IV วิจารณ์ผลการทดลอง

การหาความผิดปกติของต่อมธัยรอยด์นั้น Somogyi (1930) ได้เริ่มใช้วิธีวัด protein-bound-iodine (PBI) เพื่อใช้ในการพิจารณา วิธีนี้เป็นที่นิยมใช้มาเป็นเวลานาน แต่เป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมที่จะใช้ค่า PBI พิจารณาความผิดปกติของต่อมธัยรอยด์ เพราะปริมาณที่ได้เป็นปริมาณไอโอโดโปรตีนทั้งหมดในร่างกาย ซึ่งรวมทั้งที่เป็นไอโอโดโปรตีนที่เป็นฮอร์โมนจากต่อมธัยรอยด์และสารไอโอโดโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่ฮอร์โมนเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีคนมีครรภ์หรือคนที่รับประทานยาประเภทไอโอดีน ปริมาณไอโอโดโปรตีนสูงกว่าปกติอยู่แล้ว ดังนั้นเมื่อวัดปริมาณ PBI ก็จะมีค่าสูง ปริมาณนี้ถ้านำมาพิจารณาภาวะของต่อมธัยรอยด์ก็จะทำให้บอกภาวะผิดไปได้

Ekins (1963) ได้เริ่มต้นใช้วิธี 'saturation analysis'ในการวัดปริมาณธัยรอกซินในซีรัมปริมาณน้อย ๆ ขนาด 1 มล. ซึ่งเป็นหลักเดียวกับวิธีcompetitive protein-binding ของ Murphy (1965) โดยสกัดฮอร์โมนจากซีรัม แล้วให้ทำปฏิกิริยากับโปรตีนอินเตอร์-แอลฟา-โกลบูลิน ที่ได้จากซีรัมของคนปกติ วิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว เที่ยงตรง และสามารถทำการทดลองได้พร้อม ๆ กันหลาย ๆ ตัวอย่าง เหมาะที่จะใช้ในงานประจำวันทางการแพทย์

วิธีที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ดัดแปลงจากวิธีของ Ekins (1963) โดยใช้โปรตีนอินเตอร์-แอลฟา โกลบูลิน จากซีรัมของคนมีครรภ์เป็น binding protein แทนซีรัมของคนปกติ เพราะซีรัมของคนมีครรภ์มีปริมาณโปรตีนมากกว่าซีรัมของคนปกติ Ekins (1969) ใช้อัตราส่วนในการเจือจางซีรัมคนปกติ 1:2 (ซีรัม: buffer) ในอัตรานี้ ปริมาณโปรตีนอินเตอร์-แอลฟาโกลบูลิน ไม่ถูกลด activity มาก และ non-specific protein ในซีรัมก็ยังอยู่ในระดับค่อนข้างสูงด้วย ทำให้ค่า K_o ค่อนข้างต่ำ เป็นผลให้การวัดมีความไวน้อย จากรายงานของ Ekins (1969) ได้รายงานถึงค่า sensitivity ของการวัด และเป็นรายงานอันเดียวที่แสดงถึงค่านี้ มีค่า sensitivity = 65 พิโคกรัมต่อ มล. แต่จากการศึกษาครั้งนี้วัดค่า sensitivity ได้ต่ำสุดถึง 62 พิโคกรัมต่อ มล. ทั้งนี้เพราะได้เลือกใช้โปรตีนอินเตอร์-แอลฟาโกลบูลินจากซีรัมของคนมีครรภ์ ซึ่งสามารถจะเจือจางได้ในอัตราส่วน 1:5 (ซีรัม: buffer) การเจือจางได้มากนี้เป็นการลด activity ของ

non-specific protein เป็นผลทำให้ค่า K_e สูงขึ้น ความไวในการวัดดีขึ้น มีความเที่ยงตรงมากขึ้น

