หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำและทฤษฎี

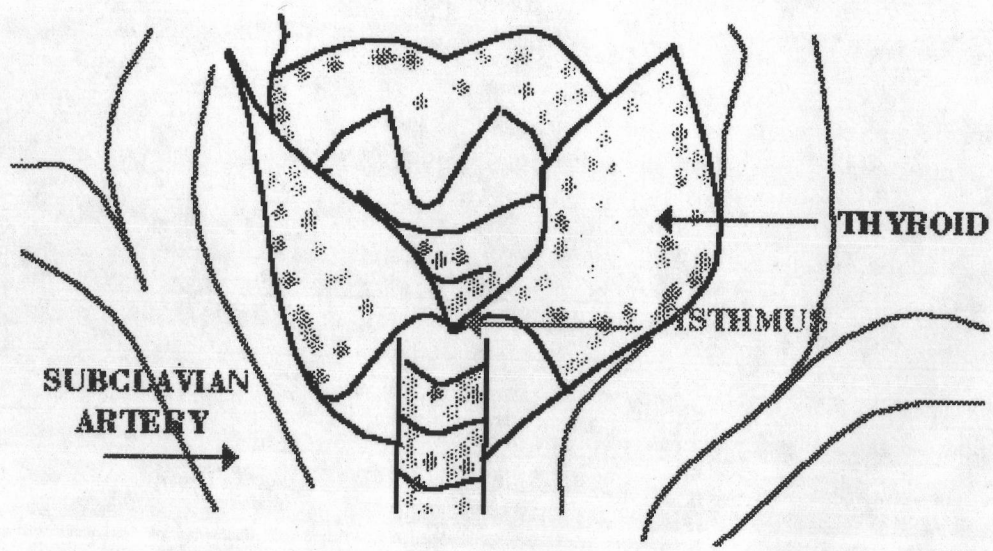
1.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับต่อมธัยรอยด์

ต่อมธัยรอยด์ (thyroid gland) ทำหน้าที่สร้างและเก็บฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเมตาบอลิสมของร่างกายธัยรอยด์ฮอร์โมนจะกระตุ้นให้เกิดการใช้ออกซิเจนในเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ของร่างกายและฮอร์โมนนี้มีค่ายิ่งสำหรับการเจริญเติบโตและพัฒนาการของร่างกาย (ชาญวิทย์,2529)

ถ้าขาดต่อมธัยรอยด์แล้วอาจทำให้ทนต่อความเย็นไม่ได้ มีการเจริญเติบโตและพัฒนาการของสมองช้าและอาจทำให้เด็กเกิดภาวะเตี้ยแคระ แต่ในทางตรงกันข้ามถ้าร่างกายเกิดภาวะที่มีฮอร์โมนมากเกินไปอาจทำให้น้ำหนักลด ใจสั่น ขี้ร้อน และตัวชื้นอยู่เสมอ

การทำงานของต่อมธัยรอยด์ถูกควบคุมโดยธัยรอยด์สติมูเลติงฮอร์โมน (thyroid stimulating hormone) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้าการหลั่งของฮอร์โมนนี้มีกลไกการควบคุมย้อนกลับเพื่อปรับระดับของธัยรอยด์ฮอร์โมนในเลือดให้คงที่ตลอดเวลา

เมื่อพิจารณาลักษณะทางกายวิภาค จะพบว่าต่อมธัยรอยด์เป็นต่อมไร้ท่ออยู่ด้านหน้ามี 2 กลีบ หนักรวมกันประมาณ 20-30 กรัม กลีบทั้ง 2 ข้าง ซ้ายและขวาติดต่อกันด้วยอิชมัสโดยกลีบขวาใหญ่กว่ากลีบซ้ายเล็กน้อย แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงลักษณะทางกายวิภาคของต่อมธัยรอยด์

ฮอร์โมนที่หลั่งจากต่อมธัยรอยด์ มีดังนี้

1.1.1 เตตราไอโอโดธัยโรนีน (tetraiodothyronine) หรือ ธัยรอกซิน (thyroxine) หรือ ที4 (T4)

1.1.2 ไตรไอโอโดธัยโรนีน (triiodothyronine) หรือ ทีว (T3)

1.1.3 ธัยโรแคลซิโตนิน (thyrocalcitonin)

ทีว และ ทีว มักรวมเรียกว่าธัยรอยด์ฮอร์โมน ฮอร์โมนทั้งสองนี้มีผลต่อเนื้อเยื่อของร่างกายคล้ายคลึงกัน มีข้อแตกต่างบ้างดังนี้

1. ทีว เกาะกับโปรตีนในพลาสมาได้น้อยกว่า ทีว
2. ทีว มีผลต่อเนื้อเยื่อของร่างกายเร็วกว่า ทีว
3. ทีว สลายตัวในร่างกายเร็วกว่า ทีว
4. ทีว มีฤทธิ์แรงกว่า ทีวประมาณ 3-5 เท่า

หลังจากเข้าสู่กระแสเลือด ทีว และทีว จะจับอยู่กับโปรตีนในพลาสมา โดยทีว จะจับกับโปรตีน 99.97% (ช่วงชีวิต 7-10 วัน) และทีว 99.70% (ช่วงชีวิต 1-2 วัน) ที่เกาะอยู่กับโปรตีนในพลาสมาที่เหลือเป็นฮอร์โมนอิสระ และสามารถเปลี่ยนรูปไปมาระหว่างฮอร์โมนอิสระ และฮอร์โมนที่จับอยู่กับโปรตีนได้ ทีว อิสระมีปริมาณเป็น 10 เท่าของทีว อิสระ โดย ทีว จะเกิด เมตาบอลิสมเป็นทีว โดยวิธี 5′ - โมโนดีไอโอดิเนชัน (5 ′- monodeiodination) (Braveman และคณะ ,1991) ประมาณว่า หนึ่งในสี่ของทีวที่หลั่งออกมาทุกวันจะเปลี่ยนเป็นทีว ทีว ที่ใช้ทุกวันได้จากวิธีนี้ 60-80% ขบวนการเมตาบอลิสมนี้จะเกิดขึ้นที่ตับ ไต ต่อมพิทูอิทารี (pituitary gland) และเนื้อเยื่อเกือบทั่วร่างกาย

ดังนั้น ต่อมธัยรอยด์จึงหลั่งฮอร์โมนสองชนิด คือ ทีวค่อนข้างเด่น และทีว ซึ่งส่วนใหญ่ได้จากโมโนดีไอโอดิเนชันของทีว ทีวและทีว ที่หลั่งออกมานี้ยังเกิดเมตาบอลิสมโดยเกี่ยวข้องกับขบวนการดีไอโอดิเนชัน-ดีคาร์บอกซิเลชัน และ ดีแอมิเนชัน (deiodination-decarboxylation and deamination) โดยคอนจูเกตกับกลูคูโรนิกแอซิดและซัลเฟต (glucuronic acid and sulfate) ทำให้เกิดสารรวมที่ขับถ่ายออกทางปัสสาวะได้

โดยปกติแล้วธัยรอยด์ฮอร์โมนอิสระเท่านั้นที่มีผลทางเมตาบอลิสมต่อเนื้อเยื่อและยับยั้งการหลั่งธัยรอยด์สติมูเลติงฮอร์โมนได้ ปริมาณธัยรอยด์ฮอร์โมนอิสระนี้จะช่วยบอกถึงสภาวะของต่อมว่าปกติหรือไม่ ปริมาณธัยรอยด์ฮอร์โมนอิสระนี้ถูกควบคุมให้อยู่ในระดับปกติ โดยขบวนการควบคุมย้อนกลับซึ่งควบคุมโดยแกนร่วมของต่อมพิทิวอิทารีและต่อมธัยรอยด์

ธัยรอยด์ฮอร์โมนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเป็นส่วนของธัยโรโกลบูลิน (thyroglobulin)ซึ่งอยู่ในรูปโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 660,000 ดาลตัน การสังเคราะห์ธัยโรโกลบูลินเกิดที่เอ็นโดพลาสมิกเรติคูลุม (endoplasmic reticulum) โดยแยกอิสระจากปฏิกริยาไอโอดิเนชัน

ไอโอดีนจะถูกดูดเข้ารวมกับธัยโรโกลบูลินและธัยรอยด์ฮอร์โมน โดยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

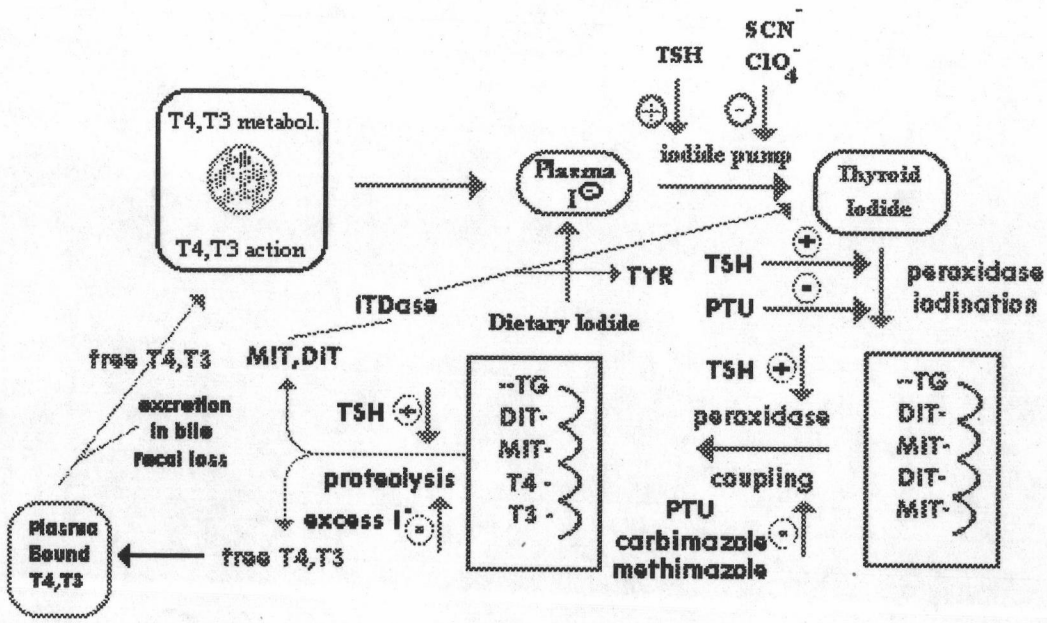
ก. การทำไอโอไดให้เข้มข้นโดยต่อมธัยรอยด์

ข. ปฏิกริยาไอโอดิเนชัน ซึ่งเกี่ยวกับการออกซิเดชันของไอโอไดด์เป็นไอโอดีน

ค. การรวมกันของหน่วยไอโอโดไทโรซิล (iodotyrosyl unit) ภายในธัยโรโกลบูลินเพื่อรวมเป็นไอโอโดธัยโรนีน (iodothyronine) ซึ่งก็เป็นส่วนหนึ่งของธัยโรโกลบูลิน

ง. การหลั่งของไอโอโดธัยโรนีนอิสระตามหลังโปรติโอไลซิส(proteolysis)ของธัยโรโกลบูลิน

ขั้นตอนทั้งสี่ข้างต้น ถูกกระตุ้นโดย ธัยโรโทรปิน หรือ ธัยรอยด์สติมูเลติงฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า แสดงดังรูปที่ 2 ผลของฮอร์โมนดังกล่าวต่อต่อมธัยรอยด์ มักเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการสร้างไซคลิกเอเอ็มพี (cyclic AMP)



