

RADIORECEPTORSKI TEST ZA TSH – PRIPREMA I TESTIRANJE KOMPONENTI

Paunković Džejn, Nebojša Paunković i Kosta Nikolić

Hipertireoza u Graves-ovoj bolesti uzrokovana je hroničnom stimulacijom štitaste žlezde autoantitelima na receptore za TSH na membranama tireocita (TRAb). Ova autoantitela dokazuju se iz krvi obolelih merenjem efekata stimulacije receptora (aktivisanje adenil ciklaze, generacija cAMP) bioassay-ima (1,2). Mogućno ih je dokazati i merenjem njihove kompeticije sa tireotropinom, što je osnova za primenu radioreceptorskog testa, RRA (3,4). Dokazivanje ovih autoantitela receptorskim testom zasniva se na zapažanjima da imunoglobulini iz krvi obolelih od autoimune hipertireoze ometaju vezivanje »obebeženog« TSH na membrane tireocita za razliku od imunoglobulina eutireoidnih osoba (4,5). Međutim, ovu razliku treba shvatiti kvantitativno jer ima izveštaja da i eutireoidni serum ometa vezivanje TSH na tireocitne membrane (6,7). Mada su prvi RRA napravljeni služeći se »sirovim« tireocitnim membranama (3,4), kasnija zapažanja daju prednost radu sa solubilizovanim receptorskim proteinima (8,9). Cilj ovog rada je priprema sopstvenih komponenti za RRA za TSH i njihovo testiranje za primenjivost u dokazivanju TRAb.

MATERIJAL I METOD

Postupak za radioreceptorski test koristi tri komponente: receptorsku frakciju, radiojodirani TSH i neradioaktivnu hormonsku preparaciju.

Receptorska preparacija dobijana je iz štitnjača tek zaklanih svinja. Postupak za dobijanje »sirovih« membrana tireocita razradili smo pre nekoliko godina (10).

Bovini TSH (ICN, USA) radiojodiran je metodom laktoperoksidaze (S.Savin, INEP) ili modifikovanim postupkom hloraminom T (11). Receptorska purifikacija vršena je na sirovim tireocitnim membranama svinja. Obično smo koristili količinu sirovih membrana koja sadrži 50 do 100 mg proteina i dodavali bTSH (¹²⁵I) aktivnosti od 25 do 50 miliona imp/min. Vezivanje je vršeno inkubiranjem na 37°C uz kontinuirano mešanje. Posle centrifugovanja i ispiranja vršena je elucija receptorski vezanog TSH u visokomolarnom elektrolitskom ratsvoru.

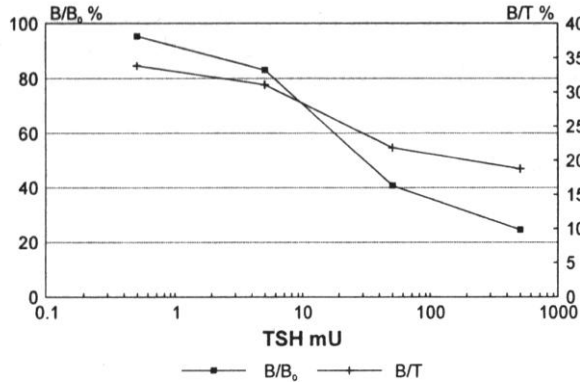
Za neradioaktivnu hormonsku preparaciju koristili smo komercijalni preparat delimično prečišćenog tireotropina (Ambinon, Organon). Podesne dilucije vršene su radnim puferom (TRIS HCl, pH 7,4). U slučaju kada se testira inhibitorno delovanje seruma pacijenta korišćen je serum dobijen na uobičajeni način.

Radioreceptorski test izvodjen je na sledeći način: sve tri komponente u ekvivolumskim odnosima (po 0,1 ml) činile su inkubacionu smešu koja je inkubirana 1h na 37°C uz kontinuirano mešanje. Po završetku inkubacije vezane komponente su taložene centrifugovanjem na 15.000xg, aspiriran je supernatant i merena radioaktivnost precipitata.

