

# PRAKTYKA LABORATORYJNA

ANDRZEJ LACHOWSKI

## Znakowanie hormonów chromem Cr-51

Pracownia Radiobiologii Instytutu Weterynarii w Puławach  
Kierownik: doc. dr M. DECOWSKI

Radioimmunologiczna metoda oznaczania poziomu insuliny we krwi opisana przez Yalow'a i Berson'a (9) była w ostatnich latach zastosowana przez szereg autorów do ilościowego określania niektórych hormonów tropowych w materiałach biologicznych. Hunter i Greenwood (3, 4) zaadaptowali tę metodę do określenia poziomu hormonu wzrostowego; Odell i wsp. (6) używali jej do rutynowego oznaczania poziomu hormonu pęcherzykowego (FSH), luteinizującego (LH) i tyreotropowego (TSH), zaś Kwa i Verhofstad (5) oraz Araï i Lee (1) do oznaczania hormonu laktogenowego (LTH). Wszyscy wymienieni autorzy używali do znakowania hormonów J-131 względnie J-125 (5).

Jod 131 ma krótki półokres fizyczny (8,05 dni) co obok takich cech jak łatwość sublimowania oraz posiadanie stosunkowo wysokiej energii promieniowania beta (0,610 MeV) czyni go kłopotliwym i niebezpiecznym w użyciu. J-125 ma wprawdzie długi fizyczny półokres (60 dni), ale posiada zbyt niską energię promieniowania (35 KeV) i jest trudny do nabycia co w dużym stopniu obniża jego przydatność. Oprócz tego podobnie jak J-131 posiada wybitne powinowactwo do tarczycy co może powodować nieprawidłowości w metabolizmie wprowadzanych do organizmu substratów i prowadzić do mylnych ocen. Celem niniejszej pracy jest zastąpienie aktywnego jodu innym pierwiastkiem promieniotwórczym więcej przydatnym do pracy nad oznaczaniem poziomu hormonów. Po wstępnych badaniach wybrano do tego celu chrom-51 z uwagi na dogodną energię promieniowania i półokres, a co najważniejsze na łatwość wiązania się z białkiem i nie poddawania się metabolizmowi w ustroju. Badania prowadzono w kierunku wyjaśnienia:

- czy hormony tropowe dają się znakować radiochromem.
- czy chrom wiąże się łatwo z hormonami,
- w jakich warunkach poszczególne hormony dały się znakować.

### Materiał

1. Hormony: ACTH, FSH, LN, STH i TSH (owcze) otrzymano z Endocrinology Study Section National Institutes of Health, Bethesda, USA. Laktogeny hormon uzyskano drogą ekstrakcji z przysadek owczych, posługując się metodą Cole i Li (2). Ekstrakt oczyszczano na kolumnie z DEAE celuloza, wg metody Reisfeld'a i wsp. (7). Aktywność biologiczną (27 j) określono na wolu gołęmbi wg metody Riddle'a i Bates'a (8).

2. Chrom (Cr-51) w postaci wodnego roztworu soli chloru o aktywności około 50 mC/mg otrzymano z Instytutu Badań Jądrowych w Świerku. Czystość radiochemiczna i chemiczna wg danych firmowych była wyższa od 99%. Radiochrom, którego półokres fizyczny wynosi 27,75 dni emituje wyłącznie promieniowanie gamma.

3. Albuminę surowicy krwi bydlecej otrzymano z firmy Calbiochem, USA.

4. Bufory:

- kwaśny — weronal sodu 0,07 M + 1 N HCl (pH 3,5)
- zasadowy — weronal sodu 0,07 M + 0,2 N HCl (pH 8,2)

5. Sefadeks G-50 otrzymano z firmy Pharmacia Uppsala, Szwecja.

### Metody

1. Aparatura licząca. Do pomiarów aktywności używano licznika scyntylicyjnego typu SE-2 z kryształem studzienkowym NaJ/Tl sprzężonego z przelicznikiem elektronowym typu PEL-5. Do kolorimetrii użyto spektrokolorymetru typu „Spekol” firmy VEB Carl Zeiss, Jena.

2. Metoda znakowania hormonów. Używano  $\text{Cr}^{51}\text{Cl}_3$  przygotowany w formie roztworu na wodzie apirogennej. Znakowanie przeprowadzono w środowisku kwaśnym i zasadowym. Hormony rozpuszczano w buforach o pH 3,5 i pH 8,2 w ilościach 1 mg/ml. Z tych roztworów pobierano przy pomocy półautomatycznych pipet (H. J. Elliott LTD., Emil Works, Treforest, Glam, Wielka Brytania) objętości 0,05 ml i 0,025 ml co stanowiło równowartość 50 µg względnie 2 µg hormonu. Ilości te umieszczano w zagłębieniach porcelanowej płyty, do których dodawano  $\text{Cr}^{51}\text{Cl}_3$  o aktywności rzędu 50 i 100 µC. Hormony i radiochrom mieszano przez 30 sek. po czym inkubowano w 37°C w ciągu 2 dni aż do zupełnego wyschnięcia. Doświadczalnie przekonano się, że wysuszenie preparatu obok czasu inkubacji i pH środowiska jest czynnikiem potęgującym proces wzajemnego łączenia się hormonów z radiochromem. Otrzymane suche osady rozpuszczano w buforze weronalowym o pH 8,2 i nanoszono na kolumnę chromatograficzną w celu oczyszczenia znakowanych hormonów z jonowego chromu.

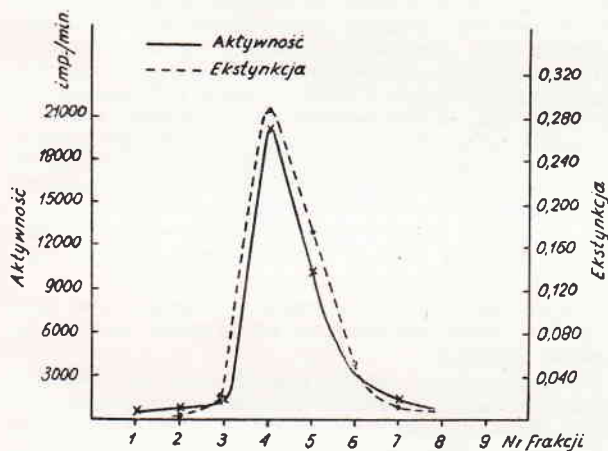
3. Oczyszczanie znakowanych hormonów. Zastosowano chromatografię kolumnową z użyciem sefadeksu G-50. Jeden gram sefadeksu G-50 moczone w wodzie przez 3 godz., przemywano kilkakrotnie buforem weronalowym i umieszczono w kolumnie chromatograficznej (Quickfit CR 12/30). Wysokość słupa sefadeksu wynosiła około 13 cm. W celu zmniejszenia absorpcji hormonów na żelu przemyto wynielnioną kolumnę 20 ml roztworu albuminy surowicy krwi bydlecej (1 mg/ml\*). Następnie znakowane hormony nanoszono na kolumnę i chromatografie rozwijano buforem weronalowym o pH 8,2. Objętość poszczególnych frakcji przy szybkości przepływu 1 ml/5 min. wynosiła 1 ml (Chromatografia 1).

\* Straty powstałe w wyniku zaabsorbowania hormonów przez sefadeks wynosiły około 30% naniesionego hormonu na kolumnę. Przekonano się o tym w wyniku kilkakrotnego sączenia hormonów znakowanych o znanej aktywności. Otrzymane wyniki pokrywają się z wynikami cytowanymi przez Greenwood'a i Hunter'a (3). Poprawkę tę uwzględniono w rubr. II, tab. 1.

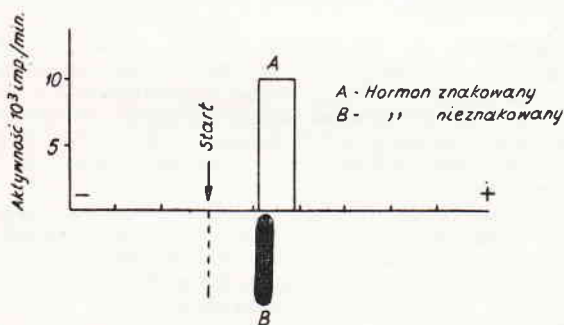
4. Wykrywanie hormonów znakowanych we frakcjach. Przeprowadzono przez pomiar aktywności frakcji z zastosowaniem odczynu Folina jako testu kontrolnego. Do części aktywnej frakcji z chromatografii I dodano 1,5 mg hormonu i sączono przez uprzednio użytą kolumnę. (Chromatografia II). Otrzymane frakcje z chromatografii II badano łącznie na aktywność i na obecność białka z zastosowaniem reakcji Folina. Trwałość wiązania hormonów i radiochromu badano przy użyciu elektroforezy. Na paski z octanu celulozy (Oxoid) zanurzone w buforze weronałowym o pH 8,2 nanoszono: hormon znakowany o aktywności około 10 000 imp./min., oraz dla kontroli hormon nieznakowany i radiochrom w postaci jonowej. Rozdział przeprowadzono przez 3 godz. przy 300 V napięcia.

### Wyniki

Badania wstępne dotyczące techniki znakowania radiochromem wykonano przy użyciu hormonu FSH. Jak wynika z wykresu 1 ilustrującego dane otrzymane z chromatografii kolumnowej szczyt aktywności frakcji i szczyt nasilenia barwy po reakcji Folina pokrywają się co stanowi dowód, że w obydwu badanych frakcjach obecne było białko w tym przypadku hormon. Jest to jednoznaczne ze stwierdzeniem, że badane hormony zostały napiętnowane radiochromem. W wyniku przeprowadzonej elektroforezy (wykres 2) stwierdzono,



Wykres 1. Wyniki chromatografii kolumnowej.



Wykres 2. Wyniki elektroforezy.

że hormony znakowane podobnie jak nieznakowane zdążają do anody z jednakową szybkością. Strefa aktywności znakowanego hormonu uwidoczniona na wykresie pokrywa się z położeniem hormonu na dołączonym zdjęciu

fotograficznym. Zaznaczyć należy, że nie stwierdzono aktywności w miejscu naniesienia materiału na pasek tzn., że radiochrom wywędrował łącznie z hormonem podczas gdy radiochrom w postaci jonowej nałożony na pasku kontrolnym elektroforezie nie podlegał i pozostał na miejscu naniesienia. Powyższe świadczą zarówno o związaniu się radiochromu z hormonem jak i trwałości związku.

Z tab. 1 wynika, że hormony białkowo-cukrowe FSH, LH i TSH w środowisku kwaśnym związały odpowiednio 30, 40 i 35 procent użytego  $Cr^{51}Cl_3$  zaś w środowisku zasadowym 60, 62 i 64 procent. Natomiast hormony białkowe — ACTH, LTH i STH w środowisku kwaśnym związały 30, 25 i 30 procent a w środowisku zasadowym tylko 5, 4 i 5 procent radiochromu.

Tabela 1. Wyniki napiętnowania hormonów radiochromem ( $Cr^{51}$ )

Symbol hormonu	Ilość hormonu $\mu g$	Aktywność $Cr^{51}Cl_3$ w $\mu C$	pH środowiska	% związanego $Cr^{51}Cl_3$
FSH	36	50	3,5	30
	18	100	8,2	60
LH	36	50	3,5	40
	18	100	8,2	62
TSH	36	50	3,5	35
	18	100	8,2	64
LTH	18	100	3,5	30
	18	100	8,2	5
STH	18	100	3,5	25
	18	100	8,2	4
ACTH	18	100	3,5	30
	18	100	8,2	5

### Omówienie

Zamierzony cel pracy został osiągnięty, gdyż opracowano metodę skutecznego i trwałego znakowania użytych w tym doświadczeniu hormonów. Przez analogię można sądzić, że metoda będzie mogła być zastosowana również do pozostałych nie przebadanych hormonów tropowych. Metoda ta jest prosta, łatwa w użyciu i odznacza się stosunkowo wysoką efektywnością znakowania, co kwalifikuje się do oznaczania hormonów w materiale biologicznym. Stwierdzone różnice w dynamice wiązania radiochromu z badanymi hormonami w różnych środowiskach należy przypuszczać odnieść do różnic w budowie i chemicznym składzie tych hormonów.

### Wnioski

1. Opracowano metodę znakowania hormonów tropowych chromem  $Cr^{51}$ . Do badań użyto hormony: ACTH, FSH, LH, LTH, STH i TSH.

2. Hormony białkowe lepiej znakują się w środowisku kwaśnym (około 30%), hormony białkowo-cukrowe w środowisku zasadowym (około 62%).

3. Opiszana metoda nadaje się do pracy z zastosowaniem znakowanych hormonów.

## Piśmiennictwo

1. Arai Y., Lee T. H.: *Endocrinology* 81, 1041, 1967.
2. Cole R. D., Li C. H.: *J. Biol. Chem.* 213, 197, 1955.
3. Greenwood F. C., Hunter W. M., Glover J. S.: *Biochem. J.* 89, 114, 1963.
4. Hunter W. M., Greenwood F. C.: *Biochem. J.* 91, 43, 1964.
5. Kwa H. G., Verhofstad F.: *Biochim. Biophys. Acta* 133, 186, 1967.
6. Odell W. D., Rayford P. L., Ross G. T.: *J. Lab. and Clin. Med.* 70, 973, 1967.
7. Reisfeld R. A., Williams D. E., Cirillo V. J., Tong G. L., Brink N. G.: *J. Biol. Chem.* 239, 1777, 1964.
8. Riddle O., Bates R. W., Dykshorn S. W.: *Am. J. Physiol.* 105, 191, 1933.
9. Yalow R. S., Berson S. A.: *J. Clin. Invest.* 39, 1157, 1960.

Adres autora: Andrzej Lachowski, Lublin, ul. Pana Tadeusza 2/63.

**Ляховски А. — Клеймение гормонов при помощи радиохрома Cr-51.**

Клеймение избранных троповых гормонов проведено в кислой (pH = 3,5) и в щелоческой (pH = 8,2)

среде, в 37°C, в течение 48 часов. Получили стабильное соединение радиоизотопа Cr-51 с гормонами, причем белковые гормоны ACTH, LTH и STH лучшие связывали в кислой среде (30, 40 и 35%), а белково-полисахаридные FSH, LH и TSH в щелоческой (60, 62 и 64% Cr-51).

**Lachowski A. — The labelling of hormones with Chromium Cr-51.**

The purpose of the work was the application of the Chromium Cr-51 in labelling some chosen hormones. The labelling was performed at 37°C during 48 hours in acid (pH 3.5) and basic (pH 8.2) environments. It was obtained the solid linkage of Cr-51 with the hormones. The proteinic hormones- ACTH, LTH and STH bound Cr-51 more effectively in acid environment (30, 40 and 35 per cent of Cr-51 respectively) and glycoproteinic hormones — FSH, LH and TSH in basic environment (60, 62 and 64 per cent of Cr-51 respectively).

## RECENZJE I BIBLIOGRAFIA

**STEFAŃSKI W.: Parazytologia weterynaryjna, t. I: Protozoologia i helmintologia, t. II: Arachno-Entomologia. PWRiL, Warszawa, 1968.**

Pisząc przed trzema laty recenzję z I wydania I tomu Parazytologii Weterynaryjnej (*Wiad. Parazytol.*, 11, 97—98, 1965 (1—2)) wyraziłem nadzieję, że wkrótce autor obdarzy nas całością tego, tak bardzo potrzebnego podręcznika. I oto mam przed sobą nie tylko II tom obejmujący zwięzy, ale wyczerpujący przegląd stawonogów pasożytniczych, ale również i drugie wydanie tomu pierwszego, znacznie rozszerzone. Omawiając przeto całość dzieła wypada wstępnie stwierdzić, że dzięki pracy wielce zasłużonego dla polskiej parazytologii Autora, mamy obecnie całość podstawowej problematyki parazytologicznej ujętą i zwięzle omówioną w oryginalnym polskim podręczniku, przeznaczonym w pierwszym rzędzie dla studentów wydziałów weterynaryjnych. Oceniając z tego też punktu widzenia „Parazytologię” Stefańskiego wypada z pełną satysfakcją stwierdzić, iż wieloletnie, bogate doświadczenia pedagogiczne Autora znalazło swe pełne odbicie zarówno w układzie jak i materiale zawartym w omawianej książce. Można bez obawy o przesadę powiedzieć, że na treść podręcznika złożyło się przede wszystkim to co istotnie słuchaczom weterynarii jest dzisiaj niezbędne do studiów. Szczególnie cenne jest przy tym, że podręcznik stanowi aktualny arsenał wiedzy parazytologicznej, wolny od balastu starych nieprzydatnych już dzisiaj wiadomości. Odnosi się to zarówno do II jak i do I tomu podręcznika, jak to już wspomniałem powyżej w znacznym stopniu uzupełnionego i unowocześnionego. Owe uzupełnienia dotyczą w pierwszym rzędzie tych pasożytów, które z praktyczno-weterynaryjnego punktu widzenia są szczególnie ważne.

Po dzieło to sięgają będą często także lekarze praktycy i to zarówno weterynarii jak i medycyny, a dalej szeroka rzesza biologów s.l. — a zatem ci wszyscy dla których parazytologia jako dyscyplina nauk biologicznych i medycznych jest z wielu względów bliska.

„Parazytologia” to podręcznik zawierający z konieczności dużo materiałów opisowych, morfologicznych. Dla czytelnika tego rodzaju książki niezwykle ważne jest odpowiednie zilustrowanie poruszanych w niej zagadnień. I pod tym względem autor dołożył wszelkich starań aby ułatwić czytelnikowi percepcję trudnego często materiału. Strona ilustracyjna jest tutaj doprawdy bez zarzutu. Wybór rysunków i ich piękne wykonanie podnosi wartości dydaktyczne recenzowanego dzieła.

Z prawdziwą przyjemnością wypada też podkreślić

walory edytorskie „Parazytologii Weterynaryjnej”. Książka, jak wiele innych ostatnio wydanych przez PWRiL publikacji, wyszła w pięknej nowoczesnej szacie graficznej, na dobrym papierze, starannie opracowana tekstowo, z przejrzystymi wyróżnieniami itd. Nieliczne błędy literowe, braki w odnośnikach i indeksach w niczym nie zmieniają jej wartości. Zresztą wszyscy, którzy zetknęli się choć trochę z pracą wydawniczą, dobrze wiedzą, że złośliwie z reguły chochliki drukarskie drzemią we wszystkich redakcjach i patają tam „niemożliwe” figle. Przy tej jednak w pełni pozytywnej ocenie pracy zasłużonego na naszym rynku wydawniczym PWRiL-u mam doń uzasadniony chyba żal, że nie potrafił się on uporać z reprodukcjami fotograficznymi. Szkoda wielka, że zdjęcie Autora, zamieszczone na drugiej nienumerowanej stronie I tomu „Parazytologii”, nie najlepiej świadczy o możliwościach technicznych Wydawnictwa. A przecież fotogramy zamieszczone na końcu wspomnianego tomu wyglądają obecnie o wiele lepiej niż w I wydaniu.

Miejmy nadzieję, że następne wydania i pod tym względem będą bez zarzutu, bo przecież stać na to naszego Edytora.

Po przeczytaniu całości podręcznika prof. Stefańskiego recenzujący odczuł jednakże i wyraźny niedosyt. Brak bowiem w tym dziele, konkretnie w II jego tomie, kilku lub może dwóch, objętościowo niewielkich nawet rozdziałów omawiających ogólnoparazytologiczną i sanitarną problematykę stawonogów.

Oczywiście, że wiadomość na ten temat znaleźć można w treści książki — są one jednak rozrzucone i zwiłaszcza dla studenta trudne do wyłowienia z ogromnej masy materiałów informacyjnych. Ze względów zatem dydaktycznych zebranie ich, podsumowanie w oddzielnych końcowych rozdziałach byłoby bardzo wskazane.

Jeśli już mowa o tych sprawach, to płyną same spod pióra słowa pytania: czy Autor nie zechciałby pomyśleć o wznowieniu rozszerzonego nieco wydania swego „Zarysu parazytologii ogólnej”? My wszyscy wdzięczni Mu czytelnicy byłibyśmy wtedy w pełni usatysfakcjonowani.

Przed trzema laty pisząc recenzję z I tomu „Parazytologii Weterynaryjnej” pozwoliłem sobie zwrócić się do Autora z apelem o obdarzenie nas w możliwie krótkim czasie II tomem tego dzieła. Apel ten został przyjęty i zrealizowany nadspodziewanie szybko. Może i tym razem prof. Stefański podejmie jeszcze trud opracowania wspomnianego „Zarysu”, trud godny twórcy polskiej szkoły parazytologii weterynaryj-