บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และการทดลอง

วัสดุ

สัตว์ทดลอง

ใช้สัตว์ทดลอง 2 ชนิด คือ

1. หนูแรท (Rattus nonvigicus) พันธุ์วิสตาร์ เพศเมีย โตเต็มวัย อายุ 90-120 วัน
2. หนูไมซ์ (Mus musculus) พันธุ์สวิส เพศผู้ อายุ 24 วัน

สถานที่เลี้ยง

หนูแรทเลี้ยงในเรือนเลี้ยงหนูของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งปรับอากาศให้อุณหภูมิห้องประมาณ 25 °ซ. และควบคุมแสงสว่างวันละ 14 ชั่วโมง ระหว่างเวลา 6.00-20.00 น. ด้วยเครื่องควบคุมอัตโนมัติพร้อมทั้งให้อาหารและน้ำดื่มตลอดเวลา

หนูไมซ์ สั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

สารเคมี

charcoal reagent	: WHO RIA reagent programme, Switzerland
dextran reagent	: WHO RIA reagent programme, Switzerland
diethyl ether	: E. Merk, Germany
dioxane	: E. Merk, Germany
disodium hydrogen phophate (anhydrous)	: E. Merk, Germany
ethanol	: E. Merk, Germany
gelatin	: Difco laboratories, USA
POPOP (1,4-bis [5-phenyl-2 oxazolyl] benzone; 2,2-P-phenylene-bis [5-phenyloxazole])	: Sigma chemical company, USA
PPO (2,5-diphenyl oxazole)	: Sigma chemical company, USA

sodium chloride : E. Merk, Germany

sodium dihydrogen phosphate (anhydrous) : E. Merk, Germany

thimerosal : Sigma chemical company, USA

toluene : E. Merk, Germany

ฮอร์โมนและแอนติบอดี

estradiol benzoate E-8515 : Sigma chemical company, USA

Luteinzing Hormone standard AFP 5551B : NIADDK NIH Bethesda, MD

progesterone P-0130 : Sigma chemical company, USA

Suprefact : โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

testosterone antisera : WHO RIA reagent programme, Switzerland

testosterone standard (220n mol/L) : WHO RIA reagent programme, Switzerland

(1,2,6,7, ^{3}H) testosterone : WHO RIA reagent programme, Switzerland

ฮอร์โมนสังเคราะห์โดย รศ.ดร. สุกัญญา วีรวัฒนะกุมพะ

D-Ala^{6} GnRH

D-Ala^{6} Pro^{9} ethylamide GnRH

D-Ala^{6} Pro^{9} diethylamide GnRH

อุปกรณ์

Beta liquid scintillation counter (model 1218-811) : Wallac, Finland

Pri-block heater (model DB-3) : Tecam laboratory and industrial equipment, USA

Dubnoff incubator shaker (model 3575-1) : Labline instrument Inc., USA

Dynac centrifuge : Clay-Adam, Bectom-Dickenson company, USA

magnetic stirror (model S-18520) : Thermoline corporation, USA

micropipette (model 3130) : Eppendorf, Germany

(pipette gun) : Clay-Adams, USA

(pipette man M81)	: Gilson, France
pH meter (model 5985)	: Cole-Parmer instrument equipment, USA
refrigerated centrifuge (model PR-J)	: International equipment company, USA
Vortex miner (model M-16715)	: Thermolyne corporation, USA

การทดลอง

1. การสังเคราะห์ GnRH

GnRH ที่นำมาทดสอบนี้ได้มาจากการสังเคราะห์โดย รศ.ดร.สุกัญญา วีรวัฒนะกุมพะ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสังเคราะห์ GnRH โดยใช้เครื่อง 9050 Peptide Synthesizer ของ MiliGen โดยขั้นตอนแรกจะนำกรดอะมิโน 9 ตัวมาเรียงต่อกัน โดยเรียงลำดับกรดอะมิโน 9-8-7-6-5-4-3-2-1 ส่วนกรดอะมิโนตัวที่ 10 จะติดกับ resin ซึ่งจะบรรจุในคอลัมน์ เมื่อเปิดเครื่องเครื่องจะดูดสารเคมีละลายกรดอะมิโนตัวที่ 9 แล้วดูดเข้าไปทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนตัวที่ 10 ซึ่งต่อกับ resin ทำให้เกิดพันธะเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโนตัวที่ 10 กับกรดอะมิโนตัวที่ 9 เมื่อเสร็จแล้วเครื่องก็จะดูดสารละลายกรดอะมิโนตัวที่ 8 เข้าไปทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนตัวที่ 9 ทำให้เกิดพันธะเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโนตัวที่ 9 กับกรดอะมิโนตัวที่ 8 จะทำเช่นนี้ต่อไปตามลำดับจนถึงกรดอะมิโนตัวที่ 1 ก็จะได้ GnRH ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 10 ตัวต่อกับ resin จากนั้นแยก GnRH ออกจาก resin โดยใช้กรด TFAC (Tri fluoro acetic acid) นำไปกรองได้ Peptide solution แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี chromatography แล้วจะนำโปรตีนพีคไประเหยแห้งด้วยเครื่อง lyophilizer จะได้ผง peptide ออกมา

2. การตัดรังไข่

ทำการสลบหนูโดยใช้อีเธอร์ จับหนูนอนตะแคงแล้วใช้กรรไกรปลอดเชื้อเปิดชั้นผิวหนังและชั้นกล้ามเนื้อตรงบริเวณรังไข่ ทำการตัดรังไข่แล้วเย็บให้เรียบร้อย ต่อจากนั้นจับหนูพลิกไปอีกข้างหนึ่ง แล้วทำซ้ำเหมือนเดิม แล้วปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลา 1 เดือน

3. การละลายฮอร์โมนเอสตราไดออลเบนโซเอท และโปรเจสเตอโรน

นำฮอร์โมนมาละลายในแอลกอฮอล์ก่อน จากนั้นจึงเติมน้ำมันมะกอกในปริมาณที่มีความเข้มข้นที่ต้องการ แล้วจึงทำการระเหยแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 40 $^{\circ}$C

4. การฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลเบนโซเอท และโปรเจสเตอโรน

นำหนูที่ตัดรังไข่เป็นระยะเวลานาน 1 เดือน มาทำการฉีดเอสตราไดออลเบนโซเอท ขนาด 50 ไมโครกรัมต่อตัว และโปรเจสเตอโรน 25 มิลลิกรัมต่อตัว เข้าทางใต้ผิวหนัง และปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 3 วัน

5. การฉีด GnRH analogs

ทำการฉีด GnRH analogs เข้าที่เส้นเลือดดำที่หาง โดยมีแผนการทดลอง ดังนี้

ตารางที่ 1 แผนการทดลอง

กลุ่มทดลอง	กลุ่มควบคุม
1. ฉีด D-Ala^{6} GnRH 100 ng/rat จำนวน 10 ตัว	ฉีดน้ำเกลือ จำนวน 10 ตัว
2. ฉีด D-Ala^{6} Pro^{9} ethylamide GnRH 100 ng/rat จำนวน 10 ตัว	
3. ฉีด D-Ala^{6} Pro^{9} diethylamide GnRH 100 ng/rat จำนวน 10 ตัว	

6. การทำ Cardiac Puncture

หลังจากฉีด GnRH analogs 15 นาที ทำการเก็บซีรัมโดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 2.5 มิลลิลิตร เจาะเลือดทางหัวใจประมาณ 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำเลือดที่ได้ไปปั่นที่ 1,500 รอบต่อนาที ที่ 4 °C นาน 15 นาที เพื่อเก็บซีรัมนำไปหาปริมาณของ LH ซีรัมที่เก็บได้ประมาณ 1 มิลลิลิตร

7. การตรวจวัดหาปริมาณ LH โดยวิธีไบโอแอสเสย์ (BA)

การตรวจวัดหาปริมาณ LH โดยวิธี BA นี้ใช้วิธี Mouse leydig cells bioassay for LH (Dufau et. al., 1976) ซึ่งเป็นที่นิยมและเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลาย วิธีการนี้อาศัยคุณสมบัติของ LH ที่มีผลกระตุ้นเซลล์เป้าหมาย คือ leydig cells ของอัณฑะ (in vitro) ให้สร้างฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนมากน้อยตามปริมาณของ LH ที่ปรากฏ การวัดค่าฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนนี้ จึงสามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ปริมาณ LH ในสารตัวอย่างที่ต้องการทราบได้

การเตรียมอาหารเลี้ยง Leydig cell (M199)

ละลาย	M199	0.992	กรัม
	HEPES	0.596	กรัม
	โซเดียมไบคาร์บอเนต	0.035	กรัม
	สารละลายเพนนิซิลิน-สเตรพโตมัยซิน	1	มิลลิลิตร

ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.3-7.4 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร กรองอาหารเลี้ยงเซลล์ผ่าน Millipore ขนาด 0.22 μ เก็บไว้ที่ 4 °C ทุกครั้งที่ใช้นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาเติม 0.2% BSA

การเตรียมสารละลาย LH มาตรฐาน

นำ Ovine LH NIADDK-OLH-26 10 มิลลิกรัม มาละลายน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จะมีความเข้มข้นเป็น 1 มิลลิกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร ทำ aliquot ไว้ tube ละ 1 มิลลิกรัมต่อ 100 ไมโครลิตรได้ 7 หลอด นำ 1 aliquot มา 50 ไมโครลิตร มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อ 50 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเป็น 5 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด เป็น working solution นำมา 1 หลอด นำมา 50 ไมโครลิตร มีความเข้มข้นเป็น 5,000 นาโนกรัมต่อ 50 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์จนได้ 1 มิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 500 นาโนกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร

ตารางที่ 2 การเจือจางแบบอนุกรมของสารละลาย LH มาตรฐาน

ลำดับที่	สารละลาย LH มาตรฐาน		M199	ความเข้มข้นที่ได้
	ความเข้มข้นที่ใช้	ปริมาตรที่ใช้ (μl)	(μl)	(ng / 100 μl)
1	500 ng / 100 μl	1,000	–	500.00
2	ลำดับที่ 1	500	500	250.00
3	2	500	500	125.00
4	3	500	500	12.50
5	4	500	500	31.25
6	5	500	500	15.70
7	6	500	500	7.80

การเตรียม Leydig cell

หนูไมซ์พันธุ์สวิสเพศผู้ อายุ 24 วัน 2 ตัว นำเอา leydig cell ออกมาจากอัณฑะด้วยการเปิดหน้าท้องหนูด้วยกรรไกรที่ปลอดเชื้อ ใช้ปากคีบดึงเอาอัณฑะออกมาจากถุงอัณฑะไปล้างใน M 199 ที่มี 0.2% BSA 1 มล. ใน culture dish (60 x 15 m.m.) ที่วางอยู่บนกระบะน้ำแข็ง เจาะเยื่อบาง ๆ ที่หุ้มถุงอัณฑะด้วยกรรไกรที่ปลอดเชื้อ และใช้เข็มเขี่ยกลุ่มเนื้อเยื่อที่อยู่ภายในถุงอัณฑะออกจนหมดลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ตัดกลุ่มเนื้อเยื่อเหล่านี้จนละเอียดแล้วนำไปใส่ในบีกเกอร์ที่ปลอดเชื้อขนาด 50 มล. ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ 24 มล. นำไปกวนที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เพื่อให้ seminiferous tubules กระจายออกทั่วกันทุก 5 นาที ใช้ pasture pipette ดูดกลุ่มเนื้อเยื่อขึ้นลง 20 ครั้ง ซึ่งช่วยให้เซลล์แยกตัวกันดีขึ้น

กรองอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดผ่าน nylon mesh (Nitex 102) ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 50 มล. แล้วจึงนำไป incubate ใน Dubnoff Metabolic Shaker Incubator ที่อุณหภูมิ 34 °C เขย่า 60 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง เมื่อ incubate ครบ 1 ชั่วโมงแล้ว นำไปปั่นที่ 100 x G (1,500 รอบต่อนาที) ที่ 4 °C นาน 15 นาที นำอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้งไป นำกลุ่มเซลล์ไปทำให้กระจายอีกครั้งด้วย M 199 ที่มี 0.2% BSA 30 มล. นำเซลล์ที่เตรียมได้นี้ไปนับจำนวนเซลล์ภายใต้ phase contrast microscope โดยใช้ Hemacytometer และตรวจหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดด้วยการหยด 0.1% trypan blue 1 หยด cell suspension 1 หยด เขย่าตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จึงนำไปตรวจนับเซลล์ที่ติดสีและไม่ติดสี ภายใต้ phase contrast microscope เซลล์ที่ตายจะติดสีน้ำเงิน เซลล์ที่เตรียมได้นี้มีจำนวนเซลล์ประมาณ $5x10^4$ เซลล์ / 100 µl และมีอัตราการมีชีวิตรอดมากกว่า 80% นำเซลล์ที่เตรียมได้นี้ไปกวนตลอดเวลาที่ 4 °C ในขณะที่เติมลงในสารละลายตัวอย่างที่ต้องการตรวจหาปริมาณ

ขั้นตอนการทำไบโอแอสเสย์ของ LH

ในหลอดทดลองนั้น นำสารละลาย LH มาตรฐาน และซีรัมที่ได้ใส่หลอดทดลองหลอดละ 100 ไมโครลิตร แล้วจึงนำ cell suspension ที่เตรียมไว้ไปใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 100 ไมโครลิตร

ส่วนหลอดควบคุมมี 2 หลอด หลอดแรกนำอาหารเลี้ยงเซลล์ (M 199) ใส่ลงไป 200 ไมโครลิตร ส่วนหลอดที่สอง นำอาหารเลี้ยงเซลล์ (M 199) ใส่ลงไป 100 ไมโครลิตร แล้วจึงนำ cell suspension ใส่ลงไป 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำหลอดทดลองทั้งหมดไป Incubate ที่ 34 °C เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง

หลังจาก incubate ครบ 2 ชั่วโมงแล้ว หยุดปฏิกิริยาด้วยการนำหลอดทดลองทุกหลอดลงแช่ในกระบะน้ำแข็งทันที นำอาหารเลี้ยงเซลล์เหล่านี้ไปตรวจวัดหาปริมาณเทสโทสเตอโรนโดยใช้ RIA ต่อไป

<u>การวิเคราะห์หาปริมาณเทสโทสเตอโรนโดยวิธี RIA</u>

การเตรียมสารละลายสำหรับ RIA

1. Phosphate buffer solution

สารเคมีที่ใช้มีดังนี้

disodium hydrogen phosphate (anhydrous)	11.6	กรัม
gelatin	1.0	กรัม
sodium chloride	8.8	กรัม
sodium dihydrogen phosphate (anhydrous)	2.35	กรัม
thiomersal	0.1	กรัม

ละลาย gelatin ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirror และอุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิ 40 °C จนกระทั่งละลายเข้ากันดี ทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากนั้นค่อย ๆ เติมสารเคมีที่เหลือลงไปทีละอย่าง เมื่อละลายเข้ากันดี แล้วนำไปปรับ pH ด้วย pH meter ให้ได้ pH อยู่ในช่วง 7.2 - 7.4 ในปริมาณ 1,000 มิลลิลิตรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C อายุใช้งาน 1 เดือน

2. Charcoal suspension

สารเคมีที่ใช้มีดังนี้

buffer solution	100	มิลลิลิตร
charcoal reagent	0.625	กรัม
dextran reagent	0.0625	กรัม

ละลาย dextran ใน buffer solution หลังจากนั้นเติม charcoal ลงไป เขย่าอย่างแรงนาน 30 วินาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ตลอดระยะเวลาที่ใช้ อายุใช้งาน 1 เดือน

3. Scintillation fluid

สารเคมีที่ใช้มีดังต่อไปนี้

dioxane	200	มิลลิลิตร
POPOP	0.35	กรัม

PPO	5.5	กรัม
toluene	1000	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน ใส่ในขวดสีน้ำตาล กวนด้วย magnetic stirrer จนเข้ากันดี เตรียมก่อนใช้ประมาณ 1 สัปดาห์

ตารางที่ 3 แสดงการเจือจางแบบอนุกรมของสารละลายเทสโทสเตอโรนมาตรฐาน

ลำดับที่	สารละลายเทสโทสเตอโรนมาตรฐาน		buffer solution	ความเข้มข้นที่ได้
	ความเข้มข้นที่ใช้	ปริมาตรที่ใช้ (มล.)	(มล.)	(เฟมโตโมล/ 0.5 มล.)
1	stock solution	0.5	–	1100
2	ลำดับที่ 1	2.0	2.0	550
3	2	2.0	2.0	275
4	3	2.0	2.0	138
5	4	2.0	2.0	69
6	5	2.0	2.0	34
7	6	2.0	2.0	17

การตรวจหาปริมาณเทสโทสเตอโรนโดยวิธี RIA

การตรวจหาปริมาณเทสโทสเตอโรนโดยวิธี RIA ดัดแปลงจากวิธีของ WHO, 1981 ดังนี้

การสกัด

หลังจาก incubate ซีรัมกับ Leydig cell ของหนู Mice ที่ 34 °C ครบ 2 ชั่วโมงแล้ว ปริมาณเทสโทสเตอโรนในแต่ละหลอดทดลองนำมาสกัดด้วยไดเอธิล อีเทอร์ เติมไดเอธิล อีเทอร์ ลงในทุกหลอด หลอดละ 5 มล. อุดปากหลอดด้วยจุกพลาสติก ทำการสกัดด้วยการพลิก rack ที่ใส่หลอด คว่ำ-หงาย ประมาณ 50 ครั้งต่อนาที นาน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จึงนำไปปั่นที่ 500 x G (2,500 รอบต่อนาที) ที่ 4 °C นาน 15 นาที เพื่อให้ Leydig cells ตกตะกอน เทสโทสเตอโรนจะถูกสกัดไปอยู่ในชั้นของ diethyl ether แยกชั้นของ diethyl ether ออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ ด้วยการนำไปแช่แข็งในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ที่แช่อยู่ใน ethanol 95% รินส่วนใสที่เป็น ไดเอธิล อีเทอร์ ลงในหลอดทดลองอีกชุดหนึ่งที่เตรียมไว้ นำไปทำให้แห้งด้วย Dri block heater ที่อุณหภูมิ 40-80 °C หลอดทดลองที่แห้งสนิทแล้วเติม ไดเอธิล อีเทอร์ อีก 1 มล. เพื่อไปชะล้างฮอร์โมนที่ติดอยู่ข้างหลอดให้ลงไปรวมกันที่ก้นหลอด และนำไปทำให้แห้งอีกครั้ง เมื่อทุกหลอดแห้งสนิทแล้ว นำไปเติม assay buffer 500 µl เพื่อไปชะล้างสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่ติดอยู่ข้างหลอด

ให้มาอยู่ในบัฟเฟอร์ เตรียมฮอร์โมนมาตรฐานแอนติบอดีและ working tracer เติม testosterone working tracer และ antiserum (Ab) อย่างละ 100 µl โดยมีขั้นตอนการทำดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 4 การตรวจวัดเทสโทสเตอโรนโดยวิธี RIA

หลอดทดลอง	Assay buffer	Tracer	Antibody	ตั้ง	Charcoal suspension
Tc	600 µl	100 µl	–	ไว้	–
NSB	600 µl	100 µl	–	ที่ 4	200 µl
Tbo	500 µl	100 µl	100 µl	°C	200 µl
สารละลายมาตรฐาน หรือสารละลายตัวอย่าง	500 µl	100 µl	100 µl	ค้าง คืน	200 µl

หลังจากเติม tracer และ antibody แล้ว ตั้งไว้ที่ 4 °C ค้างคืน แล้วจึงเติม charcoal suspension 200 µl เขย่าตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที นำไปปั่นแยกเอา charcoal ออกที่ 500 x G (2,500 รอบต่อนาทีที่ 4 °C นาน 15 นาที เทส่วนใสที่เป็นส่วน bound form ใส่ใน counting vial และเติม scintillation fluid 4.5 มล. เขย่าและนำไปตรวจวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง β-Liquid Scintillation Counter 5 นาทีต่อ vial

การคำนวณและอ่านค่าฮอร์โมน

นำค่าปริมาณรังสีที่วัดได้ (count per minute, cpm) ของแต่ละ vial ซึ่งทำซ้ำกันตัวอย่างละ 3 vial มาหาค่าเฉลี่ยหรือมัชฌิมเลขคณิต ลบออกด้วยค่า cpm ของส่วนที่เป็น NSB ทุกตัวอย่าง ยกเว้นส่วนที่เป็น TC

การทำกราฟเทสโทสเตอโรนมาตรฐาน

นำค่าเฉลี่ย cpm ในส่วนของเทสโทสเตอโรนมาตรฐานลบออกด้วยค่าเฉลี่ย cpm ของ NSB แล้วจึงนำเอาค่า cpm ที่ได้มาเขียนกราฟระหว่าง log ความเข้มข้นของเทสโทส-เตอโรนมาตรฐานกับ cpm ของ bound เทสโทสเตอโรนบน semilogarithmic graph ปริมาณของเทสโทสเตอโรนในสารตัวอย่างจะหาได้จากเส้นกราฟมาตรฐานที่ได้นี้

การทำกราฟ LH มาตรฐาน

นำค่าปริมาณเทสโทสเตอโรนที่อ่านได้ในส่วนที่เป็น rLH มาตรฐาน มาเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของเทสโทสเตอโรน กับ ความเข้มข้นของ rLH มาตรฐาน ดังนั้นปริมาณของ rLH ในสารตัวอย่างจึงอ่านได้จากกราฟนี้ โดยเทียบจากปริมาณของเทสโทสเตอโรน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>ความสามารถในการสกัดฮอร์โมนตัวอย่าง (% Recovery)</u>

ในการวิเคราะห์หาฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนทุกครั้งจะหา % Recovery ได้โดยวิธีการดังนี้

ดูด tracer มา 50 ไมโครลิตแล้วเติม pool serum 100 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง 3 หลอดนำไปเติม อีเธอร์ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย Vortex mixer หลังจากนั้นทำการแยกชั้นโดยวางบนถาดน้ำแข็งแห้งเพื่อให้ส่วนของฮอร์โมนถูกสกัดออกมาอยู่ในชั้นของอีเธอร์แล้วนำไป heat จนแห้ง แล้วจึงนำไปปิเปตใส่หลอดทดลองอีกชุดหนึ่ง 250 ไมโครลิตร เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ recovery

ดูด tracer มา 50 ไมโครลิตร ใส่ counting vial นำเติม buffer 500 ไมโครลิตร จำนวน 3 vial เพื่อหา total count recovery (TCR)

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ RCE}) \times 100}{(\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ TCR})}$$

ซึ่งการวิจัยครั้งนี้มีประสิทธิภาพการสกัดเท่ากับ 90-95%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การประเมินผลวิธีที่ใช้ในการตรวจวัด

การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีการตรวจวัดสาร (reliability of method) แต่ละวิธีนั้น Ekins (1970) และ Abraham (1974) ได้ให้ข้อเสนอว่า ควรจะมีการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ความแม่นยำ (precision) และความไวของการวัดปริมาณ (sensitivity) เพื่อเป็นข้อบ่งชี้ว่าวิธีการแต่ละวิธีนั้น มีความเชื่อถือได้มากน้อยเพียงใด รายละเอียดของการประเมินผลในแต่ละหัวข้อมีดังนี้

ความจำเพาะ (specificity)

ความจำเพาะของ RIA หมายถึงความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีของแอนติเจน หรือฮอร์โมนแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดแอนติเจนกระตุ้นสัตว์ทดลองให้สร้างแอนติบอดี จะเป็นแบบ polyclonal ดังนั้นมักจะมีปฏิกิริยากับสารอื่น ที่มีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลใกล้เคียงกับฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์เรียกปฏิกิริยาการทดสอบนี้ว่า cross reaction

% cross reaction

$$= \frac{\text{ปริมาณสารมาตรฐานของสารที่จะวิเคราะห์ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี 50\% x 100}}{\text{ปริมาณของสารมาตรฐานโครงสร้างคล้ายกับสารที่ต้องการ จะวิเคราะห์ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ 50 เปอร์เซ็นต์}}$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ความจำเพาะของแอนติบอดีเทสโทสเตอโรนที่ศึกษา และสารอื่นที่นำมาตรวจสอบ

(จาก Sufi, Donaldson and Jeftcoate, 1986)

ฮอร์โมน	% cross reaction
testosterone	100
5 ∝ dihydrotestosterone	14.0
Δ 4 - androstinedione	0.8
cortisol	0.0001
5 ∝ androstinediol	6.0
Δ 5 - androstinediol	2.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความแม่นยำ เป็นการตรวจสอบความสามารถในการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนในสารตัวอย่างชนิดหนึ่ง ๆ ซ้ำ ๆ กันหลาย ๆ ครั้ง แล้วค่าที่ได้ใกล้เคียงกัน ค่าความแม่นยำในการตรวจวัดครั้งเดียวกัน (intra-assay) และค่าความแม่นยำในการตรวจวัดแต่ละครั้ง (inter-assay) ทำได้โดยการนำสารควบคุมคุณภาพ (pools serum) 3 ระดับ คือ ค่าสูง ค่าปกติ และค่าต่ำ มาวัดหาปริมาณฮอร์โมนในสารตัวอย่าง ทำซ้ำอย่างน้อย 10 ครั้ง เพื่อหาความแม่นยำในการตรวจวัดครั้งเดียวกัน และทำซ้ำ 2 ครั้ง ในแต่ละครั้งที่ทำการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมน เพื่อนำมาคำนวณหาค่าความแม่นยำในการตรวจวัดแต่ละครั้ง การแสดงค่าความแม่นยำ จะแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (% co-efficient of variance หรือ %CV) ซึ่งคำนวณได้จาก

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

ตารางที่ 6 แสดง % cv ของความแม่นยำใน intra และ inter assay

สารควบคุมคุณภาพ	intra-assay		inter-assay	
	X ± SD	% cv	X ± SD	% cv
ปกติ	387 ± 21.65	5.59	371 ± 29.23	7.87

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความไวของการวิเคราะห์ (sensitivity)

ความไวของการวิเคราะห์ หมายถึงค่าที่น้อยที่สุดของฮอร์โมนที่วิธีการวิเคราะห์นั้นสามารถวัดได้ ทำได้โดยการวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐาน โดยใช้ค่าเฉลี่ย cpm จากจุดที่ไม่มีความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (B_O) ลบด้วย 2 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่จุดนี้ นำค่า cpm นี้ไปคำนวณหาค่า B/B_O*100 แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนจากกราฟมาตรฐาน ก็จะได้ค่าความไว (Abraham,1974)

ความไวของการวิเคราะห์หาฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ในครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 9 เฟมโตโมลต่อมิลลิลิตร

การแปลผลทางสถิติ

ปริมาณฮอร์โมนที่วัดได้ในแต่ละกลุ่มนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้ T-test two way analysis ที่ระดับความเชื่อมั่น $P<0.05$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย