

## BIOASSAY CORTICOTROPH RELEASING FACTOR (CRF) KVANTITATIV MEGHATÁROZÁSÁRA

KÁRTESZI MIHÁLY, STARK ERVIN, az MTA lev. tagja, MAKARA B. GÁBOR, az orvostudományok kandidátusa, FAZEKAS ILONA és RAPPAY GYÖRGY, az orvostudományok kandidátusa

Közlésre érkezett: 1978. I. 8.

A hypophysis peptidhormonjainak elválasztását szabályozó hypothalamikus eredetű kémiai anyagok közül elsőként az ACTH elválasztását szabályozó faktort, a corticotroph releasing faktort (ma használatos szinonimák: CRF, CRH, kortikoliberin) írták le (Saffran és Schally 1955).

Kémiai szerkezete mindmáig ismeretlen, s ebből következik, hogy a CRH közvetlen mennyiségi mérése ma még nem lehetséges. Léte mint más, azóta már kémiai szerkezetében ismert hypothalamikus eredetű neurohormonoké, közvetett úton — biológiai hatásán keresztül — nyert bizonyítást.

Az elmúlt 25 esztendőben számos *in vitro* és *in vivo* módszert használtak a hypothalamikus eredetű vagy más szöveti eredetű CRF aktivitás mérésére (Hiroshige és mtsai 1968; Portanova és Sayers 1973a; Saffran és mtsai 1973; Buckingham és Hodges 1977).

E módszerek, bár számos új adat és összefüggés felismeréséhez vezettek, sok kívánnivalót hagynak érzékenység, specificitás, egyszerűség szempontjából.

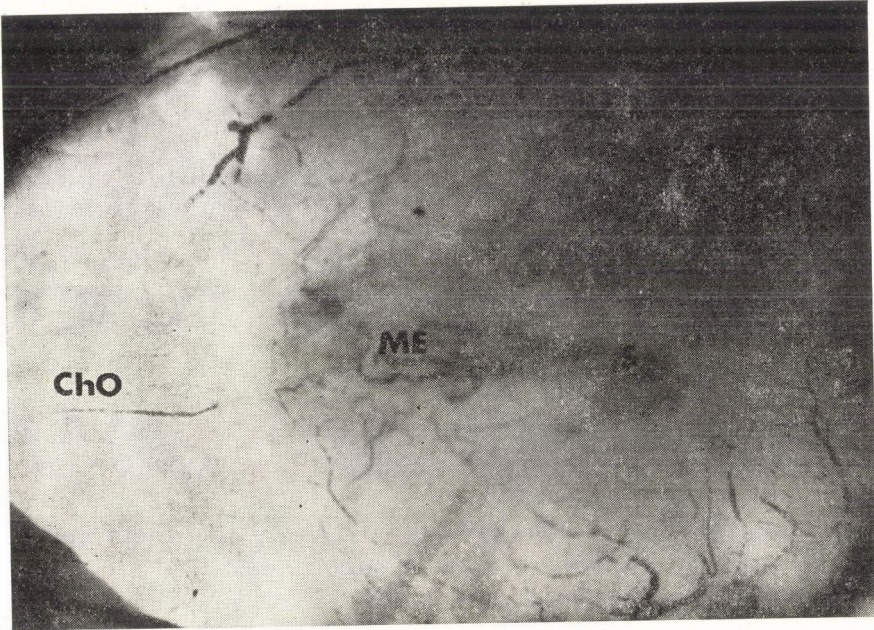
Laboratóriumunkban a 60-as évek elején eredményesnek bizonyult az az elképzelés, hogy a tenyésztett mellékvesekéreg sejtek által elválasztott és a tápfolyadékban mérhető corticoidok mennyisége jó mutatója mind a mellékvesekéreg sejtekkel együtt tenyésztett adenohypophysis sejtek ACTH elválasztásának, mind a tápfolyadékhoz tett különböző dóziszú ACTH-nak (Stark és mtsai 1965a, b).

Amikor az ACTH mennyiségének radioimmunoassay-vel való közvetlen mérése lehetővé vált, indokoltnak láttuk a stalk median eminence (SME) CRH tartalmát tenyésztett hypophysis sejtek ACTH elválasztásán mérni. Az általunk bevezetett CRF bioassay, mely lényegében megegyezik a Takebe és mtsai (1975) által időközben közölt módszerrel, bír némi technológiai előnnyel, és kielégíti egy bioassay-vel szemben támasztható legfontosabb igényeket.

### *Anyagok és módszerek*

*Pathány hypophysis monolayer tenyészetek készítése:* A laboratóriumban rutineljárásként alkalmazott szövettenyésztési technikát adaptáltuk a bioassay követelményeihez (Rappay és mtsai 1973). A 0,25%-os trypsinnel





1. ábra. A hypothalamus bazális felszíne ChO: chiasma opticum ME: eminentia mediana  
S: hypophysis nyél



2. ábra. A hypothalamus bazális felszíne az eminentia mediana kivétele után ChO: chiasma  
opticum V: III. agykamra; A nyíl az eminentia mediana helyére mutat



(Difco) CFY törzsű, kontroll patkányok (200—250 g) adenohipophysiséből nyert elülső lebény sejtszuszpenzió 1 ml-es aliquotját (kb.  $5 \times 10^5$  sejt/ml) soklyukú tálca (Multi-Dish Dispo-Trays, Linbro) edénykéibe mértük szét. A tenyészeteket 7—8 napig inkubáltuk foetális borjúsavót tartalmazó TC 199 tápfolyadékban 37°C-on 5% CO<sub>2</sub> tartalmú atmoszférában. A tápfolyadékot 48 óránként cseréltük.

*Patkány nyél-eminentia mediana (SME) kivonat készítése:* A hypophysis nyelet és az eminentia mediana-t együttesen távolítottuk el az állatok dekaptálását követően 2 percen belül (1, 2. ábra). A nyél 0,2 mm-es disztális végét mikromanipuláció útján leválasztottuk az MBH (medialis bazális hypothalamus) kimetszett darabjáról. Ezáltal a készítendő extraktum ACTH szennyezettsége minimálisra csökkenthető, s az így kapott SME preparátumot (fehérjegtartalom: 1 SME =  $30 \pm 1,8 \mu\text{g}$ ) mikrohomogenizátorban 40  $\mu\text{l}$  0,1 N HCl-el jégfürdőn homogenizáltuk. Legalább 1 óráig tartó extrahálás után a kivonatot lecentrifugáltuk (2000 rpm, 10 perc, 4°C), s a CRF aktivitású felülúszót polietilén mikrocövekben liofilizáltuk. Az ily módon készült SME preparátum érdelemes, a tesztelést zavaró ACTH szennyeződést nem tartalmaz, 1SME ACTH szennyezettsége  $\leq 200\text{pg}$ .

*CRF tartalom meghatározása:* A 7—8 napos elülső lebényből készült monolayer tenyészetekről leszívtuk a tápfolyadékot, a sejteket savómentes TC 199 tápfolyadékkal megmostuk, majd a tenyészetekhez random elrendezésben kontroll (SME nélküli), ill. az SME kivonat különböző mennyiségeit tartalmazó tápfolyadékot (2,5 mg/ml human szérum albumint (Calbiochem) tartalmazó TC 199) adtunk. A tenyészeteket 2 óráig 37°C-on 5% CO<sub>2</sub> tartalmú atmoszférában inkubáltuk. Ezt követően a tápfolyadékot műanyag hegyű mikropipettával polistiren csövekbe (Sterilin) szívtuk le, amelyekbe előzőleg 0,1 ml 0,5 M Sörensen foszfát puffert (pH 7,6) mértünk be. A leszívott tápfolyadékot lecentrifugáltuk, s a felülúszót az ACTH tartalom meghatározásáig —20 °C-on fagyasztva tároltuk. Az ACTH mennyiségét radioimmunoassay-vel (Rees és mtsai 1971; Stark és mtsai 1976) mértük. (Az ACTH előzetes extrahálását szükségtelenné tette az a tény, hogy tápfolyadék jelenlétében a dózishatás összefüggés egyértelmű volt.) Az elválasztott ACTH mennyiségét vagy az egyedi tenyészetekre (ng/ml), vagy azok sejtfehérje tartalmára (ng/100  $\mu\text{g}$ ) vonatkoztatva adtuk meg. A fehérjét Lowry (1951) módszerével határoztuk meg.

### Eredmények

A CRF bioassay pontossága és reprodukálhatósága szempontjából igen fontos, hogy egy adott sejtszuszpenzióból előállított egyedi tenyészetek kontroll ACTH elválasztása közel azonos legyen. Mivel tesztelésre 7—8 napos tenyészeteket használtunk, először önkontrollos kísérletben két napos időközökben

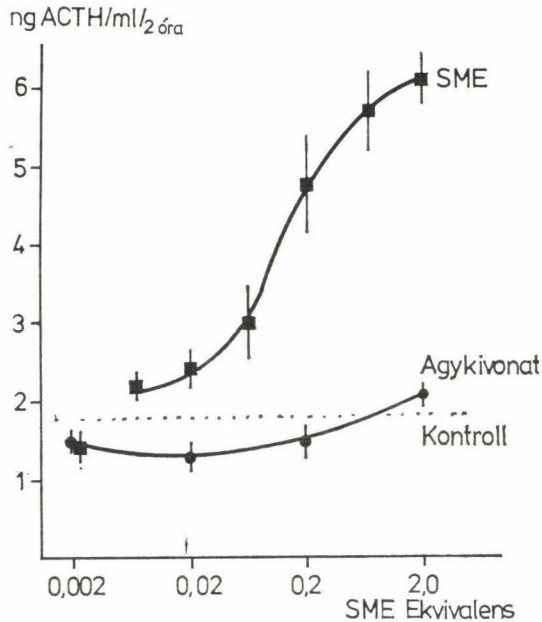
1. táblázat

*Hypophysis elülső lebeny tenyészetek ACTH elválasztása a kiültetéstől a tesztelésig*

Tenyészetek sorszáma	ng ACTH (tenyészet) 48 óra			
	0–2 nap	2–4 nap	4–6 nap	6–8 nap
1	0,9	1,2	1,7	2,9
2	1,3	1,4	2,4	3,0
3	1,0	1,1	1,8	4,0
$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$1,1 \pm 0,12$	$1,2 \pm 0,08$	$2,0 \pm 0,22$	$3,3 \pm 0,35$

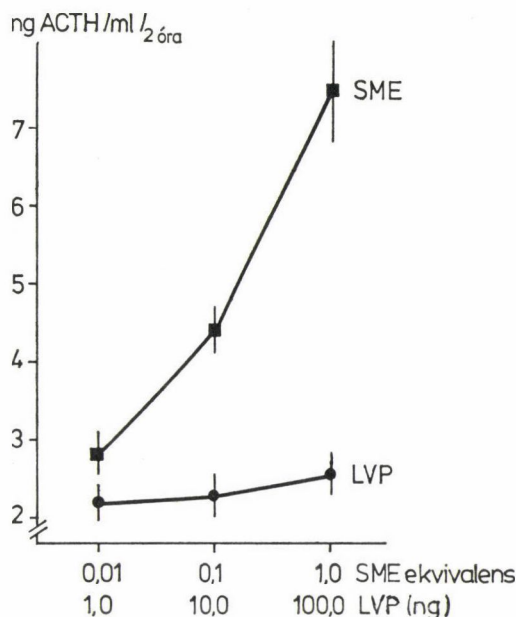
megvizsgáltuk, hogyan változik a nyugalmi ACTH elválasztás a kiültetéstől a tesztelésig (1. táblázat). Látható, hogy a tápfolyadékban mérhető ACTH mennyisége a 8. napig fokozatosan növekszik (későbbi időpontokban mérést nem végeztünk). Ezt követően meghatároztuk az egyazon sejtszuspenzióból származó 8 napos tenyészetek által 2 órás inkubálás alatt elválasztott ACTH mennyiségét. Eredményeink azt mutatták, hogy az egyedi tenyészetek hormontermelése egyöntetű (részletes kísérleti adatokat nem közlünk).

Miután előkísérletekben megállapítottuk az SME preparátum minimálisan hatásos dóziséját, többször megismételve meghatároztuk azt a dózistarto-



3. ábra. Kortikoliberin dózis-hatás görbe. 1 SME ekvivalens = egy nyél-eminencia mediana preparátumból készült CRF extraktum, ill. 1 SME fehérjeteralmának megfelelő  $(30 \pm 1,8 \mu\text{g})$  fehérjemennyiséget tartalmazó más (pl. agy) szövetkivonat. Az ábrán az  $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$  ( $n = 5$ ) értékeket tüntettük fel





4. ábra. Vazopresszin (LVP) hatása tenyésztett elülső lebeny hypophysis sejtek ACTH elválasztására. Az ábrán az  $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$  ( $n = 3$ ) értékeket tüntettük fel

mányt, amelyben az SME különböző dózisaival és az ACTH szekréció között kielégítő dózis-hatás összefüggés áll fenn. Mint a 3. ábra mutatja, 0,06 SME hatására az ACTH elválasztás fokozódik, s 0,06—2,0 SME dózistartományban a bioassay-re általában jellemző dózis-hatás összefüggés nyerhető. A módszer specifikusát jelzi, hogy ekvivalens fehérjemennyiséget tartalmazó agykivonat hígításával hasonló összefüggést nem kaptunk. Mivel vitatott, hogy az *in vivo* adott vazopresszin ACTH elválasztást fokozó hatása specifikus hatás-e, illetve kérdéses, hogy a vazopresszin önmagában rendelkezik-e CRF hatással, tesztrendszerünkben különböző dózisu lizin-vazopresszin hatásosságát is megvizsgáltuk. A 4. ábrán az látható, hogy 1 ng, 10 ng és 100 ng lizin-vazopresszin (LVP, Sigma) nem stimulálja a tenyésztett sejtek ACTH elválasztását. A referensként használt SME preparátum hatásossága az adott tesztrendszer válaszkészségét bizonyítja.

### Megbeszélés

Amíg a szintetikus előállított CRH segítségével lehetőség nyílik a releasing hormon tartalom közvetlen mérésére, szükségesek az anyag biológiai hatásán alapuló *in vivo* vagy *in vitro* módszerrel történő CRF aktivitás mérések.

A CRF aktivitás *in vivo* meghatározására több módszer ismeretes (Vernikos-Danellis 1964, Hedge és Yates 1965; Hiroshige és mtsai 1968). Az utóbbi két módszer kétségtelen előnyének látszik, hogy a CRF aktivitást hordozó

mintát élő állat hypophysisébe juttatva, s mérve az ACTH elválasztás fokozódását tükröző plazma kortikoszteron koncentrációt, az ismeretlen minta CRF aktivitására végül is a hypophysis-mellékvese rendszer in vivo aktivitásának fokozódásából következtetünk. Hátrányuk, hogy igen bonyolult mikrokirurgiai technikát igényelnek, s ily módon nagyszámú mintát csak igen fáradságos úton lehet meghatározni.

Az in vitro bioassay-ek (Portanova és Sayers 1973a; Saffran és mtsai 1973; Takebe és mtsai 1975; Buckingham és Hodges 1977) közös sajátága, hogy a CRF aktivitás indikátora a célszervből — hypophysisből — készített szövet-(inkubált hypophysis darabok), ill. sejtpreparátumok (hypophysis sejtszuszpenzió, monolayer tenyészet) ACTH elválasztásának dózistól függő fokozódása. Az elválasztott ACTH mennyiségének mérése történhet közvetve: szteroidogenetikus hatás mérésén alapuló bioassay-vel, redox assay-vel; és közvetlenül: radioimmunoassay-vel.

Úgy tűnik, hogy a tenyésztett hypophysis sejteket mint tesztrendszer és az ACTH radioimmunoassay-t mint specifikus hormonmérő módszert kombináló in vitro CRF bioassay előnyös tulajdonságokkal rendelkezik: (1) a tenyésztett sejtek specifikus stimulusra való válaszkészsége jobb, mint a többi in vitro hypophysis rendszeré, időben azonos az in vivo válaszadással (Takebe és mtsai 1975); (2) a sejteknek viszonylag nagy hányada a kezdeti sejtpusztulás után életben marad és hosszú időn át életképes is (Bácsy és mtsai 1976); (3) a tenyésztés tárgyi körülményei egyszerűek; (4) a tenyésztett sejtek felhasználása időbeli és pénzületi megtakarítás: a sejtszuszpenzióból sok párhuzamos tenyészet készíthető, s a tenyészetek tesztelésre ismételtelen felhasználhatók; (5) a radioimmunoassay segítségével nagyszámú minta ACTH tartalmát lehet viszonylag egyszerűen meghatározni; az alkalmazott ACTH antiszérum  $\alpha$  MSH-val 10% alatti keresztreakciót adott; az ily módon mért immunreaktív ACTH mennyisége jó egyezést mutat a tenyészetek által elválasztott biológiailag aktív ACTH mennyiségével, mely utóbbit esetenként Sayers és mtsai (1971) módszerével határoztuk meg; (6) a módszer specifitását illetően megállapítottuk, hogy lizin-vazopresszin nem stimulálja a tenyésztett sejtek ACTH elválasztását. Ez a megfigyelésünk megegyezik a Takebe és mtsai (1975) által közölt adatokkal, de ellentmond — feltehetőleg az in vitro rendszerek különbözősége miatt — a Portanova és Sayers (1973b) által korábban tett megállapításnak, miszerint a vazopresszin képes akut hypophysis sejtszuszpenzió ACTH elválasztását fokozni. Adataink inkább arra utalnak, hogy a vazopresszin önmagában nem CRF aktivitású anyag.

Mint hogy az általunk bevezetett CRF bioassay lényegében megegyezik a Takebe és mtsai (1975) által közölt módszerrel, külön is érdemes kitérni arra, hogy a kisebb eltérések milyen előnyökkel járnak: (1) a soklyukú tálcák felhasználásával sikerült a tenyésztést miniaturizálni és technikailag egyszerűsíteni; (2) jóval kevesebb (kb. 30%) sejt elegendő egyetlen minta tesztelésére. A kisebb



sejtszám ellenére maximális stimulusra (2SME) a 2 órás inkubálás alatt elválasztott ACTH mennyisége a bazális érték 5—10 szerese; (3) egy további lényeges különbség az, hogy az általunk használt SME preparátum zavaró ACTH szennyeződést nem tartalmaz. Ennek magyarázata az, hogy a bazális hypothalamus jól definiált része kerül kimetszésre, amely csak a neuroszekretoros sejtek preszinaptikus rostjait és szinaptikus végződéseit tartalmazza. Az SME preparátum nagy fajlagos aktivitása igen fontos, különösen ha különböző eredetű minták (pl. neurohypophysis, plazma stb.) CRF aktivitását hasonlítjuk össze.

Eredményeinket összefoglalva megállapítható, hogy a CRF aktivitás meghatározására leírt bioassay alkalmas egyetlen SME preparátum CRF tartalmának több hígításban történő pontos, specifikus mérésére. A módszer segítségével új lehetőségek nyílnak a CRF-ACTH elválasztás szabályozásának kísérletes vizsgálatára.

### Összefoglalás

A szerzők érzékeny és specifikus bioassay-t dolgoztak ki CRF aktivitás meghatározására. A tesztrendszerként használt patkány elülső lebeny monolayer tenyészet homogén, CRF kivonatra adott specifikus válaszkészsége a tenyésztés folyamán megmarad. CRF tartalmú SME preparátum hatására a tenyésztett sejtek ACTH elválasztása dózistól függő. A beállított bioassay érzékenysége 0,06 SME ekvivalens, ami lehetővé teszi egyetlen nyél-eminencia mediana preparátum CRF tartalmának több hígításban történő pontos mérését.

Szerzők köszönetüket fejezik ki Garamvölgyi Veronikának, Deák József-nének és Szabó Ilonának értékes technikai segítségükért.

### IRODALOM

- Bácsy, E., Tougard, C., Tixier-Vidal, A., Marton, J. és Stark, E.: *Histochemistry*, **50**, 161 (1976).
- Buckingham, J. C. és Hodges, J. R.: *J. Endocrinol.* **72**, 187 (1977).
- Hedge, G. A. és Yates, F. E.: *Abstract. Fed. Proc.* **24**, 128 (1965).
- Hiroshige, T., Kunita, H., Yoshimura, K. és Itoh, S.: *Jap. J. Physiol.* **18**, 179 (1968).
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. és Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- Portanova, R. és Sayers, G.: *Neuroendocrinology*, **12**, 236 (1973a).
- Portanova, R. és Sayers, G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **143**, 661 (1973b).
- Rappay, G., Gyévai, A., Kondics, L. és Stark, E.: *In vitro*, **8**, 301 (1973).
- Rees, L. H., Cook, D. M., Kendall, J. W., Allen, C. F., Kramer, R. M., Ratchliffe, J. G. és Knight, R. A.: *Endocrinology*, **89**, 254 (1971).
- Saffran, M. és Schally, A. V.: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **33**, 408 (1955).
- Saffran, M., Pearlmutter, A. F. és Rapino, E.: *In vitro assays for corticotropin-releasing factors*. In: *Brain-pituitary-adrenal interrelationships* (Brodish and Redgate eds.) pp. 47—56. Karger, Basel 1973.
- Sayers, G., Swallow, R. L. és Giordano, N. D.: *Endocrinology*, **88**, 1063 (1971).
- Stark, E., Gyévai, A., Szalay, K. és Ács, Zs.: *Canad. J. Physiol. Pharmacol.* **43**, 1 (1965a).
- Stark, E., Gyévai, A., Szalay, K. és Pósalaky, Z.: *J. Endocrin.* **31**, 291 (1965b).
- Stark, E., Kárteszi, M., Gyévai, A. és Bukulya, B.: *Biológia*, **24**, 9 (1976).
- Takebe, K., Yasuda, N. és Greer, M. A.: *Endocrinology*, **97**, 1248 (1975).
- Vernikos-Danellis, J.: *Endocrinology*, **75**, 514 (1964).