วัสดุและวิธีดำเนินการ

1. สารเคมี

(1,2 -^{3}H) cortisol specific activity 49 ci/m mol, (The Radiochemical Centre, Amersham, England) ทำให้เจือจาง โดย absolute ethanol เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 10uci/ml และเก็บไว้ที่ -20°C

Cortisol, naphthaleneและ Fuller's earth (B.D.H., England)

Absolute ethanol และ dichloromethane (E.Merck, Darmstadt, Germany)

BBOT (2,5 - bis - 2 (5 - tert - butylbenzoxazolyl) - thiophene) (Scintillation grade) (Packard, U.S.A.)

Eihylene glycol monoethyl ether และ toluene (Carlo Erba, Milano)

Cortrophine ACTH Organon (highly purified) (N.V. Organon Oss. Holland) 1 vial บรรจุ 50 I.U. corticotrophin

Liguid scintillator เตรียมโดย ใช้ naphthalene 80 กรัม และ BBOT 6 กรัม ละลายใน toluene 500 มล. และ ethylene glycol monoethyl ether 500 ml.

2. บุคคลที่ใช้ในการทดลอง

ได้แก่ นักศึกษา, คนงาน และคนไข้ซึ่งหายเป็นปกติแล้ว ประกอบด้วยผู้หญิง 58 คน และผู้ชาย 50 คน อายุระหว่าง 15 – 75 ปี ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

---

1 บุคคลที่ใช้ทำการทดลอง จะต้องไม่เป็นโรคเกี่ยวกับระบบต่อมไร้ท่อ, โรคตับ และโรคไต และจะต้องไม่ได้รับคอร์ติโคสเตียรอยด์, เอสโตรเจน และ ACTH ในเวลาใกล้ ๆ กับที่จะเก็บตัวอย่างด้วย

ก. กลุ่มที่ 1 กลุ่มนี้ใช้ในการหาค่าปกติของคอร์ติซอลในพลาสม่าและในปัสสาวะ ประกอบด้วย ผู้ชาย 58 คน และผู้หญิง 50 คน อายุระหว่าง 15 – 75 ปี

ข. กลุ่มที่ 2 กลุ่มนี้ใช้ในการศึกษา adrenal cortical reserve โดยการฉีด ACTH ประกอบด้วยผู้ชาย 16 คน และผู้หญิง 5 คน อายุระหว่าง 19 – 52 ปี

3. การเก็บตัวอย่าง (specimens)

ก. ปัสสาวะ เก็บปัสสาวะ 24 ชม. โดยไม่ต้องเติมสารกันบูด อาจจะทำการทดลองทันที หรือเก็บใส่ตู้เย็นไว้ก่อน หรือจะเก็บไว้ที่ -20°C ก็ได้

ปัสสาวะที่เก็บจากผู้ชาย 2 คน และผู้หญิง 2 คน อายุ 25 – 30 ปี ทุก ๆ 2 ชม. จนครบ 24 ชม. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับคอร์ติซอลในปัสสาวะตลอด 24 ชม.

ในการศึกษา adrenal cortical reserve จะเก็บปัสสาวะ 24 ชม. เป็นเวลา 4 – 5 วัน ติดต่อกัน เก็บปัสสาวะจากผู้ชาย 7 คน และผู้หญิง 3 คน อายุระหว่าง 19 – 45 ปี ละลาย 25 units ของ ACTH ในน้ำเกลือ (normal saline) 500 มล. แล้วให้ทางเส้นเลือดดำ เป็นเวลา 8 ชม. โดยให้ในวันที่ 2 และ 3 ตั้งแต่เวลา 8 – 9 น. ถึงเวลา 15 – 16 น.

ข. เลือด เจาะเลือด 5 มล. ในระหว่างเวลา 8 – 9 น. และอีกครั้งหนึ่ง ในเวลา 15 – 16 น. ใช้ heparin เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anti-coagulant)

ในการศึกษา adrenal cortical reserve จะเจาะเลือดในเวลา 8 น. และ 14. น. ก่อน และให้ ACTH 25 units ทางกล้ามเนื้อ และ 1 ชม. หลังจากนี้จะเจาะเลือดอีกครั้ง บุคคลที่ใช้ทำการทดลองประกอบด้วยผู้ชาย 9 คน และผู้หญิง 2 คน อายุระหว่าง 22 – 52 ปี

