บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

หลักการทั่วไปในการเลือกให้ได้แอนตีบอดีที่เหมาะสมสำหรับเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของสารใด ๆ ก็ตาม นอกจากจะต้องพิจารณาถึง titre ปัจจัยสำคัญอย่างยิ่งที่จะต้องคำนึงถึงก็คือ พลังงานที่เกิดจากการรวมตัว (energy of interaction) ระหว่างแอนติเจนและแอนตีบอดีนั้น ๆ หรืออีกนัยหนึ่ง คือ ความจำเพาะ (specificity) และความแน่นในการรวมตัว(affinity) ของแอนตีบอดีต่อแอนติเจนที่กำลังศึกษา ในรายงานนี้ ผู้ทดลองได้เลือกใช้แอนตีบอดีที่ได้จากการฉีด E_2-6-BSA เข้าในสัตว์ทดลอง แอนตีบอดีนี้เป็นแอนตีบอดีที่คาดว่าจะมีความจำเพาะสูงสำหรับเอสตราไดออล (Linberg และคณะ, 1974) เนื่องจากแอนติเจนที่ใช้เป็นอนุพันธ์ของเอสตราไดออลที่มีโปรตีนมาเกาะที่ตำแหน่ง 6 ของสเตอรอยด์นิวเคลียส โดยเหลือ functional groupที่ตำแหน่ง 3 และตำแหน่ง 17 ไว้ จากการทดสอบปฏิกริยาการรวมตัวของสารติดฉลากกับแอนตีบอดีทั้ง 4 ชุด คือ R1,R3, R3 f.b. และS5 (รูปที่ 5 ก. หน้า 35 และ 5 ข. หน้า 36) พบว่า ที่ความเข้มข้นของแอนตีบอดีเป็น 1:2,500 แอนตีบอดีชุดR1 จะเกิดปฏิกริยาการรวมตัว (%bound)สูงกว่าแอนตีบอดีชุดอื่น ๆ เมื่อความเข้มข้นของแอนตีบอดีน้อยลง ปฏิกริยาการรวมตัวจะลดลงน้อยกว่าแอนตีบอดีชุดอื่น ๆ นอกจากนี้ปฏิกริยาการแทนที่ด้วยสารมาตรฐาน 1,000 พิโคกรัม เมื่อใช้แอนตีบอดีชุด R1 จะไม่ดีเท่าแอนตีบอดี 3 ชุดหลัง

ถ้าจะพิจารณาเลือกแอนตีบอดีจากปฏิกริยาการรวมตัวที่ลดลง เนื่องจากการแทนที่ด้วยสารมาตรฐานอาจกล่าวได้ว่าแอนตีบอดี R3 f.b. จะมีคุณสมบัติดีที่สุด แต่ถ้าจะพิจารณาให้ละเอียดยิ่งขึ้น ควรพิจารณาจาก % ความแตกต่างสูงสุดของปฏิกริยาการรวมตัวด้วย จากตารางที่ 5 หน้า 37

จะเห็นว่า แอนติบอดี R3 f.b. จะให้ % ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัว ถึง 57% ซึ่งสูงกว่าค่าที่คำนวณได้จากแอนติบอดีชุดอื่น ๆ

นอกจากค่า % ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัวแล้ว ปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งที่ควรนำมาประกอบการพิจารณาเลือกแอนติบอดีก็คือ ค่า equilibrium constant (K) ของปฏิกริยาการรวมตัวระหว่างสารติดฉลากกับแอนติบอดี และโดยปกติแล้ว ผู้ทดลองสามารถคำนวณค่า K ได้โดยอาศัย Scatchard plot (Scatchard,1949) แต่ในการทดลองนี้ไม่สามารถคำนวณค่า K ที่ถูกต้องได้ เนื่องจากไม่ทราบความเข้มข้นที่แท้จริงของสารติดฉลากที่นำมาใช้ จึงจำเป็นจะต้องพิจารณาเลือกแอนติบอดี โดยใช้ % ความแตกต่างสูงสุดของปฏิกริยาการรวมเป็นหลัก นอกจากนี้ในสภาวะที่ใช้ในการทดลองนี้ ค่า nonspecific binding อยู่ในระดับต่ำพอที่จะนำไปใช้งานได้

