บทที่ 4

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการทดลองติดสลากลูทีไนซิ่งฮอร์โมนด้วยไอโอดีน-125 นั้นได้เลือกใช้วิธีคลอรามีน-ที โดยมีคลอรามีน-ทีเป็นตัวออกซิไดซ์ซึ่งต้องเลือกใช้ในปริมาณความเข้มข้นที่น้อยมากทั้งนี้เพราะคลอรามีน-ทีส่วนที่เหลือจากปฏิกริยาจะเป็นตัวทำลายสารที่เพิ่งติดสลากได้ การแก้ไขทำได้โดยการเติมโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ลงไปเป็นตัวลดปฏิกริยาของคลอรามีน-ทีส่วนที่เหลือ (Hunter, 1974) และการแยกสารติดสลากที่ได้ออกโดยทันทีหลังจากหยุดปฏิกริยาก็จะเป็นการช่วยให้สารติดสลากที่ได้ถูกทำลายน้อยลง สภาพของสารละลายที่ใช้ก็จะต้องมีสภาพเป็นด่างอ่อนๆ Burr และคณะ (1969) ใช้ฟอสเฟทบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 และ Odell และคณะ (1969) ใช้พีเอช 7.8 ในการทดลองเลือกใช้ฟอสเฟทบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันมากและเชื่อว่าเกิดปฏิกริยาได้ดีที่สุด (Hunter, 1974) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกริยาก็มีความสำคัญในการทดลองเช่นเดียวกัน จากการทดลองพบว่าเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการทำปฏิกริยาคือ 20 วินาที ส่วนไอโอดีน-125 ที่ใช้นั้นจะต้องมีความแรงรังสีจำเพาะสูงซึ่งในการทดลองใช้ไอโอดีน-125 ในรูปของ $Na^{125}I$ ความแรงรังสีจำเพาะ 100 มิลลิคูรี/มิลลิลิตร ปริมาณของไอโอดีน-125 กับปริมาณของลูทีไนซิ่งฮอร์โมนจะต้องพอเหมาะกัน ทั้งนี้เพราะถ้าปริมาณของไอโอดีน-125 ที่ใช้มากเกินไปก็จะเป็นสาเหตุให้เกิดการทำลายจากรังสี (radiation damaged) ได้ ซึ่งทำให้สภาพหรือคุณสมบัติของฮอร์โมนเปลี่ยนแปลงได้ การทดลองนี้เลือกใช้ปริมาณของ $Na^{125}I$ 0.5 มิลลิคูรีต่อลูทีไนซิ่งฮอร์โมน 5 ไมโครกรัม ส่วนผลผลิตของการติดสลากนั้นจากการตรวจสอบด้วยวิธีเปเปอร์อีเลคโตรโฟรีซิสจะพบว่าผลผลิตของการติดสลากจะได้ประมาณ 50-70 เปอร์เซนต์ และหลังจากการทำให้บริสุทธิ์ 2 ครั้งความบริสุทธิ์ของสารติดสลากจะสูงขึ้นซึ่งจะทำให้มีคุณสมบัติในการทำปฏิกริยาทางเรดิโออิมมิวโนเอสเส เพิ่มขึ้นด้วย การทำให้บริสุทธิ์

