

Forschung, Wissenschaft

Diagnostica: Probleme aus der Sicht des Chemikers *

R. O. Studer

F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, CH-4002 Basel

Abstract

Diagnostics: Problems from the chemist's view point

Many diseases lead to qualitative and/or quantitative alterations of metabolic products in body fluids. Their determinations serve as additional tools for the physician to establish the diagnosis of a disease by confirming his clinical impression and as tools to monitor the applied therapy. The development of test systems (Diagnostics) having the appropriate sensitivity and specificity combined with economy is the field in which the chemist is faced with a great variety of challenging problems of multidisciplinary nature. Some of them are discussed using as examples an in vivo pancreatic function test and an in vitro test with potential usefulness for monitoring diabetic patients.

Die Identifizierung eines Krankheitsbildes (Diagnose) durch den Arzt erfolgt in der Regel schrittweise von der Frage nach den Beschwerden (Befragung oder Anamnese) über die direkte Krankenuntersuchung zu ergänzenden Untersuchungen von Körperflüssigkeiten (Blut, Urin, Speichel, Liquor etc.). Auf der so erarbeiteten Diagnose baut sich die Therapie auf, deren Überwachung wiederum zur Bestätigung bzw. Modifikation der Diagnose herangezogen wird. Die Untersuchung von Körperflüssigkeiten mit dem Ziel, einen besseren Einblick in den Stoffwechsel des gesunden und kranken Organismus zu erhalten, hat zur Erkenntnis geführt, dass die meisten Krankheiten mit qualitativen und quantitativen Veränderungen von Stoffwechselprodukten korrelieren. Die Entwicklung und Bereitstellung adäquater Testsysteme (Diagnostics) zur Erfassung solcher Veränderungen ist das Ziel der diagnostischen Forschung und stellt damit den Aufgabenbereich des in dieser Richtung arbeitenden Chemikers dar. Solche Tests erlauben dem Arzt, seine Sinne bis auf die molekulare Ebene auszudehnen und damit wesentliche zusätzliche Information für seine Entscheidung zu erhalten.

Zur Entwicklung diagnostischer Tests müssen relevante Substanzen, wie z. B. Enzyme, Hormone, Tumormarker etc., in der Regel aus geeigneten Quellen zuerst isoliert und charakterisiert werden, um anschliessend eine für sie geeignete Nachweismethode entwickeln zu können. Ist

eine solche dann vorhanden, muss je nach Art des Tests und des Indikationsgebietes eine kleinere oder grössere klinische Erprobung durchgeführt werden, um die Signifikanz, den Stellenwert und die praktische Handhabung in der Routine zu evaluieren. Vor einer Markteinführung müssen sich aus den Reihenuntersuchungen ergebende Änderungen vorgenommen sowie die Produktionsbedingungen und die Spezifikationen für die Qualitätskontrollen erarbeitet werden.

Während bereits vor ca. 2000 Jahren in Indien ca. 10 pathologische Harnarten, inklusive die diabetische Form, beschrieben und diagnostisch benutzt wurden, artete die Verwendung von Urin im Mittelalter in den Mystizismus der Harnschau aus. Erst basierend auf den Fortschritten, welche Chemie und Biologie mit dem Beginn des 19. Jahrhunderts erlebten, konnte eine chemische Harnanalyse entwickelt, in die Praxis eingeführt und zu breiter Verwendung gebracht werden. Bei dieser Entwicklung haben Berner Wissenschaftler eine wesentliche Rolle gespielt. Bereits im Dezember 1859 hat der Berner Arzt *Adolf Ziegler*, ein Schüler von *Heller* in Wien, der seinerseits ein Schüler von *Liebig* und *Wöhler* war, vor der Medizinisch-chirurgischen Gesellschaft des Kantons Bern einen Vortrag «über die praktisch verwertbaren Resultate der Harnanalyse» gehalten. Ihm, *Quincke* und insbesondere *Sahli* ist es zu verdanken, dass die Harnanalyse nicht nur verwissenschaftlicht wurde, sondern auch zur Verwendung beim praktischen Arzt gelangte [1, 2]. Mit der seit ca. 1950 beginnenden rapiden Entwicklung von Analysemethoden, die ein Vordringen in den Mikro- und Ultramikromassstab erlaubten, wurde die Harnanalyse durch die Blutanalyse überholt, wobei heute beide ihren Indikationsbereich haben. Das Vorantreiben der Techniken zur Gewebeentnahme ermöglicht zudem eine Ausdehnung der analytischen Methode auf Gewebe. Die enorme Zunahme der diagnostischen Tests in den letzten 2 Jahrzehnten, sowohl in ihrer Vielfalt als auch in ihrer Anzahl, ist auf die immer rascheren Entwicklungen auf dem gesamten Gebiet der Naturwissenschaften, vor allem Chemie, Biochemie, Molekularbiologie, Mikrobiologie und Immunologie, der Technik der Automation und Datenverarbeitung sowie der Medizin zurückzuführen. All diese Entwicklungen ha-

