

ANDRZEJ ŚLEBODZIŃSKI, MARIAN JASTRZĘBSKI

Wiązanie trójiodotyroniny przez Sephadex *in vitro*, jako wskaźnik aktywności tarczycy i powinowactwa białka surowicy do hormonów tarczycy

Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Zootechniki w Krakowie
Kierownik: prof. dr Z. EWY

W 1955 r. Hamolsky (2) zaobserwował, że u pacjentów z tyreotoksykozą występuje zwiększona utrata znaczonej jodotyroniny z krwi. Badania *in vitro*, które uzupełniały tę obserwację, wykryły ponadto zwiększoną inkorporację radioaktywnych jodotyronin w skrawkach przepony szczura w obecności surowicy osób z nadczynnością tarczycy. Okazało się dalej, że dodana do pełnej krwi trójiodotyronina wiązana przez receptory erytrocytów w stopniu zależnym od stanu funkcjonalnego tarczycy, tj. w większym, w przypadkach hipertyreozы, a w mniejszym, w przypadkach hipotyreozы. Obserwacje te stały się podstawą dla opracowania diagnostycznego testu klinicznego (3), znanego w piśmiennictwie pod nazwą pomiaru wychwytu trójiodotyroniny przez erytrocyty w skrócie wychwyt T_3 lub testu Hamolskyego.

W latach 1961—1963 podjęto badania nad zastosowaniem testu Hamolskyego do pomiaru wychwytu znaczonej radiojodem trójiodotyroniny przez erytrocyty zwierząt domowych (8). W ustalonych warunkach pomiaru (*in vitro*) wykazano, że inkubowana z krwią trójiodotyronina (T_3) wiązana jest zależnie od właściwości gatunkowych w 70—90 procentach przez białko surowicy, wreszcie przez elementy morfotyczne krwi. Obliczono, że wychwyt T_3 skorygowany dla celów porównawczych do 100 procent hematokrytu, wynosi u przeżuwaczy 10—14%, u prosiąt 23—25% a u kur ponad 30% (9). Koreluje on dodatnio z aktywnością tarczycy i jest większy u zwierząt młodych, a w szczególności w okresie tzw. neonatalnej nadczynności tarczycowej (11). U świń w okresie hipotyreozы jest niższy od 20 procent (7).

W pracy poświęconej metodzie testu Hamolskyego zwróciliśmy uwagę (10), że test ten, choć prosty w założeniu, przedstawia trudności z analitycznego punktu widzenia. Szereg niespecyficznych czynników jak np. obecność koagulantów, ślady hemolizy, temperatura inkubacji, ilość przemywań krwinek, a także stopień czystości radiochemicznej trójiodotyroniny, modyfikują ostateczny rezultat testu. Z podobnych względów stosunkowo wcześniej podjęto próby modyfikacji metody, zmierzające do tego, aby w miejsce erytrocytów „współzawodniczących” z receptorami białka surowicy o trójiodotyroninę użyć substancji wykazującej powinowactwo do jodotyronin o stałej charakterystyce fizyko-chemicznej w czasie po-

stepowania analitycznego. Substancją taką okazały się żywice jonowymienne (6, 13) a następnie dekstran znany pod nazwą firmową Sephadex (5). Zastosowanie żywic jonowymiennych wzgl. dekstranu, zachowuje praktyczne zalety testu Hamolskyego, tj. szybkość i dokładność pomiaru aktualnego stanu czynności tarczycy, bez potrzeby wprowadzania radiojodu do organizmu po jednorazowym pobraniu tylko około 10 ml krwi. Usuwa się przy tym te niedogodności, które wiążą się ze zmiennymi właściwościami erytrocytów.

W obecnej pracy, jako frakcji wiążącej znaczoną trójiodotyroninę użyto Sephadexu G-25 (Pharmacia, Szwecja). Celem pracy było wykrycie różnic w powinowactwie białka surowicy krwi do trójiodotyroniny u zwierząt domowych, jako wstępu do standaryzacji metody dla celów zootechnicznych i klinicznych.

Teoretyczne podstawy testu wychwytu — T_3 .

Wychwyt jodotyronin (tyroksyny i trójiodotyroniny) przez białka plazmy krwi jest m. in. formą transportu tych substancji w łożysku naczyniowym. Polega on na odwracalnym wiązaniu, w stopniu odpowiednim do powinowactwa białek. Przynajmniej trzy frakcje białkowe krwi zwierząt spełniają rolę transportera tyroksyny i trójiodotyroniny. Są to: a) globulina wiążąca tyroksynę — TBG, b) albumina i c) frakcja przedalbuminowa — TBPA, u ludzi i niektórych zwierząt.

TBG wykazuje właściwości selektywnego wiązania hormonów tarczycy, charakteryzuje się przy tym małą pojemnością wiążącą, odwrotnie aniżeli albuminy (12). Jeśli na skutek wzmoczonej sekrecji hormonalnej tarczycy (*hyperthyreosis*) wzrasta ilość hormonu w krwi (mierzone zwykle w formie jodu związanego z białkiem, PBI) to wówczas znaczna część receptorów TBG wysycona jest hormonem, a tym samym proporcjonalnie większa jego część „dostępna” jest dla albumin czy elementów morfotycznych, a także dla dekstranu (jeśli do mieszaniny dekstranu i surowicy od osobników cierpiących na hipertyreozę dodamy egzogennej, znaczonej trójiodotyroniny). W stanie hipertyreozы interakcja trójiodotyroniny z białkiem surowicy i dekstranem wykazuje odwrócenie proporcji. Nienasycona endogennym hormonem TBG wiąże większość dodanej do surowicy trójiodotyroniny, co z kolei obniża jej ilość „dostępna” dla dekstranu.

Zdolność wiązania, względnie wychwytu hormonów tarczycy przez Sephadex polega na jego powinowactwie do związków zawierających w cząsteczce pierścień aromatyczny.

Materiał i metody

Materiał zwierzęcy stanowiły: dorosłe krowy, świnię i 3—4 tygodniowe cielęta, nieznanego pochodzenia i rasy, poddawane ubojowi w rzeźni; owce 4-letnie, rasy cakiel, króliki 2—4-letnie, rasy Polskie Białe średnie, lisy (piesaki), kury i świnki morskie.

Pobraną od zwierząt krew wirowano, a uzyskaną surowicę przechowywano w lodówce w temperaturze około 1°C. W miejsce powszechnie używanej trójiodotyroniny — ^{131}I , o krótkim okresie półtrwania, użyto trójiodotyroniny znaczonej jodem — ^{125}I .*

Z roztworu macierzystego trójiodotyroniny— ^{125}I (prod. IBJ Świerk) sporządzano co trzy tygodnie roztwór roboczy, dodając odpowiednią ilość pierwszego do mieszaniny 1% albuminy i glikolu propylonowego (w/w), rozcieńczając w miarę potrzeby 0,15 M buforem fosforanowym o pH 7,4 tak, aby 0,1 ml roztworu zawierało około 0,03 μC radioaktywności i $30\text{--}210 \times 10^{-4}$ μg nieradioaktywnej trójiodotyroniny (nośnika). Roztwory z trójiodotyroniną przechowywano w lodówce w temperaturze około 1°C. Ilość roztworu roboczego dodawanego do 1 ml surowicy wynosiła od 0,05 do 0,15 ml.

Przebieg analizy

Do 2 ml surowicy dodawano trójiodotyroninę— ^{125}I (T_3), mieszano i pozostawiano w temperaturze pokojowej na okres 10—20 minut. Następnie $3 \times 0,5$ ml surowicy z T_3 przenoszono do probówek plastikowych (o pojemności około 5 ml), zawierających nastawiony w buforze fosforanowym Sephadex G-25, fine (w ilości odpowiadającej 0,5 g suchego Sephadexu). Surowicę z Sephadexem dokładnie mieszano, a radioaktywność mierzono w liczniku studzińkowym (typ USB-2, prod. IBJ). Z kolei przemywano dopełniając probówki do pełna buforem, wirując i wylewając płyn z nad osadu. Po 7-miu przemyciach liczono ponownie pozostałość radioaktywność w probówkach. Procent wychwyty wyliczano ze stosunku:

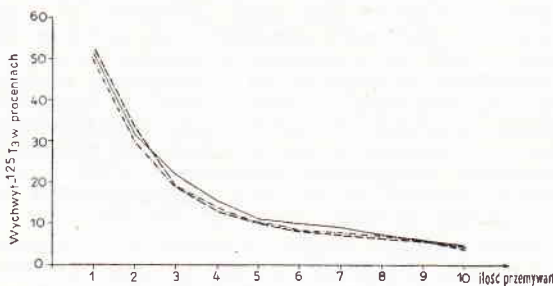
$$\frac{\text{radioaktywność sephadexu po przemyciu}}{\text{radioaktywność wyjściowa}} \times 100$$

Do przemywania używano (z tym samym rezultatem) 0,15 M buforu fosforanowego lub 0,05 M buforu Tris-HCl, (pH 7,4).

Czystość radiochemiczną roztworów oceniano wobec standardów przy pomocy chromatografii wstępnej, na bibule (Whatman Nr 3) w solwencie n-butanol : kw. octowy lodowaty : woda — wg Grossa (1).

Wyniki

Ryc. 1 ilustruje zależność stopnia wychwyty— T_3 od ilości wirowań. Wskazuje on, że już pierwsze przemycie mieszaniny Sephadexu z surowicą obniża radioaktywność wyjściową do połowy. Po trzech wirowaniach pozostaje za-



Rys 1 Wpływ ilości przemywań na stopień związania (%) znaczonej trójiodotyroniny ^{125}I przez Sephadex

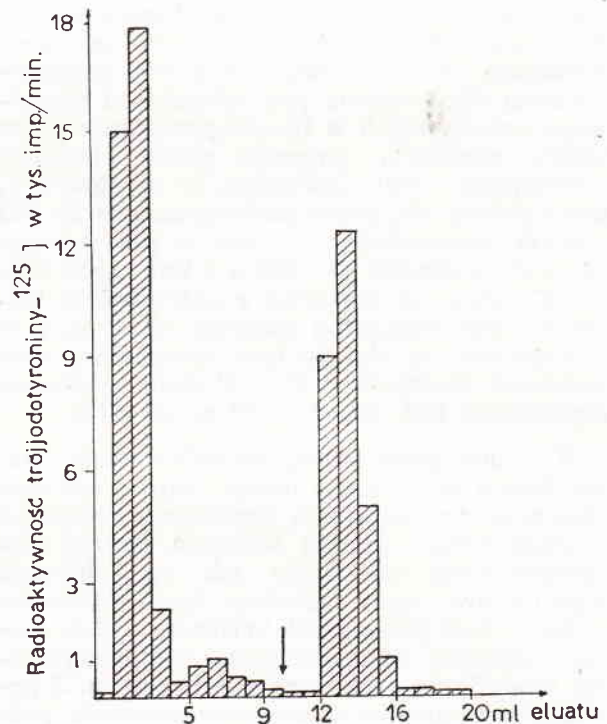
*) Jod- ^{125}I , o półokresie trwania 60 dni, rozpada się w procesie zwanym wychwytem elektronu, któremu towarzyszy emisja niskoenergetycznego promieniowania X. Promieniowanie ^{125}I ma słaby efekt radiolityczny, w związku z tym stopień rozłożenia znaczonej trójiodotyroniny jest wielokrotnie mniejszy w porównaniu z rozkładem trójiodotyroniny ^{131}I .

ledwie 21% radioaktywności wyjściowej. Kolejne przemywania „wypłukują” trójiodotyroninę nadal, chociaż w znacznie mniejszym stopniu. Dlatego rezultat po 7 wirowaniach przyjęty w niniejszej pracy jako reprezentatywny, mimo że przypada na tę część krzywej, która charakteryzuje się najmniejszym spadkiem (najmniejszą zależnością od przemywania), ma charakter arbitralny.

Tab. 1. Wychwyty trójiodotyroniny- ^{125}I przez dekstran (Sephadex G-25) u różnych gatunków zwierząt, *in vitro*

Gatunek	Ilość zwierząt	Srednia arytmetyczna	Zakres	Błąd średniej arytmetycznej	Odchylenie standardowe
Krowa	20	10,3	7,3 — 12,9	0,34	1,54
Ciełę	12	12,7	10,7 — 14,1	0,30	1,04
Owca	10	10,9	8,8 — 12,9	0,50	1,59
Świnia	12	10,5	9,8 — 12,0	0,27	0,93
Królik	8	17,7	16,1 — 21,6	0,77	2,18
Kura	7	17,3	15,6 — 20,6	0,75	2,00
Lis (piesak)	6	15,8	14,0 — 18,0	0,65	1,61
Świnia morska	12	27,2	25,1 — 30,1	0,44	1,53

W czasie przemywania buforem, wypłukaniu ulega w pierwszej kolejności trójiodotyronina związana z białkiem plazmy, z kolei jod

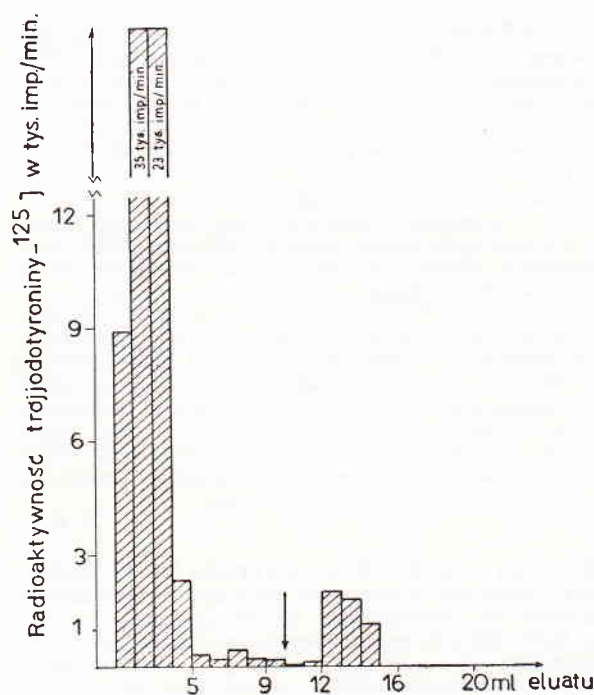


Rys. 2

Ryc. 2. Rozdział radioaktywnej trójiodotyroniny- ^{125}I (^{125}I w 1% albuminie) na kolumnie z Sephadexem G-25; bufor fosforanowy, pH 7,4. Od punktu oznaczonego strzałką eluowano 1 ml surowicy i buforem. Frakcja 1 do 5 — ^{125}I związana z albuminą; frakcja 5 do 9 — jodek nieorganiczny, ^{125}I ; frakcja 12 do 16 — wolna, niezwiązana ^{125}I .

nieorganiczny, natomiast radioaktywność związana przez Sephadex reprezentowana jest przez trójjodotyroninę. Ilustruje to przejrzyste wyniki analizy przedstawiony na ryc. 2 i 3. Dla potrzeb tej analizy przemywań dokonano nie w próbkach wirówkowych, lecz w rurce zatkaanej z jednej strony watą szklaną. Bufor, którym eluowano surowicę zbierano w sposób ciągły, we frakcjach 1 mililitrowych. Pozostałą na Sephadexie radioaktywność wymywano przy pomocy 1 ml nieradioaktywnej surowicy i buforu.

W pierwszym przypadku (ryc. 2) eluowano z sephadexu roztwór trójjodotyroniny— ^{125}J w 1% albuminie. Ryc. 3 przedstawia wyniki eluowania z Sephadexu $^{125}\text{T}_3$ w surowicy. Ponieważ powinowactwo albuminy do trójjodotyroniny jest znacznie mniejsze aniżeli TBG i pozostałych białek surowicy, radioaktywność frakcji Sephadexowej (12 do 16 ml) jest wyższa w przypadku albumin (ryc. 1) a niższa w przypadku eluowania surowicy (ryc. 3).



Rys.3

Ryc. 3. Rozdział radioaktywnej trójjodotyroniny- ^{125}J ($^{125}\text{T}_3$ w surowicy krwi) na kolumnie z Sephadexem G-25; bufor fosforanowy, pH 7,4. Od punktu oznaczonego strzałką eluowano 1 ml surowicy i buforem. Frakcje jak na ryc. 2.

W pracy nie zaobserwowano uchwytanych różnic w wychwytcie w zależności od płci badanych zwierząt (być może z uwagi na ich niewielką liczbę), dlatego różnice gatunkowe w powinowactwie białek surowicy do trójjodotyroniny zestawiono w tabeli bez uwzględniania płci. Uzyskane wartości wskazują, że powinowactwo białka surowicy różni się w zależności od gatunku. Dorosłe krowy, owce i świny wykazują średni wychwyty bardzo zbliżony,

wynoszący 10—11%; kury i króliki o około 70%, a świnki morskie ponad 2,5 razy wyższy od dużych zwierząt gospodarskich. Cielęta w wieku 3—4 tygodni miały wychwyty wyższe od obserwowanego u krów ($P < 0.001$). Wychwyty u ryb (karp $n = 5$, nie umieszczony w tabeli) był niższy jedynie od obserwowanego u świnek morskich i wynosił $21,1 \pm 0,60$.

Przechowywanie surowicy w temperaturze około 1°C przez okres dwóch tygodni, nie miało wpływu na wartość wychwyty.

Omówienie wyników

Z przeprowadzonych obserwacji wynika, że dodanie Sephadexu do surowicy zawierającej trójjodotyroninę, wiąże dostępny, wolny hormon. Stopień wychwyty zależy od właściwości wiążących białek (ryc. 2 i 3), dlatego też wychwyty T_3 przez Sephadex może być wykorzystany dla mierzenia względnej siły wiązania hormonu przez białka surowicy u różnych gatunków.

Różnice w powinowactwie białek plazmy do trójjodotyroniny pozwalają na uszeregowanie gatunków:

krowa < świnia < owca < cielę < piesak < kura < królik

Szereg ten, podobny jest do obserwowanego uprzednio uzyskanego na drodze pomiaru wychwyty trójjodotyroniny przez erythrocyty (9): owca < koza < cielę < prosię < kura < królik

Należy podkreślić, że wychwyty T_3 , czy to przez erythrocyty czy też przez Sephadex, jest miarą nie tylko gatunkowych różnic w powinowactwie białek surowicy do hormonu, lecz także miarą aktualnego stanu czynności tarczycy, tzn. zależy od poziomu krążącego hormonu w krwi. Tym tłumaczy się obserwowane w niniejszej pracy zjawisko, że w obrębie tego samego gatunku (krowa) zwierzęta młode mają wyższy wskaźnik wychwyty. Przypuszczalnie także odmienna gatunkowo pozycja świni, w szeregu podanym dla wychwyty T_3 przez erythrocyty w porównaniu z podobnym szeregiem wynikłym z analizy prowadzonej przy użyciu Sephadex, może być częściowo tłumaczona różnicą wieku badanych zwierząt. Wymaga to jednak dodatkowych badań, ponieważ podobieństwo we względnym powinowactwie białka surowicy jakie daje się zaobserwować w szeregu gatunków, porównując wychwyty przez erythrocyty i Sephadex, wskazuje jednocześnie na istnienie różnic. Tak więc gdy wychwyty Sephadexu jest zaledwie o 70% wyższy u kur czy królików w porównaniu z dorosłymi zwierzętami gospodarskimi, wychwyty erythrocytarny jest 3 razy większy. Wychwyty Sephadexu nie oddaje więc tych wszystkich właściwości białka krwi, które wykrywa się testem Hamol-skiego. Oczywiście jest jednakże to, że różnice

nie dotyczą tych właściwości białek, które decydują o przydatności analizy opartej na Sephadexie dla klinicznej oceny czynności tarczycy. Przeciwnie, opublikowane dane wskazują na większą wartość diagnostyczną wychwytu T_3 z użyciem Sephadexu (4, 5).

Wnioski

1. Sephadex wykazuje zdolność wiązania (wychwytu) wolnej trójiodotyroniny i w ustalonych warunkach pomiaru może być użyty dla wykazania gatunkowych różnic w powinowactwie białka surowicy do hormonów tarczycy.

2. Wychwyt trójiodotyroniny przez Sephadex zależy od fizjologicznego stanu zwierzęcia (wiek).

3. Zastosowanie wychwytu T_3 *in vitro*, jako diagnostycznego wskaźnika czynności tarczycy, winno być połączone ze standaryzacją testu, uwzględniającą właściwości gatunkowe białek surowicy i fizjologiczną zmienność aktywności tarczycy.

Autorzy składają serdeczne podziękowanie tech.-med. p. Alicji Wincenciak za pomoc techniczną przy doświadczeniach.

Piśmiennictwo

1. Gross J.: Brit. med. Bull. 10, 218, 1954.
2. Hamolsky M. W.: J. clin. Invest. 34, 914, 1955.
3. Hamolsky M. W., Stein M., Freedberg A. S.: J. clin. Endocr. Metab. 17, 33, 1957.
4. Hansen H.: Scand. J. clin. Lab. Invest. 18, 240, 1966.
5. Shapiro B., Rabinowitz J. L.: J. nucl. Med. 3, 417, 1962.
6. Sterling K., Tabachnick M.: J. clin. Endocr. Metab. 21, 456, 1961.
7. Słobodziński A.: Res. Vet. Sci. 6, 207, 1965.
8. Słobodziński A.: Endokr. Polska, 1, 25, 1962.
9. Słobodziński A.: Nature, 199, 75, 1963.
10. Słobodziński A.: Endokr. Polska, 15, 521, 1964.
11. Słobodziński A.: Endokr. Polska, 15, 673, 1964.
12. Słobodziński A.: Post. Hig. i Med. Dośw. 20, 503, 1966.
13. Woltring M. G., Bakker A., Doorenbos H.: Acta endocr., Copenh. 37, 607, 1961.

Adres autora: Andrzej Słobodziński, Kraków, Al. Mickiewicza 24/28. Zakład Fizjologii Zwierząt IZ.

Слєбодзиньски А., Ястшембски М. — Связывание три-иод-тиронина — ^{125}J препаратом „Sephadex” (in vitro) как индикатор активности щитовидной железы и средства сыворотки крови с гормонами этой железы.

Исследовали связывание три-иод-тиронина- ^{125}J препаратом „Sephadex G-25” (in vitro). В стабилизированных условиях измерения установили что сыворотки взрослых коров, овец и свиней оказывают родственные свойства. Сила связывания сывороток крови других исследованных видов животных позволяет установить следующую очередность активности:

КОРОВЫ
СВИНЬИ < ТЕЛЯТА < КУРЫ
ОВЦЫ < КРОЛИКИ < РЫБЫ < МОРСКИЕ СВИНКИ

Активность связывания три-иод-тиронина- ^{125}J сыворотками крови молодых животных является более сильной что отвечает более высокой активности их щитовидной железы. Работа указывает, что стандартизация теста для диагностических целей должна учитывать видовые свойства сыворотки крови и физиологическое непостоянство активности щитовидной железы.

Słobodziński A., Jastrzębski M. Binding of triiodothyronine by Sephadex in vitro as an index of thyroid gland activity and affinity of serum proteins to thyroid hormones.

In order to compare the affinity of serum protein of different animal species to thyroid hormones there were carried out measurements on the uptake of triiodothyronine- ^{125}J by Sephadex G-25 (in vitro). It was found that sera of adult cows, sheep and pigs revealed almost the same characteristics. Sera of other examined animals showed a lower binding force. On the evidence of results there was estimated the following sequence:

COWS
PIGS < CALVES < HENS
SHEEP < RABBITS < FISH < GUINEA-PIGS

The greater uptake was observed in young animals. It was related with the increased activity of thyroid gland. The standardization of the test for the diagnostic purpose must take into account the species properties of blood protein and physiological alterations in the activity of thyroid gland.

NAKAMURA R. M., EASTREDAY B. C. Badania nad influencją świń. III. Namnażanie wirusa influenzy świń w eksplantatach tkanek układu oddechowego płodów świni. (Studies on swine influenza. III. Propagation of swine influenza virus in explants of respiratory tract tissues from fetal pigs). Cornell Vet., 60, 27—35, 1970 (1).

Eksplantaty tkanek układu oddechowego płodów prosięcia (tchawica, nabłonek jamy nosowej, płuca) umożliwiają namnożenie wirusa influenzy świń (SI). Eksplantaty hodowano na podłożu Parkera 199 z dodatkiem dwuwęglanu (pH 7,0—7,2), penicyliny i streptomycyny i 5% surowicy świń zdrowych. W niektórych przypadkach dodawano surowicę odpornościową o mianie HI 1:640. Maksymalne stężenie wirusa w płynie hodowlanym uzyskano 1—3 dnia po zakażeniu, następnie miano spadło 5 dnia po zakażeniu i utrzymywało się na stałym poziomie przez okres około 20 dni. Dodatek surowicy odpornościowej swoistej do podłoża hodowlanego na 4 godziny przed lub po zakażeniu hamował rozwój wirusa.

Z. G.

TAKATORI I., HUHN R. G., SWITZER W. P.: Stwierdzenie obecności przeciwciał wiążących dopełniacz swoistych dla Mycoplasma hyopneumoniae w surowicy świń chorych na enzootyczne zapalenie płuc. (Demonstration of complement-fixing antibody against Mycoplasma hyopneumoniae in the sera of pigs infected with swine enzootic pneumonia). Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., 8, 195—204, 1968 (4).

Badania przeprowadzono na 7 prosiątach w wieku 8 tygodni które zakażono donosowo zawieszoną płuc prosiąt zakażonych Mycoplasma hyopneumoniae. Prosięta zakażano trzykrotnie w odstępach 2—3 dniowych. Ponadto do badań włączono 6 prosiąt zakażonych donosowo płynną hodowlą M. hyopneumoniae (2—5 ml, trzykrotnie co 3 dni). Przeciwciała wiążące dopełniacz swoiste dla M. hyopneumoniae pojawiły się we krwi prosiąt 2—3 tygodnie po zakażeniu. Miano przeciwciał wzrastało do 9 tygodnia po zakażeniu. Surowice reagujące dodatnio z antygenami sporządzonymi z M. hyopneumoniae nie reagowały w odczynie wiązania dopełniacza z antygenami M. hyorhinis i M. granularum. Antygen M. hyopneumoniae stosowany do odczynu wiązania dopełniacza był ciepło i trypsynoporny i występował we frakcji rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej w eterze.

Z. G.