รูปที่ 2 แสดงวัฏจักรไอโอดีนในร่างกาย

การหลั่งของธัยรอยด์ฮอร์โมน ซึ่งจะอยู่ในระดับปกติได้นั้น จำเป็นต้องอาศัยปริมาณธัยรอยด์สติมูเลติงฮอร์โมนที่มากพอ โดยฮอร์โมนดังกล่าวถูกสร้างจากธัยรอยด์โทรปิกเซล (thyrotropic cell) ที่อยู่ในต่อมใต้สมองส่วนหน้า และยังต้องอาศัยองค์ประกอบที่สำคัญอีก 2 ประการ คือ

1.การหลั่งของธัยโรโทรปิกรีลีสซิงฮอร์โมน (thyrotropic releasing hormone) จากต่อมฮัยโปทาลามัส (hypothalamus gland)

2.ระดับธัยรอยด์ที่หมุนเวียนในกระแสเลือดซึ่งจะทำหน้าที่ควบคุมย้อนกลับในเชิงปฏิเสธ (negative feedback)

ธัยรอยด์ฮอร์โมนมีผลต่อเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ทั่วร่างกาย กลไกพื้นฐานเกี่ยวกับธัยรอยด์ฮอร์โมนต่อเนื้อเยื่อ และอวัยวะต่างๆ ยังไม่ค่อยแจ่มชัดนัก แต่เท่าที่ศึกษากันมาพบว่ามีความเกี่ยวเนื่องกับ

1. ผลของการใช้ออกซิเจนต่อเนื้อเยื่อและต่อไมโตคอนเดรีย (mitochondria) จากการศึกษาทดลองพบว่าที4 และ ที3 จะเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนของร่างกาย และ ไมโตคอนเดรียโดยมีความเกี่ยวเนื่องกับการใช้ออกซิเจนของร่างกายกว่า 90% ดังนั้นจึงมีการศึกษาค้นคว้าในเชิงเกี่ยวกับไมโตคอนเดรียอย่างกว้างขวาง และมีการศึกษาถึงผลของการเพิ่มจำนวนไมโตคอนเดรียต่อการเพิ่มไมโตคอนเดรียเอนไซม์โปรตีน

2. ผลต่อนิวเคลียสและการสร้างโปรตีนในร่างกาย ธัยรอยด์ฮอร์โมนมีผลต่อการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ที่ต้องใช้เอนไซม์ถ้ามีการขัดขวางการสร้างโปรตีน ผลของธัยรอยด์ฮอร์โมนต่อร่างกายจะเปลี่ยนแปลงไป (Braveman และคณะ ,1991 ; Kendall , 1954)

3. ผลต่อการสร้างความร้อนในร่างกาย และ โซเดียมไอออน (sodium ion)ในเอทีพีเอส (Adenosine TriPhosphatase, ATPase) การเพิ่มการผลิตความร้อนในเนื้อเยื่อทั่วร่างกายเป็นสมมติฐานที่ค่อนข้างจะเชื่อถือได้ในการอธิบายผลของธัยรอยด์ฮอร์โมน ซึ่งใช้อธิบายได้ทั้งในแง่การขาดหรือมีมากเกินไปของธัยรอยด์ฮอร์โมน กลไกที่ตั้งขึ้นคือ มีการเพิ่มโซเดียมไอออนปั๊มพ์ (sodium ion pump) และต้องใช้เอทีพี (ATP) เพิ่ม ทำให้มีการเพิ่มการใช้ออกซิเจนด้วย (Webb และคณะ , 1967)

กลไกการทำงานของต่อมธัยรอยด์สามารถอธิบายได้โดยอาศัยสมมติฐานหลายอย่างรวมเข้าด้วยกัน ผลจากธัยรอยด์ฮอร์โมนใดเกิดก่อนยังเป็นที่ศึกษากันอยู่ โดยผลที่เกิดอาจช่วยเสริมการทำงานต่อกันทั้งนี้เพราะธัยรอยด์ฮอร์โมนมีผลต่อเนื้อเยื่อและอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของร่างกายเป็นจำนวนมากจึงเป็นการยากที่จะบอกว่าผลใดเกิดก่อนหลังหรือเกิดร่วมกัน ในภาวะที่ต่อมธัยรอยด์ทำงานผิดปกติ กลไกการปรับการควบคุมด้วยตัวเองของต่อมธัยรอยด์จะไม่เกิด ถ้ากลไกการยับยั้งไอโอดิเนชันเสียไปจะทำให้เกิดภาวะไฮเปอร์ธัยรอยดิสม ถ้าในร่างกายมีแต่กลไกการยับยั้งไอโอดิเนชันแต่การขนส่งไอโอไดด์เสียไปทำให้ความเข้มข้นของไอโอไดด์ในเซลมากเกินไปจะทำให้เกิดภาวะไฮโปธัยรอยดิสม

การวิเคราะห์การทำงานของต่อมธัยรอยด์

ในการศึกษาสภาพการทำงานของต่อมธัยรอยด์ นับตั้งแต่ Kendall ได้สกัดแยกธัยรอกซินจากต่อมธัยรอยด์ ตั้งแต่ปี ค.ศ.1914 เป็นต้นมา ได้มีผู้คิดค้นวิธีการตรวจสภาพการทำงานของต่อมธัยรอยด์วิธีต่าง ๆ ซึ่งมีวิวัฒนาการสืบเนื่องมาจนถึงปัจจุบันโดยมีการปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์ให้ได้มาตรฐานดียิ่งขึ้น ดังนี้

การวิเคราะห์ความสามารถของต่อมธัยรอยด์ในการจับและเก็บไอโอดีนเพื่อใช้ในการสร้างฮอร์โมนหรือเรดิโอไอโอดีนอัพเทค (Radioiodine uptake) เป็นการวัดปริมาณเรดิโอไอโอดีนโดยอาจใช้ไอโอดีน 131 (iodine-131) หรือไอโอดีน 125 (iodine-125) ซึ่งถูกต่อมธัยรอยด์จับเอาไว้ ภายหลังจากที่ให้กินหรือฉีดเข้าเส้นเลือดเพื่อศึกษาการทำงานของตัวต่อมหรือการผลิตธัยรอยด์ สติมูเลทติงฮอร์โมนจากต่อมใต้สมอง และยังใช้ศึกษาปริมาณอาหารไอโอดีนที่ได้รับ ในการศึกษาเรดิโอไอโอดีนอัพเทคก่อนและหลังการฉีดธัยรอยด์สติมูเลทติงฮอร์โมนสามารถบอกถึงสภาพการทำงานของต่อมในสภาวะไฮโปธัยรอยด์ (hypothyrodism) ได้ โดยพบว่าปริมาณเรดิโอไอโอดีนอัพเทคจะลดลงแต่จะเพิ่มมากขึ้นในกรณีไฮเปอร์ธัยรอยด์ (hyperthyrodism) และการขาดไอโอดีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่รวมกับไอโอดีน (Protein-Bound Iodine, PBI) และธัยรอกซินไบน์ดิงโกลบูลิน (Thyroxine-Binding Globulin) มีวิธีการดังนี้

เนื่องจากธัยรอกซินส่วนใหญ่ในพลาสมา (plasma) จับอยู่กับพลาสมาโปรตีนหรือธัยรอกซินไบน์ดิงโกลบูลิน ดังนั้นประมาณ 90 % ของไอโอดีนในพลาสมาโปรตีนจึงเป็นธัยรอกซิน นอกนั้นเป็นไตรไอโอดีนธัยโรนีนและไอโอดีนอื่น ๆ ซึ่งมีปริมาณค่อนข้างคงที่ ดังนั้นการวัดปริมาณไอโอดีนที่จับกับโปรตีนในพลาสมาค่าที่ได้จึงใกล้เคียงกับปริมาณของธัยรอยด์ฮอร์โมนในกระแสเลือดและบ่งถึง

สภาพการทำงานของต่อมธัยรอยด์ เช่น ในไฮโปธัยรอยด์จะมีปริมาณไอโอดีนที่จับกับโปรตีนในพลาสมาต่ำ แต่ในไฮเปอร์ธัยรอยด์จะมีค่านี้สูง ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์จะกระทำได้ค่อนข้างง่าย แต่ผลการวิเคราะห์มักเชื่อถือไม่ได้เนื่องจากขั้นตอนการวิเคราะห์ต้องระมัดระวังการปนเปื้อนกับสารที่มีไอโอดีนประกอบ เช่น ยา อาหาร หรือแม้กระทั่งทิงเจอร์ไอโอดีนที่เช็ดผิวหนังก่อนเก็บเลือด

ตามปกติแล้วระดับของไอโอดีนในร่างกายจะไม่เปลี่ยนแปลงเนื่องจากสาเหตุอื่นนอกจากการทำงานของต่อมธัยรอยด์เท่านั้น ในสมัยก่อนจึงนิยมวัดระดับไอโอดีนเป็นข้อบ่งชี้การทำงานของต่อมธัยรอยด์ซึ่งเป็นการวัดระดับไอโอดีนที่รวมกับโปรตีน โดยพบว่าไอโอดีนที่ตรวจวัดได้นั้นครึ่งหนึ่งได้จากไอโอดีนที่จับกับพลาสมาโปรตีน และยังพบด้วยว่าการกินอาหารไอโอดีนมีผลต่อระดับของปริมาณโปรตีนที่รวมกับไอโอดีนได้โดยตรง ดังนั้นการประเมินผลการทำงานของต่อมธัยรอยด์โดยวิธีนี้จึงได้ผลไม่แน่นอน (Ferguson , 1984)

คอมเพททิทีฟโปรตีนไบน์ดิง(Competitive Protein Binding ,T4 CPB) เป็นวิธีการวิเคราะห์ธัยรอกซินโดยใช้คุณสมบัติในการจับธัยรอกซินของธัยรอกซินไบน์ดิงโกลบูลิน (Murphy และ Pattee, 1964) วิธีการประกอบด้วยการสกัดแยกธัยรอกซินจากซีรัมแล้วปล่อยให้รวมกับธัยรอกซิน-ไอโอดีน 125-ธัยรอกซินไบน์ดิงโกลบูลินที่อิ่มตัวซึ่งจะเกิดการแลกเปลี่ยนระหว่างธัยรอกซินจากซีรัมและ ธัยรอกซินที่ติดฉลาก (labelled thyroxine) กับธัยรอกซินไบน์ดิงโกลบูลิน ในปริมาณที่เป็นสัดส่วนกับปริมาณของธัยรอกซินที่มีในซีรัม จากนั้นทำการวัดกัมมันตภาพรังสี (count radioactivity) ที่เหลือในธัยรอกซิน ไบน์ดิงโกลบูลิน วัดปริมาณธัยรอกซินได้โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน (standard curve) ข้อดีของวิธีการนี้ คือ สารประกอบไอโอดีน ไอโอไดด์ จะไม่เข้ามาปนเปื้อนในการแลกเปลี่ยนระหว่างธัยรอกซินจากซีรัมและธัยรอกซินที่ติดฉลาก นอกจากสารที่จะเข้ามาแย่งจับกับธัยรอกซิน ซึ่งก็มีเพียงดิลาติน (Dilantin) และ ซาลิสิเลต (Salicylate) ในปริมาณสูงเท่านั้นจึงจะเกิดการปนเปื้อนได้ แต่ถ้าปริมาณต่ำก็ไม่มีผลแต่อย่างใด (Kaneko ,1974)

