วิจารณ์ผลการทดลอง

วิธี bioassay เป็นวิธีแรกที่ใช้หาปริมาณ LH ผลที่ได้ถึงแม้จะมีความถูกต้อง แต่มีความไวต่ำ นอกจากวิธีของ Keller และ Rosemberg (1965) ที่หาปริมาณของฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองในพลาสมา เป็นวิธี bioassay ที่มีความไวที่สุด ข้อเสียของวิธี bioassay ที่พบคือต้องสูญเสียฮอร์โมนไปมากจากการสกัดหลาย ๆ ครั้ง เสียเวลาในการทดลอง ต้องใช้สารตัวอย่างปริมาณมาก มีความไว ในการวัดปริมาณLH ในปัสสาวะได้ค่าต่ำถึงระดับไมโครกรัมเท่านั้น ซึ่งจะพบจากรายงานของ McArthur (1952) และ Fukushima และคณะ (1964) ที่ไม่สามารถหาปริมาณ LH ในเด็ก และหาปริมาณ LH ในรอบเดือนได้เฉพาะตอนกลางของรอบเดือนเท่านั้น ได้มีผู้ทดลองหาวิธีวัด LH ปริมาณน้อย ๆ และให้ได้หลายตัวอย่างในเวลาเร็วขึ้น โดยปรับปรุงวิธีทดลองให้มีความจำเพาะและความไวดีขึ้น วิธีนี้เรียกว่า immunoassay Wide และคณะ (1961), Wide (1962) และ Rizkallh และคณะ(1965) หาปริมาณ LH โดยวิธี bioassay เปรียบเทียบกับ immunoassay พบว่าวิธี immunoassay ได้เปรียบกว่าวิธี bioassay ในด้านเวลาที่ใช้น้อยกว่า นอกจากนี้ยังมีความจำเพาะและความไวสูง แต่ก็ยังวัดปริมาณ LH ได้ค่าต่ำ ระดับไมโครกรัมเช่นเดียวกับ bioassay

วิธี radioimmunoassay เป็นวิธีใหม่ที่ปรับปรุงวิธีหาปริมาณ LH ให้ดีขึ้น มีความแม่นยำในการวัด และใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อย เช่น ใช้ซีรัมหรือปัสสาวะประมาณ 0.05–0.4 มล. (Midgley,1966 และ Aono และคณะ,1967) มีความไวที่จะวัดปริมาณฮอร์โมนได้ถึงระดับนาโนกรัม ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสองวิธีที่กล่าวมาแล้วจะมีความไวสูงกว่าไม่น้อยกว่า 1000 เท่า

การศึกษาวัดปริมาณของ LH จากซีรัมด้วยวิธีแอนติบอดีสองชนิด ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Aono และคณะ(1967) หลักการทดลองเช่นเดียวกัน แต่สิ่งที่ดัดแปลงคือใช้ซีรัมตัวอย่างและปริมาตรสารในหลอดทดลองเป็นครึ่งหนึ่ง เวลาที่ใช้ในการทดลองน้อยกว่า 1–2 วัน ทำให้มีความไวในการวัด 0.16 นาโนกรัม/มล.
ส่วนวิธีของ Aono และคณะมีความไว 2 mIU/มล.(^{2nd}IRP–HMG*) หรือ 6.4 นาโนกรัม/มล. (LER 907) จะเห็นว่าวิธีที่ทดลองได้มีความไวสูงกว่าของ Aono และคณะประมาณ 40 เท่า

---

^{2nd}IRP–HMG (second international reference preparation of human menopausal gonadotropin)
1 mIU ^{2nd}IRP–HMG = 3.2 นาโนกรัม (LER 907)

การหาปริมาณของ LH จากซีรัมด้วยวิธีใช้ผงถ่านแยก ดัดแปลงจากวิธีของ Sand และ Torjesen (1973) สิ่งที่ดัดแปลงให้แตกต่างจากวิธีของ Sand คือ

1. ใช้ความเข้มข้นของแอนตีบอดีในระดับที่เจือจางกว่า ปริมาตรของซีรัมตัวอย่างลดลงครึ่งหนึ่ง และปริมาตรของสารในหลอดทดลองก็ลดลงเป็นครึ่งหนึ่งเช่นกัน

2. ใส่ HFS แทนซีรัมของคนปกติ (ที่ไม่ได้ดูดซับด้วยถ่าน)

