บทที่ 2

การทดลอง สารเคมี และอุปกรณ์

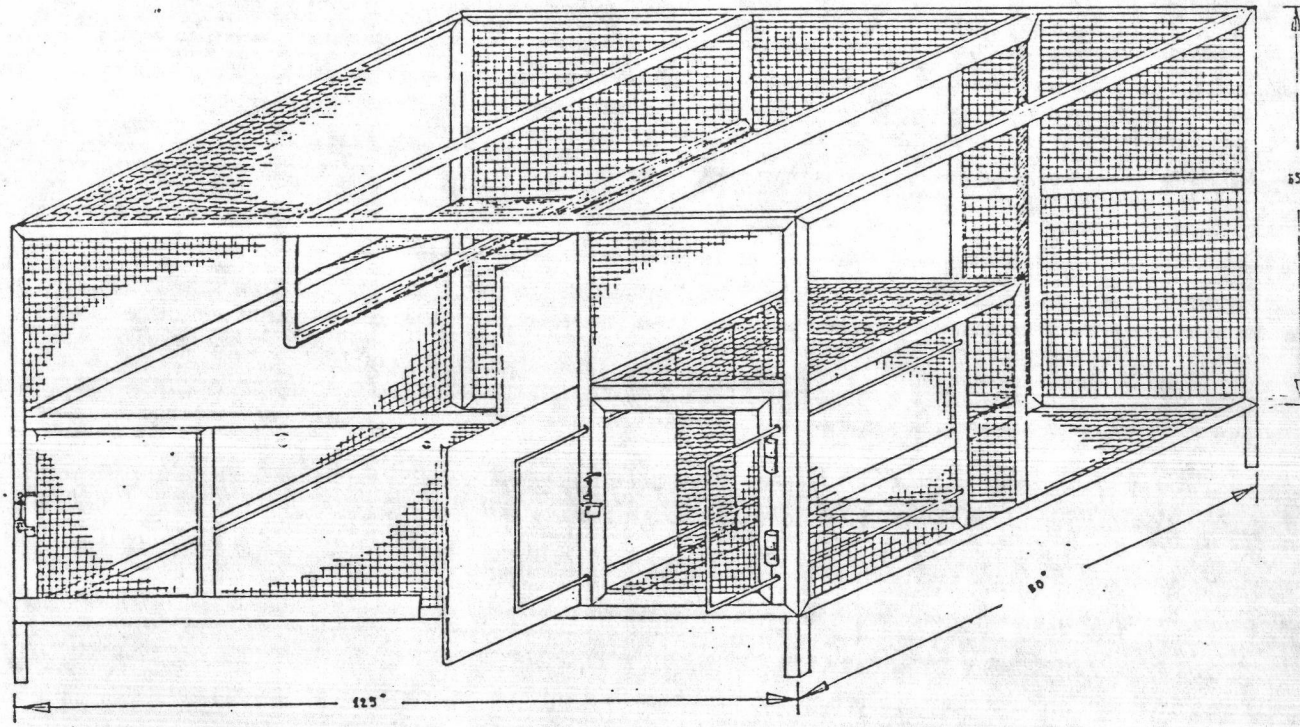
สัตว์ทดลอง

ลิงหางยาวเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 5 ตัว จากโคโลนี (colony) ของศูนย์วิจัยไพรเมต ภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แยกเลี้ยงไว้ในกรงเดี่ยวขนาด 24 x 34 x 28 นิ้ว (ภาพที่ 2.1) ในเรือนเลี้ยงลิงมีอากาศถ่ายเทได้สะดวก และควบคุมปริมาณแสงที่ได้รับแต่ละวัน (ได้รับแสงวันละ 12 ชั่วโมง ตั้งแต่ 06.00-18.00 น.) เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปจากบริษัทโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ในเวลาเช้า เสริมด้วยผักและผลไม้ เช่น แตงกวา ถั่วฝักยาว สับปะรด กล้วย มันเทศ ในเวลาบ่าย และเสริมด้วยไข่ต้มสัปดาห์ละครั้ง

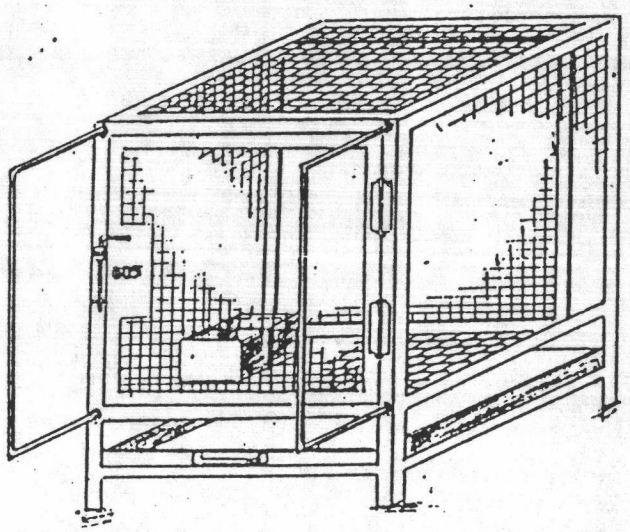
ลิงเพศเมียที่ใช้ในการทดลองทุกตัวอยู่ในวัยเจริญพันธุ์อายุ 3.5-5 ปี มีน้ำหนักระหว่าง 3.5-7 กิโลกรัม ทุกตัวเคยมีรอบเดือนติดต่อกันมาอย่างน้อย 3 เดือนก่อนหน้าการทดลอง ลิงเพศเมียที่ผ่านการคัดเลือกทุกตัวเป็นลิงที่เกิดในโคโลนีของหน่วยวิจัยไพรเมต และยังไม่เคยมีปฏิสัมพันธ์ทางเพศมาก่อน สัตว์ทดลองแต่ละตัวมีประวัติโดยสังเขปดังตารางที่ 2.1