ไตรไอโอโดธัยโรนีนอัพเทค (Triiodothyronine uptake) เป็นวิธีการตรวจสภาพการทำงานของต่อมธัยรอยด์ภายนอกร่างกาย โดยการวิเคราะห์ส่วนของไตรไอโอโดธัยโรนีน-ไอโอดีน-131 ซึ่งเกาะกับธัยรอกซินไบน์ดิงโกลบูลินและเซลเม็ดเลือดแดง ซีรัมธัยรอกซินไบน์ดิงโกลบูลินที่เกาะกับธัยรอกซินได้แน่นกว่าไตรไอโอโดธัยโรนีนไอโอดีน-131 ที่เกาะกับเซลเม็ดเลือดแดงหรืออาจใช้สารอื่น เช่น เรซิน (resin) ในสัดส่วนปริมาณ ธัยรอกซินในซีรัม จนเกิดสมดุลย์ (equilibrium) ภายนอกร่างกายซึ่งเป็นไปอย่างรวดเร็ว จากนั้นนำเซลเม็ดเลือดแดงหรือเรซินไปวัดกัมมันตภาพรังสีของฮอร์โมนที่เกาะกับเซลเม็ดเลือดแดงหรือเรซินซึ่งเป็นส่วนกลับกับสัมพรรคภาพการรวม (binding affinity) และความเข้มข้นของบริเวณที่ไม่เกิดการรวมตัว (unoccupied site) ซึ่งอยู่บนพลาสมาที่รวมกับโปรตีน (plasma binding protein) ดังนั้นถ้าความเข้มข้นของพลาสมาที่รวมกับโปรตีนลดลงหรือมีปริมาณธัยรอกซินเพิ่มขึ้นจะทำให้เรซินอัพเทคมากขึ้น (Ferguson,1984) สามารถคำนวณหาธัยรอกซินไบน์ดิงโกลบูลินที่ไม่ถูกเกาะได้ การอัพเทคค่ามักต่ำในกรณีไฮโปธัยรอยด์ แต่สูงขึ้นในกรณีไฮเปอร์ธัยรอยด์ วิธีการนี้ Halmolsky และคณะ (1957,1959) เป็นผู้คิดค้นและนำเสนอทฤษฎีของการอัพเทคโดยใช้เซลเม็ดเลือดแดง ต่อมาได้รับความนิยมมากขึ้นและมีการดัดแปลงเป็นชุดฮอร์โมนสำเร็จรูป (kit) Pain และ Oldfield (1969) รายงานว่ามีทั้งสิ้น 6 วิธี ได้แก่

1. การอัพเทคโดยใช้เซลเม็ดเลือดแดง (red cell uptake)
2. เรซินอัพเทค (resin uptake)
3. เรซินสปอนจ์อัพเทค (resin sponge uptake)
4. เซฟาเด็ก (Sephadex)
5. ที3-ชาร์โคล-ฮีโมโกลบิน (T3-charcoal-hemoglobin)
6. ธัยรอยด์-ไบน์ดิง-อินเด็กซ์ (thyroid-binding index)

Irvine และ Standevan (1961) กล่าวว่าวิธีดั้งเดิมคือ เรด เซล ที3 อัพเทค (red cell T3 uptake) สามารถวิเคราะห์ได้ผลดี ส่วนวิธีการใหม่คือ เซฟาเด็ก และ ชาร์โคลให้ผลดีทั้งไฮเปอร์ และไฮโปธัยรอยด์ แต่การทดสอบที3-ชาร์โคล-ฮีโมโกลบิน เป็นวิธีการที่ทำได้ง่ายถึงแม้ว่าจะได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางแต่พิสัย (range) ของข้อมูลมักจะกว้างและผลที่ได้ไม่สัมพันธ์กับสภาวะการทำงานของต่อมธัยรอยด์ Kallfelz,1969 ได้รายงานผลของไตรไอโอโดธัยโรนีน-เรซินสปอนจ์อัพเทคในสุนัข 40-50 % (49.75 +/- 5.51 %) ในขณะที่ Wilson และคณะ (1961) ใช้เซลเม็ดเลือดแดงได้ค่าเพียง 10-30 % (Kaneko,1974)

การวิเคราะห์ฮอร์โมนธัยรอกซินและไตรไอโอโดธัยโรนีน

Butanol Extractable Iodine (BEI) เป็นวิธีการที่แม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณธัยรอกซิน เนื่องจากเป็นการวัดไอโอไดอินทรีย์ที่ละลายในบิวทานอล (butanol) วิธีนี้ใช้ตรวจสภาพการทำงานของต่อมธัยรอยด์ได้อย่างน่าเชื่อถือ (Schultz และคณะ,1954)

คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography,T4-Col) เป็นวิธีสกัดแยกธัยรอยด์ฮอร์โมนจากซีรัม (Pilleggi และคณะ,1961 ; Fisher และคณะ,1965) โดยใช้เรซินแยกธัยรอกซิน, ไตรไอโอโดธัยโรนีน, ไอโอโดอมิโนแอซิด (iodoamino acid) อื่น ๆ และไอโอไดออกจากซีรัมแล้วจึงละลายแยกสารประกอบต่าง ๆ เหล่านี้ออกจากเรซินนำไปหาปริมาณไอโอดีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของธัยรอกซินและไตรไอโอโดธัยโรนีนได้ หน่วยที่วัดเป็นไมโครกรัมไอโอดีน ต่อ 100 มล. วิธีนี้ช่วยลดการปนเปื้อนที่เกิดจากไอโอไดด์อนินทรีย์หรือสารประกอบที่มีไอโอดีนรวมอยู่ (Kaihara และคณะ ,1969)

อิเล็กโตรฟอเรซีส (Electrophoresis) ได้แก่ การหาสัดส่วน ที4 ที่ทำการไดอะไลซีสแล้วโดยการเติมตัวตามรอย (tracer) ที4 ลงในซีรัมเจือจางและไดอะไลซีสในบัฟเฟอร์จนถึงสมดุลย์ที่4° ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง (Refetoff และคณะ,1970) ความสามารถในการรวมตัวของธัยรอกซินกับธัยรอกซินที่รวมกับโปรตีนชนิดต่าง ๆ สามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้ reverse flow paper electrophoresis ในบัฟเฟอร์ไกลซีนอะซิเตด (glycine acetate buffer) ที่พีเอช 9.6

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นวิธีการที่ใช้วิเคราะห์สารทางชีวภาพ (biological substance) ต่าง ๆ โดยอาศัยหลักปฏิกริยาทางภูมิคุ้มกัน (immunological reaction) เริ่มมาตั้งแต่ปี 1970 โดย Engvall และ Perlmann และ Schuurs ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นเป็นการแย่งจับระหว่างเอนไซม์ที่เกาะกับแอนติเจน และ แอนติเจนที่ต้องการตรวจวัดกับแอนติบอดีที่จำเพาะซึ่งติดกับข้างหลอดหรือวัสดุ (solid phase) เมื่อเติมเอนไซม์ ซับสเทรต (enzyme substrate) ลงไปจะมีสีเกิดขึ้นซึ่งความเข้มของสีจะเปลี่ยนไปตามความเข้มข้นของแอนติเจนที่ต้องการตรวจวัด การวิเคราะห์

ฮอร์โมนด้วยวิธีนี้มีความไว (sensitivity) ต่ำประกอบกับมีการแปรผันระหว่างการทำวิเคราะห์ และในการทำวิเคราะห์ (inter and intra assay variability) สูง (Ferguson,1984) จึงไม่เป็นที่นิยม

เรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (Radioimmunoassay,RIA) ทฤษฎีของวิธีนี้เริ่มตั้งแต่ปี ค.ศ. 1960 โดย Rosalyn Yalow ต่อมาได้มีการใช้อย่างแพร่หลาย ซึ่งในทางปฏิบัติแล้วจำเป็นต้องมีแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ (specificity) สูงกับสารประกอบนั้นๆ สำหรับสารที่ขนาดโมเลกุลเล็ก เช่น สเตอรอยด์ (steroid) จำเป็นต้องเชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ (carrier protein) เช่น โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) เพื่อทำให้เกิดการตอบสนองที่จำเพาะได้ แต่ในโปรตีนฮอร์โมนมีคุณสมบัตินี้อยู่แล้ว (Heap และ Holdsworth,1981)

ในการทำเรดิโออิมมูโนแอสเสย์จำเป็นต้องเตรียมสารกัมมันตภาพรังสีของลิแกนด์ (radioligand) เพื่อใช้เป็นตัวตามรอย สำหรับธัยรอยด์ฮอร์โมนนิยมใช้ไอโอดีน-125 เป็นสารกัมมันตภาพรังสี หลักการของเรดิโออิมมูโนแอสเสย์เป็นการแย่งจับระหว่างฮอร์โมนที่ติดฉลากกับสารกัมมันตภาพรังสีที่ทราบจำนวนและฮอร์โมนที่ต้องการตรวจวัดกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อกัน แล้วแยกสารที่ได้จากปฏิกริยามานับจำนวนกัมมันตภาพที่รวมกันของแอนติเจนและแอนติบอดี และแอนติเจน (ฮอร์โมน) ที่ติดฉลากกับสารกัมมันตภาพรังสีที่เหลือ เปรียบเทียบผลที่ได้จากกราฟมาตรฐานจะสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของฮอร์โมนได้ ในการวิเคราะห์แต่ละครั้งต้องปล่อยให้ปฏิกริยาถึงจุดสมดุลย์เสียก่อนจึงจะแยกสารเชิงซ้อนแอนติเจน-แอนติบอดีและแอนติเจนที่เหลือออกจากกัน ซึ่งแยกโดยตกตะกอนด้วยแอนติบอดีตัวที่ 2 แล้วปั่นแยกตะกอนออกจากส่วนใส (Heap และ Holdsworth, 1981)

นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์เพื่อตรวจความผิดปกติในการทำงานของต่อมธัยรอยด์วิธีอื่น ๆ อีก เช่น

1. ธัยรอกซิน ซีครีชัน เรต [Thyroxine Secretion Rate(TSR)] เป็นวิธีที่ให้แอล-ธัยรอกซิน (L-thyroxine) เข้าไปยับยั้งการหลั่งไอโอดีน-131 ในต่อมธัยรอยด์โดยวิธีการแทนที่ด้วยธัยรอกซิน

2. การตอบสนองธัยรอยด์สติมูเลติงฮอร์โมน โดยการฉีดธัยรอยด์สติมูเลติงฮอร์โมน

การวิเคราะห์การทำงานของต่อมธัยรอยด์โดยวิธีต่าง ๆ เหล่านี้ ส่วนใหญ่เป็นวิธีการที่ซับซ้อนหรือให้ผลไม่แน่นอน วิธีที่นิยมอย่างแพร่หลายและมีความเชื่อถือสูงในขณะนี้คือการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนโดยตรงด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ซึ่งได้นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

