บทที่ 2

สัตว์ทดลอง การทดลอง สารเคมี และอุปกรณ์

สัตว์ทดลอง

ลิงหางยาวเพศเมียจำนวน 5 ตัว จากโคโลนีของศูนย์วิจัยไพรเมต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แยกเลี้ยงไว้ในกรงเดี่ยวขนาด 24 × 34 × 28 นิ้ว ในเรือนเลี้ยงซึ่งมีอากาศถ่ายเทได้สะดวกและควบคุมปริมาณแสงที่ได้รับในแต่ละวัน (ได้รับแสงวันละ 12 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 10.00-18.00 น.) เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ เสริมด้วยผักผลไม้ เช่น แตงกวา กล้วย มันเทศ สับปะรด และไข่ต้ม สัปดาห์ละครั้ง ลิงเพศเมียที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ทุกตัวอยู่ในวัยเจริญพันธุ์ อายุระหว่าง 5-7 ปี น้ำหนักระหว่าง 3.5 - 4.5 กิโลกรัม สัตว์ทดลองทุกตัวไม่เคยได้รับยาทุกชนิดก่อนนำมาทดลอง

ยาที่ใช้

เคทตามีนฮัยโดรคลอไรด์ (Parke-Davis, U.S.A.) ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขนาดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ 2, 5, 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ปริมาณของเคทตามีนฮัยโดรคลอไรด์ที่ให้กับสัตว์ทดลองแต่ละตัวแสดงไว้ในตารางที่ 2.1

เกณฑ์ที่ใช้ในการวัดระยะเวลาในการออกฤทธิ์และระยะเวลาที่สลบเมื่อให้ยาแต่ละขนาดในสัตว์ทดลองแต่ละตัว มีดังต่อไปนี้

ระยะเวลาในการออกฤทธิ์ (Induction time) วัดจากระยะเวลาหลังจากการฉีดยาแต่ละขนาดจนกระทั่งสัตว์ทดลองสูญเสียการทรงตัว (Righting reflex) ซึ่งเป็นภาวะที่สัตว์ทดลองไม่สามารถรับน้ำหนักตัวเองด้วยขาหน้า พบในสัตว์ทดลองที่หมดสติและในภาวะนี้สัตว์ทดลองจะไม่สามารถตอบสนองต่อความเจ็บปวด

ระยะเวลาสลบ (Anesthesia time) ช่วงเวลาตั้งแต่สูญเสียการทรงตัว จนสัตว์ทดลองมีความสามารถเคลื่อนไหวร่างกายตามความต้องการได้ ซึ่งมีข้อบ่งชี้คือ การที่สัตว์ทดลองสามารถใช้ขาหน้ารับน้ำหนักพยุงตัวเองขึ้นได้ (Porter, 1982)

ตารางที่ 2.1 แสดงค่าเฉลี่ยระยะเวลาในการออกฤทธิ์และระยะเวลาสลบ เมื่อได้รับยาเคทตามีนฮัยโดรคลอไรด์ ขนาด 2, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

ขนาดยา เคทตามีนฮัยโดรคลอไรด์ (มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	ระยะเวลาที่ยาออกฤทธิ์ (นาที)	ระยะเวลาสลบ (นาที)
2	-	-
5	4.32 ± 0.49	13.89 ± 2.30
10	4.12 ± 0.38	28.06 ± 2.49

เคทตามีนฮัยโดรคลอไรด์ 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ไม่สามารถทำให้สัตว์ทดลองสลบได้ แต่จะพบว่ามีอาการ "Ataxia" คือ การเคลื่อนไหวของแขน ขา ไม่สามารถประสานงานกันได้ ทำให้สัตว์ทดลองมีอาการเซ ลดการเคลื่อนไหวลง

ตารางที่ 2.2 แสดงปริมาณของยาเคทตามีนฮัยโดรคลอไรด์ ขนาด 2, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ที่ได้รับในลิงทดลองแต่ละตัว

หมายเลขลิงทดลอง	น้ำหนัก (กิโลกรัม)	ปริมาณเคทตามีนฮัยโดรคลอไรด์ (มิลลิกรัม)		
		2 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก.	5 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก.	10 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก.
41	3.5	7	17.5	35
42	4.5	9	22.5	45
102	3.5	7	17.5	35
104	3.8	7.6	19.0	38
107	4.2	8.4	21	42

