หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

สัตว์ทดลอง อุปกรณ์ สารเคมีและการทดลอง

สัตว์ทดลอง

ใช้ลิงหางยาว (Macaca fascicularis) เพศเมียจากหน่วยวิจัยไพรเมต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 12 ตัว อายุระหว่าง 3.5 - 10 ปี มีน้ำหนักตัว 3.0 - 4.5 กิโลกรัม ทุกตัวมีรอบประจำเดือนอย่างสม่ำเสมอและแน่นอน (28 - 35 วัน) มาแล้วอย่างน้อย 3 รอบประจำเดือน และทำการศึกษาในระหว่างเดือนเมษายนถึงเดือนสิงหาคม

ลิงเหล่านี้ถูกเลี้ยงไว้ในกรงเดี่ยวทำด้วยเหล็กอาบสารกันสนิม มีขนาดกว้าง 24 นิ้ว ยาว 28 นิ้ว สูง 34 นิ้ว อยู่ภายในเรือนเลี้ยงที่มีอากาศถ่ายเทสะดวกและได้รับแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 6.00 น. ถึง 18.00 น. อาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นอาหารสำเร็จรูปของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ เสริมด้วยผักสดและผลไม้ ได้แก่ แตงกวา สับปะรด กล้วย และมันเทศ โดยได้รับอาหารวันละ 2 มื้อ เวลา 8.00 น. - 9.00 น. และ 15.00 - 16.00 น.

อุปกรณ์

1.	β-Liquid Scintillation Counter	: Model BPL, Packard Instrument Co., U.S.A.
2.	Dri-Block Heater	: Model DB-3, Tecam Laboratory and Industrial Equipment, U.S.A.
3.	Magnetic Stirror	: S-18520, Thermolyne Corporation, U.S.A.
4.	Micropipette	: Pipetteman M81 Gilson, France; Eppendorf 3130, Germany
5.	Mixer	: M 16715, Thermolyne Corporation, U.S.A.

6. pH-meter : 5985, Cole Parmer Instrument Company, U.S.A.
7. Refrigerated Centrifuge : Model PRJ, International Equipment Company, U.S.A.
8. Spectrophotometer : Digispec 61388, Helena Laboratories

<u>สารเคมี</u>

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็น A.R. grade ทั้งหมด

1. Charcoal Reagent : WHO RIA Reagent Programme, Switzerland
2. Creatinine : Deutche Ware, Germany
3. Dextran : WHO RIA Reagent Programme, Switzerland
4. Diethyl ether : E.Merck, Germany
5. Dioxane : Millinkrodt Inc., U.S.A.
6. 2,5-Diphenyloxazole (PPO) : E.Merck, Germany
7. Disodium Hydrogen Phosphate (Na_2HPO_4, MW. 142) : E.Merck, Germany
8. Ethanol (absolute) : E.Merck, Germany
9. Gelatin : Difco Laboratories, U.S.A.
10. Hydrochloric Acid : BDH Chemicals Ltd., England
11. Liquiflor : New England Nuclear, U.S.A.
12. Picric Acid : J.T. Baker Chemical Co., U.S.A.
13. Sodium Chloride (NaCl, MW. 58.44) : E.Merck, Germany
14. Sodium Dihydrogen Phosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$ MW. 137.99) : E.Merck, Germany
15. Sodium Hydroxide (NaOH) : BDH Chemicals Ltd., England
16. Toluene : E.Merck, Germany

17. Thimerosal (Merthiolate) : Sigma Chemicals Company, U.S.A.

18. Triton X-100 : New England Nuclear, U.S.A.

สารโปรเจสติน

เลโวนอร์เจสเตรล และสารไอซีไอได้รับจากองค์การอนามัยโลก เจนีวา สวิส-เซอร์แลนด์ ตาม Project No.84047 (Effect of Nonsteroidal Progestin Developed by ICI on Lipoprotein Metabolism in Cynomolgus Monkeys)

ฮอร์โมนมาตรฐานและแอนติบอดี

ฮอร์โมนมาตรฐานของ E_1, E_1-3-G และ Pd-3α-G และแอนติบอดีของ E_1, E_1-3-G และ Pd-3α-G ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr.Fortune Kohen สถาบันวิทยาศาสตร์ไวซ์แมน ประเทศอิสราเอล

ฮอร์โมนติดสลากรังสี

(2, 4, 6, 7 - ^{3}H) - E_1 และ 20α- Hydroxy [1, 2, 6, 7 - ^{3}H] - pregn - 4 - ene- 3-one ซื้อจากบริษัทอะเมอแชม ประเทศอังกฤษ

วิธีทดลอง

1. เก็บตัวอย่างปัสสาวะของลิงทุกตัวก่อนให้ยาเป็นเวลา 1 รอบประจำเดือน โดยเปลี่ยนถาดรองรับเศษอาหารที่ใต้กรงในตอนเย็นเวลาประมาณ 17.00 น. ซึ่งเป็นเวลาที่ลิงได้รับอาหารเรียบร้อยแล้ว และเก็บปัสสาวะในถาดนี้ตอนเช้าก่อนให้อาหาร เวลาประมาณ 7.00 - 8.00 น. โดยเก็บวันเว้นวัน (ยกเว้นวันที่มีประจำเดือน) นำปัสสาวะที่เก็บนี้ไปปั่นที่ 1,500 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสของปัสสาวะไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการตรวจหาปริมาณฮอร์โมนและครีเอตินีน

2. การเตรียมยา

- เลโวนอร์เจสเตรล 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เตรียมโดยละลาย เลโวนอร์เจสเตรล 25 มิลลิกรัม ในน้ำมันงา 100 มิลลิลิตร

- สารไอซีไอ 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมโดยละลายสารนี้ 125 มิลลิกรัม ในน้ำมันงา 50 มิลลิลิตร
- สารไอซีไอ 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมโดยละลายสารนี้ 12.5 มิลลิกรัม ในน้ำมันงา 50 มิลลิลิตร

3. การให้ยา หลังจากเก็บปัสสาวะครบ 1 รอบประจำเดือนแล้ว แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ตัว

กลุ่มที่ 1 ได้รับเลโวนอร์เจสเตรล 25 ไมโครกรัม/วัน โดยฉีด 0.05 มิลลิลิตรของเลโวนอร์เจสเตรล 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) วันละ 2 ครั้ง เวลา 7.00 น. และ 17.00 น. ติดต่อกันเป็นเวลา 28 วัน โดยเริ่มฉีดตั้งแต่วันแรกของการมีประจำเดือนในรอบประจำเดือนนั้น

กลุ่มที่ 2 ได้รับสารไอซีไอ 1 มิลลิกรัม/วัน โดยฉีด 0.2 มิลลิลิตร ของสารนี้ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนังตามวันและเวลาเดียวกับกลุ่มที่ 1

กลุ่มที่ 3 ได้รับสารไอซีไอ 0.1 มิลลิกรัม/วัน โดยฉีด 0.2 มิลลิลิตร ของสารนี้ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนังตามวันและเวลาเดียวกับ 2 กลุ่มแรก

4. เก็บปัสสาวะของสัตว์ทดลองในระหว่างการให้ยาตามวัน, เวลา และวิธีการเดียวกับข้อ 1

5. นำปัสสาวะที่เก็บไว้มาตรวจหาปริมาณ E_1, E_1-3-G และ Pd-3α-G โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (RIA) และปริมาณครีเอตินีนโดยใช้ Jaffe' reaction

การวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนโดยวิธี RIA

สารละลายที่ใช้และวิธีเตรียม

1. Assay buffer

ละลาย Gelatin 1 กรัม ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร อุ่นให้ Gelatin ละลายจนหมด ทิ้งไว้จนเย็นแล้วจึงเติมสารเคมีอื่น ๆ ดังนี้

Sodium dihydrogen phosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$)	3.1 กรัม
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	11.6 กรัม
Sodium Chloride (NaCl)	8.8 กรัม
Thimerosal	0.1 กรัม

เมื่อละลายเข้ากันดีแล้ว นำไปปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.2-7.4 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการใช้งาน 1 เดือน

2. Charcoal suspension

ละลาย dextran 0.0625 กรัม ใน assay buffer 100 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม charcoal reagent 0.625 กรัม เขย่าอย่างแรงนาน 30 วินาที เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการใช้งาน 1 เดือน เมื่อจะใช้ต้องนำไปกวนที่ 4 องศาเซลเซียสตลอดเวลาที่ใช้

3. Counting solution

3.1 สูตรที่ 1 ใช้ในการตรวจหาปริมาณฮอร์โมน E_1 อิสระ และ E_1 ทั้งหมด

ตวง Toluene	3,000 มิลลิลิตร
Liquiflor	128 มิลลิลิตร
dioxane	600 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชา

3.2 สูตรที่ 2 ใช้ในการหาปริมาณฮอร์โมน E_1-3-G และ Pd-3α-G

ละลาย 2,5-diphenyloxazole (PPO) 22.5 กรัม ใน Toluene 3,000 มิลลิลิตร แล้วเติม Triton X-100 1,500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชา

4. สารละลายฮอร์โมนมาตรฐาน

4.1 สารละลาย E_1 มาตรฐาน จากสารละลายตั้งต้น 20 นาโนกรัม/มิลลิลิตร นำมาทำเจือจางลำดับส่วนโดยใช้ assay buffer จนได้สารละลาย E_1 มาตรฐาน 8 ความเข้มข้นตั้งแต่ 7.81 - 1,000.00 พิโคกรัม/ 0.5 มิลลิลิตร โดยมีขั้นตอนดังตาราง ที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการเตรียมสารละลาย E_1 มาตรฐาน

ลำดับที่	จากสารละลาย E_1 มาตรฐาน		assay buffer (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นที่ได้ พิโคกรัม /0.5 มิลลิลิตร
	ความเข้มข้น	ปริมาตร(มิลลิลิตร)		
1	20 นาโนกรัม/มล.	0.5	4.5	1,000.00
2	ลำดับที่ 1	2.0	2.0	500.00
3	ลำดับที่ 2	2.0	2.0	250.00
4	ลำดับที่ 3	2.0	2.0	125.00
5	ลำดับที่ 4	2.0	2.0	62.50
6	ลำดับที่ 5	2.0	2.0	31.25
7	ลำดับที่ 6	2.0	2.0	15.62
8	ลำดับที่ 7	2.0	2.0	7.81

4.2 สารละลาย E_1-3-G มาตรฐาน จากสารละลายตั้งต้น 80 นาโนกรัม/มิลลิลิตร นำมา 0.5 มิลลิลิตร เจือจางด้วย assay buffer 4.5 มิลลิลิตร จะได้ E_1-3-G มาตรฐานความเข้มข้นแรกที่ 4,000.00 พิโคกรัม/0.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำเจือจางลำดับส่วนอีก 4 ลำดับส่วน จะได้ E_1-3-G มาตรฐาน 5 ความเข้มข้น โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 250 พิโคกรัม/ 0.5 มิลลิลิตร

4.3 สารละลาย Pd-3α-G มาตรฐาน จากสารละลายตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร นำมา 0.5 มิลลิลิตร เติม assay buffer 4.5 มิลลิลิตร จะได้ Pd-3α-G มาตรฐาน ความเข้มข้นแรกที่ 5,000 พิโคกรัม/0.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำเจือจางลำดับส่วนอีก 5 ลำดับ จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 156.25 พิโคกรัม/0.5 มิลลิลิตร

5. สารละลายฮอร์โมนติดสลากรังสี

5.1 (2,4,6,7-^{3}H) - E_1 จากสารละลายตั้งต้นที่มีความแรง 10 ไมโครคูรี/มิลลิลิตร ซึ่งละลายในเบนซีน : เอธานอล ในอัตราส่วน 9:1 นำมาเจือจางเป็นสารละลายสำหรับใช้งานที่มีความแรง 100 นาโนคูรี/มิลลิลิตร โดยนำสารละลายตั้งต้นมา 1 ส่วน เป่าให้แห้งด้วย compressed air แล้วเติม assay buffer 100 ส่วน เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

5.2 20α-Hydroxy -(1,2,6,7 -^{3}H) - pregn - 4 - ene - 3 -one จากสารละลายตั้งต้น 5 ไมโครคูรี/มิลลิลิตร ในเบนซีน:เอธานอล อัตราส่วน 9:1 นำมาเจือจางให้ได้ความแรงที่จะใช้งาน เท่ากับ 100 นาโนคูรี/มิลลิลิตร โดยนำสารละลายตั้งต้นมา 1 ส่วน เป่าให้แห้ง แล้วเติม assay buffer 50 ส่วน เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