ครั้งแรกด้วยเซฟาเดกซ์ จี-50 กอลัมน์สามารถแยกสารที่ติดฉลากได้ออกจาก $Na^{125}I$ ส่วนที่ไม่ได้ทำปฏิกริยาในการทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2 ด้วยเซลลูโลสคอลัมน์นั้นจะแยกส่วนของฮอร์โมนที่ถูกทำลายออกจากสารติดฉลากที่ได้ด้วยซึ่งหลังจากทำให้บริสุทธิ์ 2 ครั้งแล้ว ความบริสุทธิ์ของสารติดฉลากที่ได้ประมาณ 90-95 เปอร์เซนต์จากการทดลองพบว่า ผลผลิตของการติดฉลากนี้จะขึ้นอยู่กับสภาวะของไอโอดีน- 125 ที่ใช้ด้วย กล่าวคือ ไอโอดีน- 125 ถ้าสามารถใช้ทำปฏิกริยาในการติดฉลากได้ในช่วงสัปดาห์ต้นๆ หลังจากส่งออกจากโรงงานของบริษัทในต่างประเทศก็จะสามารถทำปฏิกริยาได้ผลผลิตของสารติดฉลากได้สูง แต่ถ้าไอโอดีน-125 ที่ใช้นั้นถูกเก็บไว้นานอาจจะเนื่องจากอุปสรรคในการขนส่งหรือในการนำของออกเมื่อนำมาใช้ทำปฏิกริยาจะพบว่าผลผลิตที่ได้จะลดลงถึงแม้ว่าครึ่งชีวิต (half life) ของไอโอดีน-125 จะยาวถึง 60 วันก็ตาม

ส่วนการทดลองและวิเคราะห์ทางเรดิโออิมมิวโนเอสเส นั้นส่วนใหญ่อาศัยวิธีการของ Schams การทดลองขั้นต้นทำการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีชนิดแรกคือ AS-LH 901 โดยการทำไตเตอร์ (titer) ซึ่งในการทดลองได้เลือกใช้สารติดฉลากที่มีค่าปริมาณรังสีต่างๆ กันควบคู่ไปด้วยเพื่อเลือกค่าปริมาณรังสีที่เหมาะสมสำหรับปฏิกริยาทางเรดิโออิมมิวโนเอสเส ในการทำไตเตอร์เพื่อหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมนี้ Odell และคณะ (1969) เสนอว่าควรจะเลือกช่วงความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ทำปฏิกริยากับสารติดฉลากให้เปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวประมาณ 50 เปอร์เซนต์ เมื่อพิจารณาผลจากกราฟในรูปที่ 3 ก., รูปที่ 3 ข., รูปที่ 3 ค. และรูปที่ 3 ง. ก็ได้เลือกใช้ความเข้มข้นของแอนติบอดีตัวแรกในช่วง 1 : 70,000 ซึ่งควบคู่กับซีรัมของกระต่ายปกติความเข้มข้น 1 : 300 และปริมาณรังสีที่เติมลงไปประมาณ 15,000 เคาท์/นาที เพราะในช่วงดังกล่าวนี้จะเป็นช่วงที่มีความเข้มข้นของแอนติบอดีน้อยที่สุดที่จะทำให้เกิดปฏิกริยาการรวมตัวได้เปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวที่สูงพอ (ประมาณ 50 เปอร์เซนต์) มีค่าความแตกต่างของการรวมตัวระหว่างกราฟที่เติมและไม่ได้เติมฮอร์โมนมาตรฐานมากที่สุดและลักษณะของกราฟทั้งสองก็ไม่แตกต่างกัน ทำนองเดียวกันทำการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีชนิดที่สองคือ แอนติบอดีของกระต่ายในรูปของ

แกมมาโกลบูลินที่ได้จากแกะโดยแสดงด้วยกราฟระหว่างเปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวและค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีชนิดที่สองนี้ซึ่งจากกราฟที่ได้จากผลการทดลองในรูปที่ 4 พอจะสรุปได้ว่าเปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวซึ่งแสดงถึงปฏิกริยาในการรวมตัวจะสูงขึ้นเรื่อยๆ เมื่อความเข้มข้นของแอนติบอดีชนิดที่สองนี้เพิ่มขึ้น แต่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่จะใช้งานได้คือ ให้เปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวที่สูงพอคือ ความเข้มข้นของแอนติบอดีชนิดที่สอง 1 : 21 ในการทำปฏิกริยาทางเรดิโออิมมิวโนแอสเสนี้เวลาในการอินคิวเบทจะมีผลต่อปฏิกริยาเช่นเดียวกันจึงได้ทำการทดลองเพื่อจะหาเวลาที่เหมาะสมในการอินคิวเบทที่จะทำให้ปฏิกริยาถึงจุดสมดุล การทดลองเลือกเวลาอินคิวเบทหลังจากเติมสารติดสลากแล้วที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลของการทดลองซึ่งแสดงโดยกราฟในรูปที่ 5 สรุปได้ว่าการอินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงจะทำให้เกิดปฏิกริยาการรวมตัวได้ค่าเปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวสูงสุดถึงแม้ว่าจะเพิ่มระยะเวลาในการอินคิวเบทอีกเป็น 72 ชั่วโมงแต่เปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวที่ได้ก็ไม่ได้สูงขึ้นอีกเลย จะเห็นได้ว่าเวลาในการทำปฏิกริยากว่าจะถึงขั้นสุดท้ายจะกินเวลานานมากจึงทำการทดลองเพื่อจะหาวิธีที่จะทำให้การวิเคราะห์ใช้เวลาน้อยลงด้วยการทำวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์อย่างเร็วโดยการอินคิวเบทที่อุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องคือ 38 องศาเซลเซียสและลดระยะเวลาในการอินคิวเบทในช่วงต่างๆ ลง ปรากฏว่าจากการทดลองสามารถได้กราฟมาตรฐานของฮอร์โมนในรูปที่ 7 ที่มีความชันพอแต่เปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวที่ได้ไม่สูงพอจึงไม่อาจจะใช้เป็นวิธีในการวิเคราะห์เพื่อที่จะได้ค่าที่ถูกต้องแน่นอนได้ แต่ก็พอที่จะใช้เป็นวิธีในการทดลองการทำปฏิกริยาอย่างคร่าวๆ ได้ ในการทดลองจะพบเสมอว่าสารติดฉลากที่ได้นั้นบางครั้งไม่อาจที่จะใช้ทดลองในครั้งเดียวได้หมด เพื่อความประหยัดจึงได้ทำการทดลองเพื่อหาระยะเวลาการเก็บสารติดฉลากที่เหลือเพื่อจะใช้ในคราวต่อไป การทดลองได้ทดสอบปฏิกริยาของสารติดสลากภายหลังจากการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงโดยกราฟในรูปที่ 8 ก. และรูปที่ 8 ข. จะเห็นว่าการเก็บสารติดสลากไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสามารถเก็บได้นานถึง 2 สัปดาห์ก็สามารถนำ

มาใช้งานได้โดยสามารถให้กราฟมาตรฐานของฮอร์โมนที่มีความชันและเปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวสูงพอที่จะใช้งานได้

นอกจากนี้ได้ทำการทดลองเพื่อทดลองความเชื่อถือได้และความแม่นยำของวิธีทดลองโดยการเปรียบเทียบค่าปริมาณลูทีไนซิงฮอร์โมนที่วิเคราะห์ได้จากคอนโทรลซีรัม 3 ค่า ซึ่งผลของการทดลองทั้งในการทดลองเดียวกันและในการทดลองต่างครั้งกันก็สามารถให้ค่าที่ใกล้เคียงไม่แตกต่างกันมากนัก และทดสอบความถูกต้องของวิธีทดลองโดยการทดลองและคำนวณหาเปอร์เซนต์รีคอเวอรี เปอร์เซนต์รีคอเวอรีที่คำนวณได้คือ 85.14 ± 4.39 จึงคิดว่าวิธีการทดลองดังกล่าวข้างต้นจะสามารถใช้ในการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและแม่นยำพอสมควร ซึ่งปัจจุบันวิธีการทดลองนี้ทางคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้นำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณลูทีไนซิงฮอร์โมนในซีรัมของควายปลักและผลของการวิเคราะห์ในหลายๆ การทดลองก็ให้ผลที่สามารถเชื่อถือได้ นอกจากนี้จากการทดลองของ มณีวรรณและคณะ (ข้อมูลซึ่งยังไม่ได้ตีพิมพ์) ได้พิสูจน์โดยทดลองหากราฟมาตรฐานเปรียบเทียบระหว่าง ลูทีไนซิงฮอร์โมนมาตรฐาน ฮอร์โมนนี้ในซีรัมควายปลักและฮอร์โมนนี้ที่สะกัดได้จากต่อมใต้สมองพบว่าทั้ง 3 แหล่งของฮอร์โมนนี้ให้กราฟมาตรฐานที่ขนานกันจึงเป็นหลักฐานยืนยันได้ว่า การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้สามารถใช้ในการวัดปริมาณลูทีไนซิงฮอร์โมนในซีรัมของควายปลักได้และในขั้นตอนสุดท้ายของการทดลองก็ได้แสดงตัวอย่างของการวิเคราะห์ปริมาณลูทีไนซิงฮอร์โมนในซีรัมของควายปลักตัวเมียที่ได้รับการฉีดโปรสตาแกลนดินซึ่งผลของการทดลองสามารถวิเคราะห์ได้ว่าระดับลูทีไนซิงฮอร์โมนจะขึ้นสูงสุดภายหลังจากฉีดโปรสตาแกลนดิน 57.00 ± 7.35 ชั่วโมงและระดับสูงสุดของลูทีไนซิงฮอร์โมนที่เกิดขึ้นวัดได้ 5.82 ± 6.21 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>ข้อเสนอแนะ</u>

1. ในการทดลองติดสลากลูทีไนซิ่งฮอร์โมนด้วยไอโอดีน-125 นั้น ปัญหาเกี่ยวกับไอโอดีน-125 ที่เกิดขึ้นคือ ปัญหาทางด้านการขนส่ง การนำเข้าจากต่างประเทศทำให้เกิดการล่าช้าและไม่แน่นอน ประกอบกับราคาของไอโอดีน-125 เมื่อรวมกับค่าขนส่งแล้วมีราคาแพงมาก จึงน่าจะมีการทดลองโดยใช้ไอโอดีน-131 แทนทั้งนี้เพราะไอโอดีน-131 นี้สามารถผลิตได้เองภายในประเทศโดยสำนักงานพลังงาน-ปรมาณูเพื่อสันติ ซึ่งราคาจะถูกกว่ามากและไม่มีปัญหาทางด้านการขนส่ง ถึงแม้ไอโอดีน-131 จะมีครึ่งชีวิตสั้นแค่ 8 วันเท่านั้น แต่คิดว่าคงจะพอใช้งานได้

2. ควรจะมีการทดลองสกัดลูทีไนซิ่งฮอร์โมนขึ้นใช้เอง โดยสกัดจากต่อมใต้สมองและตั้งเป็นศูนย์กลางในการช่วยเหลือสนับสนุนเกี่ยวกับความต้องการลูทีไนซิ่งฮอร์โมนแก่สถาบันอื่นๆ ภายในประเทศและรวมทั้งการสร้างแอนติบอดีขึ้นใช้เองด้วย ทั้งนี้เพราะปัจจุบันส่วนใหญ่อาศัยสิ่งเหล่านี้จากความช่วยเหลือจากสถาบันในต่างประเทศซึ่งไม่เป็นการสะดวกเท่าที่ควร

3. ในด้านเรดิโออิมมิวโนเอสเสนั้นควรจะมีการพัฒนาการทดลองในการย่นระยะเวลาให้เสร็จเร็วขึ้นเพื่อจะได้นำผลของการวิเคราะห์ที่ได้ไปประยุกต์ใช้งานได้ทันตามความต้องการ โดยการปรับปรุงวิธีการอินคิวเบทสารเพื่อให้ปฏิกริยาถึงจุดสมดุลอย่างสมบูรณ์เร็วขึ้น สามารถให้ค่าเปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวที่สูงพอและให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำ

4. น่าจะมีการดัดแปลงวิธีการทดลองดังกล่าวเพื่อนำผลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในงานที่ใกล้เคียงกัน เช่น ในการขยายและปรับปรุงพันธุ์ของสัตว์ประเภทอื่น โดยอาศัยแนวทางของการทดลองที่ได้ทำมาแล้ว