การทดลอง

1. ระยะก่อนการทดลอง จำกัดการเคลื่อนไหวสัตว์ทดลองร่วมไปกับการเจาะเลือดโดยการจับของมนุษย์ และจำกัดการเคลื่อนไหวโดยการลดพื้นที่กรงทดลองร่วมกับการเจาะเลือด เพื่อให้สัตว์ทดลองเคยมีประสบการณ์ก่อนการทดลองจริง โดยการเจาะเลือดด้วยวิธีการเช่นนี้ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลานาน 1 เดือน

2. เพื่อทดสอบผลของความเครียดที่เกิดจากสาเหตุต่าง ๆ ต่อระดับฮอร์โมนคอร์ติซอลและโปรแลคติน แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

2.1 ทดสอบผลกระทบของยาเคทตามีนฮัยโดรคลอไรด์แต่ละขนาด

2.2 ผลกระทบที่เกิดจากการจำกัดการเคลื่อนไหวสัตว์ทดลองโดยมนุษย์ร่วมกับการเจาะเลือด

2.3 ผลกระทบที่เกิดจากการจำกัดการเคลื่อนไหวสัตว์ทดลองโดยการลดพื้นที่กรงทดลองร่วมไปกับการเจาะเลือด

ระยะเวลาห่างแต่ละการทดลองนาน 1 สัปดาห์

วิธีและแผนดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอนที่ 1

- เพื่อทดสอบผลกระทบของเคทตามีนฮัยโดรคลอไรด์ขนาดต่าง ๆ 3 ขนาด คือ 2, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ที่มีต่อระดับคอร์ติซอลและโปรแลคตินในซีรัมหลังจากการให้เคทตามีนฮัยโดรคลอไรด์แต่ละขนาด

- ลิงแต่ละตัวจะถูกจับออกมานอกกรงและเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำหน้าขาจำนวน 3 ซีซี ทุกครั้งก่อนให้ยาแต่ละขนาด เรียกตัวอย่างที่ได้จากการเจาะครั้งนี้ว่าเป็นเลือดตัวอย่างที่นาทีที่ 0 ซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุม (Control sample) หลังจากนั้นฉีดเคทตามีนฮัยโดรคลอไรด์ขนาดต่าง ๆ ที่กล่าวไว้ข้างต้นเข้ากล้ามเนื้อบริเวณขา ส่งกลับเข้า

ไปไว้ในกรงตามเดิมและจับมาเจาะเลือดอีกครั้งหนึ่ง จำนวน 3 ซีซี หลังจากทิ้งไว้นาน 5 นาที หรือ 10 นาที หรือ 20 นาที หรือ 30 นาที

- เริ่มทำการทดลองในช่วงเช้าที่เวลา 10.00 น. การเจาะเลือดแต่ละวันจะเจาะไม่เกินวันละ 6 ซีซี ในแต่ละตัว ดังนั้นขณะดำเนินการทดลองจึงเจาะเลือดลิงในนาทีที่ 0 และหลังจากที่ลิงได้รับยาในแต่ละขนาดใน 1 ช่วงเวลาเท่านั้น การเจาะเลือดครั้งต่อไปจะกระทำใน 3 วันต่อมา ดังนี้

วันที่ 1 ลิงทั้ง 5 ตัวจะถูกเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างที่นาทีที่ 0 ตัวละ 3 ซีซี และหลังจากให้เคทตามีนฮัยโดรคลอไรด์ขนาด 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม นาน 5 นาที อีก 3 ซีซี

วันที่ 4 ลิงทั้ง 5 ตัวจะถูกเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างที่นาทีที่ 0 ตัวละ 3 ซีซี และหลังจากให้เคทตามีนฮัยโดรคลอไรด์ขนาด 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม นาน 10 นาที อีก 3 ซีซี

วันที่ 7 ลิงทั้ง 5 ตัวจะถูกเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างที่นาทีที่ 0 ตัวละ 3 ซีซี และหลังจากให้เคทตามีนฮัยโดรคลอไรด์ขนาด 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม นาน 20 นาที อีก 3 ซีซี

วันที่ 10 ลิงทั้ง 5 ตัวจะถูกเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างที่นาทีที่ 0 ตัวละ 3 ซีซี และหลังจากให้เคทตามีนฮัยโดรคลอไรด์ขนาด 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม นาน 30 นาที อีก 3 ซีซี

ทำเช่นเดียวกันนี้ เมื่อให้เคทตามีนฮัยโดรคลอไรด์ ด้วยขนาด 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

ขั้นตอนที่ 2

- เพื่อทดสอบผลของการจำกัดการเคลื่อนไหวจากการจับของมนุษย์เป็นระยะเวลานาน 5 นาที 10 นาที 20 นาที และ 30 นาที ต่อระดับคอร์ติซอลและโปรแลคตินในซีรัม

- ลิงแต่ละตัวถูกจับออกจากกรงและเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำหน้าขาทันทีจำนวน 3 ซีซี เรียกตัวอย่างที่ได้จากการเจาะเลือดครั้งนี้ว่า เป็นตัวอย่างที่นาทีที่ 0 ใช้เป็นตัวอย่างควบคุม (Control sample) เจาะเลือดอีกครั้งหนึ่งหลังจากปล่อยให้ลิงอยู่ในสภาพจำกัดการเคลื่อนไหวจากการจับของมนุษย์เป็นระยะเวลานาน 5 นาที หรือ 10 นาที หรือ 20 นาที หรือ 30 นาที

- เริ่มทำการทดลองในช่วงเช้าที่เวลา 10.00 น. การเจาะเลือดแต่ละวันจะเจาะไม่เกินวันละ 6 ซีซีในแต่ละตัว ขณะดำเนินการทดลองจึงเจาะเลือดในนาทีที่ 0 และหลังจากจำกัดการเคลื่อนไหว 1 ช่วงเวลาเท่านั้น การเจาะเลือดครั้งต่อไปจะกระทำ 3 วันต่อมาดังนี้

วันที่ 1 ลิงทั้ง 5 ตัวจะถูกเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างที่นาทีที่ 0 ตัวละ 3 ซีซี ในทันทีที่ถูกจำกัดการเคลื่อนไหว และอีก 3 ซีซี หลังจากจำกัดการเคลื่อนไหวเป็นเวลานาน 5 นาที

วันที่ 4 ลิงทั้ง 5 ตัวจะถูกเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างที่นาทีที่ 0 ตัวละ 3 ซีซี ในทันทีที่ถูกจำกัดการเคลื่อนไหว และอีก 3 ซีซี หลังจากจำกัดการเคลื่อนไหวเป็นเวลานาน 10 นาที

วันที่ 7 ลิงทั้ง 5 ตัวจะถูกเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างที่นาทีที่ 0 ตัวละ 3 ซีซี ในทันทีที่ถูกจำกัดการเคลื่อนไหว และอีก 3 ซีซี หลังจากจำกัดการเคลื่อนไหวเป็นเวลานาน 20 นาที

วันที่ 10 ลิงทั้ง 5 ตัวจะถูกเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างที่นาทีที่ 0 ตัวละ 3 ซีซี ในทันทีที่ถูกจำกัดการเคลื่อนไหว และอีก 3 ซีซี หลังจากจำกัดการเคลื่อนไหวเป็นเวลานาน 30 นาที

ขั้นตอนที่ 3

- เพื่อทดสอบผลของการจำกัดการเคลื่อนไหวโดยการลดเนื้อที่ในกรงทดลองเป็นระยะเวลานาน 5 นาที 10 นาที 20 นาที และ 30 นาที ต่อระดับคอร์ติซอลและโปรแลคตินในซีรัม

- ลิงแต่ละตัวจะถูกจำกัดการเคลื่อนไหวโดยการลดเนื้อที่ในกรงจนลิงทดลองไม่สามารถเคลื่อนไหวตัวได้ เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำหน้าขาจำนวน 3 ซีซีทันที โดยเหยียดขาสัตว์ทดลองจากกรงเท่านั้น เรียกตัวอย่างที่ได้จากการเจาะเลือดครั้งนี้ว่าเป็นเลือดตัวอย่างที่นาทีที่ 0 เป็นตัวอย่างควบคุม (Control sample) และเจาะเลือดอีกครั้งหนึ่งจำนวน 3 ซีซี หลังจากปล่อยให้ลิงอยู่ในสภาพจำกัดการเคลื่อนไหวเป็นระยะเวลานาน 5 นาที หรือ 10 นาที หรือ 20 นาที หรือ 30 นาที

- เริ่มทำการทดลองในช่วงเช้าที่เวลา 10.00 น. การเจาะเลือดแต่ละวันจะเจาะไม่เกินวันละ 6 ซีซีในแต่ละตัว ดังนั้นขณะดำเนินการทดลองจึงเจาะเลือดในนาทีที่ 0 และหลังจากจำกัดการเคลื่อนไหว 1 ช่วงเวลาเท่านั้น การเจาะเลือดครั้งต่อไปจะกระทำ 3 วันต่อมาดังนี้

