บทที่ 2

สัตว์ทดลอง อุปกรณ์ สารเคมี และการทดลอง

1. สัตว์ทดลอง

ใช้ลิงหางยาว (Macaca fascicularis) จากหน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 60 ตัว ซึ่งลิงกลุ่มนี้เป็นลิงซึ่งยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษาเกี่ยวกับธัยรอยด์ฮอร์โมน และไม่เคยได้รับการทดลองให้ยาเกี่ยวกับธัยรอยด์ฮอร์โมนมาก่อน ลิงเหล่านี้ขณะทำการศึกษามีความสมบูรณ์ของร่างกายปกติ และทำการศึกษาในระหว่างเดือนเมษายน ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2530

ลิงเหล่านี้ถูกเลี้ยงไว้ในกรงเดี่ยวทำด้วยเหล็กอาบสารกันสนิมมีขนาดกว้าง 24 นิ้ว ยาว 28 นิ้ว สูง 34 นิ้ว อยู่ภายในเรือนเลี้ยงที่มีอากาศถ่ายเทสะดวก และได้รับแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 6.00 น. ถึง 18.00 น. อาหารที่ใช้เลี้ยง เป็นอาหารสำเร็จรูปจากบริษัทโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ และเสริมด้วยกล้วยน้ำว้า แตงกวา มันเทศ และสัปรด โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เวลา 8.00-9.00 น. และ 15.00- 16.00 น.

2. อุปกรณ์

1. Beta Counter	: Model 1218 Rack Beta LKB Wallac, Finland.
2. Driblock heater	: Model DB-3 ของ Tecam Laboratory and Industrial Equipment, U.S.A.
3. Foam decanting rack	: Diagnostic Products Corporation, U.S.A.
4. Gamma counter	: Methods in the LKB Wallac 1282, Finland.
5. Magnatic stirring bars	: Kit No. 4772-15 Cole-Parmer Instrument company.

6. Micropipets : 10, 25, 50, 10, 200, 500 ไมโครลิตร Eppendorf 3130, Germany.

7. Mixer : M 16715, Thermolyne Corporation U.S.A.

8. pH meter : PHM 83 Autocal pH Meter ของ Rodiometer A/S Copenhagen Denmark.

9. Refrigerated centrifuges : Model PR-J International Equipment Company U.S.A

10. Repeating dispenser : Eppendorf Multipetle 4780 and Combitips 50,100,500 ไมโครลิตร และ 1 มิลลิลิตร Postfach 6506 70 2000 Hamburg 65

11. Scintillation counting vials : Packard Instrument Company, ILL.

12. Water bath : Model 3575-1 Lab-line Intruments, Inc. Melrose Park, ILL.

3. <u>สารเคมี</u>

Art. 3115 1,4 - Dioxan reinst ($C_4 H_8 O_2$) : E. Merck, Germany.

Art. 2946 PPO (2,5 Diphenyloxozol) ($C_{15}H_{11}No$): E. Merck, Germany.

Charcoal Reagent : WHO RIA Reagent programme, Switzerland

Dextran : WHO RIA Reagent progromme, Switzerland.

Diethyl ether $(C_2H_5)_2O$ (MW. 74.12 g/mol) : E. Merck, Germany.

Di-Sodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4) : E. Merck, Germany.

Ethanol (Absolute) : E. Merck, Germany

Gelatin : DIFCO Laboratories U.S.A.

Methanol (CH_3OH) : E. Merck, Germany.
(MW.32.04 g/mol)

Natrium dihydrogenphosphote - Monohydrated : E. Merck, Germany.
($NaH_2\ PO_4.H_2O$)

Popop [1,4-bis (2-(5-phenyloxazolyl))]-Benzene, Phenyloxazolyphenyl-Oxazolyl phenyl] Anhydrous (MW 364.6) : Sigma chemical Company, U.S.A.

Sodium Cholride (NaCl) : BPH chemicals Ltd., England.

Thiomersal : Sigma chemical company, U.S.A.

Toluene P.a. ($C_7\ H_8$) : E. Merck, Germany.
(MW = 92.14 g/ ml)

ฮอร์โมนมาตรฐานและแอนติบอดี

ฮอร์โมนมาตรฐาน และแอนติบอดี ของ Total T_4, Total T_3 และ TSH ซื้อจากบริษัท Diagnostic Product Corporation และฮอร์โมนมาตรฐานและแอนติบอดีของ TBG ซื้อจากบริษัท Clinical Assays.

ฮอร์โมนมาตรฐานและแอนติบอดีของเอสตราไดออล, เทสทอสเตอโรน และโปรเจสเตอโรน ได้รับจากองค์การอนามัยโลก กรุงเจนีวา สวิสเซอร์แลนด์

ฮอร์โมนติดสลากรังสี

^{125}I-T_4, ^{125}I-T_3, ^{125}I-TSH ซื้อจากบริษัท Diagnostic Products Corporation ลอสเอเจลลิส ประเทศสหรัฐอเมริกา และ ^{125}I-TBG ซื้อจากบริษัท Clinical Assays แคมบริด ประเทศสหรัฐอเมริกา

(2, 4, 6, 7-^3H)-เอสตราไดออล, (1, 2, 6, 7-^3H) เทสทอสเตอโรน และ (1, 2, 6, 7-^3H) โปรเจสเตอโรนซื้อจากบริษัท Amersham ประเทศอังกฤษ

4. วิธีการทดลอง

4.1 การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

แบ่งกลุ่มลิงออกเป็น 8 กลุ่ม โดยใช้อายุและเพศเป็นเกณฑ์ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ลิงวัยเด็ก (juvenile) เพศเมีย อายุ 1 ถึง 3 ปี น้ำหนักตัวอยู่ระหว่าง 1.9-2.2 กิโลกรัม จำนวน 6 ตัว (#622, #623, #624, #625, #800, #801)

กลุ่มที่ 2 ลิงวัยเด็ก (juvenile) เพศผู้ อายุ 1 ถึง 3 ปี น้ำหนักตัวอยู่ระหว่าง 1.9-2.1 กิโลกรัม จำนวน 3 ตัว (#518, #519, #520)

กลุ่มที่ 3 ลิงวัยรุ่น (young adult) เพศเมีย อายุ 3 ถึง 5 ปี น้ำหนักตัวอยู่ระหว่าง 2.5-4 กิโลกรัม จำนวน 5 ตัว (#616, #618, #619, #620, #621)

กลุ่มที่ 4 ลิงวัยรุ่น (young adult) เพศผู้ อายุ 3 ถึง 5 ปี น้ำหนักตัวอยู่ระหว่าง 3.8-4.9 กิโลกรัม จำนวน 3 ตัว (#704, #705, #706)

กลุ่มที่ 5 ลิงวัยเจริญพันธุ์ (adult) อายุ 5 ถึง 12 ปี น้ำหนักตัวอยู่ระหว่าง 3-9 กิโลกรัม จำนวน 21 ตัว (#601, #608, #609, #610, #611, #613, #615, #3, #60, #64, #65, #66, #67, #68, #70, #76, #80, #81, #85, #92, #93)

กลุ่มที่ 6 ลิงวัยเจริญพันธุ์ (adult) อายุ 5 ถึง 12 ปี น้ำหนักตัวอยู่ระหว่าง 5.7-9.3 กิโลกรัม จำนวน 14 ตัว (#511, #512, #700, #702, #703, #500, #504, #21, #46, #47, #55, #56, #57, #93)

กลุ่มที่ 7 ลิงสูงอายุเพศเมียที่มีน้ำนมไหล อายุมากกว่า 10 ปี น้ำหนักตัวอยู่ระหว่าง 3-6 กิโลกรัม ซึ่งในลิงกลุ่มนี้ยังแบ่งออกได้เป็น

- ลิงที่มีรอบประจำเดือนปกติ จำนวน 1 ตัว (#24)
- ลิงที่มีรอบประจำเดือนยาว จำนวน 4 ตัว (#11, #29, #58, #74)

กลุ่มที่ 8 ลิงเพศเมียโตเต็มวัยที่ตัดรังไข่อายุมากกว่า 12 ปี น้ำหนักตัวระหว่าง 3.8-6 กิโลกรัม จำนวน 3 ตัว (#5, #6, #28)

4.2 <u>การเก็บตัวอย่างเลือด</u>

เจาะเลือดทางแอ่งเส้นเลือดหน้าขา (femeral venipuncture) โดยไม่ใช้ยาสลบยกเว้นลิงเพศผู้ที่มีอายุตั้งแต่ 5 ปี ขึ้นไปใช้ Katamine ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ในช่วงเวลา 9.00-12.00 น. เลือดที่เจาะได้จะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมงจึงเก็บเข้าตู้เย็นทิ้งไว้ 1 คืน จึงนำไปปั่นที่ 2800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกซีรั่มโดยแบ่งซีรั่มใส่หลอดเล็กๆ ในปริมาณที่พอเพียงสำหรับการวิเคราะห์ฮอร์โมนในแต่ละฮอร์โมน เพื่อป้องกันการสลายตัวของฮอร์โมนในการที่ซีรั่มต้องถูกละลายหลายครั้ง เก็บซีรั่มที่ได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียสทันที เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนต่อไป โดยใช้ตัวอย่างซีรั่มเดียวกันตรวจหาสารและฮอร์โมนทุกตัว โดยแต่ละกลุ่มเจาะเลือดดังนี้

4.2.1. ลิงวัยเด็ก ทั้งในเพศเมียและเพศผู้ เก็บตัวอย่างเลือดแต่ละตัวครั้งละ 5 มิลลิลิตร เดือนละครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 3 เดือน แล้วนำตัวอย่างเลือดแต่ละครั้งไปหาปริมาณฮอร์โมนทั้งหมด จากค่าที่ได้นำมาหาค่าเฉลี่ย ± SEM

4.2.2. ลิงวัยรุ่น ทั้งในเพศเมียและเพศผู้ เก็บตัวอย่างเลือดแต่ละตัวครั้งละ 8 มิลลิลิตร โดยเจาะ 3 ครั้ง ห่างกันทุก 2 สัปดาห์ แล้วนำตัวอย่างเลือดแต่ละครั้งไปหาปริมาณฮอร์โมนทั้งหมด สำหรับลิงเพศเมียที่ผ่านพ้นจากการมีประจำเดือนครั้งแรก (menarche) แล้วดูความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ±SEM ของปริมาณฮอร์โมนทั้งหมด ในช่วงที่คาดว่าเป็นระยะ follicular (วันที่ 1-12 ของรอบประจำเดือน) และ ระยะที่คาดว่าเป็น luteal (14 วัน ก่อนกลับมามีประจำเดือนอีก)

4.2.3. ลิงวัยเจริญพันธุ์ ทั้งในเพศเมียและเพศผู้ เก็บตัวอย่างเลือดแต่ละตัวครั้งละ 10 มิลลิลิตร เพียงครั้งเดียว แล้วนำตัวอย่างเลือดไปหาปริมาณฮอร์โมนทั้งหมด สำหรับลิงเพศเมียดูความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ± SEM ของปริมาณฮอร์โมนทั้งหมดในช่วงที่คาดว่าเป็นระยะ follicular และ ระยะที่คาดว่าเป็น luteal ตามที่ได้กล่าวในข้อ 4.2.2

4.2.4. ลิงสูงอายุเพศเมียที่มีน้ำนมไหล ในลิงที่มีรอบเดือนปกติเจาะตามรอบประจำเดือน โดยเริ่มเจาะวันแรกของรอบประจำเดือนแล้วเจาะทุก 3 วัน จนครบรอบประจำเดือน โดยเจาะติดต่อกันจนครบ 3 รอบประจำเดือน ส่วนลิงที่มีรอบประจำเดือนยาวเจาะสัปดาห์ละครั้งเป็นเวลา 100 วัน

4.2.5. ลิงเพศเมียโตเต็มวัยที่ตัดรังไข่แล้ว เก็บตัวอย่างเลือดแต่ละตัวครั้งละ 10 มิลลิลิตร โดยเจาะ 3 ครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ นำเอาตัวอย่างเลือดไปหาปริมาณฮอร์โมนทั้งหมด จากค่าที่ได้นำมาหาค่าเฉลี่ย ± SEM

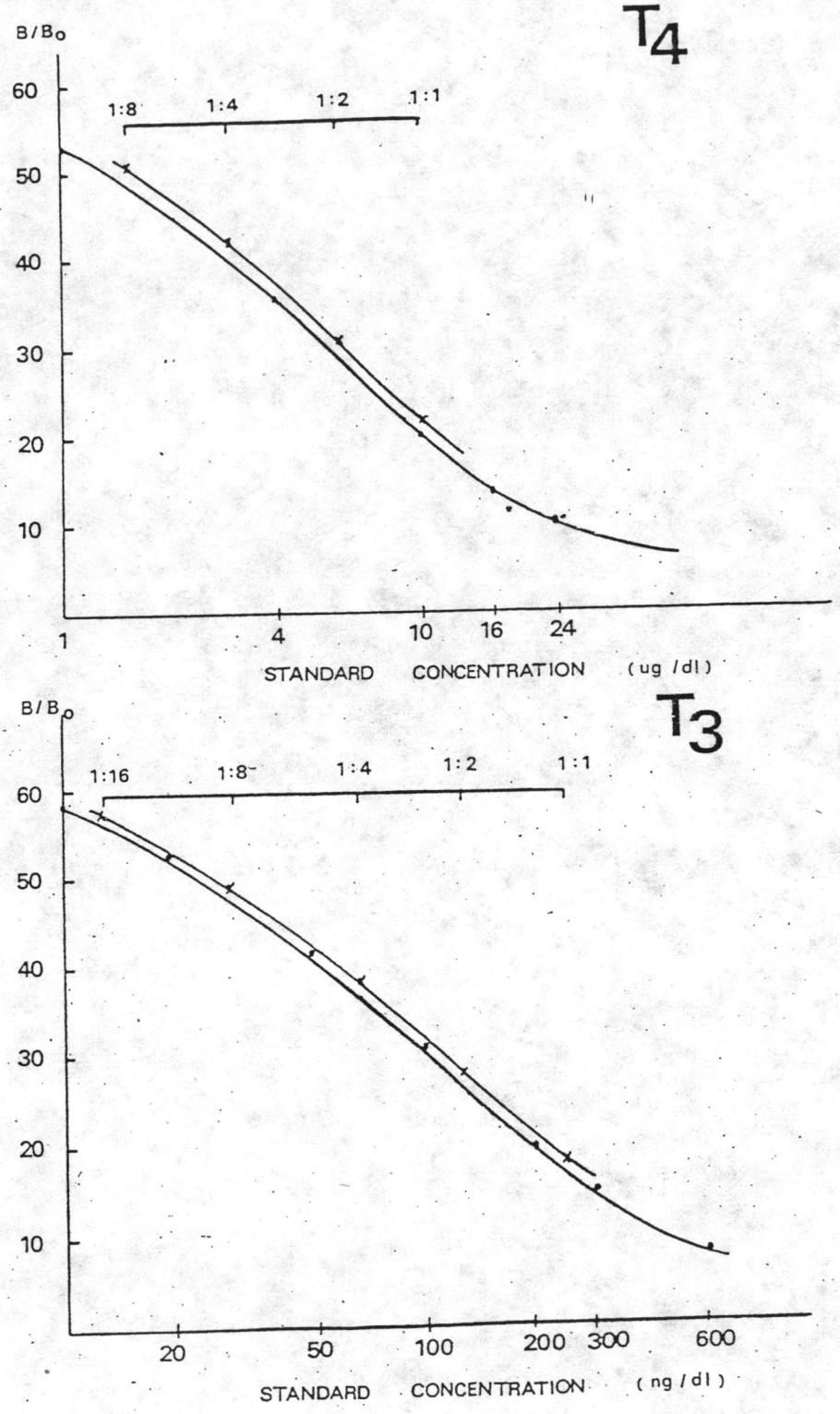
และเพื่อป้องกันการเกิดภาวะโลหิตจาง ลิงทุกตัวที่ทำการศึกษาภายหลังเจาะเลือดจะเสริมด้วยให้กินวิตามินรวมทางปาก (Neutroplex Liquid)

4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน T_4, T_3, TSH และ TBG โดยวิธี RIA

การหาปริมาณ T_4, T_3, TSH ใช้ชุดวิเคราะห์ฮอร์โมนสำเร็จรูปจากบริษัท Diagnostic Product Corporation และ TBG จากบริษัท Clinical Assays ซึ่งชุดวิเคราะห์สำเร็จรูปนี้ทำไว้เพื่อใช้ในคนแต่ได้ทำการทดสอบว่าใช้กับซีรั่มของลิงได้ ดังนี้

4.3.1 Parallelism

เนื่องจากการวัดปริมาณโดยวิธี RIA เป็นการเปรียบเทียบปฏิกิริยาที่เกิดในสารมาตรฐานกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในสารตัวอย่าง ดังนั้นถ้าปฏิริยาที่เกิดขึ้นในสารมาตรฐานกับสารตัวอย่างแตกต่างกัน จะเป็นผลให้ความแม่นยำในการวัดไม่ดี ซึ่งเป็นผลต่อเนื่องทำให้ความถูกต้องในการวัดไม่ดีด้วย ดังนั้นในการทดลองซึ่งใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป ซึ่งใช้ได้ดีในซีรั่มคน เมื่อนำมาใช้กับซีรั่มลิงจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบ immunochemical reaction ซึ่งทำได้โดยวัดปริมาณซีรั่มลิงที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน (serial dilution) เทียบกับสารมาตรฐาน จะได้กราฟที่เขียนระหว่าง B/B_0 กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ขนานกับกราฟที่เขียนขึ้น ระหว่าง B/B_0 กับ dilution ของซีรั่มลิงดังรูปที่1



กราฟรูปที่ 1 เปรียบเทียบ Immunochemical identity ระหว่างสารละลายมาตรฐาน T_4, T_3 กับซีรั่มลิงที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน (serial dilution)

4.3.2 <u>การเตรียมซีรั่มที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพ (Quality Control, QC) สำหรับธัยรอยด์ฮอร์โมน</u>

หลักการ : สารที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพได้จากการรวมสารชนิดเดียวกันจำนวนมากๆ เมื่อแบ่งเป็นส่วนๆเก็บไว้ในแต่ละส่วนควรมีสารที่ต้องการวิเคราะห์ใกล้เคียงกัน

ในการทดลองผู้วิจัยได้เตรียมซีรั่มที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพทั้งซีรั่มคน และลิงหางยาว โดยในคนนั้นได้จากการรวบรวมซีรั่มของผู้ป่วยที่เอสเสย์และทราบค่าแล้วจากห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์นิวเคลียร์ ตึกโปษะยานนท์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยแยกเก็บซีรั่มไว้เป็น 3 กลุ่ม คือ ค่าสูง, ค่ากลาง และค่าต่ำ แล้วนำมาปรับค่าที่พอเหมาะสำหรับควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์ฮอร์โมนดังนี้ คือ pool serum ค่าสูง ซึ่งหาค่า T_4 เท่ากับ 45 ไมโครกรัม/เดซิลิตร และ T_3 เท่ากับ 445 นาโนกรัม/เดซิลิตร นำมาทำ dilution กับ pool serum คนไข้มะเร็งของธัยรอยด์ อัตราส่วน 3:2 และ 5:1 ตามลำดับ ซึ่งนำมาหาค่า T_4 จะได้ความเข้มข้นประมาณ 18.5 ไมโครกรัม/เดซิลิตร และ T_3 มีความเข้มข้นประมาณ 354 นาโนกรัม/เดซิลิตร pool serum ค่ากลาง ซึ่งมีค่า T_4 อยู่ในช่วง 4.5-12.5 ไมโครกรัม/เดซิลิตร สำหรับ T_3 อยู่ในช่วง 90-190 นาโนกรัม/เดซิลิตร ตามลำดับ pool serumค่าต่ำ ซึ่งนำมาหาค่า T_4 เท่ากับ 3.5 ไมโครกรัม/เดซิลิตร T_3 เท่ากับ 76 นาโนกรัม/เดซิลิตร ซึ่งค่าที่ได้สำหรับ T_3 นี้ ยังสูงอยู่เล็กน้อย ดังนั้นจึงปรับค่าโดยนำมาทำ dilution กับซีรั่ม

สำหรับซีรั่มลิงหางยาวได้จากการเจาะเลือดลิงปกติหลายตัวมารวมกัน และปรับให้มีค่าของระดับฮอร์โมนที่ต้องการโดยเติมสารมาตรฐาน (addition or spiking) (สุกัญญา วีระวัฒนะกุมพะ, 2525) โดยแบ่งเป็น 3 ระดับ คือ ค่าสูง ค่ากลาง และ ค่าต่ำ เช่นเดียวกับ pool serum คน โดยในการวิเคราะห์ฮอร์โมน T_4 ได้จากการเติมสารมาตรฐาน Stable T_4 (Sodium L - Thyroxine Pentahydrate MW. 889 : Sigma chemical company, England) ที่มีความเข้มข้น 191 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยดูดมา 10 ไมโครลิตรในpool serum ลิง 2 มิลลิลิตร หาค่า T_4 ได้ค่าประมาณ 56 ไมโครกรัม/เดซิลิตรซึ่งนำมาทำ dilution กับ pool serum ลิงปกติ อัตราส่วน 1:13 โดยดูดมา 400 ไมโครลิตร ต่อ pool serum ลิงปกติ 4.8 มิลลิลิตร จะได้ค่า T_4 ประมาณ 21ไมโครกรัม/เดซิลิตร ซึ่งเป็น stock pool serum ค่าสูงของลิง สำหรับ pool serum ค่ากลางของลิงมีค่า T_4 อยู่ในช่วง 6-7 ไมโครกรัม/เดซิลิตร และ pool serum ค่าต่ำของลิงได้จาก pool serum ลิงที่มีค่า T_4 อยู่ในช่วง 2-3 ไมโครกรัม/เดซิลิตร และมีค่า TSH สูง ส่วนการวิเคราะห์ฮอร์โมน T_3 ได้จากการเติมสารมาตรฐาน Stable T_3 (3, 5 , 3'-Triiodo-1-thyronine sodium salt : Sigma chemical company, England)ที่มีความเข้มข้น

216.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยดูด 20 ไมโครลิตรลงใน pool serum ลิงปกติ 2 มิลลิลิตร ซึ่งนำมาทำ dilution กับซีรั่มลิงปกติอีกครั้งในอัตราส่วน 1: 400 โดยดูดมา 5 ไมโครลิตรต่อซีรั่มลิงปกติ 1.5 มิลลิลิตรและทำให้เจือจางอีกทีด้วย hormone free serum อัตราส่วน1:1 จะได้ pool serum ค่าสูงของลิงที่มีความเข้มข้น 340 นาโนกรัม/เดซิลิตร สำหรับ pool serum ค่าต่ำของลิงมีค่า T_3 อยู่ในช่วง 95-105 นาโนกรัม /เดซิลิตร และ pool serum ค่าต่ำของลิงมีค่า T_3 อยู่ในช่วง 55-60 นาโนกรัม/เดซิลิตร นำ pool serum ที่ได้แบ่งเก็บใส่หลอดเล็กๆ ไว้เป็นส่วนๆ ตามที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนครั้งหนึ่งๆ ซึ่งการเตรียมซีรั่มที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพควรมีประมาณหรือเท่ากับรากที่ 2 ของจำนวนหลอดที่วิเคราะห์ทั้งหมด (n)

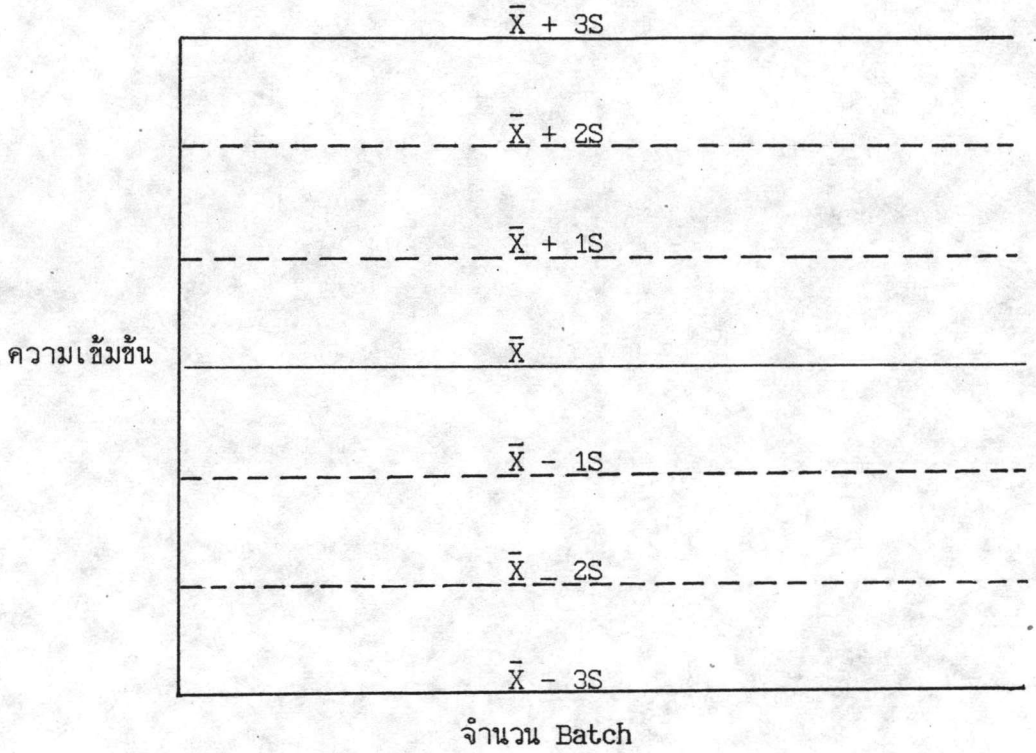
$$\text{จำนวนหลอดของ Q.C} = \sqrt{n}$$

ซีรั่มที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพนอกจากจะใช้ตรวจดูความแม่นยำของการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนชุดต่อชุด (between batch reproducibility) แล้วยังใช้ตรวจสอบ within batch drift ได้ดี

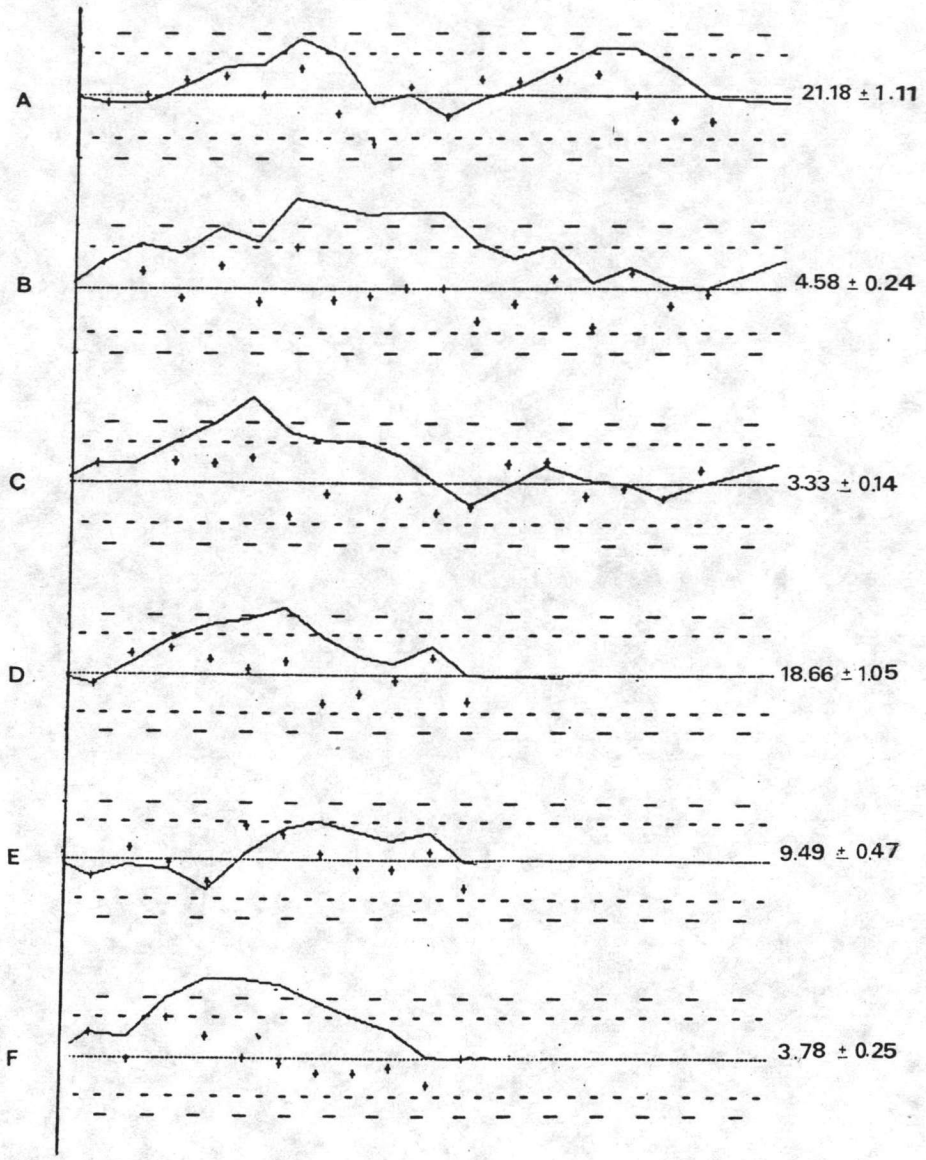
4.3.3 <u>แผนภูมิควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์ผลการทำเอสเสย์</u>

จุดประสงค์ของการทำแผนภูมิควบคุมคุณภาพ เพื่อเป็นเกณฑ์ในการตัดสินผลการวิเคราะห์ ของการทำเอสเสย์ฮอร์โมนในแต่ละครั้งว่ามีความแม่นยำหรือคลาดเคลื่อนไปจากการทำเอสเสย์ครั้งก่อนมากน้อยแค่ไหน เนื่องจากชุดวิเคราะห์สำเร็จรูปนี้ทำขึ้นเพื่อใช้กับซีรั่มคน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เตรียมซีรั่มสำหรับควบคุมคุณภาพทั้งของคนและลิงโดยวิธีดังกล่าว มาแล้วข้างต้น โดยแบ่งเป็นค่าสูง ค่ากลาง และค่าต่ำ ในการเอสเสย์แต่ละครั้งทำการเอสเสย์ซีรั่มที่ใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพนี้ 20 ครั้ง นำมาหาค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) แล้วสร้างแผนภูมิสำหรับควบคุมโดยกำหนดแกน Y เป็นค่าความเข้มข้นของค่าเฉลี่ย แกน X แสดงจำนวน batch จากนั้นจะกำหนดเส้น upper control limit ซึ่งคอยกำหนดว่าการเอสเสย์ครั้งหนึ่งค่าของสารควบคุมคุณภาพไม่ควรสูงกว่าเส้นนี้ และเส้น lower control limit กำหนดว่าค่าที่เอสเสย์ที่ได้ไม่ควรต่ำไปกว่าเส้นนี้ วิธีกำหนดเส้น 2 เส้นนี้โดยใช้ค่าเฉลี่ยเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ที่ได้จากการคำนวณโดยการใช้ข้อมูลชุดเดียวกับที่ใช้คำนวณค่าเฉลี่ย แล้วนำมาสร้างแผนภูมิควบคุมคุณภาพตามวิธีของ Westgard และคณะ (1981) ดังนี้

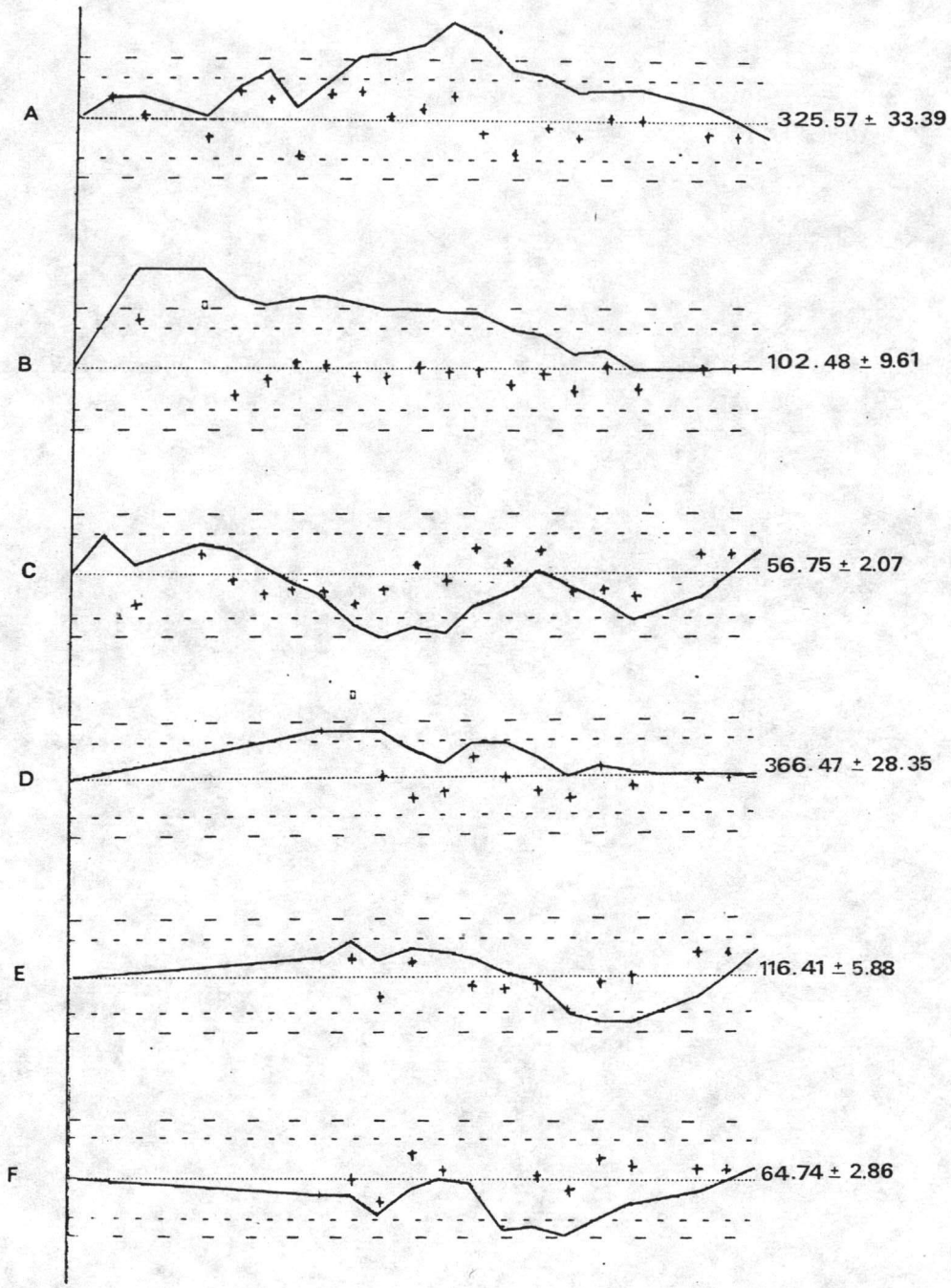
016596



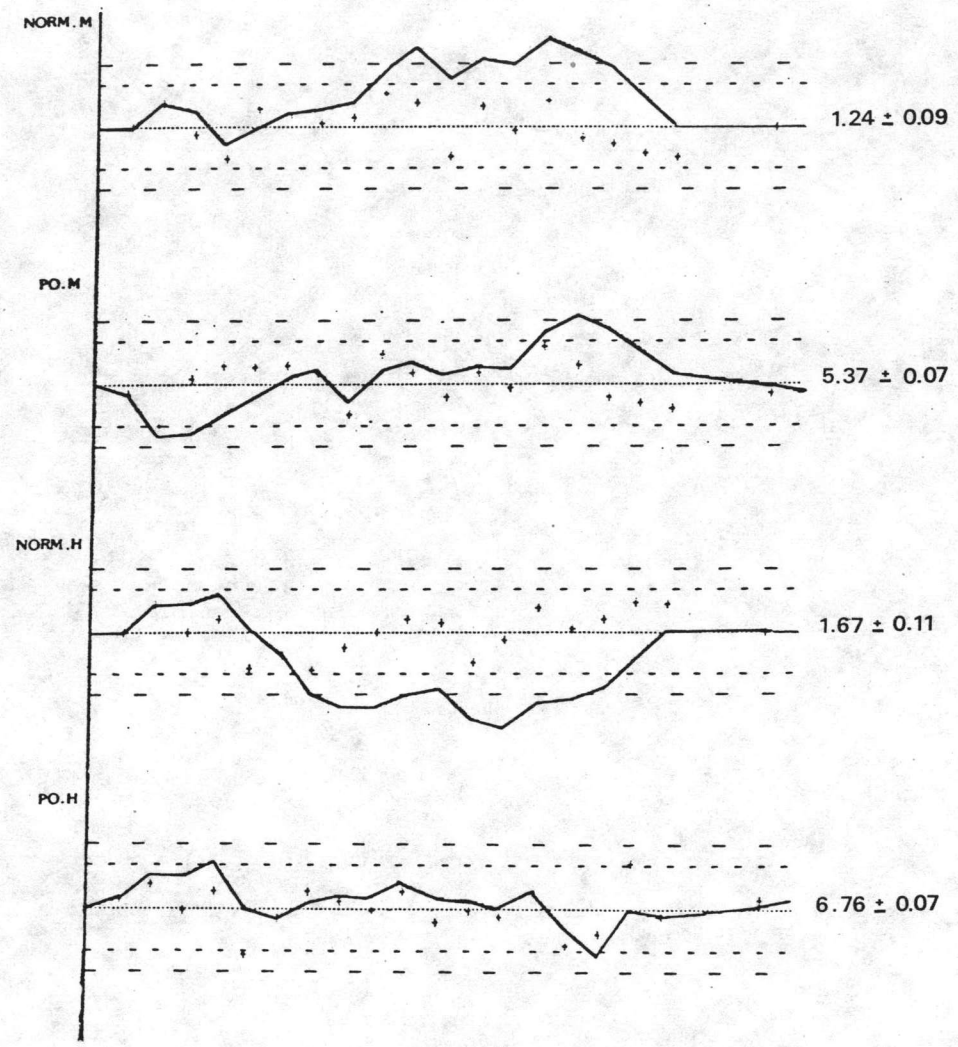
รูปที่ 2 การสร้างแผนภูมิควบคุมภาพตามวิธีของ Multi-rule Shewhart Chart



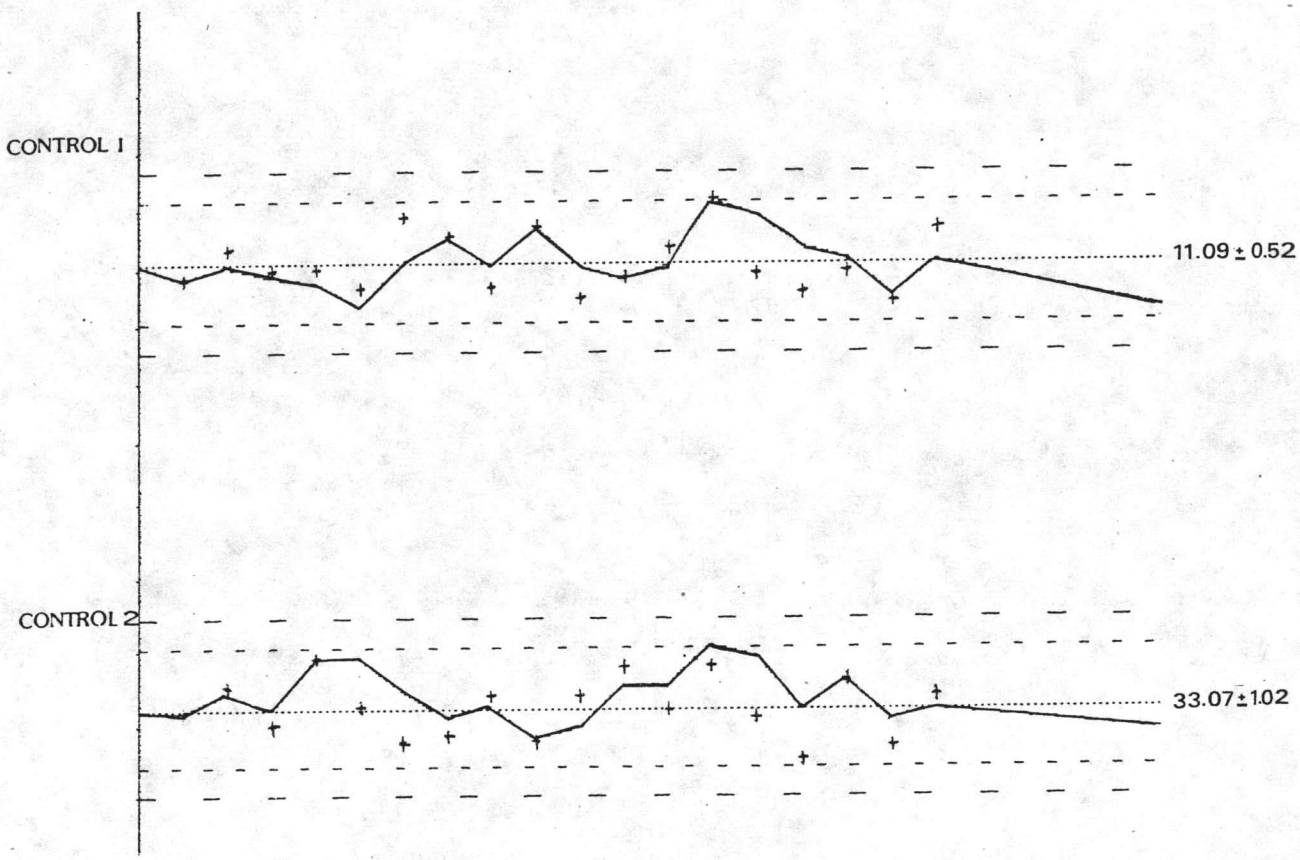
รูปที่ 3 แผนภูมิควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์หาฮอร์โมนธัยรอกซิน (ไมโครกรัม/เดซิลิตร) ค่าเฉลี่ย ± SD. (A = ค่าสูงของชีรั่มลิง, B = ค่ากลางของชีรั่มลิง, C = ค่าต่ำของชีรั่มลิง, D = ค่าสูงของชีรั่มคน, E = ค่ากลางของชีรั่มคน, F = ค่าต่ำของชีรั่มคน)



รูปที่ 4 แผนภูมิควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์หาฮอร์โมนไดรไอโอโดธัยโรนีน (นาโนกรัม/เดซิลิตร) ค่าเฉลี่ย ± SD. (A = ค่าสูงของชีรั่มลิง, B = ค่ากลางของชีรั่มลิง, C = ค่าต่ำของชีรั่มลิง, D = ค่าสูงของชีรั่มคน, E = ค่ากลางของชีรั่มคน, F = ค่าต่ำของชีรั่มคน)



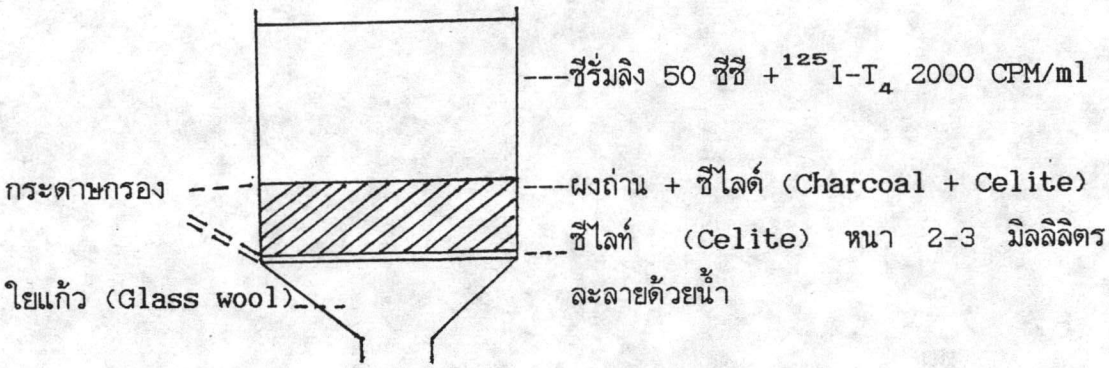
รูปที่ 5 แผนภูมิควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์หาฮอร์โมนธัยโรโทรฟิน (ไมโครอินเตอร์ยูนิต/มิลลิลิตร) ค่าเฉลี่ย ± SD. (NORM.M = ค่าปกติของซีรั่มสิง, PO.M = ค่าสูงของซีรั่มสิง, NORM.M = ค่าปกติของซีรั่มคน, PO.M = ค่าสูงของซีรั่มคน)



รูปที่ 6 แผนภูมิควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์หา ทีบีจี (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ค่าเฉลี่ย ± SD
(control 1 = สารควบคุมระดับต่ำ, control 2 = สารควบคุมระดับสูง)

4.3.4 การเตรียมซีรั่มที่ปราศจากฮอร์โมน (Homone Free Serum)

ตามวิธีของ NORTH EAST THAMES REGION IMMUNOASSAY UNIT (NETRIA) โดยใช้ซีรั่มของลิงหางยาวหลายตัวมารวมกัน แล้วนำมากรองผ่าน colunm ซึ่งเตรียมโดยใช้ disposable syringe 50 cc. ดังรูปที่1



รูปที่ 7 แสดงการเตรียมซีรั่มที่ปราศจากฮอร์โมน ตามวิธีของ NETRIA

จากรูปก่อนที่จะใส่ซีไลท์ และผงถ่านต่อซีไลท์ ต้องผสมน้ำก่อนเทลงใน column สำหรับสารผสมผงถ่านต่อซีไลท์ในอัตราส่วน 4:1 ซึ่งจะช่วยในการกรองดีขึ้นใช้ชาโค (Norit PNS) 8 กรัม ผสมกับซีไลท์ (Celite Hyflo- Super - Cel) 2 กรัมโดยใช้น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตรเป็นตัวทำละลายใช้แท่งแก้วคนจนกระทั่งสารทั้งสองผสมกันโดยใส่น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ก่อนเทลงใน column แล้วหล่อด้วยน้ำที่เหลืออีก 5 มิลลิลิตร ตั้ง column ทิ้งไว้จนกระทั่งน้ำบริเวณผิวบนสุดหายไปแต่ต้องระวังมิให้บริเวณผิวหน้าของ column แห้ง เพราะจะทำให้ column ที่ pack ไว้แตก แล้วจึงใส่ซีรั่มลิงหางยาว 50 มิลลิลิตรลงใน columnโดยเหลือไว้ 1 มิลลิลิตรสำหรับเติม ^{125}I-T_4 เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม ปริมาณน้ำที่ไหลออกมาจาก column ประมาณเท่าน้ำที่ใส่เข้าไป โดยสามารถทดสอบความแตกต่างระหว่างน้ำกับซีรั่มที่ไหลผ่าน column โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ salt ซึ่งเป็นสารทดสอบโปรตีนหยด ซึ่งถ้าสารที่หยดออกจาก column เป็นซีรั่มจะทำปฏิกริยากับสารนี้ได้ตะกอนขุ่น จึงเริ่มทำการเก็บซีรั่ม ส่วนที่เป็นน้ำที่ไหลออกมานำทิ้งไป ซึ่งตามวิธีของ NETRIA นี้สามารถกรอง endogenous hormones ออกได้อย่างน้อยที่สุด 98% นำซีรั่มที่ปราศจากฮอร์โมนที่เตรียมได้นี้ไปใช้ในการเตรียมสารควบคุมคุณภาพ ดังที่กล่าวมาแล้ว

4.3.5 <u>วิธีตรวจหาปริมาณฮอร์โมน T_4 และ T_3 โดยวิธี RIA</u>

การตรวจหาปริมาณฮอร์โมน T_4 และ T_3 โดยชื้อชุดวิเคราะห์สำเร็จรูปจากบริษัท Diagnostic Products Corporation Total T_4, Total T_3 Double antibody ก่อนลงมือทำวิเคราะห์ต้องเตรียมสารไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อน ยกเว้น precipitating solution และละลายซีรั่มในอุณหภูมิห้อง ทำซีรั่มให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยคว่ำหลอดขึ้นลง 2-3 ครั้ง และเตรียมหลอดทดลอง สำหรับ Total count, NSB (Nonspecific binding), Maximum binding และฮอร์โมนมาตรฐาน สำหรับ T_4 ซึ่งมีความเข้มข้นต่างกัน 6 ระดับ คือ 0, 1, 4, 10, 16 และ 24 ไมโครกรัม/เดซิลิตร และสำหรับ T_3 ซึ่งมีความเข้มข้นต่างกัน 6 ระดับ คือ 0, 20, 50, 100, 200, และ 600 นาโนกรัม/เดซิลิตร และเพื่อให้ครอบคลุมพิสัยของระดับฮอร์โมน T_3 ในซีรั่มของลิงได้ดี จึงเพิ่มความเข้มข้นที่ระดับ 300 นาโนกรัม/เดซิลิตร โดยการเจือจาง ความเข้มข้นที่ระดับ 600 นาโนกรัม/เดซิลิตร ด้วยความเข้มข้น 0 นาโนกรัม/เดซิลิตร อัตราส่วน 1:1 เพราะฉะนั้นความเข้มข้นที่ได้จะต่างกัน 7 ระดับ คือ 0, 20, 50, 100, 200, 300 และ 600 นาโนกรัม/เดซิลิตร และเตรียมหลอดทดลองสำหรับ QC และตัวอย่างซีรั่ม โดยเตรียมหลอดเอสเสย์ต่างๆ เหล่านี้ อย่างละ 2 หลอด

ดูดฮอร์โมนมาตรฐานที่ระดับ 0 ลงในหลอด NSB และ Maximum binding และฮอร์โมนมาตรฐาน ความเข้มข้นที่เหลือทั้งหมด, QC และตัวอย่างซีรั่มโดยในการหาปริมาณฮอร์โมน T_4 ใช้ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และ T_3 ใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้

เติมสารละลาย ^{125}I-T_4, ^{125}I-T_3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงทุกหลอด โดยใช้ repeating dispenser แล้วนำไปเขย่าเบาๆ ด้วย vortex mixer แยกหลอด total count ไว้ต่างหาก

เติมสารละลายแอนติบอดีของ T_4, T_3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงทุกหลอด ยกเว้น NSB แล้วนำไปเขย่าด้วย vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับ T_4 เป็นเวลา 20 นาที, T_3 เป็นเวลา 60 นาที

จากนั้นเติม cold precipitating solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงทุกหลอดแล้วนำไปเขย่าด้วย vortex mixer สำหรับ T_4 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ก่อนแล้วจึงนำไปปั่นที่ refrigerated centrifuge 15 นาที ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที จากนั้นเทคว่ำหลอดเอาส่วนของน้ำใสทิ้งโดยใช้ foam decanting rack คว่ำหลอดทิ้งไว้บนกระดาษซับ 10 นาที เพื่อให้ของเหลวที่เหลือติดอยู่ค่อยๆ ไหลซึมลงกระดาษซับหมด นำตะกอนที่ได้ไปหาปริมาณรังสี ในแกมมาเคาน์เตอร์ 1 นาที ต่อหลอดทดลอง

4.3.6. <u>วิธีตรวจหาปริมาณฮอร์โมน TSH โดยวิธี RIA</u>

การตรวจหาปริมาณฮอร์โมน TSH โดยชื้อชุดวิเคราะห์สำเร็จรูปจากบริษัท Diagnostic Products Corporation ชนิด NHS-TSH Double antibody ก่อนลงมือทำการวิเคราะห์ ต้องเตรียมสาร และเตรียมหลอดทดลอง เช่นเดียวกับ การวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน T_4 และ T_3 สำหรับฮอร์โมนมาตรฐาน TSH มีความเข้มข้นต่างกัน 7 ระดับ คือ 0, 1, 2, 5, 10, 20 และ 60 ไมโครอินเตอร์เนชั่นเนลยูนิต/มิลลิลิตร

ดูดฮอร์โมนมาตรฐานที่ระดับ 0 ลงในหลอด NSB และ Maximum binding และความเข้มข้นที่เหลือทั้งหมด, QC และตัวอย่างซีรั่ม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้

เติมสารละลายแอนติบอดี ของ TSH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลอดยกเว้นหลอด NSB, Total count โดยใช้ repeating dispenser นำไปเขย่าโดยใช้ vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน water bath เป็นเวลา 120 นาที

หลังจากนั้นเติมสารละลาย ^{125}I-TSH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลอดนำไปเขย่าด้วย vortex mixer แยกหลอด total count ไว้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน water bath เป็นเวลา 120 นาที

หลังจากนั้นเติม cold precipitating solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในทุกหลอด เขย่าด้วย vortex mixer นำไปปั่นที่ refrigerated centrifuge 15

นาที ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เทส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้ง โดยใช้ foam decanting rack และคว่ำหลอดไว้เพื่อให้ของเหลวที่เหลือไหลลงสู่กระดาษซับประมาณ 10 นาที โดยตบบริเวณก้นหลอดเบาๆ นำไปวัดหาปริมาณรังสี โดยใช้แกมมาเคาน์เตอร์ 1 นาที ต่อหลอดทดลอง หรือหลังจากเติมสารละลายแอนติบอดี ของ TSH 100 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ตลอดคืนเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องและป้องกันการระเหยของสารโดยใช้ parafilm ปิดระหว่างตั้งทิ้งไว้ตลอดคืน หลังจากนั้นเติมสารละลาย ^{125}I-TSH 100 ไมโครลิตร ทุกหลอด นำไปเขย่าด้วย vortex mixer แยกหลอด total count ไว้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม cold precipitating solution 1 มิลลิลิตร ทุกหลอด นำไปเขย่าด้วย vortex mixer นำไปปั่นที่ refrigerated centrifuge 15 นาที 3000 รอบต่อนาที เทส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้งโดยใช้ foam decanting rack และคว่ำหลอดไว้ 10 นาที นำไปหาปริมาณรังสี โดยใช้แกมมาเคาน์เตอร์ 1 นาที ต่อหลอดทดลอง

4.3.7. <u>วิธีตรวจหาปริมาณฮอร์โมน TBG โดยวิธี RIA</u>

การตรวจหาปริมาณฮอร์โมน TBG โดยซื้อชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป จากบริษัท Clinical Assays ชนิด Gamma DAb^{R} ^{125}I-TBG โดยใช้หลัก Sanwich ligand assay เนื่องจาก TBG เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ดังนั้น การจับของ anti-TBG antibodies กับ TBG ซึ่งโดยปกติจะไม่ขัดขวางการจับของ T_3 และ T_4 ต่อ TBG ด้วย ดังนั้นจะเป็นไปได้ว่า TBG จะจับกับ T_4 และ anti - TBG ในเวลาเดียวกัน ดังนั้นจึงใส่สารละลาย ^{125}I-T_4 ใน TBG standard หรือซีรั่ม ซึ่ง ^{125}I-T_4 จะ fixed จำนวน total T_4 ในหลอดทดลอง เพราะฉะนั้น tracer ที่จะจับกับ TBG จะเป็นส่วนของ total TBG ที่มีอยู่ในซีรั่ม ถ้าใส่ anti-TBG จำนวนที่เพียงพอลงในหลอดทดลอง จะจับกับ TBG ทั้งหมด precipitating antiserum ซึ่งเป็นแอนติบอดีตัวที่สองจะทำให้ตกตะกอนของ T_4-TBG-anti-TBG complex ซึ่ง TBG-bound tracer จะถูกแยกจาก tracer ที่เหลือทั้งหมด โดยนำหลอดทดลองไปปั่นแยก supernatant จะถูกเททิ้งไปและนำตะกอนที่ได้ไปวัดหาปริมาณรังสีโดยแกมมาเคาน์เตอร์

ก่อนจะทำการวิเคราะห์ TBG ต้องนำสารควบคุม และซีรั่ม มาทำให้เจือจาง ด้วยน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:41 โดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ต่อสารควบคุมหรือซีรั่ม 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเขย่าเบา ๆ ไม่ให้เกิดฟอง เตรียมหลอดทดลองสำหรับ Total count,

Blank (0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สารมาตรฐานความเข้มข้น 5, 10, 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารควบคุมระดับ I (ต่ำ), สารควบคุมระดับ II (สูง) และสารตัวอย่างซีรั่ม อย่างละ 2 หลอด

ดูด Blank, สารมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ, สารควบคุมที่เจือจางแล้ว และตัวอย่างซีรั่มที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้

เติมสารละลาย ^{125}I-T_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงทุกหลอด แยกหลอด total count ไว้ต่างหาก หลังจากนั้นเติม sheep anti-TBG serum ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงทุกหลอด เขย่าเบา ๆ ด้วย วิธีเขย่า test tube rack ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

หลังจากนั้นเติม precipitating antiserum ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วย vortex mixer ความเร็วต่ำๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 2-27 องศาเซลเซียสใน refrigerated centrifuge 15 นาทีที่ความเร็ว3000 รอบต่อนาที เทส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้ง ตั้งทิ้งไว้บนกระดาษซับให้ส่วนของเหลวที่เหลือไหลซึมลงหมด นำไปหาปริมาณรังสี โดยแกมมาเคาน์เตอร์เป็นเวลา 1 นาที

4.4. การวิเคราะห์หาปริมาณเอสตราไดออล, เทสทอสเตอโรน และโปรเจสเตอโรน โดยวิธีเรดิโออิมมิวในเอสเสย์

4.4.1. 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 ให้อยู่ 7.2-7.4 แล้วเติม น้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 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 องศาเซลเซียส ตลอดเวลาที่ใช้

3. Counting solution

ละลาย PPO (2,5 diphenyloxazole) 15 กรัม, Dimethyle POPOP 0.9 กรัม ใน Toluene 3 ลิตร และ dioxane 600 มิลลิลิตร นำไปปั่น ให้ละลายให้เข้ากันดีแล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

