์มีนในพลาสมาของสตรีตั้งครรภ์ปกติสูงกว่าสตรีปกติที่ไม่ได้ตั้งครรภ์ Russell และคณะ (1978) ได้รายงานว่าปริมาณโพลีเอมีนทั้ง 3 ชนิดในปัสสาวะของสตรีตั้งครรภ์ปกติที่แต่ละอายุครรภ์มีความแตกต่างกันคือ ปริมาณโพลีเอมีนจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากสัปดาห์ที่ 10 ของการตั้งครรภ์ และมีปริมาณสูงสุดที่อายุครรภ์ 12 สัปดาห์ หลังจากนั้นจะเริ่มลดลงอย่างรวดเร็วจนมีปริมาณสูงกว่าสตรีปกติไม่มากนักหลังสัปดาห์ที่ 16 ของการตั้งครรภ์ แต่การวิจัยครั้งนี้ไม่พบช่วงของอายุครรภ์ที่มีปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาสูงเหมือนที่ Russell และคณะ (1978) พบในปัสสาวะ

ถ้าแบ่งช่วงอายุครรภ์ของสตรีตั้งครรภ์ปกติเป็น 3 ช่วงคือ 5 ถึง 12, 13 ถึง 24 และ 25 ถึง 36 สัปดาห์ พบว่าสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์น้อย (5 ถึง 12 สัปดาห์) จะมีค่าเฉลี่ยของปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมามากกว่าสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์ 13 ถึง 24 และ 25 ถึง 36 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญ และมีค่ามากกว่าในพลาสมาของสตรีปกติที่ไม่ได้ตั้งครรภ์อย่างมีนัยสำคัญด้วย ทั้งนี้คงเนื่องมาจากในระยะแรกของการตั้งครรภ์นั้น มีการสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมามากมาย และเป็นช่วงที่มีการเติบโตของตัวอ่อนสูงที่สุด (period of dramatic embryonic growth) นอกจากนั้นยังมีปัจจัยการสูญเสียของเซลล์สูง (high cell loss factor) ด้วย (Russell และ Durie, 1978; Hamilton และ Mossman, 1972) ส่วนค่าเฉลี่ยของปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์ 13 ถึง 24 และ 25 ถึง 36 สัปดาห์ใกล้เคียงกับของสตรีปกติ แต่ Chaisiri และคณะ (1980)

เคยศึกษาในสตรีปกติที่มีอายุครรภ์มาก ๆ (31 ถึง 40 สัปดาห์) พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาต่ำกว่าสตรีปกติเล็กน้อย อาจเนื่องมาจากในซีรัมของสตรีตั้งครรภ์ปกติมีปริมาณโพลีเอมีนออกซิเดสมากขึ้นตามอายุครรภ์ โดยเฉพาะสตรีที่มีอายุครรภ์ 14 ถึง 40 สัปดาห์ จะมีปริมาณโพลีเอมีนออกซิเดสในซีรัมสูงกว่าสตรีที่มีอายุครรภ์ 10 ถึง 13 สัปดาห์มาก (Illei และ Morgan, 1979) ดังนั้นสเปอร์มิดีนในซีรัมของสตรีที่ตั้งครรภ์จึงถูกออกซิไดส์โดยเอ็นไซม์ตัวนี้ ทำให้สตรีที่มีอายุครรภ์มากกว่า 13 สัปดาห์มีปริมาณสเปอร์มิดีนในซีรัมใกล้เคียงกับสตรีปกติ

ในพลาสมาของสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกที่มีอายุครรภ์ 5 ถึง 23 สัปดาห์พบว่ามีค่าเฉลี่ยของปริมาณสเปอร์มิดีนมากกว่าสตรีปกติที่ไม่ได้ตั้งครรภ์ และสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์ 5 ถึง 36 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกกับของสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์เท่ากัน ปรากฏว่าที่อายุครรภ์น้อยๆ (5 ถึง 13 สัปดาห์) ปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีทั้ง 2 ประเภทใกล้เคียงกัน การที่สตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกมีปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาไม่แตกต่างจากสตรีตั้งครรภ์ปกติในระยะแรกของการตั้งครรภ์อาจสันนิษฐานได้ว่าในระยะแรกของการตั้งครรภ์อัตราการเจริญของโคริโอนิควิลไลไม่สูงมากและจำนวนเซลล์ที่เติบโตขึ้นมาใหม่ยังมีจำนวนไม่มากนัก ดังนั้นสเปอร์-มิดีนที่มีในพลาสมาของสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกซึ่งเป็นผลิตผลจากการเจริญเติบโตของเซลล์ (Russell, 1977b) จึงมีปริมาณไม่แตกต่างจากของสตรีตั้งครรภ์ปกติในระยะแรกของการตั้งครรภ์ และมีปริมาณสูงกว่าสตรีปกติไม่มากนัก เปรียบเหมือนกับการที่ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งชนิดที่มีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช้า เช่น มะเร็งที่ปากมดลูกหรือมะเร็งลำไส้ใหญ่ ผู้ป่วยเหล่านี้จะมีปริมาณสเปอร์มิดีนในปัสสาวะต่ำกว่าผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งชนิดที่มีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งสูง เช่น มะเร็งตับ และมีปริมาณสเปอร์มิดีนในปัสสาวะสูงกว่าคนปกติไม่มากนัก (Russell และคณะ, 1971; อัญชลี มไหศิริโยดม, 2526) แต่ในสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกที่มีอายุครรภ์มากขึ้น (ประมาณ 13 สัปดาห์ขึ้นไป) ส่วนใหญ่จะมีปริมาณสเปอร์มิดีนมากกว่าสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์เท่ากัน สตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกที่มีอายุครรภ์มากขึ้นย่อมมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์โทโฟบลาสมากขึ้น เนื่องจากมีการโพรลิเฟอเรท (proliferation) สูงขึ้น นอกจากนั้นยังมีการเสื่อมสลายของตัวอ่อนและเส้นเลือดภายในวิลไลด้วย ดังนั้นสเปอร์มิดีนจึงถูกปล่อยออกจากเซลล์ที่กำลังเจริญอย่างรวดเร็วหรือจากเซลล์ที่ตายแล้วเข้าสู่กระแสโลหิต ทำให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นในพลาสมา

จากการศึกษาในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นว่า โพลีเอมีนจะถูกขับออกจากเซลล์เนื้องอกหรือเซลล์มะเร็งเข้าสู่กระแสโลหิตและปัสสาวะ (Russell และคณะ, 1974a; Russell และคณะ, 1974b; Russell และคณะ, 1976) ในผู้ป่วยที่มีก้อนเนื้องอกหรือมะเร็งที่กำลังมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจึงมีปริมาณโพลีเอมีนในปัสสาวะสูง และเมื่อทำการผ่าตัดเอาก้อนเนื้องอกหรือมะเร็งออกปริมาณโพลีเอมีนในปัสสาวะจะลดลง (Russell และคณะ, 1971; อัญชลี มไหศิริโยดม, 2526) Russell และคณะ (1971) พบว่าผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งที่รังไข่ (ovarian teratoma) ซึ่งมีปริมาณสเปอร์มิดีนในปัสสาวะสูงมาก เมื่อตัดรังไข่ออกพบว่าปริมาณสเปอร์มิดีนในปัสสาวะจะลดลงถึง 3 เท่า นอกจากนี้ยังมีผู้รายงานว่า ผู้ป่วยโรคมะเร็งหลายชนิดหลังการรักษาโดยการผ่าตัดเอาก้อนมะเร็งออกแล้วประมาณ 7 วันจะมีปริมาณพูเทรสซีน สเปอร์มิดีนและสเปอร์มีนในปัสสาวะลดลงต่ำกว่าก่อนการผ่าตัด (อัญชลี มไหศิริโยดม, 2526) สำหรับปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีที่เป็นโรคครรภ์ไข่ปลาอุกก่อนและหลังทำแท้งเพื่อเอาก้อนโมลออก มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยและการเปลี่ยนแปลงนี้คล้ายคลึงกับในสตรีปกติที่ไม่ได้ตั้งครรภ์ เพราะเมื่อวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีปกติที่ไม่ได้ตั้งครรภ์ 2 รายที่วันต่าง ๆ กัน ปรากฏว่ามีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาอยู่ในช่วง 5 ถึง 37 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของพลาสมาในระยะเวลา 10 วัน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของผู้ป่วยก่อนและหลังการรักษาโดยการทำแท้งก็อยู่ในช่วงเดียวกันนี้ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมากจากปริมาณสเปอร์มิดีนในผู้ป่วยเหล่านี้ก่อนการรักษามีปริมาณสูงกว่าสตรีปกติ (54.0±14.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของพลาสมา) ไม่มากนัก ดังนั้นหลังการรักษาการเปลี่ยนแปลงระดับของสเปอร์มิดีนจึงมีเพียงเล็กน้อย ซึ่งต่างจากผู้ป่วยโรคมะเร็งอื่น ๆ ที่มีปริมาณสเปอร์มิดีนก่อนการรักษาสูง หลังการผ่าตัดเอาก้อนมะเร็งออกปริมาณสเปอร์มิดีนจึงลดลงอย่างเห็นได้ชัด