วันที่ 1 ลิงทั้ง 5 ตัวจะถูกเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างที่นาทีที่ 0 ตัวละ 3 ซีซี ในทันทีที่ถูกจำกัดการเคลื่อนไหว และอีก 3 ซีซี หลังจากจำกัดการเคลื่อนไหวเป็นเวลานาน 5 นาที

วันที่ 4 ลิงทั้ง 5 ตัวจะถูกเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างที่นาทีที่ 0 ตัวละ 3 ซีซี ในทันทีที่ถูกจำกัดการเคลื่อนไหว และอีก 3 ซีซี หลังจากจำกัดการเคลื่อนไหวเป็นเวลานาน 10 นาที

วันที่ 7 ลิงทั้ง 5 ตัวจะถูกเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างที่นาทีที่ 0 ตัวละ 3 ซีซี ในทันทีที่ถูกจำกัดการเคลื่อนไหว และอีก 3 ซีซี หลังจากจำกัดการเคลื่อนไหวเป็นเวลานาน 20 นาที

วันที่ 10 สิงทั้ง 5 ตัวจะถูกเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างที่นาทีที่ 0 ตัวละ 3 ซีซีในทันทีที่ถูกจำกัดการเคลื่อนไหว และอีก 3 ซีซีหลังจากจำกัดการเคลื่อนไหวเป็นเวลานาน 30 นาที

การเก็บซีรัม

หลังจากเจาะเลือดแล้ว ทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 ชั่วโมง จึงนำไปปั่นแยกซีรัมโดยใช้ Refrigerated centrifuges 2,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำซีรัมที่แยกได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาหาปริมาณของฮอร์โมน

การหาปริมาณของฮอร์โมน

คอร์ติซอล โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ โดยทำตามขั้นตอนและวิธีการของ WHO

โปรแลคติน โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ โดยทำตามขั้นตอนและวิธีการของ Diagnotic Products Corporation ปี 1985

สถิติ

เปรียบเทียบระดับเฉลี่ยฮอร์โมนโปรแลคตินและคอร์ติซอลนาทีที่ 0 ของทุกช่วงเวลาในลิงทดลองแต่ละตัว หลังได้รับเคทตามีนฮัยโดรคลอไรด์ทุกขนาด การจำกัดการเคลื่อนไหวทั้งสองรูปแบบ โดยใช้ ANOVA แบบ Randormized Complete Block Design ทดสอบความแตกต่างโดยใช้ DUNCAN New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

เปรียบเทียบอัตราการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนโปรแลคตินและคอร์ติซอลในช่วงเวลา 30 นาที หลังได้รับเคทตามีนฮัยโดรคลอไรด์แต่ละขนาดและการจำกัดการเคลื่อนไหวทั้งสองรูปแบบ โดยใช้ Linear Regression

เปรียบเทียบระดับเฉลี่ยของฮอร์โมนโปรแลคตินและคอร์ติซอลในช่วงเวลา 30 นาที หลังได้รับเคทตามีนฮัยโดรคลอไรด์แต่ละขนาด และการจำกัดการเคลื่อนไหวทั้งสองรูปแบบกับนาทีที่ 0 ของแต่ละช่วงเวลา โดยใช้ Paired t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

เรดิโออิมมิวโนแอสเสย์โปรแลคติน

สารที่ใช้

1. $|^{125}I|$ Prolactin Lot No. PRD 2163 Diagnostic Products Coporation Los Angeles, CA., U.S.A.

2. Prolactin Antiserum Lot No. PRD G 1106 Diagnostic Products Coporation Los Angles, CA., U.S.A.

3. Prolactin Standard Lot No. PRO 3031, 4031, 5031, 6031, 7031, 8031, 9031 Diagnotic Products Coporation, Los Angeles, CA., U.S.A.

