หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้เป็นลิงหางยาวเพศเมีย จากศูนย์วิจัยไพรเมตส์ ภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 11 ตัว ซึ่งมีอายุอยู่ในช่วง 6-10 ปี มีน้ำหนักระหว่าง 3-4.5 กิโลกรัม โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่มีภาวะเจริญพันธุ์ปกติ เมื่อได้รับการผสมจากพ่อพันธุ์สามารถตั้งครรภ์ได้ มีรอบประจำเดือนปกติ (28-32 วัน) จำนวน 5 ตัว

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่มีภาวะเจริญพันธุ์ต่ำ ได้รับการผสมจากพ่อพันธุ์เป็นเวลามากกว่า 3 ครั้ง ก็ไม่สามารถตั้งครรภ์ได้ จำนวน 6 ตัว ซึ่งจะมีทั้งมีรอบประจำเดือนปกติ (28-32 วัน) และรอบประจำเดือนยาวกว่าปกติ

ลิงทุกตัวถูกแยกเลี้ยงกรงละตัว ในห้องทดลองที่มีอากาศถ่ายเทได้สะดวก โดยมีการควบคุมแสงที่ได้รับในแต่ละวัน (ได้รับแสงวันละ 12 ชั่วโมง) สัตว์ทดลองถูกเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปจากบริษัทโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ ในเวลาเช้า และเสริมด้วยผักและผลไม้ เช่น แตงกวา สับปะรด ถั่วฝักยาว กล้วย และมันเทศ ในเวลาบ่าย และเสริมด้วยไข่ต้มสัปดาห์ละครั้ง

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาระดับของฮอร์โมนอีสตราดิออล ลูทีนไนซิงฮอร์โมน และโปรเจสเตอโรน ในลิงหางยาวที่มีภาวะเจริญพันธุ์ปกติ

ใช้ลิงหางยาวเพศเมีย จำนวน 5 ตัว มีอายุประมาณ 7-8 ปี มีน้ำหนัก 3-4.5 กิโลกรัม ในขณะที่ศึกษามีรอบประจำเดือนปกติ 28-32 วัน

ทำการเจาะเลือด โดยเริ่มจากวันที่มีประจำเดือนวันแรก โดยถือว่าเป็น

วันที่ 1 ของรอบประจำเดือน เจาะวันเว้นวัน และเจาะติดต่อกันทุกวันในวันที่ 11-15 ของรอบประจำเดือน จนกระทั่งถึงวันที่มีประจำเดือนของรอบต่อไป นำเลือดที่ได้มาแยกเอาซีรัมเก็บไว้ศึกษาหาระดับฮอร์โมนอีสตราดิออล ลูทีนไนซิงฮอร์โมน และโปรเจสเตอโรน โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

2. การศึกษาระดับฮอร์โมนอีสตราดิออล ลูทีนไนซิงฮอร์โมน และโปรเจส-เตอโรน ในลิงหางยาวเพศเมีย จำนวน 6 ตัว ได้แก่ # 22, # 33, # 9, # 41, # 42 และ # 101 โดยเริ่มเจาะเลือดในฤดูฝน

ฤดูฝน (พฤษภาคม - ตุลาคม)

เริ่มเจาะเลือดจากวันที่ 1 ของรอบประจำเดือน เจาะเลือดวันเว้นวันและติดต่อกันในวันที่ 11-15 จนครบรอบ นำเลือดที่ได้ในแต่ละวันแยกเก็บซีรัมไว้ นำไปหาระดับฮอร์โมนอีสตราดิออล ลูทีนไนซิงฮอร์โมน และโปรเจสเตอโรน ของลิงแต่ละตัว

หลังจากศึกษารูปแบบของฮอร์โมนแล้วลองทดสอบความสามารถในการสืบพันธุ์ โดยนำไปผสมกับพ่อพันธุ์ที่มีความสามารถในการสืบพันธุ์สูงในรอบประจำเดือนต่อมา พบว่าลิง # 22 และ # 33 สามารถตั้งครรภ์ได้ ส่วน # 9, # 41, # 42 และ # 101 ไม่สามารถตั้งครรภ์ได้

ฤดูแล้ง (พฤศจิกายน - เมษายน)

เริ่มเจาะเลือดในลิง 4 ตัวที่ไม่สามารถตั้งครรภ์ได้ จากวันที่ 1 ของรอบประจำเดือน เจาะเลือดวันเว้นวันและติดต่อกันในวันที่ 11-15 จนครบรอบ นำเลือดที่ได้ในแต่ละวันแยกเก็บซีรัมไว้ นำไปหาระดับฮอร์โมนอีสตราดิออล ลูทีนไนซิงฮอร์โมน และโปรเจส-เตอโรน ของลิงแต่ละตัว

ศึกษารูปแบบของฮอร์โมนอีสตราดิออล ลูทีนไนซิงฮอร์โมน และโปรเจสเตอโรน และทดสอบความสามารถในการสืบพันธุ์โดยนำไปผสมกับพ่อพันธุ์ที่มีความสามารถในการสืบพันธุ์สูงในรอบประจำเดือนต่อมา พบว่าลิงทั้ง 4 ตัวไม่สามารถตั้งครรภ์ได้

3. การศึกษาผลของคลอมิฟีน ซิเตรท ต่อระดับฮอร์โมนในลิงหางยาวเพศเมียที่มีภาวะเจริญพันธุ์ต่ำ

ภายหลังเจาะเลือด และทดสอบความสามารถในการสืบพันธุ์ในฤดูแล้ง เมื่อเข้าสู่ฤดูฝนอีกครั้งก็ทำการศึกษา ผลของคลอมิฟีน ซิเตรท โดยเมื่อเริ่มเข้าสู่รอบประจำเดือนใหม่ในวันแรกก็ให้ลิงกิน คลอมิฟีน ซิเตรท 10 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นเวลา 5 วันติดต่อกันในเวลาประมาณ 10.00 น. ขณะเดียวกันก็เริ่มเจาะเลือดในวันที่ 1 ของรอบประจำเดือน โดยเจาะวันเว้นวันและเจาะติดต่อกันในวันที่ 11-15 เจาะจนถึงวันที่ 30 ของรอบประจำเดือน นำเลือดที่ได้ในแต่ละวันแยกเก็บซีรัมไว้ นำไปหาระดับฮอร์โมนอีสตราดิออล ลูทีน-ไนซิงฮอร์โมน และโปรเจสเตอโรน

4. การศึกษาผลของคลอมิฟีน ซิเตรทต่อการรักษาภาวะเจริญพันธุ์ต่ำในลิงหางยาว

ในระหว่างรอบประจำเดือนที่ทำการรักษาด้วยคลอมิฟีน ซิเตรท หลังจากให้คลอมิฟีน ซิเตรทในวันที่ 1-5 แล้ว เมื่อถึงวันที่ 12-16 ของรอบประจำเดือน ก็นำไปผสมกับพ่อพันธุ์ เพื่อทดสอบความสามารถในการสืบพันธุ์

แผนผังการศึกษาในลิงแต่ละตัวได้แสดงไว้ในแผ่นภาพที่ 2 (# 22) แผ่นภาพที่ 3 (# 33) แผ่นภาพที่ 4 (# 9) แผ่นภาพที่ 5 (# 41) แผ่นภาพที่ 6 (# 42) และแผ่นภาพที่ 7 (# 101)

<u>คลอมิฟีน ซิเตรท</u>

มีชื่อทางการค้าคือ คลอมิด (Clomid) ผลิตโดยบริษัท เมอเรลล์-เนชันแนล แลบบอราทอรีส์ จำกัด มีสรรพคุณในการชักนำให้เกิดชบวนการตกไข่ในสตรี ปริมาณที่ใช้ในสตรีจะเริ่มจาก 50 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นเวลาติดต่อกัน 5 วัน ในระยะฟอลลิคูลาร์ ถ้าการรักษาในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน ไม่เกิดผลดี จะเพิ่มขนาดขึ้นจนถึง 250 มิลลิกรัมต่อวัน โดยไม่มีอันตรายและสามารถเพิ่มอัตราการตกไข่ได้สูงมากขึ้น

การใช้คลอมิฟีน ซิเตรท ในลิงหางยาวที่มีรอบประจำเดือนปกติ ในขนาด 3, 9, 15 และ 30 มิลลิกรัมต่อวัน ในวันที่ 5-9 ของรอบประจำเดือน โดยเทียบกับน้ำหนักตัว (ประมาณ 50, 150, 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อวันในคน) จะพบว่าการตกไข่ไม่ขึ้นกับปริมาณของคลอมิฟีน ซิเตรท แต่จะขึ้นกับตัวสัตว์เอง (Littman และ Hodgen, 1985)

จากการที่คลอมิฟีน ซิเตรท สามารถรักษาสตรีที่มีปัญหามีบุตรยากเนื่องจากไม่มีการตกไข่ ดังนั้นในลิงหางยาวที่มีปัญหาผสมติดยากก็น่าจะสามารถใช้คลอมิฟีน ซิเตรทในการรักษาได้

ขนาดที่เลือกใช้ ในลิงหางยาวสำหรับการทดลองครั้งนี้คือ 10 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งเมื่อเทียบกับที่ใช้ในคนประมาณ 200-250 มิลลิกรัมต่อวัน ช่วงเวลาที่เลือกใช้ในการให้ยาคือวันที่ 1-5 ของรอบประจำเดือน

การเก็บซีรัม

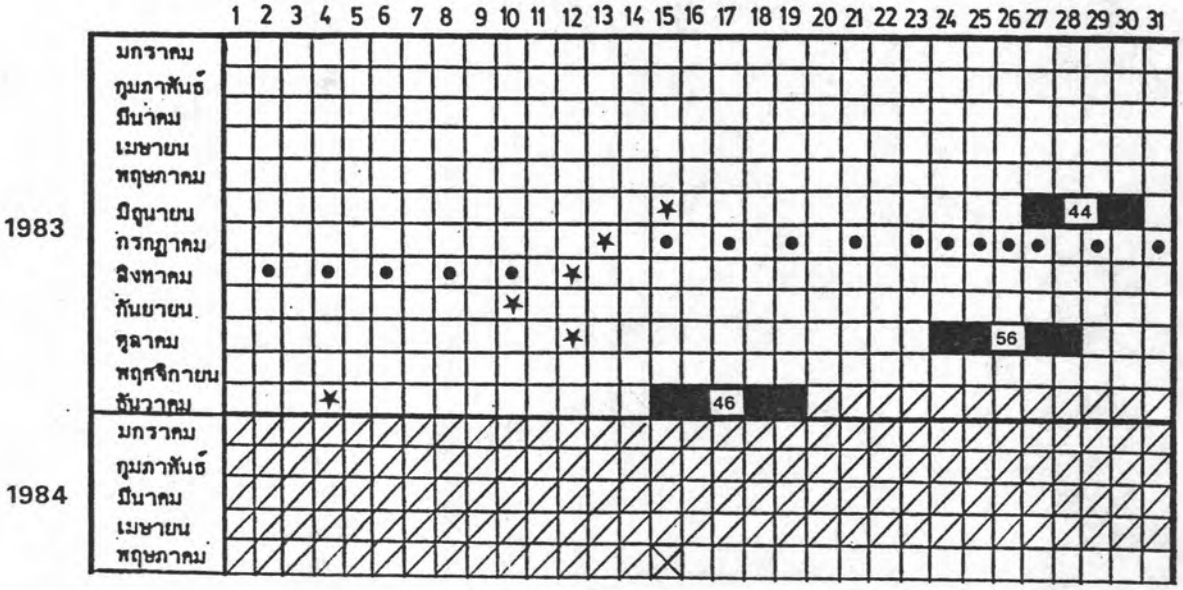
ทำการเจาะเลือดลิงที่ทำการทดลองทั้ง 11 ตัว ที่ไม่ได้วางยาสลบ จากเส้นเลือดดำบริเวณต้นขาครั้งละ 3 มิลลิลิตร ในเวลาประมาณ 9.00-10.30 น. นำเลือดที่เจาะได้ในแต่ละวันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที แยกซีรัมที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์หาระดับฮอร์โมนอีสตราดิออล ลูทีนไนซิงฮอร์โมน และโปรเจสเตอโรน โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

การผสมพันธุ์

ในลิงหางยาวที่มีรอบประจำเดือนปกติและสม่ำเสมอ จับผสมในวันที่มีการตกไข่ ซึ่งวันตกไข่ถือเอาวันที่ 0.48 ของรอบประจำเดือน (Dukelow และ Brüggeman, 1979) เมื่อถึงวันนั้นก็จับลิงเพศเมียใส่ในกรงของลิงพ่อพันธุ์ คอยดูว่ามีการผสมพันธุ์ประมาณ 3-4 วัน แล้วจึงแยกออก ลิงเพศผู้ที่ใช้อายุประมาณ 6-12 ปี ทุกตัวเคยใช้เป็นพ่อพันธุ์และสามารถทำให้ลิงเพศเมียตั้งครรภ์ได้

การทดสอบการตั้งครรภ์

สามารถทำได้โดยการตรวจหา mCG (monkey chorionic gonadrotropin) โดยใช้วิธีฮีมแอกกลูติเนชัน อินฮิบิชันแอสเสย์ (Hemagglutination Inhibition Assay: HIA) ตามวิธีของ Varavudhi และคณะ (1982) โดยใช้ปัสสาวะของลิงในวันที่ 23-27 หลังจากวันที่ได้รับการผสม



★ วันที่ 1 ของรอบประจำเดือน

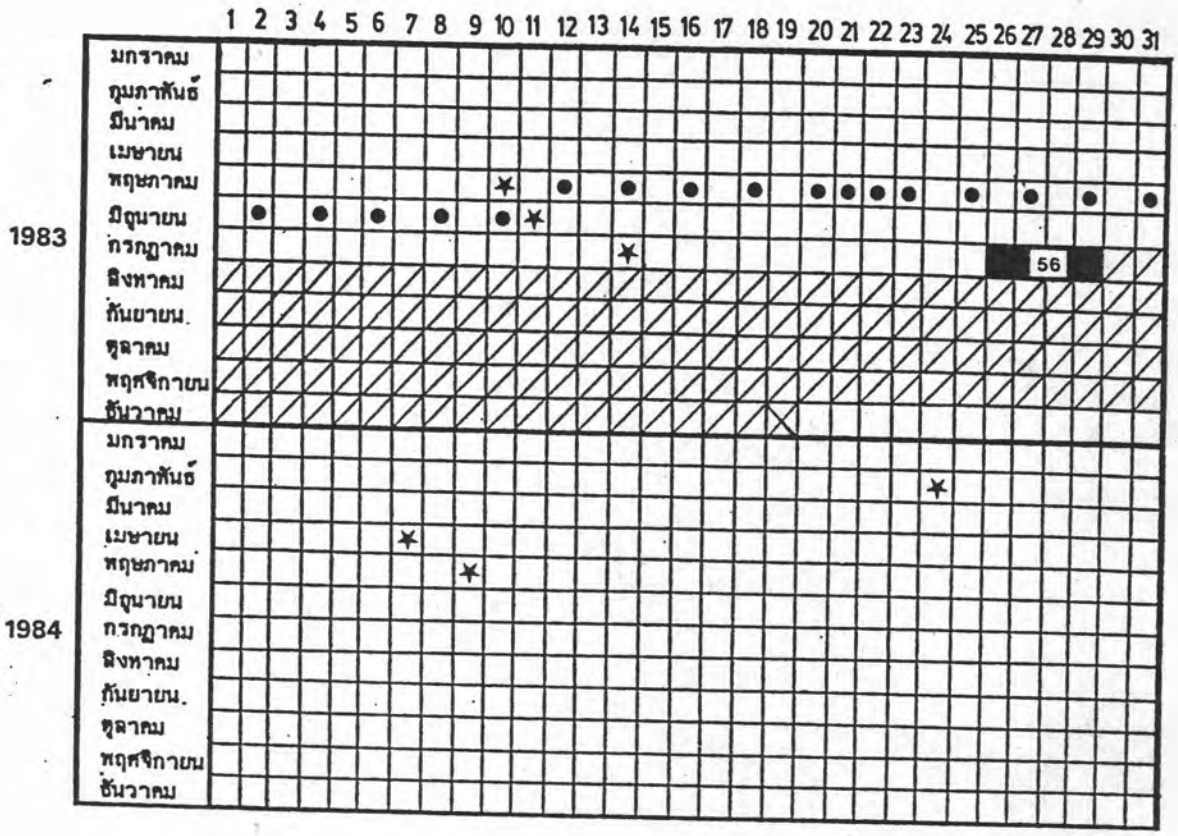
● วันที่ได้รับการเจาะเลือด

■ วันที่จับผสมกับเพศผู้ (ตัวเลข = เบอร์ลิงเพศผู้ที่ใช้)

☑ วันที่ตั้งครรภ์

☒ วันที่ caesarean delivery

ภาพที่ 2 แสดงแผนผังการศึกษาในลิง # 22



✶ วันที่ 1 ของรอบประจำเดือน

● วันที่ได้รับการเจาะเลือด

■ วันที่จับผสมกับเพศผู้ (ตัวเลข = เบอร์ลิงเพศผู้ที่ใช้)

