หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ในปี ค.ศ. 1923 และ 1924 Allen และ Doisy พบว่าสารที่ได้จากการสกัดฟอลลิเคิล (follicle) ของรังไข่สุกรมีฤทธิ์ทำให้หนูทดลองซึ่งถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างกลับมี oestrus cycle ดังเดิมในระยะเวลาใกล้ ๆ กัน Aschheimกับ Zondex (1927) และ Funk (1929) ค้นพบสารที่มีคุณสมบัติข้างต้นในปัสสาวะของหญิงมีครรภ์ ต่อมาในปี ค.ศ. 1936 The Council on Pharmacy and Chemistry of the American Medical Association ได้เสนอให้เรียกสารที่มีฤทธิ์คล้ายกับที่กล่าวแล้ว และค้นพบในแหล่งธรรมชาติโดยใช้ชื่อรวมว่าเป็น เอสโทรเจน ซึ่งประกอบด้วยสารที่สำคัญ คือ เอสโทรน เอสตริออล และเอสตราไดออล

สารชนิดแรกพบในปัสสาวะของหญิงมีครรภ์ โดย Butenandt (1929) และ Doisy กับคณะ (1929) ในปีต่อมา Marrian พบว่านอกจากเอสโทรนแล้วในปัสสาวะของหญิงมีครรภ์ยังมีเอสตริออลด้วย (Marrian, 1930) ส่วนเอสตราไดออลค้นพบโดย MacCorquodals และคณะ (1935) ในของเหลวจากฟอลลิเคิลของรังไข่สุกร ต่อมา Huffman และคณะ (1940) พบสารนี้ในปัสสาวะของหญิงมีครรภ์ จากรายงานต่อ ๆ มา พบว่า แหล่งสังเคราะห์เอสโทรเจนในสตรีที่สำคัญ คือ รังไข่ รก และเปลือกต่อมหมวกไต (Loraine กับ Bell, 1971)ส่วนในบุรุษนั้น พบเอสโทรเจนในปริมาณประมาณร้อยละ 0.04 ของสตรี (Kutsky, 1973) และแหล่งที่ค้นพบ คือ ในน้ำอสุจิ (Diczfulusy, 1954) กับอัณฑะและเปลือกต่อมหมวกไต (Simpson กับ Joll, 1938 และ Dohan กับคณะ,1953) เป็นต้น

อาจกล่าวได้ว่าในวงการแพทย์ปัจจุบัน การวัดปริมาณเอสโตรเจนเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องมีในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเป็นประโยชน์กับการวินิจฉัยพยาธิสภาพของร่างกาย สำหรับการวัดปริมาณเอสตราไดออลนั้น มีประโยชน์ที่สำคัญหลายประการ อาทิ

1. <u>ศึกษาหน้าที่ของรังไข่</u> เนื่องจากเอสตราไดออลเป็นฮอร์โมนเพศที่มีปฏิกริยาทางชีวภาพ (biological activity) ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของระบบสืบพันธุ์โดยเฉพาะรังไข่ ดังนั้น การศึกษาปริมาณเอสตราไดออลในรอบเดือน (menstrual cycle) และในระหว่างตั้งครรภ์ (pregnancy period) จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการชี้นำสภาวะการทำงานของระบบสืบพันธุ์ของสตรี และคิดตามผลการรักษาโรคทางสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา ตัวอย่างเช่น Sybulski กับ Maughan (1972) พบว่าระดับของเอสตราไดออลในมารดาที่มีพิษแทรกซ้อนในครรภ์ (toxemia of pregnancy และ fetal malnutrition) จะต่ำกว่าระดับในสตรีตั้งครรภ์ปกติ Dawood กับ Ratnam (1974) รายงานว่ามารดาที่ตั้งครรภ์แฝด จะมีระดับเอสตราไดออลสูงกว่าสตรีตั้งครรภ์ปกติ นอกจากนี้การวัดปริมาณเอสตราไดออลในซีรัม อาจใช้ประกอบการวินิจฉัยผู้ป่วยด้วยโรคอื่น ๆ เช่น การตั้งครรภ์ไข่ปลาอุก (hydatidiform molar pregnancy) (Dawood, 1975)

2. <u>ศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการคุมกำเนิด</u> มีรายงานที่แสดงให้เห็นว่า การวัดปริมาณเอสตราไดออลเป็นปัจจัยอย่างหนึ่ง ที่ควรกำนึงถึงในการคิดตามและควบคุม การคุมกำเนิดทั้งในสตรีและบุรุษ ตัวอย่างเช่น Diczfalusy (1968) และ Weisz กับคณะ (1973) พบว่ายาคุมกำเนิดทำให้ระดับเอสตราไดออลในรังไข่และซีรัมต่ำกว่าสตรีที่ไม่ได้ใช้ยา แต่ Nygren กับ Johansson (1973) และ Brenner กับ Mishell (1975) รายงานว่า สตรี

ที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดนานกว่า 1 ปี จะมีระดับโปรเจสเตอโรน และเอสตราไดออล ในซีรัมสูงกว่าปกติ สิ่งที่น่าสนใจ คือ Smith และคณะ (1976) พบว่าบุรุษที่ทำหมันประมาณ 2 ปี มีเอสตราไดออล เทสทอสเตอโรน ลูทีไนซิงฮอร์โมน และฟอลลิเคิลสทิมูเลทิงฮอร์โมนในซีรัมอยู่ในระดับปกติ

3. <u>การวินิจฉัยโรคเกี่ยวกับอัณฑะ</u> จากรายงานการศึกษาหลายรายงาน (Woitz และคณะ, 1955 Rabinowitz, 1956 และ Kelch กับคณะ, 1972) แสดงให้เห็นว่า อัณฑะสามารถสังเคราะห์เอสโทรเจนได้ยิ่งกว่านั้น Kley และคณะ (1976) เสนอการใช้ระดับเอสตราไดออลเป็นดรรชนีวัดการตอบสนองของโกนาโดโทรฟิน (gonadotrophin) แทนเทสทอสเตอโรนได้ เช่น ในกรณีที่ต้องการวินิจฉัย primary hypogonadism (ความผิดปกติของหน้าที่และการเจริญเติบโตของอัณฑะแต่กำเนิด โดยที่อัณฑะไม่สามารถตอบสนองต่อโกนาโดโทรฟินได้ตามปกติ) และ secondary hypogonadism (ความผิดปกติของหน้าที่และการเจริญของอัณฑะเนื่องจากความผิดปกติของต่อมใต้สมองหรือศูนย์ควบคุมที่สูงกว่า)

4. <u>การวินิจฉัยโรคเต้านม</u> (breast disease) ถึงแม้ในปัจจุบันจะยังไม่มีข้อสรุปที่แน่นอนเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของปริมาณเอสตราไดออลกับพยาธิสภาพของเต้านม แต่ก็มีรายงานที่น่าสนใจอยู่เป็นจำนวนมาก เช่น Hayward (1972) Mac-Mahon กับ Cole (1972) และ Mac-Mahon กับคณะ (1973) ที่เสนอว่าการเกิดเนื้องอกและมะเร็งเต้านม (benign and malignant breast disease) มีความสัมพันธ์กับหน้าที่ของรังไข่ นอกจากนี้ England และคณะ (1974) พบว่าระดับซีรัมเอสตราไดออลในระยะ luteal phase ของผู้ป่วยที่เป็นเนื้องอกในเต้านมสูงกว่าระดับในสตรีที่มีรอบเดือนปกติ และผู้ป่วยเป็นมะเร็งเต้านมจะมีระดับเอสตราไดออลทั้งในช่วง follicular และ luteal phase สูงกว่าปกติด้วย

ในสมัยแรก ๆ ของการวัดปริมาณเอสโตรเจนในของเหลวต่าง ๆ จากร่างกาย วิธีการส่วนใหญ่มีความไวและความจำเพาะต่ำ ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการให้มีความไวและความจำเพาะสูงขึ้น สำหรับวิธีการที่ใช้วัดปริมาณเอสโตรเจน อาจแบ่งได้เป็น

1. วิธีทางชีวภาพ มีหลักการคือ วัดปริมาณฮอร์โมนโดยอาศัยคุณสมบัติของเอสโตรเจนที่ออกฤทธิ์ต่ออวัยวะเป้าหมายของสัตว์ทดลอง Emmens ได้รวบรวมวิธีการเหล่านี้ไว้เมื่อปี ค.ศ. 1962 (Emmens, 1962) การวัดปริมาณเอสโตรเจนด้วยวิธีนี้เหมาะสำหรับทดสอบทางด้านสรีรวิทยา แต่ไม่เหมาะสมในการประเมินค่าฮอร์โมนทางด้านเวชปฏิบัติ เพราะค่าใช้จ่ายในการปฏิบัติสูง สิ้นเปลืองเวลาและแรงงาน วิธีนี้มีความแม่นยำและความจำเพาะในการวัดต่ำ

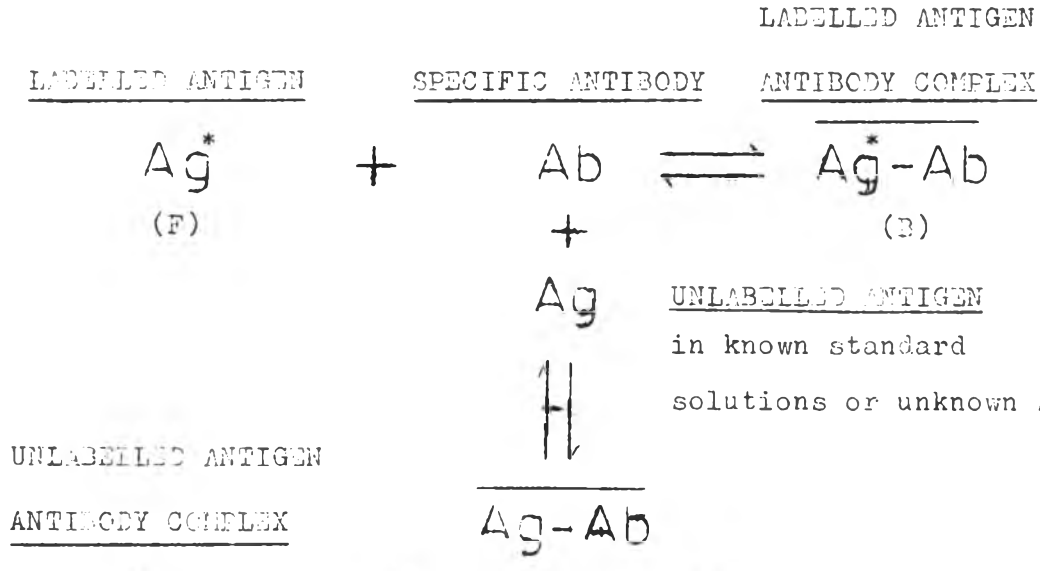
2. วิธีทางเคมี อาศัยคุณสมบัติของเอสโตรเจนในการทำปฏิกริยากับสารเคมีบางชนิด ทำให้เกิดสารมีสีหรือสารเรืองแสง และวัดปริมาณเอสโตรเจนด้วยการเปรียบเทียบสีหรือการเรืองแสงที่เกิดเนื่องจากสารตัวอย่างเทียบกับสิ่งที่เกิดขึ้นเนื่องจากเอสตราไดออลมาตรฐาน ตัวอย่างเช่น วิธี colorimetry (Kober, 1931) หรือวิธี fluorimetry (Ittrich, 1958 และ สดใส บางสมบุญ, 1973) วิธีเหล่านี้ ถึงแม้จะมีความจำเพาะดีขึ้นแต่ก็ยังมีปัญหาเกี่ยวกับปฏิกริยาจากสารแปลกปลอม และจำเป็นต้องใช้วิธีการสกัดและทำโครมาโตกราฟีก่อนวัดปริมาณ วิธีการเหล่านี้ ถึงแม้จะเป็นประโยชน์มากในเวชปฏิบัติแต่ค่อนข้างเสียเวลา สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย นอกจากนี้ยังมีความไวไม่สูงพอที่จะนำมาใช้ โดยเฉพาะสำหรับงานวิจัยที่จำเป็นต้องวัดปริมาณน้อยมาก ๆ นอกจากนี้มีวิธีอื่น ๆ เช่น วิธี gas liquid chromatography (Vanden-Heuvel และคณะ, 1962) double isotope derivative method (Svendsen, 1960) และ Baird, 1968) วิธีทั้งสองนี้ให้ความไวและความจำเพาะในการวัดสูง แต่ค่อนข้างยุ่งยาก เสียเวลาและค่าใช้จ่ายสูง และต้องใช้ปริมาณสารมาก

3. วิธีทางอิมมิวโน เป็นวิธีการที่นำเอาความรู้ทางอิมมิวโนวิทยาและรังสีวิทยามาใช้รวมกัน ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง

3.1 วิธี competitive protein binding หรือ saturation analysis (Ekins,1960) อาศัยหลักการที่สารต้องการวัดปริมาณและสารติดฉลากรังสีแข่งขันกันในการรวมตัวกับ serum หรือ tissue binding protein ตัวอย่างเช่น testosterone - oestradiol binding globulin ซึ่งพบในซีรัมของหญิงมีครรภ์ (Murphy, 1968) หรือโปรตีนที่เตรียมจากมดลูกของกระต่ายตั้งครรภ์ (Korenman, 1968 และ Corker กับ Exley,1970)การวัดปริมาณเอสตราไดออลด้วยวิธีนี้มีความไวสูงขึ้น และ specific binding protein เตรียมได้ง่าย แต่มีข้อเสียคือ มีความจำเพาะต่ำกว่าของโมเลกุล และการวัดปริมาณเอสตราไดออลในซีรัม จำเป็นต้องใช้โครมาโทกราฟีช่วย นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนที่ใช้อาจจะมีค่า dissociation constant สูงและเสียคุณสมบัติได้ง่ายไม่คงตัวต่อความร้อน (Doerr, 1973)

3.2 วิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ (Yalow กับ Berson, 1959) เป็นวิธีที่มีหลักการคล้ายกับวิธี competitive protein binding ต่างกันที่ใช้แอนติบอดีแทน specific binding protein ซึ่งมีความจำเพาะต่อชนิดของโมเลกุลสูงกว่า ผู้ที่นำวิธีนี้มาใช้วัดปริมาณเอสตราไดออลในซีรัมเป็นคนแรกคือ Abraham (1969) และ Midgley กับคณะ (1969) ต่อมา Mikhail และคณะ (1970) Exley และคณะ, (1971) และ Jeffcoate กับ Searle (1972) ได้นำวิธีนี้มาใช้วัดปริมาณเอสตราไดออลเช่นเดียวกัน

วิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ มีหลักการทั่วไป (Yalow กับ Berson,1970)



เมื่อ Ag เป็นสารที่ต้องการวัดปริมาณ หรือสารมาตรฐาน

Ab เป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะในการรวมตัวกับ Ag ให้เกิดเป็น bound complex (B)

Ag^* สารรังสีฉลากรังสี ซึ่งใช้เป็นตัววัดปฏิกริยา (F)

Ag และ Ag^* ควรเป็นสารซึ่งมีคุณสมบัติทางอิมมิวโนเหมือนกัน (Ekins กับ Newman, 1970) ถ้า Ab และ Ag^* มีปริมาณคงที่ ทั้ง Ag และ Ag^* จะแข่งขันกันในการทำปฏิกริยากับ Ab การเกิด Ag-Ab และ Ag^*-Ab จะแปรตามปริมาณ Ag มาตรฐาน หรือปริมาณ Ag ในสารตัวอย่าง การหาปริมาณของ Ag ในสารตัวอย่าง ทำได้โดยการเปรียบเทียบ Ag^*-Ab ที่เกิดในสภาวะที่มีสารตัวอย่างกับการเกิด Ag^*-Ab ในสภาวะที่มีสารมาตรฐาน

การหาปริมาณของสารใด ๆ โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์นั้น มีปัจจัยสำคัญที่ควรกำนึงถึงหลายประการ อาทิ คุณภาพและปริมาณของแอนติบอดี สารติดฉลาก และวิธีการแยกสารรูปอิสระออกจากรูปที่จับกับแอนติบอดี เป็นต้น

แอนติบอดีที่ใช้สำหรับเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของสเตอรอยด์ต่าง ๆ รวมทั้งเอสตราไดออล เตรียมได้จากแอนติเจนต่างกัน และโดยทั่วไป ผู้ทดลอง

จะพยายามใช้แอนติเจนที่คาดว่าจะทำให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูง และสามารถจะรวมตัวกับสารที่ต้องการวัดได้พอเหมาะ แอนติบอดีที่เตรียมจากเอสตราไดออลคอนจูเกตกับ bovine serum albumin (BSA) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่ง 3 และ 17 (E_2-3 or 17-BSA) จะมีความจำเพาะค่อนข้างต่ำ มีปฏิกริยาการรวมตัวกับเอสโตรนและเอสตริออลได้มาก (Lindberg และคณะ, 1974) ต่อมา Exley และคณะ (1971) Jeffcoate กับ Searle (1972) Lindner และคณะ (1972) Kuss กับ Goebel (1972) และCameron กับ Jones (1972) สามารถเตรียมแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงมากขึ้นโดยใช้แอนติเจนเป็นเอสตราไดออลคอนจูเกตกับ BSA ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่ง 6 (E_2-6-BSA) และนำมาใช้วัดเอสตราไดออลที่สกัดจากซีรัมได้โดยไม่ต้องทำโครมาโตกราฟฟี ต่อมา England และคณะ (1974 a) รายงานเพิ่มเติมว่าแอนติบอดีที่เตรียมจากเอสตราไดออลคอนจูเกตกับ BSA ที่ตำแหน่ง 11 มีความจำเพาะสูงกว่าตำแหน่ง 6

สำหรับสารติดฉลากนั้น ในปัจจุบันสารติดฉลากด้วยกริเตรียมยังเป็นที่นิยมใช้อยู่มากสำหรับการวัดปริมาณสเตอรอยด์ด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ เนื่องจากสารติดฉลากกริเตรียมมีโครงสร้างคล้ายกับสารเดิม และมักจะเกิดปฏิกริยาทางอิมมิวโนกับแอนติบอดีได้ดี นอกจากนี้ยังหาซื้อได้สะดวกและสามารถเก็บไว้ใช้ได้เป็นระยะเวลานาน ต่อมามีผู้นำสารติดฉลากไอโอดีน-125 มาใช้แทนสารติดฉลากกริเตรียมในปฏิกริยาเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของสเตอรอยด์หลายชนิดรวมทั้งเอสตราไดออล เนื่องจากการใช้สารติดฉลากกริเตรียมต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการวัดรังสี และมีปัญหาเกี่ยวกับ quenching ของสารตัวอย่าง นอกจากนี้ Midgley กับ Niswender (1970) และ Abraham (1974) พบว่าสารติดฉลากกริเตรียมยังเสื่อมคุณภาพได้ภายหลังเก็บไว้นาน 6 เดือน การใช้สารติดฉลากไอโอดีน-125 มีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารติดฉลากกริเตรียมที่เห็นได้ชัดคือ การวัดรังสีสะดวกและค่าใช้จ่ายถูกกว่าการใช้กริเตรียม

การเตรียมสารติดฉลากไอโอดีน-125 อาจเตรียมได้หลายวิธี Oliver และคณะ (1968) เป็นผู้ริเริ่มโดยคอนจูเกต ดิจิทอกซิน กับ tyrosine methyl ester (TME) แล้วจึงนำไปติดฉลากด้วยไอโอดีน-125 ต่อมา Midgley และคณะ (1969) และ Jeffcoate กับคณะ (1973) ได้ทดลองติดฉลากไอโอดีน-125 กับ E_2-6-RSA และพบว่าไอโอดีน-125 สามารถติดฉลากเข้าที่ A-ring ของเอสตราไดออล ทำให้ปฏิกริยาอิมมิวโนลดลง (Abraham กับ Odell, 1970) นอกจากนี้ Nars กับ Hunter (1973) และ Hunter กับคณะ (1975) ได้ทดลองติดฉลากไอโอดีน-125 กับฮีสตามีนก่อนแล้วจึงนำไปคอนจูเกตกับเอสตราไดออล โดยปฏิกริยา mixed anhydride method (Erlanger และคณะ, 1957) ซึ่งเป็นวิธีที่เตรียมง่าย และสามารถนำสารติดฉลากนี้มาใช้วัดปริมาณเอสตราไดออลในซีรัมได้ดี

การแยกฮอร์โมนรูปอิสระออกจากรูปที่จับกับแอนติบอดีในเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของสารใด ๆ ก็ตาม จำเป็นต้องกำนึงถึงปัจจัยที่สำคัญหลายประการ หลักการที่ Ratchiff (1974) เสนอคือ วิธีที่ใช้ควรจะแยกฮอร์โมนรูปอิสระออกจากรูปที่จับกับแอนติบอดีได้อย่างหมดจด เนื่องจากปัจจัยนี้มีอิทธิพลมากต่อความไวและความแม่นยำของวิธีการวัด นอกจากนี้ ควรเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และราคาถูก สำหรับเอสตราไดออลนั้นวิธีการที่ใช้มีหลายวิธี คือ

1. Dextran coated charcoal (Abraham และคณะ, 1971 Tulchinsky กับ Abraham, 1971 Wu กับ Lundy, 1971 Robertson และคณะ, 1972 Powell กับ Stevens, 1973 และ Dupon กับคณะ, 1973)
2. Double antibody (Midgley และคณะ 1969)
3. Coated tube with antibody (solid phase)

(Catt กับ Tregear, 1967 Abraham, 1969 Mikhail และคณะ, 1970 และ Moore กับคณะ,1972)

4. Ammonium sulfate (Mayes กับ Nugent, 1970)

5. Polyethylene glycol (Schiller กับ Brammall,1974)

จุดประสงค์ของการวิจัยนี้ ก็เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการวัดปริมาณเอสตราไดออลในซีรัมจากวิธีใช้สารดูดซับจากถ่านกัมมันต์ริเภรียมมาใช้สารดูดซับจากไอโอดีน ศึกษาวิธีการดูดซับและคุณสมบัติของสารที่ดูดซับจากไอโอดีน และงานที่เสนอในรายงานนี้ แสดงถึงผลการพัฒนาวิธีวัดปริมาณเอสตราไดออลในซีรัมด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ โดยใช้เอสตราไดออลดูดซับจากไอโอดีน-125 ซึ่งเตรียมขึ้นเองตามวิธีของ Nars กับ Hunter (1973) และ Hunter กับคณะ (1975) แอนติบอดีที่ใช้เป็นแอนติบอดีที่ได้จากการฉีด E_2-6-BSA เข้ากระต่ายทดลอง นอกจากนี้ได้ศึกษาถึงการแยกฮอร์โมนรูปอิสระออกจากที่จับกับแอนติบอดี โดยวิธีดูดซับด้วยผงถ่านเคลือบเดกซ์แทรน อิทธิพลของวิธีโครมาโตกราฟีและวิธีทดลอง ออกจากนั้นจึงนำวิธีที่พัฒนาและทดสอบความเชื่อถือได้แล้ว ไปวัดปริมาณเอสตราไดออลในซีรัมของสตรีทั้งในวงจรรอบเดือน