4. Precipitating Solution Lot No. PRG 010 Diagnotic Products Coporation, Los Angeles, CA., U.S.A.

5. Distilled Water

อุปกรณ์

1. Gamma Counter Abbott Laboratories, U.S.A.

2. Centrifuge

3. Volumetric pipets 3, 6, 10 มิลลิลิตร

4. Micropipet : Microman Gilson France and Nichiryo Model 8100

5. Vortex Mixer

013915

การเตรียมสารละลาย

1. $|^{125}I|$ Prolactin Tracer (อยู่ในรูปที่ถูกทำให้แห้ง)

ปิเปตน้ำกลั่นปริมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่ใน vial ของ Prolactin tracer เขย่าเบา ๆ แต่ละ vial จะมีความเข้มข้นของกัมมันตภาพรังสีเท่ากับ 400 นาโนคูรีต่อมิลลิลิตร ผสมแล้วใช้ได้ทันที และสามารถเก็บไว้ได้นาน 30 วันที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

2. Prolactin Antiserum (อยู่ในรูปที่ถูกทำให้แห้ง)

ปิเปตน้ำกลั่นปริมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่ใน vial ของ Prolactin antiserum เขย่าเบา ๆ หลังผสมแล้วใช้ได้ทันทีและสามารถเก็บไว้ได้นาน 30 วัน ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

3. Prolactin Standard

อยู่ในรูปที่ถูกทำให้แห้งของ human serum บรรจุใน vial จำนวน 7 vials ที่ปิดฉลากไว้เรียงตามตัวอักษรตั้งแต่ A ถึง G โดยมีความเข้มข้นของโปรแลคติน 7 ระดับ เรียงตั้งแต่ A ถึง G คือ 0, 5, 10, 20, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตน้ำกลั่นปริมาณ 6 มิลลิลิตร ใส่ vial A และปริมาณ 3 มิลลิลิตร ใน vial B ถึง G ผสมให้เข้ากันอย่างเบา ๆ หลังผสมแล้วใช้ได้ทันที และสามารถเก็บไว้ได้นาน 30 วันที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

4. Precipitating Solution

เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย Goat-antirabbit gamma globulin (Secondary antibody) และ Polyethylene glycol in saline เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ก่อนมาใช้ต้องเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อน หลังจากเปิดใช้แล้วสามารถเก็บส่วนที่เหลือได้นาน 30 วัน ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 2.3 แสดงความเข้มข้นมาตรฐานของ Prolactin Standard

Prolactin Standard	ความเข้มข้นมาตรฐาน
Standard A	0 ng/ml
Standard B	5 ng/ml
Standard C	10 ng/ml
Standard D	20 ng/ml
Standard E	50 ng/ml
Standard F	100 ng/ml
Standard G	200 ng/ml

<u>เรดิโออิมมิวโนแอสเสย์โปรแลคติน</u>

สารมาตรฐาน สารควบคุมคุณภาพ และสารตัวอย่าง

ปิเปตสารตัวอย่าง สารมาตรฐาน ตั้งแต่ B ถึง G และสารควบคุมคุณภาพ ปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง 3 หลอดสำหรับสารมาตรฐาน 2 หลอดสำหรับสารควบคุมคุณภาพ และสารตัวอย่าง หลังจากนั้นปิเปต Prolactin tracer และ Prolactin antiserum อย่างละ 50 ไมโครลิตร ใส่ลงทุกหลอดผสมให้เข้ากันโดยใช้วอร์เทกซ์ แล้วอินคิวเบทไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาปิเปต Precipitating Solution (เขย่าก่อนนำมาใช้) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองทุกหลอด ผสมให้เข้ากันโดยใช้วอร์เทกซ์ เสร็จแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนที่ใสทิ้งคว่ำทุกหลอดลงใน rack ที่มีกระดาษซับรองไว้ด้านล่างเพื่อซับส่วนที่เป็นน้ำออกให้มากที่สุดทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที หลังจากนั้นนำส่วนที่เป็นตะกอนแข็งซึ่งติดอยู่ที่ก้นหลอดทดลองทุกหลอดไปวัดปริมาณกัมมันตภาพรังสีโดยใช้ Gamma Counter หลอดละ 1 นาที

นอกจากนั้นการทำ เรดิโออิมมิวโนแอส เสย์ของโปรแลคตินยังประกอบด้วยหลอด Non Specific binding, Maximum binding (Bo), Total count, Blank และ Recovery

Non specific binding (NSB)

ปิเปตสารมาตรฐาน vial A ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และ Prolactin tracer ปริมาณ 50 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันโดยใช้วอร์เทกซ์ หลังจากนั้นอินคิวเบทที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง เติม Precipitating solution ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกัน จากนั้นทำตามขั้นตอนเหมือนสารตัวอย่าง วัตถุประสงค์ในการทำหลอด Non Specific binding เพื่อทดสอบว่า ตัว Tracer ไปจับกับ Antigen มีค่า Counting

Maximum binding (Bo)

ปิเปตสารมาตรฐาน vial A ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วปิเปต Prolactin tracer และ Prolactin antiserum อย่างละ 50 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันโดยใช้วอร์เทกซ์ อินคิวเบทที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง เติม Precipitating solution ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกันโดยใช้วอร์เทกซ์ จากนั้นทำตามขั้นตอนเหมือนสารตัวอย่าง วัตถุประสงค์ในการทำเพื่อต้องการทราบว่า การจับกันของ Prolactin tracer และ Prolactin antiserum จับกันสูงสุดมีปริมาณเท่าไร

Total count

ปิเปต Prolactin tracer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง นำไปวัดหากัมมันตภาพรังสี วัตถุประสงค์ในการทำหลอด Total count เพื่อต้องการทราบว่า Prolactin tracer มีปริมาณกัมมันตภาพรังสีเท่าไร

Blank

นำหลอดทดลองเปล่า วัดปริมาณกัมมันตภาพรังสี หลอดนี้ทำเพื่อต้องการทราบว่า Counting tube มีกัมมันตภาพรังสีหรือไม่

Recovery

ปิเปต Prolactin standard ที่ทราบค่า ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง หลังจากนั้นกระทำตามขั้นตอนเหมือนกับสารตัวอย่าง วัตถุประสงค์ในการทำเพื่อวัดประสิทธิภาพของการแอส เสย์

ตารางที่ 2.4 แสดงองค์ประกอบของสารละลายในหลอดทดลอง เพื่อการวิเคราะห์ปริมาณโปรแลคตินในซีรัมด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

ชนิดของหลอดทดลอง	Sample (ไมโครลิตร)	Standard (ไมโครลิตร)	Tracer (ไมโครลิตร)	Antiserum (ไมโครลิตร)	Precipitating (มิลลิลิตร)	Total (มิลลิลิตร)
NSB	-	std A 100	50	-	1	1.15
Bo	-	std A 100	50	50	1	1.2
Standard	-	std B G 100	50	50	1	1.2
Sample	100	-	50	50	1	1.2
Q.C.	100	-	50	50	1	1.2

การคำนวณ ใช้วิธีเดียวกับการหาปริมาณคอร์ติซอล แต่ในที่นี้เครื่อง Gamma Counter วัดค่ารายงานผลเป็นปริมาณของโปรแลคติน เป็นนาโนกรัมต่อมิลลิลิตรได้เลย

เรดิโออิมมิวโนแอสเสย์คอร์ติซอล

สารที่ใช้

1. ^{3}H-Cortisol : Amersham International plc, England.

2. Antiserum to cortisol : Batch No. K 907010 WHO RIA Reagent Programme

3. Cortisol Standard : Batch No. K 079510 WHO RIA Reagent Programme

4. Charcoal Reagent : Batch No. 81/Q WHO RIA Reagent Programme Switzerland

5. Dextran : Batch No. 82/83/S WHO RIA Reagent Programme Switzerland

6. Sodium dihydrogen phosphate (anhydrous) : No. 01169297 AR Grade. BDH Chemical Ltd., Endland

7. Disodium hydrogen phosphate : No. 0119086 AR Grade. BDH Ltd., England.

8. Gelatin : Bacto Gelatin Difco Laboratory, U.S.A.

9. PPO (2, 5-diphenyloxazole) : Art. 2946 E. Merck, Darmstadt.

10. Thiomersal (merthiolate) : No. T 5152, Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A.

11. Toluene : Pro analysi E. Merck, D-6100 Darmstadt, F. R. Germany

12. Triton X-100 (Octyl Phenoxy Polyethoxyethanol) : No. T 6878 Rohm & Haas Co.,

13. Sodium Chloride : General Purpose Reagent BDH Chemical Ltd., Pook, England.

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งละเอียด : Right a Weight, M. W. Aingworth & Son Inc., U.S.A.

2. เข็มฉีดยาเบอร์ 22 และเบอร์ 27 : Turumo Corporation, Tokyo.

3. Syring ขนาด 10 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร (ชนิดใช้ครั้งเดียวทิ้ง) Turumo Corporation, Tokyo.