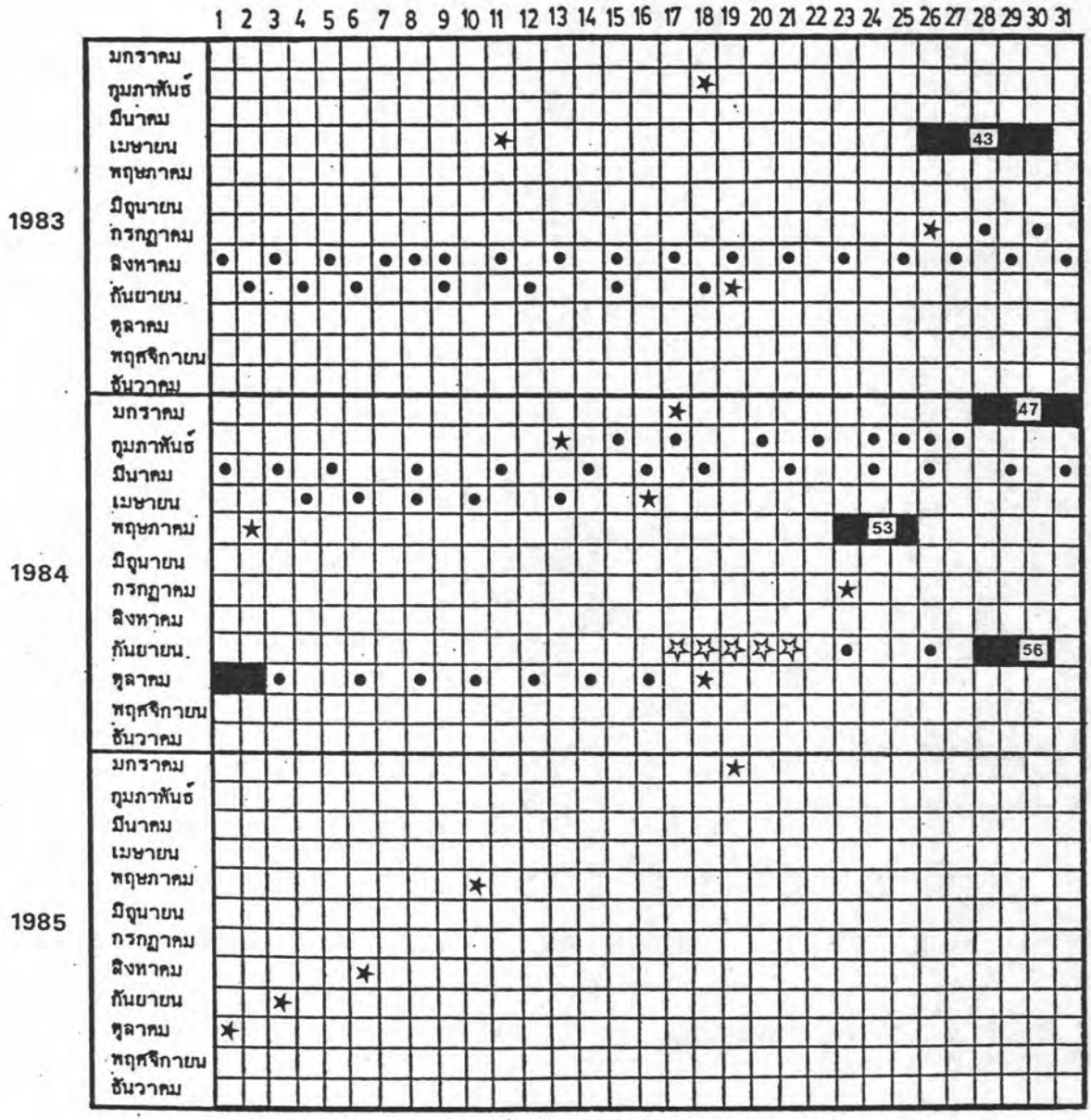
☑ วันที่ตั้งครรภ์

☒ วันที่ caesarean delivery

ภาพที่ 3 แสดงแผนผังการศึกษาในลิง # 33

011931

i 17471784



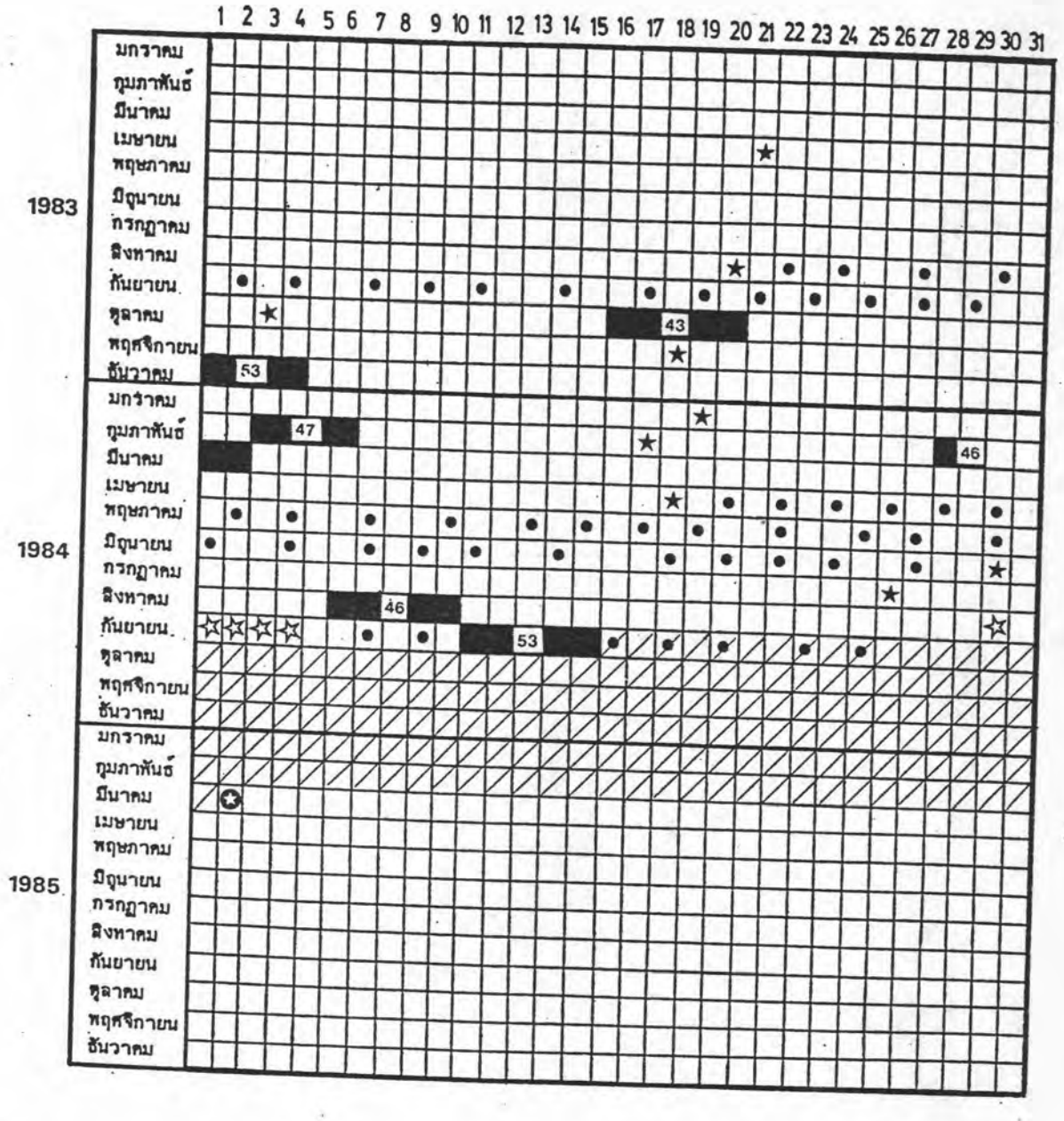
★ วันที่ 1 ของรอบประจำเดือน

● วันที่ได้รับการเจาะเลือด

■ วันที่จับผสมกับเพศผู้ (ตัวเลข = เบอร์ลิงเพศผู้ที่ใช้)

☆ วันที่รักษาด้วย คลอมิฟีน ซิเตรท

ภาพที่ 4 แสดงแผนผังการศึกษาในลิง # 9



★ วันที่ 1 ของรอบประจำเดือน

● วันที่ได้รับการเจาะเลือด

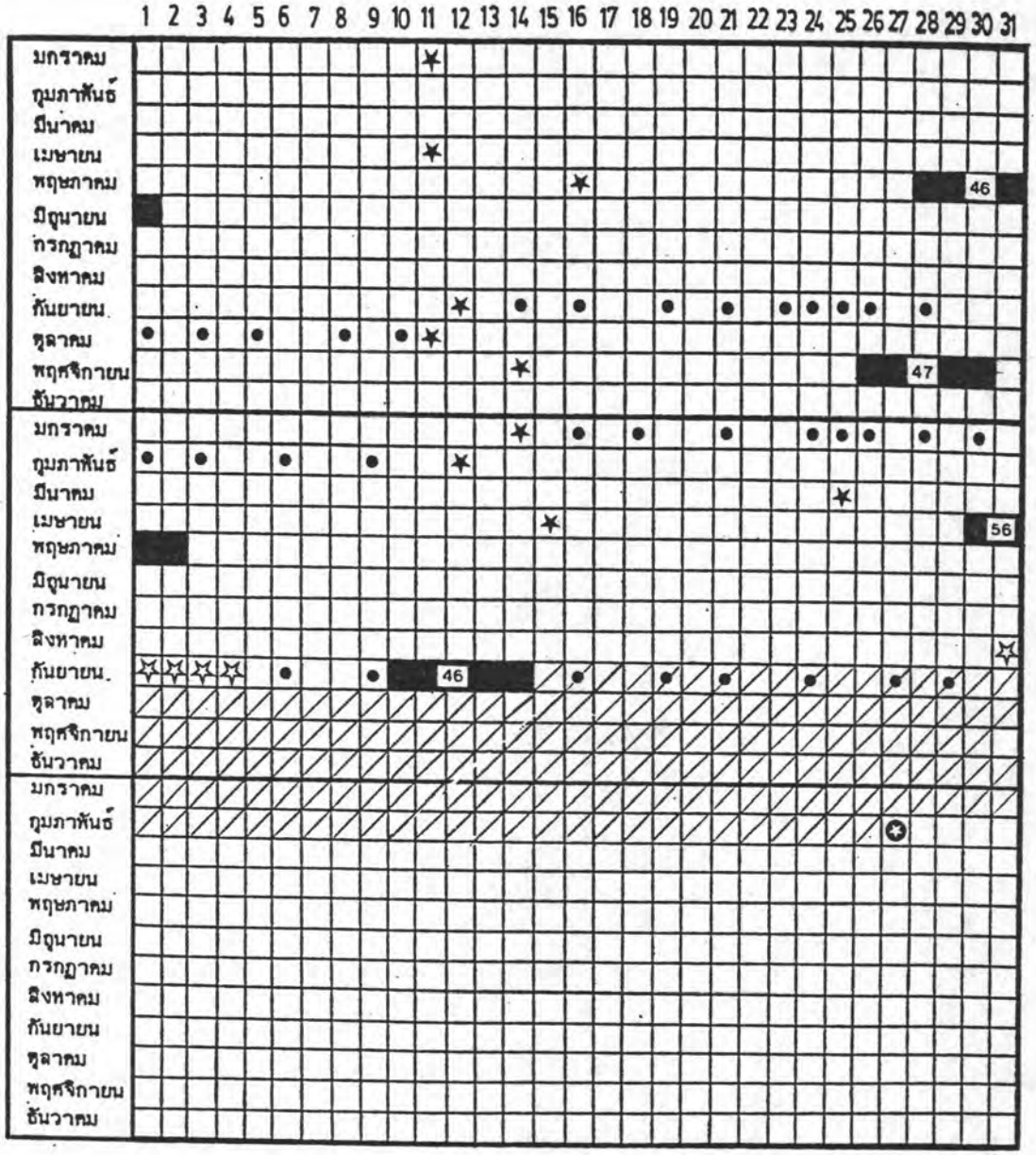
■ วันที่จับผสมกับเพศผู้ (ตัวเลข = เบอร์ลิงเพศผู้ที่ใช้)

