

J. OPIŃSKA - BLAUTH

Metody otrzymywania i ilościowego określania wyciągów przytarczycznych.

Methods of preparing and quantitative determination of parathyroid hormone.

Hormon przytarczyczny, produkt wydzielania najmniejszych organów w organizmie zwierzęcym, sąsiadujących z tarczycą jest pod względem składu chemicznego substancją białkową. Pogląd, według którego substancja czynna gruczołów przytarczycznych obejmuje kilka hormonów natury białkowej o specyficznym działaniu biologicznym znajduje dziś dużo zwolenników. Ilość gruczołów, ich wielkość, położenie są zależne od gatunku. U człowieka spotykane są zwykle 4 gruczoły, u zwierząt 2 do 8. Waga gruczołu ludzkiego waha się w granicach 20 do 30 mg. Histologicznie, przytarczycę są pochodzenia nabłonkowego, w których dają się wyróżnić 2 rodzaje komórek: jedne, określone jako komórki główne, zawierają niewielkie jądro, protoplazmę o słabej zdolności barwienia, drugie określone mianem komórek kwasochłonnych barwią się eozyną. Ilość komórek kwasochłonnych wzrasta wraz z wiekiem, co świadczy o ich charakterze prawdopodobnie degeneratywnym. Przypuszczalnie miejscem produkcji hormonu są komórki główne.

Czynność fizjologiczna hormonu przytarczycznego jest związana z metabolizmem wapniowo-fosforowym. Hormon ten jest mediatorem w ruchu wapnia z substancji kostnej przez krew do nerek i innych tkanek. Stany patologiczne wpływające z nadczynności lub niedoczynności gruczołów przytarczycznych pozostają w ścisłym związku z metabolizmem wapniowo fosforowym. Obrazy kliniczne tych stanów patologicznych są dokładnie poznane, ale mechanizm działania hormonu pozostaje jeszcze w sferze przypuszczeń i hipotez często sprzecznych. Proces powodujący mobilizację wapnia, jego ucieczkę z tkanki kostnej, hyper-

kalcemię, negatywny bilans wapniowy, zwiększone wydalanie fosforanów i w związku z tym hypofosfatemię i ujemny bilans fosforowy stanowi obraz choroby Recklinghause na. W bezpośrednim z nią związku pozostaje schorzenie kostne „*Ostitis fibrosa cystica generalisata*“. Pierwszym symptomem choroby są bóle reumatoidalne w kończynach, początkowo napadowe, później coraz częstsze zmuszające chorego do stałego leżenia. Kości stają się kruche i łamliwe. Już przy badaniu zewnętrznym daje się zauważyć zniekształcenie kostne. Badanie rentgenowskie wykazuje początkowo objawy dekalcyfikacji, a przy przedłużającej się chorobie zmiany w strukturze kości. Charakterystyczne są również cysty występujące przede wszystkim w częściach nasadowych kości długich. Zawartość wapnia wyraźnie podniesiona może dochodzić w skrajnych wypadkach do 29—30 mg⁰/₀: zwykle waha się w granicach 18—20 mg⁰/₀. Z dwu form wapnia występującego we krwi wzrasta frakcja wapnia ultra dializującego. Podwyższenie poziomu wapnia nie jest stałe, raczej występuje pewnymi skokami. Hyperkalcemii towarzyszy hypofosfatemia, która pozostaje w związku z zwiększonym wydalaniem fosforanów przez nerki. W moczu występują zwiększone zawartości wapnia i fosforanów. W wielu wypadkach daje się zauważyć osadzanie wapnia w szeregu tkanek oprócz tkanki kostnej, przede wszystkim w nerkach, często i w płucach. Zatkanie kanalików moczowych solami wapniowymi staje się przyczyną uremii. Pobudliwość nerwowo-mięśniowa na bodźce elektryczne jest silnie zmniejszona. Przedłużająca się choroba Recklinghause na sprowadza ostatecznie silne wyniszczenie organizmu, całkowite zubożenie szkieletu w wapń, wkońcu zejście śmiertelne, którego bezpośrednią przyczyną jest mocznica lub osłabienie mięśnia sercowego. Dla zespołu chorobowego Recklinghause na charakterystyczne są guzy samych gruczołów przytarczycznych i guzy w tkance kostnej. Z całą pewnością można stwierdzić, że choroba Recklinghause na, *ostitis fibrosa generalisata* pozostaje w ścisłym związku z nadczynnością gruczołów przytarczycznych. (Dowodem tego jest osiągnięcie poprawy klinicznej po wycięciu gruczołów przytarczycznych, operacja dokonana poraz pierwszy przez F. Mandla). Istotą procesu chorobowego jest mobilizacja wapnia z tkanki kostnej, zachwianie równowagi wapniowo-fosforowej, negatywny bilans fosforowo-wapniowy. Inne symptomy, jak zmniejszenie pobudliwości nerwowo-mięśniowej, zwapnienie tkanek, hypotonia mięśni są tylko zaburzeniami wynikającymi z procesów pierwotnych. Dla rozpoznania choroby decydujące będą oznaczenia poziomu wapnia i fosforanów we krwi i badania rentgenowskie. W leczeniu najlepsze rezultaty otrzymuje się przy usuwaniu gruczołów przytarczycznych. Poziom wapnia i fosforanów stosunkowo szybko wraca do normy, wapń osadza się w kościach. Jedynym niebezpieczeństwem leczenia chirurgicznego jest obawa przed wystąpieniem ciężczki przy całkowitym usunięciu wszystkich gruczołów przytar-

czycznych. Doświadczalnie możemy wywołać stany podobne do objawów choroby Recklinghause na stosowaniu przez dłuższy okres czasu dużych dawek wyciągów przytarczycznych, względnie dużych dawek preparatów witaminu D. Chociaż, jak stwierdzono później, tylko te preparaty witaminowe działają równoległe do hormonu przytarczycznego, w których przeważa czynnik hyperkalcemiczny, a nie przeciwkrzywicy. Dehydrotachysterol wprowadzony do leczenia pod nazwą preparatu AT 10, otrzymywany przez naświetlanie ergosterolu jest w swoim działaniu odpowiednikiem hormonu przytarczycznego i ma tę wyższość nad nim, że może być wprowadzany do ustroju doustnie.

Niedoczynność gruczołów przytarczycznych staje się przyczyną wystąpienia zespołu objawów wywołanych przez zwiększoną pobudliwość nerwowo-mięśniową znaną pod nazwą tężyczki. Nie wszystkie formy tężyczek są związane z niedoczynnością gruczołów przytarczycznych. Hance klasyfikuje wszystkie dotychczas poznane formy tężyczek według następującego schematu: I. Tężyczki pierwotne: 1) tężyczki samoistne 2) tężyczki wywołane zakażeniem lub zatruciem, 3) tężyczki występujące w ciąży, względnie w okresach karmienia, 4) tężyczki wywołane usunięciem gruczołów przytarczycznych, 5) tężyczka wywołana niedomogą gruczołów nadnerczy.

II. Tężyczki wtórne: hyperwentylacja wywołana nadmierną czynnością oddechową.

Tężyczki samoistne występują tylko sporadycznie. Występowanie ich jest związane poniekąd i z okolicą, porami roku, zawodem (choroba szewska). Przypuszcza się, że przyczyną tężyczek samoistnych jest brak pewnych witamin. Tężyczki zakażeniowe występują w przebiegu duru, płonicy, anginy i przy zatruciach ołowiem, morfiną, fosforem, chloroformem. Tężyczka wywołana usunięciem gruczołów przytarczycznych daje zespół charakterystycznych objawów występujących zresztą i w innych formach tężyczek. Skurcze zaczynają się zawsze od rąk, obejmują górne kończyny i twarz. Drgawki dolnych kończyn występują, przede wszystkim u dzieci. Charakterystyczne są pewne ułożenia rąk (ręka położnika), nóg i swoisty wyraz twarzy. Dla rozpoznania klinicznego przyjęte zostały następujące objawy tężyczkowe:

Objaw Trousseau (*carpopedalspasm*)

Objaw Chwostka (drgawki górnej wargi i twarzy)

Laryngospasm (skurcz mięśni krtani)

Objaw Erba wyrażony zmianą pobudliwości nerwów ruchowych na bodźce elektryczne. W stanach normalnych pobudzenie następuje przy 6.0 miliamp. natomiast przy stanach tężyczkowych ta sama reakcja jest wywołana już przy 0.6—3 miliamp. Stany niedoczynności przytarczycznej charakteryzują się hypokalcemią i hyperfostatemią. Przy poziomie wapnia poniżej 7 mg⁰/o występują już zwykle objawy tężyczkowe. W moczu

występują pewne aminy pochodzenia białkowego guanidynowe. Wkońcu wymienić należy zaburzenia pochodzenia ektodermalnego towarzyszące przewlekłym stanom tężyczek potencjalnych związanych z niedomogą gruczołów przytarczycznych, do nich należą: zaćma soczewki, uszkodzenia emalii zębów, zmiany skórne (wypryski i inne), wypadanie włosów i zmiany w paznokciach, które stają się kruche i łamliwe.

W leczeniu chorób związanych z niedomogą gruczołów przytarczycznych stosowane są: preparaty otrzymywane z gruczołów przytarczycznych, preparat dehydrotachysterol AT 10, duże dawki soli wapniowych (chlorek wapniowy, mleczan wapniowy, glukonian wapniowy) — stosowane przy diecie mleczno jarzynowej, bogatej w wapń.

Leczenie preparatami przytarczycznymi, nieobojętnymi dla organizmu wymaga ciągłej kontroli poziomu wapnia we krwi, dokładnego zmianowania podawanych preparatów w jednostkach. Należy też zwrócić uwagę na różnice w reakcji zdrowych i z niedomogą przytarczyczną. Długotrwałe stosowanie preparatów przytarczycznych obniża wrażliwość ustroju na ten hormon. W końcu zaznaczyć należy, że preparaty te mogą być stosowane tylko pozajelitowo, ponieważ jako substancje białkowe ulegają strawieniu w przewodzie pokarmowym. Większą rolę w leczeniu stanów tężyczkowych odegrać może preparat witaminowy AT 10, który ma jeszcze tę wyższość, że może być stosowany doustnie. Preparat AT 10, dehydrotachysterol, czyli naświetlany ergosterol jest czynnikiem mobilizującym wapń z tkanki kostnej. Działanie jego w odróżnieniu od hormonu przytarczycznego jest powolne i przedłużone. Podczas gdy wprowadzenie hormonu przytarczycznego powoduje maksimum wzrostu poziomu wapnia już po 15 godzinach, to po podaniu preparatu AT 10 zaznacza się słaby wzrost dopiero po 1 — 2 dniach i działanie to trwa przez 8 dni. Wobec niebezpieczeństwa kumulacji należy stosować dawki bardzo ostrożnie przy ciągłej kontroli poziomu wapnia we krwi, który nie powinien przekroczyć 11 mg‰.

Obok tych zupełnie wyraźnie zdefiniowanych zespołów chorobowych będących w bezpośredniej zależności od funkcjonowania gruczołów przytarczycznych można wymienić jeszcze inne o podobnych obrazach klinicznych, których związek z gruczołami przytarczycznymi nie jest pewny. Do nich należy zespół Alberta Schonberga z pewnym podobieństwem do ostitis fibrosa. Choroba Pageta identyfikowana przedtem z chorobą Recklinghausena daje obraz chorobowy kliniczny, histologiczny, rentgenologiczny zupełnie swoisty nie pozostający w związku z gruczołami przytarczycznymi. Zwapnienie mięśni (*myositis ossificans*) mimo podobnych zaburzeń w metabolizmie wapniowym nie wykazuje bliższego związku z wydzielaniem gruczołów przytarczycznych. Wprawdzie obraz chorobowy osteomalacji (zmiękczenia kości) wykazuje pewne podobieństwo do ostitis fibrosa, ale wybitne różnice w obrazach

rentgenologicznych, nie przedstawiających żadnych zmian strukturalnych w tkance kostnej, i różnice w poziomie wapnia nie wskazują na związek z gruczołami przytarczycznymi. Natomiast pewne stwardnienia skóry, zaćmy oczne są zdaniem wielu klinicystów w związku z czynnością gruczołów przytarczycznych. Brak jednak jeszcze pewnych dowodów ustalających zależność tych zespołów chorobowych od gruczołów przytarczycznych.

Po tym krótkim wstępie mającym na celu wprowadzenie w zagadnienia związane z rolą hormonu przytarczycznego w ustroju, należy podać:

1. Wyniki dotychczasowych badań nad strukturą chemiczną hormonu, które są związane bezpośrednio z próbami preparatywnymi otrzymania czynnej substancji z gruczołów. Do dnia dzisiejszego nie zdołano otrzymać jeszcze substancji jednorodnej pod względem chemicznym o określonej masie cząsteczkowej i budowie chemicznej. Istnieje przypuszczenie co do istnienia kilku hormonów przytarczycznych, z których każdy ma odrębną rolę fizjologiczną.

2. Metody dla celów standaryzacji preparatów merkantylnych i dla celów badań klinicznych w endokrynologii. Znane w literaturze metody oparte są na oznaczeniach poziomu wapnia we krwi lub w moczu różnych zwierząt doświadczalnych. Nie opracowano dotychczas metody opartej na metabolizmie fosforanowym w związku z wydzielaniem gruczołów przytarczycznych. Metoda późniejsza oparta na zasadzie wybiórczego apetytu u zwierząt dotkniętych zaburzeniami gruczołów przytarczycznych nie ma wystarczających podstaw dla otrzymania ścisłych ilościowych wyników.

3. Postęp w dziedzinie badań nad zależnościami panującymi między gruczołami przytarczcznymi a innymi gruczołami wewnętrznego wydzielania.

4. Współdziałanie, względnie przeciwdziałanie hormonu przytarczycznego z witaminami.

5. Środki terapeutyczne w leczeniu zaburzeń i chorób związanych z funkcjami gruczołów przytarczycznych.

Celem tej pracy jest z jednej strony wyprowadzenie pewnego syntetycznego poglądu na stan badań w dziedzinie hormonu przytarczycznego w związku z pracami lat ostatnich i charakterystyka metod stosowanych do oczyszczania i izolowania czynnej substancji z gruczołów przytarczycznych, wkońcu przeprowadzenie porównań między wynikami moich prac doświadczalnych z lat 1938/9, a badaniami przeprowadzonymi w okresie wojennym prawie wyłącznie w laboratoriach amerykańskich.

Poglądy na mechanizm wpływów hormonu przytarczycznego ulegają jeszcze ciągle wahaniom. Z szeregu prac lat ostatnich dadzą się wprowadzić dwie teorie odnoszące się do roli hormonu przytarczycznego w ustroju.— S e l a y e (1), C o h n, T. C o h n, W. A u b l (2), L o g a n M. A. (3), T h o m s o n i C o l l i p (4) są zwolennikami dwutorowości

w działaniu hormonu przytarczycznego. Jeden tor działania stanowi uderzenie hormonu na tkankę kostną mobilizujące wapń, w wyniku czego odbywa się wzmożona resorpcja wapnia do krwi powodująca hiperkalcemię i w następstwie tego zwiększone wydalanie wapnia przez nerki w moczu i w ogólnym efekcie ujemny bilans wapniowy. Drugim punktem zadziałania hormonu są nerki, w wydalaniu fosforanów. Wzmożony proces wydalinowy fosforanów przez nerki jest według szkoły pierwszej zupełnie niezależny od procesu wapniowego. W związku z tą akcją we krwi zaznacza się hypofosfatemia, a w moczu hyperfosfaturja. F a y M. B e h r m a n n, V. G. B u c k D. M. (5) stwierdzają swoimi doświadczeniami bezpośredni wpływ hormonu przytarczycznego na nerki w wydzielaniu fosforanów. Nieco wcześniej L e a n M. A. i B l o o m W. (6) wyprowadzają swoją teorię bezpośredniego wpływu hormonu przytarczycznego na tkankę kostną, powodującego ucieczkę wapnia z kości i przez to zmiany histologiczne w strukturze kości. Potwierdzeniem teorii niezależności dwójnej akcji hormonu przytarczycznego są wyniki prac S t o e r c k a H.C.(7), który przeprowadzał swoje doświadczenia na zwierzętach z usuniętymi nerkami i pozbawionymi przytarczyc. U zwierząt z zahamowaną czynnością nerek S t o e r c k a stwierdził niezmienny poziom wapnia w surowicy, a podwyższony o 100% poziom fosforanów. Po drugim zabiegu wycięcia gruczołów przytarczycznych zaznaczył się zmniejszony o $\frac{1}{3}$ poziom wapnia w surowicy, a podwyższony poziom fosforanów. Wyniki jego doświadczeń wskazują, że normalny poziom wapnia w surowicy może być utrzymany w stanach nieczynności nerek, ale nie może być zachowany przy zaburzeniach gruczołów przytarczycznych. Natomiast poziom fosforanów uzależniony jest tak od stanu nerek, jak i gruczołów przytarczycznych. Podobnie, jak to widzimy w pracach S t o e r c k a w większości prac badawczych nad metabolizmem wapniowo fosforowym badacze stosują metodę wyłączenia z obiegu pewnych organów, nerek całkowicie lub częściowo, lub gruczołów przytarczycznych, względnie jednych i drugich.

K a h l a u (8) zakłada istnienie kilku hormonów przytarczycznych podobnych do siebie ze względu na swoją budowę chemiczną, białkową, ale różnych również pod względem działania biologicznego. Jeden z tych hormonów miałby regulować metabolizm wapniowy, a drugi fosforowy. K a h l a u przewiduje dla każdego z nich odrębny mechanizm działania.

Druga szkoła badaczy metabolizmu wapniowo-fosforowego, której przedstawicielami są: A l b r i g h t F. (9), M c. J u n k i n F. A. T w e e d W. R. M c. N a m a r a F. W. (10), T w e e d y W. R. T e m p l e t o n R. D. M c. J u n k i n F. A. (11), N e u f e l d A. H. C o l l i p J. B. (12) wyraża pogląd ścisłego skojarzenia wpływów hormonu przytarczycznego w jeden ciąg reakcji:

a) wydalania fosforanów przez nerki, b) resorpcji wapnia z tkanki kostnej. N e u f e l d i C o l l i p przeprowadzili swoje doświadczenia

na zwierzętach różnego rodzaju z zahamowaną czynnością nerek częściowo, bądź całkowicie, na drodze ich wycięcia lub podwiązania moczowodów. W wyniku swoich doświadczeń autorzy stwierdzili bezsprzecznie udział nerek w metabolizmie wapniowym. Iniekcje wyciągów przytarczycznych zwierzętom z zahamowaną czynnością nerek nie wywołały wzrostu poziomu wapnia we krwi. Po przywróceniu nerek do ich normalnego funkcjonowania zaznaczały się normalne reakcje po iniekcjach hormonu przytarczycznego, to znaczy hiperkalcemia i hypofosfatemia. Wyniki te zostały potwierdzone przez Tweedy i jego współpracowników.

