วิจารณ์

1. การแยกส่วนประกอบของธัยรอยด์ฮอร์โมนจากเนื้อต่อมธัยรอยด์

1.1 การหา Solvent system ที่เหมาะสมในการแยกธัยรอยด์ฮอร์โมน

Solvent system ที่ 1 คือ Chloroform:n-Butanol:28 % NH_3 อัตราส่วน 7:4:1 โดยบริมาตร (Sakurada, 1966) เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 12 ชั่วโมง นำชั้นล่างมาใช้ และเมื่อดัดแปลงส่วนผสมเป็น 6:5:1 ทำให้แยกธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานได้ดีกว่าเดิม (รูปที่ 1 หน้า 15) แต่ให้ผลไม่เป็นที่พอใจกับธัยรอยด์ฮอร์โมนที่สกัดได้ คือ แถบต่าง ๆ เละอะ (blurred) ไม่เป็นระเบียบ

Solvent system ที่ 2 คือ t-Amyl alcohol:Dioxane:6N NH_4OH (Danutra,1968) ในการศึกษานี้ได้ดัดแปลงส่วนผสมเป็น 3:5:2 ให้ผลดีทั้งในการแยกธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานและที่สกัดได้ แต่ R_f ของ MIT และ DIT ห่างกันไม่มาก (รูปที่ 2 หน้า 15) เป็นที่น่าสังเกตว่าการใช้ solvent system ที่ 2 นี้ ให้ผลดีกับธัยรอยด์ฮอร์โมนที่สกัดโดยผ่าน Dowex resin (Dimitriadou และคณะ,1966) แต่ถ้าใช้กับสารที่สกัดโดยผ่าน Sephadex LH-20 (Nauman และคณะ, 1967) ได้ผลไม่ดี

Solvent system ที่ 3 ประกอบด้วย Ethyl acetate:Methanol:6N NH_4OH อัตราส่วน 5:2:3 โดยบริมาตร (Danutra, 1968) ใช้ได้ผลดีกับธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานและที่สกัดได้ โดยการผ่าน Sephadex LH-20 แยกธัยรอยด์ฮอร์โมนแต่ละชนิดได้ห่างกันดีกว่า solvent system ที่ 2 (ดังในรูปที่ 3 หน้า 16 และรูปที่ 4 ข หน้า 18) แต่เมื่อทดลองใช้กับสารที่สกัดโดยผ่าน Dowex resin ให้ผลไม่เป็นที่พอใจ

เนื่องจากการศึกษานี้มุ่งแยกส่วนประกอบของธัยรอยด์ฮอร์โมนในเนื้อต่อมธัยรอยด์ตามวิธีของ Dimitriadou และคณะ,1966 ซึ่งใช้ Dowex resin เป็นหลักตลอดมาตั้งแต่ต้นจนจบ จึงเลือกใช้ solvent system ที่ 2 ในการศึกษาเปรียบเทียบส่วนประกอบของธัยรอยด์ฮอร์โมนในหนูที่ต่อมพอกเป็นพิษ และไม่เป็นพิษ

การเลือกใช้ solvent system เป็นสิ่งสำคัญมาก solvent system ที่ดีควรจะแยกสาร unknown ออกเป็นส่วน ๆ ได้อย่างชัดเจน ให้มี R_f value ห่างกันพอสมควร และใช้เวลาไม่นานเกินไปนัก จากการทดลองพบว่า ถ้าผ่านสารที่ทองการสกัดโดยใช้ Dowex resin และอะซีเททบัฟเฟอร์ pH ต่ำ ๆ เป็นตัว elute ใช้ได้ผลดีกับ solvent system ที่ 2 เท่านั้น แต่ถ้าผ่าน Sephadex LH-20 ใช้ methanol : ammonia (9 : 1) เป็น eluent ให้ผลดีกับ solvent system ที่ 3 ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากสารที่สกัดได้มี pH ต่างกัน คือ ใช้ eluent เป็นกรดในวิธีผ่าน Dowex resin แต่ใช้ eluent ที่เป็นด่างในวิธีผ่าน Sephadex LH-20 จึงให้ผลต่างกันออกไปในแต่ละ solvent system (รูปที่ 4 ก. และ ง. หน้า 18)

1.2 น้ำยาสีเพื่อให้เกิดสี

ใช้น้ำยา ferric chloride-ferricyanide arsenic acid (FFCA) ให้ผล sensitive มากกับพวก iodide, iodinated-tyrosine และ iodinated-thyronine แม้ T_3 จะมีจำนวนเพียงเล็กน้อยก็ไม่อาจแสดงได้โดย ceric sulphate - arsenious acid หรือ ultraviolet rays ก็อาจแสดงได้ชัดเจนโดยใช้ FFCA แต่มีข้อเสียคือเก็บไว้ไม่ได้นาน สีจะเปลี่ยนไป และมีฤทธิ์กัดกร่อน น้ำยาจะต้องเย็นอยู่ตลอดเวลาเมื่อเตรียมแล้วต้องรีบใช้ทันที และควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

วิธีนี้เป็นเพียง Semi- quantitative เท่านั้น อาจหาปริมาณของฮอร์โมนแต่ละชนิด โดยวิธี quantitative คือ ชูด (scrap) แต่ละแถบของฮอร์โมนที่แยกได้แล้ว clute ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ทำให้เกิดปฏิกริยาโดยใช้ ceric sulphate-arsenicus acid วัดการเปลี่ยนแปลงของสี (degree of color fading) ด้วย Spectrophotometer เทียบหาปริมาณกับ standard curve ของฮอร์โมนมาตรฐาน (ตามวิธีของ Sakurada, 1966) แต่เนื่องจากว่าวิธีนี้เสียเวลามากและเกิดความผิดพลาดได้ง่าย ไม่ค่อยมีผู้นิยมทำ ส่วนมากนิยมทำวิธี semi-quantitative ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่า และให้ผลดีพอสมควร (ดังในตัวอย่าง รูปที่ 8 หน้า 21)

1.3 วิธีสกัดฮอร์โมนจากเนื้อต่อมธัยรอยด์ :-

วิธีการของ Dimitriadou และคณะ,1966 คือการใช้ elute ด้วยกรดกลาเซียลอะซีติคอย่างเดียว จะเกิดฟองอากาศกับ Dowex resin ให้ลอยขึ้นมา และทำให้การสกัดได้ผลไม่ดีพอ จึงได้ดัดแปลงดังนี้ คือ elute ครั้งแรกด้วยอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 3.6, 2.2 และ 1.4 ซึ่งจะชะ MIT, DIT และ T_4 + T_3 ออกมาตามลำดับ (Galton และ Pitt-Rivers, 1959) จนสุดท้ายจึงใช้กรดอะซีติค โดยจะไม่เกิดฟองอากาศ eluate ที่ได้จะมีสีเหลืองใส

ส่วนการผ่าน Sephadex LH-20 ดัดแปลงจาก Nauman และคณะ,1967 ซึ่งวิธีการเดิมใช้สำหรับสกัดฮอร์โมนจากรังไข่ และต้องการศึกษาเฉพาะ T_3 เท่านั้น เมื่อดัดแปลงนำมาใช้กับเนื้อต่อมธัยรอยด์ พบว่าให้ผลดีกับพวก Thyronines คือ พบ T_3 (ซึ่งไม่ค่อยพบเมื่อใช้วิธีผ่าน Dowex resin) มี resolution ของ T_4 และ T_3 ดี วิธีการง่ายและรวดเร็วกว่าวิธี Dimitriadou และคณะ 1966

จากการทดลองพบว่า วิธีที่ผ่าน Dowex resin กินเวลานานให้ผลดีกับพวก iodotyrosine คือ MIT และ DIT ส่วนวิธีที่ผ่าน Sephadex นั้นกินเวลาน้อยกว่า ให้ผลดีได้ iodothyronine คือ T_4 และ T_3 ชัดเจน (ตามรูปที่ 7ข หน้า 20)

ฉะนั้น จะถือว่าวิธีใดดีที่สุดยังไม่ได้ จากผลการทดลองจะเห็นว่าวิธีผ่าน Dowex resin ปล่อย DIT น้อยกว่าวิธีที่ผ่าน Sephadex LH-20 แต่ T_3 จะออกมากเมื่อใช้วิธีผ่าน Sephadex LH-20 (รูปที่ 7 ก. และ ข. หน้า 20) ทั้งนี้ อาจเนื่องจากว่า Dowex resin และ Sephadex LH-20 มี adhesive property ต่อธัยรอยด์ฮอร์โมนแต่ละชนิดไม่เท่ากัน หรืออาจเป็นไปได้ว่า eluent ที่ใช้มีคุณสมบัติที่ elute ธัยรอยด์ฮอร์โมนแต่ละชนิดออกได้ไม่เท่ากัน จึงทำให้ผลที่ได้โดยวิธีผ่าน Dowex resin และ Sephadex LH-20 ไม่เหมือนกัน (รูปที่ 4 ก. และ ข หน้า 18)

1.4 การสกัดฮอร์โมนของต่อมธัยรอยด์ในศพที่มีต่อมธัยรอยด์ปกติ

เนื่องจากไม่สามารถหาเนื้อต่อมธัยรอยด์ปกติจากคนที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ จึงดัดแปลงโดยศึกษาจากศพที่เพิ่งถึงแก่กรรมไปแล้วประมาณ 22-23 ชั่วโมง (ที่อุณหภูมิ 10° C) เพื่อเป็น Control สำหรับเปรียบเทียบส่วนประกอบของธัยรอยด์ฮอร์โมน ในคนไข้คอพอกเป็นพิษและไม่เป็นพิษ พบว่า ถ้าใช้วิธีที่ผ่านกับ Dowex resin จะมี MIT มาก และมี DIT น้อย (แต่จำนวน DIT นี้มีมากกว่าในคนคอพอกเป็นพิษ) ส่วน T_4 พบมาก ซึ่งสนับสนุนงานของ Means และคณะ, 1963; Höfer และ Pfeiffer, 1963 T_3 มีจำนวนไม่มากนัก แต่จะได้ T_3 และ T_4 ปริมาณมากขึ้นอย่างเห็นแตกต่างได้ชัดถ้าใช้วิธีผ่าน Sephadex LH-20 (รูปที่ 7 หน้า 20)

การแยกส่วนประกอบของธัยรอยด์ฮอร์โมนในเนื้อต่อมธัยรอยด์ ของศพที่เพิ่งถึงแก่กรรมไปแล้วประมาณ 22 ชั่วโมง อาจมีการเปลี่ยนแปลงของธัยรอยด์ฮอร์โมน เช่น ในระยะท้าย ๆ ก่อนที่ผู้ป่วยสิ้นชีวิต และ โรคที่ทำให้ผู้ป่วยถึงแก่กรรม แต่ผลที่ได้นั้นเพียงเพื่อเอามาเปรียบเทียบให้เห็นความแตกต่างกับคนที่เป็นโรคคอพอกเท่านั้น (รูปที่ 7 ก. และ ข. หน้า 20)

1.5 การหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนด้วย enzymes (Optimal time of incubation)

แบ่งระยะ incubate เป็น 4 ตอน คือ 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 24-36 ชั่วโมง ซึ่งการทดลองในการศึกษานี้ใช้เวลา incubate 36 ชั่วโมง ถ้านานเกินไปถึง 60 ชั่วโมง จะเกิดการสลายตัว (decompose) ของ T_4 (Galton และ Pitt-Rivers, 1958) และมีกลิ่นเหม็นเน่าเกิดขึ้น

จะเห็นได้ว่าการหา Optimal time of incubation เป็นสิ่งจำเป็น ทั้งนี้เพื่อให้ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นเป็นไปอย่างสมบูรณ์ และให้ได้ส่วนประกอบของธัยรอยด์ฮอร์โมนที่ต้องการมากที่สุด ในเวลาที่เหมาะสม เพราะว่าถ้าใช้เวลานานมากจะทำให้เสียเวลาโดยใช่เหตุ และทำให้ธัยรอยด์ฮอร์โมนบางตัวเช่น T_4 เกิดการสลายตัว (Galton และ Pitt-Rivers, 1958) จากการทดลองพบว่า incubate ระยะเวลา 36 ชั่วโมง ให้ผลดีที่สุด (รูปที่ 9 หน้า 22)

1.6 จากการศึกษา intrathyroidal metabolism โดยใช้ TLC แสดงผลสนับสนุนความเห็นทางคลินิค และการเปลี่ยนแปลงทาง Patho-physiology ในสภาพการทำงานต่าง ๆ ของต่อมธัยรอยด์ได้ดี ในรายคอพอกเป็นพิษมีอัตราการถ่ายเท (turnover rate) ของธัยรอยด์ฮอร์โมนอย่างรวดเร็ว ดังนั้น การใช้ไอโอดีนเพื่อสังเคราะห์ฮอร์โมนภายในต่อมธัยรอยด์จึงเป็นไปอย่างรีบเร่ง มี precursor คือ MIT มาก แต่ T_4 และ T_3 น้อย แสดงว่าต่อมธัยรอยด์จำเป็นต้องรีบเร่งในการทำงาน เพื่อสกัดพวก Thyronines(T_3 และ T_4)ออกไปอย่างรวดเร็ว คือ เมื่อสร้างเสร็จก็จะพยายามหลั่งออกไปทันที ทำให้ระดับของธัยรอยด์ฮอร์โมนในกระแสเลือดสูง และให้ผลค่า PBI สูง และมีอาการเนื่องจากต่อมธัยรอยด์ทำงานมากกว่าปกติ

ส่วนในรายคอพอกไม่เป็นพิษ ให้ผลน่าสนใจแบ่งเป็นสองประเภท คือ คอพอกชนิดเรียบเป็นมาไม่นานและมักพบในคนอายุน้อยมี precursors คือ MIT และ DIT มากแต่ Thyronines น้อย จะแสดงความพยายามทดแทนการขาดไอโอดีน โดยการขวนขวายเพิ่มสมรรถภาพในการผลิตฮอร์โมนเพื่อให้พอเพียงกับความต้องการของร่างกาย เพียงให้มีพอใช้เท่านั้น ไม่รีบเร่งมากเหมือนในคอพอกเป็นพิษ เมื่อสังเคราะห์เสร็จก็จะหลั่งสู่กระแสเลือดทันที ทำให้พบพวก Thyronines น้อยในต่อมธัยรอยด์ คอพอกไม่เป็นพิษอีกชนิดหนึ่งคือ คอพอกตะปุ่มตะป่ำที่เป็นมานานพบในคนอายุมาก มีลักษณะบ่งชัดคือ ทุกส่วนของธัยรอยด์ฮอร์โมนน้อยไปหมด จึงพบแต่ MIT และ T_4 จำนวนเล็กน้อย อาจเป็นเพราะต่อมธัยรอยด์ทำงานมากในตอนแรก เพื่อทดแทนการขาดไอโอดีน ต่อมจะขยายตัวใหญ่ขึ้น ระยะแรกต่อมธัยรอยด์ก็อาจมีสมรรถภาพกู้ไว้ได้เพียงระยะหนึ่ง ต่อมานานเข้า ๆ ต่อมใหญ่มากขึ้นและล้าในการทำงาน ทำให้เสื่อมสมรรถภาพในการสังเคราะห์ธัยรอยด์ฮอร์โมน จนกระทั่งเป็นปุ่ม ๆ เกิดขึ้นอีกปุ่มเหล่านี้ คือ หย่อมเนื้อในต่อมธัยรอยด์ที่เสื่อมและไม่ทำงาน เช่น อาจมี fibrosis หรือแทรกด้วย cells ชนิดอื่น ๆ อาจเป็นถุงน้ำหรือถุงเลือด ต่อไปนานเข้า ๆ อาจมีหินปูนมาจับ ทำให้ต่อมโต และตะปุ่มตะป่ำมากขึ้น ซึ่งเป็นเครื่องหมายของความเสื่อมโทรมของต่อมธัยรอยด์

2. <u>ผลของการทดลองที่เกี่ยวกับ TBG capacity โดยวิธี electrophoresis</u>:-

ได้ดัดแปลงจาก Berger และคณะ, 1962 โดยการใช้ Sepraphore แทนกระดาษ ทำให้สะดวกและกินเวลาน้อย สามารถแยกโปรตีนได้ชัดเจนทุกแถบ การหาเปอร์เซ็นต์ TBG capacity