การวัดปริมาณเอสตราไดออล-17 บีตา ในซีรั่มของสตรีไทยปกติ ด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

นาย สมัย ลีพิพัฒน์ไพบูลย์

005335

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

แผนกวิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2518

I 17814212

Radioimmunoassay of Estradiol - 17β in Normal Thai Women Serum

Mr. Samai Leepipatpaiboon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1975

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์ ..... ประธานกรรมการ
..... กรรมการ
..... กรรมการ

อาจารย์ผู้ควบคุมการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์วิชัย โปษยะจินดา

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การวัดปริมาณเอสตราไดออล–17 บีตาในซีรั่มของสตรีไทยปกติด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์
ชื่อ นายสมัย ลีพิพัฒน์ไพบูลย์
แผนกวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2518

หอสมุดกลาง

บทคัดย่อ

การวัดปริมาณเอสโตรเจน นิยมใช้วิธีทางเคมีวัดจากปัสสาวะ 24 ชม. วิธีนี้มีข้อเสียหลายประการ เช่น ปัญหาในการเก็บปัสสาวะ 24 ชม. วิธีการวัดมีความจำเพาะไม่เพียงพอ และความไวในการวัดก็ไม่สูงพอสำหรับวัดความเข้มข้นของเอสตราไดออล–17 บีตา (E_2) ในสตรีที่ไม่ตั้งครรภ์ เนื่องจากวิธีการนี้วัดปริมาณเมตาโบไลท์ของเอสโตรเจนจึงทำให้ไม่ทราบอัตราการสังเคราะห์เอสโตรเจน การวัดปริมาณเอสโตรเจนโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์นี้ อาศัยคุณสมบัติเฉพาะของแอนติบอดี ทำให้การวัดมีความจำเพาะเพิ่มขึ้นและความไวในการวัดก็สูงพอที่จะวัดปริมาณ E_2 ในหนึ่งมิลลิลิตรของซีรั่ม (น้ำเหลือง) สตรีที่ไม่ตั้งครรภ์

วิธีการหาปริมาณ E_2 ในน้ำเหลืองของสตรีไทยปกติ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Abraham และคณะ (1971) และได้ศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวัด ซึ่งสรุปได้ดังนี้

ปฏิกิริยาการจับตัวระหว่าง E_2 มาตรฐานกับแอนติบอดี จะสูงสุดเมื่อปฏิกิริยาเกิดที่ 4°ซ

การแยกสเตอรอยด์อิสระออกจาก bound complex ด้วยผงถ่าน ควรทำที่อุณหภูมิ 0°ซ หรือ 4°ซ และการแตกตัวของ bound complex จะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิและเวลา

การทำ E_2 ให้บริสุทธิ์โดยใช้ celite microcolumn สะดวกและง่ายในทางปฏิบัติ นอกจากนี้ยังให้ resolution ในการแยกสูง

ความแม่นยำในการวัด ได้จากการวัดค่าความเข้มข้นของ E_2 ที่ทราบค่าแล้ว 2 ระดับ คือ ที่ความเข้มข้น 100 พิโคกรัม/มล. และ 500 พิโคกรัม/มล. ผลปรากฏว่า coefficient of variation ของ intraassay มีค่า 16.4% และ 9.5% ตามลำดับ และ interassay ค่า coefficient of variation เฉลี่ย 17%

ความถูกต้องในการวัดซึ่งทดสอบจากการวัดปริมาณ E_2 มาตรฐานที่เติมลงในน้ำเหลืองของผู้ชาย ผลที่ได้พบว่า recovery เฉลี่ย 84.8%

ระดับ E_2 ในสตรีไทยปกติจำนวน 6 ราย ซึ่งมีอายุระหว่าง 16 – 32 ปี ใน follicular phase มีค่าระหว่าง 25 – 226 พิโคกรัม/มล. (ค่าเฉลี่ย 87 พิโคกรัม/มล.) ในช่วงกลางรอบเดือนมีค่าระหว่าง 177 – 552 พิโคกรัม/มล. (ค่าเฉลี่ย 431 พิโคกรัม/มล.) และใน midluteal phase มีค่าระหว่าง 77 – 326 พิโคกรัม/มล. (ค่าเฉลี่ย 254 พิโคกรัม/มล.) ระดับความเข้มข้นและรูปลักษณะของ E_2 ที่ได้จากการวิจัยนี้สอดคล้องกับการวิจัยที่พบในสตรีตะวันตก ซึ่งได้มีรายงานมาแล้ว

Thesis Title:	Radioimmunoassay of Estradiol-17β in Normal Thai Women Serum.
Name:	Mr. Samai Leepipatpaiboon
Department:	Biochemistry
Academic Year:	1975

Abstract

Estrogens have been measured in 24 hours urine by chemical method, which has many inherent drawbacks such as problems in collecting 24 hours urine, lack of specificity and the sensitivity is not sufficient for measuring the estradiol-17β (E_2) concentration in nonpregnant women. Since the method measures metabolites of the estrogens, the rate of production can not be estimated. The recently developed radioimmunoassay method for estrogens applying highly specific antiserum has successfully overcome all these problems and equips with high degree of sensitivity which enable E_2 to be measured from one millilitre of nonpregnant serum.

Radioimmunoassay method for E_2 developed after those of Abraham et al (1971) was used to determine the pattern of E_2 in normal Thai women. Factors which influence the intrinsic potentialities of E_2 radioimmunoassay were also studied. The summarised results are as followed.

The bound moiety of the reaction between standard E_2 and the antisera used was high at incubation temperature of $4^{\circ}C$.

Charcoal separation of free and bound fractions should be performed at either $0^{\circ}C$ or $4^{\circ}C$ and dissociation of the bound fraction during separation appears to increase with temperature and time.

Purification of E_2 after ether extraction by celite microcolumn was shown to be comparatively simple. Good resolution could be achieved by varying the organic eluants.

Precision established by assaying known concentration of E_2 in low concentration pool serum (100 pg/ml) and high concentration pool serum (500 pg/ml) yielded coefficient of variations of 16.4% and 9.5% respectively for intraassay statistics. The mean coefficient of variation for inter-assay statistic was 17%.

The accuracy of the method performed by assaying male serum supplimented with standard E_2 had an average recovery of 84.8%.

The E_2 levels in six normal Thai women, age range 16-32 years, were between 25-226 pg/ml (mean 87 pg/ml), 177-552 pg/ml (mean 431 pg/ml) and 77-325 pg/ml (mean 254 pg/ml)

during follicular phase, midcycle and midluteal phase respectively. The pattern and levels of E_2 are in accordance with those of caucasian subjects reported in other literatures.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้ ซึ่งได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

รองศาสตราจารย์ ดร. กำจัด มงคลกุล

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิชัย โปษยะจินดา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ นิกร ดุสิตสิน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ประมวล วีรุตมเสน

อาจารย์นายแพทย์ เทพ หิมะทองคำ

อาจารย์ ดร. วราพรรณ ด่านอุตรา

อาจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์

คุณ รัตนา สินธุภัค

คุณ เย็นจิต ลุวีระ

คุณ มานพ โรจนวุฒนนท์

คุณ ประเสริฐ ปานซ้าย

คุณ นภาพร คงถาวร

เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการตึกนวมินทราชินี ชั้นที่ 2 แผนกสูติศาสตร์– นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เจ้าหน้าที่โครงการร่วมระหว่างภูมิภาคเกี่ยวกับอุปกรณ์การคุมกำเนิดขององค์การอนามัยโลก แผนกสูติศาสตร์ –นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยนี้

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฌ

รายการตารางประกอบ ..... ฎ

รายการภาพประกอบ ..... ฐ

บทนำ 1

วัสดุและวิธีทำการวิจัย

- สารเคมีและเครื่องมือ 14
- การเก็บสารตัวอย่าง และการเตรียมสาร 16
- วิธีทำการทดลอง 20
- การวัดปริมาณ E_2 21
- การคำนวณ 23

ผลการวิจัย

- การหาความเข้มข้นของแอนติบอดี 26
- การหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา 28
- อิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อปฏิกิริยาการจับตัวของแอนติบอดี - กับแอนติเจน 29
- การหาปริมาณผงถ่านที่เหมาะสมสำหรับแยก F ออกจาก B 31
- การทดลองแยก F ออกจาก B โดยใช้ผงถ่านจากบริษัท Serva และ Matheson Coleman & Bell 34
- อิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาที่มีต่อการดูดซับของผงถ่าน 36
- การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมหลังจากเติมผงถ่านลงในหลอดทำปฏิกิริยา 38
- เสถียรภาพของสารติดฉลากรังสี E_2 40

หน้า

- ความจำเพาะของแอนติบอดี 42
- การหา resolution ของ celite column 48
- การเปรียบเทียบ Immunological identity ของสารที่สกัดได้จากน้ำเหลืองสตรีตั้งครรภ์กับสารมาตรฐาน E_2 50
- ความแม่นยำในการวัด 53
- ความถูกต้องในการวัด และการเปรียบเทียบผลของการใช้แอนติบอดี 2 ชนิด หาปริมาณ E_2 57
- ระดับปริมาณ E_2 ในสตรีไทยปกติ 61

วิจารณ์ผลของการวิจัย 70

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 78

บรรณานุกรม 80

ภาคผนวก 95

ประวัติการศึกษา 97

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	Cross reaction ของสเตอรอยด์กับแอนติบอดี (A # 0012)	45
2	Cross reaction ของสเตอรอยด์กับแอนติบอดี (S 52 # 5)	46
3	Resolution ของ celite column	49
4 A	ความแม่นยำในการวัดปริมาณ E_2 ในเวลาเดียวกัน	55
4 B	ความแม่นยำในการวัดปริมาณ E_2 ในเวลาเดียวกันครั้งที่ 2 ...	55
4 C	แสดงการคำนวณหาค่า percent difference	56
5	วัดปริมาณ E_2 หลังจากผ่าน celite column	59
6	วัดปริมาณ E_2 โดยไม่ผ่าน celite column	60
7	เปรียบเทียบ E_2 ในน้ำเหลืองสตรีที่ปกติ	63

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของสเตอรอยด์	2
2	การสังเคราะห์ E_1 และ E_2 ในรังไข่	5
3	เมตาโบลิสมของเอสโตรเจน	6
4	การสกัด E_2 จากน้ำเหลืองด้วยอีเทอร์ และการทำให้ E_2 บริสุทธิ์ก่อนวัดด้วยวิธี RIA	22
5	แสดงปฏิกิริยาการตอบสนองของความเข้มข้นแอนติบอดี ต่อ $^3H - E_2$	27
6	แสดงอิทธิพลของเวลาที่มีต่อปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับแอนติเจน	28
7	แสดงอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับแอนติเจน ..	29
8	ความเข้มข้นของสารละลายผงถ่านที่มีต่อการดูดซับฮอร์โมนอิสระ ..	33
9	แสดงการดูดซับของผงถ่านต่างบริษัท	35
10	อิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อการดูดซับของผงถ่าน	37
11	อิทธิพลของเวลาที่มีต่อการดูดซับของผงถ่าน	38
12	เสถียรภาพของสารติดสลากรังสี E_2	41
13	ความจำเพาะของแอนติบอดี ($A^{\#}$ 0012)	43
14	ความจำเพาะของแอนติบอดี	44
15	แสดง Immunological identity ของสารที่สกัดจาก – น้ำเหลืองแล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย celite column เทียบกับสารมาตรฐาน E_2 (Ab - E_2 ใช้ S – 52 $^{\#}$ 5)	51
16	แสดง Immunological identity ของสารที่สกัดได้จาก – น้ำเหลือง โดยไม่ผ่าน column เทียบกับสารมาตรฐาน E_2 (Ab - E_2 ใช้ $A^{\#}$ 0012)	52

รูปที่		หน้า
17	ระดับโปรเจสเตอโรนและ E_2 ในน้ำเหลืองอาสาสมัครรายที่ 1	64
18	ระดับโปรเจสเตอโรนและ E_2 ในน้ำเหลืองอาสาสมัครรายที่ 2	65
19	ระดับโปรเจสเตอโรนและ E_2 ในน้ำเหลืองอาสาสมัครรายที่ 3	66
20	ระดับโปรเจสเตอโรนและ E_2 ในน้ำเหลืองอาสาสมัครรายที่ 4	67
21	ระดับโปรเจสเตอโรนและ E_2 ในน้ำเหลืองอาสาสมัครรายที่ 5	68
22	ระดับโปรเจสเตอโรนและ E_2 ในน้ำเหลืองอาสาสมัครรายที่ 6	69
23	ระดับโปรเจสเตอโรน E_2 และ LH ในน้ำเหลืองของสตรีไทยปกติ จำนวน 19 ราย	96