

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
11. Jg. 1973, S. 323—325

Radioimmunologische Schnellmethode zur Messung von Trijodthyronin im Serum ohne Extraktion

Von P. HILGER¹⁾, J. HERRMANN und H. L. KRÜSKEMPER

Aus der 2. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Düsseldorf

(Eingegangen am 11. Januar/17. März 1973)

Es wird über eine rasche, genaue und empfindliche Methode zur Trijodthyroninbestimmung im Serum ohne vorangehende Extraktion unter Verwendung eines hochspezifischen Antikörpers und 8-Anilino-naphthalin-1-sulfonsäure berichtet.

Rapid radioimmunoassay for the measurement of triiodothyronine in serum without extraction

A rapid, precise and highly sensitive method for the determination of triiodothyronine in serum without extraction is described. It is based on the use of a highly specific antibody and 8-anilino-naphthalene-1-sulfonic acid.

Im Laufe des vergangenen Jahres sind einige radioimmunologische Methoden zur Messung der Trijodthyronin-(T₃)-Konzentration aus Nativserum vorgestellt worden (1—6, 8). Diese Verfahren unterscheiden sich erheblich hinsichtlich Empfindlichkeit, Höhe des erforderlichen Antikörpertiters, des Arbeitsaufwandes und der Art der Substanz, die das endogene T₃ aus seiner Serum-Protein-Bindung freisetzt. Allen gemeinsam sind lange Inkubationszeiten über mehrere Tage. Sie weisen damit relativ geringe Probenkapazitäten pro Arbeitswoche auf, was ihre Anwendbarkeit als klinische Routinemethoden beeinträchtigt.

MITSUMA et al. (5) haben kürzlich auf die Möglichkeit hingewiesen, die Gleichgewichtseinstellung der Bindung von markiertem und endogenem T₃ am Antikörper durch Inkubation bei höheren Temperaturen stark zu beschleunigen. Wir haben dieses Prinzip unter Benutzung von 8-Anilino-naphthalin-1-sulfonsäure als „blockierendes“ Agens mit unseren T₃-Antikörpern angewandt und gute Erfahrungen gemacht. Die im folgenden dargelegten Ergebnisse lassen erkennen, daß diese Arbeitsmodifikation allen Ansprüchen einer klinisch-chemischen Routinemethode zur T₃-Bestimmung genügt.

Material und Methoden

Antikörper

Hochspezifische Antikörper gegen T₃ wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit an Albumin gekoppeltem T₃ (Carbodiimid-Methode (7)) gewonnen; nach 3maliger Booster-Injektion des Antigens (je 1 mg in komplettem FREUND's Adjuvans, 0,1 ml an 10 verschiedenen Stellen des Rückens des Kaninchens subkutan injiziert) war der Titer innerhalb von 6 Wochen so hoch, daß das antikörperhaltige Kaninchenserum im Test in einer Endverdünnung von 1:60000 verwendet werden konnte.

Puffer

0,1 mol/l Barbitol-Puffer pH 8,6, mit Zusatz von 0,1 g/100 ml Rinderserumalbumin.

8-Anilino-naphthalin-1-sulfonsäure-Lösung

8-Anilino-naphthalin-1-sulfonsäure (Serva, Heidelberg); 3,22 mmol/l; gelöst in Barbitol-Puffer. Prozentuale Verdrängung von ¹²⁵J-T₃ vom Thyroxin-bindenden Globulin verschiedener Seren durch 8-Anilino-naphthalin-1-sulfonsäure: $98 \pm 2\%$ (n = 20).

Markiertes Trijodthyronin

¹²⁵J-L-Trijodthyronin, spezifische Aktivität 80—120 mCi/mg (Byck Mallinckrodt, Frankfurt) Tracer-T₃-Konzentration im Test: 40—60 pg/0,1 ml Barbitol-Puffer (60—90 fmol/0,1 ml).

Eichkurve

Nicht-markiertes T₃ (Fa. Henning, Berlin) für die Eichkurve wurde in T₃-freiem Serum gelöst, so daß Konzentrationen von 10, 20, 40, 100, 200 pg T₃ pro 25 µl Serum entstanden (3,8; 7,6; 15,2; 38,2; 76,4 fmol/25 µl). Das T₃-freie Serum wurde durch Adsorption des Hormons an Aktivkohle (160 g/l Serum) hergestellt.

Trenngemisch

Nach der Inkubation wird mit Dextran beschichteter Aktivkohle (Norit A) getrennt, dazu werden 1,0 g Aktivkohle mit 0,1 g Dextran T 70 (Fa. Pharmacia, Schweden) in 120 ml Barbitol-Puffer suspendiert.

Zur Durchführung des Tests wird ein Reagenzgemisch hergestellt, das 2 Teile 8-Anilino-naphthalin-1-sulfonsäure-Lösung und 1 Teil Tracer enthält. Mit einem Verdünnungsautomaten (Fa. Brand, Wertheim) werden die Proben aufgenommen; 25 µl natives Patientenserum werden mit 0,375 ml des Reagenzgemisches aus dem Verdünnungsautomaten in ein Plastikreagenzgefäß (Fa. Eppendorf, Hamburg) pipettiert. Gleichermaßen wird die Eichkurve pipettiert. Der Test wird mit der Zugabe des Antikörpers gestartet, 0,1 ml 1:12000 verdünntes, Antikörperhaltiges Kaninchenserum in Barbitol-Puffer wird mit einer Konstriktionspipette hinzugegeben. Die Proben werden mit einem Mixer etwa 2 s geschüttelt und für 1½ h bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation werden die Proben 10 min lang bei 4°C abgekühlt und anschließend mit 0,7 ml kalter Aktivkohlesuspension über weitere 20 min inkubiert. Nach Zentrifugieren bei 4°C über 10 min mit 3000 U/min (Mistral-Kühlzentrifuge) wird der klare Überstand abgesaugt und die an der Aktivkohle verbleibende Radioaktivität in einem Gamma-Probenwechsler (Fa. Philips) gemessen. Bei der Berechnung der gebundenen Impulse pro

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Minute wird die unspezifische Bindung (U. B.) des Tracers durch die Wandungen der Reaktionsgefäße und durch das Reaktionsgemisch in Abwesenheit des Antikörpers berücksichtigt. Die gebundenen Impulse pro Minute der einzelnen Werte errechnen sich nach der Formel $\text{Imp./min bound} = \text{Imp./min UB} - \text{Imp./min free}$. Die unspezifische Bindung beträgt je nach Alter der Tracer- T_3 -Charge zwischen 2 und 10% der Gesamtradioaktivität im Ansatz.

Ergebnisse und Diskussion

Die Problematik der radioimmunologischen T_3 -Bestimmung aus Patientenserum ohne vorangehende Extraktion liegt neben der Gewinnung eines spezifischen Antikörpers gegen T_3 darin, eine geeignete Substanz zu finden, die zwar das T_3 aus seiner Bindung an die Trägerproteine des Serums verdrängt, die Bindung des T_3 an den Antikörper jedoch nicht beeinflusst. Von den zahlreichen in der Literatur vorgeschlagenen Substanzen, wie Tetrachlorthyronin, Heparin, Dinitrophenol, Diphenylhydantoin, Thimerosal, Natrium-Salicylat und 8-Anilinnaphthalin-1-sulfonsäure werden nur die letzten drei z. Z. noch bei radioimmunologischen T_3 -Bestimmungen verwandt. Die hier beschriebene Methode, die durch den Einsatz von 8-Anilinnaphthalin-1-sulfonsäure, eines sehr guten Antikörpers, kurzer Inkubationszeiten und eines genauen Verdünnungsautomaten gekennzeichnet ist, erscheint als klinische Routinemethode ideal. 150 Proben können an einem Tag von einer Person aufgearbeitet werden, die Ergebnisse können bereits nach 6 h vorliegen.

Abbildung 1 zeigt eine typische Eichkurve. Gleichzeitig ist eine Kurve aufgetragen, die der Überprüfung der Richtigkeit der Methode dient. Bei Berechnung des B/F Quotienten (gebundene Impulse durch freie Impulse) nach Serienverdünnung eines Hyperthyreose-serums verlief die erhaltene Kurve zur Eichkurve parallel. In Wiederfindungsversuchen nach Zusatz von nicht-markiertem T_3 zu einem Hypothyreoseserum war der Korrelationskoeffizient zwischen gemessenen und

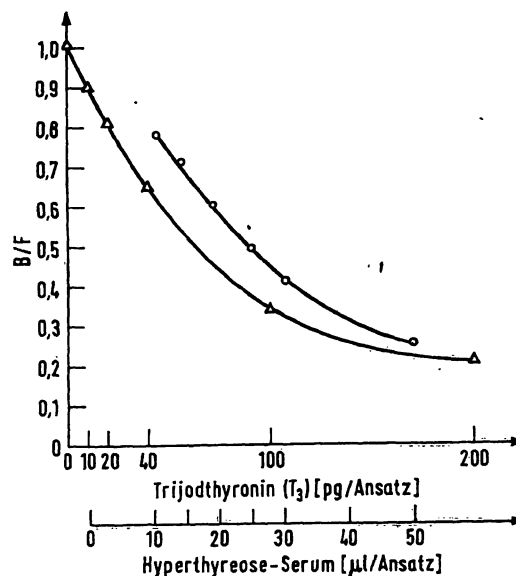


Abb. 1
Standard Eichkurve mit T_3 -Zusatz zu T_3 -freiem Serum (Δ - Δ).
Serumverdünnung von Hyperthyreose-Serum (\circ - \circ - \circ)

erwarteten Werten mit $r = 0,995$ hoch signifikant. Der verwendete T_3 -Antikörper ist für T_3 hochspezifisch. Die Kreuzreaktion mit T_4 war kleiner als 0,2%. Die untere Empfindlichkeit der Methode entsprechend dem T_3 -Wert, der sich statistisch gegen 0 pg T_3 unterscheiden läßt, liegt bei 5 pg pro Ansatz. Daher können auch Hypothyreoseseren gemessen werden, ohne daß die eingesetzte Serummenge erhöht zu werden braucht. Bei einem T_3 -Gehalt im Patientenserum über 8 $\mu\text{g/l}$ (12 nmol/l) wird eine Verdünnung des Patientenserums notwendig, da die Eichkurve im hohen Meßbereich zu flach wird. Der Variationskoeffizient als Maß der Präzision in Serie betrug $\pm 3,5\%$ ($n = 10$). Bei der Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag ($n = 50$) betrug der Variationskoeffizient $\pm 10\%$. Die Materialkosten betragen etwa 0,20 DM pro Bestimmung.

Tab. 1

T_3 -Serum-Konzentrationen (ng/l) bei verschiedenen Funktionszuständen der Schilddrüse gemessen mit unterschiedlichen radioimmunologischen Methoden

Autor	Euthyreose		Hypothyreose		Hyperthyreose	
	Bereich	$\bar{x} \pm s$	Bereich	$\bar{x} \pm s$	Bereich	$\bar{x} \pm s$
CHOPRA et al. (1)	1000—1700	?	1000	?	1660—13000	5190 \pm ?
LIEBLICH u. UTIGER (3)	1020—2150	1450 \pm 250	600—1360	990 \pm 240	2050—7930	4290 \pm 1460
GHARIB et al. (12)	1200—3120	2150 \pm 550	400—1630	1030 \pm 430	3680—14730	7600 \pm 2890
MITSUMA et al. (5)	960—1720	1380 \pm 230	440—800	590 \pm 90	2480—17000	4940 \pm 2650
GUANSING et al. (10)	700—3500	1950 \pm ?	280—1800	?	1800—10000	?
HILGER et al., diese Methode	600—2200	1340 \pm 420	0—800	420 \pm 240	2400—13000	5110 \pm 2480
HESCH et al. (6)	?	1350 \pm 290	?	?	3000—10100	?
SURKS et al. (11)	1000—1960	1460 \pm 240	?	440 \pm 260	2890—13000	6650 \pm 2890
LARSEN (4)	?	1100 \pm 250	?	390 \pm 210	1880—23800	?

Tab. 2

Mittelwerte und Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) von Patientenkollektiven mit verschiedenen Funktionszuständen der Schilddrüse

Euthyreose	n = 352	1340 \pm 417 ng/l	(2,060 \pm 0,640 nmol/l)
Hypothyreose	n = 31	424 \pm 239 ng/l	(0,652 \pm 0,352 nmol/l)
Hyperthyreose	n = 63	5110 \pm 2480 ng/l	(7,850 \pm 3,810 nmol/l)
Alte Patienten (70—90 Jahre)	n = 46	664 \pm 403 ng/l	(1,018 \pm 0,619 nmol/l)

Die gefundenen Mittelwerte der T_3 -Serumkonzentrationen stimmen gut mit den meisten bisher veröffentlichten, auf kleineren Fallzahlen basierenden Ergebnissen überein (Tab. 1). Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Bei Einzelbeobachtungen von T_3 -Hyperthyreosen (mit normalem Gesamt- T_4 und Thyroxin-bindenden Globulin-Gehalt des Serums) fanden wir maximale Werte von $15 \mu\text{g } T_3/\text{l}$ (23 nmol/l). Bei 70–90jährigen „euthy-

reoten“ Klinik-Patienten war der T_3 -Mittelwert signifikant gegenüber dem anhand eines jüngeren Kollektivs ermittelten Wert gesenkt.

Bei 5 der bisher gemessenen Hypothyreoseren und in 4 Fällen aus der Gruppe der alten Patienten (trotz normalen oder nur leicht gesenkten Thyroxingehaltes des Serums) lag der T_3 -Serumspiegel unterhalb der Nachweisgrenze (9).

Literatur

1. CHOPRA, I. J., SOLOMON, D. H. & BEALL, G. N. (1971), *J. Clin. Invest.* **50**, 2033–2041. — 2. MITSUMA, T., NIHEI, N., GERSHOGORN, M. C. & HOLLANDER, C. S. (1971), *J. Clin. Invest.* **50**, 2679–2688. — 3. LIEBLICH, J. & UTIGER, R. D. (1972), *J. Clin. Invest.* **51**, 157–166. — 4. LARSEN, P. R. (1972), *J. Clin. Invest.* **51**, 1939–1949. — 5. MITSUMA, T., COLUCCI, J., SHENKMAN, L. & HOLLANDER, C. S. (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 2107–2113. — 6. HESCH, R. D., HÜFNER, M. & VON ZUR MÜHLEN, A. (1972), *Deut. Med. Wochenschr.* **97**, 351–353. — 7. OLIVER, G. C., PARKER, B. M., BRASFIELD, D. L. & PARKER, C. W. (1968), *J. Clin. Invest.* **48**, 1035–1042. — 8. LARSEN, P. R. (1971), *Metab. Clin. Exp.* **20**, 976–980. — 9. HERRMANN, J., RUSCHE, J., HILGER, P. & KRÜSKEMPER, H. L., in Vorbereitung. — 10. GUANSING, A. R., WEBSTER, B. R. & HUMMEL, B. W. C. (1971), *Clin. Res.* **19**, 772 (abstract). — 11. SURKS, M. J., SCHADLOW, A. R. & OPPENHEIMER, J. H. (1972), *J. Clin. Invest.* **51**, 3104–3113. — 12. GHARIB, H., RYAN, R. J., MAYBERRY, W. E. (1970), *J. Clin. Endocr.* **31**, 709–712.

Priv. Doz. Dr. J. Herrmann
2. Medizinische Klinik der Universität Düsseldorf
4 Düsseldorf
Moorenstraße 5