

Extrakciós és direkt ^{125}I - tesztoszteron radio-immunoassay összehasonlító vizsgálata szarvasmarha vérérszérumban

Mézes Miklós¹, Tózsér János², Tóth Géza³

¹Gödöllői Agrártudományi Egyetem, Takarmányozástani Tanszék, Gödöllő, 2103

²Gödöllői Agrártudományi Egyetem Állattenyésztési Intézet, Gödöllő, 2103

³Izotóp Intézet Kft, Budapest Pf. 77. 1525

A szerzők szarvasmarha vérérszérumban tesztoszteron tartalmát határozták meg extrahált mintákból, illetve direkt módszerrel, radioimmunoassay (^{125}I) segítségével. A kötött illetve kötetlen jelölt molekulák elválasztása a direkt módszernél mágneses immunoszorbenssel (MIS), míg az extrakciós módszernél polietilén-glikollal (PEG) történt. Megállapították, hogy a direkt módszer alkalmazása során fajazonos mentesített szérumban használata indokolt. Bár a két módszer között szignifikáns korrelációt kaptak ($r=0,864$, $P<0,001$), az extrahált mintákra kapott értékek szisztematikusan magasabbak voltak a direkt módszerrel mért értékeknél, különösen a magas koncentráció-tartományban.

COMPARISON OF EXTRACTION AND DIRECT ^{125}I TESTOSTERONE RADIOIMMUNOASSAY METHODS IN BOVINE SERUM

The authors investigated the testosterone content of blood serum of bulls using direct and extraction radioimmunoassay (^{125}I) methods. The separation of the bound and free radioligands was carried out with either magnetic immunosorbent (direct assay) or polyethylene-glycol (extraction method). Application of testosterone-free serum to standard curve set-up was found a prerequisite for reliable direct assay from unextracted serum samples. Correlation of values obtained in direct assay with those obtained after extraction was evaluated in 15 bovine serum samples selected at random. In spite of a significant correlation found (correlation coefficient $r=0,864$, $P<0,001$), a considerable degree of bias is expected in the range of high concentration, due to the shift of slope.

Bevezetés

Az állatorvosi klinikai gyakorlat mellett ma már a genetikai szelekciós munkában is egyre inkább elterjed egyes endokrinológiai paraméterek, így például a tesztoszteron, rutinszerű mennyiségi mérése. A szexuáliszteroidok kvantitatív meghatározása ma már szinte kizárólagosan valamely immunokémiai módszer felhasználásával történik. Ezek közül a humán diagnosztikában egyre inkább teret hódítanak azok az ún. direkt eljárások, amelyek során a munkaiigényes és gyakran alacsony visszanyerési hatékonyságot mutató extrakciót kiiktatják, a mérés közvetlenül a plazmából, illetve szérumból történik. Ugyancsak felmerült az igénye annak, hogy különösen nagy mintasorozatok

esetén az antitesthez kötött illetve a szabad jelzett molekulák korábban általánosan alkalmazott elválasztási módszerét egyszerűsítsék, hatékonyságát fokozzák. Ennek egyik lehetséges módszere mágneses immunoszorbens alkalmazása, amelyben az elválasztás centrifugálás helyett mágnes segítségével történik vaspertikulumok alkalmazásával.

Jelen összehasonlító vizsgálat célja az volt, hogy a hazai állatorvosi, illetve állattenyésztési gyakorlatban korábban már évek óta sikeresen alkalmazott extrakciós tesztoszteron mérési eljárást összehasonlítsa a jelenleg bevezetés alatt álló, humán diagnosztikai célra

kifejlesztett, mágneses immunoszorbenst alkalmazó, direkt módszerrel. A vizsgálat további célja annak megállapítása volt, hogy az utóbbi módszer alkalmas-e szarvasmarha vérszérumban tesztoszteron tartalmának mérésére is.

Anyagok és módszerek

Mindkét vizsgálati módszerhez az Izotóp Intézet Kft. által kifejlesztett ^{125}I radioimmunoassay készleteket alkalmaztuk. Az aktivitásmérés automatikus mintaváltóval ellátott, ^{125}I mérésre beállított gamma számlálóval történt (GAMMA, Budapest). Az aktivitás mérés ideje 60 sec volt, előzetes háttérkorrekció után. A jelölt vegyület mindkét rendszerben tesztoszteron-3-(O-karboximetiloximino)-3'-jódtirozin-metilészter- ^{125}I volt.

A vérszérumban mintákat 12-14 hónapos életkorú magyar tarka bikákból nyertük. A vérszérumban centrifugálással választottuk el és a mintákat a meghatározások elvégzéséig - 20°C-on tároltuk.

Az extrakciót frissen desztillált peroxidmentesített dietiléterrel végeztük. Az éteres fázist kifagyasztással választottuk el (30 min, -20°C-on). Az éteres fázist vákuumban 40°C-on bepárooltuk és az assay puffertben visszaoldott extraktumból végeztük el a mérést.

A direkt módszer alkalmazása során az extrakciót egy, korábban progeszteron meghatározásához leírt módszerrel helyettesítettük (2). A módszer azon az elven alapul, hogy a szteroid molekulának a vérplazma fehérjékhez való kötődését danazol (17 α -pregn-4-en-20-yno-(2,3-d)izoxasole-17-ol) hozzáadásával akadályozzuk meg. A direkt assay-ban a kalibrációs görbék készítéséhez szükséges reagens-csővekbe a mintákkal azonos térfogatú és hígítású - agarózban diszpergált Norit-A-val szteroidmentesített - szarvasmarha-szérumot adagoltunk.

Az assay kísérleti körülményei azonosak voltak, eltérés csak az antitesthez kötött illetve szabad tracer elválasztásában volt. Az elválasztás az extrakciós módszer esetén polietilénlikol (PEG MW 6000) segítségével, míg a direkt módszer alkalmazása során vasparkulumokhoz kötött anti-nyúl antitestet tartalmazó mágneses immunoszorbens (MIS) (Amerlex-M, Amersham) felhasználásával mágneses elválasztó lapon történt.

A dózis-válasz görbék kiértékelésére és az ismeretlen minta-koncentrációk számítására logit-log transzformációt, míg a korreláció számítására lineáris regresszióanalízist alkalmaztunk. (4).

Eredmények

A vizsgálatokban először összehasonlítottuk a kétféle elválasztó reagenssel kapott dózis-válasz görbék főbb paramétereit. Ezek az alábbiak voltak:

1. PEG:

Bo/T : 37,66 %

NSB/Bo : 6,90 %

logit-log egyenes egyenlete:

$$y = -0,517x + 0,301 \quad (r=0,992)$$

2. MIS:

Bo/T : 37,66%

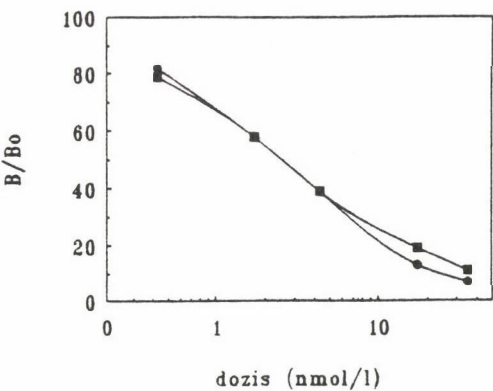
NSB/Bo : 4,18%

logit-log egyenes egyenlete:

$$y = -0,678x + 0,511 \quad (r=0,998)$$

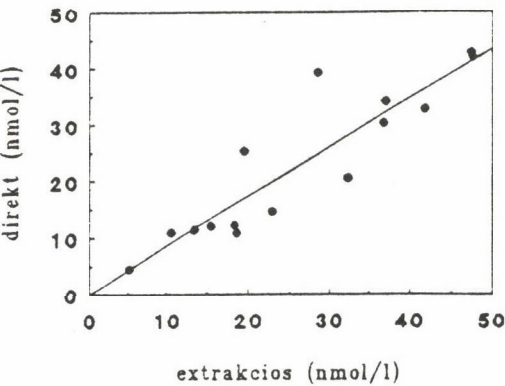
A paraméterekből látható, hogy a specifikus kötési értéke mindkét módszerrel azonos, míg a nem-specifikus kötési a mágneses immunoszorbens esetében számottevően kisebb. A logit-log egyenesek értékeléséből megállapítható, hogy a legkisebb kimutatható dózissal, vagy az 50 %-os gátláshoz tartozó dózissal jellemzett érzékenység a PEG elválasztásnál nagyobb, ezt azonban a MIS-nél kapott nagyobb meredekség részben kompenzálja.

Az ismeretlen minták meghatározása előtt megvizsgáltuk, lehetséges-e a direkt assay legegyszerűbb változatát alkalmazni, azaz a kalibrálást háttér-médium nélkül, pufferes közegben végezni. Ennek érdekében a mérendő mintákkal azonos térfogatú és hígítású, csontszénnel szteroid-mentesített szarvasmarha szérumban jelenlétében kapott dózis-válasz görbét összehasonlítottuk a szérumban nem tartalmazó, pufferes standard görbével. Az 1. ábrán feltüntetett eredményekből látható, hogy a nagyobb dózistartományban a két görbe fokozatosan "széttart" ("shift"), ami a dózis-becslés hibáját a magasabb koncentrációknál jelentősen növeli. Éppen ezért a direkt és extrakciós értékek összehasonlításához a direkt assay egyszerű módszere helyett azt a kísérleti elrendezést követtük, amelyben a kalibrációs görbét a mintákkal azonos térfogatú, fajazonos, hatóanyagmentes szérumban jelenlétében mérjük.



1. ábra

Mentesített szarvasmarha szérum hatása a standard görbére
Effect of steroid-free plasma on standard curve
A - kontroll, B - mentesített szérum



2. ábra

Direkt és extrakciós módszerrel mért tesztoszteron koncentrációk összehasonlítása
Correlation of direct (x-axis) vs extraction (y-axis) values of testosterone

A két eljárás korrelációjának tanulmányozására 15, véletlenszerűen kiválasztott vérszérummintát vizsgáltunk egyidejűleg az extrakciós illetve a direkt módszerrel. Az egyes mérések eredményeit az 1. táblázatban mutatjuk be.

A direkt assay-vel kapott eredményeket az extrakcióval kapott koncentrációk függvényében ábrázolva a 2. ábrán bemutatott regressziós egyenest kapjuk, amelynek egyenlete: $y = 0,85x - 0,40$ ($r = 0,864$, $P < 0,001$, $FG = 13$). A regressziós egyenes analíziséből megállapítható, hogy a szignifikáns lineáris korreláció ($r=0,864$, $P < 0,001$) ellenére az extrahált mintákra kapott értékek szisztematikusan magasabbak, mint a direkt assay-vel kapott értékek. Ebből adódóan a dózis becslésének hibája (torzítás, "bias") várhatóan a

magasabb mintakonzentrációk esetében számottevő lehet.

Mintaszám	Direkt	Extrakciós
	Tesztoszteron (nmol/L)	
1.	10,83	18,58
2.	10,95	10,61
3.	14,59	22,83
4.	12,18	18,31
5.	11,99	15,48
6.	42,82	47,30
7.	20,51	32,30
8.	30,28	36,79
9.	32,83	41,73
10.	34,15	37,04
11.	11,46	13,45
12.	25,33	19,43
13.	4,49	5,14
14.	39,34	28,46
15.	41,98	47,48

1. táblázat.

Szarvasmarha vérszérum tesztoszteron tartalma direkt -
mágneses immunoszorbens illetve extrakciós - PEG módszerrel
mérve

Megbeszélés

A vizsgálati eredményekből levont fő következtetésünk, hogy a mágneses immunoszorbent alkalmazó direkt tesztoszteron-mérési módszer alkalmas szarvasmarha vérszérumból történő meghatározásra. Ez a megállapítás összhangban van azzal a tapasztalattal, hogy eredetileg humán diagnosztikai célra kifejlesztett készleteket más hormonok esetében is eredményesen alkalmaztak ugyanazon hormonnak szarvasmarhában történő meghatározására (1,3).

A kapott eredmények azonban arra hívják fel a figyelmet, hogy a szarvasmarha szérumban jelenlétében fellépő matrix-hatás kiküszöbölésére a kalibrációt mentesített szérumban jelenlétében szükséges elvégezni. Természetesen a várhatóan magas koncentrációjú mintáknál - pl. GnRH indukció után - a minták hígítása is szükséges, és ebben az esetben külön tisztázandó, hogy a háttér-médiumként alkalmazott mentesített szérumban milyen hígítási tartományban alkalmas egy mérési sorozaton belül különböző hígítású minták megfelelő pontosságú mérésére.

Irodalom

1. *Anderson*, Relation between GnRH-induced testosterone maxima, sperm motility and fertility in Ayrshire bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 27 (1992) 107.
2. *McGinley, J.M. Casey*, Analysis of progesterone in unextracted serum. A method using danazol (17 α -pregn-4-en-20-yno-(2,3-d) isoxazol-17-ol): a blocker of steroid binding to proteins. *Steroids* 33 (1979) 127.
3. *Post, H.R. Christensen, G.W. Seifert*, Reproductive performance and productive traits of beef bulls selected for different levels of testosterone response to GnRH. *Theriogenology* 27 (1987) 317.
4. *Snedecor, W.G. Cochran*, Statistical Methods. 6th ed. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, 1976. p. 172.

(Érkezett: 1993. június 14.)