บทที่ 2

เรื่องทั่วไปเกี่ยวกับแฮบโตกลอบบิน และวิธีการวิเคราะห์

2.1 แฮบโตกลอบบิน (Haptoglobin; Hp)

Polonovski และ Jayle (1938) เป็นผู้เริ่มศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนชนิดหนึ่งในซีรัม ที่สามารถจับกับฮีโมกลอบบิน(Hb)และกระตุ้นปฏิกิริยา pseudo-peroxidase ของฮีโมกลอบบินได้ ต่อมา Polonovski และ Jayle (1940) ได้ตั้งชื่อโปรตีนที่พบนี้ว่า Haptoglobin โดยมาจากภาษากรีกซึ่งมีความหมายว่า attach (จับ) กับ globin (กลอบบิน) เมื่อแยกโปรตีนโดยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซิสพบว่าแฮบโตกลอบบินเป็นโปรตีนส่วน อัลฟา-2 ไกลโคโปรตีน ต่อมา Jayle (1951) เป็นคนแรกที่วัดปริมาณแฮบโตกลอบบิน โดยใช้คุณสมบัติที่สามารถกระตุ้นปฏิกิริยาของเอ็นไซม์เพอร์ออกซิเดสได้ เมื่อวัดปริมาณเอ็นไซม์จะเป็นปริมาณแฮบโตกลอบบิน

Smithies และ Walker (1956) ได้ทดลองแยกแฮบโตกลอบบินโดยวิธีสตาชเจล-อิเล็คโตรโฟริซิส พบว่าแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ตามพันธุกรรมคือ Hp 1-1, Hp 2-1 และ Hp 2-2

Nyman (1959) กล่าวว่า การวัดปริมาณแฮบโตกลอบบินในกระแสโลหิต สามารถใช้บอกสภาวะของโรคเม็ดเลือดแดงแตกได้

Jayle และ Moretti (1962) ได้ทดลองวัดปริมาณแฮบโตกลอบบินเป็นครั้งแรก โดยใช้วิธีวัดความสามารถในการจับฮีโมกลอบบิน และพบว่าแฮบโตกลอบบินประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต อยู่ประมาณร้อยละ 20 คือ เฮกโซส(hexoses),กลูโคซามีน(glucosamine), ฟูโคส (fucose)และ กรดเซียลิก(sialic acid)

Smithies, Connel และ Dixon (1962) แยกโมเลกุลของแฮบโตกลอบบินส่วนของโปรตีนแยกออกด้วยสารละลาย เบตา-เมอร์แคบโตเอททานอล และสารละลาย 8 โมลาร์ยูเรีย แล้วตามด้วยอิเล็คโตรโฟรีสิสใน acid-urea starch gel พบว่า 1โมเลกุลของแฮบโตกลอบบิน ประกอบด้วยสองสายอัลฟาและสองสายเบตา เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ สายอัลฟามีส่วนประกอบเป็นโปรตีนมีสองเส้นต่างกันคือ อัลฟา-1 (น้ำหนักโมเลกุล 9,100) และ อัลฟา-2 (น้ำหนักโมเลกุล 17,300) สายเบตา (น้ำหนักโมเลกุล 40,000) มีส่วนประกอบเป็นคาร์โบไฮ

เดรต แฮบโตกลอบบินที่แบ่งตามพันธุกรรม จะมีสายอัลฟาและเบตาต่างกัน ดังเช่น Hp 1-1 มีสายอัลฟา-1 สองสาย และสายเบตาสองสาย , Hp2-1 มีสายอัลฟา-1 หนึ่งสาย สายอัลฟา-2 หนึ่งสาย และสายเบตาสองสาย , Hp 2-2 มีสายอัลฟา-2 สองสาย และสายเบตาสองสาย

Owen,Smithes,Padanyi และ Martin (1964) พบว่าซีรัมแฮบโตกลอบบินสูงขึ้นในภาวะ neoplasia , biliary obstruction , glomerulonephritis, pyelonephristis, ulcerative colitis, arterial disease.

Mouray, Moretti และ Jayle (1964) พบว่าไม่มีแฮบโตกลอบบิน ชนิดที่ยังไม่โตเต็มที่อยู่นอกกระแสโลหิตเลย

Krauses และ Sarcione (1964) พบว่าแฮบโตกลอบบินสร้างขึ้นจากตับ โดยเซลล์ชนิดHepatocyte และมีหน้าที่ซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ได้รับอันตราย

Javid (1965) ศึกษาพบว่าแฮบโตกลอบบินชนิดโมเลกุลใหญ่ จะจับฮีโมกลอบบินน้อยกว่าชนิดโมเลกุลเล็ก โดยเทียบน้ำหนักต่อน้ำหนัก ดังนั้นการหาปริมาณแฮบโตกลอบบินโดยวิธีการจับกับฮีโมกลอบบินจึงให้ผลผิดพลาดได้

Keene และ Jandi (1965)พบว่าแฮบโตกลอบบินสามารถจับกับฮีโมกลอบบินเกิดสารฮีโมกลอบบิน-แฮบโตกลอบบิน อย่างชนิดไม่มีการปล่อย (irreversibly) สารประกอบชนิดนี้จะถูกกำจัดออกจากกระแสโลหิต โดยมี $t_{1/2}$ = 8 นาที

John และ Miller (1967) กล่าวว่าการผลิตแฮบโตกลอบบิน อาจขึ้นอยู่กับอิทธิพลของฮอร์โมนบางชนิด และ prostaglandins

Searcy (1969) พบพันธุกรรมของแฮบโตกลอบบินอีกหนึ่งชนิด คือ Hp O คือไม่มีปริมาณแฮบโตกลอบบินในกระแสโลหิตเลยตั้งแต่เกิด เช่น ในคนนิโกรบางคน