ลิงเพศผู้ที่ใช้ในการทดลองคัดเลือกจากลิงเพศผู้ที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์คือ อายุมากกว่า 4 ปี จำนวน 5 ตัว หนักประมาณ 5-10 กิโลกรัม 4 ตัวเกิดในโคโลนีของศูนย์วิจัยไพรเมต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตัวที่ห้าเป็นลิงที่ซื้อจากแหล่งจำหน่ายลิงจังหวัดสมุทรสงคราม แต่ละตัวมีประวัติโดยสังเขปดังตารางที่ 2.2

กรงลิงที่ใช้ในการทดลองมีอยู่ 2 แบบ แบบแรกเป็นกรงเดี่ยวขนาด 24 x 34 x 28 นิ้ว (ภาพที่ 2.1) อยู่ในเรือนเลี้ยงลิงโดยก่อนและหลังการทดลอง สัตว์ทดลองจะถูกแยกขังอยู่ในกรงเดี่ยวนี้กรงละตัว กรงแบบที่สองเป็นกรงขนาดใหญ่ แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งมีขนาด 121 x80 x65 นิ้ว ใช้เป็นบริเวณทดสอบพฤติกรรม อีกส่วนหนึ่งขนาด 24 x 34 x 28 นิ้ว ใช้เป็นบริเวณขังลิงทดลองก่อนฉีด ketamine hydrochloride ทั้งสองส่วนนี้ติดต่อถึงกันได้ด้วยประตูเลื่อนซึ่งปกติจะปิดไว้ขณะทำการทดลอง และจะเปิดเมื่อต้องการฉีด ketamine



ภาพที่ 2.1 แสดงลักษณะของกรงที่ใช้ในการศึกษาพฤติกรรม



ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะของกรงที่ใช้เลี้ยงลิงก่อนและหลังศึกษาพฤติกรรม

ตารางที่ 2.1 แสดงประวัติโดยสังเขปของลิงหางยาวเพศเมียที่ใช้ในการทดลองและปริมาณ ketamine hydrochloride (ket.) ที่ใช้ในการเจาะเลือดแต่ละครั้ง

หมายเลขลิงทดลอง	หมายเลขแม่ที่ให้กำเนิด	หมายเลขพ่อที่ให้กำเนิด	วัน เดือน ปีเกิด	มีประจำเดือนครั้งแรก	น้ำหนัก (กิโลกรัม)	ปริมาณ ket. ที่ใช้ในการเจาะเลือดแต่ละครั้ง (มิลลิลิตร)
601	82	-*	19 กุมภาพันธ์ 2525	15 เมษายน 2527	7.0	0.5
603	71	-*	21 กุมภาพันธ์ 2525	26 ตุลาคม 2528	3.5	0.2
605	80	-*	17 มีนาคม 2525	25 ตุลาคม 2527	3.2	0.3
606	62	-*	9 เมษายน 2525	7 เมษายน 2528	3.2	0.3
607	67	-*	16 สิงหาคม 2525	7 เมษายน 2527	3.8	0.3

*ไม่ทราบ ผสมตามธรรมชาติจากป่าชายเลนสมุทรสงคราม

ตารางที่ 2.2 แสดงประวัติโดยสังเขปของลิงหางยาวเพศผู้ที่ใช้ในการทดลอง และปริมาณ ketamine hydrochloride (ket.) ที่ใช้ในการเจาะเลือดแต่ละครั้ง

หมายเลขลิงทดลอง เพศผู้ (ลิงเพศเมียที่ใช้เข้าคู่)	แม่	พ่อ	วัน เดือน ปีเกิด	แหล่งที่ได้มา	ปริมาณ ket. ที่ใช้ในการเจาะเลือดแต่ละครั้ง (มิลลิลิตร)
48 (601)*	-	-	-	สมุทรสงคราม	0.6
500 (603)	81	-	1 มกราคม 2525	หน่วยวิจัยไพรเมต จุฬาฯ	0.4
503 (605)	73	-	9 พฤษภาคม 2525	หน่วยวิจัยไพรเมต จุฬาฯ	0.3
504 (606)	84	-	30 มีนาคม 2525	หน่วยวิจัยไพรเมต จุฬาฯ	0.3
505 (607)	23	-	22 กันยายน 2525	หน่วยวิจัยไพรเมต จุฬาฯ	0.4

*48 ได้มาจากป่าชายเลนสมุทรสงคราม เมื่ออายุประมาณ 1 ปี

601 อดนม เมื่ออายุ 19 วัน

hydrochloride หรือเมื่อต้องการแยกสัตว์ทดลองออกจากกัน (ภาพที่ 2.2)

เมื่อย้ายลิงที่ใช้ในการทดลองทั้งสองเพศจากกรงขนาดเล็กในเรือนเลี้ยงลิงไปยังห้องไปยังห้องพฤติกรรม จะปล่อยให้สัตว์ทดลองปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ประมาณ 2 วัน จากนั้นจึงเริ่มการทดลอง

<u>การเจาะเลือด</u>

ก่อนการเจาะเลือดทุกครั้งฉีด ketamine hydrochloride เพื่อลดความเครียดขณะเจาะเลือด เข้ากล้ามในปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม การเจาะเลือดจะกระทำทุกสัปดาห์ ๆ ละ 2 ครั้ง คือทุกวันอังคารและวันศุกร์ (รายละเอียดวันเจาะเลือดดูที่ appendix) ทันทีที่สิ้นสุดการทดลองในภาคเช้า (8.30-9.00 น.) ลิงแต่ละตัวจะถูกเจาะเลือดครั้งละประมาณ 3 มิลลิลิตร จากเส้นเลือดดำหน้าขา (femoral vein) เก็บเลือดไว้ในหลอดทดลองที่ปิดด้วยแผ่นพาราฟิลม์ ทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที ประมาณ 30 นาที ใช้พลาสเตอร์ปิเปตแยกซีรัมที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์หาระดับฮอร์โมนอีสตราไดออลและฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

<u>วิธีการทดลอง</u>

การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 ตอน คือ วิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนอีสตราไดออลและฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ และสังเกตพฤติกรรมของคู่สัตว์ทดลอง ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

1. ระยะก่อนการทดลอง (Pre-Treatment) ขังลิงทดลองทุกตัวไว้ในกรงเดี่ยวขนาด 24 X 34 X 28 นิ้ว เจาะเลือดลิงทดลองทุกคู่เป็นระยะเวลานานอย่างน้อย 1 เดือน ตามวันและเวลาที่กำหนดไว้ข้างต้น (วิธีการเจาะเลือด)

2. ระยะการทดลอง (Treatment) ในวันแรกที่ลิงเพศเมียในคู่ทดลองสิ้นสุดการมีรอบเดือน ย้ายลิงคู่ที่จะทดลองขึ้นมาไว้ในกรงที่ใช้สังเกตพฤติกรรมขนาด 80 X 125 X 65 นิ้ว (ภาพที่ 2.2) โดยให้ลิงเพศเมียอยู่ในส่วนเล็กและลิงเพศผู้อยู่ในส่วนใหญ่ ทิ้งคู่ทดลองไว้ให้คุ้นเคยกับที่อยู่ใหม่ประมาณ 2 วัน และเริ่มทดลองในวันที่ 3 การทดลองจะกระทำในตอนเช้า

ตารางที่ 2.3 แสดงการเจาะเลือดในระยะก่อนการทดลอง ระยะการทดลอง และระยะหลังการทดลอง

ระยะการทดลอง	Condition	ระยะเวลา	Bleeding	จำนวน (มิลลิลิตร)
Pre-treatment	ตัวเมียอยู่ตามลำพัง	1 เดือน	วันอังคารและวันศุกร์	3
Treatment	ตัวเมียอยู่ร่วมกับตัวผู้วันละ 40 นาที	1 เดือน	วันอังคารและวันศุกร์	3
Post-treatment	ตัวเมียอยู่ตามลำพัง	1 เดือน	วันอังคารและวันศุกร์	3

012960

ประมาณ 8.00-8.30 น. เป็นเวลานาน 20 นาที และภาคบ่ายเวลาประมาณ 16.00-16.30 น. เป็นเวลานาน 20 นาทีเช่นกัน ข้อมูลที่ได้จากการทดลองในช่วงเช้าและช่วงเย็น 2 ครั้ง รวมกันเป็น 1 การทดลอง การบันทึกข้อมูลพฤติกรรมจะกระทำสัปดาห์ละ 4 วันคือ วันจันทร์ วันอังคาร วันพฤหัสบดี และวันศุกร์ เป็นเวลาติดต่อกัน 4 สัปดาห์ ขณะที่กำลังทดลองคู่ที่ 1 นี้ ก็ทำ Pre-treatment สำหรับลิงทดลองคู่ที่สองต่อไปด้วย

3. ระยะหลังการทดลอง (Post-treatment) เมื่อสิ้นสุดการทดลองแล้ว ลิงทุกคู่จะถูกย้ายมาขังไว้ในกรงเดี่ยวในเรือนเลี้ยงลิงเช่นเดิม และยังคงถูกเจาะเลือดต่อไปตามวันและเวลาเดิมนานเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 2.3)

4. เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ติดตามดูว่ามีประจำเดือนอีกครั้งเมื่อใด

<u>การบันทึกพฤติกรรม</u>

ผู้บันทึกจะนั่งสังเกตอยู่หลังกระจกด้านเดียว (one-way mirror) บันทึกข้อมูลลงในตารางที่ออกแบบไว้บันทึกพฤติกรรมโดยเฉพาะ (ตารางที่ 2.4) พฤติกรรมที่บันทึกได้แก่

1. พฤติกรรมทางเพศ (Reproductive Behaviour) ได้แก่

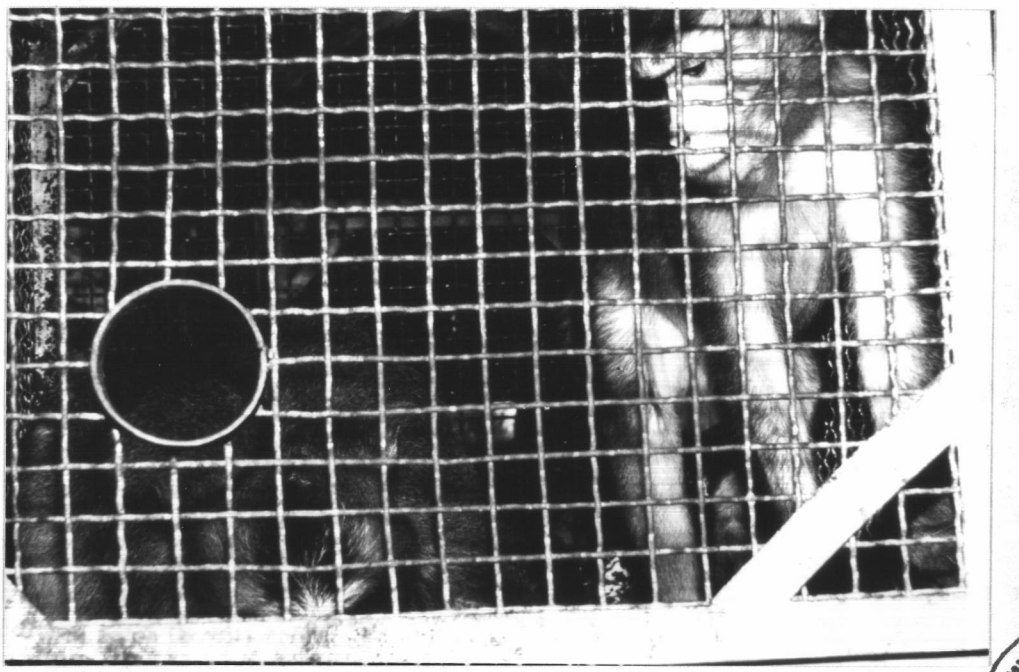
1.1 Presentation (PR) : ลิงเพศเมียเคลื่อนที่เข้าใกล้ลิงเพศผู้ ย่อตัวลงและหันสะโพกให้กับลิงเพศผู้ ในบางครั้งอาจยกหางขึ้นขนานกับพื้นราบ หรือไพล่หางไปทางใดทางหนึ่ง จากนั้นจะวิ่งห่างจากตัวผู้เป็นระยะทางสั้น ๆ และกระทำกริยาเดิมซ้ำอีก (Presenting : Dixson และคณะ, 1975)

1.2 Approach (AP) : ลิงตัวหนึ่งเคลื่อนที่เข้าใกล้ลิงอีกตัวหนึ่งในระยะเอื้อมมือถึง และยังคงอยู่ในตำแหน่งนั้นอย่างน้อย 5 วินาทีโดยไม่มีการต่อสู้

1.3 Investigation : ลิงเพศผู้จ้องมองดู Perineal sexual skin ของตัวเมีย หน้าลิงเพศผู้ห่างจาก Perinium ของลิงเพศเมียไม่เกิน 10 เซนติเมตร ในการทดลองนี้ถือว่า Investigation คือ Inspection (INS)

1.4 Huddle : การเบียดเข้าหากันบนคอนหรือพื้น โดยอาจใช้ส่วนของร่างกายติดกันหรือใช้ส่วนของหางพันกัน

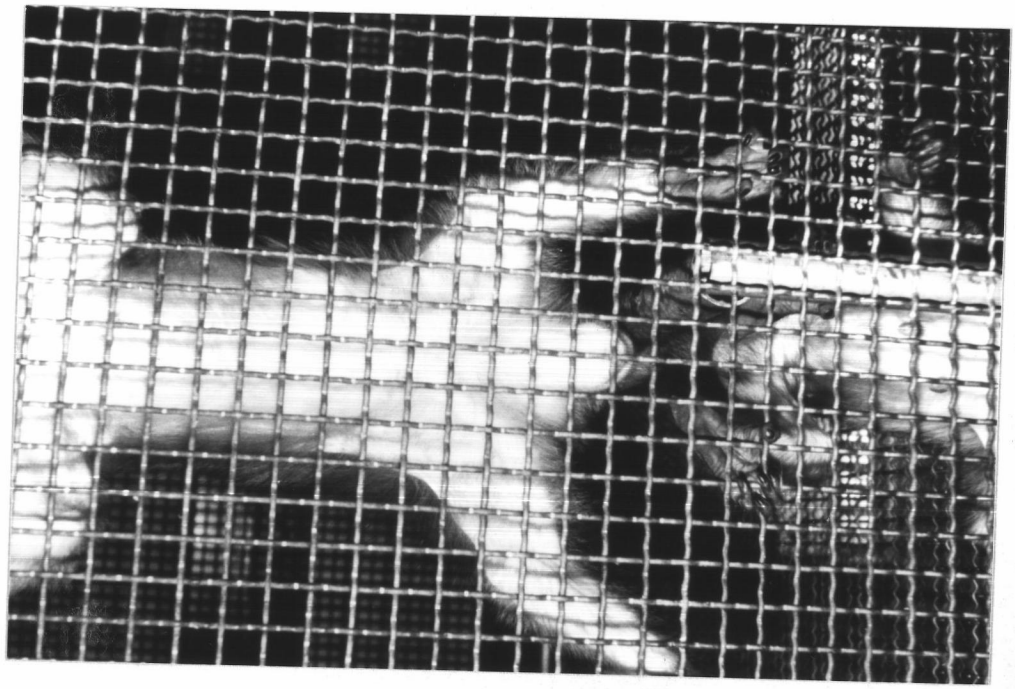
1.5 Groom (GR) : ลิงตัวหนึ่งใช้มือเก็บอานุภาลเล็ก ๆ ที่ติดอยู่ตามขนหรือหนังของลิงอีกตัวหนึ่งเข้าปาก



