MAATALOUDEN TUTKIMUSKESKUS

KOTIELÄINHOIDON TUTKIMUS-LAITOKSEN TIEDOTE NO. 4

siv.

Ritva Mäkelä, Vappu Kossila & Kalle Maijala
Käytännöllisiä ongelmia radioimmunologisten menetelmien käyttöön soveltamisessa 1-24

Ritva Mäkelä & Vappu Kossila
Naudan prolaktiinin määrittämisestä radioimmunologisesti 25-86

Vappu Kossila, Ritva Mäkelä, Erkki Rajakoski & Heimo Simula
Ay-keinosiemennyssonnien veren prolaktiinipitoisuudesta ja sperman laadusta 87-97

Helsinki 1975

KÄYTÄNNÖLLISIÄ ONGELMIA RADIOIMMUNOLOGISTEN MENETELMIEN KÄYTTÖÖN SOVELTAMISESSA

Ritva Mäkelä, Vappu Kossila ja Kalle Maijala

Helsingin yliopiston monistuspalvelu 1975

S I S Ä L L Y S L U E T T E L O

Sivu

1. RADIOIMMUNOLOGISEN MENETELMÄN KÄYTTÖTARKOITUS..... 5

2. RADIOIMMUNOLOGISTEN MENETELMIEN YLEISET TYÖVAIHEET..... 6

2.1. Hormonivalmisteen hankkiminen..... 6

2.2. Antiseerumin valmistaminen..... 7

2.3. Hormonin merkkaus..... 7

2.4. Immunologisen reaktion voimakkuuden mittaaminen..... 8

2.5. Standardikäyrän määrittäminen..... 9

2.6. Näytteen laimennusten tutkiminen..... 9

2.7. Radioimmunologisen menetelmän luotettavuuden tutkiminen. 10

2.8. Näytteiden analysointi..... 10

2.9. Tulosten tilastomatemaattinen käsittely..... 10

3. RADIOIMMUNOLOGISTEN MENETELMIEN RYHMITTELY..... 10

3.1. Solid-phase-menetelmä..... 11

3.2. Dextran-charcoal-menetelmä..... 12

3.3. Double-antibody-menetelmä..... 14

4. KIRJALLISUUSLUETTELO..... 15

5. KUVAT..... 18

1. RADIOIMMUNOLOGISEN MENETELMÄN KÄYTTÖTARKOITUS

Niiden runsaan 10 vuoden aikana, jona radioimmunologisia menetelmiä on käytetty, tiedot hormonien erittymisestä, erittymiseen vaikuttavista tekijöistä, hormonien merkityksestä fysiologisiin toimintoihin, hormonien metaboliasta ja sisäerityssairauksien diagnostiikasta ovat valtavasti lisääntyneet. Kotieläintenkin veren hormonipitoisuuksia tunnetaan jo melkoisesti. Naudan veren kasvuhormonipitoisuus pienenee iän mukana. TRENKLEn (1971) mukaan kolmen kuukauden ikäisistä yksilöistä puolitoistavuotisiin yksilöihin kasvuhormonipitoisuus muuttuu 18 ng:sta/ml 4.7 ng:aan/ml. Sonnivasikoiden hormonipitoisuus on korkeampi kuin lehmävasikoiden. Naudan veren prolaktiinipitoisuus riippuu ennen kaikkea vuoden ja vuorokauden ajasta. Nämä muutokset tapahtuvat molemmilla sukupuolilla. Merkittävä prolaktiinipitoisuuden lisääntyminen tapahtuu juuri ennen poikimista. SCHAMSin ja KARGin (1970) mukaan prolaktiinipitoisuus voi vaihdella laajalla konsentraatioalueella, muutamasta ng:sta/ml lähes yhteen µg:aan/ml. Hormonitasojen periytyvyyttä ja niiden suhdetta tuotanto-ominaisuuksiin tunnetaan kuitenkin vielä hyvin vähän. Tämän tutkimuksen toivotaankin tuovan valaisua näihin asioihin.

NKJ:llä (= Nordiska kontaktorganet för jordbruksforskning) on meneillään laaja yhteispohjoismainen tutkimusprojekti (no 22.), jonka nimi on "Undersökning av sammanhanget mellan djurens hormonaktivitet och deras produktionsegenskaper". Projektin tarkoituksena on selvittää hormonien ja tuotanto-ominaisuuksien välisiä suhteita. Projektin suomalaiseen tutkimusryhmään kuuluvat kotieläintieteen dos., MMT, Vappu Kossila Maatalouden tutkimuskeskuksen kotieläinhoidon tutkimuslaitokselta, Maatalouden tutkimuskeskuksen kotieläinjalostuslaitoksen esimies, prof. Kalle Maijala ja FK Ritva Mäkelä Helsingin yliopiston kotieläintieteen laitokselta. Tämän tutkimusryhmän tehtävänä on selvittää, onko naudan veren kasvuhormonin ja prolaktiinin ja eläimen jalostuksellisesti tärkeiden ominaisuuksien välillä korrelaatioita. Selvien korrelaatioiden löytyminen ja niiden perinnöllisyysasteen selvittäminen huomattavasti tehostaisivat ja nopeuttaisivat kotieläinten jalostustyötä. Tutkimuseläiminä tullaan käyttämään kotieläinyhdistysten koenavettojen ja kasvatusasemien eläimiä, joiden jalostusominaisuuksista ja niiden periytymisestä on käytettävissä kortisto. Tutkimusta varten

veren hormonit täytyy pystyä kvantitatiivisesti määrittämään tarkasti. Tällöin kysymykseen tulevat radioimmunologiset menetelmät. Ne perustuvat isotooppilaimennukseen spesifisten vasta-aineiden läsnäollessa. Ne ovat paljon monimutkaisempia kuin klassilliset kemialliset analyysimenetelmät. Radioimmunologisilla menetelmillä pystytään määrittämään tarkasti ja spesifisesti biologisten nesteiden ja jopa kudosten pienet hormonipitoisuudet, jotka vaihtelevat ng (= 10^{-9} g)/ml-konsentraatiosta pg (= 10^{-12} g)/ml-konsentraatioon. Menetelmien spesifisyys perustuu immunologiaan ja tarkkuus radioaktiivisuuteen. Radioimmunologinen menetelmä on jo kehitetty useimpia proteiini-, peptidi- ja steroidihormoneita varten. Tämän tutkimusryhmän tehtävänä on löytää olosuhteisiin sopivin radioimmunologinen menetelmä naudan aivolisäkkeen etulohkosta peräisin oleville kasvuhormonille ja prolaktiinille. Seuraavassa keskitytäänkin radioimmunologisten menetelmien käytännöllisiin ongelmiin.

2. RADIOIMMUNOLOGISTEN MENETELMIEN YLEISET TYÖVAIHEET

Kaikille radioimmunologisille menetelmille yhteisiä työvaiheita ovat seuraavat: hormonivalmisteen hankkiminen, antiseerumin valmistaminen, hormonin merkkaus, vasta-aineiden, merkatun hormonin, standardihormonin sekä näytteessä olevan hormonin immunoreaktiivisuuden määrittäminen, standardikäyrän määrittäminen, näytteestä tehtyjen laimennusten tutkiminen, menetelmän luotettavuuden tutkiminen, näytteiden analysointi ja tulosten tilastomatemaattinen käsittely. Työvaiheita saattaa olla enemmänkin riippuen radioimmunologisesta menetelmästä.

2.1. Hormonivalmisteen hankkiminen

Ryhdyttäessä kehittelemään radioimmunologista menetelmää täytyy olla käytettävissä puhdasta hormonivalmistetta. Sitä tarvitaan immunisointiin, merkkaukseen ja standardeihin. Merkkaukseen käytettävän hormonin on oltava puhtainta. Immunisointiin ja jopa standardeihinkin sopii vähemmän puhdas hormoni, jos erittäin puhdasta hormonia on niukalti saatavissa. Sekä naudan että lampaan kasvuhormonia ja prolaktiinia olemme saaneet lahjoituksina the National Institutes of Health'istä, Amerikasta.

2.2. Antiseerumin valmistaminen

Hormoni toimii vieraassa eläinlajissa antigeeninä saaden aikaan vasta-aineiden muodostuksen. Tavallisimmin antiseerumit tuotetaan kaneissa tai marsuissa injisoimalla tutkittavaa hormonia yhdessä fysiologisen suolaliuoksen ja Freundin adjuvantin kanssa useita kertoja pitkähkön ajan kuluessa. Antiseerumin vasta-ainepitoisuuden täytyy olla riittävän suuri, jotta sitä voidaan käyttää mahdollisimman suurina laimennuksina pienten hormonimäärien mittaamiseen näytteistä. Vasta-aineiden on herkästi osallistuttava immunologiseen reaktioon eli niiden on herkästi sitouduttava antigeeniinsä eli tässä tapauksessa hormonimolekyyleihin. Vasta-aineiden on myös oltava spesifisiä. Ne saavat muodostaa komplekseja vain tutkittavan hormonin kanssa. Suoritettujen kokeiden mukaan (3.2.) ainakin naudan prolaktiinia vastaan tuotettu antiseerumi on radioimmunologiseen menetelmään sopivaa. Luultavasti myös naudan ja lampaan kasvuhormonia ja prolaktiinia vastaan tuotetut antiseerumit ovat soveliaita radioimmunologisiin määrityksiin.

2.3. Hormonin merkkaus

Jotta hormonimolekyylin immunologista reagointia voidaan seurata, tehdään hormonimolekyyli radioaktiiviseksi eli merkataan radioaktiivisella isotoopilla. Tähän käytetään joko jodi-125- tai jodi-131-isotooppia. Tästä syystä toimenpidettä kutsutaan myös jodaukseksi. Merkattavan hormonin on oltava kaikkein puhtainta, koska radioimmunologisessa menetelmässä mitataan juuri merkatun hormonin sitoutumismäärää vasta-aineisiin. Radioaktiivisuusmäärä hormonin painoyksikköä kohti eli nk. spesifinen aktiivisuus on oltava korkea radioimmunologista menetelmää varten, koska merkattua hormonia käytetään hyvin pieniä määriä. Muuten säteilymittarit eivät pysty luotettavasti toteamaan radioaktiivisuusmääriä. Proteiinihormoneille vaatimus on noin 100 μCi/μg. Mitä vähemmän radioaktiivista hormonia käytetään, sitä tarkempaan määritykseen päästään (vrt. standardikäyrän määrittämiseen).

Yleisimmin käytetty hormonin merkkausmenetelmä radioimmunologisia menetelmiä varten on GREENWOODin ym. (1963) kehittämä menetelmä, joka perustuu kloramiini-T:n hapettavaan vaikutukseen. Jodi sitoutuu valkuaisaineen tyrosiini-osaan, yleensä ei enempää kuin yksi jodi/hormonimolekyyli. Tämä antaa hormonille riittävän spesifisen aktiivisuuden, ja hormoni säilyttää immunologisen aktiivisuutensa.

Edellämainitulla kloramiini-T-tekniikalla suoritettiin useita lampaan kasvuhormonin merkkauksia. Tulokset olivat huonoja (3.1.). Syy huonoihin tuloksiin oli kuitenkin käytetyssä radioimmunologisessa menetelmässä, joka silloin oli solid-phase-menetelmä. Myöhemmin kahdella muulla radioimmunologisella emenetelmällä (3.2. ja 3.3.) totesimme samalla tavoin merkatun naudan prolaktiinin olevan immunologisesti aktiivista.

2.4. Immunologisen reaktion voimakkuuden mittaaminen

Jotta immunologinen reaktio tapahtuisi, täytyy sekä antigeenin että vasta-aineen olla immunologisesti aktiivisia. Antiseerumissa olevien hormonin vasta-aineiden ja merkatun hormonin immunologinen aktiivisuus määritetään inkuboimalla näitä tietty aika ja sen jälkeen määrittämällä merkatun hormonin sitoutumismäärä vasta-aineisiin. Mitä suurempiin sitoutumisiin päästään, sitä aktiivisempia immunologisesti ovat vasta-aineet ja merkattu hormoni. Immunologinen reaktio on riippuvainen lämpötilasta, pH:sta, suola- ja proteiinikonsentraatiosta. Nämä olosuhteet on mm. puskuriliuosten avulla järjestettävä optimaalisiksi.

Käytännössä immunologisen reaktion voimakkuutta mitataan määrittämällä nk. antiseerumin laimennuskäyrä (Kuva 1). Siinä vakiomäärää merkattua hormonia inkuboidaan antiseerumin laimennussarjan kanssa ja määritetään sitoutumisprosentti kussakin käytetyssä antiseerumikonsentraatiossa. Käyrää piirrettäessä sitoutumisarvot merkitään aritmeettiselle asteikolle ja laimennusarvot logaritmiselle asteikolle. Se antiseerumi, jonka laimennuskäyrä laskee jyrkimmin (esim. kuvassa 1 antiseerumi no 4) on immunologisesti herkintä eli sopivinta radioimmunologiseen menetelmään.

Kolmea eri radioimmunologista menetelmää (3.1., 3.2. ja 3.3.) käyttäen tutkittiin tuotettujen antiseerumeiden ja merkattujen hormonien immunoreaktiivisuutta. Solid-phase-menetelmällä saatujen sitoutumisprosenttien mukaan ei voitu piirtää antiseerumin laimennuskäyriä lainkaan (3.1.). Dextran-charcoal-menetelmällä (3.2.) ja double-antibody-menetelmällä (3.3.) sen sijaan saatiin kauniit antiseerumin laimennuskäyrät (Kuva 2 ja Kuva 3). Näissä kahdessa menetelmässä sitoutumisprosentit vaihtelivat välillä 0-70.7 %,

Radioimmunologisissa määrityksissä pyritään käyttämään antiseerumista sitä laimennusta, joka 50%-isesti sitoo merkatun hormonin.

2.5. Standardikäyrän määrittäminen

Standardikäyrän avulla määritetään tutkittavan näytteen hormonipitoisuus.

Standardikäyrän määrittäminen perustuu nk. kompetetiiviseen inhibitioon eli siihen ilmiöön, että merkkaamaton hormoni kilpailee merkatun hormonin kanssa sitoutumisesta vasta-aineisiin. Standardikäyrää määritettäessä merkkaamattomana hormonina on standardihormoni ja hormonianalyyseissä näytteen hormoni. Mitä enemmän lisätään merkkaamatonta hormonia, sitä vähäisemmäksi käy merkatun hormonin määrä vasta-ainekompleksissa. Standardikäyrä kuvaa sitoutumismäärän muuttumista standardihormonilisäysten mukaan (Kuva 4).

Hormonien analysoimiseen käytettävän standardikäyrän pitoisuusalue riippuu tutkittavan näytteen hormonipitoisuudesta. Standardikäyrän pitoisuusalue säädetään merkatun hormonimäärän avulla. Mitä vähemmän merkattua hormonia käytetään, sitä alhaisemmille konsentraatioalueille standardikäyrä asettuu (Kuva 5).

Standardien ja näytteiden kemialliset analysointiolosuhteet on oltava mahdollisimman samanlaiset. Tätä varten verinäytteitä analysoitaessa olisi standardeissa käytettävä tutkittavan eläinlajin hormonivapaata seerumia. Muuten saadaan liian alhaisia arvoja verinäytteiden hormonipitoisuuksille. (Kuva 6).

Radioimmunologisissa määrityksissä on yleensä parasta pitää mukana käytetyn standardikäyrän koko konsentraatiosarja, jotta mahdolliset pienetkin muutokset voidaan heti havaita ja korjata.

2.6. Näytteen laimennusten tutkiminen

Ennen kuin standardikäyrän osoittamiin tutkittavan näytteen hormonipitoisuuksiin voidaan luottaa, täytyy osoittaa standardihormonin ja tutkittavassa näytteessä olevan hormonin käyttäytyvän immunologisesti samoin. Standardikäyrä ja näytteen laimennuksille vastaavasti saatu käyrä (Kuva 7) ovat muodoltaan samanlaiset, jos molemmat hormonit ovat immunologisesti samanlaiset.

Lisäksi verinäytteille on määritettävä pienin plasmalaimennus, jossa immunologista reaktiota häiritsevä plasman tekijä tulee eliminoiduksi.

Analyysissä käytetään näytteestä yleensä vähintään kahta eri laimennusta.

Kummankin pitää antaa sama hormonipitoisuus.

2.7. Radioimmunologisen menetelmän luotettavuuden tutkiminen

Kun radioimmunologinen menetelmä on saatu näin pitkälle, täytyy seuraavaksi tutkia sen laatuominaisuudet. Niitä ovat toistettavuus, täsmällyys, herkkyys ja spesifisyys. MIDGLEY (1969) on antanut tarkat ohjeet näiden tutkimiseksi juuri radioimmunologista menetelmää varten.

2.8. Näytteiden analysointi

Vasta kun radioimmunologinen menetelmä on havaittu luotettavaksi ja muutenkin käyttökelpoiseksi, ruvetaan analysoimaan näytteitä. Blankkien ja standardien lisäksi on verinäytteitä tutkittaessa hyvä pitää jokaisessa ajossa mukana kontrolliplasmaa. Sen pitäisi joka kerta antaa sama tulos tai muuten eri ajojen tulokset eivät ole vertailukelpoisia ilman korjauksia. Kontrollin avulla voidaan siis harjoittaa menetelmän jatkuvaa laadun valvontaa.

2.9. Tulosten tilastomatemaattinen käsittely

Radioimmunologisia menetelmiä varten on myös omat tilastomatemaattiset kaavat (RODBARD ym. 1968 ja CHARD, 1971), jotka saattavat huomattavastikin poiketa klassillisille kemiallisille analyysimenetelmille käytetyistä kaavoista ja joita on syytä käyttää hyväksensä.

3. RADIOIMMUNOLOGISTEN MENETELMIEN RYHMITTELY

Radioimmunologisia menetelmiä on useita. Ne eroavat toisistaan siinä, että vapaan merkatun hormonin ja vasta-aineisiin sitoutuneen merkatun hormonin erottaminen tapahtuu eri menetelmillä.

Yleisimmät erotusmenetelmät käyttävät hyväkseen kromatoelektroforeesia, toista vasta-ainetta (immunologinen saostaminen), kemiallista saostamista,

dekstraanilla päällystettyä hiiltä, talkkia tai kiinteitä kappaleita. Menetelmien nimissä saatetaan käyttää yleisesti myös niiden englanninkielisiä muotoja. Kromatoelektroforeesi-menetelmässä vapaa hormoni adsorboituu suodatinpaperille pipetointikohtaan, kun taas vasta-aineeseen sitoutunut hormoni vaeltaa vasta-aineiden kanssa. Double-antibody-menetelmässä hormoni-vasta-ainekompleksi saostetaan toisella antiseerumilla, joka on valmistettu hormonin vasta-ainetta tuottaneen eläinlajin gammaglobuliineja vastaan. Hormoni-vasta-ainekompleksi voidaan saostaa myös natriumsulfaatilla tai etanolilla, niin kuin tehdään kemiallisessa saostusmenetelmässä. Dextran-charcoal-menetelmässä dekstraanilla päällystetty hiili sitoo itseensä vapaan hormonin. Talkki-menetelmässä vapaan hormonin sitoo talkki. Solid-phase-menetelmässä vasta-aineet on ensin kemiallisesti sidottu kiinteisiin polysakkaridihiukkasiin tai muihin polymeereihin muodostaen immunosorbentteja. Immunosorbentissa oleva hormoni-vasta-ainekompleksi on sentrifugoimalla helposti erotettavissa vapaasta hormonista.

Kaikkia näitä menetelmiä on menestyksellisesti käytetty plasman hormonien määrittämiseen. Oikeissa ja sopivissa olosuhteissa useimmat näistä menetelmistä ASHFORDin ym. (1969) ja RAPTISin (1971) mukaan ovat luotettavia ja antavat melko yhdenmukaisia tuloksia plasman hormonipitoisuuksista. Tämän tutkimuksen puitteissa kokeiltiin kolmea eri menetelmää. Ne olivat solid-phase-menetelmä, dextran-charcoal-menetelmä ja double-antibody-menetelmä.

3.1. Solid-phase-menetelmä

Ensimmäiseksi kokeiltiin solid-phase-menetelmää (WIDE 1969). Siinä valmistetaan antiseerumista ensin immunosorbentti kiinnittämällä natriumsulfaatilla saostetut vasta-aineet kestävin kovalenttisin sidoksin aktivoituihin polysakkaridihiukkasiin, esim. selluloosaan. Sitoutumistapahtumassa vasta-aineen vapaa aminoryhmä tarttuu polysakkaridiin. Tällaisen käsittelyn jälkeen pitäisi vasta-aineiden olla edelleen immunologisesti aktiivisia ja pystyä sitoutumaan antigeeniinsä. Hormoni-vasta-ainekompleksi ollessaan sitoutuneena kiinteisiin hiukkasiin voidaan helposti erottaa sentrifugoimalla. Sakan radioaktiivisuus ilmoittaa sitoutuneen merkatun hormonin määrän.

Menetelmä suoritetaan käytännössä siten, että putkiin pipetoidaan kontrollipuskuri, standardi tai näyte, immunosorbenttilaimennus ja merkattu hormoni.

Inkuboidaan pyörittäjässä. Sentrifugoidaan. Hiukkaset pestään ja jälleen sentrifugoidaan. Supernatantti imetään pois. Mitataan sakan radioaktiivisuus.

Kokemukset tästä menetelmästä lähes parin vuoden ajalta olivat erittäin huonot. Valmistettiin useita eriä lampaan merkattua kasvuhormonia, jonka immunologista sitoutumista selvitettiin 18 eri antiseerumista valmistettuun immunosorbenttiin. Käytetyt immunosorbenttilaimennukset vastaavan antiseerumin suhteen olivat 1:10, 1:100, 1:1000, 1:5000 ja 1:10 000. Puhdistamisen seurauksena lampaan merkattu kasvuhormoni jakaantui useaan fraktioon. Lisäksi näiden immunologista aktiivisuutta vasta-aineisiin tutkittiin erikseen, jotta elisi löydetty paras fraktio. Tutkimuksissa käytettiin myös kahta eri aikaan aktivoitua selluloosaerää. Merkatun hormonin sitoutuminen vasta-aineisiin kaikki tapaukset huomioonottaen vaihteli vain välillä 0–2.84 %, mikä osoitti, että immunologinen reaktio jäi lähes kokonaan tapahtumatta.

Menetelmän suurimpana virhelähteenä saattoi olla immunosorbentti. Antiseerumeissa ei voinut olla ainakaan pääasiallinen syy, sillä ainakin yksi antiseerumi oli immunologisesti aktiivista. Se oli lahjoitus Australiasta tri Wallace'lta, joka itse oli käyttänyt sitä menestyksellisesti omassa talkkimenetelmässään (WALLACE & BASSETT 1970). CnBr-käsittelyn aikana selluloosahiukkaset eivät todennäköisesti aktivoituneet tai vasta-aineet muusta syystä jäivät sitoutumatta niihin. Mahdollisesti inkubointiaika oli liian pitkä, niin että merkattu hormoni ehti tuhoutua sinä aikana, koska inkubointi suoritettiin huoneenlämmössä. Lämpötila saattoi olla liian korkea hormoni-vasta-ainekompleksille aiheuttaen sen nopean hajoamisen. Solid-phase-menetelmä sinällään osoittautui käytettyihin olosuhteisiimme sopimattomaksi.

Solid-phase-menetelmä on määritysvaiheessa yksinkertainen, helppo ja nopea. Aktiivisen selluloosan valmistaminen on CnBr:n käytön takia kuitenkin erittäin vaarallista. Lisäksi vasta-aineiden kiinnitys aktivoituihin selluloosahiukkasiin on aikaavievää ja työlästä.

3.2. Dextran-charcoal-menetelmä

Solid-phase-menetelmällä saatujen huonojen kokemusten jälkeen siirryttiin seuraavaksi kokeilemaan dextran-charcoal-menetelmää (JACOBS 1969).

Hiilellä on erittäin suuri kyky fysikaalisesti adsorboida itseensä erikokoisia molekyylejä. Hiili voidaan etukäteen päällystää tietynkokoisilla molekyyleillä. Tällöin vain päällystysainetta pienemmät molekyylit kiinnittyvät hiileen muiden jäädessä sitoutumatta. Proteiinihormonien radioimmunologista menetelmää varten hiili tavallisesti päällystetään polysakkaridilla, dekstraanilla, jonka molekyylikoko vaihtelee 100 000 - 150 000 (WOOL & SELENKOW 1968 ja SCHAMS & KARG 1969). Kun sekä kasvuhormonin että prolaktiinin molekyylipainot ovat noin 25 000 luokkaa (ANDREWS 1966 ja TURNER 1966) ja vasta-ainemolekyylin molekyylipaino on noin 160 000 luokkaa (CLAUSEN 1969), hormonimolekyylit kevyinä molekyyleinä adsorboituvat hiileen hormoni-vasta-ainekompleksin jäädessä liuokseen.

Käytännössä dextran-charcoal-menetelmässä pipetoidaan ensimmäisessä vaiheessa kontrollipuskuri, standardi tai näyte, määrityspuskuri, antiseerumilaimennus ja merkattu hormoni. Näitä inkuboidaan. Toisessa vaiheessa pipetoidaan hiili-dekstraani-suspensio. Dekstraanilla päällystetty hiili ja siihen adsorboitunut hormoni erotetaan liuoksesta sentrifugoimalla. Kaikki työvaiheet on tehtävä +4°C:ssa. Mittaamalla dekstraani-hiilen radioaktiivisuus saadaan selville vapaan merkatun hormonin määrä, josta voidaan edelleen laskea merkatun hormonin sitoutumisprosentti vasta-aineisiin.

Suoritettujen kokeiden mukaan tämä menetelmä toimi hyvin. Saadut antiseerumin laimennuskäyrät olivat hyvät (Kuva 2). Tällä menetelmällä osoitettiin naudan prolaktiinia vastaan tuotetun antiseerumimme olleen immunologisesti aktiivista (Kuva 8).

Dextran-charcoal-menetelmä on erittäin yksinkertainen, käytännöllinen ja nopea. Tämä on ratkaiseva etu, jos tutkittavia näytteitä on runsaasti. Menetelmällä on myös haittapuolensa. Se ei ole täysin spesifinen. Immunologisen aktiivisuutensa menettänyt hormoni ei sitoudu vasta-aineisiin, vaan pysyy vapaana. Näin ollen myös se tulee sidotuksi hiileen. Tämän seurauksena vapaan merkatun hormonin määrä tulee virheellisen suureksi ja vastaavasti tutkittavan näytteen hormonipitoisuus liian suureksi. ASHFORD ym. (1969) ja RAPTIS (1971) vertaillessaan erilaisia radioimmunologisia menetelmiä havaitsivat dextran-charcoal-menetelmän antavan hiukan korkeampia hormonipitoisuuksia kuin muiden menetelmien.

Dextran-charcoal-menetelmällä jatketaan tutkimuksia edelleen.

3.3. Double-antibody-menetelmä

Double-antibody-menetelmässä (useita ohjeita mm. SCHRÖDER 1971 ja NIH:n ohje) erotus perustuu kokonaan immunologisiin reaktioihin. Hormonin vasta-aineen vasta-aine sitoutuu immunologisesti hormoni-vasta-ainekompleksiin, joka on yleensä liukoinen. Tämän seurauksena syntyy suurempi kompleksi, joka on veteen liukenematon. Sakka erottuu helposti liuoksesta sentrifugoimalla.

Toinen antiseerumi tuotetaan tavallisesti tutkittavan hormonin vasta-ainetta vastaan eri eläinlajissa kuin ensimmäinen vasta-aine. Toisen antiseerumin ei kuitenkaan tarvitse olla spesifistä. Sen antigeeninä käytetään yleensä ensimmäisen antiseerumin tuottaneen eläinlajin seerumin normaaleja gamma-globuliineja, jotka on ammoniumsulfaattisaostuksella erotettu muusta seerumista.

Käytännössä määritykset suoritetaan siten, että ensimmäisessä vaiheessa lisätään kontrollipuskuri, standardi tai tutkittava näyte, määrityspuskuri, ensimmäinen antiseerumilaimennus ja merkattu hormoni. Näitä inkuboidaan. Sen jälkeen lisätään toinen antiseerumi ja jälleen inkuboidaan. Muodostunut sakka erotetaan sentrifugoimalla. Sakan radioaktiivisuus osoittaa vasta-aineisiin sitoutuneen merkatun hormonin määrää.

Saadut omat kokemukset double-antibody-menetelmästä olivat positiivisia. Tällä menetelmällä saadut antiseerumin laimennuskäyrät olivat hyvät (Kuva 3).

Double-antibody-menetelmä on työläs, koska joudutaan valmistamaan kahta antiseerumia. Tästä syystä menetelmä on myös melko kallis. Näytteiden analysoimiseen kuluu aikaa, koska joudutaan inkuboimaan kaksi kertaa, siis kummankin antiseerumilisäyksen jälkeen. Verinäytteitä analysoitaessa double-antibody-tekniikkaa häiritsee plasman inhivoiva tekijä, joka voidaan kyllä poistaa käyttämällä riittävän suuria laimennuksia plasmasta tai lisäämällä plasmaan hepariinia. Jos plasman inhiboivaa tekijää ei poisteta, saadaan liian alhaisia sitoutumisprosentteja ja sen seurauksena liian korkeita hormonipitoisuuksia tutkittavalle plasmalle. Double-antibody-menetelmä on erittäin spesifinen, koska siinä mitataan vain immunologisesti aktiivisen hormonin sitoutumista vasta-aineisiin. Jos merkattu hormoni menettää immunologisen aktiivisuutensa, se jää vapaaksi liuokseen eikä näin ollen aiheuta virheitä sitoutumisprosenteissa.

Myös double-antibody-menetelmän tutkimuksia jatketaan. Lopullisesti käytettäväksi radioimmunologiseksi menetelmäksi tullaan todennäköisesti valitsemaan joko dextran-charcoal-menetelmä tai double-antibody-menetelmä.

Double-antibody-tekniikan spesifisyyteen nojautuen MORGAN (1966) mukaeli menetelmää eteenpäin niin, että samanaikaisesti voitiin määrittää kaksi eri hormonia. Ne olivat kasvuhormoni ja insuliini. Kumpaakin hormonia vastaan oli oma antiseeruminsa. Saostava antiseerumi oli molemmille yhteinen. Se sakkautti kasvuhormoni-vasta-ainekompleksin sekä insuliini-vasta-ainekompleksin. Toinen hormoni merkattiin jodi-125-isotoopilla ja toinen jodi-131-isotoopilla. Merkattujen hormonien sitoutumismäärät voitiin mitata samasta sakkanäytteestä γ-laskijalla, koska käytettyjen isotooppien maksimienergia-alueet sattuvat eri kohdille. Näin saadut tulokset olivat yhtä hyvät kuin määritettäessä hormonit erikseen.

Tällaisella menetelmällä saattaisi tässäkin tutkimuksessa olla tulevaisuudessa käyttöä. Ensin täytyy varmistua siitä, että tutkittavat hormonit, kasvuhormoni ja prolaktiini, eivät häiritse toistensa immunologisia reaktioita. Hormonien samanaikainen määrittäminen olisi erittäin nopeata ja taloudellista.

4. KIRJALLISUUSLUETTELO

ADDISON, G.M., HALES, C.N. & MILES, L.E.M. 1971. Quantitative determination of hormones in plasma by means of antibodies. "Immunological Methods in Endocrinology". Toim. FEDERLIN, K., HALES, C.N. & KRACHT, J. Academic Press. New York. 22-25.

ANDREWS, P. 1966. Nature 109: 155-157.

ASHFORD, W.R., CAMPBELL, J., DAVIDSON, J.K., FISHER, A.M., HAIST, R.E., LACEY, A.H., LIN, B., MARTIN, J.M., MORLEY, N.H., RASTOGI, K.S. & STORVICK, W.O. 1969. A consideration of methods of insulin assay. Diabetes 18: 828.

BERSON, S.A. & YALOW, R.S. 1968a. General principles of radioimmunoassay. Clin. Chim. Acta 22: 51-69.

– & – 1968b. Radioimmunoassay: A Status Report. Hospital Practice. November 1968: 73-83.

van CAUWENBERGE, H. & FRACHIMONT, P. 1970. "Assay of Protein and Polypeptide Hormones". Pergamon Press. Oxford 44.

CHARD, T. 1971. Observations on the uses of a mathematical model in radioimmunoassay. "Radioimmunoassay Methods". Toim. KIRKHAM, K.E. & HUNTER, W.M. Churchill Livingstone. Edinburgh. 595–598.

CLAUSEN, J. 1969. "Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules". North-Holland Publishing Company. Amsterdam. 427–430.

GREENWOOD, F.C., HUNTER, W.M. & GLOVER, J.S. 1963. The preparation of 131-I-labelled growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. 89: 114–123.

HERBERT, V. 1969. Coated charcoal separation of free labelled hormone from hormone bound to antibody. "Protein and Polypeptide Hormones". Toim. MARGOULIES, M. Excerpta Medica Foundation. Amsterdam. 55–60.

HURN, B.A.L. & LANDON, J. 1971. Antisera for radioimmunoassay. "Radioimmunoassay Methods". Toim. KIRKHAM, K.E. & HUNTER, W.M. Churchill Livingstone. Edinburgh. 121–142.

JACOBS, E.S. 1969. Use of activated charcoal in the radioimmunoassay of human growth hormone in plasma. J. Clin. Path. 22: 710–717.

MIDGLEY, A.R. Jr., NISWENDER, G.D. & REBAR, R.W. 1969. Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specificity). Acta endocr. 63: 163–184.

MORGAN, C.R. 1966. Immunoassay of human insulin and growth hormone simultaneously using ^{131}I and ^{125}I tracers. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123: 230–233.

– & LAZAROW, A. 1963. Immunoassay of insulin: Two antibody system. Plasma insulin levels of normal, subdiabetic and diabetic rats. Diabetes 12: 115–126.

RAPTIS, S. 1971. Radioimmunoassay of insulin: comparison of different separation techniques. "Immunological Methods in Endocrinology". Toim. FEDERLIN, K., HALES, C.N. & KRACHT, J. Academic Press. New York. 26–28.

RODBARD, D., RAYFORD, P.L., COOPER, J.A. & ROSS, G.T. 1968. Statistical quality control of radioimmunoassays. J. Clin. Endocr. 28: 1412–1418.

SCHAMS, D. & KARG, H. 1969. Radioimmunologische Bestimmung von Prolaktin im Blutserum vom Rind. Milchwissenschaft 24: 263–265.

SCHRÖDER, K.E. 1971. Radioimmunoassay for human growth hormone: problems and characteristics. "Immunological Methods in Endocrinology". Toim. FEDERLIN, K., HALES, C.N. & KRACHT, J. Academic Press. New York. 36–39.

THORELL, J.A. 1969. Improved accuracy of standard curves in radioimmunoassay. "Protein and Polypeptide Hormones". Toim. MARGOULIES, M. Excerpta Medica Foundation. Amsterdam. 335–336.

TRENKLE, A. 1971. Growth hormone secretion rates in cattle. J. Anim. Sci. 32: 115–118.

– . 1972. Radioimmunoassay of plasma hormones: review of plasma insulin in ruminants. J. Dairy Sci. 55: 1200–1211.

TURNER, C.D. 1966. "General Endocrinology". W.B. Saunders Company. Philadelphia. 135–137.

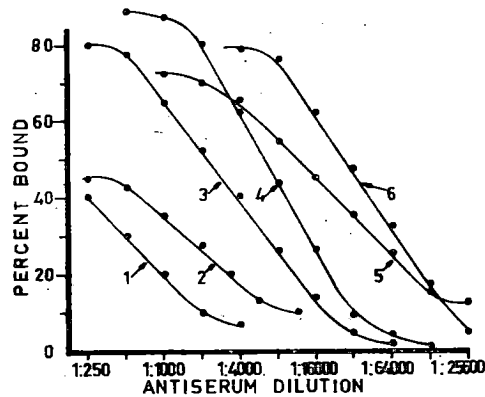
WALLACE, A.L.C. & BASSETT, J.M. 1970. Plasma growth hormone concentrations in sheep measured by radioimmunoassay. J. Endocr. 47: 21–36.

WIDE, L. 1969. Radioimmunoassay employing immunosorbents. Acta endocr. 63: 207–221.

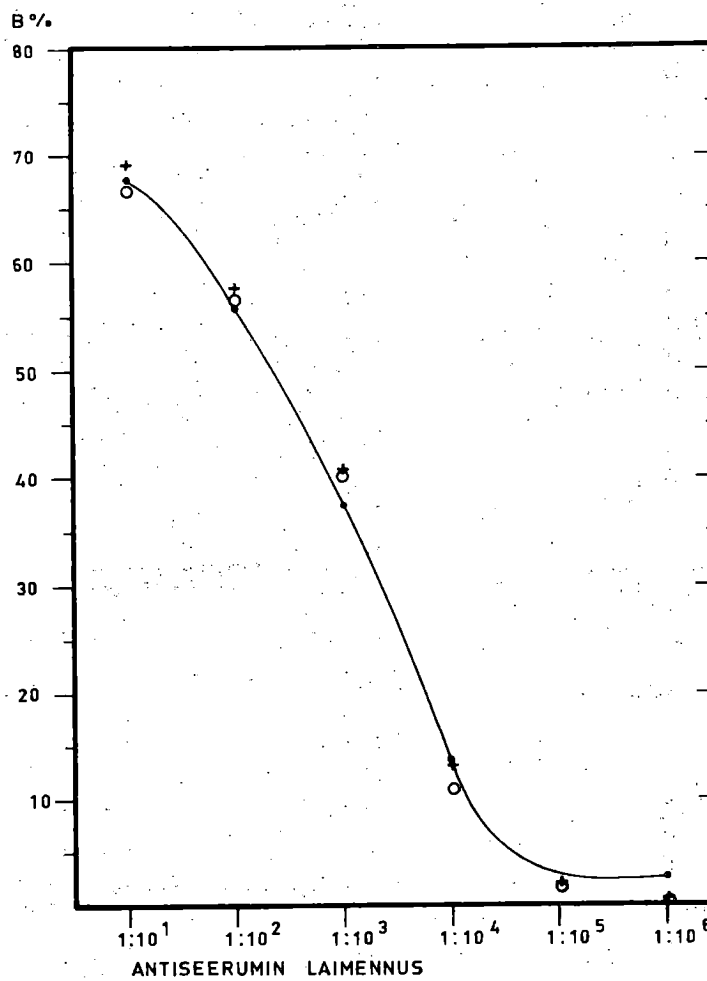
WOOL, M.S. & SELENKOW, H .A. 1968. Charcoal-dextran radioimmunoassay of human growth hormone. Acta endocr. 57: 109–114.

YALOW, R.S. & BERSON, S.A. 1968. Radioimmunoassay of human growth hormone in plasma. Principles, practices and techniques. "Growth Hormone". Toim. PECILE, A. & MÜLLER, E. Excerpta Medica Foundation. New York. 60–69.

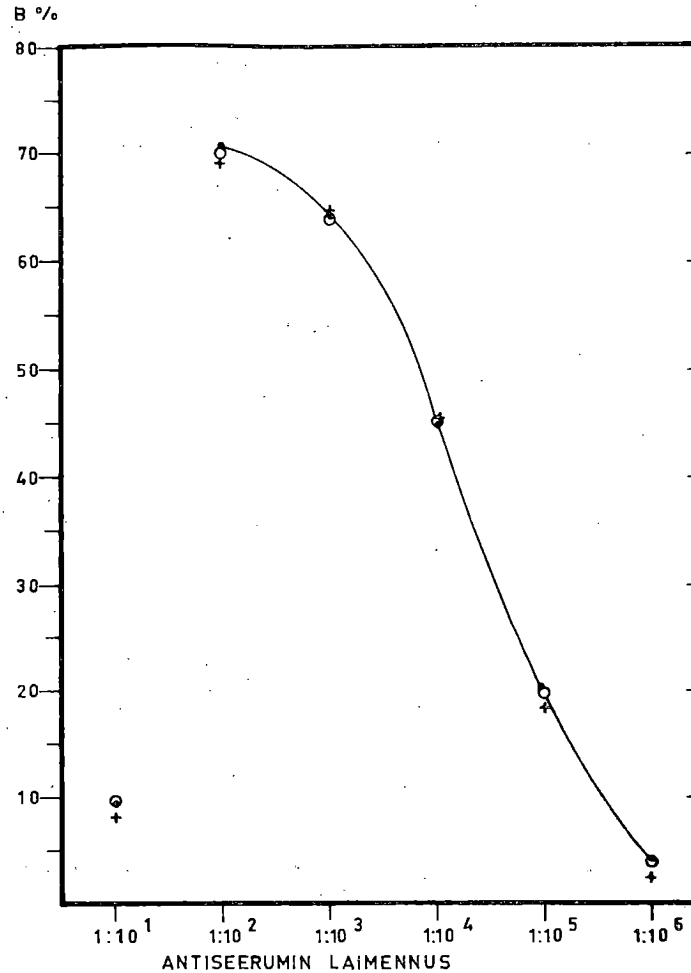
5. KUVAT



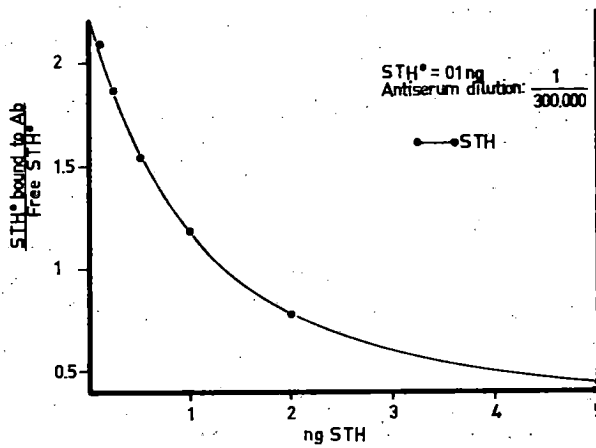
Kuva 1. Kuuden antiseerumin laimennuskäyrät (HURN & LANDON 1971).



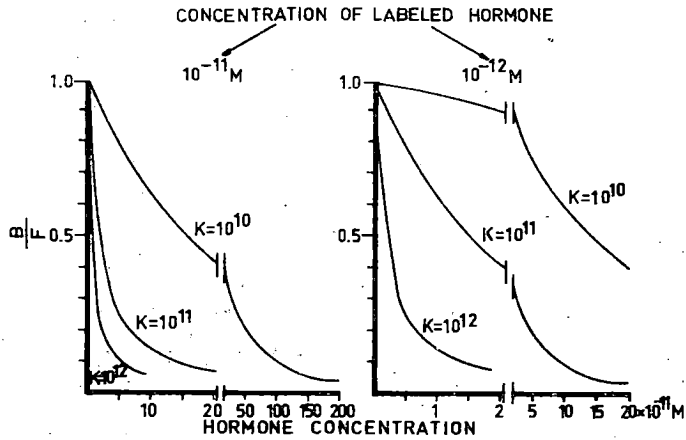
Kuva 2. Dextran-charcoal-menetelmällä saadut antiseerumin (lahjoitettu) laimennuskäyrät käyttämällä merkatusta prolaktiinista fraktiota 13. (•——•), fraktiota 14. (o——o) ja fraktiota 15. (×——×).



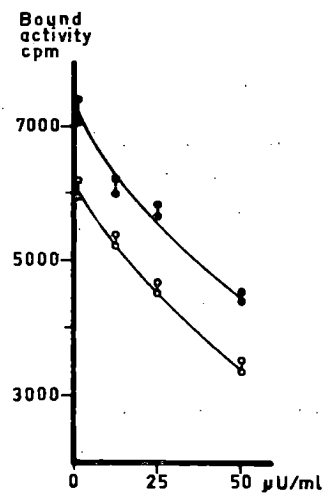
Kuva 3. Double-antibody-menetelmällä saadut antiseerumin (lahjoitettu) laimennuskäyrät käyttämällä merkatusta prolaktiinista fraktiota 13. (●——●), fraktiota 14. (○——○) ja fraktiota 15. (×——×).



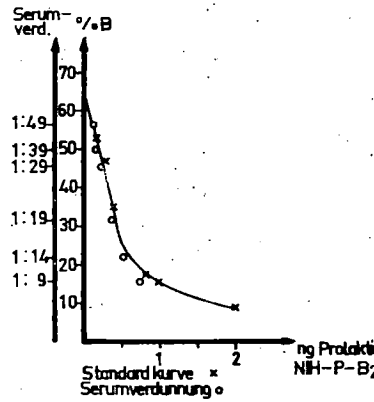
Kuva 4. Somatotrooppisen hormonin (STH) standardikäyrä (CAUWENBERGE & FRANCHIMONT 1970).



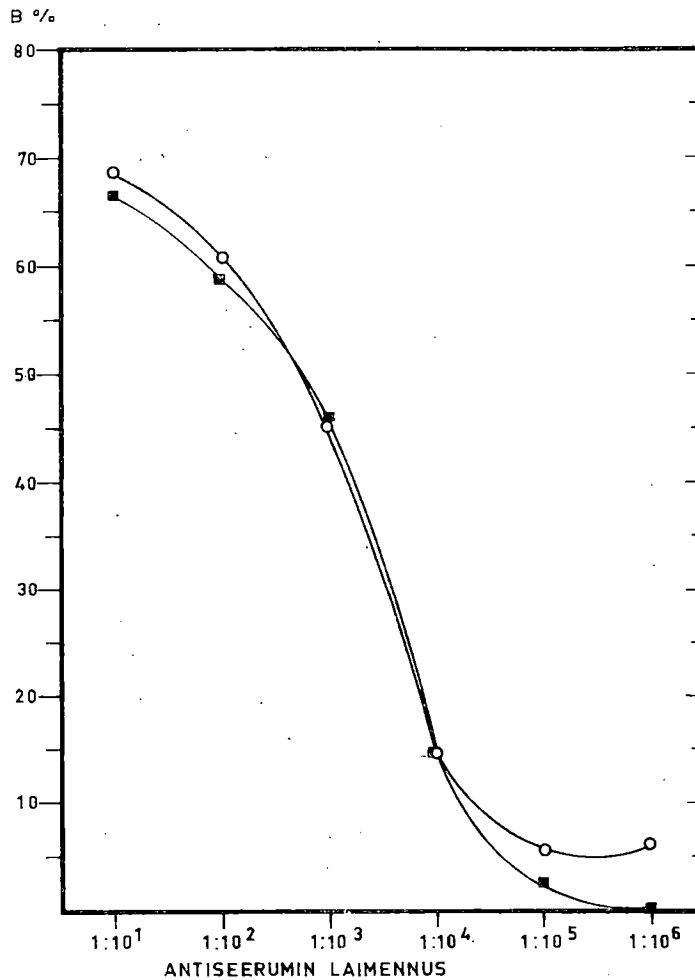
Kuva 5. Standardikäyriä, jotka on saatu käyttämällä erilaisia määriä merkattua hormonia (BERSON & YALOW, 1968).



Kuva 6. Standardikäyrät, joista toinen (alempi) on määritetty puskurissa ja toinen (ylempi) hormonivapaassa plasmassa (THORELL, 1969).



Kuva 7. Standardikäyrän ja seerumilaimennusten vertailu (SCHAMS & KARG 1969).



Kuva 8. Tutkimuksen aikana tuotetun (o——o) ja lahjaksi saadun (■——■) antiseerumin laimennuskäyrien vertailu.

NAUDAN PROLAKTIININ MÄÄRITTÄMISESTÄ RADIOIMMUNOLOGISESTI

Ritva Mäkelä ja Vappu Kossila

ESIPUHE

Tutkimus aloitettiin lokakuussa 1969 ja sitä jatketaan edelleen. Tutkimus on osa NKJ:n (Nordiska kontaktorganet för jordbruksforskning) pohjoismaiden yhteisprojektista no 22., jonka nimi on "Undersökning av sammanhanget mellan djurens hormonaktivitet och deras produktionsegenskaper". Tutkimus saatiin käyntiin Maatalouden tutkimuskeskuksen kotieläinjalostuslaitoksen esimiehen, prof. Kalle Maijalan, myötävaikutuksella. Suurin osa tutkimuksesta on tehty yhteistyönä Helsingin yliopiston kotieläintieteen laitoksen ja Maatalouden tutkimuskeskuksen kotieläinhoidon tutkimuslaitoksen kanssa. Isotooppityöskentely on suoritettu Helsingin yliopiston maatalous-metsätieteellisen tiedekunnan isotooppiosastolla. Radioaktiivisuusmittauksia on suoritettu myös Maatalouden tutkimuskeskuksen isotooppilaboratoriossa.

Tutkimuksen päärahoittajana on ollut Suomen Akatemian maatalous-metsätieteellinen toimikunta. Muina rahoittajina ovat olleet Suomen Kulttuurirahasto (Alma ja Jussi Jalkasen rahasto), August Johannes ja Aino Tiuran maatalouden tutkimussäätiö, Helsingin yliopisto, Maatalouden tutkimuskeskus, Pohjoismaiden maataloustutkijain yhdistys sekä Maa- ja metsätalousministeriö, mistä tutkimuksen suorittajat täten lausuvat lämpimät kiitoksensa.

LUETTELO LYHENTEISTÄ

BPR = naudan prolaktiini (bovine prolactin)

I-125 = jodi-125-isotooppi (iodine)

BPR-I-125 = jodi-125-isotoopilla merkattu naudan prolaktiini

B % = % käytetystä BPR-I-125:stä sitoutunut vasta-aineisiin verrattuna sokeaan kokeeseen, joka ei sisällä antiseerumia (binding)

GH = kasvuhormoni (growth hormone)

BSA = naudan seerumin albumiini (bovine serum albumin)

NRS = kanin normaali seerumi (normal rabbit serum)

EDTA = etyleenidiamiinitetraetikkahappo (ethylenediaminetetra-acetic acid)

cpm = pulssia minuutissa (counts per minute)

mg = 1×10^{-3} g

µg = 1×10^{-6} g

ng = 1×10^{-9} g

pg = 1×10^{-12} g

S I S Ä L L Y S L U E T T E L O

	Sivu
RADIOIMMUNOLOGISEN MENETELMÄN KÄYTTÖTARKOITUS JA PERIAATE.....	33
MENETELMÄT JA MATERIAALI.....	35
1. Prolaktiinin eristäminen.....	35
2. Antiseerumin valmistaminen ja puhdistaminen.....	35
2.1. Antiseerumin valmistaminen kaneissa.....	35
2.2. Antiseerumin valmistaminen marsuissa.....	36
2.3. Antiseerumeiden puhdistaminen.....	37
3. Prolaktiinin merkkaus ja merkatun prolaktiinin puhdistaminen...	37
4. Inkubointi.....	40
5. Vasta-aineisiin sitoutuneen ja sitoutumattoman prolaktiinin erottaminen.....	41
5.1. Hiilimenetelmä.....	41
5.2. Kaksoisvasta-ainemenetelmä.....	41
6. Radioaktiivisuusmittaukset.....	42
TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU.....	43
1. Prolaktiinin merkkaus.....	43
1.1. Jodin sitoutuminen prolaktiiniin.....	43
1.2. Merkatun prolaktiinin muutokset säilytyksen aikana.....	46
2. Antiseerumin immunologinen reagointi.....	48
2.1. Antiseerumin immunologinen reagointi immunisaation eri vaiheissa.....	48
2.2. Tutkimuksen aikana tuotetun ja lahjaksi saadun antiseerumin vertailu	50
2.3. Antiseerumin puhdistuksen vaikutus immunologiseen reagointiin.....	50
2.4. Antiseerumin laimennuspuskurin vaikutus antiseerumin laimennuskäyrään.....	51
2.5. Antiseerumin immunologisen aktiivisuuden säilyminen +4°C:ssa.....	51
3. Merkatun prolaktiinin immunologinen reagointi.....	52
3.1. Merkatun prolaktiinin puhdistusten vaikutus immunologiseen reagointiin.....	52
4. Inkubointi.....	53
4.1. Inkubointipuskurin vaikutus immunologiseen reaktioon.....	54

5. Vasta-aineisiin sitoutuneen ja sitoutumattoman prolaktiinin erottaminen..... 54
5.1. Dekstraanin molekyylikoon vaikutus hiilierotusmenetelmään 54
5.2. Hevosen seerumin vaikutus hiilierotusmenetelmään..... 56
5.3. Hiili- ja kaksoisvasta-aine-erotusmenetelmän vertailu.... 57
6. Standardikäyrä..... 58
6.1. Standardiprolaktiinilisäysten vaikutus merkatun prolaktiinin ja vasta-aineiden sitoutumiseen..... 59
6.2. Antiseerumin laimentamisen vaikutus naudan prolaktiinin standardikäyrään..... 60
6.3. Naudan prolaktiinin standardikäyrä..... 61
6.4. Antiseerumin puhdistamisen vaikutus prolaktiinin standardikäyrään..... 62
TIIVISTELMÄ..... 63
KIRJALLISUUSLUETTELO..... 65
KUVAT..... 68

RADIOIMMUNOLOGISEN MENETELMÄN KÄYTTÖTARKOITUS JA PERIAATE

Naudan maidonerityskyvyn hormonaalisen ja osittain myös geneettisen taustan selvittämiseksi ollaan parhaillaan kehittelemässä radioimmunologista menetelmää hormonien määrittämiseksi verinäytteistä. Prolaktiinin ollessa varsinainen maidonerityshormoni keskitytään ensin sen merkitykseen maidonerityskyvyssä ja sen analyysimenetelmän kehittelyyn.

Hormoneita esiintyy veressä yleensä erittäin pieniä määriä, 1×10^{-9} - 1×10^{-12} g/ml. Tästä syystä normaalit kemialliset analyysimenetelmät eivät sovellu niiden määrittämiseen. Aikaisemmin tähän tarkoitukseen käytettiin biologisia ja immunologisia menetelmiä. 1960-luvun alkupuoliskolla kehitettiin hormoneille radioimmunologinen menetelmä, joka on erittäin suosittu suuren tarkkuutensa, herkkyytensä ja spesifisyytensä ansiosta.

Radioimmunologinen menetelmä perustuu radioaktiivisella isotoopilla merkatun ja merkkaamattoman hormonin kykyyn sitoutua spesifisiin vasta-aineisiin. Ennen kuin menetelmä on mahdollinen täytyy tutkittavasta eläinlajista eristettyä hormonia olla puhtaana saatavilla. Tätä tarvitaan spesifisten vasta-aineiden tuottamiseen, hormonin merkkaukseen sekä standardiksi. Hormoni, sekä merkattu että merkkaamaton, toimii antigeeninä. Vasta-aineet saadaan vieraan eläinlajin seerumista, antiseerumista, hormoni-injektioiden jälkeen. Injisoitu hormoni siis saa aikaan vieraassa eläinlajissa vasta-aineiden muodostumista. Inkuboimalla hormonimolekyylejä ja vasta-ainemolekyylejä ne sitoutuvat toisiinsa. Tätä ilmiötä kutsutaan immunologiseksi reaktioksi. Merkattu ja merkkaamaton hormoni kilpailevat keskenään sitoutumisesta vasta-ainemolekyyleihin. Sitoutumaton hormoni erotetaan hormonivasta-ainekompleksista. Radioaktiivisuus mitataan joko sitoutuneesta tai sitoutumattomasta hormonista tai molemmista. Kun inkubointiin käytetään tunnettu määrä merkattua hormonia ja tunnettu määrä vasta-aineita, vapautuu merkattua hormonia vasta-aineista sitä enemmän, mitä enemmän lisätään merkkaamatonta hormonia joko standardina tai verinäytteestä. Analysoitavan näytteen antaman merkatun hormonin sitoutumismäärän perusteella lasketaan

hormonipitoisuus standardikäyrän avulla.

Radioimmunologisen menetelmän kehittelyn onnistumisen edellytyksiä ovat antiseerumin, merkatun hormonin ja standardihormonin immunologinen aktiivisuus sekä immunologisen reaktion että vasta-aineisiin sitoutuneen ja sitoutumattoman hormonin erotusmenetelmän optimaaliset olosuhteet. Näiden asioiden testaamiseksi suoritettiin useita laboratoriokokeita, joiden tuloksia on koottu tähän kirjoitukseen.

MENETELMÄT JA MATERIAALI

1. Prolaktiinin eristäminen

Naudan prolaktiinin eristäminen tapahtui Amerikassa the National Institutes of Healthissä, joka lahjoitti kaiken tässä tutkimuksessa käytetyn naudan prolaktiinin (NIH-P-B2). Hormonivalmiste säilytettiin kylmäkuivattuna tiiviisti suljetussa astiassa +4°C:ssa. Tämän prolaktiinivalmisteen biologinen aktiivisuus oli keskimäärin 19.9 kansainvälistä yksikköä milligrammassa lahjoittajan ilmoituksen mukaan. Puhdasta hormonivalmistetta tarvittiin spesifisten vasta-aineiden tuottamiseen, merkityn prolaktiinin valmistamiseen ja standardiliuoksiin.

2. Antiseerumin valmistaminen ja puhdistaminen

Naudan prolaktiinin antiseerumien valmistamiseen käytettiin pääasiassa CLAUSEN (1969) ohjeita. Antiseerumieläiminä käytettiin terveitä, sukukypsiä, nuoria kaneja ja marsuja.

2.1. Antiseerumin valmistaminen kaneissa

Rokotteen tekoa varten puhdasta prolaktiinivalmistetta (NIH-P-B2) liuotettiin fysiologiseen suolaliuokseen, jonka tilavuus vaihteli välillä 0.1 – 1.0 ml. Kanin lymfaattisen elimistön kiihottamiseksi lisättiin liuokseen vielä tehosteainetta, Freundin complete adjuvanttia niin, että adjuvanttia oli vähintään sama tilavuusmäärä kuin suolaliuosta. Näitä sekoitettiin huolellisesti, kunnes saatiin valkea, sitkeä vesi-öljy-emulsio.

Ruiskutettavan hormonin määrää pienennettiin immunisaation edistyessä. Ensimmäisellä ruiskutuskerralla eläin sai prolaktiinia 5 mg, kahdella seuraavalla kerralla 2.5 mg, tästä edelleen kolmella seuraavalla ker-

ralla 1 mg ja lopuilla yli kymmenellä kerralla 0.5 mg. Ruiskutukset tehtiin kullakin kerralla ihon alle ja useaan eri kohtaan lähelle imusolmukkeita.

Ruiskutusten väli oli yleensä kolme viikkoa, paitsi ensimmäisen ja toisen ruiskutuksen väli, joka oli kaksi viikkoa, toisen ja kolmannen ruiskutuksen väli, joka oli viikko sekä immunisaation loppuosa, jolloin pidettiin muutaman kuukauden tauko ja tämän jälkeen jälleen injisoitiin. Ruiskutusten ja verenottojen aikataulu käy ilmi kuvasta 1.

Kanien verinäytteet otettiin korvan keskusvaltimosta valuttamalla. Ne pyrittiin ottamaan aina kahden viikon kuluttua edellisestä ruiskutuksesta. Verinäytteet saivat seistä huoneenlämmössä seuraavaan päivään, jolloin ne sentrifugoitiin. Antiseerumien säilytys tapahtui osittain seerumina ja osittain kylmäkuivattuna -20°C:ssa.

Kanissa naudan prolaktiinia vastaan valmistettua antiseerumia saatiin myös lahjoituksena prof. KARGilta ja dos. SCHAMSilta Saksasta Münchenin teknillisen yliopiston maataloustieteellisen tiedekunnan fysiologian laitokselta. Tällä lahjoitetulla antiseerumilla suoritettiin muutamia kokeiluja (siv. 50 ja 57).

2.2. Antiseerumin valmistaminen marsuissa

Rokotteiden valmistamiseen käytettiin naudan prolaktiinivalmistetta, NIH-P-B2. Sen määrä kahdella ensimmäisellä ruiskutuskerralla oli 0.5 mg ja viidellä seuraavalla kerralla 1 mg. Kahdella ensimmäisellä kerralla hormoni lisättiin suoraan Freundin complete adjuvanttiin. Sen sijaan kolmannesta kerrasta seitsemänteen kertaan hormoni liuotettiin ensin ½ ml:aan fysiologista suolaliuosta. Tällöin Freundin adjuvanttia käytettiin 1 ml. Kolmannella ja neljännellä kerralla adjuvantista käytettiin complete-laatua ja viidennestä seitsemänteen kertaan saakka incomplete-laatua. Ruiskutukset tehtiin ihon alle useaan eri kohtaan 2-3 viikon välein. Marsujen ruiskutusten ja verenottojen aikataulu on kuvassa 2.

Marsujen kaikki verinäytteet otettiin neulalla suoraan sydämestä eli nk. sydänpunktiotekniikalla. Ensimmäisellä sydänpunktiokerralla, joka tapahtui ennen immunisaation aloittamista, otettiin marsuista seerumi-näyte (0-näyte). Seuraava sydänpunktio suoritettiin immunisaa-

tion aikana. Kolmas sydänpunktio suoritettiin marsujen lopettamisen yhteydessä. Verinäytteet saivat hyytyä, ja ne pidettiin seuraavaan päivään +4°C:ssa. Hyytymän poistamisen jälkeen ne sentrifugoitiin. Näytteiden säilytys tapahtui -20°C:ssa.

2.3. Antiseerumeiden puhdistaminen

Kun kanin antiseerumeita puhdistettiin, siihen käytettiin homogenisoitua ja kylmäkuivattua (lyofilisoitua) naudan aivo-, maksa- ja munuaiskudosta sekä kylmäkuivattua seerumia (siv. 50 ja 62). Näiden vaikutusta antiseerumiin kokeiltiin sekä erikseen että yhdessä. 50 mg kutakin kudoslyofilisaattia tai 30 mg lyofilisoitua seerumia liuotettiin 1 ml:aan tislattua vettä. Tähän seokseen lisättiin 1 ml antiseerumia. Seoksia inkuboitiin 1 tunti +37°C:ssa ja sen jälkeen 24 tuntia +4°:ssa. Tämän jälkeen ne sentrifugoitiin, ja tutkimuksiin käytettiin vain kirkasta antiseerumisupernatanttia.

3. Prolaktiinin merkkaus ja merkatun prolaktiinin puhdistaminen

Naudan prolaktiinin (NIH-P-B2) merkkaukseen käytettiin GREENWOODin ym. (1963) kehittämää menetelmää.

Merkkaukseen käytetyt aineet ja määrät olivat seuraavat:

1 mCi	NaJ-125 10 µl:ssä NaOH-liuosta, pH 8-11 (Amersham)
10 µl	0.5 M fosfaattipuskuria, pH 7.5
5 µg	naudan prolaktiinia (NIH-P-B2) 10 µl:ssä 0.05 M fosfaattipuskuria, pH 7.5, jossa oli 0.15 M NaCl
10 µl	kloramiini-T (3 mg/2 ml vm. puskuria), 15 µg/10 µl

Reaktioaika oli 20 tai 30 sekuntia, jonka jälkeen lisättiin seuraavat aineet:

25 µl Na-metabisulfiittia (3 mg/2 ml vm. puskuria), 37.5 µg/25 µl
200 µl KJ (15 mg/2 ml vm. puskuria).

Kun hormonin merkkausreaktio oli koeputkessa saatettu loppuun, erotettiin merkattu hormoni reagensseista geelisuodatuksen avulla. Tätä toimenpidettä kutsutaan merkatun hormonin ensimmäiseksi puhdistamiseksi. Tarkoitukseen käytettiin Sephadex-G-100 pylvästä (1 x 25 cm), joka oli käsitelty BSA:lla estämään merkatun hormonin adsorptiota pylvääseen. Eluointiin käytettiin 0.07 M veronaalipuskuria pH 8.6. 8 tipan fraktiot kerättiin koeputkiin, joissa oli joko 1 ml tai 0.1 ml 0.5 % BSA:ta sisältävää eluointipuskuria. Fraktioiden suhteelliset radioaktiivisuudet mitattiin automaattisilla gammatuikelaskimilla (Wallac GTL $^{300-1000}$ ja LKB-Wallac 1280 Ultrogamma). Fraktioiden kokonaisaktiivisuuksien mittaaminen ei ollut mahdollista korkeiden säteilymäärien vuoksi.

Merkatulle prolaktiinille saatettiin suorittaa vielä lisäpuhdistus. Tätä toimenpidettä kutsutaan merkatun hormonin toiseksi puhdistamiseksi. Sekin tehtiin geelisuodatuksella. Tällä kertaa käytettiin Sephadex-G-200-pylvästä (1 x 25 cm). BSA-käsittely, eluointi ja fraktioiden keruu olivat samat kuin ensimmäisessä geelisuodatuksessa. Jälleen mitattiin fraktioiden suhteelliset radioaktiivisuudet.

Antiseerumin laimennuskäyrien ja standardikäyrien määrittämiseen käytettiin joko yhteen tai kahteen kertaan puhdistettua merkattu prolaktiinia, joka edellisessä tapauksessa oli hormonipiikin fraktioista ja jälkimmäisessä tapauksessa monomeeristä hormonia sisältävistä fraktioista. Yhteen määritykseen käytettiin 100 µl laimennettua merkattua prolaktiinia, jonka mitattu säteilymäärä oli välillä 4000 - 25000 cpm käytettäessä laskimelle 40 %:n mittaustehokkuutta ja noin 30 000 cpm käytettäessä 60 % mittaustehokkuutta.

Spesifisen aktiivisuuden laskemiseksi oli ohjeita (GREENWOOD ym. 1963, SCHAMS 1974), jotka tämän tutkimuksen puitteissa eivät olleet käyttökelpoisia. Tästä syystä jouduttiin kokeilemaan omia menetelmiä spesifisen aktiivisuuden selvittämiseksi.

Koska merkatun hormonin spesifistä aktiivisuutta ei voitu suoraan laskea, pyrittiin ensin kokeellisesti selvittämään jodin sitoutumisprosentti ja siitä edelleen laskemalla merkatun hormonin spesifinen aktiivisuus. Jodin sitoutumisprosentin laskemiseen tässä tutkimuksessa käytettiin kahta eri menetelmää: a ja b. Kumpikin perustui geelisuodatuksessa saatujen fraktioiden suhteellisiin radioaktiivisuuksiin (kuva 3). Sekä hormoni- että jodi-

piikki leikattiin paperilta irti ja punnittiin. Piikkien painojen perusteella laskettiin radiojodin sitoutumisprosentti hormoniin seuraavasti:

a) $S\% = \frac{100 \cdot HPP}{(HPP+JPP)}$

S% = jodin sitoutumisprosentti hormoniin
HPP = hormonipiikin paino (g)
JPP = jodipiikin paino (g)

Tämä pätee silloin, jos sekä vapaa että sitoutunut jodi adsorboituvat reaktioputkeen, tipettiin ja geelipylvääseen samassa suhteessa.

b) GREENWOODin ym. (1969) tutkimuksissa vapaan ja sitoutuneen jodin adsorboitumiset olivat erilaiset, niin että hormonipiikissä oli vain 35.1 % sitoutuneesta jodimäärästä ja jodipiikissä 96 % vapaasta jodista, kun jodaukseen käytettiin 2.0 mCi jodi-131-isotooppia. Näiden mukaan korjattiin piikkien painot, ennen kuin sitoutumisprosentti laskettiin.

$$s\% = \frac{100 \cdot kHPP}{(kHPP+kJPP)}$$

$$kHPP = \frac{100 \cdot HPP}{35.1}$$

$$kJPP = \frac{100 \cdot JPP}{96}$$

kHPP = korjattu hormonipiikin paino (g)
kJPP = korjattu jodipiikin paino (g)

Kun jodin sitoutumisprosentti ja jodaukseen käytetty jodimäärä sekä hormonimäärä tunnettiin, pystyttiin näiden perusteella laskemaan spesifinen aktiivisuus:

$$SA = \frac{S\%}{100} \cdot \frac{RAM}{HM}$$

S% = sitoutumisprosentti
SA = spesifinen aktiivisuus ($\mu Ci/\mu g$)
RAM = radioaktiivisuusmäärä (μCi)
HM = hormonimäärä (μg)

4. Inkubointi

Inkubointipuskurina oli 0.07 M veronaalipuskuri, pH 8.6, jossa oli 0.5 % BSA ja 0.15 M NaCl. Tällä puskurilla laimennettiin myös merkattu prolaktiini ja standardiprolaktiini. Antiseerumilaimennukset tehtiin muuten samanlaisella puskurilla, paitsi että puskuriin oli lisätty 1-3 % NRS vähentämään vasta-aineiden epäspesifistä sitoutumista koeputken seinämiin. Muilta osin antiseerumin laimennuskäyrien määrittämisessä ja standardikäyrien määrittämisessä käytettiin toisistaan hiukan poikkeavia inkubointiolosuhteita.

Antiseerumin laimennuskäyrien määrittämisessä inkubointiolosuhteet olivat seuraavat:

100 µl antiseerumilaimennusta
100 µl merkattua prolaktiinia
500 µl puskuria

Aineet pipetoitiin tässä järjestyksessä koeputkiin. Inkubointi tapahtui 1-2 vuorokauden aikana, +4°C.

Standardikäyrämäärityksissä inkubointiolosuhteet olivat seuraavat:

100 µl standardiliuosta
100 µl antiseerumilaimennusta
500 µl puskuria (Kokeissa siv. 60 ja 61 puskuria oli vain 100 µl).

Edellä mainitussa järjestyksessä aineet pipetoitiin koeputkiin. Tämän jälkeen inkuboitiin seuraavaan päivään, +4°C. Sen jälkeen lisättiin 100 µl merkattua prolaktiinia. Inkubointia jatkettiin vielä 4 vuorokautta, +4°C. Aina ennen inkubointia koeputket ravisteltiin huolellisesti.

Inkuboinnit suoritettiin yleensä lasisissa koeputkissa (12 x 100 mm). Kokeisiin siv. 59 ja 60 käytettiin muoviputkia (11 x 70 mm).

Kaikki tämän tutkimuksen aikana käytetyt puskurit sisälsivät 0.1 % natriumatsidia (NaN_3).

5. Vasta-aineisiin sitoutuneen ja sitoutumattoman prolaktiinin erottaminen

Tämän tutkimuksen yhteydessä käytettiin kahta erilaista menetelmää vasta-aineisiin sitoutuneen ja sitoutumattoman hormonin erottamiseen. Ensimmäkseen käytettiin hiilimenetelmää (JACOBS 1969, SCHAMS & KARG 1969). Myös kokeiltiin kaksoisvasta-ainemenetelmän (ohje the National Institutes of Healthista) sopivuutta sitoutuneen ja sitoutumattoman naudan prolaktiinin erottamiseen (siv. 57).

5.1. Hiilimenetelmä

Käytettäessä hiilimenetelmää vasta-aineisiin sitoutuneen ja sitoutumattoman prolaktiinin erottamiseen lisättiin inkuboinnin jälkeen ensin 0.1 ml hevosen seerumia. Se oli laimennettu 1:4 0.07 M veronaalipuskurilla, pH 8.6. Tästä samasta puskurista valmistettiin myös hiilisuspensio. Sen valmistaminen tapahtui siten, että 5 g hiiltä (Norit A) lisättiin 50 ml:aan puskuria ja 0.5 g Dextran-T-110 liuotettiin erikseen 50 ml:aan samaa puskuria. Dekstraanin liukenemisen jälkeen hiilisuspensio ja dekstraaniliuos yhdistettiin. Tällöin suspensio sisälsi 5 % hiiltä ja 0.5 % dekstraania. Suspensiota sekoitettiin magneettisekoittajalla jäävesihauteella. Tällaista kylmää suspensiota käytettiin 0.8 ml antiseerumin laimennuskäyrien määrittämiseen ja 1.0 ml standardikäyrien määrittämiseen putkea kohti. Lisäyksen jälkeen putket ravisteltiin ja ne saivat inkuboitua 15 min jäävesihauteessa. Sen jälkeen ne sentrifugoitiin 20 min 2000 kierrosta/min, +4°C. Kokeissa siv. 60 ja 61 sekä inkubointi että sentrifugointi tapahtui huoneenlämmössä, koska RATCLIFFEn (1974) mukaan ei erotusvaiheen inkubointilämpötilalla eikä myöskään -ajalla ole ratkaisevaa merkitystä hiilierotusmenetelmässä.

5.2. Kaksoisvasta-ainemenetelmä

Kaksoisvasta-ainemenetelmään (ohje the National Institutes of Healthistä) tarvittiin kahta erilaista antiseerumia. Toisessa antiseerumissa olivat naudan prolaktiinia vastaan tuotetut spesifiset vasta-aineet. Tämä antiseerumi oli tuotettu kanissa. Kaksoisvasta-ainemenetelmässä tätä antiseerumia kutsutaan ykkösantiseerumiksi. Toisessa antiseerumissa oli vasta-

aineita naudan prolaktiinin vasta-aineita, kanin immunoglobuliineja (IgG-globuliineja), vastaan. Tätä antiseerumia kutsutaan kakkosantiseerumiksi. Se saatiin lahjoituksena tutkimusryhmältä LEPPÄLUOTO-LYBECK-RANTA Helsingin yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan fysiologian laitokselta. Edellämainitut tutkijat olivat tuottaneet kakkosantiseerumia ruiskuttamalla kanin IgG-globuliineja lampaaseen. Kakkosantiseerumin vasta-aineet sitoutuvat erotusvaiheessa immunologisesti hormoni-vasta-ainekompleksiin muodostaen siten erittäin suuren kompleksin, joka saostuu. Sentrifugoimalla sakka pohjaan saadaan vasta-aineisiin sitoutunut hormoni erottumaan liuoksessa vapaana olevasta hormonista.

Kaksoisvasta-ainemenetelmässä käytettiin myös erilaisia puskureita kuin hiilimenetelmässä. Peruspuskurina oli fosfaattisuolaliuos, joka oli 0.01 M fosfaattipuskuri, pH 7.6, ja joka sisälsi 0.15 M NaCl. Merkatun prolaktiinin laimentamiseen käytettiin fosfaattisuolaliuosta, jossa oli 0.1 % BSA. Inkubointipuskurina oli 1.0 % BSA sisältävä fosfaattisuolaliuos. Ykkösantiseerumin laimentamiseen käytettiin fosfaattisuolaliuosta, jossa oli 0.05 M EDTA ja 3 % NRS. Kakkosantiseerumin laimentamiseen käytettiin fosfaattisuolaliuosta sellaisenaan.

Inkubointi prolaktiinin ja sen vasta-aineiden immunologisen reaktion aikaansaamiseksi suoritettiin samoin kuin hiilimenetelmässä. Inkuboinnin jälkeen lisättiin 200 µl kakkosantiseerumilaimennusta (1:4). Sen jälkeen putkia inkuboitiin vielä seuraavaan päivään, +4°C. Sitten putket sentrifugoitiin 2500 kierrosta/min, 30 min, +4°C. Supernatantti kaadettiin pois, ja sakan radioaktiivisuus mitattiin.

6. Radioaktiivisuusmittaukset

Radioaktiivisuusmittaukset suoritettiin automaattisilla gammatuikelaskimilla (Wallac $GTL^{300-1000}$ ja LKB-Wallac 1280 Ultro-Gamma). Wallac, $GTL^{300-1000}$ oli säädetty siten, että mittaustehokkuus jodi-125-isotoopille oli noin 40 % ja vastaava lukema LKB-Wallac 1280 Ultro-Gammalle oli noin 60 %. Kutakin putkea mitattiin joko yksi tai kaksi minuuttia.

TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

1. Prolaktiinin merkkaus

Jotta radioimmunologisessa menetelmässä voidaan seurata hormonimolekyylien immunologista sitoutumista vasta-aineisiin, tehdään hormonimolekyyli radioaktiiviseksi eli merkataan. Proteohormoneihin liitetään tavallisesti jodiisotooppi, mistä syystä toimenpidettä kutsutaan myös jodaukseksi. Tähän tarkoitukseen käytetään nykyään jodi-125-isotooppia. Jodin liittäminen hormoniin voi tapahtua monella eri menetelmällä (HUNTER 1971, HUNTER 1974). Yleisesti käytetty menetelmä on GREENWOODin ym. (1963) kehittämä kloramiini-T-tekniikkaan perustuva menetelmä, jota myös tässä tutkimuksessa käytettiin. Siinä jodi sitoutuu ennen kaikkea tyrosiiniin sekä jossain määrin histidiiniin. Reaktio tapahtuu kahdessa vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa kloramiini-T hapettaa radioaktiivisen jodidin jodiatomeiksi. Toisessa vaiheessa jodi korvaa tyrosiinin aromaattisesta renkaasta vedyn. Jodausreaktio pysäytetään natriummetabisulfiitilla, joka pelkistää jodin takaisin jodidiksi. Merkattu hormoni saadaan eroon reaktiossa mukana olleista aineista geelisuodatuksella. Jodin sitoutuminen hormoniin riippuu monista tekijöistä: kloramiini-T:n, jodi-125:n ja jodattavan hormonin määrästä sekä reaktioajasta, lämpötilasta, pH:sta, ionivahvuudesta ja reaktioliuoksen tilavuudesta (HUNTER 1971).

1.1. Jodin sitoutuminen prolaktiiniin

Siv. 37 ilmoitetulla merkkausmenetelmällä saatiin mm. kuvan 3 osoittama radioaktiivisuuden suhteellinen jakautuminen eri fraktioihin ensimmäisen geelisuodatuksen jälkeen. Käyrää kutsutaan jodauskäyräksi. Geelisuodatuksessa aineiden erottuminen toisistaan tapahtuu yleensä molekyylikoon perusteella siten, että ensimmäisinä tulevat suodatuspylväästä ulos isot molekyylit. GREENWOOD ym. (1963) osoittivat kokein, että jodauskäyrän ensimmäinen piikki sisälsi hormoniin sitoutuneen radioaktiivisen jodin ja toinen vapaan, sitoutumatta jääneen radioaktiivisen jodin. Ensimmäistä piikkiä kutsutaan hormoni- tai proteiinipiikiksi ja toista jodipiikiksi. Tässä tutkimuksessa saadussa jodauskäyrässä (kuva 3) oli selvästi myös kaksi piikkiä. Ensimmäinen edusti prolaktiiniin sitoutunutta jodia, koska prolaktii-

nin molekyylipaino, noin 24000 (ANDREWS 1966), on korkeampi kuin jodin, 126.9. Toinen piikki sisälsi vapaan jodin. Piikkien sisällyksen varmistamiseksi suoritettiin kaikki merkkaustoimenpiteet ja geelisuodatus ilman prolaktiinia. Kuva 4 osoittaa saatua tulosta. Tässä tapauksessa kuvan 3 ensimmäinen piikki puuttui, jotan sen täytyi olla hormonipiikki. SCHAMSin (1974) ilmoittama jodauskäyrä (kuva 5) naudan prolaktiinille käyttämällä kloramiini-T-tekniikkaa merkkaukseen ja Sephadex-G-50:tä geelisuodatukseen muistuttaa suuresti tässä tutkimuksessa saatua jodauskäyrää. Kuvan 3 jodauskäyrän perusteella jodia todella sitoutui prolaktiiniin näissä olosuhteissa.

Jodin sitoutumismäärän laskemiseksi kokeiltiin tämän tutkimuksen yhteydessä kahta eri menetelmää (siv.39), joiden paikkansapitävyyttä testattiin soveltamalla niitä muiden tutkijoiden saamiin jodauskäyriin ja vertaamalla näin saatuja sitoutumisprosentteja tutkijoiden ilmoittamiin sitoutumisprosentteihin, jotka saatiin joko suoraan tai laskemalla spesifisis-

Taulukko 1. Kahdella eri menetelmällä (a ja b) saatujen jodin sitoutumisprosenttien vertailu muiden tutkijoiden ilmoittamiin jodin sitoutumisprosentteihin.

Kirjallisuusviite	Tutkijoiden ilmoittama sitoutumisprosentti	a-menetelmällä saatu sitoutumisprosentti	b-menetelmällä saatu sitoutumisprosentti
GREENWOOD ym. (1963)	60-75	65	84
SCHAMS (1974)	26.3 [1)]	39	64
PEAKE (1974)	n. 60	65	84
HANDWERGER & SCHERWOOD (1974)	60-70	63	82
TYREY ym. (1974) [2)]	43.8-62.5 [1)]	45	69

1) laskettu spesifisen aktiivisuuden mukaan

2) merkkaukseen käytetty jodi-131-isotooppia

tä aktiivisuuksista (Taulukko 1). a-menetelmällä saadut arvot olivat alhaisempia ja huomattavasti lähempänä tutkijoiden ilmoittamia sitoutumisprosentteja kuin b-menetelmällä saadut. Mikäli taulukossa 1 mainittujen tutkijoiden ilmoittamat sitoutumisprosentit olivat oikein ja tarkasti määritettyjä, voitiin a-menetelmää pitää luotettavampana jodin sitoutumisen mittausmenetelmänä kuin b-menetelmää. a-menetelmällä saadut paremmat tulok-

set merkitsevät sitä, että vapaa ja sitoutunut jodi-125-isotooppi adsorboituivat miltei samoissa suhteissa merkkauksessa ja geelisuodatuksessa käytettyihin aineisiin ja välineisiin. Vaikka a-menetelmäkään ei olisi ehdottoman tarkka, antaa se kuitenkin mahdollisuuden vertailla jodin sit utumismääriä eri merkkauskerroilla. Tämä taas on välttämätöntä, jotta pystytään laskemaan, mikä säteilymäärä kullakin kerralla vastaa määrityksissä tarvittavaa hormonimäärää.

a-menetelmää käytettiin viidellä eri merkkauskerralla jodin sitoutumisprosenttien määrittämiseen (Taulukko 2). Kaikki merkkaukset suoritettiin muuten samoin (siv.37) lukuunottamatta radiojodin määrän ja jodausajan vaihteluita. Kun jodi-125-isotoopin määrä vaihteli välillä 1.0 - 1.5 mCi, vaihteli sitoutumisprosentti välillä 32.9 - 91.1 % käytettäessä 30 sekunnin jodausaikaa. Jodin sitoutuminen prolaktiiniin vaihteli jopa näennäisesti samoissakin olosuhteissa eri jodauskerroilla. Käytettäessä 1 mCi jodi-125-isotooppia sitoutumisprosentit vaihtelivat välillä 32.9 - 88.6. Suuret vaihtelut sitoutumisprosenteissa ovat tavallisia, ja ne johtuvat merkkaukseen käytetyn jodin spesifisen aktiivisuuden vaihteluista.

Taulukko 2. Viidellä eri merkkauskerralla saadut jodin sitoutumisprosentit (a-menetelmällä) ja naudan merkatun prolaktiinin spesifiset aktiivisuudet.

Merkkauskerta	Jodimäärä mCi	Sitoutumisprosentti	Spesifinen aktiivisuus µCi/µg
1. [1)]	1	32.9	65.8
2.	1	70.9	141.8
3.	1	88.6	177.2
4.	1.22	91.1	222.3
5.	1.5	64.4	193.2

1) Jodauskäyrä kuvassa 3.

Sen jälkeen kun jodin on todettu sitoutuneen hormoniin, täytyy määrittää merkatun hormonin spesifinen aktiivisuus eli radioaktiivisuusmäärä hormonin painoyksikköä kohti (µCi/µg tai nCi/ng). Tämän jälkeen tiedetään, mikä säteilymäärä vastaa määrityksiin tarvittavaa hormonimäärää. Näin kuhunkin määritykseen osataan käyttää merkattua hormonia juuri haluttu määrä. Viidellä eri jodauskerralla saadut, siv. 39 olevan kaavan avulla lasketut, merkatun prolaktiinin spesifiset aktiivisuudet vaihtelivat välillä 65.8 - 222.3 µCi/µg (Taulukko 2). Radioimmunologiseen menetelmään tarvittavan mer-

katun hormonin spesifisen aktiivisuuden suuruus riippuu herkkyydestä, jolla isotoopin lähettämä radioaktiivinen säteily voidaan mitata, säteilymittauksen käytettävästä tilavuudesta sekä mitattavien näytteiden hormonikonsentraatiosta (BERSON & YALOW 1973). Merkatun hormonin määrän on oltava pienempi kuin mitattavan hormonin määrä. Mitattavien näytteiden alhaisista hormonipitoisuuksista johtuen myös merkatun hormonin pitoisuuden on oltava alhainen. Jotta säteilymittaukset ovat tilastollisesti luotettavia, täytyy spesifisen aktiivisuuden olla riittävän korkea. Toisaalta taas merkattu hormoni immunologisesti inaktivoituu sitä herkemmin, mitä enemmän siihen liitetään radioaktiivista jodia.

Näistä syistä sopivimman spesifisen aktiivisuuden määrittäminen kullekin hormonille on erikseen tehtävä immunologisten kokeiden perusteella. GREENWOOD ym. (1963) saivat korkeita spesifisiä aktiivisuuksia, 250–590 μCi/μg, ihmisen kasvuhormonille käyttämällä 2–4 mCi jodi-131-isotooppia ilman, että hormonin immunologinen aktiivisuus siitä kärsi. Useille proteohormoneille, joihin naudan prolaktiinikin kuuluu, on noin 100 μCi/μg havaittu radioimmunologiseen menetelmään sopivaksi spesifiseksi aktiivisuudeksi (HUNTER 1971). SCHAMSin (1974) mukaan taas radioimmunologisiin määrityksiin tarkoitetun, naudan merkatun prolaktiinin spesifinen aktiivisuus ei saisi ylittää arvoa 100 μCi/μg. Kuvan 3 tapauksessa merkatun prolaktiinin spesifiseksi aktiivisuudeksi saatiin 65.8 μCi/μg. Kokeisiin siv. 60 ja 61 käytettiin naudan merkattua prolaktiinia, jonka spesifinen aktiivisuus oli 173 nCi/ng. Saadun standardikäyrän perusteella (kuva 33) näinkin korkean spesifisen aktiivisuuden omaava merkattu prolaktiini säilytti ainakin huomattavan osan immunologisesta aktiivisuudestaan.

1.2. Merkatun prolaktiinin muutokset säilytyksen aikana

Merkattu hormoni ei ole pysyvä yhdiste. Jo jodauksen aikana osa hormonista tuhoutuu ja tätä tuhoutumista jatkuu vielä merkkauksen jälkeenkin. Tuhoutuminen on märehtijöiden hormonien osalta lähinnä useiden hormonimolekyylien yhteenlittymistä eli aggregoitumista (CUNNINGHAM 1969). Nimenomaan kloramiini-T-tekniikkaan perustuva merkkaus tuhoaa merkattua hormonia enemmän kuin muut merkkausmenetelmät (MOUDGAL & MADHWA RAJ 1974). Tuhoamista aiheuttaa itse kloramiini-T, joka on voimakas hapetin. Mitä vähemmän merkkauksessa käytetään kloramiini-T:tä, sitä pienemmiksi jäävät myös tuhovaikutukset (BRYANT & GREENWOOD 1968). Märehtijöiden aggregoituneen

ja monomeerisen hormonin erotukseen sopii hyvin Sephadex-G-200-geelisuodatus (CUNNINGHAM 1969).

Tämän tutkimuksen puitteissa seurattiin merkatun naudan prolaktiinin tuhoutumisen jatkumista säilytyksen aikana. Merkattu prolaktiini säilytettiin +4°C:ssa, ja se puhdistettiin uudelleen 9 ja 23 vuorokauden kuluttua Sephadex-G-200:lla (siv. 38). Geelisuodatuksessa saatujen fraktioiden radioaktiivisuuksien perusteella piirretyissä käyrissä (kuva 6 ja 7) oli kolme piikkiä. Ensimmäinen edusti aggregoitunutta prolaktiinia, toinen monomeeristä prolaktiinia ja kolmas säilytyksen aikana hormonista irronnutta, vapaata jodia. Säilytyksen aikana sekä aggregoituneen prolaktiinin että vapaan jodin määrät jatkuvasti lisääntyivät. Merkatun prolaktiinin tuhoutuminen siis jatkui säilytettäessä hormonia +4°C:ssa. Vastaavanlaiseen tulokseen pääsi myös JACOBS (1974) säilyttäessään kloramiini-T-tekniikalla merkattua sian prolaktiinia -20°C:ssa (kuva 8).

2. Antiseerumin immunologinen reagointi

Antiseerumin laimennuskäyrän määrittämistä käytetään ennen kaikkea antiseerumeiden vasta-ainepitoisuuksien toteamiseen (HURN & LANDON 1971). Siinä antiseerumista valmistettua laimennussarjaa inkuboidaan vakiomäärän kanssa merkattua hormonia. Tämän jälkeen määritetään merkatun hormonin sitoutumisprosentti vasta-aineisiin kussakin laimennuksessa. Antiseerumin laimennuskäyrä on tapana esittää graafisesti siten, että antiseerumin laimennukset merkitään logaritmisen asteikon abskissalle ja vasta-aineisiin sitoutuneen merkatun hormonin prosenttimäärä aritmeettisen asteikon ordinaatalle. Kuvassa 9 on radioimmunologiseen menetelmään sopivan antiseerumin tyypillinen laimennuskäyrä (MOUDGAL & MADHWA RAJ 1974). Siinä on käytetty samanlaisia antiseerumin laimennuksia, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$ ja $1:10^6$, kuin tämän tutkimuksen yhteydessä suoritetuissa kokeissa.

Antiseerumin vasta-ainepitoisuuden eräänä arvosteluperusteena voidaan pitää sitä antiseerumin laimennusta, joka 50%-sesti sitoo merkatun hormonin. Mitä enemmän antiseerumia voidaan laimentaa 50 %-isen sitoutumisen aikaansaamiseksi, sitä enemmän antiseerumi sisältää vasta-aineita.

Jos antiseerumin tai merkatun hormonin immunolginen aktiivisuus laskee tai immunologisen reaktion olosuhteet huononevat, tapahtuu merkatun hormonin ja vasta-aineiden sitoutumista vähemmän, mikä näkyy alhaisina merkatun hormonin sitoutumisprosentteina. Tämän perusteella antiseerumin laimennuskäyrää voidaan käyttää edellä mainittujen asioiden testaamiseen, niin kuin tässä tutkimuksessa on tehty.

2.1. Antiseerumin immunologinen reagointi immunisaation eri vaiheissa

Vasta-aineiden muodostuminen riippuu monista eri tekijöistä, kuten immunisoitavan aineen määrästä ja laadusta, antiseerumieläinestä, rokotteen valmistamiseen käytettävästä tehosteaineesta, adjuvantista, ruiskutuspaikasta, immunisaatioaikataulusta jne. Jo ensimmäisen injektion jälkeen antiseerumieläimet alkavat kehittää vasta-aineita vereensä. Vasta-aineiden maksimaalinen pitoisuus veressä saavutetaan tavallisesti 2-6 ruiskutuksen jälkeen. Useampien injektioiden antaminen ei yleensä lisää vasta-aineiden määrää, mutta vasta-aineiden laatua se tavallisesti parantaa (HURN & LANDON 1971).

Tässä tutkimuksessa seurattiin kahden kanin (101 ja 102) antiseerumin immunologisen reagoinnin muuttumista immunisaation eri vaiheissa antiseerumin laimennuskäyrien avulla. Kuvasta 1 näkyy koko immunisaation aikana noudatettu prolaktiiniruiskutusten ja verenottojen aikataulu, joka oli molemmille antiseerumieläimille sama. Immunisaatioaika oli melko pitkä, lähes kaksi vuotta, ja ruiskutuksia tehtiin 20. Tänä aikana verenottoja oli 11.

Kaneista 101 ja 102 ennen ruiskutusten aloittamista otettujen nk. nolla-seerumeiden sekä antiseerumeiden laimennuskäyrät näkyvät kuvasarjoista 10 a-l ja 11 a-j vastaavasti. Ensimmäisen prolaktiiniruiskutuksen jälkeen antiseeruminäytteiden vasta-ainepitoisuudet olivat vielä alhaiset, joskin ne olivat jo selvästi kohonneet verrattuna nolla-seerumeiden vasta-ainepitoisuuksiin. 2. ja 3. verenottokerrasta eteenpäin immunisaation loppuun saakka prolaktiinin 50 %-ista sitoutumista vastasi antiseerumin laimennus n. $1:10^4$ eli 1:10 000. Toiseen verenottokertaan mennessä kanit olivat saaneet 5 ruiskutusta (kuva 1).

Tämän kokeen perusteella siis jo ainakin 5 injektiota aikaansaivat kanien vereen maksimaalisen vasta-ainepitoisuuden. Tämä tulos on yhdenmukainen HURNin ja LANDONin (1971) havaintojen kanssa. Siis toisesta tai kolmannesta verenotosta lähtien kanien antiseerumeiden vasta-ainepitoisuus ei enää lisääntynyt. Suurin osa kanien 101 ja 102 antiseerumien laimennuskäyristä oli MOUDGALin ja MADHWA RAJin (1974) radioimmunologiseen menetelmään sopivaksi havaitseman antiseerumin laimennuskäyrän (kuva 9) kaltaisia.

Antiseerumin laimennuskäyrien avulla ei voitu paljastaa vasta-aineiden laadullisia muutoksia immunisaation aikana. CLAUSENin (1969) mukaan immunisaation alkuaikoina vasta-aineet ovat lähinnä IgM-globuliinien luokkaan kuuluvia, kun taas pitkäaikaisen immunisaation tuloksena saadaan IgG-globuliineihin kuuluvia vasta-aineita. Radioimmunologisiin menetelmiin tarvitaan juuri IgG-globuliineja (HURN & LANDON, 1971). Tästä syystä pitkäaikainen immunisaatio on varmin tapa tuottaa sopivia vasta-aineita radioimmunologista menetelmää varten. Antiseerumin laimennuskäyrien ja lähes kaksi vuotta kestäneen immunisointiajan perusteella suurin osa tämän kokeen aikana tuotetuista ja testatuista antiseerumeista on todennäköisesti radioimmunologiseen menetelmään sopivia.

2.2. Tutkimuksen aikana tuotetun ja lahjaksi saadun antiseerumin vertailu

Eläinten väliset yksilölliset erot vasta-aineiden tuottamisessa saattavat olla erittäin huomattavia (PLAYFAIR ym. 1974). Esimerkkinä tästä mainittakoon 6 eri marsun tuottaman antiseerumin laimennuskäyrät kuvassa 12 (BERSON & YALOW, 1964).

Tässä tutkimuksessa verrattiin kanissa 102 tuotettua antiseerumia (9. verenotto 16 prolaktiiniruiskutuksen jälkeen) sellaiseen antiseerumiin, joka oli saatu lahjaksi naudan prolaktiinimäärityksiä radioimmunologisella menetelmällä suorittavasta laboratoriosta (SCHAMS & KARG) Saksasta. Lahjoitettu antiseerumi oli myös tuotettu kanissa naudan prolaktiinia vastaan. Tutkimuksessa tuotetun ja lahjoituksena saadun antiseerumin immunologinen reagointi laimennuskäyrien perusteella olivat lähes samanlaiset (kuva 13). Tämän perusteella itse tuotettu antiseerumi on nähtävästi radioimmunologiseen menetelmään sopivaa.

2.3. Antiseerumin puhdistuksen vaikutus immunologiseen reagointiin

Jos immunisoitava hormonivalmiste sisältää hiukankin epäpuhtauksia, saattavat antiseerumieläimet tuottaa vasta-aineita myös epäpuhtauksia vastaan. Näiden nk. epäspesifisten vasta-aineiden poistamiseen antiseerumista eli absorboimiseen (CLAUSEN 1969) voidaan käyttää sellaisia kudoksia tai biologisia nesteitä, joiden oletetaan sisältävän epäspesifisten vasta-aineiden antigeenejä, mutta jotka eivät sisällä tutkittavaa hormonia tai sisältävät sitä vain hyvin vähän. Inkuboimalla antiseerumia tällaisten kudosten tai nesteiden kanssa tapahtuu immunologista sitoutumista antiseerumin epäspesifisten vasta-aineiden ja niiden absorboimiseen käytetyissä kudoksissa ja nesteissä olevien antigeenien välillä. Vaikka epäspesifisiä vasta-aineita ei saataisi kokonaan erotettua antiseerumista, niiden häiritsevä vaikutus vähenee, kun ne joutuvat kompleksimuotoon. Analyysiä häiritsevien epäspesifisten vasta-aineiden absorboimisen jälkeen antiseerumi käyttäytyy spesifisemmin juuri tutkittavan hormonin kanssa kuin absorboimaton antiseerumi.

Tutkittaessa antiseerumin (kani 102, 11. verenotto) puhdistamisen (siv. 37) vaikutusta antiseerumin laimennuskäyrään todettiin, että naudan aivo-,

maksa- ja munuaiskudoksella sekä seerumilla, joko erikseen tai yhdessä käytettyinä oli samansuuntainen vaikutus (kuvat 14 - 18). Puhdistettujen antiseerumeiden laimennuskäyrät siirtyivät kuvien asteikolla vasemmalle. Kokeet ilmaisivat sen, että puhdistukseen käytetyt kudokset ja seerumi olivat immunologisesti toimivia. Antiseerumin laimennuskäyrien perusteella ei voida varmasti sanoa, vähensikö puhdistus prolaktiinin spesifisiä tai epäspesifisiä vasta-aineita tai molempia. Spesifisten vasta-aineiden mahdollinen pieni väheneminen puhdistuksen aikana ei olisi pienentänyt antiseerumin käyttöarvoa, koska antiseerumin alkuperäinen vasta-ainepitoisuus oli melko korkea (merkatun prolaktiinin 50 %-ista sitoutumista vastasi antiseerumin laimennus 1:10 000, kuva 14). Sen sijaan pienikin epäspesifisten vasta-aineiden poistuminen olisi parantanut antiseerumin laatua. Tutkimalla vain antiseerumin laimennuskäyrää ei saada tarkkaa käsitystä antiseerumin spesifisyydestä. Sitä varten olisi tutkittava antiseerumin immunologista käyttäytymistä analysoitavassa näytteessä olevien muiden hormonien tai mahdollisten muiden yhdisteiden kanssa määrittämällä näille kullekin standardikäyrä. Suorittamalla spesifisyyskokeet ennen ja jälkeen absorption, saadaan selville, lisääkö absorboiminen antiseerumin spesifisyyttä.

2.4. Antiseerumin laimennuspuskurin vaikutus antiseerumin immunologiseen reagointiin

Antiseerumin laimentamiseen käytetään yleensä veronaali- tai fosfaattipuskuria. Tässä kokeessa veronaalipuskuri oli 0.07 M, pH 8.6, ja sisälsi 0.5 % BSA. Fosfaattipuskuri taas oli 0.01 M, pH 7.5, ja sisälsi 0.1 % BSA. Lisäksi molemmat sisälsivät vielä 0.9 % NaCl ja 3 % NRS. Antiseerumin (kani 102, 9. verenottokerta) laimennuskäyrien testaaminen näillä kahdella puskurilla osoitti, että immunologinen reagointi oli lähes sama kummassakin tapauksessa (kuva 19). Tämän tuloksen mukaan nähtävästi antiseerumin laimentamiseen voidaan käyttää yhtä hyvällä menestyksellä joko veronaali- tai fosfaattipuskuria.

2.5. Antiseerumin immunologisen aktiivisuuden säilyminen +4°C:ssa

Vasta-aineet ovat kemialliselta rakenteeltaan valkuaisaineita. Valkuaisaineet yleensä denaturoituvat helposti useiden eri vaikutusten johdosta. Denaturoituessa vasta-aineiden tertiäärirakenne muuttuu ja sen johdosta niiden immunologinen aktiivisuus saattaa vähentyä. Vasta-aineet ovat erittäin kes-

täviä, kun niitä säilytetään syväjäädytettyinä tai kylmäkuivattuina. Jopa +4°C:ssa antiseerumeita voidaan laimentamattomina säilyttää huomattavia aikoja. Eräitä vasta-aineita on pidetty +4°C:ssa jopa 10 vuotta ja niiden immunologinen aktiivisuus aleni tuona aikana vain alle 10 %. Sen sijaan jo laimennetut antiseerumit kestävät huonommin säilytystä +4°:ssa (HURN 1969). Tämän tutkimuksen tarkoitus oli juuri selvittää, kuinka jo laimennettu naudan prolaktiinia vastaan kanissa tuotettu antiseerumi kestäisi säilytystä +4°C:ssa.

Tätä koetta varten tehtiin samasta antiseeruminäytteestä (kani 102, 9. verenotto) eri aikoina normaalit kuusi eri laimennusta (siv. 48), joita säilytettiin jääkaapissa +4°:ssa, kunnes niiden immunologinen aktiivisuus testattiin samalla kertaa. Immunologisen aktiivisuuden mittaamiseen käytettiin jälleen antiseerumin laimennuskäyriä. Ensimmäinen laimennussarja tehtiin 30 vrk, toinen 24 vrk ja kolmas 1 vrk ennen antiseerumin laimennuskäyrien määrittämistä. Tässä kokeessa poikkeuksellisesti käytettiin 1%-ista hiilisuspensiota erottamassa vasta-aineisiin sitoutumatonta prolaktiinia. Antiseerumin immunologinen aktiivisuus heikkeni vain hiukan säilytysajan kuluessa (kuva 20). Vasta-aineet olivat siis tässäkin tapauksessa erittäin kestäviä, koska antiseerumilaimennuksia voitiin säilyttää jääkaapissa (+4°C) jopa kuukauden ajan ilman, että antiseerumin immunologinen aktiivisuus huomattavasti vähentyi.

3. Merkatun prolaktiinin immunologinen reagointi

Kuten sivulla 47 kokein todettiin, merkatun naudan prolaktiinin aggregoitumista ja jodin vapautumista tapahtui merkatun hormonin säilytyksen aikana. Aggregoitunut hormoni on osoittautunut immunologisesti huomattavasti vähemmän aktiiviseksi kuin monomeerinen hormoni (BRYANT & GREENWOOD 1968 ja PEAKE 1974). Aggregoitunut prolaktiini voitiin poistaa uudella geelisuodatuksella (sivu 38). Tämän jälkeen haluttiin immunologisin kokein selvittää, oliko uudelleen puhdistetulla, monomeerisellä, prolaktiinilla suurempi immunologinen aktiivisuus kuin uudelleen puhdistamattomalla merkatulla prolaktiinilla, joka sisälsi säilytysajasta riippuen erilaiset määrät aggregoitunutta ja monomeeristä hormonia sekä vapaata jodia.

3.1. Merkatun prolaktiinin puhdistusten vaikutus immunologiseen reagointiin

Puhdistusten vaikutusta merkatun prolaktiinin immunologiseen aktiivisuuteen

testattiin määrittämällä kaksi antiseerumin (kani 102, 9. verenotto) laimennuskäyrää, joista toiseen käytettiin uudelleen puhdistettua, monomeeristä merkattua prolaktiinia ja toiseen uudelleen puhdistamatonta merkattua prolaktiinia. Merkattu prolaktiini oli kolme vuorokautta vanhaa. Uudelleen puhdistaminen suoritettiin välittömästi ennen kokeen alkua. Merkatun prolaktiinin uudelleen puhdistaminen 3 päivän kuluttua merkkauksesta osoitti, että aggregoitunutta prolaktiinia ja vapaata jodia oli muodostunut vain vähän (kuva 21) verrattuna 9 ja 23 vrk:n kuluttua tehtyihin uudelleen puhdistamisiin (kuva 6 ja 7). Kuitenkin jo näinkin pienillä määrillä aggregoitunutta prolaktiinia ja vapaata jodia oli merkatun prolaktiinin immunologista aktiivisuutta heikentävä vaikutus (kuva 22). Uudelleen puhdistamattomalla merkatulla prolaktiinilla saatiin alhaisempia sitoutumisprosentteja (alempi käyrä) kuin uudelleen puhdistetulla prolaktiinilla (ylempi käyrä). Jos merkattu prolaktiini olisi ollut vielä vanhempaa, kuten kuvassa 6 tai 7, olisi uudelleen puhdistamattoman merkatun prolaktiinin immunologinen aktiivisuus todennäköisesti ollut alhaisempi kuin kuvassa 22 johtuen lisääntyneestä aggregoituneen hormonin ja vapaan jodin määrästä. Saatujen tulosten perusteella uudelleen puhdistettu ja sen tuloksena saatu monomeerinen merkattu prolaktiini oli immunologisesti aktiivisempaa kuin uudelleen puhdistamaton merkattu prolaktiini, joka sisälsi myös aggregoitunutta hormonia ja vapaata jodia. Kuvien 6, 7 ja 21 perusteella näyttäisi siltä, että ensimmäisen geelisuodatuksen jälkeen merkattu prolaktiini ei sisältäisi aggregoitunutta hormonia tai sisältäisi sitä vain erittäin vähän. Tämän johdosta heti merkkauksen jälkeen merkattu prolaktiini ei siten kaipaisi uudelleen puhdistamista. Jos sen sijaan merkattua prolaktiinia joudutaan säilyttämään, olisi se syytä uudelleen puhdistaa välittömästi ennen käyttöä.

4. Inkubointi

Inkuboinnin aikana tapahtuu immunologinen reaktio, jossa hormoni- ja vasta-ainemolekyylit sitoutuvat toisiinsa, jos ne ovat immunologisesti aktiivisia. Reaktio on sitä täydellisempi, mitä enemmän hormonia sitoutuu vasta-aineisiin. Parhaaseen tulokseen päästään optimaalisissa olosuhteissa, joihin vaikuttaa ennen kaikkea lämpötila, aika, pH sekä suola- ja proteiinikonsentraatio (CLAUSEN 1969). Immunologisen reaktion kemialliset olosuhteet säädetään inkubointipuskurilla.

4.1. Inkubointipuskurin vaikutus immunologiseen reaktioon

Radioimmunologisissa menetelmissä yleensä käytetään veronaali-, fosfaatti-, tris- tai boraattipuskuria (Standardization of Radioimmunoassay Procedures 1974). Niiden pH vaihtelee välillä 7.4-8.6. Ionivahvuus pyritään pitämään melko alhaisena 0.01 - 0.04 M. Puskureita vahvistetaan yleensä jollain immunologisesti inaktiivisella valkuaisaineella. Proteohormonien ollessa kyseessä käytetään tavallisesti albumiinia (BSA). Kaikella tällä säätelyllä pyritään järjestämään optimaaliset olosuhteet immunologiselle reaktiolle.

Tässä kokeessa muuttuva tekijä oli inkubointipuskuri, ja siinä verrattiin kahdella eri inkubointipuskurilla saatuja antiseerumin laimennuskäyriä toisiinsa. Toinen puskureista oli tässä tutkimuksessa yleisesti käytetty 0.07 M veronaalipuskuri, pH 8.6, jossa oli 0.5 % BSA ja toinen 0.01 M fosfaattipuskuri, pH 7.5, jossa oli 0.1 % BSA. Kummassakin oli 0.9 % NaCl. Sitoutuneen ja sitoutumattoman prolaktiinin erotukseen käytettiin 0.5 % hiilisuspensiota (0.05 % Dextran-T-110). Kahdella eri inkubointipuskurilla saadut antiseerumin laimennuskäyrät olivat lähes samat (kuva 23), joten inkubointiin voidaan käyttää joko veronaali- tai fosfaattipuskuria.

5. Vasta-aineisiin sitoutuneen ja sitoutumattoman prolaktiinin erottaminen

Jotta immunologista reaktiota voidaan mitata, täytyy pystyä erottamaan vasta-aineisiin sitoutunut ja sitoutumaton hormoni. Hormonivasta-ainekompleksi ei alhaisista konsentraatioista johtuen cle itsestään saostuva. Siksi hormoneille on kehitelty useita erilaisia erotusmenetelmiä (RATCLIFFE 1974). Radioimmunologisten menetelmien ryhmittely perustuukin erotusmenetelmiin. Tässä tutkimuksessa kokeiltiin kahta eri tekniikkaan perustuvaa erotusmenetelmää. Ne olivat hiili- ja kaksoisvasta-ainemenetelmä.

5.1. Dekstraanin molekyylikoon vaikutus hiilierotusmenetelmään

Hiili on erittäin tehokas adsorboimaan itseensä erilaisia aineita. Sellaisenaan se adsorboi lähes kaikkia aineita valikoimatta niitä mitenkään. Jos hiili päällystetään tietyn kokoisilla molekyyleillä, niin vain tätä pienemmät

molekyylit tulevat adsorboiduiksi, koska ne mahtuvat kulkemaan päällyste-molekyylien välistä. Päällysteainetta suuremmat molekyylit jäävät liuokseen. Päällystetty hiili pystyy siten erottelemaan erikokoisia molekyylejä toisistaan (HERBERT 1969). Erottuminen on mahdollista, jos erotettavat molekyylit eroavat kooltaan riittävästi. Sitoutuneen ja sitoutumattoman hormonin erottamiseksi hiili tavallisesti päällystetään dekstraanilla. Sentrifugoitaessa hiili, jossa on vapaa prolaktiini, painuu pohjaan ja prolaktiini-vasta-ainekompleksi jää supernatanttiin.

Vapaan ja sitoutuneen naudan prolaktiinin erottaminen on mahdollista hiilimenetelmällä, koska ne eroavat molekyylipainoltaan riittävästi toisistaan. Naudan prolaktiinin molekyylipaino on 24 000 (ANDREWS 1966) ja vasta-aineen, IgG-globuliinien, molekyylipaino on 160 000 (CLAUSEN 1969), joten hormoni-vasta-aine-kompleksin molekyylipaino on 184 000. Sitoutuneen ja sitoutumattoman naudan prolaktiinin erottamiseksi käyttivät SCHAMS ja KARG (1969) hiilen päällystämiseen Dextran-T-110, jonka molekyylipaino on 110 000. HERBERT (1969) suosittelee hiilen päällystämiseen käytettäväksi ainetta, jonka molekyylipaino sattuu hormonin ja hormonivasta-ainekompleksin molekyylipainojen puoliväliin. Prolaktiinin tapauksessa päällysteaineen molekyylipainon pitäisi siten olla noin 80 000 (Dextran-T-80). Tämän tutkimuksen puitteissa haluttiin selvittää, onko päällysteaineen molekyylikoolla merkitystä naudan sitoutuneen ja sitoutumattoman prolaktiinin erottamisessa. Edellisten ohjeiden mukaan valittiin tutkittaviksi Dextran-T-110 (SCHAMS 1969) ja Dextran-T-70 (HERBERT 1969), jonka molekyylipaino on 70 000. Hiilisuspensio sisälsi 5 % hiiltä. Päällysteaineen vaikutus on tehokkaimmillaan, kun sitä on 10 % päällystettävän aineen painosta (JACOBS 1969). Myös SCHAMS ja KARG (1969) käyttivät 5 %-isessa hiilisuspensiossa 0.5 % dekstraania ja niin tehtiin tässäkin tutkimuksessa. Eri suuruisten dekstraanimolekyylien erotuskyky arvosteltiin antiseerumin (kani 102, 9. verenotto) laimennuskäyrien avulla.

Tämän kokeen perusteella päällysteaineen molekyylikoosta riippui suuresti hiilisuspension erotuskyky (kuva 24). Tässä tapauksessa suurempimolekyylisellä päällysteaineella päästiin parempiin tuloksiin. Dextran-T-110 oli siis soveliaampi hiilen päällysteaine kuin Dextran-T-70, kun oli kysymys vasta-aineisiin sitoutuneen ja sitoutumattoman naudan prolaktiinin erottamisesta. Myös JACOBS (1969) havaitsi että Dextran-T-110 oli yksi parhaita päällysteaineita erottamaan sitoutunutta ja sitoutumatonta ihmisen kasvuhormonia (GH) johtuen ehkä siitä, että ihmisen GH:n molekyylipaino 21 500 (KARLSON 1974), on lähellä naudan prolaktiinin molekyylipainoa.

5.2. Hevosen seerumin vaikutus hiilierotusmenetelmään

Hiilierotusmenetelmän optimaalisissa olosuhteissa vapaan hormonin adsorptio hiileen on maksimoitu ja sitoutuneen hormonin minimoitu. Optimaalisiin oloihin ei päästä, jos ei käytetä riittävästi sopivaa kantajaproteiinia (YALOW & BERSON 1969).

Tässä tutkimuksessa tarkasteltiin hevosen seerumin merkitystä kantajaproteiinina hiilierotusmenetelmässä antiseerumin (kani 102, 9. verenotto) laimennuskäyrien avulla. Toinen antiseerumin laimennuskäyrän erotusvaihe tehtiin kuten sivulla 41 mainittiin eli käytettiin 0.1 ml 1:4 laimennettua hevosen seerumia juuri ennen hiilisuspension lisäämistä, kun taas toisen antiseerumin laimennuskäyrän erotusvaiheessa ei käytetty hevosen seerumia lainkaan.

Hevosen seerumin vaikutus hiilierotusmenetelmään oli huomattava (kuva 25). Hevosen seerumin avulla saatiin korkeampia prolaktiinin sitoutumisprosentteja kuin ilman sitä. Erot sitoutumisprosenteissa eivät voineet johtua eroista immunologisessa reaktiossa. Inkubointihan tapahtui kummassakin tapauksessa samoin. Lisäksi itse erotusvaihe kesti niin lyhyen ajan (n. 40 min, +4°C), että hevosen seerumissa mahdollisesti olleet immunologiseen reaktioon vaikuttavat tekijät eivät ehtineet vaikuttaa siihen. Kysymys oli ilmeisesti juuri eroista sitoutuneen ja sitoutumattoman prolaktiinin erottumisessa.

Prolaktiinivasta-ainekompleksi todennäköisesti jossain määrin adsorboitui hiilihiukkasiin, jos hevosen seerumia ei ollut läsnä. Hevosen seerumilla saatujen korkeampien sitoutumisprosenttien mukaan hevosen seerumi nähtävästi esti prolaktiinivasta-ainekomplekseja adsorboitumasta hiileen. Tämä tapahtui todennäköisesti siten, että hevosen seerumin jotkut valkuaisaineet adsorboituivat hiileen ja samalla vapauttivat prolaktiinivasta-ainekomplekseja liuokseen. Tästä oli tuloksena täydellisempi sitoutuneen ja sitoutumattoman prolaktiinin erottuminen kuin ilman hevosen seerumia.

YALOW & BERSON (1969) ilmoittivat, että tavallisesti juuri plasman proteiineilla oli vähentävä vaikutus sitoutuneen hormonin adsorptioon ilman, että vapaan hormonin adsorptio estyi. RATCLIFFEn (1974) mukaan tämä selektiivinen vaikutus perustuisi plasman tai seerumin globuliiniosaan, joihin myös vasta-aineet itse kuuluvat. Hänen mukaansa globuliinit valikoiden estävät hormonivasta-ainekomplekseja adsorboitumasta hiileen. Tämä nyt tehty tutkimus tukee hänen käsitystään, koska erilaisilla albumiinikonsentraatioilla

sivun 54 mukaan ei ollut huomattavaa vaikutusta erottumiseen, kun sen sijaan hevosen seerumilla, joka sisältää myös globuliineja, oli huomattava vaikutus siihen. RATCLIFFEn (1974) mukaan jopa dekstraanin käyttö hiilen päällysteaineena voidaan korvata seerumilla. 10-30 % seerumia sisältävä hiilisuspensio erottaa vapaan ja sitoutuneen hormonin ainakin yhtä tehokkaasti kuin hiilisuspensio, jossa hiili on päällystetty dekstraanilla.

5.3. Hiili- ja kaksoisvasta-aine-erotusmenetelmän vertailu

Hiilierotusmenetelmän periaatteet käyvät ilmi sivulla 54 . Kaksoisvasta-aine-erotusmenetelmässä (ohje the National Institutes of Health'istä) tarvitaan vasta-aineita hormonin vasta-aineita vastaan. Nämä sitoutuvat hormonivasta-ainekompleksiin ja siten muodostavat saostuvan sakan. Sentrifugoinnin jälkeen sakassa on siis vasta-aineisiin sitoutunut hormoni ja supernatantissa vapaa hormoni.

Lahjoituksena saadun kakkosantiseerumin ansiosta oli mahdollista kokeilla myös kaksoisvasta-aine-erotusmenetelmää (siv. 41) antiseerumin laimennuskäyrien määrittämisessä. Laimennukseen käytetty antiseerumikin oli lahjoitus (siv. 36). Tässä kokeessa verrattiin hiili- ja kaksoisvasta-ainemenetelmällä saatuja laimennuskäyriä toisiinsa. Edellisessä tapauksessa käytettiin noin neljä kertaa vähemmän merkattua hormonia kuin jälkimmäisessä tapauksessa. Muuten koeolosuhteet olivat samat. Tällä kertaa hiilierotusmenetelmässä ei käytetty hevosen seerumia.

Kaksoisvasta-ainemenetelmällä päästiin korkeampiin prolaktiinin sitoutumisprosentteihin kuin hiilimenetelmällä (kuva 26). Tähän voi osittain vaikuttaa se, että hiilimenetelmässä ei nyt käytetty hevosen seerumia. Jos sitä olisi käytetty, hiilimenetelmällä saatu antiseerumin laimennuskäyrä olisi todennäköisesti siirtynyt oikealle lähemmäksi kaksoisvasta-ainemenetelmällä saatua antiseerumin laimennuskäyrää. Sivulla 56 jo todettiin hevosen seerumin edullinen vaikutus hiilierotusmenetelmään. Mitä vähemmän merkattua hormonia käytettiin antiseerumin laimennuskäyrän testaamiseen, sitä enemmän oikealle asteikolla siirtyy laimennuskäyrä (HUNTER 1971). Tämän mukaan hiilimenetelmällä saadun antiseerumin laimennuskäyrän pitäisi olla asteikolla kaksoisvasta-ainemenetelmällä saadun antiseerumin laimennuskäyrän oikealla puolella. Hevosen seerumin lisäyksellä pitäisi hiilierotusmenetelmässä todella olla erittäin huomattava vaikutus, ennen kuin päästäisiin kaksoisvasta-ainemenetelmällä saatuihin sitoutumisprosentteihin tai

niiden yli. Tämän perusteella tuntuisi sille, että kaksoisvasta-ainemenetelmä olisi hiukan tehokkaampi kuin hiilimenetelmä. Varmaa johtopäätöstä jomman kumman erotusmenetelmän paremmuudesta ei tämän kokeen perusteella kuitenkaan voida vetää, koska kokeessa oli kaksi muuttujaa: itse erotusmenetelmä sekä merkatun prolaktiinin määrä. Kuitenkin koe osoitti, että molemmat erotusmenetelmät olivat käyttökelpoisia.

Kaksoisvasta-ainemenetelmä on spesifinen, koska erottuminen siinä perustuu immunologiseen reaktioon kakkosvasta-aineiden ja hormonivasta-ainekompleksin välillä. Haittapuolia tällä menetelmällä on häiriintyminen näytteiden antikoagulanteista, proteiinikonsentraatiosta sekä kakkosvasta-aineiden tuoton kalleus (RATCLIFFE 1974). Hiilimenetelmä taas on nopea ja halpa, mutta se saattaa olla epäspesifinen. Hiili voi adsorboida itseensä myös hormoni-vasta-ainekomplekseja, niin että erottuminen ei ole täydellistä. Lisäksi hiilimenetelmäkin on riippuvainen näytteiden proteiinikonsentraatiosta. Siitä johtuva epäspesifinen sitoutuminen saattaa nousta jopa 25 %:iin (SCHAMS 1974).

6. Standardikäyrä

Radioimmunologisen menetelmän standardikäyrä ilmaisee sen, kuinka merkatun hormonin sitoutuminen vasta-aineisiin muuttuu, kun merkkaamattoman hormonin lisäykset suurenevat. Tyypillinen radioimmunologisen menetelmän standardikäyrä naudan prolaktiinille (SCHAMS 1974) on kuvassa 27. Näytteiden antamien sitoutumisprosenttien mukaan luetaan standardikäyrältä niitä vastaavat hormonimäärät.

Hormonin analysoimiseen käytettävän standardikäyrän pitoisuusalue pitäisi saada niin alhaiseksi, että pienimmänkin hormonipitoisuuden omaavien näytteiden hormonimäärät pystytään tarkasti lukemaan standardikäyrältä. Kuvassa 27 oleva standardikäyrä sijoittui alhaiselle ja kapealle konsentraatioalueelle, 0–2 ng. Siihen pyrittiin tässäkin tutkimuksessa, koska naudan plasmassa saattaa syksy- ja talvikuukausina olla prolaktiinia vain muutamia nanogrammoja millilitrassa ja koska näytettä käytetään vain 0.2 ml ja sekin vielä usein laimennettuna häiriötekijöiden poistamiseksi (SCHAMS 1974). Tästä syystä standardikäyrän pitoisuusalueen täytyy todella olla alhainen.

Radioimmunologisen menetelmän standardikäyrän pitoisuusalue riippuu monista tekijöistä, joista tärkeimpiä ovat antiseerumin ja merkatun hormonin immuno-

loginen aktiivisuus sekä niiden absoluuttiset ja suhteelliset määrät. Etukäteen ei voida varmuudella tietää, mille pitoisuusalueelle standardikäyrä tietyissä oloissa asettuu. Tämä täytyy aina kokeellisesti selvittää.

6.1. Standardiprolaktiinilisäysten vaikutus merkatun prolaktiinin ja vasta-aineiden sitoutumiseen

Tutkimukset naudan prolaktiinin standardikäyrän kehittämiseksi aloitettiin selvittämällä erisuuruisten standardiprolaktiinilisäysten vaikutusta merkatun hormonin ja vasta-aineiden sitoutumiseen. Naudan prolaktiinista (NIH-P-B2) valmistettujen standardiliuosten pitoisuutta lisättiin aina kymmenkertaisesti. Standardiliuosten pitoisuusalue vaihteli välillä 0.02 - 0.02 x 10^7 pg/100 µl. Tässä tutkimuksessa käytettiin merkattua prolaktiinia 0.3 ng (spesifinen aktiivisuus 66 nCi/ng) ja antiseerumin (kani 102, 9. verenotto) laimennettuna $1:10^3$. Immunologista sitoutumista osoittavaa käyrää piirrettäessä merkittiin aritmeettisen asteikon ordinaatalle immunologinen sitoutuminen ja lisätyt standardiprolaktiinimäärät logaritmisen asteikon abskissalle (kuva 28).

Kokeen olosuhteissa (kuva 28) standardiprolaktiinilisäysten ollessa hyvin pieniä, välillä 0.02 - 200 pg, ei niillä ollut vaikutusta merkatun prolaktiinin ja vasta-aineiden sitoutumiseen. Näissä tapauksissa sitoutuminen pysyi maksimaalisena, >65 %. (Merkatun hormonin ja vasta-aineiden välinen sitoutuminen on maksimaalista silloin, kun merkkaamatonta hormonia ei ole lainkaan läsnä.) Kun lisätyt standardiprolaktiinimäärät vaihtelivat välillä 200 - 2000 ng, merkatun prolaktiinin ja vasta-aineiden immunologinen sitoutuminen oli nolla eli merkkaamaton standardiprolaktiini syrjäytti merkatun prolaktiinin kokonaan vasta-aineista asettuen itse tilalle (kompetetiivinen inhibitio). Standardiprolaktiinimäärien vaihdellessa välillä 0.2 - 200 ng, standardiprolaktiinilisäys sai aikaan vain osittaisen inhibition. Vain tälle alueelle (standardikäyräalue) jäävät merkkaamattoman hormonin lisäykset pystyttiin erottamaan toisistaan sitoutumisprosentin (B %) perusteella. Vaikka tämä koe osoitti standardiprolaktiinin olleen immunologisesti aktiivisen, ei mainittu standardiprolaktiinin osittaisen inhibition aikaansaama pitoisuusalue ollut vielä riittävän herkkä naudan verinäytteiden analysoimiseen. Tästä syystä seuraavissa kokeissa pyrittiin järjestämään olosuhteet sellaisiksi, että standardikäyrä olisi herkimmillään lisättäessä merkkaamatonta hormonia 0.05 - 2.0 ng.

6.2. Antiseerumin laimentamisen vaikutus naudan prolaktiinin standardikäyrään

Mitä vähemmän merkattua hormonia käytetään, sitä alhaisemmille standardihormonipitoisuusalueille standardikäyrä asettuu (BERSON & YALOW 1968). Tästä syystä seuraavissa standardikäyrän kehittelykokeissa käytettiin vain 0.15 ng naudan merkattua prolaktiinia (spesifinen aktiivisuus 173 nCi/ng). Myös antiseerumin laimentaminen herkistää standardikäyrää (kuva 29, HURN & LANDON 1971). Tässä tutkimuksessa kokeiltiin useita eriväkevyisiä marsun (M 2, 2. verenotto) antiseerumilaimennuksia.

Tutkittaessa antiseerumin laimentamisen vaikutusta standardikäyrään käytettiin ensin antiseerumista seuraavia laimennuksia: $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$ ja $1:10^6$. Tämän kokeen tulos (kuva 30) osoitti, että myös naudan prolaktiinin standardikäyrä herkistyi antiseerumia laimentamalla. Kun antiseerumista käytettiin laimennusta $1:10^3$, osittaisen inhibition alue eli standardikäyräalue asettui standardiprolaktiinin pitoisuusalueelle 20–200 ng. Kun antiseerumista käytettiin laimennusta $1:10^4$ standardikäyräalue asettui standardiprolaktiinin pitoisuusalueella 4.0 – 20 ng. Kun antiseerumilaimennus oli $1:10^5$, pääosa standardikäyrästä asettui välille 0.05 – 2.0 ng. Sen sijaan antiseerumin laimennus $1:10^6$ oli jo liian laimea, koska maksimaalinen sitoutuminen oli vain 16.6 %. Optimaalisissa standardikäyräolosuhteissa merkatun hormonin maksimaalinen sitoutuminen vasta-aineisiin pitäisi olla suunnilleen 50 % (MOUDGAL & MADHWA RAJ 1974). Antiseerumilaimennuksilla $1:10^3$, $1:10^4$ ja $1:10^5$ päästiin vastaavasti seuraaviin maksimaalisiin sitoutumisiin: 57.9 %, 55.0 % ja 54.8 %.

Käytetystä neljästä eriväkevyisestä antiseerumilaimennuksesta osoittautui näissä koeolosuhteissa parhaimmaksi antiseerumin laimennus $1:10^5$ (= 1:100 000). Kuvassa 31 on tällä laimennuksella saatu naudan prolaktiinin standardikäyrä esitetty uudelleen levennetyllä standardiprolaktiinin pitoisuusasteikolla. Siinä käyrän muoto näkyy selvästi. Tämäkään käyrä ei ollut vielä tarpeeksi herkkä, varsinkaan käyrän alkupäästä (0.05 – 0.3 ng).

Jotta myös standardikäyrän alkupää saataisiin melko jyrkästi laskevaksi kokeiltiin vielä antiseerumin laimennuksia: 1:50 000, 1:107 895, 1:250 000 ja 1:500 000 samoissa olosuhteissa kuin edelliset standardikäyräkokeilut. Merkatun prolaktiinin maksimaalinen sitoutuminen vasta-aineisiin pieneni tässäkin tapauksessa antiseerumin laimentuessa. Maksimaaliset sitoutumiset

olivat väkevimmästä antiseerumilaimennuksesta laimeimpaan antiseerumilaimennukseen vastaavasti seuraavat: 51.3, 50.7, 44.5 ja 35.2. Tämän kokeen perusteella (kuva 32) todettiin edelleen, että antiseerumia laimennettaessa standardikäyrä alkupäästäänkin jyrkkeni. Edellisten standardikäyräkokeilujen perusteella olikin odotettavissa, että antiseerumin laimennuksilla 1:107 895 ja 1:50 000 ei saataisi haluttuja, jyrkästi laskevia standardikäyriä. Sen sijaan antiseerumin laimennuksilla 1:250 000 ja 1:500 000, se oli mahdollista. Antiseerumin laimennus 1:500 000 oli ilmeisesti jo liian laimeata, koska maksimaalinen sitoutuminen oli vain 35.2. Sen lisäksi standardikäyräalue mainitulla antiseerumilaimennuksella jäi liian kapealle konsentraatioalueelle (0.05 - 0.06 ng). Sen sijaan antiseerumilaimennuksella 1:250 000 päästiin 44.5 %:n maksimaaliseen sitoutumiseen ja standardikäyräalue asettui konsentraatioalueelle 0.05 - 0.8 ng. Standardikäyrien eräänä arvosteluperusteena voidaan käyttää myös herkkyyttä. Se ilmoittaa, mikä on pienin määrä merkkaamatonta hormonia, joka selvästi inhiboi merkatun hormonin sitoutumista vasta-aineisiin. Kuvan 32 perusteella standardikäyrän herkkyys huomattavasti lisääntyi antiseerumia laimennettaessa.

6.3. Naudan prolaktiinin standardikäyrä

Kaikkien edellä suoritettujen standardikäyrän kehittelykokeiden ja niistä saatujen tulosten perusteella voitiin parhaimpana naudan prolaktiinin standardikäyränä pitää sitä, joka saatiin marsun (M 2, 2. verenotto) antiseerumilaimennuksella 1:250 000 käyttämällä merkattua prolaktiinia 0.15 ng (spesifinen aktiivisuus 173 nCi/ng) (kuva 33). Tämä oli paras käyrä ottaen huomioon käytetyn antiseerumilaimennuksen antaman maksimaalisen sitoutumisprosentin (44.5 %), saadun standardikäyrän muodon, lähinnä jyrkkyyden, merkkaamattoman standardihormonin inhibitioalueen (0.05 - 0.8 ng) sekä herkkyyden eli pienimmän selvästi havaittavan merkkaamattoman hormonin lisäyksen (kuvan 33 mukaan ainakin 50 pg merkkaamatonta standardiprolaktiinia voitiin havaita). Todennäköisesti juuri kuvan 33 osoittamaa standardikäyrää tullaan tässä tutkimuksessa käyttämään naudan verinäytteiden analysoimiseen.

Ennen kuin naudan radioimmunologinen menetelmä on valmis rutiinikäyttöön, tullaan sitä ennen selvittämään menetelmän luotettavuus: spesifisyys, herkkyys, tarkkuus, toistettavuus sekä naudan seerumin inhibitiokäyrä. Menetelmän rutiinikäytön aikana taas tullaan suorittamaan jatkuvaa menetelmän laadunvalvontaa.

6.4. Antiseerumin puhdistuksen vaikutus prolaktiinin standardikäyrään

Tämän kokeen yhteydessä kokeiltiin myös standardikäyrän tekoa puhdistetulla antiseerumilla. Antiseerumin puhdistukseen käytettiin naudan aivo-, maksa- ja munuaiskudosta sekä seerumia yhdessä (siv. 37). Muut koeolosuhteet olivat aivan samat kuin aikaisemmassa kokeessa sivulla 59 , koska määritykset tapahtuivat rinnakkain. Verrattaessa puhdistetulla antiseerumilla saatua standardikäyrää (kuva 34) puhdistamattomalla antiseerumilla saatuun standardikäyrään (kuva 28) ei näissä koeolosuhteissa mainittavaa eroa voitu havaita. Tämä kokeilu vain edelleen vahvisti, että standardikäyrä näissä oloissa todellakin asettui pitoisuusalueelle 0.2 - 200 ng.

TIIVISTELMÄ

Tämän tutkimuksen avulla luotiin pohjaa naudan prolaktiinin radioimmunologisen menetelmän käytäntöönsoveltamiseksi. Antiseerumin laimennuskäyräkokein testattiin antiseerumeiden ja merkatun prolaktiinin immunologista aktiivisuutta sekä inkubointiolosuhteita ja vasta-aineisiin sitoutuneen ja sitoutumattoman prolaktiinin erotusmenetelmiä. Naudan prolaktiinin hiilierotustekniikkaan perustuvalle radioimmunologiselle menetelmälle kehiteltiin standardikäyrä.

1. Antiseerumit naudan prolaktiinia vastaan tuotettiin osittain kaneissa lähes kaksi vuotta kestäneen immunisaation aikana. Vasta-aineita todettiin muodostuneen kanien vereen jo ensimmäisen ruiskutuksen jälkeen. Maksimaalinen vasta-ainepitoisuus saavutettiin 5 ruiskutuksen jälkeen. Maksimaalisen vasta-ainepitoisuuden omaavat antiseerumit voitiin laimentaa noin 1:10 000 merkatun prolaktiinin 50 %-sen sitoutumisen aikaansaamiseksi. Pitkästä immunisaatioajasta johtuen immunologisesti aktiivisia antiseerumeita saatiin runsaasti. Tutkimuksen aikana tuotettu antiseerumi todettiin yhtä hyväksi kuin Saksasta lahjoituksena saatu antiseerumi. Absorboiminen erilaisilla kudos- ja seeruminäytteillä ei parantanut antiseerumin immunologista aktiivisuutta. Antiseerumeiden laimentamiseen sopivat lähes yhtä hyvin veronaali- ja fosfaattipuskuri. Antiseerumilaimennukset kestivät jopa kuukauden säilytystä +4°C:ssa.

   Antiseerumeita naudan prolaktiinia vastaan tuotettiin osittain myös marsuissa. Niitä immunisoitiin viiden kuukauden ajan. Suurin osa standardikäyrän kehittelykokeista tehtiin juuri marsun antiseerumilla.

2. Kloramiini-T-tekniikalla suoritetuissa merkkauksissa jodi-125-isotooppia sitoutui 32.9-91.9 % prolaktiiniin. Jodauskäyrän piikkien painoihin perustuva jodin sitoutumisprosentin määritysmenetelmä osoittautui melko luotettavaksi. Merkatun prolaktiinin spesifiset aktiivisuudet vaihtelivat välillä 65.8 - 222.3 μCi/μg. Säilytettäessä merkattua prolaktiinia +4°C:ssa osa merkatusta prolaktiinista aggregoitui ja osasta merkattua hormonia vapautui jodia. Näiden määrät lisääntyivät säilytyksen aikana. Tästä syystä prolaktiinin puhdistaminen heti ensimmäisen geelisuodatuksen jälkeen ei todennäköisesti ollut välttämätöntä, mutta säilytyksen jälkeen merkattu prolaktiini oli syytä puhdistaa toisella geelisuodatuksella välittömästi

ennen käyttöä. Merkattu prolaktiini oli immunologisesti aktiivista, koska siitä jopa 70 % sitoutui vasta-aineisiin.

3. Korkeitten immunologisten sitoutumisprosenttien perusteella inkubointiolosuhteet olivat melko suotuisat immunologiselle reaktiolle. 0.07 M veronaalipuskuri, pH 8.6, osoittautui lähes samanlaiseksi kuin 0.01 M fosfaattipuskuri, pH 7.5.

4. Vasta-aineisiin sitoutuneen ja sitoutumattoman prolaktiinin erottuminen hiilimenetelmällä parani, kun mukana käytettiin hevosen seerumia ja kun hiili päällystettiin Dextran-T-110:llä. Kaksoisvasta-ainemenetelmä oli todennäköisesti ainakin yhtä hyvä erotusmenetelmä kuin hiilimenetelmä.

5. Standardina käytetty naudan prolaktiini osoittautui immunologisesti aktiiviseksi, koska sen lisäyksillä oli inhiboiva vaikutus merkatun prolaktiinin sitoutumisprosentteihin. Antiseerumin laimentamisen todettiin huomattavasti herkistävän naudan prolaktiinin standardikäyrää. Käytetyissä koeolosuhteissa saatiin paras standardikäyrä naudan prolaktiinille käyttämällä 0.15 ng merkattua prolaktiinia ja marsun antiseerumia laimennettuna 1:250 000. Tällöin standardikäyrä oli herkimmillään hormonipitoisuusalueella 0.05 – 0.8 ng. Antiseerumin absorboimisella naudan kudoksilla ja seerumilla ei ollut merkittävää vaikutusta standardikäyrään.

KIRJALLISUUSLUETTELO

ANDREWS, P. 1966. Molecular weights of prolactin and pituitary growth hormones estimated by gel filtration. Nature 209: 155–157.

ANON. 1974. Standardization of Radioimmunoassay Procedures. Int. J. Appl. Rad. Isot. 25: 145–160.

BERSON, S.A. & YALOW, R.S. 1964. Immunoassay of protein hormones. "The Hormones". Toim. PINCUS, G., THIMANN, K.V. & ASTWOOD, E.B. Academic Press. New York. 557.

– & – 1968. General principles of radioimmunoassay. Clin. Chim. Acta 22: 51–69.

– & – 1973. "Peptide Hormones". North-Holland Publishing Company, Inc. New York. 69.

BRYANT, G.D. & GREENWOOD, F.C. 1968. Radioimmunoassay for ovine, caprine and bovine prolactin in plasma and tissue extracts. Biochem. J. 109: 831–840.

CLAUSEN, J. 1969. "Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules". North-Holland Publishing Company. Amsterdam. 399–572.

CUNNINGHAM, N.F. 1969. Keskustelu. "Protein and Polypeptide Hormones". Toim. MARGOULIES, M. Excerpta Medica Foundation. Amsterdam. 610.

EKINS, R.P. 1969. Separation Methods: Charcoal. "Protein and Polypeptide Hormones". Toim. MARGOULIES, M. Excerpta Medica Foundation. Amsterdam. 633–635.

GEIGER, W. 1971. Keskustelu. "Radioimmunoassay Methods", Toim. KIRKHAM, K.E. & HUNTER, W.M. Churchill Livingstone. Edinburgh. 171.

GREENWOOD, F.C., HUNTER, W.M. & GLOVER, J.S. 1963. The preparation of 131-I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. 89: 114–123.

HANDWERGER, S. & SHERWOOD, L.M. 1974. Human placental lactogen (HPL).* "Methods of Hormone Radioimmunoassay". Toim. JAFFE, B.M. & BEHRMAN, H.R. Academic Press, Inc. 417–426.

HERBERT, V. 1969. Coated charcoal separation of free labelled hormone from hormone bound to antibody. "Protein and Polypeptide Hormones". Toim. MARGOULIES, M. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam. 55–60.

HURN, B.A.L. & LANDON, J. 1971. Antisera for radioimmunoassay. "Radioimmunoassay Methods". Toim. KIRKHAM, K.E. & HUNTER, W.M. Churchill Livingstone. Edinburgh. 121–142.

HUNTER, W.M. 1971. The preparation and assesment of iodinated antigens. "Radioimmunoassay Methods". Toim. KIRKHAM, K.E. & HUNTER, W.M. Churchill Livingstone. Edinburgh. 3–23.

– 1974. Preparation and assesment of radioactive tracers. Br. Med. Bull. 30: 18–23.

JACOBS, H.S. 1969. Use of activated charcoal in the radioimmunoassay of human growth hormone in plasma. J. Clin. Path. 22: 710–717.

JACOBS, L.S. 1974. Prolactin. "Methods of Hormone Radioimmunoassay". Toim. JAFFE, B.M. & BEHRMAN, H.R. Academic Press, Inc. New York. 87–102.

KARLSON, P. 1974. "Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler". George Thieme Verlag. Stuttgart. 332.

KIRKHAM, K.E. & HUNTER, W.M. 1971. "Radioimmunoassay Methods". Churchill Livingstone. Edinburgh. 3–677.

MOUDGAL, N.R. & MADHWA RAJ, H.G. 1974. Pituitary Gonadotropins. "Methods of Hormone Radioimmunoassay". Toim. JAFFE, B.M. & BEHRMAN, H.R. Academic Press, Inc. New York. 57–85.

NEWTON, J.R. 1971. Keskustelu. "Radioimmunoassay Methods". Toim. KIRKHAM, K.E. & HUNTER, W.M. Churchill Livingstone. Edinburgh. 65.

PEAKE, G.T. 1974. Growth hormone. "Methods of Hormone Radioimmunoassay". Toim. JAFFE, B.M. & BEHRMAN, H.R. Academic Press. New York. 103–123.

PLAYFAIR, J.H.L., HURN, B.A.L. & SCHULSTER, D. 1974. Production of antibodies and binding reagents. Br. Med. Bull. 30: 24–31.

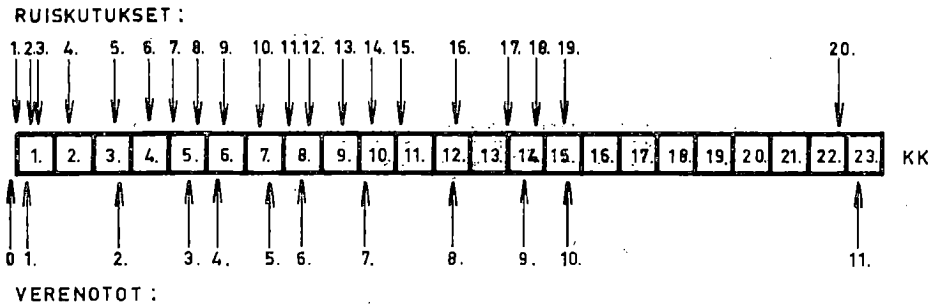
RATCLIFFE, J.G. 1974. Separation techniques in saturation analysis. Br. Med. Bull. 30: 32–37.

SCHAMS, D. 1974. Untersuchungen über Prolaktin beim Rind. Fortschr. Tierphysiol. Tierernähr. 5: 1–125.

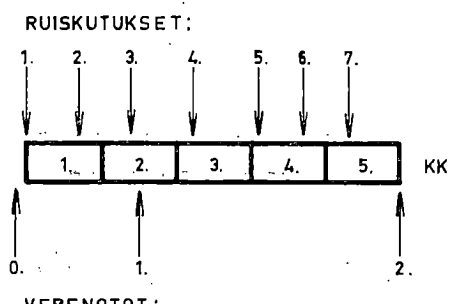
– & KARG, H . 1969. Radioimmunologische Bestimmung von Prolaktin im Blutserum vom Rind. Milchwissenschaft 24: 263–265.

TYREY, L., HANDWERGER, S. & SCHERWOOD, L.M. 1974. Human Chorionic Gonatropin (HCG)*. "Methods of Hormone Radioimmunoassay". Toim. JAFFE, B.M. & BEHRMAN, H.R. Academic Press, Inc. New York. 427-436.

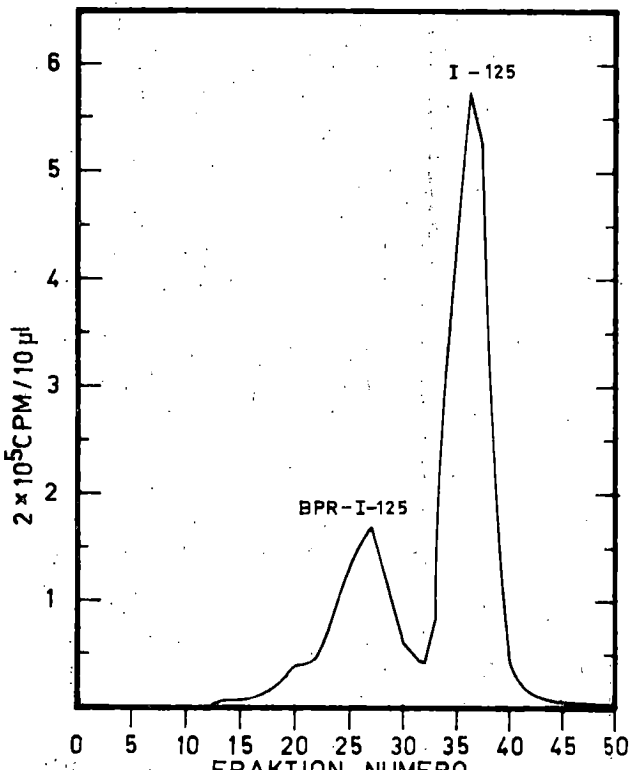
YALOW, R.S. & BERSON, S.A. 1969. Topics on radioimmunoassay of peptide hormones. "Protein and Polypeptide Hormones". Toim. MARGOULIES, M. Excerpta Medica Foundation. Amterdam. 36-44.



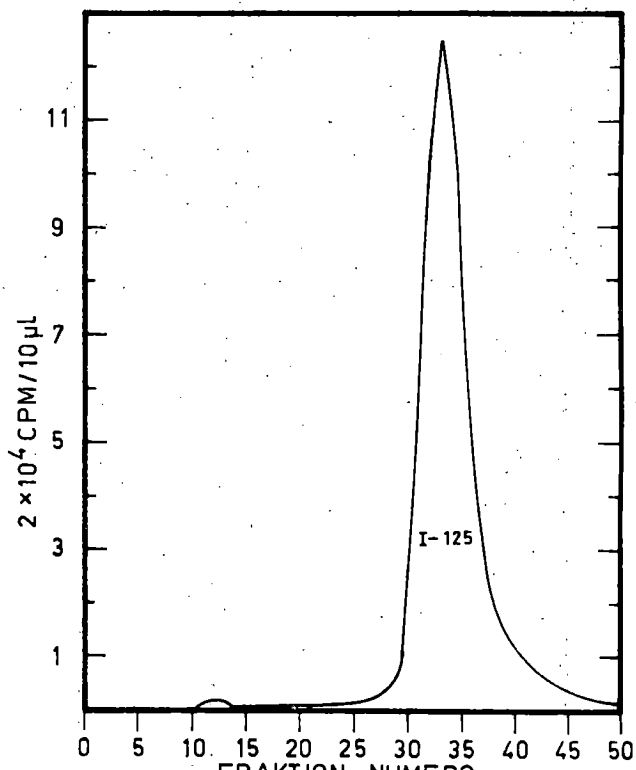
Kuva 1. Kanien ruiskutukset ja verenotot immunisaation aikana.



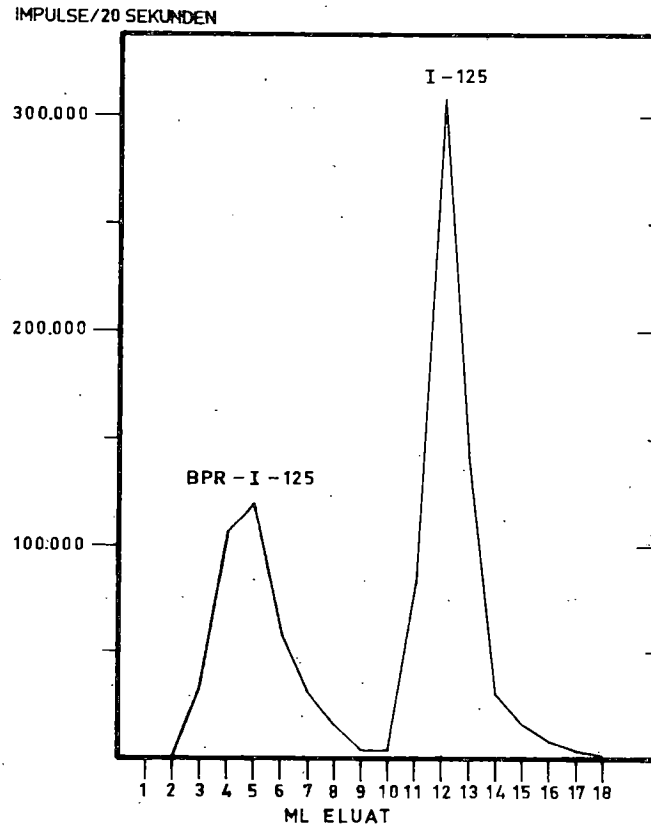
Kuva 2. Marsujen ruiskutukset ja verenotot immunisaation aikana.



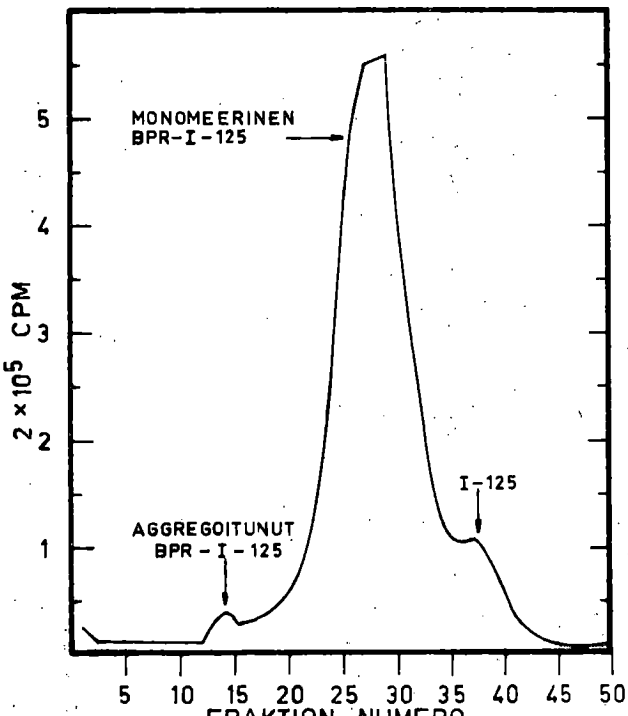
Kuva 3. Naudan merkatun prolaktiinin (BPR-I-125) ensimmäinen puhdistaminen (Sephadex-G-100-geelisuodatus). I-125 = vapaa jodi.



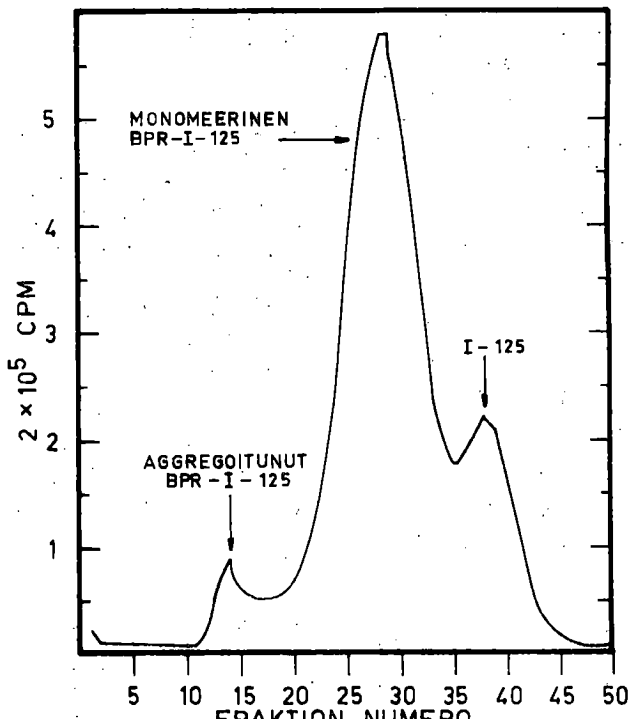
Kuva 4. Merkkaustoimenpiteet ja ensimmäinen puhdistaminen (Sephadex-G-100-geelisuodatus) ilman naudan prolaktiinia. I-125 = vapaa jodi.



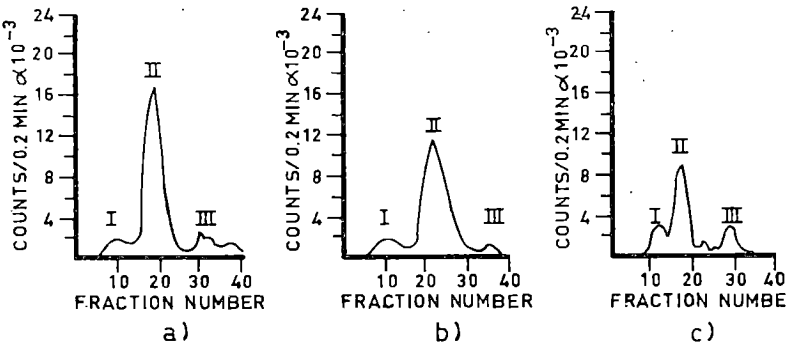
Kuva 5. Naudan prolaktiinin (BPR) jodauskäyrä Sephadex-G-50-geelisuodatuksella (SCHAMS 1974). Impulse/20 Sekunden = pulssia/20 sek, ml Eluat = ml eluaattia.



Kuva 6. Naudan merkatun prolaktiinin (BPR-I-125) toinen puhdistaminen (Sephadex-G-200-geelisuodatus) 9 vuorokauden kuluttua. I-125 = vapaa jodi.

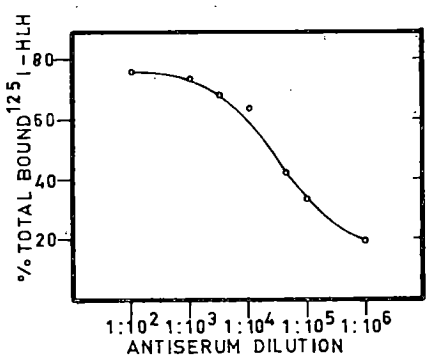


Kuva 7. Naudan merkatun prolaktiinin (BPR-I-125) toinen puhdistaminen (Sephadex-G-200-geelisuodatus) 23 vuorokauden kuluttua. I-125 = vapaa jodi.

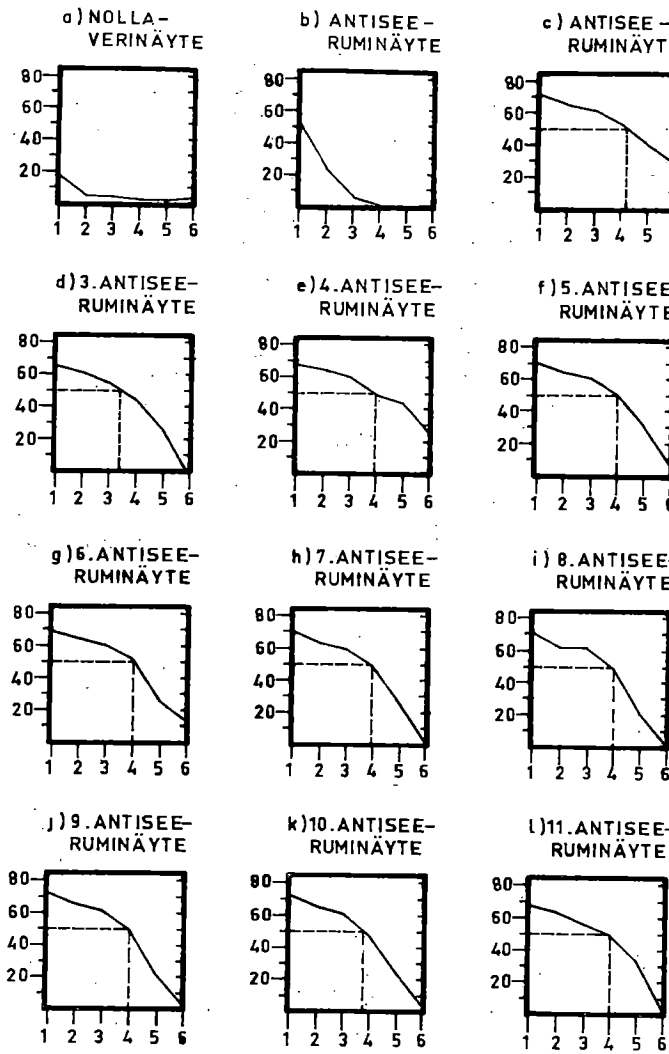


I = aggregoitunut materiaali
II = monomeerinen hormoni
III = vapaa jodi ja/tai pieniä peptidifragmentteja

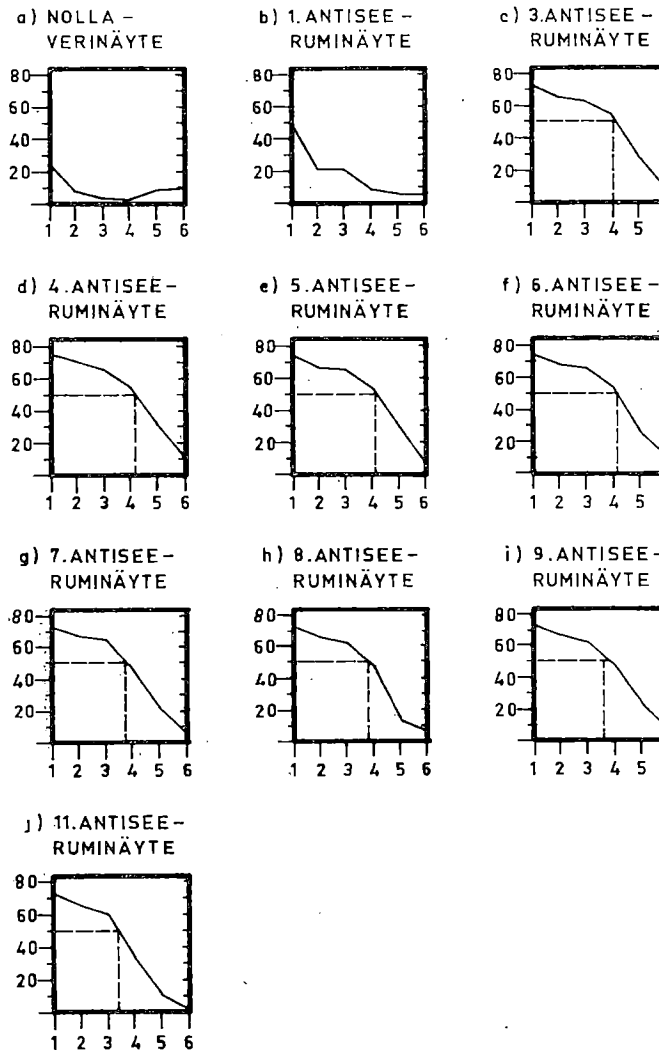
Kuva 8. Säilytysajan vaikutus merkatun sian prolaktiiniin. Uudelleen puhdistaminen Sephadex-G-100-geelisuodatuksella. a) 1 viikon, b) 4 viikon ja c) 8 viikon kuluttua jodauksesta (JACOBS 1974). (Counts = pulsseja, fraction number = fraktion numero).



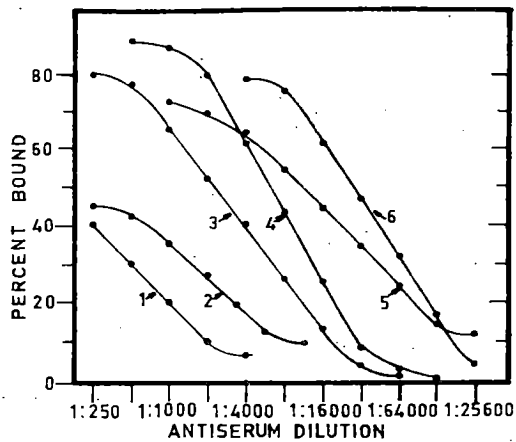
Kuva 9. Antiseerumin laimennuskäyrä. (MOUDGAL & MADHWA RAJ 1974). (HLH = ihmisen luteinisoiva hormoni, % total bound 125-I-HLH = 125-I-HLH:n B%, antiserum dilution = antiseerumin laimennus).



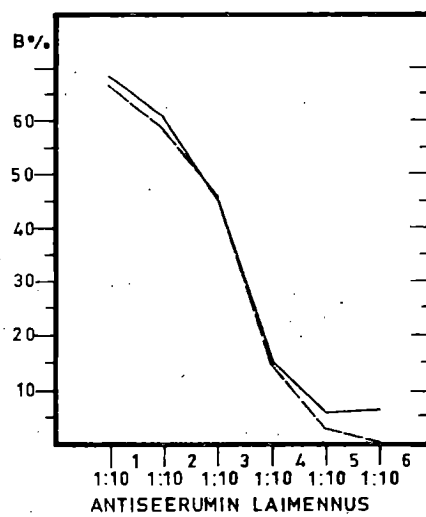
Kuva 10. Kanista 101. immunisaation eri aikoina otettujen antiseeruminäytteiden laimennuskäyriä. Abskissalla antiseerumin laimennukset: 1=1:10^1, 2=1:10^2, 3=1:10^3, 4=1:10^4, 5=1:10^5, 6=1:10^6. Ordinaatalla B%.



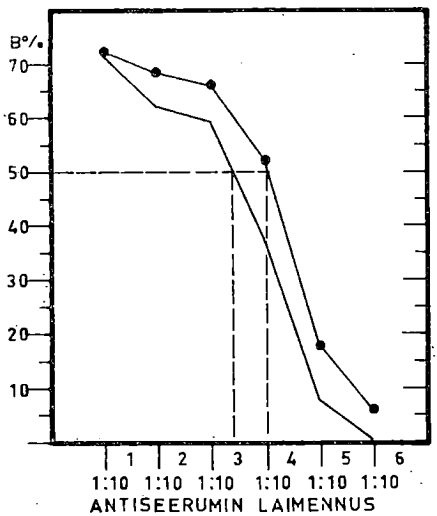
Kuva 11. Kanista 102. immunisaation eri aikoina otettujen antiseeruminäytteiden laimennuskäyriä. Abskissalla antiseerumin laimennukset: $1:10^1$, $2=1:10^2$, $3=1:10^3$, $4=1:10^4$, $5=1:10^5$ ja $6=1:10^6$. Ordinaatalla B%.



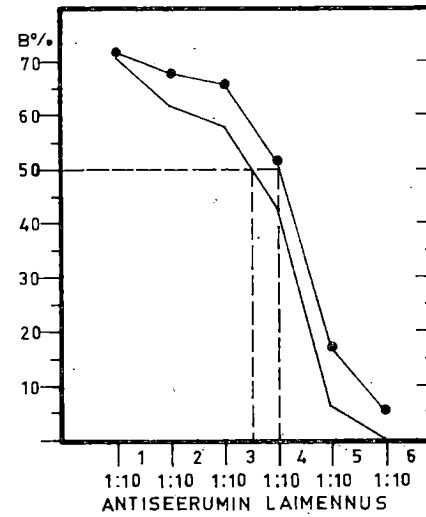
Kuva 12. Kuudessa marsussa α_p-ACTH:ta vastaan tuotettujen antiseerumeiden laimennuskäyrät käyttämällä 100 pg ^{125}I-α_p-ACTH:ta (HURN & LANDON 1971). Percent bound = B%, antiserum dilution = antiseerumin laimennus.



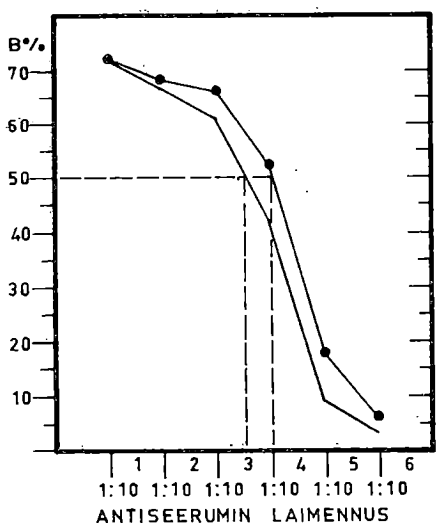
Kuva 13. Tutkimuksen aikana tuotetun (—— = kani 102., 9. verenotto) ja lahjaksi saadun antiseerumin (– – –, kani) laimennuskäyrät.



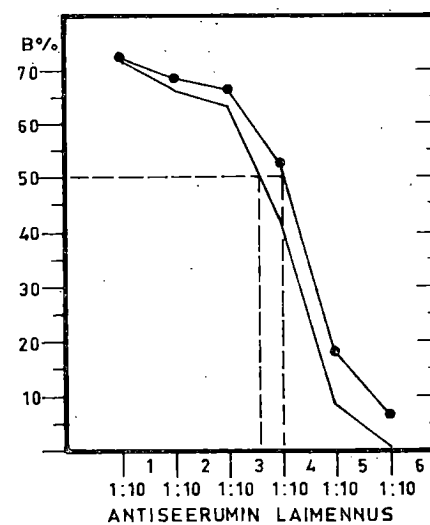
Kuva 14. Naudan aivokudoksella puhdistetun (——) ja puhdistamattoman (●—●) antiseerumin (kani 102., 11..verenotto) laimennuskäyrät.



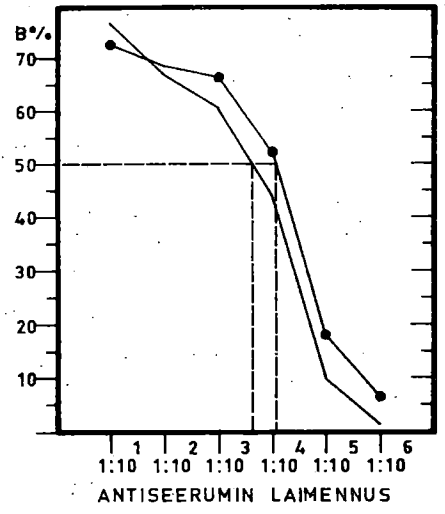
Kuva 15. Naudan maksakudoksella puhdistetun (——) ja puhdistamattoman (●—●) antiseerumin (kani 102., 11. verenotto) laimennuskäyrät.



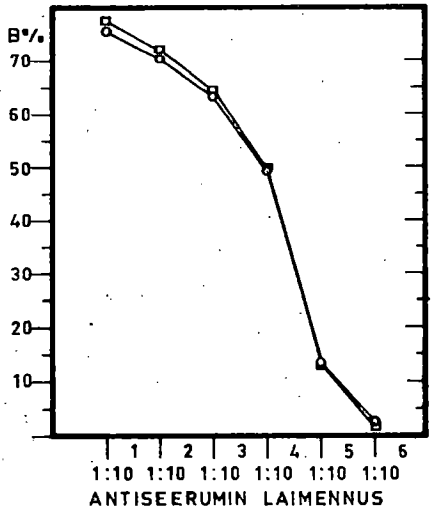
Kuva 16. Naudan munuaiskudoksella puhdistetun (——) ja puhdistamattoman (●—●) antiseerumin (kani 102., 11. verenotto) laimennuskäyrät.



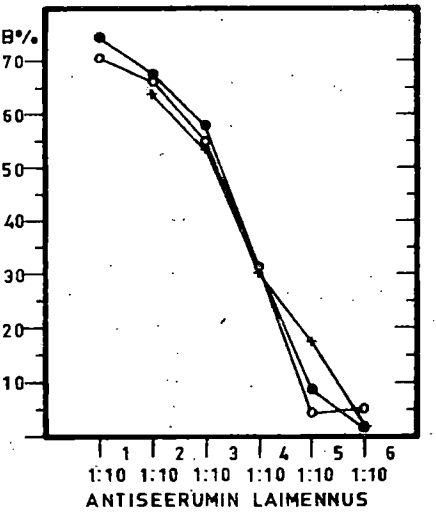
Kuva 17. Naudan seerumilla puhdistetun (——) ja puhdistamattoman (●—●) antiseerumin (kani 102., 11. verenotto) laimennuskäyrät.



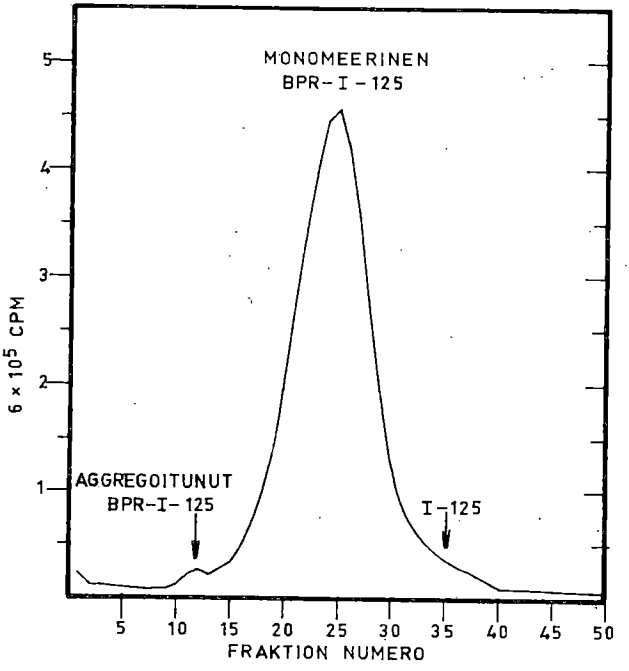
Kuva 18. Naudan aivo-, maksa- ja munuaiskudoksella sekä seerumilla puhdistetun (——) ja puhdistamattoman (●——●) antiseerumin (kani 102., 11. verenotto) laimennuskäyrät.



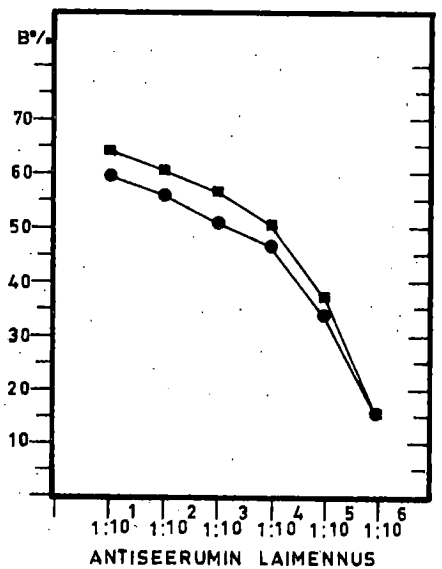
Kuva 19. Veronaali- (o——o) ja fosfaattipuskurilla (□——□) laimennetun antiseerumin (kani 102., 9. verenotto) laimennuskäyrät.



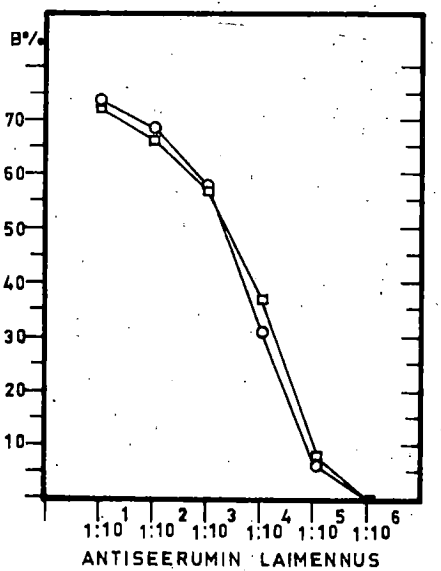
Kuva 20. Säilytysajan (●——● = 1 vrk, o——o = 24 vrk, ×——× = 30 vrk +4°C:ssa) vaikutus antiseerumin (kani 102., 9. verenotto) laimennuskäyrään.



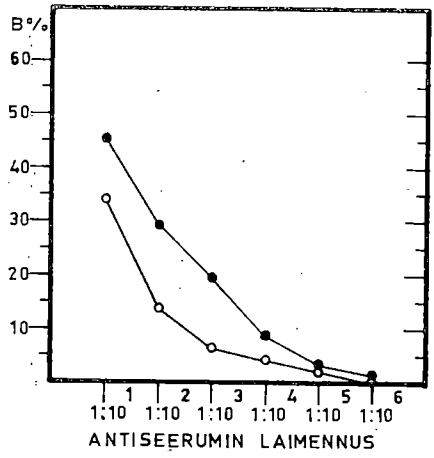
Kuva 21. Naudan merkatun prolaktiinin (BPR-I-125) toinen puhdistaminen (Sephadex-G-200) 3 vrk:n kuluttua ensimmäisestä puhdistamisesta (Sephadex-G-100).



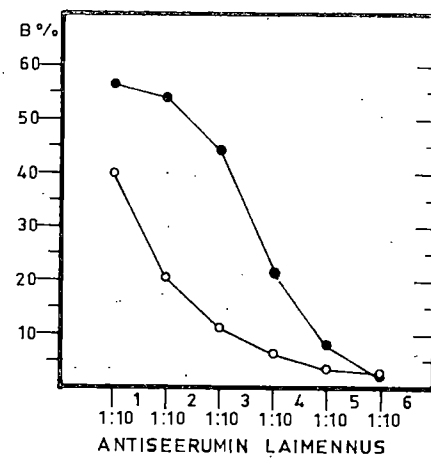
Kuva 22. Yhteen (●——●) ja kahteen (■——■) kertaan puhdistetulla naudan merkatulla prolaktiinilla saadut antiseerumin (kani 102., 9. verenotto) laimennuskäyrät.



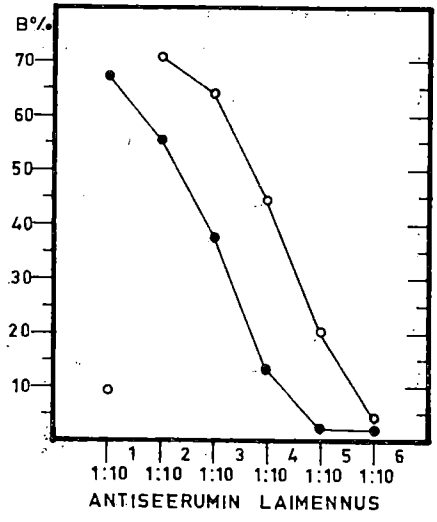
Kuva 23. Inkubointipuskurin (○——○ = veronaalipuskuri 0.07 M, pH 8.6 ja □——□ = fosfaattipuskuri 0.01 M, pH 7.5) vaikutus antiseerumin (kani 102., 9. verenotto) laimennuskäyrään.



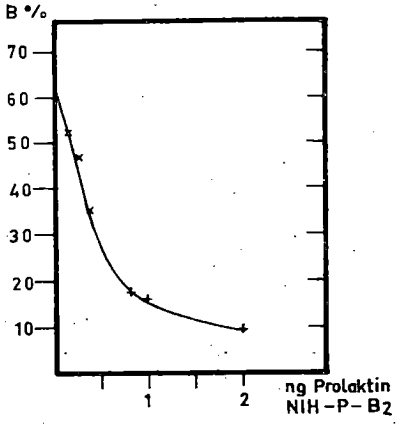
Kuva 24. Dekstraanin molekyylikoon (●—● = MP 110 000 ja o—o = MP 70 000) vaikutus hiilierotusmenetelmään. Antiseerumin (kani 102., 9. verenotto) laimennuskäyrät.



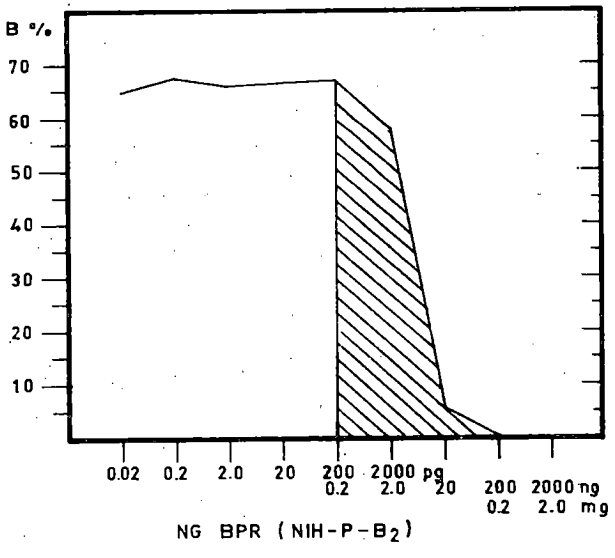
Kuva 25. Hevosen seerumin vaikutus hiilierotusmenetelmään. Antiseerumin (kani 102., 9. verenotto) laimennuskäyrät (●—● = erotukseen käytetty hevosen seerumia ja o—o = erotus ilman hevosen seerumia).



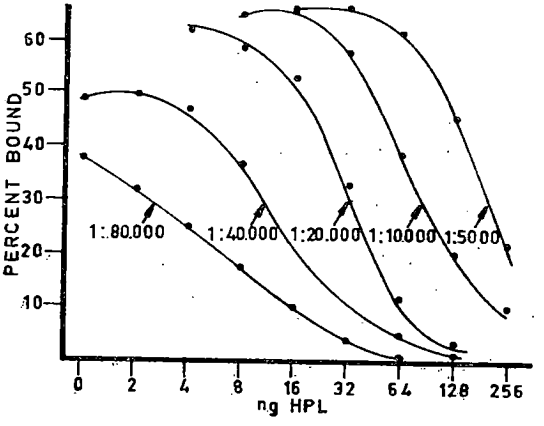
Kuva 26. Antiseerumin (lahjoitettu) laimennuskäyrät käyttämällä erotukseen hiilimenetelmää (●—●) ja kaksoisvasta-ainemenetelmää (o—o).



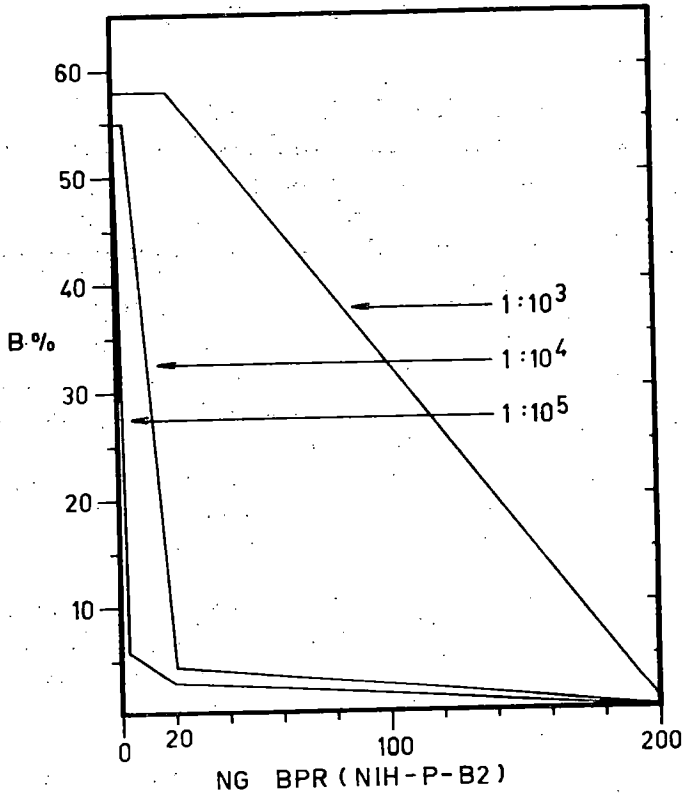
Kuva 27. Naudan prolaktiinin standardikäyrä (SCHAMS 1974).



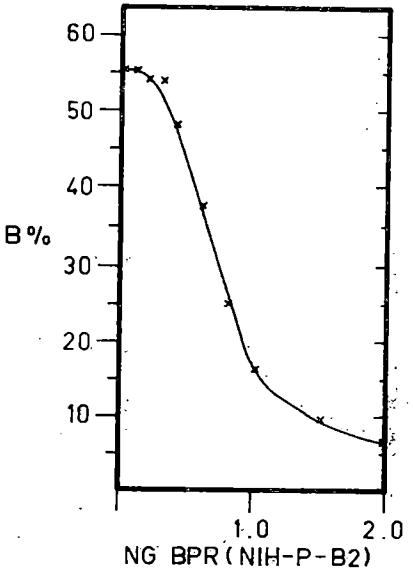
Kuva 28. Naudan prolaktiinin standardikäyrä, kun käytetty 0.3 ng BPR-I-125 (spesifinen aktiivisuus 66 nCi/ng) ja antiseerumia$_3$ (kani 102., 9. verenotto) laimennettuna 1:10^3.



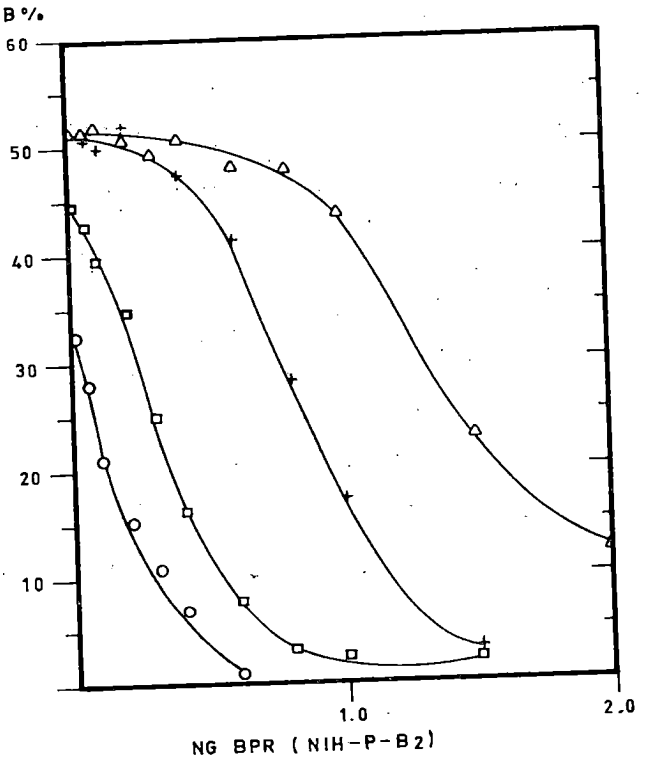
Kuva 29. Ihmisen istukan laktogeenisen hormonin (HPL) standardikäyrän herkistyminen antiseerumia laimennettaessa (HURN & LANDON 1971). Percent bound=B%.



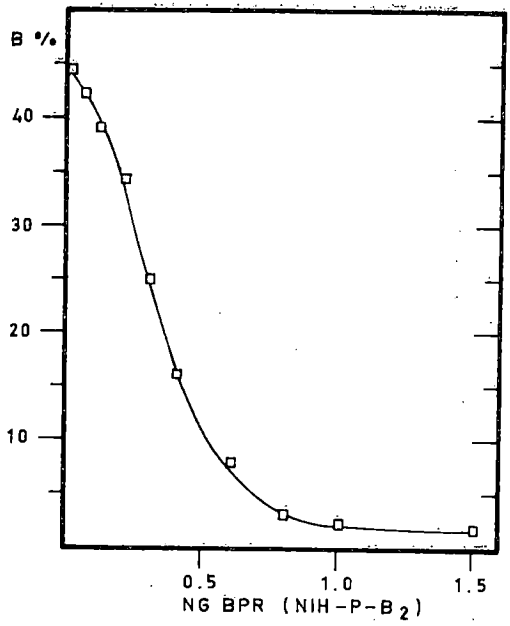
Kuva 30. Antiseerumin (marsusta M 2, 2. verenotto) laimentamisen herkistävä vaikutus naudan prolaktiinin standardikäyrään. 0.15 ng BPR-I-125 (spesifinen aktiivisuus 173 nCi/ng).



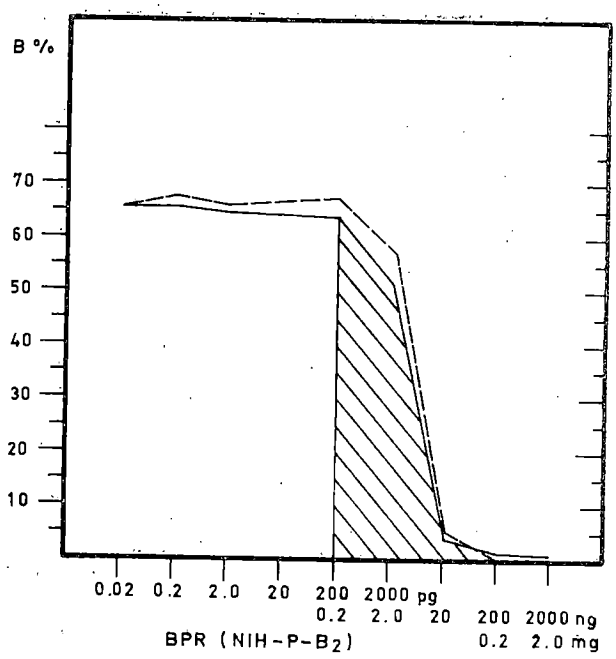
Kuva 31. Naudan prolaktiinin standardikäyrä. 0.15 ng BPR-I-125 (spesifinen aktiivisuus 173 nCi/ng) ja antiseerumi (marsusta M 2, 2. verenotto) laimennettu $1:10^5$.



Kuva 32. Naudan prolaktiinin (BPR) standardikäyriä eriväkevyisillä antiseerumin (marsu M2, 2. verenotto) laimennuksilla (o—o = 1:500 000, □—□ =1: 250 000, x—x = 1:107 895 ja Δ—Δ = 1:50 000), kun käytetty 0,15 ng BPR-I-125 (spesifinen aktiivisuus 173 nCi/ng).



Kuva 33. Naudan verinäytteiden analysointiin kehitelty naudan prolaktiinin standardikäyrä, kun käytetty 0.15 ng BPR-I-125 (spesifinen aktiivisuus 173 nCi/ng) ja antiseerumi (marsu M 2, 2. verenotto) laimennettu 1:250 000.



Kuva 34. Naudan prolaktiinin standardikäyrät naudan kudoksilla ja seerumilla puhdistetulla (——) ja puhdistamattomalla (— — —) antiseerumilla (kani 102., 9. verenotto), joka laimennettu $1:10^3$, ja 0.3 ng:lla BPR-I-125 (spesifinen aktiivisuus 66 nCi/ng).

AY-KEINOSIEMENNYSSONNIEN VERIPLASMAN PROLAKTIINIPITOISUUDESTA JA SPERMAN LAADUSTA

Vappu Kossila
Maatalouden tutkimuskeskus, Kotieläinhoidon tutkimuslaitos

Ritva Mäkelä
Helsingin yliopiston kotieläintieteen laitos

Erkki Rajakoski
Helsingin yliopiston eläinlääketieteen laitos

Heimo Simula
Salpausselän sonniasema

PROLAKTIINI

Naudan prolaktiinin rakenne ja prolaktiinin yleisiä biologisia vaikutuksia. Aivolisäkkeen etulohkosta erittyvä prolaktiini on kemialliselta rakenteeltaan yksinkertainen valkuaisaine. Naudan prolaktiinin aminohappoketju koostuu 198 aminohaposta (SEAVEY & LEWIS 1971) ja sen molekyylipaino on 24 000 (ANDREWS 1966). Prolaktiinin erittymistä aivolisäkkeen etulohkosta säätelee naudalla hypothalamuksesta erittyvät prolaktiinin vapauttaja hormoni (PRH) ja estäjä hormoni (PRIH) (DULAR ym. 1974).

BERNin ja NICOLLin (1968) mukaan prolaktiini vaikuttaa nisäkkäillä: maitorauhasen kehitykseen ja maidoneritykseen, talirauhasten ja esinahan rauhasten kokoon ja aktiivisuuteen, karvoittumiseen, yhdessä androgeenien kanssa koirassukupuolen lisäkasvuun, keltarauhasen eritystoimintaan, kääpiöyksilöiden hedelmällisyyteen, punasolujen syntyyn, veren sokeripitoisuuteen (sokeritautia aiheuttava), elimistön rasvoittumiseen, munuaisten toimintaan, sisäelinten jättikasvuun, emojen käyttäytymiseen (poikasten puolustaminen) ja koiraiden paritteluaktiivisuuteen.

Radioimmunologisesti naudan prolaktiinia on tähän mennessä määritetty verestä (mm SCHAMS 1974), aivolisäkkeestä (SWANSON ym. 1971) ja maidosta (MALVEN & McMURTRY 1974). Kummallakin sukupuolella naudan veren prolaktiinipitoisuudet voivat vaihdella melko laajalla alueella, nimittäin muutamasta ng/ml muutamaan sataan ng/ml (SCHAMS 1974).

Veren prolaktiinipitoisuuteen vaikuttavia tekijöitä naudalla. Tärkein veren prolaktiinipitoisuuteen vaikuttava tekijä on vuodenaika (SCHAMS & REINHARDT 1974). Kesäkuukausina veren prolaktiinipitoisuus on korkea ja talvikuukausina matala. Lämpö ja runsas valo lisäävät prolaktiinipitoisuutta.

Naudan veren prolaktiinipitoisuus vaihtelee myös vuorokauden ajan mukaan (SCHAMS & KARG 1970, SMITH ym. 1973). Nämä vaihtelut ovat nopeita ja ne saattavat osittain selittyä prolaktiinin nopealla puoliintumisajalla (SCHAMS 1974). Vuorokauden ajasta johtuvat prolaktiinin vaihtelut ovat epäsäännöllisempiä naarailla kuin koirailla (SCHAMS & KARG 1970). Ruokinnan ja hoidon osuuden vaikutuksista on esitetty ristiriitaisia käsityksiä (SCHAMS & KARG 1970, SMITH ym. 1973).

Iällä ei ole mainittavaa vaikutusta naudan veren prolaktiinipitoisuuteen (CONVEY ym. 1971). Ensimmäisen elinviikon aikana sekä lehmä- että sonnivasikoilta on löydetty yhtä suuria veren prolaktiinipitoisuuksia kuin täysikasvuisilta naudoilta samana vuodenaikana (SCHAMS & REINHARDT 1974). Jopa 90 päivää vanhalla sikiöllä on veressä jo muutama ng prolaktiinia (OXENDER ym. 1972 b). Tiineyden edistyessä sikiön veren prolaktiinipitoisuus kasvaa koko ajan. Syntymähetkellä pitoisuus on suurimmillaan ja se laskee muutaman päivän kuluttua syntymästä.

Eri sukupuolilla veren prolaktiinin perustasossa ei ole selvää eroa (SCHAMS 1974). Aivolisäkkeen prolaktiinipitoisuus on kummallakin sukupuolella lähes yhtä suuri (SWANSON ym. 1971, SINHA & TUCKER 1969). Naaras- ja koirassikiöillä veren prolaktiinipitoisuus on samaa suuruusluokkaa (OXENDER ym. 1972 b). Sikiön sukupuoli näyttää kuitenkin vaikuttavan emän veren prolaktiinipitoisuuteen (OXENDER ym. 1972 a). Koirassikiötä kantavan lehmän veren prolaktiinipitoisuus on korkeampi kuin naaraspuolista sikiötä kantavan lehmän.

Poikimisen ja lypsämisen yhteydessä veren prolaktiini kohoaa huomattavasti (SCHAMS 1974). Nisien koskettelu lisää veren prolaktiinipitoisuutta sekä lehmillä että sonneilla (REINHARDT & SCHAMS 1974).

Prolaktiinin pitoisuus vaihtelee verenkiertojärjestelmän eri kohdissa (OXENDER ym. 1972 a). Kantavalla lehmällä kaulalaskimoveren prolaktiinipitoisuus on 61 % suurempi kuin kohdun valtimo- tai laskimoveren pitoisuudet.

Sekä lyhytaikainen että pitkäaikainen stressi vaikuttavat voimakkaasti veren prolaktiinipitoisuuteen. Melu, vedenpuute, erilaiset pakkokeinot (RAUD ym. 1971) sekä teurastus (SWANSON ym. 1971) kohottavat nopeasti mutta paasto alentaa veren prolaktiinipitoisuutta (SCHAMS & KARG 1970).
Stressi on huomionarvoinen tekijä otettaessa verinäytteitä eläimistä. Neulatekniikalla suoritetut useat perättäiset verenotot kohottavat veren prolaktiinipitoisuutta (TUCKER 1971). Neulatekniikalla saadaankin yleensä korkeampia veren prolaktiinipitoisuuksia kuin kateterilla (RAUD ym. 1971). Lisäksi neulatekniikalla otetuista verinäytteistä eläimen fysiologiasta johtuvat prolaktiinipitoisuuden muutokset tulevat huomattavasti heikommin esille kuin katetéritekniikalla otetuista. Kateterin asettaminen eläimeen aiheuttaa veren prolaktiinin nousua. Vasta lähes kahden tunnin kuluttua prolaktiinipitoisuus normalisoituu. Jotkut eläimet ovat niin herkkiä, että päivän ensimmäisen verinäytteen ottaminen kateteritekniikalla saa aikaan stressiä ja veren prolaktiinin nousua, vaikka eläin olisikin tottunut verinäytteiden ottamiseen (SCHAMS 1974).

Veren prolaktiinipitoisuutta voidaan kummallakin sukupuolella keinotekoisesti joko vähentää tai lisätä injektoimalla tai infusoimalla erilaisia aineita nautaan. Ergotalkaloidi (CB-154) on tehokas prolaktiini-inhibiittori. Estrogeenit ja progesteronit alentavat annon aikana veren prolaktiinipitoisuutta, mutta annon loputtua lisäävät sitä (SCHAMS ym. 1974). Tyreotrooppista hormonia vapauttavalla hormonilla (TSH-RF) ja synteettisellä glukokortikoidilla (Flumethason) on voimakas veren prolaktiinipitoisuutta lisäävä vaikutus. Myös tyroksiinilla ja gonadotropiineja vapauttavalla hormonilla (LH/FSH-RF) on jossain määrin veren prolaktiinipitoisuutta kohottava vaikutus (SCHAMS 1974).

Sonnien prolaktiinista. Prolaktiinitutkimuksia, jotka liittyvät erityisesti sonnien sukupuoleen, on tehty tähän mennessä vähän. Kastroimisen tiedetään kohottavan veren prolaktiinia (KARG & SCHAMS 1969). Sonneilla prolaktiinipitoisuus kohoaa sukupuolisen kiihoittumisen yhteydessä. Jokaisen siemensyöksyn jälkeen veren prolaktiini kohoaa, jopa 6-kertaiseksi. Ilmiö ei riipu sonnin iästä tai ennen siemensyöksyä suoritettujen hyppyjen lukumäärästä, eikä käytetystä hyppyalustasta (kiimainen lehmä tai teline). Toisaalta hyppyalustana käytetyn sonnin veren prolaktiinipitoisuudessa ei tapahdu muutoksia. Veren prolaktiinipitoisuuden kohoaminen siemensyöksyn jälkeen on lyhytaikaista. Puolen tunnin päästä siemensyöksystä sonnin veren prolaktiinipitoisuus on kuitenkin vielä korkeampi kuin puoli tuntia ennen siemensyöksyä (CONVEY ym. 1971, SCHAMS 1974).

Sonnien veren prolaktiinin suhde veren androgeeneihin on vielä epäselvä. Siemensyöksyn jälkeen kohoaa paitsi prolaktiini myös testosteronipitoisuus. Prolaktiini-injektiot eivät lisää sonneilla veren testosteronitasoa. Vuorokauden vaiheesta johtuva prolaktiinin vaihtelu ei sonneilla ole yhteydessä veren testosteroniin (SMITH ym. 1973). Elinaikaisten verinäytteiden prolaktiini- ja androgeenipitoisuuksien välillä ei ole merkittävää vuorosuhdetta (SWANSON ym. 1971). Teurastuksen yhteydessä otettujen verinäytteiden prolaktiinin ja testosteronin pitoisuuksien välille on sensijaan saatu positiivinen vuorosuhde, r = 0.31 (SMITH ym. 1973).

Prolaktiini vaikuttaa todennäköisesti sonnin sukupuolirauhasiin ja tätä kautta siittiöiden muodostumiseen sekä lisäsukupuolielimiin. Seerumin prolaktiinin ja kivesten (r=0.36) sekä lisäkivesten (r = 0.30) siittiöiden lukumäärän välille on saatu merkitsevä positiivinen korrelaatio. Aivolisäkkeen prolaktiinipitoisuuden ja rakkularauhasten fruktoosipitoisuuden välillä on taas selvä negatiivinen korrelaatio, r=-0.34 (SWANSON ym. 1971).

Tässä tutkimuksessa on pyritty selvittämään missä määrin neula tai kateteritekniikka vaikuttavat prolaktiinipitoisuuteen nuorilla sonneilla. Samalla on tarkasteltu prolaktiinipitoisuuden ja sperman ominaisuuksien välisiä suhteita ja eräitä muita tekijöitä.

MATERIAALI JA MENETELMÄT

Salpausselän sonniaseman 1.5 - 3.0 vuotiaista sonneista otettiin kuuden tunnin sisällä yhteensä 75 verinäytettä neulalla ja kateterilla kaula- ja korvalaskimosta marraskuussa. Osa näytteistä otettiin noin 30 min. kuluttua ensimmäisen kaula- ja korvalaskimoverinäytteen otosta. Eläinaines, josta näytteet otettiin, käsitti kolmekymmentä nuorta sonnia, joista 10 oli Betty's Commander'in, 10 Nokan Olpin ja 10 Anttilan Mimron poikia. Verinäytteet kerättiin heparinisoituihin putkiin joita säilytettiin jäävedessä kunnes ne sentrifugoitiin näytteenottopäivän iltana ja syväjäädytettiin 2 ml muoviputkissa. Näytteet lähetettiin lentoteitse syväjäädytettyinä Länsi-Saksaan prolaktiinimäärityksiä varten. Sonnien veriplasmasta määritettiin prolaktiini kaksoisvasta-ainetekniikkaan perustuvalla radioimmunologisella menetelmällä (SCHAMS 1974). Kustakin plasmanäytteestä valmistettiin kolme laimennusta (1:2, 1:9, 1:25) joista jokainen analysoitiin kahtena rinnakkaismäärityksenä.

Astumishalu, tuoreen sperman määrä, tiheys, liike, elävyys ja sperman pakastettavuus arvosteltiin pistein käyttämällä asteikkoa 1-3. Arvostelun suoritti kokenut asiantuntija asteikossa 1=huono, 2= tyydyttävä (välttävä) ja 3=hyvä. Aineiston tilastollinen käsittely suoritettiin Maatalouden tutkimuskeskuksen laskentatoimistossa.

TULOKSET

Verinäytteenottohetkellä Nokan Olpin pojat olivat keskimäärin 15 kk, Bettys Commander'in pojat 30 kk ja Anttilan Mimron pojat 32 kk ikäisiä. Poikaryhmien keskimääräinen elopaino 1-vuotiaana oli 474, 434 ja 449 kg vastaavasti. Veriplasman prolaktiinipitoisuudeksi saatiin keskimäärin 29.4, 7.69 ja 9.40 ng/ml vastaavasti. Nokan Olpin poikien veriseerumin prolaktiinipitoisuus oli merkittävästi ($P < 0.01$) suurempi kuin Betty's Commander'in tai Anttilan Mimron poikien. Nokan Olpin poikien elopaino 1-vuotiaana oli merkittävästi suurempi kuin Betty's Commanderin poikien. Elopaino 1-vuotiaana korreloitui positiivisesti sonnien plasman prolaktiinipitoisuuteen ($r = .21$). Ikä verinäytettä otettaessa korreloitui negatiivisesti plasman prolaktiiniin ($r = -.49$, $P < 0.001$).

Taulukko 1.
Verinäytteenottotavan vaikutus laskimoveren prolaktiinipitoisuuteen nuorilla keinosiemennyssonneilla

Eläimiä kpl	Näytteenottotapa	Prolaktiinia plasmassa, ng %
5	Heti neulalla korvalaskimosta	7.35
	30 min päästä kateterilla korvalaskimosta	7.50
10	Heti neulalla kaulalaskimosta	11.32
	30 min päästä kateterilla kaulalaskimosta	12.47
4	Heti neulalla kaulalaskimosta	5.93
	Sitten neulalla korvalaskimosta	7.73
	30 min päästä kateterilla kaulalaskimosta	6.33
	Sitten kateterilla korvalaskimosta	7.10
22	Heti neulalla kaulalaskimosta	16.50
	Sitten neulalla korvalaskimosta	16.39
6	Heti neulalla korvalaskimosta	12.00
	Sitten neulalla kaulalaskimosta	18.04

Taulukko 2.
Sperman otosta kuluneen ajan, astumishalun, elopainon 1-vuotiaana, sonnin isän ja sonnin iän vaikutukset sperman ominaisuuksiin yksinkertaisten vuorosuhteiden valossa

Tuoreen sperman ominaisuus	Sperman otosta kulunut aika, pv	Astumis-halu	Elopaino 1-vuotiaana, kg	Sonnin isä	Sonnin ikä kk
Määrä	$-.105$	$.442^{XXX}$	.080	.235	.102
Tiheys	$.454^{XXX}$	-.072	-.214	$-.123$	$.471^{XXX}$
Liike	$.331^{x}$	.105	-.201	$-.317^{xx}$	$.425^{XXX}$
Elävyys	$.271^{x}$	.094	-.035	$-.356^{xx}$	$.341^{xx}$
Pakastettavuus	.068	.017	-.067	$-.616^{XXX}$	-.131

XXX = $P<0.001$, xx = $P<0.01$, x = $P<0.05$

Veren prolaktiinipitoisuudessa oli eri eläimillä melkoisia eroja. Näytteenottotekniikalla ei näyttänyt olevan selvää vaikutusta prolaktiinipitoisuuteen. Ainoastaan otettaessa neulalla ensiksi korvalaskimosta ja tämän jälkeen kaulalaskimosta saatiin jälkimmäisellä menetelmällä korkeampi, mutta tilastollisesti ei-merkitsevä prolaktiinipitoisuus (taulukko 1).

Tutkitusta aineistosta saadut tuoreen sperman ominaisuuksien yksinkertaiset vuorosuhteet sperman otosta kuluneeseen aikaan, astumishaluun, elopainoon 1-vuotiaana, sonnin isään ja sonnin ikään on annettu taulukossa 2. Siitä nähdään että sperman otosta kuluneen

ajan lisääntyessä sperman tiheys, liike ja elävyys lisääntyivät merkittävästi. Sperman määrään ja pakastettavuuteen sperman otosta kulunut aika ei vaikuttanut merkittävästi. Astumishalu korreloitui merkittävästi sperman määrään, joka lisääntyi astumishalun noustessa. Elopaino 1-vuotiaana ei sanottavasti vaikuttanut sperman ominaisuuksiin. Negatiivinen trendi todettiin elopainon ja sperman tiheyden sekä liikkeen välillä. Sonnin isä vaikutti merkittävästi sperman liikkeeseen ja elävyyteen sekä varsinkin pakastettavuuteen. Sonnin ikä vaikutti merkittävästi sperman tiheyteen, liikkeeseen ja elävyyteen, jotka kaikki nousivat iän mukana. Sperman pakastettavuuteen ja määrään ikä ei sanottavasti vaikuttanut.

Sperman ominaisuuksien keskinäisistä vuorosuhteista todettiin, että tuoreen sperman elävyys korreloitui erittäin kiinteästi liikkuvuuteen ($r = .834$, $P < 0.001$). Sperman pakastettavuus lisääntyi liikkuvuuden ($r = .412$, $P < 0.001$) ja elävyyden ($r = .465$, $P < 0.001$) mukaan merkittävästi. Tuoreen sperman määrän ja tiheyden välille saatiin positiivinen vuorosuhde ($r = .286$, $P < 0.01$).

Aineistoa tarkasteltiin myös siten, että prolaktiinipitoisuutta selitettiin muuttujilla: sonnin isä, elopaino 1-vuotiaana ja ikä näytteenottohetkellä, verinäytteenottomenetelmä (neulalla/kateterilla t. heti/myöhemmin otettu verinäyte), sperman otosta kulunut aika, astumishalu, tuoreen sperman määrä, tiheys, liike, elävyys ja pakastettavuus. Taulukossa 3 on annettu tutkittua aineistoa edustavat keskiarvot standardipoikkeamineen, erilaisin selittäjäyhdistelmin saadut vakiotermit regressiokertoimineen sekä selittävien muuttujien selitysasteen merkitsevyys ja kokonaisselitysprosentti.

Taulukosta 3 nähdään, että selittävien muuttujien selitysasteen merkitsevyys riippuu siitä mitä muuttujia kulloinkin otetaan samanaikaisesti tarkastelun kohteeksi. Prolaktiinipitoisuuden vaihteluista pystyttiin tarkastelun alaisesta aineistosta selittämään yhteensä 20.48 prosenttia isällä, elopainolla 1-vuotiaana, iällä ja verenottomenetelmällä (neula/kateteri t. heti/myöhemmin otettu näyte). Tässä tapauksessa ikä selittäjänä oli erittäin merkittävä; elopaino 1-vuotiaana ei mainittavammin selittänyt prolaktiinin vaihteluita.

Kun prolaktiinin vaihteluita selitettiin isällä, iällä, verinäytteenottomenetelmillä, sperman otosta kuluneella ajalla,

Taulukko 3. Veriplasman prolaktiinipitoisuutta selittävien muuttujien osittaisregressiokertoimet, niiden merkittävyys ja kokonaisselitysprosentti käytettäessä erilaisia selittävien muuttujien yhdistelmiä nuorilla keinosiemennyssonneilla.

PROLAKTIINI	Vakiotermi	Isä	Elop. 1-v.	Ikä kk	Neula/kateteri	Heti/myöh.	Pv sperman otosta	Astumishalu	Tuoreen sperman määrä	Tuoreen sperman tiheys	Tuoreen sperman liike	Tuoreen sperman elävyys	Pakastettavuus	Kokonaisselitys, %
X_{10}	-	X_3	X_4	X_5	X_8	X_9	X_{21}	X_{22}	X_{23}	X_{24}	X_{25}	X_{26}	X_{27}	
Keskiarvot														
15.085		2.205	452.8	27.232	1.191	0.520	1.876	2.561	2.465	2.493	2.356	2.246	2.493	
Standardipoikkeamat														
16.88			27.99	8.77	0.40	0.50	1.70	0.50	0.55	0.50	0.54	0.74	0.50	
X_{10} =	46.562	+2.574	-0.023	-0.888^{+++}	-3.319	+2.752								20.48
X_{10} =	49.231	+2.417		-0.772^{+}	-1.664	+2.510	-1.964	-7.487				+2.260		25.43
X_{10} =	51.053						-3.388^{+}	-2.857	-1.050	+1.249	-10.212^{+}		+0.499	26.55
X_{10} =	59.645	-1.958		-0.245	-1.371	+2.910	-2.671	-2.285			-9.591^{+}			30.17
X_{10} =	62.423	-1.452			-2.105	+2.050		+2.476	-3.206		-31.419^{+++}	$+14.654^{+++}$		33.93
X_{10} =	82.555	-3.625	+0.004		-1.424	+2.577		+2.616	-1.462	-5.848	-30.398^{+++}	$+16.019^{+++}$	-5.581	37.30
X_{10} =	66.335	-0.757		-0.413	+0.544	+1.980	-2.083	-3.988			-24.952^{+++}	$+14.650^{+++}$		42.84

$^{+}P < 0.05$, $^{++}P < 0.01$, $^{+++}P < 0.001$

astumishalulla ja sperman elävyydellä, niin kokonaisselitysprosentiksi saatiin 25.43 %. Tällöin iän vaikutus oli merkittävä, mutta muiden selittäjien vaikutus ei-merkittävä.
Kun prolaktiinipitoisuuden vaihteluita selitettiin sperman otosta kuluneella ajalla, astumishalulla, tuoreen sperman määrällä, tiheydellä, liikkeellä ja pakastettavuudella, niin kokonaisselitysprosentiksi saatiin 26.55 %. Tuoreen sperman liike ja sperman otosta kulunut aika selittivät prolaktiinin vaihteluita merkittävästi.

Iän vaikutus prolaktiinipitoisuuden vaihteluiden selittäjänä muuttui merkityksettömäksi heti kun selittäväksi muuttujaksi otettiin samanaikaisesti tuoreen sperman liike (taulukko 3).

Kun prolaktiinipitoisuuden vaihteluita selitettiin samanaikaisesti eläimen isällä, iällä, verenottomenetelmällä (neula/kateteri t. heti/myöhemmin), sperman otosta kuluneella ajalla, astumishalulla, sperman liikkeellä ja elävyydellä, niin kokonaisselitysprosentiksi saatiin 42.84 %. Tuoreen sperman liike selitti parhaiten prolaktiinin vaihteluita ($P< 0.001$) ja toiseksi paras selittäjä oli tuoreen sperman elävyys ($P<0.001$).

Taulukon 3 regressiokertoimien merkit osoittavat, että prolaktiinipitoisuus suhtautuu positiivisesti sperman elävyyteen mutta negatiivisesti tuoreen sperman määrään ja liikkeeseen sekä sperman otosta kuluneeseen aikaan ja eläimen ikään verinäytteenottohetkellä. Verinäytteenottohetki vaikuttaa hiukan prolaktiinipitoisuuteen; vetkuttelu näytteen otossa lisää prolaktiinin määrää veressä.

TULOSTEN TARKASTELU JA PÄÄTELMÄT

Alustavat tulokset osoittavat että nuorten sonniryhmien veriplasman prolaktiinipitoisuus vaihtelee melkoisesti eri eläimillä. Tutkitut sonnit olivat eri jälkeläisryhmissä eri ikäisiä. Nokan Olpin pojat olivat nuorimmat, niiden paino 1-vuotiaana oli suurin ja niillä veriplasman prolaktiinipitoisuus oli korkein verrattuna kahden muun sonnin poikaryhmiin. Nämä havainnot ovat mielenkiintoisia ja riittänevät jo yksin aiheeksi jatkotutkimuksiin.

Verinäytteenottomenetelmällä ei näyttänyt olevan merkittävää vaikutusta veriplasman prolaktiinipitoisuuteen. Tämä johtui ainakin

osaksi siitä, että metodierot peittyivät suurten yksilövaihteluiden alle. Näyttää kuitenkin siltä, että nopeasti neulalla kaulalaskimosta verinäytteitä ottaen saataisiin prolaktiinimäärityksiä varten käyttökelpoisia näytteitä nuorista sonneista, joita on säännöllisesti käsitelty. Verinäytteen otto korvalaskimosta on hankalaa, koska suonet ovat haaroittuneita ja usein heikosti eroittuvia. Kateterin asentaminen korvalaskimoon on hidasta. Kateteri myös tukkeutuu helposti kun verenpaine on alhainen ja suonet pieniä. Kateteri putoaa pois korvasta kun eläin heiluttelee päätään ja hankaa korviaan parren laitoihin. Kenttäolosuhteissa kateterin käyttö on hidasta ja hankalaa.

Aineistoa tutkittiin tilastollisesti monimuuttujamenetelmällä ja tällöin kävi ilmi että sperman elävyys suhtautui positiivisesti mutta liike ja määrä negatiivisesti veriplasman prolaktiinipitoisuuteen (taulukko 3). Aikaisemmissa tutkimuksissa on todettu, että prolaktiinipitoisuus kohoaa sukupuolisen kiihoittumisen ja siemensyöksyn yhteydessä (CONVEY ym. 1971, SCHAMS 1974). Nousu ei riipu sonnin iästä. SWANSON ym. (1971) saivat seerumin prolaktiinin ja kivesten ($r = .36$) ja lisäkivesten ($r = .30$) siittiöiden lukumäärän välille merkittävät positiiviset korrelaatiot. Tähänastiset tulokset näyttävät siltä, että prolaktiini vaikuttaa koirailla sukurauhasten toimintaan.

Tämän tutkimuksen tulokset perustuvat varsin rajoitettuun aineistoon. Jatkotutkimuksissa pyritään aineistoa keräämään suuremmista eläinmääristä ja useamman isän jälkeläisistä. Myös sperman ominaisuuksien mittoja jouduttaneen täsmentämään.

KIRJALLISUUTTA

ANDREWS, P. 1966. Molecular weights of prolactin and pituitary growth hormones estimated by gel filtration. Nature, London 209: 155 - 157.

BARTKE, A. 1971. Effects of prolactin on spermatogenesis in hypophysectomized mice. J. Endocr. 49: 311 - 316.

BERN, H. A. & NICOLL, C. S. 1968. The comparative endocrinology of prolactin. Rec. Progr. Horm. Res. 24: 681 - 720.

von BERSWORDT-WALLRABE, R., STEINBECK, H., HAHN, J.D. & ELGER, W. 1969. Prolactin and the ventral prostate gland in juvenile rats.

Experentia 25: 533 - 534.

CONVEY, E. M., BRETSCHNEIDER, E., HAFS, H.D. & OXENDER, W.D. 1971. Serum levels of LH, prolactin and growth hormone after ejaculation in bulls. Biol. Reprod. 5: 20 - 24.

DULAR, R., LaBELLA, F., VIVIAN, S. & LAWRENCE, E. 1974. Purification of prolactin-releasing and inhibiting factors from beef. Endoc. 94: 563.

KARG, H. & SCHAMS, D. 1969. Radioimmunologische Bestimmung der Hypophysenhormone ICSH und Prolaktin im Blut männlichen Rinden. Berliner und Münchener Tierärzliche Wochenschrift 24: 471 - 473.

MALVEN, P. V. & McMURTRY, J. P. 1974. Measurement of prolactin in milk by radioimmunoassay. J. Dairy Sci. 57: 411 - 415.

OXENDER, W. D., HAFS, H. D. & EDGERTON, L. A. 1972 a. Serum growth hormone, LH, and prolactin in the pregnant cow. J. Anim. Sci. 35: 51 - 55.

OXENDER, W. D., HAFS, H. D. & INGALLS, W. G. 1972 b. Serum growth hormone, LH and prolactin in the bovine fetus and neonate. J. Anim. Sci. 35: 56 - 61.

RAUD, H. R., KIDDY, C. A. & O'DELL, W. D. 1971. The effect of stress upon the determination of serum prolactin by radioimmunoassay. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 136: 689 - 693.

REINHARDT, V. & SCHAMS, D. 1974. Analysis of teat stimulation as specific stimulus for prolactin in cattle. Neuroendocr. 14: 289 - 296.

SCHAMS, D. 1974. Untersuchungen über Prolaktin beim Rind. Fortschr. Tierphys. Tierernähr. 5: 1 - 125.

SCHAMS, D. & KARG, H. 1970. Untersuchungen über Prolaktin im Rinderblut mit einer radioimmunologischen Bestimmungsmethode. Zentr.bl. Vet. Med. 17: 193 - 212.

SCHAMS, D. & REINHARDT, V. 1974. Influence of the season on plasma prolactin level in cattle from birth to maturity. Horm. Res. 5: 217 - 226.

SCHAMS, D., REINHARDT, V. & KARG, H. 1974. The immediate response of the plasma prolactin level to oestrogen and progesterone infusions in bulls. Acta endoc. 76: 242 - 247.

SEAVEY, B. K. & LEWIS, U. J. 1971. Bovine and ovine prolactin. A difference of two amino acids indicated by peptide maps. Biophys. Res. Commun. 42: 905.

SINHA, Y.N. & TUCKER, H. A. 1969. Mammary development and pituitary prolactin level of heifers from birth through puberty and during the estrous cycle. J. Dairy Sci. 52: 507-.

SMITH, O. W., MONGKONPUNYA, K., HAFS, H.D., CONVEY, E.M. & OXENDER, W.D. 1973. Blood serum testosterone after sexual preparation or ejaculation, or after injections of LH or prolactin in bulls. J. Anim. Sci. 37: 979 - 984.

SWANSON, L.V., WETTEMANN, R.P., RAWLINGS, N.C., HAFS, H.D. & MAGEE, W. T. 1971. Pubertal relationship of some endocrine and reproductive criteria in Hereford bulls. J. Anim. Sci. 33: 823 - 828.

TUCKER, H.A. 1971. Hormonal response to milking. J. Anim. Sci. 32, Suppl. I, 137.

Helsingin yliopiston monistuspalvelu, offset 1975