หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

เหล็กเป็นธาตุชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในสัตว์ชั้นสูง เนื่องจากเหล็กเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของฮีโมโกลบิน ประมาณร้อยละ 60 – 65 ของเหล็กในร่างกายคนอยู่ในรูปของฮีโมโกลบิน (ตารางที่ 1) เหล็กอีกส่วนหนึ่งสะสมอยู่ในรูปของเฟอริติน ซึ่งเป็นโปรตีนที่รู้จักกันมาตั้งแต่ ค.ศ. 1937 โดย Laufberger แยกและตกผลึกได้จากม้ามและตับของม้า (Laufberger 1937)

ตารางที่ 1 การกระจายของเหล็กในร่างกายของคน (น้ำหนักตัว70กิโลกรัม)

(Jacobs และ Worwood 1974)

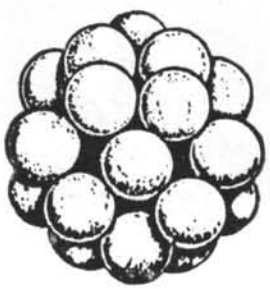
Protein	Tissues	Total iron (g)	% of Total body iron
Hemoglobin	Red blood cell	2.60	57.6
Myoglobin	Muscle	0.40	8.9
Mitochondria cytochrome		0.017	0.4
Catalase		0.005	0.1
Other cytochrome and heme-proteins		?@	
Non heme-iron (including ferritin and hemosiderin)	Liver	0.35	7.8
	Spleen	0.02	0.4
	Muscle	0.86	19.0
	Bone marrow	0.26	5.8
	Other tissues	?@	
Transferrin	Plasma	0.004	0.1

@ ? หมายถึง ยังไม่ทราบปริมาณแน่นอน

1.1 โครงสร้างของเฟอริติน

Crichton (1971 , 1973 , 1975) Munro และ Linder (1978) และ Harrison (1977) รวบรวมลักษณะโครงสร้างและคุณสมบัติบางอย่าง ของเฟอริตินจากม้ามของม้า และสรุปว่าเฟอริตินประกอบด้วยโปรตีนเปลือกนอกเรียกว่า อะโปเฟอริติน ((Apoferritin) และแกนเหล็กภายใน ((Iron core)

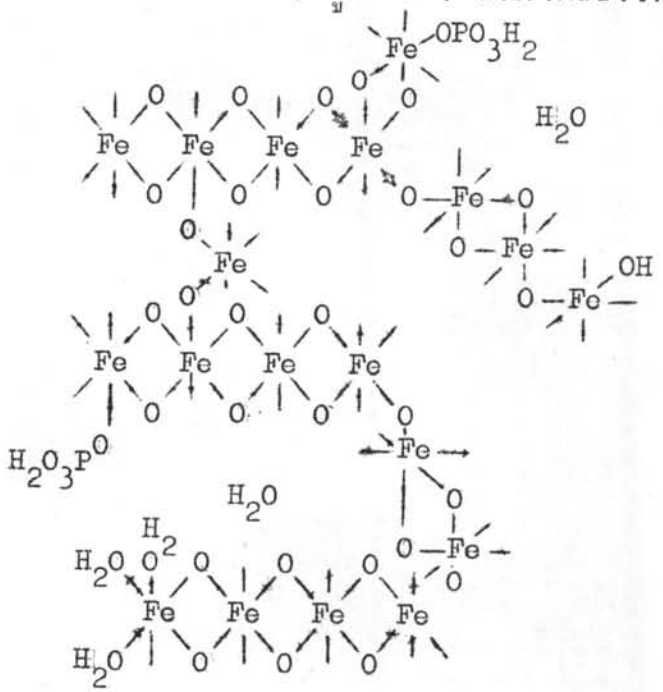
อะโปเฟอริติน เป็นโปรตีนสีเหลือง เมื่อศึกษาด้วยเทคนิคของ เซดิเมนเตชัน ((Rothen 1944) เอ็กซ์-เรย์ คริสตรอลโลกราฟฟี่ (Harrison 1963) การกระจายของแสง ((Richter และ Walker 1967) และโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเล็คโตรโฟรีซีส (Bryce และ Crichton 1971) พบว่าโปรตีนเปลือกนอกนี้มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 430,000 – 490,000 ดาลตัน ประกอบขึ้นด้วยโพลีเปปไทด์หน่วยย่อยเหมือน ๆ กัน 24 หน่วยย่อย และจัดตัวกันดังรูปที่ 1 แต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 18,500 ดาลตัน หรือประมาณ17 S (Crichton และ Bryce 1970 , 1971)



รูปที่ 1 การจัดตัวของโมเลกุลเฟอริติน (Hoare , Harrison และ Hoy 1975)

อะโปเฟอริตินมีลักษณะเป็นเปลือกหุ้มทรงกลม เส้นผ่าศูนย์กลางของผิวนอกยาว 120 –130 อังสตรอม เส้นผ่าศูนย์กลางของผิวด้านในยาว 70 – 80 อังสตรอม โปรตีนเปลือกนอกหนาประมาณ 25 อังสตรอม มีช่องทางให้เหล็กผ่านเข้าออก 6 แห่ง ขนาดกว้าง 10 อังสตรอม วางตัวอยู่ในแนวแกน four fold symmetry

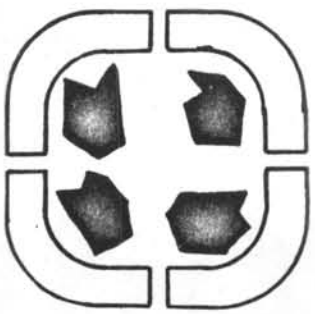
แกนเหล็ก เหล็กที่บรรจุอยู่ในโมเลกุลของเฟอริตินอยู่ในรูปของเฟอริคไฮดรอกไซด์ฟอสเฟต (รูปที่ 2) ปริมาณของเหล็กที่พบอยู่ระหว่าง 0 – 4300



รูปที่ 2 โครงสร้างอะตอมของสารเชิงซ้อนของเหล็กที่อยู่ในเฟอริติน (Gray 1975)

อะตอม/โมเลกุลของเฟอริติน หรือร้อยละ 0 – 27 ของน้ำหนักแห้ง การกระจายตัวของเหล็กในโมเลกุลของเฟอริตินไม่สม่ำเสมอ คือมีการกระจายตัวเป็น 4 ส่วน (รูปที่ 3)

รูปที่ 3 ภาพเชียนแสดงการกระจายตัวของเหล็กในโมเลกุลของเฟอริติน (Farrant1954)



1.2 หน้าที่ของเฟอริติน

Crichton (1975) สรุปหน้าที่สำคัญของเฟอริตินไว้ดังนี้

ก. เป็นแหล่งสะสมเหล็กในรูปเฟอริติน เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนชนิดอื่นที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ เซลหลายชนิดทำหน้าที่สะสมเหล็กเองแต่เซลตับจะสะสมเหล็กให้กับเซลอื่น ๆ ของร่างกายด้วย

ข. เฟอริตินในเยื่อบุลำไส้ช่วยขนส่งเหล็กจากช่องลำไส้ให้กับทรานสเฟอรินในพลาสมา และเฟอริตินในรกทำหน้าที่ช่วยขนส่งเหล็กจากทรานสเฟอรินในกระแสเลือดของมารดาให้แก่ทารกในครรภ์

ค. เฟอริตินทำหน้าที่จับเหล็กที่หลุดจากเม็ดเลือดแดงที่ถูกทำลายโดยระบบเรติคิวโลเอ็นโดทีเลียม เพื่อนำเหล็กกลับไปใช้ประโยชน์ใหม่

ง. เฟอริตินช่วยป้องกันเซลจากพิษของเหล็กเฟอริคที่อยู่ในรูปอิสระ

1.3 <u>ขบวนการแลกเปลี่ยนเหล็กในร่างกายที่เกี่ยวข้องกับเฟอริติน</u>

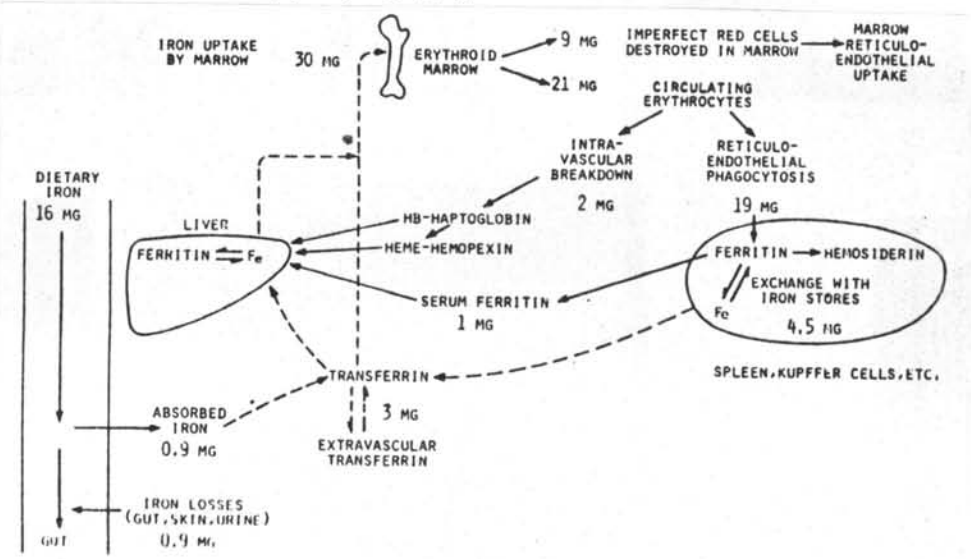
อาหารที่คนรับประทานในวันหนึ่ง ๆ จะมีเหล็กทั้งในรูปเฟอริค และเฟอรัส อยู่ประมาณ 16 มิลลิกรัม เมื่ออาหารเคลื่อนที่มาถึงบริเวณลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม และเจจูนัม เหล็กจะถูกดูดซึมผ่านเซลลำไส้โดยมีเฟอริตินในเซลบุลำไส้ช่วย (Huebers , Huebers และ Rummel 1975) ปกติลำไส้จะดูดซึมเหล็ก ในรูปเฟอรัสเท่านั้น ดังนั้นเหล็กเฟอริคในอาหารจะถูกดูดซึมได้เมื่อถูกเปลี่ยนไป เป็นเหล็กเฟอรัสก่อน โดยการรีดิวส์ของสารบางชนิด เช่นกรดแอสคอร์บิค เป็นต้น เหล็กจะผ่านลำไส้เข้าสู่กระแสเลือด และอยู่ในรูปของทรานสเฟอริน ซึ่งทำหน้าที่ขนส่งเหล็กให้กับเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย การหมุนเวียนของเหล็กนี้ จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของเหล็กภายในร่างกายประมาณวันละ 37.5 มิลลิกรัม (รูปที่ 4) ถึงแม้ว่าจะมีการดูดซึมเหล็กจากอาหารเพียงวันละประมาณ 0.9มิลลิกรัม การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น คือเหล็กในทรานสเฟอรินจะถูกส่งต่อไปยังไขกระดูกประมาณวันละ 30 มิลลิกรัม เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ฮีม ซึ่งเป็นส่วนประกอบ ที่สำคัญของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง เหล็กในเม็ดเลือดแดงจะหมุนเวียนอยู่ในกระ

