บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการเตรียมคอนจูเกตระหว่างสเปอร์มิดีนกับโปรตีนตัวนำ

เนื่องจากสเปอร์มิดีนมีขนาดโมเลกุลเล็กมากและลักษณะของโมเลกุลเป็นสายยาวจึงไม่มีคุณสมบัติเป็นอิมมูโนเจน ต้องทำให้สเปอร์มิดีนเกาะกับโปรตีนเพื่อทำให้มีคุณสมบัติเป็นอิมมูโนเจน การทดลองนี้เลือกใช้โปรตีน 2 ชนิดคืออัลบูมินและไทโรกลอบบูลินเป็นโปรตีนตัวนำ

4.1.1 ผลการเตรียมคอนจูเกตระหว่างสเปอร์มิดีนกับอัลบูมิน

ได้ทำการทดลองเตรียมคอนจูเกตระหว่างสเปอร์มิดีนกับอัลบูมิน ตามข้อ 3.3 หน้า 23 โดยเปลี่ยนอัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของสารตั้งต้น (สเปอร์มิดีน : อัลบูมิน : คาร์บอไดอิมาย) 9 อัตราส่วนดังแสดงในตารางที่ 3 หน้า 39 พบว่าสเปอร์มิดีนคอนจูเกตที่ได้จะมีจำนวนโมเลกุลของสเปอร์มิดีนเกาะกับอัลบูมินได้มากน้อยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของสารตั้งต้นที่ใช้ เช่น ถ้าใช้อัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของสารตั้งต้นเป็น 1,000:1:1,700 จะได้คอนจูเกตที่มีสเปอร์มิดีน 32 โมเลกุลเกาะอยู่กับอัลบูมิน 1 โมเลกุล ซึ่งเป็นคอนจูเกตที่มีจำนวนโมเลกุลของสเปอร์มิดีนเกาะกับอัลบูมินมากที่สุด และถ้าใช้อัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของสารตั้งต้นเป็น 120:1:300 จะได้คอนจูเกตที่มีสเปอร์มิดีน 4 โมเลกุลเกาะอยู่กับอัลบูมิน 1 โมเลกุล ซึ่งเป็นคอนจูเกตที่มีจำนวนโมเลกุลของสเปอร์มิดีนเกาะกับอัลบูมินน้อยที่สุด ได้เลือกคอนจูเกตที่มีจำนวนโมเลกุลของสเปอร์มิดีนเกาะกับอัลบูมินสูง ๆ คือ 25:1, 26:1 และ 32:1 นำไปใช้ฉีดสัตว์ทดลองเพื่อกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติสเปอร์มิดีนต่อไป

4.1.2 ผลการเตรียมคอนจูเกตระหว่างสเปอร์มิดีนกับไทโรกลอบบูลิน

ได้ทำการทดลองเตรียมคอนจูเกตระหว่างสเปอร์มิดีนกับไทโรกลอบบูลินตามข้อ 3.3 หน้า 23 โดยเปลี่ยนอัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของสารตั้งต้น (สเปอร์มิดีน : ไทโรกลอบบูลิน : คาร์บอไดอิมาย) 6 อัตราส่วนดังแสดงในตารางที่ 4 หน้า 40 พบว่าสเปอร์มิดีนคอนจูเกตที่ได้มีจำนวนโมเลกุลของสเปอร์มิดีนเกาะกับไทโรกลอบบูลินได้มากน้อยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของสารตั้งต้นที่ใช้ เช่น ถ้าใช้อัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของสารตั้งต้นเป็น

16,000:1:1,700 จะได้คอนจูเกตที่มีสเปอร์มิดีน 601 โมเลกุลเกาะอยู่กับไทโรกลอบบูลิน 1 โมเลกุล ซึ่งเป็นคอนจูเกตที่มีจำนวนโมเลกุลของสเปอร์มิดีนเกาะกับไทโรกลอบบูลินมากที่สุด และถ้าใช้อัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของสารตั้งต้นเป็น 2,000:1:200 จะได้คอนจูเกตที่มีสเปอร์มิดีน 50 โมเลกุลเกาะอยู่กับไทโรกลอบบูลิน 1 โมเลกุล ซึ่งเป็นคอนจูเกตที่มีจำนวนโมเลกุลของสเปอร์มิดีนเกาะกับไทโรกลอบบูลินน้อยที่สุด ได้เลือกคอนจูเกตที่มีจำนวนโมเลกุลของสเปอร์มิดีนเกาะกับไทโรกลอบบูลินสูง ๆ คือ 203:1, 506:1 และ 601:1 นำไปใช้ฉีดสัตว์ทดลองเพื่อกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติสเปอร์มิดีนต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ผลการเตรียมคอนจูเกตระหว่างสเปอร์มิดีนกับอัลบูมิน

Reagent molar ratio (Spd : BSA : CDI)	Incorporation molar ratio (Spd : BSA)	Code of conjugate
440 : 1 : 50	6 : 1	SB1
1,000 : 1 : 100	25 : 1	SB2*
1,500 : 1 : 100	26 : 1	SB3*
2,000 : 1 : 100	18 : 1	SB4
120 : 1 : 300	4 : 1	SB5
1,000 : 1 : 350	20 : 1	SB6
500 : 1 : 500	20 : 1	SB7
800 : 1 : 1,000	22 : 1	SB8
1,000 : 1 : 1,700	32 : 1	SB9*

* เป็นคอนจูเกตที่นำไปใช้ฉีดกระต่ายและหนูตะเภา

ตารางที่ 4 ผลการเตรียมคอนจูเกตระหว่างสเปอร์มิดินกับไทโรกลอบบูลิน

Reagent molar ratio (Spd : Tg : CDI)	Incorporation molar ratio (Spd : Tg)	Code of conjugate
2,000 : 1 : 200	50 : 1	ST1
10,000 : 1 : 1,000	203 : 1	ST2 *
8,000 : 1 : 1,700	157 : 1	ST3
16,000 : 1 : 1,700	601 : 1	ST4 *
6,000 : 1 : 4,000	240 : 1	ST5
12,000 : 1 : 4,000	506 : 1	ST6 *

* เป็นคอนจูเกตที่นำไปใช้ฉีดกระต่ายและหนูตะเภา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 ผลการหาปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนที่สัตว์ทดลองสร้างขึ้น

เมื่อนำซีรัมของสัตว์ทดลองที่เก็บไว้แต่ละครั้งมาหาปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนตามวิธีข้อ 3.5 หน้า 28 ได้ผลดังนี้

4.2.1 ผลการหาปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนที่กระต่ายสร้างขึ้น

ได้ฉีดสเปอร์มิดีนคอนจูเกตให้กับกระต่าย 3 กลุ่ม กระต่ายกลุ่มที่ 1 (Rb1 ถึง Rb4) ฉีดด้วยสเปอร์มิดีนคอนจูเกต SB3 (Spd:BSA = 26:1) ที่ผสมกับคอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์ โดยฉีดซ้ำทุก 1 เดือน 8 ครั้ง, 8 สัปดาห์ 1 ครั้งและ 7 สัปดาห์อีก 1 ครั้ง (รูปที่ 5 หน้า 45) พบว่ากระต่าย Rb1, Rb2 และ Rb3 สร้างแอนติสเปอร์มิดีนได้สูงสุดหลังจากฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ประมาณ 2 สัปดาห์หรือหลังจากฉีดครั้งแรกประมาณ 10 สัปดาห์ คือมีไตเตอร์ 45, 23 และ 55 ตามลำดับ เมื่อฉีดซ้ำต่อไปพบว่ากระต่าย Rb1 และ Rb3 มีปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนลดลงเรื่อย ๆ จนกระทั่งหลังการฉีดซ้ำครั้งที่ 6 จึงจะเริ่มมีปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนเพิ่มขึ้น แต่เพิ่มน้อยกว่าหลังการฉีดซ้ำครั้งที่ 2 และหลังจากนั้นก็เริ่มลดลงอีก ซึ่งต่างจากกระต่าย Rb2 ที่หลังจากฉีดซ้ำครั้งที่ 2, 3 และ 4 แล้วยังคงได้ปริมาณแอนติ-สเปอร์มิดีนค่อนข้างคงที่ และเมื่อฉีดซ้ำต่อไปอีกปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนจะลดลงเรื่อย ๆ ส่วนกระต่าย Rb4 สร้างแอนติสเปอร์มิดีนได้ต่ำมากจนหาไตเตอร์ไม่ได้

กระต่ายกลุ่มที่ 2 (Rb5 ถึง Rb7) ฉีดด้วยสเปอร์มิดีนคอนจูเกต SB9 (Spd:BSA = 32:1) การฉีดครั้งแรกและฉีดซ้ำครั้งที่ 1 กับครั้งที่ 2 ใช้สเปอร์มิดีนคอนจูเกต SB9 ผสมกับคอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์โดยฉีดซ้ำทุก 2 สัปดาห์ ส่วนการฉีดซ้ำครั้งที่ 3, 4 และ 5 ใช้สเปอร์มิดีนคอนจูเกต SB9 ผสมกับอินคอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์โดยฉีดทุก 1 เดือน, 2 เดือน และ 1 เดือนตามลำดับ (รูปที่ 6 หน้า 46) พบว่ากระต่าย Rb5, Rb6 และ Rb7 สร้างแอนติสเปอร์มิดีนได้สูงสุดหลังจากฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ประมาณ 2 สัปดาห์หรือหลังจากฉีดครั้งแรกประมาณ 6 สัปดาห์ คือมีไตเตอร์ 33, 29 และ 17 ตามลำดับ จะเห็นว่าแอนติสเปอร์มิดีนที่กระต่ายกลุ่มนี้สร้างขึ้นมีปริมาณต่ำกว่าที่กระต่ายกลุ่มแรกบางตัว (Rb1 และ Rb3)สร้างได้ เมื่อฉีดซ้ำต่อไปพบว่ากระต่าย Rb5 และ Rb6 เริ่มมีปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนลดลงและคงที่อยู่ระดับหนึ่ง ส่วนกระต่าย Rb7 จะมีปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนคงที่ระยะหนึ่งหลังจากนั้นจึงลดต่ำลงจนหาไตเตอร์ไม่ได้

กระต่ายกลุ่มที่ 3 (Rb8 และ Rb9) ฉีดด้วยสเปอร์มิดีนคอนจูเกต ST6 (Spd: Tg = 506:1) ที่ผสมกับคอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์ (ยกเว้นการฉีดกระต่าย Rb8 ซ้ำครั้งที่ 3 ใช้สเปอร์มิดีนคอนจูเกต ST6 ผสมกับอินคอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์) โดยฉีดซ้ำทุก 2 สัปดาห์ 1 ครั้งและทุก 1 เดือนอีก 2 ครั้ง (รูปที่ 7 หน้า 47) พบว่ากระต่าย Rb8 และ Rb9 สร้างแอนติสเปอร์มิดีนได้สูงสุดหลังจากฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ประมาณ 2 สัปดาห์ หรือหลังจากฉีดครั้งแรกประมาณ 8 สัปดาห์คือมีไตเตอร์ 30 และ 14 ตามลำดับ และหลังการฉีดซ้ำครั้งที่ 3 กระต่ายทั้ง 2 ตัวจะสร้างแอนติสเปอร์มิดีนได้ลดลงโดยเฉพาะ Rb9 มีปริมาณแอนติ-สเปอร์มิดีนลดลงจนหาไตเตอร์ไม่ได้ จะเห็นว่าปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนที่กระต่ายสร้างเริ่มวัดได้หลังจากฉีดสเปอร์มิดีนคอนจูเกตซ้ำครั้งที่ 1 ประมาณ 2 สัปดาห์ และถูกสร้างได้ปริมาณมากที่สุดหลังจากฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ประมาณ 2 สัปดาห์หรือหลังจากฉีดครั้งแรกประมาณ 6 ถึง 10 สัปดาห์

4.2.2 <u>ผลการหาปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนที่หนูตะเภาสร้างขึ้น</u>

ได้ฉีดสเปอร์มิดีนคอนจูเกตให้กับหนูตะเภา 5 กลุ่ม หนูตะเภากลุ่มที่ 1 (Gp1 ถึง Gp3) ฉีดด้วยสเปอร์มิดีนคอนจูเกต SB3 (Spd:BSA = 26:1) ที่ผสมกับคอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์โดยฉีดซ้ำทุก 2 สัปดาห์ 2 ครั้งและทุก 1 เดือนอีก 2 ครั้ง เจาะเลือดหนูตะเภามาหาไตเตอร์หลังจากฉีดซ้ำครั้งที่ 4 ประมาณ 2 สัปดาห์หรือหลังจากฉีดครั้งแรกประมาณ 15 สัปดาห์ พบว่าหนูตะเภาทั้ง 3 ตัว สร้างแอนติสเปอร์มิดีนได้ปริมาณต่ำมากจนหาไตเตอร์ไม่ได้

หนูตะเภากลุ่มที่ 2 (Gp4 ถึง Gp14) ฉีดด้วยสเปอร์มิดีนคอนจูเกต SB2 (Spd: BSA = 25:1) ที่ผสมกับคอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์ โดยฉีดซ้ำทุก 2 สัปดาห์ 4 ครั้งและเจาะเลือดหนูตะเภามาหาไตเตอร์หลังจากฉีดซ้ำครั้งที่ 4 ประมาณ 2 สัปดาห์หรือหลังจากฉีดครั้งแรกประมาณ 10 สัปดาห์ พบว่าหนูตะเภาทั้ง 11 ตัวสร้างแอนติสเปอร์มิดีนและหาไตเตอร์ได้มีเพียง 1 ตัว (Gp11) มีไตเตอร์ 20 (ตารางที่ 5 หน้า 48)

หนูตะเภากลุ่มที่ 3 (Gp15 ถึง Gp29) ฉีดด้วยสเปอร์มิดีนคอนจูเกต SB9 (Spd: BSA = 32:1) ที่ผสมกับคอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์ โดยฉีดซ้ำทุก 2 สัปดาห์ 2 ครั้งและเจาะเลือดหนูตะเภามาหาไตเตอร์หลังจากฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ประมาณ 2 สัปดาห์ หรือหลังจากฉีดครั้งแรกประมาณ 6 สัปดาห์ พบว่าหนูตะเภาทั้ง 15 ตัวสามารถสร้างแอนติสเปอร์มิดีนและหาไตเตอร์ได้มี 6 ตัว คือ Gp15, Gp16, Gp21, Gp22, Gp27 และ Gp29 แต่ไตเตอร์ที่ได้

ค่อนข้างต่ำมีค่าอยู่ระหว่าง 10 ถึง 28.5 (ตารางที่ 5 หน้า 48)

หนูตะเภากลุ่มที่ 4 (Gp30 ถึง Gp45) ฉีดด้วยสเปอร์มิดีนคอนจูเกต ST4 (Spd: Tg = 601:1) ที่ผสมกับคอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์ โดยฉีดซ้ำทุก 2 สัปดาห์ 2 ครั้งและเจาะเลือดหนูตะเภามาหาไตเตอร์หลังจากฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ประมาณ 2 สัปดาห์ หรือหลังจากฉีดครั้งแรกประมาณ 6 สัปดาห์ พบว่าหนูตะเภาทั้ง 16 ตัวสามารถสร้างแอนติสเปอร์มิดีนและหาไตเตอร์ได้มี 4 ตัว คือ Gp31, Gp33, Gp37 และ Gp43 ได้ไตเตอร์อยู่ระหว่าง 10 ถึง 70 (ตารางที่ 5 หน้า 48)

หนูตะเภากลุ่มที่ 5 (Gp46 ถึง Gp55) ฉีดด้วยสเปอร์มิดีนคอนจูเกต ST2 (Spd: Tg = 203:1) ที่ผสมกับคอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์ โดยฉีดซ้ำทุก 2 สัปดาห์ 2 ครั้งและเจาะเลือดหนูตะเภามาหาไตเตอร์หลังจากฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ประมาณ 2 สัปดาห์ หรือหลังจากฉีดครั้งแรกประมาณ 6 สัปดาห์ พบว่าหนูตะเภาทั้ง 10 ตัว สามารถสร้างแอนติสเปอร์มิดีนและหาไตเตอร์ได้มีเพียง 3 ตัว คือ Gp52, Gp54 และ Gp55 มีไตเตอร์ 16, 11 และ 19 ตามลำดับ (ตารางที่ 5 หน้า 48)

จะเห็นว่าหนูตะเภาซึ่งฉีดด้วยสเปอร์มิดีนที่คอนจูเกตกับอัลบูมิน (กลุ่มที่ 1, 2 และ 3) รวมทั้งหมด 29 ตัว สามารถสร้างแอนติสเปอร์มิดีนและหาไตเตอร์ได้มีเพียง 7 ตัว แต่ไตเตอร์ที่ได้ค่อนข้างต่ำมีค่าอยู่ระหว่าง 10 ถึง 28.5 จึงไม่สามารถนำไปใช้ในการทดลองต่อไปได้ ส่วนหนูตะเภาซึ่งฉีดด้วยสเปอร์มิดีนที่คอนจูเกตกับไทโรกลอบบูลิน (กลุ่มที่ 4 และ 5) รวมทั้งหมด 26 ตัวสามารถสร้างแอนติสเปอร์มิดีนและหาไตเตอร์ได้มีเพียง 7 ตัวเช่นกันมีค่าไตเตอร์อยู่ระหว่าง 10ถึง 70 เฉพาะหนูตะเภา Gp31 ให้ไตเตอร์ของแอนติสเปอร์มิดีนค่อนข้างสูงคือมีค่าเป็น 70 ซึ่งอาจนำมาใช้ในการทดลองต่อไปได้ แต่เนื่องจากหนูตะเภามีขนาดเล็กจึงได้ปริมาณซีรัมน้อยโดยเฉลี่ยได้ซีรัมตัวละประมาณ 6 มิลลิลิตร ดังนั้นจึงมีปริมาณแอนติ-สเปอร์มิดีนไม่พอใช้ในการทดลองต่อไป

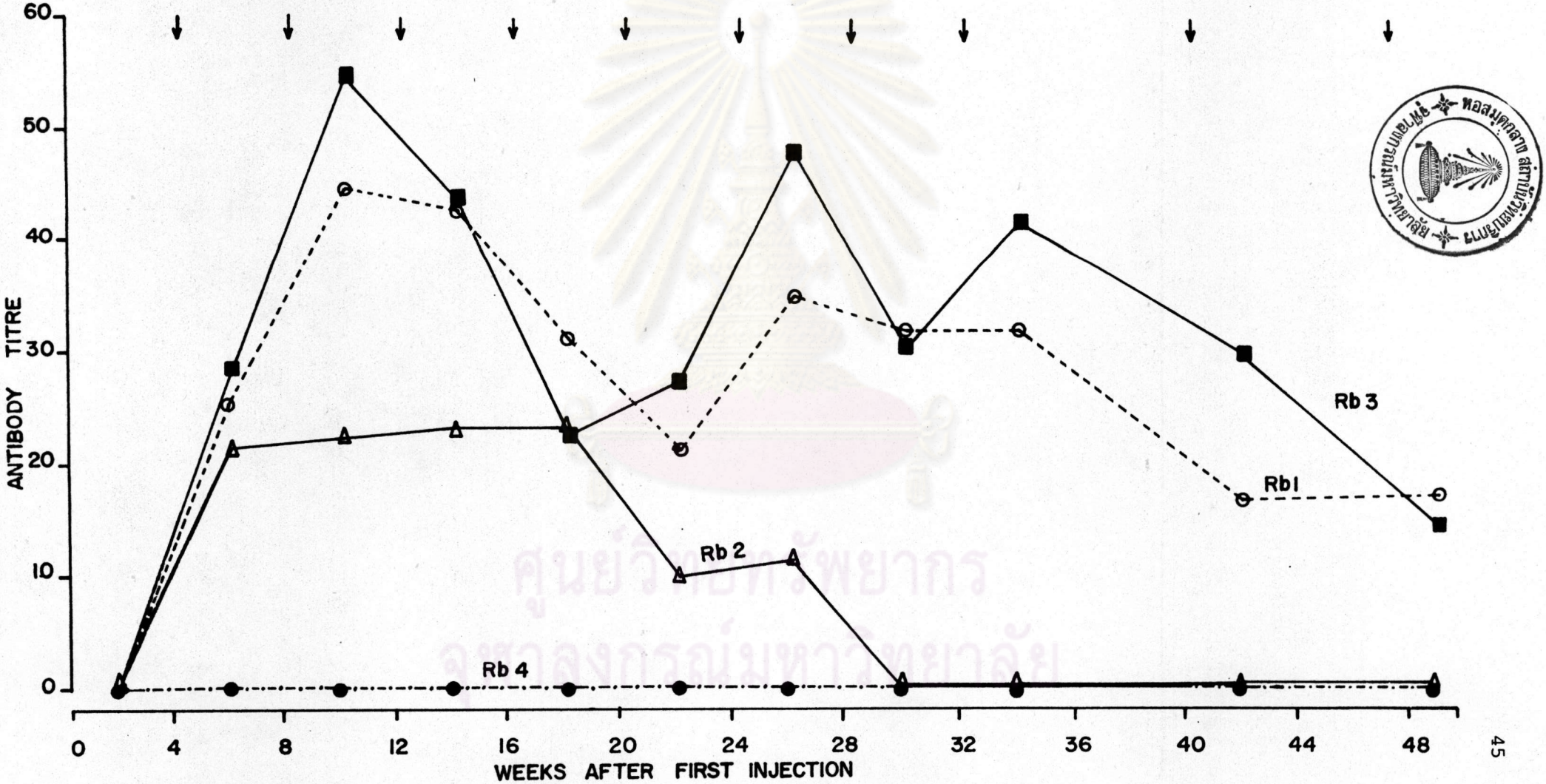
ผู้วิจัยได้เลือกแอนติสเปอร์มิดีนที่ได้จากกระต่าย Rb1 และ Rb3 ซึ่งมีปริมาณแอนติ-สเปอร์มิดีนสูงที่สุดหลังการฉีดครั้งแรกประมาณ 10 สัปดาห์คือมีไตเตอร์เป็น 45 และ 55 ตามลำดับ (รูปที่ 5) มาใช้ในการทดลองต่อไป กระต่ายทั้ง 2 ตัวนี้ให้ไตเตอร์ของแอนติสเปอร์-มิดีนสูงพอควรและซีรัมที่ได้จากกระต่ายก็มีปริมาณมากเพียงพอที่จะใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากกระต่ายแต่ละตัวจะถูกเจาะเลือดทุกครั้งหลังจากฉีดสเปอร์มิดีนคอนจูเกตประมาณ 2 สัปดาห์ จึงเลือกซีรัมที่ได้จากกระต่าย Rb1 หลังการฉีดสเปอร์มิดีนคอนจูเกตซ้ำครั้งที่ 2 ถึง 6 และซีรัม

ที่ได้จากกระต่าย Rb3 หลังการฉีดสเปอร์มิดีนคอนจูเกตซ้ำครั้งที่ 2 ถึง 7 (ยกเว้นซีรัมที่ได้หลังการฉีดซ้ำครั้งที่ 4) นำซีรัมของกระต่ายทั้ง 2 ตัว มาผสมรวมกัน นำซีรัมผสม (pool antiserum) ไปหาไตเตอร์ของแอนติสเปอร์มิดีนโดยทำการทดลองตามข้อ 3.5 หน้า 28 ได้ไตเตอร์ของแอนติสเปอร์มิดีนเท่ากับ 38 (รูปที่ 8 หน้า 49)

ในการทดลองครั้งต่อไปจึงใช้ซีรัมผสมซึ่งมีไตเตอร์ของแอนติสเปอร์มิดีนเท่ากับ 38 มาเจือจางเป็น 10 เท่าด้วยบอเรตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร pH 8.0 (จากข้อ 3.1.1) เพื่อใช้ในเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ และได้สร้างกราฟมาตรฐานของสเปอร์มิดีน (รูปที่ 9 หน้า50) โดยทำการทดลองตามตารางที่ 1 หน้า 30 แต่ใช้สเปอร์มิดีนมาตรฐานความเข้มข้นละ 2 หลอด (duplicate)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

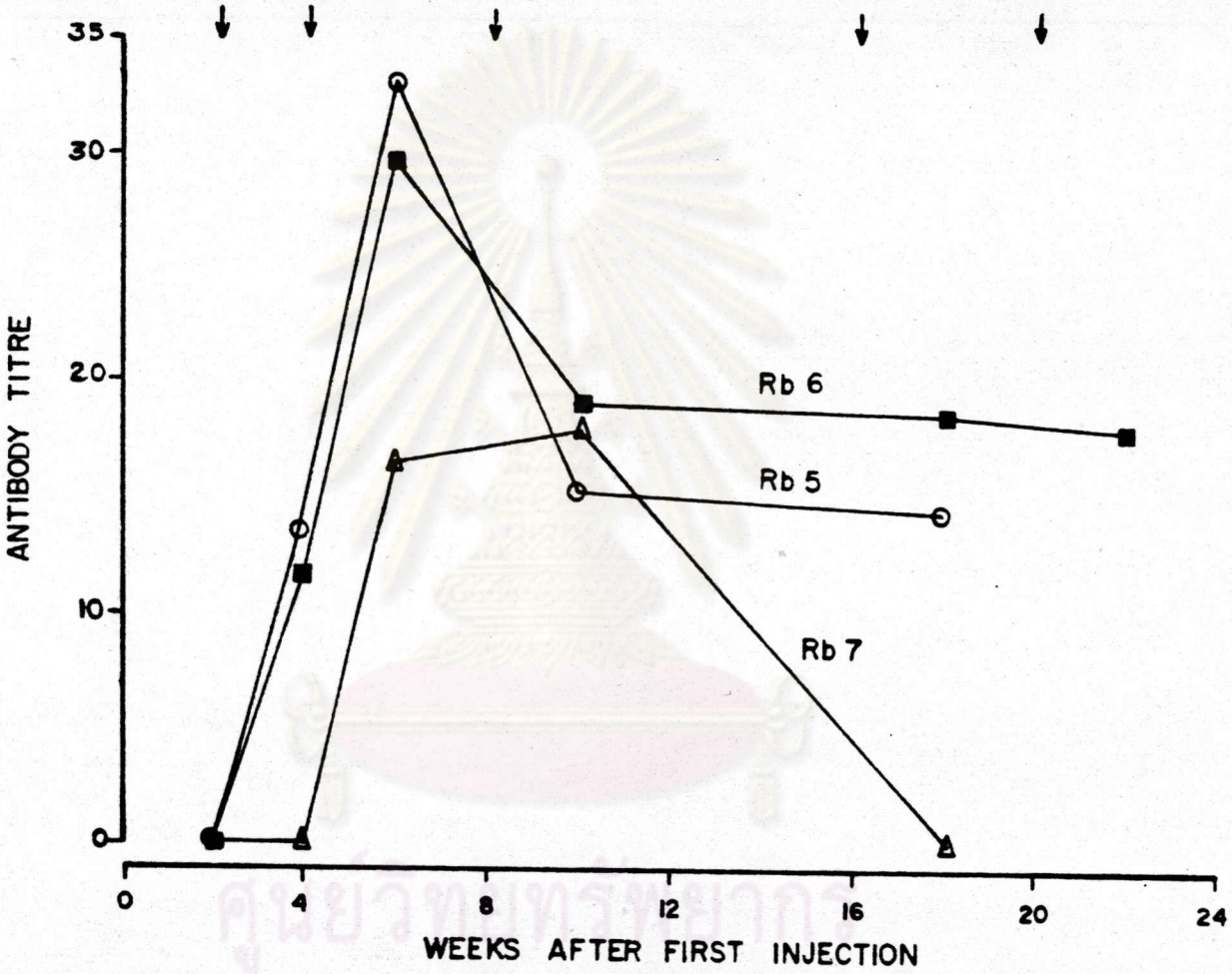
รูปที่ 5 ปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนที่กระต่ายกลุ่มที่ I สร้างขึ้นหลังจากฉีดสเปอร์มิดีนคอนจูเกต



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

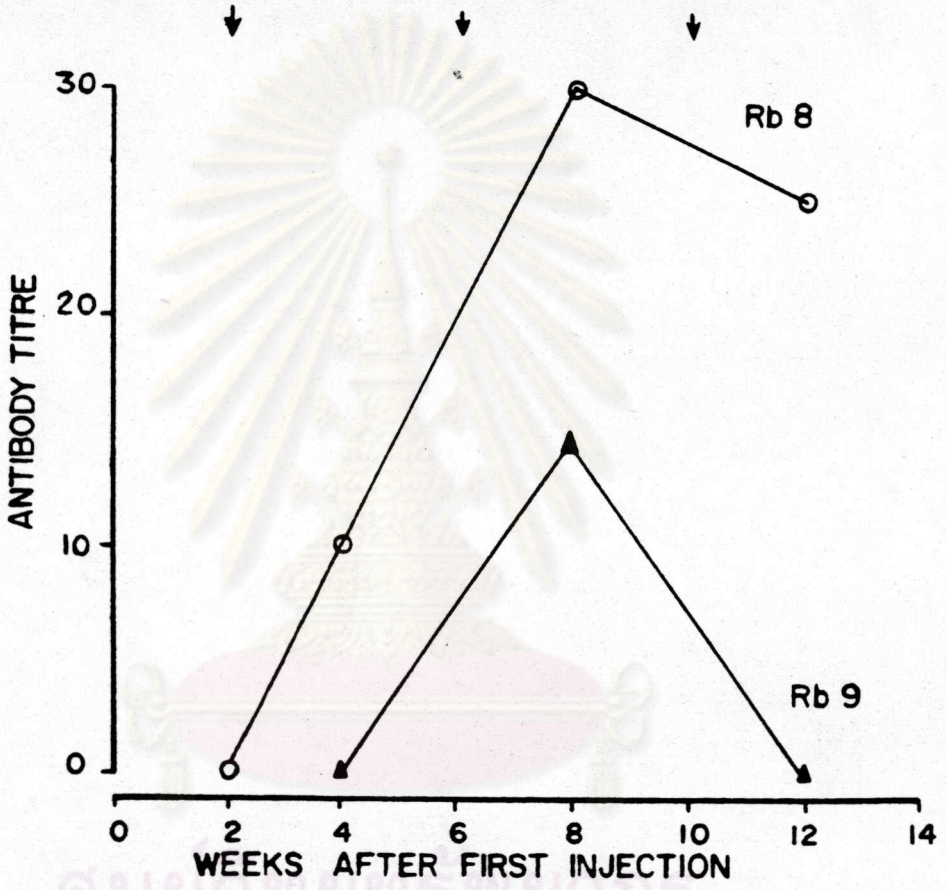
รูปที่ 6 ปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนที่กระต่ายกลุ่มที่ 2 สร้างขึ้นหลังจากฉีดสเปอร์มิดีนคอนจูเกต



เครื่องหมาย ↓ แสดงการฉีดสเปอร์มิดีนคอนจูเกต SB9 (Spd:BSA = 32:1) ซ้ำ (booster injection)

การฉีดกระต่ายแต่ละตัวในแต่ละครั้งใช้สเปอร์มิดีนคอนจูเกต 1 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซนต์) 1 มิลลิลิตรแล้วผสมกับคอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์ ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังด้านหลังประมาณ 30 จุด แต่ละจุดห่างกันประมาณ 1 นิ้ว (การฉีดซ้ำครั้งที่ 3, 4 และ 5 ใช้อินคอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์แทน)

รูปที่ 7 ปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนที่กระต่ายกลุ่มที่ 3 สร้างขึ้นหลังจากฉีดสเปอร์มิดีนคอนจูเกต



เครื่องหมาย ↓ แสดงการฉีดสเปอร์มิดีนคอนจูเกต ST6 (Spd:Pg = 506:1) ซ้ำ (booster injection)

การฉีดกระต่ายแต่ละตัวในแต่ละครั้งใช้สเปอร์มิดีนคอนจูเกต 1 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซนต์) 1 มิลลิลิตร แล้วผสมกับคอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์ ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังด้านหลังประมาณ 30 จุด แต่ละจุดห่างกันประมาณ 1 นิ้ว (การฉีดกระต่าย Rb8 ซ้ำครั้งที่ 3 ใช้อินคอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์แทน)

ตารางที่ 5 ปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนที่หนูตะเภาสร้างขึ้น

หนูตะเภาที่ไม่ได้แสดงปริมาณไตเตอร์ของแอนติสเปอร์มิดีนในตารางนี้ เป็นหนูตะเภาที่สร้างแอนติสเปอร์มิดีนได้ต่ำมากจนไม่สามารถหาไตเตอร์ได้

การฉีดหนูตะเภาแต่ละตัวในแต่ละครั้ง ใช้สเปอร์มิดีนคอนจูเกต 100 ไมโครกรัม ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซ็นต์) 100 ไมโครลิตร แล้วผสมกับคอมพลีท ฟรอยด์ แอดจูแวนท์ ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังด้านหลังประมาณ 7 จุด แต่ละจุดห่างกันประมาณ 1 นิ้ว

หนูตะเภาที่ใช้ในการทดลองแบ่งเป็น 5 กลุ่ม หลังจากฉีดสเปอร์มิดีนคอนจูเกตครั้งแรกแล้ว 2 สัปดาห์ จึงฉีดซ้ำ (booster injection) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (Gp1 ถึง Gp3) ฉีดด้วย SB3 (Spd:BSA = 26:1) ทุก 2 สัปดาห์ 2 ครั้ง และทุก 1 เดือนอีก 2 ครั้ง

กลุ่มที่ 2 (Gp4 ถึง Gp14) ฉีดด้วย SB2 (Spd:BSA = 25:1) ทุก 2 สัปดาห์ อีก 4 ครั้ง

กลุ่มที่ 3 (Gp15 ถึง Gp29) ฉีดด้วย SB9 (Spd:BSA = 32:1) ทุก 2 สัปดาห์ อีก 2 ครั้ง

กลุ่มที่ 4 (Gp30 ถึง Gp45) ฉีดด้วย ST4 (Spd:Tg = 601:1) ทุก 2 สัปดาห์ อีก 2 ครั้ง

กลุ่มที่ 5 (Gp46 ถึง Gp55) ฉีดด้วย ST2 (Spd:Tg = 203:1) ทุก 2 สัปดาห์ อีก 2 ครั้ง

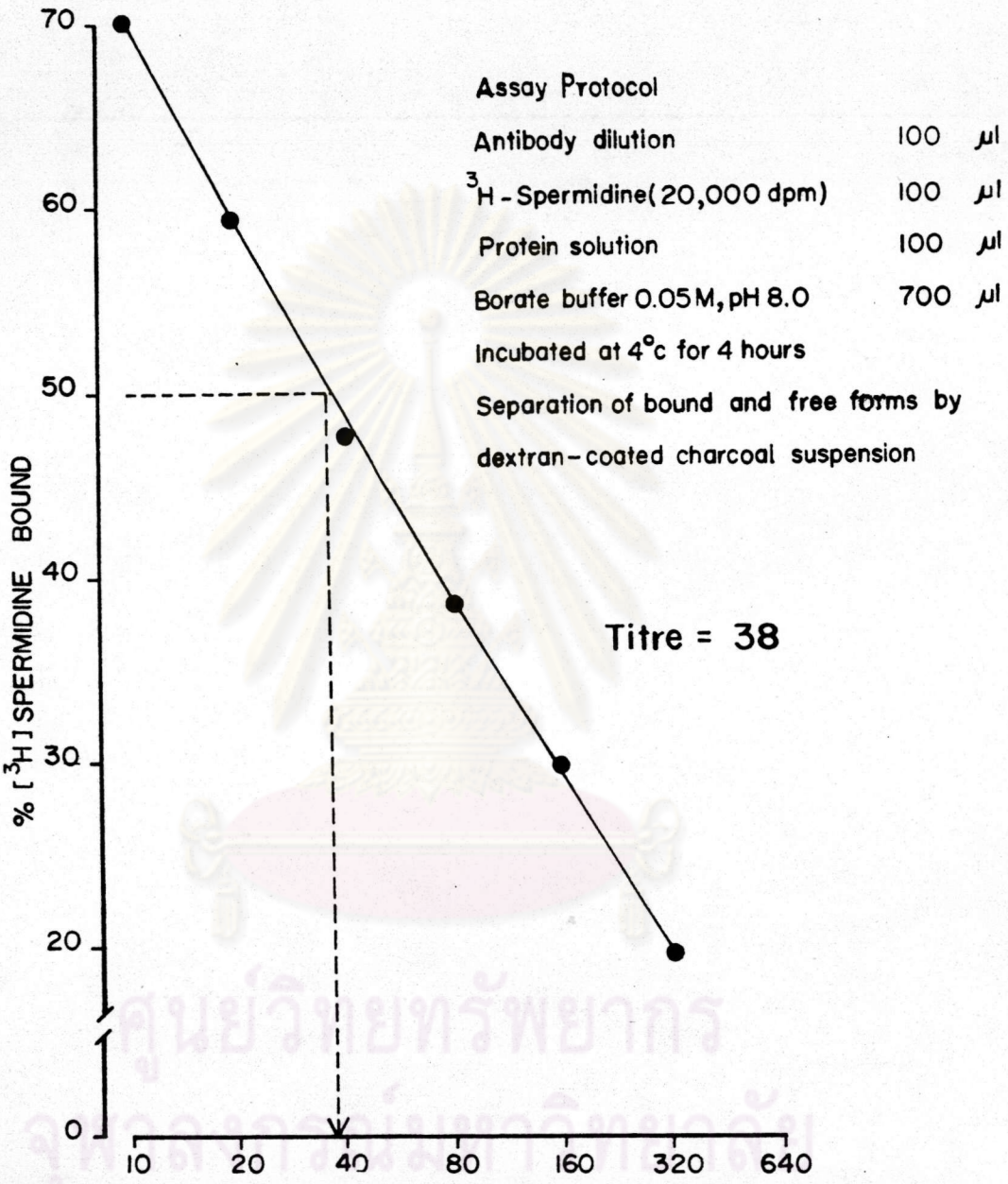
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนที่หนูตะเภาสร้างขึ้น

Group	Code of conjugate	Code of guinea-pig	Antibody titre
2	SB 2	Gp 11	20.0
3	SB 9	Gp 15	27.5
		Gp 16	28.5
		Gp 21	10.0
		Gp 22	10.0
		Gp 27	12.0
		Gp 29	12.5
4	ST 4	Gp 31	70.0
		Gp 33	16.5
		Gp 37	10.0
		Gp 43	14.0
5	ST 2	Gp 52	16.0
		Gp 54	11.0
		Gp 55	19.0

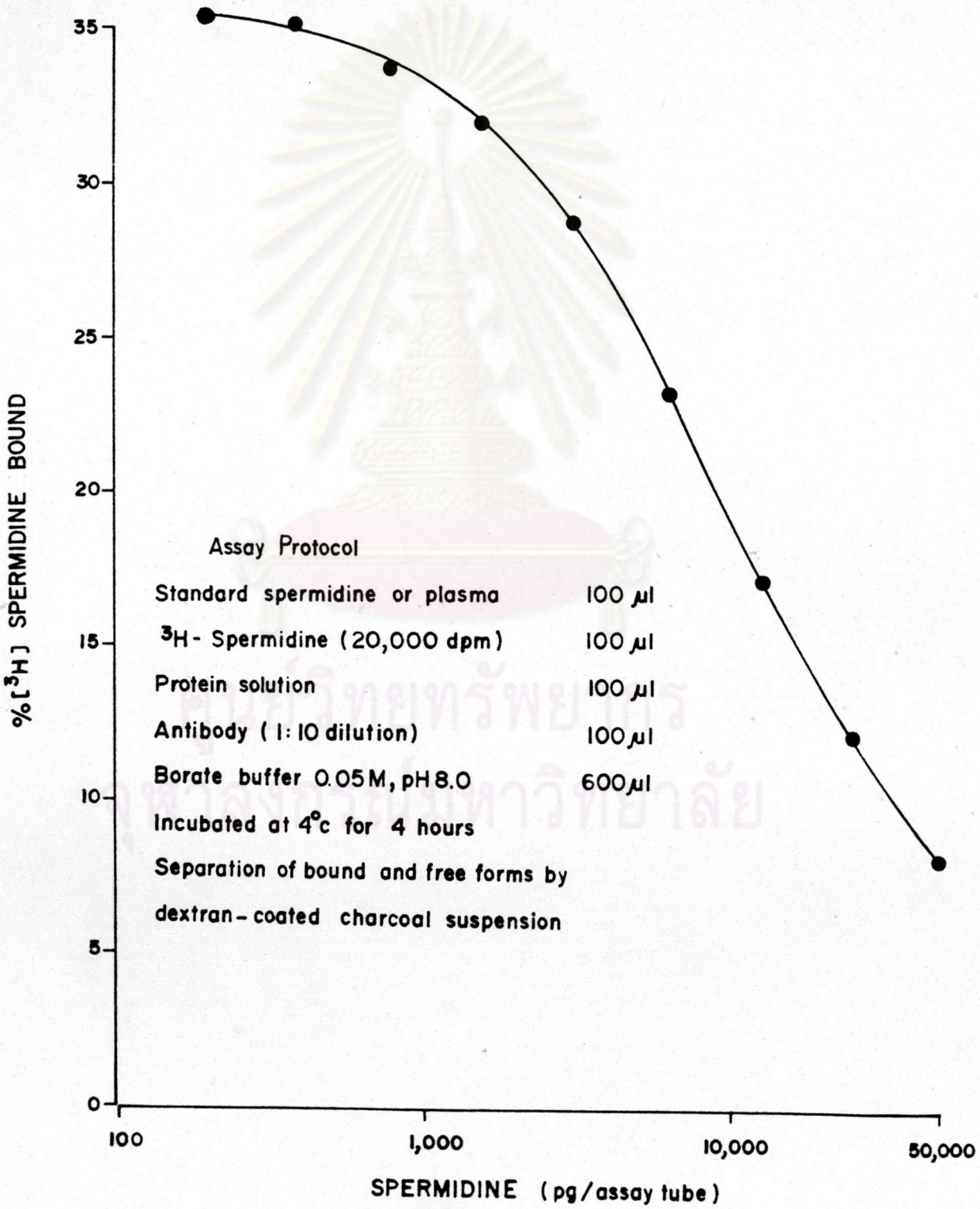
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 ไตเตอร์ของแอนติสเปอร์มิดีนที่สร้างโดยกระต่าย



แอนติซีรัมได้มาจากกระต่าย Rb1 และ Rb3 ซึ่งฉีดด้วยสเปอร์มิดีนคอนจูเกต SB 3 (Spd : BSA = 26 : 1) โดยรวมซีรัมที่ได้หลังจากการฉีดซ้ำครั้งที่ 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 (หรือหลังจากการฉีดครั้งแรกประมาณ 10 ถึง 30 สัปดาห์)

รูปที่ 9 กราฟมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมา โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์



4.3 ผลการศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของแอนติสเปอร์มิดีน

4.3.1 ผลการหาค่า Ka ของแอนติสเปอร์มิดีน

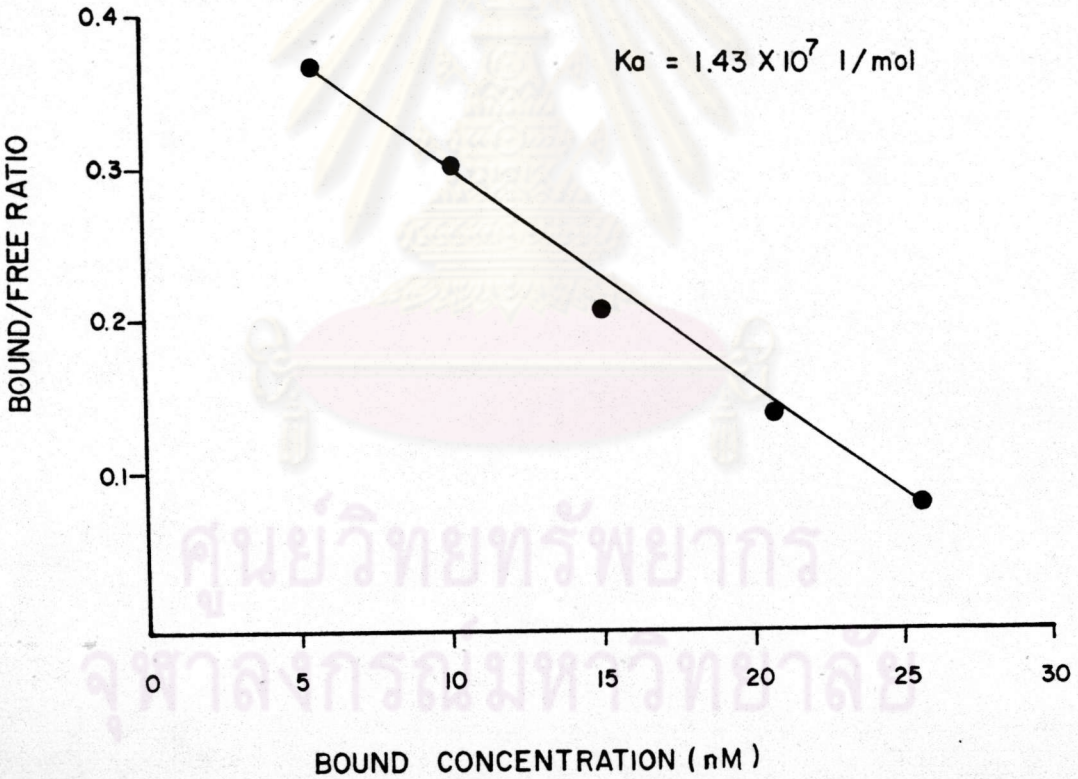
ค่าคงที่ของการจับกัน (association constant, Ka) ระหว่างตำแหน่งของแอนติเจนที่จะให้แอนติบอดีเข้าเกาะ (antibody binding site) กับตำแหน่งของแอนติบอดีที่จะเกาะกับแอนติเจน (immunoreactive site) หาได้โดยการทำเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ของสเปอร์มิดีนมาตรฐานช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 51,200 พิโคกรัมต่อหลอดทดลอง โดยทำซ้ำในการทดลองเดียวกันความเข้มข้นละ 10 หลอด (10 replicates) ตามข้อ 3.6.1 หน้า 29 ค่า Ka ของแอนติสเปอร์มิดีนหาได้ตามวิธีของ Scatchard (1949) ดังแสดงในรูปที่ 10 หน้า 52 ได้ค่า Ka ของแอนติสเปอร์มิดีนเท่ากับ 1.43×10^7 ลิตรต่อโมล ซึ่งเป็นค่าอยู่ในช่วงที่สามารถเอามาทำเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ได้

4.3.2 ผลการหาความจำเพาะของแอนติสเปอร์มิดีน

ความจำเพาะของแอนติสเปอร์มิดีนศึกษาโดยการทดสอบร้อยละของปฏิกิริยาข้ามชนิดกับสารที่มีโครงสร้างคล้ายสเปอร์มิดีนซึ่งได้แก่ พูเทรสซีน สเปอร์มีน คาดาเวอรีน และออร์นิทีน โดยทำการทดลองตามข้อ 3.6.2 หน้า 31 พบว่าแอนติสเปอร์มิดีนที่สร้างได้มีความจำเพาะสูงพอควร (รูปที่ 11 หน้า 53) มีปฏิกิริยาข้ามชนิดสูงสุดกับพูเทรสซีนซึ่งมีร้อยละของปฏิกิริยาข้ามชนิดเท่ากับ 17.7 รองลงมาคือสเปอร์มีน และคาดาเวอรีน ซึ่งมีร้อยละของปฏิกิริยาข้ามชนิดเท่ากับ 8.12 และ 2.05 ตามลำดับ ส่วนออร์นิทีนไม่มีปฏิกิริยาข้ามชนิดกับแอนติสเปอร์มิดีน (ตารางที่ 6 หน้า 54)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 การหาค่า Ka ของแอนดิสเปอร์มิดีน โดย Scatchard plot



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

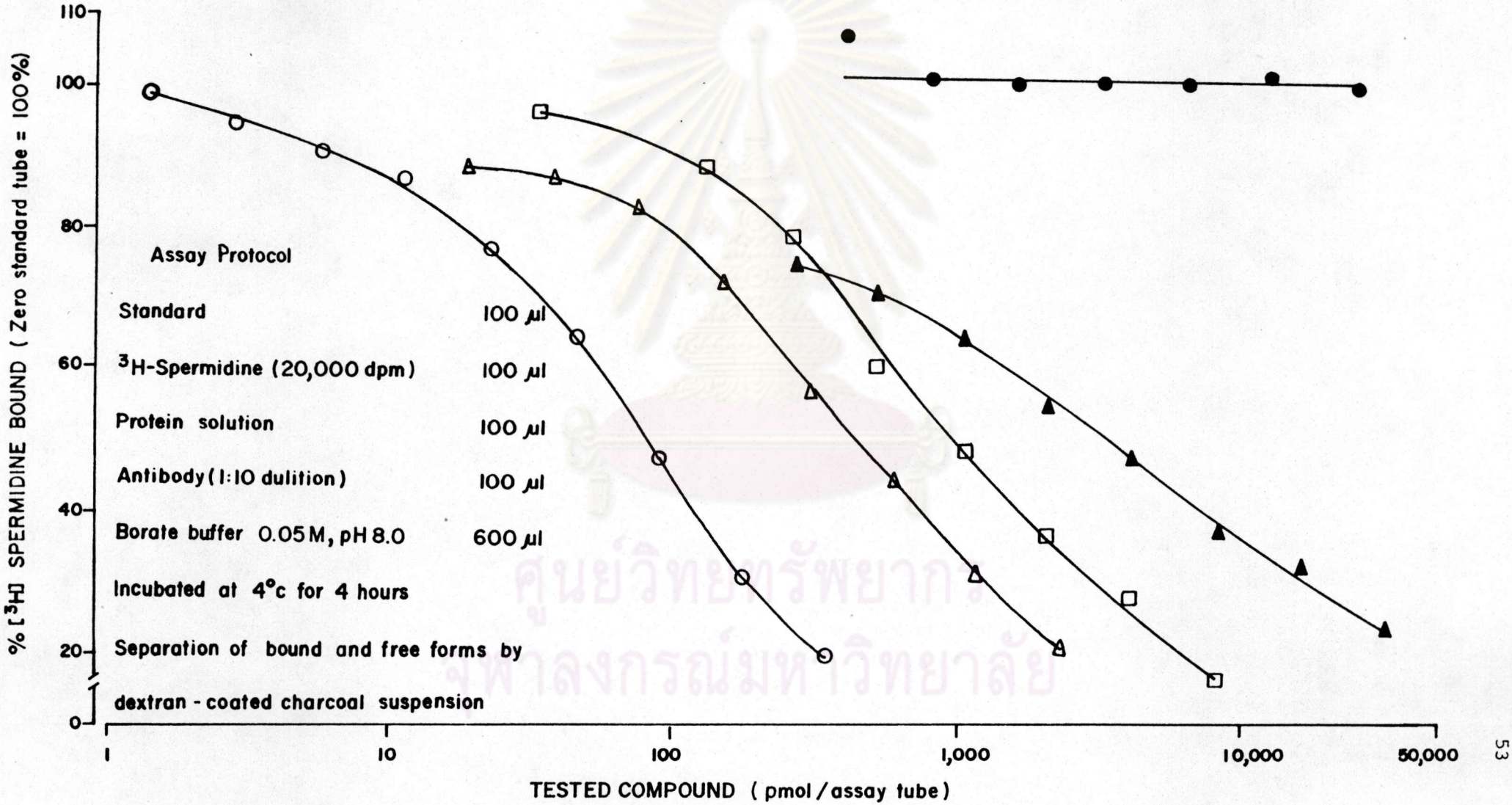
รูปที่ 11 ความจำเพาะของแอนติสเปอร์มิดีน

ทดสอบความจำเพาะของแอนติสเปอร์มิดีนกับสารต่าง ๆ ที่ช่วงความเข้มข้น ดังต่อไปนี้

สเปอร์มิดีน	(○—○)	1.38 - 352.49	พิโคโมลต่อหลอดทดลอง
พูเทรสซีน	(△—△)	18.15 - 2323.15	พิโคโมลต่อหลอดทดลอง
สเปอร์มีน	(□—□)	31.63 - 8096.84	พิโคโมลต่อหลอดทดลอง
คาดาเวอรีน	(▲—▲)	0.25 - 32.07	นาโนโมลต่อหลอดทดลอง
ออร์นิทีน	(●—●)	0.39 - 24.8	นาโนโมลต่อหลอดทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 ความจำเพาะของแอนติสเปอร์มิดีน



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ความจำเพาะของแอนติสเปอร์มิดีน

Compound investigated	Cross - reaction (%)
Spermidine	100
Putrescine	17.7
Spermine	8.12
Cadaverine	2.05
Ornithine	0.00

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

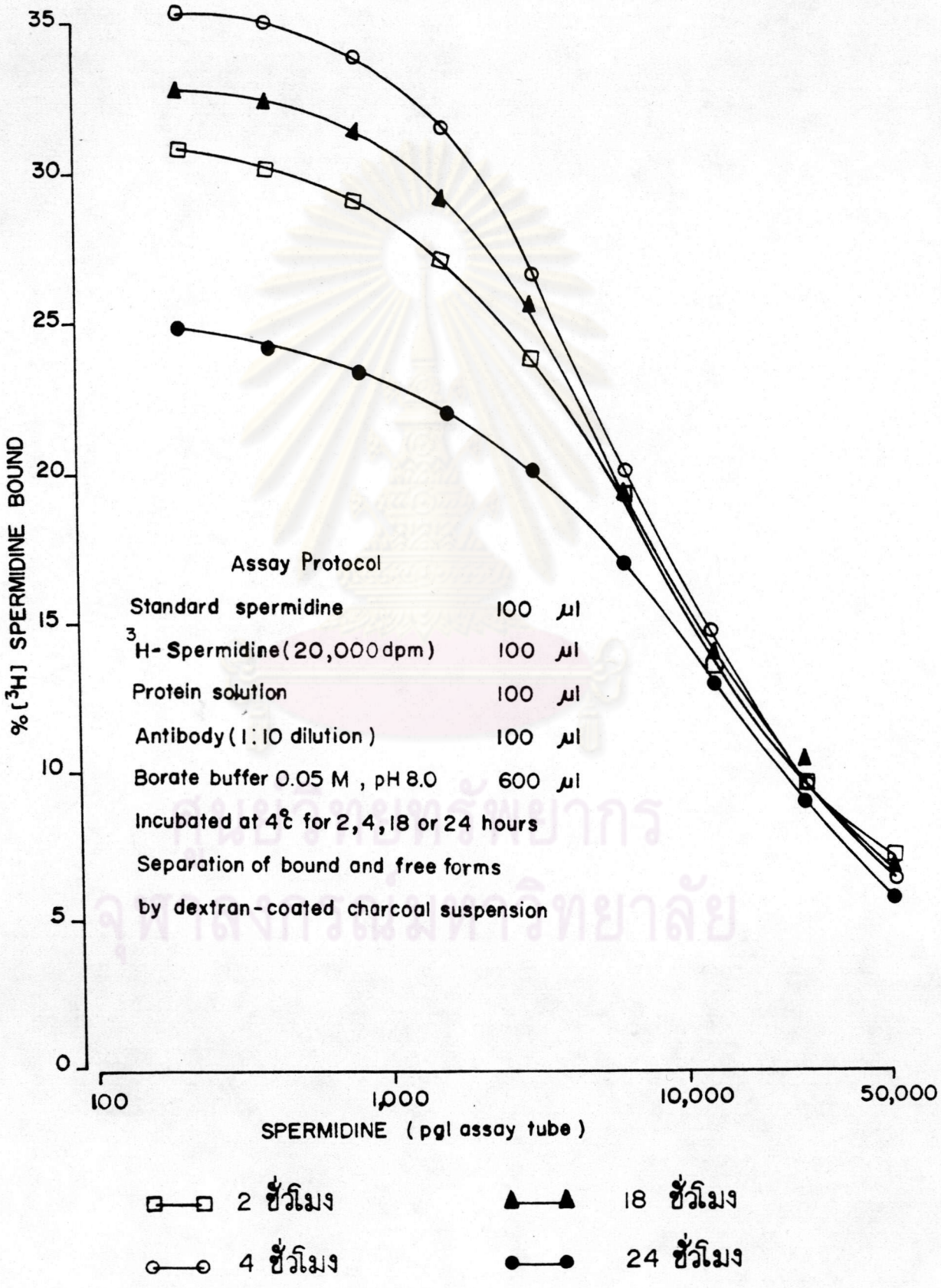
4.4.1 ระยะเวลาของการอินคิวเบท

ได้ทดลองทำกราฟมาตรฐานของสเปอร์มิดีนโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์โดยใช้เวลาในการอินคิวเบทต่าง ๆ กันคือ 2, 4, 18 และ 24 ชั่วโมง ทำการทดลองตามข้อ 3.7.1 หน้า 32 จะเห็นว่าเวลาที่ใช้อินคิวเบท 4 ชั่วโมงให้ค่าร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดี (ในหลอดที่ไม่มีสเปอร์มิดีนมาตรฐาน) สูงที่สุด และมีร้อยละของการลด (% drop) ของกราฟมาตรฐานสเปอร์มิดีนช่วงความเข้มข้น 200 ถึง 51,200 พิโคกรัมต่อหลอดทดลองสูงที่สุดประมาณ 82 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 12 หน้า 56) ถ้าอินคิวเบทนานกว่า 4 ชั่วโมง เช่น 18 และ 24 ชั่วโมง หรืออินคิวเบทน้อยกว่า 4 ชั่วโมง เช่น 2 ชั่วโมง จะให้ค่าร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดี (ในหลอดที่ไม่มีสเปอร์มิดีนมาตรฐาน) ต่ำกว่าการอินคิวเบท 4 ชั่วโมง และมีค่าร้อยละของการลดของกราฟมาตรฐานสเปอร์มิดีนที่ช่วงความเข้มข้นเดียวกันเป็น 80, 77 และ 77 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังนั้นการทดลองครั้งต่อไปจึงเลือกใช้เวลาในการอินคิวเบทเป็น 4 ชั่วโมง

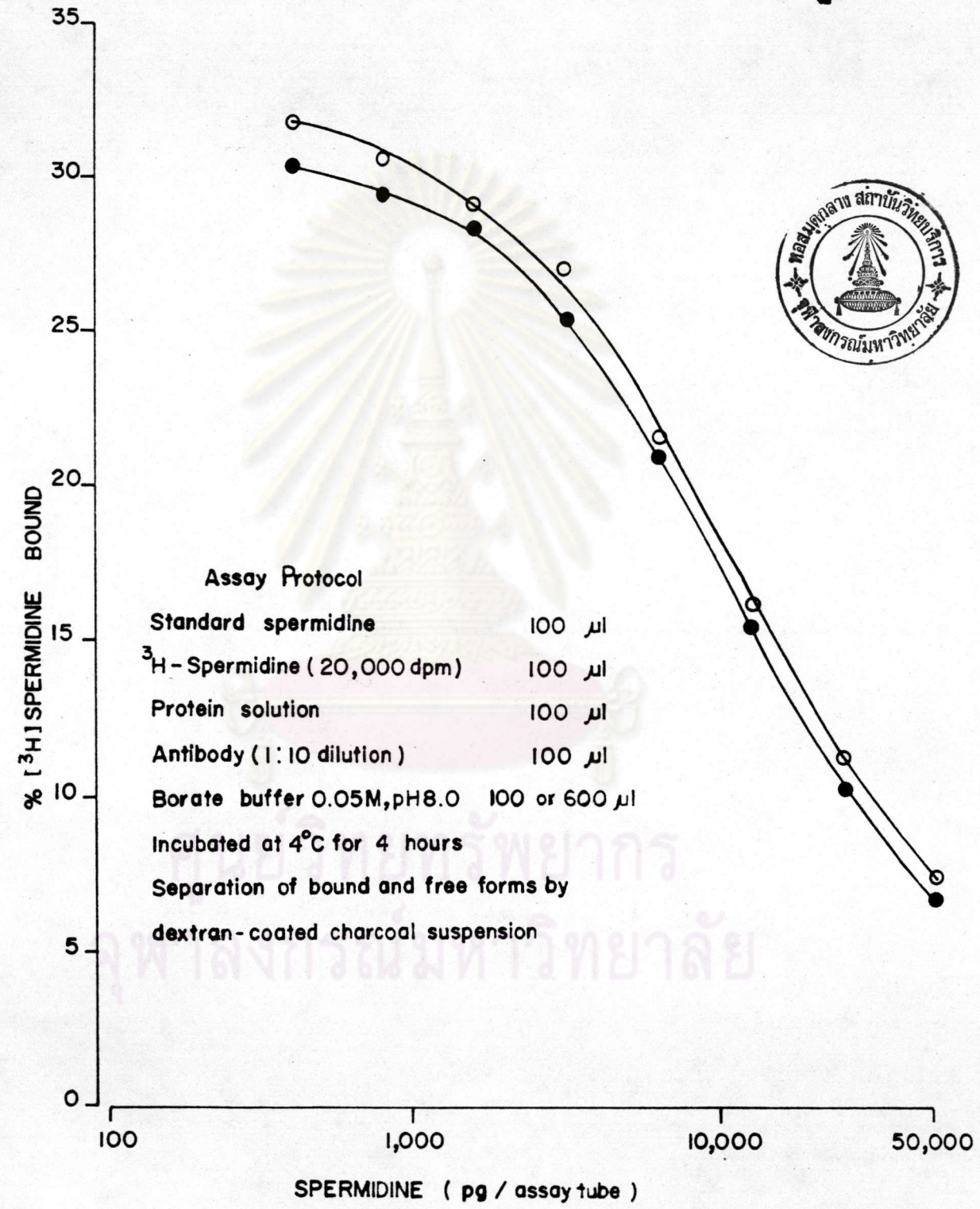
4.4.2 ปริมาตรในขณะอินคิวเบท

ได้ทดลองทำกราฟมาตรฐานของสเปอร์มิดีนโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์โดยใช้ปริมาตรในขณะอินคิวเบทต่าง ๆ กันคือ 0.5 และ 1 มิลลิลิตร ทำการทดลองตามข้อ 3.7.2 หน้า 32 พบว่าถ้าใช้ปริมาตรในขณะอินคิวเบท 1 มิลลิลิตรจะให้ค่าร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดี (ในหลอดที่ไม่มีสเปอร์มิดีนมาตรฐาน) สูงกว่าใช้ปริมาตรในขณะอินคิวเบท 0.5 มิลลิลิตรเล็กน้อย (รูปที่ 13 หน้า 57) ส่วนร้อยละของการลดของกราฟมาตรฐานสเปอร์มิดีนช่วงความเข้มข้น 200 ถึง 51,200 พิโคกรัมต่อหลอดทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ปริมาตรในขณะอินคิวเบทเป็น 1 มิลลิลิตร

รูปที่ 12 อิทธิพลของเวลาที่ใช้อินคิวเบทที่มีต่อกราฟมาตรฐาน



รูปที่ 13 อิทธิพลของปริมาตรในขณะอินคิวเบทที่มีต่อกราฟมาตรฐาน



●——● ปริมาตรในขณะอินคิวเบท 0..5 มิลลิลิตรต่อหลอดทดลอง

○——○ ปริมาตรในขณะอินคิวเบท 1.0 มิลลิลิตรต่อหลอดทดลอง

4.5 ผลการศึกษาความถูกต้องและความเชื่อถือได้ของการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

4.5.1 ความไวของวิธีวัด

จากการศึกษาโดยทำเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ของสเปอร์มิดีนมาตรฐานช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 51,200 พิโคกรัมต่อหลอดทดลองตามตารางที่ 1 หน้า 30 โดยทำในการทดลองเดียวกันซ้ำความเข้มข้นละ 10 หลอด แล้วหาความไวของการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนโดยวิธีเรดิโอ-อิมมูโนแอสเสย์ตามวิธีของ Abraham (1974) ได้ค่าเป็น 17.9 พิโคโมลต่อ 1 มิลลิลิตรของพลาสมา (รูปที่ 14 หน้า 60)

4.5.2 ความแม่นยำของวิธีวัด

ความแม่นยำของวิธีวัดแสดงถึงความสามารถในการวัดปริมาณของสารในตัวอย่างเดียวกัน ในการทดลองแต่ละครั้งว่าได้ค่าใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยมากน้อยเพียงใด (Midgley, 1969) ซึ่งสามารถหาความแม่นยำของวิธีวัดได้จากการคำนวณหาค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ศึกษาโดยวัดปริมาณสเปอร์มิดีนซ้ำ ๆ กันในตัวอย่างพลาสมา

จากการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ในพลาสมารวม 3 ตัวอย่าง คือที่มีความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนต่ำ กลางและสูง โดยทำการทดลองซ้ำตัวอย่างละ 12, 20 และ 16 หลอดตามลำดับ ภายในการทดลองเดียวกันตามวิธีข้อ 3.8.2.1 หน้า 33 ได้ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเป็น 13.4, 6.92 และ 7.56 ที่ความเข้มข้นของสเปอร์มิดีน 15.8, 64.9 และ 255 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของพลาสมา และจากการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ในพลาสมารวม 3 ตัวอย่างคือที่มีความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนต่ำ กลางและสูง โดยทำการทดลองซ้ำตัวอย่างละ 15, 20 และ 20 ครั้งตามลำดับที่ต่างการทดลองและต่างวันกันตามวิธีข้อ 3.8.2.2 หน้า 33 ได้ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเป็น 13.8, 11.5 และ 10.1 ที่ความเข้มข้นของสเปอร์มิดีน 13.5, 58.2 และ 294 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของพลาสมาตามลำดับ (ตารางที่ 7 หน้า 61)

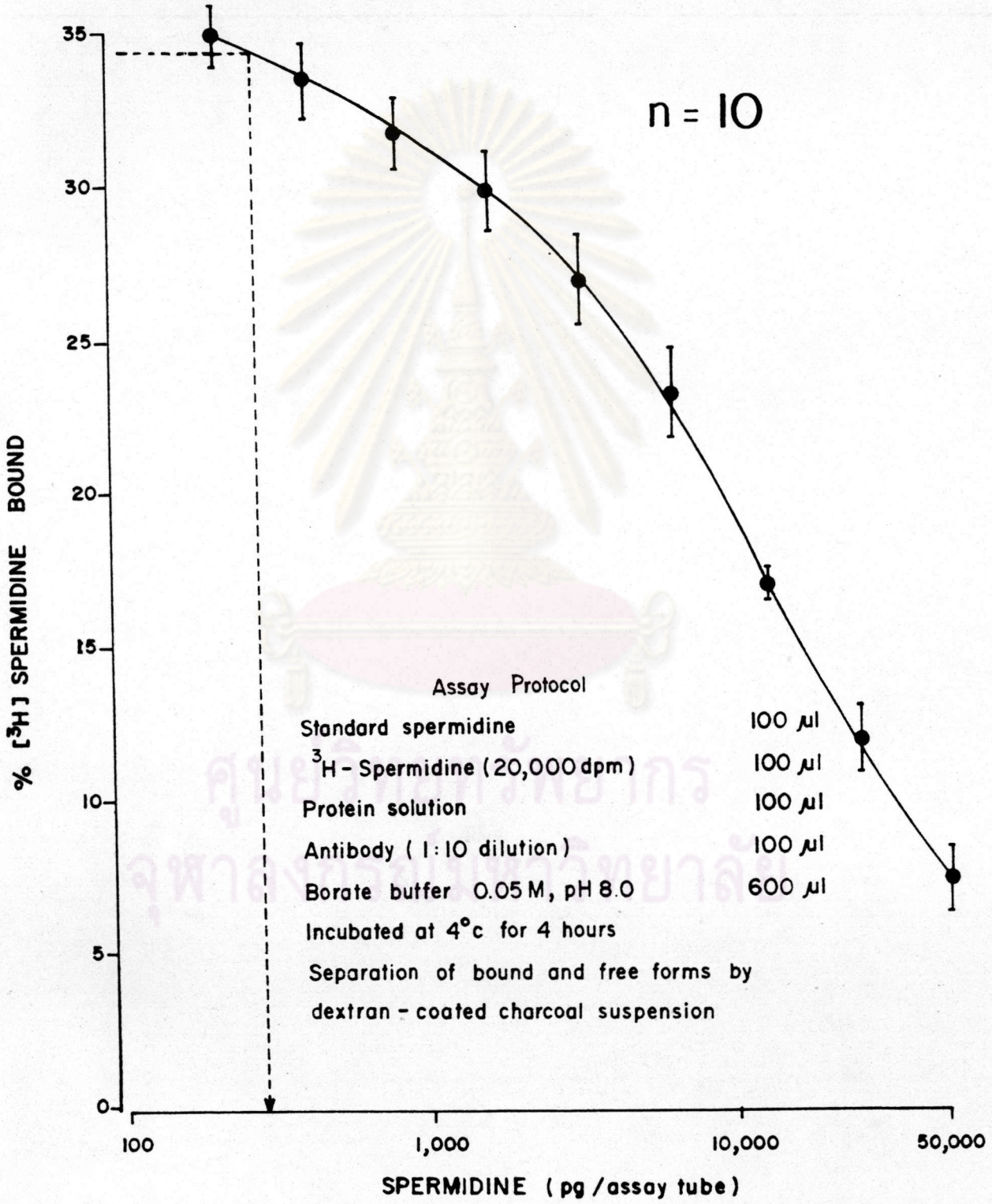
4.5.3 ความถูกต้องของวิธีวัด

ความถูกต้องของวิธีวัดแสดงถึงการวัดปริมาณของสารในตัวอย่างว่าได้ค่าใกล้เคียงกับที่มีอยู่จริงในตัวอย่างนั้นเพียงใด (Midgley, 1969) ความถูกต้องของวิธีวัดสามารถศึกษาได้จากการศึกษารีคอบเวอรีและพาราลเรลลิซึม (recovery and parallelism studies)

ความถูกต้องของวิธีวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาดูได้จากค่ารีคอบเวอรีของสเปอร์มิดีนมาตรฐานที่เติมลงไปในตัวอย่างพลาสมา (ตามวิธีข้อ 3.8.3.1 หน้า 33) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8 หน้า 62 ได้ค่ารีคอบเวอรีระหว่าง 92.1 ถึง 111.5 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าปริมาณสเปอร์มิดีนที่เติมลงไปกับที่วัดได้มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด ซึ่งจากการวิเคราะห์โดยรีเกรสชันเส้นตรงแบบธรรมดา (simple linear regression) ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) เป็น 0.976 นอกจากนี้ความถูกต้องของวิธีวัดปริมาณสเปอร์มิดีนยังดูได้จากการศึกษาพาราลเรลลิซึม โดยการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในตัวอย่างพลาสมาที่มีความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนสูง ๆ แล้วนำมาทำให้เจือจางเป็นเท่าตัวไปเรื่อย ๆ (serial double dilution) ดูลักษณะของกราฟที่ตอบสนองต่อปริมาณสเปอร์มิดีน (dose-response courve) ที่มีในพลาสมาเทียบกับสเปอร์มิดีนมาตรฐาน (ตามวิธีข้อ 3.8.3.2 หน้า 34) พบว่ากราฟของพลาสมาและสเปอร์มิดีนมาตรฐานมีลักษณะคล้ายกันดังแสดงในรูปที่ 15 หน้า 63 และมีความชันของกราฟเป็น 0.49 และ 0.54 ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบโดยใช้สติวเดนท์ ที เทสท์ (student's t-test) พบว่าความชันของกราฟทั้ง 2 เส้นไม่แตกต่างกัน จึงสรุปว่ากราฟทั้ง 2 เส้นขนานกัน แสดงว่าการเจือจางพลาสมาไม่มีผลต่อการวัดปริมาณสเปอร์มิดีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 14 กราฟมาตรฐานของสเปอร์มิดีน



ตารางที่ 7 ความแม่นยำของการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมา โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

Assay variance	Spermidine concentration(ng/ml plasma)		
	Low	Medium	High
Within assay			
n	12	20	16
$\bar{X}$	15.8	64.9	255
SD	2.12	4.49	19.3
%CV	13.4	6.92	7.56
Between assay			
n	15	20	20
$\bar{X}$	13.5	58.2	294
SD	1.86	6.72	29.7
% CV	13.8	11.5	10.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

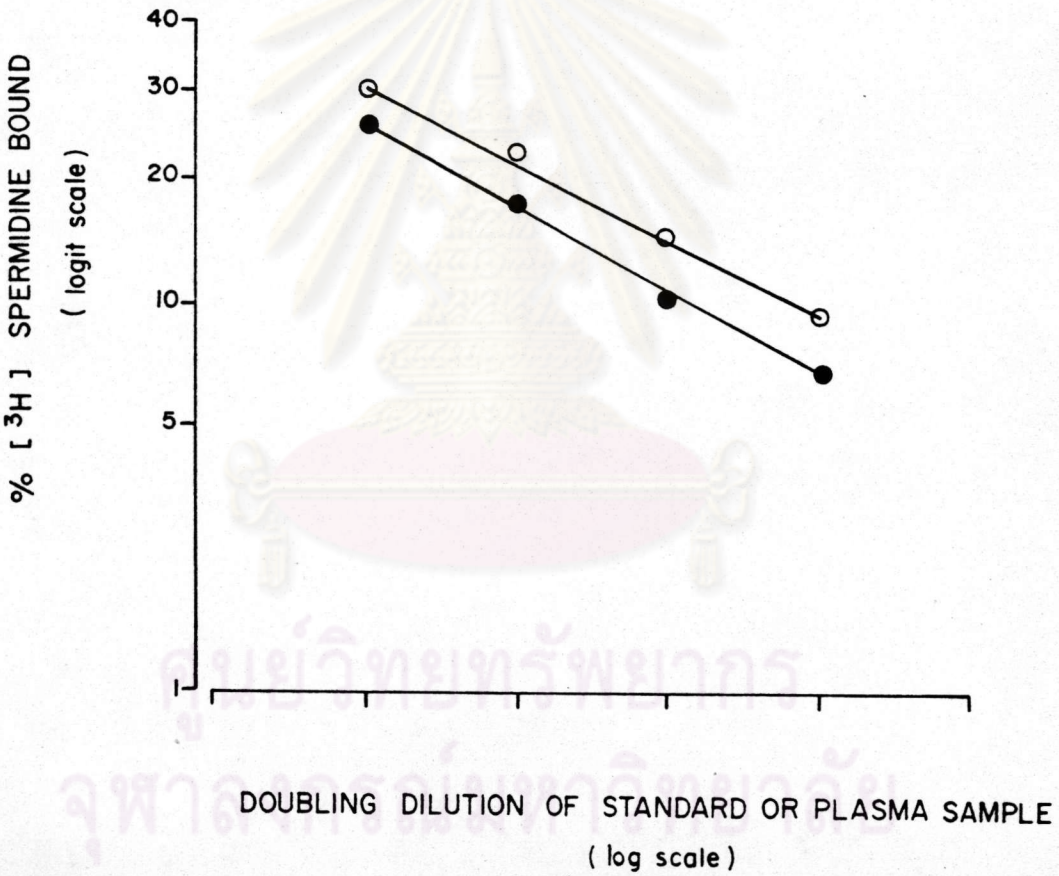
ตารางที่ 8 ความถูกต้องของการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมา โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

Spermidine added (ng/ml plasma)	Spermidine measured (ng/ml plasma)	Recovery* (%)
0	99.0	-
2	93.0	92.1
4	106.0	102.9
8	103.0	96.3
16	115.0	100.0
32	146.0	111.5

* มีสัมประสิทธิ์สหพันธ์ (Correlation coefficient, r) = 0.976

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 15 ความถูกต้องของการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์



4.6 การวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

เมื่อนำตัวอย่างพลาสมาได้แก่พลาสมาของสตรีปกติที่ไม่ตั้งครรภ์จำนวน 50 ราย สตรีตั้งครรภ์ปกติอายุครรภ์ตั้งแต่ 5 ถึง 36 สัปดาห์จำนวน 144 รายและสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกก่อนการรักษาซึ่งมีอายุครรภ์ตั้งแต่ 5 ถึง 23 สัปดาห์จำนวน 14 ราย มาวัดปริมาณสเปอร์-มิดีนตามวิธีข้อ 3.9 หน้า 35 ปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีปกติและสตรีตั้งครรภ์ปกติมีค่าเป็น 54.0±14.1 และ 58.2±14.7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของพลาสมาตามลำดับ (ตารางที่ 9 หน้า 66) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกพบว่ามีปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาเป็น 72.0±23.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของพลาสมาซึ่งมีค่าสูงกว่าสตรีปกติและสตรีตั้งครรภ์ปกติอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อดูปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์ต่าง ๆ กัน (รูปที่ 16 หน้า 67) พบว่าแต่ละอายุครรภ์มีปริมาณสเปอร์มิดีนแตกต่างกันเล็กน้อย และในสตรีที่มีอายุครรภ์เท่ากันจะมีปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาแตกต่างกัน (variation) ค่อนข้างสูง จากผลการศึกษาครั้งนี้ไม่พบช่วงของอายุครรภ์ที่มีปริมาณสเปอร์มิดีนสูงสุด สำหรับปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกก่อนการรักษาเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์เท่ากัน จะเห็นว่าสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกบางรายมีปริมาณสเปอร์มิดีนต่ำกว่าสตรีตั้งครรภ์ปกติ บางรายมีค่าใกล้เคียงกันและบางรายมีค่าสูงกว่า แต่มีข้อน่าสังเกตว่าอายุครรภ์ต่ำกว่า 13 สัปดาห์สตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกส่วนใหญ่จะมีปริมาณสเปอร์มิดีนใกล้เคียงหรือต่ำกว่าสตรีตั้งครรภ์ปกติเล็กน้อย แต่ที่อายุครรภ์มากกว่า 13 สัปดาห์สตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกส่วนใหญ่จะมีปริมาณสเปอร์มิดีนสูงกว่าสตรีตั้งครรภ์ปกติ

เมื่อแบ่งสตรีตั้งครรภ์ปกติเป็น 3 กลุ่มตามช่วงของอายุครรภ์คือ 5 ถึง 12, 13 ถึง 24 และ 25 ถึง 36 สัปดาห์ พบว่ามีปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาเป็น 64.7±14.3, 55.7±13.8 และ 51.8±12.6 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของพลาสมาตามลำดับ (ตารางที่ 10 หน้า 68) จะเห็นว่าสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์ 5 ถึง 12 สัปดาห์จะมีปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมามากกว่าสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์ 13 ถึง 24 และ 25 ถึง 36 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญ และมีปริมาณสเปอร์มิดีนมากกว่าสตรีปกติอย่างมีนัยสำคัญด้วย ส่วนสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์ 13 ถึง 24 และ 25 ถึง 36 สัปดาห์ มีปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาไม่แตกต่างกับสตรีปกติ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีตั้งครรภ์ปกติ

ที่มีอายุครรภ์ 5 ถึง 12 สัปดาห์กับสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุก พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน

เมื่อนำปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุก 12 รายมาเปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังการรักษา (รูปที่ 17 หน้า 69) พบว่ามี 4 ราย (B,J,K.L) ที่ปริมาณสเปอร์มิดีนลดลงหลังการรักษาโดยการทำแท้งและให้ยา มี 3 ราย (D,F,G) ที่มีปริมาณสเปอร์มิดีนก่อนและหลังการรักษาแตกต่างกันเล็กน้อย และมี 5 ราย (A,C,E,H,I) ที่มีปริมาณสเปอร์มิดีนสูงขึ้นหลังการรักษา

เมื่อวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีปกติ 2 รายซึ่งไม่ตั้งครรภ์และไม่อยู่ในช่วงมีประจำเดือน โดยเจาะเลือดทั้งหมด 5 ครั้งในวันที่ 1,3,5,8 และ 10 (รูปที่ 18 หน้า 70) พบว่าปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีทั้ง 2 รายในวันต่าง ๆ กันมีค่าไม่คงที่ ในพลาสมาของสตรี M มีปริมาณสเปอร์มิดีนในวันต่าง ๆ อยู่ระหว่าง 52 ถึง 89 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของพลาสมา ซึ่งมีช่วงความแตกต่างเป็น 37 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของพลาสมา ส่วนสตรี N มีปริมาณสเปอร์มิดีนอยู่ระหว่าง 46 ถึง 73 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของพลาสมา ซึ่งมีช่วงความแตกต่างเป็น 27 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของพลาสมา จะเห็นได้ว่าปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีปกติทั้ง 2 รายนี้มีการเปลี่ยนแปลงได้มากถึง 37 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของพลาสมาในช่วงเวลา 10 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

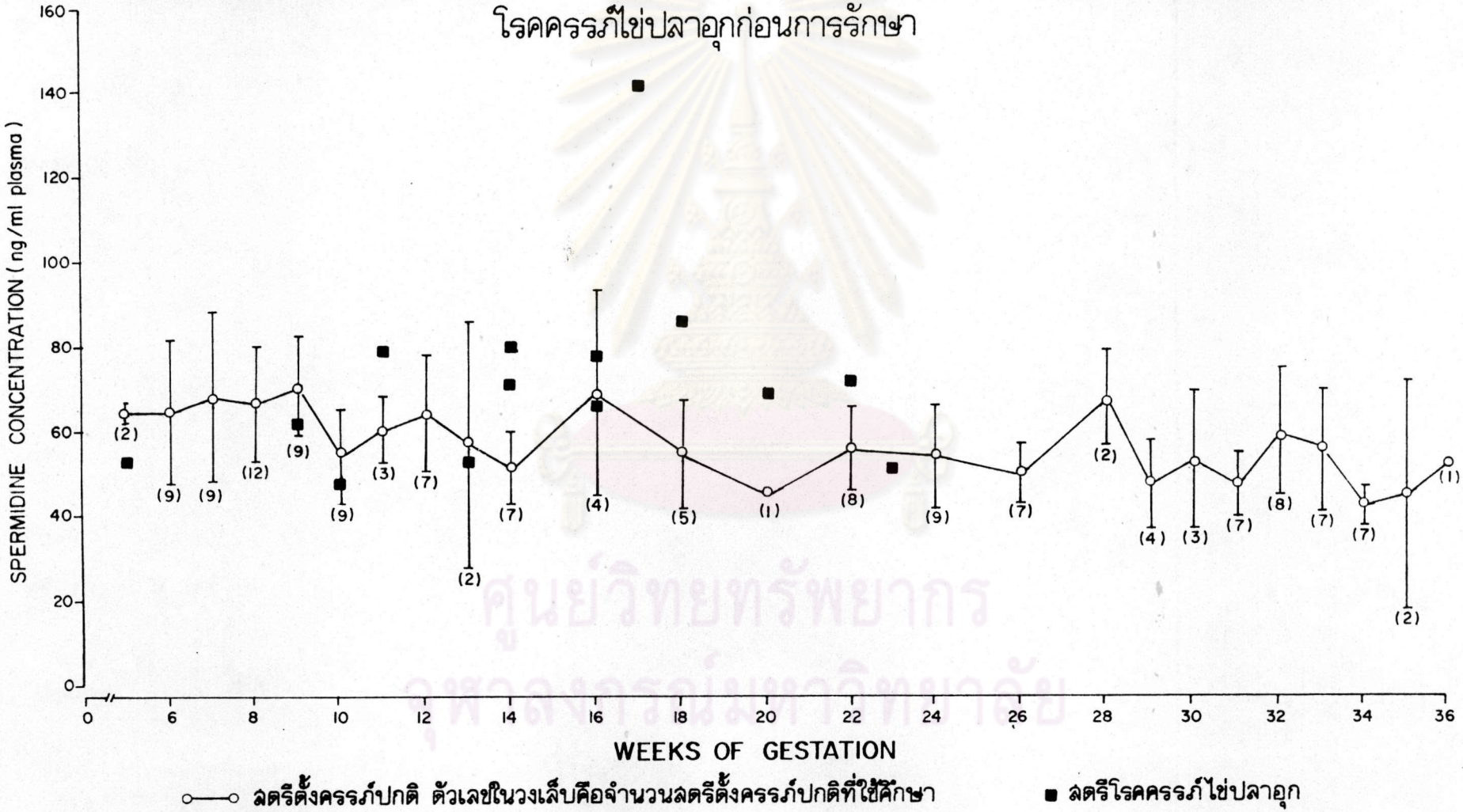
ตารางที่ 9 ปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีปกติ สตรีตั้งครรภ์ปกติ และสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุก

Subject	Age (years)	No.of subjects	Gestation age (weeks)	Spermidine concentration (ng/ml plasma)	
				Mean ± SD	Range
Normal women	17-53	50	—	54.0 ± 14.1	22 — 83
Pregnant women	17 - 41	144	5 — 36	58.2 ± 14.7	26 - 103
Hydatidiform mole	17 - 44	14	5 — 23	72.0 ± 23.5*	47 — 142

*สตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกมีปริมาณสเปอร์มิดีนมากกว่าสตรีปกติและสตรีตั้งครรภ์ปกติ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < .001$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 16 ปริมาณสเปอร์มิดีนในสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์ต่างๆกัน เปรียบเทียบกับสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกก่อนการรักษา



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

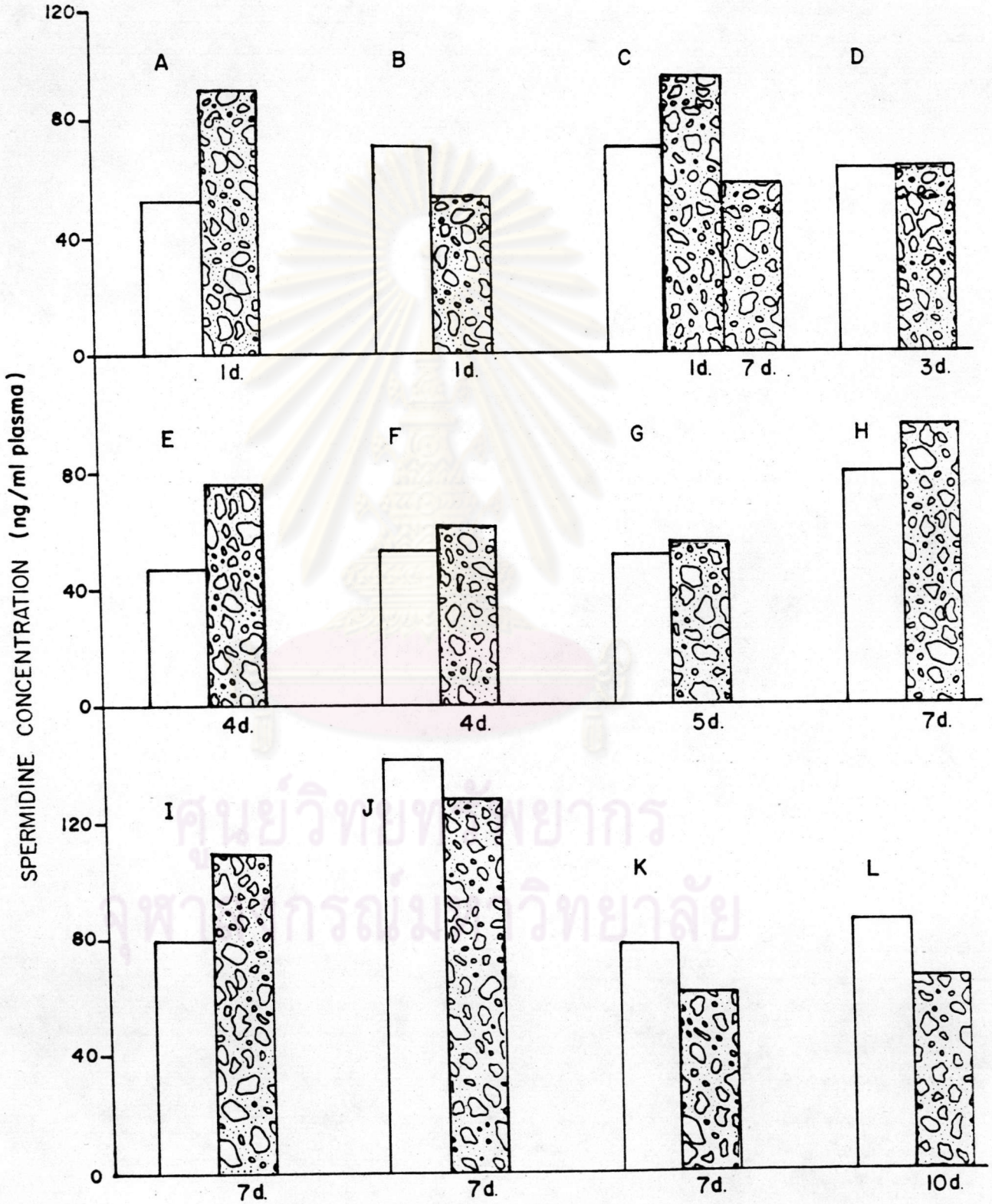
ตารางที่ 10 ปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีปกติและสตรีตั้ง-
-ครรภ์ปกติที่ช่วงอายุครรภ์ต่าง ๆ

Subject	Gestation age (weeks)	No of Subjects	Spermidine concentration(ng/ml plasma)	
			Mean ± SD	Range
Normal women	-	50	54.0 ± 14.1	22 - 83
Pregnant women	5 - 12	60	64.7 ± 14.3*	34 - 103
	13 - 24	36	55.7 ± 13.8	35 - 95
	25 - 36	48	51.8 ± 12.6	26 - 82

* สตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์ 5 ถึง 12 สัปดาห์ มีปริมาณสเปอร์มิดีน มากกว่าสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์ 13 ถึง 24 และ 25 ถึง 36 สัปดาห์ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < .005$ และ $P < .001$ ตามลำดับ) และมีปริมาณสเปอร์มิดีนมากกว่าสตรีปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < .001$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 17 ปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุก ก่อนและหลังการรักษา



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 18 ปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีปกติที่ไม่ตั้งครรภ์ที่วันต่างๆ กัน