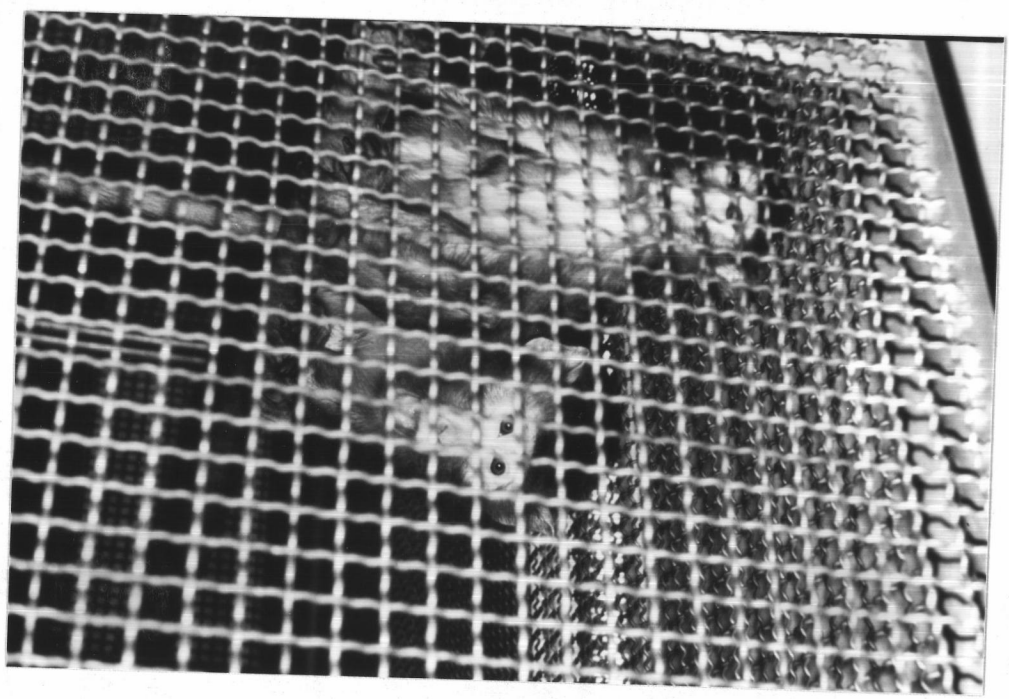
ภาพที่ 2.3 แสดงพฤติกรรม Presentation

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

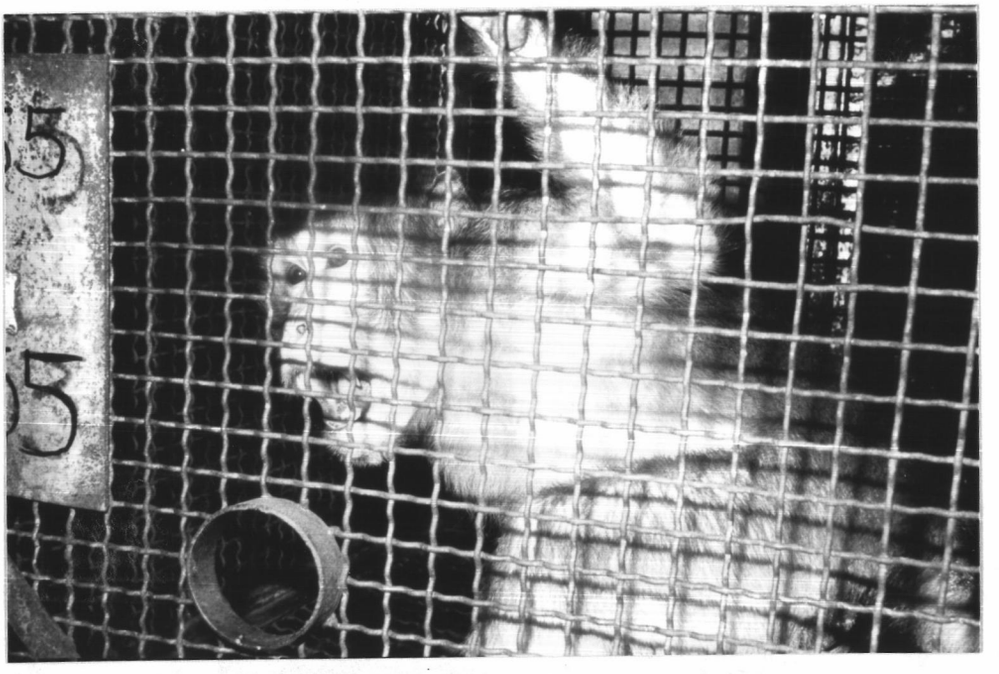
ภาพที่ 2.4 แสดงพฤติกรรม Approach



ภาพที่ 2.5 แสดงพฤติกรรม Inspection



ภาพที่ 2.6 แสดงพฤติกรรม Groom



ภาพที่ 2.7 แสดงพฤติกรรม Threat

ภาพที่ 2.8 แสดงพฤติกรรม Mount

ตารางที่ 2.4 ตารางบันทึกพฤติกรรม

ตารางบันทึกพฤติกรรม

วันที่....เดือน.....พ.ศ.....

เวลา	Sexual Behavior								Y	RJ	WD	Aggressive Behavior		
	AP	INS	M	EM	MA	PR	INV	GR				DI	TH	ATT
No...														
No...														
No...														
No...														

1.6 Invite groom (INV) : การเข้าใกล้ลิงอีกตัวหนึ่งในระยะเอื้อมมือถึง แล้วก้มหัวลงต่ำ หรืออาจหันส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกายให้และหยุดนิ่งอยู่เช่นนั้น

2. พฤติกรรมก้าวร้าว (Aggressive Behaviour) ได้แก่

2.1 Attact (ATT) : ลิงตัวหนึ่งวิ่งเข้าชน เอื้อมมือไปสัมผัส ไล่ต้อนหรือกระโดดเข้าหาลิงที่เป็นเป้าหมาย กัดหรือทำร้ายบริเวณหางหรือลำตัว

2.2 Threat (TH) : มีหลายระดับตั้งแต่การจ้องมองจนถึงอ้าปากขู่ (Open mouth threat) ในลิงมักจะเริ่มจากการจ้องเขม็ง ผงกหัวขึ้นลง ทำปากขมุบขมิบ หูตั้งชัน กลอกตาไปมาและแยกเขี้ยวให้ลิงอีกตัวหนึ่ง

2.3 Displacement (DI) : ลิงตัวหนึ่งจะเข้าไปแทนที่ลิงอีกตัวหนึ่งอย่างรวดเร็วโดยไม่เกิดการต่อสู้

<u>สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลทางพฤติกรรม</u>

วิเคราะห์โดยใช้ Non-parametric statistics โดยหาค่า median Interquartile rang Kruskal-Wallis test

<u>การศึกษาทางด้านฮอร์โมน</u>

<u>สารเคมี</u>

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณอีสตราไดออล (oestradiol ; E_2) และโปรเจสเตอโรน (progesterone; P) ด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ (radioimmunoassay; RIA) ได้แก่

1. Absolute ethanol : Proanalyse Merck Germany
2. Antiserum to progesterone : Batch No. K 078910 WHO RIA Regent Programme.
3. Antiserum to oestradiol : Batch No. K 158310 WHO RIA Reagent Programme.

4. ^{3}H-Progesterone (1, 2, 3, 7-H^{3}) Progesterone : Amersham International Plc. England
5. ^{3}H-Oestradiol (1, 2, 3-H^{3}) Oestrone : Amersham International Plc. England.
6. Progesterone standard : Lot 81/J. WHO RIA Reagent Programme Switzerland.
7. Oestradiol standard : Batch No. 81/1 WHO RIA Reagent Programme Switzerland.
8. Charcoal reagent : Batch No. 82/83/R WHO RIA Reagent Programme Switzerland.
9. Dextran : Batch No. 82/83/J WHO RIA Reagent Programme Switzerland
10. Sodium dihydrogen phosphate (anhydrous) : No. 01169297 AR Grade BDH Chemical Ltd. England.
11. Disodium hydrogen phosphate : No. 0119086 AR Grade, BDH Chemical Ltd. England.
12. Sodium Chloride : No. 2427997, May & Baker Ltd. England.
13. Thiomersal : No. T5152, Sigma Chemical Company, 14508 st. LOUIS, U.S.A.
14. Gelatin : Bacto Gelatin Difco Laboratory, U.S.A.
15. PPO (2, 5 diphenyloxazole) : No. D 4630, Sigma Chemical Company, st. LOUIS, U.S.A.
16. Toluene : Art 8325, Merck Dermstadt, Germany.
17. Triton X-100 (Octyl Phenoxy Polyethoxyethanal) : No. T 6878 Rabm & Haas Co.
18. Ketamine hydrochloride (10 mg/Kg. Body weight) Parke Davis, PTY Ltd., Australia.

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งละเอียด : Right a Weight, M.W. Aingworth & Son Inc., U.S.A.
2. เครื่องชั่งหยาบ : Mettler E. 2-0, Mettler Instrument, Switzerland.
3. เข็มฉีดยาเบอร์ 22 และเบอร์ 27 : Turumo Coporation, Tokyo, Japan.
4. Syringeขนาด 10 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร (ชนิดใช้ครั้งเดียวทิ้ง) : Turumo Coporation, Tokyo, Japan.
5. Micropipets : Pipets : Pipetteman M. 81 Gilson France
   Eppendorf 3130 Germanney
   Pipet Gun Clay Adams U.S.A.
6. Tri-block heater : U-460, Thecam incorporated, Princeton, N.J., U.S.A.
7. B-liquid Scintilation Counter : Packard Instrument Co., Model BPL, U.S.A.
8. Vortex mixture : M 16715, Thermolyne Corporation, Iowa, U.S.A.
9. pH meter : 5985 Cole Parmer Instrument Company, Chicaco, Illinoi 60648, U.S.A.
10. Megnetic stirrer : S-18520 Thermolyne Corporation, Iowa, U.S.A.
11. Refrigerated centrifuge : Model PR-J International Equipment Company, Mass., U.S.A.
12. Micro-re/Pipetter : Semi Emeryvulle, Calif. 94608, U.S.A.
13. Pepipette : 94710 Labindustries Berkeley, Ca. 74710, U.S.A.

การวิเคราะห์หาปริมาณอีสตราไดออลโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

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. Oestradiol Standard

เตรียมโดยใช้ Oestradiol Standard จาก WHO ซึ่งมีความเข้มข้น 16 นาโนโมลต่อลิตร ปิเปตสารละลายนี้ 500 ไมโครลิตร เติม Assay buffer 4.5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายโปรเจสเตอโรนมาตรฐาน ซึ่งมีความเข้มข้น 800 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร จากนั้นทำ Serial dilution ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 800 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร ถึง 25 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร เตรียมแล้วใช้ทันทีดังตารางที่ 2.5

3. Oestradiol working tracer

เตรียมโดยใช้ Oestradiol stocking tracer ซึ่งมีความแรง 10 ไมโครคูรีต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร เป่าให้แห้งด้วย Compressor air แล้วเติม assay buffer 10 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน จะได้ working tracer ซึ่งมีความแรง 100 นาโนคูรีต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 2. แสดงวิธีเตรียมสารละลายอีสตราไดออลมาตรฐาน จากสารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่ความเข้มข้น 16 นาโนโมลต่อลิตร

สารละลายที่ต้องการ	สารละลายที่ใช้ผสม		บัฟเฟอร์ที่ใช้ผสม (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้น (เฟมตาโมลต่อ 0.5 มิลลิลิตร)
	ชื่อสารละลาย	ปริมาณ (มิลลิลิตร)		
1	Stock standard	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

4. Oestradiol antiserum

เตรียมโดยใช้ oestradiol antiserum จาก WHO ซึ่งถูกทำให้แห้งเก็บไว้ในขวด นำมาเติม 10 มิลลิลิตรของ assay buffer เขย่าให้ละลายให้หมด เตรียมแล้วใช้ทันที

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 องศาเซลเซียสเสมอ

6. counting solution

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

<u>วิธีการวิเคราะห์หาอีสตราไดออล</u>

ปริมาณของโปรเจสเตอโรนในซีรัม หาได้โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ ตามวิธีการของ WHO (1981) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. การสกัด (Extraction)

ใช้ตัวอย่างซีรัมจำนวน 200 ไมโครลิตร ใส่ซีรัมลงในหลอดทดลองรูปกรวย ตัวอย่างละ 2 หลอด เติม diethyl ether 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอร์เทวอร์เท็กซ์นาน 1 นาที แล้วทิ้งไว้ให้แยกชั้นน้ำออกจากชั้น ether โดยแช่ลงในถาดที่มีน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ปนกับ ethyl alcohol รินส่วนของ ether ซึ่งสกัดเอาอีสตราไดออลออกแล้วลงในหลอดทดลอง นำไปทำให้แห้งด้วย tri-block heater ที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส

2. เรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของอีสตราไดออล

ละลายอีสตราไดออลที่ระเหย ether ออกแล้วด้วย assay buffer 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วผสมอีกครั้งหนึ่ง หลังจากนั้นเติม oestradiol antiserum จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วจึงเติม oestradiol tracer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วเติม charcoal suspension ที่ปั่นไว้ตลอดเวลาจำนวน 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่วางบนถาดน้ำแข็ง วอร์เท็กซ์แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที แล้วจึงนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที รินส่วนใสลงใน counting vials จากนั้นเติม counting solution 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำเข้าเครื่องตรวจวัดรังสีเบต้า

ในการทำแอสเสย์ ประกอบด้วยหลอดใส่สารตัวอย่าง หลอดใส่สารมาตรฐาน หลอดใส่สารควบคุมคุณภาพ หลอด NSB หลอด maximum binding และหลอด blank ซึ่งแต่ละหลอดมีส่วนประกอบของสารแตกต่างกัน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.6

2.1 หลอดใส่สารตัวอย่าง ได้จากส่วนที่สกัดและระเหยไล่ ether ออกแล้ว แล้วทำตามขั้นตอนที่บรรยายไว้ในข้อ 2 จะทราบปริมาณของฮอร์โมนในซีรัมเมื่อนำค่า count ที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.2 หลอดควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์หาอีสตราไดออลในซีรัม (quality control; Q.C.)

นำซีรัมลิงหางยาวเพศเมียซึ่งเป็นซีรัมรวม มาปิเปตใส่หลอดทดลองรูปกรวย 6 หลอด ๆ ละ 100 ไมโครลิตร ทำการวิเคราะห์หาอีสตราไดออลตั้งแต่ขั้นการสกัดควบคู่ไปกับหลอดใส่สารตัวอย่างทำเพื่อทดสอบหาความแม่นยำของการหาปริมาณสาร

2.3 หลอดใส่สารมาตรฐาน

ทำโดยนำอีสตราไดออลที่มีความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 400 และ 600 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร นำมาวิเคราะห์โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของอีสตราไดออล โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัด สามารถเติม oestradiol antiserum

และ oestradiol tracer ได้เลย แล้วทำตามขั้นตอนที่บรรยายไว้ในข้อ 2 ต่อไป

2.4 การเตรียมหลอด NSB

Non specific binding tube (NSB) เตรียมโดยเติม assay buffer 600 ไมโครลิตร และ oestradiol tracer 100 ไมโครลิตร ทำควบคู่ไปกับการทำกราฟมาตรฐานและวิเคราะห์สารตัวอย่างแล้วนำไปอินคิวเบท เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นก็ทำตามขั้นตอนที่กล่าวไว้ตั้งแต่การเติม charcoal suspension ทำเพื่อทดสอบว่าตัว tracer ไม่จับกับ antigen จะมีค่า count เท่าไร

2.5 หลอด maximum binding (Bo)

เตรียมโดยเติม assay buffer 500 ไมโครลิตร เติม oestradiol antiserum 100 ไมโครลิตร และ oestradiol tracer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นทำตามขั้นตอนตั้งแต่การเติม charcoal suspension จนสิ้นสุดกระบวนการ ทำเพื่อทดสอบว่าเมื่อ oestradiol antiserum และ oestradiol tracer จับกันสูงสุดมีปริมาณรังสีเท่าไร

2.6 หลอด blank

เตรียมโดยการเติม counting solution 5 มิลลิลิตร ลงใน counting vial แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณกัมมันตรังสี หลอดนี้ทำขึ้นเพื่อดูว่า counting solution และ counting vial มีกัมมันตภาพรังสีหรือไม่

ประสิทธิภาพการสกัด

ประสิทธิภาพของการสกัดโดยคิดออกมาเป็นเปอร์เซนต์ของ recovery ทำได้โดยใส่ตัวอย่างซีรัม 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง 2 หลอด เติม oestradiol tracer จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงทุกหลอด เขย่าด้วยเครื่องให้เข้ากัน 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 เปรียบเทียบปริมาณรังสีที่วัดได้กับปริมาณรังสีของ oestradiol

ตารางที่ 2.6 แสดงการเติมสารละลายในหลอดทดลองต่าง ๆ

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

tracer 50 ไมโครลิตรที่เติมลงไปก่อนการสกัด ก็จะทราบประสิทธิภาพของการสกัด

<u>การคำนวณ</u>

1. กราฟมาตรฐาน

นำค่า cpm ของ standard progesterone นำแต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ยแล้วลบออกด้วย cpm ของ NSB นำค่าที่ได้ไป plot กับความเข้มข้นของ standard บนกระดาษกราฟ semilog

2. ตัวอย่างซีรัม

นำค่า cpm ของตัวอย่างซีรัมแต่ละค่าลบด้วย cpm ของ NSB แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน ได้ค่าเป็นเฟมตาโมลต่อหลอดทดลอง เปลี่ยนเป็นเฟมตาโมลต่อมิลลิลิตร โดยคิดจากปริมาณที่ใช้

3. เปอร์เซนต์ประสิทธิภาพการสกัด (% recovery)

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

4. quality control

คำนวณเช่นเดียวกับตัวอย่างซีรัม นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับภายในแต่ละแอสเสย์ และระหว่างแอสเสย์เพื่อทดสอบ precision และ accuracy

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรเจสเตอโรนโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

สารละลายและวิธีเตรียม

1. Assay buffer

เตรียมโดยใช้สารเคมีและวิธีการเดียวกับ Assay buffer ที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรเจสเตอโรน

2. Progesterone standard

เตรียมโดยใช้ progesterone standard จาก WHO ซึ่งมีความเข้มข้น 16 นาโนโมลต่อลิตร ปิเปตสารละลายนี้ 500 ไมโครลิตร เติม assay buffer 4.5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายอีสตราไดออลมาตรฐาน ซึ่งมีความเข้มข้น 1,200 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร ทำ Serial dilution ให้ถึง 37.5 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร เตรียมแล้วใช้ทันที ดังตารางที่ 2.7

3. Progesterone working tracer

เตรียมโดยใช้ progesterone stock tracer ซึ่งมีความแรง 100 ไมโครคูรีต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร ป่าให้แห้งด้วย compressor air แล้วเติม assay buffer 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ Working tracer ซึ่งมีความเข้มข้น 100 นาโนคูรีต่อมิลลิลิตร

4. Progesterone antiserum

เตรียมโดยใช้ progesterone antiserum จาก WHO ซึ่งถูกทำให้แห้งแล้วมาเติม 10 มิลลิลิตรของ assay buffer เขย่าให้ละลายหมด เตรียมแล้วใช้ทันที

5. Charcoal suspension และ counting solution

เตรียมโดยใช้สารเคมีและวิธีเดียวกับที่ใช้ในการวิเคราะห์อีสตราไดออล

วิธีการวิเคราะห์หาโปรเจสเตอโรน

ปริมาณโปรเจสเตอโรนในซีรัมหาได้โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ ตามวิธีการของ WHO (1981) ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้

1. การสกัด (extraction)

ใส่ซีรัมตัวอย่าง 125 ไมโครลิตร ถ้าอยู่ในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะกลางของรอบเดือนและจำนวน 50 ไมโครลิตร ถ้าอยู่ในระยะลูเทียล ลงในหลอดทดลองรูปกรวย ตัวอย่างละ 2 หลอด เติม diethyl ether 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์ นาน 1 นาที แยกชั้น ether ออก แล้วนำไปแช่ลงในถาดที่มีน้ำแข็งแห้งปนกับ ethyl alcohol รินส่วนของ ether ซึ่งสกัดเอาโปรเจสเตอโรนออกมาแล้วลงในหลอดทดลอง นำไประเหยด้วย tri-block heater อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส

2. เรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของโปรเจสเตอโรน

ละลายโปรเจสเตอโรนที่ระเหย ether ออกไปแล้วด้วย assa buffer จำนวน 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วผสมอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นเติม progesterone antiserum 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาเติมสาร charcoal suspension ที่ปั่นไว้ตลอดเวลาจำนวน 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดทดลองที่วางไว้บนถาดน้ำแข็ง วอร์เท็กซ์แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วจึงนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที รินส่วนใสลงใน counting vials จากนั้นเติม counting solution 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำเข้าเครื่องตรวจวัดรังสีเบต้า

ในการทำแอสเสย์ประกอบด้วย หลอดใส่สารตัวอย่าง หลอดใส่สารมาตรฐาน หลอดใส่สารควบคุมคุณภาพ หลอด NSB หลอด maximum binding และหลอด blank ซึ่งแต่ละหลอดมีส่วนประกอบมีส่วนประกอบของสารแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 แสดงวิธีเตรียมสารละลายโปรเจสเตอโรน จากสารละลายตั้งต้นที่ความเข้มข้น 24 นาโนโมลต่อลิตร

สารละลายที่ต้องการ	สารละลายที่ใช้ผสม		บัฟเฟอร์ที่ใช้ผสม (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้น (เฟมตาโมลต่อ 0.5 มิลลิลิตร)
	ชื่อสารละลาย	ปริมาณ (มิลลิลิตร)		
1	Stock standard	0.5	4.5	1,200
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

2.1 หลอดใส่สารตัวอย่างได้จากส่วนที่สกัดและระเหยไล่ ether ออกแล้ว ทำตามขั้นตอนที่บรรยายไว้ในข้อ 2 จะทราบปริมาณของฮอร์โมนในซีรัมเมื่อนำค่า count ที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.2 หลอดควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์หาโปรเจสเตอโรนในซีรัม (quality control)

นำซีรัมของลิงหางยาวเพศเมียที่ใช้เป็น quality control ปิเปตใส่หลอดทดลองรูปกรวย 6 หลอด ๆ ละ 100 ไมโครลิตร ทำการวิเคราะห์ตั้งแต่ขั้นการสกัดจนสิ้นสุดกระบวนการ ควบคู่ไปกับหลอดใส่สารตัวอย่าง ทำเพื่อทดสอบความแม่นยำของการหาปริมาณสาร

2.3 หลอดใส่สารมาตรฐาน

ทำโดยนำโปรเจสเตอโรนที่มีความเข้มข้น 37.5, 70, 150, 300, 600 และ 1,200 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร ปิเปตใส่หลอดทดลอง 3 หลอด ๆ ละ 500 ไมโครลิตร นำมาวิเคราะห์โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัด

2.4 หลอด Non-specific binding (NSB)

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

2.5 หลอด maximum binding (Bo)

เตรียมโดยเติม 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 จนสิ้นสุดกระบวนการ

3. ประสิทธิภาพการสกัด (recovery)

ประสิทธิภาพของการสกัดโดยคิดออกมาเป็นเปอร์เซนต์ของ recovery ทำได้โดยใช้ตัวอย่างซีรัม 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองจำนวน 4 หลอด จากนั้นเติม progesterone tracer จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงทุกหลอด เขย่าด้วยเครื่องให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมินาน 30 นาที แล้วนำไปสกัดด้วย ether 5 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับตัวอย่างอื่น จนได้ส่วนที่แห้งนำมาละลายด้วย assay buffer 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน counting vial เติม counting solution แล้วนำเข้าตรวจรังสีเบต้า

<u>การคำนวณ</u>

ใช้วิธีเดียวกันกับการหาอีสตราไดออล

<u>สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์</u>

ในการวิเคราะห์ฮอร์โมนใช้ parametric statistics ทดสอบโดย ANOVA แบบ ONEWAY และ FACTORIAL EXPERIMENT ทดสอบนัยสำคัญด้วย TURKEY'S HSD TEST