แสเลือดประมาณวันละ 21 มิลลิกรัม (Cook และคณะ 1970) นอกจากนี้ยังนำไปสร้างมัยโอโกลบินของกล้ามเนื้อ และเอ็นไซม์บางชนิดที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ เหล็กที่เหลือส่วนใหญ่จะถูกนำไปเก็บในรูปของเฟอริตินที่ตับและม้าม โดยเฟอริตินที่สะสมในตับจะมีการแลกเปลี่ยนเหล็กประมาณวันละ 4.5 มิลลิกรัม เหล็กที่สะสมในรูปของเฟอริตินอาจเปลี่ยนไปเป็นฮีโมซิเดอรินเมื่อร่างกายมีเหล็กมากเกินพอ และเมื่อพลาสมามีเหล็กลดลง เฟอริตินและฮีโมซิเดอรินสามารถปล่อยเหล็กให้กับพลาสมาได้ มีรายงานที่แสดงว่าการปล่อยเหล็กนี้อาจเกิดขึ้นได้ในอัตราที่สูงถึงวันละ 30 มิลลิกรัม (Cook และคณะ 1973)

เหล็กที่หมุนเวียนในร่างกายอีกประมาณวันละ 3 มิลลิกรัม คือเหล็กในทรานสเฟอรินที่แลกเปลี่ยนกับทรานสเฟอรินนอกระบบเส้นเลือด

เมื่อหมดอายุการทำงานแล้วโปรตีนพวก ฮีโมโกลบิน มัยโอโกลบิน และเอ็นไซม์ที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบจะถูกทำลายไป และปล่อยเหล็กเข้าในระบบเดิมได้อีก ดังรูปที่ 4

รูปที่ 4 การแลกเปลี่ยนและเคลื่อนย้ายเหล็กภายในร่างกายของคน (เส้นประแสดงการขนส่งเหล็กโดยทรานสเฟอริน) (Garby และ Noyes 1959; Cook และคณะ 1970 , 1973)



1.4 เฟอริตินในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย

จากรายงานการศึกษาคุณสมบัติการเคลื่อนที่ผ่าน โพลีอะไครลาไมด์เจล ในสนามไฟฟ้า และองค์ประกอบทางกรดอะมิโนในโมเลกุลของเฟอริตินที่ได้จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของคน และสัตว์หลายชนิด (Richter 1964 ; Alfrey , Lynch และ Whitley 1967 ; Arora และคณะ 1970 ; Munro และคณะ 1975) พบว่ามีการเคลื่อนที่แตกต่างกันบ้างโดยไม่ได้เกิดจากปริมาณของเหล็กที่มีอยู่ในเฟอริติน (Vulmeri และคณะ 1975) แสดงว่าน่าจะมีลักษณะจำเพาะของเฟอริตินในเนื้อเยื่อต่างชนิดกันด้วย

1.5 ความสำคัญทางคลินิกของระดับเฟอริตินในซีรัม

การศึกษาปริมาณของเหล็กสะสมในร่างกายนั้นทำได้หลายวิธีคือ

ก. เจาะเลือดผู้ป่วยซ้ำหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งผู้ป่วยขาดเหล็กแล้วคำนวณหาปริมาณเหล็กสะสมในร่างกายได้ (Phlebotomy test) แต่วิธีนี้ ไม่อาจทำกับผู้ป่วยได้ทุกราย เนื่องจากผู้ป่วยบางรายมีอาการขาดเหล็กอยู่แล้ว

ข. เหนี่ยวนำการขับถ่ายเหล็กด้วยสารจับเหล็ก เดส เฟอริออกซามีน วิธีนี้สารที่ใช้มีราคาสูงมาก

ค. วัดการดูดซึมสาร รังสีเหล็ก – 59 เป็นวิธีที่ใช้ได้เฉพาะรายที่มีระบบการดูดซึมปกติเท่านั้น

ง. การวัดปริมาณเหล็กในอวัยวะ ได้แก่ ตับ และไขกระดูก วิธีนี้มีข้อจำกัดคือเก็บตัวอย่างของผู้ป่วยได้ยาก ต้องใช้บุคคลากรที่มีความชำนาญ

จ. การย้อมสีเหล็กในไขกระดูก หรือตัวอย่างตับ มีข้อจำกัด เช่นเดียวกับข้อ ง. และยังให้ผลเพียงกึ่งปริมาณวิเคราะห์ มีความเที่ยงตรงน้อย

นอกจากนี้อาจศึกษาโดยวัดปริมาณเหล็กในซีรัม การวัดทรานสเฟอรินในพลาสมา แต่ไม่ได้แสดงปริมาณเหล็กสะสมโดยตรง และมีข้อผิดพลาดได้ง่าย

เนื่องจากระดับเฟอริตินในซีรัมมีความสัมพันธ์โดยตรง กับปริมาณเหล็กที่สะสมอยู่ในร่างกาย (Addison และคณะ 1972 ; Walter , Miller และ

Worwood 1973) ดังนั้นระดับความเข้มข้นของเฟอริตินในซีรัมจึงน่าจะเป็นดัชนีชี้บ่งถึงภาวะของเหล็กในร่างกายได้ดีกว่าวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และมีข้อได้เปรียบ คือใช้ซีรัมหรือพลาสมาเป็นตัวอย่างในการตรวจ ซึ่งเก็บตัวอย่างได้ง่าย นอกจากนี้วิธีวัดปริมาณเฟอริตินตามรายงานต่าง ๆ เป็นวิธีที่ให้ความเที่ยงตรง มีความแม่นยำ และมีความไวสูง จึงใช้ในการตรวจความผิดปกติได้ดีโดยเฉพาะในรายที่มีเหล็กสะสมอยู่น้อย (Bentley และ Williams 1974)