1.2 แฮปเทน-โปรตีน คอนจูเกต

1.2.1 ความเป็นมา

การศึกษาการเตรียมแฮปเทน-โปรตีน คอนจูเกตเริ่มจาก Clutton และคณะ ได้พยายามเตรียมแอนติบอดีต่อธัยรอกซิน โดยสังเคราะห์คอนจูเกตระหว่าง 3,5-ไดไอโอโดธัยโรนีน (3,5-diiodothyronine) กับโปรตีนตามด้วยปฏิกริยาไอโอดิเนชัน (iodination reaction) ซึ่งในวิธีดังกล่าวส่วนของไดไอโอโดธัยโรนีนจะถูกเปลี่ยนเป็นธัยรอกซิน แต่โมเลกุลไทโรซีน (tyrosine) ของโปรตีนจะถูกไอโอดิเนต (iodinated) ไปด้วยแอนติซีรัมที่เตรียมได้จากการใช้แอนติเจนนี้มีความจำเพาะต่อไดไอโอโดไทโรซีน (diodotyrosine) แต่กับธัยรอกซินไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัด (Clutton และคณะ,1938)

ความสำเร็จของ Erlanger และคณะ,1957 ในการเตรียมแอนติซีรัมต่อสเตอรอยด์ฮอร์โมน โดยใช้โบไวน์ ซีรัม อัลบูมินเป็นโมเลกุลพาหะ ซึ่งแอนติซีรัมที่ได้มีความจำเพาะต่อสเตอรอยด์ฮอร์โมน

ในปี 1963 Premachandra และคณะได้ทำการผลิตแอนติบอดีต่อธัยโรโกลบูลิน ซึ่งเป็นโปรตีนพาหะในธรรมชาติ (natural carrier protein) ซึ่งแอนติบอดีดังกล่าวสามารถรวมเข้ากับที3 และที4 โดยพบว่าส่วนของแกมมาโกลบูลินของแอนติบอดีสามารถรวมเข้ากับที4 ได้ดีกว่าที3 (McKenzie และคณะ, 1967)

ในปี 1964 Churchill และ Tapley ได้ทำการเตรียมแอนติซีรัมต่อที4 และ ที3 โดยเตรียมคอนจูเกตระหว่างเตตราไอโอโดธัยโรโพรพิโอนิก แอซิด (Tetraiodothyropropionic acid) กับโบไวน์ซีรัม อัลบูมิน แต่ถ้าใช้ที4 เป็นแฮปเทนวิธีการเตรียมคอนจูเกตจำเป็นต้องใช้กระบวนการทางเคมีที่ซับซ้อน

Jonsson และคณะ, 1966 ได้ให้ข้อสังเกตว่าที4 และ โมโนไอโอโดธัยโรนีน (Monoiodothyronine) สามารถจับกับแอนติ-ธัยโรโกลบูลินได้ดี โดยแอนติเจนิก ดีเทอร์มิแนนท์ของธัยโรโกลบูลินมีโครงสร้างที่พอเหมาะกับที4 คือ มีโครงสร้างธัยโรนีน (Thyronine) และไม่ใช่ผลการแทนที่ด้วยอะตอมไอโอดีน (iodine atom) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Margherita และคณะ, 1969 พบว่าไม่สามารถเกิดการรวมระหว่าง แอล-ธัยโรนีน (L-thyronine) กับแอนติ-ธัยโรโกลบูลิน แต่สามารถรวมได้ดีขึ้นเมื่อมีการแทนที่ด้วยไอโอดีนเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในวงฟีนอลิก (phenolic ring) พวกเขายังพบอีกว่าไดไอโอไดไทโรซีนจะแย่งจับกับแอนติ-ธัยโรโกลบูลินในซีรัมของสัตว์ทดลองบางตัวที่จำนวนอะตอมไอโอดีนมากกว่าธัยโรนีนที่เป็นแอนติเจนิก ดีเทอร์มิแนนต์หลัก และยังอธิบายถึงความแตกต่างในผลการทดลองกับข้อมูลที่ได้จาก Jonsson โดยแนะว่าโมโนไอโอโดธัยโรนีนอาจปนเปื้อนกับธัยโรนีนที่มีการเติมไอโอดีนด้วย และยังอธิบายเพิ่มเติมว่าแอนติบอดีอาจมีโครงสร้างที่สมนัยกับหลาย ๆ ส่วนของโมเลกุล เช่น อะตอมไอโอดีน หรือ โครงสร้างธัยโรนีน หรือ ทั้ง 2 ส่วน

การผลิตแอนติบอดีต่อสารที่มีขนาดเล็กได้มีการสังเคราะห์เพื่อนำไปใช้ในทางการแพทย์มากมาย เช่น ดิจ็อกซิน (Digoxin) (Bulter และคณะ, 1967; Oliver และคณะ, 1968) เอสโตรเจน (Estrogen) (Abraham,1969; Jiang และคณะ, 1969) ไซคลิกเอเอ็มพี (cyclic AMP & GMP) (Steiner และคณะ, 1969) โปรเจสเตอโรน (Progesterone)(Midgley และคณะ,1970) อัลโดสเตอโรน (Aldosterone)(Mayes และคณะ,1970) และเทสโทสเตอโรน (Testosterone)(Furuyama และคณะ,1970)

จากการทดลองของ Gharib และคณะ, 1971 พบว่าในการเตรียมที3 โปรตีน-คอนจูเกต ควรใช้ที3 ในรูปกรดอิสระ (free acid) มากกว่าในรูปเกลือโซเดียม (sodium salt) และยังพบว่า ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน (human serum albumin) เป็นโมเลกุลพาหะได้ดีกว่าอัลบูมินจากวัวควาย (bovine serum albumin) หรือจากกระต่าย (rabbit serum albumin) (Deodhar และคณะ,1970)

การเปลี่ยนแปลงโซ่แขนงอลานีน (alanine side chain) มีผลต่อการรวมกับแอนติบอดีได้ต่างกัน การหมุนโมเลกุลของหมู่แอลฟา-อะมิโน (alpha-amino group) จากตำแหน่งแอล-(L-) ไปยังตำแหน่งดี-(D-) มีผลน้อยมากต่อการรวมกับแอนติบอดี แต่การลดลงของหมู่อะมิโนมีความสำคัญมากกว่า โดยทั่วไปจำนวนอะตอมคาร์บอนที่ลดลงจะมีผลให้แอคติวิตี (activity) ลดลงอย่างมากเช่นเดียวกับหมู่อะมิโน ซึ่งการลดลงของแอคติวิตีดังกล่าวมีผลต่อความจำเพาะระหว่างแฮปเทน และแอนติบอดี (Lieberman และคณะ,1959)

ในปี 1975 Burke และ Shakespear ได้เตรียมธัยรอยด์ฮอร์โมนคอนจูเกตโดยใช้ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินเป็นโปรตีนพาหะและใช้คาร์โบไดอิมีด (carbodiimide) เป็นตัวทำให้เกิดปฏิกริยาโดยใช้คอลัมน์ โครมาโตกราฟี ทำสารให้บริสุทธิ์ ใช้เวลาในการแยกเพียง 5 ชม. ซึ่งน้อยกว่าการไดอะไลซีส (dialysis) ที่ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 24 ชม.

การเตรียมแอนติซีรัมต่อ ที3 ที่ประสบผลสำเร็จแล้วเริ่มจาก Brown และคณะ, 1970 ได้ทำการเตรียมที3 คอนจูเกตกับโพลี-แอล-ไลซีน (poly-L-lysine) ต่อมาได้มีการเตรียมที3 และ ที4 คอนจูเกตกับอัลบูมิน (Gharib และคณะ,1971; Mitsuma และคณะ,1971; Larsen ,1972; Hesch และ Hufner,1972) โดยส่วนใหญ่ใช้วิธีไดอะไลซีสทำสารให้บริสุทธิ์ การไดอะไลซีสเป็นการกำจัดสารที่เหลือจากปฏิกริยาที่อาจอยู่ในรูปเกลือ หรือ กรดอิสระของที3 และ ที4 ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 24 ชม. หรือมากกว่า ซึ่งไม่สามารถแยกโปรตีนที่เกิดการรวมกัน (protein bound) จากการเชื่อมด้วยโควาเลนต์ (covalent linkage) ของที3 หรือ ที4 คอนจูเกตได้อย่างชัดเจน การใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี สามารถนำมาคำนวณจำนวนโมลที3 หรือ ที4ในคอนจูเกตได้ถูกต้องกว่าไดอะไลซีส เพราะเหตุว่าวิธีดังกล่าวคอนจูเกตอาจเกิดปฏิกริยาผันกลับ โดยเขาให้เหตุผลว่าการผันกลับของคอนจูเกตจะเกี่ยวกับวงฟีนอลิกที่อยู่ส่วนปลายของโมเลกุล แต่คอนจูเกตที่เชื่อมระหว่างที3 หรือ ที4 กับโปรตีนส่วนสำคัญอยู่ที่โซ่แขนงของหมู่อะมิโน ดังนั้นความแตกต่างของคอนจูเกตที่ต้องการกับที่เกิดการผันกลับจะอยู่ที่ปลายโมเลกุลธัยโรนีน เมื่อนำไปใช้กระตุ้นสัตว์ทดลองแอนติซีรัมที่ได้จะมีความจำเพาะต่อสารที่ไม่ต้องการด้วย ยังมีข้อมูลอีกส่วนหนึ่งซึ่งสนับสนุนข้อความดังกล่าว คือ แอนติซีรัมที่กระตุ้นด้วยอิมมูโนเจนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี เมื่อนำมาทดสอบปฏิกริยาข้าม (Cross reaction) กับไตรไอโอโดธัยโรอะซิติก แอซิด (Triiodothyroacetic acid) พบว่าไม่มีผลแต่อย่างใด แต่แอนติซีรัมที่ได้จากการเตรียมโดย Hesch และ Hufner (1972) , Gharib และคณะ, 1971 พบว่าผลของปฏิกริยาข้ามมีค่าสูงถึง 20 และ 36 % ตามลำดับ

1.2.2 ปฏิกริยาการเตรียมแฮปเทน-โปรตีน คอนจูเกต

จากการศึกษาการเตรียมคอนจูเกตในช่วงแรก (Landsteiner,1917) ทำให้สรุปได้ว่าการผลิตแอนติบอดีจำเป็นต้องใช้โปรตีนโดยให้เกิดปฏิกริยาทางเคมีที่จำเพาะกับแฮปเทน ในขณะนั้น Landsteiner เตรียมโดยใช้ปฏิกริยาเอซิเลชัน (acylation reaction) หมู่อะมิโนของอัลบูมินด้วยคลอไรด์ (chloride) หรือ แอนไฮไดรด์ (anhydride) ของบิวไทริก (butyric), ไอโซบิวไทริก (iso-butyric) ,

โมโน-(mono-) , ได- (di-) , ไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic), อะนิซิก (anisic) และ ซินนามิก แอซิด(cinnamic acid) โดยสารประกอบไดอะโซเนียม (diazonium compound) จะทำปฏิกริยากับ ฮิสทิดีน (histidine) , ไทโรซีน (tyrosine), และ ทริปโตแฟน (tryptophan) ของโปรตีน Landsteiner ได้ให้ข้อสังเกตว่าในคอนจูเกตเหล่านี้ความจำเพาะของโปรตีนพาหะที่ใช้เปลี่ยนไปจากเดิมโดยหมู่ที่เติมเข้าไปซึ่งไม่ใช่แอนติเจนิกดีเทอร์มิแนนต์และปฏิกริยาข้ามของซีรัมขึ้นกับโครงสร้างที่สัมพันธ์ระหว่างหมู่เอซิล (acyl group) หรือหมู่เอโซ (azo group) ที่เชื่อมกับโปรตีนด้วยพันธะโคเวเลนต์

