บทที่ 4

บทสรุปและวิจารณ์

การวิจัยครั้งนี้เป็นการเตรียมอิมมูโนเจนสำหรับกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง (กระต่าย) โดยให้แฮปเทนธัยรอกซินทำปฏิกิริยากับโมเลกุลพาหะ ซึ่งในที่นี้ใช้โปรตีน 3 ชนิด คือ โบไวน์ ซีรัม อัลบูมินที่เป็นโปรตีนจากสัตว์ประเภทวัว ควาย ต่อมา คือ ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินโปรตีนจากคน และโพลี-ดี-ไลซีนซึ่งเป็นโปรตีนสังเคราะห์โดยอัลบูมินทั้ง 2 ชนิดแรก มีน้ำหนักโมเลกุล 68,500 ส่วนโพลี-ดี-ไลซีนมีน้ำหนักโมเลกุล 239,300 ในการเตรียมอิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมินพบว่าถ้าใช้พีเอชน้อยกว่า 9 ในการเตรียมอิมมูโนเจนชนิดนี้จะมีตะกอนเกิดขึ้นมาก โดยตะกอนดังกล่าวสามารถละลายได้ดีในด่าง เมื่อนำไปตรวจสอบยูวีสเปกตรัมพบว่ามีพีคที่ความยาวคลื่นใกล้เคียงกับธัยรอกซินคืออยู่ในช่วง 324 - 326 นาโนเมตร เมื่อนำเฉพาะส่วนใสไปทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีแล้วนำมาคำนวณอัตราส่วนโมลพบว่าอัตราส่วนโมลธัยรอกซิน ต่อ โบไวน์ ซีรัม อัลบูมินมีค่าเพียง 1-4 : 1 เท่านั้น และเมื่อนำไปทำแห้ง (lyophilized) จะได้ของแข็งสีเหลืองอ่อน ซึ่งเมื่อนำไปละลายในสารละลายเกลือ (normal saline)พบว่าละลายค่อนข้างยากจึงไม่เหมาะในการเตรียมเป็นอิมมูโนเจนสำหรับใช้ฉีดในสัตว์ทดลอง แต่ถ้าในขั้นตอนการเตรียมมีการเพิ่มความเป็นด่างจนพีเอชอยู่ในช่วง 9 -10 พบว่าไม่มีตะกอนเกิดขึ้นแต่อย่างใดและเมื่อนำไปผ่านคอลัมน์แล้วมาคำนวณหาอัตราส่วนโมลธัยรอกซิน ต่อ โบไวน์ ซีรัม อัลบูมินปรากฏว่ามีค่าสูงถึง 9 -14 : 1 เมื่อนำไปทำแห้งจะได้ของแข็งสีขาวซึ่งสามารถละลายได้ดีในสารละลายเกลือ ในการเตรียมอิมมูโนเจนชนิดนี้เมื่อเพิ่มความเป็นด่างจนพีเอชใกล้เคียง 11 ก็ไม่ทำให้อัตราส่วนโมลสูงขึ้นกว่าในช่วงพีเอช 9-10 แต่อย่างใด ดังนั้นพีเอชที่เหมาะสมในการเตรียมให้อิมมูโนเจนมีอัตราส่วนโมลธัยรอกซิน ต่อ โบไวน์ ซีรัม อัลบูมินสูงสุดคือพีเอช 9-10

สำหรับอุณหภูมิพบว่าที่อุณหภูมิห้องอิมมูโนเจนจะให้ค่าอัตราส่วนโมลธัยรอกซิน ต่อ โบไวน์ ซีรัม อัลบูมินสูงกว่าที่อุณหภูมิ 4°ซ ในแง่ของปริมาณสารเริ่มต้นที่ใช้พบว่าถ้าให้ธัยรอกซินและคาร์โบไดอิมีดคงที่และมากเกินพอแต่เปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนที่ใช้ พบว่าการใช้โบไวน์ ซีรัม อัลบูมินให้น้อยที่สุด (0.80 มก.) จะให้ค่าอัตราส่วนโมลสูงสุดคือ 22 : 1 ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นของแข็งสีขาวละลายได้ดีในสารละลายเกลือ

ส่วนอิมมูโนเจนธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินก็เป็นไปในทำนองเดียวกันคือที่พีเอชน้อยกว่า 9 ระหว่างการเตรียมมีตะกอนเกิดขึ้นมาก เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วนำมาคำนวณอัตราส่วนโมลธัยรอกซิน ต่อ ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน พบว่ามีค่าเพียง 0.7-2.5 : 1 ได้ของแข็งสีเหลืองไม่ละลายในสารละลายเกลือ เมื่อนำมาทดสอบการละลายพบว่าเมื่อเติมด่างลงไปจะทำให้การละลายดีขึ้นแต่พีเอชสูงถึง 9-9.5 จึงไม่เหมาะสำหรับใช้ฉีดกระตุ้น ถ้าใช้พีเอชในการเตรียมอยู่ในช่วง 9-10 อัตราส่วนโมลธัยรอกซิน ต่อ ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน เพิ่มขึ้นเช่นกัน (3-6 : 1) และได้ของแข็งสีขาวละลายได้ดีในสารละลายเกลือ และเมื่อเพิ่มพีเอชถึง 10.5 อัตราส่วนโมลธัยรอกซิน ต่อ

ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน กลับลดลงเหลือเพียง 1-2 :1 เท่านั้น นั่นคือพีเอชที่เหมาะสมในการเตรียมให้ได้อัตราส่วนโมลธัยรอกซิน ต่อ ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน สูงสุดอยู่ในช่วงพีเอช 9-10 เช่นเดียวกับธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน

เมื่อคำนึงถึงผลของอุณหภูมิด้วยพบว่าที่ 4°ซ จะให้ค่าอัตราส่วนโมลสูงกว่าที่อุณหภูมิห้อง ถ้านำการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารเริ่มต้นที่ใช้มาพิจารณาด้วยจะได้ว่าเมื่อให้ธัยรอกซินและคาร์โบไดอิมีดคงที่และมากเกินพอแต่ใช้ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินให้น้อยที่สุด (0.50 มก.) อัตราส่วนโมลธัยรอกซิน ต่อ ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน มีค่าสูงถึง 16-18 : 1 และได้ของแข็งสีขาวที่ละลายได้ดีในสารละลายเกลือ

หลังจากผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แล้วนำแต่ละหลอด (fraction) ไปวัดค่าอัตรานับวัดด้วยเครื่องนับจำนวนรังสีแกมมาและค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นสูงสุดของธัยรอกซิน (326 นาโนเมตร) และอัลบูมิน (280 นาโนเมตร) ตามลำดับด้วยเครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นนำความสัมพันธ์ดังกล่าวไปเขียนกราฟเทียบกันระหว่างจำนวนรังสีแกมมา (count per minute, CPM) และค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นสูงสุดของสารทั้งสองโดยให้เป็นแกนY ส่วนลำดับที่ของแต่ละหลอด (fraction no.) ให้เป็นแกน X จะได้ว่ามีเส้นกราฟ 3 เส้นแต่ละเส้นมี 2 พีค พีคแรกคือสารที่สนใจโดยจากหลักการของเจลฟิลเตรชันที่ใช้ความแตกต่างของขนาดโมเลกุลในการแยกสารให้บริสุทธิ์ ซึ่งสารที่สนใจคือธัยรอกซิน-อัลบูมิน คอนจูเกตซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 68,500 และสารที่ไม่ต้องการจะถูกกักอยู่ภายในเจลที่ใช้แยกซึ่งคือธัยรอกซินที่ไม่เกิดการรวมกับอัลบูมินโดยมีน้ำหนักโมเลกุลเพียง 776.9 ธัยรอกซินอิสระนี้จะออกจากคอลัมน์หลังจากที่สารที่มีขนาดใหญ่ออกไปแล้ว การคำนวณจำนวนโมลธัยรอกซินที่เกิดปฏิกริยากับอัลบูมินแล้วทำได้โดยใช้ผลรวมค่าอัตรานับวัดของพีคแรกหลังการแยกแล้วเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น ส่วนจำนวนโมลอัลบูมินสามารถคำนวณได้จากปริมาณเริ่มต้นที่ใช้เพราะเหตุว่าเมื่อนำพีคที่ 2 จากการแยกไปตรวจยูวีสเปกตรัมพบแต่เพียงพีคของธัยรอกซินในช่วงความยาวคลื่น 324-326 นาโนเมตรเท่านั้นและเมื่อนำไปทำอิเล็กโตรฟอเรซีสเพื่อตรวจสอบอัลบูมินที่เหลือก็ไม่พบแสดงว่าอัลบูมินถูกใช้หมดในปฏิกริยาการเตรียม ดังนั้นจึงสามารถคำนวณจำนวนโมลอัลบูมินได้จากน้ำหนักเริ่มต้นที่ใช้

การแยกอิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โพลี-ดี-ไลซีนไม่สามารถใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีเช่นอิมมูโนเจนทั้งสองดังกล่าวได้ด้วยเหตุผลที่ว่าตัวทำละลายไพริดีนที่ใช้เตรียมสามารถละลายเจลที่ใช้แยกออกมาด้วยทำให้สารที่แยกได้ไม่บริสุทธิ์ จึงใช้การไดอะไลซีสใน 0.9 % น้ำหนักต่อปริมาตรสารละลายโซเดียมคลอไรด์

หลังจากผ่านขั้นตอนการทำอิมมูโนเจนให้บริสุทธิ์และทำแห้งแล้วจึงนำไปทดลองฉีดในกระต่าย การเตรียมอิมมูโนเจนในการฉีดทำได้โดยชั่งอิมมูโนเจนให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนละลายในน้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (sterile) จากนั้นผสมให้เข้ากันกับฟรอยด์แอดจูแวนต์ชนิดสมบูรณ์ (สำหรับการฉีดครั้งแรก) หรือชนิดไม่สมบูรณ์ (สำหรับการฉีดครั้งต่อ ๆ มา) การใช้ฟรอยด์แอดจูแวนต์มีประโยชน์เพื่อยืดระยะเวลาการอยู่ในร่างกายของอิมมูโนเจนให้นานกว่าปกติโดยไม่ถูกทำลายไปเสียก่อน ฟรอยด์แอดจูแวนต์แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ สมบูรณ์และไม่สมบูรณ์ ชนิดสมบูรณ์มีเชื้อโรคที่ถูกฆ่าด้วยความร้อนปนอยู่ในชั้นน้ำมันด้วยแต่เชื้อโรคนี้ยังสามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายทำงานได้ดีขึ้น ในขณะที่ฟรอยด์แอดจูแวนต์ชนิดไม่สมบูรณ์มีเพียงน้ำมันอย่างเดียวเท่านั้น โดย

ผสมให้เข้ากันจนเป็นอิมัลชัน การฉีดนิยมฉีดที่ชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ในบริเวณด้านหลังของกระต่ายซึ่งมีพื้นที่มากที่สุดเพื่อให้เกิดการกระจายตัวของอิมมูโนเจนได้ดี

หัวข้อแรกจะกล่าวถึงผลการใช้ปริมาณอิมมูโนเจนที่ต่างกันซึ่งจะให้การตอบสนองที่ต่างกันด้วย กล่าวคือเมื่อแบ่งกระต่ายออกเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 4 ตัว โดยทั้ง 2 กลุ่มใช้อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมินที่มีค่าอัตราส่วนโมลธัยรอกซิน ต่อ โบไวน์ ซีรัม อัลบูมินสูงสุด (22 : 1) ในการฉีดครั้งแรกเท่ากันคือ 1 มก./ตัว แต่ในครั้งต่อมา กลุ่มแรกใช้เพียง 0.2 มก./ตัว ขณะที่กลุ่มที่ 2 ยังคงใช้ 1 มก. พบว่ากระต่ายกลุ่มแรกมีการตอบสนองต่ออิมมูโนเจนนี้ทุกตัว โดยการตอบสนองในรูปไตเตอร์ (พิจารณาที่ 50 %B/T และ D > 40 %) (Chard, 1981) ให้ค่าสูงสุดที่อัตราส่วนการเจือจาง 1 : 400 แต่ในกระต่ายกลุ่มที่ 2 ให้ค่าไตเตอร์เพียง 1 : 300 และมีกระต่าย 1 ตัวที่ไม่เกิดการตอบสนองแต่อย่างใด เมื่อเปรียบเทียบการลดลงของการตอบสนองในรูป %B/T กับระยะเวลาของทั้ง 2 กลุ่มพบว่ากลุ่มที่ 2 มีการลดลงเร็วกว่ากลุ่มแรกอย่างเห็นได้ชัด นั่นคือปริมาณอิมมูโนเจนที่ใช้กระตุ้นครั้งแรกและครั้งต่อมาควรมีความแตกต่างกันมากพอ เมื่ออิมมูโนเจนเข้าสู่ร่างกายในครั้งแรกบี-ลิมโฟซัยท์ (B-lymphocyte) จะเพียงรับรู้ว่ามีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย ด้วยความช่วยเหลือจากที-ลิมโฟซัยท์ บี-ลิมโฟซัยท์ จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นพลาสมาเซล (plasma cell) ที่ทำหน้าที่ผลิตแอนติบอดี ถ้าร่างกายได้รับอิมมูโนเจนนั้นซ้ำอีกจะเกิดการตอบสนองได้อย่างรวดเร็วและรุนแรงกว่าครั้งแรกมากเนื่องจากมีเซลจดจำของทั้งที-และบี-ลิมโฟซัยท์ (memory T- and B-lymphocyte) แต่ปริมาณอิมมูโนเจนที่สูงเกินไปอาจทำให้ที-เซลหยุดการตอบสนองต่ออิมมูโนเจนที่ใช้ได้

เมื่อเปรียบเทียบผลการตอบสนองที่เกิดจากการใช้อิมมูโนเจนธัยรอกซินโบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน ซึ่งมีค่าอัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่อโบไวน์ ซีรัม อัลบูมินแตกต่างกัน โดยแบ่งกระต่ายออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 8 ตัว กลุ่มแรกใช้อิมมูโนเจนที่มีค่าอัตราส่วนโมล < 10 : 1 กลุ่มที่ 2 ใช้ค่า > 10 < 20 : 1 และ กลุ่มสุดท้ายใช้ค่า > 20 : 1 โดยทุกกลุ่มมีช่วงระยะเวลาในการฉีดกระตุ้นเท่ากัน คือ ทุก ๆ 1 เดือน และ มีระยะเวลาในการเก็บเลือดทุก ๆ 2 สัปดาห์ พบว่ากระต่ายกลุ่มที่ให้การตอบสนองดีที่สุด คือ กลุ่มที่ใช้อิมมูโนเจนซึ่งมีค่าอัตราส่วนโมลสูงสุด โดยให้ค่าไตเตอร์สูงถึง 1 : 400 และมีการตอบสนองในกระต่ายทุกตัว ส่วนกลุ่มที่มีการตอบสนองบ้างแต่ไม่เกิดกับกระต่ายทุกตัวเป็นกลุ่มที่ใช้อิมมูโนเจนค่าอัตราส่วนโมลธัยรอกซินโบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน > 10 < 20 : 1 คือมีการตอบสนองเพียง 2 ตัว และมีค่าไตเตอร์เพียง 1 : 130 เมื่อเปรียบเทียบการลดลงของการตอบสนองระหว่างกระต่ายทั้ง 2 กลุ่มข้างต้น พบว่าแนวโน้มการลดลงของการตอบสนองเป็นไปในทำนองเดียวกันแต่ค่าการตอบสนองในรูป % B/T จะแตกต่างกัน โดยกลุ่มที่ใช้อิมมูโนเจนที่มีค่าอัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่อโบไวน์ ซีรัม อัลบูมินสูงกว่าจะให้ค่าการตอบสนองในรูปของค่า % B/T มากกว่าด้วย แสดงว่าอิมมูโนเจนธัยรอกซินโบไวน์ ซีรัม อัลบูมินที่มีค่าอัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่อโบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน สูงสุดมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลธัยรอกซินที่เกาะกับโมเลกุลโปรตีนโบไวน์ ซีรัม อัลบูมินในตำแหน่งที่เหมาะสมโดยไม่บดบังแอนติเจนิก ดีเทอร์มิแนนท์ของอิมมูโนเจนที่ใช้กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองจึงทำให้กระต่ายกลุ่มนี้มีการตอบสนองในรูปค่าไตเตอร์ดีที่สุด

ในแง่ของระยะเวลาการฉีดกระตุ้นก็มีผลต่อการตอบสนองในสัตว์ทดลองเช่นกัน โดยเมื่อนำกระต่ายที่เคยให้ค่าไตเตอร์ 1 : 400 มากระตุ้นซ้ำอีก พบว่ากระต่ายที่ฉีดกระตุ้นทุก ๆ 1 เดือนยังคงมีการตอบสนองต่ออิมมูโนเจนที่ใช้ แต่กลุ่มที่ฉีดกระตุ้นทุก ๆ 2 สัปดาห์ไม่พบการตอบสนองแต่

อย่างใด นั่นคือการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองที่ดีนั้นควรมีช่วงระยะเวลาในการกระตุ้นห่างกันพอสมควร เช่น 1 เดือน ส่วนการกระตุ้นทุก ๆ 2 สัปดาห์อาจเกิดการไม่ตอบสนองในระยะยาวได้

การใช้อิมมูโนเจนธัยรอกซิน ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินก็เป็นไปในทำนองเดียวกันกับธัยรอกซิน โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน กล่าวคือเมื่อกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วยอิมมูโนเจนธัยรอกซิน ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน ที่มีค่าอัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่อฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินต่างกัน (< 10 : 1 และ > 10 < 20 : 1) พบว่ากลุ่มที่เกิดการตอบสนองดีกว่า คือ กลุ่มที่ใช้ค่าอัตราส่วนโมลสูงกว่า (ไตเตอร์ 1 : 150) และเกิดการตอบสนองต่อกระต่ายทุกตัว ส่วนกลุ่มที่ใช้ค่าอัตราส่วนโมล < 10 : 1 ไม่เกิดการตอบสนองแต่อย่างใด แสดงว่าอิมมูโนเจนธัยรอกซิน ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินที่มีค่าอัตราส่วนโมลธัยรอกซิน ต่อ ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน < 10 : 1 มีแอนติเจนิก ดีเทอร์มิแนนท์ ไม่มากพอ หรือมีการจัดเรียงตัวของธัยรอกซินที่เกาะกับโปรตีนฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินซึ่งอยู่ในตำแหน่งที่ไม่เหมาะสมโดยไปบดบังแอนติเจนิกดีเทอร์มิแนนท์ เมื่อนำกลุ่มที่เคยมีการตอบสนองมากระตุ้นซ้ำอีกครั้งกลับไม่พบการตอบสนองทั้ง ๆ ที่มีระยะเวลาการฉีดกระตุ้นเท่ากัน คือ ทุก ๆ 1 เดือน นั่นคืออิมมูโนเจนชนิดนี้อาจมีความคงตัว (stable) ไม่นานพอหรือสลายตัวในร่างกายได้รวดเร็วกว่าอิมมูโนเจนธัยรอกซิน โบไวน์ ซีรัม อัลบูมินที่จะทำให้ระบบภูมิคุ้มกัน (ทั้ง ที- และ บี-เซล) เข้าทำปฏิกริยากับอิมมูโนเจนเพื่อสร้างแอนติบอดีต่อไป

ในการเปรียบเทียบการลดลงของการตอบสนองจากการใช้อิมมูโนเจนทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวข้างต้น พบว่ามีแนวโน้มไปในทำนองเดียวกัน แต่กลุ่มที่ใช้อิมมูโนเจนธัยรอกซิน โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมลธัยรอกซิน ต่อ โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน 22 : 1) สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองได้ดีกว่าอิมมูโนเจนธัยรอกซิน ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมลธัยรอกซิน ต่อ ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน > 10 < 20 : 1) ที่มีช่วงระยะเวลาในการกระตุ้นเท่ากัน

สำหรับธัยรอกซิน คอนจูเกตตัวสุดท้ายที่จะกล่าวถึงคือ ธัยรอกซิน-โพลี-ดี-ไลซีน ซึ่งเมื่อนำไปฉีดกระตุ้นในสัตว์ทดลองไม่พบการตอบสนองแต่อย่างใดถึงแม้ว่าจะมีค่าอัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่อโพลี-ดี-ไลซีนสูงถึง 200:1 โดยทั่วไปอิมมูโนเจนที่เกิดจากแฮปเทนรวมกับโมเลกุลพาหะเมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วที-ลิมโฟซัยท์จะจดจำโมเลกุลพาหะนั้นและกระตุ้นให้บี-ลิมโฟซัยท์มีการตอบสนองต่อแฮปเทนได้ โมเลกุลพาหะที่ดีนั้นควรเป็นเฮเทอโรโพลิเมอร์ (heteropolymer) จะเป็นอิมมูโนเจนที่ดีเพราะจะมีแอนติเจนิกดีเทอร์มิแนนท์จำนวนมากที่ไม่ซ้ำกันทำให้ที-ลิมโฟซัยท์จดจำได้ดีกว่าโฮโมโพลิเมอร์ (homopolymer) ในที่นี้คือ โพลี-ดี-ไลซีน ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของกรดอะมิโนชนิดเดียวคือไลซีน นั่นคือโพลี-ดี-ไลซีนจึงไม่สามารถใช้เตรียมเป็นอิมมูโนเจนที่ดีได้ (Stasom และคณะ , 1967)

การพิจารณาแอนติซีรัมที่ผลิตได้จะพิจารณาใน 3 ลักษณะด้วยกัน คือ ไตเตอร์ โดยพบว่าอิมมูโนเจนที่สามารถกระตุ้นสัตว์ทดลองผลิตแอนติบอดีให้ค่าไตเตอร์สูงสุด คือ ธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน และพบว่าธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน ที่มีค่าอัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่อโบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน ต่างกันให้การตอบสนองต่างกันด้วย กล่าวคืออัตราส่วนโมลสูงสุด (22 : 1) แอนติซีรัมมีค่าไตเตอร์ 1 : 400 อัตราส่วนโมล > 10 < 20 : 1 สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองในสัตว์ทดลองเพียง 2 ตัว จาก 4 ตัวและให้ค่าไตเตอร์เพียง 1 : 130 ขณะที่อัตราส่วนโมล < 10 :1 ไม่เกิดการตอบสนองแต่อย่างใด แสดงว่าในการกระตุ้นให้สัตว์ทดลองเกิดการตอบสนองที่ดีนั้นอิมมูโนเจนควรมีขนาดใหญ่มากพอเพื่อใช้กระตุ้นที-ลิมโฟซัยท์ได้ดีขึ้น สัตว์ทดลองที่ได้ทดลองโดยใช้อิมมูโน

เจนที่มีอัตราส่วนโมลสูงสุดนี้แต่ไม่พบการตอบสนองอาจมีสาเหตุมาจากสัตว์ทดลองเองคือเซลที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันยังเจริญไม่เต็มที่หรือคุณสมบัติแอนติเจนเอง เช่น มีการปนเปื้อนกับสารอื่นอยู่ด้วยทำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อสารที่ไม่สนใจมากกว่า ในแง่ความผิดพลาดของระบบภูมิคุ้มกันกล่าวคือเมื่อร่างกายได้รับอิมมูโนเจนและกระตุ้นต่อที-ลิมโฟซัยท์แล้ว ขั้นตอนการแบ่งตัวและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลจดจำของทั้งที-และบี-ลิมโฟซัยท์อาจมีความผิดพลาดเกิดขึ้นโดยมีเซลที่ไม่ตอบสนอง (tolerized cell) เกิดขึ้นด้วย เรียกได้ว่าเซลเกิดการเสียหน้าที่ไป ดังนั้นไม่ว่าจะกระตุ้นอย่างไรจึงไม่มีการสร้างแอนติบอดีเกิดขึ้น และไม่มีปัญหาในเรื่องสายพันธุ์ของสัตว์ทดลองแต่อย่างใดเนื่องจากสัตว์ทดลองที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มาจากแหล่งเดียวกัน

เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน พบว่าแอนติซีรัมมีค่าไตเตอร์เพียง 1 : 150 (ใช้อิมมูโนเจนอัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่อฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน สูงสุด คือ < 20 : 1) ส่วนอัตราส่วนโมลที่ต่ำกว่าไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองได้ แสดงว่าโบไวน์ ซีรัมอัลบูมิน เหมาะสมที่จะใช้เป็นโปรตีนพาหะในการเตรียมอิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โปรตีน คอนจูเกต การที่อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองได้ดีกว่าธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน อาจเป็นเพราะการจัดเรียงตัวของธัยรอกซินหลาย ๆ โมเลกุลที่เกาะอยู่กับโมเลกุลโปรตีนจับกันได้แน่นและอยู่ในตำแหน่งพอเหมาะที่ไม่เกิดการบดบังแอนติเจนิกดีเทอร์มิแนนท์ที่ใช้กระตุ้นที-ลิมโฟซัยท์ได้

ระยะเวลาในการกระตุ้นก็มีผลต่อการตอบสนองเช่นกัน โดยพบว่าสัตว์ทดลองที่เคยได้รับการฉีดกระตุ้นทุก ๆ 2 สัปดาห์ (ไตเตอร์ 1 : 400) เมื่อนำมากระตุ้นซ้ำอีกโดยใช้อิมมูโนเจนชนิดเดิมปริมาณเท่าเดิมคือ 0.2 มก./ตัว กลับมีค่า % B/T ลดลง แต่อีกกลุ่มหนึ่งที่เคยได้รับการกระตุ้นทุก ๆ 1 เดือน (ไตเตอร์ 1 : 400 เช่นกัน) เมื่อนำมากระตุ้นซ้ำอีก (อิมมูโนเจนชนิดเดิมและปริมาณเท่ากัน) พบว่ายังคงให้การตอบสนอง (ไตเตอร์ 1 : 400) สามารถอธิบายได้ว่าเมื่อร่างกายได้รับอิมมูโนเจนนั้นบ่อย ๆ ที-ลิมโฟซัยท์ จะถูกกระตุ้นบ่อย ๆ เช่นกันทำให้มีที-ลิมโฟซัยท์ที่ถูกกระตุ้น (sensitized T-lymphocyte) เป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจถูกยับยั้งโดยเซลกดทับ (Suppressor T-cells) ทำให้ไม่เกิดการตอบสนองต่ออิมมูโนเจนได้

หัวข้อต่อมาที่ใช้พิจารณา คือ ค่าคงที่สัมพรรคภาพ ซึ่งจะบอกถึงพลังงานของปฏิกริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนที่จำเพาะต่อกัน โดยแอนติซีรัมที่มีคุณภาพดีควรมีค่านี้มากกว่า 10^8 ต่อโมลาร์ขึ้นไป ผลจากการคำนวณพบว่า แอนติซีรัมที่ใช้ธัยรอกซิน โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน อัตราส่วนโมลธัยรอกซิน ต่อ โบไวน์ ซีรัม อัลบูมินสูงสุด (22 : 1) มีค่าสัมพรรคภาพอยู่ในช่วง $1.44 \times 10^8 - 7.57 \times 10^9$ ต่อโมลาร์ ขณะที่อิมมูโนเจนชนิดเดียวกันแต่มีค่าอัตราส่วนโมลธัยรอกซิน ต่อ โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน > 10 < 20 : 1 แอนติซีรัมที่ได้มีค่าสัมพรรคภาพอยู่ในช่วง $9.51 \times 10^7 - 6.42 \times 10^8$ ต่อโมลาร์ อธิบายได้ว่าอิมมูโนเจนที่เหมาะสมซึ่งมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลแฮปเทนธัยรอกซินที่ติดกับโมเลกุลโปรตีนพอเหมาะโดยไม่เกะกะหรือบดบังแอนติเจนิก ดีเทอร์มิแนนท์ของอิมมูโนเจนทำให้สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแฮปเทนและแอนติบอดีนั้นก็สามารถรวมเข้ากับแฮปเทนนั้นได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยส่วน F_{ab} (antigen-binding fragment) ของแอนติบอดีรวมได้ดีกับแอนติเจนที่จำเพาะ แอนติบอดีที่มีความจำเพาะมากกว่าจึงสามารถรวมเข้ากับแอนติเจนได้มากและแน่นกว่า ส่วนแอนติซีรัมที่ใช้อิมมูโนเจนธัยรอกซิน ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน อัตราส่วนโมลธัยรอกซิน ต่อ ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน > 10 < 20 : 1 มีค่าในช่วง $3.87 \times 10^8 - 8.68$

$x10^8$ ต่อโมลาร์ จากค่าสัมพรรคภาพของแอนติซีรัมทั้ง 2 กลุ่มข้างต้นอยู่ในช่วงที่สามารถนำไปใช้ตรวจหาระดับธัยรอยด์ฮอร์โมนในซีรัมได้แต่ควรมีการตรวจวัดความแม่นยำและผลที่อาจทำให้ค่าธัยรอกซินที่ตรวจได้คลาดเคลื่อนเนื่องจากการควบคุมระดับธัยรอยด์ฮอร์โมนในร่างกายมีความผิดพลาดเกิดขึ้น

การพิจารณาคุณภาพแอนติซีรัมประการสุดท้ายที่จะกล่าวถึง คือ การศึกษาปฏิกริยาข้ามระหว่างแอนติซีรัมที่ผลิตได้กับสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงแอล-ธัยรอกซิน โดยพิจารณาที่ 50 % B/T ผลปรากฏว่าการทดสอบปฏิกริยาข้ามของแอนติซีรัมที่ผลิตได้จากการใช้อิมมูโนเจนทั้ง 2 ชนิดไม่มีผลอย่างเป็นนัยสำคัญ กล่าวคือสารที่สามารถรวมกับแอนติซีรัมใกล้เคียงแอล-ธัยรอกซินที่ต้องการตรวจวัดคือ ดี-ธัยรอกซิน โดยมีค่าอยู่ในช่วง 98-100 % (อิมมูโนเจนทั้ง 2 ชนิด) ส่วนสารอื่น ๆ มีผลน้อยมากคือเพียง 0.01 % สารที่มีผลต่อแอนติซีรัมน้อยกว่า 0.01 % ได้แก่ ไตรไอโอโดธัยโรโพรพิโอนิก แอซิด , ไดไอโอโดธัยโรนีน , ไดไอโอโดไทโรซีน , โมโนไอโอโดไทโรซีน และ ไทโรซีน

สรุปผลการวิจัย

การเตรียมธัยรอกซิน-โปรตีน คอนจูเกตให้ได้อัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่อโปรตีนสูงสุดต้องใช้ปริมาณโปรตีนให้น้อยที่สุด โดยในอิมมูโนเจนธัยรอกซิน โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน ปริมาณที่เหมาะสมคือ ธัยรอกซิน 10.00 มก. (1.29×10^{-5} โมล) คาร์โบไดอิมีด 4.00 มก. (2.09×10^{-5} โมล) และโบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน 0.80 มก. (0.12×10^{-7} โมล) ส่วนอิมมูโนเจนธัยรอกซิน ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินใช้ ธัยรอกซิน 20.00 มก. (2.57×10^{-5} โมล) คาร์โบไดอิมีด 5.00 มก. (2.61×10^{-5} โมล) และฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน 0.50 มก. (0.07×10^{-7} โมล) ในช่วงพีเอช 9-10 ต่างกันในกรณีที่ถ้าใช้โปรตีนฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินควรเตรียมที่อุณหภูมิ 4 ^{o} ซ จะให้ค่าอัตราส่วนโมลสูงกว่าที่อุณหภูมิห้อง

เมื่อนำไปทดลองกับสัตว์ทดลองพบว่าอิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โบไวน์ซีรัมอัลบูมินที่มีอัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่อโบไวน์ ซีรัม อัลบูมินสูงสุด (22:1) สามารถกระตุ้น ให้สัตว์ทดลองเกิดการตอบสนองได้ดีที่สุด (ไตเตอร์ 1:400) ส่วนอิมมูโนเจนธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน อัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่อฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน < 20 : 1 กระตุ้นได้รองลงมา (ไตเตอร์ 1:150)

ปริมาณอิมมูโนเจนที่ใช้ฉีดกระตุ้นครั้งแรกและครั้งต่อมาต้องมีความแตกต่างกันมากพอ เช่น 1.0 และ 0.2 มก. เพื่อป้องกันการหยุดการตอบสนองต่ออิมมูโนเจนที่ใช้ ระยะเวลาการฉีดกระตุ้นต้องมีระยะห่างมากพอ เช่น 1 เดือน เพื่อป้องกันการไม่ตอบสนองต่ออิมมูโนเจนในระยะยาว

ธัยรอกซิน-โพลี-ดี-ไลซีน ไม่เป็นอิมมูโนเจนที่ดี ถึงแม้ว่าจะมีค่าอัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่อโปรตีนสูงถึง 200 : 1 แต่ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีในสัตว์ทดลองแต่อย่างใด

แอนติซีรัมที่ผลิตได้จากการใช้อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน และธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินมีค่าสัมพรรคภาพใกล้เคียงกัน คือ อยู่ในช่วง 10^{7}-10^{9} ต่อโมลาร์ซึ่งอาจนำไปใช้ตรวจหาระดับธัยรอยด์ฮอร์โมนได้แต่ควรมีการทดสอบผลอื่น ๆ ประกอบด้วย เช่น ความแม่นยำ ความถูกต้อง และ ผลจากความผิดปกติของร่างกายซึ่งอาจทำให้ผลการตรวจวัดที่ได้มีความคลาดเคลื่อน