บทนำ

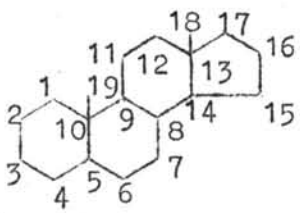
1. ประวัติของเอสโตรเจน (Estrogens)

ในปี ค.ศ. 1923 Allen และ Doisy ได้ทำการทดลองฉีดสารซึ่งสกัดจาก Ovarian follicles เข้าในหนูซึ่งถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้าง และพบว่าหนูมีวงจรสืบพันธุ์ (Estrous cycle) กลับคืนมาได้ ต่อมา Aschheim และ Zondek (1927) พบว่าปัสสาวะของหญิงมีครรภ์ก็มีสารออกฤทธิ์อย่างเดียวกับสารซึ่ง Allen และ Doisy ค้นพบและยังมีอยู่เป็นจำนวนมากด้วย การค้นพบเหล่านี้ได้กระตุ้นให้มีการศึกษาคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีของสารชนิดนี้เพิ่มขึ้นอีกมาก Funk (1929) พบว่าสารชนิดนี้ละลายได้ในสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นด่าง จึงให้สมมติฐานว่าสารนี้มี phenolic group ในปีเดียวกันนี้เอง Butenandt และ Doisy ต่างก็สามารถตกผลึกสารนี้จากสกัดปัสสาวะของหญิงมีครรภ์ และได้อธิบายคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสารนี้ นอกจากนั้นยังพิสูจน์ได้ว่า สูตรทางเคมีเป็น $C_{18}H_{22}O_2$ และได้ให้ชื่อว่า เอสโตรน (Estrone) ในปี ค.ศ. 1930 Marrian พบว่าผลึกที่ได้จากสกัดปัสสาวะของหญิงมีครรภ์มีลักษณะแตกต่างจากเอสโตรน ต่อมาสามารถพิสูจน์ได้ว่ามีสูตรทางเคมีเป็น $C_{18}H_{24}O_3$ ซึ่งแสดงว่าสารนี้มี hydroxylic group 3 groups และได้ให้ชื่อว่า เอสตริออล (Estriol) ต่อจากนั้นมาก็มีผู้สามารถสกัดเอสตราไดออล ได้จาก follicular fluid ของรังไข่สุกร (Mac. Corquodale และคณะ, 1935) ในปี ค.ศ. 1936 The Council on Pharmacy and Chemistry of the American Medical Association ได้เสนอให้เอสโตรเจน เป็นชื่อรวมของสารซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของวงจรสืบพันธุ์ ต่อมา Huffman และคณะ (1940) ก็สกัดเอสตราไดออล ได้จากปัสสาวะของหญิงมีครรภ์

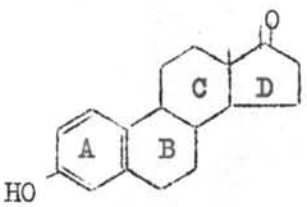
เอสโตรเจน ซึ่งสกัดได้จากปัสสาวะมีทั้งสิ้น 23 ชนิด (Preedy 1968) เอสโตรเจน ซึ่งมีปฏิกิริยาทางสรีรวิทยาของระบบสืบพันธุ์ และมีปริมาณมากกว่าชนิดอื่น ๆ คือเอสโตรน (E_1) เอสตราไดออล (E_2) และเอสตริออล (E_3) จึงนิยมเรียกสารทั้ง 3 ชนิดนี้รวมกันว่า classical estrogens

2. สูตรโครงสร้างทางเคมี

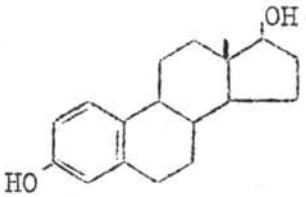
Classical estrogens มีสูตรโครงสร้างเป็น steroid nucleus ประกอบด้วยคาร์บอน 18 อะตอม มี ring A เป็น aromatic ring คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 มี hydroxylic group ซึ่งแสดงคุณสมบัติ phenolic คือ เป็นกรดอ่อนละลายได้ในสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นด่าง คาร์บอนตำแหน่งที่ 17 มี ketonic หรือ hydroxylic group นอกจากนี้อาจมี hydroxylic group ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 16 ได้ (รูปที่ 1)



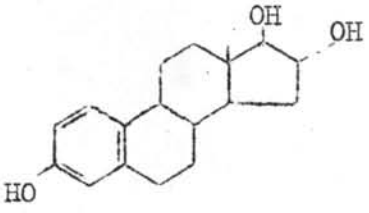
Steroid nucleus



E_1



E_2



E_3

รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Steroid mucleus, E_1 , E_2 และ E_3

3. แหล่งสังเคราะห์เอสโตรเจนในร่างกาย

3.1 รังไข่ (ovary)

เอสโตรเจนหลั่งออกมาจากเซลล์ของชั้น theca interna และ granulosa

ของ follicles ซึ่งเจริญเติบโตเต็มที่ (Ryan และ Petro 1966) และยังสังเคราะห์จาก corpus luteum ด้วย (Short 1964) เอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากรังไข่ส่วนมากเป็น E_1 และ E_2 (Mikhail 1967) Abraham และ Chakmakjian (1973) ได้ศึกษาระดับสเตอรอยด์ในระหว่างรอบประจำเดือนของสตรีที่ถูกตัดต่อมหมวกไตออกทั้งสองข้าง พบว่ารูปลักษณะ (pattern) ของ E_2 ในระหว่างรอบประจำเดือนเหมือนกับสตรีที่ปกติ และระดับความเข้มข้นของ E_2 ที่วัดได้ก็ใกล้เคียงกัน ส่วนปริมาณ E_1 ค่อนข้างต่ำ ยกเว้นในระยะกลางรอบเดือนจะมีค่าระหว่าง 100 – 150 พิโกกรัมต่อ 1 มล.

3.2 รก (placenta)

เอสโตรเจนที่สังเคราะห์ในรกส่วนมากเป็น E_3 Diczfalusy และ Lindkvist (1956) สกัดเอสโตรเจนจากรกของคน และพบว่า E_3 มีปริมาณ 314 ไมโครกรัมต่อเนื้อรก 1 กก. ส่วน E_1 และ E_2 มีปริมาณ 51 และ 170 ไมโครกรัมต่อเนื้อรก 1 กก. ตามลำดับ และในระยะไม่นานมานี้ได้มีรายงานเสนอว่า ระดับ E_3 ในเลือดของสตรีตั้งครรภ์สูงกว่าระดับ E_1 และ E_2 รวมกันถึง 8 เท่า (Tulchinsky 1973)

3.3 เปลือกต่อมหมวกไต (adrenal cortex)

Simpson และ Joll (1938) พบว่าคนไข้ที่ป่วยด้วยโรคเนื้องอกที่ต่อมหมวกไตมีเอสโตรเจนขับออกมาทางปัสสาวะมากกว่าปกติ จึงให้ข้อสันนิษฐานว่าเอสโตรเจนในผู้ป่วยเหล่านี้สังเคราะห์มาจากเปลือกต่อมหมวกไต รายงานนี้ได้รับการยืนยันจากการศึกษาในระยะต่อมา (Dohan และคณะ, 1953) นอกจากการค้นพบเหล่านี้ ยังมีหลักฐานทางอ้อมซึ่งสนับสนุนว่าเอสโตรเจนสังเคราะห์ได้จากเปลือกต่อมหมวกไต คือ Bulbrook และ Greenwood (1957) สามารถพิสูจน์ได้ว่าในปัสสาวะของสตรีซึ่งตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างมีเอสโตรเจน

3.4 อัณฑะ (Testes)

เนื้อเยื่ออัณฑะสังเคราะห์ E_2 ได้ (Wotiz และคณะ, 1955 กับ Rabinowitz 1956) และยังพบ E_1, E_2 และ E_3 ในน้ำอสุจิของคน (Human semens) (Diczfalusy 1954)

ต่อมาได้มีการพิสูจน์โดยใช้ radioactive precursor อินคิวเบทกับเนื้อเยื่ออัณฑะจะได้ radioactive estrogens และเมื่อวัดปริมาณ E_2 ใน spermatic vein และ inferior vena cava ด้วยวิธี radioimmunoassay (RIA) พบว่า E_2 ใน spermatic vein มีค่าสูงกว่า inferior vena cava แสดงว่า E_2 สังเคราะห์ในอัณฑะด้วย (Longcope และคณะ, 1969, 1972 และ Saez และคณะ, 1972)

4. <u>การสังเคราะห์ชีวโมเลกุล (biosynthesis) เมตาโบลิสม (metabolism) และกลไกการหลั่งเอสโตรเจนในร่างกาย</u>

Smith และ Ryan (1962), Dorfman (1963) และ Dorfman กับ Ungar (1965) ได้ศึกษาขบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจนในรังไข่ ซึ่งสรุปเขียนเป็นแผนภูมิได้ดังรูปที่ 2

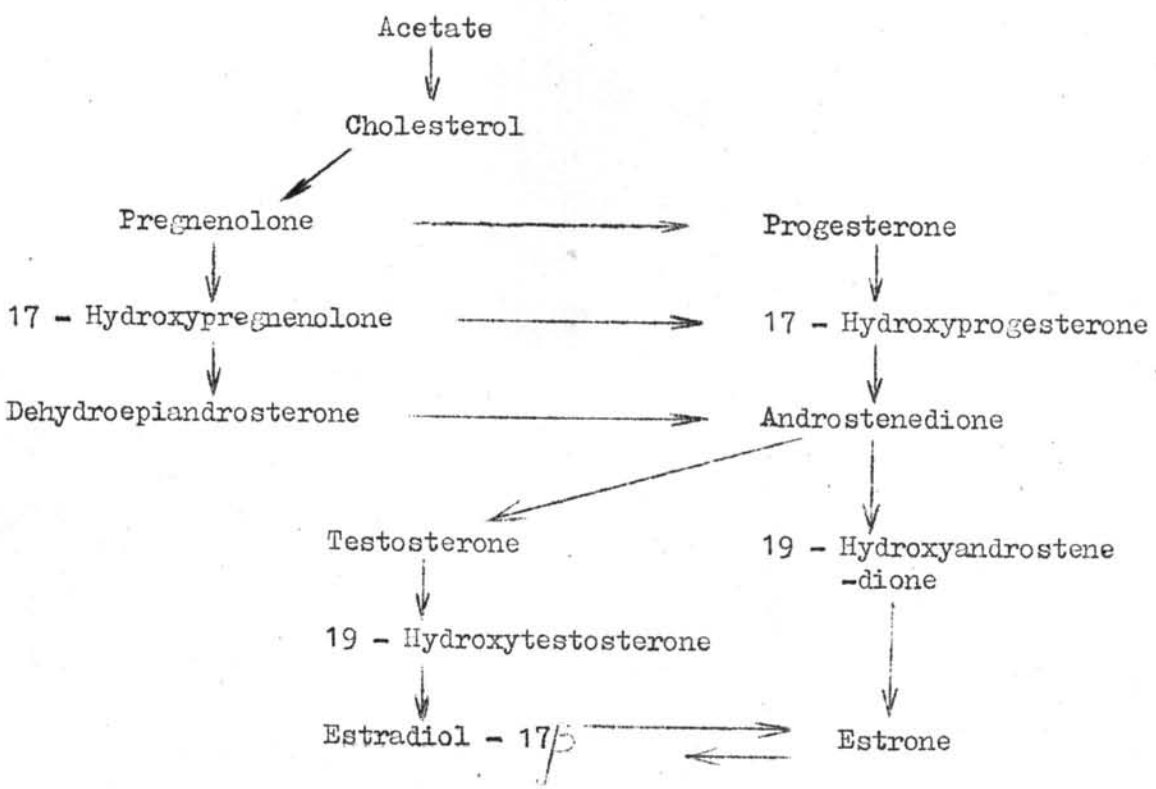
กลไกซึ่งควบคุมการหลั่งเอสโตรเจนในร่างกายเกิดขึ้นตามลำดับดังต่อไปนี้

Hypothalamus หลั่ง follicle stimulating hormone releasing hormone (FSH - RH) และ luteinizing hormone releasing hormone (LH - RH) (McCann และคณะ, 1968, McCann 1970) มากระตุ้นต่อมใต้สมองให้หลั่ง follicle stimulating hormone (FSH) และ luteinizing hormone (LH) FSH จะช่วยให้ follicles เจริญเติบโตได้เต็มที่ (Schwartz และ Waltz 1970) ส่วน LH จะกระตุ้นให้ follicle ซึ่งเจริญเติบโตเต็มที่แล้วหลั่งเอสโตรเจน (Velardo 1958) ดังนั้นระดับของเอสโตรเจนในเลือดจึงขึ้นอยู่กับระดับของ gonadotropins ต่าง ๆ ดังกล่าวมาแล้ว (Vende Weile และคณะ, 1970)

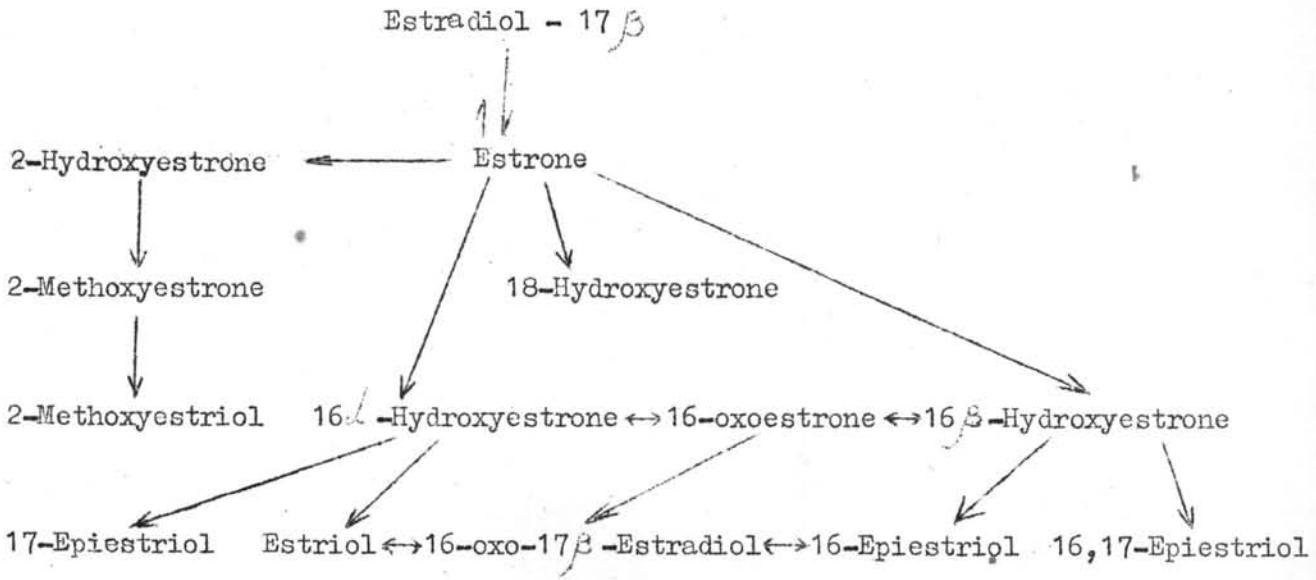
เอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากรังไข่ ส่วนมากเป็น E_2 และมี E_1 รวมด้วยบ้างเล็กน้อย แต่เมื่ออยู่ในกระแสโลหิต E_2 จะถูกเปลี่ยนไปเป็น E_1 ถึง 90% และ E_1 กลับคืนไปเป็น E_2 เพียง 50% เท่านั้น (Gurpide และคณะ, 1963) เอสโตรเจนในกระแสโลหิตจะอยู่ในรูปอิสระ และบางส่วนจะจับกับโปรตีน เอสโตรเจนที่จับกับโปรตีนจะอยู่ในระดับสมดุลย์กับ

เอสโตรเจนอิสระ (Nocenti 1968) เอสโตรเจนอิสระจะออกฤทธิ์ต่ออวัยวะเป้าหมาย และกระตุ้นต่อมใต้สมองหลั่ง LH เพิ่มขึ้น (Docke และ Dorner 1965, Vende Wiele และคณะ, 1970 และ Labhsetwar 1970) LH ที่หลั่งออกมานี้จะทำให้ไข่ตก (Yussman และ Taymor 1970 และ Abraham และคณะ, 1972)

ตับเป็นแหล่งเมตาโบลิสมที่สำคัญของเอสโตรเจน เอสโตรเจนอิสระส่วนหนึ่งจะถูกตับทำลาย โดยเปลี่ยน E_2 เป็น E_1 (Fishman และคณะ, 1960) และเปลี่ยน E_1 ต่อไปเป็น E_3 และเมตาโบไลท์อื่น ๆ (รูปที่ 3) ตับจะ conjugate เอสโตรเจนอิสระกับกรดกำมะถัน หรือ glucuronic acid ได้ผลลัพธ์เป็นสารซึ่งมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี จึงถูกขับออกมาทางปัสสาวะ



รูปที่ 2 การสังเคราะห์ E_1 และ E_2 ในรังไข่ (Smith และ Ryan 1962)



รูปที่ 3 เมตาโบลิสมของเอสโตรเจน (Preedy 1968)

หน้าที่สำคัญของเอสโตรเจนคือ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะเฉพาะของเพศหญิงในระยะเข้าสู่วัยสาว ในระยะนี้จะพบว่ารางกายของเด็กหญิงหลั่งเอสโตรเจนมากกว่าเด็กชาย ทำให้มีการเจริญเติบโตของระบบสืบพันธุ์ เช่น เต้านม มดลูก และช่องคลอดมีขนาดเพิ่มขึ้นเป็นต้น นอกจากนี้ยังออกฤทธิ์ร่วมกับโปรเจสเตอโรน (Progesterone) ทำให้เยื่อบุผนังมดลูกอยู่ในสภาวะเหมาะสำหรับการฝังตัวของไข่ที่ถูกผสมแล้ว

5. <u>การหาปริมาณเอสโตรเจน</u>

โดยทั่วไปนิยมวัดเอสโตรเจนจากน้ำเหลืองและปัสสาวะ นอกจากนี้ยังอาจวัดปริมาณจากน้ำดี (Adlercreutz 1962, Adlercreutz และคณะ, 1973) และน้ำคร่ำ (aminotic fluid) (Diczfalusy และ Troen 1961)

การวัดปริมาณเอสโตรเจนแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ

5.1 วิธีทางชีวภาพ (Biological methods)

5.2 วิธีทางเคมี (Chemical methods) ซึ่งแบ่งออกเป็น

5.2.1 - Colorimetric methods

5.2.2 - Fluorometric methods

5.2.3 - Gas chromatographic method

5.3 วิธีทางอิมมูโนวิทยา (Immunological methods)

5.3.1 - Radioimmunoassay (RIA)

5.1 วิธีทางชีวภาพ เป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้ในการวัด biological activity ของเอสโตรเจน วิธีนี้อาศัยคุณสมบัติของเอสโตรเจนที่ออกฤทธิ์ต่ออวัยวะเป้าหมาย คือทำให้อวัยวะเป้าหมายของสัตว์ทดลองมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและรูปพรรณสัณฐาน (morphology) Emmens (1962) ได้รวบรวมวิธีการเหล่านี้ไว้ การหาปริมาณเอสโตรเจนด้วยวิธีนี้ให้ประโยชน์ในทางสรีรวิทยา แต่ไม่เหมาะในทางเวชปฏิบัติ เพราะว่าค่าใช้จ่ายในการปฏิบัติสูง สิ้นเปลืองเวลามาก มีความจำเพาะในการวัดต่ำ จึงหาค่าที่ถูกต้องได้ยาก

5.2 วิธีทางเคมี

5.2.1 Colorimetric method

Kober (1931) ทดลองต้มเอสโตรเจนกับสารละลาย phenol ในกรดกำมะถัน ต่อจากนั้นทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นแล้วนำกลับไปต้มใหม่ จะได้สีชมพู ซึ่งมี absorption สูงสุดที่ 520 mμ ปฏิกิริยาเคมีนี้เรียกว่า Kober reaction จึงใช้วิธีนี้วัดปริมาณเอสโตรเจนในธรรมชาติ แต่ค่าที่วัดได้คลาดเคลื่อนเนื่องจากเอสโตรเจนที่สกัดจากปัสสาวะมีสารอื่นเจือปน เมื่อต้มกับ Kober reagent จะมีสีน้ำตาลเกิดขึ้น ทำให้ absorptivity ของสีผิดไปจากสารละลายมาตรฐาน ต่อมามีการดัดแปลงแก้ไขวิธีสกัดและทำให้บริสุทธิ์ก่อนวัดปริมาณ (Brown 1955 และ Bauld 1956) Ittrich (1958) ใช้ 2% p - nitrophenol ใน chloroform สกัดสีเอสโตรเจนที่เกิดจาก Kober reaction สารละลายที่สกัดได้นี้จะเรืองแสงสีเหลืองเมื่อกระทบกับแสงสีเขียว จึงวัดปริมาณเอสโตรเจนได้โดยวิธี colorimetry หรือ fluorometry ปฏิกิริยานี้เรียกว่า Ittrich reaction วิธีการนี้ต่อมาได้มีผู้ดัดแปลงให้เหมาะสมสำหรับวัดเอสโตรเจนในน้ำเหลือง (Roy 1962) และปัสสาวะ (Stoa และ Thorsen 1962, Mahesh 1964,

และ Brown และคณะ, 1968) วิธีนี้มีความไวในการวัด 0.08 ไมโครกรัม/มล. และมีความจำเพาะสูง จึงยังนิยมใช้ในเวชปฏิบัติ แต่ไม่เหมาะสำหรับงานวิจัย เพราะความไวในการวัดยังไม่สูงพอที่จะวัดระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้

5.2.2 Fluorometric method

วิธีนี้อาศัยคุณสมบัติพิเศษของเอสโตรเจน คือเมื่อต้มกับกรดกำมะถัน (Jailer 1948) หรือกรดฟอสฟอริค (Finkelstein 1948) แล้ว จะเรืองแสงสีเหลืองแกมเขียว ความเข้มของแสงที่เรืองจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณเอสโตรเจน วิธีนี้ให้ความไวในการวัดสูงกว่าวิธี colorimetry แต่มีความจำเพาะน้อยกว่า เพราะว่าเอสโตรเจนที่สกัดจากปัสสาวะมีสารเรืองแสงอื่นเจือปน จึงต้องทำให้บริสุทธิ์ด้วย partition chromatography ก่อนวัด (Preedy และ Aitken 1961) ทำให้ยุ่งยากและเสียเวลานาน จึงไม่นิยมใช้

5.2.3 Gas chromatography

Wotiz และ Martin (1961) ใช้ gas liquid chromatography ทำให้เอสโตรเจนอะซีเตรตบริสุทธิ์ ต่อมาได้ดัดแปลงวิธีนี้หาปริมาณเอสโตรเจน (Fishman และ Brown 1962, Wotiz และ Chattoraj 1964, Minini 1965, Knorr และคณะ 1970) วิธีนี้ไม่นิยมใช้ เพราะว่าต้องผ่านขบวนการหลายขั้นตอน ทำให้ใช้เวลามากและค่าใช้จ่ายก็สูงด้วย

5.3 วิธีทางอิมมูโนวิทยา

5.3.1 Radioimmunoassay (RIA)

เนื่องจากปริมาณของฮอร์โมนในน้ำเหลืองมีน้อยมาก เป็นหน่วยแนนโนกรัม (nanogram) หรือ พิโคกรัม (picogram) ถ้าใช้วิธีทางเคมีวัดจะต้องใช้ปริมาณน้ำเหลืองมาก เพราะว่าความไวในการวัดไม่สูงพอ (Ichii และคณะ, 1963) จึงเกิดวิธีการวัดใหม่เรียกว่า RIA ซึ่งอาศัยคุณสมบัติความไวในการวัดปริมาณรังสีร่วมกับคุณสมบัติเฉพาะของแอนติบอดีประกอบกัน จึงทำให้มีความไวและความจำเพาะในการวัดสูง

Yalow และ Berson (1959) ได้ใช้วิธีนี้เป็นครั้งแรกในการวัดปริมาณอินซูลิน (Insulin) วิธีนี้ให้ความไวในการวัดสูง ความจำเพาะ ความแม่นยำ และความถูกต้องในการวัดก็สูงด้วย (Yalow และ Berson 1968)

หลักโดยทั่ว ๆ ไปของวิธีนี้มีดังนี้ คือ.-

1. ถ้า S เป็นสารที่ต้องการวัดปริมาณ เช่น สเตอรอยด์ฮอร์โมน โปรตีนฮอร์โมน เป็นต้น

2. P เป็น specific binding protein ซึ่งสามารถจับกับสาร S เกิดเป็น bound complex (B) P อาจเป็นโปรตีนในน้ำเหลือง เช่น Transcortin (Murphy 1964) Thyroxin binding globulins (Ekins 1960) หรือ แอนติบอดี ซึ่งเป็นพวก immunoglobulins (Abraham 1969) หรือ Tissue protein เช่น rabbit uterine cytosol (Korenman และคณะ, 1969)

เมื่อ S ทำปฏิกิริยากับ P ซึ่งความเข้มข้นคงที่ ขณะปฏิกิริยาถึงสมดุลย์แล้ว จะเขียนเป็นสมการอย่างง่ายได้ดังนี้

$$P + S \rightleftharpoons PS$$

จากสมการ ความเข้มข้นของ P คงที่ เพราะฉะนั้นการเกิด PS จึงขึ้นกับ S ดังนั้น เพื่อที่จะวัดปริมาณสาร S จะต้องมีสาร *S ซึ่งเป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเหมือนสาร S แต่ต่างกันที่ *S เป็นสารติดสลากรังสี (labelled compound) S และ *S ควรจะทำปฏิกิริยาเคมีกับสาร P ได้เหมือนกัน (Ekins และ Newman 1970) สาร *S ที่เพิ่มเข้ามาจะต้องมีปริมาณไม่มากนัก เพราะว่าถ้า *S มากความไวในการวัดจะลดลง (Yalow และ Berson 1971) เมื่อมีสาร *S เพิ่มเข้ามาในปฏิกิริยาเคมี สมการเคมีจึงเขียนใหม่ ดังนี้

$$\underbrace{S + {}^*S}_{\text{free form(F)}} + P \rightleftharpoons \underbrace{SP + {}^*SP}_{\text{bound form(B)}}$$

จากสมการ *S และ P มีความเข้มข้นคงที่ ถ้ามี S มากขึ้นการเกิด SP ก็มากทำให้ *SP ลดลง และ *S เพิ่มมากขึ้น อัตราการลดของ *SP เป็นสัดส่วนกับ S ที่เพิ่มขึ้น ดังนั้น ความเข้มข้นของสารตัวอย่างจะหาได้โดยการเปรียบเทียบ *SP ที่ได้กับ *SP ที่เกิดกับสารละลายมาตรฐาน

การแยก B ออกจาก F ต้องเลือกวิธีการให้เหมาะสมซึ่งขึ้นกับชนิดของ protein complex และชนิดของสารที่จะวัด (Murphy 1968 และ Abraham 1974) เทคนิคการแยกมีหลายวิธี การที่จะเลือกวิธีใดนั้น อาจพิจารณาได้ดังนี้ (Ratcliffe 1974)

1. ต้องแยก B ออกจาก F ได้อย่างหมดจด เพราะว่าถ้าแยกไม่ดีจะทำให้ความไวในการวัดลดลง และความแม่นยำในการวัดจะลดลงด้วย
2. วิธีที่ใช้ต้องทำได้ง่าย รวดเร็ว และราคาถูก
3. เครื่องมือหรือสารเคมีสามารถหาได้โดยง่าย

วิธี RIA นี้ กำลังเป็นที่นิยมแพร่หลาย สเตอรอยด์ฮอร์โมนหลายชนิดสามารถวัดได้ด้วยวิธี RIA Abraham (1969) ใช้ solid phase radioimmunoassay หาปริมาณ E_2 โดยใช้แอนตีซีรัมเคลือบไว้บนผิวของหลอดแก้ว เมื่อปฏิกิริยาถึงสมดุลย์ ส่วนของ B จะจับติดผนังของหลอดแก้ว เทเอาส่วนใสซึ่งเป็น F ไปวัดปริมาณรังสี เขียนกราฟระหว่างค่า F กับสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จะได้กราฟมาตรฐานสำหรับหาค่าของสารตัวอย่าง

Mikhail และคณะ (1970) ใช้ Estradiol - 17β - succinyl - bovine serum albumin เป็นแอนติเจนฉีดเข้าแกะ เพื่อกระตุ้นให้แกะสร้างแอนติเอสตราไดออล แอนติบอดีที่ได้นี้จะมีปฏิกิริยาเคมีกับสเตอรอยด์ชนิดอื่นเพียงเล็กน้อย ยกเว้น E_1 จะมี cross reaction ถึง 35%

Mayes และ Nugent (1970) ใช้ Testosterone binding protein (TBP) ซึ่งได้จากน้ำเหลืองคนท้อง 3 เดือน วัดปริมาณ E_2 วิธีนี้ต้องทำให้ E_2 บริสุทธิ์ก่อนด้วยวิธี chromatography เพราะ TBP นี้ สามารถทำปฏิกิริยากับ 17β -OH ของ C_{18} สเตอรอยด์ด้วยเหตุนี้จึงไม่ค่อยนิยมใช้ เพราะมีขั้นตอนมากทำให้ใช้เวลามากขึ้น

Korenman และคณะ (1969) Corker และ Exley (1970) Hawkins และ Oakey (1972) วัดปริมาณ E_2 โดยใช้ uterine macromolecule ซึ่งได้จาก

กระต่ายที่ตั้งครรภ์ 6 วัน เป็น specific binding protein tissue protein นี้มี cross reaction กับ E_1 23%, E_3 17% และ diethylstilbestrol ถึง 256% (Korenman 1968) เพราะฉะนั้นต้องทำให้บริสุทธิ์ด้วย chromatography ก่อนวัด

ต่อมาได้มีการใช้ hapten conjugate โปรตีนที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 6 เป็นแอนติเจนฉีดเข้าในแกะเพื่อให้เกิด Anti - E_2 เนื่องจากแอนติเจนที่ใช้นี้เป็น Estradiol - 17β - 6 - (O - carboxyl - methyl)- oxime - bovine serum albumin (Anti - E_2 - 6 - CMO - BSA) มีโครงสร้างแตกต่างกับ E_1, E_2 - 17α และ E_3 จึงทำให้แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะสูง มี cross reaction ของ E_1 4.6%, E_2-17α 1% และ E_3 0.4% (Exley และคณะ, 1971; Lindner และคณะ, 1972; Jeffcoate และ Searle, 1972; Kruss และ Goebel 1972) Cameron และคณะ (1972) เปรียบเทียบการวัด E_2 เมื่อใช้แอนติบอดีที่ได้จาก E_2 - 17β - succinyl - BSA. กับ E_2 - 17β - 6 BSA พบว่าเมื่อใช้ Anti - E_2 - 6 BSA จะวัด E_2 ได้โดยไม่ต้องผ่าน chromatography England และคณะ (1974) ได้เปรียบเทียบ site ของ BSA ที่ conjugate กับ E_2 พบว่าตำแหน่งที่ 11 จะให้แอนติบอดีมีความจำเพาะสูงที่สุด แอนติเจนที่ใช้คือ Estradiol 17β - 11β - hemisuccinyl - BSA England และคณะได้อธิบายว่าแอนติบอดีที่ได้จากแอนติเจนที่ conjugate ด้วยโปรตีนที่ตำแหน่ง 6 และ 11 มีความจำเพาะสูง เนื่องจาก ring A และ ring D เป็นอิสระไม่ถูกจับด้วยโปรตีน จึงแสดงลักษณะโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกับสเตอรอยด์ฮอร์โมนอื่น และยังสรุปว่า ถ้าใช้ Anti - E_2 - 6 BSA ต้องทำ chromatography ก่อนวัด เพราะว่าแอนติบอดีนี้มี cross reaction กับ 6 substituted E_2 derivatives

การวัด E_2 โดยวิธี RIA ได้มีวิวัฒนาการให้รวดเร็วขึ้นโดยไม่ต้องผ่าน chromatography ความไวในการวัด ตลอดจนความแม่นยำและความถูกต้องก็สูงด้วย จึงนิยมใช้กันแพร่หลาย

ข้อเสียของวิธีนี้ คือต้องสูญเสียเวลาในการสร้างภูมิคุ้มกัน (Immunization) ในสัตว์

เพื่อให้ได้แอนติซีรัม ซึ่งเป็น specific binding protein

6. ประโยชน์จากการวัดปริมาณ E_2

6.1 ประโยชน์ต่อการวินิจฉัยโรคในสตรี

การวัดอัตราการสังเคราะห์ (production rate) คือ อัตราการสังเคราะห์ฮอร์โมนจากทุกแหล่งในร่างกายต่อหนึ่งวัน จะช่วยให้เข้าใจถึงการทำงานของต่อมไร้ท่อ (endocrine gland) โดยเฉพาะรังไข่ อัตราการสังเคราะห์ E_2 จึงเป็นข้อมูลสำคัญประการหนึ่งที่จะช่วยแพทย์ในการวินิจฉัยโรคทางสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา

6.2 ประโยชน์ต่อการพยากรณ์พยาธิสภาพของมารดาระหว่างตั้งครรภ์และทารกในครรภ์

Svendsen และ Sorensen (1964) พบว่ามารดาที่คลอดบุตรซึ่งมีความพิการทางสมอง (anencephalic fetus) จะมีค่า E_1 และ E_2 ในเลือดต่ำ และพบว่าสตรีที่เป็นโรคเบาหวานในระหว่างตั้งครรภ์จะมีค่า E_1 และ E_2 ในเลือดสูงกว่าปกติ Tulchinsky และ Korenman (1971) ได้สนับสนุนรายงานข้างต้นด้วยการศึกษาจากสตรีที่มีครรภ์ระหว่าง 14 ถึง 20 สัปดาห์ ซึ่งมารับการกระตุ้นให้เกิดการแท้ง และพบว่าหลังจากที่เด็กตาย ระดับ E_2 ในเลือดมารดาจะลดต่ำลงกว่าปกติโดยเฉลี่ยประมาณ 40% สันนิษฐานว่าเนื่องจาก placental insufficiency Sybulski และ Maughan (1972) พบว่าเด็กที่ตายในท้อง Toxemia of pregnancy และ fetal malnutrition ระดับ E_2 ในเลือดต่ำกว่าปกติ การหาปริมาณ E_2 ในสตรีระหว่างตั้งครรภ์จึงให้ประโยชน์ต่อสูติแพทย์

6.3 ประโยชน์ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนเพศ ซึ่งอาจจะเป็นผลเนื่องจากการใช้ยาต่าง ๆ เช่น ศึกษาผลของยาคุมกำเนิด (steroid contraceptive drugs) ที่มีปฏิกิริยาต่อการสังเคราะห์สเตอรอยด์ฮอร์โมน

Diczfalusy (1968) พบว่ายาคุมกำเนิดนอกจากจะระงับการตกไข่แล้ว ยังทำให้ steroidogenesis ลดลง ต่อมา Weisz และคณะ (1973) พบว่าในสตรีที่ใช้ยาคุมกำเนิด

จะมีระดับ E_2 ในรังไข่และน้ำเหลืองต่ำกว่าสตรีที่ไม่ได้ใช้ยา

6.4 ประโยชน์ในการรักษาโรคประเภท sexual aberration

Doerr และคณะ (1973) พบว่าระดับ E_2 ในพวกลักเพศ (Homosexual) สูงกว่าปกติ ผลนี้น่าจะเป็นประโยชน์ในการช่วยแพทย์รักษาผู้ป่วยด้วยโรคนี้

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือ

1. เพื่อที่จะหาวิธีการที่มีความเชื่อถือและมีความไวในการวัดสูง สามารถวัดปริมาณ E_2 ในสตรีปกติได้

2. เพื่อที่จะหาระดับ E_2ในสตรีไทยที่มีรอบเดือนปกติ ซึ่งจะเป็นข้อมูลสำหรับสูติแพทย์ในการวินิจฉัยโรคที่ผิดปกติทางระบบสืบพันธุ์