

A HAZAI GYÁRTMÁNYÚ 3,3'-DIJÓDTIRONIN RIA KÉSZLETTEL SZERZETT KLINIKAI TAPASZTALATOK

Gyertyánfy Géza¹, Földes János¹, Tóth Géza², Dévényi Nóra²

¹A Semmelweis Orvostudományi Egyetem I. Belklinikája Budapest, Korányi S.u.2. 1083

²A Magyar Tudományos Akadémia Izotópinizete, Budapest, Pf. 77, 1525

/Érkezett 1983. május 16-án/

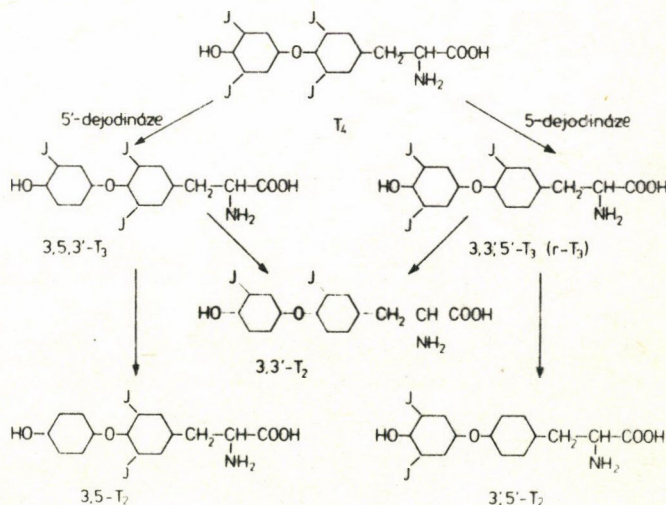
A szérumban két, biológiailag aktív pajzsmirigyhormont, a tiroxint /T₄/ és a trijódttironint /T₃/ lehet kimutatni. A T₃ 80%-a a szövetekben keletkezik a T₄ dejodálódása révén.

A dejodálódás két enzim: az 5-dejodináze és az 5'-dejodináze hatására megy végbe. Amennyiben a dejodálódás az 5'-dejodináze hatására történik, a biológiailag aktív 3,5,3'-trijódttironin /továbbiakban T₃/ keletkezik, míg az 5-dejodináze enzim a biológiailag inaktív 3,3,5'-trijódttironint /reverse trijódttironin, továbbiakban r-T₃/ hozza létre. További dejodálódás hatására dijódttironinok /T₂/ keletkeznek. A trijódttironinból és az r-T₃-ból egyaránt képződik 3,3'-dijódttironin /továbbiakban 3,3'-T₂/, ugyanakkor a trijódttironinból még 3,5-dijódttironin, az r-T₃-ból pedig 3,5'-dijódttironin is keletkezik.¹ Mindezeket az 1. ábra szemlélteti.

E dejodált metabolitok a keringésben jelen vannak, és radioimmunoassay segítségével kimutathatók²⁻⁸. Ilyen irányú vizsgálataink első lépéseként a szérumban 3,3'-T₂-tartalmának meghatározásával foglalkoztunk.

VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

A 3,3'-T₂ kimutatására a Magyar Tudományos Akadémia Izotópinizetében kidolgozott és forgalomba hozott, RK-14 kódszámu RIA készletet használtuk.



1. ábra

A tiroxin dejodálódásának menete

Ход удаления йода из тироксина

Deiodination of thyroxine

A szérumban T_2 -tartalmának meghatározása RIA módszerrel, extrakció nélkül történik. A készlet reagensai a következők: liofilizált antiszérumban, jelzett $3,3'\text{-T}_2$, /tracer/, barbitál puffert, $3,3'\text{-T}_2$ standard, $3,3'\text{-T}_2$ -mentesített szérumban, kontroll szérumban és 20%-os vizes PEG oldat.

Felhasználáskor a puffert 3,0 ml, az antiszérumban 5,0 ml, a T_2 -mentesített szérumban pedig 4,0 ml desztillált vízben feloldjuk. A standardot 1,0 ml desztillált vízben feloldva $800\text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentrációjú oldatot kapunk, ez lesz a standard görbe első pontja. Ebből készítjük el a standard görbe többi koncentrációját, mentesített szérumban való hígítással. E koncentrációk a következők: 400, 200, 100, 50, 25 és $12,5\text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

A meghatározás Burger és Sakoloff eljárása alapján történik², és menete a következő.

Műanyagcsövekbe bemértünk 50 μl standard oldatot, illetve kontroll szérumban. A zérus koncentrációjú csövekbe 50 μl mentesített szérumban pipettázunk. Ezután mindegyik csöbe 50 μl jelzett $3,3'\text{-T}_2$ oldatot és 100 μl antiszérumban mérünk. Két csöbe csak nyomjelzőt adagolunk, az összaktivitás meghatározása céljából. E csöveket mérésig félretesszük. A csövek tartalmát - az előbb említett két cső kivételével - vortex keverővel homogenizáljuk. A csöveket 5 óra hosszat szobahőmérsékleten, majd egy éjszakán keresztül $+4^\circ\text{C}$ -on inkubáljuk. Másnap mindegyik csöbe - kivéve a két összaktivitási csövet - 500 μl vizes PEG oldatot mérünk, a csövek tartalmát vortex keverővel összekeverjük, majd 2000-3000 g gyorsulással legalább 25 percig, $+4^\circ\text{C}$ -on centrifugáljuk. Ezután a felüluszt leszivjuk, és megmérjük a csapadék radioaktivitását.

Mindezt az 1. táblázat szemlélteti.

Ezután kiszámítjuk a standard görbére vonatkozó B/B_0 százalékokat és féllogaritmikus skálán felvesszük a mérőgörbét. A vízszintes tengelyen a standard koncentrációt, a függőleges tengelyen a B/B_0 százalékokat ábrázoljuk. Lehetséges a logisztikus ábrázolás is. Az ismeretlen szérumban B/B_0 százalékát kiszámítva, a koncentrációt a mérőgörbéről leolvassuk.

Vizsgálatainkhoz a klinikai beteganyagból származó eu-, hyper- és hypothyreosisos szérumbanmintákat használtuk, azokból poolozott mintákat készítve. Eseteinket is klinikai beteganyagból választottuk.

Vizsgálatainkat a következő szempontok szerint végeztük:

1. az ellenanyag fajlagosságának ellenőrzése,
2. az optimális ellenanyag-koncentráció megállapítása,
3. a mérőgörbe statisztikai adatainak vizsgálata,
4. a módszer megbízhatóságának tanulmányozása eu-, hyper- és hypothyreosisos szérumbanokkal,
5. eu-, hyper- és hypothyreosisos betegszérumban $3,3'\text{-T}_2$ -tartalmának meghatározása.

1. táblázat

Az immunoassay menete

Ход иммуноанализа

Assay protocol

C s ő				
Reagens	Standard	Minta	Bo	Total
Standard	50	-	-	-
Minta	-	50	-	-
T ₂ -mentes szérum	-	-	50	-
¹²⁵ I-3,3'-T ₂	50	50	50	50
Antiszerum	100	100	100	-
vortexeljük; inkubáljuk szobahőmérsékleten öt óra hosszat, majd +4°C-on egy éjszakán keresztül				
PEG oldat	500	500	500	-
Vortexeljük; centrifugáljuk +4°C-on, 2-3000 g gyorsulással 20 percig;				
a felüluszt leszivjuk, a csapadék radioaktivitását mérjük				
A mennyiség µl-ben értendő.				

EREDMÉNYEK

1. Az ellenanyag fajlagosságát /a keresztreakciók vizsgálatát/ az MTA Izo-tópintézete ellenőrizte. A vizsgálat eredményét a 2. táblázat mutatja.

