บทที่ 5

วิจารณ์ และสรุปผลการทดลอง

5.1. วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองนี้การเตรียมแอนติเจน 17β—estradiol-6-o-carboxymethyl-oxime-HSA คำนวณอัตราส่วนการเชื่อมติดระหว่าง 17β-estradiol-6-o-carboxymethyl-oxime กับ HSA มีค่าเท่ากับ 11.4 :1 ตามวิธีการของ Erlanger และคณะ (1967) เมื่อนำไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกระต่ายพันธุ์แคลิฟอร์เนีย จำนวน 2 ตัว ได้แก่ กระต่ายหมายเลข 4 และ 5 พบว่ากระต่ายสร้างแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนอีสตราไดออลได้ โดยสามารถวัดตรวจวัดระดับไตเตอร์ ได้โดยวิธี RIA จะเห็นได้ว่ากระต่ายสามารถตอบสนองต่อแอนติเจนที่ฉีดเข้าสู่ร่างกายได้เป็นอย่างดี และแอนติเจนที่สร้างขึ้นมีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกระต่ายได้ จากนั้นเจาะเลือดกระต่ายที่บริเวณใบหู มาปั่นแยกเอาส่วนเซลล์ลิมโฟซัยท์ นำมาเชื่อมเซลล์รวมกับเซลล์ไมอิโลมาสายพันธุ์ X63Ag8.653 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งที่พัฒนามาจากหนูตัวเล็ก ปรากฏว่าเซลล์ที่เกิดขึ้นกลายเป็นเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ จากการทดลองพบว่าโอกาสในการเกิดเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ระหว่างกระต่ายกับหนูตัวเล็กเท่ากับ 5.47 % (21/384) แล้วพบว่าเป็นเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมนอีสตรา-ไดออลเท่ากับ 12 หลุมจาก 21 หลุม (57.14%) ของเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ที่เกิดขึ้น ฉะนั้นโอกาสการเกิดเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมนอีสตราไดออลเพียง 3.125 % (12/384) ซึ่งเป็นโอกาสที่น้อยมากในเกิดขึ้นของเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมนอีสตราไดออล เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการทดลองอื่นๆ เช่น Teng และคณะ(1983) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของคนจาก heterohybridomas ระหว่างหนูกับคน ซึ่งใช้เซลล์ลิมโฟซัยท์ของคนจากหลายแหล่ง ได้แก่ เซลล์จากระบบเลือดเชื่อมเซลล์กับเซลล์ไมอิโลมาสายพันธุ์ X63Ag8.653 เกิด heterohybridomas เท่ากับ 31% และผลิตอิมมูโนโกลบูลินชนิด จี (IgG) เท่ากับ 33 % ของ heterohybridomas ที่เกิดขึ้น และอีกทดลองของ Jahn และคณะ (1990) ที่สามารถใช้เซลล์จากเซลล์จากระบบเลือดเชื่อมกับเซลล์ไมอิโลมาสายพันธุ์ CB-C7 และ P3X63Ag8.653 ได้ผลผลิตเท่ากับ 96% และ 17 % ตามลำดับ และผลิตอิมมูโนโกลบูลิน ชนิดเอ็ม (IgM) จากผลการทดลองเมื่อได้หลุมที่มีเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมนอีสตราไดออลภายในหลุมจะมีเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์หลายเซลล์เจริญขึ้นพร้อมๆกัน ดังนั้นจึงต้องทำการแยกโคลนเดี่ยวของเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ในแต่ละหลุม จากผลการทดลองพบว่า 1 หลุมของเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ (3F5) สามารถแยกโคลนเดี่ยวได้ถึง 18 โคลน

ซึ่งแอนติบอดีที่แต่ละโคลนผลิตได้คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่ง MAb ที่ได้เป็น MAb ของกระต่าย เมื่อจำแนกชนิดของอิมมูโนโกลบูลิน พบว่า โคลนทั้ง 18 โคลน เป็นชนิด IgG ของกระต่าย เนื่องจากไม่มีรายงานการพบชนิดที่แยกย่อย IgG ของกระต่าย จึงมี IgG รวมเป็นเพียงชนิดเดียว และอีกชนิดที่สามารถหาซื้อได้คือ IgA ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีเพียง 2 ชนิดในการจำแนกชนิดของอิมมูโนโกลบูลินของกระต่าย หลังจากนั้นเมื่อได้ MAb ที่ได้จากแต่ละโคลนมาทดสอบคุณสมบัติในการจับกับแอนติเจน ดังภาพที่ 17-20 ปรากฏว่าเกิดปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง MAb จากโคลนต่างๆ กับแอนติเจน ปรากฏว่าแต่ละโคลนสามารถที่จะจับกับแอนติเจนได้ดี แต่คุณสมบัติการทำปฏิกิริยาจะแตกต่างกันออกไป และเมื่อเลือก MAb จากโคลน 3F5-6C6 และ 3F5-6D8 มาวัดปฏิกิริยาเกาะเกี่ยวกับสเตียรอยด์อื่นๆ เปรียบเทียบกับโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากกระต่ายหมายเลข N23 ปรากฏผลดังตารางที่ 9 จะเห็นว่า % cross reaction กับสเตียรอยด์อื่นๆ ของ MAb ที่มาจากแต่ละโคลนจะแตกต่างกันและแตกต่างจากโพลีโคลนอลแอนติบอดี เป็นไปทำนองเดียวกับรายงานของ Fantl และ Wang (1983) ที่ % cross reaction กับสเตียรอยด์อื่นๆ ของ MAb กับ โพลีโคลนอลแอนติบอดีมีค่าใกล้เคียงกัน

จากผลการทดลองนี้ทำการเพิ่มปริมาณ MAb ทำได้ 2 วิธี ได้แก่ วิธี *in vivo* โดยการเลี้ยงเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมนอีสตราไดออลในตัวหนูตัวเล็ก ที่เรียกว่า ascitic fluid ซึ่ง MAb ที่ได้จะมีการปนเปื้อนด้วยอิมมูโนโกลบูลินชนิดอื่นๆมาก (Campbell, 1984) แต่มีข้อดีที่ได้ คือได้ปริมาณแอนติบอดีปริมาณมาก การทำ ascitic fluid ในหนูตัวเล็กต้องมีข้อควรระวังในการฉีดเซลล์ herterohybridomas ถ้าปลายเข็มเข้าไปสะกิดอวัยวะภายในของหนูตัวเล็ก จะทำให้เกิดเนื้องอกในช่องท้อง (solid tumer) ทำให้ได้ปริมาณแอนติบอดีน้อย การทำส่วนวิธี *in vitro* เป็นการเลี้ยงในน้ำเลี้ยงชนิด UltraDOMA-PF ข้อดีคือมีการปนเปื้อนจากอิมมูโนโกลบูลินชนิดอื่นๆน้อยมาก แต่จะได้ปริมาณ MAb น้อย ต้องใช้น้ำเลี้ยงปริมาณมาก และใช้เวลาในการเลี้ยงโดยประมาณ 11-20 วัน การเพิ่มจำนวนเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ให้มีปริมาณมาก เมื่อเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ มีการแบ่งเซลล์ จะมีการหายไปของโครโมโซมของสัตว์ที่สปีชีส์สูงกว่า ในกรณีนี้คือโครโมโซมของกระต่าย ซึ่งมีความสำคัญต่อการสร้าง MAb เป็นอย่าง เพราะโครโมโซมของกระต่ายจะควบคุมการสร้าง MAb ของเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ Raybould และ Takahashi (1981) ได้ผลิต heterohybridomas ระหว่างเซลล์ลิมโฟซัยท์ของกระต่ายกับ SP2/0-Ag14 ได้เป็นผลสำเร็จ และสามารถรักษาเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์สามารถผลิต MAb ได้นานถึง 4 เดือนโดยการเติมซีรัมของกระต่าย เท่ากับ 7.5 % ของอาหารเลี้ยงเซลล์ ฉะนั้น ในการทดลองนี้จึงมีการเติม 7.5% NRS ในน้ำเลี้ยงเซลล์ ทำให้การผลิตแอนติบอดีของเซลล์ลูกผสมข้าม สปีชีส์ยังคงอยู่ตลอดการผลิต (ผลไม่ได้แสดงไว้) และเป็นยืนยันว่าเซลล์ heterohybridomas ที่ได้จากการเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์เชื่อม

เซลล์ระหว่างเซลล์ไมอิโลมา (X63Ag8.653) กับเซลล์เม็ดเลือดขาวของกระต่ายที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนอีสตราไดออล ผลการทดลองได้จาก กนกวรรณ (2542) พบว่ากระต่ายพันธุ์แคลิฟอร์เนีย (*Oryctolagus cuniculus*) มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 22 คู่ ซึ่งมีโครโมโซมชนิด เมตาเซนตริคเท่ากับ 11 คู่ ซับเมตาเซนตริคเท่ากับ 6 คู่ ส่วนชนิดอะโครเซนตริคมี 3 คู่ และโครโมโซมเพศ (sex chromosome) 1 คู่ ส่วนโครโมโซมของเซลล์ไมอิโลมาสายพันธุ์ X63Ag8.653 เป็นชนิดอะโครเซนตริคทั้งหมด ซึ่งมีประมาณ 50 – 58 ชิ้น และเมื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมของเซลล์ heterohybridomas ที่ได้การเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวของกระต่ายกับเซลล์ไมอิโลมา (X63Ag8.653) ปรากฏว่ามีจำนวนโครโมโซมมีความแปรปรวนอย่างมากในแต่ละเซลล์ 52 - 72 ชิ้น ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมน้อย เนื่องจากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมได้ทำหลังจากการเชื่อมเซลล์นาน 5 เดือน ฉะนั้นเซลล์ heterohybridomas มีการกำจัดโครโมโซมออกจากเซลล์บางส่วน เนื่องจากเป็นเซลล์ที่เกิดจากการเชื่อมเซลล์ของสัตว์ข้าม สปีชีส์ระหว่างกระต่ายกับหนูตัวเล็ก เซลล์ข้ามสปีชีส์จะกำจัดโครโมโซมของสัตว์ที่มีสปีชีส์สูงกว่าออกไป ในกรณีนี้คือกระต่าย (Raybould and Takahashi, 1981) โครโมโซมของเซลล์ heterohybridomas ส่วนใหญ่จะเป็นชนิดอะโครเซนตริคของเซลล์ไมอิโลมาส่วนในเซลล์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนอีสตราไดออลได้ จะปรากฏโครโมโซมชนิดเมตาเซนตริค และซับเมตาเซนตริค ซึ่งเป็นของกระต่ายอยู่ประมาณ 1-3 คู่ ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกถึงเซลล์ heterohybridomas ได้จากการเชื่อมเซลล์ทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันเป็นผลสำเร็จ และหลักฐานที่ยืนยันได้ชัดคือการผลิต MAb ต่อฮอร์โมนอีสตราไดออล

หลังจากที่ได้ MAb ปริมาณมากพอจึงนำไปใช้ในวิธี ELISA ในการวัดปริมาณอีสตราไดออลในน้ำนมโคนมที่สกัดแล้ว เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานของ MAb โคลน 3F5-6D8 โดยใช้ไมโครเพลท เป็น solid-phase พบว่าอัตราเจือจางของ MAb ที่เหมาะคือ 1:16 และ estradiol-peroxidase-labeled อัตราการเจือจางที่เหมาะสมคือ 1:100 เมื่อได้จุดที่มีความเหมาะสมแล้ว เมื่อนำสร้างกราฟสารละลายมาตราฐานของฮอร์โมนอีสตราไดออลที่ความเข้มข้นต่างๆ ปรากฏว่าของการวิเคราะห์ 50% binding อยู่ที่ 8 pg/ml และสามารถบอกความแตกต่างของค่าฮอร์โมนอีสตราไดออลในตัวอย่างสกัดจากโคนมที่เป็นสัด และไม่เป็นสัดอย่างชัดเจนได้ จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร โดยตัวอย่างโคที่เป็นสัดจะมีปริมาณอีสตราไดออลสูง (จากผล RIA) จากการทดลองจะได้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำ ส่วนตัวอย่างสกัดของโคที่ไม่เป็นสัดมีปริมาณอีสตราไดออลต่ำมาก (จากผลของ RIA) จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงมาก ในรายงานของ Meisterling และ Dailey (1987) ในน้ำนมมีระดับฮอร์โมนอีสตราไดออล17-เบต้าการเพิ่มสูงสุดของฮอร์โมนอีสตราไดออล ในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 4.2 พิโคกรัม/มล. และมีระดับลดลงต่ำลงหลังจากนั้นที่ก่อนและหลัง 12, 24, 36 ชั่วโมง เท่ากับ 2.5, 1, 0.8 พิโครกรัม/มล. เช่นเดียวกับ Dobson (1983) รายงานความเข้มข้นของฮอร์โมน

อีสตราไดออล 17-เบต้า ในน้ำนมของโคในระยะลูเทียลเฟส เท่ากับ 1-4 พิโคกรัม/มล. และในระยะฟอลลิคูล่าเฟส เท่ากับ 4-6 พิโคกรัม/มล. จากการทดลองโดยใช้ไมโครเพลทเป็น solid-phase พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงได้อย่างชัดเจน ค่าของตัวอย่างสกัดจากน้ำนมโคที่เป็นสัดอยู่ระหว่าง 0.172-0.326 และตัวอย่างสกัดที่ไม่เป็นสัดอยู่ระหว่าง 1.102-0.610 และเมื่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร สามารถแยกความแตกต่างของโคที่เป็นสัดและไม่เป็นสัดให้ได้อย่างชัดเจน และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐานของความเข้มข้นฮอร์โมนอีสตราไดออล พบว่าสามารถบ่งบอกได้ในระดับที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมนปริมาณน้อยๆได้ ในการทดลองนี้บอกได้ในเชิงปริมาณ แสดงให้เห็นว่าสามารถวัดระดับของฮอร์โมนอีสตราไดออลในปริมาณน้อยกว่า 2.5 pg/ml ได้ ซึ่งวิธี RIA วัดไม่ได้ ส่วนในปริมาณที่ระดับอีสตราไดออลสูงค่าออกมาสูงกว่าวิธี RIA ซึ่งการใช้ปริมาณของตัวอย่างสกัดยังไม่ได้ปริมาณที่พอดี ในในปริมาณที่มาเกินไปหรือความเข้มข้นของฮอร์โมนในตัวอย่างมากเกินไป เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐานของความเข้มข้นฮอร์โมนอีสตราไดออล ที่มีความไวของการวัดความเข้มข้นของฮอร์โมนต่ำ ทำให้อ่านค่าความเข้มข้นออกมาได้สูง ในทำนองเดียวกัน เมื่อเปลี่ยน solid-phase เป็นแผ่นไนโตรเซลลูโลส พบว่าอัตราการเจือจางที่เหมาะสมของแอนติบอดีโคลน 3F5-6D8 อยู่ที่ 1:16 และของ estradiol-peroxidase-labeled อยู่ที่ 1:2000 ซึ่งเปลี่ยนไปจากการใช้ไมโครเพลท ในการใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลสจะใช้แอนติบอดีและ estradiol-peroxidase-labeled ประหยัดกว่าการใช้ไมโครเพลท แต่เมื่อสร้างกราฟมาตราฐานกับอีสตราไดออล 50% binding จะเลื่อนไปอยู่ที่ 50 pg/ml เมื่อนำมาตรวจวัดแยกความแตกต่างระหว่างโคนมที่เป็นสัดและไม่เป็นสัดได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี RIA มีค่า 50% binding อยู่ที่ 247 pg/ml และ 85 %binding อยู่ที่ 42 pg/ml ซึ่งบอกระดับของฮอร์โมนอีสตราไดออลได้ไม่ละเอียดและชัดเจนนัก เพราะปริมาณของฮอร์โมนในตัวอย่างสกัดมีปริมาณน้อยกว่า sensitivity ของการวัดด้วยวิธี RIA จะเห็นได้ว่า วิธีการวัดปริมาณฮอร์โมนแบบ ELISA มีความไวมากกว่าวิธี RIA ซึ่งความไวของการวัดของวิธี ELISA จะขึ้นกับการเลือกใช้ solid-phase ด้วย และเมื่อสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโคนมที่เป็นสัดและไม่เป็นสัดได้ จากการทดลองนี้เป็นแนวทางในการพัฒนาในทางการวิเคราะห์ตัวอย่างสกัดจากน้ำนมโคนมอย่างง่ายและมุ่งเน้นในการผลิตให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนอีสตราไดออลเป็นหลัก ฉะนั้นเมื่อมีพัฒนาในมีการวัดที่แม่นยำและคงที่ก็จะสามารถที่จะนำไปประยุกต์สำหรับตรวจวัดการเป็นสัดของโคนมและโคเนื้อนอกห้องปฏิบัติการหรือในฟาร์มได้ต่อไป

5.2. สรุปผลการทดลอง

การทดลองนี้เพื่อการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อต้านออร์โมนอีสตราไดออล โดยได้จากเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ระหว่างเซลล์ไมอิโลมาของหนูตัวเล็ก กับเซลล์เม็ดเลือดขาวของกระต่ายที่มีการสร้างภูมิคุ้มกันของฮีสตราไดออล โดยการเตรียมแอนติเจน 17β—estradiol-6-o-carboxymethyl-oxime-HSAสามารถเชื่อม 17β—estradiol-6-o-carboxymethyl-oxime เข้ากับ HSA ได้ 11.4 โมเลกุลต่อโมเลกุลโปรตีน แล้วนำไปผสมรวมกับ FCA อัตราส่วน 1:1 ฉีดกระต่ายทุกๆ 2 สัปดาห์/ครั้ง เมื่อกระต่ายมีภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนอีสตราไดออล ซึ่งวัดได้จากวิธี RIA จากนั้นทำการหลอมเซลล์ระหว่างเซลล์ลิมโฟซัยท์ของกระต่าย กับเซลล์ไมอิโลมาของหนูตัวเล็กสายพันธุ์ X63Ag8.653 ปรากฏว่าเกิดเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมนอีสตราไดออลเท่ากับ 12 หลุมจาก 21 หลุม (57.14%) ของเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ที่เกิดขึ้นการแยกโคลนเดี่ยวได้เซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมนอีสตราไดออลทั้งหมด 18 โคลน และ MAb ทั้งหมดเป็น IgG คุณสมบัติทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของ MAb แต่ละโคลนมีความแตกต่างกัน เลือก MAb ของโคลน 3F5-6D8 มาใช้ในวิธี ELISA ค่า % cross reaction โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากพลาสมาของกระต่าย มีค่า % cross reaction กับฮอร์โมนชนิดต่างๆ โดยเฉพาะฮอร์โมนอีสโตรน (1.502 %) มากกว่า % cross-reaction ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ การวิเคราะห์โดยวิธี EILSA การใช้ไมโครเพลทเป็น solid-phase จะให้กราฟมาตราฐานที่มี 50% binding อยู่ที่ 8 pg/ml และสามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างสกัดจากโคเป็นสัดและโคไม่เป็นสัดได้อย่างชัดเจนโดยค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ส่วนใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลส 50% binding อยู่ที่ 50 pg/ml การใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลส เป็น solid-Phase สามารถแยกความแตกต่างระหว่างโคนมที่เป็นสัดและไม่เป็นสัด โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร และการสังเกตความแตกต่างได้ด้วยตาเปล่า จึงสามารถตรวจการเป็นสัดของโคนมได้ ส่วนวิธี RIA เป็นวิธีที่ใช้มาแต่เดิมมี 50 % binding อยู่ที่ 247 pg/ml ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความไวในการวัดน้อยกว่า วิธี ELISA ซึ่งความไวจะขึ้นกับการเลือกใช้ชนิดของ solid-phase จากการทดลองนี้สามารถนำ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนอีสตราไดออล ที่ผลิตได้จากเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ มาใช้ในการตรวจสัดของโคนม โดยวิธี ELISA ได้ในเชิงคุณภาพ

5.3. ข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งต่อไป สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ต่อต้านฮอร์โมนอีสตราไดออล เพื่อการตรวจการเป็นสัดในโคนมโดยวิธี ELISA ควรคำนึงถึงคือ โอกาสในการเกิดเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมนอีสตราไดออลมีน้อยมาก ฉะนั้นควรทำการเชื่อมเซลล์ โดยใช้จำนวนเซลล์มากกว่าในการทดลองนี้ ในส่วนของการวัดปริมาณฮอร์โมนอีสตราไดออลควรมีทำการค่า % recovery ของการวิธี ELISA ด้วย และทำการเปรียบเทียบต้นทุนการต่อตัวอย่างการวัดและความแม่นยำในการใช้วัดกับ ELISA kid ที่มีขายอยู่ในปัจจุบัน การตรวจการเป็นสัดโดยการวิเคราะห์ ควรเพิ่มตัวอย่างให้มากขึ้น และหามาตราฐานในการเปรียบเทียบปริมาณของอีสตราไดออลในน้ำนม เช่น เปรียบเทียบในหน่วยของปริมาณโปรตีนในน้ำนม และควรศึกษารอบการเป็นสัดและปริมาณอีสตราไดออลทั้งวงรอบการเป็นสัด ควรพัฒนาทางด้านการตรวจวัดให้สามารถตรวจวัดระดับอีสตราไดออลในน้ำนมได้โดยตรงโดยไม่ต้องทำการสกัดตัวอย่างน้ำนม ควรศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอีสตราไดออลกับการได้รับการผสมพันธุ์ มีความสัมพันธ์กันมากน้อยอย่างไร ควรนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ นำไปทำ passive immunity กับกระต่าย เพื่อดูผลในทางสรีรวิทยาที่เกิดขึ้นกับกระต่าย