ค่าเฉลี่ยของปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกสูงกว่าสตรีตั้งครรภ์ปกติและสตรีปกติที่ไม่ได้ตั้งครรภ์ไม่มากนัก ซึ่งต่างกับฮอร์โมนโคริโอนิคโกนาโดโทรฟิน (chorionic gonadotrophin, HCG) ซึ่งมีปริมาณสูงมากในผู้ป่วยชนิดนี้เมื่อเปรียบเทียบกับสตรีตั้งครรภ์ปกติ (Teoh, 1967) อาจเป็นเพราะฮอร์โมนนี้ถูกสร้างมาโดยตรงจากเซลล์โทโฟบลาสชั้นซินไซติโอโทรโฟบลาส (Midgley และ Pierce, 1962) ซึ่งเซลล์พวกนี้จะมีแอคติวิตีสูงกว่าปกติ (overactivity) ในสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุก (Anderson และ

Kissane, 1977) หลังจากทำแท้งเอาก้อนโมลออกฮอร์โมนนี้จะลดปริมาณลงภายในเวลา 8 สัปดาห์จนกระทั่งไม่สามารถตรวจพบ (Goldstein และคณะ, 1974; อุทัย ชัยกิตติศิลป์, 2523) และฮอร์โมนนี้ยังสามารถใช้ติดตามผลการรักษาได้ดีอีกด้วยคือ หลังการทำแท้งแล้วปริมาณของฮอร์โมนตัวนี้ควรจะลดต่ำลงจนตรวจไม่พบ แต่ถ้าปริมาณฮอร์โมนตัวนี้ลดต่ำลงเล็กน้อยหรือกลับมีปริมาณเพิ่มขึ้นมาใหม่ จะแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของโรคครรภ์ไข่ปลาอุกไปเป็นโรคอื่น ๆ เช่น อินเวซีฟโมล และโคริโอคาร์ซิโนมา (Delfs, 1959; อุทัย ชัยกิตติศิลป์, 2523)

จะเห็นได้ว่าค่าเฉลี่ยของสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีตั้งครรภ์ปกติไม่แตกต่างจากสตรีปกติ และค่าเฉลี่ยของสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกจะสูงกว่าสตรีตั้งครรภ์ปกติและสตรีปกติ ส่วนสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์ 5 ถึง 12 สัปดาห์ จะมีค่าเฉลี่ยของสเปอร์มิดีนในพลาสมาสูงกว่าสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์ 13 ถึง 24 และ 25 ถึง 36 สัปดาห์ และสูงกว่าสตรีปกติด้วย ในสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกที่มีอายุครรภ์มากกว่า 13 สัปดาห์ส่วนใหญ่จะมีปริมาณสเปอร์มิดีนสูงกว่าสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์เท่ากัน หลังการทำแท้งเอาก้อนโมลออก ปริมาณสเปอร์มิดีนจะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยคล้ายการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสเปอร์มิดีนในแต่ละวันของสตรีปกติ

อย่างไรก็ตามวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ที่พัฒนาได้นี้มีความไวและความจำเพาะพอสมควร สามารถนำมาใช้วัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาได้โดยให้ความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีพอใช้ได้ ทำได้ครั้งละไม่ต่ำกว่า 100 ตัวอย่างต่อวัน ตัวอย่างพลาสมาไม่ต้องผ่านกรรมวิธีหรือขั้นตอนอื่น ๆ มาก่อน และเครื่องมือที่ใช้ก็มีอยู่ในห้องทดลองทั่วไป เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น ๆ จะเห็นว่าเรดิโออิมมูโนแอสเสย์เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วที่สุด วิธีนี้นอกจากจะใช้วัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาได้แล้ว ยังอาจใช้วัดปริมาณสเปอร์มิดีนในของเหลวอื่น ๆ จากร่างกายได้อีก เช่น ซีรัม ปัสสาวะ และน้ำไขสันหลัง เป็นต้น ซึ่งอาจได้มาจากผู้ป่วยโรคมะเร็งรวมทั้งผู้ป่วยโรคอื่น ๆ เช่น ซิสติคไฟโบรซิส (cystic fibrosis) ซอเรียซีส (psoriasis) หรือโพลีไซทีเมียเวอรา (polycytemia vera) เป็นต้น เพราะในผู้ป่วยดังกล่าวมีหลักฐานว่ามีปริมาณโพลีเอมีนในพลาสมา ปัสสาวะและน้ำไขสันหลังสูงกว่าของคนปกติ (Russell และคณะ, 1971; Nishioka และ Romsdahl, 1974; Lundgren และคณะ, 1975; Proctor และคณะ, 1975; Desser และคณะ,

1975; Russell และคณะ, 1975; Russell และ Russell, 1975; Marton และคณะ, 1976; Cohen และคณะ, 1976; Durie และคณะ, 1977; Marton และคณะ, 1979; Chaisiri และคณะ, 1979; Chaisiri และคณะ, 1980) ซึ่งการวัดปริมาณโพลีเอมีนอาจมีประโยชน์ในการพิจารณาวินิจฉัยโรคได้ ความสะดวกและความรวดเร็วของวิธีนี้น่าจะมีประโยชน์มาก โดยนำมาใช้สครีน (screen) กลุ่มประชากรที่มีอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งสูงสำหรับช่วยในการวินิจฉัยขั้นต้นได้อย่างรวดเร็ว

การพัฒนาวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์นี้ทำได้ค่อนข้างยากมาก เนื่องจากความยากของการสร้างแอนติบอดีให้มีไตเตอร์และความจำเพาะสูง การศึกษาครั้งนี้ย่อมเป็นแนวทางสำหรับผู้ที่ต้องการสร้างแอนติบอดีต่อโพลีเอมีนและพัฒนาวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์สำหรับวัดปริมาณโพลีเอมีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะเป็นแนวทางที่สำคัญในการพัฒนาวิธีเรดิโออิมมูโน-แอสเสย์สำหรับวัดปริมาณพูเทรสซีนในของเหลวจากร่างกาย ซึ่งยังไม่มีผู้ใดเคยทำมาก่อน ซึ่งการสร้างแอนติบอดีต่อพูเทรสซีนน่าจะยากมากกว่าการสร้างแอนติบอดีต่อสเปอร์มิดีนหรือสเปอร์มีน เพราะพูเทรสซีนมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเพียง 88 ดาลตันเท่านั้น Fugita และคณะ (1976) รายงานว่าปริมาณพูเทรสซีนในปัสสาวะสามารถใช้วินิจฉัยได้ทั้งมะเร็งของเลือด (blood cancer) และมะเร็งอื่น ๆ (solid cancer) Nishioka และ Romsdahl (1974) ได้รายงานว่าพูเทรสซีนเป็นตัวชี้บ่งการเป็นมะเร็งได้ดีตัวหนึ่ง ดังนั้นถ้ามีการพัฒนาวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์สำหรับวัดปริมาณของพูเทรสซีนได้ก็น่าจะมีประโยชน์ต่อวงการแพทย์อย่างยิ่ง

ถ้าจะมีการสร้างแอนติบอดีต่อสเปอร์มิดีนเพื่อสำหรับใช้ในเรดิโออิมมูโนแอสเสย์อีก น่าจะทดลองคอนจูเกตสเปอร์มิดีนกับโปรตีนตัวนำอื่น ๆ เช่น โอวาลบูมิน หรือฮีโมไซยานิน เป็นต้น เพราะอาจจะทำให้ได้สเปอร์มิดีนคอนจูเกตที่มีอิมมูโนเจนิคซิตี (immuno-genicity) เพิ่มขึ้น ทำให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีนได้ไตเตอร์สูงขึ้น หรืออาจฉีดกระตุ้นโดยวิธีมาโครฟาจฮาร์เวสติงเทคนิค (Johnston, 1972)

สำหรับโรคครรภ์ไข่ปลาอุกน่าจะมีการศึกษาต่อไปอีก โดยใช้จำนวนผู้ป่วยให้มากกว่านี้และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์เนื้อเยื่อจากก้อนโมลกับปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาด้วย เพื่อดูความสัมพันธ์ของปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมากับความรุนแรงของโรค และน่าจะติดตามวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของผู้ป่วยหลังจากทำแท้งเอาก้อนโมลออกไปเป็น

ระยะ ๆ เหมือนกับการติดตามวัดปริมาณฮอร์โมนโคริโอนิคโกนาโดโทรฟิน เช่น ทุก 2 สัปดาห์, 1 เดือนและ 3 เดือน เพื่อศึกษาดูว่าปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอินเวซีพโมลหรือโคริโอคาร์ซิโนมา ในภายหลังหรือไม่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย