การหาปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีตั้งครรภ์ปกติและโรคครรภ์ไข่ปลาอุก โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

นางสาวมนต์จันทร์ วณิชย์พันธุ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2526

ISBN 974-562-396-2

008650 I 16978067

DETERMINATION OF PLASMA SPERMIDINE IN NORMAL AND MOLAR PREGNANCIES BY RADIOIMMUNOASSAY

Miss Monchand Vanichapuntu

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences
Department of Biochemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
1983

ISBN 974-562-396-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหาปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีตั้งครรภ์ปกติและโรคครรภ์ไข่ปลาอุกโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์
โดย	นางสาว มนต์จันทร์ วณิชย์พันธุ์
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. ปรีดา ชัยศิริ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประดิษฐ์ บุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สรรเสริญ ทรัพย์โตษก)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วราพรรณ ด่านอุตรา)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ไพโรจน์ วิฑูรพณิชย์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหาปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีตั้งครรภ์ปกติ และโรคครรภ์ไข่ปลาอุกโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์
ชื่อนิสิต	นางสาวมนต์จันทร์ วณิชย์พันธุ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ
ภาควิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2525

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การศึกษาเกี่ยวกับโพลีเอมีนในทางการแพทย์ จำเป็นต้องมีวิธีวัดปริมาณโพลีเอมีนที่มีความไวและความถูกต้องสูง จึงได้มีการพัฒนาวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ขึ้นมาสำหรับวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมา แอนติสเปอร์มิดีนที่สร้างได้มีค่า Ka เท่ากับ 1.43×10^7 ลิตรต่อโมล และมีความจำเพาะพอสมควร มีปฏิกิริยาข้ามชนิดกับพูเทรสซีนสูงที่สุดซึ่งมีร้อยละของปฏิกิริยาข้ามชนิดเป็น 17.7 รองลงมาคือสเปอร์มิดีนและคาดาเวอรีนซึ่งร้อยละของปฏิกิริยาข้ามชนิดเป็น 8.12 และ 2.05 ตามลำดับ วิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ที่พัฒนาได้นี้มีความไว 17.9 พิโคโมลต่อมิลลิลิตรของพลาสมา มีความถูกต้องและความแม่นยำพอใช้ วิธีนี้สามารถวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาโดยใช้พลาสมาเพียง 100 ไมโครลิตรและสามารถวัดได้วันละไม่ต่ำกว่า 100 ตัวอย่าง

ค่าเฉลี่ยของปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์ 5 ถึง 36 สัปดาห์ ซึ่งวัดโดยวิธีที่พัฒนาได้นี้มีปริมาณไม่แตกต่างจากของสตรีปกติ อย่างไรก็ตามสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์ 5 ถึง 12 สัปดาห์มีปริมาณสเปอร์มิดีนสูงกว่าสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์ 13 ถึง 24 และ 25 ถึง 36 สัปดาห์และสูงกว่าสตรีปกติด้วย ซึ่งอาจเนื่องมาจากมีอัตราการเจริญของตัวอ่อนในระยะแรกของการตั้งครรภ์สูงกว่าระยะหลังของการตั้งครรภ์

สตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกที่มีอายุครรภ์น้อยกว่า 13 สัปดาห์จะมีปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาใกล้เคียงกับสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์เท่ากัน แต่สตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกที่มีอายุครรภ์มากกว่า 13 สัปดาห์ส่วนใหญ่จะมีปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาสูงกว่าสตรีปกติที่มีอายุครรภ์เท่ากัน อาจเนื่องมาจากในระยะหลังของการตั้งครรภ์ไข่ปลาอุกมีจำนวนเซลล์โทรโฟบลาสเพิ่มขึ้นและมีอัตราการเจริญของเซลล์สูงกว่าระยะแรกของการตั้งครรภ์ หลังการทำแท้งเอาก้อนไมล

ออก 1 ถึง 10 วันปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย คล้ายกับในสตรีปกติ ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมากับการเกิดโรคครรภ์ไข่ปลาอุกหรือการเปลี่ยนแปลงของโรคครรภ์ไข่ปลาอุกไปเป็นอินเวซีฟโมลและโคริโอคาร์ซิโนมา จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปอีก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis title	Determination of Plasma Spermidine in Normal and Molar Pregnancies by Radioimmunoassay
Name	Miss Monchand Vanichapuntu
Department	Biochemistry
Thesis Advisor	Preeda Chaisiri, Ph.D.
Academic Year	1982

Abstract

Studies on the clinical importance of polyamines have been greatly hindered by lack of adequate analytical methods. The development of a reliable and sensitive method for quantitative determination is required. A radioimmunoassay has been developed for the measurement of plasma spermidine concentrations. The association constant, Ka for spermidine antibody was 1.43×10^7 l/mol. The sensitivity of the method was 17.9 pmol spermidine/ml plasma and the cross reactivity was 17.7% with putrescine, 8.12% with spermine and 2.05% with cadaverine. The reliability of the radioimmunoassay described in this thesis in terms of sensitivity, accuracy and precision are satisfactory, and compare favourably with other reports. The assay could detect 260 pg/100 µl of plasma spermidine. The radioimmunoassay permitted a rapid technique for measuring at least 100 plasma samples a day.

Mean plasma spermidine levels of normal pregnancy subjects(5-36 weeks of gestation) measuring by this technique was not significantly higher than that of normal females. However,mean plasma spermidine concentrations in normal early pregnancy subjects (5-12 weeks of gestation) was significantly higher than that of normal late pregnancy subjects

(from 13 weeks of gestation onwards) and also that of normal females. This is probably reflecting a larger percentage of cell undergoing mitosis in the foetoplacental unit at an early stage of pregnancy.

Plasma spermidine concentrations in molar and normal pregnancy subjects having the same gestation were compared. During early molar pregnancy (less than 13 weeks of gestation) the plasma spermidine concentration of each individual was slightly different to that of normal pregnancy subjects. Most of late molar pregnancy subjects (from 13 weeks of gestation onwards) showed higher plasma spermidine concentrations than normal pregnancy subjects. This may be the result of an increase in trophoblastic cell mass with high proliferation rate during late molar pregnancy. One to ten days after the removal of mole tissues, slightly change in plasma spermidine concentrations in molar pregnancy subjects were observed. The correlation between plasma spermidine concentrations and the development of the molar pregnancy or invasive mole and choriocarcinoma, however, needs further investigation.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้จะไม่สำเร็จลุล่วงถ้าไม่ได้รับความช่วยเหลือจาก อาจารย์ดร.ปรีดา ชัยศิริ ที่ได้กรุณาแนะนำและให้คำปรึกษาในการทำวิจัยมาตั้งแต่ต้นจนจบ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ระบิล รัตนพานี คณบดีคณะสัตวแพทย์ศาสตร์ ที่อนุญาตให้ใช้ตึกสัตว์ทดลองของคณะสำหรับเลี้ยงกระต่ายและหนูตะเภา ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร.นิคม ชัยศิริ ที่ให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับการเลี้ยงสัตว์ทดลองและการใช้เครื่องมือบางอย่างของหน่วยวิชาชีวเคมี คณะสัตวแพทยศาสตร์ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์ ที่ได้กรุณาเก็บตัวอย่างพลาสมาของสตรีตั้งครรภ์ปกติ และสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุก

ขอขอบพระคุณ แพทย์หญิง เผ่าประยูร วิจิตรพาหนการ หัวหน้าฝ่ายสูตินารีเวช โรงพยาบาลราชวิถี ที่ได้กรุณาอนุญาตให้เก็บตัวอย่างพลาสมาจากผู้ป่วยในตึกผู้ป่วยสูตินารีเวช ขอขอบพระคุณ แพทย์หญิง วิมล สิริวาสิน แพทย์ประจำฝ่ายสูตินารีเวช ที่ให้ความช่วยเหลือในการค้นประวัติผู้ป่วย ขอขอบคุณ คุณขนิษฐา อารยภิญโญ หัวหน้าพยาบาลประจำตึกผู้ป่วยสูติ-นารีเวชที่ให้ความสะดวกในการเก็บตัวอย่างพลาสมา ขอขอบคุณ คุณอัญญาภรณ์ สามชัย เสมียนประจำตึกผู้ป่วยสูตินารีเวช ที่ได้ช่วยประสานงานเกี่ยวกับการเก็บตัวอย่างพลาสมาจากสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุก

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่เจาะเลือดของโรงพยาบาลรามาธิบดีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างพลาสมาของสตรีตั้งครรภ์ปกติ ขอขอบคุณ คุณอรวรรณ วีระเสริฐนิยม ที่กรุณาเขียนรูปบางส่วนให้ ขอขอบคุณผู้ป่วยโรคครรภ์ไข่ปลาอุก สตรีตั้งครรภ์ปกติ และอาสาสมัครทุกท่านที่กรุณาให้ตัวอย่างพลาสมาสำหรับการวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกให้ใช้ห้องปฏิบัติการรวมทั้งวัสดุและครุภัณฑ์ต่าง ๆ และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย . . . . . ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ . . . . . ฉ
กิตติกรรมประกาศ . . . . . ช
สารบัญตาราง . . . . . ฌ
สารบัญภาพ . . . . . ฎ
คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ . . . . . ฑ

บทที่

1. บทนำ 1
2. เคมีภัณฑ์ วัสดุภัณฑ์ และเครื่องมือ
   - 2.1 เคมีภัณฑ์ 17
   - 2.2 วัสดุภัณฑ์ 18
   - 2.3 เครื่องมือ 18
   - 2.4 สัตว์ทดลอง 19
   - 2.5 การเก็บตัวอย่างพลาสมา 20
   - 2.6 วิธีเก็บพลาสมา 20
3. วิธีทดลอง
   - 3.1 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ . . . 21
   - 3.2 การเตรียมพลาสมารวมสำหรับใช้ในเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ . . 23
   - 3.3 การเตรียมคอนจูเกตระหว่างสเปอร์มิดีนกับโปรตีนตัวนำ . . . 23
   - 3.4 การกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติสเปอร์มิดีน 26
   - 3.5 การหาปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนที่สัตว์ทดลองสร้างขึ้น 28
   - 3.6 การศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของแอนติสเปอร์มิดีน 29
   - 3.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ . . . 32

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

3.8 การศึกษาความถูกต้องและความเชื่อถือได้ของการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ 32

3.9 การวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาโดยวิธีเรดิโออิมมูโน-แอสเสย์ 35

4. ผลการทดลอง

4.1 ผลการเตรียมคอนจูเกตระหว่างสเปอร์มิดีนกับโปรตีนตัวนำ . 37

4.2 ผลการหาปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนที่สัตว์ทดลองสร้างขึ้น . . . 41

4.3 ผลการศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของแอนติสเปอร์มิดีน 51

4.4 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ . 55

4.5 ผลการศึกษาความถูกต้องและความเชื่อถือได้ของการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ 58

4.6 การวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาโดยวิธีเรดิโออิมมูโน-แอสเสย์ 64

5. วิจารณ์ผลการทดลอง 71

เอกสารอ้างอิง 89

ภาคผนวก 105

ประวัติผู้เขียน 111

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เรดิโออิมมูโนแอสเสย์ของสเปอร์มิดีนมาตรฐาน	30
2	การวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์	36
3	ผลการเตรียมคอนจูเกตระหว่างสเปอร์มิดีนกับอัลบูมิน	39
4	ผลการเตรียมคอนจูเกตระหว่างสเปอร์มิดีนกับไทโรกลอบบูลิน	40
5	ปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนที่หนูตะเภาสร้างขึ้น	48
6	ความจำเพาะของแอนติสเปอร์มิดีน	54
7	ความแม่นยำของการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาโดยวิธีเรดิโออิมมูโน-แอสเสย์	61
8	ความถูกต้องของการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาโดยวิธีเรดิโออิมมูโน-แอสเสย์	62
9	ปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีปกติ สตรีตั้งครรภ์ปกติ และสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุก	66
10	ปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีปกติและสตรีตั้งครรภ์ปกติที่ช่วงอายุครรภ์ต่าง ๆ	68

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	วิถีการสร้างโพลีเอมีนในเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	2
2	การพัฒนาของไซโกทไปเป็นบลาสโตซิส	8
3	ภาพภายในมดลูกของสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุก และโคริโอนิควิลลัสปกติ กับที่เป็นโรคครรภ์ไข่ปลาอุก	9
4	หลักการของวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์	16
5	ปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนที่กระต่ายกลุ่มที่ 1 สร้างขึ้นหลังจากฉีดสเปอร์มิดีน-คอนจูเกต	45
6	ปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนที่กระต่ายกลุ่มที่ 2 สร้างขึ้นหลังจากฉีดสเปอร์มิดีน-คอนจูเกต	46
7	ปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนที่กระต่ายกลุ่มที่ 3 สร้างขึ้นหลังจากฉีดสเปอร์มิดีน-คอนจูเกต	47
8	ไตเตอร์ของแอนติสเปอร์มิดีนที่สร้างโดยกระต่าย	49
9	กราฟมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาโดยวิธีเรดิโออิมมูโน-แอสเสย์	50
10	การหาค่า Ka ของแอนติสเปอร์มิดีนโดย Scatchard Plot	52
11	ความจำเพาะของแอนติสเปอร์มิดีน	53
12	อิทธิพลของเวลาที่ใช้อินคิวเบทที่มีต่อกราฟมาตรฐาน	56
13	อิทธิพลของปริมาตรในขณะอินคิวเบทที่มีต่อกราฟมาตรฐาน	57
14	กราฟมาตรฐานของสเปอร์มิดีน	60
15	ความถูกต้องของการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาโดยวิธีเรดิโออิมมูโน-แอสเสย์	63
16	ปริมาณสเปอร์มิดีนในสตรีตั้งครรภ์ปกติที่มีอายุครรภ์ต่าง ๆ กัน เปรียบเทียบกับสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกก่อนการรักษา	67

รูปที่ หน้า

17 ปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีโรคครรภ์ไข่ปลาอุกก่อนและหลังการรักษา 69

18 ปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีปกติที่ไม่ตั้งครรภ์ที่วันต่าง ๆ กัน . . 70

19 กราฟมาตรฐานของโปรตีนโดยวิธีของ Lowry 109

20 การแยกสเปอร์มิดีนติดสลากออกจากสารรังสีเจือปนโดยวิธีธินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี 110

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

BSA	=	bovine serum albumin
Tg	=	thyroglobulin
CDI	=	1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide
Spd	=	spermidine
Ag	=	antigen
Ab	=	antibody
OD	=	optical density
SD	=	standard deviation
g	=	gravity
dpm	=	disintegration per minute
M	=	mole/litre
nM	=	nanomole/litre
p mol	=	picomole
µg	=	microgram
ng	=	nanogram
pg	=	picogram
µl	=	microlitre
ml	=	millilitre
nm	=	nanometre

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย