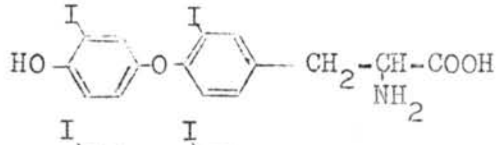
บทนำ

1.1 เรื่องราวของต่อมธัยรอยด์ทั่ว ๆ ไป

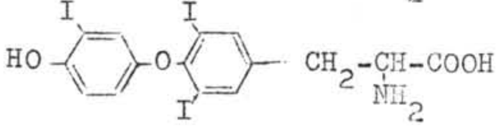
ต่อมธัยรอยด์เป็นต่อมไม่มีท่อขนาดใหญ่ ประกอบด้วยสองกลีบตั้งอยู่สองข้างของหลอดลม ข้างหน้าลูกกระเดือกหรือกระดูกอ่อน ต่อมทั้งสองข้างนี้จะเชื่อมกันเป็นคอคอด(isthmus) ต่อมธัยรอยด์ในผู้ใหญ่นับเป็นต่อมไร้ท่อที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในร่างกาย ต่อมธัยรอยด์นี้ถ้าดูจากกล้องจุลทรรศน์จะประกอบด้วย follicle หรือ acini อยู่รวมกัน มีเยื่อบาง ๆ กั้นอยู่แต่ละ follicle ประกอบด้วย acinar cell ซึ่งทำหน้าที่เป็นต่อมซึ่งผิดกับต่อมอื่น ๆ คือเมื่อสร้างฮอร์โมนขึ้นแล้วจะไม่เก็บฮอร์โมนไว้ในเซล แต่เก็บไว้ใน follicular cavity ฮอร์โมนซึ่งเก็บไว้ใน follicle นี้มีลักษณะเหนียวข้นเป็นคอลลอยด์ (colloid) ซึ่งส่วนใหญ่เป็น peptide chain ของธัยโรโกลบูลิน

Roche และ Michel (1951) ; Robbins และ Rall (1960)และ Rall, Robbins และ Edelhoch (1960) ได้พยายามแยกธัยโรโกลบูลิน ออกมาศึกษาพบว่าเป็นโมเลกุลใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลถึง 650,000. amino acid ที่มีอยู่ในโปรตีนนี้ ส่วนใหญ่เป็น iodo-amino acid, iodo-amino acid ที่สำคัญมี 2 พวกคือ ไอโอโดธัยโรนีนและไอโอโดทัยโรซีน

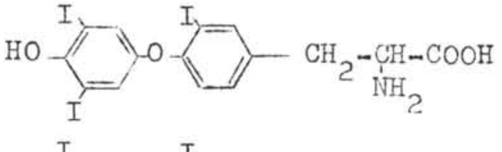
ไอโอโดธัยโรนีน มี 4 ตัวที่สำคัญ ดังสูตรต่อไป



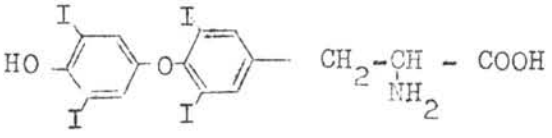
3,3', di-iodothyronine (T_2)



3,5,3',tri-iodothyronine (T_3)

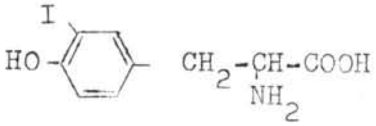


3,3',5', tri-iodothyronine

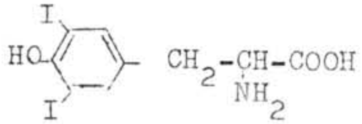


thyroxine (T_4)

ไอโอโดทัยโรซินเป็นส่วนประกอบของธัยโรโกลบูลินที่สำคัญรองลงมาจากไอโอโดธัยโรนีน คือ



3 mono-iodotyrosine (MIT)



3,5 di-iotyrosine (DIT)

Pitt - River และ Tata (1960) ศึกษาเกี่ยวกับ iodinated amino acid ในต่อมธัยรอยด์นั้น ในภาวะปกติไม่พบ MIT และ DIT และยังไม่ทราบแน่ว่ามี biological activity อย่างไร พวกที่ทราบแน่นอนว่ามี biological activity คือ T_3 และ T_4 และจะอยู่ในร่างกายในรูปของ L-form ไตรไอโอโดธัยโรนีนที่พบ 2 ตัวนั้น T_3 จะมีปฏิกริยาต่อร่างกายมากกว่า 3,3,5 tri-iodothyronine หรือ T_4 ถ้าเทียบ biological activity ของ T_4 เป็น 100 T_3 จะมี biological activity 500-1,000(คือเป็น 10 เท่า) และ 3,3,5 tri-iodothyronine จะมี biological activity=5 เมื่อเทียบกันตามน้ำหนัก ดังนั้นจะเห็นว่าธัยรอยด์ฮอร์โมนที่สำคัญเป็นพวก T_3 และ T_4

ธัยรอยด์ฮอร์โมนมีความสำคัญต่อร่างกายตั้งแต่เกิดจนตลอดชีวิตเพราะทำหน้าที่สัมพันธ์กับการทำงานต่าง ๆ ในร่างกาย

Barker (1951) ได้ศึกษาพบว่า ธัยรอยด์ฮอร์โมนจะเป็นตัวกระตุ้นการออกซิไดซ์ของเซลที่มีชีวิต เพิ่มการใช้ออกซิเจน และพบว่าถ้าตัดต่อมธัยรอยด์ทิ้ง ค่า basal metabolic rate (BMR) เมื่อวัดในภาวะที่หยุดพักและอดอาหารจะลดต่ำลงไป 40 % ดังนั้นปริมาณที่ลดลงนี้ขึ้นอยู่กับธัยรอยด์ฮอร์โมนนั่นเอง

Gemmill (1952) เชื่อว่าธัยรอยด์ฮอร์โมนทำหน้าที่ภายในเซลเท่ากับเป็น respiratory enzyme และมีผลต่อความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่าง ๆ ด้วย

Gordon (1944) ได้ศึกษาใน tissue slice ของหนูที่อวัยวะต่าง ๆ กัน พบว่าถ้านำ tissue slice ของตับ,ไต,กะบังลมมาใส่ธัยรอกซินจะเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนขึ้น แต่จะไม่มีผลต่ออวัยวะตรงข้าม,มันสมอง และ testis

แต่ในทางตรงกันข้าม Wiswell, Ziegler, Fassano และ Asper (1954) ได้ทดลอง **in vitro** โดยเติมธัยรอกซิน (T_4) และ tri-iodothyronine (T_3) ใน liver slice และ diaphram slice จะไม่มีการเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจน

Wiswell (1955) ยังพบว่า ถ้าเติม T_4 หรือ T_3 ลงใน medium ที่มีหัวใจบดละเอียด และ succinate (ใช้เป็น substrate) จะมีการเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจน

ในปี 1953 Andrus ได้ศึกษาธัยรอยด์ฮอร์โมนพบว่ามีอิทธิพลต่อการเต้นของหัวใจ, stroke volume และ cardiac out put เนื่องจากเซลหัวใจทำงานมากกว่าปกติในคนที่เป็น hyperthyroid และจะทำงานน้อยในคนที่เป็น hypothyroid

Altschule และ Volk (1935) ศึกษาพบว่าธัยรอยด์ฮอร์โมนมีผลต่อ pulse pressure ด้วย ในคนที่เป็น hyperthyroid, systolic pressure จะเพิ่ม และ diastolic pressure จะลด ทำให้ช่วงของ pulse pressure กว้างเรียกว่าเป็น 'water-hammer' pulse ส่วนใน คนที่เป็น hypothyroid, systolic pressure จะค่อย ๆ ลดและ diastolic pressure จะสูง จะพบว่าในเด็กที่เป็น hypothyroid มีค่า 90/78 ม.ม.ปรอท ซึ่งผิดปกติ

Blumgart, Gargill และ Gilligan (1933) ศึกษาธัยรอยด์ฮอร์โมนที่มีผลเกี่ยวกับเวลาการหมุนเวียนของโลหิต พบว่าในคน hyperthyroid จะใช้เวลาเร็วกว่าปกติและจะช้าในคน hypothyroid เฉพาะอย่างยิ่ง ถ้าขาดธัยรอยด์ฮอร์โมนจะเป็นเหตุให้การไหลของโลหิตลดลง และเกิดโลหิตที่คั่งที่เส้นโลหิตฝอยตามผิวหนังทำให้ผิวซีด,คล้ำเป็นจ้ำ ๆ ดวง ๆ และเย็นจัดในบริเวณนั้น แต่จะมีอาการตรงข้ามในคน hyperthyroid

Fleichman (1942) ได้ศึกษาในหนูที่เป็น hypothyroid พบว่าระดับโคเลสเตอรอลในซีรัมจะเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นเพราะไขมันใน depot fat จะถูกดึงมาใช้ทำให้ปริมาณในเลือดเพิ่มขึ้น

Roseman, Byers และ Freidman (1952) ยังได้ศึกษาการสังเคราะห์และการทำลายของ tritium-tagged cholesterol ในหนู พบว่าในหนูที่เป็นhypothyroid จะลดอัตราการสลายและการขับถ่าย cholesterol ในลำไส้เล็ก

ในปี 1925 Boothby, Sandiford และ Slossy ได้ศึกษาในคนที่เป็น hyperthyroid อย่างแรง ร่างกายจะมี negative nitrogen balance ยกเว้นถ้ารับประทานอาหารที่ให้พลังงานสูงมากพอชดเชยความต้องการของร่างกายได้ และในคนที่เป็น hypothyroid มานาน จะมีการสะสม mucoprotein ที่มี hyaluronic acid อยู่ใน extracellular fluid

Johnston และ Maroney (1939) ศึกษาพบในคนที่เป็น hypothyroid เมื่อรักษาด้วยฮัยรอยด์ฮอร์โมน ทีแรกจะมี negative nitrogen balance และบางที่จะศูนย์เสีย mucoprotein ที่เคยสะสมไว้ด้วย แต่ต่อมาจะเกิดการสมดุลย์ของโปรตีนแล้วจะกลายเป็น positive nitrogen balance ซึ่งเนื่องจากการสร้างโปรตีน และผลจากการกระตุ้นการเจริญเติบโตของร่างกายจากธัยรอยด์ฮอร์โมนนั่นเอง

ธัยรอกซินไม่มีบทบาทโดยตรงต่อการเผาผลาญของคาร์โบไฮเดรต แต่มีผลต่อการดูดซึมของกลูโคส, กาแลคโทส และน้ำตาลอื่น ๆ ที่ลำไส้ Wilkin (1957) ได้สรุปอีกด้วยว่าธัยรอกซินยังมีผลต่อการใช้คาร์โบไฮเดรตของร่างกาย คือจะเพิ่ม glycogenolysis gluconeogenesis และเพิ่มการใช้กลูโคสของเนื้อเยื่อ

Darrow (1944) ศึกษาในคนเป็น hypothyroid จะพบว่ามีน้ำอยู่ใน extracellular compartment เป็น myxedematous fluid ซึ่งมีปริมาณโปรตีนสูง ปริมาตรของพลาสม่าลด แต่ความเข้มข้นของโปรตีนในพลาสม่าสูงขึ้น แต่ในคนที่เป็นhyperthyroid จะมีลักษณะตรงกันข้าม ถ้าในคนที่เป็น hypothyroid ได้รับการรักษาด้วยธัยรอยด์ฮอร์โมน จะมีการศูนย์เสีย myxedematous fluid ในขณะเดียวกันจะเกิดโซเดียม diuresis ด้วย

Soffer, Jonnaccone, Weiner, Griboff และ Eisenberg (1954) ได้ศึกษาbody fluid และการสมดุลย์ของอีเล็คโตรไลท์ในคนที่เป็น myxedema* พบว่าในคนที่เป็น hyperthyroid อย่างแรงจะเพิ่มการขับถ่ายแคลเซี่ยมในปัสสาวะและอุจจาระพร้อม ๆ กับถูกดึงแคลเซี่ยมจากกระดูกไปด้วย ยกเว้นแต่ว่าจะมีการเพิ่มชดเชยแคลเซี่ยมจนพอแก่ความต้องการของร่างกายในขณะนั้น สำหรับเด็กที่เป็น hypothyroid นั้น ถ้าฉีดธัยรอยด์ฮอร์โมน การสะสมแคลเซี่ยมในร่างกายเพื่อทำให้กระดูกเจริญเติบโตนั้นยังคงอยู่ แต่เอนไซม์ฟอสฟาเตสในซีรัมจะมีปริมาณต่ำในคนเป็น hypothyroid และจะยังไม่เพิ่มในขณะที่รับการรักษาด้วยธัยรอยด์ฮอร์โมน

Gudernatsch (1913) ได้แสดงให้เห็นว่าธัยรอยด์มีผลต่อการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของลูกกบ โดยการตัดต่อมธัยรอยด์ของสัตว์ตัวอ่อน ๆ หลาย ๆ ชนิด พบว่าถ้าไม่มีธัยรอยด์ฮอร์โมนจะไม่เจริญเติบโตตามปกติ

Wilkin (1938) ได้ศึกษาพบว่าถ้าเด็กเล็กมาก ๆ เป็น hypothyroid ไม่ใช่แต่เด็กจะเจริญเติบโตช้า แต่จะถูกหน่วงเหนี่ยวการพัฒนาอัตราส่วนของโครงกระดูก, facial contour หรือการเจริญของกระดูกตรงส่วนบน และฟันที่จะเกิดใหม่ การหน่วงเหนี่ยวการพัฒนาสิ่งเหล่านี้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (metamorphism)

Wilkin (1941) ยังกล่าวว่า เรื่องธัยรอยด์ฮอร์โมนที่มีผลต่อการเกิดของกระดูกอ่อนนั้น เป็นเรื่องที่น่าสนใจ เพราะเขาพบว่าคนที่เป็น hypothyroid การเจริญเติบโตของกระดูกอ่อนจะถูกหน่วงเหนี่ยวและทำให้กระดูกอ่อนถูกเปลี่ยนแปลงไป ปรากฏว่าเอ็นไซม์ในระบบการเจริญเติบโตของกระดูกอ่อนต้องอาศัยธัยรอยด์ฮอร์โมนด้วย

Wilkin (1938) ยังศึกษาพบว่า ธัยรอยด์ฮอร์โมนมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาของระบบประสาทอย่างยิ่ง พบว่าถ้าเอาลิงมาตัดเอาต่อมธัยรอยด์ออกทันที หลังจากที่เกิดใหม่ ๆ การเจริญเติบโตและการพัฒนาทางสมองจะเริ่มลดลงทันที เนื่องจากสมองของทารกในครรภ์

---

*myxedema คือ สภาพที่เกิดจากผลการขาดธัยรอยด์ฮอร์โมนของร่างกายในขั้นร้ายแรง

จะเจริญเติบโตและพัฒนาเร็วมาก จนถึงเดือนแรกหรือปีแรกหลังจากเกิด ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่คนที่เป็น cretinism* แต่กำเนิด ควรต้องรีบรับการตรวจและรักษาโดยเร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้ ถ้าเด็กมาขาดฮอร์โมนเมื่อโตแล้ว และเมื่อสมองเจริญเต็มที่แล้ว ก็จะไม่เกิดผิดปกติหรือถูกทำลายสมองด้วย แต่ก็ทำให้ปฏิกริยาของสมองและความสามารถในการพัฒนาสมองเชื่องช้าไป เด็กที่เป็น cretinism อย่างรุนแรง ถ้าได้รับการรักษาช้าไปกว่า 6 หรือ 12เดือน การเจริญเติบโตของเซลประสาทและเนื้อสมองไม่สมบูรณ์ อาจเกิดโรคปัญญาอ่อนได้

Clausen และ Mc.Coord (1938) ศึกษาพบว่า ถ้าขาดธัยรอกซินทำให้ไม่สามารถจะเปลี่ยน carotene เป็นวิตามิน A. ได้ ทำให้มี carotene เพิ่มจำนวนขึ้นในพลาสมา และเนื้อหนังของเด็กที่เป็น hypothyroid ทำให้ผิวเป็นสีเหลือง และวิตามิน A ไป antagonize ธัยรอยด์ฮอร์โมนที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของลูกกบ

Sure และ Thesis (1939) ได้พบว่า ถ้ามีธัยรอกซินมากในร่างกายจะทำให้ร่างกายต้องการวิตามิน C และ B complex

Drill (1943) ศึกษาในเด็ก hypothyroid 3 คน จะมีปริมาณแคลเซี่ยมสูงทั้ง ๆ ที่ปริมาณฟอสฟอรัสไม่เพิ่ม และสามารถแสดงให้เห็นได้ว่า ปริมาณวิตามิน D ในเลือดจะเพิ่มมากทั้ง ๆ ที่ปริมาณที่กินปกติ

Tierney (1943) ได้ศึกษาพบว่า ถ้าให้อาหารที่ไม่มี creatine จะทำให้การขับถ่าย creatine ทางปัสสาวะสูงขึ้นใน hyperthyroidismและน้อยหรือไม่มีเลยใน hypothyroidism ทำให้เหมือนว่าร่างกายเก็บ creatine ไว้มากใน hypothyroidism

Wilkin (1957) ได้รวบรวมสรุปหน้าที่ที่สำคัญ ๆ ของธัยรอยด์ฮอร์โมนไว้ดังต่อไปนี้ คือ

ก. เพิ่มการใช้ออกซิเจนของเซลที่มีชีวิต

ข. ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระบบการหมุนเวียนโลหิต,,ความดันโลหิต และ pulse pressure

