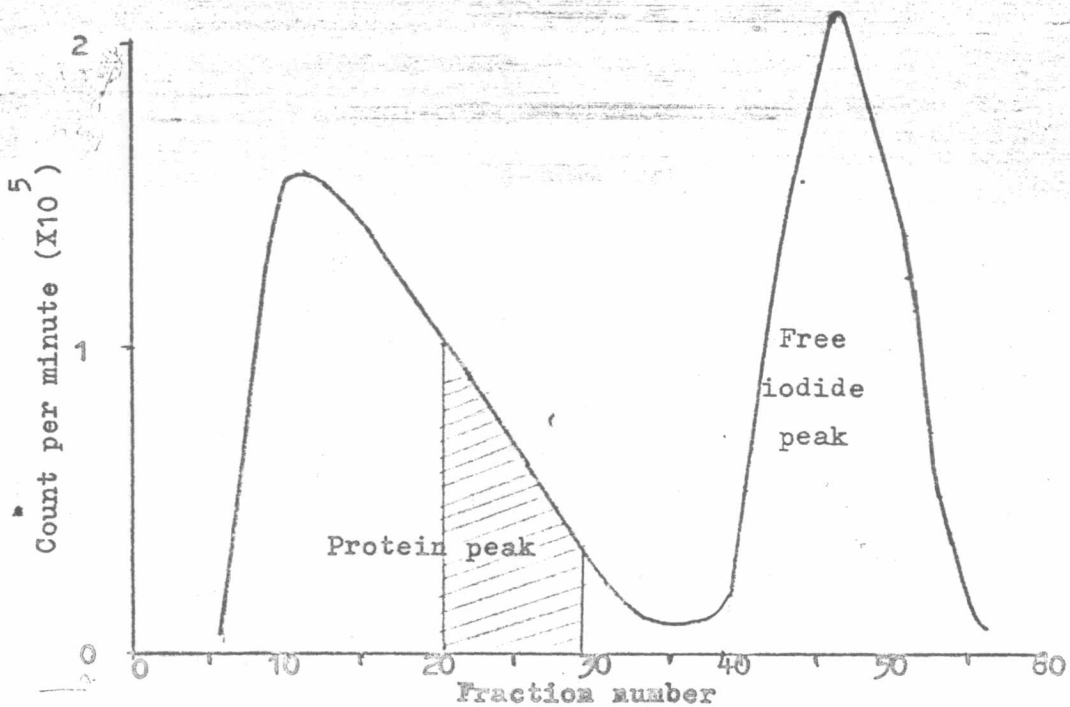




4.1 การคัดสลายโปรแลคตินมาตรฐาน ด้วยไอโอดีน -125

จากการทดลองคัดสลายโปรแลคตินมาตรฐาน ด้วยไอโอดีน -125 ใช้วิธี Chloramine -T ที่ 4° C แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านส่วนผสมของสารที่คัดสลายลงใน เซฟาเซกซ์คอลัมน์ เก็บส่วนที่ผ่านลงมาหลอดละ 1/มล. นำ 10 ไมโครลิตร ของแต่ละ หลอดไปนับปริมาณรังสี เป็น cpm เขียนกราฟ ให้แกน Y เป็น cpm แกน X เป็น ลำดับที่ของหลอดที่เก็บ พบว่า แยกได้ peak 2 peaks peak แรกเป็น "Protein peak" peak หลังเป็น "Free iodide peak" รูปที่ 5

รูปที่ 5 First purification profile of iodinated materials



จากการทดสอบ binding ของแต่ละ fraction ใน protein peak โดยใช้ tracer ที่มีปริมาณ 10,000 cpm ทำปฏิกิริยากับ anti-hPRL ที่มี ความเข้มข้นตอนต้นเป็น 1 : 1,000 ปรากฏว่า fraction 21 - 28 ให้ binding ประมาณ 22 - 28 % Bound จึงนำ fraction 21 - 28 (ส่วนที่แสดง ในรูปที่ 5) มารวมกัน แล้วจึงนำมาทำ second purification เพื่อ ทำให้ tracer ที่ใช้ มี ^{125}I -hPRL บริสุทธิ์มากที่สุด เพื่อที่จะมากได้ tracer ที่เตรียมได้ สามารถนำมาใช้กับ วิธเรดิโออิมมูโนแอสเส สำหรับตรวจวัดปริมาณโปรแลคตินได้ เป็น อย่างดี แต่เนื่องจาก การติดสลากรด้วยวิธีนี้ ไม่ได้ผลกับโปรแลคตินมาตรฐาน ที่โตมาใหม่ ซึ่งเป็นคนละชนิดกับที่โตทำการทดลองไปแล้ว อาจเป็นเพราะ คลอรามิน - ที เป็นสารลด- ซิโตซิงค์อย่างแรง ทำให้โมเลกุลของโปรแลคติน เปลี่ยนไปขณะติดสลากร ทำให้สารที่ติด สลากร มีปฏิกิริยากับ anti-hPRL น้อยมาก ซึ่งไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ ในการทดลอง จึงได้นำ ^{125}I -hPRL ขององค์การอนามัยโลก ได้รับความช่วยเหลือจาก ฝ่ายเวชศาสตร์ ประชากร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาใช้ตลอดการทดลองในขั้นต่อไป

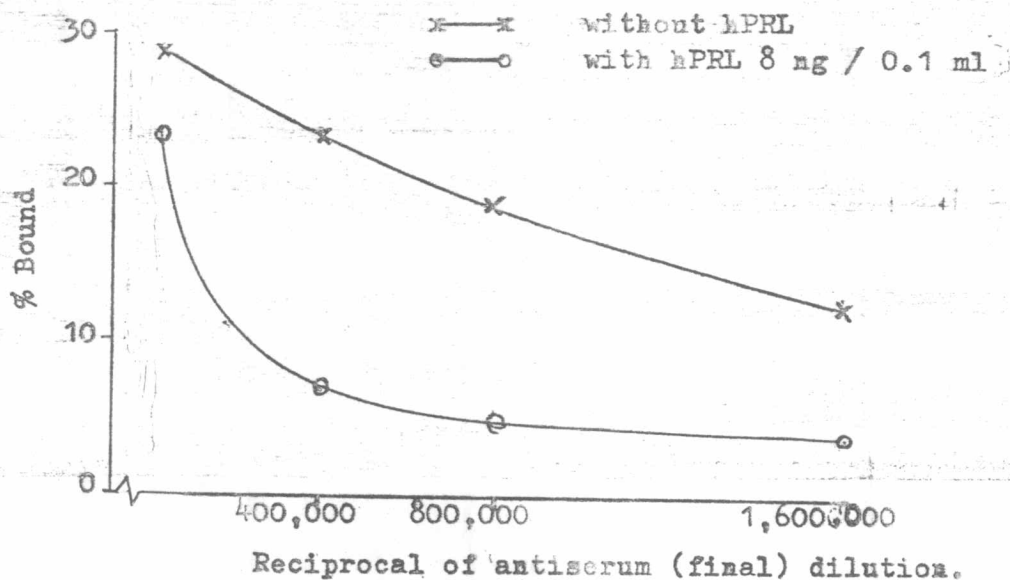
4.2 การเลือกความเข้มข้นของ anti-hPRL ที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ ในการทดลอง

จากการนำ anti-hPRL ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1 : 5,000 ถึง 1 : 320,000 ทำปฏิกิริยากับ ^{125}I -hPRL ที่มี ปริมาณ 5,000 cpm. ได้ผลการทดลอง ตามรูปที่ 6 จากผลการทดลองที่ได้ ตามตารางที่ 2 หนา 29 พบว่า ความเข้มข้นสุดท้าย ของ anti-hPRL เท่ากับ 1 : 400,000 ในความแตกต่างของ % bound ระหว่างจุดที่เติมโปรแลคตินมาตรฐาน 8 เคนโนกรัม กับ จุดที่ไม่ได้เติมโปรแลคติน มาตรฐาน มากที่สุด จึงเลือก anti-hPRL ที่มี ความเข้มข้นสุดท้าย 1 : 400,000

4.3 การเลือกความเข้มข้นของผงถ่าน เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

จากผลการทดลองในข้อ 4.2 ได้ใช้น้ำยาแขวนตะกอนผงถ่านความเข้มข้น 1%

รูปที่ 6 Antiserum dilution curve

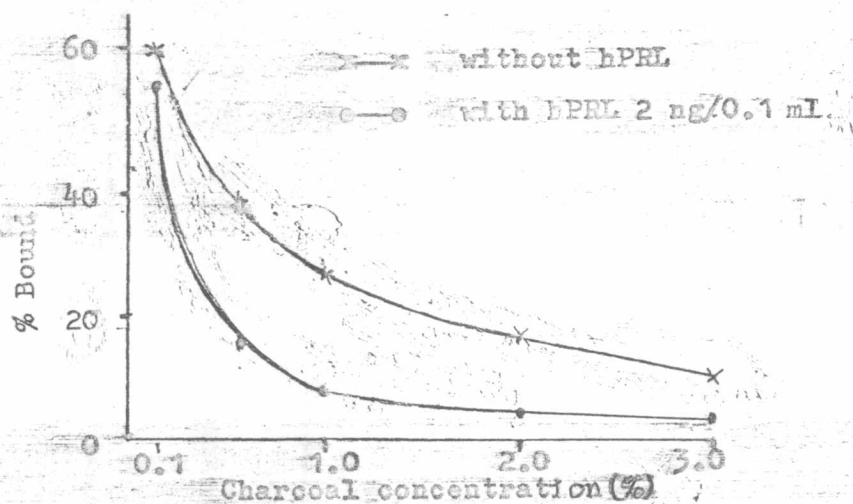


ตารางที่ 2 % Bound ที่ต่างกันระหว่างที่เติมโปรแลคตินมาตรฐาน กับ ที่ไม่เติมโปรแลคตินมาตรฐาน ในการทำ Antiserum dilution curve

ความเข้มข้นสุดท้าย ของแอนติบอดี (กลับเศษเป็นส่วน)	Average % Bound		% Bound ที่ต่างกัน
	ไม่เติม hPRL	เติม hPRL	
50,000	28.4	23.4	5.0
100,000	28.2	15.4	12.8
200,000	26.7	10.9	15.8
400,000	22.6	6.2	16.4
800,000	17.9	4.8	13.1
1,600,000	11.6	2.7	8.9