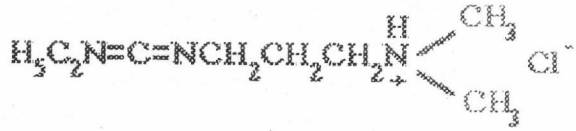
ในปี 1959 Beiser และคณะได้ทำการสังเคราะห์สเตอรอยด์-โปรตีน คอนจูเกต (steroid-protein conjugate) เพื่อผลิตแอนติ-สเตอรอยด์ (anti-steroid) ซึ่งก็ยังคงใช้เทคนิคการทำปฏิกริยาของ Landsteiner คือการรวมหมู่เอโซ (azo coupling techniques) และยังใช้โปรตีนโบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน โดยให้เหตุผลว่าเนื่องจากราคาไม่แพงและสามารถเตรียมเป็นคอนจูเกตที่ละลายน้ำได้ง่าย จากการหาส่วนประกอบของหมู่อะมิโนในโบไวน์ ซีรัม อัลบูมินทำให้ทราบได้ว่าการแทนที่ของแฮปเทนจะเกิดที่หมู่อะมิโนในตำแหน่งเอปสิลอน (ε-aminogroup) ของส่วนไลซีน (lysine) มากกว่าส่วนของไทโรซีน , ทริปโตแฟน และ อิมิดาโซล (imidazoles) การสร้างพันธะเปปไตด์ (peptide bond) ระหว่างหมู่กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid group) ของแฮปเทนกับหมู่อะมิโนของโปรตีนทำให้ปฏิกริยาเกิดได้ดี

การเลือกโมเลกุลพาหะ

โปรตีนพาหะที่นิยมใช้ในการเตรียมคอนจูเกต เช่น โกลบูลิน, อัลบูมินสปีชีส์ (species) ต่าง ๆ โดยทั่วไปแฮปเทนโปรตีน-คอนจูเกตของอัลบูมินมีความสามารถในการละลายได้ดีกว่าคอนจูเกตของโกลบูลิน เช่น สเตอรอยด์-โปรนตีนคอนจูเกตของอัลบูมินละลายได้ดีที่พีเอชมากกว่า 5.5 (Erlanger และคณะ, 1957) ขณะที่ในการเตรียมคอนจูเกตของโกลบูลินมีตะกอนเกิดขึ้นและไม่สามารถละลายได้

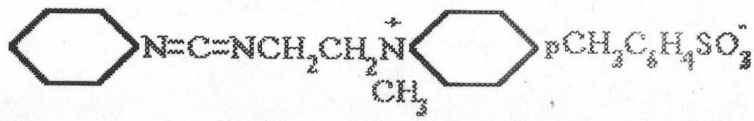
กลไกของปฏิกริยา

ในที่นี้จะเน้นแฮปเทนที่มีหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ซึ่งจะเกิดปฏิกริยาได้ง่ายกับโปรตีน เช่น ธัยรอกซินกับอัลบูมิน วิธีการรวมแฮปเทน (หมู่คาร์บอกซิล) กับ โปรตีน (หมู่อะมิโน) โดยใช้คาร์โบไดอิมีดในการทำให้เกิดปฏิกริยา คาร์โบไดอิมีดที่ใช้มี 2 รูปแบบ คือ 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิล-อะมิโนโพรพิล) คาร์โบไดอิมีด [1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide hydrochloride, Ethyl CDI] และ1-ไซโคลเฮกซิล-3-(2-มอร์โฟลินิล-(4) เอทิล) คาร์โบไดอิมีด เมโท-พารา-โทลูอีนซัลโฟเนต[1-cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-(4)-ethyl) carbodiimide metho-p-toluenesulphonate, Morpho CDI] แสดงโครงสร้างได้ดังรูปที่ 3



1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimide hydrochloride

Ethyl CDI

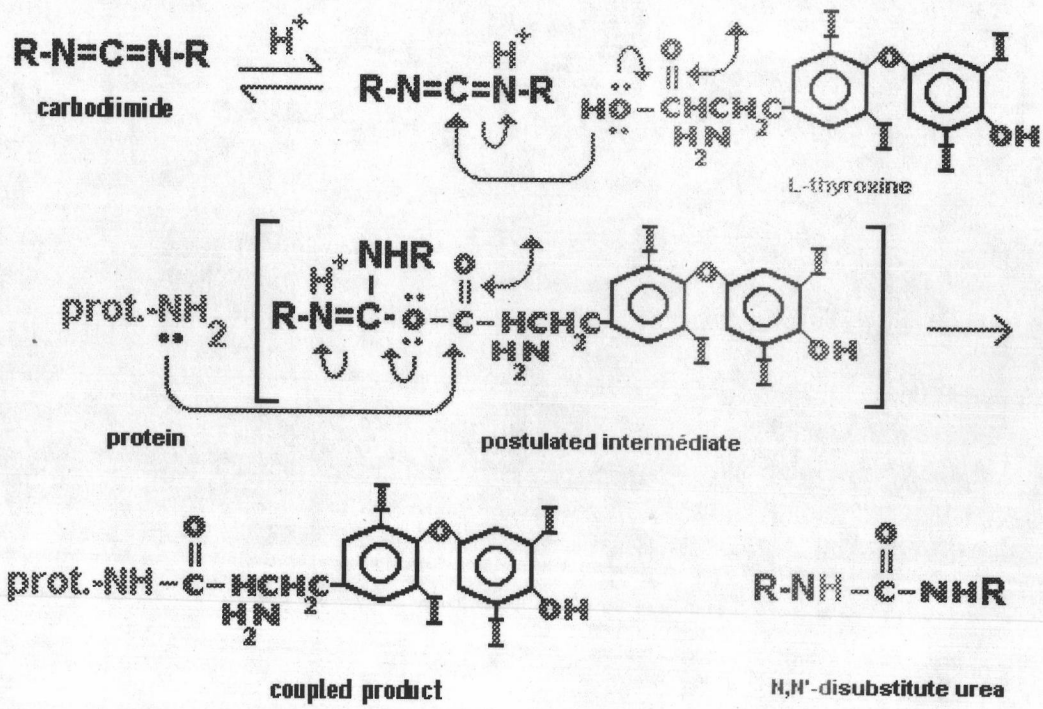


1-cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-(4)-ethyl)carbodiimide metho-p-toluenesulphonate

Morpho CDI

รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างทั้ง 2 รูปแบบของคาร์โบไดอิมีด

กลไกการเกิดปฏิกริยาเริ่มจากคาร์โบไดอิมีดรับโปรตอนจาก (proton, H^+) จากน้ำแล้วหมู่คาร์บอกซิลจะเข้ารวมกับคาร์โบไดอิมีดที่ขาดอิเล็กตรอน (electron) นั้นทำให้ได้อินเตอร์มิเดียต (intermediate) เกิดขึ้นแล้วจึงทำปฏิกริยากับโปรตีนซึ่งมีหมู่อะมิโนที่มีอิเล็กตรอนหนาแน่น สิ่งที่ได้คือแฮปเทน (ธัยรอกซิน)-โปรตีน คอนจูเกต แสดงได้ดังรูปที่ 4 (Sheehan และคณะ,1961 ; Goodfreind และคณะ,1964)



รูปที่ 4 แสดงกลไกปฏิกริยาการรวมกันของธัยรอกซินกับโมเลกุลโปรตีน

1.3 แอนติเจนและแอนติบอดี (antigen and antibody)

แอนติเจน คือ สารซึ่งสามารถชักนำให้ร่างกายสร้างแอนติบอดี หรือ ทีลิมโฟซัยท์ชนิดจำเพาะได้ และสามารถทำปฏิกริยาจำเพาะกับแอนติบอดีหรือลิมโฟซัยท์นั้น ๆ (ประพันธ์ , 2522) จากคำจำกัดความนี้ แอนติเจนต้องมีคุณสมบัติ 2 ประการ คือ

1.3.1 ความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกัน (immunogenicity) คือ ความสามารถตามธรรมชาติที่จะชักนำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีหรือทีลิมโฟซัยท์ชนิดจำเพาะ(specific T-lymphocyte)

1.3.2 ความสามารถในการทำปฏิกริยาจำเพาะ (specific reactivity) คือ ปฏิกริยาชนิดจำเพาะระหว่างแอนติบอดี หรือ ทีลิมโฟซัยท์ที่แอนติเจนได้สร้างขึ้น

แอนติเจนิก ดีเทอร์มิแนนท์ (antigenic determinant) หรือเอพิโทป (epitope) คือ ตำแหน่งย่อย ๆ บนแอนติเจนที่จะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยแอนติเจน 1โมเลกุลจะมีแอนติเจนิก ดีเทอร์มิแนนท์ได้มากมายและแอนติเจนชนิดหนึ่ง ๆ จะมีจำนวนแอนติเจนิก ดีเทอร์มิแนนท์อยู่บนโมเลกุลไม่เท่ากัน เช่น โมเลกุลของไข่ขาวมีแอนติเจนิก ดีเทอร์มิแนนท์ 5 อัน ต่อโมเลกุล โมเลกุลของธัยโรโกลบูลินมี 40 อันต่อโมเลกุล เป็นต้น แอนติบอดีหรือ ทีลิมโฟซัยท์ชนิดจำเพาะที่เกิดจากการกระตุ้นของแอนติเจนิกดีเทอร์มิแนนท์ใดจะมีความจำเพาะต่อดีเทอร์มิแนนท์นั้น ๆ เท่านั้น

สารที่มีความเป็นอิมมูโนเจนิซิตี จะต้องมีคุณสมบัติดังนี้

1.3.1.1 เป็นสิ่งแปลกปลอม โดยที่โมเลกุลจะชักนำให้ร่างกายเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ต้องเป็นสิ่งแปลกปลอม ที่ปกติแล้วไม่พบในร่างกายหรืออาจเป็นสิ่งที่พบในร่างกายแต่ไม่เคยได้สัมผัสกับระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อมีการเล็ดลอดออกมาระบบภูมิคุ้มกันจะจัดให้เป็นสิ่งแปลกปลอมเช่นกัน

1.3.1.2 คุณสมบัติทางฟิสิกส์

ก. ขนาด แอนติเจนที่ดีต้องเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000ขึ้นไป ทั้งนี้เพราะยิ่งโมเลกุลใหญ่จะยิ่งมีแอนติเจนิก ดีเทอร์มิแนนท์มากขึ้น และสามารถถูกกินโดยมาโครฟาจได้ง่ายขึ้นนั่นคือเกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น (Weir , 1986)

ข. โครงสร้าง ถ้าแอนติเจนมีโครงสร้างที่ซับซ้อนสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดี โปรตีนบางชนิดที่เป็นโมเลกุลเดี่ยว ๆ จะไม่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน แต่ถ้าประกอบด้วยหลายโมเลกุลหรือมีการเกาะกลุ่มจะสามารถชักนำให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีได้ นอกจากนั้นแอนติเจนบางชนิดเมื่อกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะขึ้นแล้ว ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแอนติเจนเกิดขึ้น แอนติบอดีเดิมนั้นจะไม่สามารถจับกับแอนติเจนที่เปลี่ยนแปลงนี้ได้อีก เช่น โปรตีนเกิดการเสียสภาพ โครงสร้างเปลี่ยนแปลงไปโดยโครงสร้างใหม่นี้ก็สามารถไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้สร้างแอนติบอดีตัวใหม่ขึ้นได้