Izračunavani su sledeći parametri: nespecifično vezivanje (NSB), gde je vršena maksimalna inhibicija vezivanja TSH* koncentrovanim rastvorom Ambinona (1.000 IJ po epruveti); maksimalno specifično vezivanje (SB max) gde je umesto neradioaktivne inhibicione komponente stavljan samo radni pufer; konstruisana je »inhibiciona krivulja« dilucijama Ambinona i registrovana je inhibicija vezivanja TSH* serumom eutireoidnih osoba (SBeu).

REZULTATI

Na grafikonu 1. prikazane su vrednosti za NSB (10 eksperimenata), maksimalno specifično vezivanje (SB max) radiojodiranog ali receptorski neprečišćenog TSH (TSH*) (3 eksperimenata), SB max receptorski purifikovanog »obeležnog« TSH (RP TSH*) (12 eksperimenata) i specifično vezivanje RP TSH* u eutireoidnom serumu (SB eu) (7 eksperimenata).

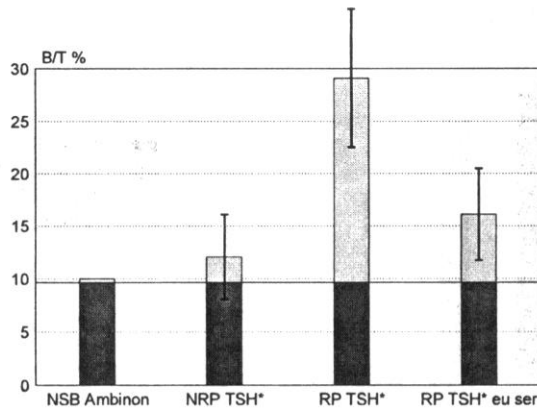


Grafikon 1. . Vezivanje "obeležnog" TSH pri promenljivim količinama neradioaktivnog TSH

B - vezan ¹²⁵I TSH

*B*₀ - vezan ¹²⁵I TSH bez inhibicije neobeležnim TSH

T - ukupno dodat ¹²⁵I TSH



Grafikon 2. Uticaj receptorske purifikacije "obeležnog" TSH na specifično vezivanje na receptore

B/T - vezan / ukupni

NSB - nespecifično vezan

NRP - receptorski neprečišćen

RP - receptorski prečišćen

Na grafikonu 2. prikazana je krivulja inhibicije vezivanja RP TSH* neradioaktivnim bTSH koji je korišćen za obeležavanje (Bovine Thyrotropin, ICN) (srednje vrednosti 3 eksperimenta). Procenti inhibicije izraženi su kao vezivanje u odnosu na pufer (prva ordinata) ili na ukupno dodatu radioaktivnost RP TSH* (druga ordinata).

DISKUSIJA

Kao i drugim radioreceptorskim testovima, tako se i RRA za TSH mogu da testiraju sve komponente sistema: da se određuje koncentracija receptora u tkivu, ispituje kvalitet »obeleženog« hormona, ili testiraju materije koje inhibiraju vezivanje »obeleženog« specifičnog hormona – neradioaktivni specifični hormon, ili njegovi analozi. Posebno interesantan analog tireotropinu su antitela na TSH receptor (TRAb) koja vezivanjem na taj receptor ometaju vezivanje specifičnog hormona.

Da bi RRA za TSH mogao da se primeni za testiranje receptora u tireoidnom tkivu, neophodno je da se raspolaze sa druge dve komponente: kvalitetnim »obeleženim« TSH i odgovarajućim neradioaktivnim hormonom za upoređenje. Da bi se »obeleženi« hormon izdašno specifično vezivao na svoje receptore u ispitivanom tkivu mora da bude biološki visoko aktivan i nakon »obeležavanja« i afinitetno prečišćen na preparaciji kvalitetnih specifičnih receptora (11,12,13). U modelu radioreceptorskog određivanja, maksimalno (neinhibisano) specifično vezivanje ovakvog TSH treba da se kreće od 20 do 40% (12). Receptorski nepurifikovan TSH* nema tu mogućnost (10). U ovom radu, dobili smo zadovoljavajući kvalitet RP TSH* (SB max 12 do 30%). S druge strane, neradioaktivni TSH koji se koristi za "standardnu krivu" može da bude isti preparat koji se i markira, što je vrlo ekonomično, ili široko dostupan preparat delimično prečišćenog TSH (Ambinon, Organon), što smo ranije (10) ali i ovaj put potvrdili. Kvalitet ove dve komponente RRA sasvim zadovoljava pa one mogu da se koriste za testiranje treće, tj za ispitivanje TSH receptora u tkivu štitaste žlezde.