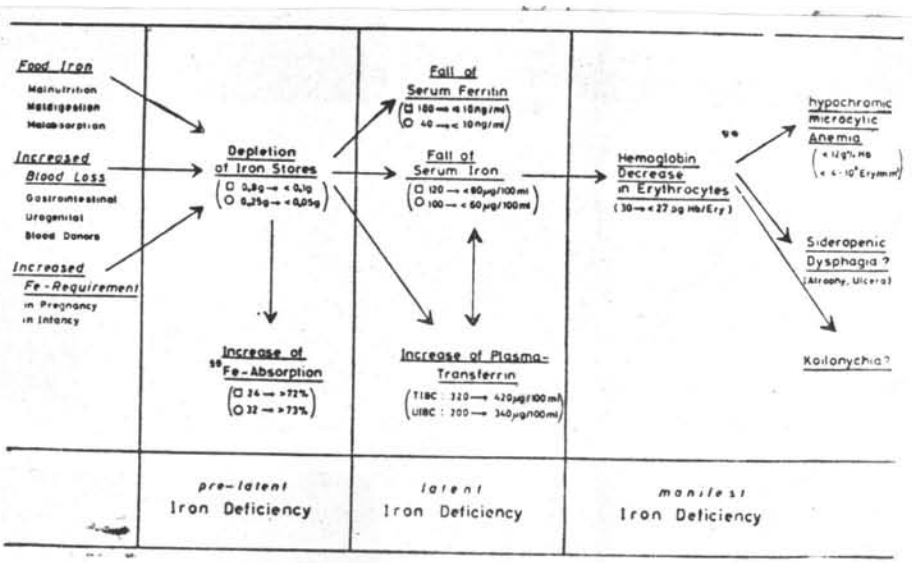
ปัจจุบันมีการใช้ระดับเฟอริตินในซีรัมเป็นดัชนี เพื่อแสดงการสะสมของเหล็กในภาวะต่าง ๆ เช่น

ก. ภาวะโลหิตจางเนื่องจากการขาดเหล็ก

ภาวะโลหิตจางเนื่องจากการขาดเหล็ก เป็นภาวะที่จำนวนเม็ดเลือดแดงต่อ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีค่าต่ำกว่าปกติ ความเข้มของฮีโมโกลบินและปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นลดลง เนื่องจากปริมาณเหล็กในร่างกาย ลดน้อยลงมาก จนไม่เพียงพอในการสร้างฮีโมโกลบินสำหรับเม็ดเลือดแดง Linman พบว่าภาวะโลหิตจางโดยสาเหตุนี้มีถึงร้อยละ 90 ของภาวะโลหิตจางทั้งหมด (Linman 1975) และมีระดับความรุนแรงแตกต่างกันขึ้นกับปริมาณเหล็กที่มีอยู่ใน ร่างกาย Heinrich แบ่งภาวะโลหิตจางเนื่องจากการขาดเหล็กออกเป็นระดับต่าง ๆ ไว้ดังรูปที่ 5

การวินิจฉัยภาวะโลหิตจางโดยปกติมักดูจากค่าความเข้มของฮีโมโกลบิน ลักษณะของเม็ดเลือดแดง ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และดัชนีเม็ดเลือดแดงต่าง ๆ ซึ่งมีปริมาตรของเม็ดเลือดแดงเฉลี่ย (MCV) ปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง 1 เม็ด (MCH) และความเข้มเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCHC) ดัชนีเหล่านี้ไม่ได้แสดงถึงภาวะของเหล็กโดยตรง และจะบ่งชี้ความผิดปกติเมื่อมีอาการของโลหิตจางแล้ว

รูปที่ 5 ระดับความรุนแรงของการขาดเหล็ก และข้อบ่งชี้ที่ใช้แยกระดับความรุนแรงในชาย และหญิง (Heinrich 1975)



ผู้ที่อยู่ในภาวะโลหิตจางเนื่องจากการขาดเหล็ก จะมีระดับความเข้มข้นของเฟอริตินในซีรัมตั้งแต่ 1 – 14 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 3.4 ถึง 7.2 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (Addison และคณะ 1972 ; Jacobs และคณะ 1972 ; Lipschitz , Cook และ Finch 1974 ; Siimes Addiego และ Dallman 1974 ; Leyland และคณะ 1975) ระดับความเข้มข้นนี้จะต่ำกว่าระดับในชายและหญิงปกติอย่างมีนัยสำคัญ

Bentley และ Jacobs พบว่าเมื่อให้การรักษาผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะโลหิตจางเนื่องจากการขาดเหล็กที่ไม่มีภาวะอื่นแทรกซ้อน โดยการให้เหล็กเสริม เฟอริตินในซีรัมจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 ระยะ (Bentley และ Jacobs 1975) ในระยะแรกเฟอริตินจะเพิ่มขึ้นถึงระดับ 30 – 40 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

แล้วคงที่อยู่ในระดับนี้จนความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในเลือดสูงขึ้นถึงระดับปกติเฟอริตินในซีรัมจึงเพิ่มขึ้นอีกระยะหนึ่ง รายงานนี้ชี้แนะว่า น่าจะใช้ระดับเฟอริตินในซีรัมติดตามผลการรักษาได้ แต่อย่างไรก็ตามเฟอริตินที่เพิ่มขึ้นในระยะแรก ไม่ได้แสดงถึงภาวะของเหล็กสะสมโดยตรง เนื่องจากเหล็กส่วนใหญ่ที่ผู้ป่วยได้รับจะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ฮีโมโกลบิน

