พิพิธภัณฑ์การแพทย์ศิริราช
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

บทวิจารณ์ผล

Boltan (1977) ได้กล่าวถึงความนิยมไอโอดีน -125 มากกว่าไอโอดีน -131 เนื่องจากไอโอดีน -131 มีข้อเสียคือมีครึ่งอายุสั้น (8 วัน) ทำให้ count rate ลดลงเร็ว ดังนั้น counting efficiency ของไอโอดีน -131 จะน้อยกว่าไอโอดีน -125 ประมาณสองเท่า ถึงอย่างไรก็ตาม การติดสลากเปปไทด์บางตัว ก็อาจจะต้องเลือกใช้ไอโอดีน -131 เพื่อความเหมาะสมกับงานที่ใช้

ไอโอดีน -125 มีเวลาครึ่งอายุ 60 วัน ให้พลังงานแกมมา 0.149 Mev. เกิดจากอิเลคตรอนแคปเจอร์ เหมาะสำหรับเครื่องวัดรังสี ที่สร้างขึ้นมาจำหน่ายในปัจจุบัน

เทคนิคการติดสลาก ที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ เป็นวิธีการทำให้ไอโอดีน -125 เข้าจับในโมเลกุลของโปรแลคตินโดยตรง (direct iodinated method) เนื่องจากโมเลกุลของโปรแลคติน (ดูรูปที่ 1) มีแอมมิโนแอซิดไทโรซีน เป็นโมเลกุลที่ $^{125}I^{+}$ (cationic iodine-125) เข้าจับ โดยการเลือกออกซิไดซิ่งเอเจนท์คลอรามีน -ที เพื่อเปลี่ยนโซเดี่ยมไอโอไดด์ -125 ให้เป็น active iodine -125 ตามวิธีของ Sinha และคนอื่นๆ (1973) และ Aubert และคนอื่นๆ (1974) มาดัดแปลงใช้ให้เหมาะสม ในการทดลองเพื่อหาวิธีติดสลาก ได้ทำการทดลองโดย ตั้งตัวแปรไว้สองอย่าง คือ ปริมาณคลอรามีน -ที และ เวลาที่ใช้ในการติดสลาก โดยแปรเวลาในการติดสลากก่อน จนได้โปรแลคตินติดสลาก ที่มี immunoreactivity ดีพอใช้แล้ว จึงปรับปริมาณความเข้มข้นของคลอรามีน -ทีต่อไป เพื่อให้การติดสลากโปรแลคตินแล้วมี immunoreactivity สูงขึ้น จากการทดลองปรากฏว่า ใช้คลอรามีน -ที เพียง 35 ไมโครแกรม กับใช้เวลาทำปฏิกริยาเพียง 10 วินาที ในการหยุดปฏิกริยานั้น ใช้โซเดียมเมตตาไบซัลไฟต์ 50 ไมโครกรัม ก็สามารถจะรีดิวส์ คลอรามีน -ที ที่เหลือและเปลี่ยน ionic iodine

ให้เป็นไอโอไดน์หมด สำหรับปริมาตรรวมขณะติดสลาก ควรใช้ปริมาตรเพียง 25 ไมโครลิตร เพื่อให้ปฏิกริยาเกิดขึ้นเร็ว

ในตอนต้นของการติดสลากโปรแลคติน พบปัญหาของโปรแลคตินถูกทำลายไปง่าย เป็นเหตุให้หมดคุณสมบัติทางอิมมูโน (immunoreactivity) จึงได้ปรับปรุงแก้ไข โดยการติดสลากที่อุณหภูมิ 4° C ตามวิธีของ Redshaw and Lynch (1974) ซึ่งได้ใช้วิธีนี้ในการติดสลากโปรแลคตินและฮอร์โมนอื่น ๆด้วย

กลไกการติดสลากเปปไทด์ฮอร์โมนนั้น ส่วนใหญ่โมเลกุลของเปปไทด์ ถูกเปลี่ยนแปลงได้ง่าย แม้จะรักษาขั้นตอนการติดสลากให้เหมือนเดิมทุกประการก็ตาม และในการติดสลากควรใช้สารมาตรฐานตัวเดียวกัน ซึ่งละลายอยู่ในสารละลายชนิดเดียวกันด้วย จะทำให้ได้สารติดสลากชนิดเดียวกัน จากผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้สารมาตรฐานโปรแลคตินในสารละลาย NH_4HCO_3 จะติดสลากได้ดีกว่าสารมาตรฐานที่ละลายใน $NaHCO_3$ ตามวิธีที่ใช้คลอรามีน-ที

ในการทำให้โปรแลคตินติดสลากบริสุทธิ์ ได้เลือกใช้แบบเจลฟิลเตรชั่น (gel filtration) โดยใช้เซฟาเดกซ์ จี-75 ซึ่งมีความสามารถในการแยกเปปไทด์ฮอร์โมนที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 3,000-70,000 โปรแลคตินติดสลากจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงดังกล่าว โปรแลคตินที่ติดสลากได้นั้น ก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป จะต้องนำมาทำให้บริสุทธิ์อีกหนึ่งครั้ง ซึ่งโปรแลคตินที่ติดสลากนี้ใช้กับการทดลองได้ในช่วงเวลาหนึ่งเท่านั้น จากผลการทดลองหาอายุการใช้งานของโปรแลคตินติดสลาก พบว่ามีอายุการใช้งานที่อยู่ในเกณฑ์ใช้ได้ประมาณ 3 สัปดาห์

โปรแลคตินติดสลากที่มี immunoreactivity สูงมากพอที่จะนำไปใช้ได้ ไม่ว่าจะได้จากการติดสลากด้วยวิธีใดก็ตาม เมื่อจะนำมาใช้ทำเรดิโออิมมูโนแอสเส จะต้องทดสอบหาความเหมาะสมในการทำปฏิกริยากับ anti-hPRL จากการทดลองปรากฏว่า anti-hPRL ความเข้มข้นสุดท้าย 1 : 400,000 เหมาะสมกับโปรแลคตินติดสลากที่มีปริมาณ 5,000 cpm.

ในการแยก free form และ bound form นี้ Yalow and Berson (1976) กล่าวว่าวิธีที่ให้ผลการแยกได้ค่อนข้างสมบูรณ์กว่าวิธีอื่น ก็คือการใช้ double antibody technique แล้วแยกออกโดยการปั่น วิธีนี้ต้องใช้เวลานานเกินกว่าจะนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์ได้ทันกับการวินิจฉัย และติดตามการรักษาโรค ด้วยเหตุนี้จึงเลือกใช้วิธีการแยก free form ออกโดยการดูดซับด้วย dextran-coated charcoal ซึ่งเป็น solid phase Herbert และคนอื่น ๆ (1965) รายงานว่า dextran จะเคลือบเป็นร่างแห ทำให้มีช่องว่างเหลือมีขนาดพอเหมาะกับการดูดซับ free form แต่ Binoux and Odell (1973) ให้ความเห็นว่า dextran ช่วยลดจำนวน free site ของผงถ่านที่ดูดซับทั้ง free และ bound form ซึ่งต่างจากรายงานของ Sand and Torjesen ที่ว่าการเติม dextran ลงไป ช่วยให้มีความสะดวกในขั้นแยก เนื่องจากผงถ่านตกตะกอนได้ง่ายระหว่างการปั่นแยก

จากการทดลองหาความเข้มข้นของผงถ่าน พบว่าน้ำยาแขวนตะกอนผงถ่าน 1% ปริมาตร 0.5 ml เติมลงในส่วนผสมที่ทำปฏิกริยา สามารถดูดซับ free form ได้ดีที่สุด โดยที่ % bound ของ non-specific binding ไม่สูงมาก และหลอดที่มีความเข้มข้นของโปรแลคตินเป็น 0 ng มี % bound สูงมากพอ ที่จะทำให้กราฟมาตรฐานมีความชันเหมาะกับการใช้งาน ข้อดีของการใช้ผงถ่านเคลือบเดกซแตรนก็คือ ราคาถูกและใช้ได้รวดเร็ว ส่วนข้อเสียคือโมเลกุลของผงถ่านไม่สามารถจับ free form ได้หมด เนื่องจากเปปไทด์มีขนาดของโมเลกุลใหญ่ จึงทำให้ % bound ของ non-specific binding สูง

การเลือกเวลาสำหรับอินคิวเบท มีหลักในการเลือก โดยคำนึงถึงความเหมาะสมของเวลาทำงาน ได้เลือกเวลา 4, 24 และ 48 ชม.ใช้ในการทดลอง จากผลการทดลอง (รูปที่ 8 หน้า 31) พบว่าการอินคิวเบท 24 ชม.เป็นเวลาที่เหมาะที่สุด เนื่องจากเวลาที่ใช้น้อยแต่ให้ผลต่อกราฟมาตรฐานดีใกล้เคียงกับ 48 ชม. ซึ่งต้องใช้เวลาในการอินคิวเบทอีกหนึ่งวัน ส่วนการที่จะให้ได้ผลได้เร็วที่สุดคือได้ผลภายในวันเดียวนั้น ผลการทดลองกับการอินคิวเบท 4 ชม.นั้นไม่สามารถทำได้ เนื่องจากกราฟมาตรฐานไม่เหมาะสมกับการนำมาใช้งาน จึงเลือกเวลาของการอินคิวเบท 24 ชม.

ได้ทดสอบการเปลี่ยนแปลงของกราฟมาตรฐาน โดยการเติม charcoaled serum ลงในสารละลายมาตรฐานที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐาน เพื่อทดสอบปฏิกริยาโปรตีนในซีรัมที่มีต่อ anti-hPRL จากผลการทดลองพบว่า charcoaled serum มีปฏิกริยาต่อ anti-hPRL สังเกตได้จากกราฟมาตรฐานเปลี่ยนไป (ดูรูปที่ 8 หน้า 31) การทดลองหาปริมาณโปรแลคตินในซีรัม จึงต้องเติม charcoaled serum ลงในสารละลายโปรแลคตินมาตรฐานตอนทำกราฟมาตรฐานด้วย เพื่อให้กราฟมาตรฐานอยู่ในภาวะเดียวกันกับสารละลายตัวอย่าง

ได้ทดลองความเชื่อถือได้ของวิธีการแอสเส โดยทำการทดลองตรวจหาความถูกต้อง ความแม่นยำ ความไวและความจำเพาะของวิธีการ พบว่าความถูกต้องของการแอสเสที่ได้จากการตรวจหาปริมาณโปรแลคติน จากสารละลายตัวอย่างที่มีปริมาณโปรแลคติน 6, 20 และ 50 นาโนกรัม/มล. โดยคิดเป็น % recovery ได้ 100.5 ± 21.1 %, 120.8 ± 11.8 % และ 97.3 ± 5.0 % สำหรับค่าต่ำ, ค่ากลาง และค่าสูงตามลำดับ นอกจากนี้ได้คำนวณ % deviation ของทั้งหมดได้ -6.3 % ซึ่ง Abraham และคนอื่น ๆ (1971) ได้กำหนด % deviation ไว้ไม่เกิน ±20 % จาก expected value

จากการทดสอบความแม่นยำของวิธีการแอสเส โดยการหาปริมาณโปรแลคติน 3 ระดับ ๆละ 3 ครั้ง (ตารางที่ 5 หน้า 33) ความแม่นยำของการแอสเสคิดเป็นสัมประสิทธิ์ของการแปรเปลี่ยน (% CV) พบว่าความแม่นยำของการแอสเสเป็น 14.6-16.6 %, 5.6-7.3 % และ 4.1-10.5 % จากการตรวจวัดสำหรับค่าต่ำ, ค่ากลาง และค่าสูงตามลำดับในการทำ within assay ส่วน between assay พบว่าสัมประสิทธิ์ของการแปรเปลี่ยนเป็น 24 %, 15.9 % และ 13.1 % สำหรับค่าต่ำ, ค่ากลาง และค่าสูงตามลำดับ การที่พบว่าสัมประสิทธิ์ของการแปรเปลี่ยนของค่าต่ำมีเปอร์เซนต์สูง เป็นเพราะว่าค่าต่ำที่เตรียมไว้ให้อ่านตรงส่วนบนของกราฟมาตรฐาน ซึ่งเป็นส่วนที่อ่านความถูกต้องได้น้อย จึงทำให้สัมประสิทธิ์ของการแปรเปลี่ยนสูง

ได้ทดสอบความไวของกราฟมาตรฐาน พบว่ากราฟมาตรฐานสามารถอ่านค่าได้ต่ำสุด 1.90 นาโนกรัม/มล. (รูปที่ 10 หน้า 35) ส่วนการทดสอบความจำเพาะของ anti-hPRL ได้ทดสอบการทำปฏิกริยาของเปปไทด์ฮอร์โมน ได้แก่ LH, FSH, hCG, hGH และ hPL กับ anti-hPRLพบว่าเปปไทด์ฮอร์โมนที่นำมาทดสอบ มีปฏิกริยากับ anti-hPRL น้อยมาก คือน้อยกว่า 0.01 % cross reaction ทุกตัว

เนื่องจากสารติดสลากโปรแลคตินเป็นสารที่ติดสลากด้วยไอโอดีน-125 ซึ่งให้รังสีแกมมา และมีเวลาครึ่งอายุ 60 วัน จำเป็นต้องทดสอบอายุการใช้งานของ ^{125}I-hPRL พบว่า immunoreactivity ลดลงเมื่อ ^{125}I-hPRL มีอายุ 2-3 สัปดาห์ แต่ยังอยู่ในเกณฑ์ที่จะนำมาใช้ในการแอสเสได้ และ immunoreactivity จะลดลงมากเมื่อ ^{125}I-hPRL มีอายุ 4 สัปดาห์ จึงกำหนดอายุของ ^{125}I-hPRL ไว้เพียง 3 สัปดาห์หลังจากการติดสลาก

ได้ทำการตรวจหาปริมาณโปรแลคตินในซีรัมของสตรีอาสาสมัคร 4 รายตลอดระยะเวลาหนึ่งรอบเดือน ซึ่งตัวอย่างซีรัมของสตรีอาสาสมัครทั้ง 4 รายนี้ได้ผ่านการตรวจหาปริมาณ LH โดยฝ่ายเวชศาสตร์ประชากร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่าซีรัมของสตรีอาสาสมัครแสดง LH peak วันที่ 14, 21, 15 และ 15 ของรอบเดือนของสตรีอาสาสมัครรายที่ 1, 2, 3และ 4 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรแลคตินที่ได้กับ LH peak ที่หาได้แล้ว พบว่าสตรีอาสาสมัครรายที่ 3 แสดง prolactin peak ตรงกับ LH peak พอดี ซึ่งตรงกับรายงานของ Robyn และคนอื่น ๆ ที่รายงานในปี 1977 ส่วนสตรีอาสาสมัครรายอื่น ๆไม่แสดง prolactin peak ให้ปรากฏ ผลการทดลองนี้ตรงกับรายงานของ Hwang, Guyda and Friesen (1971) ซึ่งได้รายงานว่าไม่พบ prolactin peak ในระหว่างรอบเดือน จากการทดลองได้ผลทั้งพบและไม่พบ prolactin peakในสตรีอาสาสมัครทั้ง 4 รายนี้ ไม่สามารถอธิบายได้เพราะจำนวนตัวอย่างจากสตรีอาสาสมัครน้อยเกินไป

เมื่อนำปริมาณโปรแลคตินที่ได้ทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ย พบว่าปริมาณโปรแลคตินที่

follicular phase เป็น 15.9 ± 5.6 ng/ml (n=37), mid-cycle 21.2 ± 12.7 ng/ml (n=4) และ luteal phase 16.4 ± 6.2 ng/ml (n=40) ซึ่งตรงกับรายงานของ Th.Lemarchand-Beraud, Reymond and Rey (1977) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรแลคตินในระหว่างรอบเดือน โดยพบว่าปริมาณโปรแลคตินมีค่าสูงในระหว่าง mid-cycle และ luteal phase

ประโยชน์ที่ได้รับจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ คือได้วิธีตรวจหาปริมาณโปรแลคตินในซีรัมที่ให้ผลได้รวดเร็ว มีความถูกต้องและเชื่อถือได้ สามารถนำไปประยุกต์เพื่อใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ได้

สรุป

ก. การทดลองนี้ใช้เวลาในการอินคิวเบท 24 ชม. และใช้น้ำยาแขวนตะกอนผงถ่านเคลือบเดกซ์แตรน 1% แยก free formและ bound form ออกจากกันหลังจากเติมน้ำยาแขวนตะกอนผงถ่าน ดังนั้นหากต้องการผลการตรวจด่วน ก็สามารถทำให้เสร็จได้ภายในเวลาสองวัน

ข. พบว่าวิธีนี้มีcross-reactionกับเปปไทด์ฮอร์โมนอื่น ๆน้อยมาก วิธีนี้จึงมี specificity สูงมาก ความแม่นยำในการวัดเมื่อทำ within assayได้สัมประสิทธิ์ของการแปรเปลี่ยนเป็น 14.6-16.6 %, 5.6-7.3 % และ 4.1-10.5 %สำหรับค่าต่ำ, ค่ากลาง และค่าสูงตามลำดับ และได้ 24.0 %, 15.9 % และ 13.1 %สำหรับค่าต่ำ, ค่ากลาง และค่าสูงตามลำดับสำหรับ between assay ส่วนความถูกต้องได้% deviation เฉลี่ยเป็น -6.3% จาก expected value

ข้อเสนอแนะ

ก. สิ่งที่ควรพยายามทำต่อไปคือ ควรหาวิธีการสกัดสลากโปรแลคตินที่ใช้ได้กับโปรแลคตินซึ่งอยู่ในสารละลายชนิดต่าง ๆ

ข. เนื่องจากการทดลองนี้ ทดลองในสตรีอาสาสมัครเพียง 4 ราย ควรจะตรวจวัดปริมาณโปรแลคตินในคนไทยปกติมากกว่านี้ ซึ่งจะให้ประโยชน์ทางด้านการศึกษา.