2. táblázat

Keresztreakciók

Перекрестные реакции

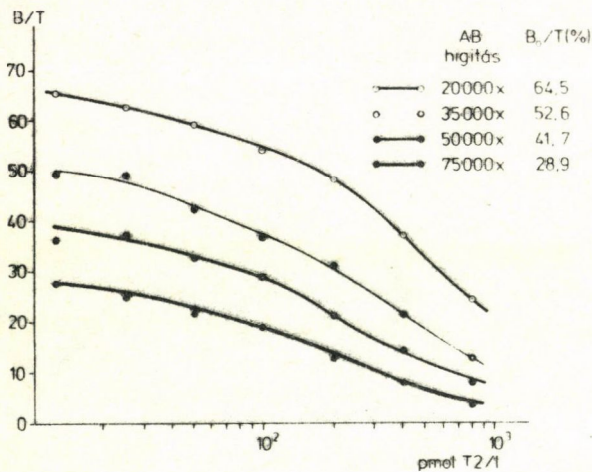
Cross reactions

Vegyület	%
T ₄	0,015
T ₃	0,085
r-T ₃	0,01
3'-T ₁	0,46
Triac	0,22
Tetrac	0,02

Ennek értelmében a trijód-tironinnal, r-T₃-mal, tiroxin-nal és tetrajód-tiroecetsavval /tetrac/ szemben a keresztreakció 0,1%-nál kisebb. Csak a trijód-tiroecetsavval és a 3'-monojód-tirozin-nal szemben mutatkozott valamivel nagyobb keresztreakció, de ez is 0,5% alatt volt.

2. Az optimális ellenanyag-higitás beállítására vonatkozó vizsgálat eredményét grafikusán a 2. ábra szemlélteti. A meghatározás céljára az 1:35 000 higitás mutatkozott a legalkalmasabbnak.

3. A mérőgörbékre vonatkozó eredményeket a 3. táblázatban láthatjuk. Tizenkét mérőgörbe statisztikai jellemző adatait értékelve, a variációs együtthatók átlaga 2,5%, az átlagos kötődés 50%, az átlagos érzékenység pedig 4,7 pmol·l⁻¹ volt.



2. ábra

Különböző hígítású ellenanyaggal kapott 3,3'-T₂ görbék

Стандартные кривые 3,3'-T₂, полученные с антигенами разного разбавления

Standard curves obtained with antigens of various dilution

3. táblázat

A T₂ mérőgörbék adatai

Данные по измерительным кривым T₂

T₂ measurement curves data

	Tartomány	Átlag
VK	1,0731-3,2936	2,3043
Korrelációs együttható	0,9116-0,9940	0,9738
Kötődési %	38,33-61,55	50,06
Érzékenység pmol·l ⁻¹	3,19-10,18	4,70

átlagos 3,3'-T₂-tartalma 82,3, hyperthyreosisban 167,58, hypothyreosisban 56,57 pmol·l⁻¹. Az egyes csoportok átlaga közötti különbség szignifikáns.

A szérum 3,3'-T₂- és tiroxintartalma közötti összefüggést grafikusan a 3. ábra mutatja. Rendszerint erősen megnőtt T₄-tartalom esetén kapunk igen nagy T₂-értékeket, amely alacsonyabb T₄-szint mellett már nem ilyen markáns.

4. A módszer megbízhatóságát vizsgálva az intraassay-meghatározást euthyreosisban 58, hyperthyreosisban 61, hypothyreosisban 35 esetben végeztük el, összesen 154 esetben. Az interassay-meghatározás euthyreosisban 18, hyperthyreosisban 10, hypothyreosisban pedig 9 esetben történt, összesen 37 esetben. Eredményét 4. táblázatban láthatjuk. Az intraassayben a variációs együttható értéke, a pajzsmirigy működési állapotától függően, 8,71 és 18,44% között volt, míg az interassay variációs együtthatójának értéke ennél nagyobbak adódott; ez különösen hypothyreosisban volt nagy /23,2%/. A standard deviáció értéke az intraassayben 8,0 és 13,54 között volt, interassayben pedig 10,82 és 19,63 között mozgott.

5. Végül a klinikai betegek közül meghatároztuk 27 euthyreosisos, 8. hypothyreosisos és 36 hyperthyreosisos beteg szérumának 3,3'-T₂-tartalmát. A diagnózist a klinikai képen kívül a szérum T₄-tartalmának előzőleg már elvégzett meghatározása is megerősítette. Ezen eredményeket az 5. táblázat szemlélteti. Látható, hogy euthyreosisban a szérum

4. táblázat

Megbízhatóság

Надежность

Confidence

	Átlag, $\text{pmol} \cdot \text{l}^{-1}$	95%-os megbízhatósági határ
Hypothyreosis n = 8	56,57	45,84 - 67,31
Euthyreosis n = 27	82,27	69,30 - 95,24
Hyperthyreosis n = 36	167,58	137,58 - 197,58

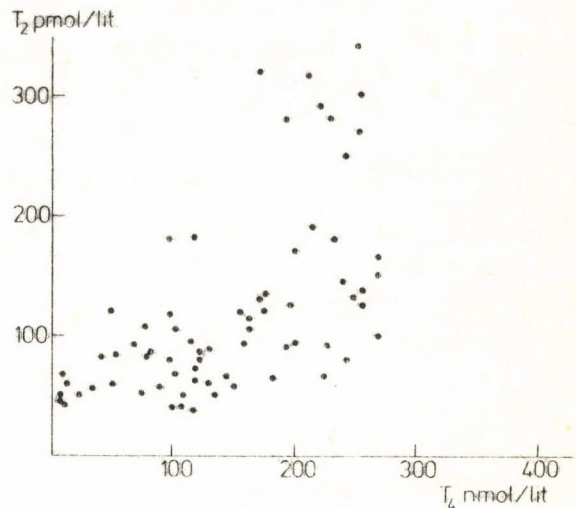
5. táblázat

Betegeredmények

Данные больных

Patients data

	Intraassay	
	SD	VK
Euthyreosis n = 58	8,295	12,423
Hyperthyreosis n = 61	13,540	8,707
Hypothyreosis n = 35	8,03	18,44
	Interassay	
	SD	VK
Euthyreosis n = 18	10,89	15,088
Hyperthyreosis n = 10	19,633	11,739
Hypothyreosis n = 9	10,823	23,21



3. ábra

A szérumban T_4 - és $3,3'$ - T_2 -koncentrációjának összefüggéseВзаимосвязь концентрации T_4 и $3,3'$ - T_2 в сывороткеThe relation between T_4 and $3,3'$ - T_2 concentrations of the serum

MEGBESZÉLÉS

A pajzsmirigyhormonok perifériális metabolizmusát tanulmányozva, szükséges a T_4 , T_3 és $r\text{-}T_3$ deiodációs termékeinek a kimutatása a szérumban. Ilyen irányú vizsgálataink első lépéseként egyrészt ellenőriztük az MTA Izo-

megbízhatóságát, másrészt meghatároztuk a szérum $3,3'$ - T_2 -tartalmát eu-, hyper- és hypothyreosisos beteganyagon, és az eredményeket összefüggésbe hoztuk a szérum T_4 -tartalmával.

A T_2 ellenanyag specifikusnak bizonyult. A T_4 , illetve a T_3 -metabolitokkal szemben a keresztreakció minden esetben 0,5%-nál kisebbnek adódott. Ez az eredmény összhangban volt Faber és munkatársainak, valamint Skovsted és munkatársainak eredményeivel^{1,2,7}. Adataink alapján a $3,3'$ - T_2 -meghatározás általános érzékenysége $4,7 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ értékűnek bizonyult, és ez megfelel Hüfner és Grüssendorf régebbi eredményeinek⁵.

A módszer megbízhatóságát vizsgálva az eu-, hyper- és hypothyreosisos tartományban meghatároztuk az intraassay és interassay variációs együtthatóit. Noha ezek az eu- és hyperthyreosisos szérumokat vizsgálva elég nagynak bizonyultak, mégis megfelelték a világirodalmi adatoknak^{1,4,7}. A hypothyreosisos szérumok esetében azonban az interassay variációs együtthatója 23%-nak adódott. Mindez arra utal, hogy a módszer megbízhatóságát a továbbiakban még növelni kell.

Hyper-, illetve hypothyreosisos betegcsoportunkban a szérum átlagos $3,3'$ - T_2 - tartalma jól elkülöníthető volt az euthyreotikus csoporttól, és az eredmény megfelelt a világirodalmi adatoknak^{1,2,7}. A szérum $3,3'$ - T_2 - és T_4 - tartalma közötti összefüggést vizsgálva megállapíthatjuk, hogy a szérum nagy T_4 -koncentrációja esetében az összefüggés szembeötlő, kis T_4 -tartalma esetében azonban ez már nem mutatható ki. Ennek egyik magyarázata az lehet, hogy hypothyreosisban, az esetek döntő többségében, a szérum T_4 -tartalma az euthyreotikusakénál kisebb, ugyanakkor a T_3 -koncentráció még nem kicsi. Ebből a trijótirtioninból olyan mennyiségben képződhet a szövetekben $3,3'$ - T_2 , amely az utóbbi normális szérumkoncentrációját eredményezi. Vizsgálati eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy az MTA Izotóptételezésében előállított készlet alkalmas a szérum $3,3'$ - T_2 -tartalmának meghatározására. Amennyiben azonban a pajzsmirigyhormonok perifériális metabolizmusát részletesebben óhajtjuk vizsgálni, úgy szükséges a szérum $3,3'$ - T_2 -tartalma mellett a $3,5$ - T_2 - és $3,5'$ - T_2 -szintjét is meghatározni.

IRODALOM

1. L.A. Gavin, et al., J. Clin. Invest. 60 /1978/ 1276
2. A. Burger, et al., J. Clin. Endocr. Metab. 45 /1977/ 384
3. K.D. Burman, et al., J. Clin. Endocr. Metab. 45 /1977/ 339
4. H. Meinhold, F. Schürnbrand, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15 /1977/ 419
5. M. Hüfner, M. Grüssendorf, Acta Endocr. 89 /1978/ 679
6. P. Laurberg, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 38 /1978/ 537
7. L. Skovsted, Acta Med. Scand., Suppl. 624: /1979/ 19
8. J. Faber, et al., Clin. Endocr. 14 /1981/ 119

*

Elvégeztük az RK-14 kódszámu, $3,3'$ -T₂ RIA készlet klinikai kipróbálását. Megállapítottuk a mérőgörbe statisztikai jellemző adatait; inter- és intraassay segítségével megvizsgáltuk a módszer megbízhatóságát, majd meghatároztuk eu-, hyper- és hypothyreosisos szérumok /71 betegminta/ $3,3'$ -T₂ koncentrációját. Az egyes csoportok T₂-szintje egymástól szignifikánsan elkülönült.

A készlet szérum $3,3'$ -T₂ -tartalmának meghatározására alkalmas.

КЛИНИЧЕСКИЕ ОПЫТЫ С РАДИОИММУНОАНАЛИТИЧЕСКИМ НАБОРОМ $3,3'$ -ДИЙОДТИРОНИНА ВЕНГЕРСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

Дьертянфи, Г., Фэльдеш, Я., Тот, Г., Девеньи, Н.

Были произведены клинические испытания $3,3'$ -T₂ радиоиммуноаналитического набора RK-14. Были определены статистические характеристики измерительной кривой; с помощью интер- и интраизмерений была исследована надежность метода и определена концентрация $3,3'$ -T₂ в эу-, гипер- и гипотиреотических сыворотках /на 71 образце/. T₂ -уровни отдельных групп однозначно отделяются друг от друга.

Набор пригоден для определения содержания $3,3'$ -T₂ в сыворотке.

CLINICAL EXPERIENCES WITH THE HUNGARIAN MADE DIIODOTHYRONINE RADIOIMMUNOASSAY KIT

Gyertyánfy, G., Földes, J., Tóth, G., Dévényi, N.

Clinical testing of the RK-14 radioimmunoassay kit for the determination of $3,3'$ - diiodothyronine was performed. The statistical characteristics of the calibration curve were established, the reliability of the method by means of intra- and interassay variation coefficients was studied and the serum $3,3'$ -T₂ concentration of patients with various thyroid diseases was determined /71 cases/. A significant difference was found among the serum levels of $3,3'$ -T₂ in the groups of euthyroid, hyperthyroid and hypothyroid patients.

The RK-14 kit seems to be applicable for the determination of $3,3'$ -T₂ content in the serum.