

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

DEGRADACIJA SINTETSKOG THYROTROPIN-RELEASING HORMONA U KRVI LJUDI IN VIVO I IN VITRO

Paunković N., Miladinović J., Albahari S.

UVOD

Podaci da se endogeni »thyrotropin-releasing hormone« (TRH) može detektovati u plazmi periferne krvi ljudi (2,5,7) nagoveštavali su da će se asortiman metoda za ispitivanje hipotalamo-hipofizo-tireoidne osovine uskoro dopuniti i direktnim određivanjem koncentracije TRH. Međutim, protivrečni izveštaji o vrednostima ovog hormona u cirkulaciji bolesnika sa poremećenom tireoidnom funkcijom (6,7,8) naveli su nas da pre kliničke primene proverimo metodu za radioimunološko određivanje TRH. Naša ispitivanja su pokazala da se u plazmi periferne krvi ljudi, kako zdravih tako i onih sa tireoidnim disfunkcijama, ne može da detektuje TRH, a da su rezultati koje su saopštili neki autori verovatno artefakti (9,10).

U ovom radu smo radioimunološki test za TRH koristili za izučavanje nekih metodoloških i metaboličkih aspekata koji se odnose na enzimsku degradaciju sintetskog TRH u krvi ljudi.

MATERIJAL I METODE

Koristili smo specifičan i osetljiv radioimunološki test koji je razvijen u Institutu »Boris Kidrič« u Vinči (S.Albahari). Njegove karakteristike smo naveli predhodno (10). Uzorci plazme za određivanje TRH dobijaju se uzimanjem venske krvi u ohladjene epruvete koje sadrže mešavinu koja inhibira enzimsku degradaciju TRH. Ova inhibiciona mešavina se sastoji od EDTA, 8-hydroxi quinolina (8-HQ) i Tween 20 (7). Mi smo iz nje izbacili Tween 20 za koji smo dokazali da je uzrok lažne detektabilnosti TRH (10).

U ovom radu smo ispitivali: 1) Pouzdanost i trajnost inhibicije enzimske degradacije TRH u ljudi našim modifikovanim postupkom (bez Tween 20); 2) Merenje brzine degradacije sintetskog TRH u cirkulaciji eutireoidnih osoba; 3) Merenje brzine degradacije sintetskog TRH u krvi eutireoidnih osoba »in vitro«; i 4) Procese navedene pod (2) i (3) kod bolesnika sa promenjenom funkcijom štitaste žlezde.

REZULTATI

1. Testiranje pouzdanosti enzimske inhibicije

Inhibiciona mešavina (EDTA, 8-HQ,T) dugotrajno inhibira degradaciju TRH u plazmi (7). Mi smo sada iz nje izbacili T (Tween 20), jer smo našli da je uzrok lažnoj detektabilnosti TRH. Da bismo ispitili da li je za tu namenu dovoljan samo 8-HQ uz dotatak antikoagulantnog sredstva EDTA, izveli smo sledeća ispitivanja:

a) »Recovery« test: u plazmi koja ne sadrži TRH rastvorili smo sintetski TRH uz dodatak EDTA i 8-HQ i određivali dodate količine. Rezultate testa smo prikazali na tabeli 1.

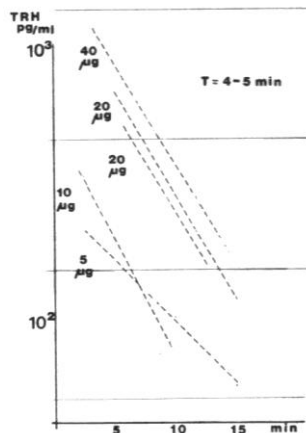
Tabela 1 VREDNOSTI "RECOVERY TESTA"

Broj uzoraka	dodato TRH pg/ml	dokazano TRH %
5	50	70±2
5	200	84±4
2	800	94±5

b) Ispitivanje konstantnosti koncentracije TRH, na sledeći način: šestorici zdravih dobrovoljaca ubrizgali smo intravenski male količine (5 do 20 mcg) sintetskog TRH (Berlin Chemie). Nakon 5 min od ubrizgavanja iz vene druge ruke smo uzeli uzorak krvi i od njega po 5 ml usuli u dve staklene epruvete sa inhibicionom mešavinom (0,1 ml 10% EDTA i 0,5 mg 8-HQ na 1 ml krvi). Iz jedne epruvete smo predhodno opisanim postupkom (10), odmah pripremili uzorak za određivanje TRH. Drugu smo stavili u termostat na 37°C, uz povremeno mešanje. Uzorak iz nje smo pripremili posle 3h. Iz oba uzorka istovremeno je određivana koncentracija TRH (tabela 2).

Tabela 2 REZULTATI ODREĐJIVANJA KONCENTRACIJE TRH NA 37 ° UZ ENZIMSKU INHIBICIJU BEZ TWEEN 20

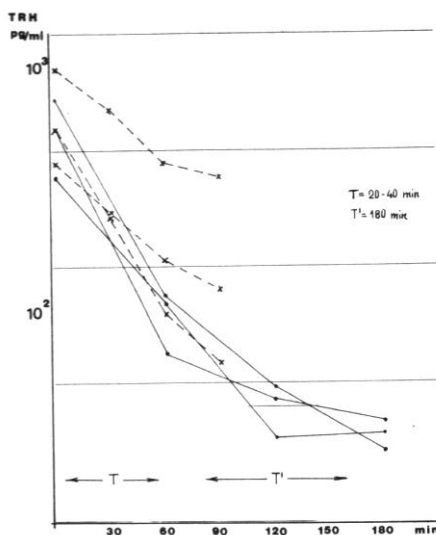
Redni broj	I uzorak (0h) TRH pg/ml	II uzorak (3h) TRH pg/ml
1	970	975
2	724	746
3	554	535
4	549	536
5	353	373
6	187	209
sr. vred.	556	562
st. dev.	275	271



Grafikon 1 — Degradacija sintetskog TRH u perifernoj cirkulaciji eutireoidnih osoba

2. Degradacija TRH u perifernoj cirkulaciji eutireoidnih osoba ispitana je postupkom: grupi od 5 zdravih dobrovoljaca intravenski su ubrizgane male količine (4 do 40 mcg) sintetskog TRH. Uzorci su uzimani iz vene druge ruke nakon 2 min, i dalje na po 5 min, ukupno četiri puta, u epruvete sa inhibicionom mešavinom (EDTA, 8-HQ). Opisanim postupkom iz njih su određene koncentracije TRH (grafikon 1).

3. Degradacija TRH u krvi eutireoidnih osoba »in vitro«. Metod: Grupi od šest zdravih ispitanika (ispitivanje korišćeno istovremeno i za podatke predstavljene na tabeli 2) ubrizgane su male (5 do 20 mcg) sintetskog TRH. Pet minuta nakon injiciranja iz vene suprotne ruke uzimana je krv i odmah odvajana u staklene epruvete koje sadrže samo EDTA kao antikoagulans (0,1 ml 10% EDTA na 1 ml krvi). Epruvete su stavljane u termostat na 37°C. Enzimska degradacija TRH u krvi in vitro prekidana je dodavanjem 8-HQ (0,5 mg na 1 ml krvi). Ovo je izvedeno kod tri osobe u vremenu od 0 (odmah po uzimanju krvi), 60, 120 i 180 min. a kod druge tri osobe u vremenu od 0, 30, 60 i 90 min. Iz svih uzoraka određene su koncentracije TRH (grafikon 2).



Grafikon 2 — Degradacija sintetskog TRH u krvi eutireoidnih osoba »in vitro«

4. Degradacija TRH u krvi bolesnika sa tireoidnim disfunkcijama (in vivo i in vitro) izučavana je na samo 4 bolesnika (tabela 3).

Tabela 3 POLUVREME RAZGRADNJE SINTETSKOG TRH U KRVI TIREOIDNIH BOLESNIKA (IN VIVO I IN VITRO)

bolesnik, dg	$T_{1/2}$ (in vivo) min	$T_{1/2}$ (in vitro) min
M. Basedowi	4,5	20
M. Basedowi	5,1	40
Hypothy. prim.	4,8	32
Hypothy. prim.	5,0	30

DISKUSIJA

Thyrotropin-releasing hormone je tripeptid koji vrlo brzo nestaje iz periferne krvi delovanjem inhibicionih enzima i metaboličkom degradacijom. Ova razgradnja TRH se vrši i u krvi in vitro pod dejstvom degradacionih enzima (6).

Pomenuta degradacija TRH važna je iz više razloga: a) Ona je uzrok što se, uz znatnu diluciju u distribucionom prostoru, u perifernoj krvi nalaze koncentracije endogenog TRH ispod nivoa detektabilnosti; b) Ovu enzimsku degradaciju neophodno je blokirati kada se želi da pokuša određivanje TRH u cirkulaciji (endogenog ili injiciranog sintetskog); c) Postoji mogućnost da je veličina ove enzimske degradacije različita u krvi ljudi u odnosu na funkciju njihove tireoideje.

Mi smo u predhodnim radovima (9,10) primetili da korišćenje neadekvatne »inhibicione smeše« za blokadu degradacionih enzima dovodi do lažne detektabilnosti TRH. U ovom radu smo detaljnije ispitali našu modifikaciju sastava inhibicione smeše. Našli smo da je u tu svrhu dovoljno enzimsku degradaciju inhibirati dodavanjem EDTA i 8-HQ krvi u kojoj se želi blokada enzima. Ovakva blokada je dugotrajna (najmanje 3h) i kada se ne radi u uslovima niže temperature (čak i na 37°C). Ovom modifikacijom dobili smo pogodan test za određivanje TRH.

ZAKLJUČAK

Ispitivanjem koncentracija sintetskog TRH u krvi ljudi in vivo i in vitro, našli smo da on iz cirkulacije eutireoidnih osoba iščezava brzo, u eksponencijalnom ritmu (poluvreme oko 5 min), a iz krvi in vitro sporije (bieksponencijalno, sa prvim poluvremenom od oko 30 min). Mali broj za sada ispitanih bolesnika ne pokazuje razlike u brzini ove enzimske degradacije TRH kod različitih stanja tireoidne funkcije.

Neki naši nalazi u vreme objavljivanja prvih naših podataka (9) bili su u suprotnosti sa navodima iz literature (2,7). Medjutim, svežija saopštenja (4) kao i radovi prezentirani nedavno na jednom inostranom naučnom skupu (1,3) potvrđuju naša zapažanja o nemogućnosti detekcije endogenog TRH u perifernoj krvi. Podaci o enzimskoj i metaboličkoj degradaciji sintetskog TRH, koju smo izučavali u ovom radu, uglavnom su u saglasnosti sa sličnim, doduše retkim ispitivanjima (4,6).

LITERATURA

- 1 Arancibia S. La technique de perfusion »push-pull« en endocrinologie. *Ann Endocr (Paris)* 48:410-418,1987.
- 2 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.
- 3 Guillaume V., Peyre G., Grino M., et al. Methodes de collection du sang porte hypothalamo-hypophysaire *Ann Endocr (Paris)* 48:407-409,1987.
- 4 Iversen E. Thyrotropin releasing hormone can not be detected in plasma from normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 63:516-519,1986.
- 5 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.
- 6 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.
- 7 Mitsuma T., Hirooka Y., Nihei N. Radioimmunoassay of Thyrotropin releasing hormon in human serum and its clinical application. *Acta Endocriol* 83:225-235,1976.
- 8 Montoya E., Seibel M., Wilber J. Thyrotropin releasing hormone secretory physiology: Studies by radioimmunoassay and affinity chromatography. *Endocrinology* 96:1413-1418,1985.

-
- 9 Paunković N., Miladinović J., Albahari S. Thyrotropin-releasing hormone plasma level in normal subjects and abnormal thyroid states. Europ Nucl Med Congress, Budapest, 1987.
 - 10 Paunković N., Miladinović J., Albahari. Određjivanje koncentracije endogenog thyrotropin-releasing hormona u plazmi zdravih osoba i tireoidnih bolesnika. Radiol Jugosl 22(3):257-260,1988.

Radiol Jugosl 23(1):51-54,1989.