4. Micropipet : Pipetman H-81-12297 M 81 Gilson, France; Eppendorf 3130, Germany; Pipet Gun, Clay Adams, U.S.A.

5. Vortex mixture : M 16715, Thermolyne Corporation; Iowa U.S.A.

6. pH meter : 5985 Cole Parmer Instrument Company, Chicago Illinoi 60648

7. Magnetic stirrer : S 18520 Thermolyne Corporation, Iowa, U.S.A.

8. Refrigerated Centrifuge

9. β-Liquid Scintillation Counter

การวิเคราะห์หาปริมาณคอร์ติซอลโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

สารละลายและวิธีที่เตรียม

1. Assay Buffer เตรียมโดยใช้สารเคมีต่อไปนี้

Sodium dihydrogen phosphate (anhydrous)	2.35 กรัม
Disodium hydrogen phosphate (anhydrous)	11.60 กรัม
Sodium chloride	8.80 กรัม
Thiomersal (merthiolate)	0.01 กรัม
Gelatin	1.00 กรัม

ละลาย Gelatin ในน้ำอุ่นก่อนเล็กน้อย เติมสารทั้งหมดลงไปจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 7.2-7.4 โดยใช้สารละลาย 1 M. sodium hydroxide และ 1 M. Hydrochloric acid เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บไว้ได้นาน 1 เดือน

2. Charcoal suspension เตรียมโดยใช้

Charcoal	0.625 กรัม
Dextran	0.0625 กรัม

ละลาย Dextran ใน Assay Buffer 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติม charcoal ลงไปปั่นให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน

3. Cortisol standard

ปิเปต Cortisol standard จาก WHO ที่มีความเข้มข้น 6 ไมโครโมลต่อลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร เติม Assay Buffer 10 มิลลิลิตร นำไปอินคิวเบทที่ 40 องศาเซลเซียส 30 นาที ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายคอร์ติซอลมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 60 นาโนโมลต่อลิตร สารละลายนี้เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 2-3 สัปดาห์ เมื่อจะใช้นำสารละลายที่เก็บนี้มาทำ Serial Dilution ให้มีความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 6,000, 3,000, 1,500, 750 และ

187 เฟมตาไมลต่อมิลลิลิตร

4. Cortisol Working Tracer

ใช้ Cortisol Stocking Tracer ที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครคูรีต่อมิลลิลิตรปริมาณ 100 ไมโครลิตรเป่าให้แห้ง จากนั้นเติม Assay buffer ปริมาณ 7.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ working tracer ที่มีความเข้มข้น 133.33 นาโนคูรีต่อมิลลิลิตร

5. Cortisol Antiserum

ใช้ Cortisol Antiserum จาก WHO ซึ่งอยู่ในรูปที่ถูกทำให้แห้ง เติม Assay buffer 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลาย นำไปใช้ได้ทันที

6. Counting Solution

เตรียมโดยใช้ PPO (2, 5 diphenylcxazole) ปริมาณ 15 กรัม ละลายใน Toluene 2 ลิตร เติม Triton x-100 ปริมาณ 1 ลิตร ปั่นให้เข้ากัน

<u>เรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของคอร์ติซอล</u>

ปิเปตซีรัมตัวอย่างและซีรัมที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพปริมาณ 10 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองรูปกรวยที่มีน้ำกลั่นปริมาณ 1 มิลลิลิตรบรรจุอยู่ ผสมเข้าด้วยกันโดยใช้เครื่องวอร์เทกซ์ แล้วนำไปอินคิวเบทที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสใน water bath นาน 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ผสมเข้าด้วยกันอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นปิเปตใส่หลอดทดลองหลอดละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 2 หลอดในกรณีเป็นสารตัวอย่าง และ 3 หลอดสำหรับสารควบคุมคุณภาพและสารละลายมาตรฐาน เติม Assay buffer ปริมาณ 400 ไมโครลิตรลงทุกหลอดผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์ ปิเปต Cortisol tracer และ Cortisol antiserum ชนิดละ 100 ไมโครลิตรใส่ลงทุกหลอดผสมให้เข้าด้วยกันโดยใช้วอร์เทกซ์ นำไปอินคิวเบทนาน 18-24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดเวลา ปิเปต Charcoal suspension ที่ถูกปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันปริมาณ 200 ไมโครลิตรใส่หลอดทดลองทุกหลอดที่วางแช่ไว้ในภาชนะที่มีน้ำแข็ง ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอร์เทกซ์ ตั้งทิ้งไว้นาน 15 นาที จึงนำไปปั่นโดยใช้ Refrigerated Centrifuge ด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

