หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การทดลอง สารเคมีและอุปกรณ์

สัตว์ทดลอง

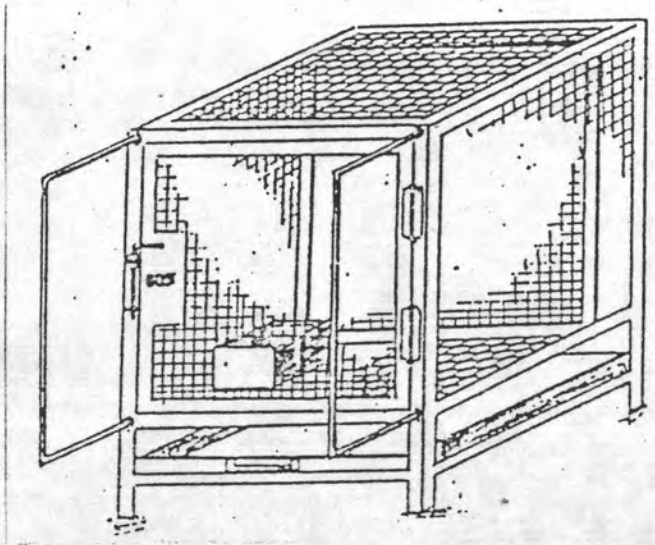
สัตว์ที่ใช้ทดลองเป็นลิงหางยาวเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 6 ตัว จากโคโลนีของศูนย์วิจัยไพรเมต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลิงเหล่านี้ปกติถูกเลี้ยงแยกไว้ในกรงเดี่ยวขนาด 24 x 34 x 28 นิ้ว (ภาพที่ 2.1) ในเรือนเลี้ยงที่มีอากาศถ่ายเทได้สะดวก มีการควบคุมปริมาณแสงในแต่ละวัน โดยให้ได้รับแสงวันละ 12 ชั่วโมง ตั้งแต่ Ø6.ØØ - 18.ØØน. อาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นอาหารสำเร็จรูปจากบริษัทโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ ผักและผลไม้ เช่น แตงกวา กล้วย สับปะรด มันเทศ สัตว์ทดลองจะได้รับอาหารโปรตีนเสริมโดยให้ไข่ต้มสัปดาห์ละครั้ง

ลิงเพศเมียที่ใช้ทดลอง เป็นลิงที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์มีอายุ 5 ปี น้ำหนักอยู่ระหว่าง 3.5 - 7 กิโลกรัม ลิงทุกตัวเคยมีรอบเดือนติดต่อกันมาอย่างน้อย 3 เดือนก่อนการทดลอง สัตว์ทดลองแต่ละตัวมีประวัติสังเขปดังตารางที่ 2.1 ลิงเพศผู้ที่ใช้ในการทดลอง เป็นลิงในวัยเจริญพันธุ์อายุมากกว่า 4 ปี น้ำหนัก 5 - 1Ø กิโลกรัม ลิงแต่ละตัวมีประวัติโดยสังเขปดังแสดงในตารางที่ 2.2

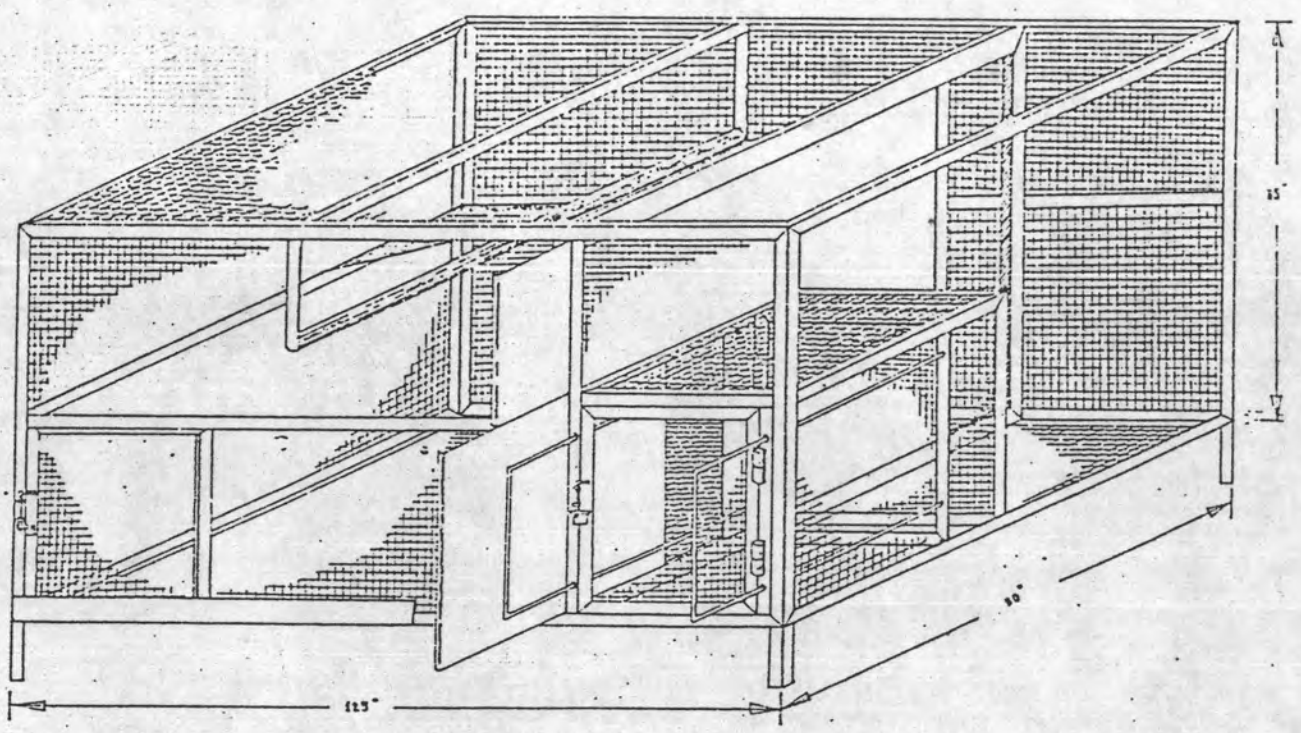
ลิงทั้ง 12 ตัว ถูกสุ่มจัดเป็นคู่เพศผู้ - เพศเมีย จำนวน 6 คู่ เพื่อใช้ในการทดสอบพฤติกรรม ดังแสดงในตารางที่ 2.3

กรงเลี้ยงมี 2 แบบ แบบแรกเป็นกรงเดี่ยวขนาด 24 x 34 x 28 นิ้ว (รูปที่ 2.1) อยู่ในเรือนเลี้ยง ในช่วงก่อนการทดสอบพฤติกรรมและหลังการทดสอบพฤติกรรม สัตว์ทดลองจะถูกขังอยู่ในกรงเดี่ยวนี้กรงละตัว กรงแบบที่สองเป็นกรงที่ใช้ในการทดสอบพฤติกรรม มีขนาด 8Ø x 125 x 65 นิ้ว (รูปที่ 2.2) แบ่งเป็นสองส่วน ส่วนแรกมีขนาด 8Ø x 1Ø1 x 65 นิ้ว ใช้ทดสอบพฤติกรรมและเป็นที่อยู่สำหรับลิงเพศผู้ อีกส่วนหนึ่งเป็นที่อยู่ของลิงเพศเมียเมื่อจบการทดสอบพฤติกรรมในแต่ละวัน ส่วนนี้มีขนาด 8Ø x 24 x 65 นิ้ว ทั้งสองส่วนถูกแบ่งด้วยประตูเลื่อน ซึ่งจะเปิดออกให้ลิงเพศเมียเข้าไปในส่วนที่ลิงเพศผู้อยู่และเป็นที่ที่จะใช้ในการทดสอบพฤติกรรมด้วย นอกจากนี้ยังมีกรง ขนาด 24 X 28 X 34 นิ้ว ใช้เป็นที่ขังสัตว์ทดลองเพื่อฉีด Ketamine hydrochloride

ทอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



รูปที่ 2.1 กรงเลี้ยงก่อนการทดสอบพฤติกรรม



รูปที่ 2.2 กรงที่ใช้ทดสอบพฤติกรรม

ก่อนการเจาะเลือด กรงส่วนนี้แบ่งออกจากส่วนทดสอบพฤติกรรมด้วยประตูเลื่อน กรงสำหรับทดสอบพฤติกรรมนี้อยู่ในห้องสังเกตพฤติกรรมที่มีการควบคุมแสง (ให้แสง 06.00 - 18.00 น.) เช่นเดียวกับเรือนเลี้ยง และควบคุมอุณหภูมิที่ 24 - 26 องศาเซลเซียส

เมื่อจะเริ่มทดสอบพฤติกรรม จะย้ายลิงทดลองคู่ที่เลือกไว้แล้ว เข้าไปไว้ในกรงใหญ่ในห้องศึกษาพฤติกรรม ลิงแต่ละเพศจะถูกขังแยกกันคนละส่วนของกรงดังที่ได้อธิบายไว้ในเบื้องต้นเป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้สัตว์ทดลองปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่แล้วจึงเริ่มทดสอบพฤติกรรมในวันที่สาม

การแบ่งระยะรอบเดือนในลิงหางยาวเพศเมีย

การศึกษาเกี่ยวกับวงจรสืบพันธุ์ในลิงหางยาวเพศเมียมีรายงานว่าความยาวของรอบเดือนในลิงหางยาวอยู่ในช่วง 28.5 - 33 วัน (Dukelow,1977; Zump & Michael,1984 และ Wallis et al. 1986; Varavudhi and Yodyingyuad;1988) Wallis และคณะ (1986) กล่าวว่าระยะการตกไข่ (periovulatory phase) ของลิงหางยาวเพศเมียอยู่ในช่วงวันที่ 11 - 13 จนถึงวันที่ 12 - 17 ของรอบเดือน ในขณะที่ Rowson และ Dukelow (1973) พบว่าการตกไข่จะเกิดขึ้นในระยะวันที่ 12 ถึง 16 ของรอบเดือน Dukelow และคณะ (1979) แบ่งลักษณะของรอบเดือนในลิงหางยาวเพศเมียออกไปอีก โดยให้กลุ่มที่มีความยาวของรอบเดือนน้อยกว่า 20 วัน เป็นกลุ่มที่มีรอบเดือนสั้น (short cycle) กลุ่มที่มีรอบเดือนอยู่ในช่วง 40 - 50 วัน จัดเป็นกลุ่มที่มีรอบเดือนยาว (long cycle) และกลุ่มที่มีความยาวรอบเดือนมากกว่า 50 วัน ให้เป็นกลุ่ม amenorrheic cycle

การศึกษานี้จัดแบ่งระยะต่าง ๆ ของรอบเดือนลิงหางยาวเพศเมียที่ใช้เป็นคู่ในการทดสอบพฤติกรรมกับลิงหางยาวเพศผู้ออกเป็นระยะต่าง ๆ เช่นเดียวกับที่กาญจนา (กาญจนา เศรษฐชัยวัฒน์, 2530) แบ่งไว้คือ วันที่ 1 ถึงวันที่ 11 ของรอบเดือนเป็นระยะฟอลลิคูลา ระยะกลางของรอบเดือนเป็นวันที่ 12 ถึง 17 ของรอบเดือน และตั้งแต่วันที่ 18 ของรอบเดือนเป็นต้นไปจนถึงวันสุดท้ายก่อนจะพบการมีประจำเดือนครั้งต่อไปเป็นระยะลูเตียล โดยถือว่าวันแรกที่พบ vaginal breeding เป็นวันที่ 1 ของรอบเดือน

ตารางที่ 2.1 ประวัติโดยสังเขปของลิงหางยาวเพศเมียที่ใช้ในการทดลอง

หมายเลขลิงทดลอง	วัน เดือน ปี เกิด	น้ำหนัก (กิโลกรัม)	สถานที่เกิด
95 *	(อายุประมาณ 8 ปี)	4.Ø	ป่าชายเลน จ.สมุทรสงคราม
6Ø1	19 กุมภาพันธ์ 2523	7.Ø	ในโคโลนี ภาควิชาชีววิทยา
6Ø3	21 กุมภาพันธ์ 2523	3.5	,,
6Ø5	17 มีนาคม 2523	3.2	,,
6Ø6	9 เมษายน 2523	3.2	,,
6Ø7	16 สิงหาคม 2523	3.8	,,

หมายเหตุ * ไม่ทราบวันเกิด

ตารางที่ 2.2 ประวัติโดยสังเขปของลิงหางยาวเพศผู้ที่ใช้ในการทดลอง และปริมาณ Ketamine hydrochloride ที่ให้ก่อนการเจาะเลือดแต่ละครั้ง

หมายเลขลิงทดลอง	วัน เดือน ปี เกิด	น้ำหนัก (กิโลกรัม)	Ketamin (มล.)	สถานที่เกิด
48 *	(อายุประมาณ 6 ปี)	8.4	Ø.6	ป่าชายเลน จ.สมุทรสงคราม
56 *	(อายุประมาณ 6 ปี)	8.5	Ø.8	,,
5ØØ	1 มกราคม 2523	5.3	Ø.4	โคโลนีภาควิชาชีววิทยา
5Ø3	9 มกราคม 2523	4.6	Ø.3	,,
5Ø4	3Ø มีนาคม 2523	3.8	Ø.3	,,
5Ø5	22 กันยายน 2523	5.2	Ø.4	,,

หมายเหตุ * ไม่ทราบวันเกิด

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 การจัดคู่สิ่งทดลองแต่ละคู่ในการทดสอบพฤติกรรม

คู่ที่	หมายเลขสิ่งเพศผู้	หมายเลขสิ่งเพศเมีย
1	48	601
2	56	95
3	500	603
4	503	605
5	504	606
6	505	607

การเก็บตัวอย่างซีรัม

ในการเจาะเลือด สัตว์ทดลองจะได้รับ ketamine hydrochloride โดยการฉีดเข้ากล้ามในปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม การเจาะเลือดจะทำสัปดาห์ละสองครั้งตลอดรอบเดือนทุก ๆ วันอังคารและวันศุกร์ ระหว่างเวลา 8.30-9.00 น. ทันทีหลังจากจบการทดสอบพฤติกรรมในตอนเช้าโดยเจาะจากเส้นเลือดดำหน้าขา (femeral vein) ครั้งละประมาณ 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เม็ดเลือดแข็งตัวนำไปปั่นเพื่อแยกส่วนซีรัมออกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีค่า G เท่ากับ 500 นาน 15 นาที แล้วจึงใช้พาสเจอร์ปิเปต แยกเอาเฉพาะส่วนของซีรัมเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็นสองตอน คือ การวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนและคอร์ติซอล ด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ และการศึกษาพฤติกรรม ขั้นตอนของการทดลองเป็นดังนี้ :

1. ระยะก่อนการทดสอบพฤติกรรม ในระยะนี้สัตว์ทดลองแต่ละตัวจะถูกขังไว้ในกรงเดี่ยวและเจาะเลือดสัปดาห์ละสองครั้ง ในวันอังคาร และวันศุกร์ เป็นเวลา 1 รอบเดือนของลิงเพศเมียที่ถูกเลือกให้เข้าคู่กัน

2. ระยะทดสอบพฤติกรรม วันแรกที่ตรวจพบว่าลิงเพศเมียที่ถูกเลือกไว้ให้เป็นคู่เริ่มมีประจำเดือน ลิงทั้งสองเพศที่ถูกเลือกคู่ไว้แล้วจะถูกย้ายเข้าไปไว้ในกรงสำหรับศึกษาพฤติกรรม โดยจัดให้ลิงเพศผู้อยู่ในส่วนที่จะใช้เป็นที่ทดสอบพฤติกรรมและ ลิงเพศเมียอยู่ในกรงส่วนที่เล็กกว่า โดยมีประตูเลื่อนกั้นแยกออกจากกัน สัตว์ทดลองทั้งสองเพศจะถูกขังแยกอยู่เช่นนี้นาน 2 วัน เพื่อปรับตัวกับที่อยู่ใหม่ วันที่สามจะเริ่มปล่อยให้ลิงเพศเมียเข้าไปในกรงส่วนของเพศผู้เป็นเวลานาน 2Ø นาที เพื่อทำการทดสอบพฤติกรรม โดยแบ่งการทดสอบพฤติกรรมเป็นสองช่วง ๆ ละ 2Ø นาที ในตอนเช้าเริ่มเวลา 8.ØØ - 8.2Ø น.และในตอนบ่ายเวลา 16.ØØ - 16.2Ø น. เมื่อทดสอบพฤติกรรมแล้วลิงทดลองทั้งสองจะถูกแยกออกไปอยู่คนละส่วนของกรงเช่นเดิม ข้อมูลที่ได้จากการทดสอบพฤติกรรมในตอนเช้าและตอนบ่ายรวมกันเป็นหนึ่งการทดลอง การบันทึกพฤติกรรมจะทำสัปดาห์ละ 4 วันคือในวันจันทร์ อังคาร พฤหัสบดีและวันศุกร์ การทดสอบอาจเพิ่มวันขึ้นเมื่อลิงเพศเมียมีรอบเดือนใกล้ระยะตกไข่ การศึกษาพฤติกรรมจะสิ้นสุดลงเมื่อลิงเพศเมียมีรอบเดือนใหม่อีกครั้ง หรือถ้าหากลิงเพศเมียที่ใช้มีรอบเดือนไม่ปกติการทดสอบจะทำติดต่อกันจนครบหนึ่งเดือน ในระหว่างที่มีการทดสอบพฤติกรรม ในวันอังคารและวันศุกร์เมื่อการทดสอบจบลงในตอนเช้าลิงทั้งคู่จะถูกฉีด ketamine hydrochloride เพื่อเจาะเลือดทันที ในระหว่างการศึกษาพฤติกรรมของลิงคู่แรก ลิงคู่ต่อไปที่จะศึกษาจะถูกเจาะเลือดสำหรับเป็นข้อมูลก่อนการทดลองไปพร้อม ๆ กันด้วย

3. ระยะหลังการทดสอบพฤติกรรม เมื่อสิ้นสุดการทดสอบพฤติกรรมย้ายลิงทั้งคู่ออกมาขังไว้กรงเดี่ยวในเรือนเลี้ยงเช่นเดิม การเจาะเลือดจะยังคงทำต่อไปจนกว่าลิงเพศเมียที่เป็นคู่จะมีรอบเดือนอีกครั้ง หรือในกรณีเพศเมียมีรอบเดือนไม่ปกติการเจาะเลือดจะทำต่อไปจนครบหนึ่งเดือน

การบันทึกพฤติกรรม

การบันทึกพฤติกรรมทำทันทีหลังจากที่ปล่อยสัตว์ทดลองทั้งสองเพศให้อยู่ด้วยกัน โดยผู้ทดสอบจะนั่งสังเกตและบันทึกข้อมูลหลังกระจกด้านเดียว (one - way

mirror) โดยทำเครื่องหมายลงในตารางที่ออกแบบไว้สำหรับบันทึกพฤติกรรมโดยเฉพาะ (รูปที่ 2.3)การให้คะแนนจะให้ 1 คะแนน ต่อการแสดงพฤติกรรมหนึ่งครั้ง แต่ถ้าเป็นพฤติกรรมต่อเนื่องที่ใช้เวลาในการแสดงนานจะให้คะแนนจากระยะเวลาที่แสดงพฤติกรรมโดยให้ 1 คะแนน ต่อการแสดงพฤติกรรมนาน 2 นาที สำหรับพฤติกรรมที่บันทึกได้แก่

ก. พฤติกรรมทางเพศ

1. Approach (AP) คือการที่ลิงตัวหนึ่งเคลื่อนที่เข้าใกล้ลิงอีกตัวหนึ่งในระยะเอื้อมมือถึง และยังคงอยู่ในตำแหน่งนั้นอย่างน้อย 5 วินาที โดยไม่มีการต่อสู้

2. Investigation หรือ Inspection (Ins) คือการที่ลิงเพศผู้จ้องมองดูผิวหนังรอบอวัยวะเพศของลิงเพศเมีย ใบหน้าของลิงเพศผู้อยู่ห่างจากเพศเมียไม่เกิน 1Ø เซนติเมตร

3. Groom (GR) คือการที่ลิงตัวหนึ่งใช้มือเก็บอนุภาคเล็ก ๆ ที่ติดอยู่ตามขนหรือหนังของลิงอีกตัวหนึ่งเข้าปาก

4. Invite to groom (INV) คือการที่ลิงตัวหนึ่งเคลื่อนที่เข้าใกล้ลิงอีกตัวหนึ่งในระยะที่เอื้อมมือถึง จากนั้นก้มหัวลงต่ำหรืออาจจะหันส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกายให้และหยุดนิ่งอยู่เช่นนั้น

5. Yawn (Y) ลิงจะอ้าปากกว้างมองเห็นฟันพร้อมทั้งเงยหน้าขึ้น

6. Mounting (M) ลิงเพศผู้วางมือบนตะโพกของลิงเพศเมียที่เป็นคู่แล้วใช้เท้าจับบริเวณข้อเท้าหลังของลิงเพศเมีย

7. Ejaculation (E) เป็นการหยุดชั่วขณะหลังจากมี pelvic thrusting อย่างรวดเร็วพร้อม ๆ กับอาการเกร็งของขาและส่วนหางยกสูงขึ้น (Phoenix, chamber, 1984; Chamber et all, 198Ø)

ข. พฤติกรรมก้าวร้าว

1. Attack (ATT) เกิดขึ้นเมื่อลิงตัวหนึ่งวิ่งเข้าชนหรือไล่ต้อนหรือกระโดดเข้าหาตัวที่เป็นเป้าหมาย กัดหรือทำร้ายบริเวณลำตัวหรือหางของลิงตัวที่เป็นเป้าหมาย

2. Threat (TH) มีหลายระดับ ตั้งแต่การจ้องมองจนถึงการอ้าปากขู่ (open mount threat) ลิงมักจะเริ่มจากการจ้องมองเขม็ง ผงกหัวขึ้นลง หูตั้งชัน กลอกตาไปมาและแยกเขี้ยว

รูปที่ 2.3 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...														

015376

3. Displacement (DI) ลิงตัวหนึ่งจะเดินไปยังลิงที่สนใจ เป็นเหตุให้ตัวที่ถูกสนใจต้องลุกออกไปโดยไม่เกิดการต่อสู้ จากนั้นตัวที่สนใจจะเข้าไปแทนที่ตำแหน่งของตัวที่ถูกสนใจทันที ซึ่งบางครั้งการเข้าแทนที่ในตำแหน่งที่ลิงตัวเดิมอยู่นั้นอาจเกิดจากการผลักตัวที่อยู่เดิมออกไปก็ได้

การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน และ คอร์ติซอล ด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเส์ มีดังนี้

1. Absolute ethanol : Proanalysis Merk Germany.
2. Antiserum to testosterone : Batch No. 83/M WHO RIA Matched Reagent Programme.
3. Antiserum to Cortisol : Batch No. K9Ø7Ø1Ø WHO RIA Matched Reagent Programme.
4. ^{3}H - Testosterone [1,2,6,7 - ^{3}H] Testosterone : TRK. 4Ø2 Batch 46: Amersham International Ltd. Amersham UK.
5. 3H - Cortisol [1,2,6,7 - 3H] Cortisol : TRK. 4Ø7 Batch 46 : Amersham International Ltd. Amersham UK.
6. Testosterone Standard : Batch No. 83/N WHO RIA Matched Reagent Programme.
7. Cortisol Standard : Batch No. KØ7951Ø WHO RIA Matched Reagent Programme.
8. Charcoal Reagent : Batch No. 82/83/R WHO RIA Matched Reagent Programme. Switzerland.
9. Dextran : Batch No. 82/83/J WHO RIA Matched Reagent Programme. Switzerland.
1Ø. Sodium dihydrogen phosphase (anhydrous) : No. Ø1169297 AR Grade. BDH Chemical Ltd.,England.
11. Disodium hydrogen phosphase : No.Ø119Ø86 AR Grade. BDH

Ltd.,England.

12.Gelatin : Bacto Gelatin Difco Laboratory. U.S.A..

13.PPO (2,5 diphenyloxazole) No. D4630, Sigma Chemical Company, st.LOUIS U.S.A.

14.Thaimersal (merthiolate) : No. T5152, Sigma Chemical Company, St,LOUIS U.S.A.

15.Toluene : ART 8325, Merck Dermstadt, Germany.

16.Ketamine hydrochloride (10 mg./Kg. Body Weight) Park Davis, PTY Ltd., Australia.

17.Triton X - 100 (Octyl Phenoxy Polyethoxyethanal) : No. T6878 Rabm & Haas Co.

18.Sodium Chloride : No.2427997, May & Baker Ltd., England.

อุปกรณ์

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

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

3. Syring ขนาด 10 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร (ชนิดที่ใช้ครั้งเดียวทิ้ง) : Turumo Coporation, Tokyo.

4. Pipettes ขนาด 20 ไมโครลิตร, 200 ไมโครลิตร, 500 ไมโครลิตร และ 1 มิลลิลิตร : Pipetteman H - 81 - 12297 M81 Gilson, France.

5. B - Liquid Scintilation Counter : Packard Instrument Co., Model BPL, U.S.A.

6. Vortex mixture : M16715, Thermolyne Coporation., Iowa. U.S.A.

7. pH meter :5985 Cole Parmer Instrument Company, Chicaco, Illinoi 60648, U.S.A.

8. Refigerated Centrfuge : Model PR - J International Equipment Company, Mass, U.S.A.

9. Micro - re/Pipetter : Semi Emeryvulle, Calif 94608, U.S.A.

10. Dri - Block DB - 3 : Techne Incoporated Princeton., U.S.A.

11. Pyro - Magnestir : Catalog N.1279 - 1 Lab - Line Instruments Inc.,U.S.A.

12.Pepipette : 94710 Labindustries Berkcley, Ca.74710, U.S.A.

การวิเคราะห์ปริมาณเทสโทสเตอโรนโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเส์

สารละลายและวิธีเตรียม

1. แอสเส์บัฟเฟอร์ เตรียมโดยใช้สารเคมีต่อไปนี้

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

อุ่น gelatin ให้ละลายในน้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อยก่อน จากนั้นนำสารทั้งหมดเติมลงไปและเติมน้ำกลั่นลงไปจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 7.2 และ 7.4 โดยใช้สารละลาย 1 M. sodium hydroxide และ 1 M. hydrochloric acid เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอายุใช้งานได้นาน 1 เดือน

2. Charcoal suspension เตรียมโดยใช้

Charcoal	0.625 กรัม

Dextran Ø.Ø625 กรัม

ละลาย dextran ใน แอสเสย์ บัฟเฟอร์ 1ØØ มิลลิลิตร จากนั้นเติมผงถ่าน ลงไป ปั่นให้เข้ากันเป็นเวลา 3Ø นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 1 เดือน

3. สารมาตรฐานเทสโทสเตอโรน

เตรียมโดยใช้ สารมาตรฐานเทสโทสเตอโรน จาก WHO ที่มีความเข้มข้น 22 นาโนโมลต่อลิตร ปิเปต สารมาตรฐานเทสโทสเตอโรน ปริมาณ 5ØØ ไมโครลิตร แล้วเติม แอสเสย์ บัฟเฟอร์ 4.5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเทสโทสเตอโรน ที่มีความเข้มข้น 2.2 นาโนโมลต่อลิตร (หรือ 22ØØ เฟมตาโมลต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำสารละลายที่ได้ซึ่งเรียกว่าสารละลาย B มาเจือจางแบบอนุกรม(serial dilution) ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 11ØØ เฟมตาโมลต่อ 5ØØ ไมโครลิตร ถึง 34เฟมตาโมลต่อ 5ØØ ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานในการเทียบหาปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ดังแสดงใน ตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 แสดงวิธีเตรียมสารละลายเทสโทสเตอโรนมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐาน ตั้งต้นที่ความเข้มข้น 22ØØ เฟมตาโมลต่อมิลลิลิตร

หลอดทดลองชุดที่	สารละลายที่ใช้ผสม			
	สารละลาย	ปริมาณ (มิลลิลิตร)	ปริมาณ Buffer (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นที่ได้ (เฟมตาโมล/.5 มล.)
1	สารละลาย B	.5	4.5	11ØØ
2	สารละลาย 1	2	2	55Ø
3	สารละลาย 2	2	2	275
4	สารละลาย 3	2	2	138
5	สารละลาย 4	2	2	69
6	สารละลาย 5	2	2	34

4. Testosterone Working Tracer

ใช้ testosterone stocking tracer ปริมาณ 10 ไมโครคูรีต่อมิลลิลิตร จำนวน 150 ไมโครลิตร ระเหยแห้งแล้วเติม แอสเสย์บัฟเฟอร์ 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันใช้เวลา 30 นาที เพื่อให้ tracer ละลายผสมกับ บัฟเฟอร์ สารละลายที่ได้จะใช้สำหรับการแอสเสย์ 100 หลอด ซึ่งเป็น working tracer ปริมาณ 100 นาโนคูรีต่อมิลลิลิตร

5. Testosterone antiserum

ใช้ testosterone antiserum จาก WHO ซึ่งอยู่ในรูปที่เป็นสารระเหยแห้ง เติม แอสเสย์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน 5 - 10 นาที นำไปใช้ได้กับการแอสเสย์ 100 หลอด

6. Counting solution

ใช้ PPO (2,5 diphenyloxazole) 15 กรัม ละลายใน toluene 2 ลิตร จากนั้นเติม triton X - 100 จำนวน 1 ลิตร

วิธีวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน

1. การเจือจางซีรัมก่อนการแอสเสย์

ใช้ซีรัม จำนวน 100 ไมโครลิตร แล้วเติม แอสเสย์บัฟเฟอร์ 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

2. การสกัด (extraction)

ใช้สารละลายซีรัมจากข้อ 1 จำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองรูปกรวยตัวอย่างละ 2 หลอด เติม ไดเอททิล อีเธอร์ 5 มิลลิลิตร แล้ว vortex mixed นาน 1 นาที จากนั้นทิ้งให้มีการแยกชั้นแล้วจึงทำการแยกชั้นของน้ำออกจากอีเธอร์ โดยแช่หลอดทดลองลงในถาดที่มีน้ำแข็งแห้ง (dry ice) และเอทธิลแอลกอฮอร์ทำให้ชั้นน้ำแข็งตัวแล้วเทส่วนของอีเธอร์ ที่อยู่ด้านบนและมีเทสโทสเตอโรนละลายปนอยู่ออกใส่หลอดทดลอง นำไประเหยอีเธอร์ออกด้วย dri - block heater ที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส

3. เรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของเทสโทสเตอโรน

3.1 การเตรียมสารตัวอย่าง

3.1.1 นำหลอดทดลองที่ได้จากข้อ 2 ซึ่งเป็นซีรัมที่สกัดและระเหย อีเธอร์ออกแล้วมาเติมด้วย แอสเสย์บัฟเฟอร์ จำนวน 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วผสมกันอีกครั้ง

3.1.2 เติมสารละลาย testosterone antiserum จำนวน 100 ไมโครลิตร

3.1.3 เติมสารละลาย testosterone tracer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

3.1.4 นำหลอดทดลองไปอินคิวเบทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

3.1.5 เติม charcoal suspension 200 ไมโครลิตร ในขณะที่เติมหลอดทดลองแช่อยู่ในถาดน้ำแข็ง และ charcoal suspension ถูกกวนที่ 4 องศาเซลเซียส ตลอดเวลาที่เติม

3.1.6 Vortex mixed แล้วอินคิวเบทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.1.7 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีค่า g เท่ากับ 500 นาน 15 นาที

3.1.8 เทส่วนที่ใสลงใน counting vials เติม counting solution 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตรวจวัดหาปริมาณเทสโทสเตอโรนด้วยเครื่องวัดรังสีเบต้า

3.2 การตรวจสอบความแม่นยำของการแอสเสย์

นำซีรัมรวม(pooledd serum)ของลิงหางยาวเพศผู้ที่เจือจางด้วย แอสเสย์บัฟเฟอร์ในอัตราของซีรัมต่อ บัฟเฟอร์ 1:9 มาปิเปตใส่หลอดทดลองรูปกรวย 12 หลอด ๆ ละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปสกัดและวิเคราะห์ปริมาณเทสโทสเตอโรนเช่นเดียวกับหลอดใส่สารตัวอย่าง โดยแบ่งออกเป็นสองชุด ๆ ละ 6 หลอด ไว้ในอันดับต้นและท้ายของการแอสเสย์ เพื่อทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์หาปริมาณเทสโทสเตอโรน

3.3 การเตรียมสารมาตรฐาน

ทุนวิจัยการแพทย์มหาวิทยาลัย

นำสารละลายมาตรฐานเทสโทสเตอโรนที่มีความเข้มข้น 34, 69, 138, 275, 550 และ 1100เฟมตาโมลต่อ 0.5 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับสารตัวอย่างโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการสกัดด้วยอีเธอร์

3.4 การเตรียม Non Specific Binding (NSB)

เติม แอสเสย์บัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตร และ testosterone working tracer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดแล้วนำไปอินคิวเบทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง ดำเนินการทดลอง จนจบกระบวนการเช่นเดียวกับหลอดใส่สารมาตรฐาน การเตรียมหลอด NSB เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ของ tracer ในรูปอิสระที่ไม่ถูกจับโดยผงถ่าน

3.5 การเตรียม Maximum Binding (Bo)

เติม 100 ไมโครลิตรของ testosterome antiserum และ 100 ไมโครลิตร testosterone tracer ลงในสารละลาย แอสเสย์บัฟเฟอร์ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปอินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 18 - 24 ชั่วโมง จนจบกระบวนการ เช่นเดียวกับหลอดใส่สารละลาย
การทำ maximum binding เพื่อไว้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวสูงสุดของ testosterone tracer และ testosterone antibody

3.6 การเตรียม Total Count (TC)

เติม testoste rone tracer 100 ไมโครลิตร ลงใน แอสเสย์บัฟเฟอร์ 800 ไมโครลิตร นำไปอินคิวเบท จนจบกระบวนการเช่นเดียวกับหลอดใส่สารละลาย

ประสิทธิภาพของการสกัด (Recovery of Extraction)

การคำนวณหาประสิทธิภาพของการสกัดโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ recovery หาได้โดยการเติม 50 ไมโครลิตร ของ testosterone tracer ลงในหลอดทดลอง 2 หลอด แล้วนำไปผ่านกระบวนการสกัดเช่นเดียวกับหลอดตัวอย่าง จากนั้นนำหลอดที่ระเหย อีเธอร์ ออกแล้ว เติมด้วย แอสเสย์บัฟเฟอร์ หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปิเปตออกมา 500 ไมโครลิตร ใส่ counting yial เติม Counting solution 5 มิลลิลิตร นำไปวัดหาปริมาณรังสีแล้วนำไปคำนวณดังนี้

$$\text{ประสิทธิภาพการสกัด} = \frac{\text{ค่า CPM} \times 2 \times 100}{\text{ค่า CPM ของ testosterone tracer 50 ไมโครลิตร}}$$

ประสิทธิภาพของการแอสเสย์ (Recovery of Assay)

ในการหาประสิทธิภาพของการแอสเสย์ ทำได้โดยใช้ testosterone standard ที่รู้ค่าจำนวณ 50 ไมโครลิตร ผ่านกระบวนการแอสเสย์เช่นเดียวกับสารตัวอย่าง เมื่อนำค่า CPM ไปอ่านค่า ฮอร์โมนจากกราฟมาตรฐานแล้วจึงนำไปเทียบกับค่าจริงของฮอร์โมนจะได้ประสิทธิภาพของการแอสเสย์ออกมา

ตารางที่ 2.5 แสดงปริมาณองค์ประกอบสารละลายในแต่ละหลอด ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเทสโทสเตอโรน (ไมโครลิตร)

หลอด	Buffer (ul)	Std.-T (ul)	Anti.-T (ul)	Tracer [^{3}H]T (ul)	Charcoal (ul)
TC	800	-	-	100	-
NSB	600	-	-	100	200
Bo	500	-	100	100	200
Std.	-	500	100	100	200
Sample	500	-	100	100	200

การสร้างกราฟมาตรฐาน

นำค่า CPM ของสารมาตรฐานเทสโทสเตอโรน แต่ละความเข้มข้นที่ทำซ้ำกันมาหาค่าเฉลี่ย แล้วลบออกจากค่า CPM ของ NSB นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตราฐานโดยเทียบกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน บนกระดาษกราฟ semilog

การอ่านค่าสาร.

นำเอาค่า CPM ของตัวอย่างลบออกจากค่า CPM ของ NSB แล้วนำค่าที่ได้ไปอ่านปริมาณเทสโทสเตอโรนได้จากกราฟมาตรฐาน จะได้ค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนเป็นเฟมตาโมลต่อหลอดทดลอง จากนั้นเปลี่ยนค่าให้เป็นพิโคกรัมต่อมิลลิลิตร นำค่า recovery ของการสกัดมาคำนวณหาค่าปริมาณเทสโทสเตอโรนที่แท้จริงที่

มีในตัวอย่าง

การวิเคราะห์ปริมาณคอร์ติซอลโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

สารละลายและวิธีเตรียม

1.แอสเสย์บัฟเฟอร์

ใช้สารเคมีและวิธีการเช่นเดียวกับ แอสเสย์บัฟเฟอร์ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเทสโทสเตอโรน

2. Charcoal Suspension

เตรียมเช่นเดียวกับการแอสเสย์เทสโทสเตอโรน

3. สารมาตรฐานคอร์ติซอล

ปิเปต สารมาตรฐานคอร์ติซอล จาก WHO ที่มีความเข้มข้น 6 ไมโครโมลต่อลิตร จำนวณ 100 ไมโครลิตร เติม แอสเสย์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร นำไปอินคิวเบทที่ 40 องศาเซลเซียส 30 นาที ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายคอร์ติซอลมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 60 นาโนโมลต่อลิตร (60 พิโคโมลต่อมิลลิลิตร) สารละลายนี้เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 2 - 3 สัปดาห์ เมื่อจะใช้นำสารละลายที่เก็บไว้นี้มาเจือจางแบบอนุกรม เป็น 60, 30, 15, 7.5, 3.75, และ 1.87 พิโคโมลต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายที่เตรียมไว้ความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดแอสเสย์จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 แสดงวิธีเตรียมสารละลายคอร์ติซอลมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐาน 2200 เฟมตาโมลต่อมิลลิลิตร

หลอดทดลองชุดที่	สารละลายที่ใช้ผสม			
	สารละลาย	ปริมาณ (มิลลิลิตร)	ปริมาณ Buffer (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นที่ได้ (เฟมตาโมล/ มล.)
1	สารละลาย B	-	-	6000
2	สารละลาย 1	2	2	3000
3	สารละลาย 2	2	2	1500
4	สารละลาย 3	2	2	750
5	สารละลาย 4	2	2	375
6	สารละลาย 5	2	2	187

4. Cortisol Working Tracer

ใช้ cortisol stocking tracer ปริมาณ 10 ไมโครคูรีต่อมิลลิลิตร ผสมจำนวน 150 ไมโครลิตรระเหยแห้งแล้วเติมแอสเสย์บัฟเฟอร์ 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันใช้เวลา 30 นาทีเพื่อให้ tracer ละลายเข้ากับบัฟเฟอร์ working tracer นี้ใช้สำหรับการแอสเสย์ 100 หลอด โดยมีปริมาณ 100 นาโนคูรีต่อมิลลิลิตร

5. Cortisol Antiserum

เติมแอสเสย์บัฟเฟอร์10 มิลลิลิตร ลงใน cotisol antiserum ซึ่งอยู่ในรูปที่เป็นสารระเหยแห้งเขย่าให้ละลายเข้ากัน แล้วนำไปใช้ได้ทันที

6. Counting Solution

เตรียมเช่นเดียวกันกับ counting solution ที่ใช้ในการทำ RIA ของเทสโทสเตอโรน

วิธีวิเคราะห์ปริมาณคอร์ติซอลในซีรัม

1. การเจือจางซีรัมก่อนการแอสเสย์

ใช้ตัวอย่างซีรัมจากลิงหางยาวเพศผู้จำนวน 150 ไมโครลิตร เติมแอสเสย์ บัฟเฟอร์ 850 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเข้ากระบวนการแอสเสย์ทันที

2. การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีไม่ผ่านการสกัด

การทำเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของคอร์ติซอลทำด้วยวิธีที่ไม่ต้องมีการสกัดฮอร์โมน โดยมีการเตรียมตัวอย่างดังนี้

2.1 เติม 100 ไมโครลิตร ของซีรัมตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางแล้วลงในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.2 อินคิวเบทซีรัมในข้อ 2.1 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 นาที เพื่อทำลาย cortisol binding globulin

2.3 ปล่อยซีรัมให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ผสมให้เข้ากัน

2.4 ปิเปตซีรัมในข้อ 2.3 จำนวน 100 ไมโครลิตรใส่ในหลอดสำหรับแอสเสย์

3. เรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของคอร์ติซอล

3.1 หลอดใส่สารตัวอย่าง

นำหลอดทดลองจากข้อ 2.4 มาผ่านกระบวนการเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ดังนี้

3.1.1 เติม cortisol antiserum 100 ไมโครลิตร และ cortisol tracer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.1.2 เติม แอสเสย์บัฟเฟอร์ 400 ไมโครลิตร

3.1.3 หลอดทดลองจากข้อ 3.1.1 ไป อินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง

3.1.4 เติม charcoal suspension 200 ไมโครลิตร ด้วยวิธีการเช่นเดียวกันกับการทำ เรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของเทสโทสเตอโรน

3.1.5 vortex mixed นำไปไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.1.6 ปั่นแยก ที่ 500 g 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.1.7 รินเอาส่วนที่ใสลงใน counting vial แล้วเติม counting solution 4.5 มิลลิลิตร vortex mixed นำไปตรวจวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่องตรวจวัดรังสีเบต้า

3.2 การตรวจสอบความแม่นยำ

นำซีรัมรวมของลิงหางยาวเพศผู้มาทำการเจือจางเช่นเดียวกับการเจือจางตัวอย่าง และเตรียมซีรัมด้วยวิธีไม่ผ่านการสกัด จำนวน 2 ชุด ๆ ละ 6 หลอด แล้วนำผ่านกระบวนการวิเคราะห์หาปริมาณคอร์ติซอลเช่นเดียวกับซีรัมตัวอย่าง

3.3 การเตรียมสารมาตรฐาน

นำเอาสารละลายมาตรฐานคอร์ติซอลที่มีความเข้มข้น 187, 375, 750, 1500, 3000 และ 6000 เฟมตาโมลต่อ 100 ไมโครลิตร มาผ่านกระบวนการเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์เช่นเดียวกับหลอดทดลอง

3.4 การเตรียม NSB

เติม cortisol working tracer 100 ไมโครลิตรลงในแอสเสย์บัฟเฟอร์ 600 ไมโครลิตร นำไปอินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียส 18 - 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติม charcoal suspension และนำไปปั่นแยกล่านเช่นเดียวกับหลอดตัวอย่าง

3.5 การเตรียม Maximun Binding (Bo)

ปิเปต cortisol antiserum 100 ไมโครลิตร และ cortisol working tracer 100 ไมโครลิตร ลงใน แอสเสย์บัฟเฟอร์ 500 ไมโครลิตร นำไปผ่านกระบวนการเติมผงถ่านเช่นเดียวกับหลอดตัวอย่างจนจบกระบวนการ

3.6. การเตรียม Total Count (TC)

ปิเปตแอสเสย์บัฟเฟอร์ 800 ไมโครลิตร ลงใน counting vial เติม cortisol working tracer 100 ไมโครลิตร นำไปตรวจวัดกัมมันตภาพรังสี

ประสิทธิภาพของการแอสเสย์ (recovery of assay)

นำสารละลาย สารมาตรฐานคอร์ติซอล ที่รู้ค่าจำนวณ 50 ไมโครลิตร ผ่านกระบวนการแอสเสย์เช่นเดียวกับสารตัวอย่าง

ตารางที่ 2.7 แสดงปริมาณขององค์ประกอบสารละลายในแต่ละหลอด ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณคอร์ติซอลในซีรัม (ไมโครลิตร)

หลอด	Buffer (ul)	Std. cortisol (ul)	Anti. cortisol (ul)	Tracer [^{3}H]cortisol (ul)	Charcoal (ul)
TC	800	-	-	100	-
NSB	600	-	-	100	200
Bo	500	-	100	100	200
Std.	-	500	100	100	200
Sample	400	100	100	100	200

การสร้างกราฟมาตรฐานและการอ่านค่าสาร

การสร้างกราฟมาตรฐาน ทำเช่นเดียวกับการหาปริมาณของเทสโทสเตอโรน ค่าของคอร์ติซอลอ่านได้จากกราฟมาตรฐาน ไม่ต้องนำเปอร์เซนต์ ของการสกัดมาคำนวนด้วย

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ข้อมูลพฤติกรรม วิเคราะห์โดยใช้ non - parametric statistics โดยวิเคราะห์หาค่า median, interquartile deviation, Kruskal Wallis H test และ Mann Witney U test

2. ข้อมูลฮอร์โมน วิเคราะห์ด้วย parametric statistics โดยหาค่า mean, standard deviation, oneway ANOVA และ Turkey's HSD test