ค. fat metabolism พบว่า ใน hypothyroidism โซเลสรอลในเลือด

---

* cretinism คือ สภาพที่เกิดจากผลการขาดธัยรอยด์ฮอร์โมนมาแต่กำเนิด

จะเพิ่มขึ้น ใน hyperthyroidism จะลดลง

ง. protein metabolism ถ้าธัยรอกซินในเลือดสูง ร่างกายจะมี negative nitrogen balance

จ. carbohydrate metabolism ธัยรอกซินมีผลต่ออัตราการดูดซึมของน้ำตาลต่าง ๆ ถ้าขาดธัยรอกซิน อัตราการดูดซึมลดน้อยลง อัตรา glycogenolysis, gluconeogenesis และการใช้กลูโกสที่เนื้อเยื่อจะลดลงด้วย

ฉ. น้ำและอีเล็คโตรไลท์ ถ้าธัยรอกซินต่ำ แคลเซี่ยมในเลือดจะเพิ่มโดยที่ฟอสฟอรัสไม่เปลี่ยน และจะมีน้ำขังอยู่ใน extracellular compartment

ช. ระบบประสาท ถ้าธัยรอกซินน้อยในเด็กเกิดใหม่ การเจริญเติบโตของเซลประสาทและเนื้อสมองจะไม่สมบูรณ์ เกิดโรคปัญญาอ่อนได้

ซ. กระดูก ถ้าขาดธัยรอกซิน จะทำให้การพัฒนาโครงร่าง หรือกระดูกถูกเปลี่ยนแปลงไป ทำให้รูปร่างเปลี่ยนแปลง เรียกว่า metamorphism

ฌ. วิตามิน ธัยรอยด์ฮอร์โมน เกี่ยวข้องกับวิตามิน A, B_{12}, C และ D

ญ. creatine-creatinine metabolism ถ้าอาหารไม่มี creatine จะทำให้การขับถ่าย creatine ทางปัสสาวะ สูงขึ้นใน hyperthyroidism และน้อยหรือไม่มีเลยใน hypothyroidism ทำให้เหมือนว่าร่างกายเก็บ creatine ไว้มากใน hypothyroidism

ฎ. ธัยรอยด์ฮอร์โมน มีความสัมพันธ์กับการทำงานของต่อมไม่มีท่ออื่น ๆ อีกหลายต่อม แต่กลไกของปฎิกริยายังไม่ทราบแน่นอน

ดังนั้น ถ้าต่อมธัยรอยด์ทำหน้าที่ผิดปกติไป จะทำให้เกิดผลกระทบกระเทือนต่อการทำหน้าที่ของอวัยวะส่วนอื่นของร่างกายด้วย

Pitt- River (1959) พบว่า ต่อมธัยรอยด์ต่างจากต่อมไม่มีท่ออื่น ๆ คือ ฮอร์โมนในคอลลอยด์และในเลือดเป็นคนละรูป ในคอลลอยด์นั้นเป็น peptide chain ของธัยโรโกลบูลิน ส่วนในเลือดจะจับกับโปรตีนอินเตอร์-แอลฟา-โกลบูลิน โดย non covalent linkage

Osorio (1967) และ Oppenheimer (1968) ได้ตั้งข้อสังเกตว่าภาวะการทำงานของต่อมธัยรอยด์ในร่างกายนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณธัยรอกซินอิสระ ส่วนที่ยังไม่ได้จับกับโปรตีน และกำลังจะถูกส่งเข้าเส้นเลือด เพื่อจะผ่าน cell membrane เข้าสู่บริเวณส่วนที่จะมีการเผาผลาญซึ่งปริมาณนี้น้อยมาก และการวัดปริมาณธัยรอกซินอิสระนี้ยากมาก

หอสมุดกลาง

1.2 การศึกษาความผิดปกติของธัยรอยด์

การศึกษาความผิดปกติของธัยรอยด์นั้นจำเป็นต้องศึกษาภาวะการทำงานของต่อมธัยรอยด์ (thyroid status) อย่างละเอียด

เริ่มแรกการศึกษา ภาวะการทำงานของธัยรอยด์นั้นใช้วัด basal metabolic rate (BMR) ของร่างกายในทางปฏิบัติ ค่าที่ได้เชื่อถือไม่ค่อยได้ และยังเป็นวิธีที่ ยากจะควบคุมให้ผลเที่ยงตรงได้

Somogyi (1930) ได้เริ่มวัด protein-bound-iodine (PBI) โดยใช้สังกะสีไฮดรอกไซด์ในการตกตะกอน protein-bound-iodine ทั้งหมด ดังนั้น สารประกอบไอโอดีนทุกชนิดที่จับโปรตีนนี้ก็จะตกตะกอนออกมาด้วย รวมทั้งสารประกอบไอโอดีนจากยาที่รับประทานด้วย

Man และคณะ (1942) และ Bruger และคณะ (1943) ได้ใช้วิธีของSomogyi ในการวัดหาปริมาณธัยรอกซินจากซีรัม เมื่อตกตะกอนด้วยสังกะสีไฮดรอกไซด์แล้วล้างด้วยกรด วิธีนี้จะได้ T_4 ถึง 90 % และ di-iodotyrosine ถึง 80 %

Chaikoff, Taurog และ Reinhardt (1947) ได้ดัดแปลงวิธีโดยใช้ trichloroacetic acid ในการตกตะกอนโปรตีนที่จับกับสารประกอบไอโอดีน (PBI) แล้วล้างตะกอนด้วย trichloroacetic acid ความเข้มข้น 5 % หรือ 10 % แต่ T_3 จะถูกล้างออกไป ดังนั้นตะกอนควรจะล้างด้วยด่าง

Robbins (1954) ใช้ phosphate buffer ในการตกตะกอน PBI แต่ผลที่ได้ไม่ใช่โปรตีนที่จับธัยรอกซินอย่างเดียว แต่รวมทั้งสารประกอบไอโอดีนตัวอื่นด้วย คือ รวมทั้ง iodoprotein ตัวอื่น ๆ ด้วย

ในปี 1932 Leland และ Foster และปี 1939 Trevorrow ได้ใช้วิธี butanol - extractable - iodine (BEI) Leland และ Foster แยกสารประกอบไอโอดีนจาก thyroid hydrolysate แต่ Trevorrow แยกจากเลือด แต่วิธีโดยทั่วไปเหมือนกันคือ เอาซีรัมมาสกัดด้วย n-butanol แล้วเอาชั้น butanol ไปสกัดด้วย 2 N. โซเดียมไฮดรอกไซด์

และในปี 1933 นั้น Blau ก็ใช้ซีรัมสกัดด้วย n-butanol แล้วเอาชั้นของ butanol phase สกัดด้วย 4 N. โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่มีโซเดียมคาร์บอเนต 5 % โดยวิธีนี้ T_3 และ T_4 จะอยู่ในส่วนของสารละลายอินทรีย์ (n-butanol) และ iodoprotein, iodotyrosine และ iodide จะอยู่ในชั้น aqueous phase และการทดลองจะได้ผลดีถ้าก่อนสกัดทำซีรัมให้เป็นกรดมี pH = 2 ถึง 4 ด้วยกรดเกลือหรือกรดกำมะถันเสียก่อน

Robbin (1956) ใช้วิธีแยกโดยถือหลักว่า T_4 ไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม คือใส่คลอโรฟอร์ม 3 ส่วนลงในสารละลายของธัยรอกซินใน n-butanol แล้วใช้สารละลายด่าง เช่น แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ไปสกัดธัยรอกซินออกมาได้ วิธีนี้ใช้แยกธัยรอกซินกัมมันตภาพรังสีจาก chloroform soluble contaminant และเป็นวิธีที่ดีในการแยกธัยรอกซินและ iodo-amino acid อื่น ๆ จาก blood lipid

Tong, Taurog และ Chaikoff (1952) ใช้วิธี chromatogram คือทำ partition chromatography โดยใช้สารตัวอย่างเพียงเล็กน้อย เมื่อทำ chromatogram, iodo-protein ที่ไม่ต้องการตรวจหาจะอยู่ที่เดิม ส่วน iodo-amino acid ตัวอื่น ๆ ก็จะเคลื่อนที่ วิธีนี้จะต้องใช้ iodocompound ที่มีกัมมันตภาพรังสีที่มี activity แรงเติมลงไปด้วย จึงจะได้ผลดี

Sterling และ Brunner (1966) ได้ใช้วิธีเติมธัยรอกซินกัมมันตภาพรังสีในสารตัวอย่าง (sample) แล้วใช้แมกนีเซียมซัลเฟตในการตกตะกอน โดยวิธีนี้จะวัดกัมมันตภาพรังสีจากธัยรอกซินที่ตกตะกอนมาโดยเฉพาะ ผลที่ได้จึงดีกว่าวิธีอื่น และวิธีนี้ยังหลีกเลี่ยงข้อผิดพลาดอันเกิดจากการเปรอะเปื้อนกัมมันตภาพจากธัยรอกซินกัมมันตภาพรังสีตอนที่ทำการไดอะไลซ์ วิธีนี้จะวัดได้เฉพาะกัมมันตภาพของธัยรอกซินอิสระเท่านั้น แต่วิธีนี้ไม่ค่อยแพร่หลายในงานประจำวันทางการแพทย์

