

การศึกษาส่วนประกอบต่าง ๆ ของฮอร์โมนไทรอยด์ ในเนื้อต่อมไทรอยด์และ
ซีรั่มของซีรั่ม ไบโกลบูลิน (ที.บี.จี.) ของซีรั่ม

Studies of Thyroid Hormones in Thyroid Tissue and
Thyroxine-Binding Globulin (TBG) in Serum.



โดย

นางสาว วิภา บุญนำศิริ ก.บ. (2510)

004752

วิทยานิพนธ์นี้

เป็นส่วนประกอบการศึกษาสามารถเทียบปริมาณหาบัณฑิต

ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนกวิชาเคมี (สาขาชีวเคมี)

พ.ศ. 2512

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนมรุพงษ์ กรุงเทพมหานคร เป็นส่วนประกอบ
การศึกษาตามระเบียบวิธีปฏิบัติงานตามนี้

แฉะ วัชรินทร์

คณะบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการทรวจวิทยานิพนธ์..... วัชรินทร์ประธานกรรมการ

..... วัชรินทร์กรรมการ

..... วัชรินทร์กรรมการ

..... วัชรินทร์กรรมการ

อาจารย์ผู้ควบคุมงานวิจัย : ศาสตราจารย์ นายแพทย์ รมโน สวรรณี

วันที่... ๕...เดือน... พฤษภาคม... พ.ศ. ๒๕๑๖...

เรื่อง : การศึกษาส่วนประกอบต่าง ๆ ของธัยรอยด์ฮอร์โมนในเนื้อต่อมธัยรอยด์ และ
ธัยร็อกซิน ไบโกลิงค์ กลอบูลิน (ที.บี.จี.) ของซีรัม

ผู้เขียน : นางสาว วิกา บุญศิริ

แผนกวิชา: เคมี

วันที่ : 1 พฤษภาคม 2512



บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีจุดประสงค์ เพื่อศึกษาวิธีการสกัดธัยรอยด์ฮอร์โมน และทำให้สารที่สกัดได้บริสุทธิ์ ตลอดจนการแยกส่วนต่าง ๆ ของธัยรอยด์ฮอร์โมนออกจากกัน ให้ได้ผลชัดเจนขึ้น เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาส่วนประกอบของธัยรอยด์ฮอร์โมน ในต่อมธัยรอยด์ของคนคอพอกชนิดเป็นพิษ และไม่เป็นพิษในคนไทย

การศึกษานี้ส่วนใหญ่ได้ดำเนินการตามวิธีของ Dimitriadou และคณะ, 1966 ซึ่งในหลักการโดยย่อ คือ ให้คนไข้รับประทาน ^{131}I ไอโอดีน 48 ชั่วโมงต่อมา บ่อยเนื้อต่อมธัยรอยด์ที่ได้จากการผ่าตัดด้วย enzymes แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน column ของ Dowex AG 1 x 2 (200-400 mesh) resin elute ด้วยกรดกลูเซอิก อะซิติก (glacial acetic acid) ทำหน้าที่รองรับไอโอดีนให้แห้งภายใต้สูญญากาศและกลั่นในไตรเจน ก่อนทำการแยกสารที่สกัดได้ออกจากกันโดยวิธี Paper Chromatography แล้วทำให้เกิดสีด้วยน้ำยาซีริก ceric sulphate-arsenious acid

ผลงานของ Dimitriadou และคณะ, 1966 อาจสรุปได้คือ ในคนคอพอกเป็นพิษ (Hyperthyroid) พบอัตราส่วนของ Moniodotyrosine (MIT) ต่อ Diiodotyrosine (DIT) มากกว่าหนึ่งเล็กน้อย และมี Thyronines คือ Thyroxine (T_4) และ Triiodothyronine (T_3) ด้วยเล็กน้อย เขาพบว่าในคนคอพอกธรรมดา (Simple Goitre) พบอัตราส่วนของ MIT ต่อ DIT มากกว่าในคนคอพอกเป็นพิษ $T_4 + T_3$ พบอย่างมาก สำหรับคนคอพอกตะปุ่มตะป่ำ (Nodular goitre) นั้น พบเฉพาะ MIT และ T_4 อย่างละเล็กน้อยเท่านั้น อย่างไรก็ตามวิธีของ Dimitriadou และคณะ, 1966 ไม่สามารถแยก T_3 ออกจาก T_4 ได้



ผู้ทดลองโคคัตแปลงวิธีของ Dimitriadou และคณะ, 1966 ให้ได้นัลคีและ
เหมาะสมยิ่งขึ้นหลายประการ คือ (1) elute ซีรอยด์ฮอร์โมนจาก resin ครั้งแรกตาม
วิธีของ Galton และ Pitt-Rivers 1959 ด้วย อะซิเตทบัฟเฟอร์ (acetate buffer)
pH 3.0, 2.2, 1.4 ตามลำดับ และใช้กรกလာเจียลอะซีติกเป็นตัว eluent สดท้าย ซึ่ง
ในผลก็ถือว่า elute ด้วยกรกလာเจียลอะซีติกแต่ลำพังอย่างเดียว คือ ทำให้ไม่เกิดฟองอากาศ
ขณะ elute (2) ใช้ Thin Layer Chromatography (TLC) แทน Paper -
Chromatography และได้เลือกหา solvent system ที่แยก T_4 ออกจาก T_3 ตามวิธีของ
Danutra, 1968 (3) ใช้ ferric chloride-ferricyanide arsenic acid (FFCA)
ตามวิธีของ Gmelin และ Virtanen, 1959 ซึ่งให้ผล sensitive มากกว่าวิธีเดิมของ
Dimitriadou และคณะ, 1966 ถึง 10 เท่า (4) นอกจากนี้ยังโคคัตแปลงการสกัดซีรอยด์-
ฮอร์โมน โดยใช้ Sephadex LH - 20 (แทน Dowex resin) และ elute ด้วย
methanol: ammonia (9:1) ให้ผล คือ พบ T_3 จำนวนมากขึ้น และมี resolution
ดี แยกซีรอยด์ฮอร์โมนแต่ละตัวได้ชัดเจนกว่าวิธีเดิม

การศึกษาค้นไขโรคคอพอกในโรงพยาบาลศิริราช คณะแพทยศาสตร์และศิริราชพยาบาล
24 คน ให้ผลดังนี้ คือ คนคอพอกเป็นพิษ 16 ราย พบ MIT มาก DIT น้อยมากจนเกือบไม่มี
เลย T_4 น้อย และ T_3 ส่วนใหญ่ไม่พบ พบข้างบางรายแต่น้อยมาก ในคนคอพอกชนิด-
ธรรมดา 3 ราย พบ MIT และ DIT จำนวนมากได้เช่นกัน (อัตราส่วนของ MIT ต่อ DIT
ประมาณหนึ่ง) T_4 พบน้อย T_3 พบข้างบางรายแต่น้อยมาก ส่วนในคนคอพอกกะปุมตะป่า 3 ราย
พบแต่ MIT และ T_4 ซึ่งมีอย่างละเอียดเล็กน้อยเท่านั้น และในคอมซีรอยด์ที่ได้จากศพที่เพิ่งถึงแก่
กรรม (ประมาณ 22 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 10°C) พบ MIT มาก DIT น้อย (แต่มิ่จำนวนของ
DIT มากกว่าในคนคอพอกเป็นพิษ) T_4 และ T_3 พบมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าใช้ Sephadex
LH - 20 ตามข้อ (4)

จากการศึกษา Intrathyroidal metabolism นี้ แสดงชัดเจนยิ่งขึ้นตามการเปลี่ยนแปลง
อัตราส่วนของ MIT ต่อ DIT ซึ่งจะมากหรือน้อยแล้วแต่จำนวนไอโอดีนที่มีอยู่ในร่างกาย
ถ้าคอมซีรอยด์มีไอโอดีนน้อย จะมีส่วนของ MIT มากในซีรอกลูบูลิน (Thyroglobulin)



ความรายงานของ Schut และ Terpstra, 1957; Bois และ Larsson, 1958. อัตราส่วนของ MIT ต่อ DIT จะเพิ่มมากขึ้นในโรคต่าง ๆ ของต่อมธัยรอยด์รวมทั้งคอพอกเป็นพิษและคอพอกตะปมตะป้า (Pitt-Rivers และ Hoather, 1957) ส่วนในคนปกติมันจะมี T_4 จำนวนมากในต่อมธัยรอยด์ ที่อาจพบกับความต้องการของร่างกายได้ถึงสองเดือน โดยไม่ต้องมีการสังเคราะห์ใหม่ (Means และคณะ, 1963)

ส่วนการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการ Transport ของธัยรอยด์ฮอร์โมนในเลือด คือ Thyroxine-Binding Globulin capacity (TBG capacity) ในคนคอพอก ที่โรงพยาบาลศิริราช คณะแพทยศาสตร์และศิริราชพยาบาล ได้ดัดแปลงจากวิธีของ Berger และคณะ, 1962 เพื่อให้ง่ายและรวดเร็วกว่าวิธีเดิม มีประโยชน์ในการแยกโรคต่าง ๆ ของต่อมธัยรอยด์ได้ผลดังนี้ คือ เปอร์เซ็นต์ TBG capacity ใน Hyperthyroid 26 คน มีค่า 60.53 ± 7.05 Euthyroid 27 คน มีค่า 75.01 ± 3.08 และ Hypothyroid 4 คน มีค่า 82.28 ± 2.35 ซึ่งในหลอดทดลองและใกล้เคียงกับผลของวิธีเดิม (Berger และคณะ, 1962)

Title : Studies of Thyroid Hormones in Thyroid Tissue and
Thyroxine-Binding Globulin (TBG) in Serum.
Name : Miss Vipa Boonnamsiri
Department : Chemistry
Date : 1 May, 1969

ABSTRACT

It is the main object of this studies to develop the methodology hitherto used in extracting and purifying the organic hormonal components in the tissue of the thyroid gland. The work includes also the refinement of the techniques of separating various iodocompounds in the thyroid extract thus obtained. Then the technique has been applied in the studies of intrathyroidal iodine metabolism in toxic and non-toxic goitre in Thailand.

The studies has been adapted mainly from the work of Dimitriadou, et al., 1966, the steps of which are briefly as follows. After enzymatic hydrolysis of the thyroid tissue divided from the surgical specimen, the purification was done by eluting the hydrolysed portion in a resin column (Dowex AG 1 x 2, 200 - 400 mesh, in acetate form at pH 5.6) with glacial acetic acid. The eluent was dried in vacuo under nitrogen. The extract was then subjected to paper chromatography and sprayed with ceric sulfate-arsenious acid. Their work showed in the toxic goitres MIT/DIT ratio of slightly greater than one and small amounts of thyronines; the technique then used could not separate T_3 from T_4 . They found in simple goitre the ratio of MIT and DIT of substantially greater than one and traces of thyronines whereas the non-toxic nodular goitre showed only small amount of MIT and T_4 .



In this studies, many modifications were performed to refine the technique. (1) The elution of the resin column were done by acetate buffers of varying gradients, i.e. at pH 3.0, 2.2, 1.4 respectively and followed by glacial acetic acid (Galton and Pitt-Rivers, 1959) instead of using glacial acetic acid only. (2) The paper chromatography was switched to Thin Layer Chromatography (TLC), and, with the new solvent system, (Danutra, 1968) T_3 and T_4 could be separated with good resolution. (3) The spraying agent was switched also from ceric sulphate-arsenious acid to ferric chloride ferricyanide-arsenic acid (FFCA) which was tenfold in sensitivity (Gmelin and Virtanen, 1959). (4) Recently Sephadex LE-20 with methanol:ammonia (9:1) elution (Nauman, et al., 1967) was tried instead of the Dowex resin method resulting in much better identification of T_3 .

The studies of 24 cases of goitres admitted in Siriraj Hospital and Medical School by this means showed the following results. Sixteen cases of toxic goitre showed substantial amount of MIT, traces of DIT and T_4 ; T_3 is almost negligible. Three cases of simple goitre showed an appreciable amount of MIT and DIT (the ratio of which was about one), small amount of T_4 and traces of T_3 , whereas three cases of non-toxic nodular goitre showed only small amount of MIT and T_4 . The thyroid gland taken from two autopsy cases having no thyroid disease showed MIT substantially and small amount of DIT; the amount of T_4 was appreciable and also good quantity of T_3 was obtained especially on separation with Sephadex.

The results enumerated above agree favourably with those of the previous workers (Schut and Terpstra, 1957; Bois and Larsson, 1958) who showed that the degree of variation in MIT/DIT ratio depends on the availability of iodine in the body. If the total amount of iodine in the thyroid gland is low there will be predominant quantity of MIT in the thyroglobulin. The MIT/DIT ratio is increased in a number of thyroid disorders including toxic as well as non-toxic nodular goitre (Pitt-Rivers and Hoather, 1957). In the normal, as this studies also has shown, and as have been stated by Menns, et al. 1963, substantial amount of T_4 is present in the thyroid gland, in such a quantity that the supply can last for two months without need of re-synthesis.

The next immediate step,- the transport of the circulating hormones, is the determination of Thyroxine-Binding Globulin capacity (TBG capacity) by modified method of Berger, et al., 1962. The technique has been modified for practical routine daily use and applied for the determination of thyroid function to differentiate thyroid disorders more discriminatingly. The percent TBG capacity of 26 toxic goitres, 27 euthyroids, and 4 hypothyroids were 60.53 ± 7.05 , 75.01 ± 3.08 and 82 ± 2.35 respectively. The results are essentially as accurate as those of the original method.



คำขอบคุณ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือ
ให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงด้วยดี คือ

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ร่มไทร สุวรรณิก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กาจจักษ์ มงคลกุล

อาจารย์ ดร. สุนิสา จุลกะรัตน์

อาจารย์ นายแพทย์ ประเสริฐ ปาจรีย์

แพทย์หญิง วิยะดา อัครนาโถ

อาจารย์ วราพรรณ คานอุตรา

หน่วยภาพการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ และศิริราชพยาบาล

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัย และ สภาวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ทุนอุดหนุนเรื่องนี้

วิภา บุญนำศิริ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
คำขอขอบคุณ.....	ฉ
สารบัญ.....	ข
รายการตารางประกอบ.....	ฅ
รายการรูปประกอบ.....	ฉ
บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	6
วิธีทำ.....	9
1. <u>การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการแยกซีรอยด์ฮอร์โมนจากเนื้อต่อมซีรอยด์:-</u>	
1.1 การเตรียม Plate สำหรับทำ Chromatography.....	9
1.2 การเตรียม Solvent system สำหรับทำ Chromatography...	9
1.3 การเตรียม Chromatography ของซีรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐาน	9
1.4 การสกัดซีรอยด์ฮอร์โมนจากเนื้อต่อมซีรอยด์ โดยการผ่าน Dowex - resin.....	10
1.5 การสกัดซีรอยด์ฮอร์โมนจากเนื้อต่อมซีรอยด์ โดยการผ่าน Sephadex LH-20.....	10
1.6 การทำ Chromatography ของซีรอยด์ฮอร์โมนที่สกัดจากเนื้อ- ต่อมซีรอยด์ เปรียบเทียบกับซีรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐาน.....	11
1.7 การทำให้เกิดสีความจำเพาะ FPCA.....	12

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2. การศึกษาวิธีทำเชื้อหา Thyroxine-binding globulin capacity (TBG capacity) โดยวิธี Electrophoresis :-

2.1 การย้อมสี TBG electrophoresis..... 12

2.2 การทำ autoradiography ของ TBG electrophoresis.. 12

ผลของการทดลอง

1. ผลของการแยกส่วนประกอบของซีรัมของสัตว์จากเนื้อคอมซีรัม :-

1.1 ผลของการหา Solvent system ที่เหมาะสมในการแยกซีรัมของสัตว์โมนมาตรฐาน..... 14

1.2 ผลของการศึกษาส่วนประกอบของซีรัมของเนื้อคอมซีรัมในคนใช้คอลลอยด์เป็นพิษ..... 18

1.3 ผลของการศึกษาส่วนประกอบของซีรัมของเนื้อคอมซีรัมในคนใช้คอลลาเจนชนิดไม่เป็นพิษ..... 19

1.4 ผลของการศึกษาส่วนประกอบของซีรัมของสัตว์จากศพที่มีคอมซีรัมปกติ..... 20

1.5 ผลของการหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนของเนื้อคอมซีรัม (Optimal time of incubation)..... 22

2. ผลของการศึกษา TBG electrophoresis 25

วิจารณ์ผลของการทดลอง..... 26

สรุปผลของการทดลอง..... 32

บรรณานุกรม..... 35



รายการสารบัญประกอบ

สารบัญที่ 1 แสดง Solvent system ที่เหมาะสมในการแยกชั้นรอยค้ำสารโมโนมาครฐาน และ R_f value โดย TLC..... 14

สารบัญที่ 2 แสดงส่วนประกอบของชั้นรอยค้ำสารโมโนของคอมพ็อยด์ในคนใช้คอกพอกเป็น พืช คอกพอกชนิดเรียบ คอกพอกตะปุ่มตะป่ำ และชั้นรอยค้ำจากสพที่เพิ่งถึง- แกกกรรม..... 17

สารบัญที่ 3 แสดงผลของเปอร์เซ็นต์ TBG capacity โดย Electrophoresis... 23

สารบัญที่ 4 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ TBG capacity ของ Berger และคชช, 1962 กับผลที่ได้จากการศึกษา..... 24

รายการรูปประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงผลของการแยกซีโรยคัสโตรโมเนมาตรฐานใน Solvent system ที่ 1 Chloroform:n-Butanol:28% NH ₃ (6:5:1).....	15
รูปที่ 2 แสดงผลของการแยกซีโรยคัสโตรโมเนมาตรฐานใน Solvent system ที่ 2 t-Amyl alcohol : Dioxane: 6NH ₄ OH(3:5:2).....	15
รูปที่ 3 แสดงผลของการแยกซีโรยคัสโตรโมเนมาตรฐานใน Solvent system ที่ 3 Ethyl acetate:Methanol:6NH ₄ OH(5:2:3).....	16
รูปที่ 4 แสดงส่วนประกอบของซีโรยคัสโตรโมเนของคอมซีโรยคัสโตรโมเนคอปอกเป็นพืช ก. โดยวิธีผ่าน Dowex resin column. ข. โดยวิธีผ่าน Sephadex LH-20 column.....	18
รูปที่ 5 แสดงส่วนประกอบของซีโรยคัสโตรโมเนของคอมซีโรยคัสโตรโมเนคอปอกชนิดธรรมดา.	19
รูปที่ 6 แสดงส่วนประกอบของซีโรยคัสโตรโมเนของคอมซีโรยคัสโตรโมเนคอปอกตะปุมตะป้า..	19
รูปที่ 7 แสดงส่วนประกอบของซีโรยคัสโตรโมเนของคอมซีโรยคัสโตรโมเนที่ไม่มีโรคของคอม - ซีโรยคัสโตรโมเนที่เพิ่งถึงแก่กรรม ก. โดยวิธีผ่าน Dowex resin column ข. โดยวิธีผ่าน Sephadex LH-20 column.....	20
รูปที่ 8 แสดงแผนภูมิ (diagram) ทยาย ๆ จากผลของการทดลองเปรียบเทียบความ- แตกต่างกันของส่วนประกอบของซีโรยคัสโตรโมเนของคอมซีโรยคัสโตรโมเนคอปอกเป็นพืช คอปอกชนิดธรรมดา และ คอปอกตะปุมตะป้า.....	21

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 9	แสดงระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนของเนื้อคอมซัยรอกด้วย enzymes (Optimal time of incubation).....	22
รูปที่ 10	แสดงตัวอย่าง Autoradiography ของ TBG Electrophoresis เช่น ใน- รายของ hyperthyroid.....	25