

สัตว์ทดลอง สารเคมี อุปกรณ์ และการทดลอง

3.1 สัตว์ทดลอง

ลิงที่ใช้ศึกษาเป็นลิงหางยาวแม่ลูกอ่อนที่เลี้ยงในหน่วยวิจัยไพรเมท ประกอบด้วยลิงที่มีสายพันธุ์ดั้งเดิมจากป่าชายเลนจังหวัดสมุทรสงคราม 5 ตัว จากป่าจังหวัดปราจีนบุรี 2 ตัว และแม่ลิงที่เพิ่งหย่านมจากเขางูจังหวัดราชบุรี 3 ตัว ลิงแต่ละตัวเลี้ยงในกรงเดี่ยวทำด้วยเหล็กอบสารกันสนิม ขนาดกว้าง 24 นิ้ว สูง 34 นิ้ว และลึก 28 นิ้ว เรือนเลี้ยงลิงกรุด้วยลวดตาข่ายและมุ้งลวด พร้อมทั้งพัดลมดูดอากาศ เพื่อให้อากาศถ่ายเทได้สะดวก และควบคุมให้ได้รับแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง (06.00-18.00) อาหารเลี้ยงเป็นอาหารสำเร็จรูปของ บริษัทเจริญ-โกภัณฑ์อาหารสัตว์ และเสริมด้วยกล้วย มันเทศ แดงกวา ข้าวโพด ถั่วฝักยาว และไข่ต้ม โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้ง

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (RIA) (ใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูปที่ใช้ในคน แต่ได้ทำการทดสอบว่าใช้กับซีรัมของลิงได้โดยการทำ parallelism check)

1. PRL - Double Antibody : Cat. No. KPRD1, Diagnostic Commercial Kit Products Corporation, U.S.A.
2. Total T_4 Double Antibody : Cat. No. KT4D1, Diagnostic Commercial Kit Products Corporation, U.S.A.
3. Total T_3 Double Antibody : Cat. No. KT3D1, Diagnostic Commercial Kit Products Corporation, U.S.A.
4. Coat-A-Count Free T_4 : Cat. No. TKF 41, Diagnostic Products Corporation, U.S.A.
5. GammaDab ^{125}I hTSH : Cat. No. Ca-591, Incstar Radioimmunoassay Corporation, U.S.A.

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการห้ามการผลิต้น้ำนม

โบรโมคริปติน หรือ CB 154, Sandoz, Ltd., Basel, Switzerland

3.3 อุปกรณ์

1. เข็มฉีดยาเบอร์ 22 G x $1\frac{1}{2}$ " : Terumo Corporation, Tokyo, Japan.
และเบอร์ 26 G x $\frac{1}{2}$ "
2. Syringe ขนาด 5 มิลลิลิตร : Terumo Corporation, Tokyo, Japan.
และขนาด 1 มิลลิลิตร Yamaguch Medical Instrument, Co,
(ชนิดใช้ครั้งเดียวทิ้ง) Ltd.,
3. Micropipetts : Model 5000 DG, Nichiyo, Co, Ltd.,
Tokyo, Japan
4. Syringe Dispenser : Model 8100 Nichiyo, Co, Ltd.,
Tokyo, Japan
5. Vortex Mixture : M-16715, Thermolyne Corporation,
Iowa, U.S.A.
6. Dubnoff Incubator-Shaker : Model 3575-1, Lab-line Instrument
Inc., U.S.A.
7. Refrigerated Centrifuge : Model PR-J International Equipment
Company, Mass. - U.S.A.
8. Foam Decanting Rack : Diagnostic Products Corporation,
U.S.A.
9. Polystyrene Test Tube : Elkay, U.S.A.
ขนาด 12 x 75 mm.
10. Gamma Counter : Model 1282 Compugamma LKB Wallac,
Finland

3.4 วิธีดำเนินการทดลอง

3.4.1 การคัดเลือกลิงทดลอง

คัดเลือกลิงเพศเมียที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์อายุ 5-10 ปี และมีลูกมาแล้วไม่เกิน 3 ครั้ง นำไปผสมพันธุ์กับลิงเพศผู้โตเต็มวัยอายุ 7-12 ปี และมีประวัติเคยมีลูกมาก่อน ในวันที่ 12-16 ของรอบประจำเดือนปกติ วันที่พบลิงเพศผู้ทำการผสมและมี ejaculation หรือเข้าวันที่ตรวจพบสเปิร์มในการทำ vaginal smear ถือเป็นวันที่ 1 ของการตั้งครรภ์ ลิงที่คัดเลือกทุกตัวคลอดลูกเป็นปกติ และมีน้ำนมหลั่งออกมาเลี้ยงลูกได้เป็นปกติ

3.4.2 การเจาะเลือดและฉีดโพรโมคริสตินระหว่างให้นมลูก แบ่งลิงแม่ลูกอ่อนออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่มควบคุม เป็นแม่ลิงจำนวน 4 ตัว (# 99, # 800, # 61 และ # 200) เริ่มเจาะเลือดตอนเช้าก่อนให้อาหาร (07.00 น.) และตอนค่ำ (19.00 น.) ตั้งแต่ตอนเช้าของ D2 และถัดไปทุกสัปดาห์จนถึง D93 (ค่ำ) และ D149 (เช้า) การเจาะเลือดจะทำได้เส้นเวเนบริเวณหน้าขา (femoral Venipuncture) โดยแต่ละครั้งจะเจาะเลือดประมาณ 5 ml

2. กลุ่มการทดลอง เป็นแม่ลิงจำนวน 3 ตัว (# 615, # 107 และ # 201) ในกลุ่มนี้จะเริ่มฉีดโพรโมคริสตินขนาด 1.5 มก./วัน เข้าใต้ผิวหนังบริเวณต้นขา โดยแบ่งให้วันละ 2 ครั้งในเวลา 08.00 น. และ 18.00 น. เริ่มตั้งแต่ D30 ของการให้นมลูก และให้ติดต่อกันนาน 14 วัน (D44) การเจาะเลือดเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม ในระหว่างให้นม การเจาะเลือดจะต้องกระทำในตอนเช้าก่อนฉีดโพรโมคริสติน

เก็บตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลานาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยกซีรัมที่ความเร็ว 2500 rpm. แยกซีรัมสำหรับวิเคราะห์ฮอร์โมน PRL, TSH และ thyroid hormones ออกจากกันก่อนที่จะนำมาแช่แข็งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนโดยวิธี RIA

แผนภูมิการเจาะเลือดและการฉีดโบรโมคริปตินในช่วงเวลาต่าง ๆ ของการให้นมลูก
ได้แสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150

ตารางที่ 1 แผนภูมิแสดงกำหนดเวลาการเจาะเลือด และการฉีดโบรโมคริปติน

☉ วันที่ 1 ของการให้นมลูก

* เจาะเลือดเวลา 07.00 และ 19.00 น.

● เจาะเลือดเฉพาะเวลา 07.00 น.

☞ ฉีดโบรโมคริปตินขนาด 1.5 มก./วันในกลุ่มการทดลอง

เพื่อติดตามเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนในซีรัมภายหลังหย่านมในแม่
ลิงกลุ่มที่ได้รับโบรโมคริปติน (# 107 และ # 201) และกลุ่มที่ไม่ได้รับโบรโมคริปติน (# 200,
1, # 4 และ # 5) โดยลิง # 1, # 4 และ # 5 คือแม่ลิงที่อยู่ในธรรมชาติภายหลังหย่านม
ใหม่ ๆ ที่เต้านมของลิงพวกนี้จะมีลักษณะ engorgement ทำการเจาะเลือดลิงเหล่านี้ในตอนเช้า
ของ D2 ของการหย่านมและในทุก ๆ 7 วันหลังจากนั้น (D2, 9, 16 ...) ถึง D30

รายละเอียดของลิงทดลองกลุ่มต่าง ๆ ได้สรุปในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ข้อมูลโดยสังเขปของแม่และลูกเลี้ยงที่ศึกษา

กลุ่มเลี้ยงที่ศึกษา	ช่วงเวลาที่ ตั้งครรภ์ (วัน)	วัน/เดือน/ปี คลอด	น้ำหนักตัว					
			เมื่อคลอดลูก		ระหว่างให้นมลูก		หย่านม D155	
			แม่เลี้ยง	ลูกเลี้ยง	D30	D44	แม่เลี้ยง	ลูกเลี้ยง
I. กลุ่มสมุทรสงคราม								
1) กลุ่มควบคุม								
# 99	167	23/5/2533	7.5	0.295	7.3	7.5	-	-
# 800	173	18/7/2533	6.1	0.300	6.0	6.0	-	-
# 61	175	28/7/2533	7.0	0.331	6.5	6.5	-	-
2) กลุ่มให้โปรโมคริปติน (D30 - D44)								
# 615	168	23/1/2534	6.7	0.369	6.5	6.5	-	-
# 107	175	19/6/2534	6.0	0.305	5.5	5.3	5.2	0.850
II. กลุ่มปราจีนบุรี								
1) กลุ่มควบคุม								
# 200	-	18/7/2534	4.0	0.295	3.8	3.7	3.8	1.095
2) กลุ่มให้โปรโมคริปติน (D30 - D44)								
# 201	-	28/6/2534	4.0	0.263	3.3	3.5	3.0	0.774
III. กลุ่มเขาสูง*								
# 1	-	-	-	-	-	-	3.7	-
# 4	-	-	-	-	-	-	5.6	-
# 5	-	-	-	-	-	-	4.5	-

* อยู่ตามธรรมชาติ ได้มาเมื่อหย่านมลูกแล้ว

3.5 การตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนในซีรัมโดยวิธี RIA

3.5.1 PRL, Total T₄, T₄ อิสระ และ Total T₃ ดำเนินการตามวิธีการของ Diagnostic Products Corporation (1988)

3.5.2 TSH ดำเนินการตามวิธีการของ Incstar Corporation (1990)

3.6 การประเมินผลวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน

ดำเนินการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ความแม่นยำ (precision) ความถูกต้อง (accuracy) ความไว (sensitivity) และ parallelism check ดังนี้

3.6.1 ความจำเพาะ

ตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ใช้ศึกษาว่าสามารถเกิดปฏิกิริยากับสารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับฮอร์โมน หรือกับสารที่มีปริมาณมาก ๆ ในสารตัวอย่างที่นำมาทำการศึกษาได้มากนักน้อยเพียงใด โดยทำ Cross reactivity (ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับสารอื่น) ระหว่างแอนติบอดีที่ใช้กับสารที่นำมาทดสอบแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยว (binding) และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ Cross reactivity ที่ระดับเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยว 50 % ดังสมการ

$$\% \text{ Cross reaction} = \frac{b}{a} \times 100$$

a = ปริมาณความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด ที่ทดสอบจากกราฟมาตรฐานของสารนั้นที่ระดับการเกาะเกี่ยว 50 %

b = ปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมน (ในสารตัวอย่าง) ที่ต้องการศึกษา จากกราฟมาตรฐานของฮอร์โมนนั้นที่ระดับการเกาะเกี่ยว 50 %

3.6.1.1 ความจำเพาะของ PRL, Total T₄, T₄ อิสระ และ Total T₃ ดำเนินการตาม Diagnostic Products Corporation (1988)

3.6.1.2 ความจำเพาะของ TSH ดำเนินการตาม Incstar Corporation (1990)

3.6.2 ความแม่นยำ

ค่าความแม่นยำในการตรวจวัดครั้งเดียวกัน (intra-assay) และค่าความแม่นยำในการตรวจวัดแต่ละครั้ง (interassay) นำสารควบคุมคุณภาพ (pooled serum) 3 ระดับ

คือค่าสูง ค่าปกติ และค่าต่ำ มาตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมนในสารตัวอย่าง ทำอย่างน้อย 10 ซ้ำ เพื่อหาความแม่นยำในการตรวจวัดครั้งเดียวกัน และทำ 2 ซ้ำในแต่ละครั้งที่ทำการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมน เพื่อนำมาคำนวณหาค่าความแม่นยำในการตรวจวัดแต่ละครั้ง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (% CV) แสดงในตารางที่ 3-7

ตารางที่ 3 แสดงความแม่นยำของการตรวจวัดปริมาณ TSH

การตรวจวัดครั้งเดียวกัน

สารควบคุมคุณภาพ	จำนวนซ้ำ	ค่าเฉลี่ย (u IU/ml)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	% CV
ระดับสูง	10	16.478	1.52	9.22
ระดับปกติ	10	2.384	0.34	14.26
ระดับต่ำ	10	2.775	0.39	14.05

การตรวจวัดแต่ละครั้ง

สารควบคุมคุณภาพ	จำนวนซ้ำ	ค่าเฉลี่ย (u IU/ml)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	% CV
ระดับสูง	2	17.018	0.76	4.47
ระดับปกติ	2	2.388	0.27	11.30
ระดับต่ำ	2	2.834	0.34	12.00

ตารางที่ 4 แสดงความแม่นยำของการตรวจวัดปริมาณ T₄

การตรวจวัดครั้งเดียวกัน

สารควบคุมคุณภาพ	จำนวนซ้ำ	ค่าเฉลี่ย (ug/dl)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	% CV
ระดับสูง	10	15.588	1.50	9.62
ระดับปกติ	10	7.636	0.49	4.62
ระดับต่ำ	10	1.758	0.21	11.95

การตรวจวัดแต่ละครั้ง

สารควบคุมคุณภาพ	จำนวนซ้ำ	ค่าเฉลี่ย (ug/dl)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	% CV
ระดับสูง	5	15.34	0.69	4.50
ระดับปกติ	5	7.09	0.52	7.34
ระดับต่ำ	5	1.98	0.14	7.06

ตารางที่ 5 แสดงความแม่นยำของการตรวจวัดปริมาณ T₂

การตรวจวัดครั้งเดียวกัน

สารควบคุมคุณภาพ	จำนวนซ้ำ	ค่าเฉลี่ย (ng/dl)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	% CV
ระดับสูง	10	337.29	17.47	5.18
ระดับปกติ	10	149.43	7.78	5.21
ระดับต่ำ	10	79.91	7.16	8.96

การตรวจวัดแต่ละครั้ง

สารควบคุมคุณภาพ	จำนวนซ้ำ	ค่าเฉลี่ย (ng/dl)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	% CV
ระดับสูง	8	316.05	13.68	4.33
ระดับปกติ	8	151.60	8.05	5.31
ระดับต่ำ	8	81.97	8.98	10.95

ตารางที่ 6 แสดงความแม่นยำของการตรวจวัดปริมาณ FT₄

การตรวจวัดครั้งเดียวกัน

สารควบคุมคุณภาพ	จำนวนซ้ำ	ค่าเฉลี่ย (ug/dl)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	% CV
ระดับสูง	10	5.06	0.54	10.67
ระดับปกติ	10	1.05	0.03	2.95
ระดับต่ำ	10	0.23	0.03	12.28

การตรวจวัดแต่ละครั้ง

สารควบคุมคุณภาพ	จำนวนซ้ำ	ค่าเฉลี่ย (ug/dl)	ส่วนเบี่ยงเบน	% CV
ระดับสูง	4	5.06	0.23	4.55
ระดับปกติ	4	1.11	0.07	6.30
ระดับต่ำ	4	0.25	0.03	12.24

ตารางที่ 7 แสดงความแม่นยำของการตรวจวัดปริมาณ PRL

การตรวจวัดครั้งเดียวกัน

สารควบคุมคุณภาพ	จำนวนซ้ำ	ค่าเฉลี่ย (mIU/L)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	% CV
ระดับสูง	10	2082.44	172.90	8.30
ระดับปกติ	10	354.55	19.32	5.45
ระดับต่ำ	10	108.57	10.58	9.75

การตรวจวัดแต่ละครั้ง

สารควบคุมคุณภาพ	จำนวนซ้ำ	ค่าเฉลี่ย (mIU/L)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	% CV
ระดับสูง	8	2161.21	174.39	8.07
ระดับปกติ	8	338.73	18.78	5.54
ระดับต่ำ	8	105.82	13.8	13.04

3.6.3 ความไวของการตรวจวัด

ความสามารถในการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมนจากสารตัวอย่างได้ค่าน้อยที่สุดและ แยกจากค่าศูนย์อย่างมีนัยสำคัญ โดยกำหนดจากค่าปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ระดับการเกาะ เกี่ยว 95 % จากกราฟมาตรฐานที่ตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมนความเข้มข้นศูนย์ (blank) ซ้ำกัน อย่างน้อย 10 ครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 3

ตารางที่ 8 แสดงความไวของการตรวจวัด TSH, T_4 , T_3 , fT_4 และ PRL

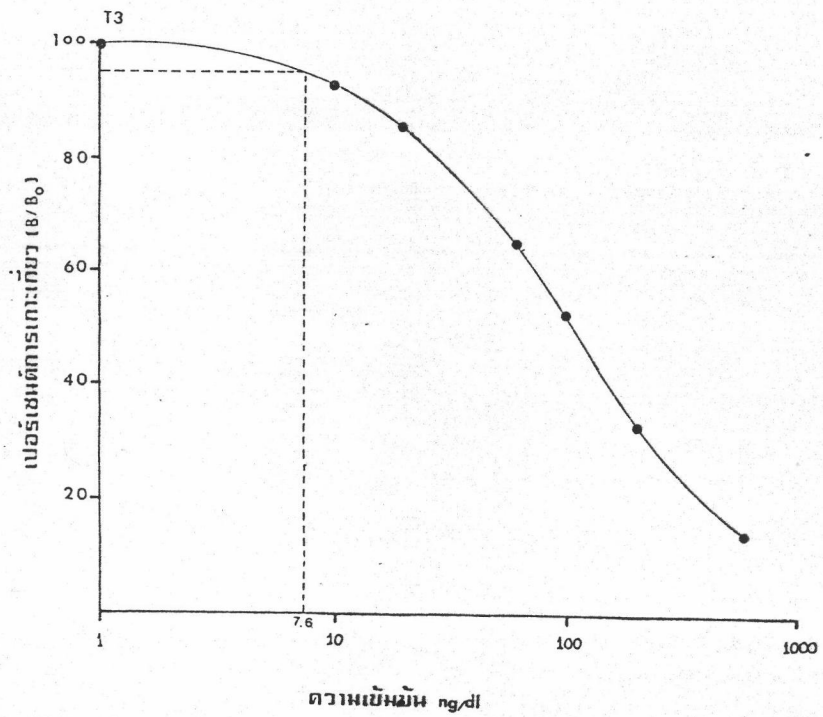
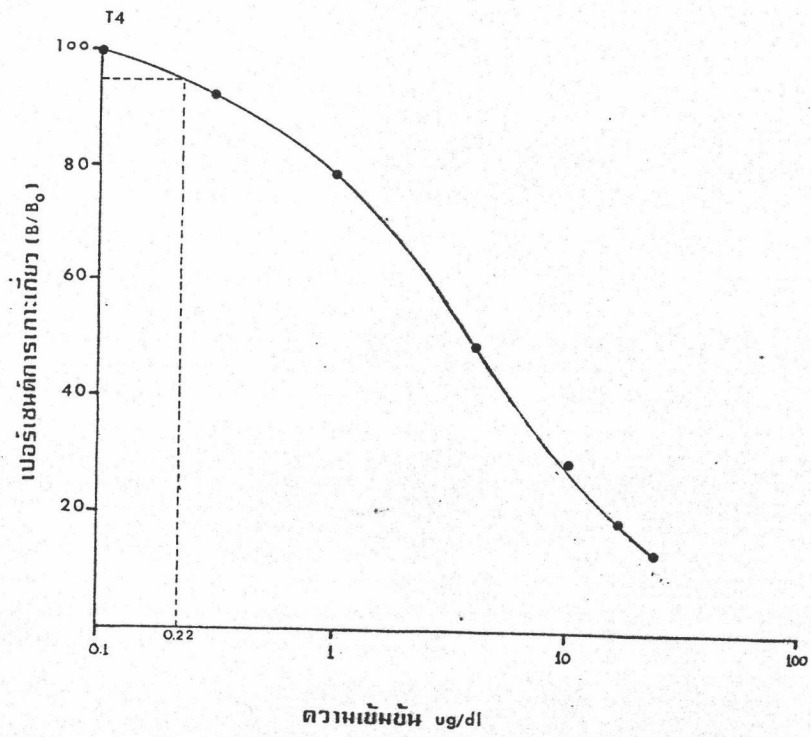
ฮอร์โมน	ความไวของการตรวจวัด
TSH	0.48 uIU/ml
T_4	0.22 ug/dl
T_3	7.6 ng/dl
fT_4	0.017 ug/dl
PRL	14.7 mIU/L

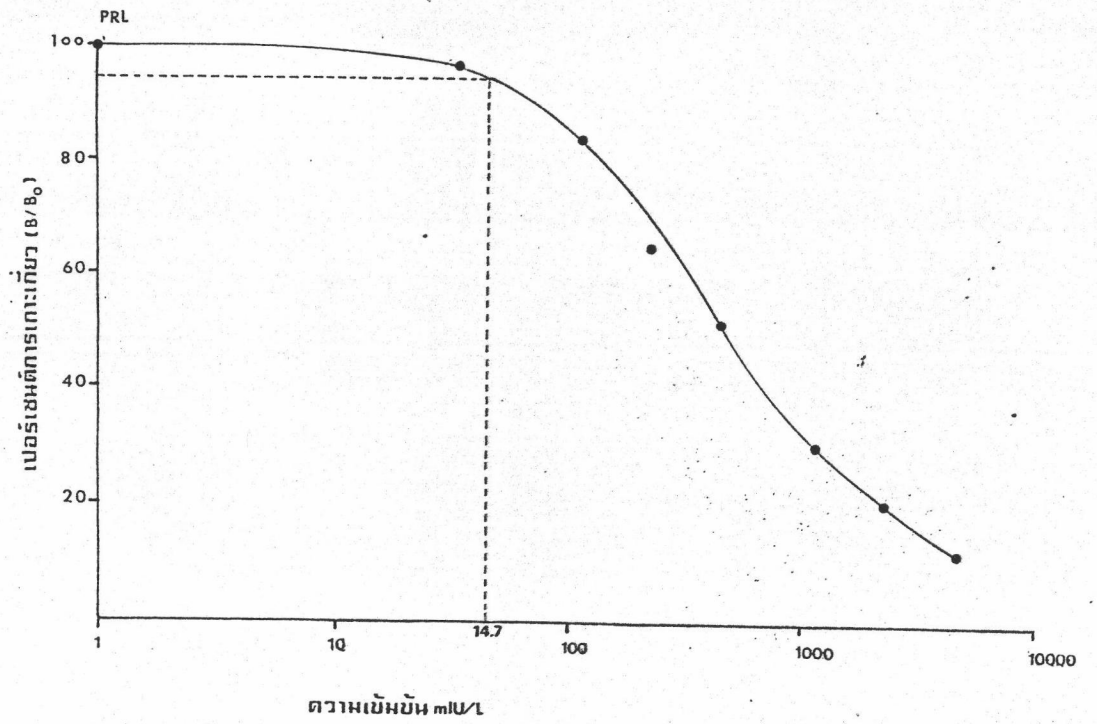
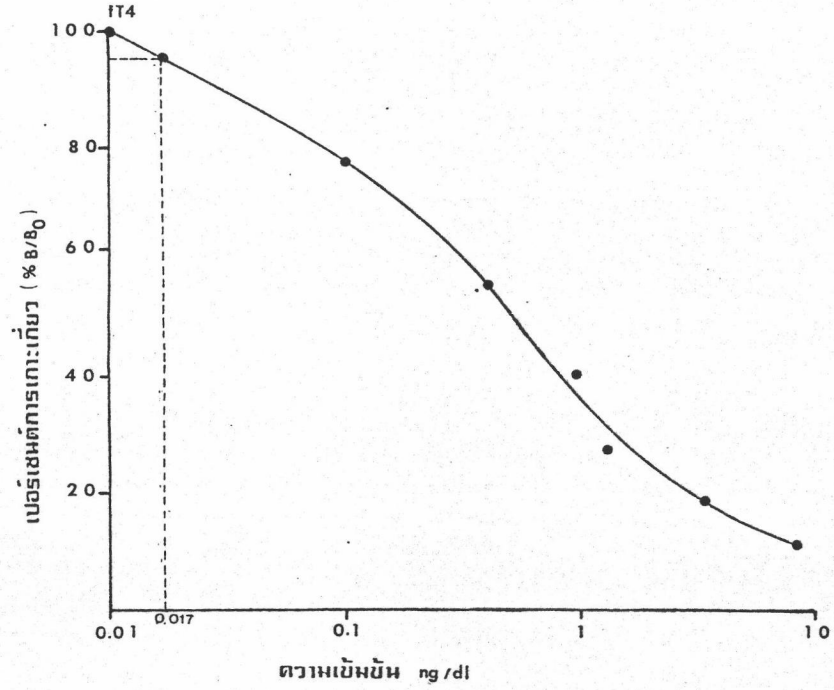
3.6.4 ความถูกต้อง

ตารางที่ 13-16 แสดงความสามารถในการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมนจากสารตัวอย่างได้ใกล้เคียงกับค่าจริงมากที่สุด โดยใช้สารมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนเติมลงในสารตัวอย่างที่ทราบค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนแน่นอนแล้วไปผ่านการตรวจวัดพร้อมสารกับ สารตัวอย่าง แล้วเปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นที่ได้กับปริมาณความเข้มข้นจริงที่ทราบ คำนวณค่า ความถูกต้องจากสูตร

$$\% \text{ ความถูกต้อง} = \frac{\text{ค่าฮอร์โมนที่วัดได้}}{\text{ค่าฮอร์โมนที่ใส่ลงไปจริง}} \times 100$$

รูปที่ 3 แสดงความไวในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน T₄, T₃, fT₄ และ PRL





ตารางที่ 9 แสดงความถูกต้องในการตรวจวัด T_4

ความเข้มข้นของ ฮอร์โมนไทรอยด์ มาตรฐาน (ug/dl)	ความเข้มข้นของ ฮอร์โมนไทรอยด์ ตัวอย่าง (ug/dl)	ค่าจริง	ค่าจากการ ตรวจวัด	% ความถูกต้อง
0.00	3.818	3.818	3.674	96.23
5.00	3.818	8.818	8.560	97.07
12.00	3.818	15.818	15.901	100.52

ตารางที่ 10 แสดงความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณ T_3

ความเข้มข้นของ ฮอร์โมนไทรอยด์ มาตรฐาน (ng/dl)	ความเข้มข้นของ ฮอร์โมนไทรอยด์ ตัวอย่าง (ng/dl)	ค่าจริง	ค่าจากการ ตรวจวัด	% ความถูกต้อง
0.00	74.713	74.713	67.009	89.69
25.00	74.713	99.713	112.185	112.50
100.00	74.713	174.713	172.931	98.98
300.00	74.713	374.713	370.823	98.96

ตารางที่ 11 แสดงความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณ FT₄

ความเข้มข้นของ ฮอร์โมนในสาร มาตรฐาน (ug/dl)	ความเข้มข้นของ ฮอร์โมนในสาร ตัวอย่าง (ug/dl)	ค่าจริง	ค่าจากการ ตรวจวัด	% ความถูกต้อง
0.0	0.526	0.526	0.536	98.1
0.9	0.526	1.426	1.375	103.7
1.9	0.526	2.426	2.335	103.9
4.1	0.526	4.626	4.631	99.9

ตารางที่ 12 แสดงความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณ PRL

ความเข้มข้นของ ฮอร์โมนในสาร มาตรฐาน (mIU/L)	ความเข้มข้นของ ฮอร์โมนในสาร ตัวอย่าง (mIU/L)	ค่าจริง	ค่าจากการ ตรวจวัด	% ความถูกต้อง
0.00	269.053	269.053	285.155	105.98
57.50	269.053	326.553	325.990	99.53
575.00	269.053	844.053	862.624	102.20
2300.00	269.053	2569.053	2702.986	105.20

3.6.5 pararellism check

ในการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมน โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ เป็นการเปรียบเทียบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในสารมาตรฐานกับสารตัวอย่าง ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบ immunochemical reaction ระหว่างสารมาตรฐานและสารตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาได้เหมือนกันหรือไม่ แล้วเขียนกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวกับความเข้มข้นของสารที่ระดับต่าง ๆ ถ้าหากสารมาตรฐานและสารตัวอย่างมี immunochemical reaction เหมือนกัน กราฟที่ได้จะขนานกัน (pararell) หรือซ้อนทับกัน (รูปที่ 4)

รูปที่ 4 เปรียบเทียบ immunochemical identity ระหว่างสารละลายมาตรฐาน fT_4 , T_4 , T_3 และ PRL ตามลำดับ ในซีรัมของลิงทางยาว