ต่อมา Ekins (1960) มีวิธีวัดธัยรอกซินเป็นปริมาณธัยรอกซินทั้งหมด (คือทั้งฮอร์โมนอิสระและทั้งที่รวมอยู่กับโปรตีน) โดยถือว่าความเข้มข้นของธัยรอกซินอิสระนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโปรตีนที่จับธัยรอกซินเท่า ๆ กับปริมาณธัยรอกซินทั้งหมด (ทั้งที่อิสระและรวมอยู่กับโปรตีน) ดังนั้น ถ้าวัดปริมาณธัยรอกซินทั้งหมดได้ก็สามารถจะบอกภาวะการทำงานของต่อมธัยรอยด์ได้เช่นกัน Ekins ได้ทำการวัดปริมาณธัยรอกซินโดยวิธี electrophoresis ที่ pH=8.6 โดยหาปริมาณธัยรอกซินที่จับกับโปรตีน (thyroxine - binding protein, TBP) ในซีรัมคือระหว่าง α_1 และ α_2 โกลบุลิน โดยเติมธัยรอกซินกัมมันตภาพรังสีลงในพลาสมา สกัดฮอร์โมนด้วย n-butanol ที่ pH เป็นกรด ทำให้แห้งแล้วเติมซีรัมคนปกติ การทดลองทำควบคู่ไปกับฮอร์โมนมาตรฐาน แล้วนำไปทำ electrophoresis วัดการกระจายของกัมมันตภาพรังสีซึ่งจะมีอยู่ในแถบของอัลบูมินและแถบของ thyroxine - binding protein (TBP) ซึ่งจะสามารถคำนวณหาปริมาณธัยรอกซินในพลาสมาได้

ในปี 1963 Ekins ได้เปลี่ยนวิธีวัดธัยรอกซิน มาใช้วิธี 'saturation analysis' เป็นการวัดปริมาณธัยรอกซินทั้งหมด และเป็นวิธีที่ง่าย มีความเที่ยงตรง และใช้ได้โดยตรงกับฮอร์โมนชนิดนี้ ยิ่งกว่านั้นคือสามารถจะวัดได้พร้อม ๆ กันหลาย ๆ ตัวอย่างโดยไม่เปลืองเวลา เขาใช้วิธีทางสถิติหาช่วงปริมาณธัยรอกซินทั้งหมดของคนปกติไว้ และเมื่อวัดปริมาณธัยรอกซินของคนไข้ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่าในช่วงของคนปกติ ก็สามารถจะบอกภาวะการทำงานของคนไข้ได้ วิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมมาก ที่จะใช้ในงานประจำวันทางการแพทย์ และการศึกษางานครั้งนี้ ผู้เขียนก็ได้ใช้หลัก 'saturation analysis' ของ Ekins มาใช้ในการวัดปริมาณธัยรอกซินเช่นกัน

ในปี 1965 Murphy ได้นำวิธี Competitive protein-binding มาใช้ในการวัดปริมาณธัยรอกซิน โดยใช้ anion-exchange resin และธัยรอกซินกัมมันตภาพรังสี การทดลองแบ่งเป็น 2 ตอนใหญ่ ๆ คือ

1. เอาโปรตีนออก

ก. ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอลกอฮอล์ ธัยรอกซินจะอยู่ใน supernatant

ข. ระเหยสารละลายให้แห้ง

2. วัดปริมาณธัยรอกซิน

ก. เติมธัยรอกซินกัมมันตภาพรังสี และ specific protein (thyroxine-binding globulin) ลงในธัยรอกซินที่สกัดได้ ตั้งทิ้งให้สมดุลย์ที่อุณหภูมิ 10° ซ.

ข. แยกส่วน protein-bound

ค. คำนวณเปอร์เซ็นต์ธัยรอกซินกัมมันตภาพในส่วนของ protein bound

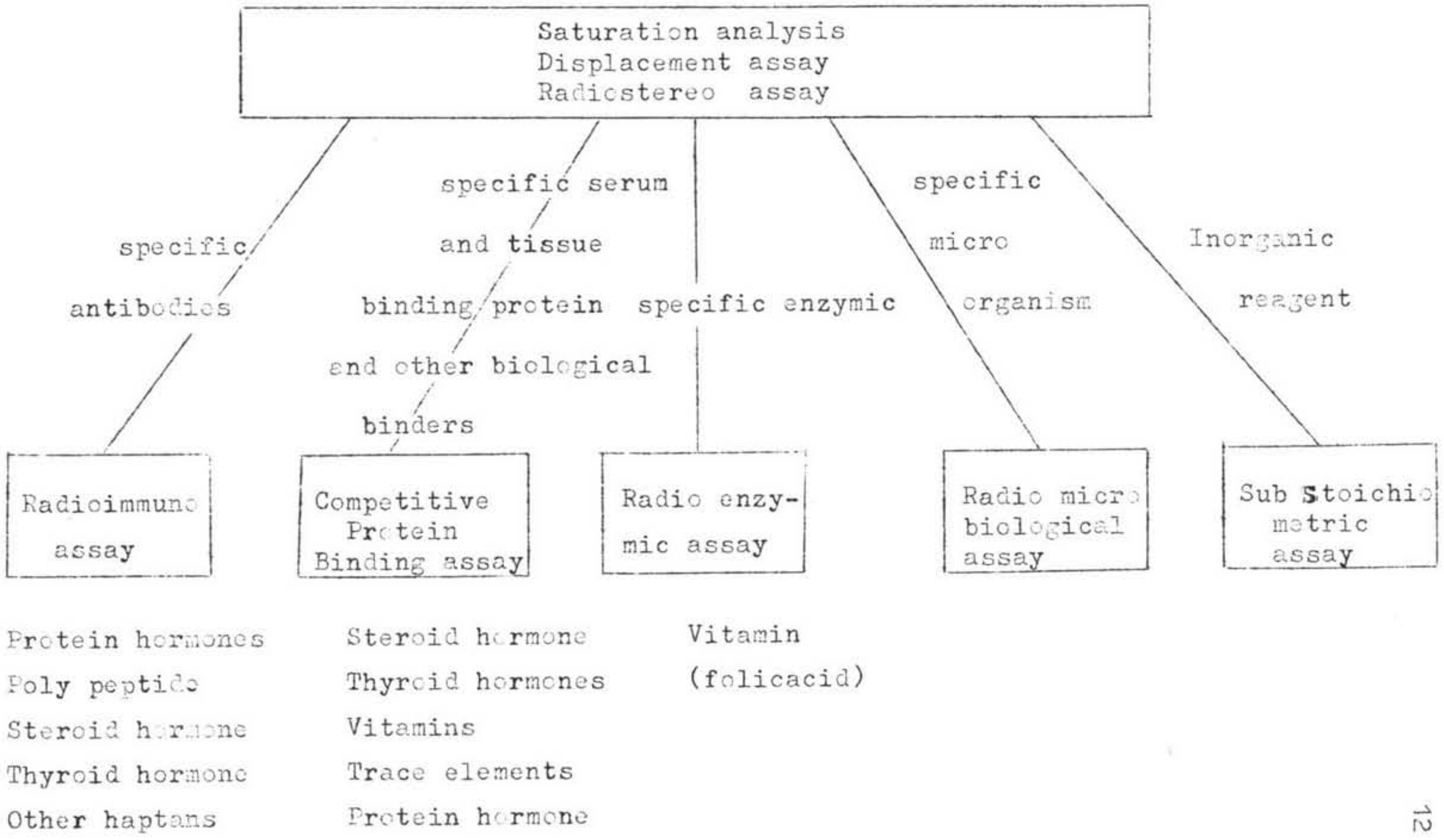
Ekins (1967) ได้ศึกษาวิธีวัดปริมาณธัยรอกซินต่าง ๆ กัน และได้อธิบายว่าวิธีการวัดปริมาณธัยรอกซิน หรือปริมาณฮอร์โมนใดก็ตาม โดยวิธี 'competitive protein-binding' Murphy (1965) หรือ 'displacement analysis' โดย Robbins และ Rall (1967) หรือ 'radiostereo-assay' โดย Murphy (1967) ทั้ง 3 วิธีใช้หลักใหญ่เหมือนกันหมด เป็นหลักเดียวกันคือ 'radioimmuno assay' ปัจจุบันการวัดปริมาณ protein hormone และ radio-enzymic **assay** ก็ใช้หลักนี้ ความแตกต่างของวิธีการต่าง ๆ ก็คือ ธรรมชาติของ specific reactant ซึ่งแต่ละอันขึ้นกับแฟคเตอร์ (ดังรูปที่ 1) ดังต่อไปนี้คือ

1. วิธี competitive protein-binding ขึ้นกับ specific serum หรือ tissue binding protein

