บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และการทดลอง

วัสดุ

สัตว์ทดลอง

ใช้สัตว์ทดลอง 2 ชนิด คือกบนา *(Rana tigerina)* และกบบูลฟรอก (*Rana catesbeiana*) เพศผู้โตเต็มวัย อายุ 12 - 18 เดือน อย่างละ 120 ตัว จากฟาร์มของโครงการขยายพันธุ์และการเพาะเลี้ยงกบ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยทราย ฯ จังหวัดเพชรบุรีเลี้ยงในบ่อคอนกรีตขนาด 2.0 x 2.5 เมตร สูง 1.2 เมตร ให้อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำ มีเปอร์เซ็นต์โปรตีนระหว่าง 28 - 35 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัว วันละ 2 ครั้ง เวลา 12.00 - 13.00 น. และ 17.00 - 18.00 น. และใช้น้ำจากเขื่อนเลี้ยง โดยมีการเปลี่ยนน้ำใหม่วันเว้นวัน

สารเคมี (สารเคมีที่ใช้เป็น AR grade ทั้งหมด)

charcoal reagent batch no. 22052	: WHO RIA reagent programme,Switzerland
dextran reagent batch no. 82 - 83 - S	: WHO RIA reagent programme,Switzerland
diethyl ether	: E.Merk, Germany
dioxane	: E.Merk, Germany
disodium hydrogen phosphate (anhydrous)	: E.Merk, Germany
ethanol (95 %)	: องค์การสุราสรรพสามิตร โรงงานสุราอยุธยา
gelatin	: Difco laboratories , USA
heparin (5000 U / ml)	: Leo , USA
hydrochloric acid	: E.Merk, Germany
POPOP (1,4 - bis [5 - phenyl - 2 oxazolyl] benzene; 2,2' - P - phenylene - bis [5 - phenyloxazole])	: Sigma chemical company , USA
PPO (2,5 - diphenyl oxazole)	: Sigma chemical company , USA
sodium chloride	: E.Merk, Germany
sodium dihydrogen phosphate (anhydrous)	: E.Merk, Germany

thimerosal : Sigma chemical company , USA

toluene : E.Merk, Germany

ฮอร์โมนและแอนติบอดี

testosterone antisera batch no. 81/F : WHO RIA reagent programme,Switzerland

testosterone standard (220 n mol / L)

batch no. 079810 : WHO RIA reagent programme,Switzerland

(1,2,6,7, ^{3} H) testosterone batch no. TRK 402 / 61 : WHO RIA reagent programme,Switzerland

อุปกรณ์

Beta liquid scintillation counter (model 1218 - 811) : Wallac , Finland

Dri - block heater (model DB - 3) : Tecam laboratory and industrial equipment , USA

Dubnoff incubator shaker (model 3575 - 1) : Labline instrument Inc. , USA

Dynac centrifuge : Clay - Adam , Bectom - Dickenson company , USA

guillotine

homogenizer (mannual , model 9825) : Pyrex , USA

magnetic stirror (model S - 18520) : Thermoline corporation , USA

micropipette (model 3130) : Eppendorf , Germany

(Pipette gun) : Clay - Adams , USA

(Pipette man M.81) : Gilson , France

pH meter (model 5985) : Cole - Parmer instrument equipment USA

refrigerated centrifuge (model PR - J) : International equipment company , USA

Vortex mixer (model M - 16715) : Thermolyne corporation , USA

การทดลอง

การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้กบนา และกบบูลฟรอกเพศผู้ อย่างละ 10 ตัวต่อเดือน เป็นเวลา 12 เดือนเริ่มตั้งแต่เดือนมกราคม ถึงเดือน ธันวาคม 2537 โดย นำกบนาและกบบูลฟรอก จากบ่อเลี้ยงที่จังหวัดเพชรบุรี มาพักฟื้นที่บ่อกบของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นเวลา 2 วัน ก่อนทำการทดลอง และจะเก็บตัวอย่างทุกวันอังคารที่ 2 ของเดือน

การเก็บพลาสมา

หลังจากชั่งน้ำหนักตัวแล้ว จะเก็บ trunk blood ด้วยวิธี decapitation ในช่วงเวลา 8.00 - 11.00 น. โดยใช้ heparinized tube หลังจากนั้นนำไปปั่น (centrifuge) 1500 X g ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วแยกชั้นพลาสมาออกมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเทสโทสเตอโรนด้วยวิธี RIA ต่อไป

การเก็บอัณฑะ

หลังจากเก็บ trunk blood แล้ว แยกอัณฑะออกมาชั่งน้ำหนักแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เช่นเดียกับพลาสมา จนกว่าจะนำมาสกัดหาปริมาณเทสโทสเตอโรนต่อไป

การสกัดเทสโทสเตอโรนจากอัณฑะ (testicular extraction)

ดัดแปลงมาจาก Singh-asa, Jenkin และ Thorburn (1982) ดังนี้ นำอัณฑะมาบดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลายของ 0.1 M HCl : 0.9% NaCl (2 : 5) ในอัตราส่วน อัณฑะ 1 มิลลิกรัม ต่อสารละลาย 4 มิลลิลิตร บดโดยใช้ manual homogenizer หลังจากนั้นนำอัณฑะที่บดแล้วมาปั่น 500 X g นาน 5 นาที นำ supernatant เก็บที่ อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเทสโทสเตอโรนด้วยวิธี RIA ต่อไป

การวิเคราะห์หาปริมาณเทสโทสเตอโรนด้วยวิธี RIA (จาก Sufi, Donaldson and Jeffcoate, 1986)

การเตรียมสารละลายสำหรับ RIA

1. buffer solution

สารเคมีที่ใช้มีดังนี้

disodium hydrogen phosphate (anhydrous)	11.6	กรัม
gelatin	1.0	กรัม
sodium chloride	8.8	กรัม
sodium dihydrogen phosphate (anhydrous)	2.35	กรัม
thiomersal	0.1	กรัม

ละลาย gelatin ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirror และอุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกระทั่งละลายเข้ากันดี ทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากนั้นค่อย ๆ เติมสารเคมีที่เหลือลงไปทีละอย่าง เมื่อละลายเข้ากันดีแล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณรวมเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร แล้ว นำไปปรับ pH ด้วย pH meter ให้ได้ pH อยู่ในช่วง 7.2 - 7.4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อายุใช้งาน 1 เดือน

2. charcoal suspension

สารเคมีที่ใช้มีดังนี้

buffer solution	100	มิลลิลิตร
charcoal reagent	0.625	กรัม
dextran reagent	0.0625	กรัม

ละลาย dextran ใน buffer solution หลังจากนั้นเติม charcoal ลงไป เขย่าอย่างแรงนาน 30 วินาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสตลอดระยะเวลาที่ใช้ อายุใช้งาน 1 เดือน

3. scintillation fluid

สารเคมีที่ใช้มีดังต่อไปนี้

dioxane	200	มิลลิลิตร
POPOP	0.35	กรัม
PPO	5.5	กรัม
toluene	1000	มิลลิลิตร

นำสารเคมีทั้งหมดผสมให้เข้ากัน ในขวดสีน้ำตาล กวนให้เข้ากันด้วย magnetic stirror ตั้งทิ้งไว้ให้ละลายเข้ากันดีอย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้

4. testosterone working tracer

จาก (1,2,6,7 ^{3}H) testosterone ซึ่งละลายอยู่ใน toluene : ethanol ในอัตราส่วน 9 : 1 เป็น testosterone stock tracer ที่มีความแรง 250 ไมโครคูรี ต่อ มิลลิลิตร นำมาเจือจางให้ได้ 100 นาโนคูรีต่อมิลลิลิตร โดยการนำ testosterone stock tracer ปริมาณ 100 ไมโครลิตร มาเป่าให้แห้งด้วย air compressor หลังจากนั้นเติม buffer solution 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer จะได้ testosterone stock tracer ที่มีความแรง 100 นาโนคูรี ต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

5. testosterone antisera

นำ testosterone antisera จาก WHO ซึ่งอยู่ในสภาพ ที่ถูกทำให้แห้ง (lyophilized) มาเติม buffer solution 10 มิลลิลิตร ต่อขวด เขย่าให้ละลายจนหมด จะได้ความเข้มข้น 1 : 210,000 เก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

6. testosterone standard

เตรียมจากสารมาตรฐาน เทสโทสเตอโรน ซึ่งมีความเข้มข้น 220 นาโนโมลต่อลิตร โดยนำสารมาตรฐาน เทสโทสเตอโรน ปริมาณ 100 ไมโครลิตร มาเติม buffer solution 10 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ แล้วนำไป incubate ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จะได้สารละลายเทสโทสเตอโรนที่มีความเข้มข้น 2.2 นาโนโมลต่อลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาเจือจางแบบอนุกรม (serial dilution) ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1,100 เฟมโตโมล ต่อ 500 ไมโครลิตร จนถึง 17 เฟมโตโมล ต่อ 500 ไมโครลิตร ดังตารางที่ 1 เพื่อใช้ทำกราฟของฮอร์โมนมาตรฐาน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงการเจือจางแบบอนุกรม ของสารละลายเทสโทสเตอโรนมาตรฐาน

ลำดับที่	สารละลายเทสโทสเตอโรนมาตรฐาน		buffer solution (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นที่ได้ (เฟมโตโมลต่อ 0.5 มิลลิลิตร)
	ความเข้มข้นที่ใช้	ปริมาตรที่ใช้ (มิลลิลิตร)		
1	stock solution	0.5	-	1100
2	ลำดับที่ 1	2.0	2.0	550
3	2	2.0	2.0	275
4	3	2.0	2.0	138
5	4	2.0	2.0	69
6	5	2.0	2.0	34
7	6	2.0	2.0	17

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสกัดเทสโทสเตอโรนจากพลาสมา ทำได้โดยเริ่มจากนำพลาสมา 250 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง (conical tube) ตัวอย่างละ 2 หลอด (duplicate) แล้วเติมอีเทอร์หลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer นานหลอดละ 1 นาที จากนั้นแยกชั้นอีเทอร์ออกจากชั้นพลาสมา โดยนำหลอดทดลองที่ใส่อยู่ใน test tube rack วางบนถาดที่ใส่น้ำแข็งแห้งผสมกับ 95 % ethanol ชั้นล่างของหลอดทดลอง ซึ่งเป็นพลาสมาจะแข็งตัว ส่วนชั้นบนจะเป็นฮอร์โมนซึ่งถูกสกัดออกมาอยู่ในชั้นของอีเทอร์ ซึ่งจะไม่แข็งตัว เทส่วนบนลงในหลอดทดลอง (assay tube) อีกชุดหนึ่ง แล้วนำหลอดทดลองชุดใหม่ ใส่ใน dri block heater ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนกว่าอีเทอร์จะระเหยไปหมด จึงนำหลอดทดลองดังกล่าวมาเติม buffer solution หลอดละ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วผสมให้เข้ากันอีกครั้ง นำหลอดทดลอง (assay tube) ทั้งหมดมาเติม testosterone working tracer และ testosterone antisera อย่างละ 100 ไมโครลิตร ดังรายละเอียดตารางที่ 2 หลังจากเติม tracer และ antisera แล้วเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวางในถาดน้ำแข็ง เติม charcoal suspension หลอดละ 200 ไมโครลิตร เขย่าด้วย vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ในถาดน้ำแข็งนาน 15 นาที charcoal จะจับเทสโทสเตอโรน ส่วนที่เป็น free form ไว้ ส่วน bound form จะยังคงละลายอยู่ใน buffer solution แยก free form จาก bound form โดยนำสารละลายที่ได้ไปปั่นให้ charcoal ตกตะกอน โดยใช้refrigerated centrifuge ปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2,000 รอบต่อนาที (rpm) นาน 15 นาที เท supernatant ที่มี bound form อยู่ ลงใน counting vial เติม scintillation fluid 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วย vortex mixer หลังจากนั้นนำไปวัดปริมาณรังสี ด้วยเครื่อง beta counter นาน 5 นาที ต่อ 1 vial

ในการทำ RIA ทุกครั้งจะทำกราฟมาตรฐาน (standart curve) โดยนำสารละลายมาตรฐานเทสโทสเตอโรน ที่ทำเจือจางแบบอนุกรมมาใส่หลอดทดลอง (assay tube) แต่ละความเข้มข้นใช้ 500 ไมโครลิตร ต่อ 1 หลอด โดยใช้ความเข้มข้นละ 3 หลอด (triplicate) หลังจากนั้นจึงเติม tracer และ antisera เช่นเดียวกับในหลอดตัวอย่าง

ตารางที่ 2 แสดงการเติมสารลงในหลอดทดลองต่าง ๆ

หลอดทดลอง	buffer solution (ไมโครลิตร)	tracer (ไมโครลิตร)	antisera (ไมโครลิตร)	**	charcoal suspension (ไมโครลิตร)
Tc	600	100	-		-
NSB	600	100	-		200
MB	500	100	100		200
สารละลายมาตรฐานเทสโทสเตอโรน	500	100	100		200
สารตัวอย่าง	500	100	100		200

** ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง

Tc = total count

NSB = non specific binding

MB = maximum binding

นำอัณฑะที่บดแล้ว (homogenized testis) มาสกัดเทสโทสเตอโรนโดย นำ supernatant ที่ได้จากการบดอัณฑะมาสกัดต่อด้วยอีเทอร์ โดยใช้อัตราส่วน supernatant 500 ไมโครลิตรต่ออีเทอร์ 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วย vortex mixer ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที 6 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 5 นาที แล้วนำไปปั่น 1,500 g นาน 5 นาทีหลังจากนั้นแยกชั้นอีเทอร์ออก โดยใช้น้ำแข็งแห้ง กับ 95 % ethanol แล้วนำไประเหยอีเทอร์ออกจนแห้ง เติม buffer solution และสารต่าง ๆ เช่นเดียวกับการสกัดเทสโทสเตอโรนจากพลาสมา

คำนวณผลจาก RIA โดย นำค่าปริมาณรังสีที่วัดได้ (count per minute , cpm) ของแต่ละ vial ซึ่งทำซ้ำกันอย่างน้อย 2 vial สำหรับสารละลายตัวอย่าง และ 3 vial สำหรับ Tc , NSB และสารละลายเทสโทสเตอโรนมาตรฐาน มาหาค่าเฉลี่ยแล้วหักออกด้วยค่า cpm เฉลี่ย ของ NSB ทุกตัวอย่าง ยกเว้น Tc หลังจากนั้นเขียนกราฟบน semi - logarithm ระหว่าง cpm เฉลี่ยของสารมาตรฐาน กับ log ความเข้มข้น ของฮอร์โมนมาตรฐาน ซึ่งกราฟดังกล่าวสามารถอ่านค่าปริมาณเทสโทสเตอโรนจากค่า cpm ของสารตัวอย่างได้

ความเชื่อถือได้ ของวิธีการที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณ เทสโทสเตอโรนประเมินได้จากความจำเพาะ (specificity) , ความแม่นยำ (precision) , ความถูกต้อง (accuracy) และ ความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) โดยยึดหลักการของ Ekins (1970) และ Abraham (1974) ดังนี้

ความจำเพาะ หมายถึง ความสามารถของแอนติบอดี ที่สามารถทำปฏิกิริยากับฮอร์โมนได้กี่เปอร์เซ็นต์ และ สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่น ๆ ที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์ได้มากน้อยเพียงใด ถ้าแอนติบอดีนั้นมีความจำเพาะสูงก็จะทำปฏิกิริยากับฮอร์โมนนั้นได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และจะไม่ทำปฏิกิริยากับฮอร์โมนอื่นที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งหาความจำเพาะของแอนติบอดีได้โดยการใช้แอนติบอดีนั้นทำปฏิกริยากับฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์ พร้อมกับฮอร์โมนอื่น ๆ ที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์ แล้วหาความจำเพาะของแอนติบอดี โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ cross reaction ดังนี้

$$\% \text{ cross reaction} = \frac{\text{ปริมาณสารมาตรฐานของสารที่จะวิเคราะห์ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้ 50 \%}}{\text{ปริมาณสารมาตรฐานที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี ที่ 50 \%}} \times 100$$

ตารางที่ 3 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเทสโทสเตอโรนที่ศึกษา และสารอื่นที่นำมาตรวจสอบ (จาก Sufi, Donaldson and Jeffcoate, 1986)

ฮอร์โมน	% cross reaction
testosterone	100
5 α dihydrotestosterone	14.0
△ 4 - androstinedione	0.8
cortisol	0.0001
5 α androstinediol	6.0
△ 5 - androstinediol	2.1

ความแม่นยำ เป็นการตรวจสอบความสามารถในการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนในสารตัวอย่างชนิดหนึ่งๆ ซ้ำๆ กันหลายๆ ครั้ง แล้วค่าที่ได้ใกล้เคียงกัน ค่าความแม่นยำในการตรวจวัดครั้งเดียวกัน (intra-assay) และค่าความแม่นยำในการตรวจวัดแต่ละครั้ง (inter-assay) ทำได้โดยการนำสารควบคุมคุณภาพ (pools plasma) 3 ระดับ คือ ค่าสูง ค่าปกติ และค่าต่ำ มาวัดหาปริมาณฮอร์โมนในสารตัวอย่าง ทำซ้ำอย่างน้อย 10 ครั้ง เพื่อหาความแม่นยำในการตรวจวัดครั้งเดียวกัน และทำซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละครั้งที่ทำการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมน เพื่อนำมาคำนวณหาค่าความแม่นยำในการตรวจวัดแต่ละครั้ง การแสดงค่าความแม่นยำ จะแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (% co-efficient of variance หรือ % CV) ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\% CV = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสาร (SD)}}{\text{มัชฌิมเลขคณิต (} \bar{X} \text{)}} \times 100$$

ตารางที่ 4 แสดงความแม่นยำของการตรวจวัดปริมาณเทสโทสเตอโรนในการตรวจวัดครั้งเดียว และการตรวจวัดในแต่ละครั้ง

สารควบคุมคุณภาพ	การตรวจวัดในครั้งเดียวกัน		การตรวจวัดในแต่ละครั้ง	
	$\bar{X} \pm SD$ (f mol /tube)	% CV	$\bar{X} \pm SD$ (f mol / tube)	%CV
ระดับสูง	825.25±41.32	5.01	-	-
ระดับปกติ	231.50±5.01	2.16	234.00±23.43	10.01
ระดับต่ำ	86.57±5.38	6.22	-	-

ความถูกต้อง เป็นการแสดงความสามารถในการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมนจากสารตัวอย่างได้ใกล้เคียงกับค่าจริงมากที่สุด โดยใช้สารมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนเติมลงในสารตัวอย่างที่ทราบค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนแน่นอน แล้วไปผ่านการตรวจวัดพร้อมกับสารตัวอย่าง แล้วเปรียบเทียบ ปริมาณความเข้มข้นที่ได้ กับปริมาณความเข้มข้นจริงที่ทราบ คำนวณค่าความถูกต้องจากสูตรดังนี้

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

ตารางที่ 5 แสดงค่าความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณเทสโทสเตอโรน

สารควบคุมคุณภาพ	ค่าจริง (f mol / tube)	ค่าจากการตรวจวัด (f mol / tube)	% ความถูกต้อง
ระดับสูง	825.00	748.87	90.77
ระดับกลาง	244.44	223.12	91.28
ระดับต่ำ	78.57	70.19	89.33

ประสิทธิภาพในการสกัด : เนื่องจากในการตรวจวัดเทสโทสเตอโรน จะต้องมีขั้นตอนการสกัดด้วยอีเทอร์ ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบความสามารถในการสกัดของอีเทอร์ที่ใช้ด้วย โดยทำไปพร้อมกับการตรวจวัดปริมาณของตัวอย่าง ทำได้โดยใช้พลาสมา 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 3 หลอด เพื่อหา recovery (recovery of assay , RCE) เติม tracer 50 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลอด ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเติมอีเทอร์หลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วย vortex mixer นาน 1 นาที นำหลอดทดลองทั้ง 3 หลอดแช่ในน้ำแข็งแห้งผสม 95 % ethanol เทส่วนที่เป็นอีเทอร์ลงในหลอดทดลองชุดใหม่ นำไปทำให้แห้งโดยใช้ dri block heater ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติม buffer solution 500 ไมโครลิตร ปั่นด้วย vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วปั่นอีกครั้ง ปิเปตสารละลายที่ได้ 250 ไมโครลิตร ลงใน counting vial เติม scintillation fluid 5 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดหาปริมาณรังสีด้วยเครื่อง beta counter นำ cpm ที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพในการสกัด (% RCE) ได้ดังนี้

$$\% \text{ RCE} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ย cpmของ RCE (recovery)} \times 2}{\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ TCR (total count of recovery)}} \times 100$$

โดยที่ total count of recovery หาได้จาก การเติม tracer 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละ counting vial ทำทั้งหมด 3 vial เติม buffer solution 650 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติม scintillation fluid 5 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดหาปริมาณรังสีด้วยเครื่อง beta counter

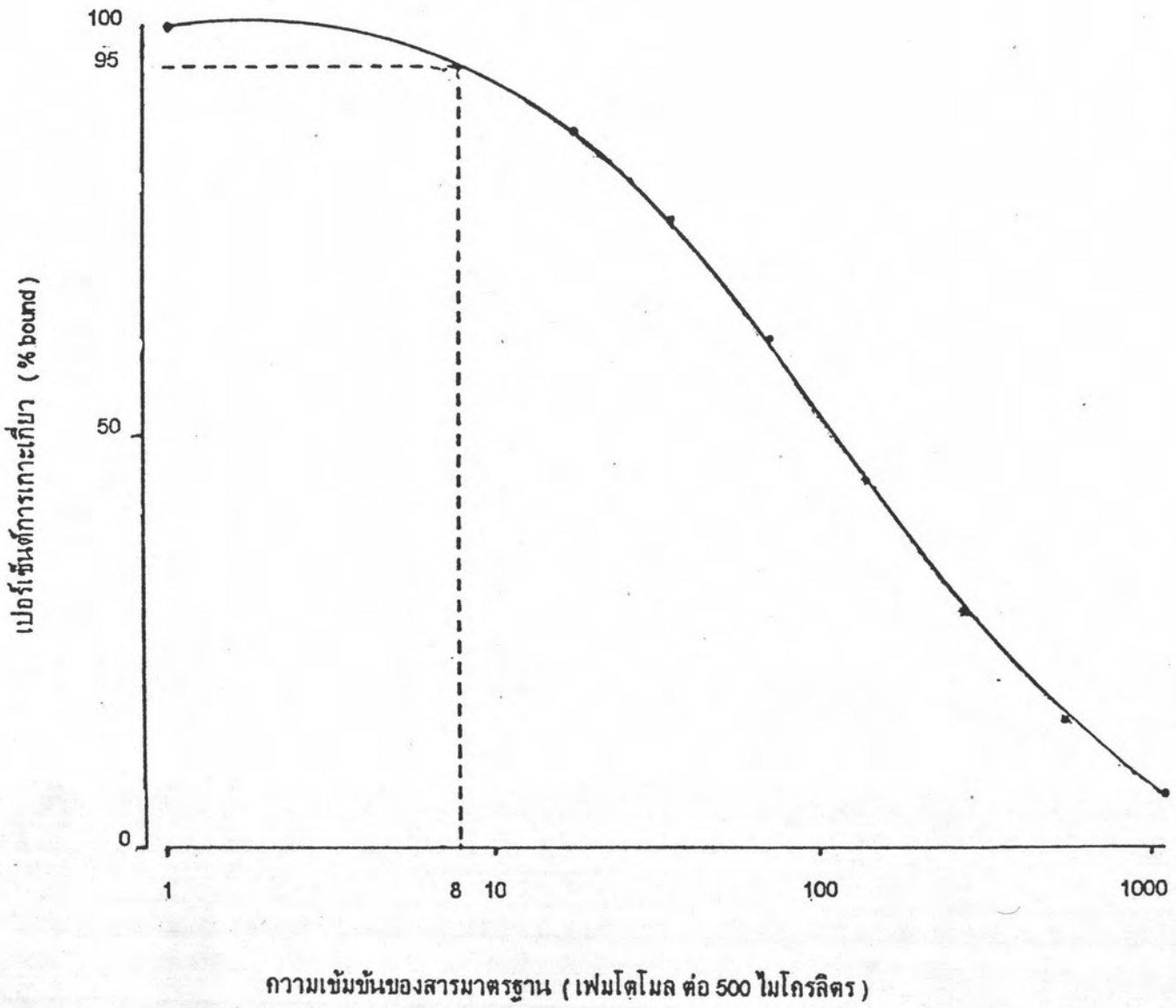
ประสิทธิภาพในการสกัด ของการตรวจวัดเทสโทสเตอโรน ในการศึกษาครั้งนี้ เท่ากับ 90.63 ± 5.09 %

ความไวของการวิเคราะห์ หมายถึงค่าที่น้อยที่สุดของสารที่วิธีการวิเคราะห์นั้นสามารถวัดได้ ซึ่งเป็นการแสดงความสามารถในการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมนจากสารมาตรฐาน ทำให้ได้ค่าที่น้อยที่สุดซึ่งสามารถแยกออกจากค่าศูนย์ได้อย่างมีนัยสำคัญ ทำได้โดยตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมนความเข้มข้นศูนย์ (blank) และสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเดียวกับความเข้มข้นที่นำมาทำกราฟมาตรฐาน โดยจะทำซ้ำ 10 ครั้ง และนำค่าเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้นทั้ง 10 ครั้งมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน semi logarithm โดยให้แกน X เป็นเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยว (% bound) และแกน Y คือ log ของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ซึ่งความเข้มข้นที่ระดับเปอร์เซ็นต์เกาะเกี่ยวเท่ากับ 95 จะเป็นความไวของการวิเคราะห์

เปอร์เซ็นการเกาะเกี่ยว หาได้จาก :-

$$\% \text{ bound} = \frac{\text{ค่า cpm เฉลี่ยของสารมาตรฐาน - NSB}}{\text{ค่า cpm เฉลี่ยของ MB - NSB}} \times 100$$

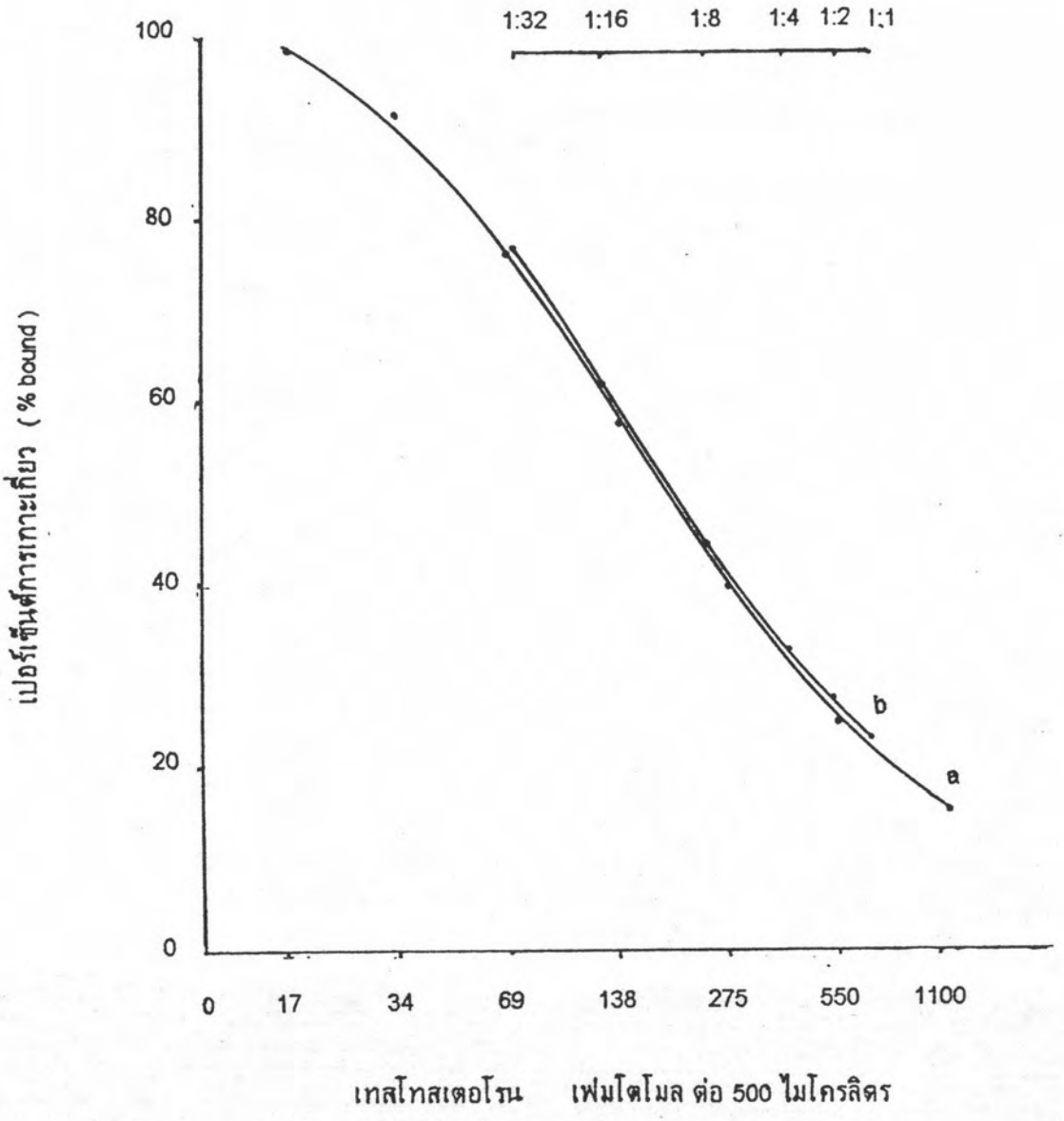
ค่าความไวของการวัดฮอร์โมนครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 8 เฟมโตโมล ต่อ 500 ไมโครลิตร หรือ 16 พิโกโมล ต่อลิตร (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 แสดงค่าความไวในการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน

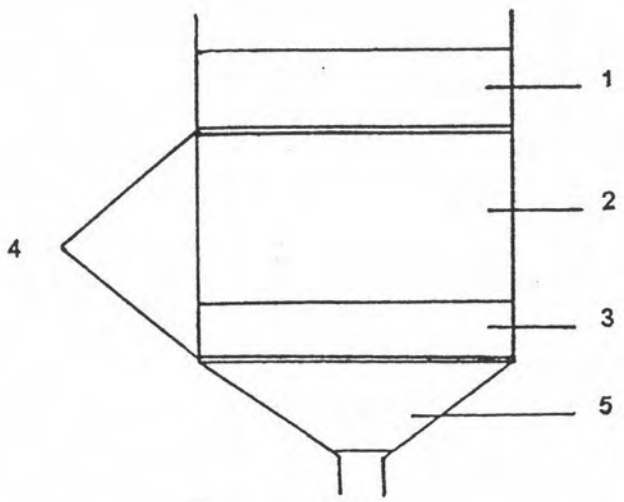
การหาปริมาณเทสโทสเตอโรนในพลาสมาของกบนาและกบบูลฟรอก ใช้ฮอร์โมนและแอนติบอดี ของ WHO ซึ่งทำไว้สำหรับใช้ในคน แต่ได้ทำการทดสอบว่าใช้กับพลาสมาของกบได้ โดยการทำ parallelism ดังนี้ :-

เนื่องจากการวัดปริมาณฮอร์โมนด้วยวิธี RIA เป็นการเปรียบเทียบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในสารตัวอย่าง ถ้าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในสารมาตรฐานกับสารตัวอย่างแตกต่างกันจะเป็นผลให้ความแม่นยำในการวัดไม่ดีซึ่งเป็นผลต่อเนื่องทำให้ความถูกต้องในการวัดไม่ดีด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้ซึ่งใช้ฮอร์โมนและแอนติบอดีที่ใช้ได้ดีในซีรัมคนนำมาใช้กับพลาสมาของกบ จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบ immunochemical reaction ซึ่งทำได้โดยวัดปริมาณฮอร์โมนในพลาสมากบที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (serial dilution) เทียบกับกราฟมาตรฐาน จะได้กราฟที่เขียนระหว่าง % bound กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ขนานกับกราฟที่เขียนขึ้นระหว่าง % bound กับ dilution ของพลาสมากบ ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดง parallelism ระหว่างสารละลายมาตรฐานเทสโทสเตอโรนของคน (a) กับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาของกบ (b)

พลาสมาของกบที่นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จะใช้พลาสมาที่ปราศจากฮอร์โมน (hormone free plasma) ของกบเป็นตัวเจือจาง ซึ่งเตรียมได้โดยดัดแปลงจากวิธีการของ North East Thames region Immunoassay unit (NETRIA) ดังนี้ ใช้พลาสมาของกบมารวมกัน (pool plasma) แล้วนำมากรองผ่านคอลัมน์ ซึ่งเตรียมโดยใช้ disposable syringe 50 มิลลิลิตร ดังรูปที่ 11



1. พลาสมากบ 50 มิลลิลิตร + ^{3}H - testosterone (2000 cpm ต่อ มิลลิลิตร)
2. ผงถ่าน + ซีไลท์ + น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร
3. ซีไลท์ 2 - 3 มิลลิลิตร
4. กระดาษกรอง
5. ใยแก้ว

รูปที่ 11 แสดงการเตรียมพลาสมาที่ปราศจากฮอร์โมน ตามวิธีของ NETRIA

ใช้ใยแก้ว (glass wool) แช่น้ำให้อ่อนตัว แล้วใส่ไว้ชั้นล่างสุดของคอลัมน์ปิดด้วยกระดาษกรอง (What man No. 4) จากนั้นใส่ ซีไลท์ (celite) ลงไป ประมาณ 2 - 3 มิลลิลิตร เกลี่ยให้เรียบ ผสมผงถ่าน (charcoal) ต่อ ซีไลท์ในอัตราส่วน 4 : 1 โดยใช้ผงถ่าน 4 กรัม ผสมกับซีไลท์ 2 กรัม โดยใส่น้ำกลั่น (distilled water) 20 มิลลิลิตร แล้วเทลงในคอลัมน์ หลังจากนั้นหล่อด้วยน้ำกลั่นอีก 5 มิลลิลิตร ปิดบริเวณผิวหน้าด้วยกระดาษกรอง เทน้ำกลั่นลงไปประมาณ 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้จนกระทั่งน้ำบริเวณผิวบนสุดหายไป ต้องระวังไม่ให้ผิวหน้าของคอลัมน์แห้ง เพราะจะทำให้คอลัมน์ที่ pack ไว้แตก หลังจากนั้นจึงใส่พลาสมาของกบ 50 มิลลิลิตร ซึ่งเติม ^{3}H - testosterone (2000 cpm ต่อมิลลิลิตร) รอจนปริมาณน้ำที่ไหลออกมาจากคอลัมน์มีปริมาณเท่าน้ำที่ใส่เข้าไปจึงทำการเก็บพลาสมาที่ทำให้ปราศจากฮอร์โมนแล้ว สามารถทดสอบความแตกต่างระหว่างน้ำกับพลาสมา โดยใช้เกลือแอมโมเนีย ($(NH_4)_2SO_4$) ซึ่งเป็นสารทดสอบโปรตีนหยดลงไป ถ้าสารที่หยดออกจากคอลัมน์เป็นพลาสมาก็จะทำปฏิกิริยากับสารนี้ได้ตะกอนขุ่นจึงเริ่มทำการเก็บพลาสมา ซึ่งตามวิธีของ NETRIA นี้สามารถกรอง endogenous hormone ออกได้อย่างน้อย 98 % ซึ่งจากการกรองครั้งนี้พบว่าสามารถกรองเทสโทสเตอโรนออกได้ 98.96 % หลังจากนั้นนำพลาสมาที่ปราศจากฮอร์โมนนี้ไปใช้ในการทำ serial dilution ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว (อ้างอิงจาก Malaivijitnond , 1994)

การแปลผลทางสถิติ

นำปริมาณเทสโทสเตอโรนในพลาสมา และในอัณฑะของกบนา และกบบูลฟรอก ที่วัดได้ในแต่ละเดือนมาหาค่าเฉลี่ยโดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ ฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว โดยที่ฤดูร้อนจะอยู่ในช่วงเดือนมีนาคม ถึงเดือนมิถุนายน (อุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 28.83 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยเท่ากับ 77.75 %) ฤดูฝนคือเดือนกรกฎาคม ถึงเดือนตุลาคม (อุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 27.95 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยเท่ากับ 77.75 %) และฤดูหนาวคือเดือนพฤศจิกายน ถึงเดือนกุมภาพันธ์ (อุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 28.83 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยเท่ากับ 74.25 %) หาความแตกต่างระหว่างกลุ่ม โดยใช้ student unpaired T - test ยอมรับค่าสถิติที่ $p < 0.05$ และ $p< 0.01$

หาค่าความสัมพันธ์ระหว่าง เทสโทสเตอโรนในพลาสมากับในอัณฑะ , เทสโทสเตอโรนในพลาสมากับ GSI % และ เทสโทสเตอโรนในอัณฑะกับ GSI % โดยใช้ค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient - r)

I16718744