ปัจจัยสำคัญอีกอย่างหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการพิจารณาเลือกแอนติบอดีที่ใช้ คือ คุณสมบัติของสารติดฉลาก การเลือกแอนติบอดีโดยใช้สารติดฉลากที่มีคุณสมบัติไม่ดีอาจจะทำให้ผลการพิจารณาเกิดการผิดพลาดได้ง่าย ในรายงานนี้ ในระยะเริ่มแรก ผู้ทดลองได้พิจารณาเลือกแอนติบอดีโดยปฏิกริยาของแอนติบอดีกับสารติดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์ครั้งเดียว และสรุปว่าแอนติบอดีชุด R3 f.b.มีคุณสมบัติดีกว่าแอนติบอดีชุดอื่น ๆ แต่จากผลการทดลองในระยะหลัง พบว่า สารติดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์ 2 ครั้ง มีคุณสมบัติดีกว่าสารที่ทำให้บริสุทธิ์ครั้งเดียว (รูปที่ 9 หน้า 47) จึงได้ทดสอบหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมอีกครั้งหนึ่ง และพบว่า เมื่อใช้สารติดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์ 2 ครั้ง จะสามารถลดความเข้มข้นของแอนติบอดีลงได้อีก (ตารางที่ 8 หน้า 46 และตารางที่ 9 หน้า 51) แต่ผู้ทดลองมิได้กลับไปทดสอบปฏิกริยาของสารติดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์ 2 ครั้งกับแอนติบอดีชุดอื่น ๆ นอกเหนือจากชุด R3 f.b.เนื่องจากเห็นว่า แอนติบอดีชุด R3 f.b.ใช้ได้ดีอยู่แล้ว และเป็นการเสียเวลาและสิ้นเปลืองแอนติบอดีชุดอื่น ๆ อีกโดยไม่จำเป็น

โดยเหตุที่คุณสมบัติของสารติดฉลากมีความสำคัญต่อปฏิกริยาการรวมตัวแอนติบอดี และมีอิทธิพลต่อความเชื่อถือได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ความไวและความถูกต้องของวิธีทดลอง (Ekins, 1970) ผู้พัฒนาวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของสารใด ๆ จึงมักจะพยายามเตรียมสารติดฉลากที่มีคุณสมบัติทางอิมมิวโนเปลี่ยนแปลงไปจากสารเดิมน้อยที่สุดและจากหลักฐานที่แสดงว่าคุณสมบัติของสารติดฉลากด้วยไอโอดีนอาจจะเปลี่ยนแปลงไปตามจำนวนอะตอมของไอโอดีนที่ติดอยู่กับสารนั้น (Hunter, 1974) ผู้ทดลองจึงได้เลือกเตรียมสารติดฉลาก E_2-6-^{125}I โดยวิธีติดฉลากอีสตาไดนอล แล้วจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทอแจูเกตกับ E_2-6-oxime ภายหลัง แทนที่จะใช้วิธีติดฉลากอนุพันธ์ของเอสตราไดออลโดยตรงเพื่อหลีกเลี่ยงการที่สเตอรอยด์นิวเคลียสอาจจะถูกติดฉลากไปด้วย (Midgley และคณะ, 1969 และ Jeffcoat กับคณะ,1973) และเพื่อเป็นการทดสอบว่าสภาวะการติดฉลากอีสตาไดนอลจะมีอิทธิพลต่อ E_2-6-^{125}I ที่เตรียมได้ภายหลังหรือไม่ ผู้ทดลองได้เปรียบเทียบ E_2-6-^{125}I ที่ได้จากการใช้สารติดฉลากอีสตาไดนอลที่ติดฉลากโดยใช้เวลาในการติดฉลากต่างกันคือ 10 และ 45 วินาที พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการแยกด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีไม่แตกต่างกันในเชิงคุณภาพ (รูปที่ 7 ก หน้า 40) กล่าวคือบนโครมาโตแกรมจะมีสาร ก. (R_f ประมาณ 0.82) และสาร ข. (R_f ประมาณ 0.65) อย่างไรก็ตาม ผู้ทดลองยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าจะมีอันตรกิริยาทางด้านปริมาณมากน้อยเพียงใด แต่สารติดฉลากทั้งสองส่วนมีปฏิกริยาการรวมตัวกับแอนติบอดีต่างกัน คือ สารส่วน ข. รวมตัวได้ดีกว่าและให้ค่า nonspecific binding ต่ำกว่า สารส่วน ก. (ตารางที่ 6 หน้า 39) นอกจากนี้ยังพบว่า สารส่วน ก. ถูกสกัดออกได้ง่ายกว่าในสภาวะที่เป็นกรดซึ่งเป็นสภาวะที่ Hunter และคณะ (1975) เชื่อว่าเป็นวิธีการขจัดสารข้างเคียงที่เกิดจากการติดฉลากและการคอนจูเกต

เพื่อเป็นการปรับปรุงคุณภาพของสารติดฉลากที่ใช้ ผู้ทดลองได้

ทดลองใช้เจลสัมผัสเซฟาเดกซ์ LH-20 ในการทำให้สารติดฉลากบริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่ง หลังจากวิธีอิมมูโนแอสเสย์โครมาโตกราฟฟี การเลือกใช้เซฟาเดกซ์นี้ได้จากประสบการณ์ที่ว่า โปรตีนฮอร์โมนที่ติดฉลากหลายชนิด เช่น อินซูลิน ยิวแมน-คอร์โอนิกโกนาโดโทรฟิน (HCG) โปรแลกตินของหนู มีคุณภาพดีขึ้นหลังจากการทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่สอง จะเห็นได้ว่า แม้เอสตราไดออลจะเป็นฮอร์โมนประเภทที่แตกต่างจากฮอร์โมนต่าง ๆ ดังกล่าวแล้วการผ่านเซฟาเดกซ์ก็ทำให้สารติดฉลากมีปฏิกริยาการรวมตัวกับแอนติบอดีได้มากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 9 หน้า 47) เมื่อทดลองกับความเข้มข้นสุดท้ายของแอนติบอดี 1:640,000 ซึ่งอยู่ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมกว่า พบว่า % ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัวกับสารติดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่านเซฟาเดกซ์ LH-20 เพิ่มขึ้นเป็น 66% (ตารางที่ 9 หน้า 51)

เนื่องจากคุณสมบัติของสารติดฉลากอาจถูกทำลายได้ง่ายโดยพลังงานจากสารกัมมันตภาพรังสีที่ติดฉลากอยู่โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารติดฉลากประเภทโปรตีนฮอร์โมนหรือเอนไซม์บางชนิดที่มี specific activity สูง ทำให้ปฏิกริยาการรวมตัวระหว่างแอนติบอดีและสารติดฉลากลดต่ำลง (Hunter, 1974) ดังนั้นเสถียรภาพของสารติดฉลากจึงเป็นปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในปฏิกริยาเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ จากผลการศึกษาเสถียรภาพของสารติดฉลากภายหลังการผ่านเซฟาเดกซ์ LH-20 และเก็บไว้ที่ 4°ซ. ตลอดระยะเวลา 126 วัน ของการทดลอง พบว่า ปฏิกริยารวมตัวที่สารมาตรฐานความเข้มข้นเป็น 0 เกือบจะไม่แตกต่าง (ตารางที่ 10 หน้า 57) และบริมาณเอสตราไดออลใน control serum ทั้ง 3 ระดับมีค่าไม่แตกต่างจากค่าเฉลี่ย ± 2 ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของ control serum เดิม ค่าอ่านได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำแตกต่างกันมากกว่าที่ระดับความเข้มข้นอื่นและที่ระดับความเข้มข้นกลางและสูง ค่าที่วัดได้เกือบไม่มีความแตกต่างกัน ผลงานนี้แสดงให้เห็นว่าการเก็บสารติดฉลากไว้เป็นระยะเวลานาน 126 วัน ก็ยังมีคุณสมบัติใช้ในการวัดสารตัวอย่างได้ในช่วงความเข้มข้นในรอบเดือนของสตรี อายุการใช้งานนี้นานกว่าอายุการใช้งานของ

สารติดฉลากหลายชนิด เช่น ^{125}I – ฮิวแมนโกรธฮอร์โมน (^{125}I-HGH) มีอายุการใช้งานประมาณ 1 เดือน (กิริรัตน์ พลอยบุตร,1974) ^{125}I –ฮิวแมน-คอร์โอนิคโกนาโดโทรฟิน (^{125}I-HCG) และ ^{125}I –ฟอลลิเคิลสทิมูเลทิงฮอร์โมน (^{125}I-FSH) มีอายุการใช้งานประมาณ 1 เดือน และ 2 สัปดาห์ตามลำดับ (Donini กับ Donini,1969)

นอกจากคุณภาพของสารติดฉลากจะมีอิทธิพลต่อความไวและความถูกต้องของวิธีทดลองแล้ว ปริมาณของสารติดฉลากก็มีอิทธิพลต่อความเชื่อถือได้ของวิธีทดลองเช่นเดียวกัน (Albanoและคณะ, 1970 และ Ekins,1970) จากรูปที่ 8 ก. หน้า 43 และรูปที่ 8 ข.หน้า 44 จะเห็นว่าปริมาณของสารติดฉลากจะมีอิทธิพลต่อปฏิกริยาการรวมตัวกับแอนติบอดี การใช้สารติดฉลากน้อยลงจะให้ค่า χ ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัวเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ การใช้สารติดฉลากน้อย (2,000 cpm) จะทำให้เกิดความแตกต่างของปฏิกริยาการรวมตัวเมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของแอนติบอดี น้อยกว่าเมื่อใช้สารติดฉลากปริมาณมากกว่าและเมื่อทดสอบหาปริมาณแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยารวมตัวกับสารติดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่สองปริมาณ 2,000 cpm (รูปที่ 11 หน้า 50) พบว่า χ ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัวจะเพิ่มสูงขึ้นกว่าเดิม (ตารางที่ 8 หน้า 46 และตารางที่ 9 หน้า 51) เมื่อเปรียบเทียบกับสารติดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์เพียงครั้งเดียว นอกจากนี้กราฟมาตรฐานที่ใช้สารติดฉลากที่ผ่านเซฟาเดกซ์ LH-20 จะมีความชันมากกว่ากราฟที่ได้จากการใช้สารติดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์เพียงครั้งเดียว (รูปที่ 12 หน้า 53) อย่างไรก็ตาม การใช้สารติดฉลากปริมาณ 2,000 cpm นี้มีข้อเสียอย่างเห็นได้ชัด คือ ทำให้เสียเวลาในการนับปริมาณรังสีมาก แต่ผู้ทดลอง พบว่า การปฏิบัติงานจริง อาจเพิ่มปริมาณสารติดฉลากเป็น 5,000 cpm ได้ โดยไม่กระทบกระเทือนต่อความแม่นยำและความถูกต้องของวิธีทดลอง (ผลที่ไม่ได้รายงาน)

การเลือกวิธีการสำหรับแยกเอสตราไดออลรูปอิสระออกจากรูปที่จับกับแอนติบอดีควรคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีอิทธิพลต่อการแยกและควรจะเลือกวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง ทำได้ง่าย และราคาถูก ผู้ทดลองได้เลือกผงถ่าน

เกลือบเคลือบแตรนในการดูดซับเอสตราไดออลรูปอิสระเนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และราคาถูก แต่การใช้ผงถ่านจำเป็นจะต้องทราบถึงอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ ต่อปฏิกริยารวมตัว ตัวอย่างเช่น อุณหภูมิ และเวลาในการอินคิวเบท และความเข้มข้นของผงถ่านที่ใช้ในการดูดซับเอสตราไดออลรูปอิสระ (Abraham, 1974) จากผลการทดลอง พบว่า ปริมาณผงถ่านที่เพิ่มขึ้นจาก 2.5-10 มก. (รูปที่ 6 หน้า 38) จะมีผลทำให้ปฏิกริยารวมตัว (%bound) ลดลงประมาณ 11% และหลังจากปรับปรุงคุณสมบัติสารสกัดฉลากโดยผ่านเซฟาเดกซ์ LH-20 พบว่า ผงถ่านมีอิทธิพลต่อปฏิกริยารวมตัวของแอนติบอดีน้อยมาก คือ ปริมาณผงถ่านที่เพิ่มขึ้นจาก 2.5-10 มก. (รูปที่ 10 หน้า 49) มีผลให้ปฏิกริยารวมตัวลดลงประมาณ 2% แสดงว่าการผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์LH-20 อาจจะช่วยชะล้างสารบางอย่างทำให้ปฏิกริยาการรวมตัวของสารสกัดฉลากกับแอนติบอดีเพิ่มขึ้น (รูปที่ 12 หน้า 53) นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบการดูดซับสารสกัดฉลากของผงถ่าน พบว่า การดูดซับสารที่ทำให้บริสุทธิ์ 2 ครั้ง จะให้ค่า nonspecific binding ต่ำกว่าการดูดซับสารที่ทำให้บริสุทธิ์เพียงครั้งเดียว (รูปที่ 12 หน้า 53)

การเลือกสภาวะในการอินคิวเบทสารที่ทำปฏิกริยากันในเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของสารใด ๆ นั้น โดยทั่วไป การใช้สภาวะการอินคิวเบทให้ปฏิกริยาถึงจุดสมดุลย์จะมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้สภาวะไม่สมดุลย์ที่เห็นได้ชัดคือ อาจเบี่ยนแปรเวลาในการอินคิวเบทได้มากกว่า ในรายงานนี้ ผู้ทดลองได้เลือกศึกษาสภาวะการอินคิวเบทที่ 4°ซ. และพบว่า การเพิ่มเวลาในการอินคิวเบทจาก 4 ชม. ถึง 24 ชม. (รูปที่ 13 หน้า 54) มีผลทำให้ %bound เพิ่มขึ้นประมาณ 10% แต่การเพิ่มเวลาจาก 16 ชม. เป็น 24 ชม. ทำให้ %bound เพิ่มขึ้นประมาณ 2-3% ทำให้คาดได้ว่าปฏิกริยาอาจจะใกล้ถึงสภาวะสมดุลย์ หรือถึงสภาวะสมดุลย์แล้ว แต่ผู้ทดลองไม่ได้ยืดเวลาในการอินคิวเบทต่อไปอีก เนื่องจากเห็นว่า สภาวะการอินคิวเบทมากกว่า 24 ชม.

ไม่เหมาะกับการใช้งานประจำวัน อนึ่ง จากผลการทดลองนี้ ผู้ทดลองกล่าวว่าสามารถจะเลือกใช้เวลาการอินคิวเบทประมาณ 4 ชม. สำหรับการวัดปริมาณเอสตราไดออลได้ในกรณีที่ต้องการจะทำการทดลองให้เสร็จในวันเดียว แต่จำเป็นต้องทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีทดลองเสียก่อน ผู้ทดลองไม่ได้ศึกษาต่อไปเนื่องจากมีเวลาจำกัด และในปัจจุบันยังไม่มีความจำเป็นในการทำการทดลองให้เสร็จในวันเดียว

การวัดปริมาณสเตอรอยด์ในธรรมโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ส่วนใหญ่จำเป็นต้องแยกสเตอรอยด์ออกจากธรรมด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อขจัดสารประเภทโปรตีน และสารอื่น ๆ ที่มีผลต่อปฏิกริยาการรวมตัว นอกจากนี้อาจจำเป็นต้องใช้วิธีโครมาโตกราฟีแยกสเตอรอยด์ชนิดนั้น ก่อนวัดปริมาณ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความจำเพาะของแอนติบอดีที่ใช้ในปฏิกริยาเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ด้วย และตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในขั้นตอนเหล่านี้อาจมีผลต่อปฏิกริยารวมตัว Korenman และคณะ (1970) รายงานว่า 30% เอทิลอะซิเตท ในไอโซออกเทนที่ใช้ชะสารจากกอลัมน์ซิลิกา ทำให้ปฏิกริยาการรวมตัวของสารติดฉลากกัมมันตรังสีเครื่องหมายกับแอนติบอดีลดต่ำลง และให้ค่าที่วัดได้สูงกว่าปกติ แต่จากผลการทดลองในรายงานนี้ (รูปที่ 14 หน้า 55) พบว่า สารที่หลงเหลือจากอีเทอร์และ 40% เอทิลอะซิเตท ใน ไอโซออกเทนที่ชะออกจากกอลัมน์ไม่มีผลต่อปฏิกริยารวมตัวเลย และ blank ยังมีค่าต่ำมาก ทำให้ผู้ทดลองสามารถวัดปริมาณเอสตราไดออล โดยใช้กราฟมาตรฐานที่ใช้บัฟเฟอร์ได้ อย่างไรก็ตาม การนำวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ที่พัฒนาในห้องปฏิบัติการหนึ่งไปใช้ในอีกห้องปฏิบัติการหนึ่งนั้น จำเป็นจะต้องทดสอบสภาวะต่าง ๆ รวมถึงอิทธิพลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องต่อปฏิกริยาระหว่างสารที่สนใจจะศึกษากับแอนติบอดีทุกครั้ง เพราะถึงแม้ตัวทำละลายอินทรีย์จากแหล่งผลิตเดียวกันก็อาจมีองค์ประกอบเปลี่ยนแปลงไปได้บ้าง ถ้ายี่ห้อการเก็บไว้เท่ากันหรือผ่านขั้นตอนของปฏิกริยาไม่เหมือนกัน

การวัดปริมาณเอสตราไดออลโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์เท่าที่ปรากฏในรายงานต่าง ๆ ยังจำเป็นต้องใช้วิธีโครมาโตกราฟีในการขจัดสารอื่น ๆ และวิธีที่ใช้กันมากได้แก่ วิธีผ่านเซฟาเดกซ์ LH-20 (Cameron กับ Jones, 1972 และ Fowell กับ Stevens, 1973) ซึ่งเป็นวิธีที่ซับซ้อนค่อนข้างยุ่งยาก และประสิทธิภาพด้อยกว่าวิธีผ่านซิลิกา Abraham, (1974) ผู้ทดลองจึงได้เลือกใช้วิธีซิลิกาโครมาโตกราฟี ในการวัดปริมาณเอสตราไดออลในซีรัมเปรียบเทียบกับวิธีไม่ผ่านโครมาโตกราฟี ปรากฏว่าจากซีรัมในสภาวะต่าง ๆ 11 ตัวอย่าง มีอยู่ตัวอย่างเดียวที่ผลการทดลองไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 11 หน้า 59) และตัวอย่างนี้เป็นตัวอย่างที่มีค่าเอสตราไดออลสูงมากประมาณ 25,000 พิโกกรัม/มม^3 จากผลการทดลองนี้ชี้แนะว่าขั้นตอนของการผ่านโครมาโตกราฟีอาจจะจำเป็น สำหรับการวัดปริมาณเอสตราไดออลในซีรัม และจากการทดสอบความถูกต้องของวิธีทดลองได้ผลสนับสนุนข้อชี้แนะนี้ (ตารางที่ 14 หน้า 64) กล่าวคือ ความถูกต้องของทั้ง 2 วิธีที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (150 พิโกกรัม/มม^3) และความเข้มข้นสูง (8,000 พิโกกรัม/มม^3 จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญ โดยที่ความถูกต้องของวิธีผ่านซิลิกาโครมาโตกราฟีที่ทั้งสองระดับความเข้มข้นจะน่าเชื่อถือมากกว่าวิธีที่ไม่ผ่านซิลิกาโครมาโตกราฟี สำหรับความเข้มข้นเอสตราไดออลในระดับกลาง (1,500 พิโกกรัม/มม^3) ค่าความถูกต้องของทั้งสองวิธีจะไม่แตกต่างกัน ดังนั้น การนำวิธีการจากรายงานนี้ไปใช้วัดปริมาณเอสตราไดออลในซีรัมควรจะพิจารณาถึงระดับเอสตราไดออลที่คาดว่าจะมีในสารตัวอย่างด้วย เช่น การวัดปริมาณเอสตราไดออลในซีรัมสตรีในรอบเดือนซึ่งคาดว่าจะมีปริมาณเอสตราไดออลในรอบเดือนระหว่าง 50–1,000 พิโกกรัม/มม^3 (Loraine กับ Bell, 1971 และ Abraham กับคณะ, 1972) ควรจะใช้วิธีผ่านซิลิกาโครมาโตกราฟี หรืออีกวิธีหนึ่งที่อาจจะทำได้คือเพิ่มปริมาณสารตัวอย่างที่จะนำมาใช้วัด แต่วิธีหลังนี้อาจจะไม่เหมาะสมในทางปฏิบัติ เพราะจำเป็นจะต้องเจาะเลือดปริมาณ

มากขึ้น และการเพิ่มปริมาณซีรัม อาจจะเป็นการเพิ่มปริมาณสารที่มารบกวนปฏิกริยามากขึ้นได้ สำหรับการวัดปริมาณเอสตราไดออลในซีรัมที่มีระดับความเข้มข้นสูง เช่น ซีรัมของสตรีระหว่างตั้งครรภ์นั้น ไม่จำเป็นต้องผ่านซีไลท์โครมาโตกราฟี เนื่องจากความถูกต้องอยู่ในระดับที่เชื่อถือได้

จากการศึกษาความเชื่อถือได้ของวิธีวัดปริมาณเอสตราไดออลในซีรัมตามหลักการของ Ekins (1970) และ Abraham (1974) ทั้งในด้านความจำเพาะของแอนติบอดีที่ใช้ ความไว และความแม่นยำ พบว่าแอนติบอดี R3 f.b. มีความจำเพาะค่อนข้างสูง คือ เกิด cross reaction น้อยมากกับสเตอรอยด์ส่วนใหญ่ที่มีอยู่ในซีรัม ตัวอย่างเช่น คอเลสเตอรอล โปรเจสเตอโรน และคอร์ทิซอล และสามารถเกิด cross reaction กับเมตาโบไลท์ของเอสตราไดออลได้บ้าง รูปที่ 15 หน้า 60 และตารางที่ 12 หน้า 61 และจากการศึกษาของ Albano และคณะ (1970) กับ Ekins (1970) พบว่าความไวของวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของสารติดฉลากและแอนติบอดีที่ทำปฏิกริยาพอเหมาะกับสารที่ต้องการวัดปริมาณ specific activity ของสารติดฉลาก และค่า equilibrium constant (K) ของปฏิกริยาการรวมตัว ในรายงานนี้ ผู้ทดลองได้ปรับปรุงสารติดฉลากให้มีคุณภาพดีขึ้นในปฏิกริยาการรวมตัวกับแอนติบอดี แต่เนื่องจากไม่ทราบปริมาณที่แน่นอนของสารติดฉลากจึงไม่สามารถวัดค่า K ของปฏิกริยาได้ ดังนั้น จำเป็นต้องคำนวณความไวของวิธีจากจุดความเข้มข้นมาตรฐานเป็นศูนย์ คูณด้วย 2 เท่าของความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Abraham, 1974) โดยวิธีนี้พบว่า ค่าความไวของวิธีทดลองจะเป็น 3.0 พิโคกรัม/หลอด หรือ 10.2 พิโคกรัม/ซม^3

เมื่อทดสอบความแม่นยำของการวัดปริมาณเอสตราไดออลโดยการเปรียบเทียบวิธีที่ไม่ผ่านและผ่านซีไลท์โครมาโตกราฟีใน control serum ตามตารางที่ 13 ก. และ 13 ข. หน้า 63 พบว่า ความแม่นยำทั้ง 2 วิธี

ไม่แตกต่างกันมากนัก และระดับความเข้มข้นกลางและสูงของเอสตราไดออล ทั้ง 2 วิธี จะมีความแม่นยำดีกว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำ

จากผลการวัดปริมาณเอสตราไดออลในชีรัมของสตรีอาสาสมัคร 4 ราย พบว่า ในสตรีอาสาสมัครรายที่ 1 และ 2 ซึ่งมีรอบเดือน 31 และ 28 วันตามลำดับจะมีปริมาณเอสตราไดออลสูงสุดก่อนวันที่มีระดับ LH สูงสุดเพียง 1 วัน และปริมาณเอสตราไดออลมีค่ามากกว่า 400 พิโคกรัม/ซม^3 ซึ่งสามารถทำให้เกิดระดับ LH สูงสุดได้ (Wiele และคณะ, 1970) และสตรีอาสาสมัครทั้ง 2 มี luteal phase ประมาณ 14 ± 1 วัน มีปริมาณโปรเจสเตอโรนมากกว่า 5 นาโนกรัม/ซม^3 และมีปริมาณเอสตราไดออลใน mid luteal phase มากกว่า 150 พิโคกรัม/ซม^3 ซึ่งถือว่ามีการตกไข่ และมีหน้าที่ของ corpus luteum ปกติ (Abraham และคณะ, 1972 และ Saxena กับคณะ, 1976) นอกจากนี้สตรีอาสาสมัครรายที่ 2 มีระดับเอสตราไดออลสูงสุดอีกครั้งหนึ่งในวันที่ 24 ของรอบเดือน และลดลงสู่ปกติภายใน 2 วัน ซึ่งยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่นอน สำหรับสตรีอาสาสมัครรายที่ 3 และ 4 ซึ่งมีรอบเดือน 28 และ 23 วันตามลำดับ มีปริมาณเอสตราไดออลสูงกว่า 400 พิโคกรัม 1 วันก่อนวันที่เกิดระดับ LH สูงสุด และมีระยะ luteal phase ประมาณ 8–10 วัน และสตรีรายที่ 3 มีระดับเอสตราไดออลใน luteal phase ต่ำมาก เมื่อเทียบกับสตรีรายอื่น ๆ ผลจากการวัดปริมาณเอสตราไดออลในสตรีอาสาสมัครทั้ง 4 ราย พบว่า ระดับเอสตราไดออลจะเริ่มสูงขึ้นประมาณ 4 วัน ก่อนวันที่มีระดับ LH สูงสุด และมีปริมาณอยู่ระหว่าง 487–1194 พิโคกรัม/ซม^3 ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงพอที่จะทำให้เกิดระดับ LH สูงสุดได้ (Wiele และคณะ, 1970) และทุกรายมีระดับ LH สูงสุด ประมาณ 24 ชั่วโมงภายหลังจากที่ระดับเอสตราไดออลขึ้นสูงสุด นอกจากนี้ระดับของโปรเจสเตอโรนในสตรีแต่ละรายมีค่าสูงกว่า 5 นาโนกรัม/ซม^3 3 ถึง 5 วันภายหลังจากที่มีระดับ

LH สูงสุด ชี้แนะว่า น่าจะมีการตกไข่เป็นปกติในสตรีแต่ละราย (Abraham และคณะ, 1972 และ Saxena กับคณะ, 1976)

จากผลการทดลองที่เสนอในรายงานนี้จะเห็นว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นมีความเชื่อถือได้และมีความไวสูงพอที่จะวัดระดับเอสตราไดออลทั้งในชีรัมบุรุษและสตรี และน่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการนำไปศึกษาหาข้อมูลเกี่ยวกับสภาวะของมารดาและทารกตลอดระยะเวลาของการตั้งครรภ์ รวมทั้งความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ วิธีการนี้เป็นวิธีที่สามารถลดค่าใช้จ่ายในการวัดรังสี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ปริมาณสารตัวอย่างมีจำนวนมาก นอกจากนี้ วิธีการวัดรังสีสะดวกและรวดเร็วเมื่อเทียบกับการใช้สารติดฉลากตริเตรียม ปัจจุบันองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้ดำริที่จะเริ่มโครงการนำเอาสารติดฉลากไอโอดีน–125 มาใช้วัดปริมาณสเตอรอยด์ต่าง ๆ ในชีรัมแทนการใช้สารติดฉลากตริเตรียม จึงเป็นที่คาดหมายว่าในอนาคตวิธีการใช้สารติดฉลากไอโอดีน–125 จะเป็นที่นิยมแพร่หลายมากขึ้น อีกประการหนึ่งข้อมูลที่เสนอในรายงานนี้ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับวิธีการวิเคราะห์ฮอร์โมนตัวอื่น เช่น สารประเภทคุมกำเนิด หรือยาเสพติดด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ต่อไปได้

การพัฒนาวิธีวัดปริมาณเอสตราไดออลด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโน–แอสเสย์ โดยใช้สารติดฉลากไอโอดีน ยังมีสิ่งที่ควรศึกษา อาทิ การศึกษาเกี่ยวกับแอนติบอดีที่ใช้ในแง่ของการสร้างแอนติบอดีในสัตว์ทดลองให้มีความจำเพาะสูง สามารถนำมาใช้วัดปริมาณเอสตราไดออลในเนื้อเยื่อต่าง ๆ และของเหลวจากร่างกายได้โดยตรง ซึ่งเป็นการลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการทดลอง นอกจากนี้ยังควรปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์ให้รวดเร็วขึ้น โดยอาจลดระยะเวลาในการอินคิวเบทลงเป็นประมาณ 2–3 ชม. อันจะเป็นประโยชน์ต่อแพทย์ในการตัดสินวินิจฉัยพยาธิสภาพของคนไข้ในกรณีที่จำเป็น