1.3.1.3 คุณสมบัติทางเคมี

สารอินทรีย์ทั้งหลายรวมทั้งจุลชีพ และ ผลผลิตของจุลชีพ แม้แต่สารสังเคราะห์บางชนิดที่มีคุณสมบัติดังกล่าวก็สามารถเป็นแอนติเจนได้ ในระหว่างสารจำพวกโปรตีนคาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิค และ ไขมัน พบว่าโปรตีนเป็นแอนติเจนที่ดีที่สุด คาร์โบไฮเดรตบางชนิดเป็นแอนติเจนได้ดี

กรดนิวคลีอิคไม่ใช่แอนติเจนที่ดีแต่ถ้าอยู่ในรูปของ single strand DNA สามารถเป็นแอนติเจนได้ โดยทั่วไปไขมันไม่เป็นแอนติเจนนอกจากบางชนิดทำหน้าที่เป็นแฮปเทน ได้ เช่น cardiolypin ของเนื้อเยื่อหัวใจ แต่อย่างไรก็ตามสารที่ประกอบกับโปรตีนเช่น ไลโปโปรตีน หรือ นิวคลีโอโปรตีน ก็สามารถเป็นแอนติเจนที่ดีได้ ตัวอย่างสารอินทรีย์และแหล่งแอนติเจน ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงสารอินทรีย์และแหล่งแอนติเจนที่พบได้ (สุทธิพันธ์ , 2529)

สารอินทรีย์	แหล่งแอนติเจน
โปรตีน	ซีรัม,เนื้อเยื่อ,เอนไซม์
ไลโปโปรตีน	ซีรัม, ไลโปโปรตีน , เซลเมมเบรน
โพลีแซคคาไรด์	แคปซูลแบคทีเรีย (capsules of bacteria)
ไลโปโพลีแซคคาไรด์	เอ็นโดท็อกซิน (endotoxins)
ไกลโคโปรตีน	หมู่เลือด, ฮิสโตคอมแพททิบิลิตี แอนติเจน (histocompatibility antigens)
โพลีเปปไตด์	ฮอร์โมน

1.3.1.4 คุณสมบัติที่เกี่ยวกับชนิดสิ่งมีชีวิต

นอกจากคุณสมบัติข้างต้นแล้วความเป็นอิมมูโนเจนิซิตียังเกี่ยวข้องกับชนิดสิ่งมีชีวิตที่ได้รับ ซึ่งแตกต่างกันเมื่อต่างสปีชีส์ หรือ แม้สปีชีส์เดียวกันก็แตกต่างกันในแต่ละบุคคลขึ้นกับพันธุ์กรรม อายุ และ อาหาร เช่น แอนติเจนบางชนิดอาจไม่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกระต่ายเลยแต่กลับไปกระตุ้นได้ดีในหนูทั้งนี้ขึ้นกับยีนส์ที่ควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์นั้น ๆ นอกจากนี้ปริมาณแอนติเจนที่เข้าสู่ร่างกายน้อยหรือมากไปและหนทางที่แอนติเจนเข้าสู่ร่างกายก็มีบทบาทเช่นกัน

1.3.1.5 แอดจูแวนต์ (Adjuvant)

เป็นสารที่เมื่อให้เข้าสู่ร่างกายพร้อมกับแอนติเจนแล้วจะช่วยเสริมให้ร่างกายมีการตอบสนองต่อแอนติเจนนั้นๆได้ดีขึ้น โดยอาจไปยืดเวลาการอยู่ในร่างกายของแอนติเจนให้นานขึ้นทำให้ระบบภูมิคุ้มกันถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนมากขึ้น เช่น Freund 's adjuvant ซึ่งแบ่งเป็น

ก. Incomplete Freund 's adjuvant มีเพียงชั้นน้ำมันพาราฟิน (paraffin oil)

ข. Complete Freund 's adjuvant มี Mycobacterium tuberculosis ซึ่งถูกฆ่าด้วยความร้อนรวมอยู่ในชั้นน้ำมันด้วย แอดจูแวนต์ชนิดนี้สามารถกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีได้ดีกว่าแบบ ก. แต่มีข้อเสียที่ว่าเมื่อใช้กับสัตว์ทดลองอาจทำให้เกิดก้อนแข็ง (granuloma) และบ่อยครั้งเกิดเป็นฝีตรงบริเวณที่ฉีดเข้าไป (Cruickshank และคณะ , 1967)

แฮปเทน หมายถึง แอนติเจนที่มีคุณสมบัติไม่ครบถ้วน คือ มีความสามารถในการทำปฏิกริยาจำเพาะ แต่ไม่มีความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกัน (Louit , 1960) กล่าวคือไม่สามารถทำให้เกิดแอนติบอดีแต่สามารถทำปฏิกริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะได้ ถ้าแฮปเทนจับกับสารที่มีโมเลกุลใหญ่กว่าที่เรียกว่าพาหะ (carrier) ทำให้มีความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นได้ เช่น ธัยรอก

ชินเป็นแฮปเทนเมื่อรวมกับโปรตีนโดยปฏิกริยาทางเคมีถ้าฉีดกระตุ้นในสัตว์ทดลองจะเกิดการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะได้

แอนติบอดี เป็นสารไกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วยโพลีเปปไตด์ 82-96 % และคาร์โบไฮเดรต 4-18 % เกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนิก ดีเทอร์มิแนนท์ที่แปลกปลอม และจะทำปฏิกริยาจำเพาะกับแอนติเจนิก ดีเทอร์มิแนนท์นั้นๆ เท่านั้น ซึ่งผลจากปฏิกริยานี้จะกำจัดสารพิษ และ สิ่งแปลกปลอมอื่น ๆ ออกจากร่างกายได้

เนื่องจากแอนติบอดีเป็นโกลบูลินที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันของร่างกายจึงเรียกว่าอิมมูโนโกลบูลิน หรือ Ig ซึ่งมี 5 ชนิด คือ IgG,IgA,IgM,IgD และ IgE (Carpenter , 1989) แสดงดังตารางที่ 2 โดยแอนติบอดีส่วนใหญ่อยู่ในซีรัมส่วนของแกมมาโกลบูลิน หรือ IgG

ตารางที่ 2 แสดงคุณสมบัติอิมมูโนโกลบูลินชนิดต่าง ๆ (สุทธิพันธ์ ,2529)

ชนิด / คุณสมบัติ	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Molecular Weight	150000	150000-160000	1000000	200000	190000
Sedimentation Coeff.	6-7s	7-15S	19S	7S	8S
Heavy Chain	γ	α	μ	δ	ε
Light Chain	k or λ	k or λ	k or λ	k or λ	k or λ
Molecular formula	γ 2κ2 γ 2λ2	α 2 κ2 α 2λ2	μ 2 κ2 μ 2λ2	δ 2 κ2 δ 2λ2	ε 2 κ2 ε 2λ2
Valence	2	2-8	10	2	2
Subclass	IgG1 61 % IgG2 30 % IgG3 5 % IgG4 4 %	IgA1 93% IgA2 7 %	IgM1 IgM2	?	?
J Chain	-	+	+	-	-
Sc (secretory component)	-	+ secretory IgA	+ secretory IgM	-	-
Genetic marker					
-Gm allotype	+	-	-	-	-
-Am allotype	-	+	-	-	-
m allotype	-	-	+	-	-
-Km allotype	+	+	+	+	+
Normal serum level	600-1700	150-300	50-150	1-14	0.01-0.07
% Total antibody	76	16	8	trace	trace

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงคุณสมบัติอิมมูโนโกลบูลินชนิดต่าง ๆ

ชนิด / คุณสมบัติ	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Half life (days)	23	6	5	2-8	1-5
In secretion	+	+++	+	+	+
Placental passage	+	-	-	-	-
Histamine release from human mast cell	-	-	-	-	+
Presence in CSF	+	+	-	-	-
Relative eff. of					
-Bacteriacidal activity	+	+	+++	?	?
-Antiviral activity	+	+++	+	?	?
Complement fixation					
-Classical	IgG1,2,3	-	+	-	-
-Alternative	IgG4	+	-	-	+
At 56 °C , 30 min.	stable	stable	stable	rel. labile	labile

แอนติบอดี หรืออิมมูโนโกลบูลิน เป็นผลผลิตของพลาสมาเซล และ เม็ดเลือดขาวไม่เพียงแต่พบในซีรัมเท่านั้น ยังพบในส่วนน้ำอื่น ๆ ของร่างกาย และ ในเนื้อเยื่อ เช่น น้ำไขสันหลัง ปัสสาวะ น้ำนม น้ำลาย น้ำตา ต่อมน้ำเหลือง ม้าม และ บนผิวของเม็ดเลือดขาวบางส่วนอีกด้วย

การพิจารณาแอนติบอดีหรือแอนติซีรัมที่ผลิตได้

โดยทั่วไปพิจารณาใน 3 ลักษณะ (Chard,1981) คือ ความจำเพาะ (specificity), สัมพรรคภาพ (affinity) และไตเตอร์ (titre)

คุณสมบัติสำคัญประการแรกที่ใช้พิจารณาแอนติซีรัม คือ ความจำเพาะต่อสารที่สนใจซึ่งแอนติซีรัมที่มีคุณภาพดีควรมีความจำเพาะต่อสารที่สนใจสูงกว่าสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียง

สัมพรรคภาพ : ถ้าเขียนปฏิกริยาระหว่างแอนติเจน (Ag) และแอนติบอดี (Ab) เป็นดังนี้

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

จากสมการดังกล่าวอัตราการเกิดปฏิกริยาไปข้างหน้าเป็นการรวมตัวของ Ag และ Ab เกิดเป็นสารเชิงซ้อน AgAb มีค่า k_1 ส่วนปฏิกริยาย้อนกลับคือปฏิกริยาการแตกตัวของสารเชิงซ้อน AgAb ให้อัตราการเกิดปฏิกริยาเป็น k_2 โดยอัตราทั้ง 2 มีค่าคงที่ หรืออีกนัยหนึ่งเป็นสัดส่วนของโมเลกุลที่

ทำปฏิกริยาใน 1 หน่วยเวลา อัตราการเกิดปฏิกริยาสัมบูรณ์ (absolute rate) จำนวนโมเลกุลที่ทำปฏิกริยาใน 1 หน่วยเวลาขึ้นกับความเข้มข้นของโมเลกุล ดังนั้นเมื่อเริ่มปฏิกริยาด้วยการเติมแอนติเจนและแอนติบอดีอัตราการเกิดปฏิกริยาไปข้างหน้าจะมีค่าสูง ส่วนอัตราการเกิดปฏิกริยาย้อนกลับจะมีค่าต่ำ