Da bi se ovako osmišljen test mogao da primeni i za dokazivanje TRAb, neophodno je da se inhibicija vezivanja TSH* postiže samo globulinima koji se nalaze u serumu obolelih od Graves-ove bolesti, a ne i serumom eutireoidnih osoba. Mada se RRA na »sirovim« membranama dugo koristio bez većih zamerki za dokazivanje TRAb, neki izveštaji mu odriču mogućnost primene zbog velike nespecifične inhibicije serumom eutireoidnih osoba (6,7). I u ovom našem istraživanju pokazali smo da serum eutireoidnih osoba znatno inhibira vezivanje TSH*. Prosečno specifično vezivanje TSH* u puferu je oko 19% a u eutireoidnom serumu samo oko 6%. U dva od 7 eksperimenata ono je bilo čak ispod 2%. Stoga za kvalitetno određivanje TRAb treba promeniti način testiranja (nespecifično vezani globulini iz eutireoidnog seruma mogu da se odstrane izdašnim ispiranjem za razliku od čvrsto vezanih IgG i seruma obolelih od Graves-ove bolesti (7), ili razraditi test sa solubilizovanim receptorskim proteinima koji na osnovu saopštenja iz literature (8,9) ovaj problem prevazilazi.

LITERATURA

- 1 Bech K., Madsen S.N.: Thyroid adenylate cyclase stimulating immunoglobulins in thyroid disease. Clin Endocrinol 1979;11:47.
- 2 Kasagi K., Konishi J., Arai K., et al.: A sensitive and practical assay for thyroid-stimulating antibodies using crude immunoglobuline fractions precipitated with polyethylene glycol. J Clin Endocrinol Metab 1986;62:855-862.
- 3 Smith BR., Hall R.: Thyroid-stimulating immunoglobulins in Graves' disease. Lancet 1974;2:427-431.
- 4 Manley S.W., Bourke J.R., Hawker R.W.: The thyrotropin receptor in guinea pig thyroid homogenate: interaction with the long acting thyroid stimulator. J Endocrinol 1974;61:437.
- 5 Smith BR., Hall R.: Measurement of thyroid-receptor antibodies. Methods in Enzymology 1981;74:405-420.

- 6 Endo K., Amir S.M., Ingbar S.H.: Development and evaluation of a method for the partial purification of immunoglobulins specific for Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;52:1113-1123.
- 7 Borges M., Ingbar J.C., Endo K., et al.: A new method for assessing the thyrotropin binding inhibitory activity in the immunoglobulins and whole serum of patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;54:552-558.
- 8 Rickards S.R., Buckland P., Smith B.R., Hall R.: The interaction of Graves' IgG with the thyrotropin receptor. *FEBS Letters* 1981;127:17-21.
- 9 Shewring G., Smith B.R.: An improved radioreceptor assay for TSH receptor antibodies. *Clinical Endocrinol* 1982;17:409-417.
- 10 Paunkovic N., Miladinovic J., Nikolic K.: Radioreceptorski test za tireotropin – priprema i testiranje komponenti. *Radiol Jugosl* 1989;23:383-386.
- 11 Goldfine I.D., Amir S.M., Petersen A.W., Ingbar S.H.: Preparation of biologically active ¹²⁵I-TSH. *Endocrinology* 1974;95:1228-1233.
- 12 Bruin de T.W.A., van der Heide D.: Anti-thyrotropin receptor antibodies in Graves' disease as demonstrated directly by immunoprecipitation assay. *Acta Endocr* 1983;102:40-56.
- 13 McKenzie J.M., Zakarija M.: Assays of the thyroid-stimulating antibodies (TRAb) of Graves' disease, In: Ingbar S.H., Braverman L.E.: *Werners's The Thyroid*, fifth ed., J.B.Lippincott Co, Philadelphia 1986;559-575.

Radiol Arch Srb 5,993-995, 1996