4. สารละลายฮอร์โมนมาตรฐาน

เตรียมโดยใช้ฮอร์โมนมาตรฐานเอสตราไดออล เทสทอสเตอโรน และโปรเจสเตอโรน จาก Stock solution ที่มีความเข้มข้น 150, 220 และ 250 พิโคโมล/มิลลิลิตร ปิเปตมา 100 ไมโครลิตร เป่าแห้งแล้วเติม assay buffer 10 มิลลิลิตร จากนั้น ทำ serial dilution ของฮอร์โมนมาตรฐานเอสตราไดออล ให้มีความเข้มข้น 750, 375, 187, 93, 46 และ 23 เฟมโตโมล/500 ไมโครลิตร

เทสทอสเตอโรนให้มีความเข้มข้น 1110, 550, 275, 138, 69 และ 34 เฟมโตโมล/500 ไมโครลิตร

โปรเจสเตอโรนให้มีความเข้มข้น 1250, 625, 313, 156, 78 และ 39 เฟมโตโมล/500 ไมโครลิตร

5. สารละลายฮอร์โมนติดสลากรังสี

เตรียมโดยใช้ stock tracer ซึ่งมีปริมาณกัมมันตภาพรังสี จำนวน 10 ไมโครคูรี่/มิลลิลิตร ดูดมา 100 ไมโครลิตร ระเหยให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วเติม assay buffer10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ working tracer ซึ่งมีปริมาณกัมมันตภาพรังสี 100 นาโนคูรี่/มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

6. สารละลายแอนติบอดี

เตรียมโดยใช้แอนติบอดี ซึ่งอยู่ในสภาพที่ระเหยแห้ง จากองค์การอนามัยโลกนำมาเติม assay buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายแล้วใช้ทันที

4.4.2. วิธีการตรวจหาปริมาณฮอร์โมน เอสตราไดออล, เทสทอสเตอโรน และโปรเจสเตอโรน โดยวิธี RIA

การสกัดซีรั่ม

เอาตัวอย่างซีรั่มที่แช่แข็งออกมาทำให้ละลายแล้วดูดลงในหลอดทดลองที่ใช้ ในการสกัด โดยใช้ปริมาณตัวอย่างซีรั่ม ดังนี้คือ

การหาเอสตราไดออล ปริมาณซีรั่มลิงเพศเมีย โดยปกติใช้ประมาณ 250 ไมโครลิตร สำหรับลิงเพศเมียที่มีอายุ 1 ถึง 3 ปี ต้องใช้ปริมาณซีรั่มถึง 500 ไมโครลิตรต่อหลอดทดลอง

การหาเทสทอสเตอโรน ปริมาณซีรั่มลิงเพศผู้ โดยปกติใช้ประมาณ 10 ไมโครลิตร สำหรับลิงเพศผู้ที่มีอายุ 1 ถึง 3 ปี ต้องใช้ปริมาณซีรั่มถึง 50 ไมโครลิตรต่อหลอดทดลอง

การหาโปรเจสเตอโรน ปริมาณซีรั่มลิงเพศเมียที่คาดว่าจะเป็น luteal phase ใช้ 50 ไมโครลิตร และในช่วงที่จะเป็น follicular phase ใช้ 100 ไมโครลิตร ต่อหลอดทดลอง

ดูดตัวอย่างซีรั่มลงในหลอดทดลองอย่างละ 2 หลอด รวมทั้งซีรั่มสำหรับควบคุมคุณภาพของวิเคราะห์ และเพื่อหา recovery ของการสกัด โดยเติม working tracer 50 ไมโครลิตร ลงในซีรั่ม 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม อีเทอร์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงแต่ละหลอด แล้ว vortex mix นาน 1 นาที แช่แข็งส่วนที่เป็นซีรั่ม ซึ่งอยู่ส่วนล่างของหลอดทดลองในเอทานอลกับน้ำแข็งแห้ง รินส่วนของอีเทอร์ ลงในหลอดทดลอง แล้วนำไปทำให้แห้ง โดยใช้ driblock heater ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสนำหลอดทดลองที่ทำให้อีเทอร์แห้งสนิทมาเติม assay buffer 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วย vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที และ vortex mix อีกครั้ง ก่อนนำหลอดทดลองนี้ไปทำ RIA ต่อไป ส่วนหลอดที่หา recovery ของการสกัด ปิเปต 250 ไมโครลิตรลง vial

วิธีการเอสเสย์

เติมสารละลายฮอร์โมนติดสลากรังสี 100 ไมโครลิตร ลงใน counting vial เพื่อหา total count และหลอดเอสเสย์ทุกหลอด รวมทั้ง NSB, B_o และฮอร์โมนมาตรฐาน ความเข้มข้นต่าง ๆ และเติมแอนติบอดี 100 ไมโครลิตรลงทุกหลอดยกเว้น NSB นำไป vortex mix ตั้งทิ้งไว้ 18-24 ชั่งโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำออกมาแช่ในอ่างน้ำแข็งเติม charcoal suspension จำนวน 200 ไมโครลิตร ซึ่งตลอดเวลาในการดูด ต้องปั่นให้เข้ากันและวางอยู่บนถาดน้ำแข็งตลอดเวลา (ยกเว้น total count) เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งอีก 15 นาที นำไปปั่นที่ refrigerated centrifuge ที่ 2000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที รินส่วนใสลงใน vial และนำไปเติม scintillation fluid 5 มิลลิลิตร รวมทั้ง recovery vial ด้วย นำไป vortex mix อีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปเข้าเครื่องหาปริมาณรังสีโดยใช้เบต้าเคาน์เตอร์ 5 นาที ต่อ vial

4.5. การคำนวณผลทางเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์

โดยใช้คอมมพิวเตอร์โปรแกรม S.A.S. Immunoassay program (A5.1) by P.R Edwards, Molecular Endocrinology Midlesex Hospital 1/5/88 pc Version for MS. Dos 2.1-3.2 with both single binding site & logistic fitters

4.6. การประเมินความเชื่อถือได้ของการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์

4.6.1. การประเมินความเชื่อถือได้ของชุดวิเคราะห์ฮอร์โมน T_4, T_3 TSH และ TBG (Ekin 1981, Wilkins et al, 1977.)

1. การทดสอบความสามาถในการหาปริมาณสารจำนวนที่น้อยที่สุด (Sensitivity)

โดยคำนวณจาก dose response curve จากทุกความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ทดสอบ พิจารณาความไวของการเอสเสย์ โดยดูจากค่า SD เมื่อความเข้มข้นของฮอร์โมนเป็นศูนย์

1.1. ความไวของการตรวจวัด T_4 มีค่า = 0.13 ไมโครกรัม/เดซิลิตร

1.2. ความไวของการตรวจวัด T_3 มีค่า = 2.23 นาโนกรัม/เดซิลิตร

1.3. ความไวของการตรวจวัด TSH มีค่า = 0.08 ไมโครอินเตอร์ยูนิต/มิลลิลิตร

1.4. ความไวของการตรวจวัด TBG มีค่า = 0.14 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. การทดสอบความจำเพาะของปฏิกริยา (specificity)

เป็นการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ใช้ ซึ่งจะต้องมีปฏิกริยาเฉพาะกับสารที่ต้องการวัดปริมาณเท่านั้น โดยไม่ถูกรบกวนโดยสารอื่น ซึ่งทำได้โดยการหา cross reaction ระหว่างแอนติบอดี ที่ใช้กับสารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับสารที่ต้องการวัดปริมาณซึ่งชุดวิเคราะห์ฮอร์โมนต่างๆ ได้มีการตรวจสอบไว้เป็นที่เรียบร้อยแล้วตามตาราง 1, 2, 3, และ 4

ตารางที่ 1 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดี T_4

สารที่ทดสอบ	% cross reaction
L - Thyroxin	100
D - Thyroxin	100
Tetraiodothyroacetic acid	7.4
Triodo - L - thyronine	4.0
Triiodo - D - thyronine	9.7
Diiodo - L - tyrosine	0.058
Monoiodotyrosine	0.36
Methimazole	0.42
5, 5 - Diphenylhydantion	0.051
Phenylbutazone	0.059
6 -n-Propyl-2-thiouracil	0.42
Triiodothyroacetic acid	0.62

ตารางที่ 2 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดี ของ T_3

สารที่ทดสอบ	% cross reaction
Triodo - L - thyronine (T_3)	100
L - thyroxine (T_4)	0.086
D - thyroxine	0.92
Tetraiodothyroacetic acid	0.55
Monoiodotyrosine	0.02
3, 5 - Diiodo-L-tyrosine	0.03
5, 5'- Diphenylhydantion	0.02
Phenylbutazone	0.01
Methimazole	0.06
6 -n-Propyl-2-thiouracil	0.002

ตารางที่ 3 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดี ของ TSH

สารที่ทดสอบ	% cross reaction
TSH	100
FSH	2.1
LH	0.3
HCG	0.00004

ตารางที่ 4 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดี ของ TBG

Compound	Amount Added	TBG Value (ug/ml)	Percent (%) Recovery
Aspirin	0 ug/ml	23.8	-
	2 ug/ml	25.8	108
	20 ug/ml	26.0	109
	200 ug/ml	24.0	101
Dilatin	0 ug/ml	23.8	-
	2 ug/ml	24.2	102
	20 ug/ml	24.1	101
	200 ug/ml	25.3	106
Valium	0 ug/ml	23.8	-
	1 ug/ml	25.0	105
	10 ug/ml	23.5	99
	100 ug/ml	22.9	96
Thyroxine	0 ug/dl	17.5	-
	1 ug/dl	17.5	100
	4 ug/dl	17.8	102
	8 ug/dl	19.0	109
	12 ug/dl	16.8	96
	20 ug/dl	17.6	101

3. ความแม่นยำในการวัด (precision)

การตรวจสอบความแม่นยำโดยการตรวจวัดหลายๆ ครั้ง แล้วคิดหาค่าความแม่นยำจากเปอร์เซนต์สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (% CV) ซึ่งมีอยู่ 2 ส่วน คือ ภายใน การตรวจวัดครั้งเดียว (Intra-assay) และระหว่างการตรวจวัดหลายครั้ง (Interassay) ทำได้โดยนำ Pool serum สำหรับควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนซึ่งมีความเข้มข้น 3 ระดับคือ ต่ำ กลาง และสูง มาทำการตรวจสอบหาปริมาณฮอร์โมนพร้อมกันไปกับการหาปริมาณฮอร์โมนในตัวอย่างซีรั่ม

$$\% \text{ CV} = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสาร (SD) X 100}}{\text{มัชฌิมเลขคณิต } (\overline{X})}$$

ตารางที่ 5 แสดงความแม่นยำของการตรวจวัด T_4

Interassay ของการเอสเสย์ 9 Batch

Sample	Mean ± SD (ไมโครกรัม/ดล.)	% CV
ค่าสูง (ลิง)	21.18 ± 1.11	5.25
ค่ากลาง (ลิง)	4.58 ± 0.24	5.13
ค่าต่ำ (ลิง)	3.33 ± 0.14	4.25
ค่าสูง (คน)	18.33 ± 1.05	5.65
ค่ากลาง (คน)	9.49 ± 0.47	4.95
ค่าต่ำ (คน)	3.78 ± 0.25	6.57

Intraassay ของการเอสเสย์ตัวอย่างซีรั่มลิง 10 ตัวอย่าง

Sample	Mean ± SD (ไมโครกรัม/ดล.)	% CV
ค่าสูง	21.83 ± 1.36	6.22
ค่ากลาง	4.73 ± 0.16	3.36
ค่าต่ำ	3.27 ± 0.18	5.46

ตารางที่ 6 แสดงความแม่นยำของการตรวจวัด T_3

Interassay ของการเอสเสย์ 10 Batch

Sample	Mean±SD(นาโนกรัม/ดล.)	% CV
ค่าสูง (ลิง)	325.57 ± 33.39	10.26
ค่ากลาง (ลิง)	102.48 ± 9.61	9.38
ค่าต่ำ (ลิง)	56.75 ± 2.07	3.65
ค่าสูง (คน)	366.47 ± 28.35	7.73
ค่ากลาง (คน)	116.41 ± 5.86	5.05
ค่าต่ำ (คน)	64.74 ± 2.86	4.42

Intraassay ของการเอสเสย์ตัวอย่างซีรั่มลิง 10 ตัวอย่าง

Sample	Mean±SD (นาโนกรัม/ดล.)	% CV
ค่าสูง	363.03 ± 27.76	7.65
ค่ากลาง	94.36 ± 7.51	7.96
ค่าต่ำ	55.74 ± 2.22	3.98

ตารางที่ 7 แสดงความแม่นยำของการตรวจวัด TSH

Interassay ของการเอสเสย์ 9 Batch

Sample	Mean±SD(ไมโครอินเตอร์ยูนิต/มล.)	% CV
ค่ากลาง (ลิง)	1.24 ± 0.087	7.02
ค่าต่ำ (ลิง)	5.37 ± 0.075	1.45
ค่ากลาง (คน)	1.67 ± 0.11	6.59
ค่าต่ำ (คน)	6.76 ± 0.075	1.11

Intraassay ของการเอสเสย์ตัวอย่างซีรั่ม 10 ตัวอย่าง

Sample	Mean±SD(ไมโครอินเตอร์ยูนิต/มล.)	% CV
ค่ากลาง (ลิง)	1.33 ± 0.067	5.04
ค่าต่ำ (ลิง)	5.36 ± 0.096	1.79
ค่ากลาง (คน)	1.61 ± 0.11	6.53
ค่าต่ำ (คน)	6.79 ± 0.086	1.27

ตารางที่ 8 แสดงความแม่นยำของการตรวจวัด TBG

Interassay ของการเอสเสย์ 1 Batch

Sample	Mean±SD (ไมโครกรัม/มล.)	% CV
Control 1	11.09 ± 0.52	4.71
Control 2	33.07 ± 1.02	3.08

Intraassay ของการเอสเสย์ตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง

Sample	Mean±SD (ไมโครกรัม/มล.)	% CV
Control 1	11.13 ± 0.49	4.39
Control 2	33.03 ± 1.03	3.12

4.6.2. การประเมินความเชื่อถือได้ของการวิเคราะห์หาเอสตราไดออล, เทสทอสเตอโรน และโปรเจสเตอโรน
ตามวิธีของ Ekins (1970) และ Abraham (1974)

1. ความไว (Sensitivity) ทำเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ในหน้า 28 ดังแสดงไว้ในตารางที่ 12

2. ความจำเพาะ (Specificity)

ทำเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งได้มีการตรวจสอบไว้เรียบร้อยแล้ว โดยองค์การอนามัยโลก ตามตารางที่ 9, 10, 11

ตารางที่ 9 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดี ของเอสตราไดออล

สารที่ทดสอบ	% cross reaction
Estradiol	100
Estriol	0.8
Estrone	< 0.02
Cortisol	< 0.02
Progesterone	0.02
Testosterone	< 0.02

ตารางที่ 10 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีของเทสทอสเตอโรน

สารที่ทดสอบ	% cross reaction
Testosterone	100
Cortisol	0.0001
5 α-Dihydrotestosterone	14
4 -Androstenedione	1.8
5 α-Androstanediol	6
5 -Androstenediol	2.1

ตารางที่ 11 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดี โปรเจสเตอโรน

สารที่ทดสอบ	% cross reaction
Progesterone	100
Cortisol	0.005
Testosterone	0.1
17 α-Hydroxyprogesterone	1.0
20 α-Dihydrotestosterone	2.7

3. ความแม่นยำ (precision)

ทำเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้นในหน้า 32 ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ทดสอบความแม่นยำของการวัด โดยใช้ pool serum ของลิงซึ่งทราบค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนที่แน่นอนแล้วนำมาวิเคราะห์หาความแม่นยำของฮอร์โมนเอสตราไดออล , เทสทอสเตอโรน และโปรเจสเตอโรน ทั้ง Intra-assay อย่างละ 10 ตัวอย่าง และ Interassay ของการทดลอง 5, 1 และ 4 ครั้ง ตามลำดับ ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 12

4. ความถูกต้อง (accuracy)

ความถูกต้องของการวิเคาะห์หาได้จากการนำสารหรือฮอร์โมนที่ทราบปริมาณที่แน่นอน ทำการวิเคราะห์หาปริมาณแล้วเทียบกับปริมาณฮอร์โมนที่แท้จริง คิดออกมาเป็นเปอร์เซนต์ ก็จะทราบเปอร์เซนต์ ความถูกต้องของการวิเคราะห์

$$\% \text{ ความถูกต้อง} = \frac{\text{ค่าฮอร์โมนที่ตรวจวัดได้ X 100}}{\text{ค่าฮอร์โมนจริง}}$$

ทำโดยดูดฮอร์โมนมาตรฐาน เอสตราไดออล = 100 เฟมโตโมล/100 ไมโครลิตร, เทสทอสเตอโรน = 100 เฟมโตโมล/100 ไมโครลิตร และโปรเจนเตอโรน 100 เฟมโตโมล/100ไมโครลิตร สกัดด้วยอีเทอร์ 5 มล. นาน 1 นาที นำไปผ่านขบวน

การทาง RIA ซึ่งจะทำ การตรวจวัดความถูกต้องของการเอสเสย์ ฮอร์โมนครั้งละ 10 ตัวอย่าง ของการทดลอง 5, 1 และ 4 ครั้ง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 12

ประสิทธิภาพในการวัด เนื่องจากในการตรวจวัดสเตียร์ฮอร์โมน จะต้องเป็นขั้นตอนการสกัดด้วย ไดเอธิลอีเทอร์ ดังนั้นจึงต้องทดสอบความสามารถในการสกัดของ ไดเอธิลอีเทอร์ที่ใช้ด้วย โดยทำไปพร้อมกับการตรวจวัดปริมาณของตัวอย่างดังที่กล่าวมาแล้ว (ทำ 6 หลอด ต่อการตรวจวัด 1 ครั้ง) ซึ่งนำมาคำนวณหาประสิทธิภาพ ในการสกัดได้จาก

$$\frac{\text{ค่าเฉลี่ย CPM ของ RCE (Recovery)}}{\text{ค่าเฉลี่ย CPM ของ TCR (Total count recovery)}} \times 100\ \%$$

ซึ่งประสิทธิภาพในการสกัดของการตรวจวัด เอสตราไดออล 81.74 ± 1.61 % เทสทอสเตอโรน 81.7 และโปรเจสเตอโรน 83 ± 1.69 %

ตารางที่ 12 แสดงความแม่นยำ ความไว และความถูกต้อง ของการวิเคราะห์หาสเตียร์รอยด์ฮอร์โมน

ฮอร์โมน	ความแม่นยำ (%cv)		ความถูกต้อง (%)	ความไว (fmol/tube)
	Intra-assay	Interassay		
เอสตราไดออล	16.4	8.13	82	10.55
เทสทอสเตอโรน	5.64	-	81.7	5.33
โปรเจสเตอโรน	10.11	19.5	82	3.49

4.7. การวิเคราะห์และแปลผลทางสถิติ

ผลการทดลองรายงานในรูปของค่าเฉลี่ย ± SEM (ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

ของค่าเฉลี่ย) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างฮอร์โมน T_4, T_3, TSH, TBG และโปรเจสเตอโรน, เอสตราไดออล ในช่วงที่คาดว่าจะเป็น follicular phase กับ luteal phase โดยใช้ Hypothesized test : pooled estimate of Variance: difference between two groups Means เปรียบเทียบปริมาณฮอร์โมน T_4, T_3, TSH และ TBG ในลิงช่วงอายุต่าง ๆ โดยใช้ Anova หาความสัมพันธ์ของ T_4, T_3, TSH, TBG, และ โปรเจสเตอโรน, เอสตราไดออล, เทสทอสเตอโรน โดยใช้ Correlation Coefficient (r)