ขณะที่ปฏิกริยาดำเนินไปความเข้มข้นของ Ag และ Ab จะลดลงและจะลดลงมากเมื่ออัตราการเกิดปฏิกริยาไปข้างหน้ามีค่าสูง ในขณะเดียวกันความเข้มข้นของสารเชิงซ้อน Ag-Ab เพิ่มขึ้นและจะมีการเกิดปฏิกริยาย้อนกลับแต่อัตราการเกิดปฏิกริยามีค่าต่ำกว่า ปฏิกริยาจะเข้าสู่สมดุลย์เมื่ออัตราการเกิดปฏิกริยาระหว่าง Ag และ Abที่ทำปฏิกริยาใน 1 หน่วยเวลาเกิดเป็น Ag-Ab เท่ากับอัตราการแตกตัวของ Ag-Ab โดยความเข้มข้นในสมดุลย์นี้ขึ้นกับพลังงานของ Ag และ Ab ที่ทำปฏิกริยากัน ในทางเทอร์โมไดนามิก (thermodynamic) สามารถอธิบายโดยใช้เอนโทรปี (entropy,ΔS) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระของระบบทั้งหมด จากกฎของมวล (law of mass) กล่าวว่าที่สมดุลย์อัตราส่วนของความเข้มข้นทั้ง 2 ข้างของสมการจะคงที่

$$[\,AgAb\,] / [\,Ag\,]\,[\,Ab\,] \quad = \quad K_a$$

โดย [Ag] , [Ab] และ [AgAb] เป็นความเข้มข้นของ Ag, Ab และสารเชิงซ้อน Ag-Ab ตามลำดับ ค่า Ka ดังกล่าวเรียกว่าค่าคงที่สัมพรรคภาพ ซึ่งความเข้มข้นของปฏิกริยาจะพิจารณาจากอัตราการเกิดปฏิกริยาไปข้างหน้าเทียบกับอัตราการเกิดปฏิกริยาย้อนกลับ

$$K_a \quad = \quad k_1 \,/\, k_2$$

ค่าคงที่สัมพรรคภาพของระบบใด ๆ เป็นการวัดพลังงานของปฏิกริยาระหว่างสารเริ่มต้น ในที่นี้คือ Ag และ Ab ถ้าให้ความเข้มข้นเริ่มต้นคงที่ค่า K_a สูง ๆ ที่สมดุลย์จะมีความเข้มข้นของสารเชิงซ้อน AgAb จะมีค่ามากกว่า Ag และ Ab แต่ถ้าค่า K_a ต่ำก็จะเกิดในทางกลับกัน

การวัดค่าคงที่สัมพรรคภาพ

จากปฏิกริยาระหว่างแอนติเจน (Ag) และแอนติบอดี (Ab)

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

โดยให้ค่าคงที่ของการเกิดปฏิกริยาเป็น K_a

$$[AgAb]/[Ag][Ab] \quad = \quad K_a \qquad \text{----------(1)}$$

ถ้าให้ [AgAb] = X เป็นความเข้มข้นของสารเชิงซ้อนระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่สมดุลย์ [Ag] เป็นความเข้มข้นของแอนติเจนทั้งหมดในระบบ และ [Ab] เป็นความเข้มข้นของแอนติบอดีทั้งหมดในระบบเช่นกัน ในสภาวะที่สมดุลย์จะได้ว่า

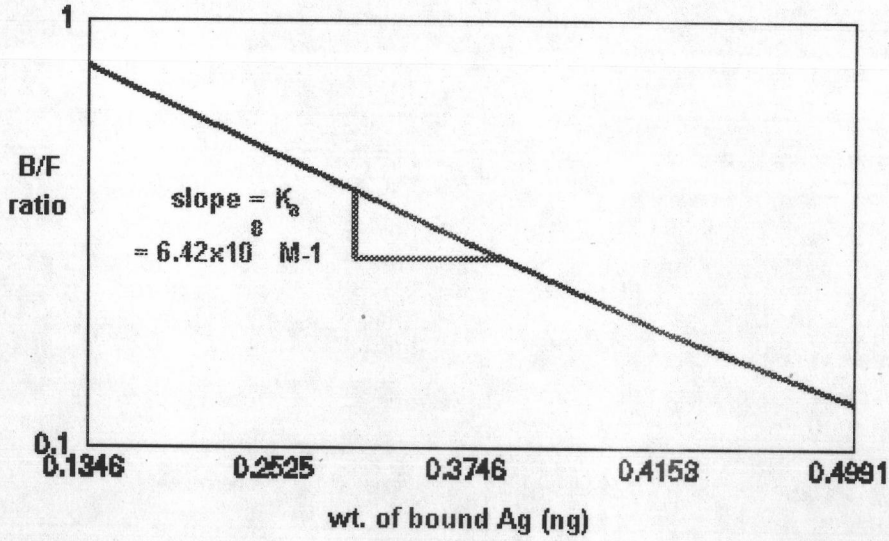
$$X/(Ag-X)(Ab-X) = K_a \qquad \text{----------(2)}$$

$$X/(Ag-X) = K_a\,Ab - K_a\,X \qquad \text{----------(3)}$$

จากความสัมพันธ์ข้างต้น (3) เมื่อเทียบกับกราฟรูปที่ 4 สามารถบอกได้ว่าเป็นความสัมพันธ์ระหว่าง X/(Ag-X) ซึ่งคือ bound/free ratio และ X ซึ่งคือ bound fraction ส่วนความชัน (slope) คือ $-K_a$ และจุดตัดแกน X ของกราฟ เมื่อ bound/free ratio เป็นศูนย์ (Scatchard plot ที่ใช้คำนวณค่าคงที่สัมพรรคภาพแสดงได้ดังรูปที่ 5)

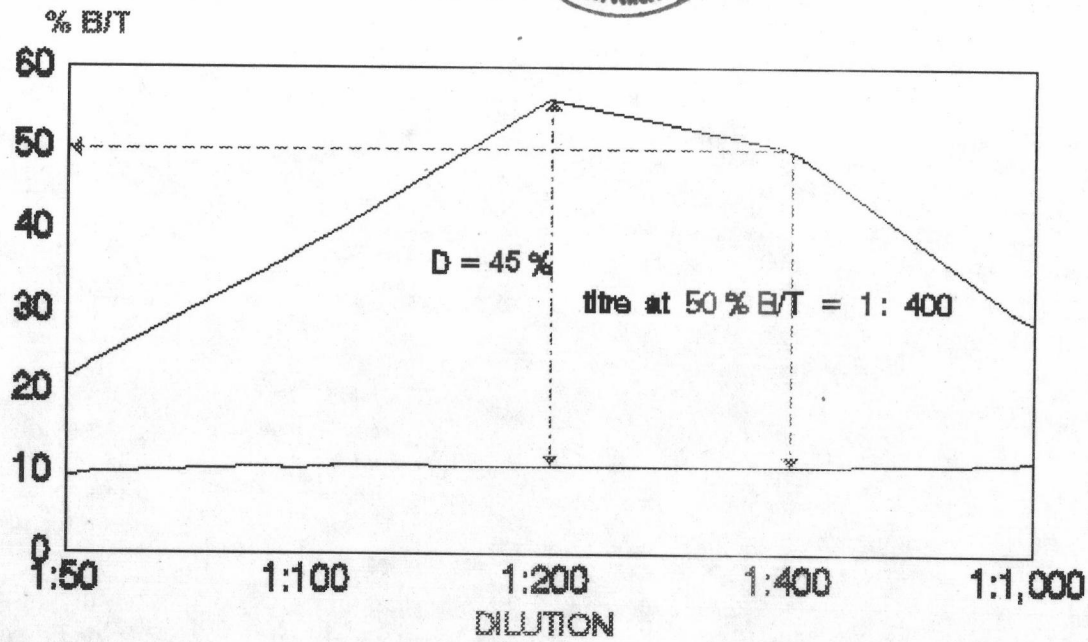
$$0 = K_a\,Ab - K_a\,X$$

$$Ab = X$$



รูปที่ 5 แสดง Scatchard plot ที่ใช้คำนวณค่า K_a

ไตเตอร์ : ถ้าแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะและสัมพรรคภาพใกล้เคียงกันคุณสมบัติสุดท้ายที่ใช้พิจารณาคัดเลือกแอนติซีรัมคือค่าไตเตอร์ซึ่งเป็นส่วนกลับของอัตราส่วนการเจือจางที่รวมกับตัวตามรอย (tracer) ที่ 50 %(แสดงได้ดังรูปที่ 6) เช่น แอนติซีรัมไตเตอร์ 1 : 50,000 จะถูกเลือกมาใช้มากกว่าแอนติซีรัมไตเตอร์ 1 : 20,000 เพราะจะให้ปริมาณการทำแอสเสย์ (assay) ต่อปริมาตรซีรัมที่เท่ากันได้มากกว่า ไตเตอร์ไม่มีส่วนสัมพันธ์โดยตรงกับสัมพรรคภาพเป็นเพียงความเข้มข้นทั้งหมดของแอนติบอดี



รูปที่ 6 แสดงกราฟไตเตอร์ของแอนติบอดี

1.4 ปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี

ในปัจจุบันการทดสอบหลายชนิดในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ และ วิทยาศาสตร์แขนงต่าง ๆ ใช้วิธีการทดสอบที่อาศัยหลักการของการทำปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อกัน (ประพันธ์ , 2522)

การทำปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในห้องปฏิบัติการบางกรณีจะก่อให้เกิดผลที่สามารถมองเห็นได้ เช่น มีตะกอนหรือ มีการเกาะกลุ่มของแอนติเจนที่เป็นเซลเกิดขึ้นเป็นต้น แต่ในบางกรณีจำเป็นต้องติดฉลากแอนติเจน หรือ แอนติบอดีด้วยสารบางชนิดเสียก่อนจึงสามารถทราบได้ว่า มีปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเกิดขึ้น ดังนั้น สามารถแบ่งการทดสอบที่อาศัยหลักการของการทำปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีตามลักษณะปฏิกริยาที่ใช้ในการทดสอบได้เป็น 5 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

1.4.1 การทดสอบที่ใช้ปฏิกริยาการลบล้างฤทธิ์ (Neutralization reaction)

1.4.2 การทดสอบที่ใช้ปฏิกริยาการตกตะกอน (Precipitation reaction)

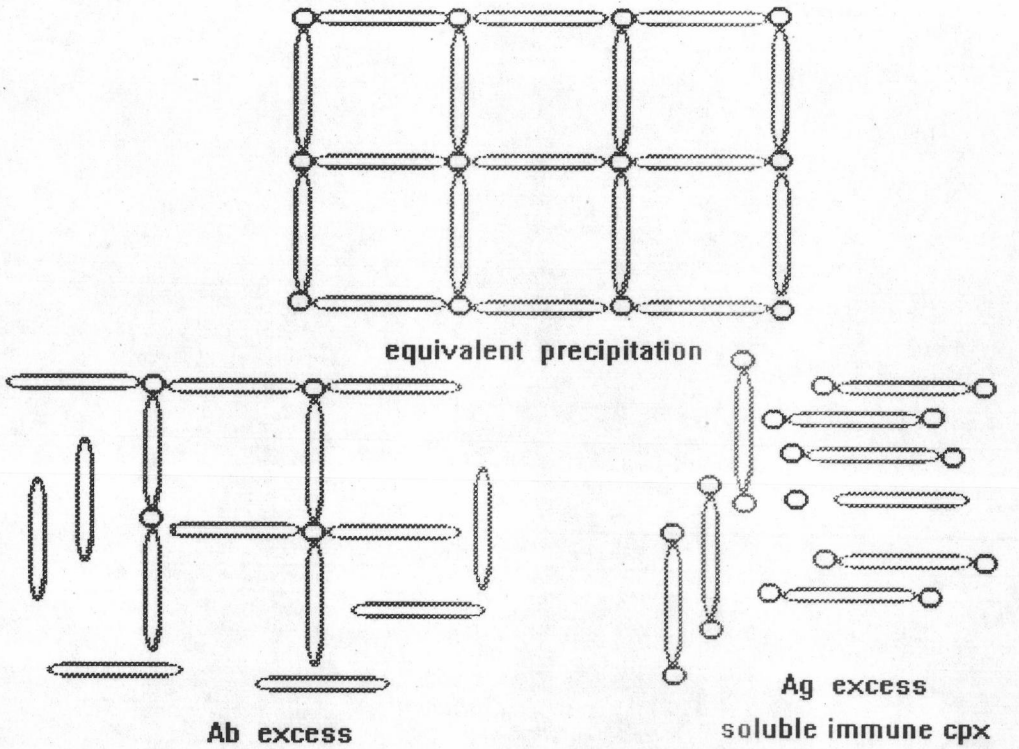
1.4.3 การทดสอบที่ใช้ปฏิกริยาการเกาะกลุ่ม (Agglutination reaction)

1.4.4 การทดสอบที่ใช้ปฏิกริยาซึ่งต้องใช้คอมพลีเมนต์ร่วมด้วย (Complement dependent reaction)

1.4.5 การทดสอบที่ใช้แอนติเจน หรือ แอนติบอดีติดฉลาก (method with labelled antigen or label antibody)

ในการทดลองนี้การทดสอบปฏิกริยาแอนติเจนและแอนติบอดีใช้หลักการของการตกตะกอนและใช้แอนติเจนติดฉลากเป็นวิธีทดสอบร่วมกัน (Sakata และคณะ , 1985)

เมื่อแอนติบอดีทำปฏิกริยากับแอนติเจนที่เป็นสารละลายจะเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีซึ่งอาจตกตะกอนให้เห็นได้โดยอัตราส่วนระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ใช้ในปฏิกริยามีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเกิดตะกอนของสารเชิงซ้อนแอนติเจน-แอนติบอดี ดังการทดลองของ Heidelberger และ Kendall เมื่อปี ค.ศ.1930 (Heidelberg และคณะ , 1930) แสดงดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 แสดงอัตราส่วนแอนติเจนและแอนติบอดีต่อการเกิดตะกอน

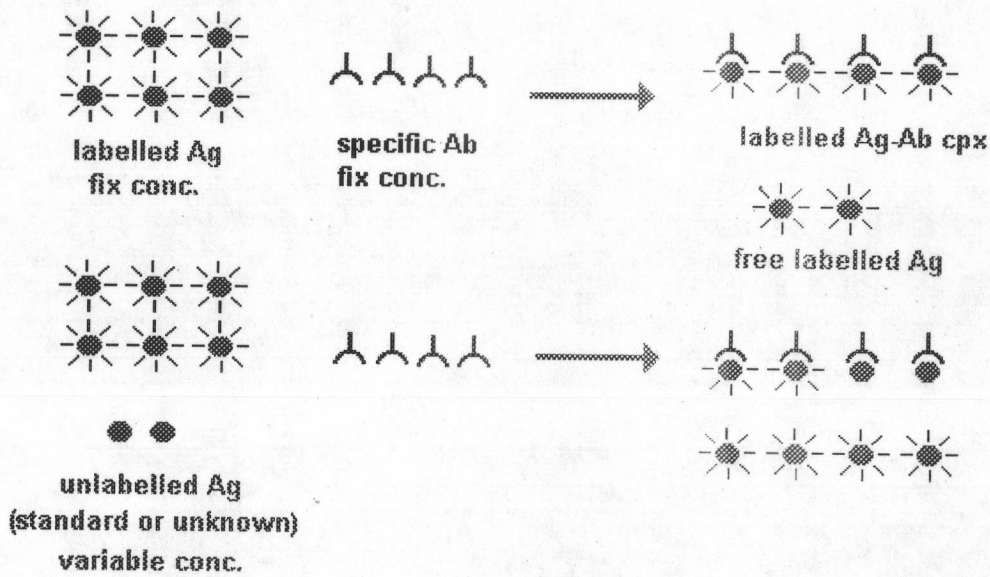
ในการทดลองครั้งนั้น (Kabat , 1968) ใช้การเติมแอนติเจนปริมาณต่าง ๆ กันลงในแอนติบอดีที่มีปริมาณ คงที่ซึ่งอยู่ในหลอดทดลองหลาย ๆ หลอด โดยเริ่มจากแอนติเจนปริมาณน้อย ๆ และเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ พบว่าตะกอนที่เกิดจะเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณแอนติเจนที่เติมลงไปจนกระทั่งคงที่ จากนั้นพบว่ายิ่งใช้แอนติเจนปริมาณมากขึ้นจะยิ่งทำให้ตะกอนลดลง ในหลอดทดลองที่ตะกอนเกิดเพิ่มตามปริมาณแอนติเจนที่เติมลงไปนั้นเรียกว่าแอนติบอดีมากเกินพอตะกอนที่เกิดขึ้นประกอบด้วยแอนติเจนทั้งหมดที่เติมลงไปและแอนติบอดีบางส่วนที่มีอยู่ จากนั้นจะถึงส่วนที่เรียกว่าสมดุลย์ซึ่งเป็นส่วนที่ทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีอยู่ทั้งหมดทำปฏิกริยากันและตกตะกอนหมด ดังนั้นจะไม่พบว่ามีแอนติเจน หรือ แอนติบอดีเหลืออยู่ในสารน้ำในหลอดทดลอง สำหรับส่วนที่พบว่าตะกอนกลับลดลงเมื่อใช้แอนติเจนมากขึ้น เรียกส่วนนั้นว่า แอนติเจนมากเกินพอ

การที่อัตราส่วนระหว่างปริมาณแอนติเจนและแอนติบอดีที่ใช้ในปฏิกริยามีผลต่อการตกตะกอนของสารเชิงซ้อนแอนติเจน-แอนติบอดีที่เกิดขึ้น สามารถอธิบายได้โดยอาศัยทฤษฎีโครงร่าง

ผลึกซึ่งเชื่อว่าแอนติบอดีหนึ่งโมเลกุลสามารถจับกับแอนติเจนได้หลายโมเลกุลและแอนติเจนหนึ่งโมเลกุลก็สามารถจับกับแอนติบอดีได้มากกว่าหนึ่งโมเลกุล

ดังนั้นถ้าแอนติเจนและแอนติบอดีมีปริมาณพอเหมาะกันก็สามารถจับกันในลักษณะที่ต่อเป็นสายยาวได้ โดยยิ่งแอนติเจนและแอนติบอดีที่จับกันนี้มีขนาดใหญ่เท่าใดก็จะยิ่งละลายได้น้อยและสามารถตกตะกอนให้เห็นได้

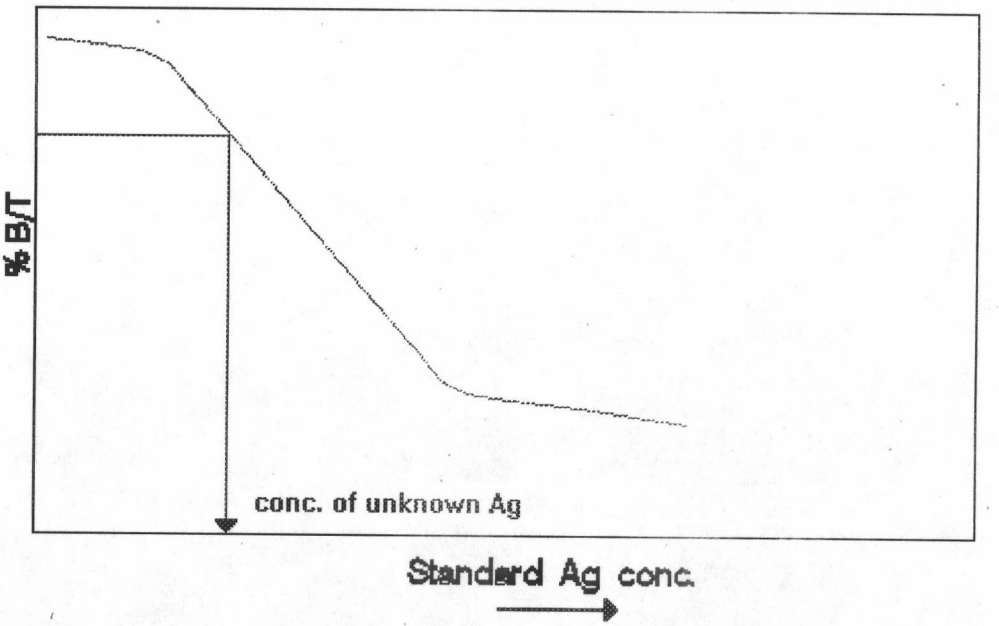
การทดสอบที่ใช้แอนติเจนเป็นสารติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีเรียกว่า วิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ แบบแข่งขัน (competitive binding) แสดงดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์แบบแข่งขัน

หลักการมีดังนี้ คือ ให้แอนติเจนที่ต้องการตรวจหาปริมาณแย่งจับกับแอนติเจนชนิดเดียวกันที่ติดฉลากไว้ด้วยสารรังสีแล้ว (ในการทดลองนี้คือ ที4-ไอโอดีน-125) ในการจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนทั้งสอง (แอนติ-ที4) ซึ่งมีอยู่ในปริมาณจำกัด ถ้าที4ปกติมีปริมาณมากก็สามารถแย่งจับกับแอนติ-ที4ได้มาก ทำให้มีที4-ไอโอดีน-125 ที่จับกับแอนติ-ที4น้อย เมื่อนำไปนับจำนวนรังสีแกมมาที่เกิดขึ้นโดยเครื่องวัดรังสีก็จะวัดได้น้อยตามไปด้วย

ในการหาปริมาณแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจ ก่อนอื่นจะทำการทดสอบแอนติเจนมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้วหลาย ๆ ตัวอย่าง ซึ่งแต่ละตัวอย่างมีปริมาณต่าง ๆ กัน วัดจำนวนรังสีของแอนติเจนติดฉลากที่จับกับแอนติบอดี แล้วนำมาสร้างเส้นโค้งมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนติเจนมาตรฐานที่ทำการทดสอบและจำนวนรังสีแกมมาของแอนติเจนติดฉลากที่จับกับแอนติบอดีแล้ว ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงเส้นโค้งมาตรฐานในการตรวจหาแอนติเจน

การคำนวณหาปริมาณแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจทำได้โดยนำค่ารังสีที่ตรวจวัดได้ของแอนติเจนติดฉลากที่จับกับแอนติบอดีแล้วเปรียบเทียบกับเส้นโค้งมาตรฐานก็สามารถทราบค่าได้

ในการวิจัยครั้งนี้เป็นการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อธัยรอกซินแต่ด้วยเหตุผลที่ว่าธัยรอกซินมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่ไม่ครบถ้วน คือ ไม่มีคุณสมบัติการชักนำให้เกิดการสร้างแอนติบอดี (ไม่เป็นอิมมูโนเจน) แต่สามารถเกิดปฏิกริยากับแอนติบอดีได้ ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงจำเป็นต้องเพิ่มคุณสมบัติในการเป็นอิมมูโนเจนของธัยรอกซินโดยการรวมกับโมเลกุลของสารที่มีขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน (Clutton และคณะ , 1938 ; Sela และคณะ , 1962) ในการวิจัยครั้งนี้ใช้โปรตีน 3 ชนิด คือ โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (Ferrua และคณะ , 1986), ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน (Byfield และคณะ , 1984), และ โพลี-ดี-ไลซีน (Haber และคณะ , 1965 ; Stasom และคณะ , 1967) โดยใช้คาร์โบไดอิมีดเป็นตัวทำให้เกิดปฏิกริยา

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาปฏิกริยาการสังเคราะห์ธัยรอกซิน-โปรตีน คอนจูเกต
2. เพื่อผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลองโดยใช้อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โปรตีน คอนจูเกต
3. เพื่อศึกษาคุณลักษณะแอนติซีรัมที่ผลิตได้