

STANOVENÍ ÚČINNOSTI ACTH*

VÁCLAV JELÍNEK

Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii v Praze

Účinnost ACTH lze stanovit doposud pouze biologickými metodami. Základním principem všech metod je vliv adrenokortikotrofního hormonu na nadledvinu, a to buď na její váhu a morfologii, nebo na její funkci. Funkce nadledviny je posuzována buď z hlediska biochemického, nebo z výsledku vlivu zvýšené činnosti kory nadledviny na reakce celého organismu.

Prvý průkaz adrenokortikotrofní účinnosti extraktu z předního laloku hypofyzy podal Collip r. 1934. Od té doby bylo popsáno mnoho metod, ale teprve v poslední době byly vypracovány specifické metody pro kvantitativní stanovení adrenokortikotrofní účinnosti. Zpřesnění všech metod přinesla definice mezinárodního standardu r. 1950. Od té doby je účinnost vyjadřována váhovou mezinárodní jednotkou, t. j. účinností 1 miligramu mezinárodního standardu. Podle doporučení mezinárodní standardizační komise je jako standardizační metoda uznávána pouze metoda vypracovaná M. Sayersovou a spol. Měřítkem účinnosti je vliv ACTH na množství askorbové kyseliny v nadledvině. Výhodou této metody je, že ji lze provést stanovení v jednom dni. Nevýhodou je, že k provedení je třeba alespoň dvacet krys hypofysekto-
movaných 18—24 hod. před provedením pokusu.

Metodu podle Sayersové provádíme již dva roky, takže na základě zkušeností můžeme provést její zhodnocení. Při našem postupu jsme dodržovali původní předpis metody, jak ji uvádí Sayersová.

Krysy, samci, přesně definovaného kmene (Sprague—Dewley), chované při teplotě 84 °F (28 °C) nejméně týden před pokusem, živé konstantní dietou, vážící 120—160 gr, jsou 24 hod. před provedením titrace hypofysekto-
movány. Druhý den po vyjmutí hypofyzy anestetizují se krysy natriumpentobarbitalem. Levá nadledvina se vyjme okamžitě po anestezii zvířete a preparuje se pro analýzu na obsah kyseliny askorbové. Zkoušený roztok ACTH se vstříkne intravenózně do obnažené ocasní žíly. Za jednu hodinu po vstříknutí ACTH se vyjme pravá nadledvina a preparuje se stejným způsobem pro analýzu. Vyjmutá nadledvina se položí na čistý zvlážený filtrační papír a pečlivě se očistí od pojivové tkáně. Vazivové pouzdro musí být intaktní, ale musí být úplně očištěné. Během preparace musí být nadledvina stále na vlhkém filtračním papíře. Po úplném očištění je nadledvina přesně zvážena diferenční technikou na omytém filmu s přesností 0,1 mg. Odvážená nadledvina se přenesse do odstředivací zkumavky a skleněnou tyčinkou se rozdrtí v trichloroctové kyselině (4%). Po dokonalém rozdrobení se přidá 0,3 gr čištěného noritu, promíchá se a v čirém extraktu, získaném filtrací nebo odstředěním, stanoví

* Přednesené na sjazde chemiků v Banské Štiavnici v červenci 1954.

se množství askorbové kyseliny kolorimetrickou reakcí dle Roe a Kuethera. Rozdíl mezi množstvím askorbové kyseliny v levé nadledvině, vyjmuté před podáním ACTH, a množstvím askorbové kyseliny v pravé nadledvině, vyjmuté za 1 hod. po podání ACTH, udává účinnost skoušeného preparátu.

Při zavádění této metody bylo nutné zvládnout tyto dílčí úkoly:

1. hypofysektomii krys,
2. stanovení askorbové kyseliny v nadledvinách,
3. vlastní provedení titrace.

K těmto bodům uvádíme vlastní zkušenosti. Na rozdíl od původní metody používáme krysy Wistar z vlastního chovu, živené Larsenovou směsí v množství ad libitum. Minimálně týden před provedením hypofysektomie ustájíme krysy v boxu, jehož teplota je automaticky udržována v rozmezí 23—26 °C. Hypofysektomii provádíme parapharyngeální cestou. Tracheální kanylu nezavádíme do průdušnice tracheotomií, nýbrž dutinou ústní. Tímto způsobem se vyvarujeme aspirace krve jednak z poraněné stěny průdušnice, jednak z operačního pole. Po odssání hypofysy ucpáváme trepanační otvor kostním voskem, čímž omezíme intrakraniální krvácení.

Stanovení askorbové kyseliny v nadledvinách provádíme prakticky přesně podle popisu metody uvedené Roem a Kuetherem. Výsledky dosažené touto metodou jsme kontrolovali metodou Tillmansovou. Zjistili jsme, že titrací dichlorphenolidophenolem dostáváme pravidelně vyšší hodnoty, průměrně o 10%. Tyto vyšší hodnoty jsou vysvětlitelné tím, že Tillmansovým způsobem se určují též oxydoredukční látky, na př. glutathion.

Při vlastním způsobu provádění titrace se nám neosvědčila narkosa barbituráty, a proto používáme nyní narkosy etherové, jak to doporučuje Greenspan. Roztok zkoušeného ACTH nevstříkujeme na rozdíl od původního předpisu do ocasní žíly, neboť vstříkování do této žíly je poměrně nespolehlivé a při neúplném vstříku je nutno hypofysektomované zvíře vyřadit. Vstříkujeme proto roztok ACTH do levé vena illiolumbalis. Tato probíhá od vena cava pod levou ledvinou šikmo přes mm. psoates kaudální směrem po zadní stěně břišní dutiny. ACTH rozpuštěný v příslušném rozpouštědle vstříkujeme tak, aby dávka byla obsažena v 0,2 ml na 100 gr váhy.

Při studiu této metody jsme se zabývali nejdříve otázkou, s jakou přesností určíme obsah askorbové kyseliny v pravé a levé nadledvině téhož zvířete. Na základě stanovení u 10 hypofysektomovaných krys jsme zjistili, že průměrný rozdíl v obsahu askorbové kyseliny v obou nadledvinách činí 15,6 mg %, t. j. 5,5% celkového obsahu askorbové kyseliny. Tuto chybu pokládáme za uspokojující, i když Sayersová uvádí, že chyba jejich stanovení činí pouze minimálně 1%. Vyšší hodnota naší chyby je vysvětlitelná tím, že krysy, které oni používali při své práci, měly podstatně vyšší, téměř trojnásobnou váhu nadledvin, takže vážení těchto nadledvin bylo přesnější. Tuto váhu nadledvin

nedosahují krysy kmene Wistar, chované ve VÚFB. Krysy dopravené z Konárovic mají sice vyšší váhu nadledvin, přece však nikdy nedosahují uváděné váhy 50—60 mg při tělesné váze 100—160 g, jsou-li zdravé.

Tímto způsobem jsme stanovili účinnost preparátu, který jsme srovnávací titrací s mezinárodním standardem prohlásili za domácí národní standard. Tento preparát má účinnost 1 m. j. v 1 mg. Je tedy stejně účinný jako mezinárodní standard.

Správnost naší titrace dokazují údaje v literatuře. Po dávce 0,5 mg domácího standardu nastane pokles askorbové kyseliny v nadledvině o 78 mg %. Po téže dávce mezinárodního standardu o 79 mg % (Claytonová). Po dávce 1,0 mg domácího standardu nastane pokles askorbové kyseliny v nadledvině o 111 mg % a po téže dávce mezinárodního standardu o 117 mg %. Výpočtem pravděpodobné hranice chyby pro $P = 0,95$ jsme zjistili, že chyba při celkovém počtu zvířat 24 se pohybuje v rozmezí 136—73 %. Popsanou metodou jsme dále provedli řadu titrací zahraničních vzorků a vzorků připravených biochemickým oddělením. Výsledky těchto titrací jsou uvedeny v tab. 1.

Tabulka 1

zkoušený preparát	označený obsah	zjištěný obsah
Cortrophine	25 m. j.	32,5 m. j.
Acton	10 m. j.	10 m. j.
Acton	25 m. j.	30,6 m. j.
Toscat	40 m. j.	45 m. j.
Toscat	10 m. j.	15,6 m. j.
Aethar	25 m. j.	22 m. j.
Orthana ACTH	10 m. j.	10 m. j.
ACTH Byla 1952	25 m. j.	13,5 m. j.
ACTH Byla 1953	25 m. j.	20,5 m. j.
ACTH J. Z. Pharm. 1952	25 m. j.	25,9 m. j.
ACTH J. Z. Pharm. 1953	25 m. j.	28,7 m. j.

Jak z uvedených výsledků vyplývá, prokázali jsme, že uvedené preparáty s výjimkou ACTH Byla 1952 obsahují deklarované množství účinného adrenokortikotrofního hormonu. Některé preparáty, na př. Cortrophine obsahují více účinného hormonu než je deklarováno, což bylo potvrzeno i při klinickém zkoušení.

Pochybnosti o specifičnosti této metody, vyslovené Reinhardem (1951), Forshamem (1952), Lim (1952), přiměly nás ku srovnání metody dle Sayerové s metodami jinými. S těchto je nejvíce doporučována metoda váhová. Tato se nejlépe provádí na hypofysektomovaných krysách způsobem, který doporučil Cortis—Jones. Měřítkem účinnosti je váhový přírůstek nadledviny za 7 dní po hypofysektomii a jednostranné kontrolní epinefrektomii při den-

ním podávání zkoušeného ACTH. Tento test jsme prováděli jako srovnávací, při čemž jsme současně podávali domácí standard definovaný metodou dle Sayersové. Porovnání výsledků dosažených jednak metodou Sayersové, jednak váhovou dle Cortis—Jonese ukazuje tab. 2.

Tabulka 2

zkoušený preparát	1 mg = m. j.	
	dle Sayersové	dle Cortis—Jonese
P. D.	0,3 m. j.	1,0 m. j.
110853	0,75 m. j.	0,5 m. j.
I/53	1,03 m. j.	1,2 m. j.
II/53	0,9 m. j.	1,0 m. j.
III/53	0,6 m. j.	1,28 m. j.
IV/53	0,78 m. j.	0,77 m. j.
V/53	0,9 m. j.	1,0 m. j.
VI/53	0,9 m. j.	1,1 m. j.
HS-51	0,1 m. j.	2,0 m. j.

I když se většina výsledků pohybuje v rozmezí uspokojující shody, preparáty P. D., HS-51 a III/53 jsou ve váhovém testu podstatně více účinné než v testu dle Sayersové. Případy neshody vysvětlujeme tím, že zkoušené preparáty P. D. a III/53 byly připraveny jiným výrobním postupem a preparát HS-51 z jiné suroviny, t. j. z hovězích hypofys. Toto zjištění by potvrzovalo názor, že biochemickými čistícími metodami lze získat jednak ACTH s převahou účinku na obsah askorbové kyseliny v nadledvině, jednak ACTH s převahou účinku na velikost nadledviny. Podobné rozdíly uvádí Forsham u dvou preparátů ACTH připravených Lim. Podle jeho názoru záleží na stupni destrukce molekuly adrenokortikotrofního hormonu. Podle jeho zjištění mají ACT-peptidy menší účinnost v testu váhovém, zatím co mají zachovanou vysokou účinnost v testu dle Sayersové. Podobný rozdíl pozoroval Forsham i při klinickém užití. Výsledek shrnul do tabulky.

Tabulka 3

dle P. H. Forsham a spol.		
kritérium účinnosti	ACTH	ACTP
krysa: eosinopenie	++++	±
dle SAYERSOVÉ	++++	++++
váhový test	++++	O
člověk: Cpd. F v moči	++++	++
eosinopenie	++++	++
klinický efekt	++++	++

Naše výsledky hodnoceny pouze měřítkem dvou různých testů ukazují, že je kvalitativní rozdíl v účinku preparátů ACTH připravených různým způsobem. Po této stránce chybí však kritické zhodnocení klinické. Přesto však naše zjištění ukazuje na závažnost otázky hodnocení preparátů ACTH. Domníváme se, že i když se jako oficiální metoda standardisační uznává metoda dle Sayersové, nepostačí tato pro odpovědné kvantitativní zhodnocení. Přikláníme se v tomto směru k názoru Liho, že každý preparát je nutno hodnotit alespoň dvěma v principu odlišnými metodami.

Souhrn

Metodou podle Sayersové lze rychle a spolehlivě stanovit účinnost adrenokortikotrofního hormonu. Výsledky dosažené touto metodou lze dobře reprodukovat, což dokazuje shoda s literárními údaji o titraci mezinárodního standardu.

Výsledky dosažené metodou dle Sayersové nesouhlasí však vždy s výsledky získanými váhovou metodou dle Cortis—Jonese. Neshodu mezi výsledky obou metod lze vyložit rozličným způsobem přípravy ACTH.

LITERATURA

1. Memorandum on the International Standard for the Adrenocorticotrophic Hormone, Departement of Biological Standard, National Institute for Medical Research, London.
2. Sayersová, Sayers, Woodbury, *Endocrinology* 42, 379 (1948).
3. Roe, Kuether, *J. Biol. Chem.* 147, 399 (1948).
4. Claytonová, *Analyst* 76, 325 (1951).
5. Reinhard, Geschwing, Li, *Acta Endocrinol.*, 8, 393 (1951).
6. Forsham, Lee, Kolb, Liddle, *J. Clin. Endocrinol.*, 12, 956 (1952).
7. Li, *Acta Endocrinol.* 10, 255 (1952).
8. Cortis—Jones, Crooke, Henly, Morris a Morris, *Biochem. J.* 46, 173 (1950).
9. Greenspan, Li, Evans, *Endocrinology* 46, 261 (1950).