ข. ภาวะโลหิตจางเนื่องจากความผิดปกติอื่น ๆ

การแยกภาวะโลหิตจางเนื่องจากการขาดเหล็ก และโลหิตจางเนื่องจากความผิดปกติเรื้อรังชนิดอื่น ทำได้ค่อนข้างยากถ้าไม่ใช้ระดับเฟอริตินในซีรัมเป็นดัชนีบ่งชี้ ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะเม็ดเลือดแดง ปริมาณเหล็กในซีรัมไม่มีความแตกต่างกัน ถึงแม้ว่าความสามารถในการจับเหล็ก (Iron binding capacity) จะแตกต่างกันบ้าง แต่ไม่แน่นอนทุกราย

ภาวะทั้งสองนี้จะแยกออกจากกันชัดเจน เมื่อใช้ระดับเฟอริตินในซีรัมเป็นดัชนี ทั้งนี้เพราะภาวะโลหิตจางเนื่องจากการขาดเหล็กมีระดับเฟอริตินเฉลี่ยต่ำกว่า 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ส่วนภาวะโลหิตจางเนื่องจาก ความผิดปกติเรื้อรังที่มีอาการอักเสบ จะมีระดับเฟอริตินในซีรัมเฉลี่ย 305 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (Lipschitz , Cook และ Finch 1974) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน

ค. ภาวะเหล็กเกิน

ผู้ป่วยฮีโมโครมาโตซีส (Hemochromatosis) ที่ไม่ได้รับการรักษาจะมีระดับเฟอริตินในซีรัมอยู่ในช่วง 1,290 – 8,300นาโนกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อได้รับการรักษาแล้วระดับเฟอริตินจะลดลง (Prieto , Berry และ Sherlook 1975)

ผู้ป่วยที่ได้รับเลือดหลาย ๆ หน่วยจะมีการสะสมเหล็กมากขึ้น เป็นผล

ให้มีการเปลี่ยนแปลงของระดับเฟอริตินในซีรัม (Jacobs และคณะ 1972 ; Leyland และคณะ 1975) และการเปลี่ยนแปลงจะมีความสัมพันธ์โดยตรง กับ log ของจำนวนหน่วยเลือดที่ได้รับ (Letsky และคณะ 1974)

นอกจากภาวะต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้ว ยังมีรายงานที่แสดงถึงความผิดปกติของระดับเฟอริตินในซีรัมในภาวะอื่น ๆ อีก เช่น ในคนที่เป็นโรคตับเรื้อรังและเฉียบพลัน มีระดับเฟอริตินสูงขึ้นถึง 27,600 นาโนกรัม/มิลลิลิตรและปริมาณที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับเอ็นไซม์ทรานสอามิเนสในซีรัม (Reissman และ Dietrich 1956) นอกจากนี้ Niitsu และคณะพบว่า 2 ใน 3 ของผู้ป่วยคาร์สิโนมา (Carcinoma) และผู้ป่วยมัลติเปิลมัยอิโลมา (Multiple myeloma) และลิวคีเมีย (Leukemia) ประมาณร้อยละ 90 มีระดับเฟอริตินในซีรัมสูงขึ้นกว่าระดับปกติ (Niisu และคณะ 1975) ในผู้ป่วยโรคฮอดกิน (Hodgkin's disease) ก็มีระดับเฟอริตินในซีรัมสูงขึ้น สำหรับผู้ป่วยโรคซาลาสซีเมีย (disease form) มีปริมาณเฟอริตินในซีรัมเฉลี่ยสูงถึง 850 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (Siimes , Addiego และ Dallman 1974)

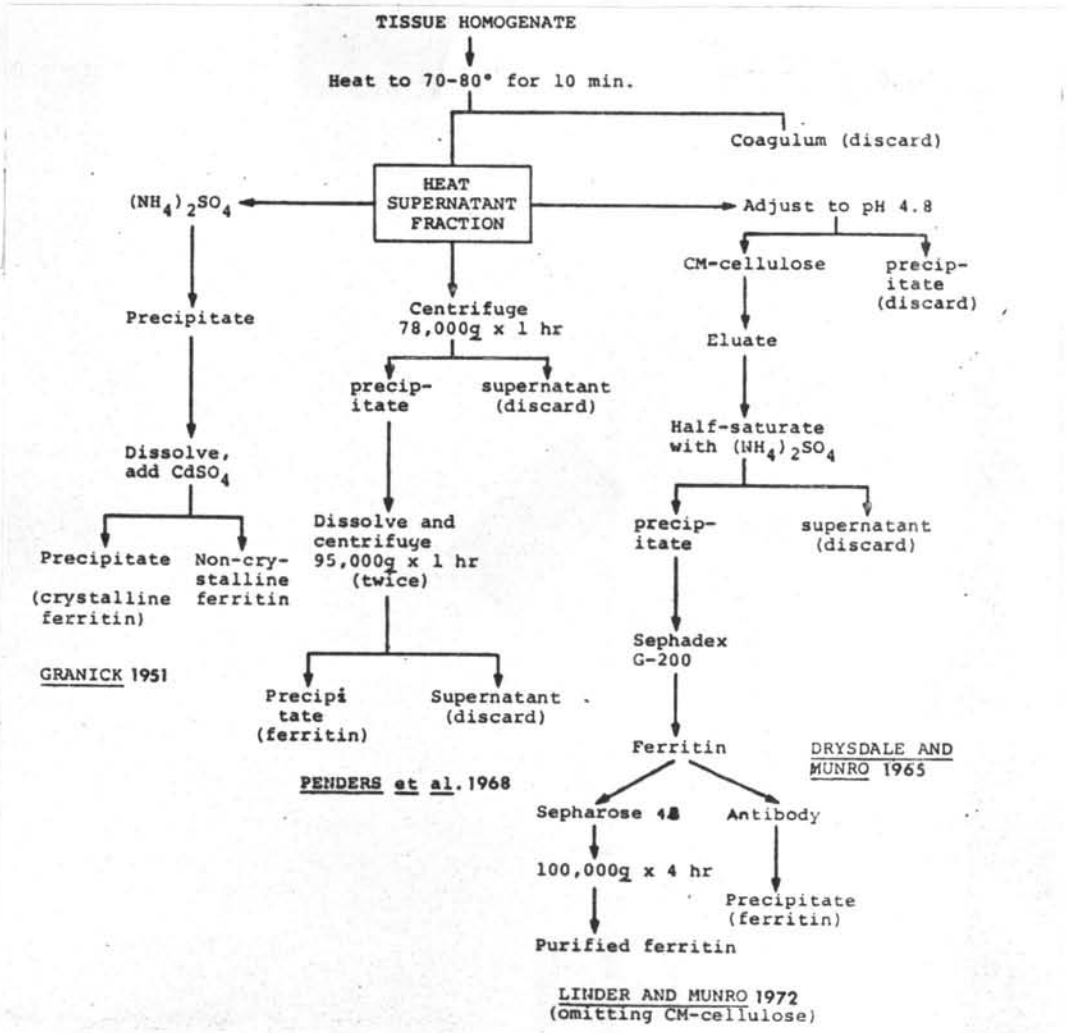
1.6 <u>การสกัดแยกเฟอริตินจากเนื้อเยื่อ</u>

เฟอริตินเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 430,000 – 490,000 ดาลตัน ทนต่อความร้อนได้ถึง 70 – 80 องศาเซลเซียส ทนต่อความเป็นกรดด่าง ตั้งแต่ pH 3.1 – 11.0 คุณสมบัติเหล่านี้มีประโยชน์ในการสกัดแยกเฟอริตินจากเนื้อเยื่อต่าง ๆ

ปัจจุบันมีวิธีการสกัดแยกเฟอริตินจากเนื้อเยื่อหลายวิธีซึ่งสามารถจำแนกออกเป็นกลุ่มวิธีใหญ่ ๆ ดังรูปที่ 6

วิธีแรกใช้หลักการตกตะกอนโปรตีนชนิดอื่นที่อุณหภูมิ 70 – 80 องศาเซลเซียส และตกตะกอนเฟอริตินในส่วนใสที่ได้ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตะ

กอนเฟอริตินละลายและตกตะกอนใหม่ด้วยแคดเมียมซัลเฟต



รูปที่ 6 การสกัดแยกเฟอริตินจากเนื้อเยื่อโดยวิธีต่าง ๆ (Munroและ Linder 1978)

วิธีที่สอง ใช้หลักการปั่นด้วยแรงหนีศูนย์กลาง (Pender และคณะ 1968) หลังจากตกตะกอนโปรตีนชนิดอื่นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส วิธีนี้จะให้เฟอริตินที่มีปริมาณเหล็กในโมเลกุลสูง

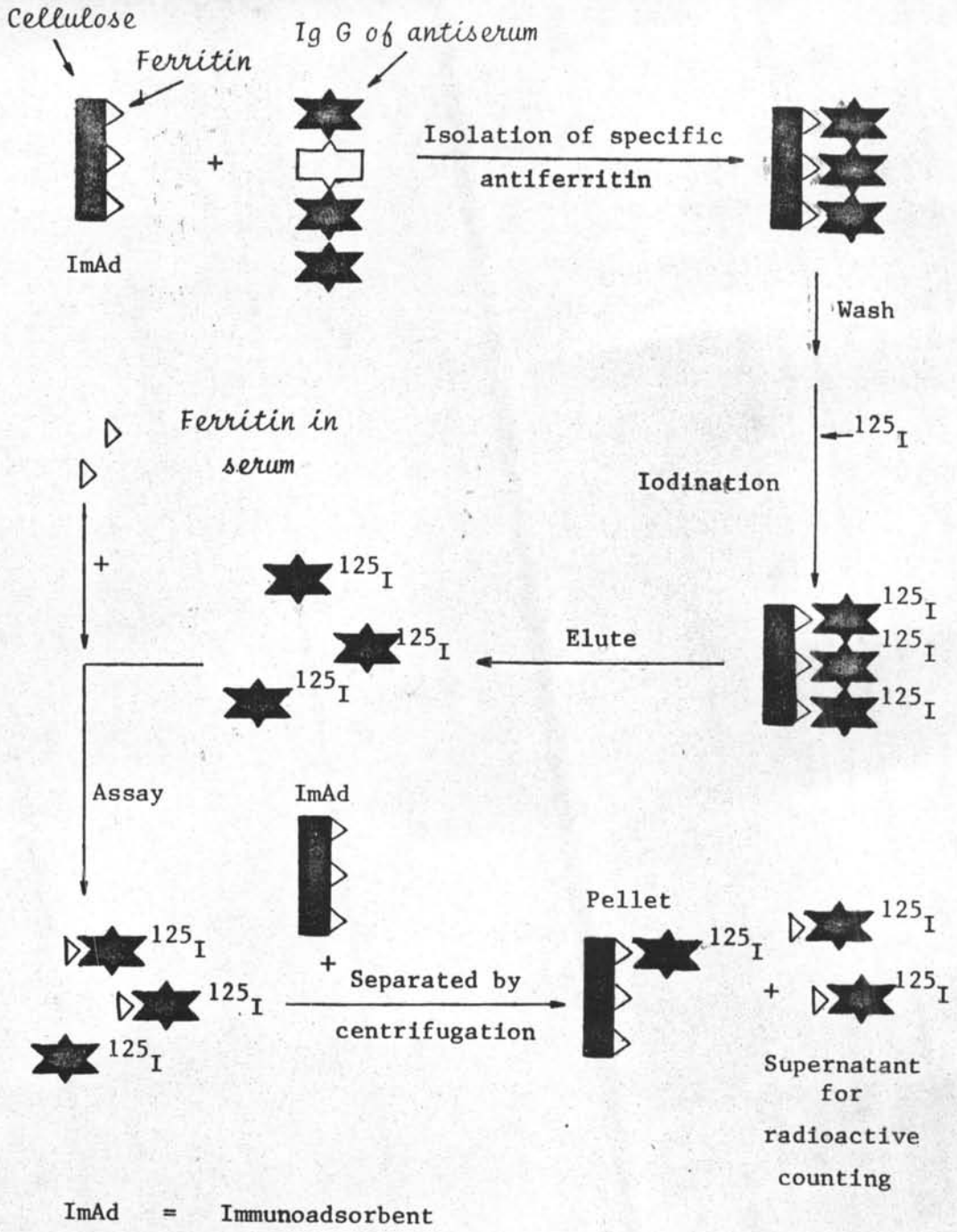
วิธีที่สาม เป็นวิธีผสมของสองวิธีแรก โดยเพิ่มการตกตะกอนด้วยกรด

ที่ pH 4.8 ดูดซับเฟอริตินด้วยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G 200 วิธีนี้ Linder และ Munro พบว่าไม่จำเป็นจะต้องใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Linder และ Munro 1972) นอกจากนี้ Worwood และคณะ แนะนำว่าถ้าใช้คอลัมน์เซฟาโรส 6 B แทนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G200 จะได้เฟอริตินที่มีความบริสุทธิ์สูง เมื่อสกัดจากเนื้อเยื่อของคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเนื้อเยื่อจากไตและหัวใจ

1.7 <u>การวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัม</u>

ก่อนปี ค.ศ. 1972 มีรายงานการพบเฟอริตินในซีรัมของผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของตับอย่างรุนแรง และในโรคฮอดกินเท่านั้น (Reisman และ Dietrich 1956 ; Aungst 1966) ทั้งนี้อาจเนื่องจากเทคนิคที่ใช้คืออิมมิวโนดิฟฟิวส์ชัน มีความไวสูงไม่พอ สำหรับการตรวจเฟอริตินในซีรัมของคนปกติและผู้ป่วยที่ขาดเหล็ก จนกระทั่ง Addison และคณะ เริ่มใช้เทคนิคที่เรียกว่าอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์ (IRMA) ในการตรวจวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัมเป็นครั้งแรกจึงตรวจพบเฟอริตินในซีรัมของคนปกติ และผู้ป่วยที่ขาดเหล็ก (Addison และคณะ 1972)

วิธีอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์ ที่ใช้ในการวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัมมีหลักการที่แสดงในรูปที่ 7 คือให้เฟอริตินในตัวอย่างทำปฏิกริยารวมตัวกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเฟอริตินและติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี แล้วดูดซับสารติดฉลากแอนติเฟอริตินอิสระที่เหลือด้วยเฟอริตินอิมมิวโนแอดสอบเบนท์ ซึ่งแยกออกจากส่วนใสได้ด้วยการปั่น ปริมาณกัมมันตภาพรังสีที่เหลืออยู่ในสารละลายส่วนใส คือปริมาณกัมมันตภาพรังสีของสารติดฉลากแอนติเฟอริตินที่รวมตัวอยู่กับเฟอริติน ซึ่งจะเป็นปฏิภาคกับปริมาณเฟอริตินในตัวอย่าง ขอสรุปของขั้นตอนต่าง ๆ ในการวัดปริมาณเฟอริตินด้วยวิธีอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์ เป็นดังนี้คือ



รูปที่ 7 หลักการติดฉลากแอนติเฟอริตินและวิธีวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัมโดยวิธีอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์

ก. การแยกแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเฟอริติน

การคัดเลือกแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเฟอริติน (แอนติเฟอริติน) เป็นขั้นตอนที่สำคัญมากขั้นตอนหนึ่ง เนื่องจากซีรัมกระต่ายทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเฟอริตินอาจมีแอนติบอดีอื่น ๆ ที่ไม่จำเพาะต่อเฟอริตินปนอยู่ แต่แอนติเฟอริตินที่ใช้จำเป็นต้องมีความบริสุทธิ์สูง การคัดเลือกทำได้โดยใช้เฟอริตินอิมมิวโนแอดสอบเบนท์เป็นตัวดูดซับแอนติเฟอริตินที่มีอยู่ในแอนติซีรัม โดยทั่วไปอิมมิวโนแอดสอบเบนท์ที่ใช้ นิยมเตรียมจากการรวมตัวของแอนติเจน (เฟอริติน) กับไดเอโซเซลลูโลส (Gurvich และคณะ 1962) หรือ CNBr - เซลลูโลส (Hendrick และ Franchimont 1972) หรือ CNBr - เซฟาโรส (Gonyea 1977) หลังจากเฟอริตินอิมมิวโนแอดสอบเบนท์ดูดซับแอนติเฟอริตินเต็มที่แล้ว จึงล้างแอนติบอดีที่ไม่จำเพาะออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ จะได้แอนติเฟอริตินที่มีความจำเพาะสูงติดอยู่บนโมเลกุลของเฟอริตินอิมมิวโนแอดสอบเบนท์

ข. การติดฉลากแอนติเฟอริติน

โดยทั่วไปนิยมติดฉลากแอนติเฟอริตินที่ติดอยู่บนโมเลกุลของ อิมมิวโนแอดสอบเบนท์ด้วยสารรังสีไอโอดีน-125 (Greenwood , Hunter และ Glover 1963) สารรังสีไอโอดีน-125 ที่ใช้ประมาณ 2 มิลลิคูรี ต่อการติดฉลากโปรตีน 50 ไมโครกรัม เนื่องจากเชื่อกันว่าการติดฉลากมากเกินไป อาจมีผลทำให้แอนติเฟอริตินเสียสภาพธรรมชาติไป (Addison และคณะ 1972)

ปฏิกริยาการติดฉลากไอโอดีน-125 ทำได้โดยใช้ปฏิกริยา ออกซิเดชันที่หมู่ไฮดรอกซีของไทโรซีน ด้วยคลอรามีน-ที หรือสารออกซิแดนท์บางชนิด เช่น เลคโตเปอร์ออกซิเดส สารละลายคลอรีน หรือโซเดียมไฮโปคลอไรด์ หรือปฏิกริยาคอนจูเกชันที่หมู่อะมิโนตำแหน่ง ϵ ของไลซีน ที่เป็นองค์ประกอบของแอนติเฟอริติน ด้วยสารติดฉลากไฮดรอกซีซัคซินิไมด์เอสเตอร์ของกรดไฮดรอกซีฟีนิลโพพิโอนิค (Bolton และ Hunter 1973)

หลังการตกตะกอนแยกไอโอดีน-125 ที่เหลือและสารตกตะกอนที่เสียสภาพธรรมชาติด้วยการล้างบนกระดาษกรองด้วยบัฟเฟอร์ และแยกสารตกตะกอนแอนติเฟอริตินโดยการทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างแอนติเฟอริตินกับเฟอริตินบนโมเลกุลของอิมมิวโนแอดสอบเบนท์ ด้วยสารละลายที่มีความเป็นกรด pH 3 และ 2 เก็บสารตกตะกอนแอนติเฟอริตินบริสุทธิ์ในรูปที่รวมตัวกับเฟอริตินอิมมิวโนแอดสอบเบนท์

ค. <u>การตรวจวัดปริมาณเฟอริติน</u>

อาศัยปฏิกริยาทางอิมมิวโนระหว่างเฟอริตินในซีรัมตัวอย่าง กับสารตกตะกอนแอนติเฟอริตินอิสระที่มีมากเกินพอ หลังจากเกิดปฏิกริยาจนถึงจุดสมดุลย์ แยกสารตกตะกอนแอนติเฟอริตินอิสระที่เหลือออกด้วยเฟอริตินอิมมิวโนแอดสอบเบนท์ และการปั่นแยกด้วยแรงหนีศูนย์กลาง นับปริมาณกัมมันตภาพรังสีที่มีอยู่ ในสารละลายส่วนใสซึ่งจะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของเฟอริตินในซีรัมตัวอย่าง

ข้อดีของวิธีอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์ คือใช้สารตกตะกอนแอนติบอดีซึ่งเป็นโปรตีนที่มีไทโรซีนเป็นองค์ประกอบของโมเลกุลมากพอควร สารตกตะกอนแอนติบอดีจึงมีไอโอดีน-125 ติดอยู่บนโมเลกุลของแอนติบอดีในอัตราส่วน ที่สูง เป็นผลให้วิธีนี้มีความไวของการวัดสูงกว่าวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ โดยเฉพาะในสารโมเลกุลใหญ่ เช่น เฟอริติน (Addison และคณะ 1972) นอกจากนี้สารตกตะกอนแอนติบอดียังมีความคงทน และสามารถเก็บในรูปที่รวมตัวกับอิมมิวโนแอดสอบเบนท์ได้เป็นเวลานาน

1.8 <u>วัตถุประสงค์ของการวิจัย</u>

เนื่องจากเฟอริตินเป็นสารที่มีความสำคัญในร่างกายดังกล่าวมาแล้วข้างต้น และระดับของเฟอริตินในซีรัมอาจเป็นเครื่องบ่งชี้ให้เห็นความผิดปกติของสภาวะเหล็กของร่างกาย ผู้เสนอวิทยานิพนธ์จึงมีจุดประสงค์ ที่จะพัฒนาเทคนิคการวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัมของคนด้วยวิธีอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์ โดยเตรียม

000359

สารต่าง ๆ ที่เป็นส่วนสำคัญในการวัดปริมาณเฟอริตินชื้นใช้เองโดยไม่ต้องอาศัยน้ำยาสำเร็จรูปจากต่างประเทศซึ่งราคาสูง อันเป็นข้อจำกัดสำคัญที่เป็นสาเหตุทำให้การใช้ประโยชน์จากระดับเฟอริตินในซีรัมไม่แพร่หลายในประเทศไทย

เมื่อได้วิธีที่มีประสิทธิภาพในการวัดสูงแล้ว จึงใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ทดลองวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัมของคนปกติ และซีรัมของผู้ป่วยด้วยโรคเกี่ยวกับ โลหิตบางชนิด

รายงานนี้น่าจะเป็นประโยชน์ในอันที่จะส่งเสริม ให้มีการใช้ระดับเฟอริตินในซีรัมให้แพร่หลายขึ้น และเป็นจุดเริ่มต้นสำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ เฟอริติน