6. สารละลายแอนติบอดี

6.1 สารละลายแอนติบอดีของ E_1 จากสารละลายตั้งต้นซึ่งมีความเข้มข้น 1:2 (แอนติบอดี 1 มิลลิลิตร และ 1% โซเดียมเอไซด์ 1 มิลลิลิตร) นำมาเตรียมให้ได้ความเข้มข้นที่จะใช้งาน คือ 1:5000 โดยนำสารละลายตั้งต้นมา 1 ส่วน เติม assay buffer 2,500 ส่วน

6.2 สารละลายแอนติบอดีของ E_1-3-G จากสารละลายตั้งต้น 1:2 เตรียมให้เป็นความเข้มข้น 1:5,000 โดยนำสารละลายตั้งต้นมา 1 ส่วน เติม assay buffer 2,500 ส่วน

6.3 สารละลายแอนติบอดีของ Pd-3α-G จากสารละลายตั้งต้น 1:2 เตรียมให้เป็นความเข้มข้น 1:4000 โดยนำสารละลายตั้งต้นมา 1 ส่วน เติม assay buffer 2,000 ส่วน

012988

การตรวจหาปริมาณฮอร์โมน E_1 อิสระ โดยวิธี RIA

การตรวจหาปริมาณ E_1 อิสระ ในปัสสาวะโดยวิธี RIA ดัดแปลงจากวิธีของ WHO (1981) เพื่อความเหมาะสม โดยมีวิธีการดังนี้

นำตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บไว้มาแบ่งใส่หลอดทดลองตัวอย่างละ 3 หลอด (triplicate aliquote) หลอดละ 0.25 มิลลิลิตร สกัดด้วยไดเอธิลอีเธอร์ 5 มิลลิลิตร นาน 1 นาที โดยใช้เครื่องวอร์เทกซ์ สเตอรอยด์ฮอร์โมนจะอยู่ในชั้นของไดเอธิลอีเธอร์ จากนั้นแยกชั้นของปัสสาวะออกจากชั้นของไดเอธิลอีเธอร์โดยนำหลอดทดลองไปแช่ในกระบะซึ่งมี dry ice และ 95% เอธานอล รินส่วนของไดเอธิลอีเธอร์ลงในหลอดทดลองอีกชุดหนึ่ง นำไปทำให้แห้งด้วย Dri block heater ที่อุณหภูมิ 45 - 50 องศาเซลเซียส ซึ่งไดเอธิลอีเธอร์จะระเหยหมดไปเหลือสเตอรอยด์ฮอร์โมนติดอยู่ข้างหลอดทดลอง เติม assay buffer หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เพื่อละลายเอาสเตอรอยด์ฮอร์โมนที่ติดอยู่ข้างหลอดออกมา

นำสารละลาย E_1 มาตรฐานที่เตรียมไว้ทั้ง 8 ความเข้มข้น มาแบ่งใส่หลอดทดลองความเข้มข้นละ 3 หลอด หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

เติมสารละลาย E_1 ติดสลากรังสี และสารละลายแอนติบอดีของ E_1 ทุกหลอด ทั้งที่บรรจุE_1 มาตรฐานและที่สกัดได้จากตัวอย่างปัสสาวะ อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง

จากนั้นเติม charcoal suspension 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วนำไปปั่นแยกผงถ่านออกที่ 2,500 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทส่วนใสที่มี bound form ของแอนติบอดีกับฮอร์โมนติดสลากรังสีลงใน counting vial แล้วเติม counting solution สูตรที่ 1 ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วเขย่าให้เข้ากัน นำไปตรวจวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง β-Liquid Scintillation Counter เป็นเวลา 5 นาทีต่อ 1 vial

ตารางที่ 3 แสดงการตรวจหาปริมาณ E_1 อิสระโดยวิธี RIA

หลอดทดลอง	assay buffer	tracer	antibody		Charcoal suspension
TC	0.6 ml	0.1 ml	-	ผสมทิ้งไว้ที่ 4 °c 16 - 24 ชั่วโมง	-
NSB	0.6 ml	0.1 ml	-		0.2 ml
TB_o	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml		0.2 ml
สารละลายมาตรฐาน หรือสารละลายตัวอย่าง	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml		0.2 ml

การคำนวณและการอ่านค่าฮอร์โมน

นำค่าปริมาณรังสีที่วัดได้ (count per minute; cpm) ของแต่ละตัวอย่างมาหาค่าเฉลี่ย แล้วลบออกด้วยค่าเฉลี่ยของ NSB ทุกตัวอย่างยกเว้น TC

TB_o หรือ maximum binding คำนวณได้จาก

$$\frac{(\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ } TB_o - \text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ NSB})}{\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ TC}} \times 100\%$$

ซึ่งในการตรวจวัด E_1 อิสระนี้มีค่า % TB_o = 50%

เปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยว (% bound)ของสารละลายตัวอย่างหรือของฮอร์โมนมาตรฐาน คำนวณได้จาก

$$\frac{\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของสารละลายตัวอย่าง} - \text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ NSB}}{\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ } TB_o - \text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ NSB}} \times 100\%$$

นำค่าเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวของ E_1 มาตรฐานทั้ง 8 ความเข้มข้น มาเขียนกราฟมาตรฐานลงบนกระดาษเซมิลอกาลิธึม ระหว่างความเข้มข้นกับเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวของ E_1 มาตรฐาน แต่ละความเข้มข้นนั้น แล้วอ่านค่าปริมาณ E_1 อิสระในแต่ละตัวอย่างปัสสาวะ โดยนำค่าเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวของแต่ละตัวอย่างมาอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานที่ทำไว้ จะได้ปริมาณของ E_1 อิสระออกมามีหน่วยเป็น พิโคกรัม/หลอด คำนวณให้มีหน่วยเป็นนาโนกรัม/มิลลิลิตร

สมมุติอ่านค่า E_1 อิสระ จากกราฟมาตรฐานได้ x พิโคกรัม/หลอด เนื่องจากในการตรวจวัดใช้ปริมาตรของตัวอย่างปัสสาวะในแต่ละหลอดเท่ากับ 0.25 มิลลิลิตร ดังนั้นจะได้ปริมาณฮอร์โมนเป็น 4x พิโคกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเท่ากับ $4x \times 10^{-3}$ นาโนกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับปริมาณของครีเอตินีนในตัวอย่างปัสสาวะเดียวกันนี้ โดยสมมุติให้ตัวอย่างปัสสาวะนี้ 1 มิลลิลิตรมีครีเอตินีน y มิลลิกรัม จากนี้คำนวณปริมาณฮอร์โมนให้มีหน่วยเป็น นาโนกรัม/มิลลิกรัม ของครีเอตินีน โดยการเทียบบัญญัติไตรยางค์

ตัวอย่างปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร มีครีเอตินีน y มิลลิกรัม มี E_1 อิสระ $4x \times 10^{-3}$ นาโนกรัม/มิลลิลิตร

" 1 " " 1 " " $\frac{4x \times 10^{-3}}{y}$ $\frac{\text{นาโนกรัม/มิลลิลิตร}}{\text{มิลลิกรัม/มิลลิลิตร}}$

จะได้ปริมาณของ E_1 อิสระเท่ากับ $\frac{4x}{y} \times 10^{-3}$ นาโนกรัม/มิลลิกรัมของครีเอตินีน

ดังนั้นใช้แฟคเตอร์ 4×10^{-3} เป็นตัวคูณปริมาณ E_1 อิสระที่หาได้ในแต่ละหลอด ซึ่งจะมีหน่วยเป็น นาโนกรัม/มิลลิลิตรของปัสสาวะ แล้วหารด้วยปริมาณของครีเอตินีนในตัวอย่างปัสสาวะเดียวกันนั้น ซึ่งมีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตรของปัสสาวะ ก็จะได้ปริมาณของ E_1 อิสระอยู่ในหน่วย นาโนกรัม/มิลลิกรัมของครีเอตินีน

<u>การตรวจหาปริมาณ E_1 ทั้งหมด โดยวิธี RIA</u>

การตรวจหาปริมาณ E_1 ทั้งหมดในตัวอย่างปัสสาวะโดยวิธี RIA จะต้องทำการไฮโดรไลซิสด้วยกรดเกลือ เพื่อให้ E_1 ที่อยู่ในรูปคอนจูเกต (conjugated form) เปลี่ยนมาอยู่ในรูปอิสระ (free form) โดยดำเนินวิธีการและขั้นตอนในการหาเหมือนของประสงค์ หลำสะอาด (1984)

นำตัวอย่างปัสสาวะมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 : 20 แล้วนำมาไฮโดรไลซิส โดยแบ่งปัสสาวะที่เจือจางแล้วใส่หลอดทดลอง 3 หลอด หลอดละ 0.05 มิลลิลิตร เติม 6% HCl 0.3 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติม assay buffer0.2 มิลลิลิตร เพื่อละลายเอาฮอร์โมนที่ติดข้างหลอดออกมา จากนั้นสกัดด้วยไดเอธิลอีเธอร์ 5 มิลลิลิตร นาน 1 นาที แล้วแยกชั้นไดเอธิลอีเธอร์ใส่ในหลอดทดลองอีกชุดหนึ่ง ทำให้แห้ง แล้วเติม assay buffer 0.5 มิลลิลิตร

จากนี้ดำเนินขั้นตอนเหมือนกับการตรวจหาปริมาณ E_1 อิสระ

อ่านค่าปริมาณของ E_1 ทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานที่ได้ ได้ปริมาณของ E_1 ทั้งหมด มีหน่วย พิโคกรัม/หลอด แล้วคำนวณให้มีหน่วยเป็น นาโนกรัม/มิลลิกรัม ของครีเอตินีน โดยในการตรวจวัด E_1 ทั้งหมด เราใช้ตัวอย่างปัสสาวะที่ได้เจือจางลงในอัตราส่วน 1 : 20 ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ดังนั้นในแต่ละหลอดมีปัสสาวะอยู่จริง 0.0025 มิลลิลิตร ซึ่งจะต้องคูณด้วยแฟคเตอร์ 0.4 จึงจะได้ E_1 ทั้งหมด มีหน่วยเป็น นาโนกรัม/มิลลิลิตร ของปัสสาวะ แล้วหารด้วยปริมาณของครีเอตินีนในตัวอย่างปัสสาวะเดียวกันนี้ ที่มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ก็จะได้ปริมาณ E_1 ทั้งหมด มีหน่วยเป็น นาโนกรัม/มิลลิกรัม ของครีเอตินีน

<u>การตรวจหาปริมาณ E_1-3-G โดยวิธี RIA</u>

การตรวจหาปริมาณ E_1-3-G ในตัวอย่างปัสสาวะโดยวิธี RIA ดัดแปลงจากของ Samarajeewa and Kellie (1975)

เจือจางปัสสาวะด้วย assay buffer ในอัตราส่วน 1 : 20 แบ่งใส่หลอดทดลอง 3 หลอด หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

นำสารละลาย E_1-3-G มาตรฐานที่เตรียมไว้ทั้ง 5 ความเข้มข้น แบ่งใส่หลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 3 หลอด หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

เติมสารละลาย E_1 ติดสลากรังสี และ แอนติบอดีของ E_1-3-G ทุกหลอดอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

จากนั้นเติม charcoal suspension 0.2 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 2,500 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รินส่วนใสใส่ counting vial แล้วเติม counting solution สูตรที่ 2 4.5 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณรังสี

เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ของ E_1-3-G มาตรฐาน กับค่าเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวของแต่ละความเข้มข้นนั้น อ่านค่าปริมาณ E_1-3-G ของแต่ละตัวอย่างจากกราฟ แล้วคำนวณให้อยู่ในหน่วยของ นาโนกรัม/มิลลิกรัม ของครีเอตินีน โดยใช้แฟคเตอร์ 0.04 คูณ แล้วหารด้วยปริมาณครีเอตินีนในปัสสาวะเดียวกันนั้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

การหาปริมาณ Pd-3∝-G โดยวิธี RIA

ดัดแปลงจากวิธีของ Samarajeewa et al. (1979)

นำตัวอย่างปัสสาวะมาเจือจางด้วย assay buffer ในอัตราส่วน 1 : 100 แบ่งปัสสาวะที่เจือจางแล้วนี้ใส่หลอดทดลอง 3 หลอด หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

นำสารละลาย Pd-3∝-G มาตรฐาน ที่เตรียมไว้ทั้ง 6 ความเข้มข้น แบ่งใส่หลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 3 หลอด หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

เติมสารละลายติดสลากของ 20∝- Hydroxy-(1,2,6,7 - ^{3}H) - pregn-4-ene-3-one และแอนติบอดีของ Pd-3∝-G ทุกหลอด อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

จากนั้นเติม charcoal suspension 0.2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วจึงนำไปปั่นที่ 2,500 รอบ/นาที เทส่วนใสใส่ counting vial แล้วเติม counting solution สูตรที่ 2 4.5 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดปริมาณรังสี

เขียนกราฟมาตรฐานแล้วอ่านค่าปริมาณ Pd-3∝-G ที่มีหน่วยเป็นพิโคกรัม/หลอด คูณด้วยแฟคเตอร์ 2×10^{-3} จึงจะได้ Pd-3∝-G มีหน่วยเป็น นาโนกรัม/มิลลิลิตร แล้วหารด้วยปริมาณครีเอตินีนในปัสสาวะนั้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จะได้ Pd-3∝-G ออกมามีหน่วยเป็น นาโนกรัม/มิลลิกรัม ของครีเอตินีน

การวิเคราะห์หาปริมาณครีเอตินีน

หาปริมาณครีเอตินีนในตัวอย่างปัสสาวะโดยใช้ Jaffe' reaction ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างครีเอตินีนกับกรดพิคริกในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วจะให้สารสีแดง (Greenwald , 1928)

สารละลายและวิธีเตรียม

1. สารละลายครีเอตินีนมาตรฐาน จากสารละลายตั้งต้น 100 มิลลิกรัม ใน 0.1 N. HCl 10 มิลลิลิตร นำมาเจือจางลำดับส่วนด้วยน้ำกลั่นจนได้ 10 ความเข้มข้น คือ 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78 และ 0.39 ไมโครกรัม/0.1 มิลลิลิตร

2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.4 N. เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 56 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายกรดพิคริก 0.036 M. เตรียมโดยชั่งกรดพิคริกบริสุทธิ์ 8.25 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร คนให้ละลายโดยใช้ความร้อนช่วย ทำให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

ขั้นตอนในการตรวจหาปริมาณ

1. เจือจางตัวอย่างปัสสาวะด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 100 แล้วแบ่งใส่หลอดทดลอง 3 หลอด หลอดละ 3 มิลลิลิตร

2. นำสารละลายครีเอตินีนมาตรฐานทั้ง 10 ความเข้มข้น มาแบ่งใส่หลอดทดลองความเข้มข้นละ 2 หลอด หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 2.9 มิลลิลิตร ทุกหลอด

3. เตรียม blank reagent โดยใช้น้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร

4. เติมสารละลายกรดพิคริก 1 มิลลิลิตร ทุกหลอด

5. เติม 0.1 N. NaOH 0.5 มิลลิลิตร ทุกหลอด เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่ปลอดแสง $1\frac{1}{2}$ - 2 ชั่วโมง

6. วัดค่าเปอร์เซนต์แสงผ่าน (% transmission) โดยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

7. นำค่าเปอร์เซ็นต์แสงผ่านและความเข้มข้นของครีเอตินีนมาตรฐาน มาเขียนกราฟในกระดาษเซมิลอกาลิธึม อ่านค่าปริมาณของครีเอตินีนในตัวอย่างปัสสาวะจากกราฟมาตรฐานนี้

การคำนวณหาปริมาณครีเอตินีน

เมื่ออ่านค่าปริมาณครีเอตินีนในตัวอย่างปัสสาวะจากกราฟมาตรฐานได้ปริมาณครีเอตินีนในหน่วยของ ไมโครกรัม/หลอด เนื่องจากในการตรวจวัดใช้ตัวอย่างปัสสาวะที่มีความเข้มข้น 1 : 100 ในปริมาณ 3 มิลลิลิตร ดังนั้นในแต่ละหลอดมีปัสสาวะอยู่จริง 3×10^{-2} มิลลิลิตร ซึ่งจะต้องใช้แฟคเตอร์ 1/30 คูณ จึงจะได้ปริมาณครีเอตินีนที่มีหน่วยเป็นมิลลิกรัม/มิลลิลิตรของปัสสาวะ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การประเมินผลของการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมน

ในการทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีการตรวจวัด (reliability of method) ของวิธี RIA มีการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ความแม่นยำ (precision) ความถูกต้อง (accuracy) และความไวในการตรวจวัด (sensitivity) เพื่อเป็นข้อบ่งชี้ว่าวิธีการนี้มีความเชื่อถือได้มากน้อยเพียงใด (Ekins, 1970, Abraham, 1974)

1. ความจำเพาะ

เป็นการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ใช้ ทดสอบโดยนำสารอื่นที่มีโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมนที่ตรวจวัดนั้นมาทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่ต้องการทดสอบ แล้วคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้น กับเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวของสารที่นำมาทดสอบแต่ละชนิด แล้วคิดหา % cross-reaction (ความสามารถในการทำปฏิกิริยากับสารอื่น) ที่ระดับเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวเท่ากับ 50% (Doerr et al., 1973)

$$\% \text{ cross reaction} = \frac{b}{a} \times 100\%$$

a = ปริมาณของฮอร์โมนนั้นที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐานของฮอร์โมนนั้นที่ระดับเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวเท่ากับ 50%

b = ปริมาณของสารอื่นที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐานของสารนั้นที่ระดับการเกาะเกี่ยวเท่ากับ 50%

ตารางที่ 4 แสดงความจำเพาะของแอนติซีรัมของ E_1

สารที่ใช้ทดสอบ	% cross - reaction
E_1	100.00%
E_1-3-G	10.50%
E_2	< 0.001%
E_3	< 0.001%
E_3-3-G	< 0.001%

ตารางที่ 5 แสดงความจำเพาะของแอนติซีรัมของ E_1-3-G

สารที่ใช้ทดสอบ	% cross-reaction
E_1-3-G	100.00%
E_1	27.00%
E_2	< 0.001%
E_3	< 0.001%
E_3-3-G	< 0.001%

ตารางที่ 6 แสดงความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาของแอนติซีรัมของ Pd - 3∝-G

สารที่ใช้ทดสอบ	% cross - reaction
Pd -3∝- G	100.00%
5β-pregnane-3∝, 20∝- diol	0.01%
5β-pregnan-20-one	< 0.001%
5β-pregnane-3∝, 20β - diol	< 0.001%
20∝- OH - P	30.00%

2. <u>ความแม่นยำ</u>

Abraham (1971, 1974) เสนอให้มีการตรวจสอบความแม่นยำโดยการตรวจวัดหลาย ๆ ครั้ง แล้วคิดหาค่าความแม่นยำจากเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (% CV) ซึ่งมีอยู่ 2 ส่วน คือ ภายในการตรวจวัดครั้งเดียวกัน (intra-assay) และระหว่างการตรวจวัดหลายครั้ง (interassay) ทำโดยนำปัสสาวะระหว่างรอบประจำเดือนของสิงหางยาวเพศเมีย (pooled urine) ซึ่งมีความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ คือ

ระดับต่ำ กลาง และสูง มาทำการตรวจหาปริมาณพร้อมกันไปกับการหาปริมาณในตัวอย่างปัสสาวะ

ตารางที่ 7 แสดงความแม่นยำของการตรวจวัด E_1 อิสระ, E_1 ทั้งหมด, E_1-3-G และ Pd-3α -G

การตรวจวัดระดับของ	ระดับความเข้มข้นของปัสสาวะ	ค่าความแม่นยำ (% CV)	
		ภายในการตรวจวัดเดียวกัน (n = 6)	ระหว่างการตรวจวัด (n = 3)
E_1 อิสระ	ต่ำ	6.71	9.53
	กลาง	8.39	6.26
	สูง	10.64	12.11
E_1 ทั้งหมด	ต่ำ	9.55	15.69
	กลาง	10.26	15.74
	สูง	12.17	12.33
E_1-3-G	ต่ำ	9.53	11.26
	กลาง	8.21	9.84
	สูง	10.12	13.59
Pd - 3α - G	ต่ำ	8.37	10.41
	กลาง	6.29	9.83
	สูง	11.74	14.89

3. <u>ความถูกต้อง</u>

ความถูกต้องในการตรวจวัดหาได้โดยใช้ฮอร์โมนที่ทราบปริมาณแล้ว ไปผ่านขบวนการตรวจวัดพร้อมกับตัวอย่างปัสสาวะ แล้วเปรียบเทียบผลกับค่าปริมาณที่ใส่ลงไป คำนวณได้ดังนี้

$$\% \text{ ความถูกต้อง} = \frac{\text{ค่าฮอร์โมนที่ตรวจวัดได้}}{\text{ค่าฮอร์โมนที่ใส่ลงไปจริง}} \times 100\%$$

3.1 ความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณ E_1 อิสระ ใช้ E_1 ที่ทราบปริมาณ คือ 250 พิโคกรัม/ 0.5 มิลลิลิตร จากการตรวจวัด 3 ครั้ง ได้ค่าความถูกต้อง 90.60, 94.00 และ 96.10% ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของการตรวจวัด 3 ครั้ง มีค่า 93.56%

3.2 ความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณ E_1 ทั้งหมด ใช้ E_1 ที่พบปริมาณ คือ 500 พิโคกรัม/ 0.5 มิลลิลิตร จากการตรวจวัด 3 ครั้ง ได้ค่าความถูกต้อง 62.50, 64.80 และ 67.20% ตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 64.83%

3.3 ความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณ E_1-3-G ใช้ E_1-3-G ที่ทราบปริมาณคือ 1,000 พิโคกรัม/ 0.5 มิลลิลิตร ตรวจวัด 3 ครั้ง ได้ค่าความถูกต้อง 88.00, 91.50 และ 93.50% ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 91.0%

3.4 ความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณ Pd-3α-G ใช้ Pd-3α-G ที่ทราบปริมาณคือ 1,000 พิโคกรัม/ 0.5 มิลลิลิตร ตรวจวัด 3 ครั้ง ได้ค่าความถูกต้อง 87.50, 89.72 และ 89.50% ตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 88.9%

<u>ประสิทธิภาพในการสกัด</u> เนื่องจากในการตรวจวัด E_1 อิสระ และ E_1 ทั้งหมด จะต้องผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยไดธิลอีเธอร์ ดังนั้นจึงต้องทดสอบความสามารถในการสกัดของไดเอธิลอีเธอร์ที่ใช้ด้วย โดยทำไปพร้อมกับการตรวจวัดปริมาณของตัวอย่างปัสสาวะ

TCR (total count recovery) ทำโดยเจือจางสารละลาย E_1 ติดสลากรังสี ลง 10 เท่า ด้วย assay buffer นำ E_1 ติดสลากที่เจือจางลงแล้ว 10 เท่านี้ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ใน counting vial แล้วเติม assay buffer 0.6 มิลลิลิตร เติม counting solution สูตรที่ 1 4.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดปริมาณรังสี

RCE (recovery) ทำโดยใช้สารละลาย E_1 ติดสลากที่เจือจางลงแล้ว 10 เท่า 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับปัสสาวะในระหว่างรอบประจำเดือนของลิงหางยาว (pooled urine) 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปผ่านขบวนการสกัดด้วยไดเอธิลอีเธอร์ แยกชั้นไดเอธิลอีเธอร์ลงใส่หลอดทดลองอีกชุด ระเหยจนแห้งแล้วเติม assay buffer 0.7 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เทใส่ counting vial เติม counting solution สูตรที่ 1 4.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณรังสี (ทำ 6 หลอด ต่อการตรวจวัด 1 ครั้ง)

ประสิทธิภาพในการสกัดคำนวณได้จาก

$$\frac{\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ RCE}}{\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ TCR}} \times 100\ \%$$

ซึ่งประสิทธิภาพในการสกัดของการตรวจวัด E_1 อิสระ และ E_1 ทั้งหมด มีค่า $89.5 \pm 2.37\%$ และ $87.0 \pm 3.01\%$ ตามลำดับ

4. <u>ความไวของการตรวจวัด</u>

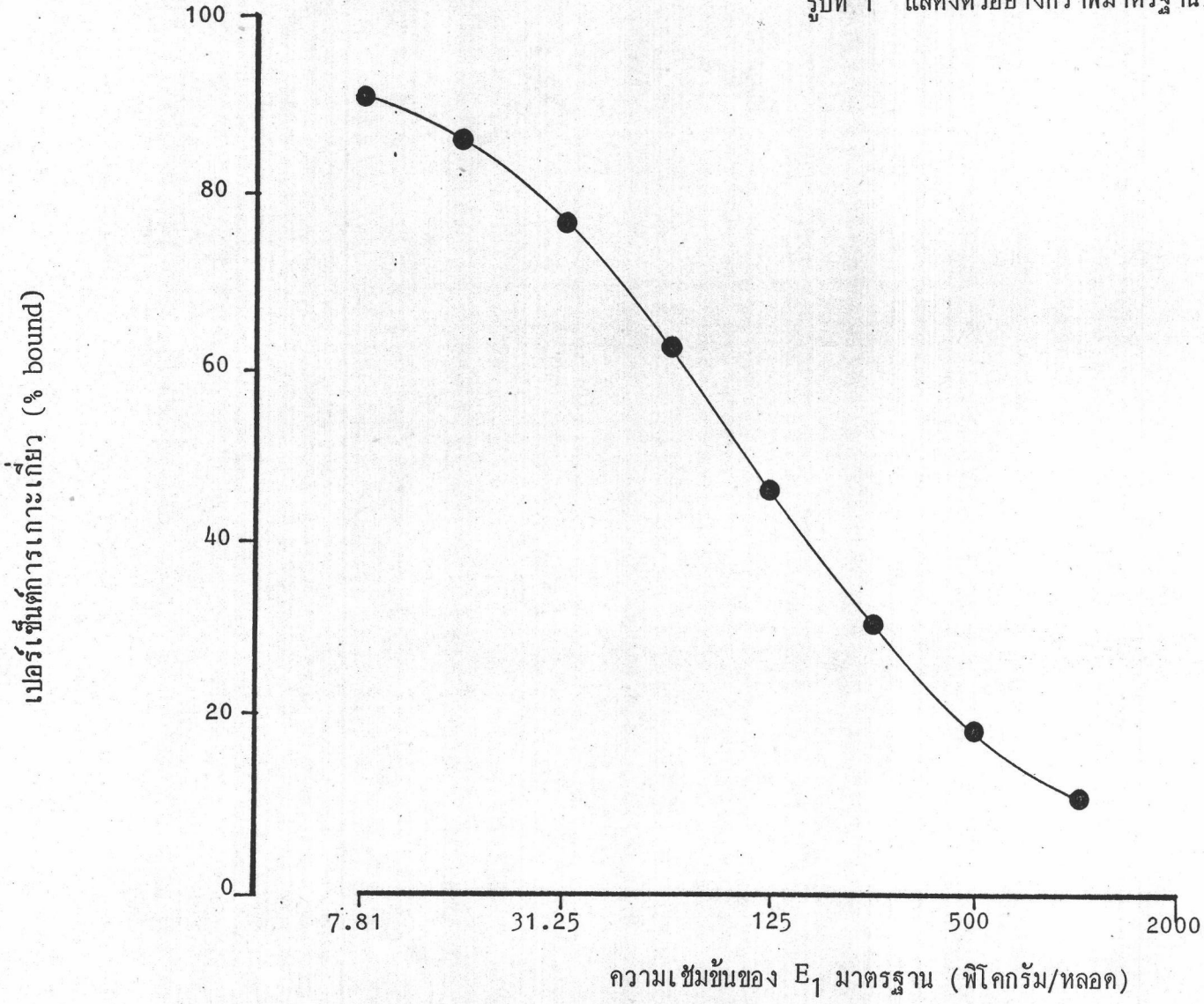
ความไวของการตรวจวัดเป็นค่าที่น้อยที่สุดของสารที่การตรวจวัดนั้นสามารถตรวจวัดได้ โดยแยกจากศูนย์อย่างมีนัยสำคัญ (maximum binding) ซึ่งในการตรวจวัดครั้งนี้ใช้ค่าปริมาณฮอร์โมนที่ระดับ 90 เปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยว โดยอ่านจากกราฟมาตรฐาน

4.1 ความไวของการตรวจวัด E_1 มีค่า 8.0 พิโคกรัม/หลอด

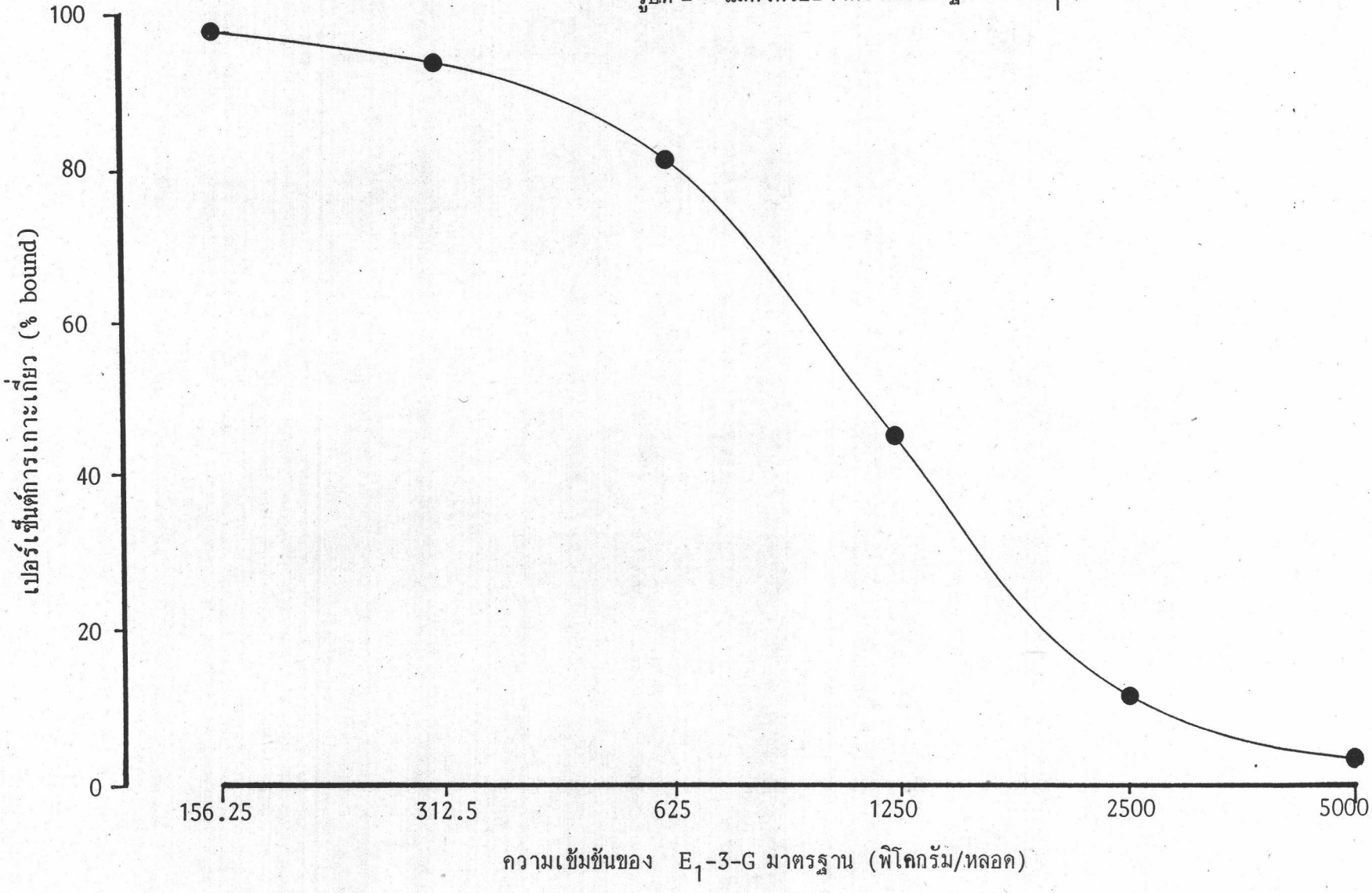
4.2 ความไวของการตรวจวัด E_1-3-G มีค่า 500 พิโคกรัม/หลอด

4.3 ความไวของการตรวจวัด Pd-3α-G มีค่า 400 พิโคกรัม/หลอด

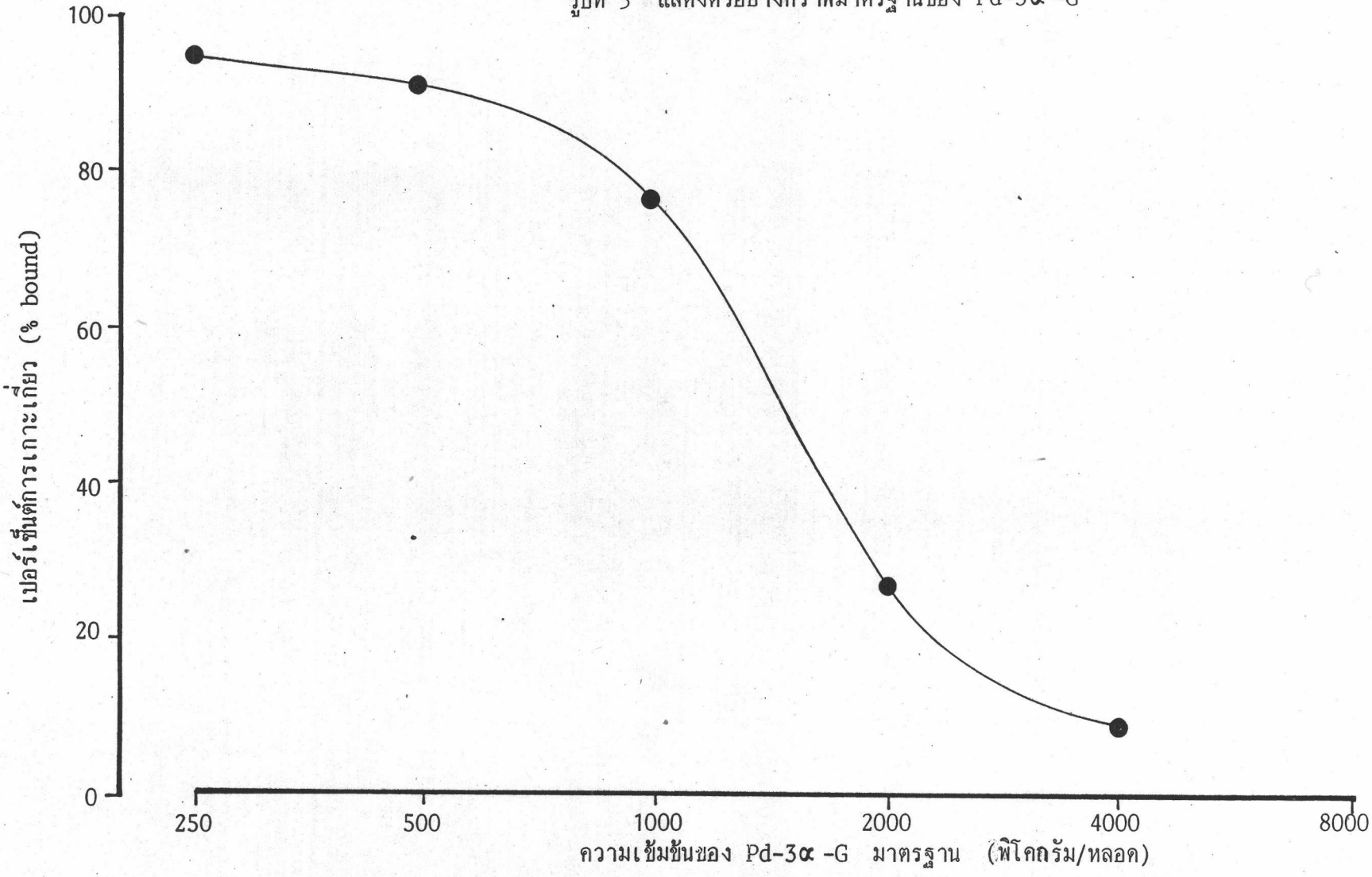
รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างกราฟมาตรฐานของ E_1



รูปที่ 2 แสดงตัวอย่างกราฟมาตรฐานของ E_1-3-G



รูปที่ 3 แสดงตัวอย่างกราฟมาตรฐานของ Pd-3α -G



รูปที่ 4 แสดงตัวอย่างกราฟมาตรฐานของครีเอตินีน