Semmelweis Orvostudományi Egyetem Élettani Intézete, Budapest

ALDOSTERON ÉS CORTICOSTERON FEHÉRJE KÖTÉSES MEGHATÁROZÁSA PATKÁNY MELLÉKVESE VÉNÁS VÉRBEN

SPÄT ANDRÁS*

Közlésre érkezett: 1973. IX. 16.

Az immár 15 éves hazai aldosteron kutatás számos olyan eredménnyel büszkélkedhet, amelyet a nemzetközi szakirodalom rendszeresen idéz. E munkák javarésze tetrazólium kék reakción alapuló aldosteron meghatározással készült. Kísérleti lehetőségeinknek azonban e módszer alacsony érzékenysége (fél—egy mikrogramm) szűk határt szabott; specifitása pedig a mai nemzetközi követelményeket nem éri el. Ezért vált elengedhetetlenül szükségessé egy, nemzetközi mércével is korszerű aldosteron analysis beállítása.

A hatvanas évek nagy érzékenységű és fajlagosságú ultramikroanalitikai módszere az ún. kettős izotóp hígításos derivatív módszer volt. A kettős izotópos módszerek műszer és izotóp igénye, ill. a kémiai feladatok nagysága e módszerek európai elterjedésének szűk határt szabtak.

Elvileg új lehetőség nyílott az aldosteron meghatározásban az 1970-es esztendőben, amikoris *Mayes* és mtsai, ill. *Bayard* és mtsai radioimmunoassay módszert dolgoztak ki az emberi plasma aldosteron tartalmának meghatározására. Az új eljárás érzékenysége és specifitása a legérzékenyebb kettős izotóp módszerekével azonos, technikailag viszont lényegesen elérhetőbbnek ígérkezett. Ezért — e fenti két közlemény útmutatása alapján — laboratóriumunkban már 1970 őszén elkezdtük az aldosteron radioimmunoassay adaptálását *patkány* mellékvese vénás vér aldosteron tartalmának meghatározásához.

A jelen dolgozatban patkány mellékvese vénás vér aldosteron tartalmának radioimmunoassay módszerével történő meghatározásáról számolunk be. Élettani meggondolások szükségessé teszik a patkány fő glykocorticoid hormonjának, a corticosteronnak párhuzamos meghatározását is. Korábban módszert dolgoztunk ki (*Spät* és *Józan*, 1972) a peripheriás plasma corticosteron tartalmának kompetitív fehérje kötéses analysisére, az aldosteron radioimmunoassay beállítása során azonban korábbi módszerünket némileg módosítanunk kellett. Ezért az alábbiakban a corticosteron meghatározás főbb lépéseit is leírjuk.

A Magyar Élettani Társaság Farkas Géza emlékpályázatára 1973. márc. 1-én beküldött díjnyertes pályamű.

Módszerek

Mellékvese vénás vér gyűjtése

Mellékvese vénás vért semiszintetikus táplálékon (Na^+ : 165 maeq/kg, K^+ : 150 maeq/kg) tartott, nembutállal altatott hím patkányokban gyűjtöttünk. Az I. kísérletsorozatban (6 darab, 205—230 gramm súlyú patkány) a gyűjtést korábban leírt módszerünkkel (*Spät* és mtsai, 1967) végeztük. A II. kísérletsorozatban (5 darab, 180—250 gramm súlyú állat) a mellékvese vénás vért *Vogt* (1954) módszerével gyűjtöttük. Mindkét kísérletsorozatban a 30. és 150. másodperc között gyűjtött mintát használtuk fel hormon-meghatározásra.

Kísérleti anyagok

Az analitikai tisztaságú diklórmetánt, ethanolt, methanolt, toluolt, chloroformot, hexánt, benzolt és formamidot *Bush* (1961) szerint tovább tisztítottuk. A florisilt (60/100 mesh) *Rittel* és mtsai (1952) szerint tisztítottuk és aktiváltuk.

Az 1-es és 2-es szénatomon tritiált aldosteront (54 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, Mass.), ill. corticosteront (31 Ci/mmol, Radiochemical Centre, Amersham) vékonyréteg kromatográfiával tisztítottuk, kettő, ill. négy hetenként, chloroform-aceton-ecetsav (100 : 40 : 2,5) rendszerrel (*Spät* és *Józan*, 1972). A tritiált szteroidok radiokémiai tisztaságát papírkromatográfiásan ellenőriztük, Bush B5 és/vagy E_2B és/vagy formamid-benzol rendszerben.

Az üvegeszközöket krómkénsavval vagy methanollal mostuk.

Extrakció

Az extrakció előtt, az analitikai veszteség ellenőrzésére, nyomjelző mennyiségű tritiált aldosteront és corticosteront adtunk a mintákhoz. A mintát 20 vol. hideg diklórmetánnal extraháltuk. A diklórmetános fázist 0,8 vol 0,1 N NaOH-val, 0,8 vol 0,1 M ecetsavval, majd desztillált vízzel mostuk. Nátriumszulfátos szárítás után az anyagot szilikonozott csőben, nitrogén áram segítségével szárazra pároltuk. Az I. kísérletsorozatban az apoláris lipideket 70% methanol és toluol-hexán (1 : 9) közötti particionálással távolítottuk el.

Vékonyréteg kromatográfia

A corticosteroidokat 0,3 mm vastag, 0,5% Leuchtpigment (Riedel-de-Haen) tartalmú Kieselgel G rétegen választottuk szét. A lemezeket 110° C-on, 40 percig aktiváltuk. A szárazra párolt mintákat 0,05% ecetsavat tartalmazó diklórmetánban vittük fel a rétegre. A kromatogrammot chloroform-aceton-ecetsav (100 : 40 : 2,5) rendszerrel, sandwich technikával, 12,5 cm magasra futtattuk. Az átlagos R_f értékek a következők voltak: aldosteron: 0,2, corticosteron: 0,4, DOC: 0,6 és progesteron: 0,7. A szteroidokat párhuzamosan futtatott standardok UV absorptiója (254 nm) alapján lokalizáltuk. Az aldosteronnak, ill. corticosteronnak megfelelő foltokat lekapartuk, eluálásukhoz 100 μl 50% ethanolt és 2×1 ml chloroformot használtunk. A kombinált szerves fázist szilikonozott csőben, nitrogén alatt bepároltuk és szükség esetén néhány csepp toluol alatt, —20° C-on tároltuk.

Az assay előtt az aldosteront 1,1 ml ethanolban oldottuk. Ebből 0,25 ml-t visszanyerés-meghatározás céljából 10 ml, PPO—POPOP-toluol-dioxán tartalmú szcintilláló folyadékba vittünk, míg egy 0,25 ml-es és egy 0,50 ml-es aliquot assay-re került. A corticosteront diklórmetán-methanol 1 : 1 arányú keverékben eluáltuk. Az eluátum egy részét visszanyerés-meghatározásra, két egymástól eltérő térfogatú részét pedig assay-hez használtuk. E két aliquot mennyiségét úgy választottuk meg, hogy feltételezett corticosteron tartalmuk a kalibrációs görbe megbízható szakaszára essék.

Aldosteron assay

Az aldosteron ellenanyagot dr. Sylvia A. S. Tait (The Middlesex Hospital Medical School, London) ajándékozta, akinek ezúton is kifejezzük köszönetünket. Az eredeti szérumot (1 : 100 hígítás, 4% bovin serum albumint és 0,1% nátriumazidot tartalmazó, pH 7-es 0,15 M foszfát pufferben) kisebb térfogatokra osztottuk, nitrogén alatt ampulláztuk és —20 °C-on tároltuk. Az 1 : 500 hígítású „munka"-törzsoldatot 4 °C-on tartottuk.

Az inkubáló (kötő) oldat 1 : 100 000 rész serumot, 0,1% bovin serum albumint (V. fractio, Calbiochem), 0,5% gamma globulint (Humán) és 0,1% NaN_3-ot tartalmazott pH 8,0-as 0,05 M borát pufferben. A minta kivonatát, ill. a standardokat (0—800 pg) tartalmazó centrifuga csövekhez 5 000 dpm ^{3}H-aldosteront adtunk. Az ethanolt nitrogénnel elpároltuk és minden csőhöz 250 μl inkubáló oldatot adtunk. Harminc percig szobahőmérsékleten, majd egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltunk.

A kötött és szabad aldosteron szétválasztását a szteroid-protein komplex precipitációjával végeztük. A komplex disszociációjának lassítására a további műveleteket 1—3 °C-on végeztük. A mintákhoz 250 μl hideg, telített ammoniumszulfátot adtunk. A csöveket örvény-keverővel (vortex) összeráztuk, majd 5 000 *g* centrifugális erővel 2 percig centrifugáltuk. A felülúszóból 300 μl-t egy másik centrifugacsőbe vittünk, az albumint és ammoniumszulfátot ethanollal precipitáltuk, majd az alkoholos supernatanst tritium leolvasás céljából szcintilláló folyadékba vittük át (PPO—POPOP-toluol-dioxán).

Corticosteron assay

A kötő oldat 100 ml-enként 2—4 μCi ^{3}H-corticosteront, 0,4 ml ethanolt és 2 ml egér szérumot tartalmazott. (Az egér szérum olyan transcortint tartalmaz, amelynek corticosteron-kötő specificitása igen kedvező (*Murphy*, 1967).) Az ún. protein-mentes oldat összetétele ugyanilyen volt, de az szérumot nem tartalmazott. A dugós csövekben szárazra párolt mintákra, ill. standardokra 1—1 ml kötő oldatot, két üres csőre pedig 1—1 ml protein-mentes oldatot mértünk. (A protein-mentes oldattal a Florisil corticosteron-adsorbeáló aktivitását kísérletsorozatonként ellenőrizhettük.) A csöveket 5 percig 38° C-on inkubáltuk, majd jégfürdőben lehűtöttük.

A kötött és szabad corticosteron szétválasztását a szabad hormon adszorbeálásával végeztük. A csövekhez 43 mg Florisilt adtunk. 120 másodperces intenzív rázás után — mely alatt a Florisil a szabad hormont adszorbeálta — 3000 *g*-vel fél percig centrifugáltuk (1° C) és 0,5 ml felülúszót közvetlenül 10 ml szcintilláló oldatba (*Bruno* és *Christian*, 1961) vittünk át.

A radioaktivitás meghatározása és számolás

A tritium aktivitást Packard gyártmányú, 3375 vagy 3380 típusú Tricarb folyadékszcintillációs spektrométerrel határoztuk meg. A mérési idő 2×20 perc volt (preset count: 10 000). A mérés hatásfokát minden egyes mintánál automata külső standardizálás segítségével állapítottuk meg és ennek alapján számítottuk ki a minta abszolút aktivitását (dpm).

A ^{3}H-aldosteron szabad frakciójának kiszámításánál figyelembe vettük azt a tritium aktivitást, amely a visszanyerés-ellenőrzésből mazadt:

$$\text{szabad } ^3\text{H-aldosteron } (\%) = \frac{10 \times S}{6\,(T + q \times R)} \times 100,$$

ahol S = 0,3 ml felülúszó abszolút aktivitása, T = 0,25 ml kötő oldat abszolút aktivitása, R = a vékonyréteg kromatográfia után visszanyerés-meghatározásra levett aliquot abszolút aktivitása és *q* faktor azt fejezi ki, hogy az assay-hez vett aliquot hányszorosa a visszanyerés meghatározásához vett aliquotnak.

A kötött corticosteron frakció kiszámításánál a fenti típusú korrekción kívül figyelembe vettük a florisil adszorpció hatásfokát is (*Spät* és *Józan*, 1972).

1. ábra. Típusos aldosteron kalibrációs görbe. Abszcissza: bevitt aldosteron (pg), ordináta: szabad ^{3}H-aldosteron (%)

2. ábra. Típusos corticosteron kalibrációs görbe. Abszcissza: bevitt corticosteron (ng), ordináta: kötött ^{3}H-corticosteron (%)

Az egyes minták abszolút aktivitását, a visszanyerés mértékét és a szabad, ill. kötött hormonfrakciók százalékos arányát Hewlett Packard 9100B típusú asztali számítógéppel számoltuk ki.

A kalibrációs görbéket oly módon szerkesztettük, hogy a hideg (standard) szteroid mennyiségével szemben ábrázoltuk a szabad aldosteron *(1. ábra)*, ill. a kötött corticosteron *(2. ábra)* százalékos arányát. Az eredeti mintában levő hormonmennyiség kiszámításánál figyelembe vettük a mért analitikai veszteséget, de nem korrigáltunk a vakra.

Eredmények

Módszerünk megbízhatóságát annak pontosságával (accuracy), reprodukálhatóságával (precision), érzékenységével és specificitásával jellemezhetjük.

Pontosság

A módszer pontosságát (tehát annak mértékét, hogy a mért eredmény hogyan egyezik a valódi értékkel) oly módon határoztuk meg, hogy ismert mennyiségű aldosteront és corticosteront adtunk 0,5 ml, albumin tartalmú foszfát pufferhez és elvégeztük a teljes analízist. A 0,5 és 2,7 nanogramm közötti tartományban a mért aldosteron (ng) = $1{,}036x - 0{,}058$, ahol x = bevitt aldosteron (ng). A 10-től 150 ng-ig terjedő sávban a mért corticosteron (ng) = $1{,}022x + 2{,}786$, ahol x = bevitt corticosteron (ng). *(3. és 4. ábra)*

3. ábra. Az aldosteron analízis pontossága. Abszcissza: bevitt, ordináta: mért aldosteron (ng).

4. ábra. A cortisteron analízis pontossága. Abszcissza: bevitt, ordináta: mért corticosteron (ng).

Reprodukálhatóság

A módszer reprodukálhatóságát szintetikus szteroidokkal kiegészített plasma-minták ismételt analízisével ellenőriztük. Az átlagos variációs koefficiens az aldosteron meghatározásnál 13,1%, a corticosteronnál 7,3% volt *(5. ábra)*.

5. ábra. A módszer reprodukálhatósága: plasma-minták ismételt analízisének eredményei.

Vak

Fél milliliter, humán albumint tartalmazó foszfát puffer aldosteron tartalmát 91±25 pikogrammnak (S. E., $n = 6$), corticosteron tartalmát 0,54±0,23 nanogrammnak (S. E., $n = 8$) határoztuk meg. (Ezeket az értékeket az analitikai veszteség figyelembevételével számítottuk ki.)

Érzékenység

A mintában levő legkisebb mennyiséget, amely szignifikánsan különbözik zérótól, a vak felső konfidencia limitje és a 2., ill. 3. ábrán szereplő regressziós egyenes pesszimális konfidencia limitje alapján számítottuk ki. Eszerint az aldosteron meghatározás érzékenysége kb. 0,3 ng, a corticosteroné pedig 0,6 ng.

Specifitás

Dr. G. Williams (Peter Bent Brigham Hospital, Boston, Mass.) vizsgálata szerint az általunk használt ellenanyag 1%-nál kisebb kereszt reakciót mutatott corticosteronnal, 18-hydroxy-corticosteronnal és 18-hydroxy-DOC-kal szemben. A teljes analízis specificitását saját magunk úgy vizsgáltuk, hogy 1 μg corticosteront, vagy progesteront, vagy DOC-ot, vagy 5 μg aldosteront tartalmazó albuminos puffermintákat ($n = 2$) határoztunk meg aldosteronra és corticosteronra. Az eredményeket az *I. táblázat*ban összegeztük.

I. táblázat

Specificitás vizsgálat

Bevitt szteroid*	Mért	
	aldosteron (ng)	corticosteron (ng)
1 μg corticosteron	0,06	—
1 μg DOC	0,16	2,9
1 μg progesteron	0,37	0
5 μg aldosteron	—	1,7

* A szteroid standardokat nem tisztítottuk.

Hormon szekréciós értékek

Az I. kísérletsorozatban a mellékvese vénás vért *Spät* és mtsai (1967) módszerével gyűjtöttük. Az aldosteron szekréciós értékek 0,38 és 2,23 ng/100 g/min közé estek ($n = 5$). A közös ketrecből egymás után kivett állatok corticosteron szekréciója folyamatosan emelkedett *(II. tábl.)*.

II. táblázat

Normál, műtött patkányok aldosteron és corticosteron szekréciója. A mellékvese vénás vért Spät és mtsai (1967) módszerével gyűjtöttük.

Az altatás időpontja	9,20	10,00	11,25	12,13	12,45	13,20
Aldosteron (ng/100 g/min)	0,38	0,41	2,23	0,99	0,99	—
Corticosteron (ng/100 g/min)	100	120	131	245	293	357

Az előbbi értékekhez hasonló aldosteron szekréciót mértünk a II. kísérletsorozatban (0,52 — 1,40 ng/100 g/min, $n = 5$), ahol a vért *Vogt* (1954) módszerével gyűjtöttük. A corticosteron szekréciós értékek 317 és 610 ng/100 g/min közé estek *(III. tábl.)*.

III. táblázat

Normál, műtött patkányok aldosteron és corticosteron szekréciója. A mellékvese vénás vért Vogt (1954) módszerével gyűjtöttük.

Az altatás időpontja	9,18	10,44	11,30	12,16	13,24
Aldosteron (ng/100 g/min)	0,80	0,52	0,84	0,72	1,40
Corticosteron (ng/100 g/min)	349	378	317	374	610

Megbeszélés

Az eddig előállított aldosteron ellenanyagok specificitása ugyan általában igen jó; az aldosteront mindazonáltal, elenyészően kis plasma-koncentrációja miatt, a többi corticosteroidtól az assay-t megelőzően el kell választani. A megfelelő kromatográfiás rendszer kiválasztása az egész analízisnek talán legnehezebb feladata: a más szempontból megfelelő kromatográfiás rendszerhez használt oldószerek gyakran megzavarják a szteroid és a kötő fehérje közötti egyensúly létrejöttét *(6. ábra)*. Emberi plasma aldosteron tartalmának radioimmunoassay meghatározásához a szerzők többsége (*Bayard* és mtsai, 1970;

6. ábra. A corticosteron assay-t megelőző formamid-benzol rendszerű papírkromatográfiából, egy particiós típusú tisztítás után nyomokban visszamaradó formamid hatása az assay-re. Abszcissza: az assay-cső corticosteron tartalma. x-szel a standard corticosteront jelöltük (kalibrációs görbe) A körök vonatkoznak a kromatografált mintákra, ezek mennyiségét a kiindulási mennyiség és a mért visszanyerés alapján számítottuk ki. Ordináta: kötött ^{3}H-corticosteron (%). (A kötő oldat 2,5% egér szérumot tartalmazott.)

Banks és mtsai, 1971; *Underwood* és *Williams*, 1972; *Ito* és mtsai, 1972) papírkromatográfiát használ. *Mayes* és mtsai (1970) a papírkromatográfia előtt, a vak csökkentése céljából, oszlopon is kromatografálnak. *Ito* és mtsai (1972) Sephadex LH20-as oszlopkromatográfia sikeres használatáról számoltak be.

Az általunk kidolgozott vékonyréteg kromatográfiás rendszer a patkány mellékvese által szekretált szteroidokat jól szétválasztja és egyenletes futást biztosít. A foltokat UV fényben lokalizált, párhuzamosan futtatott standardok alapján kaparjuk le. Ily módon a chromatogram scanner használata nem szükséges. Irodalmi adatok szerint (*Murphy*, 1970; *Vermeulen* és *Verdonck*, 1970 stb.)

szteroidok kompetitív fehérje kötéses analízisében papírkromatográfiás szétválasztással alacsonyabb vak értékek nyerhetők, mint vékonyréteggel. A megbízhatóbb lokalizáció és a könnyebb kezelhetőség miatt választottuk mégis a vékonyréteg kromatográfiát a szteroidok szétválasztására. Frissen desztillált szerves oldószerekkel és 1/200 000 rész szérumot tartalmazó kötő oldattal sikerült az aldosteron vak értékét ismételhetően 20 pikogramm körüli értékre csökkentenünk. Ha a vékonyréteg kromatográfia E_2B típusú papírkromatográfiás szétválasztást, ill. a vékonyréteg után még kovasavas oszlopkromatográfiás tisztítást is végeztünk, a vak értékét alacsonyabb értékre leszorítanunk már nem sikerült.

7. ábra. Az assay előtt alkalmazott methanol hatása az aldosteron assay-re. A mintát diklórmetán-methanol (1 : 1) keverékkel vittük a rétegre, majd a kromatográfia utáni száraz maradékot ugyanebben az oldószerben vittük át az assay-csövekbe. Abszcissza: az assay-cső aldosteron tartalma (x = standard, kör a számított érték [l. 6. ábra magyarázatát!]). (A szabad és kötött aldosteron szeparálása toluolos extrakcióval történt.)

Módszerünk megbízhatóságának előfeltételei a következők:

1. a tritiált szteroidok megfelelő tisztítása, enélkül a visszanyerést könnyen alulértékeljük;

2. a szerves oldószerek intenzív tisztítása. Az előbbiekben említett 20 pg-os vakot pl. csak úgy tudtuk elérni, hogy a szerves oldószerek közül addig egyedül nem tisztított ethanolt (p. a.) is intenzíven tovább tisztítottuk;

3. az aldosteron analízisben a methanol elhagyása a szárazra párlással járó lépések előtt. Ellenkező esetben az aldosteron jelentős része az eljárás során átalakul és a szokásos koncentrációban nem tudja a tritiált aldosteront a receptorról leszorítani *(7. ábra)*.

4. a szárazra párláshoz szilikonozott csöveket kell használni, ez csökkenti az adszorpcióból eredő veszteséget és talán az üvegfelületen bekövetkező kémiai átalakulások mértékét is;

5. az extrakció során alkalmazott lúgot tökéletesen el kell távolítani. Enélkül a bepárlás során keletkező erősen lúgos közegben a szteroid kettes és

IV.

Aldosteron és corticosteron

Szerző	Nem*	Testsúly (g)	Táplálék		Altatás
			Na+ maeq/kg	K+ maeq/kg	
Eilers és Peterson, 1964	n	175—200	—	—	aether
Cade és Perenich, 1965	h	—	293	—	aether
Palmore és Mulrow, 1967	h	150—200	103	114	—
Dufau és Kliman, 1968	h	350—450	8,5(?)	—	nembutal
Kinson és Singer, 1969	h	168—240	67	45	aether—nembutal
Abbott és mtsai, 1972	h	400—528	220	250	nembutal
Melby és mtsai, **1972	n	180—200	—	—	nembutal
saját mérés					
I. kísérlet	h	205—230	165	150	nembutal
II. kísérlet	h	180—250	165	150	nembutal

* n = nőstény, h = hím

** Aldosteron analízis radioimmunoassay-vel. A technika részletei még nem elérhetőek.

hármas szénatomján enol-keto tautoméria léphet fel, a tritium stabil protonra cserélődik ki és ezért a visszanyerést alulértékeljük.

6. a tritium-mérési hibák minimalizálása érdekében el kell kerülni a szcintilláló oldatban bekövetkező kicsapódásokat. Módszerünknél az albumin és az ammónium szulfát csapódnék ki a szcintilláló oldatban. Az előzetes alkoholos precipitálás ezt a problémát relatíve egyszerűen és a külföldi szolubilizáló vegyszerek használatánál olcsóbban küszöbölte ki.

Az 1/200 000 rész szérumot tartalmazó inkubáló oldat használata esetén kifogástalan kalibrációs görbéket nyertünk a 0—150 pikogrammos tartományban, de e fenti szempontok betartása esetén sem tudtuk az analízis pontosságát (50—350 pg között) reprodukálhatóan biztosítani. Ezért tértünk át e „túlérzékeny" kötő oldat használatáról a jelenlegi, 1/100 000 részt tartalmazó oldat használatára. Az így elért pontosság és reprodukálhatóság az irodalmi adatokkal megegyezik. A vak értéke magasabb, mint amilyenről *Mayes* és mtsai (1970), *Banks* és mtsai (1971), *Underwood* és *Williams* (1972), valamint *Ito* és mtsai (1972) beszámoltak és megegyezik *Bayard* és mtsai (1970) értékeivel E vak még mindig kellően alacsony ahhoz, hogy a patkány mellékvese vénás vért megbízhatóan analizálhassuk.

Az *in vivo* hormon szekréciót kétféle vérgyűjtési mód alkalmazásával is vizsgáltuk. A két sorozatban lényegében azonos aldosteron szekréciós értékeket mértünk. Különböző laboratóriumokban, kettős izotóp derivatív technikával mért aldosteron szekréciós értékeket gyűjtöttünk össze a IV. táblázatban. Mi ezen adatok többségénél némileg alacsonyabb értékeket mértünk. Ennek oka valószínűleg az, hogy az általunk alkalmazott igen rövid (2 perces) vérgyűjtéssel sikerült az aldosteron szekréciót alapszinten tartanunk. Az aldos-

táblázat

szekréció a patkányban (átlag ± S. E.)

Véráramlás µl/min	Minta	Aldosteron		Corticosteron	
		ng/min	ng/100 g/min	ng/min	ng/100 g/min
90	vér	2,20±0,23	—	1000±110	—
210±30	vér	—	3,3±0,6	—	630±80
—	plasma	4,0±0,5	—	1036±90	—
16—30	vér	2,2±0,54	—	220±36	—
80—270	vér	—	1,57±0,37	—	518±23
—	plasma	2,82±0,19	—	583±94	—
—	plasma	0,84±0,09	—	440±30	—
57—237	vér	2,10±0,68	1,00±0,34	211—821	100—357
105—420	vér	1,78±0,23	0,86±0,13	680—1099	317—610

teron szekréció mértékét természetesen más tényezők is befolyásolhatják (nátrium és kálium bevitel, altatás módja, stb.).

A corticosteron szekréciós értékeink az irodalmi range-be esnek.

Összefoglalás

Módszert ismertetünk patkány mellékvese vénás vér aldosteron és corticosteron tartalmának egyidejű meghatározására. Az extrakciót és vékonyréteg kromatográfiás szétválasztást követően az aldosteront radioimmunoassay-vel, a corticosteront kompetitív fehérje kötéses módszerrel határozzuk meg. Az aldosteron (0,5—2,7 nanogramm) és a corticosteron (10—150 nanogramm) analízis pontossága közel 100%. A módszer megbízhatóságát a megfelelő reprodukálhatóság, érzékenység és fajlagosság is jellemzi. Részletesen ismertettük a megbízható analízis előfeltételeit. Módszerünk alkalmas az egy perc alatt gyűjtött mellékvese vénás vér hormon-tartalmának meghatározására.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Módszerünk kidolgozását és kiértékelését számos kutató értékes segítsége vagy tanácsa tette lehetővé. Ehelyen is megköszönjük prof. dr. Zsebők Zoltán és Szy Dénes (SOTE Radiológiai Klinika), dr. Pethes György és dr. dr. Dömötör Edit (Állatorvostudományi Egyetem Élettani Intézete), valamint prof. dr. Antoni Ferenc és dr. Garzó Tamás (SOTE Orvosi Vegytani Intézet) segítségét, amely a folyadékszcintillációs tritium-méréseket lehetővé tette. A computer programokat Szutrély Judit és Kanyár Béla (SOTE Számítástechnikai Központ) voltak szívesek elkészíteni. A Hewlett—Packard

9100B computer használatáért dr. Tarján Imre és dr. Turchányi György professzor urakat (SOTE Biofizikai Intézet) illeti köszönet. A statisztikai számítások elvégzéséhez Hajtmann Bélától (SOTE Biofizikai Intézet) és dr. Harza Tibortól (SOTE Élettani Intézet) kaptam értékes tanácsokat. Az ellenőrző vizsgálatokhoz használt humán albumint dr. Richter Péter (Humán Oltóanyagtermelő és Kutató Intézet, Bp.) bocsátotta rendelkezésemre.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm Józan Miklósné lelkes és megbízható technikai segítségét, amelynek eredményeink elérésében fontos része van.

IRODALOM

Abbott, E. C., James, V. H. T., Parker, R. A., Peart, W. S. és *Fraser, R.:* Hormones **3,** 129 (1972).
Banks, P., Ekins, R. P. és *Slater, J. D. H.:* Acta endocrin. (Kbh.) **67** Suppl. **155,** 94 (1971).
Bayard, F., Beitins, I. Z., Kowarski, A. és *Migeon, C. J.:* J. clin. Endocrin. **31,** 1 (1970).
Bruno, G. A. és *Christian, J. E.:* Anal. Chem. **33,** 1216 (1961).
Bush., I. E.: The Chromatography of Steroids. Pergamon Press, Oxford, p. 347 (1961).
Cade, R. és *Perenich, T.:* Amer. J. Physiol. **208,** 1026 (1965).
Dufau, M. L. és *Kliman, B.:* Endocrinology **82,** 29 (1968).
Eilers, E. A. és *Peterson, R. E.:* in *Aldosterone* (Eds.: Baulieu, E. E., Robel, P.) Blackwell, Oxford, p. 251 (1964).
Ito, T., Woo, J., Haning, R. és *Horton, R.:* J. clin. Endocrin. **34,** 106 (1972).
Kinson, G. A. és *Singer, B.:* Acta endocrin. (Kbh.) **61,** 239 (1969).
Mayes, D., Furuyama, S., Kem, D. C. és *Nugent, C. A.:* J. clin. Endocrin. **30,** 682 (1970).
Melby, J. C., Dale, S. L., Grekin, R. J., Gaunt, R. és *Wilson, T. E.:* Rec. Progr. Horm. Res. **28,** 287 (1972).
Murphy, B. E. P.: J. clin. Endocrin. **27,** 973 (1967).
Murphy, B. E. P.: In: Steroid Assay by Protein Binding (Ed.: Diczfalusy, E.). Karolinska Symposia II. Stockholm, p. 37 (1970).
Palmore, W. P. és *Mulrow, P. J.:* Science **158,** 1482 (1967).
Rittel, W., Hunger, A. és *Reichstein, T.:* Helv. chim. Acta **35,** 434 (1952).
Spät, A. és *Józan, S.* : J. Steroid Biochem. **3,** 755 (1972).
Spät, A., Sturcz, J., Farkas, Á. és *Fazekas, Á.:* J. Endocrin. **39,** 444 (1967).
Underwood, R. H. és *Williams, G. H.:* J. Lab. clin. Med. **79,** 848 (1972).
Vermeulen, A. és *Verdonck, L.:* In: Steroid Assay by Protein Binding (Ed.: Diczfalusy, E.). Karolinska Symposia II. Stockholm, p. 239 (1970).
Vogt, M.: J. Physiol. (Lond.) **130,** 601 (1954).