* Basierend auf einem Vortrag, gehalten am 10. 12. 1980 vor der Berner Chemischen Gesellschaft

ben die Erschliessung neuer Tests, die Standardisierung, die Vereinfachung der Testmethoden sowie die Automation ermöglicht (Tabelle 1).

Tabelle 1: Historischer Überblick einiger Entwicklungen

~ 400 v. Chr.	Urinanalyse z. B. diabetischer Harn Indien Schwangerschaft Ägypten
Mittelalter	mystische Harnschau
~ 1800 n. Chr.	Harnsäure Harnstoff Urin Proteine
~ 1900	Quantitative Blutanalyse
~ 1940	Steroidbestimmungen
~ 1950	Enzymbestimmungen Kolorimetrie Flammenphotometer Standard- bzw. Kontrollseren Immunodiffusion, Immunelektrophorese Analysatoren
~ 1960	Radioimmunoassays (RIA) Agglutinationstests Mikromethoden
~ 1970	Tumormarker Isoenzyme Profilanalysen Enzymimmunoassays (EIA) Hypothalamushormone Papierstreifen Automation (klin. Chemie, Immunologie)
~ 1980	Fluoreszenzimmunoassays (FIA) Lumineszenzimmunoassays (LuIA) Laser-Nephelometrie Automation der Bakteriologie Monoklonale Antikörper

Damit ein Test im Rahmen der Diagnose die notwendige zusätzliche Information liefert, muss er

- Individuen mit Krankheit identifizieren (Sensitivität)
- Individuen ohne Krankheit ausschliessen (Spezifität)
- ökonomisch sein, und
- mit möglichst geringer Belastung für den Patienten durchführbar sein.

Diese Anforderungen unterliegen einem immer stärker werdenden Trend zur behördlichen Kontrolle (Registrierung), wobei im Hinblick auf die enorme Zunahme der Gesundheitskosten die Frage nach Ökonomie und Belastung (z. B. ambulant versus Hospitalisierung) immer stärker ins Gewicht fällt. Diese zusätzlichen Probleme bilden jedoch meistens einen weiteren Anreiz bei der Entwicklung neuer bzw. beim Überarbeiten bereits vorhandener Tests.

Neben den diagnostischen Tests, welche ausserhalb des Körpers zur Untersuchung von Körperflüssigkeiten verwendet werden (in vitro Diagnostica), gewinnen in den letzten Jahren Substanzen bzw. Präparate, die in den menschlichen Körper gelangen müssen, um eine Diagnose zu stellen (in vivo Diagnostica), eine immer wichtigere Rolle (Tabelle 2). Diese Diagnostica werden ähnlich wie Pharmazeutika entwickelt und registriert.

Tabelle 2: Einteilung diagnostischer Tests

Diagnostica	
<i>in vitro</i>	Diagnostica, die zu diagnostischen Zwecken ausserhalb des Körpers verwendet werden (z. B. Blut, Speichel, Urin, Gewebe)
<i>in vivo</i>	Substanzen oder Präparate, die in den menschlichen Körper gelangen, um eine ärztliche Diagnose zu ermöglichen
	Substanzen, die keine Veränderung auslösen (z. B. Röntgenkontrastmittel)
	statische Tests (z. B. Radiojod)
	dynamische Tests mit dosisabhängiger Reaktion des Organismus (z. B. Insulin-, TRH-, LRH-Test)

Die vielfältigen Aufgaben, die sich einem Chemiker bei der Entwicklung diagnostischer Tests stellen, sollen nachfolgend an zwei Beispielen, die mit pathologischen Veränderungen der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) zusammenhängen, illustriert werden (Tabelle 3). Damit lassen sich die Entwicklung und Bedeutung eines *in vivo* sowie eines *in vitro* Diagnosticums, die Verwendung von Urin sowie die Verwendung von Blut als Testflüssigkeit

