

## HIDROLIZA TIREOGLOBULINA I EKSTRAKCIJA JODIRANIH AMINOKISELINA IZ TKIVA ŠTITNJAČE

VIŠNJA MIKULIČIĆ i I. ŠIMONVIĆ

*Interna klinika Medicinskog fakulteta  
Sveučilište Zagreb*

*(Primljeno 29. U 1964)*

U ovom radu ispitali smo utjecaj vremena hidrolize na količinu nehidroliziranih tireoglobulina. Hidrolizu smo izvršili tripsinom, pankreatinom i papainom. Ispitali smo i utjecaj vremena ekstrakcije n-butanolom na količinu ekstrahiranih jodiranih aminokiselina. Uspoređivali smo vrijednosti rezultata dobivenih kromatografskim odvajanjem čistog hidrolizata i butanolnog ekstrakta hidrolizata.

Pokusi su izvršeni na štitnjačama bijelih štakora. Životinjama smo injicirali 50  $\mu$ c. radioaktivnog joda (J-131).

Kromatografska odvajanja izveli smo u otapalima n-butanol : etanol :  $2\text{N NH}_3$  (5 : 1 : 2) i n-butanol : octena kiselina : voda (12 : 3 : 5).

Detekcija obilježenih spojeva na kromatogramu vršena je metodom autoradiografije. Kvantitativna mjerenja izvršena su u scintilacionom brojaču.

Studij anorganske i organske faze metabolizma joda znatno je olakšan nakon otkrića i mogućnosti primjene radioizotopa joda. Time je omogućeno promatrati normalnu i patološku biosintezu hormona štitnjače i studirati kinetiku joda u organizmu. Podaci iz ovih područja znatno su doprinijeli razvoju endokrinologije, a sigurno bi se mogli iskoristiti i u radiotoksikologiji. Jod -131 spada među najvažnije fisione produkte, a najviše ugrožava štitnjaču.

Razrada metode za studij hormonogeneze u štitnjači može pomoći daljem razvoju fiziologije i patologije štitnjače i radiotoksikologije J-131.

Hormoni štitnjače i njihovi prekursori najčešće se određuju u plazmi i tkivu štitnjače. Općenito se smatra, da je za te postupke najprikladnija metoda radiokromatografije. Nakon primjene radiojoda u toku biosinteze »in vivo«, označe se prekursori i hormoni. Naknadnim postupkom kromatografije moguće ih je kvantitativno odvojiti. Postupak određivanja hormona vrlo je osjetljiv i zavisi od raznih faktora. Pri ispiti-

vanju tkiva štitnjače važno je obratiti pažnju na homogenizaciju tkiva, hidrolizu tireoglobulina, ekstrakciju hormona, pH medija i na način kromatografskog odvajanja.

Razni autori primjenjuju različite modifikacije analitičkih postupaka (1-11). Neslaganje rezultata pripisuje se upravo toj činjenici.

U ovom radu iznosimo vlastita iskustva i rezultate ispitivanja nekih faktora, koji mogu značajno utjecati na rezultate radiokromatografske analize tkiva štitnjače. Pokušali smo ispitati utjecaj vremena hidrolize na količinu nehidroliziranih tireoglobulina, efikasnost 48-satne hidrolize raznim enzimima i upoznati neke faktore koji mogu utjecati na butanolnu ekstrakciju hormona i njihovih prekuzora. Većina autora koji primjenjuju metodu radiokromatografije za ispitivanja sadržaja hormona u plazmi i tkivu štitnjače, prethodno ekstrahiraju jodirane aminokiseline sa n-butanolom. Prednost n-butanola sastoji se u tome što iz matricijala selektivno odvaja jodtirozine i jodtironine. Na taj način možemo obraditi veću količinu uzorka. To je naročito važno kod uzoraka male radioaktivnosti. Osim toga ekstrakcijom sa n-butanolom možemo prirediti relativno čisti uzorak za ispitivanje. U novijoi literaturi (12, 13, 14, 15) spominju se i postupci gdje se metodom kromatografije odvaja hidrolizat tkiva štitnjače bez butanolne ekstrakcije. Mi smo pokušali ispitati kako utječe vrijeme ekstrakcije na količinu i sadržaj ekstrahiranih hormona i prekuzora i utvrditi da li uopće postoji razlika rezultata direktnog kromatografskog odvajanja hidrolizata i butanolnog ekstrakta hidrolizata. Ukoliko se rezultati ne razlikuju, ekstrakcija sa n-butanolom mogla bi se izostaviti iz postupka.

#### MATERIJAL I METODE

Postupak određivanja jodiranih aminokiselina u tkivu štitnjače ispitivali smo na bijelim štakorima. Odraslim životinjama istog spola i težine injicirali smo intraperitonealno  $50 \mu\text{C}$  J-131 bez nosača u 0,5 ml redestilirane vode. Tireoidektomije su izvršene 48 sati nakon primjene radiojoda. Akumulacija radioaktivnog joda u štitnjačama iznosila je 12-15% od primijenjene doze.

Svježe tkivo štitnjače homogenizirali smo u staklenom homogenizatoru da izbjegnemo oksidoreduktivne promjene spojeva koje ispitujemo. Svaka štitnjača homogenizirana je u 1 ml ohlađenog pufera (0,05 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  — 0,05 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) pH 8,4 (3). Puferu je dodano 0,4 mg tripsina ili pankreatina, 4 mg ureje, kap toluena i 10  $\mu\text{l}$  0,1 M otopine  $\text{MnSO}_4$ . Hidroliza je vršena na temperaturi  $37^\circ\text{C}$ . Kombiniranu hidrolizu pankreatinom i papainom proveli smo na taj način, da smo nakon 24-satne hidrolize pankreatinom zakiselili uzorak sa N/100 HCl na pH 6 i dodali 0,4 mg papaina. Hidrolizu smo nastavili još 24 sata. Nakon hidrolize smo netopljivi dio odvojili centrifugiranjem kod 2500-3000 okretaja/

min. Dio gornjeg sloja nanijeli smo na papir za kromatografsko odvajanje. Drugi dio čistog hidrolizata uparili smo u vakuumu na temperaturi od 45–50° C skoro do suha i ekstrahirali sa n-butanolom. Butanolne ekstrakte također smo ispitali metodom radiokromatografije.

Kromatografsko odvajanje izveli smo radi kontrole u dva sistema otapala.

1. n-butanol : etanol : 2N NH<sub>3</sub> (5 : 1 : 2) (Bu : et : NH<sub>3</sub>)
2. n-butanol : octena kis. : voda (12 : 3 : 5) (Bu : oc : H<sub>2</sub>O)

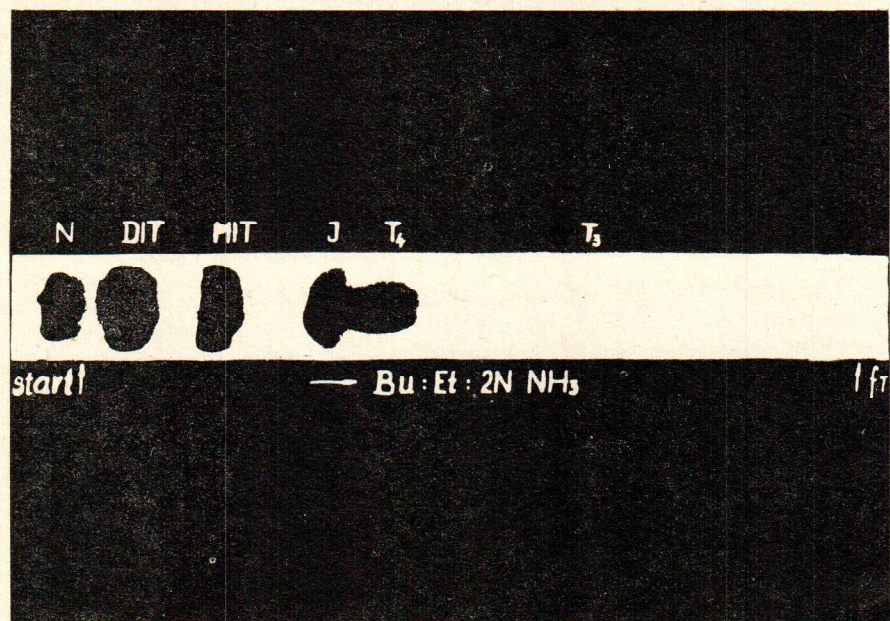
Primijenili smo jednodimenzionalnu uzlaznu tehniku odvajanja na Whatman papiru 3 MM kod sobne temperature. Vrijeme odvajanja iznosilo je 20 sati. Detekciju radioaktivnih mrlja na kromatogramu vršili smo metodom autoradiografije. Na taj način dobili smo tačnu lokalizaciju obilježenih hormona štitnjače i njihovih prekurzora. Prema slici na autoradiogramu rezali smo pojedine frakcije na papiru i mjerili njihovu aktivnost u scintilacionom brojaču tipa »Well«. Rezultati su izraženi kao procent ukupne aktivnosti na kromatografskoj traci (20).

### REZULTATI I DISKUSIJA

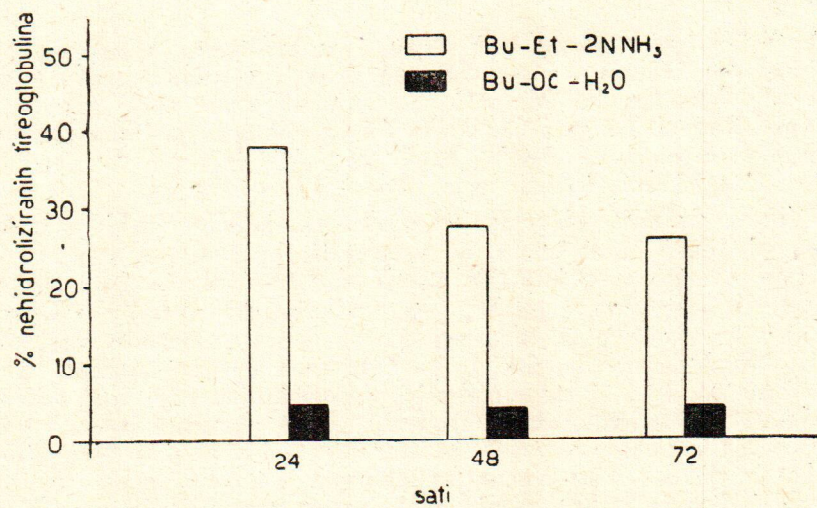
*Hidroliza tireoglobulina.* Alkalna hidroliza dovodi do razgradnje hormona (16, 17) i zato je gotovo napuštena. Umjesto kemijskih agensa primjenjuju se enzimi proteinaze ili peptidaze. Najčešće se upotrebljava pankreatin koji sadržava tripsin, amilazu i lipazu, zatim čisti tripsin i papain.

U našim ispitivanjima radili smo s pankreatinom, tripsinom i papainom proizvodnje »Ciba«. Poznato je da specifični metalni kationi kao Mg, Mn, Co, Fe, Mo i Cu povisuju aktivnost nekih hidrolitskih enzima. Radovi Tonga i Chaikoffa (6) su pokazali da hidroliza tireoglobulina u prisutnosti Mn<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> ili Ca<sup>++</sup> daje veće količine tiroksina. Ova iskustva koristili smo i kod naših ispitivanja.

Utjecaj trajanja hidrolize tripsinom na količinu nehidroliziranih tireoglobulina ispitali smo u tri vremenska intervala : nakon 24, 48 i 72 sata. U svakom pokusu analizirali smo tri štitnjače. Štitnjače smo obradili pojedinačno, a rezultate smo prikazali kao srednje vrijednosti tri paralelna ispitivanja. Smatrali smo da zaostala aktivnost na startnoj liniji kromatograma predstavlja nehidrolizirane tireoglobuline (sl. 1). Rezultate 24, 48 i 72-satne hidrolize tireoglobulina tripsinom prikazali smo na sl. 2. Količine nehidroliziranih tireoglobulina u kiselom i alkalnom otapalu znatno se razlikuju. Rezultati dobiveni u kiselom otapalu su konstantni u sva tri vremenska intervala, a količina nehidroliziranih tireoglobulina je znatno manja. U lužnatom otapalu količina nehidroliziranih tireoglobulina opada u toku vremena, ali su vrijednosti najdužeg vremena hidrolize još uvijek vrlo visoke.

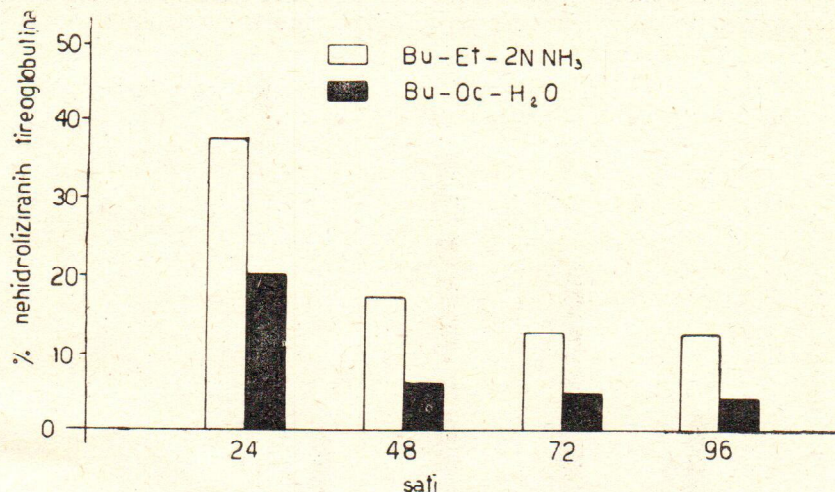


Slika 1. Autoradiogram kromatograma hidrolizata štitnjače. Nehidrolizirani dio (N) zaostaje na startnoj liniji.



Slika 2. Nehidrolizirani tireoglobulini nakon 24, 48 i 72-satne hidrolize (tripsin).

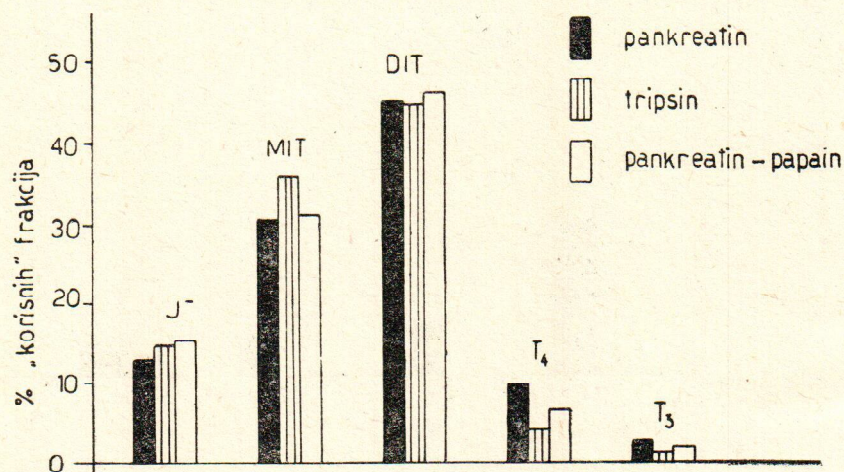
Hidrolizu pankreatinom ispitali smo na isti način kao i hidrolizu tripsinom. Jedina razlika sastojala se u tome što smo hidrolizu pratili u vremenskim razmacima do 96 sati. Rezultati su prikazani na slici 3. I ovdje postoje razlike u količini nehidroliziranih tireoglobulina kod odvajanja u kiselom i alkalnom mediju. U kiselom otapalu vrijednosti su znatno niže, a konstantne su nakon 48 sati.



Slika 3. Nehidrolizirani tireoglobulini nakon 24, 48, 72 i 96 satne hidrolize (pankreatin).

Neslaganje rezultata u n-butanol : etanol : 2N NH<sub>3</sub> i n-butanol : octena kiselina : voda nismo mogli objasniti nastajanjem novih frakcija na kromatogramu u kiselom otapalu. Zbog toga smo pretpostavili da kiselo butanolno otapalo hidrolizira tireoglobuline i, prema tome, smanjuje količinu nehidroliziranog materijala na startnoj liniji. Da provjerimo ovu pretpostavku, radiokromatografski smo ispitali nehidrolizirani ekstrakt štitnjača štakora u kiselom i alkalnom butanolnom otapalu. Količine nehidroliziranih tireoglobulina nisu se među sobom razlikovale i iznosile su u oba otapala oko 95 % ukupne aktivnosti na traci. Ove rezultate pokušali smo protumačiti time, da tek u jednoj fazi enzimatskog cijepanja tireoglobulina kiseli butanol vrši dalju hidrolizu. Dodatnim ispitivanjem htjeli smo dokazati ovu drugu pretpostavku. Nakon 48-satne enzimatske hidrolize ekstrahirali smo nehidrolizirane tireoglobuline sa startne linije kromatograma odvojenog u alkalnom otapalu. Eluat smo ponovo kromatografirali u otapalu n-butanol : octena kiselina : voda. U tom pokusu se dalje hidroliziralo 75 % nehidroliziranih tireoglobulina. Na kromatogramu smo dobili sve frakcije jodiranih aminokiselina. Prema tome, u kiselom butanolnom otapalu nastavlja se započeta hidroliza proteina štitnjače.

Učinak pankreatina, tripsina i papaina ispitali smo nakon 48-satne hidrolize tkiva štitnjače. Rezultati ispitivanja prikazani su na slici 4. »Korisnim frakcijama« smatrali smo anorganski jod, 3-monojodtirozin (MIT), 3:5-dijodtirozin (DIT), 3:5:3'-trijod tironin ( $T_3$ ) i 3:5:3':5'-tetrajodtironin ( $T_4$ ). Cijepanje jodtironina od tireoglobulina znatno je teže od cijepanja jodtirozina. Prema tome se učinak hidrolize najbolje vidi analizom tironina. Naši rezultati pokazuju da hidroliza s pankreatinom daje za isti uzorak najviše vrijednosti jodtironina.

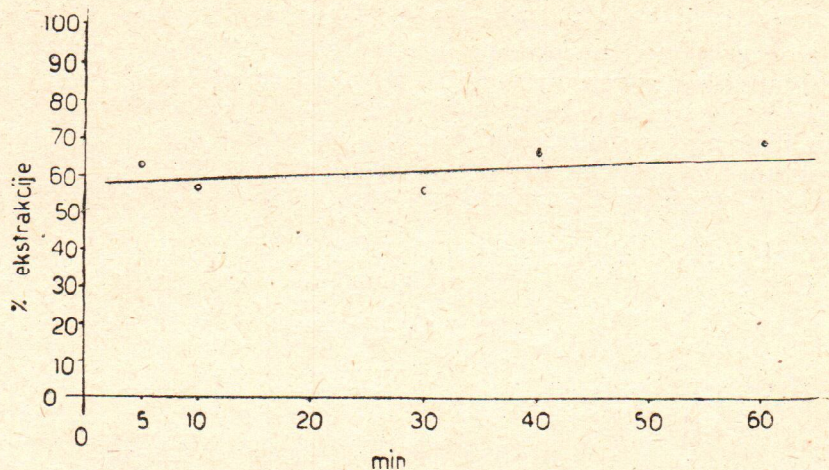


Slika 4. Hormoni štitnjače i njihovi prekursori nakon hidrolize enzimima pankreatinom, tripsinom i pankreatinom-papainom.

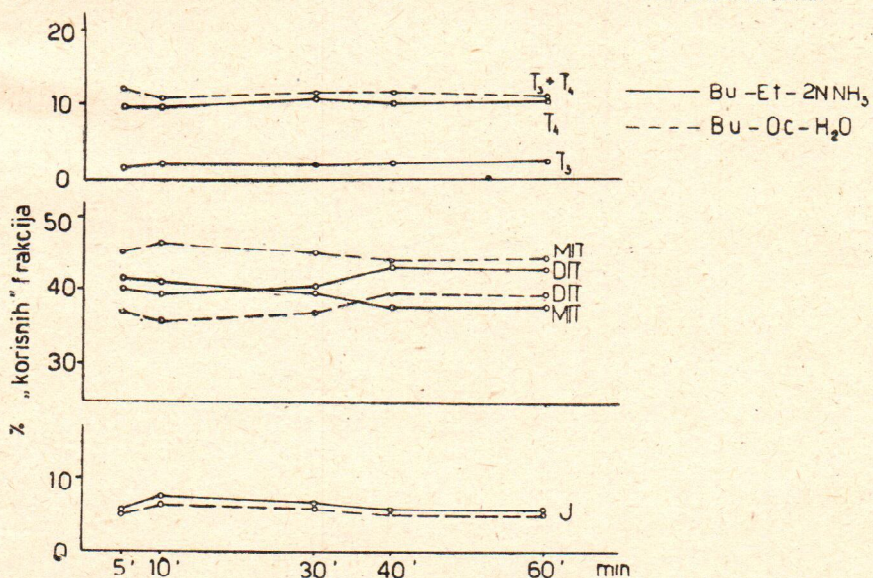
Procenat jodida zavisi od količine neutiliziranog joda u biosintezi hormona i od stupnja degradacije jodtironina i jodtirozina u toku postupka (18, 19). Poznato je, a i sami smo se uvjerali, da je količina jodida manja u svježem neobrađenom materijalu nego na kromatogramu nakon hidrolize i butanolne ekstrakcije. Ovu tvrdnju lako je dokazati radiokromatografskim ispitivanjem istog uzorka prije i poslije hidrolize odnosno butanolne ekstrakcije.

**Butanolna ekstrakcija.** Štitnjače štakora hidrolizirali smo pankreatinom 48 sati i zatim pojedinačno ekstrahirali n-butanolom 5, 10, 30, 40 i 60 minuta. Rezultati pokazuju (sl. 5) da različito dugo vrijeme ekstrakcije, tj. od 5–60 min. bitno ne utječe na ukupnu količinu ekstrahiranih jodiranih aminokiselina.

Radiokromatografskom analizom odredili smo i količine aminokiselina u butanolnom ekstraktu. Rezultati ovih ispitivanja u dva otapala pokazuju da je ekstrakcija brzi proces i vrši se jednolično u roku od jednog sata za sve komponente koje ispitujemo (sl. 6).



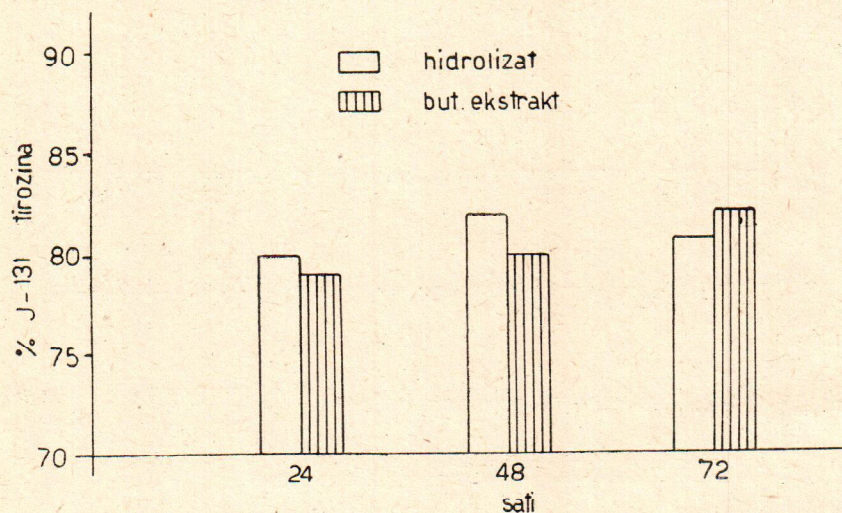
Slika 5. Utjecaj vremena ekstrakcije na količinu ekstrahiranih aminokiselina.



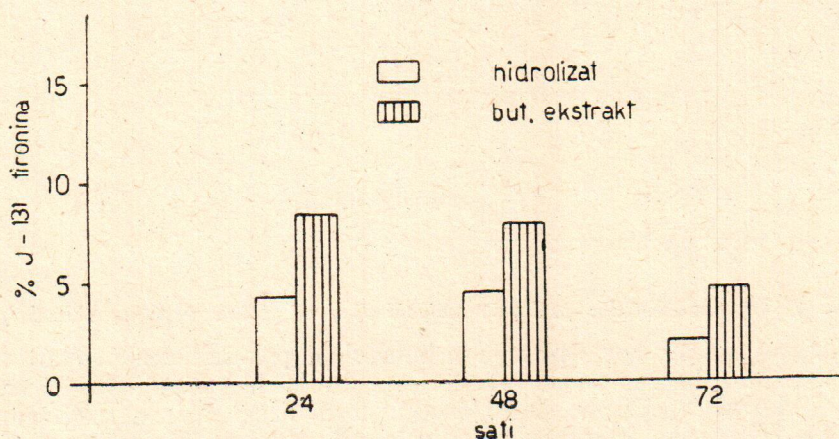
Slika 6. Zavisnost količine jodiranih aminokiselina od dužine vremena ekstrakcije.

Utjecaj višestrukog ispiranja n-butanolom pokušali smo ispitati sa tri uzastopne butanolne ekstrakcije istog uzorka hidrolizata. Prvi butanolni ekstrakt sadržavao je 70 % aktivnosti, drugi 4 %, a treći samo 0,6 %. Višestruko ispiranje hidrolizata n-butanolom minimalno povišuje količinu jodiranih aminokiselina u ekstraktu, a produljuje i otežava postupak.

Količine jodtironina i jodtirozina nakon 24, 48 i 72-satne hidrolize s tripsinom ispitali smo posebno u hidrolizatu i butanolnom ekstraktu hidrolizata istog uzorka. Rezultati su prikazani na slici 7 i 8. U sva tri vremenska intervala u butanolnom ekstraktu našli smo veće količine jodtironina nego u hidrolizatu. Količina jodtirozina podjednaka je u hidrolizatu i butanolnom ekstraktu. Prema tome, i rezultati ovih pokusa sugeriraju mogućnost da butanol nastavlja hidrolizu tireoglobulina.



Slika 7. Jod tirozini nakon 24, 48 i 72-satne hidrolize tripsinom u hidrolizatu štitnjače i butanolnom ekstraktu hidrolizata.



Slika 8. Jod tironini nakon 24, 48 i 72-satne hidrolize tripsinom u hidrolizatu štitnjače i butanolnom ekstraktu hidrolizata.



## ZAKLJUČCI

Primjenom kiselih ili alkalnih n-butanolnih otapala za kromatografsku analizu dobiva se različita količina nehidroliziranih tireoglobulina. Količina slobodnih jodiranih aminokiselina u alkalnom otapalu je proporcionalna vremenu hidrolize do 48 sati, a zatim je konstantna. Vrijednosti dobivene kromatografskim odvajanjem u kiselom otapalu su konstantne za vrijeme hidrolize od 24–72 sata. Razlika rezultata u kiselom i alkalnom n-butanolnom otapalu može se protumačiti time što kiseli butanol nastavlja proces hidrolize.

Najbolji rezultati hidrolize tireoglobulina postižu se pankreatinom.

Vrijeme ekstrakcije n-butanolom u vremenskom razmaku od 5–60 minuta ne utječe na količinu ekstrahiranih aminokiselina. Ponavljanim ekstrakcijama postiže se tek nešto veći doprinos jodiranih aminokiselina u ekstraktu.

Odnos jodiranih aminokiselina u hidrolizatu i butanolnom ekstraktu hidrolizata je različit. U butanolnom ekstraktu hidrolizata ima relativno više jodtironina.

Za uspoređivanje rezultata radiokromatografske analize tkiva štitnjače neobično je važno stalno primjenjivati identične postupke. Minimalne varijacije postupaka daju različite rezultate.

## Literatura

1. Taurog, A., Tong, W. i Chaikoff, I. L.; J. Biol. Chem. 184, 1950 83.
2. Roche, J., Michel, R., i Uolpert, E.; Compt. rend. soc. biol. 148, 1954, 21.
3. Braash, J. W., Flock, E. U. i Albert, A.; Endocrinology 55, 1954. 768.
4. Roche, J., Michel, R., Wolf, W. i Nunez, J.; Compt. rend. Acad. 240, 1955. 92.
5. Feuer, G.; Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 12, 1957. 19.
6. Tong, W. i Chaikoff, I. L.; J. Biol. Chem. 232, 1958. 939.
7. Beckers, C. i Michel De Uisscher; Metabolism. 10, 1961. 695.
8. Plaskett, L. G., Barnaby, C. F. i Gwen, I. Lloyd; Biochem. J. 87, 1963. 473.
9. Ermans, A. M., Dumont, J. E., Bastenie, P. A., Galpérin, H., Beckers, C., van den Schrieck, H. G. i De Uisscher, M.; J. Clin. Endocrinol. & Metab. 21, 1961. 996.
10. Pitt-Rivers, R., Hubble, D., i Hoather, W. H.; J. Clin. Endocrinol. & Metab. 17, 1957. 1313.
11. Pitt-Rivers, R., i Rall, J. E.; Endocrinology 68, 1961. 309.
12. Tong, W., Chaikoff, I. L.; J. Biol. Chem. 232, 1958. 939.
13. Wollman, S. H. i Scrow, R. O.; Endocrinology 56, 1955. 445.
14. Lissitzky i Michel R.; Ciba Foundation colloquia on Endocrinology, London 10, 1957. 134.
15. Taurog, A., Polter, G. D. i Chaikoff, I. L.; J. Biol. Chem. 213, 1955. 119.
16. Stanley, P. G.; Nature 171, 1953. 933.
17. Kennedy, T. H.; Nature 179, 1957. 50.

18. *Tavrog, A., Tong, W., Chaikoff, I. L.*; Ciba Foundation colloquia on Endocrinology, London 10, 1957. 59.
19. *Tavrog, A.*; *Biochim. Biophys. Acta* 60, 1962. 197.
20. *Mikulić U. i Šimonović I.*; *Med. glasnik* 17, 1963. 120.

#### Summary

### HYDROLYSIS OF THYROGLOBULIN AND EXTRACTION OF IONIZED AMINOACIDS FROM THE THYROID TISSUE

The influence of the hydrolysis time on the amount of unhydrolyzed thyroglobulins was examined. Hydrolysis was carried out with trypsin, pancreatin and papain. The influence of the time of extraction with n-butanol on the amount of the extracted iodized amino acids was also tested. The results obtained by chromatographic separation of pure hydrolyzate and butanol extract of the hydrolyzate were compared.

Experiments were performed on the thyroid glands of white rats. The rats were injected 50  $\mu\text{c}$  of radioactive iodine ( $\text{I}^{131}$ ).

Chromatographic separations were carried out in solutions n-butanol : ethanol : 2N  $\text{NH}_3$  (5 : 1 : 2) and n-butanol : acetic acid : water (12 : 3 : 5).

For the detection of marked compounds on the chromatograph the autoradiographic method was used. Quantitative measurements were performed with a scintillation counter.

*Department of Medicine,  
University Hospital, Zagreb*

*Received for publication  
May 23, 1964*