จากรายงานของ Ekins (1969) แสดงค่า sensitivity ในการวัดเมื่อใช้ adsorbent ในการแยก free ออกจาก bound ต่าง ๆ กันคือใช้ anion-exchange resin แยก sensitivity มีค่า 65 พิโคกรัมต่อ มล. ถ้าใช้charcoal แยกมี sensitivity 190 พิโคกรัมต่อ มล. และถ้าใช้ charcoal suspend ด้วย albumin แยกจะมี sensitivity 140 พิโคกรัมต่อ มล. ย่อมจะเห็นว่าการใช้ anion-exchange resin ในการแยก free ออกจาก bound มีผลทำให้ค่าความไวในการวัดดีกว่า charcoal การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ anion-exchange resin ในการแยก และผลที่ได้มีค่า sensitivity ดีกว่าของ Ekins เล็กน้อย คือ 62 พิโคกรัมต่อ มล. เมื่อเปรียบเทียบวิธีทำและเครื่องมือเครื่องใช้ในการศึกษาครั้งนี้กับ Ekins การเขย่าเรซินเพื่อดึง free ออกจาก bound นั้น Ekins ใช้วิธี rotate หลอดทดลองเป็นมุม 360 องศา ทำให้เรซินสามารถจะดูด free จากสารผสมได้ทั่วถึง เป็นที่แน่ใจได้ว่า free ถูกดูดด้วยเรซินหมด แต่การศึกษาครั้งนี้ เครื่องมือที่ใช้เขย่า สามารถเขย่าได้ในแนวราบเท่านั้น โอกาสที่เรซินจะกระจายทั่วหลอดเพื่อดูดส่วน free ก็มีน้อยและอาจจะดูดไว้ไม่หมด ประกอบกับเครื่องมือเครื่องใช้ที่ใช้ศึกษาครั้งนี้ได้พยายามดัดแปลงแก้ไข และต้องใช้ซ้ำในการทดลองแต่ละครั้ง การเปรอะเปื้อนอันเกิดจากกัมมันตภาพรังสีและโปรตีนย่อมอาจจะมีอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ซึ่งในเรื่องนี้ Ekins (1969) ได้รายงานว่าเครื่องมือเครื่องใช้ต้องไม่มีการเปรอะเปื้อน ดังนั้นถ้าเปรียบเทียบผลการศึกษาครั้งนี้กับของ Ekins (1969) มาตรฐานการปฏิบัติจึงอยู่ในระดับที่ต่ำกว่า แต่ผลที่ได้กลับมีความไวสูงกว่า ดังนั้นจึงเป็นที่เชื่อแน่ได้ว่า ถ้าสามารถควบคุมให้การปฏิบัติในห้องทดลองอยู่ในภาวะที่เหมาะสมจริง ๆ ความไวในการวัดจะต้องดีกว่าที่เสนอในรายงานนี้

การวิจัยครั้งนี้นอกจากจะมีความมุ่งหมายที่จะสร้างวิธีวัดธัยรอกซินให้มีความไวสูงยังเป็นการทดลองเพื่อหาแฟคเตอร์ต่างในการปฏิบัติที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับความไวของการวัด และหาความเหมาะสมในการใช้แฟคเตอร์แต่ละอย่างเพื่อควบคุมให้การวัดได้ผลดี

การทดลองจึงต้องทำซ้ำ ๆ กันหลาย ๆ ครั้งเพื่อการแปลผลจะได้เป็นที่แน่นอนพอ ผลการเปลี่ยนแปลงจากแฟคเตอร์ต่าง ๆ ที่เสนอในรายงานนี้ จึงเป็นผลสรุปจากการศึกษาข้อมูลหลาย ๆ ครั้งที่ปฏิบัติดังนี้เพราะข้อมูลในแต่ละหัวข้อที่ศึกษาก็ให้ผลคล้าย ๆ กัน

จากการแปรค่าแฟคเตอร์ต่าง ๆ เพื่อหาอัตราส่วน f ต่อ b จากสารละลายธัยรอกซินมาตรฐาน พบว่าแต่ละแฟคเตอร์ที่ศึกษามีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อกราฟได้การพิจารณาว่าแฟคเตอร์ใดอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมหรืออีกนัยหนึ่งให้ผลที่มีความไวในการวัดสูงสุดใช้หลักการดังนี้

ก. กราฟที่ได้ควรมีอัตราส่วน f ต่อ b ที่เห็นได้ชัดว่าแปรไปทุกค่าสำหรับความเข้มข้นของฮอร์โมนต่าง ๆ กัน และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงที่จำเป็นที่จะต้องใช้วัดฮอร์โมนในซีรัม นับตั้งแต่ปกติ, hyperthyroid และ hypothyroid ซึ่งในกรณีนี้อยู่ในช่วงปริมาณความเข้มข้นต่ำ 0-20 นาโนกรัมต่อ 0.5 มล.