Tabelle 3: Funktionen des Pankreas

Pankreas	
endokrine Funktion	exokrine Funktion
<i>Hormone</i>	<i>Verdauungssaft</i>
Insulin	a) Wasser
Glucagon	Bicarbonat
	b) Verdauungsenzyme
	Proteasen
	Esterasen
	Carbohydrasen
	Nucleasen
Störung des Kohlenhydratstoffwechsels (Diabetes mellitus)	Verdauungsstörung

bzw. der Übergang von der Verwendung von Urin zu Blut zeigen. Gleichzeitig illustrieren sie Entwicklungen auf einem Gebiet, das einerseits wegen deutlicher Zunahme der Pankreaserkrankungen immer mehr an Bedeutung gewinnt, und auf dem es andererseits an genügend einfachen Tests für ein Screening mangelt.

Beginnen wir mit dem exokrinen Pankreas. Durch die Nahrungsaufnahme wird die Bauchspeicheldrüse angeregt, Wasser, Bicarbonat und Verdauungsenzyme bereitzustellen, um die Nahrung durch enzymatischen Abbau für eine nachfolgende Verwertung vorzubereiten. Dies wird verunmöglicht, wenn das Pankreas geschädigt ist, sei es durch chronische Entzündung, teilweise gutmütige Zerstörung oder Karzinom. Dies äussert sich in verminderter Abgabe von Enzymen, Bicarbonat und Wasser in den Darm. Bisher wurde mittels einer zu schluckenden Sonde unter Stimulation Duodenalsaft zur Analyse der Enzymaktivität, der Sekretmenge und des Gehaltes an Bicarbonat entnommen, ein Prozedere, welches Hospitalisierung benötigt und sowohl für Patient als auch für Personal unangenehm ist. Weniger aufwendig, jedoch mit anderen Nachteilen verbunden, sind die Bestimmungen von Chymotrypsin bzw. Fetten im Stuhl.

Die Vertiefung der Kenntnisse der Struktur und des Wirkungsmechanismus der Enzyme hat die Möglichkeit eröffnet, spezifische und für verschiedene Zwecke massgeschneiderte Substrate zu synthetisieren. Ein solches, für das Pankreasenzym Chymotrypsin spezifisches Substrat, das Peptid N-Benzoyl-L-tyrosyl-para-aminobenzoesäure, wurde 1972 von *Imondi* [3] zusammen mit ersten Erfahrungen zur sondenlosen Prüfung der exokrinen Pankreasfunktion beim Tier beschrieben. Nach oraler Einnahme wird das Peptid von Chymotrypsin im Dünndarm gespalten, para-aminobenzoesäure (PABA) freigesetzt, resorbiert, in der Leber teilweise metabolisiert und im Urin ausgeschieden. Die im Urin während eines bestimmten Zeitintervalls ausgeschiedene Menge PABA dient als Mass der exokrinen Pankreasfunktion. In Zusammenarbeit mit *Gyr et al.* [4] haben wir dieses Verfahren zu einem einfachen diagnostischen Test entwickelt. Für den Chemiker stellten sich vor allem drei Probleme, dasjenige der synthetischen Herstellung in grossen Mengen und in der Reinheit eines Pharmazeutikums, dasjenige der Erarbeitung der Kriterien für die Qualitätskontrolle und dann die Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der PABA. Während die beiden ersten Punkte zentral innerhalb der Firma durchgeführt und deshalb kontrolliert werden können, wird die Bestimmung der PABA dezentral durch die verschiedensten Laboratorien und Personen durchgeführt. Eine Methode muss daher möglichst einfach und narrensicher sein, um nicht durch quantitative Fehler zu einer verfälschten Diagnose zu führen. Nach der Methode von *Bratton-Marshall* in der Modifikation von *Smith* [5] wird die nach Hydrolyse von acylierten Metaboliten freigesetzte PABA mit Nitrit in das entsprechende Diazonium-Salz überführt und mit N-(1-Naphthyl)-äthylen-diamin zu einem stabilen Azofarbstoff gekoppelt, welcher im Pho-

tometer bei 546 nm gemessen wird. Diese Diazokupplung kann nun dadurch umgangen werden, dass man das bei der Aminosäure-Analyse verwendete Fluorescamin (FLURAM) [6] direkt mit dem Hydrolysat umsetzt (Abb. 1). Im Gegensatz jedoch zur Anwendung bei der

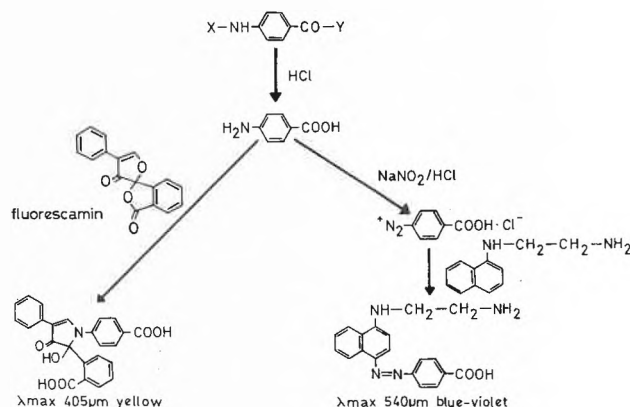


Abb. 1: Bestimmung von PABA

Aminosäure-Analyse erfolgt die Umsetzung nicht bei pH 8–9, sondern bei pH 3, wodurch im Urin vorhandene Amine nicht erfasst werden [7]. Da ferner in der Praxis Photometer wesentlich häufiger vorkommen als Fluorometer, wird nicht die starke Fluoreszenz der entstandenen Verbindung zur quantitativen Bestimmung benützt, sondern die Tatsache, dass sie bei 402 nm ein Absorptionsmaximum besitzt. Obwohl dadurch die Nachweisgrenze beeinträchtigt wird, ist sie für die angestrebten Bedürfnisse weitaus genügend. Die Korrelation mit der komplizierteren Methode von *Bratton-Marshall* ist ausgezeichnet. Durch diese Kombination konnte die Forderung nach einer einfachen Methodik erfüllt werden. Gleichzeitig hat sich nun aus den verschiedenen Elementen ein Suchtest für die exokrine Pankreasinsuffizienz ergeben, welcher die oben erwähnten Anforderungen an einen diagnostischen Test erfüllt. Der Patient nimmt mit einem Probefrühstück 1 g N-Benzoyl-L-tyrosyl-para-aminobenzoesäure ein, trinkt zur Sicherstellung einer genügenden Diurese Tee und sammelt über 6 Stunden den Urin zur Bestimmung der para-aminobenzoesäure (PABA). Ohne die Notwendigkeit einer Intubation des Duodenums wurden 86% aller chronischen Pankreatiden und 76% der Karzinome erfasst, womit eine gute klinische Sensitivität erreicht ist. Das gleiche gilt mit 93% für die Spezifität oder die Anzahl der gefundenen richtig normalen Tests [4]. Sollte es in einer weiteren Etappe gelingen, die ersten Ansätze einer Bestimmung von PABA im Blut breit zu untermauern, so könnte durch Wegfall der Urinsammlung sowie durch eine Verkürzung eine nochmalige Vereinfachung dieses Suchtests für die exokrine Pankreasinsuffizienz erreicht werden [8].

Die rapid zunehmende Kenntnis der Struktur und namentlich der aktiven Zentren von Enzymen hat es ermöglicht, dass auch eine Reihe anderer massgeschneiderter

Substrate entwickelt werden konnten, von denen einige langsam als Bestimmungsmethode in die *in vitro* Diagnostik eindringen. Oft jedoch, besonders wenn es sich um Enzymkaskaden wie z. B. bei der Blutgerinnung handelt, ist ihre Spezifität nicht absolut, so dass sie vorläufig noch nur mit Einschränkungen verwendet werden können [9]. Für das nächste Beispiel wollen wir uns dem endokrinen Pankreas zuwenden (Tabelle 3), dessen pathologische Veränderungen zur Zuckerkrankheit führen können. Durch die Therapie mit Insulin sowie auch mit den oralen Antidiabetica hat sich die Lebenserwartung des Diabetikers dem Nichtdiabetiker angenähert. Die Probleme der Diabetiker haben sich jedoch heute auf die Spätfolgen konzentriert, wobei vor allem Herz, Niere, Kreislauf und Augen betroffen sind. Diese Spätfolgen können durch eine konsequente Überwachung und Therapie weitgehend unter Kontrolle gehalten werden. Es zeigt sich immer deutlicher ein Zusammenhang dieser Spätfolgen mit dem Vorhandensein erhöhter Konzentrationen von glykosylierten Proteinen, insbesondere des Hämoglobins. Diese Glykosylierung des Hämoglobins erfolgt in Abhängigkeit von der Höhe des Blutzuckers während der ganzen Lebensdauer der Erythrocyten von ca. 120 Tagen, d.h., der Erythrocyt speichert im glykosylierten Hämoglobin (Hämoglobin A_{1c}) kumulativ das Blutzuckerverhalten. Im Gegensatz zur Blutzuckerbestimmung von Tag zu Tag, die eine Momentaufnahme ist, ermöglicht eine Bestimmung der glykosylierten Hämoglobine eine integrale Beobachtung. Die Strukturaufklärung von Hämoglobin A_{1c}, dem anteilmässig bedeutendsten in frischem Hämolysat (normalerweise 4–6 % des Gesamthämoglobins) hat ergeben, dass es sich um eine N-glykosidische Bindung von Glucose an die beiden N-terminalen Aminosäuren (Valin) der β -Ketten handelt [10, 11], (Abb. 2). Zur Bestimmung der glykosylierten Hämoglo-

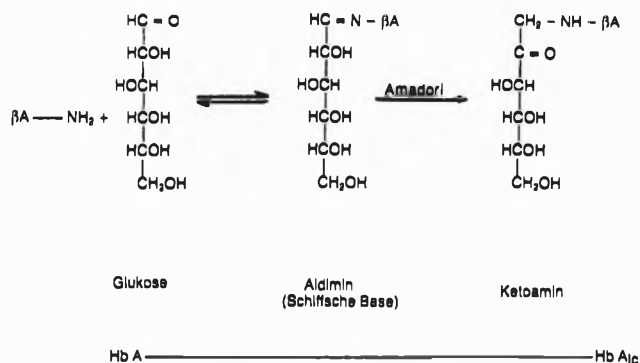


Abb. 2: Glykosylierung von Hämoglobin- β -Kette

bine bzw. des Hämoglobins A_{1c} sind eine Reihe von chromatographischen, elektrophoretischen und kolorimetrischen Methoden beschrieben worden, die jedoch für einen routinemässigen Gebrauch wenig geeignet sind. Da in der Praxis Photometer weit verbreitet sind, wurde zusammen mit Winterhalter eine von ihm früher beschriebene kolorimetrische Methode [11] so entwickelt, dass sie routinemässig auch in der Arztpraxis durchge-

Glykosylierte Proteine (Hb A_{1c}, Albumin etc.)

im Vollblut oder Hämolyat

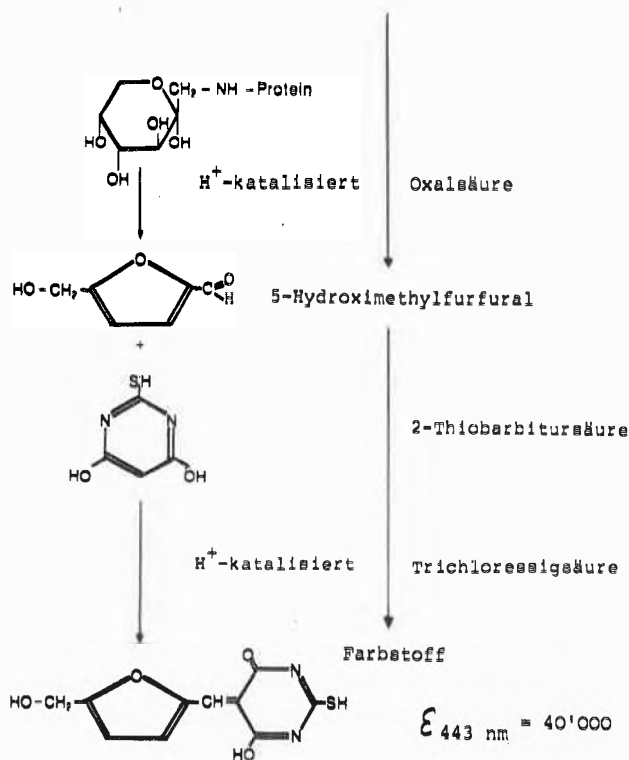


Abb. 3: Bestimmung von glykosylierten Proteinen

führt werden kann (Abb. 3). Durch Optimierung und Kombination der individuellen Schritte konnte eine Testmethode entwickelt werden, bei welcher 0,1 ml Vollblut während 3 Std. bei 99° mit 1,4 ml 0,4 M Oxalsäure erhitzt, anschliessend mit 1 ml 0,025 M Thiobarbitursäure in 20 % wässriger Trichlorsäure versetzt und der entstehende Farbkomplex nach 30 Minuten und Abtrennung der ausgefallenen Proteine bei 443 nm gemessen wird [12]. Da nun diese Methode dezentral in verschiedensten Laboratorien unter verschiedensten Bedingungen und mit wechselndem Personal durchgeführt wird, muss zur ständigen Überprüfung der Resultate, von denen ja das Therapieverhalten abhängt, eine interne Qualitätskontrolle ermöglicht werden. Dazu dient eine Reihe von Standardlösungen mit genau definiertem Gehalt an glykosyliertem Hämoglobin. Zu ihrer Herstellung wird Blut mit Glukose unter optimierten Bedingungen inkubiert, wobei Lösungen mit bis zu 20 % glykosyliertem Hämoglobin erhalten werden. Diese können nach genauer Gehaltsbestimmung durch verschiedene Methoden zum erwünschten Standard verdünnt werden. In einer klinischen Studie wurde diese vereinfachte Methode systematisch mit anderen Methoden verglichen und ihr Wert etabliert. Damit kann im Prinzip in der Arztpraxis die «mittlere» Blutzuckerhöhe der letzten 3–4 Monate abgeschätzt werden, was vor allem bei insulinabhängigen Diabetikern oder bei Diabetikern, die jeweils

erst kurz vor der zu erwartenden Blutzuckerbestimmung ihre Diät strikt eingehalten haben, wertvoll ist, da hier Einzelblutzuckerwerte nicht repräsentativ sind.

Gerade im Zusammenhang mit dem letzteren Beispiel, bei dem es sich um die Bestimmung eines modifizierten Proteins handelt, kommt immer mehr die Meinung auf, dass diese Art der chemischen Tests durch immunologische Methoden, z. B. radioimmunologische Tests [13], verdrängt wird, und dass damit die chemische Problematik im Rahmen der Diagnostik an Bedeutung verliert. Sie wurde insbesondere auch durch die rasante Entwicklung auf dem Gebiet der monoclonalen Antikörper gestärkt, weil es nun möglich ist, gegen bestimmte Domänen von Proteinen zielgerichtet Antikörper stets gleichbleibender Qualität herzustellen. Diese Ansicht jedoch ist nur bei oberflächlicher Betrachtung richtig, bei näherem Hinschauen zeigt es sich, dass sich für den Chemiker bei der Entwicklung analytischer Methoden auf diesem Prinzip ein weites und interessantes Tätigkeitsfeld öffnet.

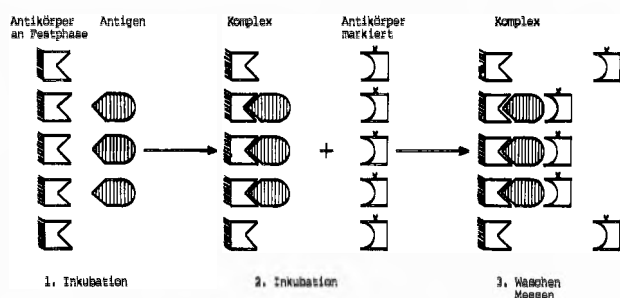


Abb. 4: Prinzip eines immunologischen Tests (Sandwich-Methode)

Einige der sich dem Chemiker stellenden Probleme können wir anhand des Sandwich-Prinzips (Abb. 4), einer sich immer mehr verbreitenden Methode, erläutern. Nach dieser Methode wird eine in einer Patientenprobe zu bestimmende Substanz (Antigen) von einem gegen sie gerichteten Antikörper, welcher an eine feste Phase (Reagenzglas, Küvette, Kugel, Partikel wie z. B. Sephadex etc.) gebunden ist, von andern Substanzen spezifisch getrennt. Die derart immobilisierte Substanz wird mit Hilfe eines zweiten gegen sie gerichteten Antikörpers, welcher meist eine radioaktive Markierung, z. B. I^{125} trägt, einer Messung zugänglich gemacht. Die gemessene Radioaktivität steht in direktem Zusammenhang mit der Konzentration der Substanz in der Patientenprobe. Aus Gründen des Umweltschutzes sowie aus Gründen der Logistik (Produktion, Versand, Haltbarkeit) werden immer imperativer Alternativen für die radioaktive Markierung gefordert. Solche werden zurzeit in Systemen gesucht, welche direkt oder indirekt durch Photometrie, Fluoreszenz, Lumineszenz oder Agglutination gemessen werden können. Wohl aus Gründen der weiten Verbreitung von Photometern sowie ihrer bereits erfolgten Automation ist die Verwendung von Enzymen zur Markierung der entsprechenden Antikörper am weitesten

fortgeschritten. Das grundlegende Problem ist die Herstellung einer kovalenten Bindung zwischen zwei Proteinen, einem mit enzymatischer Aktivität und einem mit immunologischer Aktivität, wobei das neue Molekül beide Aktivitäten möglichst unverändert besitzen muss. Wegen ihrer Wasserlöslichkeit und ihrer beschränkten Verträglichkeit mit organischen Lösungsmitteln (Denaturierung) einerseits, sowie der Vielzahl reaktiver Gruppen (wie z. B. Carboxyl-, Amino-, Hydroxylgruppen etc.) andererseits, sind die chemischen Kupplungsmethoden zur Herstellung geeigneter Konjugate eingeschränkt. Sind Polysaccharid-Seitenketten vorhanden (z. B. Meerrettich-Peroxydase), können sie zu Aldehyden aufoxydiert werden, welche mit Aminogruppen eines anderen Proteins (z. B. Antikörper) unter Bildung von Schiff-Basen reagieren, die anschliessend zur Stabilisierung reduziert werden [14]. Das für die Testdurchführung geeignete Konjugat wird von der Vielzahl der möglichen Konjugate durch Chromatographie abgetrennt. Neben der Beschränkung dieser Methode auf Systeme mit mindestens einem unter den Reaktionsbedingungen stabilen Glykoprotein als Partner, müssen die Reaktionsbedingungen, besonders im Hinblick auf die kontinuierliche Produktion grösserer Mengen bei kommerzialisierten Tests, individuell optimiert werden. Kovalente Bindungen können auch mit Hilfe bifunktionaler Reagenzien hergestellt werden [15]. Dabei handelt es sich um Verbindungen mit zwei verschiedenen funktionellen Gruppen. Verwendet man solche Reagenzien in einem Reaktionsschritt, d. h. durch Zugabe zu einem Gemisch der zu kuppelnden Proteine, besteht die Gefahr der Polymerisation. Doch auch im Falle einer Reaktion in 2 Stufen, d. h. zuerst Umsetzung des einen Proteins mit dem Reagens und anschliessend Reaktion mit dem zweiten Protein, werden in der Regel neben unveränderten Reaktionspartnern Konjugate mit variierender Stöchiometrie erhalten. Aus diesem Gemisch müssen Antikörper und Enzyme, welche nicht umgesetzt wurden, durch Chromatographie abgetrennt werden; die ersteren, weil sie die Empfindlichkeit des Tests reduzieren, die letzteren, weil sie den Leerwert des Tests in der Regel erhöhen. Das Konjugatgemisch kann in einem enzym-immunologischen Test [16] verwendet werden. Für eine universelle Anwendung sowie für eine kontinuierliche Produktion stets gleichbleibender Qualität wäre jedoch eine Kupplungsmethode erwünscht, welche reproduzierbar zu Konjugaten erwünschter Stöchiometrie führt. Hierin liegt noch ein weites und interessantes Betätigungsfeld für den Chemiker. Ähnlich ist es auch mit der Entwicklung von geeigneten Fluorophoren oder Luminophoren, mit welchen Proteine direkt markiert werden können, bzw. von Substraten, welche zur Bestimmung der Markierungsenzyme durch Fluoreszenz bzw. Lumineszenz geeignet sind. Im Prinzip haben alle diese Methoden das Potential, eine der radio-immunologischen Methode vergleichbare Empfindlichkeit im Bereich von 1 pg bis 1 ng zu erreichen.

Radio-immunologische Tests, welche nicht diese hohe Empfindlichkeit aufweisen müssen, können auch durch Agglutinationstests ersetzt werden. Schon seit längerer Zeit sind z. B. Schwangerschaftstests im Handel, welche das Vorhandensein von Choriongonadotropin (HCG) im Urin und damit eine Schwangerschaft nachweisen. Ihr Prinzip beruht darauf, dass Polystyrol-Latexpartikel mit über ihre Carboxylgruppen kovalent gebundenem HCG als Antigen durch Antikörper gegen HCG agglutiniert werden. Wenn im Urin HCG vorhanden ist, werden die Antikörper neutralisiert, so dass keine Agglutination erfolgt (Agglutinations-Hemmtest, indirekte Methode). Solche Tests liefern qualitative (Ja/Nein) oder bestenfalls semiquantitative Resultate. Mit der Entwicklung von Techniken, insbesondere der Laser-Technik oder der Messung der Extinktionszunahme pro Minute, wurde auch eine quantitative Erfassung mit einer Sensitivität im oberen Nanogramm-Bereich ermöglicht [17]. Für eine einfache Durchführung, besonders im Hinblick auf eine Automation, war es notwendig, die indirekte Methode in eine direkte Methode umzuwandeln, d. h., statt HCG den Antikörper gegen HCG kovalent an die Carboxylgruppen der Latexpartikel zu binden. Damit die immunologische Reaktivität voll erhalten bleibt, muss ähnlich wie bei den Enzym-Antikörper-Konjugaten für die enzym-immunologischen Tests die Reaktion unter möglichst schonenden Bedingungen vorgenommen werden, um inter- und intramolekulare Kondensationen zu vermeiden. Als besonders geeignet hat sich die Überführung der an der Oberfläche der Latexpartikel vorhandenen Carboxylgruppen mit Hilfe von wasserlöslichen Carbodiimiden in aktivierte Ester, die anschliessend mit dem entsprechenden Antikörper unter Ausbildung von Peptidbindungen reagieren. Mit Hilfe dieser unidirektionalen Methode gelingt es, eine ganze Reihe von verschiedenen Antikörpern kovalent unter Erhalt der immunologischen Aktivität zu binden. Die Produkte bilden sehr stabile Suspensionen, die bei Zugabe von geringen Mengen Antigen in kurzer Zeit agglutinieren [18].

Bei der Verwendung solcher Latex-Agglutinationstests in Serum oder Plasma wird jedoch gelegentlich eine Hemmung der Agglutination beobachtet, was zu falschen Interpretationen führen kann. Diese sind wahrscheinlich auf hydrophobe Interaktionen gewisser Serumproteine mit den Latexpartikeln zurückzuführen. Es wurde deshalb geprüft, ob Latexpartikel nicht vorgängig einer Reaktion mit den wertvollen Antikörpern mit einem inerten Protein beschichtet werden können, um sie der natürlichen Umgebung im Serum besser anzupassen. Als besonders geeignet erwiesen sich bovines Serumalbumin und Immunglobulin G, welche über die aktivierte Estermethode auf die Latexpartikel aufgezogen wurden. Für die Reaktion dieser Proteinschicht mit dem für den Test geeigneten Antikörper, z. B. anti-HCG, war wiederum die Erfahrung mit bifunktionellen Reagenzien von Vorteil. Als besonders geeignet erwies sich für diese Zwecke die Bisdiazobenzidin-2,2'-disulfonsäure [19].

Solche in Bezug auf Serum und Plasma «umweltfreundliche» Latexpartikel zeigten die erwartete verminderte Interferenz. Zusätzlich wurde auch gefunden, dass einige besonders empfindliche Proteine, welche bei direkter Kupplung an Latex ihre Aktivität verlieren, eine Bindung an diese modifizierten Partikel ohne Schaden überstehen. Damit erweitern sich die Möglichkeiten der Anwendung von Latex-Agglutinationen im Rahmen der Diagnostik.

Wie diese ausgewählten Kapitel zeigen, ist ein Chemiker auf diesem Arbeitsgebiet mit vielseitigen Problemen konfrontiert, die von reinen synthetischen Aufgaben auch Isolierungen und Charakterisierungen umfassen. Die Problemstellungen bringen ihn neben der Chemie mit den Gebieten der klinischen Chemie, der Biochemie, der Immunologie, in zunehmendem Masse auch der Mikrobiologie sowie der Medizin in Berührung. Zielsetzung ist immer das Erarbeiten einer analytischen Methode, die im Rahmen der Diagnostik relevant eingesetzt und im Routinebetrieb zuverlässig durchgeführt werden kann. Dies erfordert sowohl interdisziplinäre Interessen als auch Zusammenarbeit in einem Team, ohne die die vielschichtigen Aufgaben kaum zu lösen sind.

Literaturverzeichnis

- 1 H. Aebi: Schweiz. med. Wschr. 87 (1956) 549.
- 2 W. Hadorn: Schweiz. med. Wschr. 86 (1956) 694.
- 3 A. R. Imondi, R. P. Stradley und R. Wolgemuth: Gut 13 (1972) 726.
- 4 C. Lang, K. Gyr, P. Borer, L. Kayasseh und G. A. Stalder: Schweiz. med. Wschr. 110 (1980) 522.
- 5 H. W. Smith, N. Finkelstein, L. Aliminos, B. Crawford und M. Graber: J. Clin. Invest. 24 (1945) 388.
- 6 S. Udenfriend, S. Stein, P. Böhlen, W. Dairman, W. Leimgruber und M. