บทที่ 6

การศึกษา "อินวิโทร"

6. 1 บทนำ

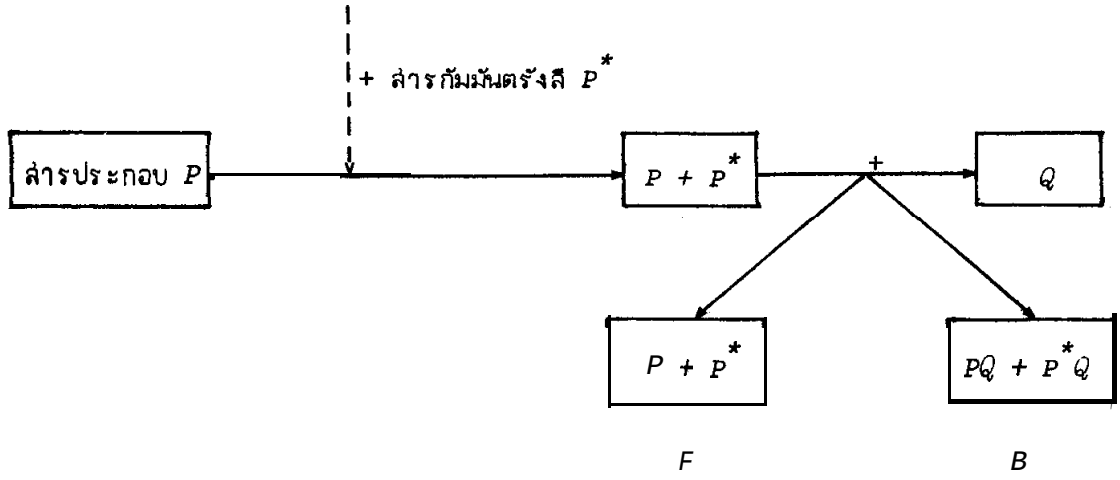
การศึกษา "อินวิโทร" *(in vitro)* หมายถึงการศึกษาโดยสารกัมมันตรังสีมิได้ผ่านเข้าสู่ภายในร่างกายเลย (ตรงข้ามกับการศึกษา *in vivo* ซึ่งได้กล่าวละเอียดแล้วในบทที่ 4) เป็นการใช้สารกัมมันตรังสีวินิจฉัยโรคหรือศึกษาการทำงานของอวัยวะต่างๆในร่างกายเช่น ทำโดยเจาะเลือด น้ำเหลือง เป็นต้น แล้วนำมาตรวจร่วมกับการใช้สารกัมมันตรังสีในหลอดทดลอง วิธีนี้ปลอดภัยจากอันตรายทางรังสีโดยสิ้นเชิง จึงเป็นวิธีวินิจฉัยโรคที่ใช้ได้กับบุคคลทั่วไป รวมทั้งเด็กและหญิงมีครรภ์

6.2 การวิเคราะห์โดยใช้วิธีการอิมตัว (saturation analysis)

หลักการของการวิเคราะห์โดยใช้วิธีการอิ่มตัวสามารถวัดปริมาณของสารแทบทุกชนิดที่มีอยู่ในร่างกาย แม้จะอยู่ในระดับที่น้อยมากก็สามารถวัดได้ ซึ่งไม่อาจหาวิธีทางฟิสิกส์หรือเคมีอื่นตรวจหาได้ นับเป็นวิธีที่เป็นประโยชน์มาก วิธีการคือ

ใส่สารกัมมันตรังสี P^* ลงในสารประกอบ P ผสมให้เข้ากันโดยรอเวลาหรือใช้วิธีการทางเคมี จะได้ส่วนผสมเป็น $(P + P^*)$ แล้วนำมารวมกับสเปซิฟิครีเอเจ้นต์ Q *(specific reagent)* ณ จุดสมดุลย์ของปฏิกริยาจะแยกผลออกได้เป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เรียกว่าโมเลกุลอิสระ (F) ซึ่งประกอบด้วย $(P + P^*)$ ที่ไม่ได้ทำปฏิกริยากับ Q และส่วนที่

เรียกว่า "บาวนด์" *B (bound)* ซึ่งส่วนนี้เกิดจาก $(P + P^*)$ ทำปฏิกริยากับ Q ได้ผลเป็น $(PQ + P^*Q)$ (แสดงในรูป 6.1)



รูป 6.1 แผนผังแสดงวิธีการวิเคราะห์โดยใช้วิธีการอิ่มตัว

ในทางปฏิบัติ จำกัดปริมาณ Q ให้คงที่ เปลี่ยนแปลงปริมาณ P จะทำให้อัตราส่วนระหว่าง F และ B แปรตามปริมาณ P สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วน F/B หรือ B/F หรือ $B/(F + B)$ กับปริมาณ P จะได้กราฟมาตรฐานที่ช่วยให้สามารถวัดปริมาณ P ในสารที่ไม่ทราบค่าได้โดยวิธีเปรียบเทียบ (โดยอาศัยกราฟ)

การวัดปริมาณซึ่งอาศัยหลักการดังกล่าวมีชื่อเรียกต่างกันออกไปตามสเปซิฟิครีเอเจ้นต์ Q ที่ใช้ เช่น

- เรดิโออิมมูโนเอสเส่ย์ *(radioimmunoassay)* ใช้สเปซิฟิคแอนติบอดี้ เพื่อประโยชน์ในการศึกษาเรื่องฮอร์โมนของโปรตีน ฮอร์โมนโพลีเพปไทด์สเตอรอยด์ *(polypeptides steroid hormones)* ฮอร์โมนรัยรอยด์ และ แฮปเทน *(haptens)* อื่นๆ

- คอมเพตติตีฟโปรตีน *(competitive protein)* ใช้สารที่มีในธรรมชาติ เช่น สเปซิฟิค ซีรั่ม *(specific serum)* ทิชชูไบน์ดิ่งโปรตีน *(tissue binding proteins)* และไบโอโลจิคอลไบน์เดอร์ *(biological binder)* ตัวอื่นๆ เช่น นม แกสตริคจูยซ์ *(gastric-juice)* วิธีนี้มีประโยชน์เพื่อศึกษาฮอร์โมนสเตอร์รอยด์ ฮอร์โมนธัยรอยด์ วิตามินต่าง ๆ เทรสเอลเลเมันต์ *(trace elements)* และฮอร์โมนโปรตีน

- เรดิโอเอ็นไซม์มาติคเอสเสย์ ใช้สเปซิฟิคเอ็นไซม์ เพื่อประโยชน์ในการศึกษาวิตามินกรดฟอลิค *(folic acid)*

- เรดิโอไบโอโลจิคอลเอสเสย์ *(radiobiological assay)* ใช้สเปซิฟิคไมโครออร์แกนิสซึม *(micro - organism)*

- ซับสโตอิคิโอเมตริคเอสเสย์ *(sub-stoichiometric assay)* ใช้สารอนินทรีย์เพื่อประโยชน์ในการหาเทรสเอลเลเมันต์

6.3 หลักการของเรดิโออิมมูโนเอสเสย์

เรดิโออิมมูโนเอสเสย์มีหลักการพื้นฐานที่สำคัญคือ

1. ไบน์ดิงเอเจ้นต์ *(binding agent)* ที่เหมาะสมได้แก่แอนติบอดี้ที่มีดีกรีของสเปซิฟิซิตี้สูง *(specificity)* กล่าวคือ สามารถเลือกทำปฏิกริยากับแอนติเจ้นที่ต้องการได้ดี และไม่มีปฏิกริยากับสารอื่นที่มีลักษณะทางเคมีคล้ายคลึงกัน เช่น ดิจอกซิน *(digoxin)* มีคุณสมบัติทางเคมีคล้ายฮอร์โมนสเตอร์รอยด์ นอกจากนั้นแอนติบอดี้ที่ใช้ในการหาระดับของดิจอกซินทำปฏิกริยากับดิจอกซินได้มากกว่าทำปฏิกริยากับ "คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ดิจิทอกซิน" *(cardiac glycoside digitoxin)* (ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกันมาก) ได้ถึง 30 เท่า แอนติบอดี้ได้จากการฉีดฮอร์โมนเข้าในสัตว์เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดี้ แล้วแยกออกมาใช้ประโยชน์

2. แอนติเจนติดฉลาก *(labelled antigen)* โดยทั่วไปมักติดฉลากด้วยไอโอดีน -125 หรือ ไอโอดีน -131 ซึ่งคุณสมบัติทางเคมีจะเหมือนแอนติเจนที่ต้องการหาปริมาณทุกอย่าง เพียงแต่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี เมื่อติดฉลากแล้วต้องมีความบริสุทธิ์และสเปซิฟิคแอคติวิตี้สูง เพราะโดยทั่วๆไปความไว *(sensitivity)* หรือปริมาณน้อยสุดที่จะหาได้ของวิธีการหาปริมาณเป็นสัดส่วนกับสเปซิฟิคแอคติวิตี้ของแอนติเจนติดฉลาก

3. แอนติเจนไม่ติดฉลากปริมาณหนึ่ง เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบใช้จัดระดับของ-กราฟมาตรฐาน เพื่อให้คลุมขนาดของปริมาณแอนติเจนที่ต้องการหา ต้องใช้สารชนิดที่มีความบริสุทธิ์ทางเคมีสูง

4. เทคนิคการแยกระหว่างส่วนที่ทำปฏิกริยากับสเปซิฟิคแอนติบอดี้ กับส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยาออกจากกัน ซึ่งนิยมใช้วิธีแลกเปลี่ยนไอออน

แผนภาพแสดงหลักการของเรดิโออิมมูโนเอสเสย์คล้ายคลึงกับที่แสดงในรูป 6.1 แต่แทน P และ P^* ด้วย Ag *(antigen)* และ Ag^**(radioantigen)* ตามลำดับ ส่วนสาร Q คือแอนติบอดี้ *(Ab)* ดังนั้น ส่วนที่เป็นโมเลกุลอิสระ *(F)* ประกอบด้วย Ag และ Ag^* ที่ไม่ทำปฏิกริยากับแอนติบอดี้ Ab และส่วนที่เป็น "บาวนด์" *(B)* ประกอบด้วย $AgAb$ (คือแอนติเจนไม่ติดฉลากทำปฏิกริยากับแอนติบอดี้) และ Ag^*Ab (คือแอนติเจนกัมมันตรังสีทำปฏิกริยากับแอนติบอดี้)

ในการทำกราฟมาตรฐาน ใช้แอนติเจนกัมมันตรังสีปริมาณน้อยๆ ส่วนแอนติบอดี้ใช้ปริมาณคงที่ เปลี่ยนปริมาณแอนติเจนไม่ติดฉลากที่ทราบค่า ที่จุดสมดุลย์ของปฏิกริยาจะได้อัตราส่วน B/F (หรือ F/B หรือ $B/(F+B)$) แปรตามปริมาณแอนติเจนมาตรฐาน (ที่ไม่ติดฉลาก)

6.4 การนำเรดิโออิมมูโนเอสเสย์มาใช้ทางการแพทย์

เรดิโออิมมูโนเอสเสย์ที่นำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ แบ่งได้เป็น 3 ลักษณะคือ

- วัดปริมาณของฮอร์โมน
- วัดสารที่พบในร่างกาย
- วัดระดับของยาบางชนิดที่ใช้ในการรักษา

วัดปริมาณฮอร์โมน วิธีการเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ใช้วัดปริมาณฮอร์โมนที่สำคัญในร่างกายได้แทบทุกชนิด เช่น T_3 *(Liothyronine)*, T_4 *(Thyroxin)*, TSH *(Thyroid stimulation hormone)*, TRH *(Thyroid releasing hormone)*, LH *(Luteinizing hormone)*, *Growth hormone*, HPL *(Human placenta2 lactogen)*, และ *Adrenocorticotrophic hormone* ฯลฯ

วัดสารที่พบในร่างกาย ใช้วิธีการเรดิโออิมมูโนเอสเสย์หาระดับสารที่พบในร่างกายได้หลายชนิด เช่น HBA *(Hepatitis B Antigen)*, *AFP (Alpha-fetoprotein)*, *Carcinoembryonic Antigen*, Renin, Angiotensin, *Coagulation factors*, *Plasmin*, *Plasminogen*, *Insulin* และวิตามินต่างๆ เช่น เอ บี และดี เป็นต้น

วัดระดับของยาที่ใช้ในการรักษา เช่น ดิจอกซิน มอร์ฟีน ฯลฯ เพื่อประโยชน์ในการติดตามระดับของยาในเลือด เพื่อการกำหนดปริมาณและระยะเวลาที่จะรักษาด้วยยานั้นต่อไป

- ตัวอย่างเรดิโออิมมูโนเอสเสย์คิทที่นำมาใช้ในเวชศาสตร์นิวเคลียร์

บริษัทต่างๆได้ปรับปรุงวิธีการเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ให้ง่ายสะดวกต่อผู้ใช้ และมีประสิทธิภาพ ช่วยประกอบในการวินิจฉัยโรคในคนไข้ โดยทำเป็นคิท *(kits)* บอกรายละเอียดของทฤษฎี วิธีการใช้วัสดุ วิธีการเอสเสย์ปริมาณ เรนจ์ *(range)* ของคนปกติ และวิธีแปลผลที่ได้ คิทที่ใช้ในการตรวจเป็นประจำมีดังนี้คือ

RES - O - MAT เป็นวิธีการตรวจการทำหน้าที่ของต่อมธัยรอยด์ โดยพิจารณาทั้งการหาค่าไบน์ดิ่งแคพแพซิตี้ *(binding capacity)* ของ *TBG* และปริมาณ T_4 ร่วมกัน จึงน่าจะเป็นวิธีการตรวจที่ให้ผลดีกว่าวิธีอื่น

T_3 - และ T_4 - *RIA* ใช้หาระดับของ T_3 และ T_4 ซึ่งเป็นฮอร์โมนของต่อมธัยรอยด์ จัดเป็นวิธีการตรวจการทำหน้าที่ของต่อมธัยรอยด์ โดยที่ฮิปโปธัลลามัส *(hypothalamus)* หลั่ง *TRH* ควบคุมการทำงานแอนธีเรียพิทูอิทารี *(anterior pituitary)* ซึ่งหลั่ง *TSH* ควบคุมการทำงานของต่อมธัยรอยด์ ซึ่งหลั่ง T_3 และ T_4 ระดับของ T_3 และ T_4 ในคนปกติคงที่ได้โดยมี "เนกาทีฟฟีดแบค" *(negative feedback)* ย้อนกลับไปมีผลต่อแอนธีเรียพิทูอิทารี และอาจจะไปยังฮิปโปธัลลามัสด้วย ถ้าแกนฮิปโปธัลลามิคหรือพิทูอิทารีหรือธัยรอยด์เสีย จะทำให้ระดับของ T_3 และ T_4 ผิดไปจากปกติ

TSH - RIA หาระดับ *TSH* ในซีรัมเพื่อเป็นการยืนยันไฮโปธัยรอยด์เริ่มแรก *(primary hypothyroidism)* ซึ่งมีค่าสูงกว่าระดับปกติ แต่ถ้าระดับ *TSH* ปกติ หรือสูงเพียงเล็กน้อย ควรฉีด *TRH* ซึ่งจะทำให้ระดับของ *TSH* สูงขึ้นทันทีในพวกไฮโปธัยรอยด์ที่มีสาเหตุจากพิทูอิทารีเก็บ *TSH* ไว้ และในคนไข้ไฮเปอร์ธัยรอยด์มีระดับ *TSH* ต่ำ หรือปกติ และไม่มี (หรือมีน้อยมาก) ที่ค่า *TSH* เปลี่ยนแปลงหลังจากฉีด *TRH*

การตรวจการทำหน้าที่ของต่อมธัยรอยด์ นอกจากคิทต่างๆดังกล่าวแล้ว ยังมีคิทอื่นๆอีก เช่น *Thyopac -3* , *Thyopac -4* , และ *Thyopac -5*

Oestriol-RIA เป็นวิธีการตรวจประสิทธิภาพของทั้งฟีตัส *(foetus)* และรก *(placenta)* ร่วมกัน เป็นวิธีนิยมใช้ในการตรวจเป็นประจำ โดยแต่ละห้องทดลองจะทำกราฟระยะเวลาการตั้งครรภ์ตั้งแต่ 22-40 สัปดาห์ กับระดับของ *unconjugated Oestriol*

ในซีรัม *(ng/ml)* ของครรภ์ปกติไว้ ถ้าเด็กในครรภ์เสียหรือสุขภาพไม่ดี ค่าอาจต่ำกว่าค่าปกติตลอดระยะเวลาที่ตั้งครรภ์ หรือค่าที่วัดได้จะตกลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งอาจแสดงว่าเด็กอาการไม่ดีมาก หรืออาจตายได้

HPL (Human Placental Lactogen) เป็นวิธีการตรวจประสิทธิภาพของรก*HPL* เช่น เพปไทด์ฮอร์โมน เช่นเดียวกับ *HCG* วิธีการในห้องทดลองจะทำกราฟเช่นเดียวกับ *Oest-tiol - RIA* แต่วิธีนี้มีข้อเสียที่ทำให้การวินิจฉัยคลาดเคลื่อนมาก จึงไม่นิยมใช้

AFP (Alpha-fetoprotein) ในระหว่างการตั้งครรภ์ฟีตัสจะสร้าง *AFP* แล้วส่งผ่านของเหลวแอมนิโอติค *(amniotic fluid)* เข้าสู่กระแสเลือดของแม่ ระดับ *AFP* ในพลาสม่าของหญิงมีครรภ์จึงสูงกว่าปกติ แต่ถ้าสูงกว่าหญิงมีครรภ์ปกติมากแสดงว่าเด็กอาจเป็น - *Anencephaly* หรือมีไขสันหลังเปิดหรือแยก *(open spina bifida)* นอกจากนี้ ถ้าระดับ *AFP* ของคนไข้ปกติไม่มีครรภ์สูงกว่าระดับปกติ อาจมีสาเหตุมาจากเฮปปาโตมา *(hepatoma)* หรือพาราโตคาร์ซิโนมา *(Paratocarcinoma)* ได้ในบางกรณี

ACTH - RIA ใช้หาระดับของฮอร์โมน *Adrenocorticotrophic* ในพลาสม่าที่อยู่ในช่วง *10 - 4000 pg/ml* เพื่อการศึกษาอาการ *cushing's syndrome* , *ectopic ACTH syndrome* , และ *Addrennocortical* insufficiency

Cortipac - kit ใช้หาระดับของ *cortisol* ในเลือด เพื่อวินิจฉัยการเสื่อมสมรรถภาพของไตที่มีสาเหตุผิดปกติมาจากแกนฮิปโปธัลลามิคหรือพิทูอิทารีหรืออะดรีนัลได้โดยอาศัยหลักการควบคุมซึ่งกันและกัน โดย *corticosteroid* ที่สังเคราะห์จาก *cholesterol* ใน *adrenal cortex* ส่วนใหญ่แล้วคือ *cortisol* การหลั่ง *cortisol* ของ *adrenal cortex* อยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมน *ACTH* จาก *Anterio Pituitary* ระดับของ *cortisol* ปกติได้เมื่อมี *feedback* ควบคุมซึ่งกันและกัน

Angiotensin ใช้ในการประมาณค่า *plasma renin activity* โดยเป็นที่ทราบกันมานานกว่า 100 ปีแล้วว่า เรนินเป็นต้นเหตุทำให้ความดันโลหิตเปลี่ยนแปลง โดยวิธีการคือ เรนินเปลี่ยน *Angiotensinogen* ให้เป็น *Angiotensin (I)* ซึ่งจะถูก *converting enzyme* เปลี่ยนเป็น *Angiotensin (II)* ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้ต่อมอะดรีนัลหลั่งแอลโดสเตอโรน *(aldosterone)* อันจะเป็นตัวทำให้ *distal tubules* ดูดกลับโซเดียมกลับไปใหม่ ถ้าแอคติวิตี้ของเรนินผิดปกติจะทำให้เสียสมดุลย์ของโซเดียม จึงกระทบกระเทือนระบบของไต และทำให้ความดันโลหิตเปลี่ยนแปลง

Insulin - RIA ใช้ตรวจความผิดปกติของเมตะโบลิซึ่มของคาร์โบไฮเดรตเนื่องจากระดับของอินซูลินและระดับของกลูโคสในเลือดจะไปด้วยกัน คือถ้าระดับกลูโคสในเลือดสูงจะเป็นสาเหตุให้การขับอินซูลินสูงด้วย และถ้าระดับของกลูโคสต่ำ ระดับของอินซูลินจะต่ำด้วย ดังนั้น ถ้าระดับอินซูลินผิดไปจากปกติหมายถึงความผิดปกติของเมตะโบลิซึ่มของคาร์โบไฮเดรต

วิตามินบี -12 - *RIA* ใช้วัดระดับวิตามินบี -12 เพื่อการวินิจฉัย *Megaloblastic anemia* (ซึ่งมีสาเหตุจากการขาดวิตามินบี -12 หรือโฟเลท) หรือ *Pernicious - anemia*

Digoxin - RIA ระดับดิจอกซินในซีรัมหลังจากคนไข้รับยานี้ มีประโยชน์ในการตัดสินใจของแพทย์ที่จะใช้ยาในปริมาณต่างๆ เพื่อการรักษาต่อไป

นอกจากนี้ ยังมีคิทที่ทำขึ้นใหม่ตลอดเวลา เช่น *cyclic - AM? (cyclic adenosine metaphosphate)* เป็นต้น

6.5 บทสรุป

เรดิโออิมมูโนเอสเสย์เป็นวิธีหนึ่งของการวิเคราะห์แบบ *in vitro* ซึ่งมีค่าความไว *(sensitivity)* สูงตั้งแต่ระดับพิโคโมล *(picomole)* ถึงเฟมโตโมล *(femtomole)* กล่าวคือ 10^{-12} - 10^{-15} โมล เทคนิคดังกล่าวเป็นที่แพร่หลายตั้งแต่ปี ค.ศ. 1960 (พ.ศ. 2503) ฮอร์โมนเป็นตัวควบคุมการเจริญเติบโตของร่างกาย และเป็นตัวสื่อข่าวสารเพื่อปรับร่างกายให้พร้อมสำหรับปฏิกริยา เช่น การไหลเวียนของอะดรีนาลิน *(adrenalin)* เมื่อเกิดภาวะอันตรายในร่างกาย เมื่ออวัยวะบางส่วนของร่างกายอักเสบหรือติดเชื้ออันเกิดจากฮอร์โมน หรือแบคทีเรีย ซึ่งเรียกในนามทั่วไปว่า "แอนติเจน" *(antigen)* ร่างกายจะสร้างแอนติบอดี้ *(antibodies)* เป็นตัวต้านทานกำจัดการอักเสบนั้นๆ แอนติบอดี้มีส่วนประกอบของกรดอมิโน *(amino acid)* เป็นส่วนใหญ่ จากความสำคัญของฮอร์โมนและแอนติบอดี้ต่อพัฒนาการของร่างกาย จึงมีการค้นหาวิธีที่จะวินิจฉัยปริมาณฮอร์โมนบางชนิดและแอนติบอดี้ในสายเลือด ซึ่งก็คือวิธีการของเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ *(radioimmunoassay)* นั่นเอง

ปัจจุบันมีคิทต่างๆเพื่อหาระดับฮอร์โมนหรือสารต่างๆในร่างกาย ซึ่งทำให้สะดวกและได้ค่าแม่นยำเพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรค

คำถามทบทวน

6.1 หลักของการวิเคราะห์โดยใช้วิธีการอิ่มตัวมีอะไรบ้าง จงอธิบาย

6.2 ประโยชน์ของเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ในทางการแพทย์มีอะไรบ้าง จงอธิบายวิธีการ

6.3 อธิบายคำหรือข้อความต่อไปนี้พอสังเขป

ก) เรดิโออิมมูโนเอสเสย์

ข) T_3 - T_4 - *RIA*

ค) *TSH - RIA*

ง) *AFP*

จ) *Insulin - RIA*

6.4 หลักการของเรดิโออิมมูโนเอล่เล่ย์มีอะไรบ้าง จงอธิบาย

6.5 จงเปรียบเทียบการศึกษาโดยใช้สารกัมมันตรังสีแบบ *"in vitro"* และ *"in vivo"*