Przy omawianiu metabolizmu wapniowego już teraz pragnę scharakteryzować nową metodę biologiczną stosowaną przez wielu badaczy do doświadczeń nad rolą hormonu przytarczycznego. Metoda ta została oparta na zupełnie innych zasadach od dotychczas stosowanych. Dała ona ciekawe wyniki odnoszące się w szczególności do zagadnienia korelacji hormonu przytarczycznego i witaminu D. Pierwsze doświadczenia i próby opracowania tej metody pochodzą od Richtera C. P. Eckerta J. F. (13). Metoda wprowadzona przez Richtera i Eckerta opiera się na obserwacji, że zwierzęta z zaburzeniami gruczołów przytarczycznych wywołanymi doświadczalnie wykazują instynktowną zdolność doboru tych składników pożywienia, które usuwają te zaburzenia. Np. szczury po usunięciu gruczołów przytarczycznych wykazują szczególny apetyt na sól wapniową podaną im w roztworze wodnym równorzędnie z wodą, względnie z fosforanem sodowym. Zwierzęta znajdowały się w indywidualnych klatkach zaopatrzonych w 2 flaszki z podziałkami. Zwierzęta te były odżywiane dietą nisko wapniową. Do picia otrzymywały w różnej kombinacji: wodę destylowaną, 2,4% roztwór mleczanu wapniowego, i 4% roztwór I-rzędowego fosforanu sodowego. Richter i Eckert stwierdzili przy pomocy tej metody u szczurów pozbawionych gruczołów przytarczycznych zwiększone zużycie mleczanu wapniowego, obniżone fosforanów w stosunku do spożywanych w normalnych warunkach przez grupy zwierząt kontrolnych. Według Richtera i Eckerta regulowanie przez zwierzęta w swobodnym wyborze ilości pobieranych soli wapniowej, czy fosforanu pozostaje w ścisłej zależności od poziomu wapnia i fosforanu we krwi. Każde zaburzenie spowodowane w metabolizmie wapnia czy fosforu odbija się na wybiórczym apetycie zwierzęcia. Willens S. Waller R. K (14) przeprowadzili podobne doświadczenia na zwierzętach w stanach patologicznych związanych z niewydolnością nerek. W doświadczeniach swoich Willens i Waller pozostawiali zwierzętom z częściową nieczynnością nerek, pozbawionych gruczołów przytarczycznych swobodę w doborze z 2 płynów znajdujących się w fiolkach. Wyniki ich doświadczeń były następujące:

A) zwierzęta z częściową nieczynnością nerek mające do wyboru wodę i roztwór mleczanu wapniowego wykazywały zwiększone zużycie

wody, natomiast zużycie soli wapniowej było takie same, jak u zwierząt kontrolnych.

B). Zwierzęta jak wyżej z ograniczoną zdolnością nerek przy pozostawieniu wyboru między wodą a fosforanem sodowym, wykazywały wyraźnie zmniejszone zużycie fosforanu w stosunku do warunków normalnych.

C). Przy pozostawieniu wyboru między solą wapniową a fosforanem sodowym zwierzęta jak A i B zużywały więcej soli wapniowej przy tym samym poziomie zużycia fosforanów odpowiadającym zwierzętom kontrolnym.

D). Zwierzęta po usunięciu gruczołów przytarczycznych wykazują niezaprzeczenie wzmożony apetyt na sól wapniową, natomiast wybitny spadek apetytu fosforanowego.

E). Przy kombinacji obu zabiegów chirurgicznych mających na celu częściowe ograniczenie funkcji nerek i całkowite wyłączenie funkcji hormonu przytarczycznego, zaznaczył się u zwierząt doświadczalnych w porównaniu do zwierząt kontrolnych tylko słaby przyrost apetytu wapniowego, natomiast wybitny spadek apetytu fosforanowego.

W późniejszych swych doświadczeniach Richter O. P. i Birmingham J. R. (15) przy zastosowaniu powyżej opisanej metody wybiórczego apetytu, przeprowadzili próby na zwierzętach z wyciętymi gruczołami przytarczycznymi i porównali działanie preparatów przytarczycznych z działaniem witaminów D, w szczególności preparatem AT 10, (*dehydrotachysterol*), witaminem D₂ (*Calciferol*) i witaminem D₃ (*7-dehydrocholesterol* naświetlany). Wyniki doświadczeń podane zostały w najmniejszych dawkach preparatów, które doprowadzały zużycie wapnia do poziomu normalnego. Doświadczenia przeprowadzone na 30 szczurach odżywianych dietą nisko wapniową z wyciętymi gruczołami przytarczycznymi dały wyniki następujące: wzmożony apetyt wapniowy, przy pomocy którego udało się uzyskać normalny poziom wapnia w surowicy i zapobieżenie tężyczcze. Zwiększenie ilości wapnia w pożywieniu obniżało apetyt zwierząt na sole wapniowe do poziomu normalnego. Przy zastosowaniu małych dawek preparatów przytarczycznych nie osiągnięto stanu normalnego aparatu wapniowego. Natomiast wyższe dawki powyżej 100 jednostek Kollipa na kg. przy pomocy których osiągnano normalny apetyt wapniowy, były już toksyczne. Preparaty witaminów D: — AT10 (0.035—0.25 mg) dziennie na kg., wagi, D₂ i D₃ — 3600j — 5000j na kg. wagi dziennie, wykazały w tych samych warunkach doświadczalnych o wiele silniejsze działania od preparatów przytarczycznych. Wyższe dawki preparatów witaminowych były silnie toksyczne. Po zastosowaniu ich występowała u zwierząt utrata wagi i śmierć. Natomiast próby z tranem nawet w znacznych dawkach, nie dały rezultatu dodatniego. Doświadczenia te są wyraźnym dowodem żywszego udziału witaminu D

w metabolizmie wapniowym od hormonu przytarczycznego. Richter i Birmingham przypuszczają, że witamin D działa bezpośrednio na przemianę wapniową i wydalanie fosforanów, natomiast hormon przytarczyczny ma wpływ bezpośredni tylko na wydalanie fosforanów. Wnioski te są potwierdzeniem teorii Collipa, Tweedy i innych o pośredniej roli hormonu przytarczycznego w metabolizmie wapniowym. Doświadczenia kliniczne przeprowadzone przez Richtera i Birminghama na chorych z niedomogą przytarczyczną potwierdziły te wyniki osiągnięte na zwierzętach doświadczalnych. Autorzy podkreślają dobre strony tej, powyżej opisanej metody biologicznej. Zdaniem ich, metoda jest bardzo prosta technicznie, bynajmniej nie długotrwała i naogół niezawodna przy zachowaniu stałych warunków doświadczalnych.

W r. 1943 pojawia się jeszcze jedna praca Richetra i Sylwii Helfrick (16), która ma na celu zbadanie wpływu hormonu przytarczycznego i AT10 na metabolizm fosforowy. Autorzy posłużyli się tą samą metodą wybiórczego apetytu zwierząt pozostających na diecie nisko wapniowej z wyciętymi gruczołami przytarczcznymi. Po operacji występowało wyraźne zmniejszenie zużycia fosforanu na korzyść wody. Iniekcje wyciągów przytarczycznych wywołały zmniejszenie apetytu fosforanowego aż do poziomu normalnego. Te same wyniki otrzymano z preparatem AT10. Te ostatnie doświadczenia podkreślają również poglądy autorów na drogi działania hormonu przytarczycznego.

Zagadnienia związane z metabolizmem wapnia i fosforu, udziału w nich hormonu przytarczycznego i witaminu D, były oddawna przedmiotem szerokiego zainteresowania biochemii. W ostatnich kilku latach pojawił się szereg prac związanych z próbami wyjaśnienia mechanizmu działania czynników antyrachitycznych i ich wpływu na metabolizm wapniowo-fosforanowy, w związku z hormonem przytarczcznym. Do szeregu znanych już dawniej preparatów, witaminu D₂ (calciferol), 50% preparatu znanego pod nazwą viosterolu i witaminu D₃ (naświetlony 7-dehydrocholesterol) przybył jeszcze powszechnie dziś stosowany preparat AT10 (dehydrotachysterol). Rola witaminowych preparatów w metabolizmie wapnia jest dwojaka, jedna to odkładanie wapnia w kościach czyli kalcyfikacja, druga to rozpuszczanie substancji kostnej. I w jednym i drugim wypadku występuje silne zapotrzebowanie soli wapniowych pobieranych w pożywieniu. W reakcji pierwszej, antyrachitycznej, osadza się pobrany wapń w kościach, w reakcji drugiej, hyperkalcemicznej następuje resorpcja wapnia do krwi i wydalania go przez nerki w moczu. Wynikiem reakcji antyrachitycznej jest pozytywny bilans wapniowy, a wynikiem reakcji hyperkalcemicznej ujemny. Techniczny preparat witaminu D jest mieszaniną czynnika antyrachitycznego i hyperkalcemicznego. Z prac Mc. L e a n a F.C (17) wynika, że preparat AT10 zawiera głównie czynnik hyperkalcemiczny.

Albright i jego współpracownicy (18, 19, 20) streszczają rolę hormonu przytarczycznego, calciferolu, preparatu AT10 w resorpcji wapnia i wydaleniu fosforanów. U zwierząt nierachitycznych zaznacza się całkowita analogia w działaniu tych preparatów w metabolizmie wapniowym. Logan i O'Connor (21) przypuszczają, że hormon przytarczyczny podobnie do preparatów witaminowych D rozpuszcza substancję kostną. W metabolizmie fosforanowym nie daje się zauważyć analogia w działaniu witaminu D i hormonu przytarczycznego. Witamin D zwiększa resorpcję fosforanów w nerkach, hormon przytarczyczny zwiększa wydalanie. Wyniki tych prac wyjaśniają dostatecznie, dlaczego hormon przytarczyczny, czynnik rozpuszczający substancję kostną, daje w ostatecznym efekcie obniżenie poziomu fosforanów w surowicy.

Próby teoretycznego uzgodnienia równoległej akcji witaminu D i hormonu przytarczycznego w metabolizmie wapniowym nie dały dotychczas jasnego i jednoznacznego poglądu na mechanizm tych procesów.

Tak jak pod pojęciem substancji zwanej dawniej witaminem D objętych jest kilka czynników o różnej strukturze chemicznej i różnym działaniu biologicznym, zapewne i hormon przytarczyczny nie stanowi substancji jednolitej pod względem chemicznym i pod względem reakcji biologicznej. Wood T. R. i Ross F (22) zakładają na podstawie swych badań istnienie przynajmniej 2 składników o różnej masie cząsteczkowej w czynnym wyciągu białkowym z gruczołów przytarczycznych. Czy metabolizm wapnia i fosforu jest związany z jednym czynnikiem hormonu przytarczycznego czy z obu, pozostaje jeszcze kwestią otwartą.

W literaturze hormonu przytarczycznego niewiele jest prac dotyczących zależności funkcji gruczołów przytarczycznych od innych gruczołów wewnętrznego wydzielania. Nawet przysadka mózgowa o roli tak wszechstronnych zależności obejmujących wszystkie gruczoły endokrynne nie wykazuje wyraźnie zdecydowanego wpływu na gruczoły przytarczyczne. Problem tych zależności został poruszony przez Blumentala i Loeba (23). W poszukiwaniu odpowiedniej metody autorzy oparli się na obserwacji nieopublikowanej zwiększenia mitozy w tarczycy pod wpływem przedniego płata przysadki mózgowej. Blumental i Loeb uzyskali w szeregu doświadczeń przeprowadzonych na świnkach morskich zwiększenie aktywności mitotycznej w obu gruczołach, tarczycy i przytarczycach. Wycięcie przysadki mózgowej powodowało w obu gruczołach zmniejszoną aktywność mitotyczną. Blumental i Loeb zakładają możliwość wydzielania w tarczycy hormonu paratyreotropowego kontaktującego tarczycę z przytarczczkami.

Natomiast wyniki późniejszej pracy Carnes, Osbolda i Storecka (24) świadczą o braku wszelkiej zależności między hormonem przytarczcznym a przysadką mózgową. W swoich doświadczeniach autorzy opierają się na próbach ze zwierzętami pozbawionymi przysadki

mózgowej, które wykazywały normalny poziom wapnia i fosforanów w surowicy.

Z innych prac nad zasięgiem hormonu przytarczycznego należy wymienić publikację Greenber (25), Nitzescu (26), Tweedy i Campbell (27), którzy sygnalizują wpływy hormonu przytarczycznego na metabolizm fosforowy w wątrobie, Tweedy (28) wskazuje przy pomocy doświadczeń z fosforem radioaktywnym na bezpośredni udział hormonu przytarczycznego w metabolizmie fosforowym wątroby.

Wood i Ross (29) przeprowadzali badania *in vitro* nad wpływem hormonu przytarczycznego na fosfatazę w nerkach. Wprawdzie w rezultacie wywoływano aktywację fosfatazy, lecz działanie hormonu przytarczycznego nie jest w tym wypadku specyficzne. Tę samą rolę odgrywają w stosunku do fosfatazy i inne białka, np. białko jaja kurzego, białko surowicy i inne.

W porównaniu do innych działów endokrynologii literatura hormonu przytarczycznego jest bardzo niewielka. Większość publikowanych prac odnosi się do roli hormonu w metabolizmie wapniowo-fosforowym. Ostatnie lata przyniosły doświadczenia, które stały się zawiązkiem dyskusji na temat korelacji między hormonem przytarczycznym a witaminą D. Prace te nie dały wystarczających dowodów doświadczalnych, któreby pozwoliły wyprowadzić ogólną teorię ujmującą rolę hormonu przytarczycznego w całym ustroju, a przede wszystkim w metabolizmie mineralnym. Natomiast zagadnienia związku hormonów przytarczycznych z innymi gruczołami wewnętrznego wydzielania, wpływu hormonu przytarczycznego na procesy odbywające się w innych ważnych organach np. wątrobie i mięśniach nie budzą jeszcze, przynajmniej w tej chwili, szerszego zainteresowania.

W r. 1938 w Państwowym Zakładzie Higieny w Warszawie, w Dziale Kontroli Organopreparatów rozpoczęłam z R. Truszkowskim i J. Iwanowską cykl badań nad hormonem przytarczycznym. W programie pracy uwzględnione były następujące tematy związane z metodyką ilościowej oceny czynności i preparatyką tego hormonu:

- A). Metoda ilościowego oznaczenia wapnia w moczu.
- B). Metoda ilościowej oceny czynności preparatów przytarczycznych.
- C). Metoda preparatywna otrzymywania czynnych wyciągów przytarczycznych i preparatu standartowego.
- D). Badania nad strukturą chemiczną czynnych wyciągów przytarczycznych.
- E). Korelacje między witaminami D i hormonem przytarczycznym.
- F). Opracowanie metody ilościowej oznaczania aktywności hormonu przytarczycznego z poziomu fosforanów wydalonych w moczu.

Z tych wyżej wymienionych tematów trzy pierwsze zostały opracowane. Wydane zostały następujące prace:

- 1). Metoda oznaczania wapnia w moczu szczurów (30).
- 2). Metoda oceny czynności preparatów przytarczycznych (31).
- 3). Metoda preparatywna otrzymywania czynnych wyciągów przytarczycznych. Ostatnia praca została przygotowana do druku w czerwcu w 1939 r. Wybuch wojny w Polsce uniemożliwił jej wydrukowanie. Na skutek działań wojennych w Warszawie wszelkie notatki odnoszące się do tej pracy zaginęły bez śladu.

Praca którą podejmuję ma na celu nie rekonstrukcję tej znacznej ilości doświadczeń przeprowadzanych w okresie kilkunastu miesięcy, gdyż to z powodu braku materiałów jest niemożliwe, ale zestawienie obserwacji i wyników badań odtworzonych z pamięci i oświetlenie ich w związku z postęпами nauki w tej dziedzinie po roku 1939.

By nawiązać z całością zagadnienia podam w streszczeniu wyniki badań już ogłoszonych, przyczem zwrócę uwagę na te momenty, które nas dzielą w poglądach od innych badaczy.

Ponieważ czynność hormonu przytarczycznego jest związana przede wszystkim z metabolizmem wapniowym, podwyższenie poziomu wapnia we krwi i w moczu jest efektem najbardziej istotnym dla określania czynności. Zmiany poziomu fosforanów nie budziły jeszcze w tych latach szerszego zainteresowania, to też tylko metody związane z oznaczeniem wapnia w moczu i w surowicy znalazły zastosowanie w metodyce ilościowej badań tego hormonu. Pierwsze doświadczenia z wyciągami przytarczycznymi były przeprowadzane przez Collipa i Clarca (32, 33), na psach, u których określano wzrost poziomu wapnia we krwi w pewnych, określonych warunkach doświadczalnych. Metoda ta, w której ze względu na zrozumiałość, niewielką ilość zwierząt używanych do doświadczeń, czynnik indywidualnej reakcji zwierzęcia odgrywa znaczną rolę, nie wydała się nam odpowiednią dla naszych celów.

Metoda Deyera (34, 35, 36), który wprowadził do oznaczeń wzrostu poziomu wapnia mocz szczurów wydała się nam bardziej racjonalna. Przeprowadzenie większej ilości doświadczeń na liczniejszych grupach małych zwierząt pozwalało wyłączyć prawie całkowicie czynnik indywidualności osobniczej. W opracowaniu Deyera metoda miała tylko charakter jakościowy i pozwalało tylko w przybliżeniu oceniać i porównywać czynność preparatów przytarczycznych. W związku z wyborem sposobu Deyera nasunęła się konieczność opracowania w pierwszym rzędzie metodyki oznaczenia wapnia w moczu szczurzym. Do tych celów zastosowaliśmy metodę mikro Halversona i Bergheima (37) zmodyfikowaną przez Van Slyke i Sendroy (38). Metoda ta, po wprowadzeniu pewnych modyfikacji i przystosowaniu do składu moczu szczurów, okazała się doskonałą, niezawodną i nadającą się do określenia ilości wapnia poniżej 0.1 mg. W naszych doświadczeniach wprowadziliśmy oznaczenia wapnia bezpośrednio w moczu bez poprzed-

niego spopielenia, przeciwnie do Deyera. Wyniki otrzymane z równoległych oznaczeń w moczach spopielenych i bezpośrednio były całkowicie zgodne. Spalanie moczków w obecności kwasu siarkowego okazało się niewskazane, ponieważ przy stężeniu jonu SO_4 ponad 1% wapń nie strąca się ilościowo jako szczawian. Część wapnia pozostaje w osadzie jako siarczan. Odbiałczanie moczu przed strąceniem wapnia okazało się konieczne. Ze względu na normalną zawartość białka w moczu szczurów odbiałczanie kwasem trójchlorooctowym było stosowane we wszystkich oznaczeniach. Kwas trójchlorooctowy i jego nadmiar w żadnym wypadku nie wpływał na wyniki oznaczeń. Ponieważ, jak należało przypuszczać Deyer stosował w swoich oznaczeniach spopielenia moczków z powodu obecności kwasu moczowego, przeprowadziliśmy szereg badań kontrolnych na wpływ kwasu moczowego na wyniki oznaczeń. W żadnym wypadku kwas moczowy nie strącał się obok szczawianu wapniowego i nie absorbował się na osadzie szczawianu wapniowego.

Wyniki tych doświadczeń pozwoliły na przeprowadzenie wszystkich oznaczeń w moczach niespopielenych. Technika samych oznaczeń była już wobec tego bardzo uproszczona. Jeszcze pewną trudność przy ilościowym strąceniu wapnia stanowiła obecność fosforanów w moczu. Należało ustalić takie stężenie jonów wodorowych, przy którym jon wapniowy strąca się ilościowo, a fosforany pozostają w roztworze. Przy pH około 6.5 wypada krystaliczny osad fosforanu amonowo-magnezowego, którego obecność uniemożliwia dokładne przemycie osadu szczawianu wapniowego amoniakiem. W szeregu prób określono optimum stężenia jonów wodorowych, przy którym szczawian wapniowy strąca się ilościowo, a fosforany pozostają w roztworze pH — 4.25-4.55.

By uzyskać całkowitą dokładność wyników opracowaliśmy w szeregu prób optimum temperatury roztworu przy strącaniu szczawianem amonowym, czasu pozostawienia osadu po strąceniu i ilości przemycia osadu rozcieńczonym amoniakiem. Technika tej metody jest zupełnie prosta, wymaga jednak pewnej wprawy i dokładności, szczególnie przy przemycaniu osadu silnym strumieniem amoniaku i syfonowaniu cieczy nad odwirowanym osadem przy pomocy cienkiej kapilary. W późniejszej literaturze w latach 1939-46 nie znalazłam żadnej pracy odnoszącej się do oznaczeń wapnia w moczu. Część druga mojej pracy miała na celu opracowania metody ilościowej oceny czynności hormonu przytarczycznego i określenie jednostki wyrażającej zależność reakcji od dawki preparatu hormonalnego. Trzeba było pokonać szereg trudności związanych z wyborem klatek dla szczurów, diety, i sposobem ich żywienia. Sposób ilościowego zbierania moczu, izolowania go od kału i resztek pożywienia wymagał również opracowania. Doświadczenia były przeprowadzane na 4 grupach białych szczurów po 5 sztuk z jednego miotu umieszczonych w dużych 6 litrowych flaszkiach z obciętymi dnami, w któ-

rych dno stanowiły nierdzewne siatki metalowe. Zwierzęta były odżywiane dietą nisko-wapniową, pełnowartościową. W celu ujednostajnienia norm pokarmowych dla wszystkich zwierząt pokarm był przygotowany pod postacią knedli jednakowej wagi. Karmienie zwierząt odbywało się raz na dobę, przyczem każdy osobnik otrzymywał swoją porcję. Codzienne obserwacje wykazały doskonale zdyscyplinowanie szczurów, z których każdy spożywał tylko swoją porcję. Nie było walk o żywność, każdy osobnik po spożyciu swojej porcji zbliżał się do flaszki z wodą. Po ujednostajnieniu warunków odżywienia, sposobów ilościowego zbierania moczu, oddzielania go od resztek jedzenia i kału, przeprowadzono około 1000 oznaczeń wapnia w moczu u różnych grup w celu otrzymania odpowiedniego materiału statystycznego potrzebnego do określenia wpływu czynnika indywidualnego zwierząt. Wyniki oznaczeń były wyrażone w mg. wapnia w $\frac{1}{2}$ dobowych zawartościach moczu w obliczeniu na 100 g. wagi zwierzęcia. Opracowano metodę graficzną dla wyrażania reakcji zwierząt na hormon przytarczyczny, której podstawy teoretyczne uzasadniono przy zastosowaniu praw i wzorów z biometrii. Z krzywych indywidualnych zawartości wapnia w dobowym moczu na 100 g. wagi zwierząt wynika, że nawet przy zachowaniu wszelkich standartowych warunków doświadczalnych, występują pewne wahania w zawartości wapnia. Jednakże z oznaczeń przeprowadzanych w kilku grupach równocześnie wynika, że czynnik zmienności w ilości wapnia jest ten sam dla wszystkich grup doświadczalnych. Prawdopodobnie wahania te nie są wynikiem indywidualnej zmienności zwierząt, ale pewnych nieskontrolowanych czynników zewnętrznych. Zastosowanie praw biometrii pozwoliło rozstrzygnąć zagadnienie wyboru wartości dla wyrażenia czynności hormonalnej przytarczyc; absolutnego przyrostu wapnia w dobowym moczu na 100 g. wagi zwierząt, czy też wartości względnej wynikającej z różnicy przyrostu wapnia grupy doświadczalnej po zastrzyku hormonu przytarczyc i równoczesnego przyrostu wapnia w grupie kontrolnej. Dla przyrostów absolutnych otrzymano standartowe odchylenie 0,156 mg. a dla przyrostów względnych w zestawieniu z grupą kontrolną 0,066 mg. W związku z tym wynikiem tylko względny sposób obliczania wyników przyrostu wapnia jako różnicy między grupą doświadczalną a kontrolną wydaje się racjonalny. Na zasadzie naszych doświadczeń chcę poddać rewizji sposób Collipa określania przyrostu wapnia w surowicy w czasie ściśle określonym po zastrzyku hormonalnym. Jak wynika bowiem z naszych doświadczeń przeprowadzanych na różnych grupach zwierząt z rozmaitymi dawkami preparatów przytarczycznych okres reagowania zwierząt nie jest jednakowy. Np. trzy grupy doświadczalne szczurów otrzymują jednakowe dawki tego samego preparatu, czwarta grupa pozostaje jako kontrolna. Otóż jedna z tych grup wykazuje powolny wzrost poziomu wapnia w moczu, maksimum wypada dopiero po 48 godzinach od chwili in-

jektacji, w trzecim dniu zaznacza się niewielki spadek, a powrót do normalnego poziomu dopiero po 5 dniach. W drugiej grupie występuje maksimum po 24 godzinach, które utrzymuje się przez następne 24 godziny, dopiero w trzecim dniu zaczyna się wolny spadek. W trzeciej grupie zaznacza się silny wzrost w pierwszych 24 godzinach, następnego dnia odbywa się gwałtowny spadek i powrót wapnia do normalnego poziomu. Te wyniki doświadczeń skłoniły nas do innego ujęcia ilościowej reakcji zwierząt na hormon przytarczyczny od ogólnie przyjętych. Zaproponowaliśmy metodę graficzną dla wyrażenia czynności preparatów przytarczycznych opartą na następujących zasadach: Względny przyrost wapnia porównawczy z grupą kontrolną wyrażony w mg (100 g. zwierząt zaznacza się na osi rzędnych). Na osi odciętych zaznaczone są dni doświadczalne (24 godz.) (Rys. 1 i 2).

Przyrost całkowity wapnia wyrażony jest powierzchnią, w której $0.1 \text{ mg—Ca} = 1 \text{ cm}^2$. Ten sposób wyrażania wyników reakcji dał najlepszą zgodność. Podaję np. wyniki osiągnięte dla 3 grup doświadczalnych przy jednakowych dawkach tego samego preparatu.

$S_1 = 22,6 \text{ cm}^2$

$S_2 = 25,2 \text{ cm}^2$

$S_3 = 22,9 \text{ cm}^2$

S — powierzchnia przyrostu
względnego wapnia.

Szereg dalszych doświadczeń miał na celu wykazanie proporcjonalności reakcji do dawki. W wielu doświadczeniach przeprowadzanych na różnych grupach szczurów z różnymi preparatami od najsłabszych do najsilniejszych stwierdziliśmy linearną zależność reakcji biologicznej wyrażonej przez S od logarytmu dawki.

Czynność preparatu przytarczycznego da się wyrazić wzorem:

$$X = \frac{S}{\log \text{dawki}}, \text{ dawka wyrażona w mg. (Rys 2)}$$

Zaproponowaliśmy wprowadzenie jednostki szczurzej jako 1/10 tej ilości preparatu, która daje wzrost wapnia wydalonego w moczu o 1 mg.

Przegląd literatury po 1939 r. do chwili bieżącej odnoszącej się do hormonu przytarczycznego wykazuje, że nie wprowadzono innej metody badań preparatów przytarczycznych oprócz już istniejących, to znaczy Collipa na psach i naszej, opartej na zasadzie Deyera, na szczurach.

Natomiast znalazłam w kilku pracach z lat ostatnich udoskonalenia wprowadzone do metody Collipa. Bliss i Ross (39) opracowali metodę Collipa według zasad biometrii, przy czym stwierdzili, że ilość zwierząt stosowana przez samego Collipa i innych badaczy, którzy tę metodę stosowali, jest niewystarczająca dla uzyskania standardowego odchylenia poniżej 10%. Wood i Ross (40) zastosowali do swych wyczerpujących badań nad preparatami przytarczcznymi metodę Collipa, ale już z większą ilością zwierząt doświadczalnych. Oni też wprowadzili modyfikację w określaniu jednostek Collipa. Pierwsza jednostka wprowadzona przez Collipa wyrażała się w 0.01 części tej

ilości hormonu, która wywołuje wzrost wapnia w surowicy psa o 5 mg. po 15 godzinach. Jednostka Hansona stanowiła 0,01 tej ilości hormonu przytarczycowego, która wywołuje wzrost wapnia u psa pozbawionego przytarczyc o 1 mg. po 6 godzinach. Późniejsza jednostka Collipa poprawiona przez Wooda i Rossa U. S. P. stanowi 0,01 tej ilości hormonu przytarczycowego, które wywołują wzrost poziomu wapnia w surowicy psa wagi 10—12 kg. o 1 mg% w czasie 16 godzin od chwili podskórnej iniekcji. Przy określaniu jednostki Wood i Ross odnosili ją do mg. azotu zawartego w prepracie (*nitrogen potency*). Autorzy chcieli tym sposobem wyeliminować wpływ związków balastowych nie będących substancją białkową.

Z innych prób, które jednak nie odegrały poważniejszej roli w pracach badawczych nad hormonem przytarczycznym, należy wymienić pracę Hamiltona i Schwartz'a (41), którzy oznaczali wzrost wapnia w surowicy królików. Króliki doświadczalne otrzymywały oprócz iniekcji hormonu przytarczycznego, per os niewielkie dawki chlorku wapniowego. Wood i Ross stwierdzają, że metoda ta nie daje dobrych wyników, gdyż zmienność reakcji u królików jest większa niż u innych zwierząt.

Wprawdzie w większości dotychczasowych prac badawczych nad hormonem przytarczycznym stosowana jest metoda Collipa i jego jednostki, sądzę jednak, że nasza metoda graficzna przy zastosowaniu mniejszych zwierząt doświadczalnych ma lepsze warunki dla wyłączenia czynnika zmienności. Ponadto, w metodzie Collipa jest pewna dowolność w założeniu, że maksimum wzrostu wapnia w surowicy wystąpi zawsze w tym samym czasie u wszystkich zwierząt.

Sądzę, że to maksimum wzrostowe poziomu wapnia w surowicy występuje nie zawsze 15—16 godzin po zastrzyku i zapewne pozostaje w związku z wielkością dawki, indywidualnością zwierzęcia i szeregiem innych czynników zmiennych w czasie doświadczenia. Nasz sposób ujmowania reakcji jako powierzchni, raczej odpowiada prawdzie.

Pod względem technicznym nasza metoda jest prosta i nie wymaga specjalnych urządzeń. Jedyną ujemną stroną jest długotrwałość jednego doświadczenia. Całkowity bowiem okres jednego doświadczenia wynosi od 7—10 dni. Należy bowiem uwzględnić okres wstępny stabilizacji wapniowej zwierząt w ściśle określonych i ujednolitych warunkach zewnętrznych (co najmniej 3 dni), drugi okres właściwego doświadczenia czyli wzrostu poziomu wapnia i powrotu do normalnego poziomu (średnio 3 i 3 dni). Ostatni okres 3-dniowy może być równocześnie okresem stabilizacji wapniowej do następnego doświadczenia. Te same grupy zwierząt mogły być używane do doświadczeń przez 3—4 miesiące bez przerwy. Z pracy Wooda i Rossa wiadomo mi, że i w metodzie Collipa doświadczenia z psami nie mogą być przeprowadzane częściej, niż raz na tydzień.

Wkońcu wypowiedzieć muszę swój pogląd, że żadna z wyżej opisanych metod nie odpowiada w zupełności wymaganiom i wszystkie są dalekie od doskonałości. Brak dobrej, prostej technicznie i krótkiej metody, brak zainteresowania tym tematem klinicystów, dla których problemy związane z hormonem przytarczycznym nie należą do palących i najważniejszych sprawił, że wszelkie zagadnienia związane z tym hormonem nie zostały tak wyczerpująco opracowane jak dla innych hormonów.

W trzeciej części projektowanego cyklu badań nad hormonem przytarczycznym zajęłam się stroną preparatywną. Zdaniem moim było przygotowanie czynnych preparatów nadających się do badań metodycznych i preparatu wzorcowego. Pierwsze prace preparatywne nad otrzymaniem czynnych wyciągów pochodzą od Collipa (32, 33).

Collip stosował ekstrakcję świeżych gruczołów rozcieńczonym kwasem solnym. Czynne frakcje białkowe otrzymywane były na drodze wysolenia całkowitego chlorkiem sodowym lub połowicznego siarczanem amonowym.

Fischer i Larson (42) przygotowywali kwaśne wyciągi drogą ekstrakcji n. kwasem solnym. Wyciągi te, po zobojętnieniu i zabezpieczeniu krezolem, przechowywane w niskiej temperaturze, zachowywały swoją aktywność w czasie 3 miesięcy. Hiot, Robison, Tendick (43) stosowali ekstrakcję wodno-alkoholową świeżych gruczołów przytarczycznych. Autorzy podkreślili znaczenie otrzymania czystych frakcji białkowych wolnych od lipidów. Ich metody preparatywne odpowiadały tym założeniom.

Davies, Dickens, Dodies (44) przygotowali z świeżych gruczołów wyciągi acetonowe i strącali czynną frakcję kwasem pikrynowym.

Tweedy (45) przeprowadził ekstrakcję świeżych gruczołów od tłuszczanych mechanicznie rozcieńczonym kwasem solnym. Czynne frakcje białkowe strącone były kwasem tróchlorooctowym. Wydajność czynnych frakcji wyniosła od 0.25 — 0.58% w stosunku do wagi świeżych gruczołów, 1.5 do 2.5 mg. na jeden gruczoł. Tweedy określał czynność swoich preparatów przy pomocy metody Collipa. Do oznaczeń wapnia w surowicy zastosował metodę Kramer Tisdalla (46) w modyfikacji Tweedy i Kochel (47). Doświadczenia te były przeprowadzone na kilku tylko zwierzętach, przy czym Tweedy stwierdził zgodność swoich wyników tylko w tych wypadkach, gdy preparaty były badane tylko na jednym zwierzęciu. Z doświadczeń Tweedy nie udało się wprowadzić proporcjonalności między reakcją a dawką. W preparatywnej pracy nad hormonem przytarczycznym przyjął w ogólnym zarysie metodę Tweedy i wprowadziłam do niej szereg modyfikacji.

Gruczoły przytarczyczne otrzymaliśmy w stanie zamrożonym. Ze względu na trudności w zdobyciu od razu większej ilości surowca, materiał był zbierany przez okres dłuższy, przechowywany w stanie zamrozo-

nym i przerabiany po paru miesiącach. Być może, że niejednorodność biologiczna naszych preparatów (od nieczynnych do silnie aktywnych przy tych samych warunkach doświadczalnych i tej samej metodzie preparatywnej), była wywołana różnicą w materiale dostarczonym z rzeźni.

Gruczoły były mielone w młynku *L a t a p i e*, którego konstrukcja specjalnie się do tego celu nadawała. Przed zmieleniem określano ilość gruczołów i ich wagę. Po zmieleniu i zważeniu zalewano miążgę gruczolową acetonem w stosunku 10-krotnym do wagi gruczołów i pozostawiano w chłodni na okres 48 godzin. Aceton zmieniano kilkakrotnie. Już w tej pierwszej fazie przeróbki udało się osiągnąć całkowite odtłuszczenie materiału przy zastosowaniu wyczerpującego traktowania acetonem.

Substancję pozostałą po oddzieleniu lipidów i acetonu poddawano kwaśnej ekstrakcji rozcieńczonym kwasem solnym. Stosowane były różne stężenia kwasu solnego. Przy ekstrakcji 1% stężenia kwasu solnego otrzymano bardzo nieznaczną wydajność czynnej frakcji białkowej. Z frakcji otrzymanej przy 5% stężenia otrzymano preparat śnieżno biały, doskonale rozpuszczalny w wodzie o największej wydajności ale słabo aktywny. Ekstrakcja przy 3% stężenia kwasu dała preparat szary, trudno rozpuszczalny w wodzie o wydajności nieco niższej od osiągniętej przez *T w e e d y* ale silnie czynny. Wobec tych wyników przy dalszych próbach stosowano zawsze ekstrakcję kwasem solnym przy 3% stężenia. Ekstrakcja była przeprowadzana na łaźni wodnej w 70-80 st. nie dłużej niż 30 min. Wyciągi były sączone przez płótno i wyciskane w prasie. Przesące były zobojętniane węglanem sodowym aż do reakcji na papierek Kongo (pH—5.3) i zadawane acetonem w stosunku 1:1 w celu całkowitego usunięcia ciał tłuszczowatych. Po 48 godzinach (w chłodni) sącono przez bibułę, osady odrzucano i klarowne przesące zagęszczano w próżni poniżej 50%. Po całkowitym oddestylowaniu acetonu (zagęszczenie do $\frac{1}{3}$ objętości), uzupełniano płyn do objętości pierwotnej wodą i przeprowadzano strącanie kwasem trójchlorooctowym. W celu wypróbowania przy jakim stężeniu kwasu trójchlorooctowego strąca się frakcja czynna, przeprowadzono szereg prób. Przy zastosowaniu kwasu trójchlorooctowego 1% stężenia otrzymano preparat niezwykle czynny przy bardzo nieznacznej wydajności. Frakcje pochodzące z strącania w stężeniu 3% dały preparaty szarawe, trudno rozpuszczalne w wodzie, o wydajności zbliżonej do tej, którą osiągał *T w e e d y*. Frakcje otrzymane przy 5% stężenia były słabo aktywne przy znacznej wydajności.

Osady otrzymane z strącania kwasem trójchlorooctowym były odwirowywane, przemywane trzykrotnie alkoholem 96%, potem absolutnym i eterem absolutnym. Osady całkowicie już odwodnione, rozcierano w móździerzyku agatowym, wydmuchiwano resztki eteru i przechowy-

wano w chłodni nad chlorkiem wapnia lub w zatopionych ampulkach. Te ostatnie służyły przede wszystkim do przeprowadzenia prób na trwałość wyciągów.

Z szeregu preparatów handlowych nadsyłanych do Państwowego Zakładu Higieny przez firmy krajowe i zagraniczne, jedynie tylko preparaty amerykańskie firmy Elli-Lily okazały się czynne. Do badań metodycznych służyły nam preparaty otrzymywane powyżej opisaną metodą. Wyniki badań pozwoliły przeprowadzić następujące obserwacje:

1) Mimo zupełnie jednakowych warunków i zupełnie tej samej metodyki preparatywnej przy otrzymywaniu wyciągów, otrzymane preparaty różniły się znacznie między sobą tak stopniem aktywności, jak i pod względem wydajności. Nigdy nie można było przewidzieć, nawet po pełnym opanowaniu strony technicznej przygotowywania wyciągów, czy otrzymany preparat będzie wybitnie aktywny, czy też zupełnie słaby.

2) Warunkiem uzyskania dobrej wydajności przy ekstrakcji kwasem solnym jest doskonale odtłuszczenie gruczołów, dające się osiągnąć już na początku przeróbki przy pomocy acetonu.

3) Optimum stężenia kwasu solnego stosowanego do ekstrakcji gruczołów wynosi 3%. Podwyższenie stężenia kwasu do 5% zwiększa wydajność ale tylko w odniesieniu do substancji białkowych balastowych.

4) Kwas trójchlorooctowy strąca czynną frakcję białkową przy stężeniu nie wyższym ponad 3%. Wyższe stężenia kwasu trójchlorooctowego dają preparaty obciążone znacznie balastem białkowym nie będącym frakcją czynną.

5) Preparaty otrzymywane według powyższej metody stanowiły białą, lub szarawą substancję, dającą się dobrze proszkować, w wodzie rozpuszczalną. Preparaty aktywne zwykle były szare, trudniej w wodzie rozpuszczalne, dające roztwory mętne.

6) Najlepsze preparaty otrzymane według powyższego sposobu wykazały przy oznaczaniu aktywności metodą graficzną na szczurach 6 j. szczurzych/mg.

7) Próbkami jakościowymi stwierdzono w czynnych preparatach obecność azotu i siarki. Dodatnie wyniki próby biurowej i Millona potwierdziły obecność substancji białkowych.

8) W żadnej z dotychczasowych prac preparatywnych o hormonie przytarczycznym nie było opracowane zagadnienie trwałości wyciągów przytarczycznych. Rozstrzygnięcie tego problemu było niezmiernie ważne, przede wszystkim już i z punktu widzenia celowości przygotowywania wzorcowych preparatów. Przygotowanie bowiem preparatów wzorcowych o znaczeniu międzynarodowym, tak jak to zrobiono dla innych hormonów (insuliny, pituitryny i innych), jest tylko wtedy uzasadnione, gdy jest gwarancja niezmiennącej się czynności preparatu przynajmniej przez rok. Nasz plan pracy przewidywał zbadanie trwałości kilku preparatów

w okresie jednego roku przy zastosowaniu badań kontrolnych co 3 miesiące. Preparaty przeznaczone do tych badań były pozostawione w stanie suchym, sproszkowanym w zatopionych ampulkach w niskiej temperaturze. Badania kontrolne były przeprowadzane co trzy miesiące.

Z przeprowadzonych doświadczeń widocznym było, że pełną czynność zachowywały badane preparaty tylko do trzech miesięcy. Badanie po sześciu miesiącach przechowywania preparatów w warunkach wyżej opisanych wykazało znaczne osłabienie aktywności naszych wyciągów. Wybuch wojny we wrześniu 1939 r. przeszkodził realizacji dalszego planu.

Z doświadczeń tych, przeprowadzonych nad stroną preparatywną w otrzymywaniu czynnych wyciągów przytarczycznych z świeżych gruczołów, dadzą się wyciągnąć następujące wnioski:

1) Strącanie kwasem trójchlorooctowym czynnej frakcji białkowej stanowiącej hormon przytarczyczny nie prowadzi do zupełnego oczyszczenia czynnej frakcji od ciał białkowych balastowych. Inne metody, jak kilkakrotne strącanie w punkcie izoelektrycznym, adsorbcja wybiórcza budzą większe nadzieje wyizolowania homogenicznej substancji białkowej określonej jako hormon przytarczyczny.

2) Nietrwałość wyciągów przytarczycznych uniemożliwia przygotowanie preparatów wzorcowych i wogóle budzi zastrzeżenia co do celowości sporządzania tych preparatów na rynek farmaceutyczny.

Szczególnie wobec takich osiągnięć w latach ostatnich, jak izolowanie czynnika hyperkalcemicznego z preparatów witaminu D znanego dziś pod nazwą preparatu AT10, przygotowywanie preparatów przytarczycznych leczniczych budzi pewne wątpliwości. Tym bardziej zagadnienie to jest istotne, ponieważ preparat AT10 może być stosowany „per os” i jego trwałość nie budzi żadnych wątpliwości.

Zagadnienie otrzymywania czynnych wyciągów przytarczycznych może mieć znaczenie tylko naukowe i ograniczone do otrzymania właściwego hormonu przytarczycznego w czystej postaci. O ile więc dalsze badania nie wykażą jeszcze innej roli dla hormonu przytarczycznego w ustroju, przy dzisiejszym stanie wiedzy naszej preparat AT10 wykazuje równoległe działanie z hormonem przytarczycznym i może go zastąpić w leczeniu stanów patologicznych wywołanych zaburzeniami w metabolizmie wapniowo-fosforowym.

Przegląd literatury po 1939 r. do chwili bieżącej pozwolił mi stwierdzić, że nad preparatyką hormonu przytarczycznego i metodyką jego badań pracowano niewiele. Są dwie interesujące prace z tej dziedziny, wpominane powyżej, jedna to praca Wooda i Rossa (30) o częściowym oczyszczaniu i badaniu struktury chemicznej hormonu przytarczycznego; i druga Bliss a i Ross a analizująca metodę wartościowania preparatów przytarczycznych według zasad biometrii.

Praca Wood i Rossa z 1943 r. stanowi duży postęp w dziedzinie preparatyki hormonu. Autorzy zastosowali inne sposoby oczyszczania, przy czym otrzymali jeden preparat 3-krotnie silniejszy od pierwszych wyciągów Collipa. Do wartościowania swoich preparatów zastosowali metodę Collipa przy użyciu większej liczby zwierząt doświadczalnych. W preparatyce zastosowali również, analogicznie do Collipa i Tweedy, ekstrakcję świeżych, odtłuszczonych gruczołów rozcieńczonym kwasem solnym. Nieczynne frakcje białkowe usuwali na drodze frakcjonowanego wysalania przy połowicznym wysyceniu siarczanem amonowym przy pH—4. Czynną frakcję białkową otrzymywali przy wysoleniu siarczanem amonowym przy pH—6. Proces frakcjonowania był powtarzany kilkakrotnie. Frakcja czynna poddana była wyczerpującej dializie i w trzeciej fazie oczyszczania adsorpcji na kwasie benzoowym. Roztwór frakcji strąconej siarczanem amonowym przy pH—6 zadawano kwasem benzoowym i wytrząsano. Autorzy śledzili czynność swoich wyciągów przy poszczególnych fazach oczyszczania. W pierwszej fazie oczyszczania wyciągi kwasem solnym wykazywały 10—15 jednostek U.S.P.: w drugiej fazie osadów strąconych siarczanem amonowym przy pH—6 60—100 jednostek U.S.P. a wkońcu w ostatniej fazie po adsorbpcji kwasem benzoowym 260—325 U.S.P.

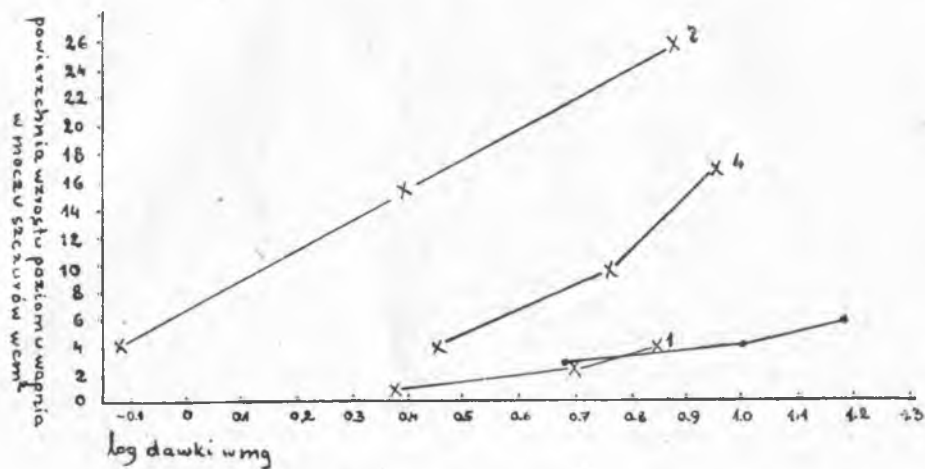
Wood i Ross próbowali jeszcze innych metod oczyszczania na swoich wyciągach przytarczycznych. Między innymi stwierdzili, że punkt izoelektryczny dla hormonu przytarczycznego wynosi nie tak jak Collip podaje 4,8, lecz około 6. Metody oczyszczania takie jak adsorbpcja na węglu, elektroforeza, elektrodializa, frakcjonowanie acetonem i kwasem pikrynowym, kwasem tróchlorooctowym nie dały tak dobrych wyników, jak adsorbpcja kwasem benzoowym. Wood i Ross posunęli również badania nad strukturą chemiczną samego hormonu. W szeregu prób stwierdzili charakter wyłącznie białkowy czynnej substancji odpornej na rozcieńczone kwasy mineralne, ulegającej zniszczeniu przy hydrolizie zasadowej i trawieniu pepsyną. Zdaniem autorów, hormon przytarczyczny w swojej odporności na kwasy mineralne i ogrzewanie z fenolem, rozpuszczalność w rozcieńczonym alkoholu zbliża się do insuliny. Przy pomocy metody ultracentryfugowej wyodrębnili 2 czynne związki białkowe: jeden o masie cząsteczkowej wahającej się w granicach 15-25000, drugi 500000 do 1000000-Frakcja o niższej masie cząsteczkowej wykazała większą aktywność.

Ci sami autorzy w pracy o acetylowaniu hormonu przytarczycznego (47) wprowadzili jeszcze jedną metodę znajdującą dziś szerokie zastosowanie przy badaniu struktury chemicznej białek. W metodzie tej autorzy zastosowali acetylowanie wolnych grup aminowych i fenolowych za pomocą ketenów. Metoda ta opierała się na dawniejszych spostrzeżeniach Tweed i Torigoe (48) Tweedy, Bell i Vicens-

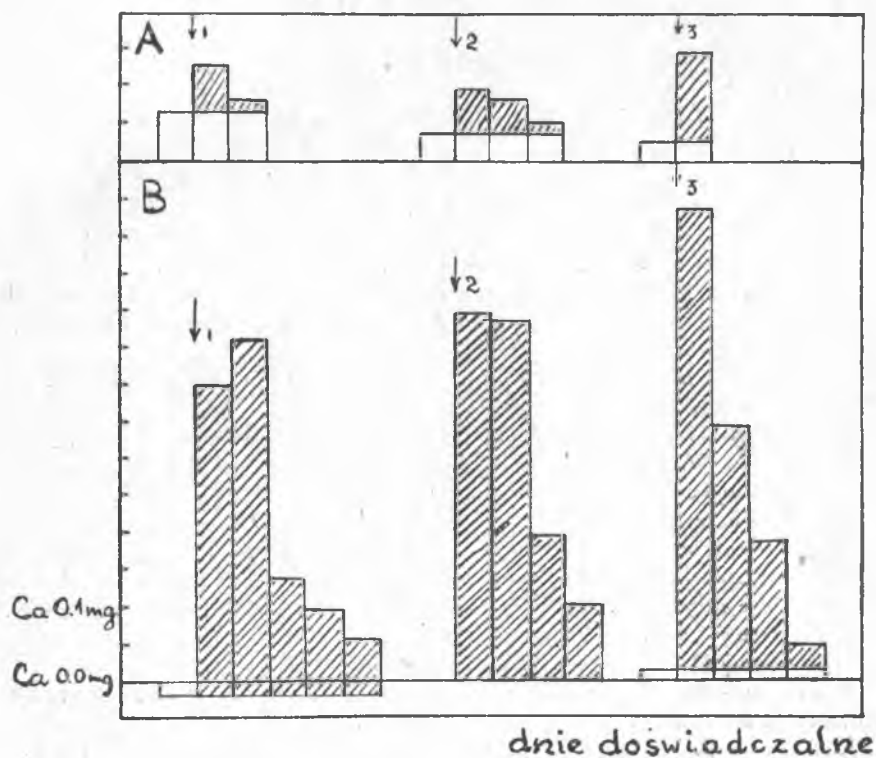
Rios (49), o roli wolnych grup aminowych w hormonie przytarczczym. Te czynniki, które wiążą lub utleniają wolne grupy aminowe, np. *formaldehyd*, kwas azotowy nieodwracalnie niszczą hormon. Podobnie działają i keteny acetylujące, jak to wykazali Wood i Ross w swojej pracy. Acetylowanie mogło obejmować albo grupy aminowe, lub fenolowe, (*tyrozyna*), względnie jedno i drugie. Ponieważ hydroliza acetylowanych związków odbudowuje częściowo grupy fenolowe, natomiast nie regeneruje czynności hormonalnych, autorzy wyprowadzają wniosek, że czynność hormonu przytarczczynego jest bezwzględnie związana z wolnymi grupami aminowymi. Ta właściwość zbliża hormon przytarczczyny do toksyny dyfterytycznej, pituitryny, natomiast wyróżnia go od insuliny, pepsyny i hormonów gonadotropowych ludzkich.

Z wszystkich badań przeprowadzonych nad hormonem przytarczczym zapoczątkowanych przez Collip'a w 1925 r. wynika, że osiągnięte wyniki nie są proporcjonalne do włożonych wysiłków i rezultatów otrzymanych na polu badań innych hormonów. Nie otrzymano bowiem jeszcze hormonu w postaci zupełnie czystej, homogenicznej substancji białkowej i nie opracowano jeszcze metody preparatywnej, wybiórczej dla tego hormonu.

Podobnie i metody dotychczas opracowane dla oznaczania aktywności preparatów przytarczczynych nie są doskonałe. Pierwsza metoda Collip'a stosowana przez wszystkich badaczy amerykańskich z tej dziedziny nie odpowiada moim zdaniem warunkom dobrej metody biologicznej. Nasza metoda opracowana na zasadzie Deyera z uwzględnieniem zasad biometrii jest lepsza, ale obie nie dają pełnego obrazu na czynność hormonu przytarczczynego, gdyż uwzględniają tylko jedną dziedzinę jego działań to znaczy metabolizm wapniowy. Drugi tor działań hormonu na metabolizm fosforanowy nie został w metodyce badań dotychczas uwzględniony. Szereg badań klinicznych wskazuje na doniosłą rolę hormonu w wydalaniu fosforanów przez nerki. Próby biologiczne opierające się na wybiórczym apetycie zwierząt z zaburzeniami w funkcjonowaniu gruczołów przytarczczynych pozwalają przypuszczać, że tylko metody, które uwzględnią metabolizm wapniowo-fosforowy oparte na oznaczeniach wapnia i fosforanów we krwi lub moczu, określeniu ilorazu wapniowo-fosforowego dadzą nam prawdziwy wskaźnik czynności hormonu przytarczczynego.



• Rys. 1.
Reakcja biologiczna
na hormon przytarczyczny w zależności od log. dawki.



Rys. 2.
Wzrost poziomu wapnia w moczu szczurów po dodaniu różnych ilości w mg preparatów
hormonu przytarczycznego (A i B) 3-m grupom szczurów.

PIŚMIENNICTWO.

- 1) Selye H., Arch. Path 34. 625—32 (1942).
- 2) Cohn W. E., Cohn E. T. Aub J. C., Ann. Rev Biochem. 11415—40 (1942).
- 3) Logan M. A. J. Biol. Chem. 127, 711—19 (1939).
- 4) Thomson D. L. Collip J. B., Ann. Rev. Physiol. 2, 309—46 (1940).
- 5) Fay M., Behrmann V. G., Buck D. M., Am. J. Physiol. 136, 716—19 (1942).
- 6) Mc. Lean F. C., Bloom W., Arch. Path. 32. 315—33 (1941).
- 7) Stoerck H. C., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 54, 50—53 (1943)
- 8) Kahlau G., Frankfurt Z. Path. 54, 494 (1940). Chem. Abstracts 36, 6221—6222 (1942).
- 9) Albright F. J. Am. Med. Assoc. 117, 527—33 (1941).
- 10) Mc. Junkin F. A., Tweedy W. R., Mc. Namara E. W., Am. J. Path. 13, 325—33 (1937).
- 11) Tweedy W. R., Templeton R. D., Mc. Junkin F. A., Endocrinology 21, 55—59 (1937).
- 12) Neufeld A. H., Collip J. B., Endocrinology 30, 135—41 (1942).
- 13) Richter C. P., Eckert J. F., Endocrinology 21, 50 (1937).
- 14) Willens S. L., Waller R. K., Endocrinology 23/5, 829 (1941).
- 15) Richter C. P., Birmingham J. R. Endocrinology 29 5, 655 (1941).
- 16) Richter C. P., Helfrick S., Endocrinology 33/6, 348 (1943).
- 17) Mc. Lean F. C. J. Am. Med. Assoc. 117, 609—19 (1941).
- 18) Albright F., Sulkowitch H. W., Clin. Investigation 17, 05—16 (1938).
- 19) Albright F., Bloomberg E., Drake, Sulkowitch H. W. Clin Investigation 18, 165—169 (1939).
- 20) Albright F., Sulkowitch H., W. Bloomberg E., J Clin. Investigation 18. 165—169 (1939).
- 21) Logan M. A., O'connor P. J. Biol. Chem. 127, 711—19 (1939).
- 22) Ross W. F., Wood T. R., J. Biol. Chem. 146, 49—62 (1942).
- 23) Blumental H. T., Loeb L., Endocrinology 30/3, 502 (1942).
- 24) Carnes, Osebold, Stoerck Am. J. Physiol. 139, 188—92 (1943).
- 25) Greenber D. M., Proc. Soc. Exptl. Biol Med. 29, 721—23 (1932).
- 26) Nitzescu I. I., Compt. Rend. Soc. Biol. 110, 1141—43 (1932).
- 27) Tweedy W. R., Cambell W. W., J. Biol. Chem. 154, 339—47 (1944).
- 28) Tweedy W. R., Federation Proc. 3, 63 (1944)
- 29) Wood T. R., Ross W. F., 146, 59—62 (1943).
- 30) Truszkowski R., Blaith-Opieńska J., Dobrowolska Z., Iwanowska J., Biochem. J. XXX II 1295—1011 (1938).
- 31) Truszkowski R., Blaith-Opieńska J., Iwanowska J., Biochem. J. XXX III 1005—1011 (1939).
- 32) Collip J. B., Clark E. P., J. Biol. Chem. 64, 485 (1925).
- 33) Deyer F. J., J. J. Physiol. 75, 13 (1932).

- 34) Deyer F. J., Quart J. Pharm and Pharmacol. 6, 426 (1933).
 - 35) Collip J. B., Clark E. P., J. Biol. Chem. 66, 133 (1925).
 - 36) Deyer F. J., Quart J. Pharm. and Pharmacol. 8, 513 (1935).
 - 37) Halverson, Berghheim J. Biol. Chem. 32, 159 (1917)
 - 38) Van Slyke, Sendroy J. Biol. Chem. 84, 217 (1929).
 - 39) Bliss C. I. Ross C. L. Am. J. Hyg. A. 31, 79 (1940).
 - 40) Vide 22.
 - 41) Hamilton B. Schwartz C. J., Pharmacol. and Therap. 46, 285 (1932).
 - 42) Fisher N. F., Larson, Am. J. Physiol. 75, 93 (1925)
 - 43) Hiot A. M., Robison S. C., Tendick F. H. J. Biol. Chem. 65, 117 (1925).
 - 44) Davies D. T., Dickens F. Dodies E. C. Bioch. J, 20, 695 (1926).
 - 45) Tweedy W. R. J. Biol. Chem. 88, 649 (1930).
 - 46) Krammer B., Tisdall F. F., J. Biol. Chem. 47, 475 (1921).
 - 47) Tweedy W. R., Kochel F. C., J. Biol. Clin. Med. 14, 747 (1929).
 - 48) Wood T. R., Ross W. F., J Biol. Chem. 146, 59 (1942).
-

S U M M A R Y.

1. Methods of determination of parathyroid hormone are discussed.
2. The authors method based on Deyers principle permits to express the activity of parathyroid preparations in rat units by quantitative determination of the calcium excreted in the urine of rats. In contrary to other methods it is proposed to take into account only the total increase of urinary calcium elicited by parathyroid extracts.
3. The rats response measured in this way is proportional to the logarithm of the administered dose.
4. Attempts to obtain isolated parathyroid extracts gave no satisfactory results with regard to complete purification of the active substance.
5. Extracts obtained from the same sources and by the same methods of purification varied in efficiency and in activity.
6. The extracts were unstable and showed a partial decrease of activity after three months.

Many clinical investigations made after the year 1939 demonstrate the role of the parathyroid hormone in the excretion of phosphates by the kidneys. A simultaneous determination of calcium and of phosphates in blood and in urine and the evaluation of their mutual proportion, seems therefore to be of importance.