Gilblett (1969) กล่าวว่านอกจากจะพบแฮบโตกลอบบินในกระแสโลหิตแล้ว ยังพบแฮบโตกลอบบินอยู่ในของเหลวในร่างกายบางชนิด เช่นน้ำเหลือง น้ำช่องปอด น้ำไขข้อ น้ำช่องท้อง และน้ำช่องไขสันหลัง

Sutton (1970) ศึกษาว่าแฮบโตกลอบบิน มีหน้าที่จับฮีโมกลอบบินที่หลุดออกมาจากเม็ดเลือดแดงที่แตกออกในกระแสโลหิต เป็นสารประกอบฮีโมกลอบบิน-แฮบโตกลอบบิน สารประกอบ

ชนิดนี้จะถูกทำลายที่ระบบการสร้างและทำลายเม็ดเลือด (recticuloendothelium system)

Mueller, Handschumacher และ Wade (1971) พบว่าปริมาณแฮบโตกลอบบิน เพิ่มขึ้นในคนไข้โรคมะเร็งรังไข่

Coombers, Powlers และ Stjernber (1977) พบว่าปริมาณแฮบโตกลอบบินเพิ่มขึ้นในคนไข้โรคมะเร็งเต้านม

Iwasshita (1986)พบว่าปริมาณแฮบโตกลอบบินเพิ่มขึ้นในคนไข้โรค Hepatitis A

Beckman, Eklund, Frohlander และคณะ (1986) พบว่าปริมาณแฮบโตกลอบบิน เพิ่มขึ้นในคนไข้โรคมะเร็งปอด

Van Rijn และ Sanderlink (1986)พบว่าปริมาณแฮบโตกลอบบินในกระแสโลหิตไม่ได้อยู่ภายใต้อิทธิพลของปริมาณฮีโมกลอบบินหรือแฮบโตกลอบบินที่มีอยู่ในกระแสโลหิต

2.2 <u>วิธีวิเคราะห์ปริมาณแฮบโตกลอบบินที่ใช้ในปัจจุบัน</u>

2.2.1 วัดปริมาณแฮบโตกลอบบิน โดยใช้คุณสมบัติที่แฮบโตกลอบบินจับกับฮีโมกลอบบิน เกิดเป็นสารประกอบ Hb-Hp แล้วทำการวัดปริมาณของสารประกอบดังกล่าว โดยวิธีต่อไปนี้

ก. วัดสีของแถบตะกอนสารประกอบ Hb-Hp ที่ทำปฏิกิริยากับสีย้อม ortho-dianisidine ก่อนทำปฏิกิริยากับสี สารประกอบ Hb-Hp ถูกแยกโดยวิธีต่างๆดังนี้

1. Starch gel eletrophoresis โดยวิธีของ Smithes (1955)
2. Column chromatography โดยวิธีของ Fahey และคณะ(1958)
3. Paper eletrophoresis โดยวิธี Javid และ Horowitz (1960)
4. Polyacrylamide eletrophoresis โดยวิธี Holmes (1967)
5. Two-dimensional immunoelectrophoresis โดยวิธีของ Clarke และ Freeman (1968)

ข. วัดสีของสารประกอบ Hb-Hp ที่ทำปฏิกิริยากับสารเคมี ดังวิธีของ Owen , Better และ Hoban (1962)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.2 วัดปริมาณของแฮบโตกลอบบิน โดยใช้คุณสมบัติทางอิมมูนเคมี แฮบโตกลอบบินเป็นสารแอนติเจนถูกฉีดเข้าในสัตว์ทดลอง เพื่อให้เกิดการสร้างสารแอนติบอดีต่อแฮบโตกลอบบินในตัวสัตว์ทดลอง แล้วมาวัดปริมาณสารประกอบแอนติเจน-แอนติบอดี โดยวิธีดังต่อไปนี้

ก. Radial immunodiffusion สารแอนติเจน(Hp)กับสารแอนติบอดีแพร่กระจายในเจลมาทำปฏิกิริยาเกิดตะกอนสารประกอบแอนติเจน-แอนติบอดี วัดปริมาณตะกอนนี้ด้วยวิธีของ Nyman(1959)

ข. Immunoturbidimetry วัดความเข้มของแสงที่ลดลงเมื่อแสงฉายผ่านตะกอนขุ่นของสารประกอบแอนติเจน-แอนติบอดี ด้วยวิธีของ Ramarks และ Krentzer (1976)

ค. Elisa วัดปริมาณของเอ็นไซม์ที่ถูกยับยั้ง ด้วยวิธีของ Kashyap(1989)

2.3 <u>หลักการของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแฮบโตกลอบบินโดยวิธี Immunoturbidimetry และใช้เครื่อง Turbitimer</u>

2.3.1 หลักการทางอิมมูน-เคมี

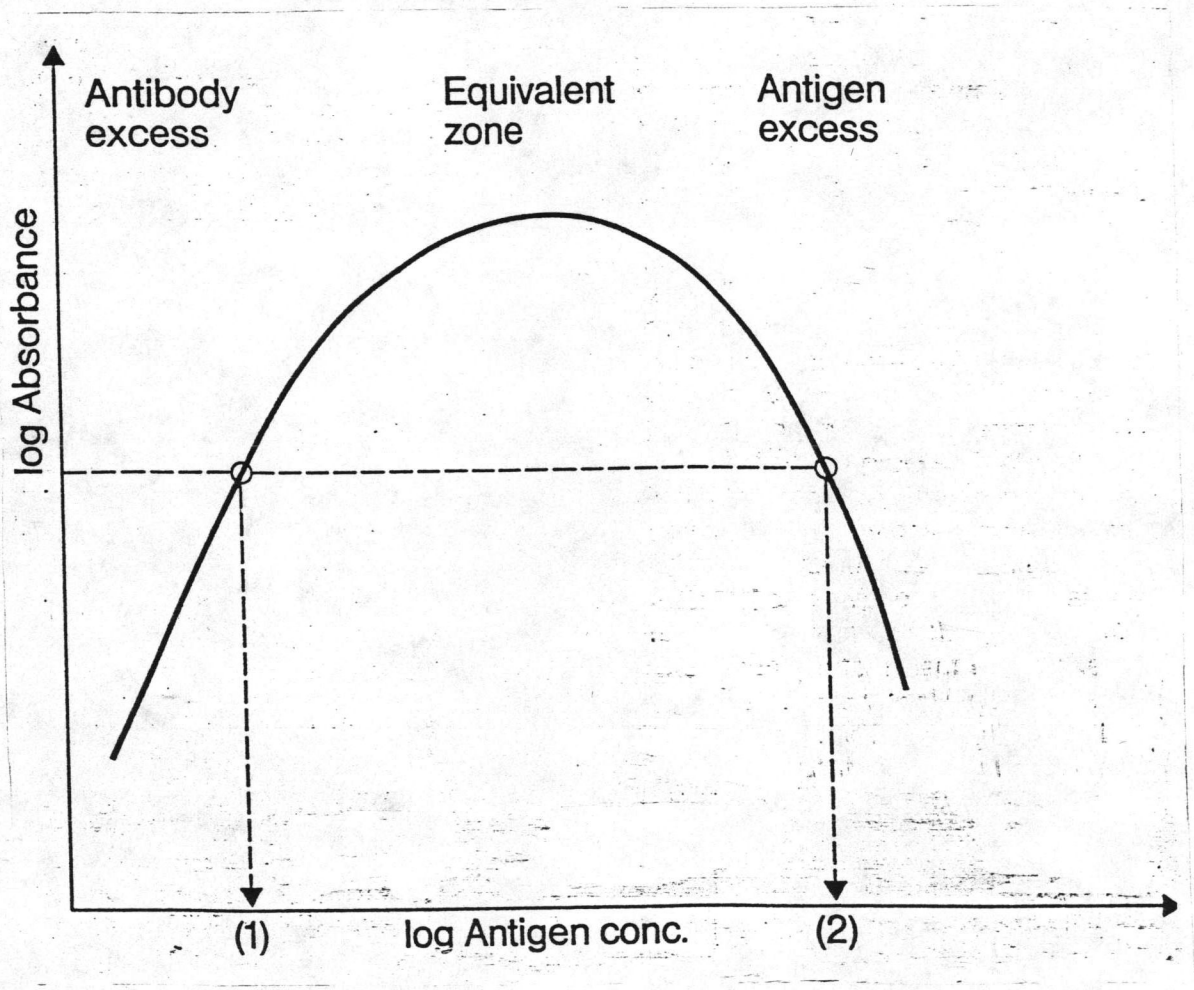
เมื่อโปรตีนหรือไวรัสที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 5,000 เรียกว่าแอนติเจน (Antigen) เข้าในร่างกาย ร่างกายที่รับเอาสารแปลกปลอมเรียกว่า host จะมีความจำได้ จึงกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ให้สร้างแอนติบอดี(Antibody) ต่อแอนติเจนขึ้นมา สารทั้งสองจะทำปฏิกิริยากัน เกิดสารประกอบเชิงซ้อนแอนติเจน-แอนติบอดี จึงใช้กระบวนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนแอนติเจนกับแอนติบอดี ในการหาปริมาณของโปรตีนได้ โดยวัดความขุ่นและการหักเหของแสงที่ฉายผ่านมา เช่น การฉีดโปรตีนชนิดต่างๆของคนเข้าในตัวกระต่าย กระต่ายจะสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนของคน แล้วนำเอาแอนติบอดีเหล่านี้มาใช้หาปริมาณของโปรตีนแต่ละชนิด

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน-แอนติบอดีมีลักษณะดังรูปที่ 2.1 คือเมื่อให้ปริมาณของแอนติบอดีคงที่ ในภาวะที่แอนติเจนมีปริมาณน้อยทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี จะมีปริมาณแอนติบอดีเหลืออยู่มาก เรียกภาวะนี้ว่า แอนติบอดีเหลือเฟือ (Antibody Excess) เกิดสารประกอบแอนติเจน-แอนติบอดีน้อยดังนั้นจึงมีสัญญาณออกมาน้อย

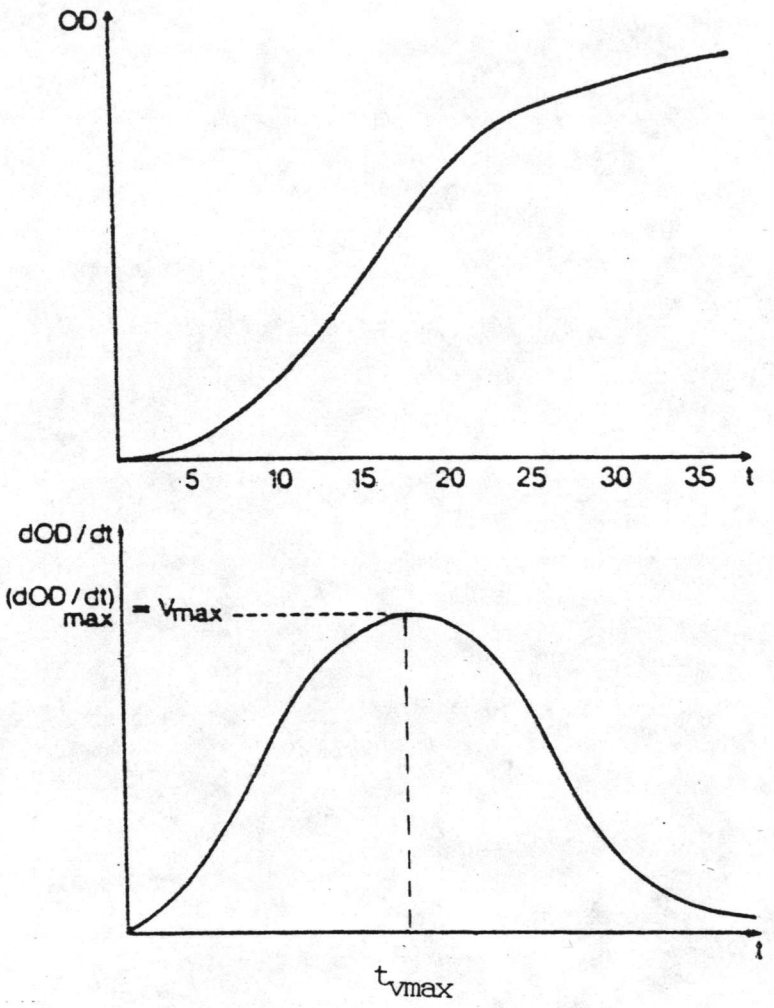
ในภาวะที่มีแอนติเจนมีปริมาณเท่ากับแอนติบอดี จะเกิดสารประกอบแอนติเจน-แอนติบอดีมากที่สุด เรียกภาวะนี้ว่า Equivalent Zone จะให้สัญญาณมากที่สุด

019694

ในภาวะที่มีแอนติเจนมากขึ้นจนปริมาณแอนติบอดีได้ทำปฏิกิริยาจนหมดแล้ว ยังเหลือแต่แอนติเจน เรียกภาวะนี้ว่า แอนติเจนเหลือเฟือ (Antigen Excess) จึงเกิดการแย่งแอนติบอดีขึ้นทำให้ตะกอนของสารประกอบสารประกอบแอนติเจน-แอนติบอดีจะมีขนาดเล็ก และสามารถละลายน้ำได้ จึงเกิดการแย่งแอนติบอดีขึ้น การหักเหของแสงน้อยจะทำให้เกิดสัญญาณน้อย ซึ่งเหมือนกับเมื่อมีปริมาณแอนติเจนน้อย ซึ่งทำให้เกิดความผิดพลาดในการหาปริมาณของโปรตีนได้ จึงใช้พารามิเตอร์ 2 ตัว คือ V_{max} และ t_{vmax} สามารถแก้ไขความผิดพลาดได้ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี

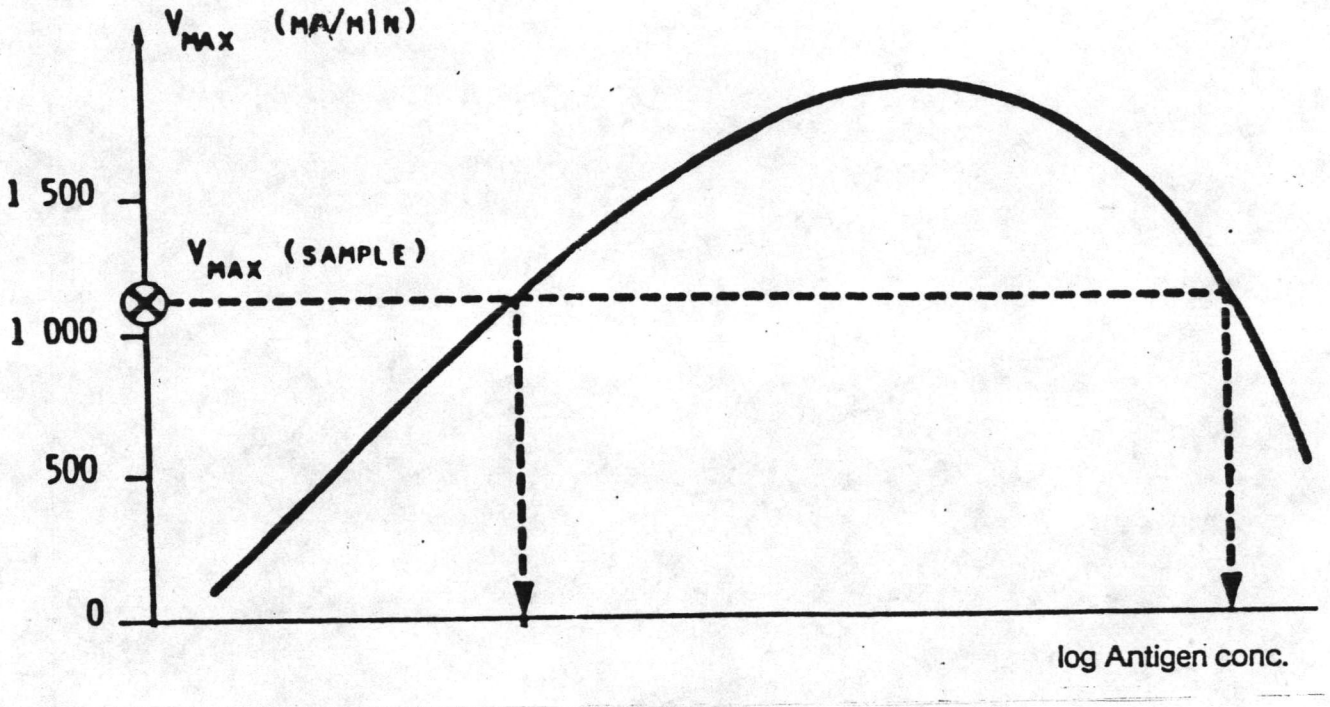


รูปที่ 2.2 แสดงการคำนวณ V_{max} และ t_{vmax}

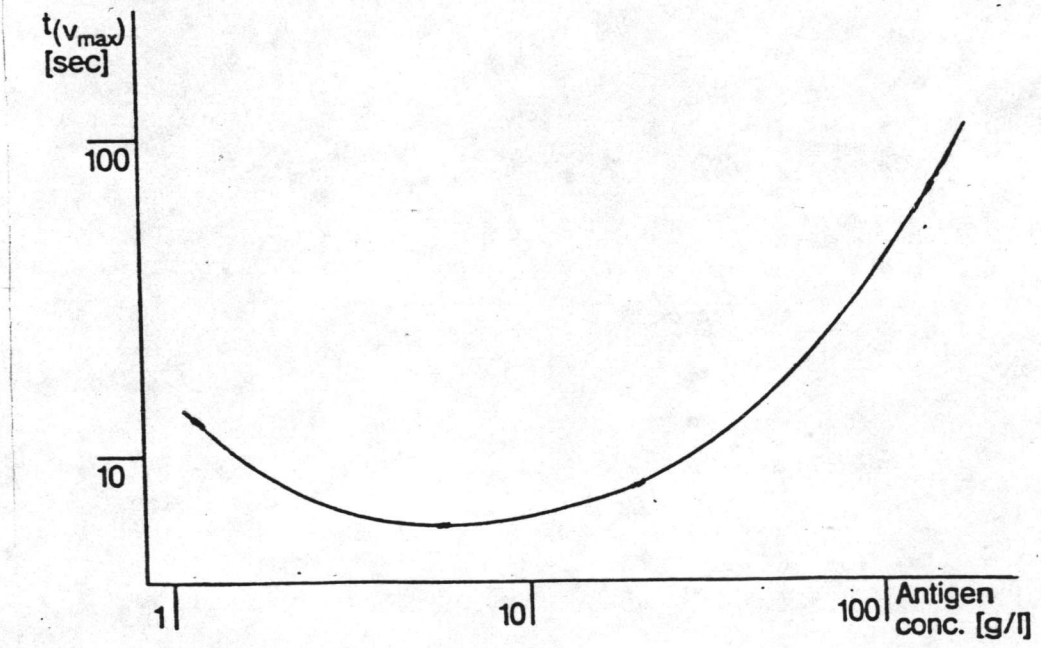
2.3.2 หลักการทางกายภาพ

เป็นวิธีการวัดปริมาณโปรตีนจากความขุ่นที่เกิดจากตะกอนสารประกอบแอนติเจนและแอนติบอดีเมื่อต้นกำเนิดแสงส่องผ่านแผ่นกรองแสง แล้วปล่อยแสงความยาวคลื่น 340 นาโนมิเตอร์ไปยังหลอดทดลองที่มีตะกอนของสารประกอบแอนติเจนและแอนติบอดี ความเข้มของแสงที่ลดลงจะถูกวัดโดยเครื่องวัดแสง (Photodetector) เวลาที่ใช้วัดเพียง 0.1 วินาที สัญญาณแสงจะถูกเปลี่ยนเป็นสัญญาณทางอิเล็กทรอนิกส์ และเปลี่ยนเป็นหน่วยนับวัดโดยเครื่อง processor เครื่องจะคำนวณพารามิเตอร์(parameter) 2 ค่า คือ ความเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (The Maximum Reaction Velocity, V_{max}) ดังรูปที่ 2.3 และเวลาที่ใช้ในความเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา(The Maximum Time, t_{vmax}) ดังรูปที่ 2.4 เก็บไว้ในหน่วยความจำก่อน ปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนจะแปรผันตามค่าคู่ของ V_{max} และ t_{vmax} เมื่อปริมาณแอนติบอดีคงที่ ดัง

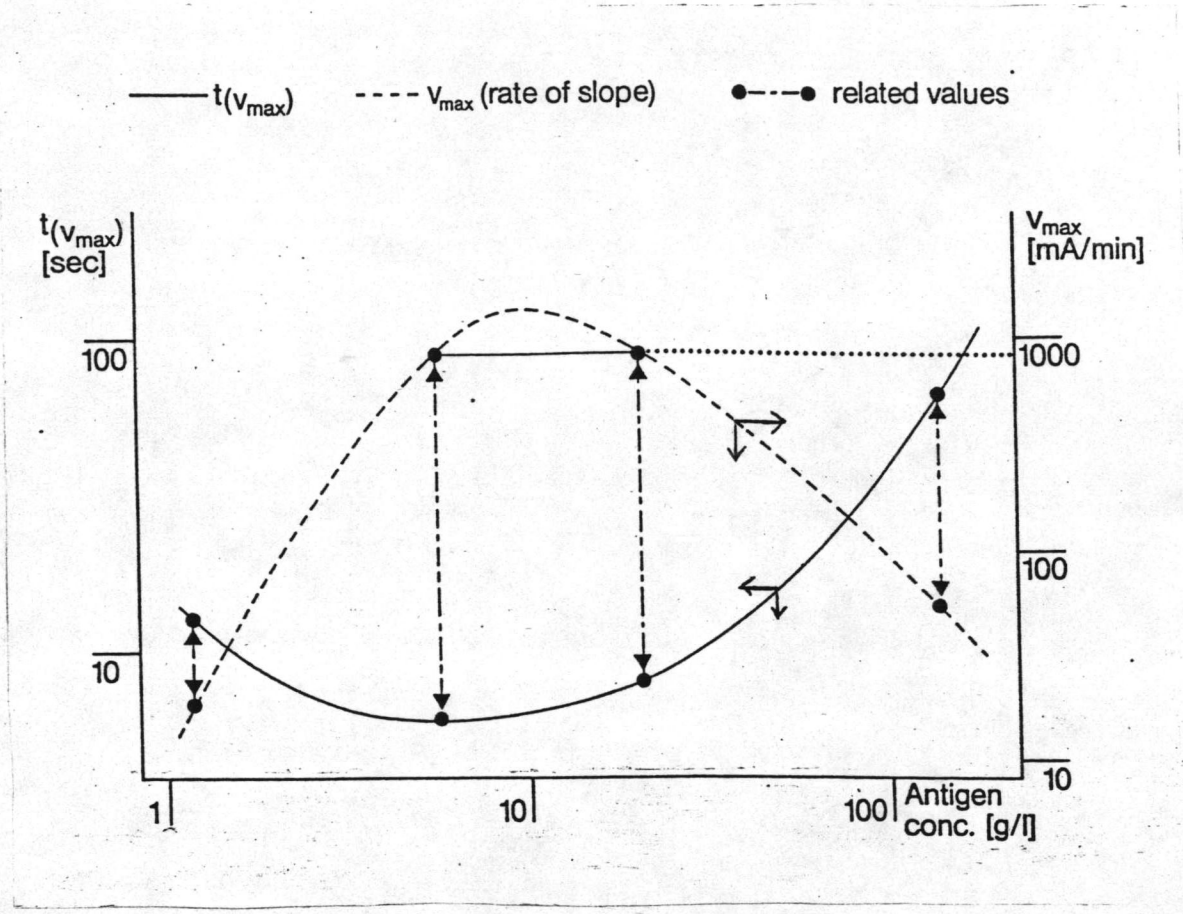
นั้นจึงหาปริมาณของแฮบโตกลอบบินเทียบกับสารมาตราฐานได้ ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.3 แสดงพารามิเตอร์ V_{max} กับความเข้มข้น