สำหรับแยก free form กับ bound form นั้นอาจไม่เหมาะสมก็ได้ จึงทำการทดลอง เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำยาแขวนตะกอนผงถ่านที่เหมาะสมจริง ๆ โดยใช้ความเข้มข้น ผงถ่านตั้งแต่ 0.1 - 3.0 % ดูคัม free form แยกออกจาก bound form พบว่าความเข้มข้นของน้ำยาแขวนตะกอนผงถ่าน 1% เหมาะสมที่สุด ดังแสดงไว้ในรูปที่ 7

รูปที่ 7 อิทธิพลของผงถ่านต่อการดูคัม 125 I-hPRL อิสระ (free form)

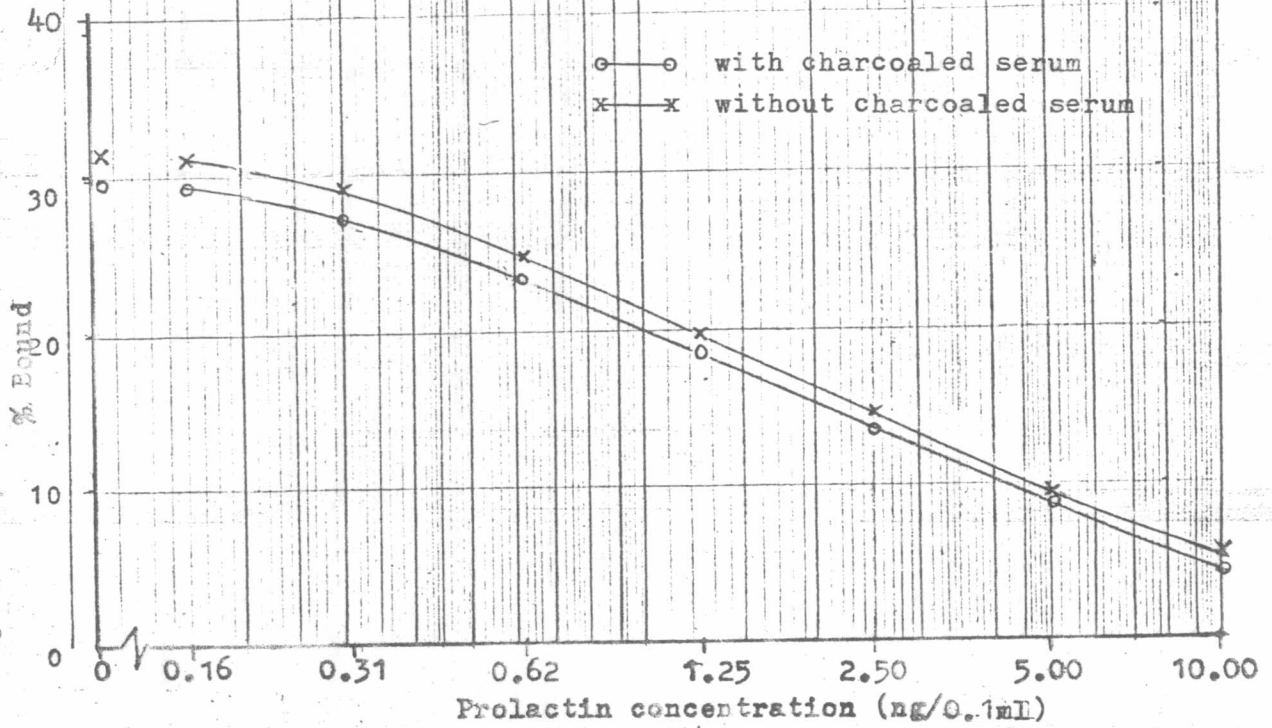


4.4 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

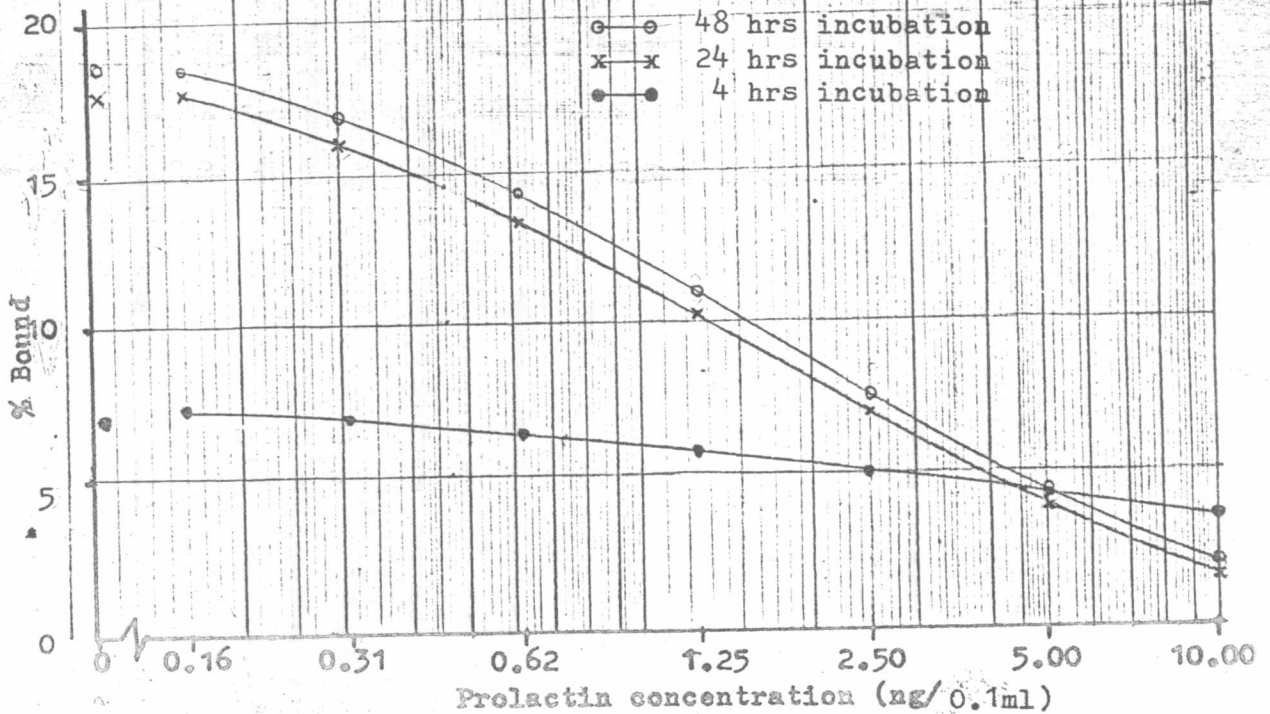
4.4.1 การเลือกเวลาในการอินคิวเบต จากการทดลองที่นำมา ได้ ใช้เวลาในการอินคิวเบต 24 ชม. ที่ 25 °C ปฏิกริยาอาจจะไม่ไปจุดอิ่มตัวที่แท้จริง จึงได้ ทดลองทำกราฟมาตรฐาน 3 ชุด แล้วอินคิวเบตเป็นเวลา 4, 24 และ 48 ชม. เมื่อได้ เปรียบเทียบกันแล้วพบว่า เวลาอินคิวเบต 4 ชม. ไม่เหมาะสม สำหรับเวลาอินคิวเบต 24 และ 48 ชม. กราฟมาตรฐานมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย แต่กราฟมาตรฐาน ทั้งสองเส้นขนานกัน ดังแสดงให้เห็นตามรูปที่ 8 จึงได้เลือกการอินคิวเบตที่ 25 °C เป็น เวลา 24 ชม. เพื่อความเหมาะสมกับการนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคไตขั้นสูงที่

4.4.2 ผลของการทดสอบคู่อิทธิพลของ charcoalized serum ต่อกราฟ มาตรฐาน จากการทำกราฟมาตรฐานสองชุด ชุดหนึ่งได้เติม charcoalized serum ลงไปค้ำย ส่วนอีกชุดหนึ่งไม่เติม charcoalized serum พบว่ากราฟมาตรฐานของ

รูปที่ 9 อิทธิพลของ charcoalled serum ที่มีต่อกราฟมาตรฐาน



รูปที่ 8 กราฟมาตรฐาน เมื่ออินคิวเบชัน 4, 24 และ 48 ชม.



ชุดที่เติม charcoal serum ต่ำกว่าชุดที่ไม่ได้เติม charcoal serum เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังแสดงให้เห็นตามรูปที่ 9 จึงได้เลือกทำกราฟมาตรฐานที่เติม charcoal serum ลงไปคาย

4.5 ผลการทดลองเพื่อหาปริมาณซีรัมที่เหมาะสม เพื่อนำมาใช้ในการหาปริมาณโปรแลคติน

จากการทดลองนำ Q C P serum มาใช้ในการตรวจหาปริมาณโปรแลคติน โดยเลือกใช้ปริมาณ 0.05 และ 0.1 มล. ผลปรากฏว่าการใช้ปริมาณ 0.1 มล. มีผลทำให้ค่าโปรแลคตินสูงชันกว่าเป็นจริงมาก ส่วนปริมาณ 0.05 มล. ให้ผลโปรแลคตินอยู่ในเกณฑ์ใกล้เคียงกับความเป็นจริง ดังได้แสดงผลการทดลองไว้ในตารางที่ 3 จึงเลือกใช้ปริมาณของซีรัม 0.05 มล. เพื่อใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 3 ผลของการตรวจวัดปริมาณโปรแลคตินใน Q C P serum

CODE & NUMBER	Reference value ng/ml (mean \pm SD)	ปริมาณที่วัดได้จากการทำครั้งเดียว ng/ml	
		เมื่อใช้ปริมาณ 0.05 มล.	เมื่อใช้ปริมาณ 0.1 มล.
Red 5	49.63 \pm 16.05	56.0	>100
Blue 5	6.69 \pm 2.91	3.6	48
Red 6	30.42 \pm 8.00	27.9	>100
Blue 6	14.38 \pm 4.70	12.3	>100

4.6 ผลการทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีการทดลอง

- 4.6.1 ความจำเพาะของวิธีการ จากการทดสอบความจำเพาะของ anti-hPRL กับ LH, FSH, hCG, hGH และ hPL ผลปรากฏว่าฮอร์โมนทุกตัวที่นำมาทดสอบมีปฏิกิริยา (cross reaction) กับ anti-hPRL น้อยกว่า 0.01% ดังแสดงผลไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความจำเพาะของ anti-hPRL

Peptide hormones	% cross reaction
Follicle-stimulating hormone (F S H)	Less than 0.01
Luteinizing hormone (L H)	"
Human chorionic gonadotrophin (h C G)	"
Human placental lactogen (h P L)	"
Human growth hormone (h G H)	"
Human prolactin (hPRL)	100

4.6.2 ความแม่นยำของการวัดปริมาณโปรแลคติน จากการวัดปริมาณโปรแลคตินใน charcoaled serum ที่มีความเข้มข้นของโปรแลคติน 3 ระดับ ซึ่งทดลองแบบ within assay และ between assay แล้ว หลังจากคำนวณ mean, S D และ % C.V. นำค่าทั้งหมดมาพิจารณาตามตารางที่ 5 พบว่า ความแม่นยำในการตรวจวัดปริมาณโปรแลคติน ในระดับค่าใด % C.V. สูงทั้ง within & between assay ส่วนระดับกลางและสูงได้ % C.V. ตากว่า

ตารางที่ 5 ความแม่นยำของการวัดปริมาณโปรแลคตินในซีรัม

Pooled serum	Within assay						Between assay	
	I		II		III		I - III	
	$\bar{X} \pm S.D$ N=10	%CV	$\bar{X} \pm S.D$ N=10	%CV	$\bar{X} \pm S.D$ N=10	%CV	$\bar{X} \pm S.D$ N=30	%CV
ค่าต่ำ	0.61±0.09	14.6	0.52±0.08	16.2	0.38±0.06	16.6	0.51±0.12	24.0
ค่ากลาง	2.47±0.13	5.6	2.67±0.18	6.8	1.88±0.13	7.3	2.34±0.37	15.9
ค่าสูง	6.23±0.54	8.6	5.64±0.59	10.5	4.86±0.20	4.1	5.57±0.73	13.1

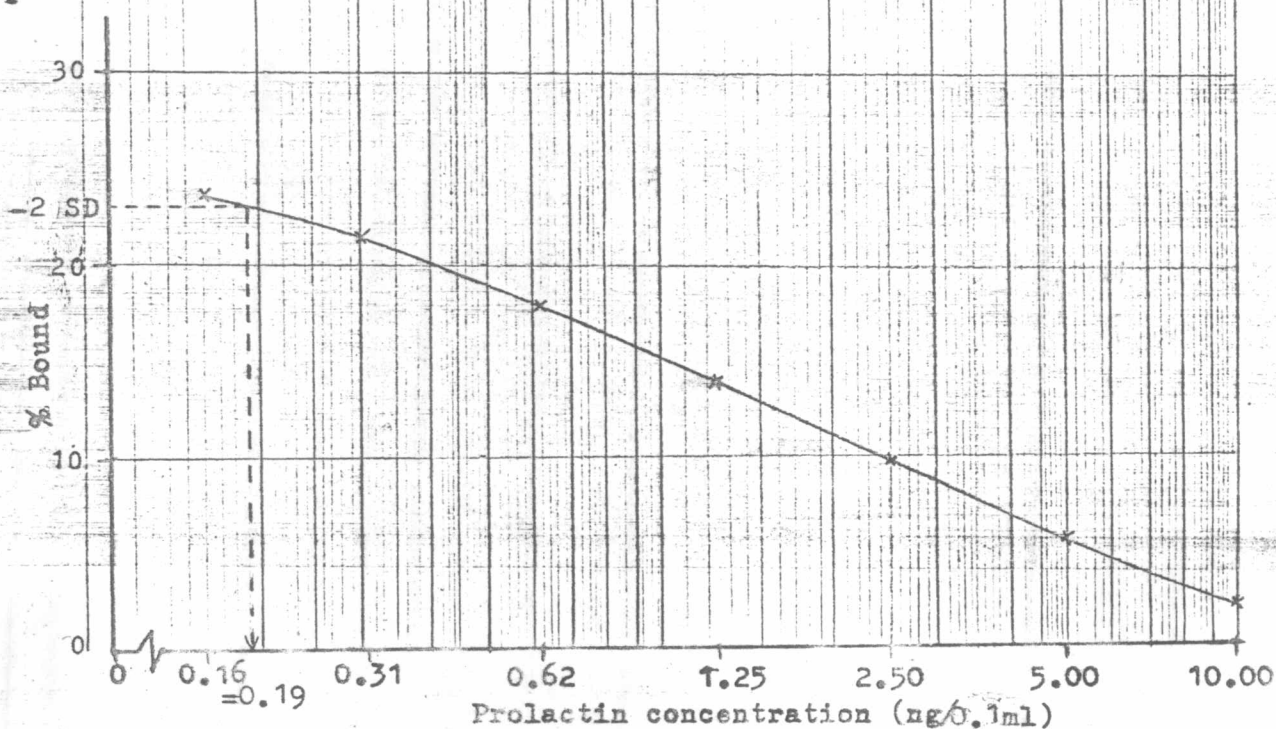
4.6.3 ความถูกต้องของการวัดปริมาณโปรแลคติน จากการตรวจวัด ปริมาณโปรแลคตินใน *controlled serum* ที่มีปริมาณโปรแลคตินเท่ากับ 6.0, 20.0 และ 50.0 ng/ml. หลังจากนั้นนำค่าที่ได้จากการตรวจวัดปริมาณ มาคำนวณหาค่า % recovery และ % deviation พบว่าได้ recovery 100.5 ± 21.1 % สำหรับค่า ต่ำ, 120.8 ± 11.8 % สำหรับค่ากลาง และ 97.3 ± 5.0 % สำหรับค่าสูง และ ได้ % deviation เฉลี่ย -6.3 ดังแสดงผลการทดลองไว้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ความถูกต้องของวิธีการตรวจวัดปริมาณโปรแลคตินในซีรัม

ปริมาณโปรแลคติน จริง (ng/ml)	ปริมาณที่วัดได้ (ng/ml)	% recovery		% deviation
		\bar{X}	$\bar{X} \pm SD$	
6	7.4	123.3	100.5 ± 21.1	- 23.0
	4.9	81.6		+ 18.0
	5.8	96.6		+ 3.0
20	21.5	107.5	120.8 ± 11.8	- 7.5
	25.0	125.0		- 25.0
	26.0	130.0		- 30.0
50	46.0	92.0	97.3 ± 5.0	+ 8.0
	49.0	98.0		+ 2.0
	51.0	102.0		- 2.0
Mean of % deviation				- 6.3

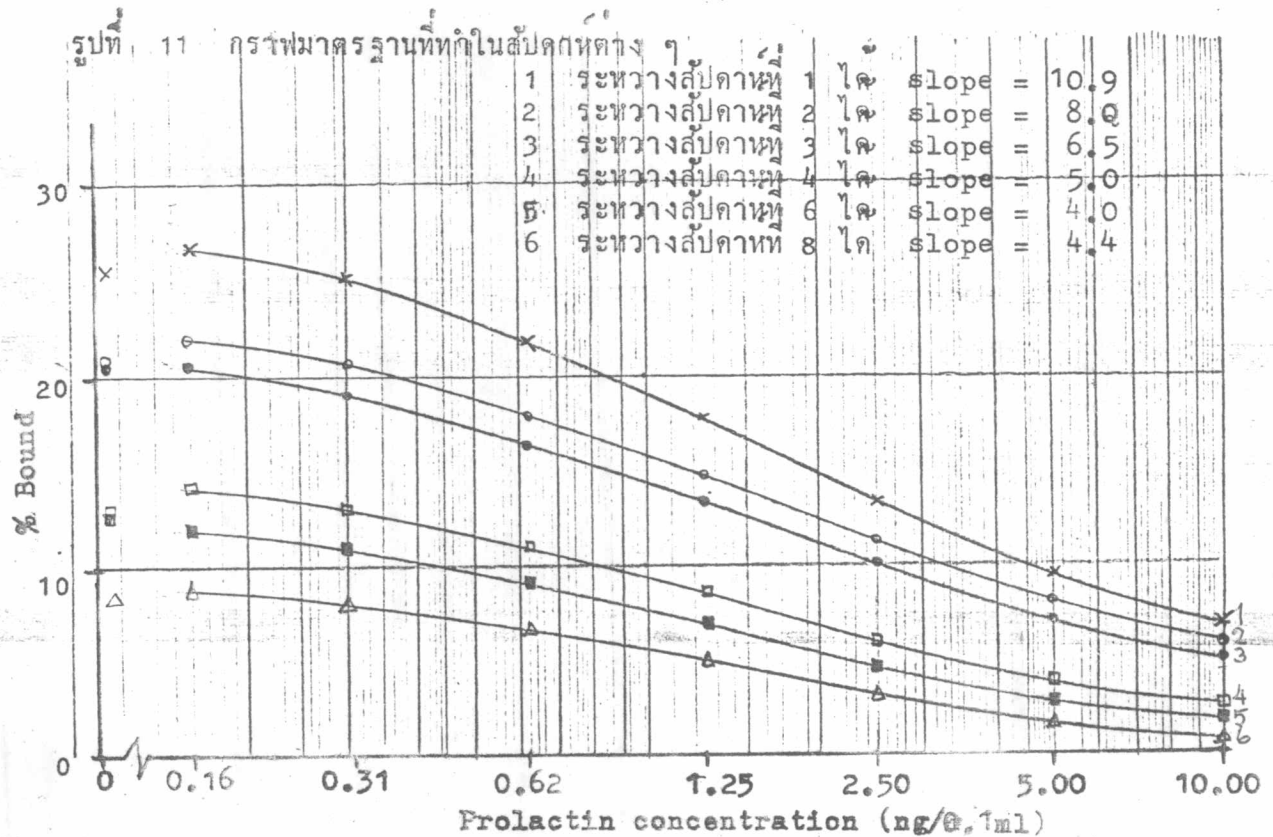
4.6.4 ความไวของวิธีการวัดปริมาณโปรแลคติน ดำเนินตามวิธีการข้อ 3.4.7 หน้า 23 หลังจากคำนวณค่า % bound เฉลี่ย และ SD ของแต่ละความเข้มข้น นำ % bound เฉลี่ยมาเขียนกราฟมาตรฐาน ค่าปริมาณโปรแลคตินที่อ่านได้จาก % bound ของหลอดที่ไม่ได้เติมโปรแลคตินมาตรฐานที่ $- 2 SD$ ได้ 1.9 ng/ml ค่าที่ได้นี้เป็นค่าความไวของวิธีการวัดปริมาณโปรแลคติน ดังได้แสดงไว้ในรูปที่ 10

รูปที่ 10 ความไวของวิธีการวัดปริมาณโปรแลคตินในซีรัม



4.7 ผลของการทดสอบอายุการใช้งานของ ^{125}I -hPRL

จากการนำ ^{125}I -hPRL มาทดลองหาประสิทธิภาพของการใช้งาน โดยการทำการวัดมาตรฐาน เมื่อ ^{125}I -hPRL มีอายุการใช้งานในสัปดาห์ต่างกัน พบว่า slope ของกราฟมาตรฐานเปลี่ยนไป เมื่อ ^{125}I -hPRL มีอายุการใช้งานย่างเข้าสัปดาห์ที่ 4 จะเห็นได้ว่ากราฟมาตรฐานต่ำลงมาก และค่า slope ลดลงครึ่งหนึ่ง และค่า slope จะลดลงอีกเมื่อ ^{125}I -hPRL มีอายุการใช้งานนานเกินสัปดาห์ที่ 4 ดังได้แสดงไว้ในรูปที่ 11



4.8 ผลการตรวจวัดปริมาณโปรแลคตินในซีรัม

จากการนำวิธีการทดลองที่เตรียมได้ นี้ มาทำการตรวจวัดปริมาณโปรแลคตินในซีรัมที่ได้จากการเจาะเลือดตลอดระยะหนึ่งรอบเดือน ของสตรีอาสาสมัคร 4 ราย โดยมีมาตรฐานการควบคุมผลการทดลองควบคู่ทุกการทดลอง ผลการทดลองดังได้แสดงไว้ในตารางที่ 7 รูปที่ 12, 13, 14 และ 15

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณโปรแลคตินในซีรัมของสตรีอาสาสมัคร 4 ราย

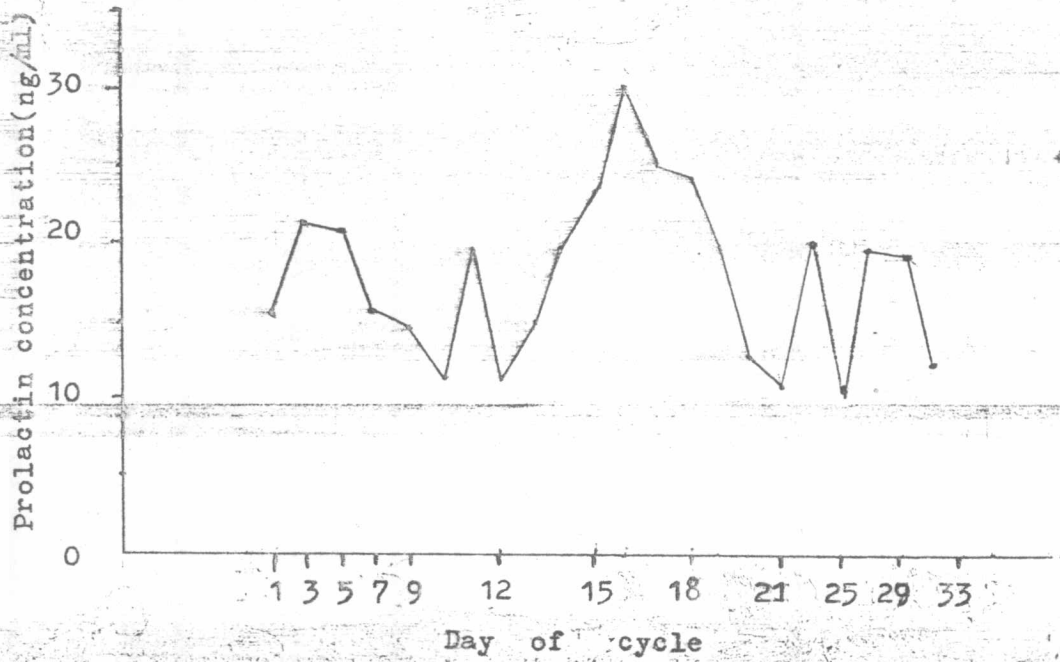
วันที่ของ รอบเดือน	ปริมาณโปรแลคติน (ng/ml) ที่ตรวจวัดได้จากซีรัม สตรีอาสาสมัครรายที่				mean \pm SD (ng/ml)	
	1	2	3	4		
1	15.4	-	-	-	15.9 \pm 9.6	
3	22.5	17.8	21.0	11.2		
5	21.0	10.7	22.5	12.0		
7	15.6	8.0	22.7	21.4		
9	14.0	28.0	16.2	13.2		
10	11.4	17.4	11.2	16.9		
11	19.0	15.9	15.2	3.3		
12	11.6	11.9	19.7	19.2		
13	14.9	17.9	21.0	5.0		
14	19.9	27.5	11.0	8.8		
15	23.6	7.7	37.7	16.0		21.2 \pm 12.7
16	30.0	12.2	9.7	21.1		16.4 \pm 6.2
17	24.5	13.6	18.7	19.2		
18	23.5	10.9	14.9	12.4		
19	19.5	16.6	5.1	23.5		
20	12.2	11.4	24.5	10.0		
21	10.6	22.0	12.7	15.0		
23	19.6	10.6	14.5	36.0		
25	9.8	14.6	9.8	-		
27	18.2	18.3	10.0	-		
29	17.2	20.5	10.9	-		
31	12.8	18.9	-	-		
33	-	21.3	-	-		

day 1-14 = follicular phase (n = 37)

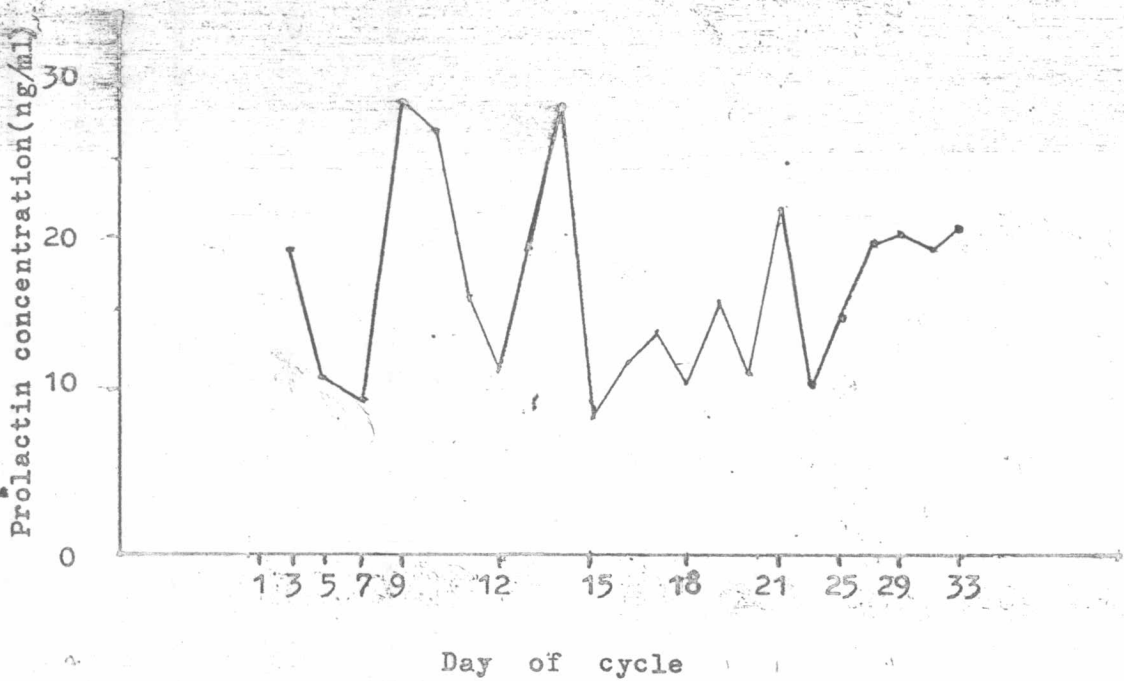
day 15 = mid-cycle (n = 4)

day 16-33 = luteal phase (n = 40)

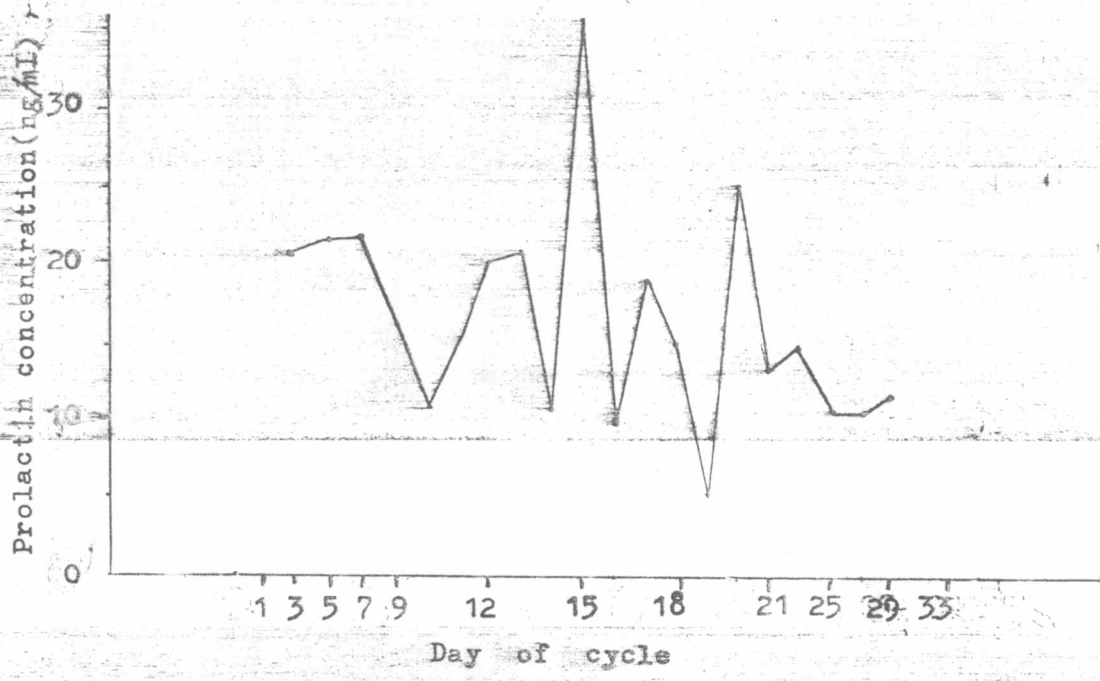
รูปที่ 12 ปริมาณโปรแลคตินในซีรัมระหว่างรอบเดือนของสตรีอาสาสมัคร รายที่ 1



รูปที่ 13 ปริมาณโปรแลคตินในซีรัมระหว่างรอบเดือนของสตรีอาสาสมัคร รายที่ 2



รูปที่ 14 ปริมาณโปรแลคตินในซีรัมระหว่างรอบเดือนของสัตว์ ราชที่ 3



รูปที่ 15 ปริมาณโปรแลคตินในซีรัมระหว่างรอบเดือนของสัตว์ ราชที่ 4

