



การหาปริมาณ T_3 uptake ในเลือดโดยวิธี Radioassay

กิจจา สุริต, วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)*
ชำนาญ อภิวัฒน์, วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

บทคัดย่อ

การหาปริมาณของ Thyroxine-binding globulin (TBG) ซึ่งเป็นอิสระในซีรัม สามารถทำได้โดยใช้สารรังสี ^{125}I -liothyronine (^{125}I - T_3) และ charcoal. หลักการทำมีอยู่ว่า ให้นำเอาซีรัมมาผสมกับ ^{125}I - T_3 ในปริมาณที่มากเกินไป เพื่อให้ ^{125}I - T_3 จับกับ TBG. เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะมี ^{125}I - T_3 เหลืออยู่, สกัดเอาออกมาได้โดยใช้ charcoal, แล้วนำไปวัดรังสีและหาปริมาณที่ ^{125}I - T_3 จับไปกับ TBG ได้. วิธีนี้พบว่าเป็นวิธีที่สะดวก, รวดเร็ว และประหยัด. รายงานผลออกมาเป็น Percent T_3 uptake และ Uptake ratio ระหว่างซีรัมที่ตรวจและซีรัมรวมของคนปกติ ซึ่งค่าเหล่านี้สามารถนำมาช่วยในการประเมินภาวะการทำงานของต่อมไทรอยด์รวมไปกับวิธีการอื่น ๆ และอาการทางคลินิกด้วย.

บทนำ

Thyroid hormone ที่ถูกขับออกมาในกระแสเลือดมีอยู่ 2 รูปด้วยกันคือ Triiodo-thyronine (T_3) และ Tetraiodothyronine (T_4) ฮอร์โมนทั้งสองตัวนี้จะจับอยู่กับโปรตีนในพลาสมาที่เรียกกันว่า Thyroxine-binding globulin (TBG) ในลักษณะของ Reversible binding equilibrium. ในภาวะของ Hypo-

thyroidism ต่อมไทรอยด์จะผลิตฮอร์โมนออกมาในเลือดได้น้อย จึงเป็นเหตุให้เหลือ TBG ที่เป็นอิสระอยู่มาก. ในทางตรงกันข้าม, ภาวะ Hyperthyroidism จะมี TBG ที่เป็นอิสระอยู่น้อย เพราะต่อมไทรอยด์ทำงานมากกว่าปกติผลิตฮอร์โมนออกมาในกระแสเลือดได้มาก. ดังนั้นการวัดปริมาณ TBG ที่เป็นอิสระก็สามารถนำไปใช้ในการประเมินการทำงานของต่อมไทรอยด์ได้เป็นอย่างดี

ตามทฤษฎีดังกล่าวมาแล้ว จึงได้มีผู้พยายามหาวิธีที่จะวัดปริมาณของ TBG ที่เป็นอิสระและนำเอาสารรังสีไอโซโทปเข้ามาช่วย ในการนี้ด้วย Hamolsky และพวก (1957) ได้รายงานวิธี Radioassay ที่ใช้ในการหา Degree of Saturation ของ TBG ขึ้น, โดยใช้ ^{131}I -labelled triiodothyronine (^{131}I -T₃) เป็น Tracer ที่จะไปจับกับ TBG, แล้วใช้เม็กเล็ค แดงเป็นตัวที่แยก binder ^{131}I -T₃ ที่เหลือจากการจับกับ TBG ออกมา. ทั้งนี้เพราะเม็กเล็ค แดงมีคุณสมบัติที่สามารถดูดซึมเอา Thyroid hormone เข้าไปในเซลล์ได้. แต่เนื่องจากการใช้เม็กเล็ค แดงค่อนข้างจะยุ่งยาก จึงมีผู้พยายามใช้สารอื่นๆ เป็น binder เช่น Resin^(1,2,4), Sephadex⁽³⁾, และ Charcoal^(6,7), เพื่อที่จะหา binder ที่ใช้ได้ดี วิธีการง่ายและราคาประหยัด. ผู้เขียนได้รายงานการหาปริมาณของ TBG ที่เป็นอิสระในซีรัม โดยวิธี Radioassay ซึ่งใช้ ^{125}I -labelled liothyronine เป็น Tracer และ Albumin coated charcoal เป็น binder, แล้วคำนวณผลออกมาเป็น % T₃ uptake และ Uptake ratio.

หลักการ

หลักของการใช้ Radioassay ในการหา % T₃ uptake ของซีรัมเป็นไปดังแสดงไว้ในรูปที่ 2.

เมื่อนำเอาซีรัมมาผสมกับ ^{125}I -labelled liothyronine (^{125}I -T₃), ส่วนหนึ่งของ ^{125}I -T₃ นี้จะจับกับ TBG ในซีรัมเรียกว่า

bound fraction, อีกส่วนหนึ่งจะไม่ถูกจับเรียกว่า free fraction. เราสามารถวัดปริมาณ free fraction ได้โดยนำเอา binder ไปจับกับ free fraction นี้แล้ว นำมาวัดปริมาณของ ^{125}I -T₃ ที่จับมาได้. เมื่อนำปริมาณนี้ไปลบจากปริมาณทั้งหมดของ ^{125}I -T₃ ที่เติมลงไป ก็จะได้ปริมาณของ bound fraction โดยคำนวณออกมาเป็นเรียกว่า % T₃ uptake.

ในการทำ Radioassay ของ T₃ uptake นี้ทุกครั้งจะต้องทำ pooled normal serum ด้วยเพื่อนำมาเทียบอัตราส่วนกับ test serum, โดยให้ T₃ uptake pooled normal serum เป็น 1.

วัสดุและวิธีการ

1. Pooled normal serum เก็บจากเลือดของผู้ที่มาจากชายเลือดที่ธนาคารเลือด โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ จำนวน 50 คน นำมาปั่นแยกเอาซีรัมแล้วรวมเข้าด้วยกันไว้ใช้ตลอดการทดลอง, โดยแบ่งเป็นขวดเล็กๆ เก็บไว้ในอุณหภูมิ 0 ถึง -10°C
2. Test serum ได้จากซีรัมของผู้ป่วยที่ส่งมาหาค่า T₄ และผู้ป่วยที่ส่งมาทำ ^{131}I -uptake.
3. ^{125}I -liothyronine สั่งซื้อจากบริษัท The Radiochemical Centre, Amersham นำมาทำให้เจือจาง 10 เท่าจึงนำไปใช้.
4. Albumin coated charcoal ใช้ 20 % charcoal (Activated charcoal, Sigma)

ผสมกับ 4% albumin solution (Bovine serum albumin) ในปริมาณเท่ากัน

5. วิธีการ ขั้นตอนในการทำ Radioassay ของ T₃ uptake มีดังนี้คือ

5.1 หยด working solution ของ ¹²⁵I-T₃

ลงใน tube 0.3 ml. นำไปวัดปริมาณรังสีให้เป็น a

5.2 เติมซีรัม 0.5 ml. ลงใน tube, ทิ้งไว้ 15 นาที ในอุณหภูมิ 3°C

5.3 เติม Michael's barbitone sodium acetate buffer, pH 7.4 3 ml. แล้วตามด้วย Coated charcoal suspension นำไปผสมด้วย Vortex mixer เป็นเวลา 10 วินาที

5.4 นำไปปั่นโดยใช้ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

5.5 เทน้ำใสข้างบนออกทิ้ง แล้วนำเอาตะกอนไปวัดปริมาณรังสี ให้เป็น b

5.6 คำนวณผลโดยใช้สูตรข้างล่างนี้

$$\% T_3 \text{ uptake} = \frac{b}{a} \times 100$$

$$\text{Uptake ratio} = \frac{\frac{b}{a} \text{ test serum}}{\frac{b}{a} \text{ pooled normal serum}}$$

ผลการทดลอง

จากการหา percent T₃ uptake ของ pooled normal serum 35 ครั้ง พบว่าได้ค่าตั้งแต่ 21 ถึง 51% มีค่าเฉลี่ยเป็น 32.1% และ S.D. เป็น 7.76%

ค่า Uptake Ratio ของซีรัมของผู้ที่มาขายเลือด มีค่าตั้งแต่ 0.91 ถึง 1.35

ผลที่ทำการซีรัมผู้ป่วยที่มารับการตรวจ ¹³¹I-uptake และที่ส่งมาหาค่า T₃ จำนวน 104 คน ปรากฏตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลของ uptake ratio กับ ¹³¹I-uptake ในซีรัมของผู้ป่วย

% ¹³¹ I-uptake	จำนวน	ค่าเฉลี่ย	S.D.	P
60 % ขึ้นไป	38	1.192	0.440	< 0.01
20-60 %	52	0.965	0.203	
ต่ำกว่า 20 %	14	0.985	0.169	> 0.5

วิจารณ์

วิธีการวัดปริมาณ T₃ ที่ทำโดย Kamolsky และพวก (1957) ที่ใช้เม็ดเลือดแดงเป็น binder นั้น มีข้อเสียอยู่ที่เม็ดเลือดแดงเกิดการ haemolyse

ง่าย เมื่อนำเอาไปแยก T₃ ออกมาแล้วต้องล้างเม็ดเลือดแดงด้วยน้ำเกลือปกติ แล้วจึงนำเม็ดเลือดแดงที่ล้างแล้วนี้ไปวัดปริมาณรังสี หากเกิดการ haemolyse ขึ้นระหว่างการล้าง

จะทำให้คำนวณ percent T₃ uptake ได้น้อยกว่าความเป็นจริง อีกประการหนึ่งการเก็บรักษา และการเตรียมเม็ดเลือดแดงมาใช้ก็มีวิธีการที่ยุ่งยาก จึงมีการนำสารอย่างอื่นมาใช้แทน

Resin เป็นสารหนึ่งที่น่าสนใจนำมาใช้แยก free T₃ (1,2,4) Resin ที่ใช้กันก็เป็น Amberlite IRA 400 cyclic formate form ปกติที่ทำออกมาขายจะอยู่ใน chloride form, จึงต้องนำเปลี่ยนให้เป็น formate form, โดย pack resin ลงใน column แล้วผ่าน formic acid ลงไปจนกว่าจะไม่มี chloride ออกมา. ทดสอบได้โดยการเกิดตะกอนกับ silver nitrate เมื่อจะนำไปใช้จะต้องล้างด้วยน้ำเกลือแล้วทำให้แห้งโดยใช้ลมผ่าน ปริมาณของ resin ที่ใช้ในหลอดจะต้องชั่งให้เท่ากันจริงๆ จึงจะได้ค่าที่แน่นอน ซึ่งก็เป็นการลำบากพอควร Resin นี้ บางคนก็นำเอามาใช้ในรูปแบบของ Resin-impregnated paper (2) หรือ Resin sponge (4)

ต่อมาก็มีผู้พยายามนำเอา Sephadex มาใช้บ้าง โดยอาศัยลักษณะที่เป็นรูพรุนๆ ของมัน เมื่อนำมาเข้ากับ T₃ มันก็จะจับ T₃ เข้าไปไว้ในรูพรุนๆ เหล่านั้นได้ดี วิธีทำทำได้ 2 แบบคือ ชั่ง Sephadex ใส่ลงในหลอดโดยตรง อีกวิธีคือทำแบบ Column chromatography จากประสบการณ์ของผู้เขียนพบว่าการทำ column ให้ได้เท่าๆ กันทุกอันนั้นทำได้โดยยาก ซึ่งถ้าควบคุมไม่ได้แล้ว ก็จะทำให้ผลที่ได้ไม่แน่นอนเกิดความแปรปรวนสูงมาก

ในระหว่างนี้ ก็มีผู้รายงานการทำ T₃ uptake test โดยใช้ charcoal เป็น binder (6,7) ซึ่งมีวิธีการเตรียมที่ง่ายและผลที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีใช้ resin ก็มีความแม่นยำ

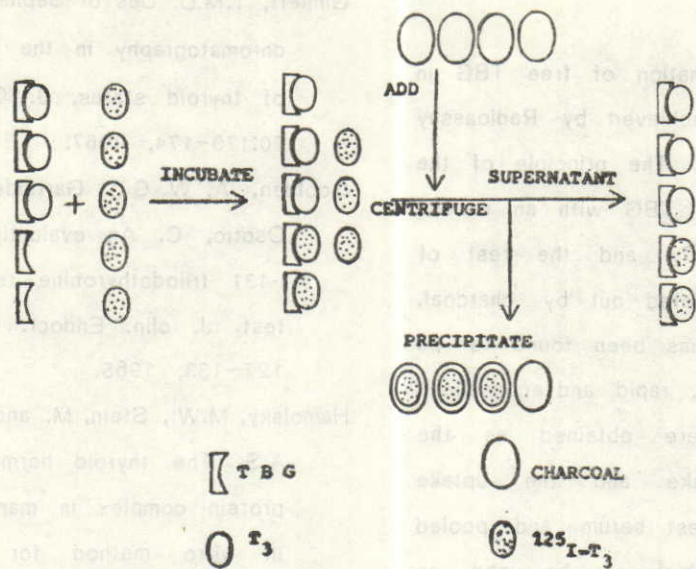
กว่าพอประมาณ ในการทดลองครั้งนี้พบว่าค่า Uptake ratio ของคนปกติอยู่ในช่วงเดียวกับที่เคยมีผู้รายงานไว้ (1,2,7)

ผู้เขียนได้นำเอาผลของ Uptake ratio ที่ได้มาหาความสัมพันธ์กับ ¹³¹I-Thyroid-uptake, โดยกำหนดให้ ¹³¹I-thyroid-uptake ที่สูงกว่า 60% เป็นภาวะ Hyperthyroidism และที่ต่ำกว่า 20% เป็น Hypothyroidism นอกนั้นให้เป็นช่วงของ Euthyroidism พบว่าค่าเฉลี่ยของ Uptake ratio ในช่วงของ Hyperthyroidism สูงกว่าค่าเฉลี่ยในช่วงของ Euthyroidism อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) แต่เมื่อดูในช่วง Hypothyroidism กลับพบว่าค่าอยู่ในช่วงเดียวกันกับของ Euthyroidism ทั้งนี้เพราะ ¹³¹I-thyroid-uptake นี้แปรปรวนได้ง่ายมาก ธาตุไอโอดีนในอาหารและยาบางชนิดทำให้ค่านี้ต่ำกว่าความเป็นจริงได้ จะเห็นได้ว่าค่าของ Uptake ratio อาจนำมาใช้ประเมินการทำงานของต่อมไทรอยด์ที่ได้ดีกว่าใช้ ¹³¹I-thyroid-uptake อย่างเดียว

สรุปได้ว่า T₃ uptake radioassay เป็นวิธีการที่สามารถนำมาใช้ช่วยในการวินิจฉัยการทำงานของต่อมไทรอยด์ได้ และการใช้ charcoal เป็น binder ในการทำ Radioassay อันนี้ก็ทำให้ได้วิธีที่รวดเร็ว ง่ายและประหยัด

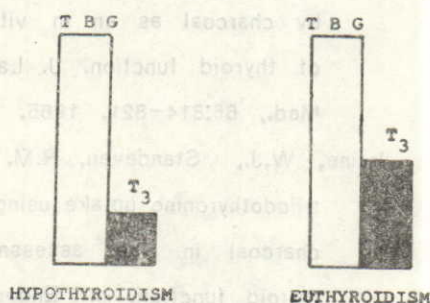
คำขอบคุณ

ผู้เขียนขอขอบคุณ อาจารย์สุวิระ วัฒนวิญญู และ อาจารย์ วาญณี คุณาชีวะ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อให้ตัวอย่างซีรัม.



ขั้นที่ 2 ขั้นตอนการทำ Radioassay ในซีรัม

เพื่อหา Percent T_3 uptake



รูปที่ 1 ระดับของ Triiodothyronine (T_3) กับ Thyroxine-binding globulin (TBG) ในภาวะการทำงานต่างๆของต่อมไทรอยด์

Abstract

The estimation of free TBG in serum can be achieved by Radioassay using $^{125}\text{I-T}_3$. The principle of the assay is binding TBG with an excess amount of $^{125}\text{I-T}_3$ and the rest of $^{125}\text{I-T}_3$ is extracted out by charcoal. This technique has been found to be simple, relatively, rapid and economical. The results were obtained as the percent T_3 uptake and the uptake ratio between test serum and pooled normal serum, which can be used as an aid in diagnosis of thyroid function together with other techniques and clinical symptom.

References

- Clark, F. Resin uptake of I-131 triiodothyronine, an in vitro test of thyroid function. *Lancet* ii; 167-169, 1963.
- Farren, H. and Evans, K. The uptake of I-131 triiodothyronine from serum by resin-impregnated paper in vitro. *J. Endocr.*, 32:265-266, 1955.
- Gimlett, T.M.D. Use of Sephadex column chromatography in the assessment of thyroid status. *J. Clin. Path.*, 20:170-174, 1967.
- Goolden, A, W. G., Gartside, J. and Osorio, C. An evaluation of the I-131 triiodothyronine resin sponge test. *J. clin. Endocr. Metab.* 25: 127-133, 1965.
- Hamolsky, M.W., Stein, M. and Freedberg, A.S. The thyroid hormone-plasma protein complex in man II, A new in vitro method for study of "uptake" of labelled hormonal component by human erythrocytes. *J. clin. Endocr. Metab.* 17:33-44, 1957.
- Herbert, V., Gottlieb, C.W., Gilbert, P. and Silver, S. Absorption of I-131 triiodothyronine (T_3) from serum by charcoal as an in vitro test of thyroid function. *J. Lab. Clin. Med.*, 66:814-821, 1965.
- Irvine, W.J., Standeven, R.M. Serum triiodothyronine uptake using coated charcoal in the assessment of thyroid function. *J. Endocr.* 41: 31-40, 1968.