บทที่ 2

การทดลอง สารเคมีและอุปกรณ์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัสดุอุปกรณ์ ขั้นตอน และวิธีดำเนินการวิจัย

1. <u>สารเคมี</u> ที่สำคัญได้แก่

สารเคมีใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ (Radioimmunoassay : RIA) ได้แก่

1) ฮอร์โมน

Progesterone Standard

Batch No. 81/J, WHO RIA Reagent Programme, Switzerland.

Estradiol Standard

Batch No. 81/J. WHO RIA Reagent Programme, Switzerland

2) แอนติซีรัม

Antiserum to Progesterone : Batch No. KO78910

Antiserum to Oestradiol : Batch No. K158310

WHO Reagent Programme, Switzerland.

Prolactin Double antibody with human serum Lot PRD1111

(PRD1) Diagnostic Productions Corporation, U.S.A.

3) สารติดสลากรังสี

^{3}H - Progesterone : Amersham International Plc, England.

^{3}H - Oestradiol : Amersham International, Plc, England.

tracer ^{125}I PRL DPC Prolactin kits, (PRD_2)

Diagnostic Productions Corporation, U.S.A.

4) สารละลายสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ สเตียรอยด์ ฮอร์โมน โดยวิธี RIA

- Charcoal reagent : WHO RIA Reagent Programme Switzerland
- Dextran reagent : WHO RIA reagent Programme Switzerland
- Dietyl ether $(C_2H_5)_2O$: E.Merk, Darmstadt, Germany

- Natrium dihydrogen phosphate-Monohydrated : ($NaH_2PO_4.H_2O$)
  E.Merck, Darmstadt, Germany.
- Disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4)
  BDH : Chemical Ltd. England.
- Sodium chloride (NaCl) : BDH Chemical Ltd., England.
- Thiomersal (merthiolate) : Sigma Chemical Company U.S.A.
- Gelatin : Difco laboratory, U.S.A.
- Toluene P.a. (C_7H_8) : E. Merck, Darmstadt, Germany.
- Art. 3115-1-4-Dioxane ($C_4H_8O_2$) ; E. Merck, Darmstadt, Germany.
- Art.2946 PPO (2,5 diphenyloxozol)($C_{15}H_{11}NO$) : E.Merck, Dramstadt, Germany.
- POPOP [1,4-bis (2-(5-phenyloxazol))]-Benzene, phenyloxazo. lyphenyloxazolyl phenyl anhydrous : Sigma Chemical Company, U.S.A.
- Ethanol (Absolute) : E.Merck, Darmstadt, Germany.
- Methanol (CH_3OH) : E.Merck, Darmstadt, Germany.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>ยาที่ใช้</u>

1. Morphine hydrochloride จากศูนย์วิจัยยาเสพติด สถาบันวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. Bromocriptine Sandoz Pharmaceutical Qucbec, Canada.

<u>อุปกรณ์</u>

1. Beta counter : Model 1218 Rack Beta LKB Wallac, Finland

2. Dri-Block Heater : Model DB-3, Tecam Laboratory and Industrial Equipment U.S.A.

3. Dunoff Incubator shaker : Model 3575-1, Lab-Line Instrument Inc., U.S.A.

4. Dynac Centrifuge : Clay Adams, Becton Dickinson and Company U.S.A.

5. Foam decanting rack-DPC, U.S.A.

6. Gamma counter : LKB Multigamma counter Model 1260 Multi gammaII, LKB Wallac, Finnland

7. Glucose Exactech, Blood Glucose Sensor : Meter Lot No:639, Medisense, Inc., Cambridge, U.S.A.

8. Exactech Blood Glucose Test Strips. Medisense, Inc. Cambridge, U.S.A.

9. Laminar flow

10. Magnetic Stirrer bars S-18520, Thermolyne Corporation Iowa, U.S.A.

11. Micropipette : 50, 100, 200 500 ไมโครลิตร
Nichiro Model 5000 Japan
Nichiro Model 8100
Eppendorff 3130 Germany,

12. Mixer : M-16715, Thermolyne Corporation Iowa, U.S.A.

13. Millipore filter

14. Millipore filter membrane 0.22 ไมครอน

15. Syring Turomo with needle 1 ml, 5 ml

16. pH meter : Corning pH meter 240 Cat No. 476530

17. Refrigerated Centrifuge : Model PR-J, International Equpipment Company, U.S.A.

18. เครื่องชั่งละเอียด : Right A Weight, W.M.

2. ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย

2.1 การคัดเลือกสิงทดลอง

เลือกสิงสูงอายุเพศเมียจากโคโลนีของหน่วยวิจัยไพรเมท คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีหลักฐานแน่นอนว่ามีอายุสูงกว่า 15 ปี ประกอบด้วยลิง 11 ตัว ที่ไม่เคยถูกตัดรังไข่ และ 5 ตัว ที่เคยตัดรังไข่มาแล้ว มีน้ำหนักตัว 3.3-8.4 กิโลกรัม (ตารางที่ 2.1)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิงแต่ละตัวเลี้ยงในกรงเดี่ยวทำด้วยเหล็กอาบสารกันสนิม ขนาดกว้าง 24 นิ้ว สูง 34 นิ้ว เรือนเลี้ยงกรุด้วยลวดตาข่ายและมุ้งลวด พร้อมทั้งพัดลมดูดอากาศ เพื่อทำให้อากาศถ่ายเทได้สะดวก อาหารเลี้ยงเป็นอาหารสำเร็จรูปของ บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหาร สัตว์ และเสริมด้วยกล้วย มันเทศ แตงกวา ไข่ต้ม ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เวลา 8.00 - 9.00 น. และ 14.00 - 15.00 น.

2.2 <u>การตรวจเลือดประจำเดือน</u>

ระหว่างที่ศึกษาจะมีการตรวจเลือดประจำเดือน (menstrual bleeding) จะทำโดยตรวจดูหยดเลือดในถาดตอนเช้าของทุก ๆ วัน ในกรณีที่สงสัยจะใช้ไม้พันสำลี (cotton bud) ป้ายที่บริเวณช่องคลอด (swab) โดยนับวันแรกที่เริ่มตรวจพบประจำเดือนเป็นวันที่หนึ่งของรอบประจำเดือนถัดไป การตรวจจะกระทำตลอดช่วงก่อนให้มอร์ฟีน ระหว่างให้มอร์ฟีน และหลังหยุดให้มอร์ฟีน 30-40 วัน

2.3 <u>การเจาะเลือด</u>

ลิงทุกตัวจะถูกเจาะเลือด ประมาณ 3-4 มล./ครั้ง ทางเส้นเลือดหน้าขา (femoral venipuncture) ช่วงเวลาประมาณ 8.00 - 9.00 น. นำเลือดที่เจาะได้ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนานประมาณ 1/2-1 ชม. แล้วไปแช่ตู้เย็นข้ามคืน เพื่อให้เลือดแข็งตัว จากนั้นจะนำไปปั่นด้วยอัตราเร็ว 2,800 รอบ/นาที นานประมาณ 20-30 นาที แยกเก็บซีรัมที่ได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20° C เพื่อนำไปตรวจสอบหาปริมาณฮอร์โมนต่อไป

2.4 <u>การเตรียมสารสำหรับฉีดในลิงทดลอง</u>

<u>มอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์</u>

เตรียมในสภาพปราศจากเชื้อ นำมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์จากศูนย์วิจัยยาเสพติด สถาบันวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้น 2.0 มก./0.5 มล. (Settheetham. Ph.D. thesis, 1992) เตรียมภายใน laminar flow กรองด้วย milipore filter membrane ขนาด 0.22 ไมครอน บรรจุในขวดปลอดเชื้อสีชา สารที่เตรียมจะใช้ภายใน 1 สัปดาห์

2.5 <u>การตรวจอาการน้ำนมไหล</u>

ลิงทุกตัวที่ศึกษาก่อนการทดลองไม่พบอาการน้ำนมไหล อาการน้ำนมไหลจะตรวจพบระหว่างให้มอร์ฟีน และหลังหยุดให้มอร์ฟีน วิธีการตรวจโดยทุกเช้า เวลา 08.00 - 10.00 น. จะทำการบีบบริเวณเต้านมทั้ง 2 ข้าง

2.6 การวิเคราะห์ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดลิงขณะอดอาหาร

ลิงทุกตัวจะดำเนินการตรวจหากลูโคสในเลือด ทุก 5 วัน ในวัน D_{11}, D_{16} และ D_{21} ของช่วงก่อนการทดลองในตอนเช้าก่อนให้อาหารช่วงเวลา 08.00 - 09.00 น. โดยนำเลือดประมาณ 1 หยด (100 ul) มาหยดลงบน glucose strip เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์ glucoseoxidase จะสามารถอ่านค่าที่ได้จาก blood glucose sensor ภายใน 30 วินาที (Exactech, Medisense, Inc., Cambridge, U.S.A.) และจะดำเนินการตรวจหาระดับกลูโคสในเลือดทุก ๆ 15 วัน ของช่วงทดลอง และหลังหยุดให้มอร์ฟีนโดยวิธีเดียวกับช่วงก่อนให้มอร์ฟีน

3. ขั้นตอนการดำเนินงาน

ลิงที่ศึกษา 16 ตัว เป็นลิงที่ตัดรังไข่ 5 ตัว ไม่ตัดรังไข่ 11 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มย่อย 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มควบคุมที่ 1 ฉีดมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ ระหว่าง D_1-D_{21} เข้าใต้ผิวหนังบริเวณก้น (Settheetham. Ph.D. Thesis, 1992) ประกอบด้วยลิงไม่ตัดรังไข่ 4 ตัว หมายเลข (11,27, 66 และ 70) และตัดรังไข่ 1 ตัว (31*)

กลุ่มทดลองที่ 2 ฉีดมอร์ฟีน ไฮโดรคลอไรด์ ระหว่าง D_1-D_{21} และให้กินโบรโมคริปตีน นาน 14 วัน ระหว่างให้มอร์ฟีน D_{40}-D_{53} ประกอบด้วยลิงไม่ตัดรังไข่ หมายเลข (3,51, 72 และ 80) และลิงตัดรังไข่ หมายเลข (6*)

กลุ่มทดลองที่ 3 ฉีดมอร์ฟีน ไฮโดรคลอไรด์ ระหว่าง D_1-D_{21} และให้กินโบรโมคริปตีนระหว่างให้มอร์ฟีน ไฮโดรคลอไรด์ D_{60}-D_{73} ประกอบด้วยลิงไม่ตัดรังไข่ หมายเลข (9, 67 และ 86) และลิงตัดรังไข่ หมายเลข (5* 14* และ 33*)

3.1 ช่วงก่อนให้มอร์ฟีน

เจาะเลือดในลิงที่ตรวจพบประจำเดือนเริ่ม (D_1) ของรอบประจำเดือน และทุก ๆ 5 วัดถัดไปของรอบประจำเดือน นั้นคือ วัน D_1, D_6, D_{11}, D_{16} และ D_{21} ในลิงที่ไม่พบประจำเดือนนานกว่า 60 วัน จะดำเนินการเจาะเลือดครั้งแรก (D_1) ตามกำหนดเวลาที่เหมาะสมและติดตามด้วย D_6, D_{11}, D_{16} ... ตามลำดับ (แผนภูมิที่ i) ตัวอย่างเลือดจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน PRL, E_2 และ P ในซีรัมโดยวิธี เรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ต่อไป

3.2 ระหว่างให้มอร์ฟีน

เริ่มฉีดมอร์ฟีน ไฮโดรคลอไรด์ 2 มก./กก./วัน เข้าใต้ผิวหนังในเช้าวันรุ่งขึ้น (D_{22} ของช่วงก่อนให้มอร์ฟีน = D_1 ของช่วงให้มอร์ฟีน) นาน 91 วัน เช้าของ D_2 (8.00-9.00 น.) และทุก ๆ 5 วัด ถัดมาจะทำการเจาะเลือดเพื่อนำไปวิเคราะห์หาฮอร์โมนดังเช่นที่ทำในช่วงก่อนให้มอร์ฟีน โดยในทุกรณีจะ เจาะ เลือดมาวิ เคราะห์ฮอร์โมนภายหลังที่ฉีดมอร์ฟีนไปแล้วนาน 24 ชั่วโมง (แผนภูมิที่ 1)

โบรโมคริปตีนที่ใช้ (Sandoz Ltd, Canada) ในวัน D_{40}-D_{53} ในกลุ่มสิงทดลองที่ 2 และวัน D_{60}-D_{73} ในกลุ่มสิงทดลองที่ 3 ให้กินโบรโมคริปตีน ขนาด 1.25 x 2 มก./วัน (8.00 และ 17.00 น.)

3.3 หลังหยุดให้มอร์ฟีน

หยุดให้มอร์ฟีน 1 วัน และเจาะเลือดในวันรุ่งขึ้นของการหยุดให้มอร์ฟีน 24 ชั่วโมง (D_1) และทำการเจาะเลือดทุก ๆ 5 วัน อย่างต่อเนื่อง จำนวน 5 ครั้ง คือ วัน D_1, D_6, D_{11}, D_{16} และ D_{21}

เพื่อวิเคราะห์หาระดับฮอร์โมน PRL, E_2, P วัดระดับกลูโคสในเลือดและทดสอบ glucose tolerance ของสิงกลุ่มต่าง ๆ เปรียบเทียบกับก่อนการให้มอร์ฟีนและระหว่างให้มอร์ฟีน

4. การวัดปริมาณฮอร์โมนในซีรัม

การหาปริมาณฮอร์โมน E_2, P และ PRL

4.1 การหาฮอร์โมนเพศ ทำโดยวิธี radio-immunoassays E_2, P ตามวิธีขององค์การอนามัยโลก (1986) เป็นวิธีที่ตรวจวิเคราะห์ sex steroids ในซีรัมได้ผลเที่ยงตรง (accuracy) และแม่นยำ (precision) มีความไวสูง (sensitivity) วิเคราะห์ได้เร็ว มีความจำเพาะเจาะจงสูง (specificity) การสกัดซีรัมเพื่อหาฮอร์โมน P และ E_2 ด้วยสารละลายอีเทอร์ทำให้แห้งแล้วนำมาเติมบัฟเฟอร์ และเติมแอนติบอดี (แอนติซีรัมของ E_2 หรือ P) จาก WHO และเติมฮอร์โมนติดสลากรังสีของ E_2 หรือ P (E_2-tracer), ^3H-E_2 หรือ ^3H-P) นำมาแยกฮอร์โมนอิสระจากฮอร์โมนที่จับกับแอนติซีรัมหรือฮอร์โมนติดสลาก โดยเติมผงถ่าน (WHO) หลังจาก incubation 18-24 ชม. เมื่อเติมผงถ่านในอุณหภูมิ 4° C แล้วนำไปปั่นแยก 2,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4° C นาน 15 นาที จึงนำส่วนที่จับกันของฮอร์โมนกับฮอร์โมนที่ติดสลาก เทใส่ใน counting vial เติม Scintillation fluid เขย่า และนำไปวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง beta-counter

นาน 5 นาที ต่อ vial

4.2 <u>การหาปริมาณฮอร์โมน PRL</u> ซึ่งเป็นโปรตีนฮอร์โมนโดยใช้ Commercial kit (Diagnostic Products Corporations, 1992) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้แอนติบอดี 2 ชั้น (double antibody) และใช้ calibrator เป็นซีรัมของมนุษย์

<u>วิธีทำ</u>

1. ติดฉลากบนหลอดเป็นเครื่องหมายต่าง ๆ ดังนี้ T (total counts) NSB (nonspecific binding), A (maximum binding) และ B ถึง G และหลอดที่จะใส่ตัวอย่างและคอนโทรลอย่างละ 2 หลอด

2. เติม Zero calibrator 100 ไมโครลิตร ลงในหลอด A และ NSB เติม calibrators ที่เหลืออย่างละ 100 ไมโครลิตรลงในหลอดที่เขียนเครื่องหมายไว้ตามลำดับ

3. เติม (^{125}I) prolactin 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทุกหลอดเขย่าให้เข้ากันเบา ๆ

4. เติม prolactin antiserum จำนวน 50 ไมโครลิตร ไปในหลอดทุกหลอด ยกเว้นหลอดที่มีเครื่องหมาย NSB และ T ผสมให้เข้ากัน

5. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 ชั่วโมง

6. เติม precipitating agent ที่แช่เย็นและผสมอย่างดีแล้ว จำนวน 500 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดทุกหลอดผสมให้เข้ากัน

7. ปั่นหลอดทุกหลอดที่ 3,000 xg นาน 15 นาที (ยกเว้นหลอด "T")

8. เทของเหลวใส่ในหลอดออก เหลือไว้แต่ตะกอน

9. นำเอาตะกอนในหลอดทั้งหมดไปวัดปริมาณกัมมันตภาพรังสี ในเครื่องวัดรังสีแกมม่า นานหลอดละ 1 นาที

4.3 <u>การทดสอบด้วยวิธีกลูโคสทอเลอรานซ์</u> (Glucose Tolerance Test-GTT) ของ WHO องค์การอนามัยโลก

กำหนดให้พลาสม่าหรือซีรั่มกลูโคสหลังอดอาหารค่อนคืน (10-16 ชม,. Fasting Blood Glucose (FBG), Fasting Serum Glucose (FSG) ในผู้ใหญ่ปกติไม่เกิน 140 มก.เปอร์เซนต์

OGTT (Oral Glucose Tolerance Test)

วิธีการทดสอบนี้มีความไวในการวินิจฉัยเบาหวาน ในรายที่ FBG ต่ำกว่า 140 มก. เปอร์เซ็นต์

วิธีทำ

1. เวลา : งดอาหารอย่างน้อย 10 ชม. แต่ไม่เกิน 16 ชม. ยกเว้นน้ำดื่ม ควรทำเวลาเช้า เพราะ glucose tolerance มี diurnal variation ดีที่สุดตอนเช้า

2. การให้กลูโคส : ให้ดื่มกลูโคส 7.5 ก. ในน้ำดื่ม 25-30 มล. ให้หมดใน เวลา 5 นาที โดยทำให้เป็นสารละลายกลูโคสไม่เกิน 25 เปอร์เซ็นต์ ก่อนดื่มให้หา FBG

3. การเจาะเลือด : ไม่รัดสายยาง หาพลาสม่ากลูโคสหลังดื่มกลูโคสแล้ว 2 ชม.

4. กลูโคสในเลือด : พลาสม่า หรือซีรั่มกลูโคสสูงกว่ากลูโคสในหลอดเลือดดำ รวม (venous-whole blood) ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ ในขณะอดอาหารกลูโคสในหลอดเลือดฝอยมีค่าเท่า ๆ กับกลูโคสในหลอดเลือดดำ แต่หลังได้กลูโคสไปแล้ว 1/2 ชม., 1 ชม. และ 2 ชม. กลูโคสในหลอดเลือดฝอยจะสูงกว่ากลูโคสในหลอดเลือดดำ 25, 40 และ 30 มก.เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ขั้นตอนในการศึกษาได้แสดงไว้ในแผนภูมิที่ 1

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์โดยใช้ paired t-test (student t-test) เพื่อเปรียบเทียบช่วง เวลาต่าง ๆ ที่ทำการทดลอง คือ ก่อนให้มอร์ฟีน, ระหว่างให้มอร์ฟีน และหลังหยุดให้มอร์ฟีน

ความสำคัญหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

1. ทราบข้อมูลพื้นฐานของระดับฮอร์โมน โปรแลคตินในซีรั่มของสิงเพศเมียสูงอายุ และการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนเมื่อได้รับมอร์ฟีนระยะยาว และการกลับคืนสภาพหลังหยุดให้มอร์ฟีน

2. ทราบศักยภาพในการสืบพันธุ์ของสิงเพศเมียสูงอายุ

3. ทราบความสามารถของสัตว์ทดลองสูงอายุเพศเมียในการปรับสมดุลของระดับน้ำตาลในเลือด ก่อนขณะที่ได้รับมอร์ฟีนและหลังได้รับมอร์ฟีน

ตารางที่ 2.1 ลิงเพศเมียสูงอายุที่ใช้ทดลอง

สถานะของลิงที่ทำการทดลอง	เบอร์ (วันที่ตัดรังไข่)	แหล่งกำเนิด	อายุเมื่อเริ่มศึกษา (พ.ศ.2535)	น้ำหนักตัวก่อนการทดลอง (เม.ย.35) (กิโลกรัม)	น้ำหนักตัวหลังการทดลอง (มี.ค.37) (กิโลกรัม)
1. ลิงที่ถูกตัดรังไข่มาก่อน	5(11/6/29)	ภาคใต้	22 ปี	4.5	4
	6(9/6/29)	ภาคใต้	22 ปี	4	5
	14(20/1/28)	ภาคใต้	22 ปี	5.2	5
	31(23/5/29)	ภาคใต้	22 ปี	4	4.5
	33(25/5/33)	แม่ตั้งครรภ์มาจากแม่สอด	17 ปี	3.5	4
2. ลิงที่ไม่เคยถูกตัดรังไข่	3	ภาคใต้	22 ปี	5.9	6.5
	9	ภาคใต้	22 ปี	3.9	3.5
	11	ภาคใต้	22 ปี	3.4	3
	27	ภาคเหนือ(แม่สอด)	20 ปี	4	3.5
	51	สมุทรสงคราม	19 ปี	5.4	5
	66	สมุทรสงคราม	20 ปี	5.9	4.5
	67	สมุทรสงคราม	20 ปี	5.7	6.5
	70	สมุทรสงคราม	15 ปี	8.4	8
	72	สมุทรสงคราม	19 ปี	6.4	6
	80	สมุทรสงคราม	20 ปี	3.3	4
	86	สมุทรสงคราม	20 ปี	6.5	7

<u>แผนภูมิที่ 1</u> แสดงขั้นตอนการทดลอง

กลุ่มที่ 1 ให้มอร์ฟีน 91 วัน

Pretreatment	Treatment	Post-treatment
21-60 วัน	91 วัน	21 วัน

*

กลุ่มที่ 2 ให้มอร์ฟีน 91 วัน + โปรโมคริปติน D_{40-53}

Pretreatment	Treatment	Post-treatment
21-60 วัน	91 วัน	21 วัน

*

โบรโมคริปติน D_{40}-D_{53}

กลุ่มที่ 3 ให้มอร์ฟีน 91 วัน + โปรโมคริปติน D_{60-73}

Pretreatment	Treatment	Post-treatment
21-60 วัน	91 วัน	21 วัน

*

โบรโมคริปติน D_{60}-D_{73}

การวิเคราะห์ระดับฮอร์โมน	D_1 และ ทุก ๆ 5 วัน	D_2 และทุก ๆ 5 วัน	D_1 และทุก ๆ 5 วัน
การวิเคราะห์ Blood Glucose	D_{11} และทุก ๆ 5 วัน	ทุก ๆ 15 วัน	ทุก ๆ 15 วัน

★ อาการแทรกซ้อน (น้ำนมไหล) อาจติดตามดูจนถึง 45-60 วัน