เทส่วนที่ใสลงใน Counting vial เติม Counting solution ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้วอร์เทกซ์ จากนั้นนำไปวัดปริมาณรังสีนานหลอดละ 5 นาที นอกจากนี้หลอดใส่สารมาตรฐาน สารควบคุมคุณภาพ หลอดใส่สารตัวอย่างแล้ว ยังต้องมีหลอด Non specific binding (NSB), หลอด Maximum binding, Total count, Blank และหลอด Recovery

หลอด Non specific binding เติม Assay buffer ปริมาณ 600 ไมโครลิตร และ Cortisol tracer ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันโดยใช้วอร์เทกซ์ นำไปอินคิวเบท 18-24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำตามขั้นตอนตั้งแต่การเติม Charcoal suspension จนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการเหมือนกับการเตรียมสารตัวอย่าง

หลอด Maximum binding (Bo) เติม Assay buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตร Cortisol tracer และ Cortisol antiserum อย่างละ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่เตรียมไว้ผสมให้เข้ากันโดยใช้วอร์เทกซ์ นำไปอินคิวเบทนาน 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำตามขั้นตอนตั้งแต่เติม Charcoal suspension ไปจนสิ้นสุดกระบวนการเหมือนกันการเตรียมสารตัวอย่าง

หลอด Total count ปิเปต cortisol tracer ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงใน counting vial ที่มี assay buffer 600 ไมโครลิตร จากนั้นเติม couting solution ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกันโดยใช้วอร์เทกซ์ นำไปวัดปริมาณกัมมันตภาพรังสี

หลอด Blank เติม counting solution ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงใน counting vial 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้วอร์เทกซ์ นำไปวัดปริมาณกัมมันตภาพรังสี

หลอด Recovery ปิเปต Cortisol standard ที่ทราบค่าความเข้มข้นปริมาณ 50 ไมโครลิตร ทำตามขั้นตอนและกระบวนการเดียวกันกับสารตัวอย่าง

ตารางที่ 2.5 แสดงวิธีเตรียมสารละลายคอร์ติซอลมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐาน

หลอดทดลองชุดที่	สารละลายที่ใช้ผสม (มิลลิลิตร)			ความเข้มข้น (เฟมตาโมล/100 ไมโครลิตร)
	ชื่อสารละลาย	ปริมาณ	ปริมาณ Buffer	
1	Solution B	0.1	-	6,000
2	Stock std	1	1	3,000
3	1	1	1	1,500
4	2	1	1	750
5	3	1	1	375
6	4	1	1	187

ตารางที่ 2.6 แสดงองค์ประกอบของสารละลายในหลอดทดลองเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณคอร์ติซอลในซีรัมด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

สารละลาย / หลอดทดลอง	Tracer (ไมโครลิตร)	Antiserum (ไมโครลิตร)	Buffer (ไมโครลิตร)	Standard (ไมโครลิตร)	Sample (ไมโครลิตร)	Total (ไมโครลิตร)
NSB	100	-	600		-	700
Bo	100	100	500		-	700
Standard	100	100	400	100	-	700
Sample	100	100	400		100	700
QC.	100	100	400		100	700

<u>การคำนวณ</u>

1. กราฟมาตรฐาน

นำค่า CPM ของ Standard cortisol แต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ย แล้วลบด้วยค่าเฉลี่ย CPM ของ NSB นำค่าที่ได้วาดกราฟ VS กับความเข้มข้นของ standard บนกระดาษกราฟ semilog

2. ตัวอย่างซีรัม

นำค่าเฉลี่ยของ CPM ซีรัมตัวอย่างลบออกด้วยค่าเฉลี่ย CPM ของ NSB นำไปอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน ได้ค่าเป็นเฟมตาโมลต่อหลอดทดลอง เปลี่ยนเป็นเฟมตาโมลต่อมิลลิลิตร โดยคำนวณจากปริมาณที่ใช้ ทำการปรับค่าโดยใช้เปอร์เซนต์ของค่า Recovery อีกครั้ง

3. Quality control

คำนวณเช่นเดียวกับตัวอย่างซีรัม นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกันภายในแต่ละแอสเสย์ และระหว่างแอสเสย์ เพื่อทดสอบ Precision และ Accuracy

4. เปอร์เซนต์ประสิทธิภาพการแอสเสย์ (% Recovery) คำนวณได้จาก

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารที่ได้จากการแอสเสย์}}{\text{ความเข้มข้นของสารที่มีอยู่จริง}} \times 100$$