บทที่ 4

วิจารณ์ผลการวิจัย

การเตรียม radioactive labelled ligard สำหรับ radioimmunoassay ของสารต่าง ๆ โดยวิธีติดสลากด้วย Na(^{125}I)เป็นวิธีที่ค่อนข้างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจาก ^{125}I ให้ γ-ray ซึ่งมี radiation energy สูง การวัดรังสี ทำได้สะดวกและรวดเร็ว นอกจากนี้ ^{125}I มี half life ประมาณ 60 วัน ซึ่งไม่สั้นเกินไปสำหรับอายุการใช้งานของสารที่ติดสลากแล้ว แต่สำหรับการติดสลากสารประเภท steroid จำเป็นจะต้องระวังให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับโมเลกุลเดิมให้น้อยที่สุด เพื่อให้คุณสมบัติในการจับกับแอนติบอดีใกล้เคียงกับสารเดิม เทคนิคการติดสลากสารประกอบเช่น histamine ซึ่งสามารถนำมาเชื่อมกับ steroid ได้ภายหลัง อาจทำได้ 2 วิธี คือ วิธีแรกติดสลาก histamine ก่อนแล้วจึงนำ histamine ที่ติดสลากแล้วไปเชื่อมต่อกับ steroid อีกทีหนึ่ง วิธีที่สองคือติดสลากภายหลังเชื่อม histamine กับ steroid ผู้รายงานได้เลือกใช้วิธีแรกสำหรับติดสลาก D-norgestrel เนื่องจากข้อดีที่ไม่ต้องกังวลว่าจะมี ^{125}I ติดอยู่กับนิวเคลียสของสารนี้หรือไม่ แต่ถึงกระนั้นก็ยังมีความจำเป็นต้องทดสอบคุณสมบัติทางอิมมิวโน (immunoreactivity) ของสารที่ติดสลากได้ว่าอยู่ในระดับที่ใช้งานได้หรือไม่ จากรูปที่ 9 หน้า 35 แสดงให้เห็นว่า เมื่อทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Thin-layer chromatography แล้ว ^{125}I-D-norgestrel สามารถจับกับแอนติบอดีได้ดี กล่าวคือ สามารถรวมตัวได้ %bound ถึง 68% เมื่อใช้แอนติบอดีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 : 80,000 และแอนติบอดีจะยังจับกับ radioligand ได้ดีเมื่อความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 : 160,000 (รูปที่ 10 หน้า 36) และปริมาณของ

^{125}I-D-norgestrel ระหว่าง 5,000 – 10,000 cpm/tube ไม่ทำให้เกิดผลต่างของการรวมตัวที่เห็นได้ชัด (รูปที่ 11 หน้า 39)

การแยก D-norgestrel รูปอิสระออกจากรูปที่จับกับแอนติบอดี อาศัยหลักการเช่นเดียวกับที่ใช้กับสารประเภท steroid อื่น ๆ และอาจใช้ได้หลายวิธี (Odell และคณะ 1975) การจะเลือกวิธีใดต้องแล้วแต่ความเหมาะสม สิ่งที่ควรคำนึงถึงคือวิธีนั้นควรจะเป็นวิธีที่แยกได้เร็ว ราคาถูก ทำได้ง่ายและที่สำคัญคือต้องแยกสารทั้ง 2 รูปออกจากกันให้สมบูรณ์ที่สุด ผู้รายงานได้เลือกใช้วิธีแยกโดยการดูดซับสารรูปอิสระออกด้วยผงถ่าน เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ไม่ยาก ค่อนข้างเร็ว และราคาถูก แต่การเลือกใช้ผงถ่านมีข้อเสียที่เห็นได้ชัดคือ สภาวะที่เหมาะสมอาจถูกจำกัดมากกว่าวิธีอื่น เช่น ปริมาณผงถ่านที่ใช้ อุณหภูมิและเวลา เป็นต้น จากรูปที่ 12 หน้า 40 จะเห็นว่า ถ้าใช้สารละลายผงถ่าน 0.25% ปริมาณ 1 cm^3 จะให้ค่า non-specefic binding ต่ำในขณะที่ %bound สูง และในการแยก D-norgestrel รูปอิสระออกจากรูปที่จับกับแอนติบอดีที่ 4°C จะทำให้ %bound เกือบไม่เปลี่ยนแปลง ตรงข้ามกับเมื่อแยกที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 27°C) ในรูปที่ 13 หน้า 41 แสดงให้เห็นว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ปฏิกริยาการจับตัวลดลง อาจจะเป็นไปได้ว่าการเพิ่มอุณหภูมิทำให้การแตกตัวของ D-norgestrel รูปที่จับกับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นตามหรือความสามารถในการดูดซับของผงถ่านเพิ่มขึ้น ทำให้ D-norgestrel รูปที่จับกับแอนติบอดีถูกดูดและตกตะกอนลงมาด้วย %bound ในส่วนที่เป็นน้ำใสจึงลดลง ผู้รายงานจึงเลือกอุณหภูมิ 4°C สำหรับการดูดซับสารรูปอิสระโดยตลอด รายงานที่น่าสนใจอีกอย่างหนึ่งเกี่ยวกับปฏิกริยาการดูดซับด้วยผงถ่านคือ รายงานของ Sand และคณะ (1973) กับ Binoux และคณะ (1973) ที่ว่าตัวดูดซับส่วนมากมีคุณสมบัติในการแยกสารรูปอิสระออกจากสารที่จับกับแอนติบอดีไม่เหมือนกัน เมื่อสารผสมที่ใช้มีความเข้มข้นของ protein ต่างกัน แต่ถ้าเกลือบ

ผงถ่านด้วย dextran หรือ polymer อื่น ๆ ก่อนจะมีผลช่วยป้องกันไม่ให้สารส่วนที่จับอยู่กับแอนติบอดีถูกดูดซับด้วย ผู้รายงานได้ศึกษาคุณสมบัตินี้กับ D-norgestrel โดยเติม dextran T 70 ลงไปในสารละลายผงถ่านและเติม gelatin phosphate buffer ลงไปในหลอดทดลองก่อนการเติมสารละลายผงถ่าน ปรากฏว่า gelatin ไม่ได้มีผลต่อทั้งปฏิกริยาการดูดซับ D-norgestrelของผงถ่านและปฏิกริยาของ radioimmunoassay (รูปที่ 14 หน้า 42) ส่วน dextranมีผลต่อปฏิกริยาการดูดซับ D-norgestrel ของผงถ่าน แต่ไม่มีผลต่อปฏิกริยาของ radioimmunoassay (รูปที่ 15 หน้า 43) ผลนี้สอดคล้องกับรายงานของ Binoux และคณะ (1973) ที่ว่า protein หรือ polymer มีอิทธิพลไปลดประสิทธิภาพการดูดซับของผงถ่านและทำให้ผงถ่านตกตะกอนช้าลง

จากการศึกษาเกี่ยวกับปฏิกริยาการจับตัวระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี พบว่า %Bound จะต่ำเมื่อปฏิกริยาเกิดที่ 4° C และจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น (รูปที่ 17 หน้า46) แต่กราฟทั้ง 3 เส้นขนานกัน ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้สภาวะที่ 4° C เนื่องจากการควบคุมอุณหภูมิทำได้ง่าย สำหรับเวลาที่ใช้ในการ incubate จากรูปที่ 16 หน้า 45 แสดงให้เห็นว่าปฏิกริยาการรวมตัวระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีจะถึงจุดสมดุลย์ในเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง แต่เพื่อความสะดวกในการทำจึงได้ใช้วิธีการ incubate ค้างคืน คือ ประมาณ 18 – 24 ชั่วโมง

การวิเคราะห์หาปริมาณของ D-norgestrel ในน้ำนมหรือซีรัมโดยวิธี radioimmunoassay มีขั้นตอนที่จำเป็นคือ การขจัดสารต่าง ๆ ที่รบกวนต่อปฏิกริยาออกจากสารตัวอย่างนั้น ๆ วิธีที่ใช้กันทั่วไป คือ การสกัดสารที่ต้องการออกจากน้ำนมหรือซีรัม โดยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ether ซึ่งสามารถขจัดสารประเภท protein รวมทั้งสารอื่น ๆ ที่รบกวนปฏิกริยาออกได้หลายชนิด แต่สารประเภท steroid ที่ละลายออกมาใน ether จะยังมีสารประเภท lipid อื่น ๆ เจือปน

ด้วย การแยกสารประเภทหลังออกจาก steroid อาจต้องเพิ่มขั้นตอนซึ่งซับซ้อนมากขึ้นตามปริมาณของ lipid ที่ปนอยู่ในสารตัวอย่างนั้น ๆ จากรูปที่ 20 หน้า 51 จะเห็นว่า เมื่อส กัดน้ำนมด้วย ether ก่อนทำ radioimmunoassay จะต้องขจัดสารที่รบกวนปฏิกริยาด้วย sephadex LH-20 เสียก่อน และ eluent ที่ใช้ได้ดี คือ isooctane : benzene : methanol ในอัตราส่วน 70 : 20: 10 โดยปริมาตร column sephadex LH-20 มี reproducibility และ stability อยู่ในเกณฑ์ดี และแต่ละอันมีอายุการทำงานไม่ต่ำกว่า 6 เดือนไม่ว่าจะอยู่ใน benzene : methanol 85 : 15 โดยปริมาตรหรือ isooctane : benzene : methanol 70 : 20 : 10 โดยปริมาตร (รูปที่ 18 หน้า 49 และรูปที่ 19 หน้า 56)

เนื่องจากในระยะต้นของการทดลอง ผู้รายงานไม่ทราบแน่นอนว่าระดับของ D-norgestrel ในน้ำนมจะมีพิสัยกว้างมากน้อยเพียงใด จึงอาจเป็นไปได้ว่าจำเป็นจะต้องใช้ปริมาณน้ำนม ตัวอย่างมากขึ้นในกรณีที่ระดับของ D-norgestrel ต่ำมาก ในกรณีนี้จำเป็นจะต้องใช้ ether สำหรับการส กัดน้ำนมมากขึ้นหรือเพิ่มจำนวนครั้งในการส กัดและปริมาณ etherที่เพิ่มขึ้นนี้อาจจะมีสารที่รบกวนปฏิกริยา radioimmunoassay เพิ่มขึ้นด้วย ผู้รายงานจึงได้ศึกษาเปรียบเทียบถึงอิทธิพลของ ether ปริมาณต่างกันว่ามีมากน้อยเพียงใด และพบว่าปริมาณ ether เพิ่มขึ้นจาก 10 cm^3 เป็น 20 cm^3 ให้ผลไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการผ่าน ether ที่ใช้ส กัดไปใน sephadex LH-20 column ก่อน แต่การส กัด 2 ครั้งทำให้ได้ปริมาณสารที่ส กัดได้เพิ่มขึ้นประมาณ 5% ซึ่งไม่ได้ทำให้เกิดประโยชน์พอกับปริมาณ ether และเวลาที่เสียไปในการส กัด อย่างไรก็ดี ผู้ทดลองจะต้องระมัดระวังข้อผิดพลาดที่อาจจะเกิดขึ้นได้จากการใช้ ether ปริมาณต่างกัน โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการวัดปริมาณ D-norgestrel ในซีรัมโดยไม่ผ่าน sephadex column ก่อน

จากการศึกษาถึงความเชื่อถือได้ของวิธีวัดปริมาณ D-norgestrel ทั้งในน้ำนม และซีรัมตามหลักการของ Ekins (1970) และ Abraham (1974) คือ ศึกษาถึงความจำเพาะ ความไว ความแม่นยำและความถูกต้องของวิธีวัดปริมาณ พบว่า แอนตีบอดีที่ใช้ ซึ่งได้จากการฉีด D-norgestrel-3-oxime-BSA เข้าไปในกระต่าย มีความจำเพาะสูง คือ มีปฏิกริยากับ steroid ที่พบในธรรมชาติน้อยมาก แม้แต่กับ progesterone แต่จะมีปฏิกริยากับ metabolite ของ D -norgestrel บ้าง (ตารางที่ 3 หน้า 56 และ 57) ส่วนความไวในการวัด Abraham (1974) เสนอว่า หมายถึงการหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานที่จุดที่ไม่มีความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน แล้วหาค่า 95% confidence limit ที่จุดนี้ว่ามีความเข้มข้นเท่าไร ความเข้มข้นที่ได้นี้ จะเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน ซึ่งก็คือความไวของวิธีการวัด ความไวแบบนี้จึงขึ้นกับความแม่นยำในการวัด สำหรับการวิจัยนี้ ได้ความไวในการวัดมีค่าเท่ากับ 5 pg/cm^3

เมื่อทดสอบความแม่นยำและความถูกต้องโดยการทดลองวัดหาปริมาณ D -norgestrel ที่เติมลงไปใน control milk หรือ charcoaled serum เป็น 3 ระดับด้วยกัน คือ 100 400 และ 700 pg/cm^3 พบว่า ความแม่นยำของวิธีวัดปริมาณมีค่าสัมประสิทธิ์ของความเปลี่ยนแปรไม่เกิน 10% ทั้งในน้ำนมและในซีรัม ทั้งในการวัดเวลาเดียวกัน (withim assay) และการวัดต่างเวลากัน (betweem assay) (ตารางที่ 4 หน้า 58 และตารางที่ 5 หน้า 59) ส่วนความถูกต้องของวิธีทดลองจะเปลี่ยนแปลงไป เมื่อปริมาณของ D -norgestrel ในสารตัวอย่างเปลี่ยนแปลงไป (ตารางที่ 4 หน้า 58 ตารางที่ 5 หน้า 59) ทั้งในน้ำนมและซีรัม ผู้ทดลองได้

เลือกใช้ปริมาณของสารตัวอย่างให้เหมาะสมเพื่อ ให้ได้ค่าความถูกต้องอยู่ระหว่าง 90 ± 10 ทุกครั้ง

จุดประสงค์ของการหาปริมาณ ดี-นอร์เกสตรีล ในน้ำนมและซีรัมของสตรี ในรายการนี้ก็เพื่อศึกษาดูว่า สตรีที่ใช้ยาคุมกำเนิดชนิดนี้ชับ ดี-นอร์เกสตรีล หรือ เมตาโบไลท์ ของสารนี้ออกมาในน้ำนมเป็นปริมาณเท่าใด และระดับของสารนี้มีความสัมพันธ์กับระดับในซีรัมหรือไม่ จากผลการทดลอง ปรากฏว่า ระดับ ดี-นอร์เกสตรีล ในน้ำนมมีค่าระหว่าง 20-160 พิโคกรัม/ซม^3 ส่วนระดับในซีรัมมีค่าระหว่าง 0.2 - 1.5 นาโนกรัม/ซม^3 จะเห็นว่า ค่าที่วัดได้นี้มีพิสัยค่อนข้างกว้าง ทั้งนี้ผู้รายงานคาดว่า อาจเนื่องมาจากสาเหตุหลายประการ

ประการแรกคือ น้ำนมและซีรัมตัวอย่างที่นำมาวัดปริมาณ ดี-นอร์เกสตรีล เป็นสารตัวอย่างที่เก็บหลังการกินยา แต่ผู้อาสาสมัครแต่ละรายอาจจะกินยาในเวลาต่างกัน ข้อแตกต่างนี้อาจจะมีอิทธิพลต่อระดับของ ดี-นอร์เกสตรีล ทั้งนี้เนื่องจากมีผู้ศึกษาพบว่า **Half life** ของ ดี -นอร์เกสตรีล ในกระแสเลือดช่วงแรกประมาณ 3 ชั่วโมง และช่วงที่สองประมาณ 18 ชั่วโมง (**Victor**และคณะ 1975)

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่อาจจะมีอิทธิพลต่อระดับของ ดี-นอร์เกสตรีล เช่น ความแตกต่างของประสิทธิภาพของผนังลำไส้ ในการดูดซึมสารหรือความแตกต่างของปริมาณน้ำนมในแต่ละคน เป็นต้น

ในการศึกษา ดี-นอร์เกสตรีลในน้ำนมและซีรัม โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ พบว่า **Saxena** และคณะ (1977) ก็ได้ทำการศึกษาเช่นกัน แต่เ า ศึกษากับยาประเภท **combined oral contraceptive** ที่มี ดี-นอร์เกสตรีล 150 ไมโครกรัม ต่อเม็ด และพบว่า ระดับที่วัดได้ในน้ำนมและซีรัมมีค่า 135-223 พิโคกรัม/ซม^3 และ 2.5-3.6 นาโนกรัม/ซม^3 ตามลำดับ ส่วน **Stanczyk** และคณะ (1975) รายงานว่าระดับของ ดี-นอร์เกสตรีลในซีรัมเป็น 1.5-2 นาโนกรัม/ซม^3 และ 0.2-0.4 นาโนกรัม/ซม^3 ในระยะเวลา 2-3 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง หลังกินยาตามลำดับ อีกรายงานหนึ่งคือ รายงานของ **Victor** และคณะ (1975) ซึ่งพบว่าระดับของสารนี้ในซีรัม 24 ชั่วโมงหลังกินยาเป็น 1.1 - 2.8 นาโนกรัม/ซม^3

จากผลการทดลองที่เสนอในรายงานนี้จะเห็นว่า วิธีการที่พัฒนาขึ้นมีความเชื่อถือได้ในระดับดี และเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการนำไปใช้ศึกษาหาข้อมูลอื่น ๆ ที่น่าสนใจเกี่ยวกับฤทธิ์ของยาคุมกำเนิดชนิดนี้ ถึงแม้จะยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าสารที่ถูกขับออกมาในน้ำนมและซีรัมเป็น เมตาโบไลท์ ชนิด ใด เพราะในการทดลองนี้แม้ว่าความจำเพาะของวิธีทดลองจะสูง แต่จะเห็นได้ว่า สำหรับ เมตาโบไลท์ของ ดี-นอร์เกสตรีล บางชนิด มี cross reaction กับแอนติบอดีของ ดี-นอร์เกสตรีล ได้ สิ่งที่น่าสนใจคือการศึกษา ต่อไปว่าระดับของ ดี-นอร์เกสตรีล หรือ เมตาโบไลท์ ที่ถูกขับออกมา โดยเฉพาะในน้ำนมจะมีผลต่อทารกหรือไม่อย่างไร ศึกษาถึง Biological activity ของสารนั้น ๆ ในสารตัวอย่างว่ามีผลต่อส่วนประกอบของน้ำนมมารดาหรือไม่ มีผลต่อทารกที่กินนมมารดาเหล่านั้นอย่างไร และมีผลต่อมารดาที่กินยาคุมกำเนิดเหล่านั้นอย่างไร จากผลการทดลองของ Vongvinyoutragan และคณะ (1976) พบว่า ดี-นอร์เกสตรีล ปริมาณเท่ากับที่ใช้ศึกษาในรายงานนี้ มีผลต่อ คาร์โบไฮเดรท เมตาโบลิสม ของสตรีที่กินยาคุมกำเนิดเหล่านี้ ซึ่งเขาศึกษาเพียงแง่เดียวเท่านั้น สิ่งที่น่าสนใจอีกอย่างคือ การศึกษาว่าผลที่เกิดขึ้นจากยาชนิดนี้ต่อมารดา จะมีผลส่งไปถึงทารกที่กินน้ำนมมารดาเหล่านั้นหรือไม่อย่างไร ถึงแม้ว่าการตอบคำถามข้างต้น จะเป็นสิ่งที่ทำได้ไม่ง่ายนัก และต้องการระยะเวลาไม่น้อย แต่ก็เป็นสิ่งที่น่าสนใจศึกษา

ข้อมูลที่เสนอในรายงานนี้ นอกจากจะเป็นประโยชน์โดยตรงต่อการศึกษาผลของยาคุมกำเนิด ดี-นอร์เกสตรีล โดยตรงแล้ว ข้อมูลเหล่านี้ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการศึกษาด้านการวิเคราะห์และการศึกษาฤทธิ์ของยาอื่น ๆ ได้อีกด้วย