รูปที่ 2.4 แสดงพารามิเตอร์ t_{vmax} กับความเข้มข้น



รูปที่ 2.5 แสดงพารามิเตอร์คู่ V_{max}, t_{vmax} กับความเข้มข้น

2.4 วิธีการทดสอบคุณสมบัติของสาร Free Radical Scavenger

2.4.1 การวัดปริมาณผลของปฏิกิริยา ไลปิดเพอร์ออกซิเดชันที่เกิดขึ้น โดยวิธีของ Dahle,Hill และ Holman (1962) Asakawa และ Mitsushita (1979) วิธีดังกล่าวใช้ไขมันชนิดไม่อิ่มตัวทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ ที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมี เกิดไลปิดเพอร์ออกไซด์ขึ้น เมื่อพบกับตัวทดสอบคือสาร 2-Thiobarbituric acid (TBA) และ 20 เปอร์เซนต์ Trichloroacetic acid ได้สาร Malonaldehyde (MDA) เกิดสีแดงวัด absorbance ที่ 535 นาโนมิเตอร์

2.4.2 การวัดปริมาณผลของน้ำตาลออกซิเดชันที่เกิดขึ้น โดยวิธีของ Gutteridge และ Wilkins (1983) วิธีนี้ใช้น้ำตาลไรโบสทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมี ได้สาร Diethydithiocarbamate (DDC) เมื่อเติมสาร Thiobarbituric acid และ Glacial acetic acid โดยวัด absorbance ที่ 532 นาโนมิเตอร์

วิธีทั้งสองมี sensitivity และ reproducibility สูง แต่ specificity ต่ำ เพราะถ้ามีการปนเปื้อนของสารเริ่มต้น เช่น มีโปรตีนหรือสารอื่นจะให้ผลผิดได้

2.4.3 การวัดปริมาณผลของโปรตีนออกซิเดชัน ใช้โปรตีนขนาดเล็กเช่น อัลบูมิน, กลอบบูลิน หรือเอ็มไซม์ขนาดเล็ก ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมี จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนหลายชนิดเรียกว่า Modification ซึ่งสามารถวัดได้หลายวิธี ดังนี้

ก. วัดปริมาณ NH_3 โดยวิธีของ Robinson, Irving และ Mccrea (1973)

ข. วัดปริมาณฟลูออเรสเซนต์ที่ลดลง โดยวิธี Gutteridge และ Wilkins (1983)

ค. วัดการสูญเสียคุณสมบัติของเอ็มไซม์ โดยวิธี Eichler และ คณะ (1987)

ง . วัดการรวมตัวกันของโปรตีน โดยวิธี Marx และ Chevion (1985)

จ. วัดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน เช่น วัดปริมาณ Thiol group โดยวิธีของWickens และคณะ (1983) โดยวัดกรดอะมิโนด้วยเครื่อง Amino acid analyzer และ HPLC โดยวิธี Lunec และคณะ (1985)

2.4.4 การวัดผลของดีเอนเอออกซิเดชัน โดยใช้เซลล์เดียวของบักเตรี ชนิด Escherichia coli ด้วงวิธีของ Billen (1984) หรือสาย DNA ซึ่งแยกมาจาก bacteriophage ϕ X174 ด้วงวิธีของ Lafleur และ Lorman (1986) เมื่อทำปฏิกิริยากับ free radical ที่เกิดจากสารก้มมันตรังสี แล้ววัดปริมาณของ DNA lingase activity ซึ่งแสดงถึงการแตกหักของสาย DNA หรือนับจำนวนเซลที่เกิดขึ้นหลังจากเอา bacteriophage

ϕ X174 ไป transfected ยัง E.coli spheroplasts

2.3.5 การวัดปริมาณของอนุมูลอิสระ ที่เกิดขึ้นโดยวัด electron spin resonance spectrum ดังวิธีของ Kuwabara และคณะ (1982), Hashiba (1989) ที่ใช้ DNA , ไขมัน หรือน้ำตาล กับตัวทดสอบทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ ที่เกิดจากสารก่มมันตรังสีแล้ววัดด้วยเครื่อง Electron spin resonance spectroscopy วิธีนี้ให้ผลการทดสอบดีที่สุด

2.5 <u>หลักการวิเคราะห์ปริมาณฟลูออเรสเซนต์ที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติ Free Radical Scavenger</u>

เมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ ที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมี ดังสมการที่ 2.1,2.2, 2.3 และ 2.4 จะเกิด Modificationหลายชนิดหน่วยย่อยของโปรตีนคือกรดอะมิโนโดยเฉพาะชนิด Aromatic เมื่อดูดซับเอาพลังงานจากอนุมูลอิสระ โมเลกุลจะมีพลังงานสูงขึ้นจากสภาวะเดิม ซึ่งจะไม่เสถียร โมเลกุลจึงพยายามที่จะกำจัดพลังงานที่ดูดซับเข้ามา โดยจะปล่อยพลังงานออกมาในรูปของคลื่นแสงฟลูออเรสเซนต์ทันที คลื่นแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ปล่อยออกมา จะมีความยาวของคลื่นแสงยาวกว่าคลื่นพลังงานที่ดูดซับเข้าไป คุณลักษณะสเปกตรัม(Characteristic spectral) ของการดูดซับคลื่นแสงของกรดอะมิโนเรียกว่า excitation spectral และของการปล่อยคลื่นแสงฟลูออเรสเซนต์ เรียกว่า emission spectral เป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของกรดอะมิโนชนิด aromatic เท่านั้น ดังเช่น โปรตีนโมเลกุลเล็กอย่างอัลบูมิน จะมีกรดอะมิโนชนิด aromatic เพียงสามชนิดคือ ทริบโตแฟน(Tryptophan), ฟีนิลลาลานีน(Phynyllalanine) และไธโรซีน(Tyrosine) จะมี excitation spectral และ emission spectral ตามลำดับดังนี้ 287/348, 260/282 และ 275/303

$$Cu^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Cu^{+} + HO_2\cdot + H^{+} \qquad \text{.....(2.1)}$$

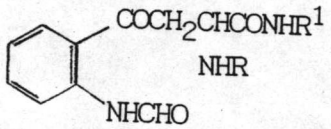
$$2HO_2\cdot \longrightarrow 2O_2^{-}\cdot + 2H^{+} \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad \text{.....(2.2)}$$

$$Cu^{2+} + O_2^{-}\cdot \longrightarrow Cu^{+} + O_2 \qquad \text{.....(2.3)}$$

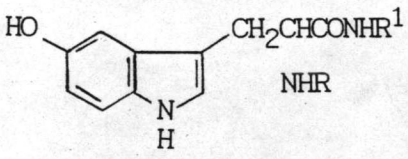
$$Cu^{+} + H_2O_2 \longrightarrow Cu^{2+} + OH^{-} + OH\cdot$$

.....(2.4)

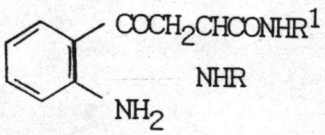
เมื่อกรดอะมิโนชนิดทริบโตแฟน ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ จะเกิดปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ คือ Hydroxylation,Rearrangement และ Destruction เกิดเป็นสารประกอบ N-Formylkyurenine ดังรูปที่ 2.6 ซึ่งมีคุณสมบัติเฉพาะตัวคือ ในสารละลายที่เป็นกลาง มี native fluorescence ของตัวเอง โดยมี excitation wavelength ที่ 267-293 นาโนมิเตอร์ และมี emission wavelength ที่ 337-347 นาโนมิเตอร์ มี blue fluorescense โดยมี excitation wavelength ที่ 360 นาโนมิเตอร์ และมี emission wavelength ที่ 450 นาโนมิเตอร์ ในสารละลายที่เป็นด่างจะมี alkaline fluorescence เฉพาะ โดยมี excitation wavelength ที่ 315 นาโนมิเตอร์และมี emission wavelength ที่ 400 นาโนมิเตอร์ ดังรูปที่ 2.7



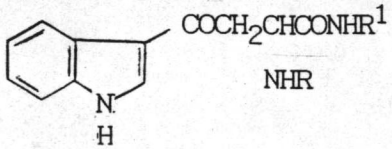
N-Formyl-L-Kynurenine



5-Hydroxy Tryptophan



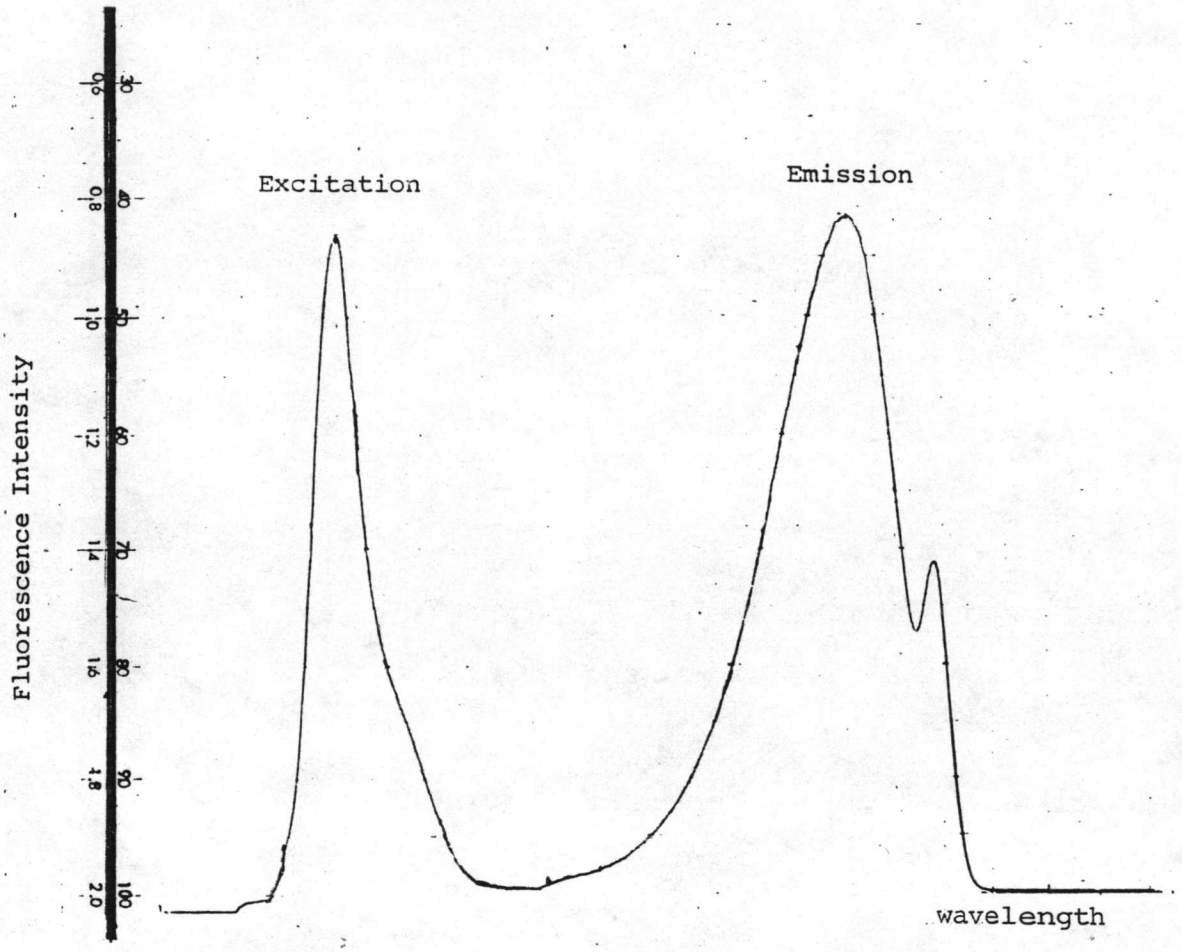
Kynurenine



Tryptophan

รูปที่ 2.6 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของกรดอะมิโน Tryptophan และ N-Formylkyurenine

NHR และ ($CONHR^1$) แทนตำแหน่งการจับของสายเปปทายด์



รูปที่ 2.7 แสดง excitation spectrum และ emission spectrum

2.6 <u>การเก็บรวบรวมตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแฮบโตกลอบบิน</u>

2.6.1 เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูก ที่มารักษาโดยรับการฉายรังสีภายนอกจากโคบอลต์-60 โดยเครื่องEldorado-78 ณ ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ป่วยจะได้รับการฉายรังสีภายนอกเป็นปริมาณรังสีรวมประมาณ 5,000 แรด โดยแบ่งการฉายรังสีวันละ 200 แรด สัปดาห์ละ 5 วัน เว้นวันเสาร์ และวันอาทิตย์ ติดต่อกันไปโดยไม่มีวันหยุด การเก็บตัวอย่างเลือดทำตามดังต่อไปนี้

ก. เจาะเลือดคนไข้หนึ่งครั้งก่อนที่จะเริ่มการฉายรังสี ทุกคนนับวันเป็น Day 0 เป็นจำนวน 34 คน

ข. เจาะเลือดคนไข้ขณะ ได้รับการฉายรังสี ตามวันที่นับได้ในช่วงวันต่อไปนี้ คือ กลุ่มที่1 Day4, Day9, Day14, Day19 และ Day24 กลุ่มที่2 Day6, Day11, Day16 และ Day21 กลุ่มที่3 Day7, Day12, Day17 และ Day22 กลุ่มที่ 4 Day8, Day13, Day 18 และ Day23 (การนับวันแรกที่คนไข้ที่ได้รับการฉายรังสีเป็น Day1 และวันถัดมาของการฉายรังสีเป็น Day2, Day3,... ไปเรื่อยๆโดยไม่นับรวมวันเสาร์และวันอาทิตย์ของทุกสัปดาห์) เป็นจำนวน 25 คน

ค. เจาะเลือดคนไข้หลังจากที่ได้รับการฉายรังสีภายนอกและภายในปริมาณรังสีรวม 12,500 แรด ในระยะเวลา 1,2,3,4,5,6 เดือนตามลำดับ เป็นจำนวน 9 คน

ง. เจาะเลือดคนปกติเพศหญิงในวันที่นับ Day0,7,12,17,22 และ27 เป็นจำนวน 6 คน

จ. เจาะเลือดคนปกติเพศหญิงที่มาบริจาคโลหิตให้กับสภากาชาดไทย

ฉ. เจาะเลือดคนไข้ 3 วันติดต่อกัน ก่อนที่จะเริ่มการฉายรังสี เป็นจำนวน 3 คน

2.6.2 วิธีการเจาะเลือดและแยกซีรัมสารตัวอย่าง

โดยเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณรอยพับแขน ในช่วงเวลา9.00-12.00 น. เลือดที่เจาะได้จะตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 4 ชั่วโมง จึงนำไปปั่นแยกซีรัมและเม็ดเลือดด้วยเครื่องปั่น โดยใช้ความเร็วประมาณ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ดูดแยกซีรัมใส่หลอดแก้วที่สะอาด แล้วเก็บหลอดซีรัมไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียสทันที