

ภาวะผิดปกติของการทำงานของฮอร์โมนจากต่อมไทรอยด์ และผลกระทบที่มีต่อ
ฮอร์โมนสืบพันธุ์ของลิงหางยาว (*Macaca fascicularis*) เพศเมียโตเต็มวัย
ระหว่างให้กินยาเมธิมาซอลระยะยาวและการกลับคืนสภาพหลังหยุดยา



นางสาว เกสร สุวรรณประเสริฐ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2534

ISBN 974-578-397-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

017705

117256744

DISORDERS OF THYROID HORMONE FUNCTIONS AND INFLUENCES UPON
REPRODUCTIVE HORMONE PRODUCTION OF ADULT FEMALE CYNOMOLGUS
MONKEY (MACACA FASCICULARIS) CHRONICALLY FORCED-FED
DAILY WITH METHIMAZOLE AND ITS RECOVERY AFTER DRUG
WITHDRAWAL

Miss Kesorn Suwanprasert

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy

Biological Science Programme

Graduate School

Chulalongkorn University

1991

ISBN 974-578-397-8



Thesis Title Disorders of Thyroid Hormone Functions and Influences upon Reproductive Hormone Production of Adult Female Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Chronically Forced-Fed Daily with Methimazole and Its Recovery after Drug Withdrawal

By Miss Kesorn Suwanprasert

Department Inter-department of biological science

Thesis advisory committee

Associate Professor Vichai Poshyachinda, M.D.

Professor M.R. Puttipongse Varavudhi, Ph.D.

Associate Professor Nikom Chaisiri, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfilment of the Requirement for the Doctor of Philosophy Degree.

Thavorn Vajrabhaya
 Dean of Graduate School
 (Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

Kosin Amatayakul
 Chairman
 (Professor Kosin Amatayakul, M.B. Ch.B., F.R.C.O.G.)

..... Member
 (Associate Professor Vichai Poshyachinda, M.D.)

Puttipongse Varavudhi
 Member
 (Professor M.R. Puttipongse Varavudhi, Ph.D.)

Nikom Chaisiri
 Member
 (Associate Professor Nikom Chaisiri, Ph.D.)

Makhumkrong Poshyachinda
 Member
 (Associate Professor Makhumkrong Poshyachinda, M.D.)

K. Pavasuthipaisit
 Member
 (Associate Professor Kanok Pavasuthipaisit, Ph.D.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University.

เกสร์ สุวรรณประเสริฐ : ภาวะผิดปกติของการทำงานของฮอร์โมนจากต่อมไทรอยด์ และ ผลกระทบที่มีต่อฮอร์โมนสืบพันธุ์ของลิงหางยาว (*Macaca fascicularis*) เพศเมียโตเต็มวัย ระหว่างให้กินยาเมธิมาซอลระยะยาวและการกลับคืนสภาพหลังหยุดให้ยา (DISORDERS OF THYROID HORMONE FUNCTIONS AND INFLUENCES UPON REPRODUCTIVE HORMONE PRODUCTION OF ADULT FEMALE CYNOMOLGUS MONKEY (*Macaca fascicularis*) CHRONICALLY FORCED-FED DAILY WITH METHIMAZOLE AND ITS RECOVERY AFTER DRUG WITHDRAWAL) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ทพ.วิชัย โปษยะจินดา, ศ.ดร.ม.ร.ว.พุดผิงค์ วรวุฒิ, รศ.ดร.นิคม ชัยศิริ, 278 หน้า. ISBN 974-578-397-8

วัตถุประสงค์การศึกษาครั้งนี้คือ (1) ใช้ลิงหางยาวเพศเมียโตเต็มวัยเป็น animal model ในการชักนำให้เกิดภาวะไฮโปไทรอยด์ 3 ระดับ คือ ระดับรุนแรง ปานกลาง และระยะฟื้นตัว ด้วยการให้กินยา methimazole (MMI) (2) ศึกษาผลกระทบของภาวะไฮโปไทรอยด์ที่เกิดขึ้นต่อการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมน T₃, T₄, fT₄, TSH, PRL, E₂ และ P รวมทั้ง TBG ในซีรัม และ (3) ศึกษาเปรียบเทียบระดับฮอร์โมนเหล่านี้ และ TBG ในลิงที่อยู่ในภาวะตั้งครรภ์หลังหยุดให้ยาเปรียบเทียบกับกลุ่มตั้งครรภ์ปกติ

ผลการศึกษาพบว่า ลิงทุกตัวที่ได้กินยา MMI 10 มก./วัน เป็นเวลา 4 - 20 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดภาวะไฮโปไทรอยด์ได้ เมื่อปรับขนาดยาเหลือ 5 มก./วัน และ 2.5 มก./วัน จะสามารถแสดงความแตกต่างของภาวะไฮโปไทรอยด์ในระดับรุนแรงและระดับปานกลางได้ โดยสามารถรักษาระดับรุนแรงและระดับปานกลางได้เป็นเวลา 63 - 140 วัน และ 80 - 231 วัน และพบระดับ fT₄ ลดต่ำลง 0.03 - 0.45 ng/dl และ 0.60 - 1.10 ng/dl ตามลำดับ พบว่าระดับของ T₃ และ T₄ ได้ลดลงอย่างสอดคล้องกับการลดลงของ fT₄ ส่วนระดับ TSH ได้เพิ่มสูงขึ้นและแกว่งอยู่ในระดับสูงกว่า 35 mIU/L และ 4 - 19 mIU/L ในขณะที่มีการผ่อนคลายจากระดับรุนแรงไปเป็นระดับปานกลางนั้นได้พบปรากฏการณ์ compensation ขึ้น ในลิงที่ปรับตัวเข้าพบภาวะไฮโปไทรอยด์ระดับรุนแรงเกิดขึ้น 2 ครั้งด้วยกัน ในระหว่างที่ลิงเป็นไฮโปไทรอยด์นั้นทุกตัวจะแสดงอาการหงุดหงิด น้านมไหล เชื่องซึม และเบื่ออาหาร ในระหว่างภาวะไฮโปไทรอยด์ระดับรุนแรงนั้นระดับ PRL เพิ่มสูงขึ้น และสอดคล้องกับการเพิ่มสูงขึ้นของ TSH มีการเพิ่มระดับ TBG ในลิงบางตัว นอกจากนี้ได้พบการลดต่ำของระดับ E₂ และ P อย่างชัดเจนร่วมกับภาวะรอบประจำเดือนผิดปกติ และ amenorrhea แต่ในระดับปานกลางนั้นกลับพบว่าระดับของ PRL ได้ลดลงตามระดับ TSH ภาวะเช่นนี้ตรวจพบว่าลิงกลับมามีประจำเดือนและมีระดับ E₂ และ P เพิ่มสูงขึ้นในระยะ follicle และ luteal ในบางรอบประจำเดือนปกติตรวจพบ LH peak ตอน mid cycle ด้วย

เมื่อหยุดให้ยาระดับของ T₃, T₄ และ fT₄ จะค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นกลับสู่ค่าปกติ ในขณะที่ระดับ TSH ลดต่ำลง เช่นเดียวกับระดับ PRL และ TBG ในลิงเบอร์ 63 ซึ่งตั้งครรภ์ได้ทั้งที่ในรอบประจำเดือนแรกหลังหยุดให้ยา พบว่ามีแบบแผนฮอร์โมนจากต่อมไทรอยด์ อัตราส่วน T₄ : T₃, fT₄, TBG, E₂ และ P คล้ายคลึงกับในกลุ่มตั้งครรภ์ปกติ แม้วาระดับ PRL ยังมีแนวโน้มสูงอยู่เมื่อเทียบกับภาวะเพิ่มขึ้นของ PRL ในขณะตั้งครรภ์ปกติ ระดับของ TSH มีแบบแผนลดลงในขณะที่กลุ่มตั้งครรภ์ปกติมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

ภาควิชา สหสาขาวิชา
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนิติ 11- P
คณะกรรมการที่ปรึกษา วิทยาลัยแพทย

.....
.....

KESORN SUWANPRASERT : DISORDERS OF THYROID HORMONE FUNCTIONS AND INFLUENCES UPON REPRODUCTIVE HORMONE PRODUCTION OF ADULT FEMALE CYNOMOLGUS MONKEY (*Macaca fascicularis*) CHRONICALLY FORCED-FED DAILY WITH METHIMAZOLE AND ITS RECOVERY AFTER DRUG WITHDRAWAL. THESIS ADVISOR: ASSO.PROF.VICHAI POSHYACHINDA, M.D., PROF.M.R.PUTTIPONGSE VARAVUDHI, Ph.D. ASSO.PROF.NIKOM CHAISIRI, Ph.D. 278 PP. ISBN 974-578-397-8

The aims of this study are (i) to establish the various degrees of hypothyroidism in adult female cynomolgus monkeys by forced-fed with methimazole (MMI), (ii) to investigate the influence of these states of hypothyroidism upon serum levels of thyroid hormones, TBG, TSH, PRL, E_2 , and P, (iii) to compare these hormonal patterns between the pregnant monkey previously treated with MMI and normal pregnant monkeys.

MMI in the dose of 10 mg/day for 4 - 20 weeks was capable of inducing hypothyroidism. The drug was reduced to 5 and 2.50 mg/day in order to exhibit less degree of inhibition and thereby the severity of hypothyroidism. These dosages of MMI were used for maintaining severe and mild hypothyroidism for 63 - 140 and 80 - 231 days, respectively. Severe and mild states of serum fT4 levels declined to 0.03 - 0.45 ng/dl and 0.60 - 1.10 ng/dl. Corresponding decrease of T3 and T4 were evident along with lower fT4 levels. On the other hand, TSH increased prominently during the severe state (> 35 mIU/L) and then dropped to 4 - 19 mIU/L during the mild state. Compensatory phenomena were noticed during the period between severe and mild states. Only one animal showed two periods of severe states. During the progressive hypothyroidism, clinical symptoms such as edematous eye lids, amenorrhea, galactorrhea, anorexia and lethargy were also observed.

The PRL levels elevated in concurrent with the raised TSH levels during severe hypothyroidism. Increment of TBG levels during this state was noted due mainly to lower T3 and T4 levels. Both levels of E_2 and P declined with irregular bleeding cycles interspersed with amenorrhea. In mild state, serum PRL levels reduced concomitantly with lower TSH levels. The greater E_2 and P during the follicular and luteal phases with resumption of menstrual bleeding cycles were found. Some normal cycles showed detectable LH peak in mid cycle with classical higher E_2 and P patterns during the follicular and luteal phases, respectively.

After drug withdrawal, the levels of T3, T4 and fT4 started to rise progressively toward the control values whereas the TSH levels diminished gradually toward the normal values. Both PRL and TBG levels decreased to normal. Pregnancy occurred during the first post-treatment cycle monkey no. 63. Comparing these hormonal patterns including TBG throughout entire gestation of monkey no. 63 and normal pregnant animals, most of them were similar. However, the PRL levels of no. 63 remained fairly high before and during the pregnancy and seemed to be greater than those in normal pregnancy while the pattern of TSH levels tended to be low and contrasted to those in normal pregnancy.

ภาควิชา สหสาขาวิชา
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนิติ
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
.....
.....



ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my deepest gratitude and admiration to my advisory committee, Associate Prof. Dr. Vichai Poshyachinda, Prof. Dr. M.R. Puttipongse Varavudhi and Associate Prof. Dr. Nikom Chaisiri for their expert guidances, patience, understanding and constant encouragement throughout this study. Their contributions cannot be easily measured.

Sincere appreciation is also expressed to Prof. Dr. Kosin Amatayakul, Associate Prof. Dr. Makhumkrong Poshyachinda, and Associate Prof. Dr. Kanok Pavasuthipaisit who served on my defence committee and gave me some valuable comments and suggestions

Gratitudes are also extened to the financial funds provided by the National Research Council of Thailand and the Primate Research Unit, Chulalongkorn University. My thanks are extened to the National Institute of Health, USA for providing the monkey LH reagents and the staffs of Institute of Health Research; Department of Nuclear Medicine, Faculty of Medicine; and Primate Research Unit.

Finally I am greatly indepted to my parents who have given me intelligence and my elder brother for his extremely useful support and encouragement given to me. As mentioned here, I wish to express my thanks to the monkeys

whom taught me touched the human being. Lacking any of
above mentioned, this dissertation could never have been
finished.



CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENT	vi
CONTENTS	viii
LIST OF FIGURES	xi
LIST OF TABLES	xviii
ABBREVIATION	xix
CHAPTER	
I INTRODUCTION AND AIMS	1
II BACKGROUND INFORMATION	6
III MATERIALS AND METHODS	43
IV RESULTS	104
1. Basal levels of thyroid hormones,	104
TSH, PRL, E ₂ and P during D10 and D23	
of the immediate treatment cycle and	
D3 of treatment cycle.	
2. Study the effects of MMI on serum	106
levels of thyroid hormones and TSH.	
3. Patterns of TSH and PRL secretion	123
during MMI-induced hypothyroidism and	
drug withdrawal: Hyperprolactinemia	
complication during MMI treatment	
4. Study the effects of various different ...	129

CONTENTS
(continued)

CHAPER	Page
states of MMI-induced hypothyroidism on serum profiles of E ₂ and P.	
5. TBG profile patterns during MMI-induced hypothyroidism and MMI- withdrawal period.	147
6. Profile patterns of thyroid hormones, ... TSH, PRL, TBG, E ₂ and P in normal pregnancy and pregnant monkeys previously treated with MMI(no. 63).	166
V. DISCUSSION	177
1. Basal values of thyroid and reproductive hormones during pre-treatment cycle.	177
2. MMI-induced hypothyroidism.	180
3. Patterns of TSH and PRL secretion during MMI-induced hypothyroidism and drug withdrawal.	187
4. TBG profile patterns during MMI-induced hypothyroidism and MMI-withdralwal period.	188
5. Baseline levels of thyriod hormones, TSH, PRL, E ₂ and P in normal pregnancy and during pregnancy previously treated with MMI.	192

CONTENTS
(continued)

CHAPTER		Page
	6. Influences of MMI-induced hypothyroidism and MMI-withdrawal on serum E ₂ and profiles.	198
VI	REFERENCES	207
VII	APPENDICES	264
	BIOGRAPHY	278

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. The studying protocol and menstrual cycle..... record in monkey no. 33.	46
2. The studying protocol and menstrual cycle..... record in monkey no. 25.	47
3. The studying protocol and menstrual cycle..... record in monkey no. 78.	48
4. The studying protocol and menstrual cycle record in monkey no. 87.	49
5. The studying protocol and menstrual cycle..... record in monkey no. 77.	50
6. The studying protocol and menstrual cycle record in monkey no.101.	51
7. The studying protocol and menstrual cycle record in monkey no. 63.	52
8. Paralellism in the immunoreactivities of..... human T4 standard and serial dilutions of cynomolgus T4 serum	55
9. Paralellism in the immunoreactivities of..... human T3 standard and serial dilutions of cynomolgus T3 serum	61

LIST of FIGURES
(continued)

Figure	Page
10. Paralellism in the immunoreactivities of.... human TSH standard and serial dilutions of cynomolgus TSH serum	66
11. Paralellism in the immunoreactivities of..... human PRL standard and serial dilutions of cynomolgus PRL serum	70
12. Paralellism in the immunoreactivities of..... human TBG standard and serial dilutions of cynomolgus TBG serum.	75
13. Parallelism in the immunoreactivities of..... human fT4 standard and serial dilutions of cynomolgus fT4 serum	79
14. Iodination of mLH and fractional collection....	88
15. Both edematous eye lids in severe..... hypothyroidism monkey	108
16. Galactorrhea in severe hypothyroidism..... monkey	108
17. MMI-induced hypothyroidism with changing..... the levels of fT4,T4,T3 and TSH in monkey no.33.	116
18. MMI-induced hypothyroidism with changing..... the levels of fT4,T4,T3 and TSH in monkey no.25.	117

LIST OF FIGURES
(continued)

Figures	Page
19. MMI-induced hypothyroidism with changing the levels of fT4,T4,T3 and TSH in monkey no. 78.	118
20. MMI- induced hypothyroidism with changing the levels of fT4,T4,T3 and TSH in monkey no. 87.	119
21. MMI-induced hypothyroidism with changing the levels of fT4,T4,T3 and TSH in monkey no.77.	120
22. MMI-induced hypothyroidism with changing the levels of fT4,T4,T3 and TSH in monkey no. 101.	121
23. MMI-induced hypothyroidism with changing the levels of fT4,T4,T3 and TSH in monkey no. 63.	122
24. The profiles of serum TSH and PRL during each state of MMI-induced hypothyroidism in monkey no.33.	131
25. The profiles of serum TSH and PRL during each state of MMI-induced hypothyroidism in monkey no.25.	132
26. The profiles of serum TSH and FRL during 	133

LIST OF FIGURES
(continued)

Figures	Page
each state of MMI-induced hypothyroidism in monkey no.78.	
27. The profiles of serum TSH and PRL during each state of MMI-induced hypothyroidism in monkey no. 87.	134
28. The profiles of serum TSH and PRL during each state of MMI-induced hypothyroidism in monkey no. 77.	135
29. The profiles of serum TSH and PRL during each state of MMI-induced hypothyroidism in monkey no.101.	136
30. The profiles of serum TSH and PRL during each state of MMI-induced hypothyroidism in monkey no. 63	137
31. The profiles of serum E ₂ , P and fT ₄ during early MMI treatment, late MMI treatment and after MMI withdrawal in monkey no. 33	149
32. Composition pattern of circulating levels of serum LH, E ₂ and P in the 34 day cycle of mild hypothyroidism state in monkey no. 33	150
33. The profiles of serum E ₂ , P and fT ₄ during early MMI treatment, late MMI treatment and after MMI withdrawal in monkey no. 25.	151

LIST OF FIGURES
(continued)

Figures	Page
34. The profiles of serum E ₂ , P and fT4 during early MMI treatment, late MMI treatment and after MMI withdrawal in monkey no. 78	152
35. The profiles of serum E ₂ , P and fT4 during early MMI treatment, late MMI treatment and after MMI withdrawal in monkey no. 87	153
36. The profiles of serum E ₂ , P and fT4 during early MMI treatment, late MMI treatment and after MMI withdrawal in monkey no. 77	154
37. The profiles of serum E ₂ , P and fT4 during early MMI treatment, late MMI treatment and after MMI withdrawal in monkey no. 101	155
38. The profiles of serum E ₂ , P and fT4 during early MMI treatment, late MMI treatment and after MMI withdrawal in monkey no. 63	156
39. The serum TBG, fT4 and T4 profiles during... hypothyroidism in monkey no. 63	159
40. the serun TBG, fT4 and T4 profiles during ... hypothyroidism in monkey no. 33	160
41. The serum TBG, fT4 and T4 profiles during ... hypothyroidism in monkey no. 25	161
42. The serum TBG, fT4 and T4 profiles during ... hypothyroidism in monkey no. 78	162

LIST OF FIGURES
(continued)

Figure	Page
43. The serum TBG, fT4 and T4 profiles during hypothyroidism in monkey no. 87	163
44. The serum TBG, fT4 and T4 profiles during hypothyroidism in monkey no. 77	164
45. The serum TBG, fT4 and T4 profiles during hypothyroidism in monkey no. 101	165
46. The serum levels of T4 throughout entire pregnancy of both normal pregnant monkeys and MMI- previously treated monkey (no. 63)	170
47. The serum levels of T3 throughout entire pregnancy of both normal preagnant monkeys and MMI-previously treated monkey (no. 63)	170
48. The patterns of T4:T3 ratio throughout entire gestation in both normal pregnant monkeys and MMI-previously treated monkey (no. 63)	171
49. The serum levels of fT4 throughout entire gestation of both normal pregnant monkeys and MMI-previously treated monkey (no. 63)	171
50. The serum levels of TBG throughout entire gestation of both normal pregnant monkeys and MMI-previously treated monkey (no. 63)	172
51. The serum levels of TSH throughout entire ... gestation of both normal pregnant monkeys and	173

LIST OF FIGURES
(continued)

Figure	Page
MMI-previously treated monkey (no. 63)	
52. The serum levels of E ₂ throughout entire ... gestation of both normal pregnant monkeys and MMI-previously treated monkey (no. 63)	174
53. The serum levels of PRL throughout entire ... gestation of both normal pregnant monkeys and MMI-previously treated monkey (no. 63)	175
54. The serum levels of P throughout entire ... gestation of both normal pregnant monkeys and MMI-previously treated monkey (no. 63)	175
55. Illustrating preparation of hormone free serum column	272
56. The precision profile of T3 assay	273
57. The precision profile of T4 assay....	273
58. The precision profile of TSH assay	274
59. The precision profile of PRL assay	274
60. The precision profile of TBG assay....	275
61. The precision profile of fT4 assay	275
62. The precision profile of E ₂ assay....	276
63. The precision profile of P assay	276

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Serum hormone levels during major phases of..... normal menstrual cycle.	105
2. The summarized serum fT4 concentrations..... obtained in MMI-induced hypothyroidism monkeys	106
3. The relationship between TSH and PRL in the..... state of severe and mild hypothyroidism in each monkey.	130
4. The relationship between TSH and PRL in each..... state of hypothyroidism in seven monkeys.	138
5. Showing the duration and menstrual bleeding..... period of each monkey in pre-treatment, during treatment and post- treatment of MMI-induced hypothyroidism.	148
6. Correlations among T4, TBG and E ₂ in each period of gestation of four normal pregnancy.	176

ABBREVIATION

Tc	=	Total count
Bo	=	Maximal binding count
B	=	Binding count
NSB	=	Non-specific binding
RCE	=	Recovery of extraction
QC	=	Quality control
CPM	=	Count per minute
Cyn LH*	=	Labeled iodine-125 cynomolgus Luteinizing Hormone
TBG	=	Thyroxine binding globulin
T3	=	Tri-iodothyronine
T4	=	Thyroxine
TSH	=	Thyroid Stimulating Hormone
TRH	=	Thyroid Releasing Hormone
PRL	=	Prolactin
fT4	=	Free thyroxine
E ₂	=	Estradiol-17 B
P	=	Progesterone
uCi	=	Micro Curie
ug	=	Microgram
ng	=	nanogram
fmole	=	femtamole
pmole	=	picomole

mIU = milli International Unit

PBS = Phosphate buffer saline

gel-PBS= Gelatin- phosphate buffer saline

HFS = Hormone Free Serum