03/0043/32

นิพนธ์ต้นฉบับ

การผลิต anti-17 α-hydroxyprogesterone ในกระต่าย*

The production of anti-17 α-hydroxyprogesterone in rabbits

*สมัย ลีพิพัฒน์ไพบูลย์** ฉัตรพร อุษณาจิตต์**
กิตติศิลป์ ตระกูลช่าง*** สุทัศน์ กลกิจโกวินท์**

Abstract : **Smai Leepipatpaiboon, Chatporn Usanajitt, Kittisilp Trakulchang and Suthat Kolkijkovinda. 1989. The production of anti-17α-hydroxyprogesterone in rabbits. Thai J Hlth Resch 3 (2) : 91-99**

The study of the production of anti 17 α-hydroxyprogesterone was undertaken in three rabbits. The immunization program followed Chaudhuri and Coulson (1980). After 30 weeks of immunization the rabbits were sacrificed to collect antiserum. These antisera were assessed for the titre, affinity constant (Ka) and specificity. We found high titre from one rabbit (1 : 140,000) and the other two were equal titre (1 : 70,000). The values of Ka calculated from Scatchard plot were similar (Ka = 3.0×10^{-10}M). The specificity of these antisera were similarly by having a little cross react with progesterone and 17-hydroxypregnenolone. No cross reactivity with other related steroids. These antisera were applied to assay 17-OHP in serum before and after column chromatography. The result showed mean of the assay before and after column chromatography were not significantly different (paired t-tested, $p < 0.5$). This experiment indicated all of the anti-17 α-hydroxyprogesterone from this study are high specificity, which suitable for assay 17-OHP in serum without chromatography. One of these antisera was used for assay 17-OHP in serum of CAH children and all of them showed high level of 17-OHP than in normal children. Therefore this assay may be useful for paediatrician to investigate and follow up treatment CAH children.

* *โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*

This project received financial support from Rachadapiseksompoj Research Funds, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

** *ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330*

Department of Obstetrics & Gynaecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330.

*** *กองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย กทม. 10330*

Scientific Division, The Thai Red Cross Society, Bangkok 10330.

01/0043/32

บทคัดย่อ **สมัย ลีพิพัฒน์ไพบูลย์, ฉัตรพร อุษณาจิตต์, กิตติศิลป์ ตระกูลช่าง และสุทัศน์ กลกิจโกวินท์. 2532. การผลิต anti-17α-hydroxyprogesterone ในกระต่าย. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 3 (2) : 91-99**

Anti-17α-hydroxyprogesterone ได้จากกระต่าย 3 ตัว โดยการฉีด 17α-hydroxyprogesterone-3-(O-carboxymethyl)-oxime-BSA หลังจากฉีดกระตุ้นจนถึงสัปดาห์ที่ 30 ฆ่ากระต่ายเพื่อเก็บ antiserum และทำการประเมินคุณภาพ โดยการหา litre, affinity constant (Ka) และความจำเพาะในการทำปฏิกิริยา (specificity) ผลการประเมินคุณภาพพบว่ากระต่ายตัวที่หนึ่งมี titre สูงถึง 1 : 140,000 ส่วนกระต่ายที่เหลือ 2 ตัว มี titre เท่ากัน (1 : 70,000) Ka ของ antiserum คำนวณจาก Scatchard plot ได้ค่าใกล้เคียงกันทั้ง 3 ตัว ($Ka = 3.0 \times 10^{-10} M$) ความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาของ antisera จากกระต่าย 3 ตัวคล้ายคลึงกัน ทำปฏิกิริยากับโปรเจสเตอโรน และ 17α-hydroxypregnenolone เพียงเล็กน้อย และได้เปรียบเทียบการวิเคราะห์ 17-OHP ในน้ำเหลืองก่อนและหลัง column chromatography ผลปรากฏว่าค่าเฉลี่ยของ 17-OHP ในน้ำเหลืองทั้ง 2 วิธี ที่ใช้ antisera จากกระต่าย 3 ตัวเป็น binding agent ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (paired t-test, $p < 0.5$) แสดงให้เห็นว่า antiserum ที่ได้จากกระต่าย 3 ตัวนี้ มีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาสูง สามารถใช้วิเคราะห์ 17-OHP ในน้ำเหลืองได้ โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอน chromatography และเมื่อนำ antiserum นี้ไปประยุกต์ใช้ ในการวิเคราะห์ 17-OHP ในเด็กที่เป็นโรค congenital adrenal hyperplasia (CAH) พบว่าระดับ 17-OHP ในเด็กที่เป็นโรคนี้สูงกว่าเด็กปกติอย่างเห็นได้ชัด

บทนำ

Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติในการสังเคราะห์สเตียรอยด์ ซึ่งส่วนมากเกิดจากความบกพร่องของ enzyme 21-hydroxylase ทำให้ steroid precursors เช่น 17α-hydroxyprogesterone (17-OHP) เพิ่มมากกว่าปกติ (Hughes and Laurence, 1979) ดังนั้นการวัดปริมาณ 17-OHP ในน้ำเหลืองโดยวิธี RIA จะเป็นตัวบ่งชี้ภาวะความบกพร่องของ 21-hydroxylase ซึ่งดีกว่าวิธีการวัดปริมาณ 17-oxosteroids ในปัสสาวะ 24 ชม. ที่ทำมาตั้งแต่ ค.ศ. 1950 เพราะ 17-oxosteroids เป็นสาร metabolites ของ steroid มากกว่า 7 ชนิด ทำให้ไม่สามารถบ่งแยกระหว่าง adrenal hyperplasia กับ androgen producing adrenal tumors นอกจากนี้ การวัดปริมาณ 17-oxosteroid ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย cortisol จะผิดพลาดได้ เพราะ 30% ของ cortisol ที่ให้เข้าไปในร่างกายจะเปลี่ยนไปเป็น 17-oxosteroids ดังนั้นถ้าใช้การวัดปริมาณ 17-oxosteroids เพื่อติดตามการรักษา CAH จึงไม่เหมาะสม (Knorr *et al.*, 1983) 17-OHP ไม่เพียงแต่จะมีประโยชน์ในการ diagnosis CAH เท่านั้น ยังมีประโยชน์ในการติดตามการรักษาด้วย (Hughes *et al.*, 1979) การวิเคราะห์หาปริมาณ 17-OHP โดยวิธี RIA ถ้าใช้ reagent kit มีราคาแพง เพราะปริมาณการใช้วิเคราะห์ 17-OHP ยังไม่แพร่หลาย และเมื่อศึกษาการผลิต anti-17α-hydroxyprogesterone จาก kit ของ Wein Laboratories, Inc. พบว่า 17-hydroxyprogesterone-3-(O-carboxymethyl)-oxime : BSA เป็น immunogen ใช้ในการฉีดกระตุ้นให้กระต่ายสร้าง antibody รายงานนี้ใช้ immunogen ชนิดเดียวกับ kit ดังกล่าวข้างต้นฉีดกระต่าย และ antibody ที่ผลิตได้มีคุณภาพดีทัดเทียมกับของ kit ดังรายละเอียดในรายงาน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณที่ผลิตได้จะมีราคาถูกกว่าของ kit ปริมาณ antibody ที่ได้นี้มีจำนวนมาก จึงเป็นประโยชน์ในการศึกษาต่อไป เพื่อลดขั้นตอนการวิเคราะห์ให้สอดคล้องในการประยุกต์ใช้วินิจฉัย และติดตามการรักษาโรค CAH ในเด็ก ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อกุมารแพทย์

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. สารเคมี

17 α-hydroxyprogesterone Sigma Co., U.S.A.

17 α-hydroxyprogesterone-3-(O-carboxymethyl)-Oxime : BSA (28 : 1) Sigma Co., U.S.A.

17 α-(1,2-^{3}H)-hydroxyprogesterone specific activity 42.3 ci/mmol. New England Nuclear, U.S.A.

Complete Freund's adjuvant Difco Laboratory, U.S.A.

0.1 M Phosphate buffer in saline pH 7.0 ± 0.1

Scintillation fluid (Toluene 1 ลิตร, liquifluor 43 มล., Dioxane 200 มล.)

2. สัตว์ทดลอง

กระต่ายเพศผู้พันธุ์ New Zealand White อายุ 3 เดือน น้ำหนักประมาณ 2.0 กก. จำนวน 3 ตัว จากกองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย กระต่ายแต่ละตัวเลี้ยงในกรงขนาดกว้าง 2 ฟุต ยาว 2.5 ฟุต สูง 1.5 ฟุต ให้อาหารผสมวันละครั้ง และให้หญ้าขนทุกวัน

3. เครื่องมือ

Refrigerated centrifuge MSE Co., U.K.

Beta liquid scintillation counter LKB, Finnland

4. น้ำเหลืองของเด็กที่เป็นโรค CAH จากหน่วยต่อมไร้ท่อเด็ก ภาควิชากุมารศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 20 ตัวอย่าง เก็บไว้ที่ −20°ซ

วิธีการ

กระบวนการฉีดสัตว์เพื่อผลิต anti-17 α-hydroxyprogesterone ดัดแปลงจากวิธีการของ Chaudhuri and Coulson (1980) โดยการละลาย immunogen (17 α-hydroxyprogesterone-3-(O-carboxymethyl)-oxime : BSA) 3 มก. ในน้ำกลั่น 3 มล. เติม complete Freund's adjuvant 3 มล. ผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันด้วย syring แก้ว 2 อัน ต่อกันด้วย adaptor 2 ทาง ฉีด immunogen ที่เตรียมได้เข้ากล้ามเนื้อตะโพก 2 ข้าง ๆ ละ 0.5 มล. และอีก 1 มล. ฉีดเข้าใต้ผิวหนังด้านหลังของกระต่าย 4–5 จุดต่อกระต่าย 1 ตัว หลังจากฉีดครั้งแรก 2 สัปดาห์ ฉีดกระตุ้นด้วยปริมาณเท่ากับครั้งแรก ที่ตำแหน่งเช่นเดียวกับครั้งแรก และฉีดต่อไปอีกทุก 4 สัปดาห์ไปจนครบ 5 เดือน หรือ titre สูงจนเป็นที่พอใจ หลังการฉีดกระตุ้นประมาณ 7–10 วัน จะดูดเลือดจำนวน 3 มล. จากเส้นเลือดดำที่หูกระต่ายมาทดสอบ titre เมื่อ titre สูงพอแล้วได้ฆ่ากระต่ายเก็บ antiserum มาทดสอบความจำเพาะในการทำปฏิกิริยา โดยการทำ cross reactivity ดังที่เคยรายงานมาแล้ว (สมัยและคณะ, 2531)

ผลการศึกษา

1. การทดสอบ titre จะทำการดูดเลือดกระต่ายจากเส้นเลือดดำที่หูประมาณ 3 มล. หลังการฉีด immunogen เข็มที่ 3 ประมาณ 7 วัน พบว่ากระต่ายตัวที่ 1 (R18) และตัวที่ 2 (R25) มีการตอบสนองในการสร้าง antibody ส่วนตัวที่ 3 (R33) ยังไม่ตอบสนองการสร้าง antibody แต่เมื่อฉีดกระตุ้นต่อไป กระต่ายทั้ง 3 ตัวมีการตอบสนองในการสร้าง antibody ดี และเมื่อฉีด immunogen จนถึงสัปดาห์ที่ 30 Titre ก็ไม่เพิ่มสูงขึ้นอีก (Figure 1) titre ของ R18 เท่ากับ 1 : 140,000 และ R25 กับ R33 มี titre เท่ากันคือ 1 : 70,000 จึงทำให้กระต่ายสลบด้วยอีเทอร์แล้วดูดเลือดจากหัวใจจนหมดตัว แยกน้ำเหลืองของกระต่ายแต่ละตัวได้ตัวละประมาณ 20 มล. แล้วแบ่งเก็บขวดละ 0.5 มล. นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง lyophilizer

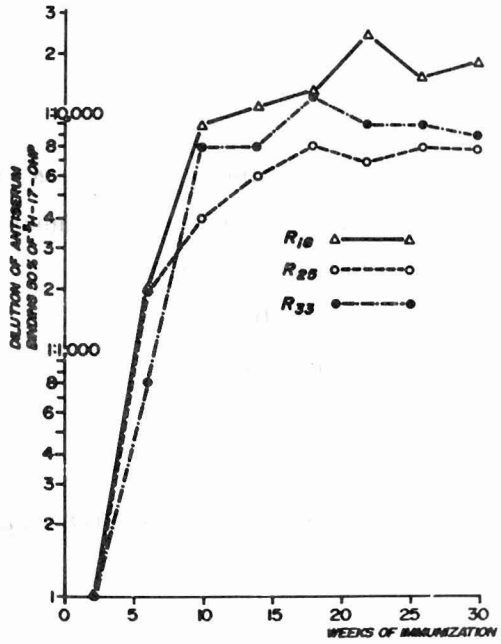


Figure 1. **Antibody response in 3 rabbits, immunized with 17-α-hydroxyprogesterone-3-(O-carboxymethyl)-oxime : BSA)**

2. การคำนวณหา affinity constant (Ka) ของ antibody โดยการสร้างกราฟมาตรฐานแล้วคำนวณ Ka ตามวิธี Scatchard Plot (Hurn and Landon, 1971) ซึ่งได้ค่าใกล้เคียงกัน คือ Ka ของ R18 มีค่า 3.0×10^{-10}M R25 และ R33 มีค่าเท่ากัน คือ 3.19×10^{-10}M

3. ทดสอบความจำเพาะในการทำปฏิกิริยากับสเตอรอยด์ฮอร์โมนที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกัน โดยการทำ cross reaction study ซึ่งได้ผลดังตาราง

Steroids	antibody against 17-OHP		
	R18	R25	R33
17 α-hydroxyprogesterone	100.0	100.0	100.0
Progesterone	1.78	2.50	1.63
17 α-hydroxypregnenolone	2.54	6.25	9.38
Pregnenolone	< 0.01	0.80	0.40
Cortisol	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Corticosterone	< 0.01	< 0.01	< 0.01
11-Deoxycorticosterone	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Testosterone	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Dihydrotestosterone	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Dehydroepiandrosterone	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Androsterone	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Androstenedione	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Estrone	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Estradiol	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Estriol	< 0.01	< 0.01	< 0.01

4. ทำการวิเคราะห์ 17-OHP ในน้ำเหลืองที่มีความเข้มข้นระดับต่ำ (น้ำเหลืองบุรุษเพศ) ถึงระดับสูงที่เป็นโรค CAH โดยใช้ anti-17-OHP ที่ได้จากกระต่าย 3 ตัว (R18, R25 และ R33) ผลการวิเคราะห์ดัง Table 1 และเพื่อนำข้อมูลนี้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) โดยใช้สถิติวิเคราะห์ ANOVA หาค่า F-test พบว่าค่าเฉลี่ยของทั้ง 3 กลุ่ม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Table 1 *Determination of 17-OHP in serum by using different antisera (R18, R25 and R33)*

Concentration of 17-OHP (ng/ml)		
R18	**R25**	**R33**
0.95	1.20	1.50
1.01	1.30	1.09
0.94	1.28	1.49
0.96	1.28	1.02
4.35	3.94	4.40
4.38	4.48	5.30
4.29	4.09	3.67
4.50	3.82	4.07
212.50	271.10	255.10
105.12	137.70	135.50
67.52	67.80	74.09
2.43	2.86	2.50
0.80	1.14	0.82

5. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ 17-OHP ในน้ำเหลืองก่อนกับหลัง celite chromatography (Abraham *et al.*, 1971) โดยใช้ anti-17-OHP ที่ได้จากกระต่าย 3 ตัว (R18, R25 และ R33) เป็น binding agent ผลการวิเคราะห์ดัง Table 2 (a, b & c) และเมื่อนำผลของแต่ละคู่มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ paired t-test พบว่าผลการวิเคราะห์ 17-OHP ในน้ำเหลืองก่อนและหลัง celite chromatography ที่ใช้ anti-17-OHP จากกระต่าย 3 ตัว ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.5$) แสดงว่า anti-17-OHP ที่ได้จากกระต่ายทั้ง 3 ตัว มีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยา สามารถวิเคราะห์ 17-OHP ได้โดยไม่ต้องผ่าน celite chromatography

6. ทำการวิเคราะห์ 17-OHP ในน้ำเหลืองของเด็กที่เป็นโรค CAH โดยวิธี blind study จากน้ำเหลืองที่ได้จาก รศ.พญ.สุมาลี ศรีวัฒนา หน่วยต่อมไร้ท่อ ภาควิชากุมารศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 20 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์พบว่าเด็กที่เป็น CAH มีระดับ 17-OHP สูงกว่าเด็กที่ไม่ได้เป็นโรคนี้อย่างเห็นได้ชัดเจน ดัง Table 3

Table 2 *Comparison between non chromatographic with chromatographic assay of 17-OHP in serum*

a		b		c	
R18 anti-17-OHP		**R25 anti-17-OHP**		**R33 anti- 17-OHP**	
non chromato-graphy	**chromato-graphy**	**non chromato-graphy**	**chromato-graphy**	**non chromato-graphy**	**chromato-graphy**
0.97	0.97	2.72	2.06	1.50	1.10
0.95	0.97	1.20	1.53	1.09	0.99
1.01	1.02	1.30	1.75	1.49	1.31
0.94	1.24	1.28	1.59	1.02	1.04
0.96	1.06	7.55	10.26	10.51	8.28
4.35	3.76	3.94	3.94	3.00	3.26
4.38	3.64	4.48	3.90	3.21	3.41
4.56	4.12	4.09	3.93	3.42	3.12
2.79	1.98	3.82	3.47	3.00	3.13
7.57	9.03	3.50	3.29	136.40	141.00
0.84	0.61	0.69	0.74	0.28	0.25
240.05	230.50	0.30	0.24	44.17	41.22
0.97	0.89	67.76	68.07	182.15	163.15
0.16	0.12	0.30	0.56	1.31	0.80
0.05	0.08	0.53	0.60	0.57	0.30

Table 3 *The concentration of 17-OHP in CAH children serum*

Item	Name	Date	17-OHP (ng/ml)	Diagnosis
1	ด.ญ.สมแสวง	11-9-85	264.98	CAH
2	ด.ช.วรเทพ	11-10-85	0.29	Male pseudohermaphrodite
3	ด.ช.วรวุฒิ	11-10-85	0.25	Male pseudohermaphrodite
4	ด.ญ.โขมพัตร 30′	21-10-85	0.86	Female pseudohermaphrodite
	60′	21-10-85	1.74	Female pseudohermaphrodite
	90′	21-10-85	1.34	Female pseudohermaphrodite
5	ด.ญ.ทิพย์สุคนธ์	25-10-85	118.76	CAH
6	ด.ญ.นิภากรณ์	25-10-85	2.74*	CAH
7	ด.ญ.ทิชากร	21-11-86	142.77	CAH
8	ด.ญ.ทิพย์สุคนธ์	27-11-86	8.67*	CAH
9	ด.ญ.วิภา	8-1-87	85.76	CAH
10	ด.ช.วรพจน์	9-1-87	155.97	CAH

Item	Name	Date	17-OHP (ng/ml)	Diagnosis
11	ด.ญ.พลอย	16-1-87	104.04	CAH
12	ด.ญ.ชนิดา	20-2-87	0.03	Female pseudohermaphrodite
13	ด.ญ.สุมาลี	23-2-87	0.28	Female pseudohermaphrodite
14	ด.ช.เอกชัย	20-5-87	165.16	CAH
15	ด.ญ.นิภากรณ์	28-5-87	37.03	CAH
16	ด.ญ.วันเพ็ญ	9-7-87	61.40	CAH
17	ด.ช.ดำรงรักษ์	3-8-87	0.07	Cortisol deficiency
18	ด.ช.ระพีภัทร์	31-8-87	217.43	CAH
19	ด.ญ.ประวิชญา	19-10-87	0.20	Vaginal bleeding
20	บุตรนางคำม่วง	23-7-88	138.22	CAH

** During treatment with Cortisol*

อภิปราย

จากผลการศึกษาพบว่า กระต่ายทั้ง 3 ตัวตอบสนองการสร้าง antibody มี titre ค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้น และสูงสุดในสัปดาห์ที่ 18 หลังจากนั้น titre ไม่สูงขึ้นอีก ถึงแม้จะฉีดกระตุ้นต่อไปอีกจนถึงสัปดาห์ที่ 30 titre ก็ยังคงที่เท่าเดิม (Figure 1) Abraham (1974) รายงานว่าหลังจากฉีดกระตุ้นประมาณ 6–8 เดือน titre จะสูงถึง plateau แต่การศึกษานี้พบว่า titre ถึง plateau เร็วกว่าที่ Abraham รายงานไว้ ดังนั้นจึงฆ่ากระต่ายเพื่อเก็บ antiserum ไว้ใช้วิเคราะห์ 17-OHP กระต่ายแต่ละตัวให้ antiserum ประมาณ 20 มล. แบ่งเก็บขวดละ 0.5 มล. แล้วระเหยแห้งเพื่อสามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน ๆ เพราะ antiserum เพียง 0.1 มล. สามารถ assay ได้ถึง 10,000 หลอดทดลอง ดังนั้นจึงต้องเก็บ antiserum ไว้ในรูประเหยแห้ง

นำ antiserum ที่ได้จากกระต่าย 3 ตัว มาประเมินคุณภาพพบว่ามีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาสูงเท่าเทียมกัน และเมื่อเปรียบเทียบความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาของ anti-17 ά-hydroxyprogesterone (anti-17-OHP) ที่ได้จากการศึกษานี้กับ anti-17-OHP ของ commercial kit ซึ่งแสดงไว้ใน Table 4 พบว่า anti-17-OHP จากกระต่าย (R18) มีคุณภาพดีทัดเทียมของ commercial kit แต่ R25 และ R33 มี cross reaction กับ 17-hydroxypregnenolone มากกว่าของ commercial kit แต่เมื่อนำ antisera ที่ได้จากกระต่ายทั้ง 3 ตัววิเคราะห์ปริมาณ 17-OHP ในน้ำเหลืองตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1) ซึ่งเป็นข้อพิสูจน์ว่า antisera ที่ได้จากกระต่ายทั้ง 3 ตัวมีคุณภาพทัดเทียมกัน

Table 4 *Specificity of anti-17 α-hydroxyprogesterone from commercial kit (Wein Laboratories, Inc. New Jersey USA)*

Steroids	% cross reaction
17 α-hydroxyprogesterone	100.0
17 α-hydroxypregnenolone	2.0
Progesterone	2.0
11-Deoxycortisol	1.26
Cortisol	0.14
Cortisone	0.31
Corticosterone	0.60
Deoxycorticosterone	0.30
Pregnenolone	0.30
Testosterone	< 0.01
Dehydroepiandrosterone	< 0.01
Estrone	< 0.01
Estradiol	< 0.01
Estriol	< 0.01

ในทางปฏิบัติการวิเคราะห์ฮอร์โมน จะต้องทำได้ง่ายและให้ผลถูกต้องแม่นยำด้วย นั่นหมายความว่า ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ก่อนการวิเคราะห์ จะต้องไม่ซับซ้อนหลายขั้นตอน เพราะยิ่งมากขั้นตอนก็ยิ่งสิ้นเปลืองทั้งทรัพย์และเวลา ไม่เหมาะในการประยุกต์ใช้งานบริการทางการแพทย์ ดังนั้นการวิเคราะห์ 17-OHP ในน้ำเหลืองโดยวิธี RIA ควรทำได้ง่ายไม่ต้องผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography จึงทำการวิเคราะห์ 17-OHP จากน้ำเหลือง โดยใช้ anti-17-OHP จากกระต่ายทั้ง 3 ตัว แล้วเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ก่อนและหลัง column chromatography โดยใช้สถิติวิเคราะห์ paired t-test พบว่า ผลการวิเคราะห์ 17-OHP ในน้ำเหลืองก่อนและหลัง column chromatography เมื่อใช้ anti-17-OHP จากกระต่ายทั้ง 3 ตัว เป็น binding agent ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.5$; Table 2) แสดงว่า anti-17-OHP ที่ได้จากการศึกษานี้ มีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาสูง สามารถใช้วิเคราะห์ 17-OHP จากน้ำเหลืองได้ โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography ทำให้การวิเคราะห์ 17-OHP ทำได้ง่าย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้สำหรับการวินิจฉัยและติดตามการรักษาโรค CAH ในเด็ก

คณะผู้วิจัยได้บรรลุวัตถุประสงค์ของการศึกษาแล้ว และหวังว่าการวิเคราะห์ 17-OHP ในน้ำเหลืองจะเป็นประโยชน์ต่อกุมารแพทย์ ในการวินิจฉัยและติดตามการรักษาโรค CAH อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบพระคุณคณะกรรมการทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุมัติเงินทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ กราบขอบพระคุณหัวหน้าภาควิชาสูติศาสตร์–นรีเวชวิทยา ที่อนุมัติให้ใช้สถานที่ อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ และบุคลากรหน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ กราบขอบพระคุณ รศ.นพ. ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์ ผู้อำนวยการกองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย ที่อนุมัติให้ใช้สัตว์ทดลอง สถานที่เลี้ยงสัตว์ทดลอง และบุคลากรทุกคนในหน่วยเลี้ยงสัตว์ทดลอง ขอขอบพระคุณคุณอุปมา เลี้ยงสว่างวงศ์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์

การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยในการสูบเลือดจากหัวใจกระต่าย ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่หน่วยคอมพิวเตอร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ยืมใช้โปรแกรมสถิติวิเคราะห์ และขอขอบพระคุณบุคลากรหน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ทุกท่านทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จสมดังปรารถนา

เอกสารอ้างอิง

สมัย ลีพิพัฒน์ไพบูลย์, สุทัศน์ กลกิจโกวินท์ และ ฉัตรพร อุษณาจิตต์. 2531. การวัดปริมาณ estrone-3-glucuronide และ pregnanediol-3α-glucuronide ในปัสสาวะสตรีตั้งครรภ์ปกติ. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 32: 827–834.

Abraham GE, Swerdloff R, Tulchinsky D, and Odell WD. 1971. Radioimmunoassay of plasma progesterone. J Clin Endocr Metab 32: 619-624.

Abraham GE. 1974. Radioimmunoassay of steroids in biological materials. Acta Endocrinol 75 (Suppl. 183) : 1-42.

Chaudhuri R, and Coulson WF. 1980. An improved hapten design for the radioimmunoassay of steroid glucuronides. J Steroid Biochem 13: 691-696.

Huhges IA, and Laurence KM. 1979. Antenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. Lancet 2: 7-9.

Hughes IA, Riad-Fahmy, and Griffiths K. 1979. Plasma 17-OH-progesterone concentrations in newborn infants. Arch Disease Childhood 54: 347-349.

Hurn BAL and Landon J. 1971. Antisera for radioimmunoassay. In: Radioimmunoassay methods. Kirkham KE and Hunter WM (Eds). Churchill Livingstone, Edinburgh. p 121-142.

Knorr D, Bidlingmaier F, Holler W, and Kuhnle U. 1983. Diagnosis of homozygosity and heterozygosity in congenital adrenal hyperplasia (CAH) and control of treatment. J Steroid Biochem 19: 645-653.