2. วิธี radioimmunoassay ขึ้นกับ specific antibody

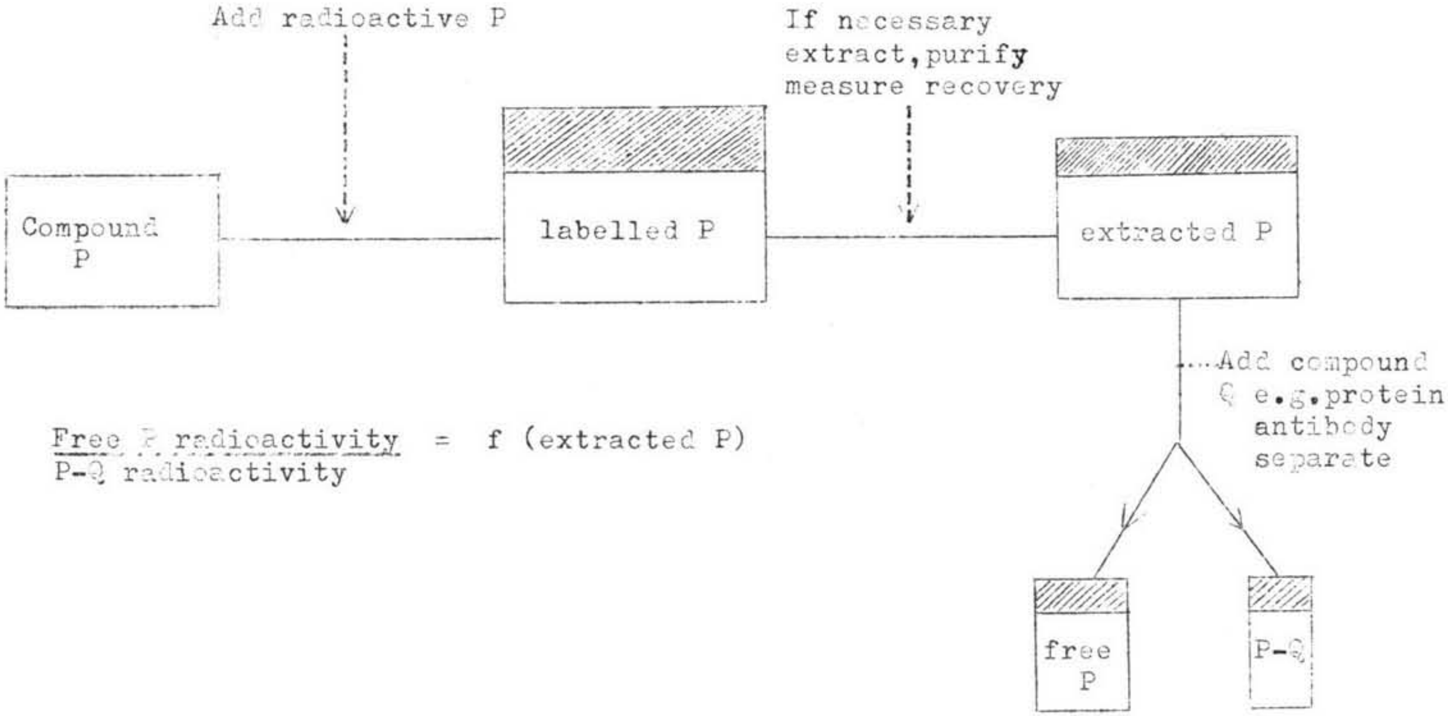
รูปที่ 1

แบบต่าง ๆ ของ 'saturation analysis' และการใช้



รูปที่ 2

แสดงหลักการของ saturation analysis



$$\frac{\text{Free P radioactivity}}{\text{P-Q radioactivity}} = f\ (\text{extracted P})$$

3. วิธี **radicenzymic - assay** ขึ้นกับ specific enzymic reaction

จากการวิเคราะห์วิธีต่าง ๆ และใช้หลักเดียวกันนี้ Ekins (1967) จึงให้ชื่อวิธีนี้เหมือนกันหมดว่า 'saturation analysis' และอธิบายหลักการไว้ดังต่อไปนี้

หอสมุด ... มหาวิทยาลัย

1.3 <u>'saturation analysis' Ekins(1967)</u>

1.3.1 <u>ทฤษฎีทั่วไปของ saturation analysis</u>

ดังรูปที่ 2

ถ้า P เป็นสารที่จะวัด (ส่วนใหญ่มีในร่างกาย เช่น เลือด, ปัสสาวะ)

Q เป็น specific saturable reactant (เช่น specific binding **protein** ,antibody หรือเอ็นไซม์)

ถ้าความเข้มข้นของ Q คงที่และให้ P ทำปฏิกิริยากับ Q อัตราส่วนระหว่างส่วนที่ P และ Q ทำปฏิกิริยากัน (bound) แทนด้วย [PQ] และส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยากัน (free) จะเป็นอัตราส่วนกับความเข้มข้นของ P เมื่อเริ่มแรกใน system นี้

อัตราส่วนระหว่าง [PQ] และ free P ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ [P] นี้เป็นไปตาม Law of mass action

$$P + Q \rightleftharpoons PQ$$

$$K = \frac{[PQ]}{[P][Q]}$$ เมื่อ [Q] มีความเข้มข้นคงที่

ดังนั้น ว่า K จึงขึ้นอยู่กับแฟคเตอร์ $\frac{[PQ]}{[P]}$

การวัดค่า P นี้ จำเป็นที่ปฏิกิริยานี้ต้องให้มีค่า K หรือ equilibrium constant สูงพอที่จะแน่ใจว่า P จะอยู่ในลักษณะของ [PQ] หรือ bound มากพอสมควร เมื่อความเข้มข้นของ P น้อยกว่าความเข้มข้นของ Q (สมมุติว่าความเข้มข้นของ Q มีมากเกินพอ)

หรือจะกล่าวว่า sensitivity ของวิธีนี้และการที่จะให้การวิเคราะห์นี้เป็นไปตามความต้องการมากน้อยเท่าใด ขึ้นอยู่กับค่าของ K และการเลือกความเข้มข้นที่พอเหมาะของ Q และ P นั้นเอง และ Ekins ได้รายงานในปี 1967 ว่าค่า K หรือ equilibrium constant ของ Q ที่ใช้ควรอยู่ในช่วง $10^{10} - 10^{20}$

ถ้า system มีภาวะที่เหมาะสมแล้ว ก็สามารถนำมาใช้วัดปริมาณของ P ในสารที่ต้องการหาโดยการเปรียบเทียบอัตราส่วนการกระจายของ P ระหว่าง freeและ bound ในสารที่ต้องการจะวัดกับสารมาตรฐาน

อัตราการกระจายของ free(f)และ bound(b)ของสารมาตรฐานจะทำเป็นกราฟมาตรฐาน โดยทั่วไปจะเขียนกราฟระหว่างอัตราส่วน b ต่อ f หรือ f ต่อ b กับความเข้มข้นของฮอร์โมน ค่า f และค่า b ได้จากการวัดกัมมันตภาพรังสีที่มีอยู่ใน free และ bound (มีหน่วยเป็น count /นาที)

การวัดธัยรอกซินในซีรัม จำเป็นต้องสกัดธัยรอกซิน (P) แล้วทำให้บริสุทธิ์ จึงจะนำไปทำปฏิกริยากับ Q เพราะโดยปกติธัยรอกซินอยู่ในภาวะการรวมตัวกับ endogeneous plasma protein หรือ endogeneous antibody ในปฏิกริยาเฉพาะบางอัน P มีน้อย แต่มีสารอื่นมากในการสกัดธัยรอกซิน (P) จากซีรัมนี้ใช้เติมธัยรอกซินที่ labelled ด้วยไอโอดีนกัมมันตภาพรังสี (^{125}I) เพื่อวัดปริมาณ recovery (ดูรูปที่ 3)

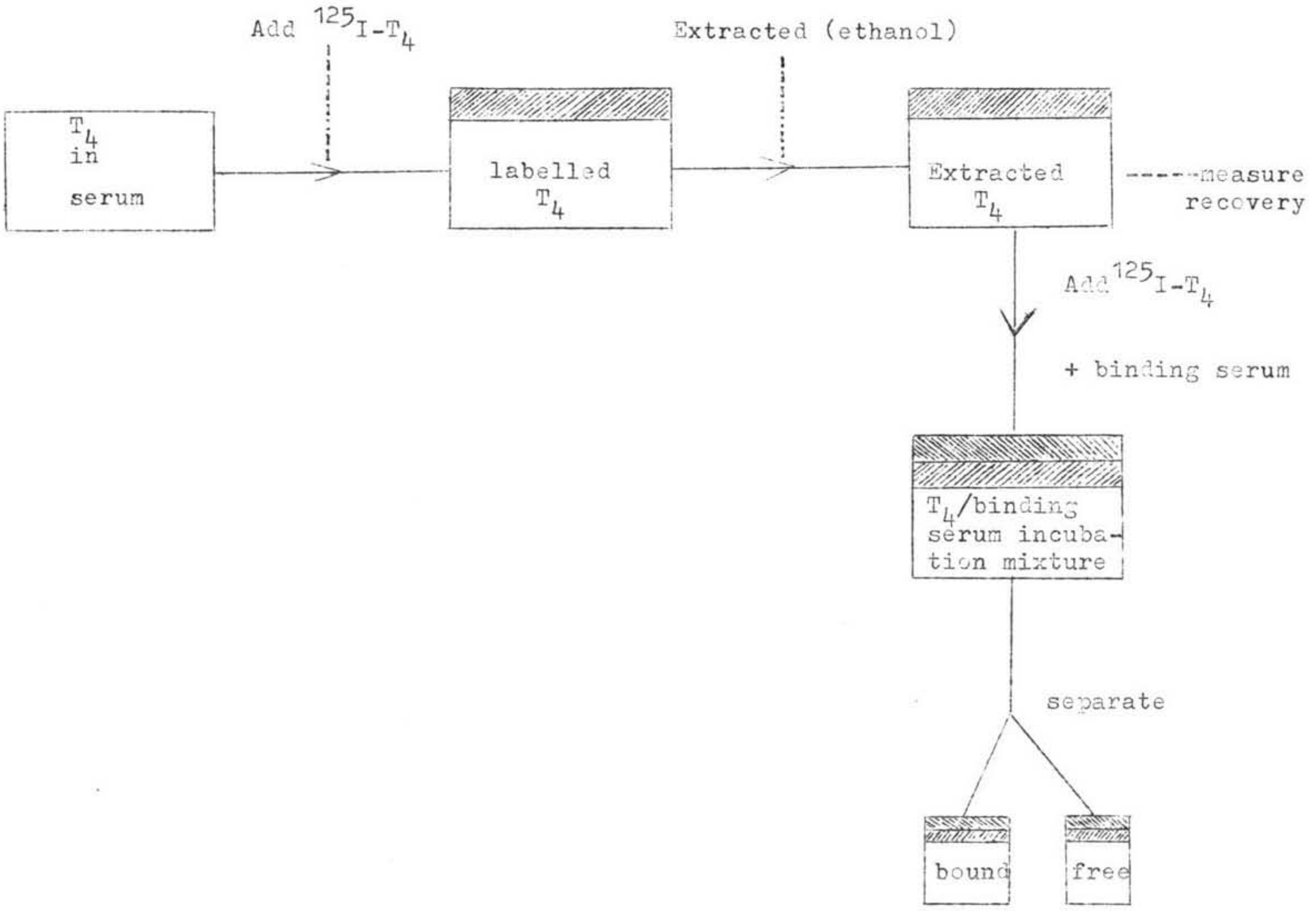
เมื่อให้ P ทำปฏิกริยากับ Q แล้วแยกส่วน free ออกจาก bound โดยใช้ adsorbent ส่วน supernatant เป็นส่วน bound Ekins(1967)ได้กล่าวถึงวิธีการแยก free ออกจาก bound ว่ามีได้หลายวิธีเช่น electrophoresis, chromatography,ใช้สารเคมีตกตะกอน หรือใช้สารของแข็งเป็น adsorbent ในการดูดสารเช่น charcoal, silica,fuller's earth, ion-exchange resin. ฯลฯ แต่เร็วนี้มีผู้ใช้ของแข็งที่เรียกว่า sephadex ในการแยก (Catt&Tregear,1968).

การแยก free ออกจาก bound นี้จะต้องแยกออกอย่างสมบูรณ์และสะอาดเพื่อให้มี sensitivity สูง นอกจากนี้ควรจะแยกอย่างรวดเร็วและใช้เวลาสม่ำเสมอเพื่อป้องกันให้การสลายตัวของโปรตีนส่วนที่ทำปฏิกริยาแล้วเกิดขึ้นน้อยที่สุด

000345

รูปที่ 3

แสดงหลักการ saturation analysis ของ thyroxine



Count : supernatants - bound

absorbant - free

อีกประการหนึ่ง adsorbent ส่วนมากให้ปฏิกริยาแยก free จาก bound ไม่เหมือนกันในสารผสมที่มีความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ กัน ดังนั้นจึงควรจะ suspend adsorbent ในโปรตีน หรือ polymer ที่ไม่ทำปฏิกริยาต่อสารที่ต้องการวัด เพื่อที่จะ normalize ให้สารตัวอย่างและสารมาตรฐานมีความเข้มข้นของโปรตีนใกล้เคียงกัน สารที่ใช้ normalize นี้อาจจะเป็นโปรตีน เช่น bovine albumin หรือ polymer เช่น dextran ก็ได้

1.3.2 <u>sensitivity และ precision ของการทดลอง</u>

ในทฤษฎีวิธีการทำ 'saturation analysis' Ekins (1967) ได้ให้คำจำกัดความของ sensitivity และ precision ดังนี้

'sensitivity' หมายถึง ปริมาณฮอร์โมนต่ำที่สุดที่จะวัดได้ ค่านี้ขึ้นอยู่กับอัตราการเบี่ยงเบนมาตรฐานของกราฟมาตรฐานที่ตำแหน่งความเข้มข้นของฮอร์โมนเท่ากับศูนย์ (หมายความว่า sensitivity จะดี ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของอัตราการกระจายของ f ต่อ b น้อยที่สุดหรือเป็นศูนย์ที่ความเข้มข้นของฮอร์โมนเท่ากับศูนย์นั่นเอง)

'precision' หมายถึง reproducibility ของการวัดและในการวิจัยครั้งนี้จะแสดงค่า precision ในเทอมของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(standard deviation), statistical error of mean of duplication (S.E.M.) และความผิดพลาดมาตรฐาน (standard error)

1.3.2 <u>การคำนวณค่า effective equilibrium constant และความเข้มข้นของ binding protein และความเข้มข้นของ tracer hormone เพื่อให้มี sensitivity สูง</u>

effective equilibrium constant(K_e) คือ ค่าเฉลี่ยของ $K_1, K_2, K_3 \ldots K_i$ เมื่อ $K_1, K_2, K_3 \ldots\ldots K_i$ เป็น equilibrium constant ของปฏิกริยาระหว่างโปรตีนหลายชนิดซึ่งรวมกันอยู่ใน binding protein

$q_1, q_2, q_3 \ldots\ldots q_i$ หมายถึงความเข้มข้นของโปรตีนแต่ละชนิดซึ่งรวมกันอยู่นั้น q_e คือค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของ $q_1, q_2, q_3 \ldots\ldots\ldots\ldots q_i$

Ekins (1967) ได้หาค่า K_e และ q_e ในเทอมต่อไปนี้

$$K_e = \frac{\sum K_i^2 q_i}{K_i q_i}$$

$$q_e = \frac{\left[\sum K_i q_i\right]^2}{\left[K_i^2 q_i\right]}$$

adsorbent ที่ใช้ในการแยก free ออกจาก bound ในสารผสมและ endogeneous hormone (สารชนิดเดียวกับ P) ใน binding protein จะมีผลต่อค่า K_e นี้ด้วย เพราะฉะนั้นจึงต้องหาค่า K_e เพื่อจะใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ q_e และ tracer hormone ที่จะทำให้การวัดมีความไวสูง

การหาค่า K_e นั้น Scatchard (1949) ได้เสนอวิธีหาโดยทำกราฟมาตรฐานแบบที่เรียกว่า 'Scatchard plot' คือ กราฟที่เขียนระหว่างอัตราส่วนของสารที่ทำปฏิกริยา (bound) ต่อสารที่ไม่ทำปฏิกริยา (free) กับปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ทำปฏิกริยาจับกัน

Scatchard (1949) ได้ใช้การคำนวณพิสูจน์ให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นต่ำของโปรตีนจนเหลือโมเลกุลต่อโมเลกุลทำปฏิกริยากัน อัตราการเกิดปฏิกริยาก็คือค่า equilibrium constant ค่านี้สามารถหาได้จากการเขียนกราฟระหว่างอัตราส่วน b ต่อ f และปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนที่ทำปฏิกริยาจับกัน แล้วต่อเส้นกราฟไปตัดแกน y และแกน x, slope ของกราฟนั้น เป็นค่า K และจุดตัดบนแกน x เป็นค่าความสามารถในการจับตัวระหว่างโปรตีนที่ทำปฏิกริยาจับกัน

ในปฏิกริยาที่ binding site ซึ่งมีค่า K ต่าง ๆ กัน กราฟที่ได้ก็จะให้รูปร่างเปลี่ยนไปต่าง ๆ กัน แต่อย่างไรก็ดี ค่า K ที่หาได้จาก slope ที่ชันที่สุดใน Scatchard plot ก็จะเป็นค่า K ของ binding site ที่มีปฏิกริยาในปฏิกริยานั้นสูงที่สุด

ค่า optimum reagent concentration ที่ต้องการจะทำให้การวัดมีความไวสูงนั้น ขึ้นอยู่กับหลายแฟคเตอร์คือ

1. facility ในห้องปฏิบัติการ เช่น หลอดทดลอง, สารที่ใช้จะต้องบริสุทธิ์ สะอาด ไม่มีสิ่งเปรอะเปื้อน เช่น โปรตีน และสารกัมมันตภาพรังสี

2. การตัดสินใจว่าใช้โปรตีนใด, tracer ชนิดใด, ระดับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวัด ปริมาตรที่ใช้ในการทำปฏิกริยา ความเข้มข้นของ binding protein การวิจัยครั้งนี้เลือกใช้โปรตีนในซีรัมคนมีครรภ์ เนื่องจากในคนมีครรภ์นั้น ปริมาณ PBI จะสูงกว่าปกติ (Heinemann และคณะ, 1948) ดังนั้นปริมาณของโปรตีนอินเตอร์-แอลฟาโกลบูลิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่จับฮอร์โมนธัยรอกซินได้ดีก็จะมีมาก รวมทั้งโปรตีนอื่นที่เป็น non-specific protein ด้วย การที่จะใช้โปรตีนในซีรัม คนมีครรภ์เป็น binding protein โดยไม่เจือจางเสียก่อน เกิดผลเสีย 2 ประการคือ ปริมาณโปรตีนอินเตอร์-แอลฟา โกลบูลิน มากเกินไปและ non-specific protein อาจจะไปจับฮอร์โมนที่เราจะวัดด้วย ทำให้ความไวของการวัดลดลง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเจือจางโปรตีนลง เพื่อที่จะให้ non-specific protein เกือบไม่มีหรือไม่มี activity เลย และต้องให้ปริมาณของโปรตีน อินเตอร์-แอลฟา โกลบูลิน อยู่ในปริมาณพอเหมาะ ถ้าใช้โปรตีนคนปกติดังที่มีรายงานอยู่แล้ว (Ekins, 1969; Murphy, 1965) ไม่สามารถจะเจือจางโปรตีนได้มากนัก เพราะปริมาณโปรตีนมีอยู่น้อยแต่เดิม ทำให้ปริมาณของ non-specific protein จะยังคงอยู่ในระดับที่ค่อนข้างสูง ซึ่งจะเป็นผลให้ K_e ต่ำลง เป็นสาเหตุให้ความไวในการวัดลดตามไปด้วย

การเลือกใช้ tracer การศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ $^{125}I\text{-}T_4$ เพราะ ^{125}I มี half life ยาวกว่า ^{131}I

ปริมาตรที่ใช้ในการทำปฏิกริยาจำเป็นต้องเหมาะสมกับการทดลองแต่ละครั้ง (หมายความว่าจำเป็นจะต้องใช้ซีรัมจำนวนเท่าใด รวมทั้ง reagent ทุกอย่าง จะต้องมีปริมาตรที่ทำให้การวัดมีความไวสูงด้วย)

3. หลังจากการจำกัดแฟคเตอร์ต่าง ๆ ลงทีละแฟคเตอร์ก็จะเหลือเพียงแฟกเตอร์ความเข้มข้นของ tracer และความเข้มข้นของโปรตีน ความเข้มข้นของโปรตีนนั้น ถ้าเจือจางมากก็มีผลดีขึ้น เพราะไปเจือจาง non-specific protein ลง ทำให้ลดค่า K ของ non-specific protein ลงเหลือค่า K_e เฉพาะของโปรตีน อินเตอร์-แอลฟา-โกลบูลิน แต่การเจือจางนี้ต้องให้พอเหมาะสมสำหรับแต่ละ incubation mixture ทั้งนี้เพราะการเจือจางมากเกินไป อาจจะทำให้อัตราการเบี่ยงเบนทางสถิติของอัตราส่วน f ต่อ b สูงขึ้นก็ได้ แม้ว่าจะได้ค่า K_e ที่สูง ดังนั้น จึงควรเจือจางในอัตราที่จะทำให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำที่สุด

ดังนั้น ความเข้มข้นของ tracer และความเข้มข้นของโปรตีนที่สามารถทำให้การวัดมีความไวสูง จึงจะหาได้จากเทคนิคที่จะกล่าวต่อไปนี้

การหาความเข้มข้นของ p (tracer) และความเข้มข้นของ binding protein (q) จะหาได้จากกราฟซึ่งเขียนโดยคอมพิวเตอร์ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Kp และ Kq กับค่า $\epsilon\sqrt{STV/K}$ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1

เมื่อ ϵ = ส.ป.ส.ของการแปรค่าจากการวัด

S = specific activity ของ tracer $^{125}I\text{-}T_4$ (count/min./ng)

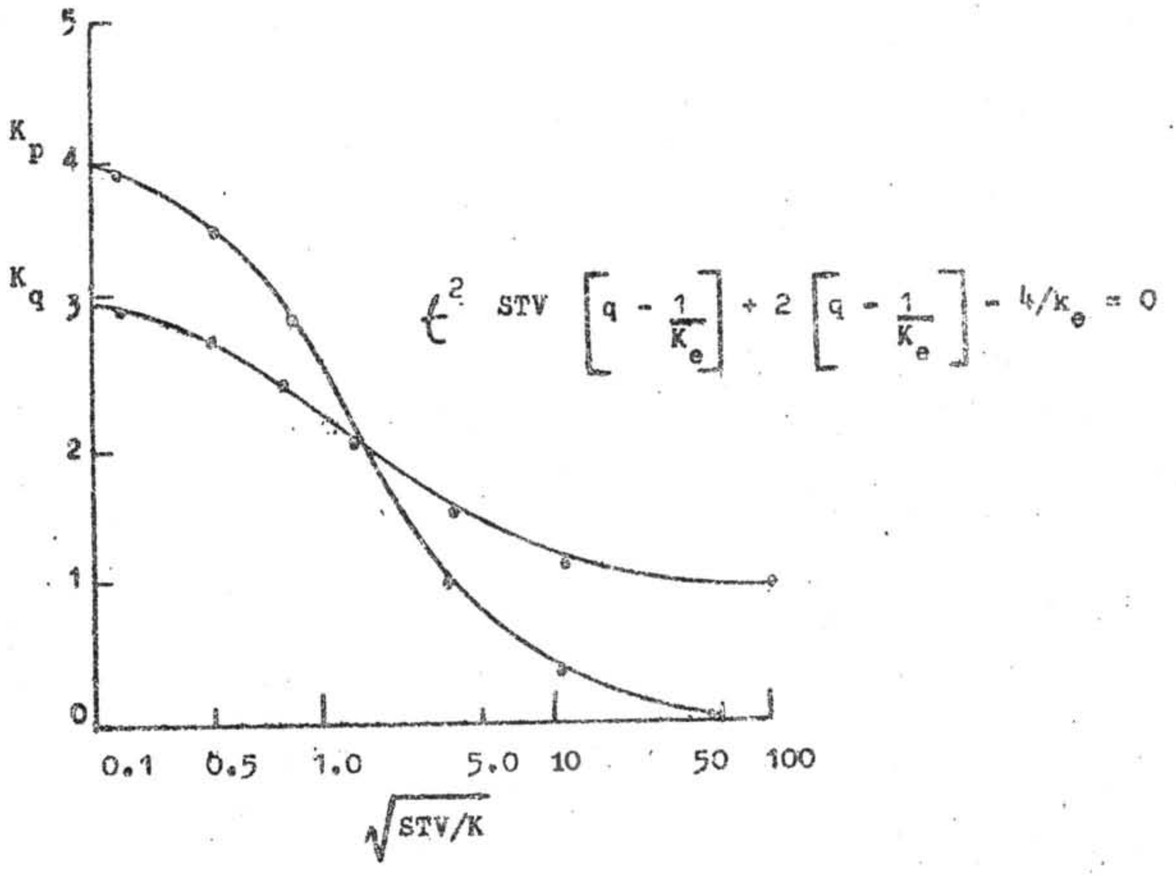
V = ปริมาตรของสารผสมทั้งหมดจะนำไปอินคิวเบท

T = เวลาเป็นนาทีที่ใช้ในการวัด activity แต่ละคู่ระหว่าง bound และ free

กราฟนี้จะใช้ได้เมื่อ binding protein ที่ใช้นั้นเป็น single binding site และการวัดกัมมันตภาพ จะต้องวัดทั้งส่วนที่ฮอร์โมนทำปฏิกิริยากับโปรตีน (bound) และส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยา(free)

กราฟนี้จะใช้ไม่ได้กับกรณีอื่น นอกจากที่กล่าวมาแล้ว เช่น ในกรณีที่มี multiple binding site of reaction หรือรังสีที่วัดเป็นเพียงส่วนใดส่วนหนึ่งเท่านั้น คือวัดเฉพาะส่วน free หรือเฉพาะส่วน bound เพียงอย่างเดียว จะไม่สามารถใช้คอมพิวเตอร์พลอตนี้หาค่า p และ q ที่เหมาะสมได้

รูปที่ 4 computor plot หาค่า optimum reagent concentration , เพื่อให้มี sensitivity สูง
ให้ q = binding site concentration
p = concentration of tracer hormone
กราฟนี้คัดมาจาก Theoretical Aspect of Saturation Analysis ของ Ekins (1967)



เมื่อคำนวณหาค่า $t\sqrt{STV/K}$ ได้แล้ว ก็อ่านค่า K_p และ K_q จากคอมพิวเตอร์พล็อต ที่ค่า $t\sqrt{STV/K}$ ที่คำนวณได้ เมื่อได้ค่า K_p และ K_q ก็สามารถหาค่า p และ q โดยนำค่า K ที่ได้จาก scatchard plot ไปหารค่า K_p และ K_q ก็จะได้ปริมาณ p (tracer) และ q (binding capacity) ที่เหมาะสมตามลำดับ เมื่อได้ค่า p และ q แล้วก็นำไปเปลี่ยนแปลงจากค่าที่หาได้จาก scatchard plot จากค่าปริมาณ binding capacity ที่ได้จากการต่อ slope ของกราฟมาตัดแกน X ถ้าค่าทั้ง 2 นี้ตรงกันก็แสดงว่าความเข้มข้นของโปรตีน (protein binding) ที่ใช้อยู่นั้นมีความเข้มข้นที่เหมาะสมอยู่แล้ว และถ้าค่าทั้ง 2 ไม่ตรงกัน จึงต้องแก้ความเข้มข้นที่ใช้อยู่เดิมมาใช้ค่าที่คำนวณจาก K_p และ K_q ที่ได้จากคอมพิวเตอร์พล็อต ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมจะทำให้ความไวในการวัดสูง

1.4 <u>อีกส่วนหนึ่งของการศึกษานี้คือ thyroxine binding globulin capacity</u>

Balfour และ Tunnicliffe (1960) ได้ศึกษาพบว่า T_4 และ T_3 ส่วนใหญ่จะยึดเกาะที่อินเตอร์-แอลฟา-โกลบูลิน และ T_4 จะยึดเกาะได้มีประสิทธิภาพมากกว่า T_3

การหา thyroxine binding capacityนี้ ได้ใช้วิธีหาโดยวิธี electrophoresis และมีผู้ศึกษาไว้มากมาย Rich และ Bearn (1958) ได้ใช้ starch-gel eletrophoresis ของซีรัม เมื่อเติมธัยรอกซินกัมมันตภาพรังสีพบว่ามันจะวิ่งไปจับที่ **pre**albumin และalbumin และไม่จับที่อินเตอร์แอลฟาโกลบูลินเลย หมายความว่าใน starch-gel TBG จะวิ่งไปพร้อม ๆ กับ prealbumin fraction หมด

Robbin (1956) ได้ดัดแปลงปรับปรุงวิธีของ Tanaka และ Starr โดยใช้วิธี paper eletrophoresis แบบ reverse flow electrophoresis โดยวิธีนี้ albumin-bound thyroxine จะแยกออกจากแอลฟาโกลบูลิน ซึ่งเป็นผลจากแรงหลายแรง เช่น electrophoretic mobility, electroosmosis,evaporation**และผลของการ**ใช้ระดับ buffer ไม่เท่ากัน

วิธีของ Robbin นี้เป็นวิธีใหม่อีกวิธีหนึ่ง คือ เติม T_4 ซึ่งเป็นกัมมันตภาพรังสี (T_4^*) จากภายนอกลงไปในซีรัมคนปกติ แล้วทำ electrophoresis ใน barbital buffer pH=8.6 T_4^* จะไปยึดกับโปรตีนอินเตอร์-แอลฟา-โกลบูลิน แต่เนื่องจาก TBG มีอยู่น้อยมากในซีรัม การทำ electrophoresis ธรรมดาจะยากมาก เพราะปริมาณของอัลบูมิน ซึ่งมีมากจะไปซ้อนอยู่บางส่วนของ TBG ด้วย จึงจำเป็นต้องใช้ reverse flow electrophoresis จะสามารถหลีกเลี่ยงปัญหาข้อนี้ได้บ้าง วิธีการปฏิบัติคือ ทำ electrophoresis ธรรมดา แต่ทำให้ระดับ buffer ทางขั้ว anode ให้สูงขึ้น แล้วน้ำไหลไปตาม strip ของกระดาษในทิศทางตรงกันข้ามกับทางที่โปรตีนเดินทาง ขนาดของระดับ buffer ที่สูงขึ้นนี้จะต้องปรับจนกระทั่งการเดินทางของอินเตอร์-แอลฟา-โกลบูลิน อยู่ที่ line of application ในขณะที่อัลบูมินจะเดินทางไปยังขั้วลบ

วิธีนี้อาจนำเอาคุณสมบัติอันนี้มาใช้ตรวจการทำหน้าที่ของต่อมธัยรอยด์คือ เมื่อเติม T_4^* จากภายนอกลงในซีรัม แล้วทำ electrophoresis ใน barbital buffer pH= 8.6 ก็อาจหาเปอร์เซ็นต์ของ T_4^* ที่เติมจากภายนอก T_4^* ก็จะไปยึดกับ TBG ในซีรัมเพิ่มเติมจากเดิมได้มากหรือน้อย แล้วแต่สภาพการทำงานของต่อมธัยรอยด์ เช่น ในราย hyperthyroid มี T_4 ซึ่งยึดกับ TBG แต่เดิมสูงอยู่แล้ว เมื่อเติม T_4^* จากภายนอกเข้าไปจึงอาจยึดเกาะกับ TBG เพิ่มเติมได้น้อย ทำให้ค่าของเปอร์เซ็นต์ TBG* capacity ต่ำส่วน hypothyroid ตรงกันข้าม จะมีค่าเปอร์เซ็นต์ TBG* capacity สูง การตรวจ TBG capacity ให้ผลเชื่อถือได้ในการวัดการทำหน้าที่ของต่อมธัยรอยด์วิธีหนึ่ง แต่ในรายที่รักษาด้วย estrogen, ภาวะตั้งครรภ์, โรคไต ฯลฯ จำนวน TBG จะเปลี่ยนแปลง การตรวจหา TBG capacity จะให้ผลที่เชื่อถือไม่ได้ ข้อดีของการตรวจโดยวิธีนี้คือ ไม่ถูกกระทบกระเทือนด้วยไอโอดีนจากภายนอก ซึ่งผิดกับ PBI (protein - bound - iodine) และ BEI (butanol-extractable-iodine) ทั้งยังไม่ถูกกระทบกระเทือนด้วยความผิดปกติ นอกต่อมธัยรอยด์ เช่น ในโรคตับ, การรักษาด้วยยาต้านการแข็งตัวของโลหิต เป็นต้น ซึ่งสภาพผิดปกติเหล่านี้จะกระทบกระเทือนด้วยวิธีตรวจชนิดอื่น ๆ การตั้งครรภ์ หรือการคุมกำเนิดด้วยการใช้ยาที่เข้า estrogen จะทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์ TBG capacity และ PBI สูง

แต่ในโรคไตจะมีค่า PBI ต่ำ แต่เปอร์เซ็นต์ TBG capacity สูง ดังนั้นการตรวจการทำหน้าที่ของต่อมธัยรอยด์ จึงจำเป็นต้องอาศัยพิจารณาจากผลของการตรวจหลาย ๆ วิธีเพื่อความถูกต้องในการพิเคราะห์โรค

งานที่จะได้ศึกษานี้เป็นการศึกษาวิธีวัดปริมาณธัยรอกซิน โดยใช้หลัก saturation analysis ของ Ekins (1967) เพื่อหาวิธีปรับปรุงให้มีความไวสูง ในการวัดปริมาณธัยรอกซินจำนวนน้อยในซีรัมและมีค่าเบี่ยงเบนทางสถิติให้น้อยลง พร้อมทั้งศึกษาวิธีหาปริมาณธัยรอกซินที่มีความสามารถจับโปรตีนอินเตอร์-แอลฟา-โกลบูลิน เพื่อว่าจะได้เป็นค่าที่ใช้เปรียบเทียบในการวินิจฉัยโรคควบคู่ไปกับค่าที่วัดได้จากวิธี saturation analysis

จากวิธีทดลองวัดปริมาณธัยรอกซินทั้งหมดที่เสนอดังกล่าวข้างบน ผู้วิจัยเลือกใช้วิธี saturation analysis ของ Ekins (1967) เพราะเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ใช้ปริมาณซีรัมน้อย สามารถทำเสร็จในเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง อาจทำได้ 40-50 ตัวอย่างใน 1 วัน เหมาะจะนำมาใช้ในงานประจำวัน แต่วิธีหาความสามารถในการจับโปรตีนอินเตอร์-แอลฟา-โกลบูลินของธัยรอกซินนั้น อาจใช้เวลานานในการวัดแต่ละครั้ง แต่ก็สามารถใช้ประกอบการพิจารณาตัดสินอาการของโรคได้ด้วย