4. การเตรียม CBG-^{3}H

เตรียมโดย ผสม (1,2 -^{3}H) Cortisol 10 μci/ml 0.4 มล. กับน้ำกลั่นก่อน แล้วจึงเติม pooled human plasma 5 ml และเติมน้ำกลั่นลงไปอีกจนครบ 100 มล. ผสมให้เข้ากัน

5. ลำดับขั้นของการทดลอง

ลำดับขั้นของการทดลองประกอบด้วย

ก. Deproteinization

ข. Quantitation

6. การทำกราฟมาตรฐาน

ใส่ 5,10,15,20,25,30 และ 40 ng ของ standard cortisol (0.1ug/ml) ลงในหลอดทดลองนำไประเหยให้แห้ง โดยใช้ N_2 อุณหภูมิไม่สูงกว่า 45°C การทำกราฟมาตรฐานแต่ละชุดจะมี 1 หลอดที่ไม่ใส่ standard cortisol

เติม CBG ^3H 1 ml ลงในหลอดทดลองที่นำไประเหยให้แห้งแล้วทุกหลอด นำไปเขย่าใน waterbath อุณหภูมิ 45°C เพื่อละลาย standard cortisol 5 นาที นำไปทำให้เย็นที่ 10°C 10 นาที แล้วเติม Fuller's earth 12 mg ลงในแต่ละหลอดนำไปเขย่าอย่างแรงโดยใช้ automatic shaker 2 นาที แล้วนำกลับไปใส่ใน waterbath อุณหภูมิ 10°C อีก 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 2000 รอบต่อนาที 5 นาที

แยกสารละลายส่วนบน 0.5 มล. ใส่ใน counting vial และเติม liquid scintillator 10 มล. เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดรังสี โดยใช้ Packard Liquid Scintillation Spectrometer Model 3390 หรือ 3375

7. การแยกฮอร์โมนจากเลือดและปัสสาวะ

ก. เลือด ใส่พลาสม่า 0.1 มล. แล้วเติม absolute ethanol 1 มล. เขย่าอย่างแรงประมาณ 1 นาที เพื่อตกตะกอน binding protein นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 2000 รอบต่อนาที 5 นาที แยกสารละลายส่วนบนมา 0.5 มล. ใส่หลอดทดลอง แล้วนำไประเหยให้แห้งโดยใช้ N_2 อุณหภูมิไม่เกิน 45°C

ข. ปัสสาวะ นำปัสสาวะปริมาตร 1/3000 ของปริมาตรทั้งหมดและเติมน้ำกลั่นลงไปจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 3 มล. เติม dichloromethane 3 มล. และเขย่าอย่างแรง 1 นาที แยกชั้นของ dichloromethane เก็บไว้แล้วเติม dichloromethane 3 มล. ลงในส่วนที่เหลือและเขย่าอย่างแรงอีก 1 นาที แยกชั้นของ dichloromethane นำมารวมกับที่เก็บไว้ครั้งแรก

เอาสารละลายที่เก็บไว้ใส่หลอดทดลอง 2 หลอดหลอดละ 2 มล. แล้วนำไประเหยให้แห้งโดยใช้ N_2 อุณหภูมิไม่เกิน 45°C

ในการทดลองแต่ละครั้ง ทุกค่าจะทำ 2 ครั้ง (duplicate) และจะมี pooled human plasma ทำด้วยเพื่อใช้เป็นการทดสอบการทดลองทุกครั้ง

หลังจากแยกฮอร์โมนจากพลาสม่า และปัสสาวะแล้ว การทดลองที่เหลือทำเหมือนกับเมื่อตอนสร้างกราฟมาตรฐาน

8. การคำนวณ

ก. เปอร์เซนต์ binding

ถ้า A เป็นจำนวน cpm (count per minute เมื่อใส่ Fuller's earth

B เป็นจำนวน cpm เมื่อไม่ได้ใส่ Fuller's earth

$$\% \text{ binding} = \frac{A}{B} \times 100$$

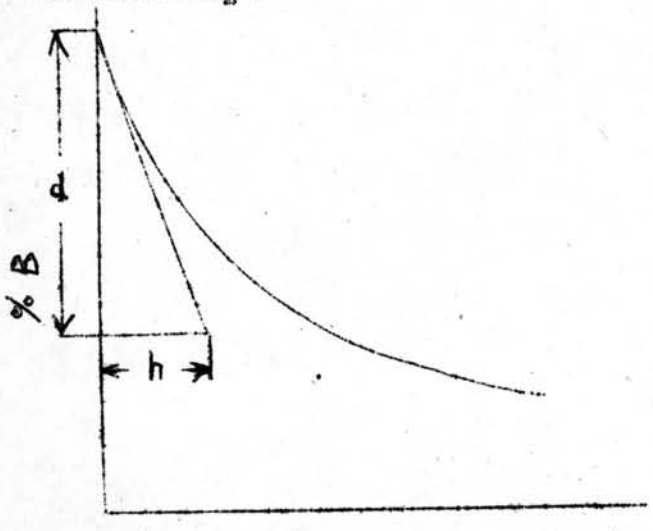
ข. ความไวในการวัด (sensitivity)

