

SLUŽBA ZA NUKLEARNU MEDICINU, ZDRAVSTVENI CENTAR U ZAJEČARU

OPTIMIZACIJA RADIORECEPTORSKOG TESTA ZA ANTITELA NA RECEPTORE ZA TSH

Paunković Nebojša, Džejn Paunković i Kosta Nikolić

Danas je opšte prihvaćeno da tireostimulantna antitela iz seruma obolelih od Graves-Bazedovljeve bolesti, pored toga što pokazuju stimulacioni efekat na receptore za TSH, ometaju i vezivanje TSH na njih (TBI). Prvi modeli za dokazivanje »tireostimulantnih imunoglobulina« bili su zato zasnovani na ometanju vezivanja »obeleženog« TSH na »sirove« membranske preparacije humanih ili animalnih tireocita (1,2). Mada je, posebno u kliničkim krugovima, zavladao dogma da IgG seruma obolelih od Graves-ove bolesti inhibira vezivanje »obeleženog« TSH, dok IgG zdrave osobe to ne čini, ipak su prva zapažanja ukazivala na nedovoljnu senzitivnost i specifičnost tih testova (3,4). Savesni istraživači saopštavaju da se ometanje vezivanja radioaktivnog TSH na tireocitne membrane u mnogo slučajeva dobija i delovanjem IgG a pogotovo seruma eutireoidnih osoba (5). Predložene su modifikacije testa zasnovane na čvrstini vezivanja specifičnih i nespecifičnih inhibitora na TSH receptore (5). Ovi radovi su praktično prekinuti kada se umesto »sirovih« membrana počinju koristiti solubilizovani proteini membranskih receptora i uz to umesto maksimalnog specifičnog vezivanja odgovarajući parametar u eutireoidnom serumu, umesto u reakcionom puferu (6). Mi smo ispitujući komponente radioreceptorskog testa koje smo sami pripremili takodje registrovali visoko ometanje »obeleženog« TSH (TSH^{*}) od strane eutireoidnog seruma (7). Iz tog razloga smo razradili postupak za korišćenje solubilizovanih tireotropinskih receptora.

MATERIJAL I METODA

»Sirove« tireocitne membrane dobijali smo iz štitnjača svinja postupkom koji smo objavili (7,8). Solubilizaciju receptorskih proteina sa membrana vršili smo rastvaranjem istih u 1% rastvoru deterdženta Lubrol u TRIS-NaCl puferu. Ovako solubilisani proteini korišćeni su neposredno, najčešće u koncentraciji od 5g/l.

Za obeležavanje radioaktivnim jodom (¹²⁵I) korišćen je bovini TSH (ICN). Primenjen je postupak laktoperoksidaznom metodom (S.Savin, INEP) ili hloraminom T u našoj laboratoriji (9). Po obeležavanju vršena je afinitetna purifikacija na »sirovim« membranama tireocita svinja, sa kojih je ovako prečišćen hormon eluiran u visoko molarnom elektrolitnom rastvoru. Kvalitet ovako pripremljenog radiojodiranog TSH predhodno je ispitan na modelu sirovih tireocitnih membrana (7).

Neradioaktivni preparat sa tireotropinskim delovanjem, koji se koristi za proveru sistema, Ambinon (Organon, Holland) pripremljen je u odgovarajućim dilucijama u eutireoidnom »pool« serumu.

Serum velikog broja eutireoidnih osoba (eutireoidna kontrola) kao i ispitivani serumi, dobijeni su na uobičajeni način.

Test je izvodjen na sledeći način: 0,1 ml solubilizovanih receptora i ista količina ispitivanog ili kontrolnog seruma, preinkubirana je na sobnoj temperaturi 30 min. Posle dodavanja 0,1 ml

radiojodiranog receptorski prečišćenog TSH vršena je inkubacija 60 min na 37 stepeni. Po završetku inkubacije staloženi su receptorski proteini na koje su se vezali IgG seruma 20% PEG-om i oboreni centrifugovanjem na 3.000xg u toku 20 min. Posle aspiracije supernatanta merena je radioaktivnost precipitata. Rezultat testa je iskazan kao % inhibicije vezivanja »obeležnog« (TSH*):

$$\% \text{ INH} = 100 \times (1 - \text{SB TSH}^* \text{ eu ser}).$$

Testirani su parametri: nespecifično vezivanje (NSB) dobijeno merenjem procenta vezanog radioaktivnog TSH u epruveti sa eutireoidnim serumom i rastvorom Lubrola umesto receptorske preparacije, maksimalno vezivanje (TSH*) u epruvetama sa eutireoidnim "pool" serumom (SB max EU), kao i provera sistema testa preparacijama Ambinona ("inhibiciona krivulja").

Ovako izveden i predhodno proveren radioreceptorski test primenjen je na 18 seruma eutireoidnih osoba i 22 seruma bolesnika sa novodijagnostikovanom Bazedovljevom bolešću. Dijagnoza je postavljena na uobičajeni način, kliničkim i laboratorijskim metodama.

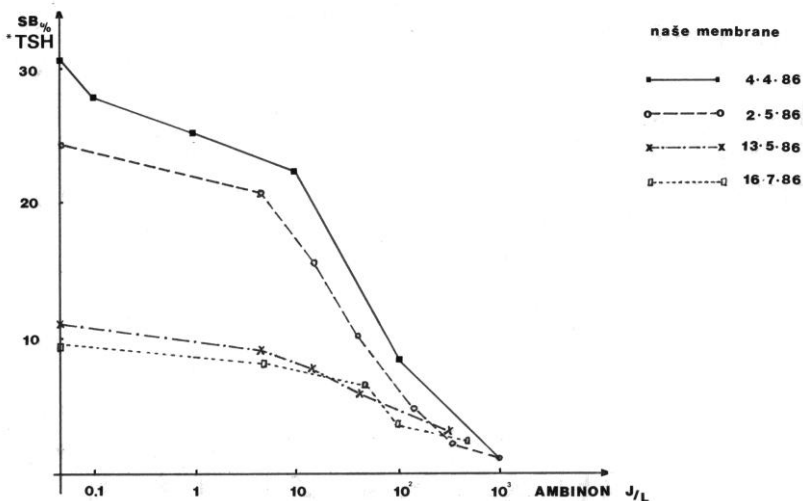
REZULTATI

U 10 nezavisnih eksperimenata određeni su NSB i SB max EU. Rezultati su prikazani na tab 1.

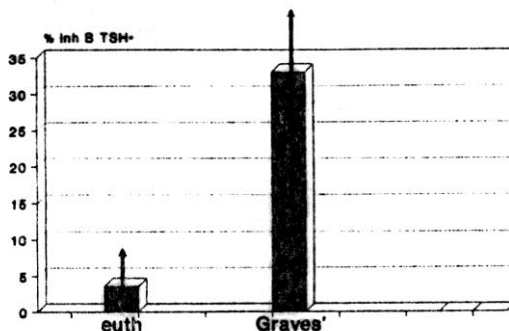
Tabela 1 OSNOVNE KARAKTERISTIKE TESTA

	NSB	SB max EU
n	10	10
X	9,0	5,47
SD	1,58	1,41

Specifična inhibicija preparatom sa tireotropnim delovanjem merena je dilucijama Ambinona u kontrolnom (eutireoidnom) serumu. Rezultati su predstavljeni u vidu »inhibicione krivulje« konstruisane kao srednje vrednosti tri nezavisna određivanja. Ove dilucije treba pripremiti i koristiti unutar dvadesetak dana jer stajanjem na 4⁰ inhibitorna aktivnost se gubi (slika 1).



Slika 1. Provera receptorske vitalnosti membranskih preparacija skladištenih na -20⁰C



Slika 2. Inhibicija vezivanja TSH* na solubilizovane receptorske proteine od strane kontrolnih i ispitivanih seruma

Rezultati testiranja ometanja vezivanja TSH* (TBI) pod uticajem eutireoidnih (kontrolna grupa) i ispitivanih (nelečena Graves-ova bolest) seruma prikazani su na slici 2.

DISKUSIJA

Prikazali smo pripremanje osnovnih komponenti radioreceptorskog testa (RRA) kojim mogu da se testiraju imunoglobulini koji ometaju vezivanje radiojodiranog TSH (TBII). Kao model testa korišćena je inhibicija vezivanja na solubilizovane proteine TSH receptora uz taloženje vezanih imunoglobulina PEG-om. U ovom modelu nedostaje uobičajeni parametar RRA – maksimalno specifično vezivanje (SB max). Umesto njega koristi se odgovarajući parametar u eutireoidnom serumu koji je znatno manji od maksimalnog vezivanja (inhibisano je vezivanje eutireoidnim serumom) ali je zato pogodan kao negativna referentna vrednost.

RRA izveden ovim komponentama na opisan način pokazuje zadovoljavajuće parametre i odlike: NSB je prosečno 9%, senzitivnost je 77% a specifičnost je 95%. Sličnu senzitivnost ili bar ne mnogo veću navodi i jedan deo stranih istraživača (10), a i naši rezultati dobijeni kvalitetnim komercijalnim kompletom kretali su se od 74% (11) do 84% (12). Ipak našim testom dobija se nedovoljno visoka referentna vrednost (SB max EU) koja se kretala od 4 do 8%, što nije ništa bolje od istog parametra dobijenog na »sirovim« membranama (7), a znatno je lošije od odgovarajuće vrednosti u komercijalnom RRA (13). Osnovni uzrok niskog maksimalnog vezivanja TSH* u eutireoidnom serumu verovatno je mala specifična biološka aktivnost preparacije koju smo imali (Tirotopin, ICN) koja iznosi samo 10 J/g za razliku od TSH koji se obično koristi za receptorske studije, 20 J/mg (8).

Rezultati koje smo prezentirali govore da smo savladali postupke za radioreceptorski test za antitela na TSH receptore. Potrebno je poboljšati kvalitet preparacije TSH za radiojodiranje i zajedno sa nekom proizvođačkom laboratorijom sprovesti finalizaciju pripreme komponenti (liofilizacija i sl).

LITERATURA

- 1 Smith BR., Hall R.: Thyroid-stimulating immunoglobulins in Graves' disease. *Lancet* 1974;2:427-431.
- 2 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.

- 3 Endo K., Kasagi K., Konishi J., et al.: Detection and properties of TSH-binding inhibitor immunoglobulins in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;46:734-739.
- 4 Fenzi G., Hashizume K., Roudebush C., DeGroot L.: Changes in thyroid-stimulating immunoglobulins during antithyroid therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1979;48:572-576.
- 5 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.
- 6 Shewring G., Smith B.R.: An improved radioreceptor assay for TSH receptor antibodies. *Clinical Endocrinol* 1982;17:409-417.
- 7 Paunkovic Dz., Paunkovic N., Nikolic K.: Radioreceptorski test za tireotropin: priprema i testiranje komponenti. Jugoslovenski sastanak za nuklearnu medicinu, Zlatibor, 1995.
- 8 Paunkovic N., Miladinovic J., Nikolic K.: Radioreceptorski test za tireotropin: priprema i testiranje komponenti. Jugoslovenski sastanak za nuklearnu medicinu Radiol Jugosl 1989;23:383-386.
- 9 Goldfine I.D., Amir S.M., Petersen A.W., Ingbar S.H.: Preparation of biologically active ¹²⁵I-TSH. *Endocrinology* 1974;95:1228-1233.
- 10 Harrison L.C., Leedman P.J.: The thyroid stimulating hormone receptor in human disease. *Clin Biochem* 1990;23:43-48.
- 11 Paunkovic N., Miladinovic J., Pavlovic O.: Određivanje autoantitela na receptore za tireotropin. 25 godina Endokrinoloske sekcije SLD, Beograd, 1987.
- 12 Paunkovic N., Miladinovic J., Pavlovic O.: Determination of TSH receptor autoantibodies in different phases of Graves-Basedow disease. *Nucl Med* 1986;25 A:129.
- 13 Henning: TRAK-assay, Berlin, 1987.

Timoč Med Glas 1996;21(1-4):21-23.