☆ วันที่รักษาด้วย คลอมิฟีน ซิเตรท

▨ วันที่ตั้งครรภ์

✪ วันที่คลอดลูก

ภาพที่ 5 แสดงแผนผังการศึกษาในลิง # 41



★ วันที่ 1 ของรอบประจำเดือน

● วันที่ได้รับการเจาะเลือด

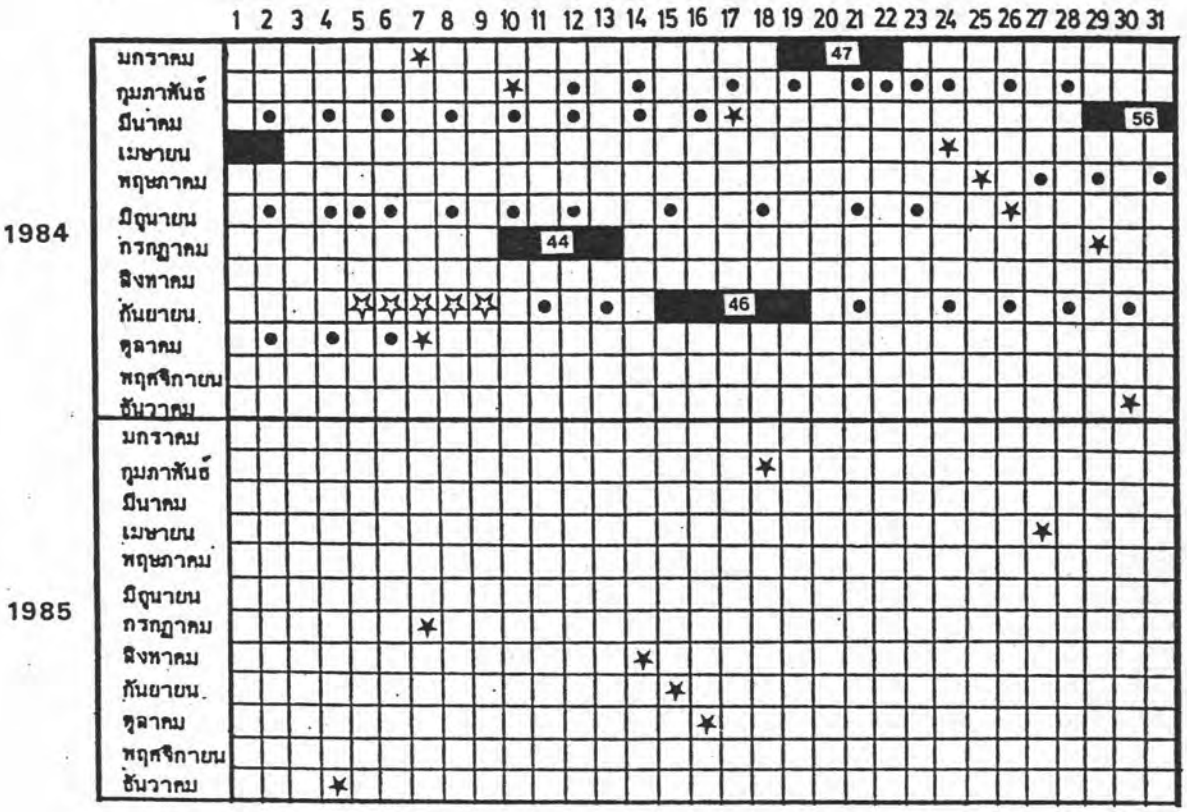
■ วันที่จับผสมกับเพศผู้ (ตัวเลข = เบอร์ลิงเพศผู้ที่ใช้)

☆ วันที่รักษาด้วย คลอมิฟีน ซิเตรท

▨ วันที่ตั้งครรภ์

✪ วันที่คลอดลูก

ภาพที่ 6 แสดงแผนผังการศึกษาในลิง # 42



★ วันที่ 1 ของรอบประจำเดือน

● วันที่ได้รับการเจาะเลือด

■ วันที่จับผสมกับเพศผู้ (ตัวเลข = เบอร์ลิงเพศผู้ที่ใช้)

☆ วันที่รักษาด้วย คลอมิฟีน ซิเตรท

ภาพที่ 7 แสดงแผนผังการศึกษาในลิง # 101

อุปกรณ์

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

2. เครื่องชั่งหยาบ : Mettler E. 2-0 Mettler Instrument Switzerland.

3. Micropipets : Pipetteman M. 81 Gilson France ; Eppendorf 3130 Germany ; Pipet Gun Clay Adams USA.

4. Tri-block heater : U-460, Thecam incorporated Princeton N.J. USA.

5. Magnetic stirrer : S-18520 Thermolyne Corporation Iowa USA.

6. Mixer : M 16715 Thermolyne Corporation Iowa USA.

7. pH meter : 5985. Cole Parmer Instrument Company Chicago Illinoi 60648. USA.

8. Refrigerated centrifuge : Model PR-J International-Equipment Company Mass. USA.

สารเคมี

BSA (Bovine serum albumin)	Sigma Chemical Company, USA
Charcoal Reagent	WHO Matched RIA Reagent Program
Dextran	WHO Matched RIA Reagent Program
Diethyl Ether	E. Merck ; Germany
Disodium hydrogen phosphate	E. Merck ; Germany
EDTA	J.T. Baker Chemical Company Co., U.S.A.
Ethanol (absolute)	E. Merck ; Germany
Gelatin	Difco Laboratories, U.S.A.

Hydrochloric Acid	BDH Chemicals Ltd., England
PPO (2, 5 Diphenyloxazole)	Sigma Chemical Company, U.S.A.
Sodium Azide	Sigma Chemical Company, U.S.A.
Sodium Chloride	BDH Chemicals Ltd., England
Sodium Hydroxide	BDH Chemicals Ltd., England
Sodium Dihydrogen Phosphate	E. Merck, Germany
Toluene	E. Merck, Germany
Triton X-100	Sigma Chemical Company, U.S.A.
Thiomersal	Sigma Chemical Company, U.S.A.

สารละลายมาตรฐานและแอนตีซีรัม

สารละลายมาตรฐานและแอนตีซีรัมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณอีสตราดิออล และโปรเจสเตอโรน ใช้ human kits สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณลูทีนไนซิงฮอร์โมน ใช้ rhesus monkey kits จาก WHO Matched RIA Reagent Program

Tracer

(2,4,6,7,16,17,^{3}H) - Estradiol	Amersham International Limited, England
(1,2,6,7,^{3}H) - Progesterone	Amersham International Limited, England
(^{125}I) - LH	WHO Matched RIA Reagent Program

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรเจสเตอโรนโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

สารละลายและวิธีเตรียม

1. Assay buffer เตรียมโดยใช้

Sodium dihydrogen orthophosphate	2.35 กรัม
Disodium hydrogen orthophosphate (anhydrous)	11.60 กรัม
Sodium Chloride	8.80 กรัม
Thiomersal (merthiolate)	0.10 กรัม
Gelatin	1.00 กรัม

นำสารทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร (โดยอุ่น Gelatin ในน้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อยก่อน) แล้วปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 7.2-7.4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้นาน 1 เดือน

2. Progesterone Standard

เตรียมโดยใช้ progesterone standardจาก WHO ซึ่งมีความเข้มข้น 24 นาโนโมลต่อลิตร ปิเปตสารละลายนี้ 500 ไมโครลิตร เติม Assay buffer 4.5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายโปรเจสเตอโรนมาตรฐาน ซึ่งมีความเข้มข้น 1200 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร จากนั้นทำ serial dilution ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1200 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร ถึง 37.5 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร เตรียมแล้วใช้ทันที ดังตารางที่ 1

3. Progesterone working tracer

เตรียมโดยใช้ progesterone stock tracer ซึ่งมีความแรง 10 ไมโครคูรีต่อมิลลิลิตร จำนวน 150 ไมโครลิตร เป่าให้แห้งด้วย Compressor air แล้วเติม assay buffer 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ working tracer ซึ่งมีความแรง 100 นาโนคูรีต่อมิลลิลิตร

4. Progesterone antiserum

เตรียมโดยใช้ progesterone antiserum จาก WHO ซึ่งถูกทำให้แห้ง

เก็บไว้ในขวด นำมาเติม 10 มิลลิลิตรของ assay buffer เขย่าให้ละลายให้หมด เตรียมแล้วใช้ทันที

ตารางที่ 1 แสดงวิธีเตรียมสารละลายโปรเจสเตอโรนมาตรฐาน จากสารละลายมาตรฐานตั้งต้น ความเข้มข้น 24 นาโนโมลต่อลิตร

สารละลายที่ต้องการ	สารละลายที่ใช้ผสม		บัฟเฟอร์ที่ใช้ผสม (มล.)	ความเข้มข้น (เฟมตาโมล/0.5 มล.)
	ชื่อสารละลาย	ปริมาณ (มล.)		
1	Stock Std.	0.5	4.5	1200
2	1	2.0	2.0	600
3	2	2.0	2.0	300
4	3	2.0	2.0	150
5	4	2.0	2.0	75
6	5	2.0	2.0	37.5

5. Charcoal suspension

เตรียมโดยใช้ Dextran 0.0625 กรัม ละลายใน assay buffer 100 มิลลิลิตร แล้วเติม charcoal 0.625 กรัม ปั่นให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บไว้ใช้ได้นาน 1 เดือน เวลาจะใช้ต้องทำให้อยู่ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เสมอ

6. Counting Solution

เตรียมโดยใช้ PPO (2,5 diphenyloxazole) 15 กรัม ละลายใน Toluene 2 ลิตร แล้วเติม Triton X-100 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน

วิธีการวิเคราะห์หาโปรเจสเตอโรน

ปริมาณของโปรเจสเตอโรนในซีรัม หาได้โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ ตามวิธีการของ WHO (1981) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. การสกัด (extraction)

ใช้ตัวอย่างซีรัม จำนวน 125 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองรูปกรวย ตัวอย่างละ 2 หลอด เติม diethyl ether 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์ นาน 1 นาที แล้วทิ้งไว้ให้แยกชั้นน้ำออกจากชั้น ether โดยแช่ลงในถาดที่มีน้ำแข็งแห้งปนกับ ethyl alcohol รินส่วนของ ether ซึ่งสกัดเอาโปรเจสเตอโรนออกมาแล้วลงในหลอดทดลอง นำไปทำให้แห้งด้วย Tri block heater อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส

2. เรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของโปรเจสเตอโรน

นำโปรเจสเตอโรนที่ถูกระเหย ether ออกไปแล้ว มาละลายด้วย assay buffer จำนวน 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วผสมอีกครั้งหนึ่ง หลังจากนั้นเติม progesterone antiserum จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงเติม progesterone tracer จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว เติมสาร Charcoal suspension ที่ถูกปั่นตลอดเวลา จำนวน 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดทดลองที่วางบนถาดน้ำแข็ง วอร์เท็กซ์แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วจึงนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที รินส่วนใสลงใน Counting vials จากนั้นเติม counting solution 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำเข้าเครื่องตรวจวัดรังสีเบต้า

3. การควบคุมมาตรฐานการวิเคราะห์หาโปรเจสเตอโรนในซีรัม (Quality control)

นำซีรัมของลิงหางยาวเพศเมียในระยะ luteal phase ที่ใช้มาปิเปตใส่หลอดทดลองรูปกรวย 8 หลอด หลอดละ 100 ไมโครลิตร ทำการวิเคราะห์ตั้งแต่ขั้นการสกัด

4. กราฟมาตรฐาน

ทำโดยนำโปรเจสเตอโรนที่มีความเข้มข้น 37.5, 75, 150, 300, 600 และ 1200 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร ปิเปตใส่หลอดทดลอง 3 หลอด หลอดละ 500 ไมโครลิตร นำมาวิเคราะห์โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของโปรเจสเตอโรน โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัด สามารถเติม progesterone antiserum และ progesterone tracer ได้เลย แล้วทำตามขั้นตอนต่อไป

5. การเตรียมหลอดทดลอง NSB

Non specific binding tube (NSB) เตรียมโดยเติม assay buffer 600 ไมโครลิตร และ progesterone tracer 100 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นก็ทำตามขั้นตอนตั้งแต่การเติม Charcoal Suspension

6. Maximum binding (Bo)

เตรียมได้โดยเติม assay buffer 500 ไมโครลิตร เติม progesterone antiserum 100 ไมโครลิตร และ progesterone tracer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นทำตามขั้นตอนตั้งแต่การเติม Charcoal suspension

7. Blank

เตรียมโดยการเติม Counting Solution 5 มิลลิลิตร ลงใน Counting vial แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณกัมมันตรังสี หลอดนี้ทำขึ้นเพื่อดูว่า counting solution และ counting vial มีสารกัมมันตรังสีหรือไม่

8. ประสิทธิภาพในการสกัด

Recovery ทำได้โดยใช้ตัวอย่างซีรัม 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จำนวน 4 หลอด จากนั้นเติม progesterone tracer จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงทุกหลอด เข่าด้วยเครื่องให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำไปสกัดด้วย ether 5 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับตัวอย่างอื่น ๆ จนได้ส่วนที่แห้ง นำส่วนที่แห้งแล้วมาละลายโดยเติม assay buffer 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปิเปตออกมา 250 ไมโครลิตร ใส่ลงใน counting vial เติม counting solution แล้วนำเข้าเครื่องตรวจวัดรังสีเบต้า

Total count of recovery เพื่อตรวจนับปริมาณรังสีที่เติมลงไปก่อนการสกัด ซึ่งจะนำไปใช้ในการคำนวณ % recovery โดยปิเปต progesterone tracer จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงใน counting vial เติม counting solution 5 มิลลิลิตร

สามารถสรุปการเติมสารละลายในหลอดทดลองได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการเติมสารละลายลงในหลอดทดลองต่าง ๆ

หลอดทดลอง	Tracer (ul)	Antiserum (ul)	Buffer	Standard (ul)	Total (ul)
NSB	100	-	600	-	700
B_0	100	100	500	-	700
Standard	100	100	-	500	700
Sample	100	100	500	-	700
Q.C.	100	100	500	-	700

การคำนวณ

1. กราฟมาตรฐาน นำค่า cpm ของ Standard progesterone ซึ่งมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1200 เฟมตาโมลต่อ 0.5 มิลลิลิตร นำแต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ย

แล้วลบออกด้วย cpm ของ NSB นำค่าที่ได้ไป plot กับความเข้มข้นของ Standard บน Semilogrithmic graph

2. ตัวอย่างซีรัม นำค่า cpm ของตัวอย่างซีรัมที่ไม่ทราบค่าทั้งหมดมาลบด้วย cpm ของ NSB แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน ได้ค่าเป็นเฟมตาโมลต่อหลอดทดลอง เปลี่ยนให้เป็น เฟมตาโมลต่อมิลลิลิตร โดยคิดจากปริมาตรที่ใช้

3. เปอร์เซนต์ประสิทธิภาพการสกัด (% Recovery)

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{cpm ที่สกัดได้}}{\text{cpm ที่ใช้เติม}} \times 2 \times 100$$

4. Quality Control คำนวณเช่นเดียวกับซีรัมตัวอย่าง นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับภายในแต่ละแอสเสย์ และระหว่างแอสเสย์ เพื่อทดสอบ precision และ accuracy

การวิเคราะห์หาปริมาณอีสตราดิออลโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

สารละลายและวิธีเตรียม

1. Assay buffer

เตรียมโดยใช้สารเคมีและวิธีการเดียวกับ assay buffer ที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรเจสเตอโรน

2. Estradiol Standard

เตรียมโดยใช้ estradiol standard จาก WHO ซึ่งมีความเข้มข้น 16 นาโนโมลต่อลิตร ปิเปตสารละลายนี้ 500 ไมโครลิตร เติม Assay buffer 4.5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายอีสตราดิออลมาตรฐาน ซึ่งมีความเข้มข้น 800 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร ทำ serial dilution ให้ถึง 37.5 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร เตรียมแล้วใช้ทันที

ตารางที่ 3 แสดงวิธีเตรียมสารละลายอีสตราดิออลมาตรฐาน จากสารละลายมาตรฐานตั้งต้น ความเข้มข้น 16 นาโนโมลต่อลิตร

สารละลายที่ต้องการ	สารละลายที่ใช้ผสม		บัฟเฟอร์ที่ใช้ผสม (มล.)	ความเข้มข้น (เฟมตาโมล/0.5 มล.)
	ชื่อสารละลาย	ปริมาณ (มล.)		
1	Stock Std.	0.5	4.5	800
2	1	2.0	2.0	400
3	2	2.0	2.0	200
4	3	2.0	2.0	100
5	4	2.0	2.0	50
6	5	2.0	2.0	25

3. Estradiol working tracer

เตรียมโดยใช้ estradiol stock tracer ซึ่งมีความแรง 10 ไมโครคูรีต่อมิลลิลิตร จำนวน 150 ไมโครลิตร เป่าให้แห้งด้วย compressor air แล้วเติม assay buffer 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ working tracer ซึ่งมีความแรง 100 นาโนคูรีต่อมิลลิลิตร

4. Estradiol antiserum

เตรียมโดยใช้ estradiol antiserum จาก WHO ซึ่งถูกทำให้แห้งแล้ว นำมาเติม 10 มิลลิลิตร ของ assay buffer เขย่าให้ละลายหมด เตรียมแล้วใช้ทันที

5. Charcoal suspension และ Counting solution

เตรียมโดยใช้สารเคมี และวิธีเดียวกับที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรเจสเตอโรน

วิธีการวิเคราะห์หาอีสตราดิออล

ปริมาณของอีสตราดิออลในซีรัม หาได้โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ ตามวิธีการของ WHO (1981) ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้

1. การสกัด (extraction)

ใช้ตัวอย่างซีรัม 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองรูปกรวย ตัวอย่างละ 2 หลอด เติม diethyl ether 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์ นาน 1 นาที แยกชั้น ether ออกโดยแช่ลงในถาดที่มีน้ำแข็งแห้งปนกับ ethyl alcohol รินส่วนของ ether ซึ่งสกัดเอาอีสตราดิออลออกมาแล้ว ลงในหลอดทดลอง นำไปทำให้แห้งด้วย Tri block heater อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส

2. เรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของอีสตราดิออล

นำอีสตราดิออลที่ถูกระเหย ether ออกไปแล้ว มาละลายด้วย assay buffer จำนวน 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วผสมอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นเติม estradiol antiserum 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม estradiol tracer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

เมื่อครบตามกำหนดเวลา เติมสาร Charcoal suspensionที่ถูกปั่นตลอดเวลา จำนวน 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดทดลองที่วางบนถาดน้ำแข็ง วอร์เท็กซ์แล้ว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วจึงนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที รินส่วนใสลงใน counting vials จากนั้นเติม counting solution 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำเข้าเครื่องตรวจวัดรังสีเบต้า

3. การควบคุมมาตรฐานการวิเคราะห์หาอีสตราดิออลในซีรัม (Quality control)

นำซีรัมของลิงหางยาวเพศเมีย ที่ใช้เป็น Quality control ปิเปตใส่หลอดทดลองรูปกรวย 8 หลอด หลอดละ 200 ไมโครลิตร ทำการวิเคราะห์ตั้งแต่ขั้นการสกัด

4. กราฟมาตรฐาน

ทำโดยนำอีสตราดิออลที่มีความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 400, 600 และ 800 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร ปิเปตใส่หลอดทดลอง 3 หลอด หลอดละ 500 ไมโครลิตร นำมาวิเคราะห์โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัด

5. Nonspecific binding (NSB)

เตรียมโดยเติม assay buffer 600 ไมโครลิตร เติม estradiol tracer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำตามขั้นตอนการเติม charcoal suspension

7. ประสิทธิภาพการสกัด (Recovery)

Recovery ทำได้โดยใช้ตัวอย่างซีรัม 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จำนวน 4 หลอด จากนั้นเติม estradiol tracer จำนวน 50 ไมโครลิตรลงทุกหลอด เขย่าด้วยเครื่องให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำไปสกัดด้วย ether 5 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับตัวอย่างอื่น จนได้ส่วนที่แห้ง นำมาละลายด้วย assay buffer 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปิเปตออกมา 250 ไมโครลิตร ใส่ลงใน counting vial เติม counting solution แล้วนำเข้าเครื่องตรวจวัดรังสีเบต้า

การคำนวณ

ใช้วิธีการเดียวกับการหาโปรเจสเตอโรน

การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีการวัดปริมาณโปรเจสเตอโรนและอีสตราดิออล

ในการทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีการทดลองแต่ละวิธี ควรมีการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ความเที่ยงตรง (accuracy) ความแม่นยำ (precision) และความไว (sensitivity)

ความจำเพาะ (Specificity) เป็นการตรวจสอบว่า antiserum นอกจากจะทำปฏิกิริยากับฮอร์โมนที่ศึกษาแล้ว ยังสามารถทำปฏิกิริยากับฮอร์โมนตัวอื่นได้เท่าใด โดยคิดเป็น % cross reaction ซึ่ง progesterone antiserum และ estradiol

antiserum ได้ทำการทดสอบแล้ว ดังตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ (WHO Matched Reagent Program,1981) เมื่อ B/Bo เท่ากับ 50 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 4 % cross reaction ของ progesterone antiserum กับฮอร์โมนอื่น

Cross Reaction Substance	% Cross Reaction
Cortisol	0.01 %
Testosterone	0.3 %
17a - hydroxyprogesterone	3.0 %
20a - dihydroxyprogesterone	3.0 %

ตารางที่ 5 % cross reaction ของ estradiol antiserum กับฮอร์โมนอื่น

Cross Reaction Substance	% Cross Reaction
Cortisol	0.001
Testosterone	0.0002
Estrone	1.7

ความแม่นยำ (precision) หมายถึง ความเบี่ยงเบนของค่าที่วัดได้จากตัวอย่างเดียวกัน ในเวลาต่างกันนั้นมีมากน้อยเพียงใด ซึ่งตรวจหาได้โดยการใช้ตัวอย่างชุดเดียวกัน (quality control) ทำการทดลองหลาย ๆ ครั้ง แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ความเบี่ยงเบนมาตรฐานและสัมประสิทธิ์ของความเบี่ยงเบนมาตรฐานในแอสเสย์เดียวกัน และในระหว่างแอสเสย์แต่ละชุด

ความไว (sensitivity) หมายถึง ค่าต่ำสุดที่สามารถวัดได้ในการแอสเสย์ หาได้จากความเบี่ยงเบนมาตรฐานที่จุดที่ไม่มีความเข้มข้นของสารละลาย (Maximum

binding) แล้วหา 95 % confident limit ที่จุดนี้ว่ามีความเข้มข้นเท่าใด ความเข้มข้นที่ได้จะเป็นค่าที่น้อยที่สุดที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน

ความเที่ยงตรง (accuracy) เป็นการทดสอบว่าค่าที่วัดได้นั้นถูกต้องตามความเป็นจริงหรือไม่ มากน้อยเพียงใด ค่านี้ตรวจวัดได้จาก % recovery ซึ่งทำได้โดยการเติมฮอร์โมนมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอนลงในตัวอย่าง แล้วทำตามขั้นตอนพร้อมกับตัวอย่างเดียวกันที่ไม่ได้เติมฮอร์โมนมาตรฐาน และคำนวณว่าผลที่ได้ต่างจากค่าจริงเท่าใด

การศึกษาครั้งนี้ การวัดระดับโปรเจสเตอโรนโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์จะมีความไวสูงสุดในการวัดเท่ากับ 37.5 เฟมตาโมลต่อ 0.5 มิลลิลิตร และมีค่า Coeffcient variation เป็น 6.17 % ในระหว่างแอสเสย์เดียวกัน และ 12.81 % ในระหว่างแอสเสย์ทั้งหมด โดยมี % recovery อยู่ระหว่าง 80-90 % ในขณะที่การวัดระดับอีสตราดิออลโดยวิธีเดียวกันมีความไวสูงสุดในการวัดเท่ากับ 20 เฟมตาโมลต่อ 0.5 มิลลิลิตร และมีค่า Coefficient variationเป็น 4.78 % ในระหว่างแอสเสย์เดียวกัน และ 9.07 % ในระหว่างแอสเสย์ทั้งหมด โดยมี % recovery อยู่ระหว่าง 75-90 %

การวิเคราะห์หาปริมาณ LH โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ (WHO Matched Reagent Program, 1984)

สารละลายและวิธีเตรียม

1. assay buffer

เตรียมสารละลายตั้งต้น A โดยใช้ 27.8 กรัม ของ $NaH_2HPO_4H_2O$ ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

เตรียมสารละลายตั้งต้น B โดยใช้ 35.6 กรัม ของ $Na_2HPO_42H_2O$ ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

2. 0.1 M phosphate buffer pH 8.0

เตรียมโดยใช้ 53 มิลลิลิตร ของสารละลายตั้งต้น A และ 947 มิลลิลิตร ของสารละลายตั้งต้น B เติม Sodium azide 2 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 2 ลิตร ปรับ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ให้เป็น 8.0

3. 1.0 % BSA phosphate buffer pH 8.0 (tracer buffer)

เตรียมโดยใช้ 1000 มิลลิลิตร ของสารละลาย 0.1 M. phosphate buffer pH 8.0 มาเติมด้วย BSA 10 กรัม

4. Sample buffer หรือ Standard buffer

เตรียมโดยใช้ 100 มิลลิลิตร ของสารละลาย 1 % BSA phosphate buffer pH 8.0 มาเติมด้วย NaCl 7.2 กรัม และ Sodium azide 1.0 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

5. First antibody buffer

เตรียมโดยใช้ 100 มิลลิลิตร ของสารละลาย 1 % BSA phosphate buffer pH 8.0 มาเติมด้วย normal rabbit serum (NRS) 50 ไมโครลิตร

6. Second antibody buffer (phosphate-EDTA)

เตรียมโดยละลาย EDTA 18.6 กรัม ใน 0.1 M. phosphate buffer pH 8.0 ปริมาณ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 โดยใช้ 5 N. NaOH เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

7. LH Standard

เตรียมโดยใช้ rhLH (WP-XV-rhLH-RPi) 1 ไมโครกรัม ละลายใน Standard buffer 2.5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้น 80 นาโนกรัมต่อ 200 ไมโครลิตร แล้วจึงทำ serial dilution โดยมีความเข้มข้นตั้งแต่ 1.25-40 นาโนกรัมต่อ 200 ไมโครลิตร

8. LH Tracer

เตรียมโดยใช้ Iodinated-LH (WP-XV-63) ละลายใน 2.0 มิลลิลิตร ของ tracer buffer เตรียมให้ได้ 20,000 dpm ต่อ 100 ไมโครลิตร

9. LH antiserum

เตรียมโดยใช้ antiserum hCG (1 : 100) ละลายใน 10 มิลลิลิตร ของ First antibody buffer

10. Second antibody

เตรียมโดยใช้ donkey serum ซึ่งจะมี anti rabbit gamma globulins 1 มิลลิลิตร ละลายใน second antibody buffer 30 มิลลิลิตร

11. Low Gonadotropin Serum (LGS)

เตรียมโดยใช้ pooled monkey serum 10 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.1 มิลลิลิตร ของ anti-hCG (1 : 100)

วิธีการวิเคราะห์ของ LH

ปิเปตตัวอย่างซีรัม 100 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองตัวอย่างละ 2 หลอด และปิเปตสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1.25-40 นาโนกรัมต่อ 200 ไมโครลิตร เติม tracer และ first antibody อย่างละ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม second antibody และ LGS ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 3200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที แล้วเทส่วนของเหลวทิ้ง นำส่วนที่เหลือไปทำให้แห้งโดยใช้กระดาษซับ แล้วจึงนำไปเข้าเครื่องวัดรังสีแกมมา

การคำนวณ

ใช้วิธีเดียวกับการคำนวณหาระดับโปรเจสเตอโรน

ในการวัดระดับ LH โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์นี้ มี % การเกาะเกี่ยวสูงสุดเป็น 15-18 % มีความไวสูงสุดในการวัดเท่ากับ 1.25 นาโนกรัมต่อ 0.2 มิลลิลิตร

ตารางที่ 6 แสดงการเติมสารละลายลงในหลอดต่าง ๆ ในการวิเคราะห์หาปริมาณลูทีนไนซิงฮอร์โมน

หลอดทดลอง	Sample (Std) (ul)	Sample Buffer (ul)	Tracer (ul)	1 ° Antibody (ul)	2 ° Antibody (ul)	LGS (ul)	Tracer Buffer (ul)
TC	-	-	100	100	100	-	-
NSB	-	200	100	100*	100	200	-
Bo	-	200	100	100	100	200	-
Std	200	-	100	100	100	200	-
Serum	100	100	100	100	100	100	100

* เติม Antibody Buffer แทน 1 ° Antibody