

599.32

26 1/17

10

การตรวจวัดอีลัสติโกลในปัสสาวะของลิงหางยาว (Macaca fascicularis)

ในระหว่างการตั้งครรภ์ และระยะเลี้ยงลูกสปีด้าห์แรก

โดยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์

ปริญญานิพนธ์

ของ

ณรงค์ เต็มเลี้ยววงศ์

- 8 พ.ศ. 2535

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

มีนาคม 2528

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

178447

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิต และคณะกรรมการสอบ ได้พิจารณาปัญหานี้นพ
ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา การศึกษามหาบัณฑิต
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธาน
..... กรรมการ
..... กรรมการ

คณะกรรมการสอบ

..... ประธาน
..... กรรมการ
..... กรรมการ
..... กรรมการ

ประกาศคุณูปการ

ในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยได้รับความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่ง
ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ จากศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. พุทธิพงศ์ วรวิม
ประธานกรรมการควบคุมการทำปริญญานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ประคอง ตั้งประพุกทิกุล
และอาจารย์ ล้วนใจ พรหมสุทธิรักษ์ กรรมการควบคุมการทำปริญญานิพนธ์ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ
เป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุ่มณฑา พรหมบุญ อาจารย์ที่ปรึกษา ได้ให้
คำแนะนำที่มีค่า และช่วยเหลือในเรื่องต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาที่ศึกษาอยู่ และรองศาสตราจารย์
สมศักดิ์ แสนสุข ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและแก้ไขข้อบกพร่องของปริญญานิพนธ์ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ
ไว้ ณ โอกาสนี้

สุดท้าย ผู้วิจัยขอขอบคุณ เพื่อน ๆ วิชา เอกชีววิทยา ที่ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประสานมิตร และที่ศูนย์วิจัยไพรเมต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความสนใจ
และช่วยเหลือในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ธเรงศ์ เต็ม เลี้ยววงศ์

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	10
ความสำคัญของการวิจัย	10
ขอบเขตการวิจัย	10
2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ	12
สัตว์ทดลอง	12
การเก็บปัสสาวะ	12
ห้องปฏิบัติการ	13
สารเคมีและฮอร์โมน	13
เครื่องมือ	14
การตรวจหาอีลัสโตริโอดโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์	15
สารละลายและวิธีเตรียม	16
วิธีการทำเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ของอีลัสโตริโอด	18
การควบคุมมาตรฐานวิเคราะห์อีลัสโตริโอดในปัสสาวะ	18
การหาวิธีทดสอบความเชื่อถือได้ของการวัดปริมาณอีลัสโตริโอด	20
วิธีหาค่าเอนทรีน	22
การวิเคราะห์ผลจากเรดิโออิมมูโนแอสเสย์	24

บทที่	หน้า
3 ผลการทดลอง	26
การทดลองความเชื่อใจได้ของวิธีการวัดปริมาณอิเล็กโตรโล	26
ผลการวิเคราะห์ปริมาณอิเล็กโตรโลในปลาสลิวะถึงขณะตั้งครรภ์	26
4 สรุปและอภิปรายผล	35
จุดมุ่งหมายของการวิจัย	35
วิธีดำเนินการวิจัย	35
สรุปผลวิจัย	36
อภิปรายผล	36
บรรณานุกรม	47

บัญชีตาราง

ตาราง

หน้า

- 1 แสดงวิธีเตรียมสารละลายยีสต์รีโอมมาตรฐานจากสารละลาย B 17

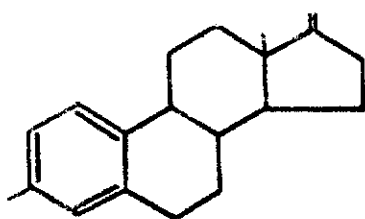
บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 สูตรโครงสร้างของอีลัสโตรเจน	1
2 ลำดับขั้นการสังเคราะห์อีลัสโตรเจนในรังไข่	3
3 ลำดับขั้นการสังเคราะห์และ เมตาโบลิซึมของอีลัสโตรเจนในรก และ ตัวอ่อน	5
4 ความจำเพาะของอีลัสโตรไดออกเซนแอนติเซรัม ต่ออีลัสโตรน อีลัสตราไดออก และอีลัสโตรไดออกมาตรฐานความเข้มข้นตั้งแต่ 7.8 - 2,000 พิโคกรัม ต่อ 0.5 มิลลิลิตร	27
5 กราฟมาตรฐานของอีลัสโตรไดออกที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 7.8 - 1,000 พิโคกรัม ต่อ 0.5 มิลลิลิตร โดยมีความไวของวิธีวัดเท่ากับ 19 พิโคกรัม ต่อ 0.5 มิลลิลิตร	28
6 แสดงปฏิกิริยา การตอบสนองของอีลัสโตรไดออกแอนติเซรัม ความเข้มข้น ต่าง ๆ กันกับอีลัสโตรไดออกติดสลากกัมมันตรังสีเตรียมปริมาณคงที่	29
7 กราฟมาตรฐานของอีลัสโตรไดออกที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 7.8 - 1,000 พิโคกรัม ต่อ 0.5 มิลลิลิตร โดยมีความไวของวิธีวัดเท่ากับ 19 พิโคกรัม ต่อ 0.5 มิลลิลิตร	30
8 ระดับของอีลัสโตรไดออกอิสระในปัสสาวะของลิงหางยาว จำนวน 5 ตัว ตั้งแต่เกิดปฏิสนธิจนถึง 1 สัปดาห์ของการให้นม	31
9 ระดับของอีลัสโตรไดออกในปัสสาวะของลิงหางยาว (mean $\pm$ SEM) ในการ ตั้งครรภ์ระยะแรก ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 50 ของการตั้งครรภ์	33
10 ระดับของอีลัสโตรไดออกในปัสสาวะของลิงหางยาว (mean $\pm$ SEM) ในการตั้งครรภ์ระยะกลาง ตั้งแต่วันที่ 60 ถึงวันที่ 120 ของการตั้งครรภ์...	34
11 ระดับอีลัสโตรไดออกอิสระในปัสสาวะของลิงหางยาว (mean $\pm$ SEM) ตั้งแต่ 50 วันก่อนวันคลอด (0) และหลังคลอด 1 สัปดาห์	35

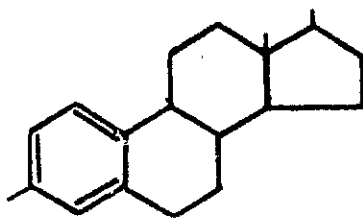
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อีสตรีโอด (Oestriol, E_3) เป็นสเตอรอยด์ฮอร์โมนในกลุ่มอีสตรีโอดเจนที่ตรวจพบว่า มีปริมาณมากที่สุดทั้งในส่วนของรก เลือด และปัสสาวะของสตรีที่ตั้งครรภ์ปกติ ที่ตรวจพบมีปริมาณรองลงมาคือ อีสตรีน (Oestrone, E_1) และอีสตราไดโอด (Oestradiol, E_2) (Diczfalusy and Mancuso. 1969 : 191) ชื่อทางเคมีของ E_3 คือ A 1, 3, 5, (10) estratriene, 3B, 10 α , 17B triol มีโครงสร้างเป็น steroid nucleus ประกอบไปด้วยคาร์บอน 18 อะตอม มี ring A เป็น aromatic ring มี hydroxylic group ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3, 16 และ 17 ดังแผนภาพที่ 1

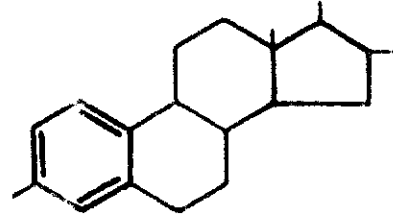
ภาพประกอบ 1 สูตรโครงสร้างของอีสตรีโอดเจน



อีสตรีน (E_1)



อีสตราไดโอด (E_2)

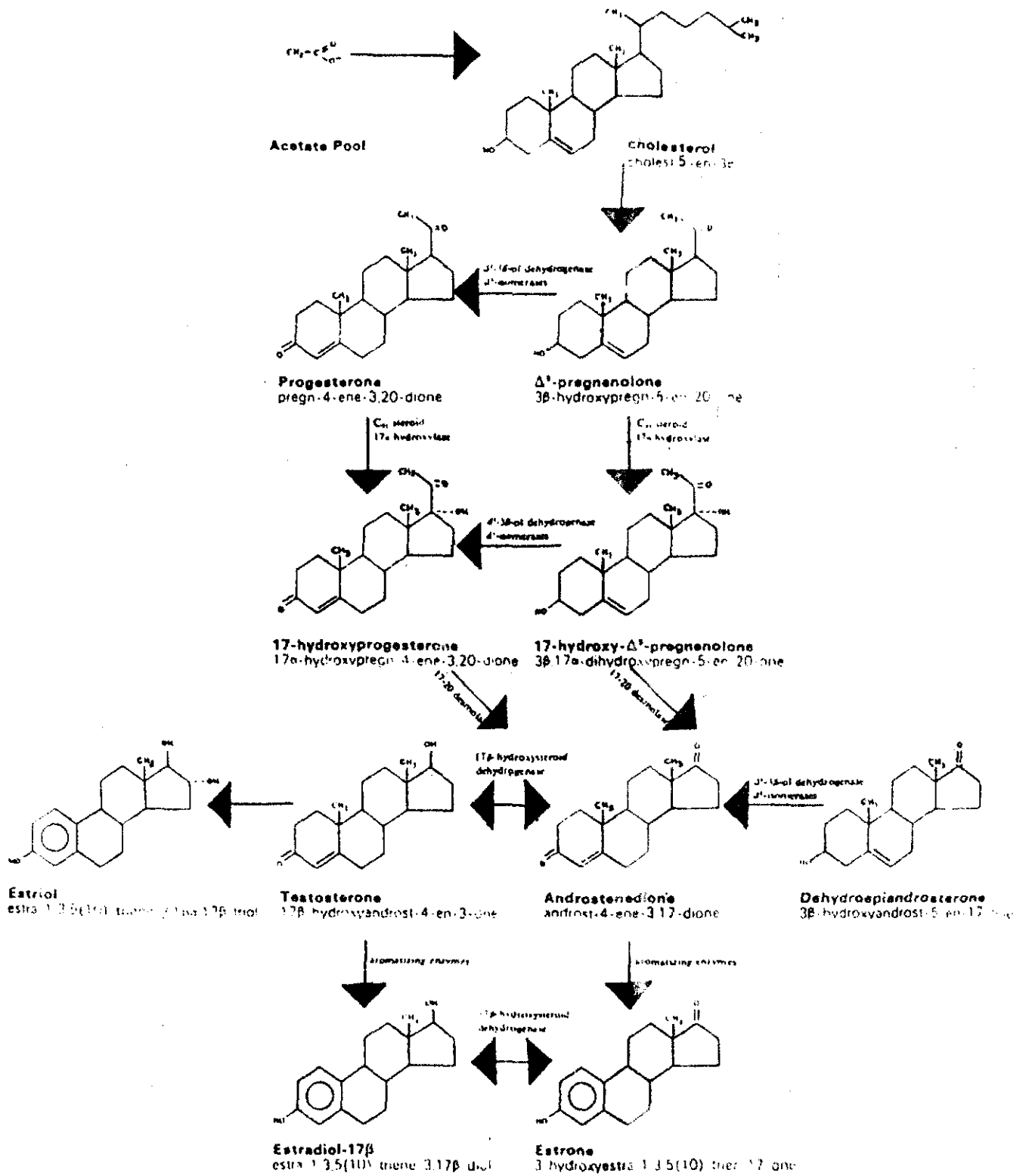


อีสตรีโอด (E_3)

แหล่งสำคัญในการสังเคราะห์อีสตรีโอดเจนในร่างกายได้แก่ รังไข่ และรก มีจำนวนเล็กน้อยที่สังเคราะห์จากต่อมหมวกไตและฮัยเพท โดยพบว่า การสังเคราะห์อีสตรีโอดเจนในรังไข่ นั้นต้องอาศัย ฟอลลิเคิล สติมูเลติง ฮอร์โมน (FSH) และลูทีนไนซิง ฮอร์โมน (LH) จากต่อมใต้สมองมากระตุ้นให้ฟอลลิเคิล และคอร์พัล ลูเตียม สร้างอีสตรีโอดเจน โดยมีอะซีเตท และโคเลสเตอรอล เป็นสารตั้งต้นดังแสดงในแผนภาพที่ 2

อีส์โตรเจนที่สังเคราะห์จากรังไข่ส่วนใหญ่ที่ตรวจพบในระหว่างรอบประจำเดือน คือ E_1 และ E_2 ส่วน E_3 ตรวจพบในปริมาณที่น้อยมาก แต่มีรายงานว่าเนื้อเยื่อรังไข่ของหญิงหมดประจำเดือนที่เป็นมะเร็งปากมดลูกสามารถเปลี่ยนเทสโทสเตอโรนเป็น E_3 ได้ (Wotiz and others. 1956 : 487)

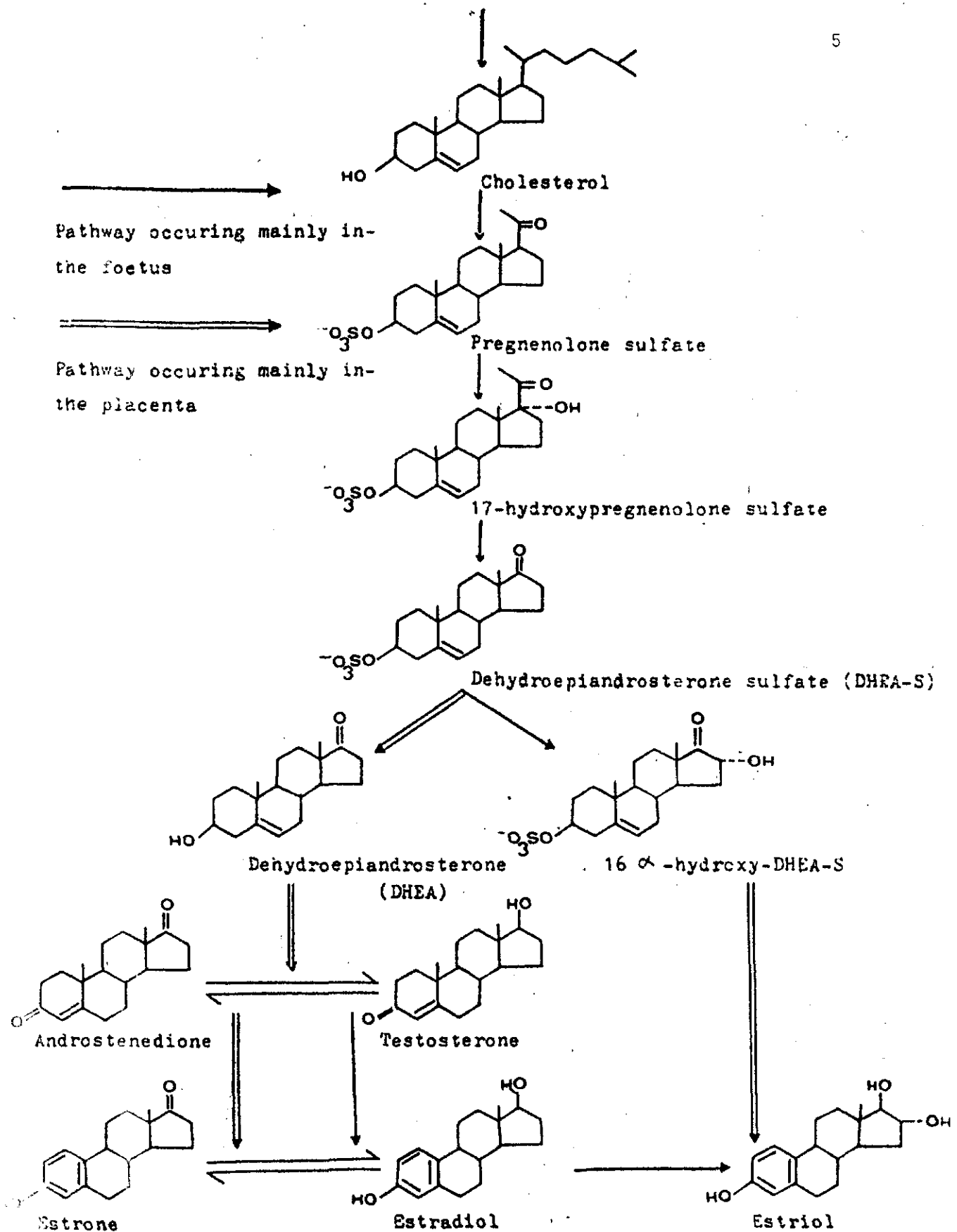
การสังเคราะห์อีส์โตรเจนโดยสังเคราะห์เป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันระหว่างตัวอ่อน รก และ ส่วนของแม่ (Diczfalusy. 1962 : 45) ในไพรเมตทุกชนิดที่ศึกษารวมทั้งในลิงหางยาว (Macaca fascicularis) รกไม่สามารถเปลี่ยนเพริกฟีโนโลนหรือโปรเจสเตอโรนไปเป็น แอนโดรเจนหรืออีส์โตรเจนได้นอกจากจะมีแอนโดรเจนเพียงพอในกระแสเลือด (Ainsworth and others. 1969 : 1421, Ainsworth and Ryan. 1969 : 301, Davies and others. 1970 : 1457, Shinada and Ryan. 1973 : 233) จากการศึกษาในคน (Bolte and others. 1964 : 576) ลิงวอก (Macaca mulatta) (Snyder and others. 1971 : 274) และลิงบาบูน (Papio cynocephalus) (Townesley. 1971 : 192 - 193) พบว่า ต่อมหมวกไตทั้งของแม่และตัวอ่อนจะเป็นตัวสังเคราะห์ตั้งต้นที่จำเป็นในการสร้างอีส์โตรเจนให้กับรก คือ ดีไฮโดรอีพิแอนโดรสเตอโรน (DHEA) และ ดีไฮโดรอีพิแอนโดรสเตอโรนซัลเฟต (DHEA-S) ซึ่งสารทั้งสองนี้ส่วนใหญ่มาจากต่อมหมวกไตของตัวอ่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงท้ายของการตั้งครรภ์ (Sitteri and MacDonald. 1966 : 751 - 761) เมื่อได้ DHEA และ DHEA-S มารกจะทำการนำที่อะโรมาไตเข้าของ DHEA และ DHEA-S ไปเป็น E_1 และ E_2 (Lamb and others. 1967 : 263) ซึ่งเหตุการณ์นี้พบว่า เกิดได้ในไพรเมตหลายชนิด เช่น ในลิงมาโมเช็ก (Callithrix jacchus) (Ryan and others. 1961 : 613), ลิงวอก (Ainsworth and others. 1969 : 1421 - 1429) จิ้งจอก (Pongo pygmaeus) (Ainsworth and Ryan. 1969 : 301) บาบูน (Milewich and Axelrod. 1971 : 589 - 595) และ ชิมแปนซี (Pan troglodyte) (Shinada and Ryan. 1973 : 233 - 244) จากการศึกษาใน



ภาพประกอบ 2 ลำดับขั้นตอนการสังเคราะห์ฮอร์โมนสเตียรอยด์ในรังไข่

สิงวอก และสิงบาบูน (Ainsworth and others. 1969 : 1421 - 1429, Snyder and others. 1971 : 274 - 278, Crystle and Townsley. 1974 : 1743) ซึ่งสามารถศึกษาได้ทุกขั้นตอนของการสร้างฮีสโตรเจน พบว่า ตามลำดับจะไม่สามารถไฮดรอกซิเลชัน DHEA-S ได้ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากต่อการสังเคราะห์ E_3 (Jackanics and Diczfalussy. 1968 : 877) แต่ตับของแม่และตับของตัวอ่อนจะเปลี่ยน DHEA-S จากต่อมหมวกไตเป็น 16 แอลฟา ไฮดรอกซิแอนโดรสเตอโรนซัลเฟต (16α OHDHEA-S) จากนั้นจึงสามารถเปลี่ยน 16α OHDHEA-S ไปเป็น E_3 ได้ (Diczfalusy. 1970 : 32) นอกจากนี้ E_3 ยังสังเคราะห์ขึ้นจาก 16-epioestrinol, E_2 และ E_1 ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดที่ตับของแม่ (Simmer and others. 1964 : 125) ดังแผนภาพที่ 3

การควบคุมการสังเคราะห์ฮีสโตรเจนในระหว่างการตั้งครรภ์ ตัวอ่อนจะทำหน้าที่ร่วมกับ Hypothalamic-hypophyseal-adrenal-axis (Challis and Thorburn. 1976 : 232 - 253) ซึ่งเมื่อเอ็นไซม์ 3 เบตา สเตอรอยด์ไฮดรอกซิเนส ในต่อมหมวกไตของตัวอ่อนมีปริมาณลดลง จะส่งผลให้มีการหลั่ง ACTH กระตุ้นให้มีการสร้าง DHEA และ DHEA-S เพิ่มขึ้น ส่วนคอร์ติโคสเตอรอยด์จะสร้างในปริมาณที่น้อยกว่า (Diczfalusy and Mancuso. 1969 : 191 - 248, Oakey, 1970 : 922) แต่มีรายงานว่า ACTH จากแม่ไม่สามารถส่งผ่านรกได้ (Simmer and others. 1974 : 283) ซึ่งเชื่อว่าการสร้างสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ฮีสโตรเจนโดยตัวอ่อนนั้นถูกควบคุมจาก ACTH ของตัวอ่อนเอง (Oakey. 1970 : 922) ในขณะที่คอร์ติซอลสามารถส่งผ่านส่วนของรกได้ (Murphy and others. 1974 : 538) ซึ่งพบว่า ระดับของคอร์ติซอลที่เพิ่มขึ้นในส่วนของแม่หรือเมื่อให้กลูโคคอร์ติคอยด์ หรือเดกซาเมตาโซนแก่สตรีและสิงวอกที่ตั้งครรภ์ สามารถส่งผ่านส่วนของรกและมีผลไปก่อกำเนิดการทำงานของ pituitary-adrenal-axis ของตัวอ่อน ซึ่งจะช่วยให้อัตราการสังเคราะห์ฮีสโตรเจนลดลงทั้งในส่วนของรกและตัวอ่อน โดยในสิงวอก ระดับฮีสโตรเจนในส่วนของแม่จะลดลงและตัวอ่อนจะมีต่อมหมวกไตขยายใหญ่ขึ้น (Bosu. 1973 : 743, Challis and others. 1974 : 389 and Simmer and others. 1974 : 283) เร็กและคณะ (Reck and others. 1978 : 820) ได้เสนอว่าปริมาณ



ภาพประกอบ 3 แสดงการสังเคราะห์ฮอร์โมนสเตอรอยด์ในส่วนของ Foeto-placental unit

การสังเคราะห์ฮีสโตริโอลในแต่ละวันส่วนใหญ่ถูกควบคุมโดยคอร์ติซอลจากแม่ ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อไฮโปทาลามัสของตัวอ่อน

ทั้ง E_1 , E_2 และ E_3 ที่สร้างจากรกจะหลังเข้าสู่กระแสเลือดของแม่ในอัตราที่ใกล้เคียงกันและส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปอิสระ (Tulchinsky. 1973 : 1079) จากการตรวจวัดฮีสโตริเจนในเลือดของหญิงตั้งครรภ์ปกติจะมี E_3 ในพลาสมาเพิ่มขึ้นจนถึง 180 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อครบกำหนดคลอด (Tulchinsky and others. 1972 : 1095) ขณะที่โพรมะตนิดอื่นอย่างเช่นในกลุ่มของลิงโลกเก่า และลิงโลกใหม่ไม่สามารถตรวจพบ E_3 ในเลือดขณะตั้งครรภ์เลยแสดงถึงตัวอ่อนไม่สามารถสร้าง 16α OHDHEA-S เป็นสเตอรอยด์ตั้งต้นให้รกลำหรับการอะโรมาไทเซชันได้ (Resko and others. 1975 : 324, Chambers and Hearn. 1979 : 30) ขณะที่ E_1 และ E_2 ได้มีการตรวจวัดในเลือด โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสซายที่มีความไวและความจำเพาะสูงมากในโพรมะตนิดต่าง ๆ อย่างเช่นในลิงมาโมเชกพบว่า ความเข้มข้นของ E_1 จะมากกว่า E_2 ในทุกระยะของการตั้งครรภ์ทั้งในรูปอิสระ และในรูปคอนจูเกต (Hodges and others. 1983 : 77) ในลิงวอกและลิงบาบูนระดับของ E_2 ในพลาสมา เพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัดประมาณวันที่ 100 ของการตั้งครรภ์จนครบกำหนดคลอด (Hodgen and others. 1972 : 896, Dawood and Funchs. 1980 : 179) สำหรับลิงหางยาวจะพบ E_1 ในซีรัมเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญตรงช่วงที่เกิดการสร้างรก (placentation) (วันที่ 10-16 ของการตั้งครรภ์) พร้อม ๆ กับการตรวจพบ mCG (macaque chorionic gonadotropin) ในปัสสาวะในระหว่างวันที่ 17-28 หลังการปฏิสนธิและสัดส่วนของ $E_1 : E_2$ ในซีรัมจะสูง คือ มีค่าประมาณ 2-2.4 ในช่วง 40 วันแรกของการตั้งครรภ์ (Varavudhi and others. 1983 : 2 - 6)

บทบาทของ ฮีสโตริเจนในระหว่างการตั้งครรภ์ โดยทั่วไปจะเกี่ยวข้องกับการรักษาลักษณะการตั้งครรภ์ให้เป็นปกติ แต่ผลที่เฉพาะเจาะจงต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนยังไม่แน่ชัด นอกจากนี้ฮีสโตริเจนยังมีส่วนต่อการเจริญเติบโตของต่อมไทมัส อวัยวะสืบพันธุ์ และสมองที่จำเป็นต่อขบวนการคลอด การหลั่งน้ำนมและพฤติกรรมในการเลี้ยงลูกอ่อน (Johnson and Everitt. 1980 : 304) ซึ่งปริมาณของฮีสโตริโอลที่ขับออกจากปัสสาวะในคนจะมีความสัมพันธ์กับการทำงาน

ของรกและความเป็นปกติของตัวอ่อนที่อยู่ในครรภ์ โดยพบว่าความผิดปกติส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นใน
ตัวอ่อน เช่น โรคพิษแห่งการตั้งครรภ์ (toxaemic pregnancies) ภาวะของตัวอ่อนในครรภ์
พิการแบบไม่มีสมอง (foetal anencephaly) โรคไตเรื้อรัง (chronic glomerula-
nephritis) และโรคเบาหวาน (diabetes mellitus) มักจะเกิดร่วมกับการตรวจพบ
ฮีสตริโอไลต์ในปัสสาวะของมารดาเป็นสัดส่วนกับความผิดปกติของตัวอ่อน การหาปริมาณฮีสตริโอไลต์
เป็นระยะจะทำให้แพทย์สามารถกำหนดระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำคลอดก่อนที่ตัวอ่อนใน
ครรภ์จะเป็นอันตราย (Greene and Touchstone. 1963 - 1, Suteri and
McDonald. 1966 : 751 - 761, Keller and others. 1971 : 729 and
Macatee and others. 1972 : 75 - 85)

เมตาโบลิซึมของฮีสโตรเจนส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ตับ ในส่วนเอ็นเตอโรเฮปาทิก เซลล์และใน
และในไตของแม่ ผลการทดลองหลายฉบับบ่งชี้ว่าเมตาโบลิซึมของฮีสโตรเจนในรอกประจำเดือน
ปกติ และในระหว่างการตั้งครรภ์ของสัตว์จะคล้ายคลึงกัน (Sluanwhite and others.
1973 : 485, Adlercreutz and Tikkanen. 1974 : 33 - 51) โดยฮีสโตรเจน
ที่ส่งจากรกที่อยู่ในรูปฮีสโตรจะถูกรีดออกที่รกและถูกขับออกจากรกด้วยวิธี
ในส่วนของตับและในชั้นผิวของรก (Sluanwhite and others. 1973 : 485 - 524)
โดยพบว่าฮีสโตรเจนบางส่วนจะถูกขับจากรกสู่เลือด ซึ่งจะมีส่วนถูกเปลี่ยนไปเป็นฮีสตริโอไลต์ที่
จากนั้นฮีสโตรเจนจะถูกขับจากรกสู่เลือดและจะถูกลดทอนที่อาศัยอยู่ในรก
ไฮโดรไลต์ให้อยู่ในรูปฮีสโตรแล้ว และมีการขับออกใหม่อีกครั้งหนึ่งในชั้นผิวของรก
(Inoue and others. 1969 : 390, Levitz and Katz. 1968 : 852 and
Adlercreutz and others. 1973 : 543) ซึ่งตาม และบรีวเออร์ (Dahmand Breuer.
1906 : 153) พบว่า เซลล์ในชั้นผิวของรกจะมีเอ็นไซม์ 17 เบตา ออกซิโดรีดักเตสอยู่มาก
ในที่สุดฮีสโตรเจนก็จะเข้าสู่กระแสเลือดอีกครึ่งหนึ่งในรูปของฮีสโตรเจน กลไกไรโนด์ จาก
การศึกษาเกี่ยวกับอัตราการกำจัดโดยไตของฮีสตริโอไลต์ที่อยู่ในรูปคอนจูเกตและความสามารถในการ
การขับกับโปรตีน (Levitz and others. 1975 : 663, Goebelsmann and others.
1973 a : 592) ทำให้ทราบการกระจายของฮีสตริโอไลต์ที่อยู่ในรูปฮีสโตรและในรูปคอนจูเกต

ตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายโตขึ้น โดยอีลโตรโวลที่จับกับการตกไข่จะจับกับโปรตีนในพลาสมา ได้มากกว่าอีลโตรโวลที่จับกับการตกไข่ของหนู ซึ่งจะทำให้อีลโตรโวลที่จับกับการตกไข่มีผลได้ น้อยกว่า ดังนั้น อีลโตรโวล 3 แอลฟา กลูคิวโรไนด์ และอีลโตรโวล 16 แอลฟา กลูคิวโรไนด์ ซึ่งขับออกทางปัสสาวะได้มากกว่าอีลโตรโวล 3 ซัลเฟตและอีลโตรโวล 3 ซัลโฟ -16 กลูคิวโรไนด์ (Rosenthal and others. 1972 : 805, Goebelsman and others. 1973a : 592) มีเพียง 2.7% เท่านั้นที่ขับออกทางอุจจาระ (Adlercreutz and Martin. 1976 : 410)

ดอร์ฟแมน และ เวเกเนน (Dorfman and Wegenen. 1941 : 545) ได้ รายงานเป็นครั้งแรกถึงการตรวจพบอีลโตรเจนโดยวิธีไบโอแอสเสย์ (bioassay) ในปัสสาวะ ลิงวอก ซึ่งจะมีปริมาณสูงขึ้นเป็นสัดส่วนกับระยะเวลาการตั้งครรภ์แล้วจะลดระดับลงหลังคลอด และจากการศึกษาโดยใช้วิธีการทางเคมีแสดงให้เห็นว่า E_1 เป็นอีลโตรเจนที่ขับออกทางปัสสาวะ มากที่สุดในช่วงตั้งครรภ์ ขณะที่ E_3 ซึ่งเป็นอีลโตรเจนที่สำคัญในคนกลับตรวจไม่พบในลิงชนิดนี้ (Short and Eckstein. 1961 : 15) ต่อมาลิวมาส์ (Laumas. 1965 : 297) ได้ดัดแปลงวิธีการของบราวน์ (Brown. 1956 : 704) ตรวจพบ E_3 เป็นส่วนใหญ่ใน ปัสสาวะ แต่ไม่พบความแตกต่างของอีลโตรเจนทั้ง 3 ชนิดในรอบประจำเดือนปกติและในช่วง การตั้งครรภ์ของลิงวอก ในปี 1967 ฮอปเปอร์ และ ทูลเนอร์ (Hopper and Tullner. 1967 : 517) ให้เทคนิค ภาวสีเคมี โคโรมาโตกราฟี ตรวจพบ E_1 ในปริมาณที่มากกว่า E_2 และ E_3 ในทุกระยะในการตั้งครรภ์ของลิงวอกและจะเพิ่มอย่างเด่นชัดในสัปดาห์ที่จะมีการคลอด (145 ug/24 hr.) จะลดลงก่อนหรือวันที่จะมีการคลอดเกิดขึ้นเหมือนกับรอบเดือนปกติ (4 ug/24 hr.) ในลิงบาบูนจะคล้ายคลึงกับลิงวอกโดย E_1 จะสูงกว่า E_2 และ E_3 รวมกันถึง 10 เท่า (200 ug/24 hr.) เฉพาะ E_1 เท่านั้นที่เพิ่มสูงเมื่อใกล้คลอด (Merkatz and Beiling. 1969 : 129) และในค้างคาว Pygathrix nemaeus (Czekala and others. 1981 : 1 - 15) และ Presbytis entellus entellus (Shandiya and others. 1976 : 7) E_1 จะเป็นเมตาโบไลต์หลักตลอดการตั้งครรภ์รองลงไป คือ E_2 และ E_3 ใน Lemur variegatus ซึ่งจัดให้พวก prosemian จะขับ E_1 ออกทางปัสสาวะ มากที่สุดขณะตั้งครรภ์ โดยอีลโตรเจนทั้งหมดที่ตรวจพบจะเพิ่มสูงจากเดิมถึง 1,000 เท่าใน

ช่วงท้ายของการตั้งครรภ์ (Shideler and others. 1983 : 9633) ในลิงโลกใหม่ เช่น Cebus albifrons, Saguinus fascicollis, Saimiri sciureus และ Ateles fusciceps robustus อีลโตรเจนที่ขับออกทางปัสสาวะมากที่สุด คือ E_1 ยกเว้นในลิงมาโมเซ็ท จะเป็น E_2 (Chamber and Hearn. 1979 : 23, Hodges and others. 1983 : 73) ในเกรทอเพลล์ เช่น อorangอุตัง (Boney and Lasley. 1982 : 431) อorangอุตัง สุ่มาตรา (Pongo phamaeus abelii) (Czekala and others. 1981 : 1 - 15) กอริลลา (Gorilla gorilla) (Seaton. 1978 : 231) อีแมเจียน (Elmajian and Forchielli. 1965 : 535) จะมีรูปแบบของระบบต่อมไร้ท่อที่ควบคุมในระหว่างการตั้งครรภ์คล้ายคลึงกับคนมาก โดยมี E_3 เป็นเมตาโบไลต์ที่พบมากที่สุด ขณะตั้งครรภ์แต่มีปริมาณน้อยมากเพียง 1 ใน 10 จากที่พบในคนเท่านั้น

ปัจจุบันมีความสนใจในการนำ non-human primate มาใช้วิจัยด้านต่าง ๆ เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะการวิจัยในแง่ชีวแพทยศาสตร์ แต่ข้อมูลส่วนใหญ่ได้มาจากไพรเมตพวกอื่น ขณะที่ข้อมูลจากลิงหางยาว (Macaca fascicularis) ซึ่งจัดใน

Class mammalia

Order primate

Suborder antherpoidea

Superfamily cercopithecoidea

Family cercopithecidae

Subfamily cercopithecinae

Genus macaca

มีชื่อสามัญว่า cynomolgus monkey มีรอบประจำเดือนเฉลี่ย 31 วัน ระยะการตั้งครรภ์นานประมาณ 166 วัน (Dukelow and others. 1979 : 39 - 47, Varavudhi and others. 1983 : 17) โดยระยะของรอบประจำเดือนและ ออร์โมน

พื้นฐานจากรังไข่ เช่น E_2 โปรเจสเตอโรน และ LH ในระหว่างรอบประจำเดือนคล้ายคลึงกับที่พบในสัตว์ และ non-human primate ชนิดอื่น ๆ (Varavudhi and Yodyinyuad. 1980 : 55 - 60) แต่ไม่พบ peak ของ E_2 อย่างเด่นชัดในช่วงกลางของระยะลูเทียลเหมือนกับที่พบในคนและชิมแปนซี (Varavudhi and others. 1984 : 8) แต่ที่พบว่า E_2 ที่สร้างขึ้นก็มีปริมาณเพียงพอที่จะทำให้คอร์เทิล ลูเตียม เสื่อมสลายได้ (luteolysis) ในช่วงปลายของระยะลูเทียล (Karsch and others. 1973 : 1148, Butter and others. 1975 : 1509) นอกจากนี้ลิงหางยาวยังสามารถผสมพันธุ์และให้ลูกตลอดปี โดยไม่พบว่ามีฤดูผสมพันธุ์ (breeding seasonality) เหมือนกับลิงวอกและลิงญี่ปุ่น (*Macaca fasciata*) (Nigi. 1976 : 81 - 87, Dukelow and others. 1979 : 44 - 45, Tangpraprutikul and Varavudhi. 1982 : xci)

สำหรับข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับเมตาโบลิซึมของอีส์โตรเจนในระหว่างการจัดสรรกันในลิงชนิดนี้ยังไม่สมบูรณ์ ดังนั้น จึงน่าสนใจที่จะทำการตรวจหาปริมาณการขับอีส์โตรเจนอิสระในปัสสาวะระหว่างการจัดสรรของลิงหางยาว ซึ่งยังไม่มีรายงานถึงการตรวจพบฮอร์โมนชนิดนี้ในลิงชนิดใดมาก่อน ผลการศึกษาครั้งนี้ทำให้เข้าใจถึงเมตาโบลิซึมของอีส์โตรเจนในระหว่างการจัดสรรในลิงชนิดนี้ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในการหาสัตว์ทดลองในกลุ่มไพรเมตที่เหมาะสมสำหรับเป็นตัวแทนในการวิจัยค้นคว้าทางสรีรวิทยา การสืบพันธุ์ต่อไปในอนาคต

จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

เพื่อศึกษาปริมาณและการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนอีส์โตรเจนอิสระในปัสสาวะของลิงหางยาวขณะจัดสรร และระยะเลี้ยงลูกอ่อน สัปดาห์แรก โดยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์

ความสำคัญของการวิจัย

1. จากการศึกษาครั้งนี้ ทำให้ทราบถึงเมตาโบลิซึมของอีส์โตรเจนในลิงหางยาวในระหว่างการจัดสรรและระยะเลี้ยงลูกอ่อนสัปดาห์แรก

2. เป็นการรวบรวมข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับปริมาณฮอร์โมนในสิ่งทางยาว ตั้งแต่ช่วงที่ก่อนมีการสร้างรกจนกระทั่งภายหลังคลอดว่ามีความคล้ายคลึงกับคนและไพรเมตชนิดอื่น ๆ เพียงใด สำหรับเป็นสัตว์ทดลองที่ใช้แทนคนในการศึกษาต่อไปในอนาคต ทั้งในแง่ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการฝังตัว การทำงานของ เนื้อเยื่อรก และตัวอ่อนในช่วงอายุต่าง ๆ และบทบาทของฮอร์โมนที่ควบคุมการคลอด

ขอบเขตการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง ใช้สิ่งทางยาวเพดเมีย (Macaca fascicularis) อายุ 3.5-10 ปี น้ำหนักระหว่าง 4-4.5 กิโลกรัม
2. ศึกษาปริมาณและการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนอีส์ตรีโอดของสิ่งทางยาวในระหว่างการตั้งครรภ์ และระยะเลี้ยงลูกสัปดาห์แรก
3. ใช้วิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ (RIA) ในการวิเคราะห์

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

1. สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้เป็นลิงหางยาว เพศเมีย จำนวน 5 ตัว ซึ่งมีอายุอยู่ในช่วง 3.5 - 10 ปี น้ำหนักระหว่าง 4 - 4.5 กิโลกรัม ทุกตัวมีรอบประจำเดือนที่แน่นอน (26 - 40 วัน) เลี้ยงไว้ในห้องทดลองของวิสัยไพรเมต ภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถูกแยกเลี้ยงกรงละตัว ในห้องทดลองที่มีอากาศถ่ายเทได้สะดวก โดยมีการควบคุมแสงที่ได้รับในแต่ละวัน (ได้รับแสงวันละ 12 ชม.) สัตว์ทดลองถูกเลี้ยงดูด้วยอาหารสำเร็จรูปจากบริษัทโภชนาการสัตว์ และเสริมด้วยผลไม้สด พวกแตงกวา สับปะรด กล้วย และมัน ตลอดจนให้ใช้ต้นไม้ทุกสัปดาห์

การผสมพันธุ์ ทำได้โดยการตรวจรอบประจำเดือนของลิงที่จะผสมพันธุ์ 2 รอบประจำเดือน และจับผสมในวันตกไข่ของรอบประจำเดือนที่ 3 ซึ่งวันตกไข่ถือเอาวันที่ 0.45 ของรอบประจำเดือน (Dukelow and Brüggemann, 1979 : 80) โดยพอถึงวันนั้นก็จับลิงเพศเมียใส่ในกรงของลิงพ่อพันธุ์ คอยดูว่ามีการผสมพันธุ์หรือไม่อย่างน้อย 2 - 3 วัน ต่อจากนั้นตรวจสเปิร์ม และถ้าพบสเปิร์มวันใดนับเป็นวันที่ 1 ของการตั้งครรภ์ การตั้งครรภ์ยืนยันได้โดยการกระทำ abdominal palpation (3 สัปดาห์หลังการผสมพันธุ์) (Varavudhi and others, 1984 : 5) และวันที่มีการคลอดเกิดขึ้นนับวันที่ 1 ของการให้นม

2. การเก็บปัสสาวะ

เปลี่ยนภาชนะที่รองรับเศษอาหารในตอนเย็นเวลา 17.00 น. ซึ่งเป็นเวลาที่ลิงกินอาหารเสร็จเรียบร้อยแล้ว และเก็บปัสสาวะในตอนเช้าเวลา 8.00 น. ในวันถัดไป ในระยะแรกที่ลิงเริ่มตั้งครรภ์วันที่ 1 - 30 เก็บปัสสาวะทุกวันและระหว่างวันที่ 31 - 140 ของการตั้งครรภ์ เก็บปัสสาวะวันเว้นสองวัน และเก็บทุกวันอีกครั้งหนึ่งเมื่อลิงใกล้คลอด คือตั้งแต่วันที่ 141 ของการตั้งครรภ์จนถึงวันคลอด และเก็บทุกวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์หลังคลอด นำปัสสาวะที่ได้ไปปั่นที่ 1,500 rpm. เวลา 5 นาที แล้วเก็บส่วนของปัสสาวะไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียส

จนกว่าจะทำการตรวจหาปริมาณฮอร์โมนและครีเอทีนีน

3. ห้องปฏิบัติการ

ใช้ห้องปฏิบัติการของหน่วยวิจัยไพโรเมต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. สารเคมีและฮอร์โมน

เอธานอลบริสุทธิ์ (Absolute ethanol : Art. 983 E. Merck, Darmstadt
Germany.)

ผงถ่าน (Chacoal reagent : Batch 81/Q WHO RIA Reagent Program)

ครีเอทีนีนบริสุทธิ์ (Creatinine : No. 52552, Deutsche Ware Gemany)

เด็กซ์แทรน (Dextran : Batch 82/83/S WHO RIA Regent Program)

ไดโซเดียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (Disodium hydrogen phosphate No. 10249)

ไดเอทิล อีเทอร์ (Diethyl ether : E. Merck, Darmstadt, Germany)

ไดออกเซน (Dioxane : E. Merch, Darmstadt, Germany)

เจลาติน (Gelatin : Difco Laboratories Detroit Michigan USA.)

กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)

ลิกวิฟลูออ (Liquifluor : No. NEF-903 New England Nuclear
st. Boston, Mass. USA.)

อีสโตริโอล แอนติเซรัม (Oestriol antiserum : Dr.Fortune Kohen Israel)

อีสโตริโอลมาตรฐาน (Oestriol Standard : Dr.Fortune Kohen, Israel)

อีสโตริโอลติดฉลาก กัมมันตรังสีเตรียม (2, 4, 6, 7 ³H-Oestriol :
No. 1357 - 252, 95.4 Ci/mmol. New England Nuclear, Boston, Mass. USA.)

กรดพิคริก (Picric acid : lot 803343, J.T Baker Chemical Co,
Phillipsburg, N.J. 08865)

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride : lot. H 1262 May and Baker Ltd.
Dagenham England)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide : No. 10252, BDH Chemicals
Ltd. Poole England.)

โซเดียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (Sodium dihydrogen phosphate : No.
10245 BDH Chemicals Ltd poole England

ไทโอเมอร์ซอล (Thiomersal : No. T-5152 Sigma Chemical company.
14508, St. LOUIS. USA.)

โทลูอีน (Toluene : Art 8325 E. Merck Darmstadt Germany)

5. เครื่องมือ

เครื่องปั่น (Centrifuge : Refrigerated Model PR-J, International
Equipment Company MASS. USA.)

หลอดคิวเวท (Cuvette : Bausch and lomb)

เครื่องกวน (Magnetic stirrer : S-18520, Thermolyne Corporation
Iowa-USA.)

ไมโคร-รีเปตเตอร์ (Micro-re/petter : Smi Emeryville, Calif 94608
USA.)

ปิเปต (Pipette : Brand, Germany)

ปิเปตแมน (Pipette-man : M.81 Gilson, France)

เครื่องวัดความเป็นกรด - เบส (pH meter : 5987 Cole Parmer Instrument
Company Chicago 111 60648 USA)

รี - ปิเปต (Repipette : 94710, Labindustries Berkeley Ca 94710 USA.)

เครื่องสเปกโตรนิค (Spectronic 20 : No. 33-29-61-64 Baush and Lomb USA.)

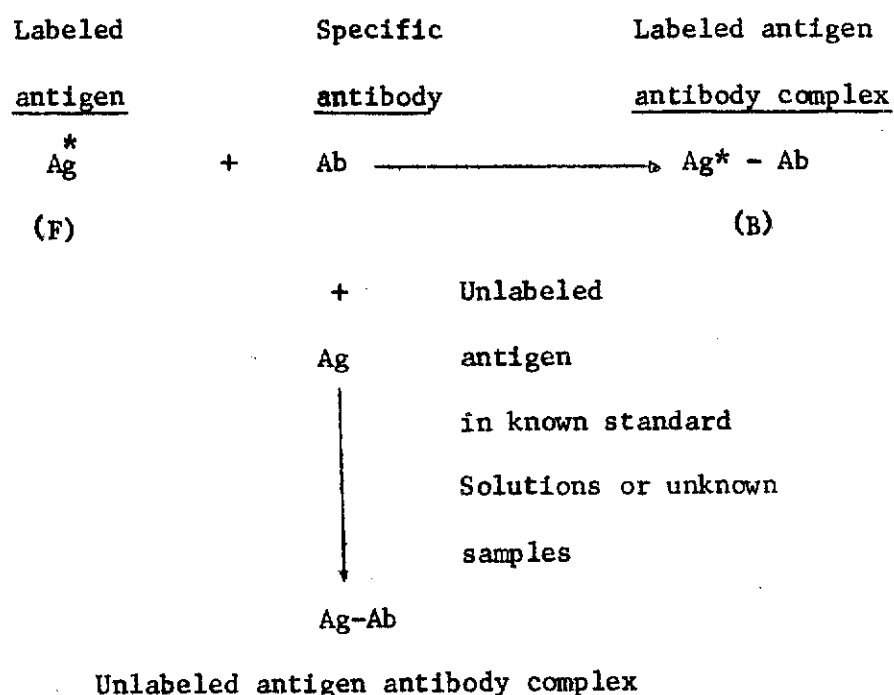
เครื่องวัดรังสีเบตา (B-Liquid Scintillation counter)

ไทรบล็อก (Tri-block : U-460, Techne in corporated Princeton, N.J. 08540 USA.)

เครื่องวอเท็กซ์ Vortex-mixer : M. 16715, Thermolyne Corporation Iowa USA.)

6. การตรวจหาอีส์ตริโอล โดยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์

การตรวจหาอีส์ตริโอล ทำโดยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ (RIA) อาศัยหลักของ RIA ตามวิธีของ Bersen and Yalow (1971) โดยหลักการที่ว่า แอนติเจนที่ต้องการหา ปริมาณกับแอนติเจนยัดติดตัวกันที่ติดฉลาก (Labelled) ด้วยสารกัมมันตรังสีและทราบจำนวน แล้ว แข่งขัน (Competition) กับแอนติบอดีของแอนติเจนที่มีปริมาณคงที่ การหาปริมาณ ของแอนติเจน (อีฮอร์โมนอีส์ตริโอล) ในปัสสาวะ ทำได้โดยการเปรียบเทียบการแย่งจับใน สภาวะที่มีสารตัวอย่างกับการแย่งจับในสภาวะที่มีสารละลายมาตรฐาน สามารถสรุปหลักการ ของ เรดิโออิมมูโน เอสเสย์ ได้ดังนี้ (Berson and Yalow. 1971 : 5)



6.1 สารละลายและวิธีเตรียม

เอสเสย์ บัฟเฟอร์ เอส

เตรียมโดยใช้ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.35 กรัม โซเดียมไฮดรอกไซด์ 11.6 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 8.8 กรัม โซโอมะซอล 0.1 กรัม และเจลาติน 1.0 กรัม ที่ละลายในน้ำอุ่นแล้ว มาละลายในน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร และปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 7.2 - 7.4 เสร็จแล้วนำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 1 เดือน

สารแขวนลอยถ่าน (Charcoal suspension)

เตรียมโดยใช้เตกซ์แทรน 0.0625 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ เอส จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วเติมผงถ่าน 0.625 กรัม บ่มให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้หนึ่งเดือน เวลาจะใช้ต้องนำไปกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดเวลาที่ใช้

เคาท์ทิง โซลูชัน (Counting solution)

เตรียมโดยใช้โทลูอีน 3 ลิตร ลิควิฟอล 128 มิลลิลิตร และไดออกแซน 600 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

สารละลายอีส์ตริโอดติดสลาไก้มันตรังสีเตรียม

เตรียมโดยใช้อีส์ตริโอดติดสลาไก้มันตรังสีเตรียมที่มีความแรง 10 ไมโครคูรี ต่อ 1 มิลลิลิตร จำนวน 250 ไมโครลิตร เป่าให้แห้งด้วย คอมเพรสเซอร์ แอร์ แล้วเติม บัฟเฟอร์ เอส จำนวน 13 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก็จะได้สารละลายที่มี specific activity 192.23 pCi/assay tube

สารละลายแอนติเซรัมของอีส์ตริโอด

เตรียมโดยใช้ แอนติเซรัมของอีส์ตริโอด 100 ไมโครลิตร (1 : 2) เก็บไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเติมบัฟเฟอร์ เอส ให้ครบ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ก็จะได้ แอนติเซรัมของอีส์ตริโอด เติบลงในอัตราส่วน 1 : 200 สำหรับใช้ในตอนทดสอบ

สารละลายอีลัตริโกลมาตรฐาน

เตรียมโดยใช้อีลัตริโกล 1 มิลลิกรัมละลายในเมธานอลบริสุทธิ์ 2 มิลลิตร จากนั้นเป่าให้แห้งด้วย คอมเพรสเซอร์ แอร์ แล้วทำเป็นสารละลายในบัฟเฟอร์ เอลส์ จนมีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม ต่อ 500 ไมโครลิตร จัดเป็น stock solution ใช้เปิดดูดสารละลายจาก stock solution จำนวน 500 ไมโครลิตร รวมกับบัฟเฟอร์ 4.5 ไมโครลิตร ก็จะได้สารละลายอีลัตริโกลมาตรฐานความเข้มข้น 1,000 พิโคกรัม ต่อ 500 ไมโครลิตร จัดเป็นสารละลาย B จากนั้นทำ serial dilution ให้มีความเข้มข้น 7.8 - 1,000 พิโคกรัม ต่อ ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ เอลส์

ตาราง 1 แสดงวิธีเตรียมสารละลายอีลัตริโกลมาตรฐานจากสารละลาย B

สารละลาย ที่ต้องการ	สารละลายที่ใช้ผสม		บัฟเฟอร์เอลส์ ที่ใช้ผสม(มล.)	ความเข้มข้นของ อีลัตริโกลมาตรฐาน (พิโคกรัมต่อ 0.5 มล.)
	ชื่อสารละลาย	ปริมาณ (มล.)		
B	Stock solution	.05	4.5	1,000
1	B	2	2	500
2	1	2	2	250
3	2	2	2	125
4	3	2	2	62.5
5	4	2	2	31.2
6	5	2	2	15.6
7	6	2	2	7.8

6.2. วิธี ทำเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ของอีลัสโตริโอล

ปริมาณของอีลัสโตริโอลในปัสสาวะ หาโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ ตามวิธีการของ WHO (WHO. 1981 : 38 - 42) และมีการเปลี่ยนแปลงให้เหมาะสม ซึ่งมีวิธีการดังนี้ คือ

1. ใช้ตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองรูปกรวย และเติมไดเอธิล อีเทอร์ 5 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องวอร์เทกซ์นาน 1 นาที แล้วทิ้งไว้ให้แยกชั้นประมาณ 5 - 10 นาที แล้วแยกชั้นน้ำออกจากชั้นอีเทอร์ โดยแยกลงในภาชนะที่มีน้ำแข็งแห้งปนกับ เอธิล แอลกอฮอล์ รินส่วนของอีเทอร์ซึ่งสกัดเอาอีลัสโตริโอลออกมาแล้ว ลงในหลอดทดลอง นำไปทำให้แห้งด้วยไทรบลิค อีเทอร์ อุณหภูมิ 55 - 60 องศาเซลเซียส
2. นำส่วนแห้งมาละลาย โดยใช้ปิเปตเติมฟิฟเฟอร์ เอส จำนวน 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน 10 วินาที โดยใช้วอร์เทกซ์ ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วผสมอีกครั้งหนึ่ง
3. เติมแอนติเซรัมของอีลัสโตริโอล จำนวน 100 ไมโครลิตร และอีลัสโตริโอล ติดสลาไก้มันตรึงอีลัสโตริโอล จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 - 24 ชั่วโมง
4. เติมสารแขวนลอยถ่านที่เป็นและปั่นตลอดเวลา จำนวน 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่วางบนภาชนะน้ำแข็ง วอร์เทกซ์ แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที รินส่วนใสลงใน counting vials จากนั้นเติมเคาทิง โซลูชัน 5 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเข้าเครื่องตรวจวัดรังสี

6.3 การควบคุมมาตรฐานวิเคราะห์อีลัสโตริโอลในปัสสาวะ (Quality control)

โดยนำตัวอย่างปัสสาวะของลิงเพศเมีย ระหว่างรอบประจำเดือน มา 6 หลอด หลอดละ 200 ไมโครลิตร มาทำการวิเคราะห์ตั้งแต่ขั้นสกัด

6.4 กราฟมาตรฐาน

ทำโดยนำอีลัสโตริลมาตรฐานที่มีปริมาณ 7.8 - 1,000 พิโคกรัม ต่อ 500 ไมโครลิตร อย่างละ 500 ไมโครลิตร จำนวน 3 หลอด มาทำการวิเคราะห์ตามวิธีการ ตั้งแต่ขั้นที่ 3 ของหัวข้อ 6.2

6.5 การเตรียมหลอดทดลอง เป็นเอลป์ แมกซิมัม บายดิง เคาท์ และ แบลิงค์

หลอดเป็นเอลป์ (Non specific binding tube)

เตรียมโดยเติมฟเฟอร์เอล 600 ไมโครลิตร และ สารกัมมันตรังสีเตรียม 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน จากนั้นก็ทำตามวิธีการตั้งแต่ขั้นที่ 4 ของหัวข้อ 6.2 หลอดนี้ทำขึ้นเพื่อดูว่ามี non - specific binding หรือว่ามี second antibody หรือไม่

แมกซิมัม บายดิง เคาท์ (Maximum binding count)

เตรียมได้โดยเติมฟเฟอร์เอล 500 ไมโครลิตร สารกัมมันตรังสีเตรียม 100 ไมโครลิตร และแอนติเซรัมของอีลัสโตริล 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย วอร์เทกซ์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน จากนั้นก็ทำตามวิธีการตั้งแต่ขั้นที่ 4 ของหัวข้อ 6.2

แบลิ่งค์ (Blank)

เตรียมโดยการเติมเคาท์กึ่ง ไซล่อน 5 มิลลิลิตร ลงในไวแอล แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณสารกัมมันตรังสี หลอดนี้ทำขึ้นเพื่อดูว่าเคาท์กึ่ง ไซล่อน และไวแอลมีสารกัมมันตรังสีหรือไม่

6.6 ประสิทธิภาพการสกัด (Recovery)

ทำได้โดยใช้ปิเปตแมนดูดตัวอย่างปลั้วละ 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จำนวน 4 หลอด จากนั้นเติม อีลัสโตริลติดสลาบกัมมันตรังสีเตรียม จำนวน 50 ไมโครลิตร

ลงทุกหลอด เขย่าด้วยเครื่องให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วนำไปสกัดด้วยอีเทอร์ เช่นเดียวกับตัวอย่างอื่น ๆ จนได้ส่วนที่แห้ง นำส่วนที่แห้งละลายใหม่ โดยเติม บัฟเฟอร์ เอส 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า ใช้ปิเปตแมนดูดเพียง 250 ไมโครลิตรลงในไวแอล เพื่อหาปริมาณสารกัมมันตรังสี โดยหลอดนี้ทำขึ้นเพื่อหาความแม่นยำของวิธีการวัด ซึ่งพบว่า ความแม่นยำของการวัดขึ้นอยู่กับ ความเที่ยงตรงในการวัด และความจำเพาะในการวัด ในการทดลองครั้งนี้จะหาจากประสิทธิภาพการสกัด

6.7 การหาความเข้มข้นของแอนติเซรัมที่เหมาะสมในการวัด อิเล็กโตรโอส

หาได้โดยการนำแอนติเซรัมของอิเล็กโตรโอส ที่ได้จาก Dr. F. Kohen จาก Weizmann Institute of Science, Israel มาทำ antibody dilution curve เพื่อเลือกแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นเหมาะสมที่สุดมาใช้วัดอิเล็กโตรโอส ในปลั้ววาระ โดยความเข้มข้นของแอนติบอดีในหลอดทดลองแต่ละชุดเท่ากับ 1 : 100, 1 : 200, 1 : 250, 1 : 400, 1 : 500 และ 1 : 800 มาทำปฏิกิริยากับอิเล็กโตรโอสติดสลายกัมมันตรังสี ตรีเตียม ปริมาณคงที่ นำผลการทดลองมาเขียนกราฟ $\frac{B}{T}$ กับความเข้มข้นของแอนติบอดี โดย B = bound complex และ T = จำนวนกัมมันตรังสีที่เดิมลงในหลอดทดลอง โดยพบว่า % bound จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแอนติบอดี ซึ่งมักจะเลือกความเข้มข้นของแอนติบอดี ที่สามารถจับกับแอนติเจนที่ติดสลาย สารกัมมันตรังสีได้ 40 - 60% ซึ่งเป็นช่วง ที่ให้ความเที่ยงตรง (precision) และความไว (sensitivity) ในการวัดปริมาณ ได้ดีที่สุด

6.8 การหาวิธีการทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีการวัดปริมาณอิเล็กโตรโอส

ในการทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีการทดลองแต่ละวิธีนั้น ควรมีการทดสอบ ความจำเพาะ (specificity) ความเที่ยงตรง (precision) ความแม่นยำและ ความไว (sensitivity) ในการวัดปริมาณ เพื่อเป็นเครื่องชี้ว่าวิธีการนั้น ๆ มีความเชื่อถือได้เพียงไร เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น ๆ

6.8.1 การหาความจำเพาะของแอนติบอดี

เป็นความสามารถของวิธีการวัด ที่มีความจำเพาะต่อสารที่ต้องการจะหาเท่านั้น โดยทั่วไปสเลเตอร์รอยด์ที่จะนำมาหา cross - reaction มักเลือกจากสเลเตอร์รอยด์ที่มีปริมาณมาก ๆ ในปัสสาวะ และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายคลึงกับอีลัสโตริโอล ในการทดลองครั้งนี้ จะใช้ E_1 และ E_2 ซึ่งจะทำให้การทดลองเป็นเดียวกันกับการหามาตรฐานของอีลัสโตริโอล โดยมีความเข้มข้นตั้งแต่ 7.8 - 2,000 พิโคกรัม ต่อ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำผลที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวกับความเข้มข้นของ สเลเตอร์รอยด์ที่ต้องการทดสอบ จากนั้นคำนวณหาค่าความจำเพาะของแอนติเซรัม ของอีลัสโตริโอล (% Cross - reaction) ตามวิธีการของ Abraham (1969 : 866)

$$\% \text{ Cross reaction} = \frac{X \times 100}{Y}$$

X = เป็นปริมาณความเข้มข้นของอีลัสโตริโอลที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐานของอีลัสโตริโอล เมื่อเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวกับ 50 เปอร์เซ็นต์

Y = เป็นปริมาณความเข้มข้นของ E_1 และ E_2 ที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐานของสเลเตอร์รอยด์ตัวนั้น เมื่อเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวกับ 50 เปอร์เซ็นต์

6.8.2 การหาความเที่ยงตรงของการวัด

เป็นการวัดของอย่างเดียวกันหลาย ๆ ครั้ง ค่าที่ได้จะใกล้เคียงกันโดยให้ทดสอบความเที่ยงตรงของการทดลองหลาย ๆ ครั้ง แล้วหาความเที่ยงตรงจากเปอร์เซ็นต์ของสัมประสิทธิ์ของความแปรเปลี่ยน ซึ่งสามารถทดสอบได้โดย ทำการตรวจวัดปริมาณของอีลัสโตริโอล จากตัวอย่างที่ใช้ควบคุมมาตรฐาน (Q.C) - ซึ่งนำมาจากปัสสาวะของลิงตัวเมีย ในระหว่างรอบประจำเดือน (pool urine)

6.8.3 การหาความไวของการวัดปริมาณ

เป็นความไวที่จะตรวจพบฮอร์โมนที่มีจำนวนน้อยที่สุดได้ ในการทดลองครั้งนี้ ทดสอบความไวของการวัดปริมาณอีลัสโตริโอลโดยการนำค่าอีลัสโตริโอลมาตรฐานของแต่ละความเข้มข้น มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยว (% binding) นำค่าเฉลี่ยที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานความไวของวิธีการวัดอีลัสโตริโอล อ่านได้จากเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวของหลอดที่ไม่ได้เติมอีลัสโตริโอลมาตรฐานที่ -2 SD

วิธีหาครีเอตินิน

ปัสสาวะที่จะนำไปหาปริมาณของอีลัสโตริโอล จะต้องนำมาหาปริมาณของครีเอตินินเสียก่อน เพื่อที่จะทราบจำนวนปัสสาวะที่ถึงขับออกมาในแต่ละวัน โดยอาศัยหลักการที่ ครีเอตินินจะถูกขับออกมากับปัสสาวะในปริมาณที่คงที่ในแต่ละวัน เมื่อครีเอตินิน ไปทำปฏิกิริยากับกรดพิกริกในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะให้สารละลายสีแดง (Jaffe reaction) ซึ่งเป็นเครื่องบ่งชี้ถึงปริมาณของครีเอตินินในปัสสาวะนั้น (Greenwald. 1928 : 539)

สารละลายและวิธีเตรียม

1. กรดพิกริก .036 M. เตรียมโดยชั่งกรดพิกริกบริสุทธิ์จำนวน 8.25 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 500 มิลลิลิตร คนให้ละลายโดยใช้ความร้อนช่วย ทำให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาลเก็บที่อุณหภูมิห้อง
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.4 N. เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จำนวน 56 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางให้ครบ 100 มิลลิลิตร
3. กรดไฮโดรคลอริก .1 N. เตรียมโดยละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 36% ในน้ำ 100 มิลลิลิตร

4. ครีเอตินีนมาตรฐาน เตรียมโดยละลายครีเอตินีน จำนวน 13.2 มิลลิกรัม ใน กรดไฮโดรคลอริก .1 N. แล้วเจือจางให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง :

การหาครีเอตินีนในปัสสาวะ

ใช้วิธีที่อาศัยหลักการของ Jeffe reaction ซึ่งดัดแปลงตามแบบของโอเวน และคณะ (Owen and others. 1954 : 426) ทำได้โดย

1. นำปัสสาวะมาเจือจาง

Reagent blank : 3.0 ml. H₂O

Standard : 2.9 ml. H₂O + 0.1 ml. standard

Unknown sample : 3.0 ml. 1 : 200 dilution urine

2. ใส่ 1 มิลลิลิตรของกรดพิคริก ในทุกหลอดผสมให้เข้ากัน

3. ใส่ 0.5 มิลลิลิตรของ 1.4 N. NaOH ในหลอดทดลองที่ 1 และเว้นเวลา 1 นาที แล้วใส่ 0.5 มิลลิลิตรของ 1.4 N. NaOH ในหลอดต่อไป

4. พอลบ 15 นาทีหลังจากใส่ NaOH อ่านค่าการดูดแสงที่ 500 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณ

$$\text{mg. Creatinine/ml. urine} = \frac{AX}{AS} \times 0.132 \times 0.1 \times \frac{1}{0.015}$$

AX = ค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากตัวอย่างที่ไม่ทราบค่า

AS = ค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากสารละลายครีเอตินีนมาตรฐาน

5. ปริมาณของครีเอตินีนที่ขับออกมาใน 24 ชั่วโมง ของแต่ละตัวอย่าง

mg. Creatinine/ml. urine (24 hr. urine)

$$= \frac{AX}{AS} \times 0.132 \times 0.1 \times \frac{1}{0.015}$$

24 hr. Creatinine = mg. Creatine (24 hr. urine) × Volume
of 24 hr. urine

6. ปริมาณของปัสสาวะที่ขับออกมาใน 24 ชั่วโมงของแต่ละตัวอย่าง
คำนวณได้จาก

$$24 \text{ hr. urine} = \frac{24 \text{ hr. Creatinine}}{\text{mg. Creatinine/ml. Urine}}$$

การวิเคราะห์ผลจากเรดิโออิมมูโนเอสเสย์

1. นำค่าที่ได้จากการตรวจนับรังสีต่อนาที (count per minute = cpm) มาหาค่าเฉลี่ยทั้งที่ทำแบบ 2 ชุด (duplicate) หรือ 3 ชุด (triplicate)
2. นำค่าของ NSB ไปลบออกจากทุกค่าที่อ่านได้จากเครื่องตรวจนับรังสี ยกเว้น blank, recovery, total count recovery และ total count.
3. คำนวณค่า cpm. ของ B_0 - tube ว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยว (% binding) เป็นเท่าไรเมื่อเทียบกับ Total count จากสูตร

$$\% \text{ cpm bound} = \frac{\text{cpm bound For } B_0 \text{ tube} \times 100}{\text{total cpm}} = \frac{B_0}{T} \%$$

4. คำนวณเพื่อเขียนกราฟมาตรฐาน (standard) โดยนำค่า cpm ที่อ่านจากแต่ละชุดตั้งแต่ 7.8 - 1,000 พิโคกรัมต่อ 500 ไมโครลิตร มาหาเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยว โดยเทียบจาก cpm ที่เป็น 100 เปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยว (B_0 - Tube) และนำเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวที่คำนวณได้ มาเขียนกราฟมาตรฐาน โดยใช้กระดาษกราฟ semilogarithm

% cpm. bound for standard

$$= \frac{\text{cpm. bound for standard} \times 100}{\text{cpm. bound for } B_0 \text{ tube}} = \frac{B}{B_0} \%$$

5. ตัวอย่างที่ไม่ทราบค่า (unknown samples) ฝากค่า cpm ของตัวอย่างที่ไม่ทราบค่าทั้งหมดมาคิดหาเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยว โดยเทียบจาก cpm ที่เป็น 100 เปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยว (B_0 - Tube) จากสูตร

% cpm bound for sample

$$= \frac{\text{cpm bound for samples tubes} \times 100}{\text{cpm. bound for } B_0 \text{ - tube}} = \frac{B}{B_0} \%$$

6. ความเข้มข้นของสเตอรอยด์ฮอร์โมน หาได้จากการเทียบเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวของแต่ละตัวอย่างที่ไม่ทราบค่าจากกราฟมาตรฐาน จากนั้นคำนวณค่าที่แท้จริงของฮอร์โมน ต่อมิลลิลิตรของปัสสาวะ

x 5 ถ้าปริมาตรของปัสสาวะที่นำมาสกัด 200 ไมโครลิตร

แล้วหารด้วยเปอร์เซ็นต์ของประสิทธิภาพการสกัด (R) หาได้จากสูตร

$$\frac{\text{mass determined from curve}}{\% \text{ Recovery}} \times \text{volume correction}$$

$$= \text{mass/ml.}$$

7. ความเข้มข้นของสเตอรอยด์ฮอร์โมนต่อปัสสาวะ 24 ชั่วโมง หาได้จาก

$$\text{mass/ml.} \times 24 \text{ hr. urine}$$

$$= \text{mass/24 hr. urine}$$

บทที่ 3

ผลการทดลอง

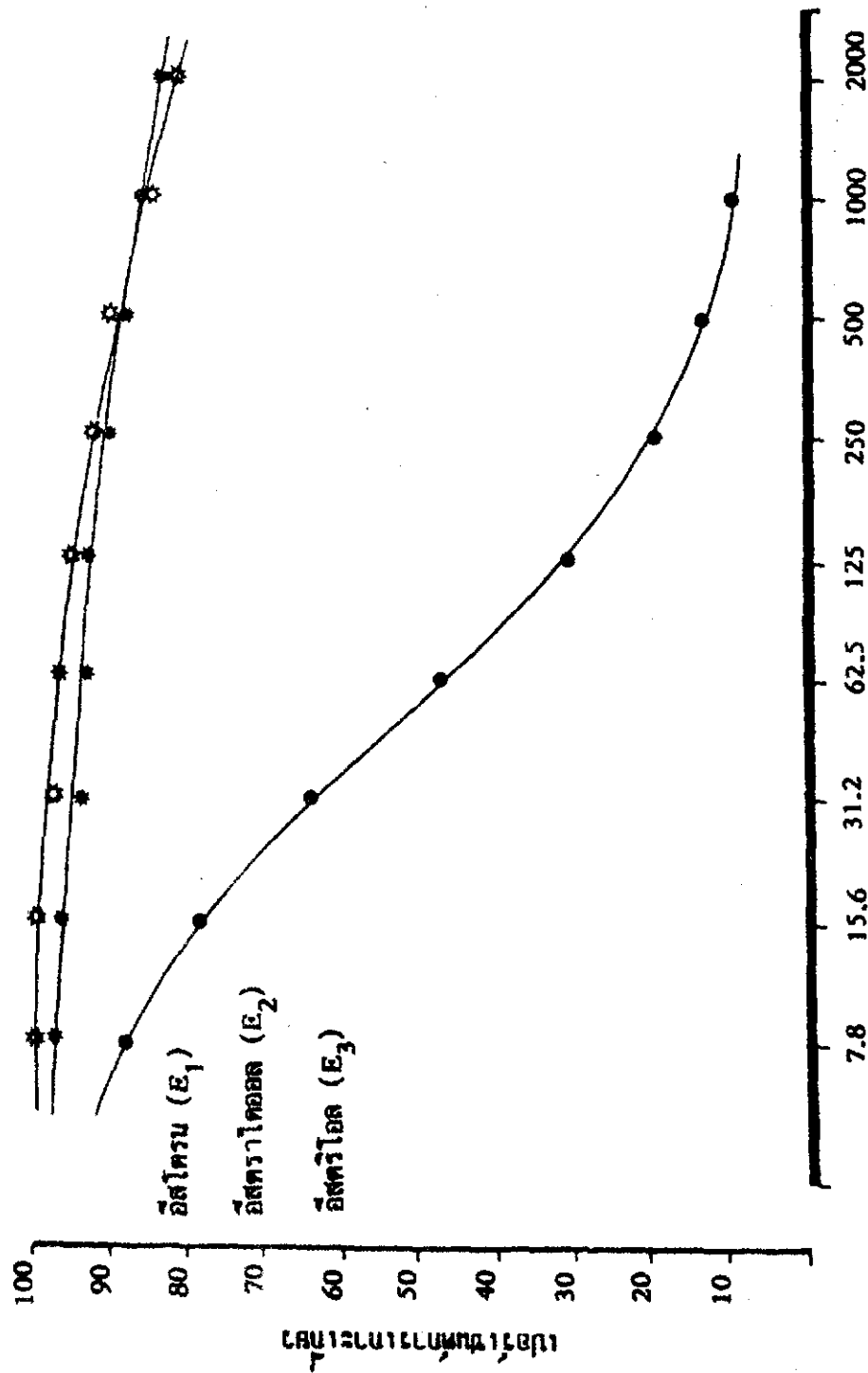
1. การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีการวัดปริมาณอีลัตรีโวล

จากผลของการทดลอง พบว่า ความเชื่อถือได้ของวิธีการวัดปริมาณอีลัตรีโวล ความจำเพาะของแอนติบอดี พบว่า เกิด cross - reaction กับ E_1 และ E_2 น้อยมากเพียง 0.04 และ .007 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพประกอบ 4) ความแม่นยำของวิธีการวัดซึ่งหาได้จากประสิทธิภาพการสกัดเท่ากับ 80 - 85 เปอร์เซ็นต์ ความไวของวิธีการวัดปริมาณอีลัตรีโวลเท่ากับ 19 พิโคกรัมต่อ 0.5 มิลลิลิตร (ภาพประกอบ 5) และความเที่ยงตรงของวิธีการวัดจะมีสัมประสิทธิ์ของความแปรเปลี่ยนของการวัดวันเดียวกัน (Intraassay) และการวัดต่างวัน (Interassay) เท่ากับ 7.23 และ 14.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าการทดลองครั้งนี้ เลือกแอนติบอดีที่มีความเข้มข้น 1 : 200 ซึ่งจะมีอัตราส่วน $\% \frac{B}{T} = 48 \%$ (ภาพประกอบ 6)

2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณอีลัตรีโวลในปัสสาวะถึงขณะตั้งครรภ์

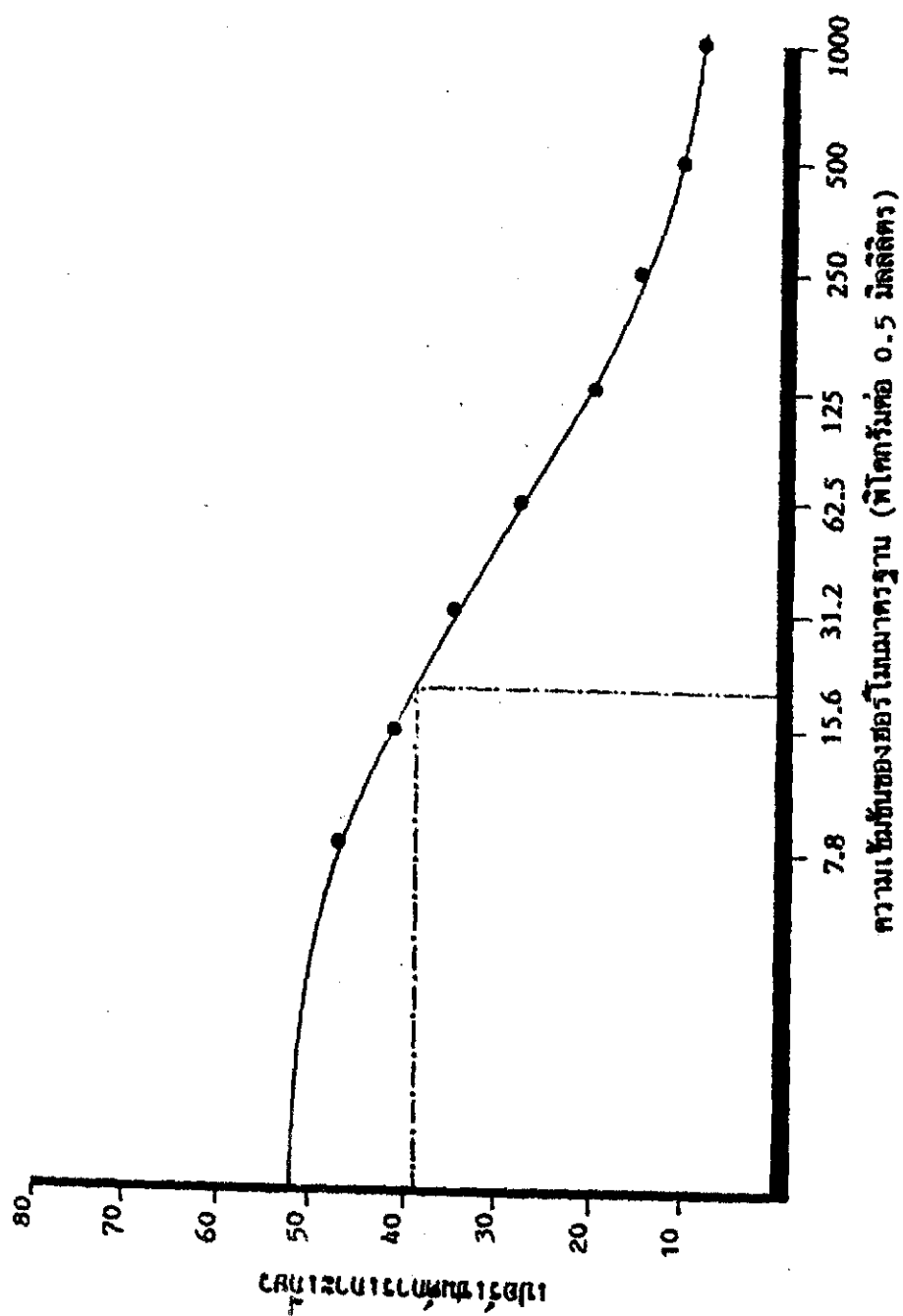
ลิงเพศเมียที่นำมาทดลองมีรอบประจำเดือนเฉลี่ย 31 ± 3 วัน และเวลาตั้งครรภ์เฉลี่ย 165 ± 5 วัน โดยระดับของอีลัตรีโวลวิเคราะห์โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานอีลัตรีโวล ที่ประกอบด้วยอีลัตรีโวลมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ คือ 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500 และ 1,000 พิโคกรัม ต่อ 500 มิลลิลิตร (ภาพประกอบ 7) ซึ่งมีสัมประสิทธิ์ของการแปรเปลี่ยนของการวัดวันเดียวกัน และการวัดต่างวันเท่ากับ 2.44 และ 7.23 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ปริมาณของอีลัตรีโวลอิสระในลิงหางยาว เบอร์ 102, 60, 94, 63 และ 82 ในระหว่างการตั้งครรภ์ แสดงในภาพประกอบที่ 8A, B, C, D และ E ตามลำดับ

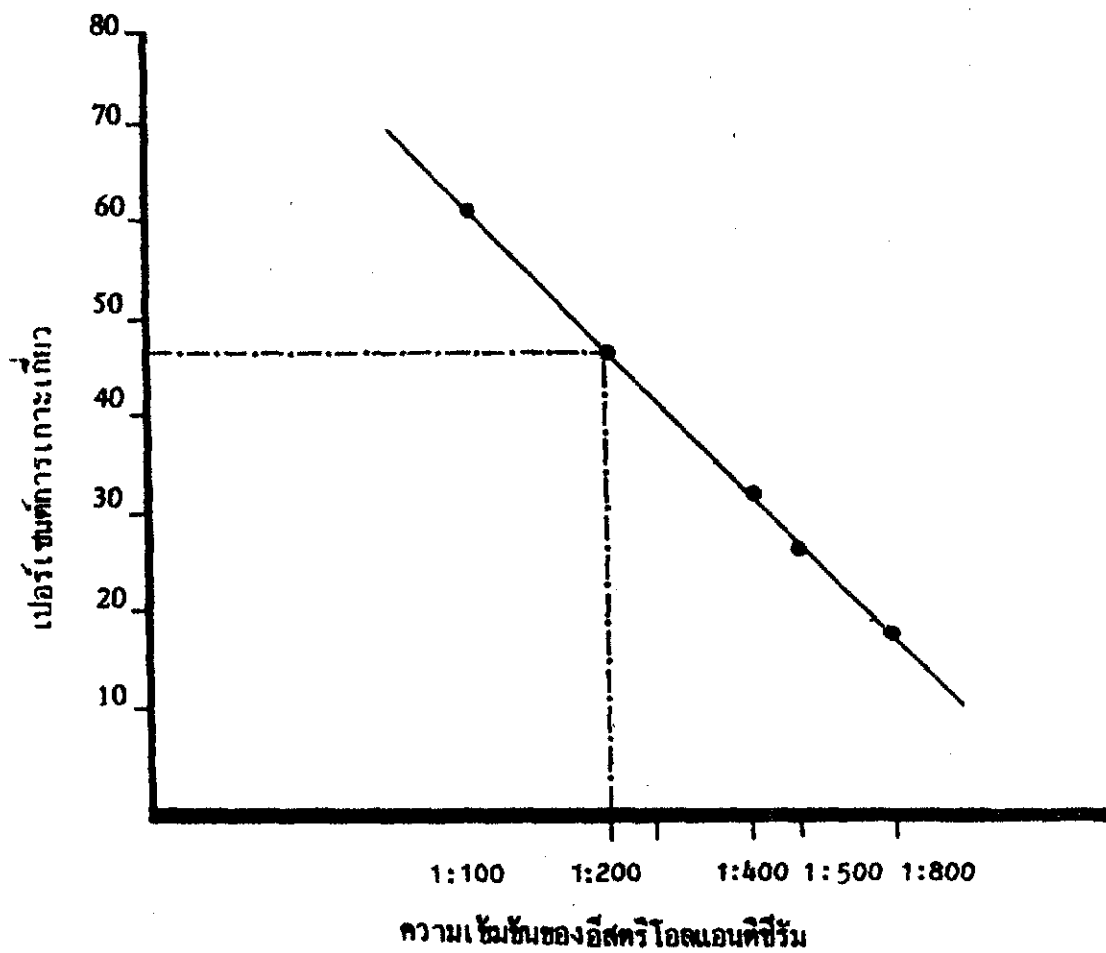


ภาพประกอบ 4 ความจำเพาะของอีสรูทอนไคออลที่มีต่ออีสรูทอน, อีสรูทอนไคออลและอีสรูทอนมาตรฐาน

ความเข้มข้นตั้งแต่ 7.8-2000 โมลลิตรต่อ 0.5 มิลลิตร

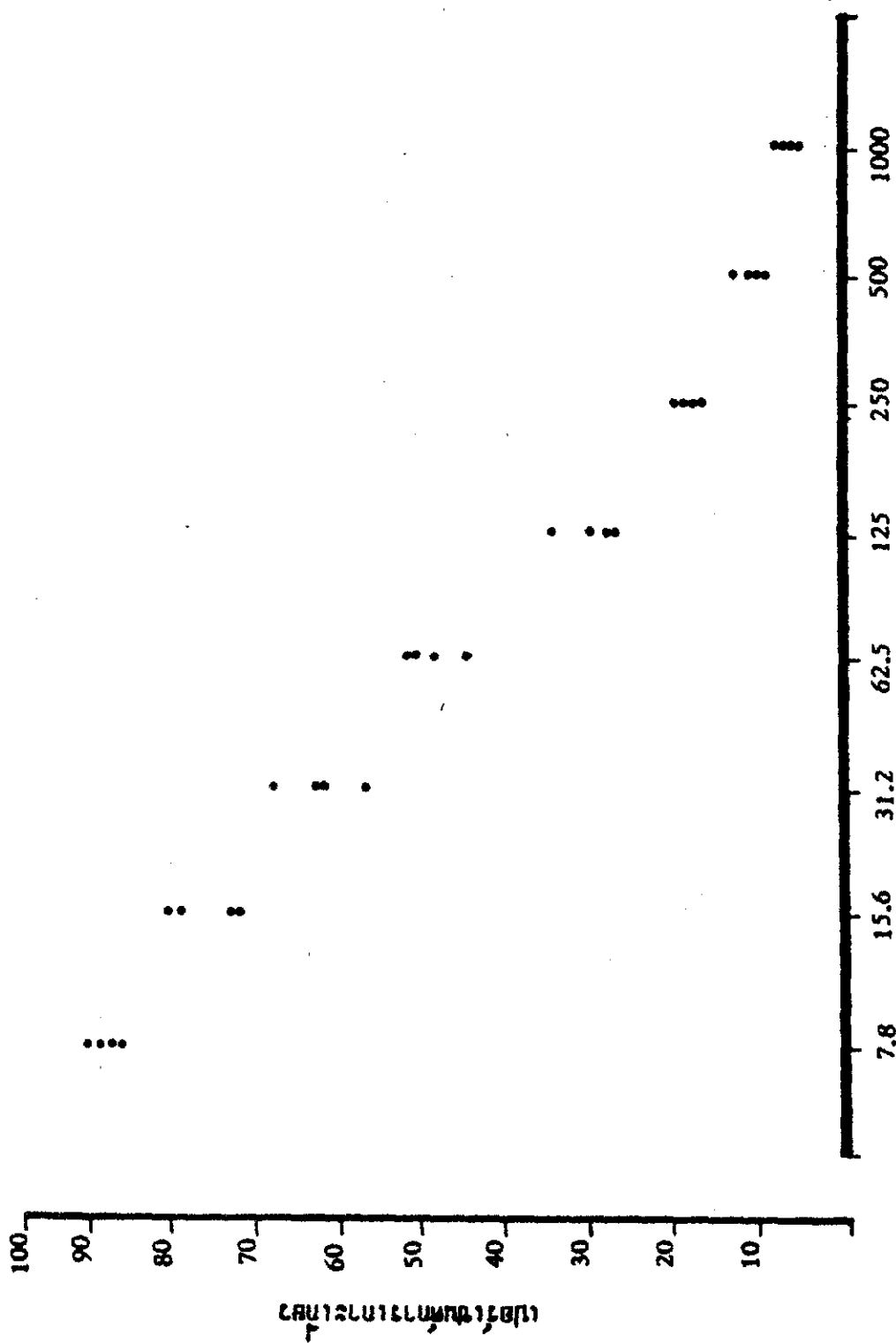


ภาพประกอบ 5 กราฟมาตรฐานของอีสเตอร์ โอล ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 7.8-1000 พีโกลัมต่อ 0.5 มิลลิกรัม โดยมีความไวของวิธีวัด = 19 พีโกลัมต่อ 0.5 มิลลิกรัม



ภาพประกอบ 6 แสดงปฏิกิริยาการตอบสนองของอีสทรีโกลแอนติซีรัม ความเข้มข้น

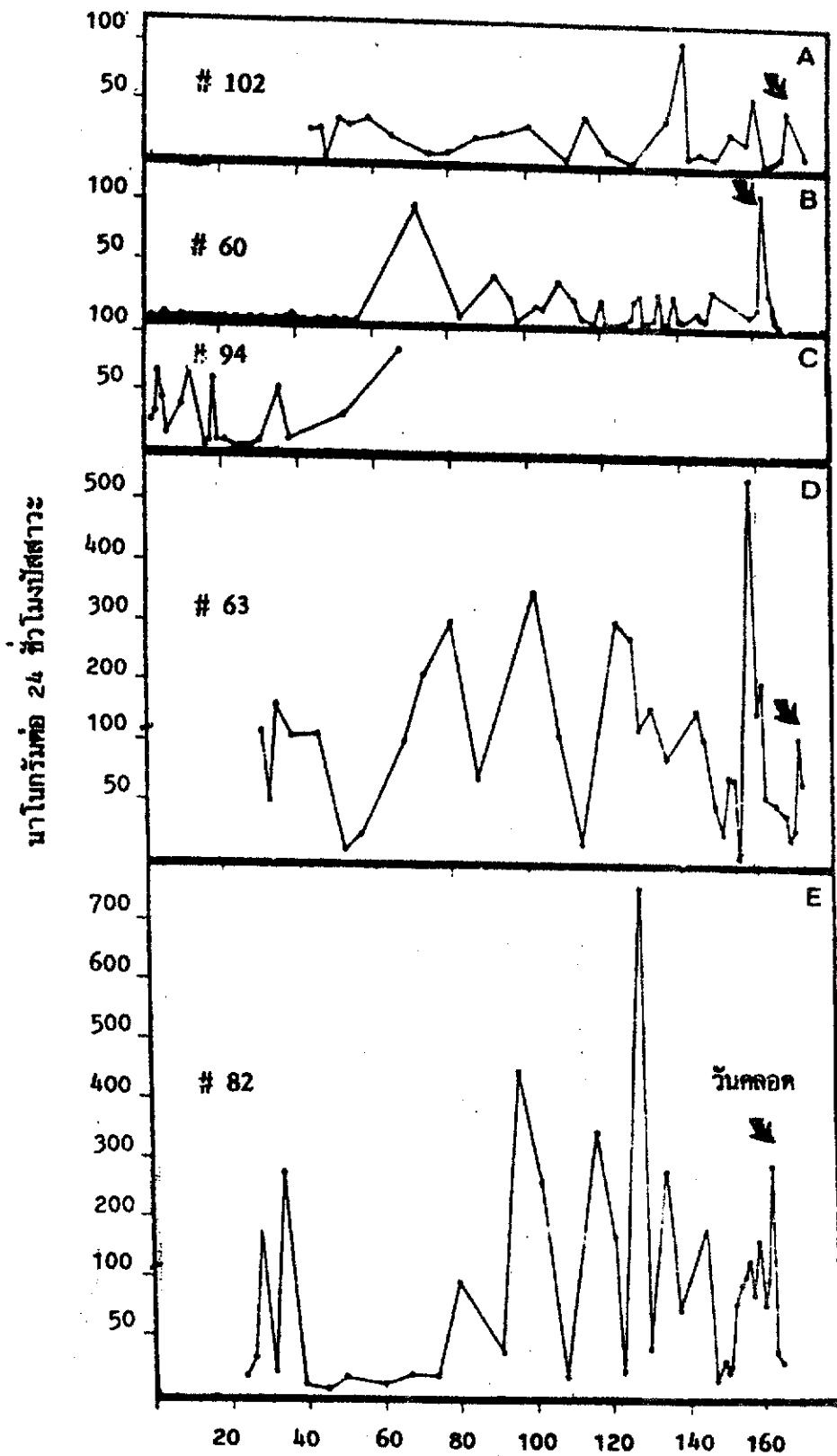
ค่า ๑ กับกับ อีสทรีโกลคัสลากันมันครึ่งสี่ครึ่งเตรียมปริมาณคงที่



ความเข้มข้นของสารอินมาพรฐาน (พีโคกรัมต่อ 0.5 มิลลิตร)

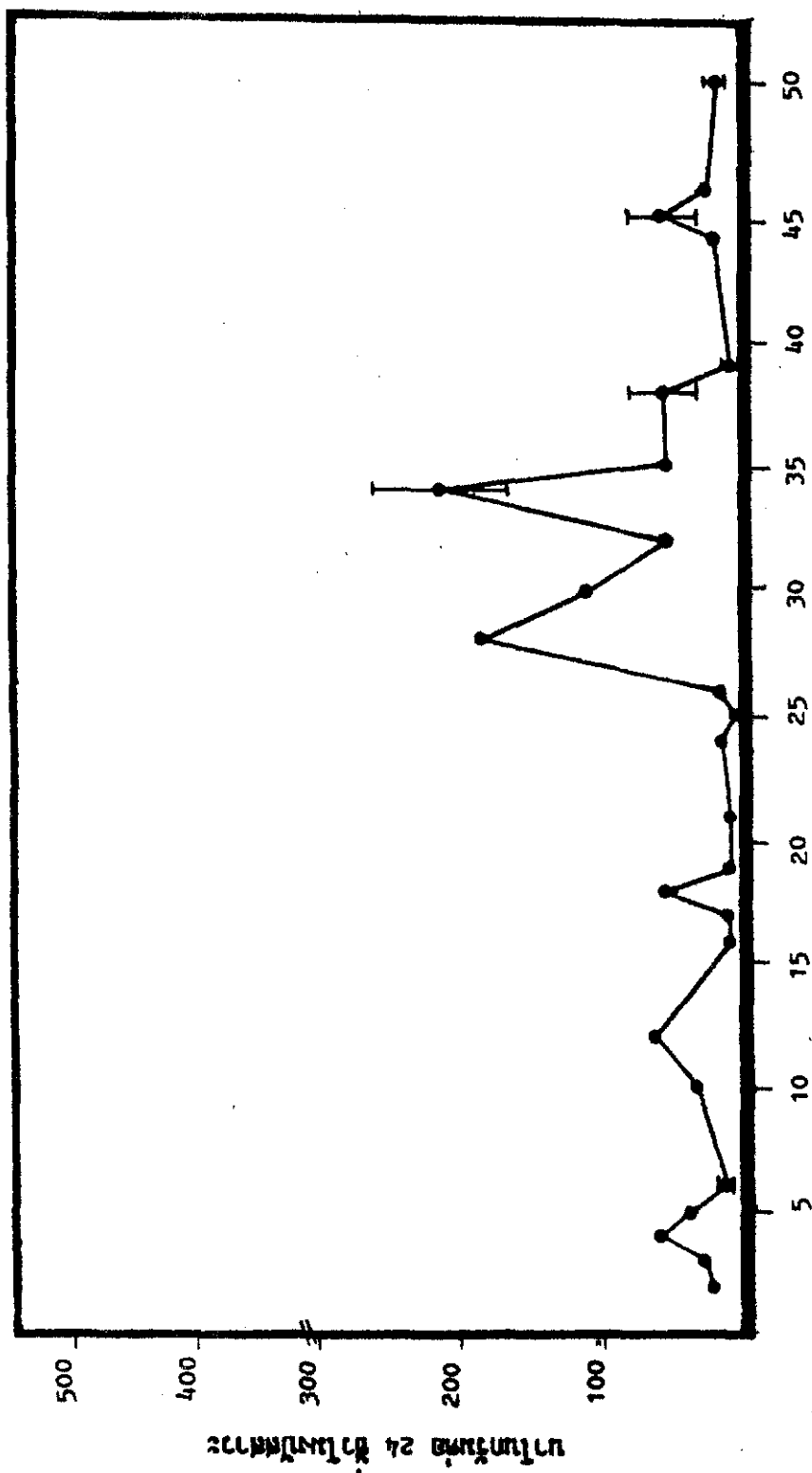
ภาพประกอบ 7 กราฟมาตรฐานของอีส์ทีโคไลความเข้มข้นตั้งแต่ 7.8-100 พีโคกรัมต่อ 0.5 มิลลิตร

โดยมีความไวของวิธีวัด = 19 พีโคกรัมต่อ 0.5 มิลลิตร

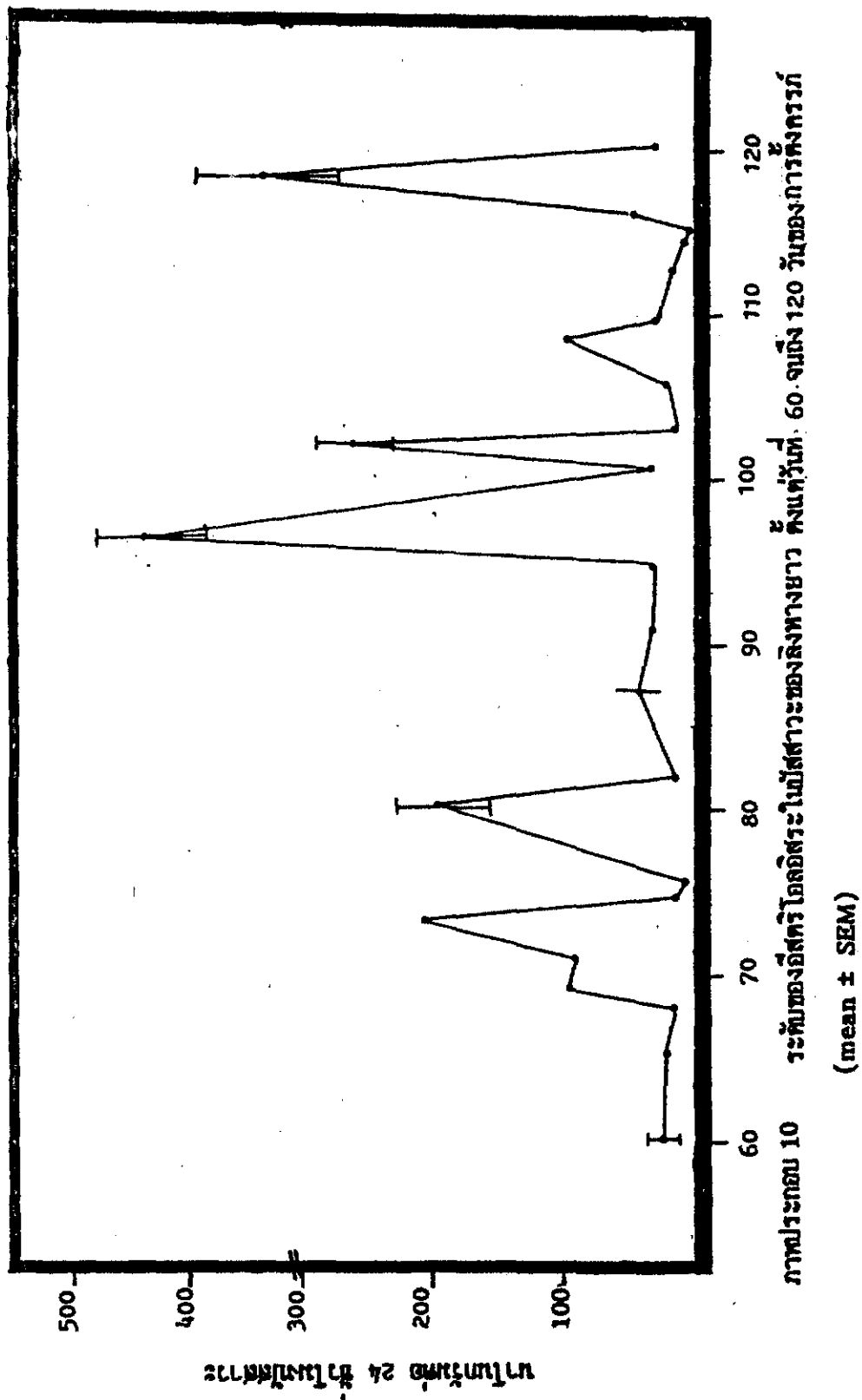


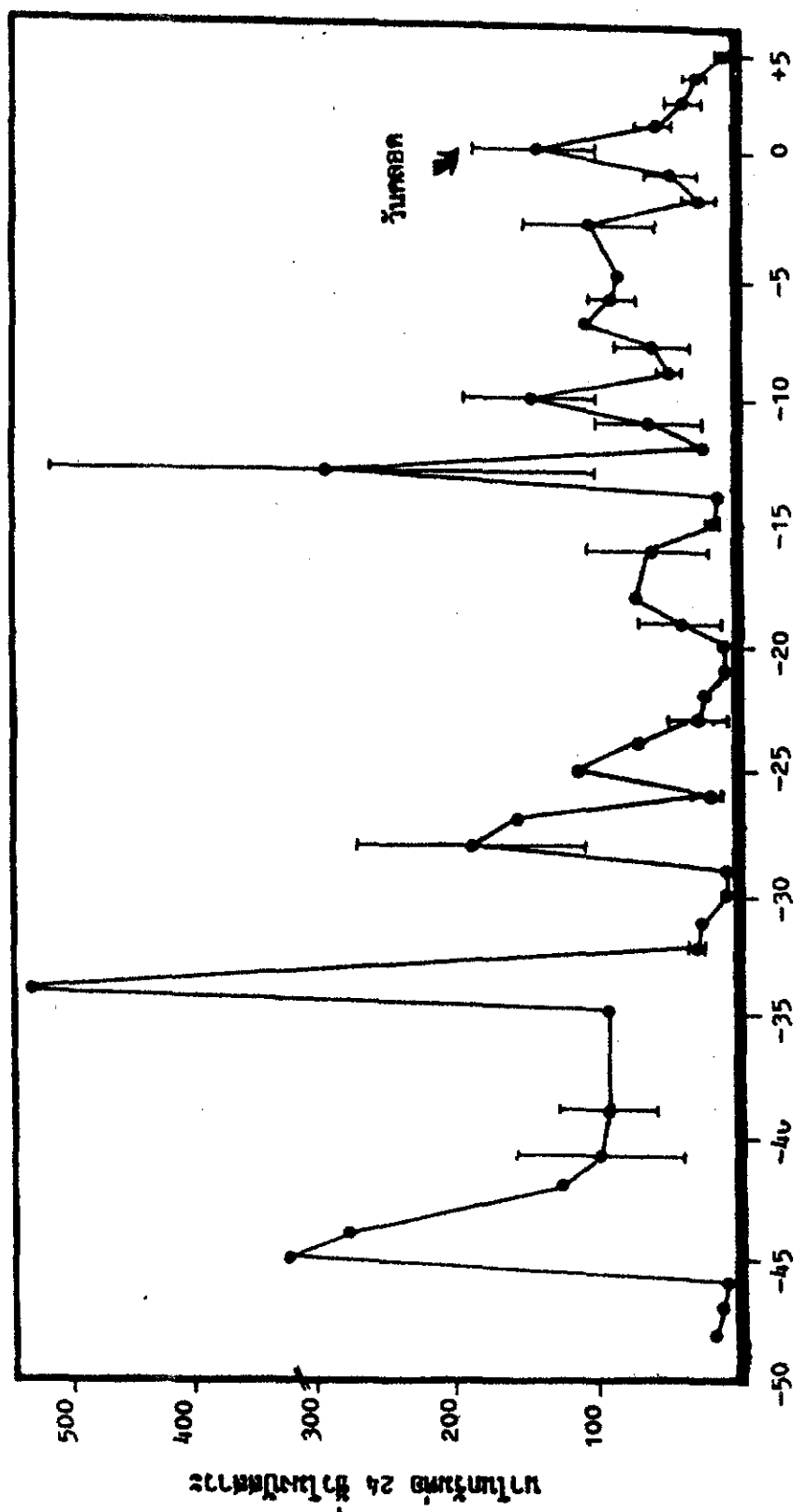
ภาพประกอบ 8 ระดับของอีสตรดิโอลอิสระในปัสสาวะของหญิงทางยาว
จำนวน 5 ตัว ตั้งแต่รับปฏิสนธิ ถึง 1 สัปดาห์ของการให้นม

พบว่า ในลิงทุกตัวในระยะ 25 วันแรกหลังการผสมพันธุ์ ซึ่งเป็นระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวระยะฝังตัว และระยะ มีการสร้างรกใหม่ ๆ ปริมาณอีลัสโตริโอลจะอยู่ในระดับต่ำกว่า 100 นาโนกรัมต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ลิงเบอร์ 60 จะมีปริมาณของฮอร์โมนอยู่ในระดับต่ำมาก ประมาณ 3 นาโนกรัมต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะ จากนั้น ระดับของฮอร์โมนอีลัสโตริโอลก็จะเพิ่มสูงขึ้นในระยะ 25 - 35 วันหลังการผสมพันธุ์ โดยเฉพาะ ลิงเบอร์ 63 และเบอร์ 82 จะเพิ่มสูงถึง 160 นาโนกรัมต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะ และ 280 นาโนกรัมต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะตามลำดับ ในช่วงกลางของการตั้งครรภ์ นับตั้งแต่วันที่ 60 - 120 ของการตั้งครรภ์ ระดับของฮอร์โมนอีลัสโตริโอลจะมีระดับเพิ่มสูงมากถึง 300 - 800 นาโนกรัมต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ลิงเบอร์ 63 และ 82 จะมีปริมาณการตรวจพบฮอร์โมนตัวนี้มากกว่าลิงเบอร์ 60 และเบอร์ 102 ประมาณ 4 - 8 เท่า ซึ่งพบว่าเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของฮอร์โมนในระหว่างช่วงแรกของการตั้งครรภ์ (0 - 60 วันหลังการผสมพันธุ์) กับช่วงกลางของการตั้งครรภ์ (61 - 120 วันหลังการผสมพันธุ์) พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < .05$) โดยจะอยู่ในระดับ 43 นาโนกรัมต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะ กับ 82.4 ± 20 นาโนกรัมต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะตามลำดับ (ภาพประกอบ 9) ในระยะท้ายของการตั้งครรภ์ (120 จนครบกำหนดคลอด) ระดับของอีลัสโตริโอลจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < .05$) ประมาณ 3 วันก่อนคลอดคือ ลดลงจาก 120 ± 50 นาโนกรัมต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะ เป็น 30 ± 20 นาโนกรัมต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะ จากนั้นระดับของอีลัสโตริโอลในปัสสาวะจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่จะมีการคลอดเกิดขึ้น ($P < .01$) คือเพิ่มจาก 30 ± 20 นาโนกรัมต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะ เป็น 140 ± 53 นาโนกรัมต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะ (ภาพประกอบ 10) อย่างไรก็ตามก็ยังมีกลุ่มหนึ่งคือเบอร์ 60 และ 102 ที่พบว่าระดับของอีลัสโตริโอลในปัสสาวะต่ำกว่า 150 นาโนกรัมต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะ ตลอดระยะเวลาดังครรภ์ แต่ในทุกกรณีพบว่าระดับของอีลัสโตริโอลจะต่ำลงใน 24 ชั่วโมงหลังคลอด และยังคงต่ำเช่นนี้ตลอด 1 สัปดาห์ที่ให้นมลูก



ภาพประกอบ 9 ระดับของอีสโตรเจนในปัสสาวะของลิงหางยาว (mean $\pm$ SEM) ในการตั้งครรภ์ระยะแรก ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 50 ของการตั้งครรภ์





ภาพประกอบ 10 ระดับของอิทธิพลของสภาวะทางชีวภาพ (mean $\pm$ SEM) ตั้งแต่ 50 วันก่อน วันหลัง (0)

และหลังคลอด 1 สัปดาห์

สรุป และอภิปรายผล

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อศึกษาปริมาณและการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนอีลัสโตรโกลในปัสสาวะของ
สิงหายาวขณะตั้งครรภ์ และระยะเลี้ยงลูกอ่อนสัปดาห์แรก โดยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลองใช้สิงหายาวเพศเมียจำนวน 5 ตัว อายุประมาณ 3.5 - 10 ปี
ที่มีรอบประจำเดือนที่แน่นอน
2. วิธีทดลอง
 - 2.1 นำสิงเพศเมียไปผสมกับสิงพ่อพันธุ์ในวันที่มีการตกไข่ของรอบประจำเดือน
การตั้งครรภ์ยืนยันโดยการตรวจอัลตราซาวด์และ abdominal palpation โดยจะเก็บ
ปัสสาวะทุกวันเมื่อถึงท้อง จากนั้นเก็บวันเว้น 2 วัน และเก็บทุกวันเมื่อถึงใกล้คลอด และ
หลังคลอด 1 สัปดาห์
 - 2.2 การตรวจหาอีลัสโตรโกลในปัสสาวะ ทำโดยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ตาม
วิธีการของ WHO (WHO. 1981 : 38 - 42) และมีการเปลี่ยนแปลงให้เหมาะสม
กับการทดลองครั้งนี้
 - 2.3 ปัสสาวะที่จะนำมาหาอีลัสโตรโกล จะต้องนำมาหาปริมาณของครีเอตินิน
เพื่อที่จะทราบจำนวนปัสสาวะที่ขับออกมาในแต่ละวัน โดยทดลองตามวิธีที่อาศัยหลักการของ
Jaffe reaction ที่ดัดแปลงตามแบบของโอเวน และคณะ (Owen and others.
1954 : 426)

สรุปผลการวิจัย

1. สิ่งเพศเมียที่นำมาทดลองมีรอบเดือนเฉลี่ย 31 ± 3 วัน และเวลาตั้งครรภ์เฉลี่ย 165 ± 5 วัน ระดับของ ของ E_3 อีลระในบัสส์ลภาวะตรวจหาโดยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานที่ประกอบด้วยอีลตริโอค มาตรฐานที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ซึ่งมีสัมประสิทธิ์ของความแปรเปลี่ยนของการวัดวันเดียวกัน และการวัดต่างวัน เท่ากับ 2.44 และ 7.23 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ มีความไวของวิธีวัดปริมาณ E_3 อีลระเมื่อเทียบจากกราฟมาตรฐานเท่ากับ 19 พิโคกรัมต่อ 0.5 มิลลิลิตร E_3 แอนติซีรัมที่ใช้ในการทดลองมีความเข้มข้น 1 : 200 มีความจำเพาะต่อ $E_3=100$ เปอร์เซ็นต์ E_1 และ E_2 เท่ากับ 0.04 และ .007 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากผลของการทดลองจะเห็นว่า การวัดปริมาณ E_3 ในบัสส์ลภาวะมีความเที่ยงตรงโดยจะมีสัมประสิทธิ์ของความแปรเปลี่ยนของการวัดวันเดียวกัน และการวัดต่างวัน เท่ากับ 7.23 และ 14.96 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และมีความแม่นยำในการวัดปริมาณ E_3 เท่ากับ 80 - 85%

2. จากการตรวจวัดระดับ E_3 อีลระในลิงหางยาวขณะตั้งครรภ์ หรือหลังคลอด โดยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ พบว่ามีระดับต่ำกว่า 100 นาโนกรัมต่อ 24 ชั่วโมง บัสส์ลภาวะในช่วงก่อนการฝังตัว การฝังตัว และการสร้างรก ระดับจะเพิ่มสูงขึ้นในลิงบางตัวที่ไม่สามารถตรวจพบ mCG ได้ในบัสส์ลภาวะ และอาจมีระดับสูงมากถึง 300 - 800 นาโนกรัมต่อ 24 ชั่วโมง บัสส์ลภาวะ นับตั้งแต่การตั้งครรภ์ได้ 80 วันขึ้นไปจนครบกำหนดคลอด อย่างไรก็ตาม ก็มีลิงอีกกลุ่มที่พบมี E_3 ในบัสส์ลภาวะต่ำกว่า 150 นาโนกรัมต่อ 24 ชั่วโมง บัสส์ลภาวะตลอดระยะเวลาการตั้งครรภ์ แต่ในทุกกรณีพบว่าระดับ E_3 จะต่ำลงภายใน 24 ชั่วโมงหลังคลอด และยังคงต่ำอยู่เช่นนี้ตลอด 1 สัปดาห์หลังคลอด

อภิปรายผล

จากผลการวิจัยหลายชิ้นบ่งชี้ถึงความเชื่อถือได้ของการตรวจวัดปริมาณของฮอโมน ในตัวอย่างบัสส์ลภาวะ โดยอาศัยปริมาณของครีเอตินีนเป็นเครื่องบ่งชี้ถึงปริมาณของฮอโมน

ในแต่ละตัวอย่างปลั้ววาระเพื่อควบคุมปริมาณและระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างปลั้ววาระ ของแต่ละวันมีการกระทำในโพรมีตหลายชนิด (Czekala and others. 1981 : 1, Hodges and others. 1983 : 76, and Shideler and others. 1983 : 963) โดยพบว่า ปริมาณของฮอร์โมนที่วัดได้จากตัวอย่างปลั้ววาระที่เก็บในตอนเช้า จากปลั้ววาระที่สร้างขึ้นตอนกลางคืนจะมีความคงที่คล้ายกับตัวอย่างปลั้ววาระที่เก็บครบ 24 ชั่วโมง (Shideler and others. 1983 : 963)

จากผลของการศึกษาครั้งนี้ พบว่า สิ่งที่มาทดลองทุกตัว ในระยะ 15 วันแรก หลังการผสมพันธุ์ ซึ่งอยู่ในช่วงก่อนที่จะมีการฝังตัว ช่วงที่มีการฝังตัว และช่วงที่มีการสร้างรกใหม่ ๆ ระดับของ E_3 อิสระจะอยู่ในระดับที่ต่ำกว่า 100 นาโนกรัม ต่อ 24 ชั่วโมง ปลั้ววาระ โดยจะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < .05$) เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงกลาง และช่วงปลายของการตั้งครรภ์ ซึ่งจะสัมพันธ์กับการตรวจพบ E_1 และ E_2 ในซีรัมของลิงหางยาวระยะตั้งครรภ์ โดยจะอยู่ในระดับต่ำเหมือนกับระยะลูเทียลของรอบประจำเดือนปกติ ขณะที่โปรเจสเตอโรนจะเพิ่มขึ้นทันทีหลังจากเกิดปฏิสนธิแล้ว (Varavudhi and others. 1982 : 8) โดยพบว่า โปรเจสเตอโรนเพียงอย่างเดียวก็เพียงพอต่อการฝังตัวของปลาส์โตซิสได้ในสัตว์พวกนี้ (Meyer. 1969 : 30) เหมือนกับที่ ไฮซาว์ (Hisaw. 1944 : 119) ได้เสนอว่ารูปแบบของฮอร์โมนระยะตั้งครรภ์ในลิงวอกสามารถแบ่งได้ 3 ระยะ คือ ระยะแรกจะคล้ายคลึงกับระยะลูเทียลของรอบประจำเดือนที่ไม่มีการผสมพันธุ์ ระยะที่ 2 เป็นระยะที่คอร์ฟัส ลูเตียมตอบสนองต่อการกระตุ้นของ mCG ที่หลังจากซินไซติโอ ไทรโอบลาสต์ (Syncytiotrophoblast) และระยะท้ายของการตั้งครรภ์ รกจะทำหน้าที่สร้างและหลั่งฮอร์โมนเพื่อรักษาสภาวะการตั้งครรภ์ ถึงแม้ไม่มีต่อมใต้สมอง และรังไข่ของแม่ มีหลักฐานยืนยันถึงบทบาทของรังไข่ที่มีความสำคัญในการสร้างอีส์โตรเจนในระยะแรกของการตั้งครรภ์ โดยทดลองตัดรังไข่ทั้ง 2 ข้าง (bilateral ovariectomy) หรือตัดคอร์ฟัส ลูเตียม (luteectomy) ของลิงวอกและลิงหางยาวในระหว่างวันที่ 22 - 24 หลังการปฏิสนธิ พบว่า ระดับของ E_1 และ E_2 ในเลือดจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเป็นเวลา 1 - 2 สัปดาห์ จากนั้นอีส์โตรเจนจะมีระดับเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และจะมี

รูปแบบที่ไม่แตกต่างจากช่วงกลาง (60 - 120 วัน) และช่วงปลายของการตั้งครรภ์ (120 - จนครบกำหนดคลอด) (Hodgen. 1975 : 275 - 282, William and others. 1978 : 539 - 545 and diZerega and Hodgen. 1980 : 253 - 263) และยังพบว่าสามารถตั้งครรภ์ได้เร็วที่สุดในวันที่ 22 หลังการปฏิสนธิโดยการตั้งครรภ์ สามารถดำเนินต่อไปได้โดยไม่เกิดการแท้งระยะนี้ คอร์ฟีล ูเตียม และส่วนอื่นของรังไข่ ยังจำเป็นต่อการรักษาลักษณะการตั้งครรภ์ให้ปกติ จากนั้นรกและตัวอ่อนก็จะรับหน้าที่ในการสังเคราะห์ฮอร์โมนอย่างเต็มที่ราว 6 สัปดาห์หลังปฏิสนธิ (Tullner and Hertz. 1966 : 1076 - 8, Bosu and Johansson. 1975 : 598, and Hodgen and Tullner. 1975 : 275) เปรียบเทียบกับลิงมาโมเชีย คอร์ฟีล ูเตียม สามารถสร้างและหลั่ง E_1 และโปรเจสเตอโรนในระยะ 40 วันแรกของการตั้งครรภ์ จากนั้นรกจะรับช่วงต่ออย่างช้าประมาณวันที่ 40 และสร้างอย่างเต็มที่ตั้งแต่วันที่ 60 ของการตั้งครรภ์ (Hodges. 1983 : 73) ขณะที่ในสัตว์ คอร์ฟีล ูเตียม ยังมีความจำเป็นต่อการตั้งครรภ์ในช่วง 5 - 6 สัปดาห์แรก จากนั้นรกจึงสามารถสังเคราะห์ เอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน จากสารตั้งต้นได้อย่างน้อยสัปดาห์ที่ 5 หลังจากปฏิสนธิ (Csapo and Pulkkinen. 1978 : 69 - 81) ซึ่งบทบาทของคอร์ฟีล ูเตียม และส่วนอื่นของรังไข่ที่มีส่วนในการสังเคราะห์เอสโตรเจนในการตั้งครรภ์ระยะแรกนั้น อาจเป็นการตอบสนองต่อ CG (William and others. 1978 : 539 and Hodgen. 1979 : 212) ในลิงวอกสามารถตรวจพบ mCG ได้เร็วที่สุด 9 - 11 วันหลังการปฏิสนธิ (Neill. 1969 : 45, Hodgen. and others. 1974 : 457 - 464) ซึ่งเป็นช่วงที่อินโซลิโอโทรโพนาสต์ เริ่มมีความสามารถในการสร้างและหลั่ง mCG โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 20 - 22 ของการตั้งครรภ์ในลิงวอกและวันที่ 17 - 28 ของการตั้งครรภ์ในลิงหางยาว (diZerega and Hodgan. 1980 : 253, Varavudhi and others. 1984 : 9) โดยจะพบว่า เอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนจะเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญ ประมาณ 3 สัปดาห์ หลังการผสมพันธุ์พร้อม ๆ กับการตรวจพบ mCG ในปริมาณมากที่สุด (Hodgen and others. 1974 : 457 and Varavudhi and others. 1984 : 5) มีการทดลองให้ mCG

แก๊สในวอกในระยะอุทกของรอบประจำเดือนปกติสามารถกระตุ้นรังไข่สร้างฮีสโตรเจน และโปรเจสเตอโรนเพิ่มขึ้นได้ (Hodgen and others. 1972 : 896 - 100) จากผลการศึกษาครั้งนี้เป็นไปอย่างที่ฮีสโตรเจนที่สร้างในระยะแรกของการตั้งครรภ์เป็นผลจากการที่รังไข่ตอบสนองต่อ mCG ที่สร้างขึ้นในลิงชนิดนี้

กูตแมนและฮอดเจน (Goodman and Hodgen. 1979 : 469 - 471)

ได้ศึกษา luteal placental shift ในการสังเคราะห์ฮอร์โมนในลิงวอก พบว่าตัวอ่อน (conceptus) สามารถสังเคราะห์โปรเจสเตอโรนได้เร็วที่สุด และเพียงพอต่อการคำนวณการตั้งครรภ์ได้ประมาณสัปดาห์ที่จะมีการฝังตัวเกิดขึ้น ซึ่งในระหว่างนี้คอร์ฟัส ลูเตียม ก็ยังคงหลั่งโปรเจสเตอโรนได้อยู่ แต่จะมีปริมาณน้อยลงตามเวลาที่ผ่านไป จากนั้น รกและตัวอ่อนจะรับหน้าที่ในการสร้างและหลั่งฮอร์โมนเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะช่วงหลังของการตั้งครรภ์ ซึ่งจากผลของการทดลองครั้งนี้จะเห็นได้ว่า หลังจากไม่สามารถตรวจพบ mCG ได้ในลิงชนิดนี้ ถึงเบอร์ 82 จะมีระดับของ E_3 อิสระจะต่ำกว่า 100 นาโนกรัม ต่อ 24 ชั่วโมงปล้สาวะ ในระยะวันที่ 39 ถึงวันที่ 91 ของการตั้งครรภ์ จากนั้น จะมีระดับสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงจุดสูงสุดในวันที่ 128 ของการตั้งครรภ์ และถึงเบอร์ 94 และ 63 ระดับ E_3 อิสระจะเริ่มสูงขึ้นทันที และจะอยู่ในระดับสูงจนครบกำหนดคลอด สอดคล้องกับการตรวจหา E_1 และ E_2 ที่จะเริ่มเพิ่มสูงขึ้นอย่างสม่ำเสมอในซีรัมของลิงชนิดนี้จนครบกำหนดคลอด (Varavudhi and others. 1983 : 4 - 6) และระดับของโปรเจสเตอโรนในซีรัมทั้งในลิงวอกและลิงหางยาวจะเพิ่มสูงขึ้น ในวันที่ 40 หลังการปฏิสนธิ และถึงจุดสูงสุดในวันที่ 100 ของการตั้งครรภ์ (Neill and others. 1969 : 45, Hodgen and others. 1972 : 896 and Stabenfeldt and Heindrick. 1973 : 1296) เหมือนกับระดับของฮีสโตรเจนในลิงวอก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง E_2 จะเพิ่มสูงขึ้นในระยะนี้ และรักษาระดับจนครบกำหนดคลอด (Bosu and others. 1974 : 601 - 616) ในระยะนี้ (mid pregnancy) คอร์ฟัส ลูเตียม ลดขนาดลงเหลือเป็นกลุ่มเซลล์เล็ก ๆ (Treolar and others. 1972 : 665 - 668) พบว่า ระยะนี้คอร์ฟัส ลูเตียมอยู่ในสภาพฝักตัว

(Gulyas. 1974 : 95 - 121) ซึ่งระดับของโปรเจสโตโรนในซีรัมในส่วนของแม่ จะไม่เพิ่มขึ้นเลย แม้ว่าจะให้ hCG แก่ลิงวอกในช่วงกลางของการตั้งครรภ์

ในระยะท้ายของการตั้งครรภ์ คือ ตั้งแต่วันที่ 120 ไป จนครบกำหนดคลอด ระดับของ E_3 มีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญประมาณ 3 วัน ครบกำหนดคลอด คือ ลดจาก 102 ± 50 เป็น 30 ± 20 นาโนกรัมต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะ จากนั้นระดับของ E_3 มีระดับเพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัดในวันที่มีการคลอดเกิดขึ้น ($p < .01$) คือ เพิ่มขึ้นจาก 30 ± 20 เป็น 140 ± 55 นาโนกรัมต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะ เปรียบเทียบกับระดับของ E_1 และ E_2 ในพลาสมาของลิงวอก เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในระหว่าง 10 วันสุดท้ายที่จะมีการคลอดเกิดขึ้น แต่เหตุการณ์นี้จะไม่เกิดขึ้นในสัตว์ทดลองทุกตัว (Bosu and others. 1973 : 743 and Atkinson and others. 1975 : 335) ขณะที่ระดับของ E_2 ในพลาสมาของลิงมาโมเอ็ท ชิมแปนซี และสัตว์ เพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอตลอดการตั้งครรภ์ และเมื่อครบกำหนดคลอดจะมีระดับสูงกว่าที่ตรวจพบในลิงวอกหลายเท่า ส่วนในลิงทางยาวระดับ E_2 ในซีรัมจะเพิ่มสูงขึ้นจนถึงวันสุดท้ายของการตั้งครรภ์ (Varavudhi and others. 1982 : 8) สำหรับใน วัว หนู และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแกะ พบว่ามีอีลโตรเจนสูงก่อนคลอด ระดับของอีลโตรเจนอิสระเพิ่มจาก 2.5 - 3.5 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตรประมาณ 5 วัน ก่อนครบกำหนดคลอด เป็น 75 - 280 พิโคกรัม ต่อ มิลลิลิตรในระยะ 16 - 24 ชั่วโมงก่อนครบกำหนดคลอด (Challis. 1971 : 208, Thornburn and others. 1972 : 61 and Challis and others. 1974a : 547) ในระยะนี้ก็มีรายงานว่า ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด จะมีระดับของโปรเจสโตโรนลดลงก่อนคลอด สัมพันธ์กับอีลโตรเจนที่มีระดับเพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัด โดยอีลโตรเจนเองมักได้รับพิจารณาว่ามีฤทธิ์ตรงกันข้าม (antagonist) กับโปรเจสโตโรน ในกรณีที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของกล้ามเนื้อดลูก โดยอีลโตรเจนจะไปเพิ่มการทำงานของกล้ามเนื้อดลูกขณะที่โปรเจสโตโรนจะไปยับยั้งผลอันนี้ เช่น ใน กระต่าย หนูขาว

หนูตะเภา แกะ และวัว (Bedford and others. 1972 : 1 and Challis and others. 1973 : 971) ระดับของโปรเจสเตอโรนจะลดลงอย่างเด่นชัดก่อนคลอด โดยในแกะมีรูปแบบที่ลดลงทันที และจำเพาะเฉพาะไม่กีวันก่อนที่จะเกิดการหดตัวของมดลูก หรือค่อย ๆ ลดลง ในระยะท้ายของการตั้งครรภ์ เช่นใน กระต่าย ในไพรเมต เช่น ลิงมาโมเช็ก ลิงหางยาว และในสัตว์ ระดับของโปรเจสเตอโรนลดลงเล็กน้อยก่อนคลอด (Hearn and Lunn. 1975 : 191, Tulchinsky and others. 1972 : 1095, Varavudhi and others. 1982 : 8) ขณะที่ลิงวอกระดับของโปรเจสเตอโรน มักไม่เปลี่ยนแปลงไปจากระยะต่าง ๆ ของการตั้งครรภ์ (Hodgen and others. 1972 : 896) หรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อยก่อนคลอด (Bosu and others. 1973 : 743) และในชิมแปนซี จะมีรูปแบบของโปรเจสเตอโรนเพิ่มขึ้นตลอดระยะของการตั้งครรภ์ (Rey and others. 1975 : 1447) แต่จากการศึกษาถึงแหล่งสร้างโปรเจสเตอโรน ที่สำคัญในลิงวอก คือรกและรังไข่ ซึ่งสร้างและหลั่งเข้าสู่หลอดเลือดทาง uterine venous blood และ utero - ovarian blood ตามลำดับ (Riesen and others. 1970 : 1212) ซึ่งพบว่าโปรเจสเตอโรนในส่วนของมดลูกและ umbilical venous blood ของลิงวอกจะลดอย่างมีนัยสำคัญก่อนที่จะมีการคลอดเกิดขึ้น และในระยะนี้ โปรเจสเตอโรนในส่วนของ peripheral blood ไม่เปลี่ยนแปลงเลย (Thua and others. 1976 : 721) แสดงให้เห็นว่าระดับของโปรเจสเตอโรนที่ค่อนข้าง คงที่ใน peripheral blood ในระยะนี้ไม่ได้เป็นข้อบ่งชี้ว่า เกิดขึ้นในส่วนของ uterine circulation

ระดับของอีลัสโตรเจนที่สูงขึ้นก่อนคลอดขณะที่โปรเจสเตอโรนมีระดับลดลง ผลิตไปกระตุ้นการสร้างและหลั่งพอร์ลิตาแกลอนดิน เช่นในแกะที่ควบคุมกำหนดคลอดระดับของ พอร์ลิตาแกลอนดิน ($\text{PGF } 2 \alpha$) และ E_2 สูงขึ้นพร้อม ๆ กันกับการหดตัวของมดลูก (Challis and others. 1972 : 485) และเมื่อให้ stilboestrol ซึ่งเป็นอีลัสโตรเจนสังเคราะห์กับแกะในระหว่างตั้งครรภ์ทำให้ $\text{PGF } 2 \alpha$ มีระดับสูงขึ้น

ในพลาสมา, กล้ามเนื้อมดลูก (myometrium) และ utero - ovarian vein ของแม่ภายใน 24 ชั่วโมง (Liggin. 1973 : 119) จากผลอันนี้จะทำให้กล้ามเนื้อมดลูกสามารถตอบสนองต่อ ออกซิโทซิน (oxytocin) ส่งผลให้เกิดการคลอดขึ้น แต่ใน non - human primate ยังไม่แจ่มชัดถึงบทบาทของ PGF 2 α ที่มีต่อกล้ามเนื้อมดลูกในขบวนการคลอดที่เกิดตามสภาพปกติ แต่ PGF 2 α สามารถกระตุ้นให้แท้งได้ในลิงวอก (Challis. 1974 b : 389) และเมื่อให้ E₂ ในระหว่างช่วงท้ายของการตั้งครรภ์ พบว่า ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการคลอดได้ และไม่สัมพันธ์กับระดับของ PGF 2 α ในพลาสมา (Challis. 1974 : 547) อย่างไรก็ตาม แคดเวลล์ (Cadwell. 1972 : 192) รายงานว่าเมื่อให้ E₂ เข้าใน ovarian artery ของลิงวอกสามารถตรวจพบ PGF 2 α เพิ่มขึ้นในส่วน of uterine venous blood และเมื่อให้ indomethacin ซึ่งเป็นสารที่ไปยับยั้งการสังเคราะห์ PGF 2 α ทำให้การตั้งครรภ์ในลิงวอกยาวกว่าปกติ นอกจากนี้ เขายังพบว่า PGF 2 α และ ออกซิโทซิน มีผลคล้ายคลึงกันต่อการทำงานของมดลูกในระยะที่มีการหดตัวและคลายตัวของมดลูกขณะเกิดการคลอด จากข้อมูลเหล่านี้เป็นไปได้ว่า ฮีสโตรเจน อาจมีส่วนร่วมในการเริ่มต้นของขบวนการคลอด โดยอัตราส่วนของฮีสโตรเจนต่อโปรเจสเตอโรน ที่เพิ่มขึ้น ร่วมกับ PGF 2 α ที่หลั่งออกมาพร้อม ๆ กัน ออกซิโทซินที่มีระดับเพิ่มขึ้น ในระยะที่ใกล้ครบกำหนดคลอดจะส่งผลต่อการทำงานของมดลูกที่จำเป็นต่อขบวนการคลอด

เมื่อพิจารณาในแง่ปริมาณจะเห็นได้ว่า ระดับของ E₃ ฮีสโตรเจนในปัสสาวะของลิงหางยาวขณะตั้งครรภ์ จะมีปริมาณที่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับฮีสโตรเจนชนิดอื่น ๆ ซึ่งมีรายงาน E₁ เป็นเมตาโบไลต์หลักที่ขับออกมามากที่สุดในช่วงนี้ โดยจะสูงถึง 200 - 300 ไมโครกรัมต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะ (Varavudhi and others. 1984 : 9) สอดคล้องกับรายงานการตรวจหาปัสสาวะของลิงวอก ลิงบาบูน ค่าง รวมทั้งลิงโลกใหม่ทุกชนิดยกเว้นลิงมาโมเซ็ท และอย่างน้อยที่สุดในลีเมอร์ที่เป็นไพรเมตชั้นต่ำ พบว่า E₁ เป็นเมตาโบไลต์

ส่วนใหญ่ที่ตรวจพบ โดยจะเพิ่มอย่างช้า ๆ ในระยะแรกของการตั้งครรภ์ และเพิ่มอย่างรวดเร็ว จนถึงจุดสูงสุดเมื่อครบกำหนดคลอด จากนั้น ระดับของ E_1 ลดลงถึงระดับปกติ (Merkatz and Beling. 1969 : 129, Liskowski and others. 1970 : 55, Chamber and Hearn. 1979 : 23, Czekala and others. 1981 : 1 - 15 and Shideler and others. 1983 : 963) โดยจะแตกต่างจากที่พบในคนและเกรทอเพล์ (Brown. 1956 : 704, Hopper and others. 1968 : 213, Reyes and others. 1975 : 1447 and Boney and Kingley. 1982 : 431) E_3 เป็นเมตาโบไลต์ของอีลัสโตรเจน ที่ตรวจพบมากที่สุด ตลอดการตั้งครรภ์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเมตาโบลิซึม และการขจัดอีลัสโตรเจนออกทางปัสสาวะระหว่างการตั้งครรภ์ในลิงหางยาว คล้ายคลึงโลกเก่า และลิงโลกใหม่มากกว่าเกรทอเพล์ และสัตว์

เป็นที่ทราบกันดีแล้ว สำหรับการสังเคราะห์อีลัสโตรลในระหว่างการตั้งครรภ์นั้นขึ้นอยู่กับความสามารถของตัวอ่อนที่จะไฮดรอกซิเลชันกับ C_{19} สเตอรอยด์ จากนั้นจึงสามารถเปลี่ยนสารเหล่านี้ให้เป็น E_3 ได้โดย E_3 อิสร่อย่างตรวจพบเป็นจำนวนมากในสตรีขณะตั้งครรภ์ (Tulchinsky. 1972 : 1095) แต่ไม่สามารถตรวจพบได้เลยในกระแสเลือดของไพรเมตหลายชนิด รวมทั้งลิงวอก ลิงหางยาว และลิงมาโมเช็ก โดยที่สาเหตุมาจากต่อมหมวกไต และตัวของตัวอ่อนไม่สามารถสร้าง 16α hydroxylated intermediate ให้เพียงพอต่อการสร้าง E_3 ได้ (Heinrich and Colas. 1970 : 159 - 163) ขณะที่ E_1 และ E_2 จะหลั่งออกมามากกว่าในลิงหางยาว (Varavudhi and others. 1983 : 4 - 5) และในลิงวอก พบว่า E_1 เป็นอีลัสโตรเจนหลักที่สร้างขึ้น โดยพบ E_2 ในปริมาณที่น้อยกว่า ซึ่งเกือบทั้งหมดถูกเปลี่ยนมาจาก E_1 โดยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรอกซิเลชันตรง peripheral site แต่ในส่วนของแม่ลิงวอกกลับตรวจพบ E_2 มากกว่า E_1 เป็นไปได้ที่ E_1 ถูกเปลี่ยนไปเป็น E_2 อย่างรวดเร็วในส่วนของแม่ หรืออาจมีแหล่งอื่นอีกที่สร้าง E_2 อีกได้เช่น รังไข่หรือต่อมหมวกไต (Resko and others. 1975 : 425)

สำหรับ E_3 ที่ตรวจพบในลิงหางยาว และ non - human primate ชนิดต่าง ๆ ยกเว้นเกรทอเพล์ และสัตว์นั้นเชื่อว่าเปลี่ยนแปลงมาจาก peripheral metabolism

ของ E_1 ก่อนที่จะกำจัดออกทางปัสสาวะมากกว่าจะเกิดจากการสร้างของรกร่วมกับตัวอ่อน (Hodges. 1983 : 73 - 82) และเป็นที่น่าสังเกตว่า รูปแบบของการกำจัดอีโตรเจน ออกทางปัสสาวะในลิงหางยาว และ non - human primate ในระหว่างการตั้งครรภ์ ระดับของ ออร์โมนอีสตรีโอล จะมีปริมาณต่ำกว่าที่สังเกตพบในสตรี เชื่อว่า อาจมีสาเหตุ มาจากการขาดระบบเอนไซม์ที่จำเป็น และสเตรอยด์อย่างเพียงพอ ในการสังเคราะห์ และ เมตาโบลิซึมอีโตรเจน ซึ่งทั้ง 2 สาเหตุอาจส่งผลต่อระดับของ อีสตรีโอลที่กำจัดออกมา ทางปัสสาวะใน non - human primate เหล่านี้ จากการทดลองในหลอดแก้วโดยมี C_{21} สเตอรอยด์ เป็นสารตั้งต้นพบว่า placental endocrine activity ของ non - human primates ชนิดต่าง ๆ รวมทั้งลิงหางยาวมีความคล้ายคลึง domestic animals มากกว่าจะคล้ายกับคน (Ainsworth and others. 1969 : 1421 - 1429, Ainsworth and Ryan. 1969 : 301)

โดยสรุปแล้ว ระดับของออร์โมนอีสตรีโอลที่ตรวจพบในปัสสาวะขณะตั้งครรภ์นั้น จะแตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละชนิด เช่น ในกลุ่มโฮมินอยด์ (homnoids) E_3 จะเป็นอีโตรเจน ที่ขับออกทางปัสสาวะมากที่สุดขณะที่กลุ่มซีบอยด์ (ceboids) และ เซอโคพิธิคอยด์ (cercopithecoids) จะเป็น E_1 สำหรับในลิงหางยาวนั้น ปรากฏว่าไม่สามารถตรวจหา E_3 ในกระแสเลือดของ ลิงชนิดนี้ได้ในการตั้งครรภ์ (unpublished data) แต่สามารถตรวจพบ E_3 ได้ใน ปัสสาวะ ซึ่งจะมีปริมาณน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของ E_1 และ E_2 ที่ตรวจพบในปัสสาวะ ระหว่างการตั้งครรภ์ ระดับของ E_3 ที่ตรวจพบในปัสสาวะแต่ไม่สามารถตรวจพบในกระแสเลือดได้ นี้เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของ E_1 ที่ระดับของแม่โดย E_1 จะเกิด 16 α hydroxylation และเปลี่ยนแปลงไปเป็น E_3 แล้วถูกกำจัดออกทางปัสสาวะในที่สุด เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณ ของ E_3 ที่ตรวจพบในปัสสาวะของลิงแต่ละตัวจะมีปริมาณที่แตกต่างกันมาก ตลอดระยะเวลา การตั้งครรภ์นั้น เป็นผลมาจากความแตกต่างของสัตว์แต่ละตัวในการกินอาหาร และอัตราการขจัด

โดยโตของฟังก์ชันมาทดลอง นอกจากนั้น ยังพบว่าปริมาณอิเล็กตรอนที่ตรวจพบในปัสสาวะ
 ในระหว่างการตั้งครรภ์นั้น มีความใกล้เคียงกับการทำงานของรก โดยรกสามารถสร้าง
 อิเล็กตรอนได้ตลอดเวลาในระหว่างการตั้งครรภ์จนครบกำหนดคลอด และหลังคลอดก็ยัง
 สามารถตรวจพบ E_3 ได้ แต่ก็มีปริมาณน้อยมาก

บรรณานุกรม

REFERENCES

- Abraham, G.E. "Solid Phase Radio immunoassay of Estradiol-17 β ," Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 28 : 866 - 870, 1969.
- Adlercreutz, H. and others. "Gas Chromatographic and Mass Spectrometric Studies on Oestrogens in Bile. Part I, Pregnant Women," Acta. Endocrinologica (Kbh). 73 : 543 - 554, 1973.
- _____ and Martin, F. "Oestrogen in Human Pregnancy Faeces," Acta. Endocrinologica (Kbh). 83 : 410 - 419, 1976.
- _____. Tikkanen, M.J. "Studies on the Maternal Contribution to Estrogen Metabolism in Pregnancy." In : Hormonal Investigations in Human Pregnancy. Editions Sepe, Paris, 1974. 51 p.
- Ainsworth, L. Daenen, M. and Ryan, K.J. "Steroid Hormone Transformations by Endocrine Organ from Pregnant Mammals Iv. Biosynthesis and Metabolism of Oestrogens and Progesterone by Primate Placenta Preparation in Vitro," Endocrinology. 84 : 1421 - 1429, 1969.
- _____. and Ryan, K.J. "Steroid Hormone Transformation by Endocrine Organs from Pregnant Mammals. V. the Biosynthesis and Metabolism of Progesterone and Estrogens by Urangutan Placental tissue in Vitro," Steroids. 14 : 301 - 314, 1969.
- Atkinson, L.E. and others. "Circulating Levels of Steroids and Chorionic Gonadotropin during Pregnancy in Rhesus Monkey, with Special Attention to the Rescue of Corpus Luteum in Early Pregnancy," Biology of Reproduction. 12 : 335 - 339, 1975.
- Bedford, C.A. and others. "The Role of Oestrogens and Progesterone in the Onset of Parturition in Various Species," Lancet. 9 : 1 - 5, 1972.
- Berson, S.A. and Yalow, R.S. Introduction and General Considerations Principles of Competitive Protein Binding Assays. J.B. Lippincott Company, 1971. 429 p.
- Bolte, E. and others "Studies on the Aromatization of Neutral Steroids in Pregnant Women.3 Overall Aromatization of Dehydroepiandrosterone Sulphate Circulation in the Foetal and Maternal Compartment." Acta. Endocrindogica (Kbh). 45 : 576 - 599, 1964.

- Bonney, R. C. and Kingsley, S. "Endocrinology of Pregnancy in the Urangutan (*Pongo pygmaeus*) and its Evolutionary Significance," International Journal of Primatology. 3 : 431 - 444, 1982.
- Bosu, W.T.K. and Johansson, E.D.B. "Implantation and Maintenance of Pregnancy in Mated Rhesus Monkeys Following Bilateral Oophorectomy or Luteectomy with and without Progesterone Replacement," Acta Endocrinologica (Kbh). 79 : 598 - 609, 1975.
- and Gemzell, C. "Patterns of Circulating Oestrone, Oestradiol-17 β and Progesterone during Pregnancy in the Rhesus monkey," Acta Endocrinologica. 74 : 743 - 760, 1973
- "Influence of Oophorectomy, Luteectomy, Fetal death and Dexamethasone on the Peripheral plasma Levels of Oestrogens and Progesterone in the Pregnant *Macaca mulatta*," Acta Endocrinologica (Kbh). 75 : 601 - 616, 1974.
- Brown, J.B. "Urinary Excretion of Oestrogens during Pregnancy, Lactation and Re-establishment of Menstruation," Lancet. 1 : 704 - 705, 1956.
- Butter, W.R. Hotchkiss, J. and Knobil, E. "Functional Estrogen and Progesterone During the Luteal Phase of the Menstrual Cycle," Endocrinology. 96 : 1509 - 1512, 1975.
- Caldwell, B.V. and others. Further studies on the role of Prostaglandins in Reproductive Physiology. Third Conference on Prostaglandins in Fertility control. Bergstrom, S. Green, K. Samuelsson, B (Editors) WHO Research and Training Centre on Hormone Reproduction, Karolinska Institute. 1972. 217 p.
- Challis, J.R.G. "Sharp increase in Free Circulating Oestrogens immediately before Parturition in Sheep," Nature (Lond). 17 : 208 - 229, 1971.
- and others. "The concentration of Progesterone, Estrone and Estradiol 17 β in the Peripheral plasma of the Rhesus monkey during the Final third of Gestation and after the Induction of Abortion with PGF 2 α ," Endocrinology. 95 : 547 - 554, 1974 a.
- and Hendrickx, A.G. "Prostaglandin F in the Peripheral plasma of the Rhesus monkey in Normal Pregnancy and after the Administration of Dexamethasone and PGF2 α ," Prostaglandins. 6 : 389 - 394, 1974 b.
- and Ryan, K.J. "The Concentration of Progesterone, Estrone and Estradiol 17 β in the Plasma of Pregnant Rabbits," Endocrinology. 93 : 971 - 975, 1973.

- Challis, J.R.G. and others. "A possible role of Oestrogens in the Stimulation of Prostaglandins F2 α output at the time of Parturition in a Sheep," Journal of Reproduction and Fertility. 30 : 485 - 488, 1972.
- _____. Thorburn, G.D. "The Fetal Pituitary Adrenal and its Functional Interactions with the Neurohypophysis. In : Fetal Physiology and Medicine. W.B. Saunders Company. 1976. 253 p.
- Chamber, P.L. and Hearn, J.P. "Peripheral plasma Levels of Progesterone, Oestradiol 17 β , Oestrone, Testosterone, Androstenedione and Chorionic gonadotrophin during Pregnancy in Marmoset monkey, Callithrix jacchus," Journal of Reproduction and Fertility. 56 : 23 - 26, 1979.
- Crystle, C.D. and Townsley, J.D. "The effect of Increasing Maternal Dehydroepiandrosterone Sulphate on Oestrogen Synthesis by Pregnant Baboons," Endocrinology. 94 : 1743 - 1745, 1974.
- Csapo, A. I. and Pulkkinen, M. "Indispensability of the Human Corpus Luteum in the Maintenance of Early Pregnancy, Lutectomy Evidence," Obstetric and Gynecology Survey. 33 : 69 - 81, 1978.
- Dahm, K. and Breuer, H. "Enzymatische Untersuchungen über die Glucuronidierung von Oestriol beim Menschen," Z. Klin. Chem. 4 : 153 - 157, 1966.
- Davies, I.J., Ryan, K.J and Petro, Z. "Estrogen Synthesis by Adrenal Placental tissue of the Sheep and the Iris monkey in Vitro," Endocrinology. 86. 1457 - 1459, 1970.
- Dawood, M.Y. and Fuchs, F. "Estradiol and Progesterone in the Maternal and Fetal Circulation in the Baboon," Biology and Reproduction. 22 : 179 - 184, 1980.
- Diczfalussy, E. "Endocrinology of the Foetus," Acta Obstetric and Gynecology. Scand (Suppl.). 1 : 45 - 85, 1962.
- _____. "A Modified Theory of Steroid Synthesis in the Human Foetoplacental Unit," Symp. Deutsch. Ges. Endocrinol. 16 : 32 - 46, 1970.
- _____. and Mancuso, S. Oestrogen Metabolism in Pregnancy, In : Foetus and the Placenta Blackwell Scientific Publication Oxford and Edinburgh. 1969, 248 p.
- diZerega, G.S. and Hodgen, G.D. "Changing Functional status of the Monkey Corpus Luteum," Biology of Reproduction. 23 : 253 - 263, 1980.

- Dorfman, R.I. and Wegenen, G.Van. "The Sex Hormone Excretion of Adult female and Pregnant Monkeys," Surg. Gynec. obstet. 73 : 545 - 548, 1941.
- Dukelow, W.R. Brüggemann, S. "Characteristics of Menstrual Cycle in Non-human Primates. II Ovulation and Optimal Mating Times in Macaques," Journal of Medical Primatology. 8 : 79 - 87, 1979.
- Grauwiler, J. and Brüggemann, S. "Characteristics of the Menstrual Cycle in Nonhuman Primates. I. Similarities and Dissimilarities between Macaca fascicularis and Macaca orctoides," Journal of Medical Primatology. 8 : 39 - 47, 1979.
- Elmajian, F. and Forchielli, E. Proceeding International Congress on Hormonal Gteroids. Academic Press. New York, 1965. 535 p.
- Goebelsmann, U. and others. "Plasma Concentration and Protein Binding of Oestriol and its Conjugates in Pregnancy," Acta Endocrinologica (Kbh). 74 : 592 - 604, 1973. _
- Goodman, A. L. and Hodgen, G.D. "Corpus luleum Conceptus - Follicle Relationships during the Fertile Cycle in the Rhesus monkeys : Pregnancy Maintenance despite Early Luteal Removal," Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 49 : 469 - 471, 1979.
- Greenwald, I. "The Chemistry of Jaffe' Reaction for Creatinine.IV. A-Compound of Creatinine, Picric acid and Sodium hydroxide," Journal Biological and Chemistry. 77 : 539 - 544, 1928.
- Greene, J.W. Touchstone, J.C. "Urinary Oestriol as an Index of Placental Function," American Journal of obstetric and Gynecology. 85 : 1 - 9, 1963.
- Gulyas, B.J. "The corpus luteum of the Rhesus monkey during Late Pregnancy. An Electron Microscopic study," American Journal of Anatomy. 139 : 95 - 121, 1974.
- Hearn, J.R. and Lunn, S.F. "The Reproductive Biology of the Mamaset monkey. Callithrix jacchus," Laboratory Animal handbook. 9 : 191 - 200, 1975.
- Hendrich, W.L. and Colás, A.E. "Hepatic Microsomal 16-Alpla Hydroxylation of 3-Beta-Hydroxyandrost-5-en-17 one (DHA) by Fetal, New born, and Adult Rhesus monkeys," General Comparative Endocrinology. 14 : 159 - 163, 1970.

- Hisaw, F.L. "Placental Gonadotrophin and Luteal Function in Monkeys (Macaca mulatta)," Yale Biology of Medicine. 17 : 119 - 137, 1944.
- Hodgen, G.D. "Primate Models for Pregnancy Hormone Secretion in man : Fetal, Maternal, and Placental factors. In : American Models for Research on Contraception and Fertility. 1979. 434 p.
- _____ and others. "Estrogen, Progesterone and Chorionic gonadotrophin in Pregnant Rhesus monkeys," Endocrinology. 91 : 896 - 900, 1972.
- _____ and Tullner, W.W. "Plasma Estrogen Progesterone and Chorionic gonadotrophin in Pregnant Rhesus monkeys after Ovariectomy," Steroids. 25 : 275 - 285.
- _____ and others. "Specific Radioimmunoassay of Chorionic gonadotrophin during Implantation in Rhesus monkeys," Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 39 : 457 - 464, 1974.
- Hodges, J.K. and others. "Levels of Circulation and Urinary Oestrogen during Pregnancy in the Marmoset monkey (Callithrix jacchus)," Journal of Reproduction and Fertility. 67 : 73 - 82, 1983.
- Hopper, B.R. and Tullner W.W. "Urinary Estrogen Excretion Patterns in Pregnant Rhesus monkeys," Steroids. 9 : 517 - 527, 1967.
- _____ and Tullner, W.W. "Urinary Estrogen Excretion during Pregnancy in a Gorilla," Proc. Soc. exp. Biol. Med. 129 : 213 - 214, 1968.
- Inoue, N. and others. "Studies on Phenolic Steroids in Human Subjects. IX Role of the Intesline in the Conjugation of Oestriol," Journal of Clinical Investigation. 48 : 390 - 396, 1969.
- Jackanicz, T.M. Diczfalusy, E. "Absence of 16- α Hydroxylating Activity in Human Midterm Placenta," Steroids. 11 : 877 - 884, 1968.
- Johnson, M. and Everitt, B. Essential Reproduction. Blackwell Scientific Publications, 1980. 356 p.
- Karsh, F.J. Hotchkiss, J : and Challis, J.R.G. "Functional Luteolysis in the Rhesus monkey; The role of Estrogen," Endocrinology. 92 : 1148 - 1152, 1973.

- Keller, P.J. and others. "Biochemical Detection of Fetoplacental distress in Risk Pregnancies," Lancet. 2 : 279 - 731, 1971.
- Lamp, E. and others. "Studies on the Metabolism of c-19 Steroid in the Human Foeto Placental Unit. I. Neutral Metabolites Formed from Dehydroepiandrosterone and Dehydroepiandrosterone sulfate by the Placenta at Midpregnancy," Acta Endocrinologica (Kbh). 55 : 263 - 277, 1967.
- Laumas, K.R. "Urinary Excretion of Oestrogens in Rhesus monkeys," Journal Endocrinology. 31 : 297 - 298, 1965.
- Levitz, M. and others. "Estrogen Conjugates in Body fluids in Late Human Pregnancy," Journal Steroid Biochemistry. 6 : 663 - 667, 1975.
- Liggin, G.C. "Hormonal Interaction in the Mechanism of Parturition," Mem. Soc. Endocrinol. 20 : 119 - 124, 1973.
- Liskowski, L. and others. "Urinary Estrogen Excretion in Pregnant Rhesus monkey," Biology of Reproduction. 3 : 55 - 60, 1970.
- Macafee, C.A.J. and others. "Fetoplacental Function and Antenatal Complications when the Foetus is Malformed," Journal Obstetric and Gynecology. 12 : 71 - 85, 1972.
- Merkatz, I.R. and Beling, C.G. "Urinary Excretion of Oestrogens and Pregnanediol in the Pregnant Baboon," Journal of Reproduction and Fertility. Suppl. 6 : 129 - 135, 1969.
- Meyer, R.K. Wolf, R.C. and Arslan, M. "Implantation and Maintenance of Pregnancy in Progesterone treated Ovariectomized monkeys," Proceeding of 2nd International Congress of Primatology. 2 : 30 - 35, 1969.
- Milewich, L. and Axelrod, L.R. "Metabolism of 4(¹⁴C) Testosterone by Lymphylized Baboon Placenta Microsomes," Endocrinology. 88 : 589 - 595, 1971.
- Murphy, B.E.P. and others. "Conversion of Maternal Cortisol to Cortisone during Placental transfer in the Human Fetus," American Journal of Obstetric and Gynecology. 118 : 538 - 541, 1974.
- Neill, J. D. Johanson, E.D.B. and Knobil, E. "Patterns of Circulating Progesterone Concentration during the Fertile Menstrual Cycle and the Remainder of Gestation in the Rhesus monkey," Endocrinology. 84 : 45 - 47, 1969.

- Nigi, H. "Menstrual Cycle and some Related Aspects of Japanese monkeys (Macaca fasciata)," Primates. 16 : 207 - 216, 1975.
- Oakey, R.E. "The Interpretation of Urinary Oestrogen and Pregnanediol Excretion in Pregnant Women Receiving Corticosteroids," Journal of Obstetric and Gynecology. Br. Commonw. 77 : 922 - 927, 1970.
- Owen, J.A. and others. "The Determination of Creatinine in Plasma or Serum, and Urine, a Critical Examination," Biochemistry Journal. 58 : 426 - 430, 1954.
- Reck, G. Nowostavskyi, H. Breckwoldt, M. "Effect of ACTH and Dexamethasone on the Diurnal Rhythm of Unconjugated Oestriol in Pregnancy." Acta Endocrinologica (Kbh) 87 : 820 - 827, 1978.
- Resko, J. A. Ploem, J.G. and Stadelmen, H.L. "Estrogens in Fetal and Meternal Plasma of the Rhesus monkey," Endocrinology. 97 : 425 - 430, 1975.
- Reyes, F.T. and others. "Serial Serum Levels of Gonadotropin, Prolactin and Sex Steroids in the Nonpregnant and Pregnant Chimpanzee," Endocrinology. 96 : 1447 - 1445, 1975.
- Riesen, J.W. and others "Origin of Ovarian venous Progesterone in the Rhesus monkey," Endocrinology. 86 : 1212 - 1214, 1970.
- Rosenthal H.E. and others. "Binding of Estrone sulfate in Human Plasma," Journal of Clinical Endocrinology. and Metabolism. 34 : 805 - 813, 1972.
- Ryan, K.J. Benirschke, K. and Smith, O.W. "Conversion of Androstenedione -4-C to Estrone by the Marmoset Placenta," Endocrinology. 69 : 613 - 618, 1961.
- Seaton, B. "Patterns of Oestrogen and Testosterone Excretion during Pregnancy in a Gorilla (Gorilla gorilla)," Journal of Reproduction and Fertility. 53 : 231 - 236, 1978.
- Shandiya, L.N. Ramaswami, L.S. and Shandiya. "Oestrogen Metabolites in Urine during the Menstrual Cycle, Pregnancy and Puerperium in the Indian Hanuman Langer (Presbytis entellus entellus)," Journal of Reproduction and Fertility. 47 : 7 - 11, 1976.
- Shideler, S.E. and others. "Urinary Estrogens during Pregnancy of the Ruffed Lemur," Biology of Reproduction. 28 : 963 - 969, 1983.
- Shinada, T. and Ryan, K.J. "The in Vitro Biosynthesis and Metabolism of Progesterone and Oestrogens by Chimpanzee Placental Tissues," Steroids. 21 : 233 - 244, 1973.

- Short, R.V. and Eckstein, P. "Oestrogen and Progesterone Levels in Pregnant Rhesus monkeys," Journal of Endocrinology. 22 : 15 - 22, 1961.
- Sliteri, P.K. MacDonald, P.C. "Placental Estrogen Biosynthesis during Human Pregnancy," Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 26 : 751 - 761, 1966.
- Simmer, H.H. and others. "Neutral C-19-Steroids and Steroids sulfates in Human Pregnancy. I. Identification of DHEA-S in Fetal Blood and Quantification of this Hormone in Cord artery, Cord venous and Maternal peripheral blood in Normal Pregnancies at Term," Steroids. 4 : 125 - 135, 1964.
- "On the regulation of Estrogen Production by cortisol and ACTH in Human Pregnancy at Term," American Journal of Obstetric and Gynecology. 119 : 283 - 296, 1974.
- Slaunwhite, W.R. Kirdani, R.Y. and Sandberg, A.A. "Metabolic Aspects of Oestrogens in Man," In : Handbook of Physiology. William and Wilkins, Baltimore, 1973.. 524 p.
- Snyder, D.L. and others. "Extent of in Vivo Aromatization of Dehydroepiandrosterone sulfate and Dehydroepiandrosterone by Perfused Macaca mulatta," Endocrinology. 88 : 274 - 278, 1971.
- Stabenfeldt, G.H. and Hendrickx, A.G. "Progesterone Studies in the Macaca fascicularis," Endocrinology. 92 : 1296 - 1300, 1973.
- Tangpraprutigul, P. and Varavudhi, P. "Lack of Breeding Seasonality in the Macaca fascicularis Studies in Bangkok Environment," Journal of Steroid biochemistry. 17 : xci, 1982.
- Thau, R. Lanman, J. T. and Brinson, A. "Declining Plasma Progesterone Concentration with Advancing Gestation in Blood from Umbilical and Uterine viens," Biology of Reproduction. in press, 1976. 721 p.
- Thorburn, G.P. and others. "Parturition in the Goat and Sheep : Chaning in Corticosteroids, Progesterone, Oestrogens and Prostaglandin F., Journal of Reproduction and Fertility. Suppl. 16 : 61 - 80, 1972.
- Townsley, J.D. "Steroids Hormones in Pregnancy : The Baboon as a Model for Studies on Oestrogen Synthesis," The use of Nonhuman Primates in Research on Human Reproduction. WHO. Symposium. Sukhumi. 1971. 536 p.
- Treolar, O.L. Wolf, R.C. and Meyer, R.K. "The Corpus Luteum of the Rhesus monkey during Late Pregnancy," Endocrinology. 91 : 665 - 668, 1972.

Tulchinsky, D. "Placental Secretion of Unconjugated Estrone, Estradiol and Estriol into the Maternal and Fetal circulation," Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 36 : 1079 - 1087, 1973.

_____ and others. "Estrone, Estradiol, Progesterone and 17-Hydroxyprogesterone in Human Pregnancy," American Journal of Obstetric and Gynecology. 112 : 1095 - 1110, 1972.

Tullner, W.W. and Hertz, R.C. "Normal Gestation and Chorionic gonadotropin levels in the Monkey after Ovariectomy in Early Pregnancy," Endocrinology. 78 : 1076 - 1078, 1966 b.

Varavudhi, P. Tangpraprutigul, P. and Aswaroengchai, H. "Final Report" WHO Special Program of Research. Development and Research Training in Human Reproduction. 1982. 8 p.

_____. Progress Report. WHO Project on Reproductive Physiology of Non-human Primate (Macaca fascicularis) The Primate Center Chulalongkorn University. 1988. 50 p.

_____ and others. "Regulation of Corpus Luteum function in Tupaia glis and Macaca fascicularis" Primate Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn, University, Bangkok, Thailand, 1984. 17 p.

_____ and Yodyingyuad, V. "Hormonal Change during the Menstrual Cycles in the Crab Eating Monkey, Macaca fascicularis" Non-human Primate Models for study of Human Reproduction. S. Karger, 1980. 232 p.

Williams, R.F. Johnson, D.D. and Hodgen, G.D. "Ovarian Estradiol Secretion during Early Pregnancy in Monkeys : Luteal versus Extraluteal Secretion and Effect of Chorionic gonadotropin," Steroids. 32 : 539 - 546, 1978.

_____. "Ovarian Estradiol Secretion during Early Pregnancy in Monkeys : Luteal versus Extraluteal Secretion and Effect of Chorionic Gonadotropin," Steroids. 183 : 422 - 428, 1979.

World Health Organization. Method Manual. World Health Organization Collaborating Centre for Research and Reference Services in the Immunoassay of Hormone in Human Reproduction. 5 th ed. 1981. 66 p.

Wotiz, H.H. and others. "Studies in Steroid Metabolism, V. The Conversion of Testosterone -4-C¹⁴ to Estrogens by Human Ovarian Tissue," Journal of biological Chemistry. 222 : 487 - 495, 1956.

การตรวจวัดอีลัสตรีโอสโมในปลาลำของลิงหางยาว (Macaca fascicularis)

ในระหว่างการตั้งครรภ์ และระยะเลี้ยงลูกสัปดาห์แรก

โดยวิธีเรดิโอไอโซโทปโนเอลส์เลย์

บทคัดย่อ

ของ

ณรงค์ เดิมเล่าวงศ์

เล่นอดอมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการ ศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

มีนาคม . 2528

จุดมุ่งหมายของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อต้องการหาปริมาณ และการเปลี่ยนแปลงของ
ระดับฮอร์โมนอีลัสโตริโอล (E_3) ในปัสสาวะของลิงหางยาวในระหว่างการตั้งครรภ์และ
เลี้ยงลูกสัปดาห์แรก โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (RIA) โดยทำการคัดเลือกลิงตัวเมีย
อายุ 3.5 - 10 ปี จำนวน 5 ตัว จากศูนย์ทดลองไพรเมต คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ผสมแล้วตั้งครรภ์ในระหว่าง เดือนตุลาคม ถึง เดือนพฤศจิกายน
2525

จากผลของการศึกษาพบว่า ลิงตัวเมียมีรอบประจำเดือนเฉลี่ย 31 ± 3 วัน และ
ระยะตั้งครรภ์เฉลี่ย 165 ± 5 วัน ปริมาณของ E_3 ที่ตรวจวัดโดยวิธี RIA แอนติเซรัม
ของ E_3 จะมี Cross - reaction กับอีลัสโตริน (E_1) = 0.04 เปอร์เซ็นต์ และ
อีลัสตราไดออล (E_2) = 0.007 เปอร์เซ็นต์ ความแม่นยำของการวัด 80 - 85 เปอร์เซ็นต์
และความเที่ยงตรงของการวัด มี Coefficient of variation ของ intraassay
และ interassay เท่ากับ 7.23 และ 14.96 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และความไวของการวัด
 E_3 เท่ากับ 19 พิโคกรัมต่อ 0.5 มิลลิลิตร ปริมาณของ E_3 ในปัสสาวะของลิงทุกตัวที่ศึกษา
ในวันที่ 1 - 25 หลังการผสมพันธุ์ จะมีระดับต่ำกว่า 100 นาโนกรัม ต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะ
และระดับจะเพิ่มสูงขึ้นในระยะ 25 - 35 วันหลังการผสมพันธุ์ในลิงบางตัวประมาณ 150 -
300 นาโนกรัม ต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะ หันทีที่ไม่สามารถตรวจพบ mCG ในปัสสาวะ และ
อาจมีระดับสูงถึง 300 - 800 นาโนกรัม ต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะ ตั้งแต่วันที่ 35 - 80
ของการตั้งครรภ์ อย่างไรก็ตาม ก็มีลิงอีกกลุ่มหนึ่ง คือ เบอร์ 60 และเบอร์ 102 จะพบว่า
มีระดับของ E_3 ในปัสสาวะต่ำกว่า 150 นาโนกรัมต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะ ตลอดระยะเวลา
การตั้งครรภ์ ระยะท้ายของการตั้งครรภ์ ในลิงทุกตัวระดับของ E_3 จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ
ทางสถิติ ประมาณ 3 วันก่อนคลอดจาก 102 ± 50 เป็น 30 ± 20 นาโนกรัม ต่อ 24 ชั่วโมง
ปัสสาวะ และระดับของ E_3 จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 3 มีการคลอดเกิดขึ้น
จะเพิ่มจาก 30 ± 20 เป็น 140 ± 53 นาโนกรัม ต่อ 24 ชั่วโมงปัสสาวะ และในทุกกรณี
พบว่าระดับของ E_3 จะต่ำลงภายใน 24 ชั่วโมง หลังคลอด (< 50 ng/24 hr. urine)
และยังคงต่ำเช่นนี้ตลอดระยะ 1 สัปดาห์แรกของการให้นมลูก

ผลการศึกษาครั้งนี้งชี้ให้เห็นว่า E_3 ไม่ได้เป็นเมตาโบไลต์ที่ถูกกำจัดออกจากปัสสาวะมากที่สุดทางยาว เมื่อเปรียบเทียบกับเมตาโบไลต์ของ เอสโตรเจนตัวอื่น ฉะนั้น E_3 ที่ตรวจพบในปัสสาวะนี้ในระหว่างการตั้งครรภ์จึง เชื่อว่าเปลี่ยนแปลงมาจาก peripheral metabolism ของ E_1 ก่อนที่จะถูกกำจัดออกจากปัสสาวะมากกว่าจะ เกิดจากการสร้างของร่อก่วมกับตัวอ่อน สอดคล้องกับการที่ไม่สามารถตรวจพบ E_3 ในกระแสเลือดของหญิงทางยาวในระหว่างการตั้งครรภ์ได้ ซึ่งพบว่ามีสาเหตุมาจากต่อมหมวกไตและตับของตัวอ่อนไม่สามารถสร้าง 16α hydroxylation กับ dehydroepiandrosterone เพื่อเป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์ E_3 ได้

RADIOIMMUNOASSAY OF URINARY OESTRIOL

IN Macaca fascicularis DURING

PREGNANCY AND EARLY LACTATION

AN ABSTRACT

BY

NARONG TERMSEREEWONG

Present in partial fulfillment of the requirements

for the Master of Education degree

at Srinakharinwirot University

March 1985

The purpose of this study is to determine the quantity and change of oestriol levels in urine of the cynomolgus monkeys during pregnancy and the first week of lactation by radioimmunoassay (RIA) method. The study was performed by selecting female monkeys, 3.5 - 10 years of age from the Primate Center at Faculty of Science, Chulalongkorn University, pregnant animals mated during the month of October to November 1982

The result of this study revealed that female monkeys selected for the study had the average menstrual cycle of 31 ± 3 days and gestational period of 165 ± 5 days. The urinary E_3 levels was determined by RIA, E_3 antiserum cross - reactivities were 0.04% for E_1 and 0.007% for E_2 . The accuracy of the assay was 80 - 85%, and the precision of this measurment measured as the coefficient of variation of intraassay and interassay was 7.23 and 14.96%, respectively. The assay sensitivity of E_3 was 19 pg/0.5 ml. The urinary E_3 levels of all monkeys were always below 100 ng/24 hr. after 25 days of mating. Immediately after the disapperance of urinary mCG some monkeys showed sudden increment of E_3 levels. The values were as high as 150 - 300 ng/24 hr. during day 25 - 35 after mating, and 300 - 800 ng/24 hr. during day 35 - 80 of gestation. However, some monkeys, # 60 and # 102, still had urinary E_3 levels below 150 ng/24 hr. during the entire period of gestation. In late pregnancy the levels of E_3 in these monkeys decreased significantly from the period of 3 days before delivery, i.e., the

value changed from 102 ± 50 to 30 ± 20 ng/24 hr., after which this hormone suddenly increased significantly, i.e., the value changed from 30 ± 20 to 140 ± 53 ng/24 hr. With no exception, the urinary E_3 levels dropped sharply with 24 hours of post-delivery (< 50 ng/24 hr. urine) and remained low at least during the first few week of active lactation.

The results of this study indicate that the main estrogen metabolite excreted via urine of the pregnant cynomolgus monkeys might not be E_3 . The E_3 detected during pregnancy in this monkey could be due to peripheral metabolism of E_1 prior to the excretion via urine, rather than being actively synthesized the feto - placental unit. This agrees with the fact that E_3 could not be detected in the serum of the pregnant cynomolgus monkey due to the absence of 16α - hydroxylation of dehydroepiandrosterone, the steroid precursor of E_3 synthesis, in the fetal liver and adrenal gland.