3. แยก F และ B โดยใช้ 0.5 มล. ของผงถ่าน 3% เคลือบด้วยเดกซ์แตรน T150 0.03% และผงถ่าน 3% อย่างเดียว ส่วนวิธีของ Sand ใช้ 3.5 มล. ของผงถ่าน 3% เคลือบด้วยเดกซ์แตรน 250 0.3%

4. เมื่อใส่ผงถ่านแล้วใช้เวลาผสมหลอดละ 5 วินาทีก่อนแยก ส่วนวิธีของ Sand เมื่อใส่ถ่านแล้วหมุนทุกหลอดพร้อมกันเป็นเวลา 30 - 60 นาที ที่อุณหภูมิห้องก่อนแยก

วิธีนี้มีความไวในการวัด 0.24 นาโนกรัม/มล. (LER 907) ส่วนวิธีของ Sand มีความไว 0.8 นาโนกรัม/มล. วิธีที่ปรับปรุงแล้วมีความไวสูงกว่าของ Sand ประมาณ 3 เท่า ส่วนความแม่นยำในการวัด และ % recovery ใกล้เคียงกัน

แฟคเตอร์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในปฏิกริยา radioimmunoassay ที่ได้จากการทดลอง

ก. Buffer จากการทดลองวิธีหาปริมาณ LH ด้วยการใช้ buffer 3 ชนิดที่มี pH ต่าง ๆ พบว่า ทั้ง phosphate, borate และ barbitone sodium buffer ให้ผลที่ไม่สามารถบอกได้ว่า buffer ชนิดไหนดีกว่ากัน และควรเลือกใช้ pH เท่าใด แต่การทดลองส่วนมากนิยมใช้ phosphate buffer pH 7 - 7.8 ซึ่งจะพบจากการทดลองของ Burr และคณะ (1969) ใช้ pH 7.4 และ Odell และคณะ (1967) ใช้ pH 7.8 ส่วนการทดลองของ Faiman และ Ryan (1967) และ Neill และคณะ (1967) ใช้ barbital buffer pH 8.6 ส่วน borate buffer ยังไม่พบว่ามีรายงานใดที่ใช้ทดลองในการหาปริมาณ LH อาจเนื่องมาจาก borate buffer ให้ค่า non-specific binding เพิ่มสูงขึ้นจาก 11-16% เมื่อ pH เปลี่ยนจาก 7 เป็น 10 ซึ่งพบจากการทดลอง ส่วน phosphate และ borbitone sodium buffer ค่า non-specific binding เปลี่ยนแปลง-ประมาณ 1% เท่านั้น

ข. แอนตีบอดี การทดลอง antibody titration พบว่าถ้าความเข้มข้นของแอนตีบอดีสูง ความแตกต่างของปฏิกริยาระหว่างแอนตีบอดีกับ LH มาตรฐานปริมาณต่าง ๆ กันจะเห็นได้ชัด ช่วงของความแตกต่างจะแคบลงมาตามลำดับ เมื่อความเข้มข้นของแอนตีบอดีน้อยลง กราฟมาตรฐานจะป่านในตอนแรก และจะค่อย ๆ ชันขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อความเข้มข้นลดลง จากการทดลองเลือกความเข้มข้นของแอนตีบอดีในหลอดทดลอง 1:40,000 เพราะว่ามีความเข้มข้นน้อยที่สุด และความเข้มข้นนี้ จะได้กราฟมาตรฐานที่สามารถวัดปริมาณ LH ตั้งแต่ 5–400 นาโนกรัม/มล. ซึ่งมีความแม่นยำในการวัดตอนกลางของรอบเดือนที่เกิด LH peak Sand และ Torjesen (1973) ใช้ความเข้มข้นของแอนตีบอดีในหลอดทดลอง 1:20,000 ค่าที่วัดได้อยู่ในช่วง 3–16 นาโนกรัม/มล. โดยไม่รวมระยะกลางของรอบเดือนที่มี LH peak

ค. เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการอินคิวเบท

การทดลองเปลี่ยนเวลาและอุณหภูมิพบว่า เวลาที่ปฏิกริยาถึงสมดุลย์อยู่ในระยะ 3–4 วันที่ 4 °ซ ผลที่ได้คล้ายกับการทดลองของ Sand และ Torjesen (1973) ซึ่งใช้เวลาอินคิวเบท 3 วันที่ 4 °ซ การอินคิวเบทที่ 18 °ซ หรือที่อุณหภูมิของห้องไม่ค่อยนิยมทำกัน เนื่องจากควบคุมอุณหภูมิยาก และอุณหภูมิของห้องอาจไม่คงที่ตลอดเวลาที่ทำการทดลอง ส่วนอุณหภูมิ 37 °ซ นั้น ปฏิกริยาถึงสมดุลย์ภายในเวลาไม่เกิน 10 ชม. และการรวมกันระหว่าง LH กับแอนตีบอดีไม่สมบูรณ์เท่าที่ 4 °ซ และ 18 °ซ จึงสรุปได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะที่สุดคือที่ 4 °ซ

ง. การใช้ถ่านเป็นตัวดูดซับ

1. ผลการเลือกใช้เดกซ์แตรนขนาดต่าง ๆ กัน (T 110, 150 และ 250) ผลที่ได้ไม่แตกต่างกัน แสดงว่าอาจเลือกใช้เดกซ์แตรนขนาดใดขนาดหนึ่งใน 3 ขนาดนี้ ตรงข้ามกับรายงานของ Herbert และคณะ(1965) ซึ่งรายงานไว้ว่า ขนาดของเดกซ์แตรนมีความสำคัญ ถ้าใช้ผงถ่าน เคลือบด้วยเดกซ์แตรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเหมาะสม เดกซ์แตรนจะป้องกันไม่ให้ถ่านดูด B ที่มีอยู่ จะดูดเฉพาะ F เท่านั้น แต่ยังไม่มีรายงานใดยืนยัน

2. การเลือกใช้ความเข้มข้นของเดกซ์แตรน (T 150) รวมกับผงถ่านที่จะทำให้ค่า non-specific binding ต่ำสุด พบว่าการลดความเข้มข้นของเดกซ์แตรนลงจนเหลือปริมาณเพียง0.03% รวมกับ ผงถ่าน 5% จะทำให้ค่า non-specific binding ต่ำสุด อาจเนื่องมาจากเดกซ์แตรนจะไปลดจำนวน binding site ของถ่าน ตามรายงานของ Binoux และ Odell (1973) ผลนี้ตรงข้ามกับ Sand และ Torjesen (1973) รายงานว่า เดกซ์แตรนไม่ได้มีผลอื่นใดนอกจากทำให้ถ่านกระจายได้ดีในสารละลาย ทำให้สะดวกในการปฏิบัติงาน เนื่องจากถ่านตกตะกอนช้าลง

3. ผลของการใช้ผงถ่านเคลือบด้วยเดกซ์แตรนหรือ BSA ในการดูด F นั้น แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ตามรายงานที่พบส่วนมากนิยมใช้เดกซ์แตรนมากกว่า BSA เนื่องจากเดกซ์แตรน ถูกกว่า BSA

4. การทดลองใช้ผงถ่านอย่างเดียวในการแยก F ออกจาก B พบว่าถ้าใช้ถ่านตั้งแต่ 3% ขึ้นไป ผลการรวมกันของแอนตีเจนและแอนตีบอดี จะค่อนข้างคงที่ในหลอดทดลองที่มีและไม่มี LH มาตรฐาน ส่วนในหลอดทดลองที่ใช้เป็น control พบว่า ค่า non-specific binding จะคงที่ เมื่อใช้ความเข้มข้นของถ่านตั้งแต่ 5% ขึ้นไป แต่ค่าก็ไม่แตกต่างกันมากกับเมื่อใช้ถ่าน 3% ผู้ที่เห็นด้วยกับการแยกโดยใช้ถ่านเพียงอย่างเดียวคือ Binoux และ Odell (1973)และพบว่าสภาวะที่ดีที่สุดในการแยก F ออกจาก B คือใช้ความเข้มข้นของถ่านที่เหมาะสมแต่เพียงอย่างเดียว

5. การใช้ผงถ่าน 3% เคลือบด้วยเดกซ์แตรน 0.03% แยก F ออกจาก B พบว่าความไวใกล้เคียงกันเมื่อแยกด้วยถ่าน 3% อย่างเดียว สามารถอ่านผล ในซีรัมที่ต้องการวัดจากกราฟมาตรฐานได้ในช่วงความเข้มข้นเดียวกัน จึงพอจะสรุปได้ว่าใช้ได้ผลทั้ง 2 วิธี

จ. HFS การใส่ HFS ในการทำกราฟมาตรฐาน พบว่า B% ที่ได้จะสูงกว่าเมื่อไม่ใส่ HFS ประมาณ 25% และความชัน สูงกว่าประมาณ 30% แสดงว่า ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นในสองการทดลองนี้ไม่เหมือนกัน เนื่องจากปริมาณโปรตีน-

แตกต่างกันถ้าไม่ใส่ HFS อาจทำให้ B% ของซีรัมตัวอย่างสูงกว่ากราฟมาตรฐาน เมื่อซีรัมนั้นมีปริมาณ LH อยู่น้อย ทำให้หาค่า LH ปริมาณต่ำไม่ได้ จากการทดลองของ Sand และ Torjesen (1973) เปรียบเทียบการกระทำกราฟมาตรฐาน 2 ชุด ชุดแรกใส่ซีรัมของคน ชุดที่สองไม่ใส่ จะได้ B% ต่างกันถึง 71% แสดงให้เห็นว่าการใช้ HFS เพื่อทำให้ปริมาณโปรตีนที่มีในกราฟมาตรฐานเท่ากับในซีรัมที่ต้องการหาปริมาณ LH เป็นสิ่งที่ดีที่สุด

ฉ. สภาวะสมดุลย์และสภาวะไม่สมดุลย์ การทดลองทำกราฟมาตรฐานในสภาวะไม่สมดุลย์ ความไวสูงขึ้นกว่าในสภาวะสมดุลย์ 1 เท่า เมื่อใช้เทคนิคการแยกด้วยผงถ่าน แต่ผลไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อใช้เทคนิคการแยกด้วยแอนตีบอดีชนิดที่สอง เพราะวิธีหลังนี้เป็นการแยกที่มีความเฉพาะที่สุด สามารถแยก B ออกมาได้หมด

ช. Radioimmunoassay โดยเทคนิคการแยกด้วยผงถ่านและแอนตีบอดีชนิดที่สอง

1. ค่า non-specific binding ของวิธีแยกโดยใช้ผงถ่านอยู่ระหว่าง 10 - 20% วิธีที่ใช้แอนตีบอดีชนิดที่สองอยู่ระหว่าง 2 - 3% ค่าต่ำกว่าวิธีใช้ผงถ่านมาก เป็นข้อที่ได้เปรียบข้อหนึ่งของวิธีนี้ เพราะเป็นการแยกที่ใช้สารสำหรับแยกที่เฉพาะ (specific separating agent) ซึ่งแยกได้สมบูรณ์กว่าวิธีอื่น แต่วิธีการทดลองโดยทั่วไปของการใช้แอนตีบอดีชนิดที่สอง ต้องใช้เวลาในการปฏิบัติงานนานกว่า และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูงกว่าการแยกด้วยถ่าน

2. ผลการวัดปริมาณ LH จากตัวอย่างเดียวกัน ในวันเดียวกันและต่างวันกัน ทั้งวิธีแยกด้วยผงถ่าน และแอนตีบอดีชนิดที่สอง พบว่าความแม่นยำของการวัดในวันเดียวกันคล้ายกัน แต่การวัดต่างวันกัน วิธีแยกด้วยผงถ่านมีความแม่นยำดีกว่า โดยดูจากค่าของ Coefficient of variation (CV) เมื่อพิจารณาดูค่า pooled serum ที่วัดได้ วิธีแรกจะได้ค่าน้อยกว่าวิธีหลังในทุกค่า อาจเนื่องจากมีการสูญเสียในขณะแยกด้วยผงถ่านมากกว่า และเมื่อปริมาณฮอร์โมนมีค่าสูงขึ้น ความแตกต่างระหว่างสองวิธีนี้จะน้อยลงไปตามลำดับ

3. recovery การหา % recovery วิธีแยกด้วยถ่าน % recovery อยู่ในช่วง 95–100% ค่าเฉลี่ย 98.3±2.19% วิธีแยกด้วยแอนตีบอดีชนิดที่สอง %recovery อยู่ในช่วง 101–110% ค่าเฉลี่ย 106.78±4.09% Sand และ Torjesen(1973) หา %recovery ได้100.7±14.1% จากการเปรียบเทียบ %recovery ทั้งสาม การทดลองนับว่าใกล้เคียงกัน แต่วิธีแยกด้วยถ่านมีความเบี่ยงเบนมาตรฐานน้อยที่สุด ส่วนวิธีของ Sand มีความเบี่ยงเบนมาตรฐานมากที่สุด จึงจัดว่าวิธีหาปริมาณ LH ที่ทำอยู่ทั้งสองวิธีนี้มีความถูกต้องมากกว่าวิธีของ Sand

4. การหาปริมาณ LH จากซีรัมในรอบเดือนของสตรีที่ปกติ ใช้วิธีแยกด้วยแอนตีบอดีชนิดที่สอง และทำในสภาวะสมดุลย์ ระยะเวลาของรอบเดือนในสตรีทุกคน ประมาณ 28±4 วัน ใกล้เคียงกับรายงานของ Fukushima และคณะ (1964), Midgley และ Jaffe(1966) และ Moghissi และคณะ (1972)

ค่าเฉลี่ยใน luteal phase และ follicular phase เกือบเท่ากัน แต่ใน follicular phase ค่าจะแปรน้อยกว่าตอน luteal phase เล็กน้อย Odell และคณะ (1967) หาปริมาณ LH ในรอบเดือนได้ค่า LH peak อยู่ระหว่าง 5.1–19.2 นาโนกรัม/มล. Midgley และ Jaffe (1966) ได้ค่า LH peak อยู่ระหว่าง 90–160 นาโนกรัม/มล. Faiman และ Ryan (1967) ได้ค่า LH peak อยู่ระหว่าง 8.3–20.3 นาโนกรัม/มล.

จากผลการทดลองที่กล่าวมานี้จะเห็นว่าปริมาณ LH ที่พบในรอบเดือน น้อยกว่าที่ทดลองได้ในรายงานนี้ ทั้งนี้เพราะปริมาณ LH ที่วัดได้อาจจะเปลี่ยนแปลงได้เมื่อเปลี่ยนชนิดของ LH มาตรฐาน, แอนตีบอดีที่ไม่บริสุทธิ์ หรือวิธีดำเนินการแยก ที่แตกต่างกันออกไป ดังแสดงให้เห็นจากการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างวิธีแยกด้วยแอนตีบอดีชนิดที่สอง และวิธีแยกด้วยถ่านในรายงานนี้ค่า LH ในซีรัมซึ่งวัดด้วยวิธีใช้ถ่าน จะต่ำกว่าค่าที่วัดได้ด้วยวิธีใช้ แอนตีบอดีสองชนิด แต่อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างนี้ไม่สู้จะมีความสำคัญในด้านการแพทย์ เพราะจุดมุ่งหมายสำคัญในการวัดปริมาณ LH นั้นอยู่ที่การหา LH peak ซึ่งเป็นข้อมูลบ่งชี้ว่าผู้ป่วยมีการตกไข่

5. BBT ที่พบในแต่ละตัวอย่างที่ทดลองเปรียบเทียบกับวันที่เกิด LH peak พบว่า อุณหภูมิใน follicular phase เฉลี่ยประมาณ 36.59°ซ±0.6% อุณหภูมิต่ำสุดตอนกลางของรอบเดือนเฉลี่ยเท่ากับ 36.29°ซ ± 0.44% บางตัวอย่างที่ทดลองจะตรงกับ LH peak พอดี บางตัวอย่างจะเกิดก่อน LH peak 1วัน และในบางตัวอย่างก็ไม่มีความสัมพันธ์ที่แน่นอนกับ LH peak อุณหภูมิเฉลี่ยหลังจากเกิด LH peak = 36.87°ซ ± 0.47% ผล BBT ยังไม่แน่นอน บางการทดลองจะตรงกับรายงานของ McArthur และคณะ (1958), Midgley และ Jaffe (1966), Ross และคณะ (1967), Saxena และคณะ (1968) และ Kazeto และคณะ(1971) และบางการทดลองก็ไม่สามารถอธิบายผลได้

จากการเปรียบเทียบการทดลองที่ทำมาทั้งหมดกับผลการทดลองที่มีผู้ทำมาแล้วจะเห็นว่า การหาปริมาณของ LH โดยวิธี radioimmunoassay แบบการแยกด้วยถ่าน ผลที่ได้มี ความแม่นยำ ความไว และความถูกต้องค่อนข้างสูง แต่มีข้อบกพร่องบางอย่างซึ่งควรจะต้องแก้ไขให้ดีขึ้น โดยการปรับปรุงวิธีทดลองเพื่อให้มีความแม่นยำดีในการวัดค่าต่ำ ลดปริมาณของถ่านให้น้อยลงจนถึง 2% หรือ 10 มก./0.5 มล. เพื่อจะทำให้การแยกสมบูรณ์ขึ้น ลดเวลาที่ใช้อินคิวเบทให้น้อยลง จะทำให้วิธีใช้ถ่านเป็นวิธีที่ดีเท่ากับ หรือดีกว่าวิธีใช้แอนติบอดีสองชนิด