

Amer. J. Med. **27**, 963 (1959). — [7] GORDON, R.: Exsudative enteropathy. *Lancet* **1959/I**, 325. — [8] SCHWARTZ, M., and B. THOMSEN: Idiopathic or hypercatabolic hypoproteinaemia. *Brit. med. J.* **1957 I**, 14. — [9] BARANDUN, S., R. AEBBERSOLD u. R. BIANCHI: „Proteindiarrhoe“. *Schweiz. med. Wschr.* **90**, 1458 (1960). — [10] HANICKI, Z., J. HAWIGER, P. HIRSZEL, and Z. TWARDOWSKI: On some aspects of the antibody deficiency syndrome. *Acta med. pol.* **2**, 229 (1963). — [11] ETHRIDGE, L.: Protein-losing enteropathy. *Med. Clin. N. Amer.* **48**, 75 (1964). [12] JEEJEBHOY, K.: Hypoanabolic hypoalbuminaemia in gastro-intestinal disease. *Brit. med. J.* **1964 I**, 30. — [13] ELIOTT, D.: Protein-losing gastroenteropathy. *Amer. J. Gastroent.* **38**, 536 (1962). — [14] KLUTHE, R., H. LIEM u. D. NUSSLIÉ: Enteraler Plasmaeiweißverlust („Proteindiarrhoe“) beim nephrotischen Syndrom. *Klin. Wschr.* **41**, 15 (1963). — [15] MARTINI, G., W. DÖLLE u. F. PETERSEN: Die exsudative Gastroenteropathie, ein polyätiologisches Syndrom. *Internist (Berl.)*

4, 197 (1963). — [16] MERTZ, D., R. KLUTHE u. H. SARRE: Schwere Erwachsenenmukoviscidose mit Proteindiarrhoe. *Med. Klin.* **57**, 1859 (1962). — [17] NUSSLIÉ, D., S. BARANDUN u. H. WITSCHT: Déperdition intestinale de protéines plasmatiques chez l'enfant. *Helv. paediat. Acta., Suppl.* **10**, ad Vol. **16**, 1—79 (1962). — [18] POMERANTZ, M., and T. WALDMANN: Systemic lymphatic abnormalities associated with gastro-intestinal loss secondary to intestinal lymphangiectasia. *Gastroenterology* **45**, 703 (1963). — [19] WALDMANN, T.: Gastro-intestinal protein loss demonstrated by 51 Cr-labelled albumin. *Lancet* **1961 I**, 121.

Doz. Dr. med. Z. HANICKI
II. Med. Klinik der Med. Akademie
Dr. med. A. KOJ
Institut für Biochemie der Med. Akademie
Kraków (Polen) Wyspianskistraße 11

Bestimmung der Bindung von Trijodthyronin an Serumproteine mittels Dextran-Gel-Filtration^{*,**}

P. C. SCRIBA, R. LANDGRAF, H. G. HEINZE und K. SCHWARZ

II. Medizinische Klinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. Dr. G. BODECHTEL)
und Institut und Poliklinik für physikalische Therapie und Röntgenologie der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. H. von BRAUNBEHRENS)

Die Schilddrüse speichert Jod gegen einen Konzentrationsgradienten, um dieses zur Synthese der Schilddrüsenhormone zu verwenden. Diese Fähigkeit der Schilddrüse läßt sich mit dem ¹³¹Jod-Speicherungstest für die klinische Diagnostik erfassen. Man bestimmt dabei einmal die Jodspeicherungsfähigkeit als sog. Jodidphase und im weiteren Kurvenverlauf die sog. Hormonjodphase. Weitere Hinweise auf die Hormonabgabe der Schilddrüse an das Blut erhält man durch Messung des Gesamt-¹³¹Jods im Serum, oder genauer durch Ermittlung des proteingebundenen ¹³¹Jods. Da es noch keine einfachen Bestimmungsmethoden für die tatsächliche Hormonkonzentration im Blut gibt, mißt man diese indirekt mit der Bestimmung des proteingebundenen, nicht radioaktiven Jods (PB¹²⁷I). Als für die Schilddrüsenhormonkonzentration spezifischer gilt der Wert des butanolextrahierbaren stabilen Jods (BE¹²⁷I). Der ganz überwiegende Anteil der Schilddrüsenhormone liegt in proteingebundener Form vor, dennoch ist die Konzentration an freiem Hormon für die Wirksamkeit des Hormons entscheidend. Man hat daher Methoden eingeführt, die diese Bindungs- und Transportverhältnisse der Hormone für die Klinik näher analysieren lassen. Die Bestimmung der Bindung von in vitro zugesetztem L-Trijodthyronin-¹³¹Jod an Erythrocyten [1] und die in vitro-Bestimmung der Serumproteinbindung von zugesetztem L-Trijodthyronin-¹³¹Jod [2—5] haben als Laboratoriumsmethoden für die klinische Schilddrüsenfunktionsdiagnostik immer mehr an Bedeutung gewonnen.

In der vorliegenden Arbeit wird über ein Dextran-Gel-Filtrations-Verfahren berichtet, das erlaubt, im Serum von Patienten den proteingebundenen und den sog. freien Anteil an in vitro zugesetztem L-Trijodthyronin-¹³¹Jod zu bestimmen.

Abkürzungen. T₃, T₃-127 = L-Trijodthyronin-¹²⁷Jod (stabiles Nuklid); T₃^{*}, T₃-131 = L-Trijodthyronin-¹³¹Jod (instabiles Nuklid), no. = normal, PB¹²⁷I = Protein Bound ¹²⁷Iodine, BE¹²⁷I = Butanol Extractable ¹²⁷Iodine, IPM = Impulse pro Minute, DPM = Desintegrationen pro Minute, TSH = Thyroid Stimulating Hormone, \bar{x} = Mittelwert, σ = Standardabweichung (sigma), μ Ci = mikro Curie.

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

** Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. CARL KRAUSPE in Verehrung zum 70. Geburtstag gewidmet.

Methoden und Präparate

Dextran-Gel-Filtration: In einem Gesamtvolumen von 3 ml wurden 1,5 ml Serum mit 0,2 bis 0,4 μ Ci L-Trijodthyronin-¹³¹Jod in 0,01 m Natriumphosphat-Puffer pH 7,4 im Schüttelbad bei 37° C 15 min lang inkubiert. Von diesem Gesamtvolumen von 3 ml wurde nach Beendigung der Inkubation je 1 ml in ein Meßröhrchen zur Bestimmung der Gesamtaktivität gebracht und 1 ml zur Dextran-Gel-Filtration verwandt. Vorversuche hatten gezeigt, daß die Inkubationszeit von 15 min zur Equilibrierung der Trijodthyroninbindung bei weitem ausreicht [4] und daß die Untersuchungen mit ausreichender Reproduzierbarkeit bei Zimmertemperatur durchgeführt werden können. Mit ¹³¹Jod verseuchtes Serum (¹³¹Jodspeicherungsteste oder ¹³¹Jod-Behandlung) kann zum Abklängen der Radioaktivität wochenlang bei —15° C aufgehoben werden, ohne daß sich die Trijodthyroninbindungsverhältnisse im Serum ändern.

Standardsäulen ($h = 23$ cm, $d = 0,8$ cm) wurden mit 1,8 g Dextran-Gel (Sephadex G-25, fine, Perlforn), welches in 0,01 m Natriumphosphat-Puffer pH 7,4 1—2 Std gequellt war [6], gefüllt. Zur Vermeidung bakterieller Besiedelung der Säulen wurden diese täglich frisch bereitet. Die Säulen erhielten nach FLODIN [7] unten eine Schicht Glaswolle, darüber eine Schicht Glasperlen und darauf das Gel-Bett, dessen untere 5 cm durch Sedimentation bei verschlossenem Ausflußhahn eingefüllt wurden. Die Säulen erlaubten eine Durchflußgeschwindigkeit von ca. 1 ml/min. Vor der Dextran-Gel-Filtration wurden die Säulen mit 3 Gelbettvolumina 0,01 m Natriumphosphat-Puffer pH 7,4 gespült.

Von dem Inkubationsgemisch wurde jeweils 1 ml mit einer Pipette vorsichtig aufgetragen und dabei vermieden, daß die Oberfläche des Gels aufgewirbelt wurde. Nach Einsinken der Probe wurde zweimal mit 1 ml 0,01 m Natriumphosphat-Puffer pH 7,4 nachgewaschen und dabei die Säulenwand über dem Gel-Bett abgespült. Danach wurde ein Puffer-Vorratsgefäß (0,01 m Natriumphosphat-Puffer pH 7,4) an die Säule angeschlossen und bei einem Filtrationsdruck von ca. 1 m Wasser eluiert. In Vorversuchen fand sich bei Verwendung von 0,01 m Tris [Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan]-HCl-Puffer pH 7,4 an Stelle von Phosphatpuffer keine Veränderung der Serumproteinbindungsverhältnisse für Trijodthyronin.

Das Eluat der zu untersuchenden Proben wurde entweder mit einem automatischen Fraktionssammler (Chromatopart der Firma Bender & Hobein, München) in 1 ml-Fraktionen gesammelt, oder in graduierten Röhrchen bis zu einem Gesamtvolumen I von 13 ml aufgefangen. Diese letztere sog. Batch-Technik (Abb. 1) stellt eine wesentliche technische Vereinfachung dar. Dabei sind die Volumina so gewählt, daß die jeweils interessierenden Gipfel, nämlich proteingebundenes Trijodthyronin-¹³¹Jod = I. Gipfel und ¹³¹Jodid = II. Gipfel (Abb. 1) nicht getrennt erhalten wurden. Von dem Gesamtvolumen wurde jeweils 1 ml in Röhrchen des Fraktionssammlers pipettiert, welche ihrerseits in die benutzten Zählgeräte paßten, so daß sowohl für die Bestimmung der Gesamtaktivität (s. oben), wie bei Benutzung des Fraktionssammlers und bei

Anwendung der Batch-Technik gleiche Zählgeometrie garantiert war. Die Versuche zeigten, daß die Batch-Technik bezüglich der Genauigkeit der „Chromatopart“-Technik ebenbürtig ist.

Glaswaren, die mit ¹³¹Jod in Berührung kamen, waren vorher mit Kaliumjodidlösungen gesättigt worden; alle Glaswaren wurden mit Dichromatschwefelsäure und Aqua bidest. gespült. Die Nullwerte der Glaswaren wurden regelmäßig geprüft. Zur Messung der Radioaktivität wurde zunächst ein

¹³¹Jods an dem Gesamt-L-Trijodthyronin. ¹³¹Jod nach Gl. (2). ¹³¹Jodid in % der Gesamtaktivität =

$$\frac{\sum \text{IPM des II. Gipfels} \times 100}{\sum \text{IPM der Gesamtaktivität}} \quad (1)$$

proteingebundenes T₃-131 in % des Gesamt-T₃-131 =

$$\frac{\sum \text{IPM des I. Gipfels} \times 100}{\sum \text{IPM der Gesamtaktivität} - \sum \text{IPM des II. Gipfels}} \quad (2)$$

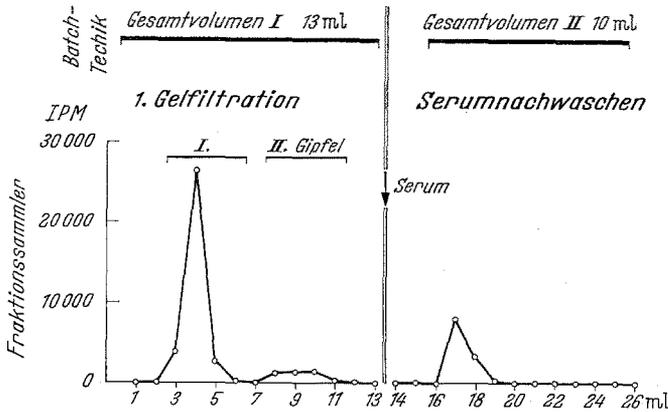


Abb. 1. Schematische Darstellung der Fraktionierung (Chromatopart) des Eluats und der Batch-Technik bei der Dextran-Gel-Filtration. Inkubation von Serum mit L-Trijodthyronin-¹³¹Jod, Dextran-Gel-Filtration, Serumnachwaschen der Säule, Messung der Radioaktivität und Berechnung wurden unter Methoden beschrieben. Die Abbildung zeigt im unteren Anteil einen typischen Versuch

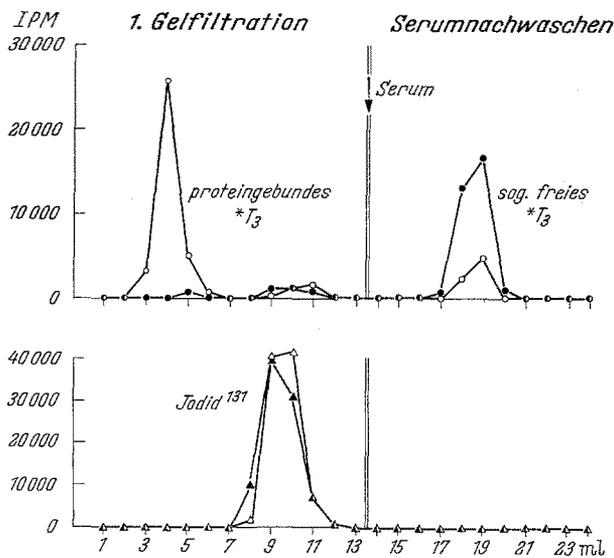


Abb. 2. Auftrennung des Inkubationsgemisches in proteingebundenes, sog. freies L-Trijodthyronin-¹³¹Jod und ¹³¹Jodid mittels Dextran-Gel-Filtration. Inkubation von Serum mit T₃-131 (○—○), Dextran-Gel-Filtration, Serumnachwaschen der Säule, Messung der Radioaktivität und Berechnung wurden unter Methoden beschrieben. In analoger Weise wurde die Dextran-Gel-Filtration von T₃-131 ohne Inkubation mit Serum (●—●) und von Na-¹³¹J-Lösung mit und ohne Inkubation mit Serum (▲—▲) bzw. (▲—▲) durchgeführt

Bohrlochkristall (h=45 mm, d=50 mm) und das Zählgerät (FH 49) der Firma Frieseke und Höpfer, Erlangen, benutzt. Dabei entsprach die Impulsausbeute (IPM) ca. 22% der DPM. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde als Zählgerät der automatische Probenwechsler der Deutschen Picker-GmbH verwandt. Gezählt wurde bei einer Impulsausbeute von 15%, der Null-Effekt betrug ca. 50 IPM; die Meßzeiten waren so gewählt, daß der statistische Fehler der Impulszählung in jedem Fall kleiner als 2% war.

Berechnung: Bei Verwendung des Fraktionensammlers wurden zwei Aktivitätsgipfel (Abb. 1 und 2), die durch ein fast aktivitätsfreies Intervall von 1 bis 2 Röhrchen getrennt waren, erhalten. Nach Abzug der Null-Effekte von den gemessenen Impulsraten berechnet sich der prozentuale Anteil des ¹³¹Jodid an der Gesamtaktivität nach Gl. (1) und der prozentuale Anteil des proteingebundenen L-Trijodthyronin-

Bei Anwendung der Batch-Technik wurden der I. und II. Gipfel (Abb. 1) in dem Gesamtvolumen I von 13 ml zusammen eluiert und von diesem Gesamtvolumen eine 1 ml-Probe gezählt. Die gemessenen IPM mußten daher nach Abzug des Null-Effektes mit der Zahl 13 multipliziert werden. Der für jeden Versuchstag mit Hilfe der „Chromatopart“-Technik ermittelte Anteil des II. Gipfels an der Gesamtaktivität ist eine über jeweils mindestens 24 Std konstante Größe, wie in Vorversuchen gezeigt wurde. Durch Multiplikation des so ermittelten prozentualen Anteils von ¹³¹Jodid an der Gesamtaktivität [Gl. (1)] mit der in allen weiteren Versuchen eines jeden Tages eingesetzten Gesamtaktivität errechnen sich die tatsächlichen Impulsraten aller II. Gipfel. Bei Subtraktion dieser berechneten Impulsraten der II. Gipfel von der gemessenen Aktivität der Gesamtvolumina I (Abb. 1) erhält man die Aktivität (Σ IPM) der I. Gipfel (= proteingebundenes L-Trijodthyronin-¹³¹Jod). Die Berechnung des prozentualen Anteils von L-Trijodthyronin-¹³¹Jod an dem gesamten zugesetzten L-Trijodthyronin-¹³¹Jod erfolgte dann wieder nach Gl. (2). — Nach Beendigung der 1. Gel-Filtration (Abb. 1) kann man durch Nachwaschen der Säulen mit Normalserum (s. unten) den an Dextran-Gel gebundenen, sog. freien Anteil des Trijodthyronin-¹³¹Jods eluieren. Die Berechnung des sog. freien Anteils des L-Trijodthyronin-¹³¹Jods an dem gesamten zugesetzten T₃-131 erfolgt in analoger Weise nach Gl. (3): sog. freies T₃-131 in % des Gesamt-T₃-131 =

$$\frac{\sum \text{IPM des Gesamtvolumens II} \times 100}{\sum \text{IPM der Gesamtaktivität} - \sum \text{IPM des II. Gipfels}} \quad (3)$$

Die Summe von sog. freien T₃-131 und proteingebundenem T₃-131 lag bei allen durchgeführten Versuchen bei 100 ± 6,17% (Mittelwert ± Streuung, $\bar{x} \pm \sigma$). Die in Prozent des zugesetzten radioaktiven Trijodthyronins angegebenen Anteile an sog. freien und proteingebundenem T₃-131 müssen bei Addition nicht 100% ergeben, da sie unabhängig voneinander ermittelt wurden. Aus diesem Grunde haben wir auch auf die Bildung eines Quotienten aus dem Verhältnis von sog. freien zu proteingebundenem T₃-131 verzichtet.

Bestimmung des proteingebundenen Jods (PB¹²⁷I) nach BARKER⁷

Zur alkalischen Fällung der Serumproteine wurde je 1 ml Serum in hitzestabilen Zentrifugengläsern mit 7 ml Aqua bidest., 1 ml 10%iger Zinksulfatlösung und 1 ml 0,5 n NaOH versetzt. Nach Zentrifugation (10 min bei 1800 × g) wurde das Sediment dreimal mit je 10 ml Aqua bidest. gewaschen und schließlich mit 1 ml 4 n Natriumcarbonatlösung vermischt. Die zum Umrühren eines jeden Sediments benutzten Glasstäbe wurden mit den letzten 0,2 ml Natriumbicarbonatlösung abgespült. Anschließend wurden die Zentrifugengläser über Nacht in einen Trockenschrank (90° C) gestellt. Am nächsten Tag erfolgte die Veraschung der getrockneten Rückstände im Muffelofen bei 600° C für 2 1/2 Std bei ausreichender Sauerstoffzufuhr. Die veraschten Rückstände wurden durch langsamen Zusatz von je 4 ml eines Gemisches von (1:1) 7 n H₂SO₄ und 2 n HCl und von 4 ml Aqua bidest. sehr sorgfältig aufgenommen. Vorversuche mit radiojodmarkiertem Trijodthyronin und Thyroxin hatten gezeigt, daß die Höhe der Jodausbeute von diesem Schritt ganz wesentlich abhängt. Nach 10 min Zentrifugieren (1800 × g) wurden je 4 ml des sauren Extraktes entnommen und mit 0,5 ml 0,1 n Natriumarsenitlösung (Firma Merck) versetzt. Nach 3minütigem Temperatenausgleich im Wasserbad (37° C) wurden den Proben fortlaufend alle 10 sec 0,5 ml einer 0,02 n Cer-Ammonsulfat-Lösung [Ce(SO₄)₂ · 2 (NH₄)₂SO₄] zugesetzt und die Reagenzgläser sofort kräftig umgeschüttelt. Nach 12 min Inkubation bei 37° C wurde die Extinktion der Proben bei 405 nm fortlaufend alle 10 sec im Photometer Eppendorf ohne Kompensationsschaltung gemessen. Zu jeder Bestimmung wurde eine Eichkurve mit Kalium-

jodid angefertigt, wofür je 1 ml Aqua bidest., bzw. Kaliumjodid-Standard (Blindwert, bzw. 0,02 bis 0,1 μg Jodid/ml) mit 1 ml 2 n Natriumcarbonatlösung und 2 ml des Gemisches von 7 n H_2SO_4 und 2 n HCl (1:1) versetzt wurden und an diesen 4 ml die Jodbestimmung, wie für die unbekanntenen Proben beschrieben, durchgeführt wurde. Die Standardlösungen wurden alle 14 Tage erneuert. Aus den Extinktionswerten der unbekanntenen Proben läßt sich durch Vergleich mit der Eichkurve, die auf semilogarithmischem Papier eine Gerade darstellt, auf die vorhandene Jodkonzentration schließen. Der erhaltene Wert wird mit 200 multipliziert, um das PB^{127}I wie üblich in $\mu\text{g}\%$ angeben zu können.

Das zu untersuchende Serum kann ohne Veränderung des PB^{127}I -Wertes tagelang bei -15°C aufbewahrt werden. Die Streubreite der Einzelwerte der untersuchten Proben erfordert eine Dreifachbestimmung zur Ermittlung eines jeden PB^{127}I -Wertes. Bei der hohen Empfindlichkeit der Methode ist diese gegen Jodverunreinigungen extrem anfällig. Es empfiehlt sich aus diesem Grunde, diese Bestimmung in einem eigens zu diesem Zweck reservierten Laborraum durchzuführen. Als Suchmethode zum Nachweis einer Jodverunreinigung, z.B. in Reagenzien, hat sich bei uns ein spot-test mit Besprühen des Filterpapiers mit 1%iger Palladiumchlorid-Lösung bewährt. Liegt Jodid vor, so entsteht ein dunkelbrauner Fleck. — In manchen Fällen kann es zweckmäßig sein, die durch Jod katalysierte Reduktion des gelben Ce^{IV} zum farblosen Ce^{II} durch Natriumarsenit [8, 9] mittels Zusatz von 0,5 ml 5% iger Bruzinsulfatlösung in 5%iger H_2SO_4 nach Ablauf der Inkubationszeit von 12 oder 15 min zu unterbrechen. Der entstehende orange-rötliche Farbkomplex ist 20 bis 40 min nach Zusatz des Bruzinsulfats relativ stabil. Die nach dieser Modifikation ermittelten Eichkurven und die PB^{127}I -Werte stimmten bei 30 untersuchten Seren mit den nach üblicher Technik ermittelten Werten gut überein. Gegenüber der im vorangehenden beschriebenen Technik erbringt diese Modifikation jedoch keinen Zeitgewinn.

Statistische Methoden. Die Berechnung von Mittelwerten (\bar{x}) und der Standardabweichung = Varianz (σ) erfolgte nach üblichen statistischen Methoden. Als Normalbereiche gelten Toleranzbereiche ohne Vertrauenswahrscheinlichkeit [10].

Präparate. *L-Trijodthyronin- ^{131}J* ($\text{T}_3\text{-}^{131}\text{J}$) wurde als Thybon®- ^{131}J von den Farbwerken Hoechst, Frankfurt am Main, in sterilisierter, pyrogenfreier Propylenglykol-Wasser (1:1)-Lösung bezogen. Die spezifische Aktivität betrug 30 mCi ^{131}J /mg Trijodthyronin und die Trijodthyroninkonzentration durchschnittlich 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Von dieser Lösung wurde eine Verdünnung mit 0,06 m Natriumphosphatpuffer pH 7,4 (1 μCi ^{131}J /ml und 0,02 bis 0,04 μg Trijodthyronin/ml) hergestellt und im Bleimantel im Eisschrank aufgehoben. Die Angaben der Firma, daß das Trijodthyronin in 3' Stellung mit Jod-131 markiert und etwa jedes fünfhundertste Molekül Trijodthyronin radioaktiv markiert sei, wurden ohne weitere Verifizierung akzeptiert. Die Haltbarkeit der Lösungen ist einmal durch Abspaltung von ^{131}J aus dem *L-Trijodthyronin- ^{131}J* -Molekül (nach einer Woche ca. 5%), zweitens durch Desaminierung und radiochemischen Zerfall (in der ersten Woche 0 bis 5%) und drittens durch den Nuklidzerfall des Thybon®- ^{131}J begrenzt¹. Aus diesen Gründen wurden Thybon®- ^{131}J -Lösungen nur bis zu einem Alter von höchstens 9 Tagen verwandt. — Nichtmarkiertes *L-Trijodthyronin* ($\text{T}_3\text{-}^{127}\text{I}$) wurde von den Farbwerken Hoechst oder von der Fluka-AG, Buchs, SG bezogen. Bei der Herstellung wäßriger Lösungen von Trijodthyronin ist auf die schlechte Löslichkeit zu achten. *Dextran-Gel* wurde als Sephadex G-25 fine, Perleform, von der Firma Pharmacia, Uppsala/Schweden, bezogen. *L-Thyroxin- ^{131}J* und nichtmarkiertes *L-Thyroxin* wurden von den Farbwerken Hoechst erhalten.

Ergebnisse

Die Dextran-Gel-Filtration erlaubt aus dem Inkubationsgemisch von radioaktiv markiertem Trijodthyronin und Serum das proteingebundene Trijodthyronin- ^{131}J , ^{131}J und das sog. freie Trijodthyronin- ^{131}J zu trennen (Abb. 1, 2, 3). Der erste nach dem Start der Gel-Filtration eluierte Gipfel der ^{131}J -Aktivität entspricht, wie aus Abb. 3 ersichtlich,

dem proteingebundenen Anteil des Trijodthyronins. Er wird parallel zu den Serumweißkörpern eluiert, die mit der von LOWRY [11] angegebenen Proteinbestimmung nachgewiesen wurden. Der dem ersten Aktivitätsgipfel folgende kleine zweite Radioaktivitätsgipfel entspricht dem ^{131}J , wie das durch parallele Chromatographie von Na^{131}J gezeigt wurde (Abb. 2). Natriumjodid passiert die Dextran-Gel-Säule mit der für Salze typischen Geschwindigkeit und wird also nach Passage des inneren und des Ausschlußvolumens des Gel-Bettes eluiert. Die Menge an ^{131}J im Radio-

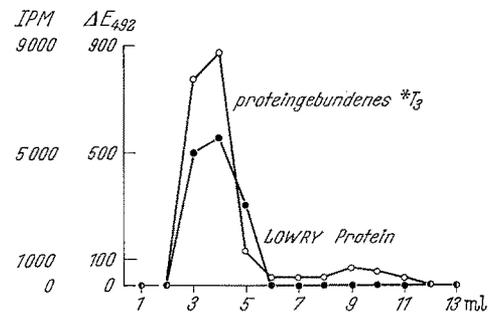


Abb. 3. Vergleich der Dextran-Gel-Filtration von proteingebundenem $\text{T}_3\text{-}^{131}\text{J}$ mit dem Elutionstyp der Serumproteine. Gleiche Serummengen (0,5 ml) wurden mit und ohne $\text{T}_3\text{-}^{131}\text{J}$ inkubiert. Dextran-Gel-Filtration, Bestimmung der Radioaktivität und der Proteinkonzentration nach LOWRY wurden unter Methoden beschrieben durchgeführt

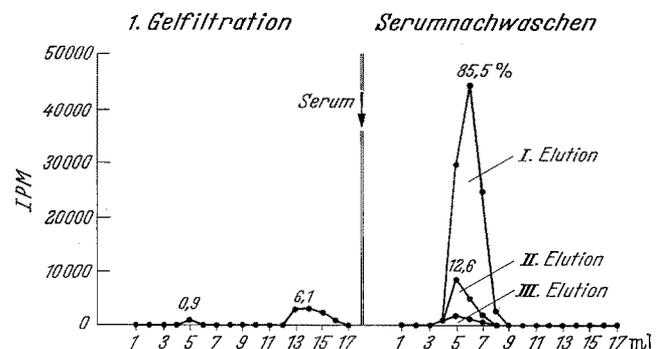


Abb. 4. Elution von Dextran-Gel-gebundenem $\text{T}_3\text{-}^{131}\text{J}$ durch Serumnachwaschen. 0,2 μCi $\text{T}_3\text{-}^{131}\text{J}$ wurden auf eine Dextran-Gel-Säule mit ca. 2,7 g Sephadex G-25, fine ($h = 27\text{ cm}$, $d = 0,8\text{ cm}$) aufgetragen und mit 0,01 m Natriumphosphatpuffer pH 7,4 eluiert. Das Eluat wurde in 17 1ml Fraktionen gesammelt. Anschließend wurde die Säule dreimal hintereinander mit jeweils 0,5 ml Serum gewaschen und noch dreimal je 17 1ml Fraktionen gesammelt (Elutionen I—III). Die Prozentzahlen geben die Menge der in den einzelnen Gipfeln enthaltenen Radioaktivität wieder

Thybon® war, während unserer sich über ein Jahr erstreckenden Beobachtungen, keineswegs bei allen Chargen vom Alter der Lösung abhängig [3].

Die zweiten Hälften der Abb. 1 und 2 zeigen, daß im Anschluß an die erste Gel-Filtration durch Nachwaschen der Säulen mit 2 ml eines gepoolten „Normalserums“¹² der sog. freie Anteil an Trijodthyronin- ^{131}J eluiert werden kann. In einem Vorversuch (Abb. 4) hatten wir gefunden, daß nach der Gel-filtration der üblicherweise den Inkubationen zugesetzten Menge an Trijodthyronin- ^{131}J in Abwesenheit des Serums über 90% des $\text{T}_3\text{-}^{131}\text{J}$ auf der Dextran-Gel-Säule zurückgehalten wurden. Schrittweise Elution mit jeweils 0,5 ml „Normalserum“ zeigte, daß nach der ersten Elution 85,5%, nach der zweiten Elution 98,1% und nach der dritten Elution 99,7% des auf die Säule gegebenen *L-Trijodthyronin- ^{131}J* im Eluat wieder gefunden waren. Daraus folgt, wie auch aus der Tatsache, daß in allen anderen Versuchen das auf die Säulen gegebene Trijodthyronin-

¹ Persönliche Mitteilung von Herrn FRÜHAUF, Farbwerke Hoechst, Frankfurt a. Main. Wir danken der Firma für die Überlassung dieser Information und für zur Verfügung gestelltes *L-Trijodthyronin- ^{131}J* .

^{131}Jod zu 100% (Mittelwert) wiedergefunden wurde (vgl. *Methoden*), daß durch Nachwaschen der Säulen mit Serum an Dextran-Gel gebundenes Trijodthyronin vollständig entfernt wurde. Die Methode des Nach-

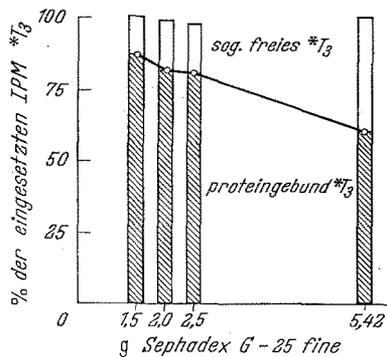


Abb. 5. Abhängigkeit der T_3 - ^{131}I -Proteinbindung von der Dextran-Gel-Menge in der Säule. Die Dextran-Gel-Filtration erfolgte auf Säulen gleichen Kalibers mit Variation der Dextran-Gel-Menge, wie auf der Abszisse angegeben. Inkubation von T_3 - ^{131}I mit Serum, Technik der Dextran-Gel-Filtration, Messung der Radioaktivität und Berechnung des Verhältnisses von sog. freien zu proteingebundenem T_3 - ^{131}I erfolgte wie unter *Methoden* beschrieben

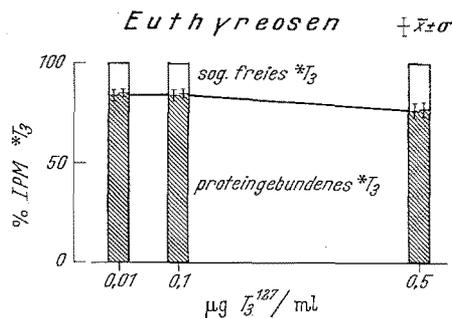


Abb. 6. Einfluß von zugesetztem L-Trijodthyronin- ^{127}Jod auf das Verhältnis von sog. freien zu proteingebundenem T_3 - ^{131}I bei euthyreoten Patienten. Dargestellt sind Mittelwerte von 27 Euthyreosen mit der Standardabweichung ($\bar{x} \pm \sigma$), links in jeder Säule für den proteingebundenen, rechts für den sog. freien, prozentualen Anteil an T_3 - ^{131}I . Die Gesamtkonzentration an Trijodthyronin (markiertes und nichtmarkiertes) ist auf der Abszisse angegeben

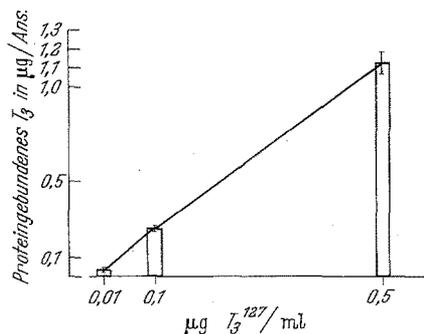


Abb. 7. Einfluß von zugesetztem L-Trijodthyronin- ^{127}Jod auf die Menge des proteingebundenen Trijodthyronins. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung ($\bar{x} \pm \sigma$) des proteingebundenen L-Trijodthyronins in μg pro Ansatz ($\Sigma V = 3 \text{ ml}$) von 27 euthyreoten Patienten. Die Menge des von 1,5 ml Serum proteingebundenen L-Trijodthyronins wurde aus der bekannten L-Trijodthyronin-Konzentration im Inkubationsgemisch und dem prozentualen Anteil des proteingebundenen T_3 - ^{131}I (Abb. 6) errechnet

waschens mit Serum ist demnach gut geeignet, die Dextran-Gel-Säulen zu regenerieren und wieder verwendbar zu machen. Das an Dextran-Gel gebundene Trijodthyronin kann auch durch alkalische Lösungen, wie z.B. Natronlauge eluiert werden [13].

Es ist vermutet worden, daß das Dextran-Gel als ein sog. Molekülsieb wirksam ist. Nach dieser Vorstellung sollen große Moleküle, wie Serumproteine und

somit auch das proteingebundene Trijodthyronin die Säulen schnell, d.h. in dem sog. Ausschlussvolumen passieren, während kleinere Moleküle, wie das „freie“ Trijodthyronin Eintritt in die Maschen des Dextran-Gel-Netzes finden und somit die Säule verzögert passieren [2, 6, 12, 14]. Dem widerspricht die Beobachtung (Abb. 5), daß die Menge des in den Säulen befindlichen Dextran-Gels einen Einfluß auf die Höhe der Anteile an sog. freien bzw. proteingebundenem Trijodthyronin hat. Mit zunehmender Größe des zu passierenden Gel-Bettes nimmt der Anteil an sog. freien Trijodthyronin, das ist der an Dextran-Gel gebundene Anteil an Trijodthyronin, zu, während der proteingebundene Anteil abnimmt. Es besteht also offensichtlich eine Konkurrenz von Dextran-Gel und Serumproteinen um das angebotene L-Trijodthyronin. Das Dextran-Gel ist also nicht nur als bloßes Molekülsieb wirksam, sondern verändert durch Adsorption von Trijodthyronin das Verhältnis von sog. freien zu proteingebundenem Trijodthyronin im Serum. Die Bezeichnung „freies“ Trijodthyronin wurde als nicht zutreffend aus diesem Grund von uns vermieden. Die Dimensionen der von uns ausgewählten Standardsäulen wurden nach Vorversuchen festgesetzt, welche gezeigt hatten, daß bei Verwendung von weniger als 1,5 g Sephadex G-25 fine die Trennung zwischen proteingebundenem L-Trijodthyronin- ^{131}Jod und $^{131}\text{Jodid}$ nicht ausreichend war. Auf die Problematik der Bestimmung des tatsächlichen „freien“ Anteils an Trijodthyronin wird in der Diskussion noch eingegangen.

Wie unter *Methoden* angegeben, wurde dem Inkubationsgemisch 0,2 bis 0,45 μCi L-Trijodthyronin- ^{131}Jod (= 0,004 bis 0,01 μg Trijodthyronin/ml) zugesetzt. Diese zugesetzte L-Trijodthyronin-Menge liegt in der Größenordnung der physiologischerweise vorhandenen L-Trijodthyronin-Konzentration im Serum und darf deshalb nicht als Spurendosis („tracer“) im strengen Sinn der Definition gelten. In sog. Verdrängungsversuchen haben wir diesem üblichen Inkubationsgemisch nichtmarkiertes Trijodthyronin zugesetzt, um Anhaltspunkte über die Gesamtbindungskapazität der Serumproteine für Trijodthyronin zu erhalten. Bei diesen Verdrängungsversuchen erfolgte die Inkubation also einmal mit „tracer“-Dosen, ferner mit 0,1 μg und schließlich mit 0,5 μg nichtmarkiertem Trijodthyronin (T_3 -127) pro ml (Abb. 6). Die Bestimmung des sog. freien und des proteingebundenen Anteils an Trijodthyronin- ^{131}Jod erfolgte wie üblich mit der Dextran-Gel-Filtration. Abb. 6 zeigt, daß mit steigender T_3 -127-Konzentration im Inkubationsgemisch der Anteil an proteingebundenem T_3 - ^{131}I langsam abnimmt und der Anteil an sog. freien T_3 - ^{131}I entsprechend zunimmt. Die Bedeutung dieser Befunde für die Schilddrüsenfunktionsdiagnostik wird in einer weiteren Mitteilung besprochen [15]. Berechnet man aus den gefundenen prozentualen Anteilen des proteingebundenen T_3 - ^{131}I und der bekannten Konzentration an T_3 -127 die tatsächlich proteingebundene Menge an Trijodthyronin pro Ansatz, so findet sich ein nahezu linearer Anstieg mit steigender Trijodthyroninkonzentration im Ansatz (Abb. 7). Vorversuche hatten bereits gezeigt, daß die Menge des proteingebundenen Trijodthyronins bei Zusatz von steigenden Mengen Trijodthyronin zum Inkubationsgemisch keineswegs asymptotisch einem Grenzwert zustrebt, wie das bei einer einfachen Sättigungskurve eines definierten

Tabelle 1. Bestimmung der proteingebundenen Trijodthyroninmenge mittels der Cer-Ammonsulfatmethode. Mit der unter „Methoden“ beschriebenen Jodbestimmung wurde die Menge des durch 1 ml Serum proteingebundenen Trijodthyronins, welches nach Inkubation von Serum in 1:2- bis 1:6-Verdünnung mit 0,005 m Phosphatpuffer pH 7,4 mit den angegebenen Trijodthyroninkonzentrationen und Dextran-Gel-Filtration auf Säulen mit 4,2 g Sephadex G-25 abgetrennt wurde, gemessen. Angegeben sind Mittelwerte und Extremwerte von 8 Versuchen

Trijodthyroninkonzentration (Millimikrogramm/ml) . . .	50	290	783
Inkubationsvolumen (ml) . .	2	2	6
Proteingebundenes Trijodthyronin (Millimikrogramm)	63 (46—80)	264 (217—335)	1550 (1096—2350)
Prozentualer Anteil des proteingebundenen Trijodthyronins . .	63 % (46—80 %)	53 % (43—60 %)	33 % (19—50 %)

Proteins zu erwarten gewesen wäre (Tabelle 1). Bei diesen Versuchen wurde nach Dextran-Gel-Filtration die proteingebundene Menge an Trijodthyronin mit der unter *Methoden* beschriebenen Jodbestimmung ermittelt. Diese Versuchsanordnung bot den Vorteil, daß man Trijodthyroninkonzentrationen und nicht nur prozentuale Verteilungen messen konnte, sie war jedoch zu ungenau und umständlich, um für die klinische Diagnostik, d. h. für die Bestimmung der Trijodthyroninbindung an Serumproteine benutzt werden zu können. Ferner war störend, daß nur etwa 41 % des in einer eingewogenen Trijodthyroninmenge befindlichen Jods mit der Cer-Ammonsulfat-Methode erfaßt wurden. Diese Schwierigkeit war auch BARKER [8] bei seinen Untersuchungen über den Jodnachweis in Papierchromatogrammen von Thyroxinanalogen aufgefallen.

Die Bestimmung des proteingebundenen Jods (PB^{127}I) mittels alkalischer Veraschung nach BARKER [7] ist ein jahrelang in die klinische Schilddrüsenfunktionsdiagnostik eingeführtes Verfahren. Es handelt sich um eine Modifikation von älteren Verfahren [16, 17]. Es ist technisch einfach und nach unserer Erfahrung ausgezeichnet reproduzierbar. Die Methode empfiehlt sich besonders bei einer großen Zahl von anfallenden PB^{127}I -Bestimmungen, wenn die Automation noch nicht zur Verfügung steht [18]. Wie unter *Methoden* bereits erwähnt, ist bei diesem Verfahren auf die gründliche Säureextraktion nach der Veraschung besonders zu achten. Versuche, bei denen ^{131}J -markiertes Thyroxin dem Serum von zwei euthyreoten Patienten vor der alkalischen Proteinfällung zugesetzt wurde, zeigten (Tabelle 2), daß 39,5 % der eingesetzten Radioaktivität in den zur Jodbestimmung verwandten 4 ml des sauren Extraktes der veraschten Proteinsedimente wiedergefunden wurden. Der Rest des Extraktes (4 ml) und die Asche enthielten die übrigen 60,5 % der Radioaktivität. Das zeigt einmal, daß das sorgfältige Umrühren bei Zufuhr des Säuregemisches zum veraschten Rückstand der die Jodausbeute bestimmende Schritt ist und daß bei der offenen alkalischen Veraschung (600° C) kein Jodverlust vom Thyroxin- ^{131}J entsteht. KUTZIM [19] hat berichtet, daß nach

Tabelle 2

Ausbeute an ^{131}J bei Zusatz von L-Thyroxin- ^{131}J zum Serum bei der PB^{127}I -Bestimmung mittels offener alkalischer Veraschung (BARKER). Erklärung s. Text. Angegeben sind Mittelwerte von je vier Bestimmungen in zwei Sera euthyreoter Patienten

I	Eingesetzte IPM	27 957	100 %
II	IPM in 4 ml „Säureextrakt“ .	11 012	39,5 %
III	IPM in den restlichen 4 ml Säureextrakt und Ascherückständen	17 729	63,5 %
IV	Summe IPM II + III	28 741	103 %

dieser Veraschung Na^{131}J vollständig wiedergefunden wurde. Bei der üblichen Verwendung von 4 ml Säureextrakt für die Jodbestimmung liegt die Ausbeute für das aus Thyroxin stammende Jod also bei $2 \times 39,5 \% = 79\%$. Dieser Wert² stimmt mit den in der Literatur, auch für die saure Veraschung mit und ohne Destillation, angegebenen Werten in etwa überein [16, 20]. — In entsprechenden Versuchen wurde dem Serum Trijodthyronin- ^{131}J zugesetzt. Dabei wurden von der eingesetzten Radioaktivität nur etwa 60 % im sauren Extrakt der veraschten Serumproteine wiedergefunden. Das ist möglicherweise der Ausdruck der gegenüber Thyroxin deutlich schwächeren Proteinbindung des Trijodthyronins im Serum [15].

Diskussion

Zum Studium der Transport- und Bindungsverhältnisse von Trijodthyronin im Serum sind eine ganze Reihe von Verfahren angegeben worden. Für die Klinik haben sich einerseits Methoden zur Bestimmung der Bindung von zugesetztem L-Trijodthyronin- ^{131}J an Erythrocyten und andererseits Verfahren, die die Bindung von Trijodthyronin an Serumproteine direkt oder indirekt messen, bewährt [1—4, 12, 21—25]. Die Methoden des L-Trijodthyronin- ^{131}J -Erythrocyten-Aufnahmetestes [1] und des L-Trijodthyronin- ^{131}J -Ionenaustauscherharz-Aufnahmetestes [22—25] wurden von uns selbst nicht mit dem von uns angewandten Verfahren der Dextran-Gel-Filtration zur Bestimmung sowohl des sog. freien, als auch des proteingebundenen Anteils an zugesetztem L-Trijodthyronin- ^{131}J verglichen. Wie RABINOWITZ u. Mitarb. zeigen konnten [2, 3], sind der Erythrocytenaufnahmetest und die Dextran-Gel-Filtrationsmethode bezüglich der Zuverlässigkeit und der Ergebnisse praktisch gleichwertig. Der Erythrocytenaufnahmetest ist mit gewissen Nachteilen, wie dem zeitraubenden Waschen der Erythrocyten, der Gefahr der Hämolyse und der Abhängigkeit der Ergebnisse vom Hämatokrit-Wert behaftet [26]. Er erlaubt ferner nicht, das freie ^{131}J -Jodid aus dem Reaktionsgemisch zu eliminieren. Demgegenüber bietet das Dextran-Gel-Filtrationsverfahren gewisse Vorteile: Die Methode ist nach unserer Erfahrung technisch einfacher [2, 3, 4, 12] und zeitsparender, vor allem dann, wenn die Batch-Technik neben der „Chromatopart“-Technik (vgl. *Methoden*) angewandt wird. Ein wesentlicher Vorteil liegt darin, daß das Verfahren die unabhängige Bestimmung des sog. freien und des proteingebundenen L-Trijodthyronin- ^{131}J erlaubt und die Möglichkeit zur Durchführung der Verdrängungsversuche bietet, welche den klinischen Wert der Methode erhöhen [15].

² Auch bei Verwendung von Jodo-trol®, Dade Reagents, Inc., lag die PB^{127}I -Ausbeute bei 80 %.

Mit der Methode der Dextran-Gel-Filtration mißt man keineswegs den physiologischerweise protein-gebundenen und „freien“ Anteil des Hormons. Wir haben daher die Bezeichnung „sogenannter freier“ Anteil an L-Trijodthyronin-¹³¹Jod gewählt. Es ist verschiedentlich behauptet worden [2, 14], daß bei diesem Verfahren das Dextran-Gel lediglich als Molekülsieb wirke und keine Kompetition zwischen Dextran-Gel und Plasmaproteinen um das zugesetzte L-Trijodthyronin bestünde. Die hier mitgeteilten Versuche (Abb. 5) zeigen dagegen, daß sich das reversibel gebundene L-Trijodthyronin kompetitiv zwischen Serumproteinen und Dextran-Gel verteilt [27]. Bei Säulen mit größerer Dextran-Gel-Menge ist deshalb auch der Anteil des „sogenannten freien“ L-Trijodthyronin-¹³¹Jods deutlich höher. Schätzt man die Werte für sog. freies bzw. proteingebundenes L-Trijodthyronin (Abb. 5) für gegen Null sinkende Dextran-Gel-Mengen, so erhält man Werte für sog. freies L-Trijodthyronin-¹³¹Jod von unter 5%. Die direkte Messung des Anteils an freiem L-Trijodthyronin durch Dialyse-Versuche³ zeigt, daß sogar weniger als 1% des gesamten L-Trijodthyronins in freier Form vorliegt. Es kann also kein Zweifel daran bestehen, daß das Dextran-Gel mit den Serumproteinen um das zugesetzte L-Trijodthyronin kompetiert und nicht als einfaches Molekülsieb wirksam ist. Die Bezeichnung „freies“ L-Trijodthyronin sollte daher bei Anwendung dieses Verfahrens sowie des Erythrocytenaufnahmetestes und auch des Resin-Aufnahmetestes vermieden werden. — Daß Dextran-Gel bei den beschriebenen Verfahren nicht nur als Molekülsieb wirksam ist, sondern Adsorptionsvorgänge für die Bindung des Trijodthyronins an Sephadex-G25 eine Rolle spielen, war schon aus dem Elutionstyp des Trijodthyronins zu schließen [6]. Wie oben besprochen, passiert Trijodthyronin die Dextran-Gel-Säulen erheblich langsamer, als z. B. Natriumjodid, ein Befund, der nicht allein durch die Molekülgröße der Verbindungen zu erklären ist.

Wir sind der Ansicht, daß man mit der Bestimmung des „freien“ Anteils an L-Trijodthyronin-¹³¹Jod einen physiologisch und auch pathogenetisch wichtigen Parameter der Schilddrüsenfunktion mißt. Es ist zur Zeit zwar noch nicht möglich, den tatsächlich physiologischerweise vorhandenen freien Anteil des L-Trijodthyronin zu bestimmen. Einerseits gilt nämlich, daß das bei dem Dextran-Gel-Filtrationsverfahren, ebenso wie bei dem Resin- oder Erythrocytenaufnahmetest, zugesetzte Trijodthyronin sich zwischen Serumproteinen und den mehr oder weniger physiologischen Akzeptoren kompetitiv verteilt. Andererseits besteht auch bei Dialyseversuchen kein physiologisches Verhältnis zwischen extracellulären sowie cellulären Bindungsstätten und wäßrigem Verteilungsmedium für Schilddrüsenhormone. Alle diese Verfahren haben ferner den Nachteil, daß radioaktiv markiertes L-Trijodthyronin in Mengen zugesetzt werden muß, die im Bereich der physiologischen Trijodthyroninkonzentrationen liegen. Man arbeitet also keineswegs mit einem „tracer“ im strengen Sinn der Definition. Es ist aber wohl doch möglich, Aussagen über die unterschiedliche Bindungsintensität von Trijodthyronin und Thyroxin zu machen. Vergleicht man die mittels Dextran-Gel-Filtration bestimmten Werte für „soge-

nanntes freies“ L-Trijodthyronin-¹³¹Jod (normal ca. 11 bis 19%) mit den Werten für „sogenanntes freies“ L-Thyroxin-¹³¹Jod (normal ca. 2 bis 3%), so findet man, daß der prozentuale Anteil an sog. freien T₃-¹³¹Jod etwa zehnmal so groß ist, wie derjenige an sog. freien T₄-¹³¹Jod [15]. Ein entsprechendes Verhältnis findet man bei Bestimmung des „freien“ Anteils der Hormone mittels Dialyseverfahren. Man weiß nun, daß die physiologische Aktivität eines Hormones von der Konzentration des nicht proteingebundenen Anteils abhängt. Man hat die Konzentration an freiem Hormon auch „Aktivität“ in Analogie zur Ionenaktivität der physikalischen Chemie genannt. — Es ist andererseits bekannt, daß die periphere L-Thyroxin-Konzentration mindestens zehnmal so hoch ist wie die des L-Trijodthyronins [46]. L-Thyroxin stellt somit den Hauptanteil der zirkulierenden Schilddrüsenhormone. Schließlich ist die Wirkung von L-Trijodthyronin auf den Basalstoffwechsel etwa achtmal stärker als die von L-Thyroxin [28]. Andere Autoren berichteten, daß bei Injektion von äquimolaren Mengen von L-Trijodthyronin und L-Thyroxin die erstgenannte Substanz eine raschere und stärkere Wirkung auf den Basalstoffwechsel hatte [29]. Es ist ja auch diskutiert worden, ob nicht L-Thyroxin erst an der 5' Stelle dejodiert werden müsse, ehe es seine Wirksamkeit entfalten kann [30]. Rechnet man alle diese Daten zusammen, so erkennt man, daß dem „freien“ oder auch dem „sogenannten freien“ L-Trijodthyronin eine wesentliche physiologische Bedeutung zukommen muß.

Für die Höhe des Anteiles an sog. freien L-Trijodthyronin im Serum ist im wesentlichen die L-Thyroxinkonzentration verantwortlich [21]. Es ist daher versucht worden, auf diesem Prinzip eine Bestimmungsmethode für die Thyroxinkonzentration im Serum aufzubauen [31, 32]. Dabei wird das in einem Probandenserum enthaltene Thyroxin alkoholisch extrahiert und die Verdrängung von an die Proteine eines gepoolten Normalserums gebundenem L-Trijodthyronin-¹³¹Jod nach Zusatz der unbekanntem Thyroxinmenge gemessen. Das von uns angewandte Verfahren bietet gegenüber dieser Methode, welche im übrigen sehr von der Vollständigkeit der alkoholischen Extraktion des L-Thyroxins aus dem Probandenserum abhängig ist, den Vorteil, daß die L-Thyroxin-Konzentration nicht bezüglich ihrer Wirkung auf die L-Trijodthyronin-¹³¹Jod-Bindung in einem gepoolten Normalserum, sondern für die tatsächlichen Proteinbindungsverhältnisse im Serum eines zu beurteilenden Patienten untersucht wird.

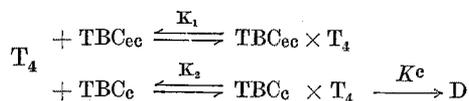
Das in steigender Konzentration dem Serum zugesetzte, nicht markierte L-Trijodthyronin führt zu einer je nach dem Schilddrüsenfunktionszustand [15] mehr oder weniger großen Verminderung des prozentualen Anteils des proteingebundenen L-Trijodthyronin-¹³¹Jods (Verdrängungsversuche). Theoretisch müßte mit Erhöhung der Konzentration eines Liganden (T₃) der prozentuale Anteil der proteingebundenen Form des Liganden sich asymptotisch einem Nullwert nähern [33]. Wird der Ligand jedoch von mehr als einem Protein gebunden und haben diese in verschiedener Konzentration vorliegenden Proteine unterschiedliche Affinität zu dem Liganden, so führt das zu einer erheblichen Abflachung der Asymptote, die sich jetzt nicht, oder nur bei sehr hoher Konzentration dem Nullwert zu nähern braucht. Bei der beobachteten

³ INGBAR, S. H.: Persönliche Mitteilung vorläufiger Ergebnisse (1965).

Kurve (Abb. 7) handelt es sich daher um die Resultante der Sättigungskurven verschiedener Proteine für den Liganden (T_3) einerseits und der Verdrängungskurven für kompetitiv gebundene Substanzen (z. B. T_4) andererseits. In dem von uns gewählten Bereich der L-Trijodthyronin-Konzentration nimmt dementsprechend der prozentuale Anteil des proteingebundenen L-Trijodthyronin- ^{131}J ods nur sehr langsam ab, während die Menge des proteingebundenen L-Trijodthyronin steil zunimmt (Abb. 6 und 7). Daraus kann man schließen, daß die Gesamtbindungskapazität der Serumproteine für L-Trijodthyronin mit den in den beschriebenen Verdrängungsversuchen angewandten Hormonkonzentrationen bei weitem nicht ausgenutzt war [34].

Die Bestimmung der Bindung von zugesetztem L-Trijodthyronin- ^{131}J od an Serumproteine läßt sich durch Anwendung der Zonenelektrophorese verfeinern. Durch diese Methode wird es möglich zu messen, wieviel L-Trijodthyronin- ^{131}J od an das thyroxinbindende Globulin (TBG) fixiert wird. Bei Zusatz von nicht markiertem L-Trijodthyronin (bis 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) erniedrigt sich der Anteil des an TBG gebundenen L-Trijodthyronin- ^{131}J ods. Dem entspricht, daß bei Zusatz von L-Thyroxin- ^{131}J od der an TBG gebundene Anteil bei Schilddrüsenüberfunktion erniedrigt und bei Schilddrüsenunterfunktion erhöht ist [35, 36]. — Papierelektrophoretische Auftrennung des Serums zeigt, daß sich das L-Thyroxin nicht nur an die spezifischen Proteine der Interalpha-Phase bindet, sondern auch die weniger spezifischen Präalbumine und Albumine mit L-Thyroxin beladen sind [37]. Bei der Untersuchung der Bindungskapazität des Serums für L-Thyroxin fand man [38] bei einer Konzentration von L-Thyroxin, die etwa das Zwei- bis Dreifache der normalen betrug, eine zunehmende Abwanderung des L-Thyroxins vom TBG zum Albumin und anderen Proteinen. Die Untersuchung der Bindung von Thyroxinanalogen an Albumin zeigte, daß die Bindung von D- und L-Thyroxin gleich stark war, also nicht stereospezifisch ist, und daß L-Trijodthyronin wesentlich schwächer gebunden wurde [39, 40, 41]. Die Affinität des L-Thyroxins zu den Serumproteinen ist absteigend vom thyroxinbindenden Globulin (TBG) über die Präalbumine (TBPA) zu den Albuminen zwei- bis sechsmal so groß wie für das L-Trijodthyronin (zit. nach [42]).

INGBAR und FREINKEL [43, 44] postulieren eine Reihe von Gleichgewichten zwischen „freiem“ L-Thyroxin, sowie T_4 -bindenden Proteinen und dem Hormonproteinkomplex. Die folgenden Gleichungen beschreiben die Gleichgewichte zwischen L-Thyroxin (T_4) und cellulären (TBC_c) sowie extracellulären (TBC_{ec}) thyroxinbindenden Komponenten (TBC) und den Komplexen von Thyroxin und thyroxinbindenden Komponenten andererseits.



Die Formel wird mit dem Ausdruck ($D = \text{Degradation}$) der Vorstellung gerecht, daß das cellulär gebundene Hormon zum Teil abgebaut wird. Man darf annehmen, daß das Maß der Beeinflussung des cellulären Stoffwechsels durch Schilddrüsenhormone von der Menge an cellulär gebundenem L-Thyroxin

($\text{TBC}_c \times T_4$) abhängig ist. Bei dem in dieser Arbeit beschriebenen Dextran-Gel-Filtrationsverfahren spielt das Dextran-Gel die Rolle der cellulären thyroxinbindenden Komponenten. Es imitiert somit die physiologischen Verhältnisse und stellt bei der Versuchsanordnung eine konstant gehaltene Größe dar.

Die Autoren danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für eine Sachbeihilfe (Sc 4/1+3). Frau D. SEIBERT und Frau E. SAMBAUER danken wir für ausgezeichnete technische Assistenz. Die in dieser Arbeit mitgeteilten Ergebnisse sind zum Teil der Dissertation von R. LANDGRAF entnommen [45].

Zusammenfassung. 1. Es wird eine Methode zur gleichzeitigen Bestimmung des sog. freien und des proteingebundenen Anteils von in vitro zugesetztem L-Trijodthyronin- ^{131}J od im Serum mittels Dextran-Gel-Filtration angegeben. In der beschriebenen Form ist diese Technik für die routinemäßige Anwendung in der Klinik zur Bestimmung der Bindungs- und Transportverhältnisse von Trijodthyronin geeignet.

2. In sog. Verdrängungsversuchen wurde nicht-markiertes Trijodthyronin dem Inkubationsgemisch von Serum und L-Trijodthyronin- ^{131}J od zugesetzt. Die zugesetzten Trijodthyroninmengen erschöpfen die Gesamtbindungskapazität der Serumproteine in dem gewählten Konzentrationsbereich keineswegs. Im Gegensatz zum Verhalten der prozentualen Anteile des sog. freien und des proteingebundenen Trijodthyronins steigt die absolute Menge des proteingebundenen Trijodthyronins dabei steil an. Man findet eine Kurve, die nicht einer einfachen Sättigungskurve entspricht, sondern eine Resultante aus Sättigungskurven verschiedener Trijodthyronin-bindender Proteine und Verdrängungskurven kompetitiv gebundener Substanzen (z. B. Thyroxin) darstellt.

3. Dextran-Gel wirkt nicht als einfaches Molekülsieb für Trijodthyronin. Es greift vielmehr durch Adsorptionsvorgänge kompetitiv in die Serumproteinbindungsverhältnisse des Trijodthyronins ein. Die physiologische Bedeutung des sog. freien Anteils an Trijodthyronin wird diskutiert.

4. Die Methode zur Bestimmung des proteingebundenen Jods (PB^{127}I) mittels alkalischer offener Veraschung (BARKER) wurde technisch vereinfacht und bezüglich ihrer Reproduzierbarkeit untersucht. Die ^{131}J odausbeute aus zugesetztem L-Thyroxin- ^{131}J od lag bei diesem Verfahren bei ca. 80%.

Summary. 1. A method allowing the simultaneous determination in serum of the so-called free and the protein bound part of L-triiodothyronine- ^{131}I added in vitro, using dextran gel filtration, is presented. Assessment of serum protein binding and transport of triiodothyronine can be conveniently performed for clinical purposes by this procedure.

2. In so-called discharge experiments non-labelled triiodothyronine is added to incubation mixtures of serum and L-triiodothyronine- ^{131}I . The amount of added triiodothyronine did not exhaust the total binding capacity of serum proteins for triiodothyronine. In contrast to the behaviour of the percentages of so-called free and protein bound triiodothyronine the absolute amount of protein bound triiodothyronine was rising linearly with rising concentrations of triiodothyronine added. The curve obtained was interpreted as resulting from saturation curves of different triiodothyronine binding proteins and discharge curves of competitively bound substances, e.g. thyroxine.

3. Dextran gel is not acting merely as molecular sieve for triiodothyronine, but rather competing actively with serum proteins for triiodothyronine, adsorbing the latter. The physiological rôle of the so-called free triiodothyronine is discussed.

4. With addition of L-thyroxine- ^{131}I 80% of ^{131}I iodine was recovered, when the method of BARKER for determination of serum protein bound ^{127}I iodine (open alkaline ashing) was used.

Literatur. [1] HAMOLSKY, M. W., M. STEIN, and A. S. FREEDBERG: The thyroid hormone plasma protein complex in man. A new in vitro method for study of „uptake“ of labelled hormonal compounds by human erythrocytes. *J. clin. Endocr.* **17**, 33 (1957). — [2] SHAPIRO, B., and J. L. RABINOWITZ: A chromatographic method utilizing Sephadex for the separation of free iodide, proteinbound and unbound triiodothyronine in sera. A) Clinical correlations with the Hamolsky T-3-RBC uptake method (108 cases). *J. nucl. Med.* **3**, 417 (1962). — [3] RABINOWITZ, J. L., B. SHAPIRO, and P. JOHNSON: „Sephadex chromatographic“ test in the evaluation of thyroid function. *J. nucl. Med.* **4**, 139 (1963). — [4] STUMPF, W., u. E. H. GRAUL: In-vitro-Bestimmung der Schilddrüsenfunktion mit dem Serum-T₃-Test. *Med. Klin.* **58**, 192 (1963). — [5] SCRIBA, P. C., H. G. HEINZE, R. LANDGRAF, K. W. FREY u. K. SCHWARZ: Untersuchungen über die Schilddrüsenfunktion mit Bestimmung des Verhältnisses von sog. freiem zu proteingebundenem Trijodthyronin im Serum mittels Dextran-Gel-Filtration. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* **71** (1965) (im Druck). — [6] FLODIN, P.: Dextran gels and their application in gel filtration. *Diss. Uppsala Sweden*, 1962. — [7] BARKER, S. B., M. J. HUMPHREY, and M. H. SOLBY: The clinical determination of protein bound iodine. *J. clin. Invest.* **30**, 55 (1951). — [8] BARKER, S. B.: Further studies on the ceric sulphate-arsenious acid reaction for the detection of various analogues of thyroxine. *Biochem. J.* **90**, 214 (1964). — [9] DUBRAVCIK, M.: Determination of iodine in natural waters. *Analyst* **80**, 295 (1955). — [10] DIEM, K.: *Documenta Geigy*. J. R. Geigy S.A., Basle, 1960, S. 146 ff. — [11] LOWRY, O. R., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. V. RANDALL: Protein measurement with the folin-phenol-reagent. *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951). — [12] CUARÓN, A., and M. E. FUCUGAUCHI: The binding of ¹³¹I-triiodothyronine by serum-proteins as an in vitro test of thyroid function. *Acta endocr. (Kbh.)* **46**, 161 (1964). — [13] LEE, N. D., R. J. HENRY, and O. J. GOLUB: Determination of the free thyroxine content of serum. *J. clin. Endocr.* **24**, 486 (1964). — [14] CUARÓN, A.: The in vitro uptake of ¹³¹I-triiodothyronine by erythrocytes and its binding by serum proteins. *Proc. Vth Internat. Thyroid Conference, Rome, 1965*, Abstr. 67. — [15] SCRIBA, P. C., H. G. HEINZE, R. LANDGRAF, K. W. FREY u. K. SCHWARZ: Klinische Bedeutung der Bestimmung der Bindung von Trijodthyronin an Serumproteine mittels Dextran-Gel-Filtration. *Klin. Wschr.* **43**, (1966) im Druck. — [16] BARKER, S. B.: Determination of protein bound iodine. *J. biol. Chem.* **173**, 715 (1948). — [17] SALTEE, W. T., and E. A. MCKAY: Iodine in blood and thyroid of man and small animals. *Endocrinology* **35**, 380 (1944). — [18] BENOTTI, J., and N. BENOTTI: Protein bound iodine, total iodine and butanol-extractable iodine by partial automation. *Clin. Chem.* **9**, 409 (1963). — [19] KUTZIM, H.: Die Bestimmung des eiweißgebundenen ¹²⁷Jods im Serum in Relation zum Radiojodtest. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* **70**, 916 (1964). — [20] SPITZY, H., M. REESE u. H. SKRUBE: Eine neue, einfache Jodbestimmung im Blutserum unter Anwendung der Isothermendiffusion. *Mikrochim. Acta* **4**, 488 (1958). — [21] SANTOS, M. A., and J. L. RABINOWITZ: L-Triiodothyronine binding to serum protein. Competition by thyroxine. *Proc. Soc. exp. biol. (N.Y.)* **115**, 901 (1964). — [22] HORSTER, F. A., u. E. KLEIN: Die Anwendung von radioaktivem Trijodthyronin zur Diagnostik der Schilddrüsenfunktion in vitro. *Dt. med. Wschr.* **89**, 983 (1964). — [23] GODDEN, D. J., and E. S. GARNETT: The ¹³¹I-Trijodthyronine resin-uptake test. *J. Endocr.* **29**, 167 (1964). — [24] STERLING, K., and M. TABACHNICK: Resin uptake of ¹³¹I-triiodothyronine as a test of thyroid function. *J. clin. Endocr.* **21**, 456 (1961). — [25] MITCHELL, M. L., A. B. HARDEN, and M. E. O'ROURKE: The in vitro resin sponge uptake of triiodothyronine-¹³¹I from serum in thyroid disease and in pregnancy. *J. clin. Endocr.* **20**, 1474 (1960). — [26] HA-

MOLSKY, M. W., A. GOLDETZ, and A. S. FREEDBERG: The plasma protein-thyroid hormone complex in man. III. Further studies on the use of the in vitro red blood cell uptake of ¹³¹I-1-triiodothyronine as a diagnostic test of thyroid function. *J. clin. Endocr.* **19**, 103 (1959). — [27] LANDGRAF, R., H. G. HEINZE, K. SCHWARZ, and P. C. SCRIBA: Clinical evaluation of determinations of free and serum protein bound triiodothyronine (dextran gel filtration). *Vth Acta Endocrin. Congr., Hamburg, 1965*. — [28] RAWSON, R. W., W. L. MONEY, R. L. KROC, KUMAOKA SOICHI, R. S. BENUA, and R. D. LEEFER: A dissociation of thyroid hormonal effect by structural alterations of the thyroxine molecule. *Amer. J. med. Sci.* **238**, 261 (1959). — [29] BLACKBURN, C. M., W. M. MCCONAHEY, F. R. J. KEATING, and A. ALBERT: Calorigenic effects of single intravenous doses of L-triiodothyronine and L-thyroxine in myxedematous persons. *J. clin. Invest.* **33**, 819 (1954). — [30] BARKER, S. B.: Peripheral actions of thyroid hormones. *Fed. Proc.* **21**, 635 (1962). — [31] MURPHY, B. E. P., and C. J. PATTEE: Determination of thyroxine utilizing the property of protein binding. *J. clin. Endocr.* **24**, 187 (1964). — [32] GOLD, A., B. E. P. MURPHY, and C. J. PATTEE: Evaluation of the diagnostic validity of a new method of serum thyroxine assay. *Proc. Vth Internat. Thyroid Conference, Rome 1965*, Abstr. 224. — [33] MURPHY, B. E. P.: Application of the property of protein-binding to the assay of minute quantities of hormone and other substances. *Nature (Lond.)* **201**, 679 (1964). — [34] FRIIS, T.: On the mechanism of the in vitro uptake of 1-triiodothyronine by human erythrocytes. *Acta endocr. (Kbh.)* **33**, 134 (1960). — [35] ALBRIGHT, E. C., F. C. LARSON, and W. D. DEISS: Thyroxine binding capacity of serum α -globulin in hypothyroid, euthyroid and hyperthyroid subjects. *J. clin. Invest.* **34**, 44 (1955). — [36] MITCHELL, M. L., A. H. BRADFORD, and S. COLLINS: Differences in the interaction of triiodothyronine-¹³¹I with serum proteins in vitro. *J. clin. Endocr.* **24**, 867 (1964). — [37] STERLING, K.: Thyroxine in blood. *Proc. Mayo Clin.* **39**, 586 (1964). — [38] ROBBINS, J., and J. E. RALL: Thyroxine-binding capacity of serum in normal man. *J. clin. Invest.* **34**, 1324, 1331 (1955). — [39] GREEN, M., and G. M. WILSON: Thyrotoxicosis treated by surgery or iodine-131. *Brit. med. J.* **1964 I**, 1005. — [40] STERLING, K.: Molecular structure of thyroxine in relation to its binding by human serum albumine. *J. clin. Invest.* **43**, 1721 (1964). — [41] STERLING, K., P. ROSEN, and M. TABACHNICK: Equilibrium dialysis studies of the binding of thyroxine by human serum albumin. *J. clin. Invest.* **41**, 1021 (1962). — [42] VANOTTI, A.: Beeinflussung der Radiojoddiagnostik durch extrathyreoidale Krankheitsprozesse und exogene Faktoren. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* **70**, 851 (1964). — [43] INGBAR, S. H., and N. FREINKEL: Regulation of the peripheral metabolism of the thyroid hormones. *Recent Progr. Hormone Res.* **16**, 353 ff. (1960). — [44] FREINKEL, N., S. H. INGBAR, J. T. DOWLING, and B. R. FINE: The influence of extracellular thyroxine-binding protein upon the accumulation of thyroxine by tissue slices. *J. clin. Invest.* **36**, 25 (1957). — [45] LANDGRAF, R.: Schilddrüsen-diagnostik unter besonderer Berücksichtigung der Bestimmung der Bindung von L-Trijodthyronin an Serumproteine mittels Dextran-Gel-Filtration. *Diss. Universität München*, 1966. — [46] KEJDERLING, W., u. D. EMEICH: Die papierchromatographische Auftrennung der ¹³¹Jod-Plasmaaktivität als differentialdiagnostisches Hilfsmittel bei Hyperthyreosen. *Dtsch. med. Wschr.* **85**, 747 (1960).

Dr. med. PETER C. SCRIBA
Priv.-Doz. Dr. med. K. SCHWARZ
II. Medizinische Klinik der
Universität München
8 München 15, Ziemssenstr. 1

Vergleichende Untersuchungen der endokrinen Drüsen und der Enzymaktivitäten bei Dystrophia myotonica und Myotonia congenita*

K. SCHIMRIGK, D. MATZELT † und H. G. MERTENS

Neurologische Klinik (Direktor: Dr. Dr. R. JANZEN) und dem Physiologisch-Chemischen Institut (Direktor: Prof. Dr. J. KÜHNAU) des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf

Wenige Jahre nachdem HOFFMANN (1896) [24] und nach ihm mehrere Autoren auf Muskelatrophien bei

* Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

der „Thomsenschen Erkrankung“ hingewiesen haben, grenzten STEINERT [49] und gleichzeitig BATTEN und GIBB [3] das Krankheitsbild der „Myotonia atrophica“ von der „Myotonia congenita“ ab. Hierbei wies