

SLUŽBA ZA NUKLEARNU MEDICINU MEDICINSKOG CENTRA ZAJEČAR
RADIOIZOTOPSKA LABORATORIJA INSTITUTA »BORIS KIDRIČ«, VINČA

ODREĐJIVANJE KONCENTRACIJE ENDOGENOG THYROTROPIN- RELEASING HORMONA U PLAZMI ZDRAVIH OSOBA I TIREOIDNIH BOLESNIKA

Paunković N., Miladinović J., Albahari S.

UVOD

Podaci iz literature o rezultatima određivanja endogenog TRH su vrlo kontradiktorni. Neki autori nalaze da je endogeni TRH detektabilan u eutireoidnih osoba, nizak (suprimiran) kod hipertireoza a visok kod primarne hipotireoze (1,5). Na suprot njima drugi nalaze da je TRH povišen kod hipertireoze a snižen kod primarne hipotireoze (3), dok treći ne nalaze nikakve razlike u koncentraciji TRH između eutireoidnih osoba i bolesnika sa hiper i hipotireozom (4) kao ni na eksperimentalnom modelu (6). Najzad, podaci iz vrlo svežeg saopštenja govore da je TRH ispod granice detektabilnosti, doduše određivan samo u eutireoidnih osoba (2).

Zbog postojanja ovako kontraverznih podataka, mi smo pokušali da radioimunološkim metodom detektujemo endogeni TRH u eutireoidnih osoba i bolesnika sa tireoidnim disfunkcijama.

MATERIJAL I METODE

Reagensi za određivanje TRH pripremljeni su u Institutu »Boris Kidrič« - Vinča. Antitela su dobijena imunizacijom zeševa sintetskim TRH vezanim na govedji serum albumin. Obeležavanje TRH vršeno je hloramin T metodom. Kao sekundarna antitela korišćen je anti zečji gama globulin kože (INEP – Zemun). Za rekonstrukciju liofiliziranih reagenasa korišćen je PBS pufer.

Za određivanje TRH korišćena je metoda Mitsume (5). Uzorci venske krvi su uzimani u predhodno hladjene staklene epruvete koje sadrže inkubacionu mešavinu: 0,1 ml 10% EDTA; 0,5 ml 8-hydroxiquinolina (HQ) i 10 ml Tween 20 (T), na svaki mililitar uzete krvi. Plazma je odvajana neposrednim centrifugovanjem na hladno i odmah vršena ekstrakcija hladnim metanolom (Merck) i uparavanje ekstrakta u struji vazduha na temperaturi od 60°C. Rekonstrukcija uzorka vršena je rastvaranjem suvog ostatka u 1 ml pufera (PBS).

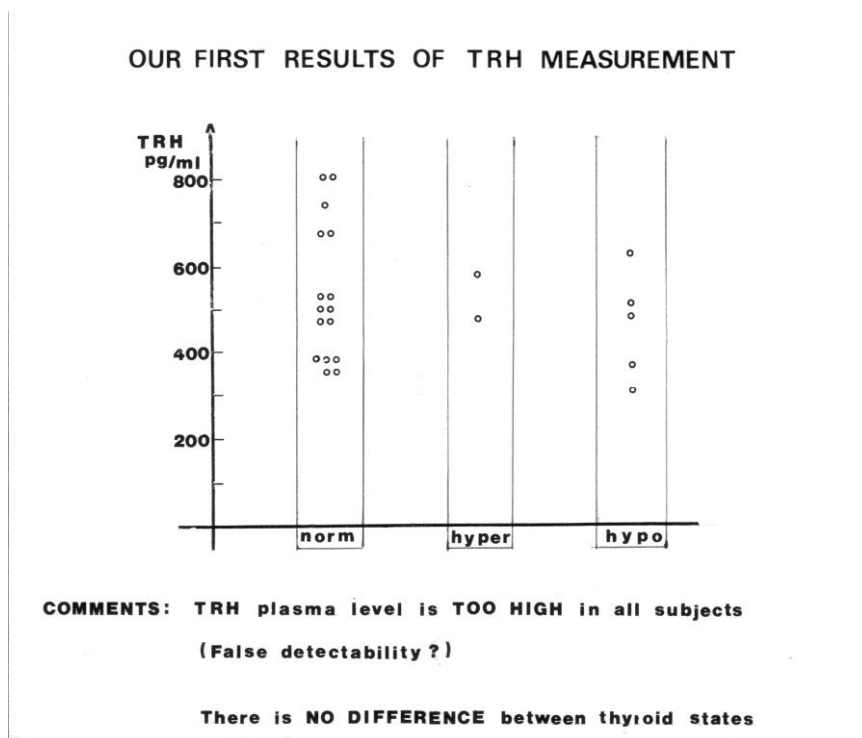
Radioimunološko određivanje se započinje postavljanjem RIA sistema, oko 18h na 4°C. Separacija imunih kompleksa je obavljena dodavanjem smeše sekundarna antitela – 10% PEG, i posle druge inkubacije (1h na 4°C) dovršena centrifugovanjem i aspiracijom supernatanta. Standardna kriva je konstruisana testiranjem pripremljenih standarda sintetskog TRH. Karakteristike metode bile su: osetljivost 20 pg/ml, preciznost 3% (intraassay varijabilnost) i reproducibilnost 8% (interassay varijabilnost).

Opisanim postupkom ispitano je: 15 eutireoidnih osoba, 2 bolesnika sa nelečenom Bazedovljevom bolešću i 5 bolesnika sa nesupstituisanom primarnom hipotireozom. Zbog nezadovoljavajućih rezultata (grafikon 1), izvršili smo proveu i modifikaciju metode (tabele 1 i

2). Ovako modifikovana metoda primenjena je kod 5 eutireoidnih osoba, 5 bolesnika sa hipertireozom, 6 sa primarnom i 2 sa pituitarnom hipotireozom (grafikon 2). U jedne eutireoidne osobe pokušana je stimulacija endogenog TRH metoclopramidom. U pet eutireoidnih osoba vršena je detekcija intravenski aplikovanih malih količina sintetskog TRH (grafikon 3).

REZULTATI

Rezultati prvog ispitivanja opisanom metodom prikazani su na grafikonu 1. Oni su pokazali da nema razlike u koncentraciji TRH kod osoba sa eutireozom, ili bolesnika od hiper ili hipotireoze. Sem toga, bili su nešto viši nego što ih navodi većina autora.



Graf 1.

Započeli smo analizu uzroka ovakvih nalaza. Pošto je RIA postupkom dobijena dobra standardna kriva, testirane su pojedine faze manipulacije sa uzorcima plazme (ekstrakcija metanolom, dodavanje inhibicione mešavine). Rezultati su prikazani na tabeli 1.

Tabela 1 TESTIRANJE UZROKA LAŽNE DETEKTABILNOSTI TRH

Plazma bez TRH i bez HQT smeše	Detektovano 350 pg/ml »TRH« ??
Plazma bez TRH sa HGT smešom	Detektovano 540 pg/ml »TRH« ?!

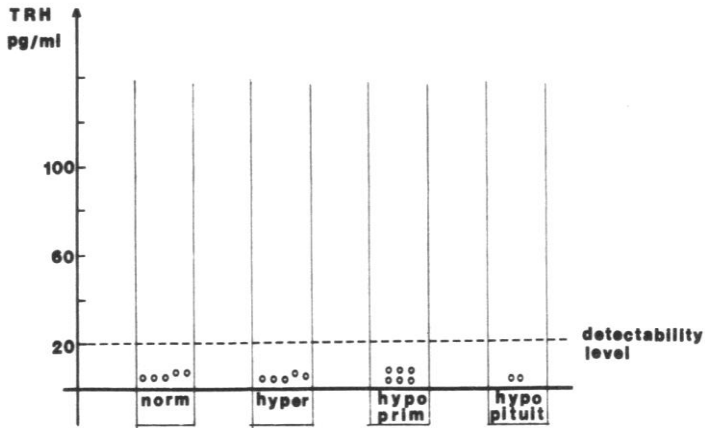
Izvršena je zamena metanola za ekstrakciju (isti proizvođač, nova boca). U obnovljenom određivanju, u plazmi bez TRH i bez HQT sada nema detektovanog TRH. Kada se doda HQT detektuje se ali na nivou od 350 pg/ml.

Izvršeno je određivanje bez dodatka Tween 20 (T) inhibicionoj smeši. U plazmi bez TRH sada nema lažno detektovanog TRH.

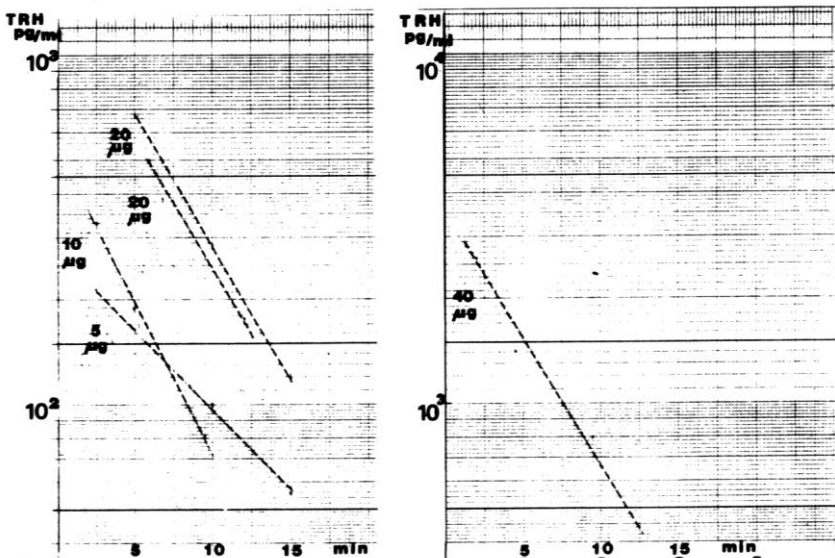
Provereno je da li se bez Tween 20 može zadovoljavajuće da blokira degradacija TRH (tab. 2).

Tabela 2 DOKAZ DA JE 8-HQ (BEZ TWEN 20) DOVOLJAN ZA INHIBICIJU DEGRADACIJE TRH U PLAZMI

Plazma bez TRH (EDTA, HQ)	Dodato 50 pg/ml TRH. Detektovano $70 \pm 2\%$
Ista plazma	Dodato 200 pg/ml TRH. Detektovano $84 \pm 4\%$



Graf. 2 — Naši definitivni rezultati radioimunološkog određivanja TRH u plazmi



Graf. 3 — Radioimunološko određivanje sintetskog TRH u plazmi

Ovako modifikovanim postupkom pripremanja uzoraka plazme izvršeno je određivanje endogenog TRH u drugoj grupi ispitanika (grafikon 2).

Pokušana je stimulacija endogenog TRH intravenskom aplikacijom 20 mg metoclopramida (Reglan). Nije detektovan TRH ni u bazalnom uzorku ni u plazmi uzetoj 5 i 30 min nakon aplikacije.

Povera RIA sistema za određivanje koncentracije TRH u plazmi in vivo, izvršena je injiciranjem malih količina sintetskog TRH (5 do 40 mcg) grupi od 5 zdravih dobrovoljaca. Rezultati određivanja prikazani su na grafikonu 3.

DISKUSIJA

Na ideju da se najčešće korišćenim postupkom određivanja endogenog TRH (1,3,5) verovatno detektuje i neki produkt koji nije TRH došli smo nakon pažljivog analiziranja podataka iz literature. Podatak da se koncentracija TRH u plazmi ne smanjuje posle inkubacije plazme bez enzimskih inhibitora na 37°C (3) sa velikom verovatnoćom potvrđuje ovakvo razmišljanje. Na tu ideju su došli i drugi (4). Rezultati našeg prvog testiranja endogenog TRH (grafikon 1) u plazmi potvrdili su ovu sumnju (mada smo i mi mogli da ih interpretiramo slično nekim nalazima iz literature: »TRH u plazmi je detektabilan i bez razlike je kod eutireoze i hiper i hipo stanja«). Kako smo uvek dobijali kvalitetnu standardnu krivu (sintetski TRH za krivu rastvoren je u puferu) to smo uzrok lažnoj detektabilnosti endogenog TRH tražili u postupcima kojima se tretira plazma (ekstrakcija, dodavanje inhibicione mešavine). Pokazali smo da je uzrok lažnoj detektabilnosti TRH u plazmi bez TRH kod nas bio dvostruk: poticao je od nečistoća u metanolu korišćenom za ekstrakciju i od Tween 20 iz inhibicione smeše. Oba uzroka smo otklonili – zamenom metanola i izbacivanjem Tween, pošto smo predhodno pokazali da se i bez njega vrši zadovoljavajuća inhibicija razgradnje TRH u plazmi (uzimanje krvi sa EDTA i 8-HQ). Senzitivnost metode i dalje je dobra (20 pg/ml, ako se uzorak plazme dvostruko koncentriše detektuje se 10 pg).

Ovako modifikovana metoda primenjena je za određivanje endogenog TRH. Nismo uspeli da registrujemo detektabilnu koncentraciju u plazmi pet eutireoidnih osoba, pet bolesnika sa nelečenom Bazedovljevom bolešću, šest bolesnika sa nesupstituisanom primarnom, kao ni dva sa pituitarnom hipotireozom. Pokušali smo kod jednog zdravog dobrovoljca da postignemo stimulaciju otpuštanja endogenog TRH primenom veće doze dopaminskog blokera metoklopramida – bez efekta.

RIA sistem za detekciju TRH u plazmi proverili smo intravenskom aplikacijom malih količina (5 do 40 mcg) sintetskog TRH petorici zdravih dobrovoljaca. Nakon aplikacije TRH, našim modifikovanim postupkom, detektovane su odgovarajuće koncentracije TRH u plazmi (250 do 3.000 pg/ml nakon 2 minuta od aplikacije) koje su se eksponencijalno smanjivale sa poluvremenom od 4-5 minuta. Distribucioni volumen TRH izračunat iz ovih krivulja njegovog iščezavanja iz cirkulacije iznosio je između 15 i 20 litara. U uzorcima plazme koje smo istovremeno uzeli bez enzimskog inhibitora (bez HQ) došlo je posle 3 časa na 37°C do iščezavanja detektabilnih količina TRH (oko 10% je preostalo kod najviših koncentracija, što potvrđuje da je određivan samo TRH).

Rezultati koje smo izneli govore da u plazmi periferne krvi ljudi ne može da se detektuje endogeni »thyrotropin-releasing hormone«. U toku manipulacije sa uzorcima plazme u kojima se vrši određivanje, može da dodje do nastanka raznih produkata koji reaguju sa anti-TRH antitelima, pa da se detektuju kao »TRH«. Mi smo na neke od uzroka ove lažne detektabilnosti ukazali.

LITERATURA

- 1 Guignier F., Pelletier J.L., Touzery C. et al. Thyrotropin releasing hormone radioimmunoassay in human serum and its application in thyroidal pathology. *Europ J Nucl Med* 6:73-78,1981.
- 2 Iversen E. Thyrotropin releasing hormone can not be detected in plasma from normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 63:516-519,1986.
- 3 Lombardi G., Panza N., Cei S., et al. Radioimmunoassay of Thyrotropin releasing hormon (TRH) in normal subjects, in abnormal thyroid states and under catecholaminic influences. *Acta Endocriol* 87:70-79,1978.
- 4 Mallik T., Wilber J., Pegues J. Measurement of Thyrotropin releasing hormone like material in human peripheral blood by affinity chromatography and radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 54:1194-1198,1982.
- 5 Mitsuma T., Hirooka Y., Nihei N. Radioimmunoassay of Thyrotropin releasing hormon in juman serum and its clinical applicatiom. *Acta Endocriol* 83:225-235,1976.
- 6 Montoya E., Seibel M., Wilber J. Thyrotropin releasing hormone secretory physiology: Studies by radioimmunoassay and affinity chromatography. *Endocrinology* 96:1413-1418,1985.

Radiol Jugosl 22(3):257-260,1988.

Annual Meeting of EANM, Budapest, 1987.