ใช้วิธีของ Ekins และ Newman (1970)

$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{Statistical error}}{\text{slope}}$$

วิธีหาเปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนทางสถิติ ทำได้โดยหาอัตราส่วน F/B ทุกจุด ที่ทำกราฟมาตรฐานและค่าเฉลี่ย และหา % ความแตกต่างและค่าเฉลี่ย ก็จะได้ความคลาดเคลื่อนทางสถิติเฉลี่ย

วิธีหาความชันของกราฟมาตรฐาน ทำได้โดยเขียนกราฟระหว่าง % B กับปริมาณของคอร์ติซอลมาตรฐาน



$$\text{slope} = \frac{d}{h}$$

ค. การคำนวณ Percentage recovery

สมมติปริมาณคอร์ติซอลใน pooled plasma = A นาโนกรัม

ปริมาณคอร์ติซอลมาตรฐานที่เติมลงไป = B นาโนกรัม

ปริมาณคอร์ติซอลที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน = X นาโนกรัม

$$\text{Percentage recovery} = \frac{X}{A + B} \times 100$$

ง. Specificity

สมมติเมื่อมี คอร์ติซอล P ng count A cpm

คอร์ติซอล P ng + X P ng count B cpm

ผลเมื่อเปรียบเทียบกับคอร์ติซอลความเข้มข้นเท่ากัน $= \frac{(A - B)}{A} \times 100\ \%$

จ. ปริมาณ คอร์ติซอลในพลาสม่าและในปัสสาวะ

เมื่ออ่านค่าจากกราฟมาตรฐานแล้ว สมมติปริมาณของคอร์ติซอลในพลาสม่า = A ng และในปัสสาวะ = B ng

ใน 0.5 มล. extraction มีคอร์ติซอล A ng

ถ้าใน 1.1 " " $\frac{1.1 \times A\ ng}{0.5}$

$= 2.2 \times A\ \mu g\ \%$

ใน 2 มล. extraction มีคอร์ติซอล B ng

ถ้าใน 6 " " $\frac{6 \times B}{2}$ ng

ใน $\frac{1}{3000}$ เท่าของปัสสาวะ 24 ชม. มีคอร์ติซอล $\frac{6 \times B}{2}$ ng

ถ้าใน 1 " " $\frac{6 \times B}{2} \times 3000$ ng

$= 9000 \times B$ ng

$= 9 \times B\ \mu g/24\text{-hr. urine}$

ปริมาณคอร์ติซอลในพลาสม่าอ่านจากกราฟมาตรฐานแล้วคูณด้วย 2.2 และในปัสสาวะคูณด้วย 9 มีหน่วยเป็น $\mu g\ \%$ และ $\mu g/24\text{-hr. urine}$ ตามลำดับ

ฉ. การคำนวณค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$), สัมประสิทธิ์ความเบี่ยงเบน (coefficient of variation), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และ t statistic

coefficient of variation $= \frac{S.D.}{Mean} \times 100$

unpaired t $= \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{\sqrt{\frac{(Nx-1)\ (SDx)^2 + (Ny-1)(SDy)^2}{N_x + N_y}\left(\frac{1}{N_x} + \frac{1}{N_y}\right)}}$

paired t $= \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{\sqrt{\frac{(SDx)^2 + (SDy)^2 - 2r\ SDx\ SDy}{N}}}$

$\bar{X} = \frac{\Sigma Xi}{Nx}$; $\bar{Y} = \frac{\Sigma Yi}{Ny}$

SDx = standard deviation of X $= \sqrt{\frac{\Sigma(Xi - \bar{X})^2}{Nx - 1}}$

SDy = standard deviation of Y $= \sqrt{\frac{\Sigma(Yi - \bar{Y})^2}{Ny - 1}}$

r = correlation coefficient

$$= \frac{\Sigma XY - \frac{\Sigma X \Sigma Y}{N}}{\sqrt{\left(\Sigma X^2 - \frac{(\Sigma X)^2}{N}\right)\left(\Sigma Y^2 - \frac{(\Sigma Y)^2}{N}\right)}}$$