หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. แฟคเตอร์ต่าง ๆ ที่มีผลต่อกราฟมาตรฐาน

ก. ปริมาณของ Fuller's earth

ปริมาณ Fuller's earth ที่เลือกใช้คือ 12 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นปริมาณน้อยที่สุดที่สามารถแยก free - cortisol ในน้ำและใน 20 % พลาสม่า โดยมีความแตกต่างกันมากที่สุด ในการทดลองเมื่อเพิ่มปริมาณ Fuller's earth ได้ทำให้กราฟมาตรฐานแบนไม่เหมาะที่จะใช้สำหรับวัดปริมาณ คอร์ติซอล เพราะเกิด stripping effect คือปริมาณ Fuller's earth ที่เพิ่มมากขึ้นจะไป absorb bound cortisol ไว้ในทางตรงกันข้ามเมื่อลดปริมาณ Fuller's earth ลง กราฟมาตรฐานจะชัน ซึ่งเป็นการเพิ่ม sensitivity ของกราฟมาตรฐาน ยิ่งกราฟมาตรฐานชันมาก sensitivity ก็จะสูงมากตามไปด้วย จากการทดลองนี้พบว่า กราฟมาตรฐานที่มี sensitivity สูง จะมี % recovery สูงในช่วงแคบกว่ากราฟมาตรฐานที่มี sensitivity ต่ำกว่า

ข. อุณหภูมิที่ใช้ในการอินคิวเบท

เนื่องจาก transcortin หรือ CBG เป็นโปรตีน เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น activity จะลดลง ในการทดลองเมื่อเพิ่มอุณหภูมิความสามารถของ CBG ที่จะเกาะกับคอร์ติซอล ลดลง (Murphy, 1967) จึงทำให้กราฟมาตรฐานแบน การควบคุมอุณหภูมิให้คงที่มีความสำคัญมากในการทดลองนี้

ค. เวลาที่ใช้ในการอินคิวเบท

เปรียบเทียบกราฟมาตรฐานที่ใช้เวลาในการอินคิวเบทต่าง ๆ กัน คือ 10, 15, 20 และ 30 นาที พบว่าไม่แตกต่างกัน เวลา 10 นาทีเป็นเวลาที่สั้นที่สุดในการทดลองชุดนี้ ที่ทำให้เกิดสภาวะสมดุลย์

ง. ปริมาณของพลาสม่า ใน CBG

โปรตีนในพลาสม่าประกอบด้วย albumin และ globulin โดยมีปริมาณ albumin สูงกว่า globulin ประมาณ 2 เท่า (Orten และ Neuhaus, 1970) globulin

มี affinity สูงต่อคอร์ติซอลในขณะที่ albumin สามารถเกาะกับคอร์ติซอลได้เล็กน้อย เมื่อเพิ่มปริมาณของพลาสม่าใน CBG กราฟมาตรฐานจึงแบน

2. Reliability ของวิธีทดลอง

ก. ความแม่นยำของวิธีทดลอง (Precision)

การทดลองนี้มีความแม่นยำทั้ง within assay และ between assay สูง

ข. %Recovery

Beardwell et al (1968) และ Murphy (1968) ได้ทำการทดลองวัดปริมาณคอร์ติซอลในปัสสาวะโดยวิธี CPB มี % recovery ของกราฟมาตรฐาน = 85 และ 96 ตามลำดับ Florelli et al (1972) ใช้วิธี CPBวัดปริมาณคอร์ติซอลในพลาสม่า มี % extraction recovery ของพลาสม่า = 98.5 ±2 และปัสสาวะ = 93.2 ±5 ในการทดลองนี้มี % extraction recovery ของพลาสม่า = 98.74 ± 0.59 และปัสสาวะ= 98.60 ±0.42 %recovery ของกราฟมาตรฐานในการวัดคอร์ติซอลในพลาสม่า =96.69 และในปัสสาวะ = 102.12 จะเห็นว่า % recovery ของวิธีทดลองนี้สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของคนอื่น

ค. Specificity

specificity ของวิธีทดลองนี้ขึ้นกับการ binding ของ CBG กับสารอื่น ถ้าสารอื่น polar มาก CBG จะ bindได้ดียิ่งขึ้น (Eisenstein, 1967) นั่นคือ specificity ของวิธีนี้ขึ้นกับสูตรโครงสร้างของสารอื่น ในการทดลองนี้พบว่า การ binding ของ CBG กับสารอื่นไม่ได้ขึ้นกับ polarity ของสารอื่นอย่างเดียวแต่เกี่ยวกับ steric hindrance ด้วย เช่นในผลการทดลองกับ เพรดนิโซโลน และ เดกซาเมซาโซน

CPB เป็นวิธีวัดปริมาณคอร์ติซอลในพลาสม่าที่ใช้พลาสม่าปริมาณน้อย (0.1 ml) และทำได้รวดเร็ว เหมาะสมที่จะใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ แต่มีข้อควรระวัง คือวิธีนี้สามารถวัดปริมาณสเตียรอยด์ฮอร์โมน บางตัว เช่น คอร์ติโคสเตียโรน และโปรเจสเตียโรน ได้ และฮอร์โมนสังเคราะห์ที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคอร์ติซอล เช่น เพรดนิโซโลน และ เพรดนิโซน ดังนั้น ในคนไข้

ซึ่งได้รับฮอร์โมนสังเคราะห์ดังกล่าว เมื่อใช้วิธีนี้วัดปริมาณคอร์ติซอลในพลาสม่า จึงได้ผลที่ไม่ถูกต้อง

3. ปริมาณคอร์ติซอลในพลาสม่า เวลา 8 – 9 น. และ 15 – 16 น. และในปัสสาวะ24 ชม. ในคนปกติช่วงอายุต่าง ๆ

ไม่มีความแตกต่างของปริมาณคอร์ติซอลในผู้ชายและหญิง และในคนช่วงอายุต่าง ๆ รวมทั้งคนหนุ่มสาว (อายุ 15 – 45 ปี) และคนสูงอายุ (อายุ 56 – 75 ปี) เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Jensen et al (1971)

การวัดปริมาณคอร์ติซอลในพลาสม่าของคนไทยปกติ โดยวิธี CPB ซึ่งทำในการทดลองครั้งนี้ ได้ค่าต่ำกว่าวิธี Fluorometry ซึ่งทำโดย คุณไพเราะ จันทร์เจริญสุข (2514) ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะวิธี CPB มีความจำเพาะสูงกว่า และไม่มีการรบกวนจากสารเรืองแสงอื่น ๆ แต่เมื่อเปรียบเทียบการวัดปริมาณคอร์ติซอลในพลาสม่าโดยวิธี CPB กับวิธี RIA ปรากฏว่าได้ค่าใกล้เคียงกัน ดังผลการทดลองของ Farmer et al (1974) และจากผลการทดลองของคุณ เย็นจิต ลุวีระ ร.พ.จุฬาลงกรณ์ พบว่า การใช้ CBG ที่ได้จากพลาสม่าของสุนัข จะทำให้ accuracy ของวิธี CPB สูงขึ้น

ปริมาณคอร์ติซอลในพลาสม่า ซึ่งมีผู้ทำมาก่อนแล้ว ทั้งโดยวิธี CPB และวิธีอื่น ๆ รวมทั้งผลการทดลองที่ทำ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 11 หน้า 53 และได้แสดงปริมาณคอร์ติซอลในปัสสาวะที่วัดโดยวิธีต่าง ๆ ไว้ในตารางที่ 12 หน้า 55 ปริมาณคอร์ติซอลที่วัดในการทดลองนี้ และการทดลองของผู้อื่นโดยวิธี CPB พบว่า อยู่ในช่วงเดียวกัน และอยู่ในช่วงเดียวกันกับการทดลองโดยวิธีอื่นบางวิธี

free cortisol ในพลาสม่าเท่านั้นที่มี biological activity (Slaunwhite et al, 1962) และส่วนนี้จะถูกขับออกมาในปัสสาวะ (Biesel et al, 1964 a) ดังนั้น การวัดปริมาณคอร์ติซอลในปัสสาวะจึงมีประโยชน์ในด้านการตรวจสอบ biological activity ของคอร์ติซอลมากกว่าวิธีอื่น

ตารางที่ 11 ปริมาณปกติของคอร์ติซอลในพลาสม่า

reference	อายุ (ปี)	เพศ	จำนวน	ค่าปกติ (µg%)	วิธีทดลอง	หมายเหตุ
Peterson et al (1957)	–	–	20	15.00	fluorometry	–
Ely et al (1958)	–	–	20	10.90 ± 0.55	"	–
Steward et al (1961)	–	–	–	9.60 ± 2.70	"	–
Vermeulen et al (1964)	–	–	50	14.60 ± 3.70	"	–
Neilson et al (1967)	–	–	18	21.40 ± 5.60	"	7 น.
	–	–	18	13.00 ± 3.30	"	9 น.
Hvidberg et al (1968)	16–78	ชาย	48	11.71 ± 4.31	"	7.30 น.
	12–69	หญิง	33	13.01 ± 4.27	"	
	–	–	81	12.24 ± 4.34	"	ชายและหญิง
Dixon et al (1969)	–	–	36	11.00 ± 4.40	"	10–12 น.
	16–35	ชาย	50	11.90 ± 3.90	"	
ไพเราะ จันทร์เจริญสุข (2514)	16–33	หญิง	50	11.60 ± 3.60	"	7–10 น.
	36–64	ชาย	31	11.10 ± 2.50	"	
	36–58	หญิง	29	10.80 ± 3.0	"	
Coglan et al (1967)	–	–	25	11.80 ± 4.30	double isotope techmique	9–10 น.

reference	อายุ (ปี)	เพศ	จำนวน	ค่าปกติ (µg %)	วิธีทดลอง	หมายเหตุ
Brorson (1968)	–	–	29	10.27 ± 3.10	double isotope technique	ตอนเช้า
Fraser et al (1968)	–	–	7	9.80	"	–
Iturzaeta et al (1970)	–	–	20	11.70 ±3.40	"	ชายและหญิง
Jensen et al (1971)	14–59	หญิง	30	15.20 ±4.84	"	8 น.
	14–59	ชาย	51	14.70 ±4.64	"	8 น.
Florelli et al (1972)	–	–	14	13.80 ±1.46	PC & CPB	8 น.
Murphy	–	ชาย	12	15.20 ±5.10	CPB	9 น.
et al (1963)	–	หญิง	12	17.60 ±4.30	"	9 น.
Jeffery et al (1971)	–	–	39	11.71 ±1.50	"	ตอนเช้า
Héctor et al (1971)	–	–	–	9.87 ±3.15	"	9 – 10 น.
การทดลองนี้	15–75	ชาย	58	8.51 ±4.55	"	8 – 9 น.
	15–75	ชาย	58	2.94 ±2.10	"	15 – 16 น.
	15–75	หญิง	50	9.03 ±4.46	"	8 – 9 น.
	15–75	หญิง	49	2.78 ±1.88	"	15 – 16 น.

PC = paper chromatography

ตารางที่ 12 ปริมาณปกติของคอร์ติซอลในปัสสาวะ 24 ช.ม.

reference	อายุ (ปี)	เพศ	จำนวน	คอร์ติซอล µg/24-hr. urine	%recovery	วิธีทดลอง	หมายเหตุ
Ayres et al (1957)	–	ชาย	24	13–86	70	PC	–
Ross (1960)	–	ชาย	8	3–48	60	PC	–
Harris +	–	–	12	4–20	40–50	PC	–
Crane (1964)	–	–	13	35–98	–	PC	–
Espiner (1966)							
Pinsker et al (1968)	–	หญิง	10	48–89	–	PC	–
Crabbe' et al (1959)	–	ชาย	8	3–48		PC & colorimeter	–
Rosner et al (1963)	–	–	38	0–181	–	glass - fibre chromatography	ไม่มีความแตกต่างระหว่างเพศ
Linholm (1973)	19–39	ชาย	6	31–50	–	TLC	–
	22–61	หญิง	11	11–83	–	"	–
Hankin et al (1972)	–	หญิง	23	17–75	–	double isotope technique	–

TLC = thin layer chromatography

reference	อายุ (ปี)	เพศ	จำนวน	คอร์ติซอล µg/24-hr. urine	%recovery	วิธีทดลอง	หมายเหตุ
Pal et al (1965)	20–50	–	24	60–159.10	72.40	fluorometry	ชาย 12 คน หญิง 12 คน
Beardwell et al (1968)	–	–	24	0–145.50	85	CPB	–
Murphy (1968)	–	–	23	0–108	96	"	ไม่มีความแตกต่างระหว่างเพศ
การทดลองนี้	15–75	ชาย	51	0–141.75	102 .12	"	"
	15–75	หญิง	55	0–108.45			

4. diurnal variation ของคอร์ติซอล

Laidlaw et al (1954) พบว่า diurnal variation ของคอร์ติซอลไม่ได้เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม เช่น การนอนนาน ๆ หรือการทำงานกลางคืนและนอนเวลากลางวัน เป็นต้น

Pal et al (1965), Jeffery et al (1971) และ Rose et al (1972) ได้ทำการทดลองพบว่า ปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมาจะสูงสุดในตอนเช้า (6 – 9 น.) และ จะลดต่ำลงไปเรื่อย ๆ จนอาจจะเป็น 0 ในเวลาเที่ยงคืน ACTH ก็มี diurnal variation ขนานไปกับคอร์ติซอลเช่นกัน (Jensen et al, 1971)

ในการทดลองนี้ได้วัด ปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมา 8 – 9 น. กับ 15 – 16 น. พบว่า ในตอนเช้า ปริมาณคอร์ติซอลจะสูงและ ตอนบ่ายปริมาณคอร์ติซอลจะลดลง

Espiner et al (1965) ได้ทำการทดลองวัด ปริมาณคอร์ติซอลในปัสสาวะตอนกลางวัน = 49± 11.3 (S.D.) µg /12 ช.ม. และตอนกลางคืน = 27.6± 7.5 (S.D.) µg /12 ชม. มีความแตกต่างในตอนกลางวันกับตอนกลางคืน ($P < 0.001$) แม้ urine flow ในตอนกลางวันมากกว่ากลางคืน ปริมาณคอร์ติซอลที่แตกต่างกันนี้ไม่ได้เป็นเพราะอัตรา urine flow เพราะในการทดลองในคน 2 คน ที่มี urine flow ตอนกลางคืนสูงกว่ากลางวันก็ได้ผลเช่นเดียวกัน

ทดลองวัดปริมาณคอร์ติซอลในปัสสาวะทุก 2 ช.ม. จนครบ 24 ช.ม. พบว่าคอร์ติซอลจะมีปริมาณสูงสุดในตอนเช้า (6 – 9 น.) และต่ำจนเกือบเป็น 0 เมื่อเวลาเที่ยงคืน

5. ACTH stimulation test

ก. การให้ ACTH 25 units ทางกล้ามเนื้อ และวัดปริมาณคอร์ติซอลภายหลังการให้ ACTH

มีการวัดปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมา ภายหลังการให้ ACTH 25 units ในเวลาต่าง ๆ เช่น Steenberg et al (1961) วัดปริมาณคอร์ติซอลภายหลังให้ ACTH 8 ช.ม. ผลการทดลองพบว่า ปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมาก่อนให้ ACTH = 11.2 ± 5.2 µg % และ 8 ช.ม. หลังให้ ACTH = 18.4 – 78.4 µg %

Nugent et al (1963) วัดปริมาณคอร์ติซอลภายหลังให้ ACTH 25 units 6 ช.ม. ผลการทดลองพบว่าปริมาณคอร์ติซอลในพลาสม่า 6 ช.ม.หลังให้ ACTH = 40.40 ±6.00 µg%

การทดลองนี้วัดปริมาณคอร์ติซอลในพลาสม่า 1 ช.ม. หลังให้ ACTH 25 units ทางกล้ามเนื้อ ใช้ทดสอบ adrenal function ในคนที่ไม่มีเวลามากพอ หรือในคนไข้ฉุกเฉิน พบว่าปริมาณคอร์ติซอลในพลาสม่า เวลา 8 – 9 น. และ 14 – 16 น. ภายหลังจากการให้ ACTH 1 ช.ม. มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เพราะ ACTH 25 units ที่ให้สามารถ overcome ACTH ที่มีอยู่ภายในร่างกายก่อนแล้ว ดังนั้นไม่ว่าปริมาณคอร์ติซอลในพลาสม่าเดิมจะมีเท่าไร ปริมาณคอร์ติซอลในพลาสม่าภายหลังการกระตุ้นจะอยู่ในช่วงเดียวกัน

ข. คอร์ติซอลในปัสสาวะ 24 ช.ม. หลังให้ ACTH 25 units ทางเส้นเลือดดำเป็นเวลา 8 ช.ม. สูงขึ้นประมาณ 10 เท่า ของปริมาณคอร์ติซอลก่อนให้ ACTH เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Crabbé et al (1959), Ross et al (1960) และ Meikle et al (1969).