# ที.เอส.เอ็ช. รีเซพเตอร์ ในต่อม ธัยรอยด์ ของคนปกติและผิดปกติ

นางสาว อุทุมมา มัฆะเนมี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาสรีรวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2525

ISBN 974-561-712-1

010616

i 1832969x

# TSH RECEPTORS IN NORMAL AND ABNORMAL HUMAN THYROID TISSUES

Miss Utumma Maghanemi

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Physiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1982

| | |
|---|---|
| Thesis Title | TSH Receptors in Normal and Abnormal Human Thyroid Tissues |
| By | Miss Utumma Maghanemi |
| Department | Physiology |
| Thesis Advisor | Assistant Professor Vipa Boonnamsiri, Ph.D. |

---

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

.....S. Bunnag.....Dean of Graduate School

(Associate Prof. Supadit Bunnag, Ph.D.)

Thesis Committee

.....Pavich Tongroach.....Chairman

(Associate Prof. Pavich Tongroach, Ph.D.)

.....Vipa Boonnamsiri.....Member

(Assistant Prof. Vipa Boonnamsiri, Ph.D.)

.....Supannee Somboontham.....Member

(Assistant Prof. Supannee Somboontham)

.....Saisudchai Tuchinda.....Member

(Col. Dr. Saisudchai Tuchinda)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | ที.เอส.เอ็ช. รีเซพเตอร์ ในต่อมธัยรอยด์ ของคนปกติและผิดปกติ |
| ชื่อนิสิต | นางสาวอุทุมมา มัฆะเนมี |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภา บุญนำศิริ |
| ภาควิชา | สรีรวิทยา |
| ปีการศึกษา | ๒๕๒๕ |

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


## บทคัดย่อ

การศึกษาโดยตรงที่เกี่ยวกับปฏิกริยาของฮอร์โมนและ รีเซพเตอร์ นับว่าเป็นเรื่องใหม่และสำคัญเรื่องหนึ่งในการศึกษาฤทธิ์ของฮอร์โมน. บทบาทของฮอร์โมน รีเซพเตอร์ ในการเปลี่ยนแปลงภาวะทางสรีรวิทยาเป็นเรื่องที่เริ่มมีการเข้าใจกัน. จุดประสงค์ของการศึกษานี้คือ การเปรียบเทียบวิเคราะห์หาปริมาณ ที.เอส.เอ็ช. รีเซพเตอร์ และลักษณะเฉพาะในการยึดเกาะกันในเนื้อเยื่อต่อมธัยรอยด์ชนิดต่าง ๆ. ได้มีการเปรียบเทียบวิธีการต่าง ๆ รวม ๓ วิธีที่จะติดฉลาก ที.เอส.เอ็ช. ด้วย $^{125}$ไอโอดีน, เพื่อใช้ในการศึกษาการยึดเกาะกันระหว่างฮอร์โมนและ รีเซพเตอร์ ในธัยรอยด์เมมเบรน คือ วิธีคลอรามีน-ที, โบลตัน-ฮันเตอร์ และ ไอโอโดเจน. พบว่าวิธีคลอรามีน-ทีให้ผลสู้ ๒ วิธีหลังไม่ได้. ได้ตัดสินใจเลือกใช้วิธีไอโอโดเจนตลอดการศึกษานี้ เพราะราคาถูก, สะดวกและปฏิกริยาไม่รุนแรง. นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบการทำราดิโอไอโอดิเนชั่นให้ได้ ที.เอส.เอ็ช. ที่ติดฉลากมี สะเปซิฟิค แอคทิวิตีย์ ต่าง ๆ กัน (๔๓.๒ - ๑๗๐.๐ ไมโครคูรีต่อไมโครกรัม หรือ ๑.๖ - ๖.๓ เบเคอเรลต่อพิโครกรัม). จากผลการทดลองพบว่าปฏิกริยาการยึดเกาะกันของ ที.เอส.เอ็ช. กับ รีเซพเตอร์ลดต่ำลงมาก, เมื่อค่าสะเปซิฟิค แอคทิวิตีย์ ของ ที.เอส.เอ็ช. สูงมากขึ้น. ค่าสะเปซิฟิค แอคทิวิตีย์ ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง ๔๓.๒ - ๗๑.๓ ไมโครคูรีต่อไมโครกรัม หรือ ๑.๖ - ๒.๖ เบเคอเรลต่อพิโครกรัม. และการทำให้ $^{125}$ไอโอดีน ที.เอส.เอ็ช. บริสุทธิ์ด้วย รีเซพเตอร์ ก่อนทำการวิเคราะห์นับว่ามีความสำคัญมาก. ที่ พี.เอ็ช. ๗.๕ เป็น พี.เอ็ช. ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกริยาการยึดเกาะกันของ ที.เอส.เอ็ช. และ รีเซพเตอร์. ผลการทดลองพบ ...

ว่า เนื้อเยื่อต่อมธัยรอยด์ ในแพพิลลารีย์ คาร์ซิโนมา และโรคต่อมธัยรอยด์อักเสบ แบบฮาชิโมโต ให้เปอร์เซนต์การยึดเกาะกันต่ำกว่าเนื้อต่อมธัยรอยด์ของคนปกติ, ท็อกซิค ดิฟฟิวส์ กอยเตอร์, โนดูลาร์ กอยเตอร์ และ ฟอลลิคูลาร์ อะดิโนมา อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (พี < ๐.๐๐๑). นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ที่ได้จาก สะแคทชาร์ด พบว่า ไบนดิงจ์ แคพาซิตีย์ และ ไบนดิงจ์ แอฟฟินิตีย์ ในธัยรอยด์ เมมเบรน ของคนปกติ, ท็อกซิค ดิฟฟิวส์ กอยเตอร์ และ โนดูลาร์ กอยเตอร์ มีค่าใกล้เคียงกัน. แต่ค่าไบนดิงจ์ แคพาซิตีย์ ของฟอลลิคูลาร์ อะดิโนมา และ แพพิลลารีย์ คาร์ซิโนมา ให้ค่าต่ำกว่าปกติอย่างเด่นชัด (พี<๐.๐๐๕ และ พี < ๐.๐๐๑ ตามลำดับ), ถึงแม้ว่าค่า ไบนดิงจ์ แอฟฟินิตีย์ จะค่อนข้างสูงกว่าปกติเล็กน้อยก็ตาม. ส่วน ธัยรอยด์ เมมเบรน จากผู้ป่วย ฮาชิโมโต ธัยรอยด์ไดดีส ให้ค่า ไบนดิงจ์ แคพาซิตีย์ ค่อนข้างสูง, แต่ไบนดิงจ์ แอฟฟินิตีย์ มีค่าต่ำที่สุด.

แม้ว่านักวิจัยส่วนใหญ่จะใช้การวิเคราะห์วิธีนี้เพื่อหาระดับ ที.เอส.ไอ. ในซีรั่มของผู้ป่วยโรค เกรฟส์ ก็ตาม. แต่การวิเคราะห์หา ที.เอส.เอ็ช. รีเซพเตอร์ วิธีนี้อาจเป็นประโยชน์ที่จะช่วยการทำนายว่า การรักษามะเร็งของต่อย ธัยรอยด์ ด้วย $^{131}$ไอโอดีนก็ย่อมให้ผลในการรักษาสูง แต่ถ้าพบว่ามี รีเซพเตอร์ น้อยมาก, การรักษาด้วย $^{131}$ไอโอดีน อาจไม่ค่อยได้ผล, ซึ่งควรอยู่ในดุลยพินิจของแพทย์ที่จะพิจารณาใช้วิธีการอื่น ๆ ในการรักษาแทน เช่น การผ่าตัด, การให้ ธัยรอยด์ ฮอร์โมน จำนวนค่อนข้างสูง หรือการรักษาด้วยการฉายแสง เป็นต้น. อย่างไรก็ตาม, การทดลองนี้นับว่าเป็นการศึกษาในระยะเริ่มแรก, จึงต้องการผลการทดลองเพิ่มมากขึ้น เพื่อช่วยในการสนับสนุนผลการทดลองเบื้องต้นนี้และจะทำให้ได้ข้อสรุปที่สมบูรณ์และชัดเจนต่อไป.

Thesis Title TSH Receptors in Normal and Abnormal Human Thyroid Tissues.

Name Utumma Maghanemi.

Thesis Advisor Assistant Professor Vipa Boonnamsiri, Ph.D.

Department Physiology

Academic Year 1982.

ABSTRACT

The direct study of hormone-receptor interaction is a new major tool in the study of hormone action. The role of the hormone receptor in altered physiologic states is begining to be understood. The purpose of this preliminary study is to compare the numbers of TSH receptors and their binding characteristics for thyroid membranes obtained from different thyroid specimens. Three different methods for $^{125}$I-labelling of TSH were compared for use in receptor-binding studies with human thyroid membranes : these were the chloramine-T, Bolton-Hunter and iodogen methods. Chloramine-T proved to be an inferior method to the other two. Iodogen method was chosen and used throughout of the present investigation since it was cheap, simple and gentle. Radioiodinations to different specific activity (43.2-170.0 μCi/μg or 1.6-6.3 Bq/pg) were also compared : too high a specific activity led to reduced binding for the TSH-receptor interaction. Specific activities of 43.2-71.3 μCi/μg

(1.6-2.6 Bl/pg) were found to be suitable for TSH receptor assay. Repurification of the $^{125}$I-TSH by receptor adsorption also proved to be important. Under these conditions, pH of 7.5 was optimal for binding of TSH to its receptors. The results indicated that the maximum binding percentages of thyroid tissues obtained from papillary carcinoma and Hashimoto's thyroiditis were significantly lower ($P<0.001$) than those of thyroid tissues from the normal, toxic diffuse goiter, nodular goiter and follicular adenoma. The binding data were interpreted by Scatchard analysis and the results revealed that the binding capacities and binging aiffinities of thyroid membranes obtained from the normal, toxic diffuse goiter and nodular goiter were similar. The binding capacities of follicular adenoma and papillary carcinoma were distinctly lower than those of the normal mean although their binding affinities were slightly greater than the normal. Thyroid membranes from patients with Hashimoto's thyroiditis had a high binding capacity but the lowest binding affinity was found in these patients.

The TSH receptor assay may be useful as a predictor of the potential behavior of thyroid cancer during radioiodine ($^{131}$I) therapy although everybody is concentrating on the use of this assay to measure serum TSI levels in Graves' disease. If a cancer has more TSH receptors, it should take up $^{131}$I and be treatable by this means. If few receptors are found, then $^{131}$I treatment is unlikely to work and, therefore, alternative treatment should be used. However, confirmatory results are required to support these preliminary findings.

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my great grateful thanks to Assistant Professor Vipa Boonnamsiri, Ph.D., my advisor and co-advisor, Assistant Professor Supannee Somboontham for their precious guidance. I acknowledge gratefully the helps of Professor Dr.Romsai Suwanik, advisor of Faculty of Medicine, Siriraj Hospital and Associate Professor Dr.Rudee Pleehachinda, Head of the section of Nuclear Medicine. Special appreciation to Associate Professor Pavich Tongroach, Ph.D., Head of Department of Physiology, Faculty of Pharmacy, Chulalongkorn University for his careful examination as a chairman of the committee and Colonel Dr. Saisudchai Tuchinda, Pramongkutklao General Hospital for her valuable suggestions and helps as advisor committee member. Deep gratitude is expressed to Assistant Professor Nit Suphaphong and his colleaques in Department of Surgery and Professor Dr. Songchat Tosayanond, Head of Department of Forensic Medicine, Siriraj Hospital for supplying human thyroid tissues, Professor Dr. Prasert Pacharee, Head of Department of Pathology for his helps in histological study, Associate Professor Dr. Chantapong Wasi, Department of Microbiology and all staffs of Department of Haemotology for permission to use superspeed centrifuge and all members of the section of Nuclear Medicine for the warm relationship during the course of this work.

The highly purified bovine TSH was given generously by Professor J.G. Pierce, University college of Los Angeles, School of Medicine, Califormia, USA. and standard bovine TSH by World Health Organization is gratefully acknowledged.

This work is supported by a research grant from Graduate School, Chulalongkorn University.

CONTENTS


PAGE

บทคัดย่อภาษาไทย ..... iv

ABSTRACT ..... vi

ACKNOWLEDGEMENT ..... viii

LIST OF TABLES ..... xi

LIST OF FIGURES ..... xii

ABBREVIATION ..... xiv

CHAPTER I. "INTRODUCTION" ..... i

CHAPTER II "MATERIAL & METHODS" ..... 19

CHAPTER III "RESULTS" ..... 28

CHAPTER IV "DISCUSSION" ..... 41

SUMMARY ..... 51

REFERENCES ..... 52

APPENDIX ..... 66

BIOGRAPHY ..... 70

# LIST OF TABLES

TABLE PAGE

1. Effect of iodination time on specific activity of $^{125}$I-bTSH and on specific binding to human thyroid membranes ..... 29

2. Efficiency of elution (%) in different elution buffer, time and temperature ..... 32

3. Effectiveness of human thyroid tissues for specific binding of $^{125}$I-receptor purified ..... 35

4. Maximum binding of $^{125}$I-receptor purified bTSH to their receptors in various thyroid membrane preparations 36

5. Binding capacities and binding affinities of human thyroid membranes for bovine TSH ..... 40

# LIST OF FIGURES


| FIGURE | | PAGE |
|---|---|---|
| 1. | Structural formula of thyrotrophin-releasing hormone..... | 4 |
| 2. | Hypothalamic-pituitary unit..... | 5 |
| 3. | Postulated mechanisms by which thyroid hormone and TRH act for the control of TSH secretion..... | 8 |
| 4. | Regulation of the secretion of TSH and thyroid hormones.... | 9 |
| 5. | Representation of mechanism of action of TSH ..... | 13 |
| 6. | Activation of protein kinase by cAMP ..... | 13 |
| 7. | Elution pattern of the reaction mixture after radioiodination ($^{125}$I) of bTSH from Sephadex G-100-40 column. | 30 |
| 8. | Chromatography of receptor-purified $^{125}$I-bTSH on a column of Sephadex G-100-40 (1 x 15 cm) in NaCl/Tris/BSA buffer flow rate 8 ml/h, fraction volume 1 ml ..... | 33 |
| 9. | Displacement curves of normal thyroid membrane eluted with different elution buffers. ..... | 34 |
| 10. | The means of displacement curves of the different thyroid membrane preparations..... | 37 |

FIGURE PAGE

11. Scatchard plot of bTSH binding to normal human thyroid membrane, human thyroid membranes of toxic diffuse goiter of nodular goiter, of follicular adenoma, of papillary carcinoma and Hashimoto's thyroiditis..... 39

## ABBREVIATION

| | | |
|---|---|---|
| ATP | = | Adenosine triphosphate |
| B | = | Concentration of TSH bound to membrane |
| Bo | = | Maximum specific binding |
| B/F | = | Bound to free ratio |
| BSA | = | Bovine serum albumin |
| C | = | Control pellet counts |
| cAMP | = | Cyclic 3', 5', adenosine monophosphate |
| CS | = | Catalytic subunit |
| DNA | = | Deoxyribonucleic acid |
| FSH | = | Follicle stimulating hormone |
| 1 g-equiv. | = | 1 g weight of chopped thyroid tissue |
| GH | = | Growth hormone |
| H | = | Concentration of free hormone |
| HR | = | Concentration of hormone-receptor complex |
| hCG | = | Human chorionic gonodotropin |
| K | = | Equilibrium constant for the reaction |
| $k_a$ | = | Association rate constant (unit are liters per mole or $M^{-1}$) |
| $k_d$ | = | Dissociation rate constant (unit are moles per liter or M) |
| LATS | = | Long acting thyroid stimulator |

| | | |
|---|---|---|
| LH | = | Luteinizing hormone |
| $L\text{-}T_3$ | = | Liothyronine or triiodothyronine |
| $L\text{-}T_4$ | = | Levothyroxine or tetraiodothyronine |
| M | = | Membrane pellet count |
| mRNA | = | Messenger ribonucleic acid |
| PBS | = | Phosphate buffer saline |
| PK | = | Protein kinase |
| RNA | = | Ribonuleic acid |
| RS | = | Regulatory subunit |
| TRH | = | Thyrotrophin releasing hormone |
| TSH | = | Thyroid stimulating hormone |
| bTSH | = | Bovine thyroid stimulating hormone |
| hTSH | = | Human thyroid stimulating hormone |
| TSI | = | Thyroid stimulating immunoglobulins |