ข. กราฟที่ได้จะต้องมีค่าเบี่ยงเบนทางสถิติน้อย คือค่าที่ได้จาก duplicate มีความแตกต่างน้อยมาก

ค. กราฟที่ได้ควรจะมีความไวในการวัดดี สำหรับความไวตลอดช่วงของการวัดนั้นไม่สามารถจะเท่ากันได้เสมอไป เพราะในการปฏิบัติจริง ๆ ไม่สามารถควบคุมให้ความผิดพลาดจากการทำงานเท่ากันได้ทุกวัน ซึ่งเป็นผลให้ค่าเบี่ยงเบนทางสถิติของแต่ละวันคลาดเคลื่อนกันเล็กน้อย

อีกประการหนึ่ง เมื่อพิจารณาในช่วงต่าง ๆ ของความเข้มข้นแต่ละกราฟมาตรฐานจะพบว่าความไวในการวัดไม่เท่ากันตลอด ทั้งนี้เพราะปริมาณสารที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาของโปรตีนจะมีได้เฉพาะในช่วงแคบ ๆ เท่านั้น จึงจำเป็นจะต้องเลือกพิจารณาว่าต้องการให้มีความไวสูงสุดในช่วงใดของกราฟนั้น กรณีผู้ป่วยด้วยโรคคอพอก การวินิจฉัยทางฮอร์โมนที่มีปริมาณน้อยยากกว่าที่มีปริมาณมาก จึงควรทำให้การวัดมีความไวมากที่สุดในช่วงที่มีค่าต่ำมากที่สุด

จากผลที่ได้เมื่อแปรค่าแฟคเตอร์ต่าง ๆ ขณะอยู่ในสภาวะเดียวกัน ดังเช่นการแปรค่าปริมาณเรซินต่าง ๆ เพื่อใช้แยก free ออกจาก bound หลังจากปฏิกริยาถึงสมดุลย์แล้ว Ekins (1967) ได้กล่าวว่า adsorbent จะมีผลทำให้เกิดแรงที่ทำให้โปรตีนแตกตัวปล่อยจากการจับกับฮอร์โมน ดังนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณเรซินก็จะเพิ่มการแตกตัวมากขึ้น ซึ่งการศึกษานี้จะเห็นว่าเป็นไปตามทฤษฎีดังกล่าวของ Ekins อย่างเห็นได้ชัด

อุณหภูมิเป็นอีกประการหนึ่ง ที่ Ekins (1967) ได้อ้างถึงในการจับตัวระหว่างโปรตีนและฮอร์โมน ถ้าอุณหภูมิสูงก็จะเพิ่มการแตกตัวปล่อยส่วน free หลุดจากฮอร์โมน และถ้าอุณหภูมิไม่สม่ำเสมอ การแตกตัวก็ไม่เป็นไปตามลำดับส่วน จากการศึกษาครั้งนี้ พิสูจน์ให้เห็นว่าอุณหภูมิเป็นแฟคเตอร์สำคัญยิ่งในการวัดปริมาณธัยรอกซินโดยวิธีนี้ ทำให้ผลดีหรือมีการเบี่ยงเบนทางสถิติมากน้อยได้

ประการสุดท้าย เวลาที่ใช้ในการทดลอง คือการอินคิวเบทสาร และการเขย่าสารกับเรซิน Ekins (1969) ได้ศึกษาไว้ว่าปฏิกริยาระหว่างโปรตีนและฮอร์โมนถ้าใช้เวลาในการทำปฏิกริยานานและที่อุณหภูมิต่ำ ปฏิกริยาการจับตัวจะมีมากขึ้นจนถึงสมดุลย์จะคงที่ และถ้าใส่เรซินลงไปเขย่ากับสาร เรซินและการเขย่าเป็นแฟคเตอร์ที่ทำให้เกิดการแตกตัว ดังนั้นถ้ายิ่งใช้เวลาการเขย่ามาก ก็ยิ่งเกิดการแตกตัวมาก จากการศึกษาครั้งนี้ผลที่ได้ให้ผลที่เห็นได้ชัดเป็นการสนับสนุนทฤษฎีนี้

จากผลงานการวัดปริมาณฮอร์โมนจากตัวอย่างเดียวกันในวันเดียวกันและต่างวันของการทดลองครั้งนี้ ถ้าวัดภายในวันเดียวกัน (within assay) วัดปริมาณฮอร์โมนได้ค่าเฉลี่ย = 8.43 ไมโครกรัมเปอร์เซ็นต์ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD.)=2.61% ถ้าวัดต่างวันกัน (between assay) วัดค่าเฉลี่ยได้ = 8.84 ไมโครกรัมเปอร์เซ็นต์ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 7.24 % เมื่อเปรียบเทียบค่าที่ Ekins เคยรายงานไว้ ถ้าวัดในวันเดียวกันได้ค่าเฉลี่ย = 8.64 ไมโครกรัมเปอร์เซ็นต์ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 2.30 % ถ้าวัดต่างวันกันวัดค่าเฉลี่ยได้ = 9.26 ไมโครกรัมเปอร์เซ็นต์ ค่าเบี่ยงมาตรฐาน =8.80 % ซึ่งจะเห็นได้ว่าการศึกษาครั้งนี้มี precision ดี และสูงกว่าที่ Ekins รายงาน

การหาเปอร์เซ็นต์ extraction recovery จากผลการทดลองครั้งนี้จะได้ค่า 74.33 ± 2.31 % จากการทดลองของ Murphy (1965) จะได้ค่าเฉลี่ย 77 ± 4.8 % และจากการทดลองของ Ekins (1969) จะได้ค่าเฉลี่ยเพียง 67.50 ± 0.58% ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการสกัดของ Murphy = 1:2 (ซีรัม : ethanol) ของ Ekins 1:3 และการวิจัยครั้งนี้ใช้ 1:5 จะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์ สกัดได้ถ้าเปรียบเทียบระหว่างผลของ Ekins และการวิจัยครั้งนี้แสดงว่าการเพิ่มปริมาณแอลกอฮอล์ทำให้สกัดได้มากขึ้น ซึ่งก็เป็นไปตามหลักทั่ว ๆ ไป แต่ผลของ Murphy (1965) ไม่สามารถจะหาข้ออธิบายได้เพราะผลไม่มีความสัมพันธ์กับรายงานของ Ekins และการวิจัยครั้งนี้

การหาเปอร์เซ็นต์ recovery เมื่อเติมสารละลายธัยรอกซินมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอนลงไป จากการทดลองครั้งนี้ จะได้ค่าเปอร์เซ็นต์ recovery อยู่ในช่วง 99–111 % ได้ค่าเฉลี่ย 104.68 ±4.69% ผลงานของ Ekins ที่หาเปอร์เซ็นต์ recovery ได้ 99 ± 6% ของ Murphy (1965) ซึ่งวัดเปอร์เซ็นต์ recovery ได้ 103 ± 3% ก็จะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์ recovery ของการศึกษาครั้งนี้และของอีก 2 รายงานที่อ้างถึงอยู่ในระดับใกล้เคียงกัน เป็นการยืนยันว่าการทดลองนี้มี accuracy อยู่ในระดับใกล้เคียงกัน

ถ้าเปรียบเทียบวิธีการทดลองทั้งหมดแล้ว ขณะนี้ถือว่าวิธีการ 'saturation analysis' เป็นวิธีเดียวที่วัดปริมาณธัยรอกซินได้ถูกต้องกว่าวิธีอื่น มีความไวในการวัด และ precision สูง ทำได้สะดวก เร็ว specific สามารถทำได้หลาย ๆ ตัวอย่างพร้อมกัน และใช้ปริมาณซีรัมจำนวนน้อย สะดวกในการเจาะเลือดจากคนไข้ในปริมาณน้อย ซึ่งวิธีการที่เสนอในรายงานนี้ ใช้ปริมาณซีรัมน้อยเพียง 0.2 มล.* ซึ่งน้อยกว่าทุก ๆ รายงานที่เสนอมา (Ekins, 1969; Murphy ; 1965; Tanaka, 1969) เป็นผลให้ช่วยย่นระยะเวลาในการปฏิบัติงานจริง ๆ ขึ้นอีกมาก

สำหรับการศึกษา thyroxine binding globulin capacity (TBG capacity)

---

*ซีรัม 0.2 มล. จะมีปริมาณฮอร์โมนอยู่ในระหว่าง 0–25 นาโนกรัมต่อ 0.5 มล.

ได้ดัดแปลงแก้ไขวิธี electrophoresis ธรรมดาเพื่อวัด TBG capacity โดย Robbins (1956) ซึ่งใช้ paper electrophoresis แบบ reverse flow คือเติม T_4 กัมมันตภาพ (T_4^*) ลงในซีรัมคนปกติ จนกระทั่งมีความเข้มข้น 1.06 ไมโครกรัมต่อ มล. ขีดบนกระดาษด้วยปริมาณ 5 ไมโครลิตร ทำการทดลองหาปริมาณธัยรอกซินในแถบอินเตอร์-แอลฟา-โกลบูลิน การทำ electrophoresis โดยวิธีนี้ปริมาณกัมมันตภาพรังสีจะไปปรากฏในแถบอัลบูมินมีพื้นที่ 16.9 ตาราง ซม. และในแถบของอินเตอร์-แอลฟา-โกลบูลิน =12.5 ตาราง ซม. เมื่อคำนวณจะพบว่ามี TBG capacity = 0.45 ไมโครกรัมต่อ มล.

Berger และคณะ (1962) ได้ใช้วิธี sepraphore eletrophoresis แทนกระดาษ สามารถแยกโปรตีนได้ชัดทุกแถบ แต่ต้องเติมซีรัมที่มี T_4^* ความเข้มข้น 0.1ไมโครกรัมต่อ มล. กัมมันตภาพจะไปปรากฏในแถบอินเตอร์-แอลฟา-โกลบูลิน ซึ่งเป็น TBG มากและที่อัลบูมินน้อย แต่ถ้าเติม 0.48 ไมโครกรัมต่อ มล.กัมมันตภาพของ T_4^* จะไปปรากฏที่อัลบูมินมากกว่าอินเตอร์-แอลฟา-โกลบูลิน

Robbins (1956) ใช้วิธี paper electrophoresis แบบ reverse flow ใน barbital buffer pH 8.6 ทำในซีรัมคนปกติ วัด TBG capacity ได้อยู่ในช่วง 0.16-0.25 ไมโครกรัมต่อ มล.ซึ่งจะเห็นว่ามีค่าต่ำกว่าการศึกษาครั้งนี้ ผลการศึกษาครั้งนี้มีค่าสูงในคนปกติอาจจะมีสาเหตุ 2 ประการคือ ปริมาณ TBG capacity ในคนไทยสูงเองหรือการแยกบริเวณอัลบูมินและอินเตอร์-แอลฟา-โกลบูลิน ไม่ชัดเจน มีส่วนเกยกันอยู่ เครื่องมือที่ใช้ในการปฏิบัติงานครั้งนี้มีขนาดเล็กระยะทางที่โปรตีนวิ่งบนกระดาษสั้นเกินไป จึงทำให้มีค่าคลาดเคลื่อนได้มาก ในที่นี้ไม่สามารถจะพิสูจน์ได้แน่นอนเนื่องจากไม่มีเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพดีกว่านี้สำหรับการทดลองต่อ

สำหรับเรื่องที่อาจจะทำการวิจัยต่อไป คือ หาเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพดีเพื่อเป็นการกำจัดความผิดพลาดในการแยกอัลบูมินและอินเตอร์-แอลฟา-โกลบูลิน ออกจากกันซึ่งจะเป็นผลให้สามารถบอกได้ว่า TBG capacity ในคนไทยมีค่าสูงแน่หรือไม่

และควรจะได้ศึกษาต่อไปด้วยว่า TBG capacity ในหญิงหรือชาย, หญิงปกติและหญิงมีครรภ์, คนเป็น hypothyroid และ hyperthyroid หรือคนเป็นโรคเกี่ยว

กับชัยรอยด์มาแต่กำเนิดว่ามีค่าเท่าใด

ในคนที่เป็นโรค hyperthyroid นั้น ได้มีผู้ศึกษาบ้างแล้วในต่างประเทศเช่น Harvey (1969) พบว่าอินเตอร์-แอลฟา- โกลบูลิน มีความสามารถในการจับชัยรอกซินต่ำ จึงควรจะได้มีการศึกษาต่อไปว่า ปริมาณอินเตอร์-แอลฟา- โกลบูลิน มีความสามารถในการจับฮอร์โมนต่ำหรือไม่ในผู้ป่วยคนไทย และต่ำมากน้อยเท่าใด

และในปัจจุบันการใช้ยาเม็ดคุมกำเนิดเป็นที่แพร่หลายมาก เป็นที่รู้กันว่ายาประเภทนี้ให้ผลเปลี่ยนแปลงต่อปริมาณโปรตีนในร่างกาย ซึ่งจะเป็นผลต่อปริมาณ TBG ในซีรัมด้วย จึงควรจะได้มีการศึกษาในเรื่องนี้ด้วย นอกจากนี้ควรจะศึกษาปริมาณชัยรอกซินควบไปด้วยเพราะจำเป็นต้องใช้ค่าทั้งสองอย่างนี้ในการประเมินผลที่แน่นอน

ผู้ทดลองยังเห็นควรว่าควรจะได้หา sensitivity และ precision ของการทดลองนี้สำหรับแฟคเตอร์ต่าง ๆ ที่มีผลต่อการจับโปรตีนกับฮอร์โมนเมื่อใช้ charcoal เป็น adsorbent เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาการเลือกใช้ adsorbent ในการแยก เพราะ charcoal เป็นสารที่ใช้แยกสะดวก ในการปฏิบัติงานสามารถตวงปริมาตรได้อย่างรวดเร็วมาก และเปลืองค่าใช้จ่ายน้อย ทั้งนี้ควรจะต้องพิจารณาค่า sensitivity ของการวัดด้วย ถ้าอยู่ในระดับที่ไม่สูงกว่าการแยกด้วยเรซินมากนัก ก็น่าจะมีประโยชน์ในการปฏิบัติงาน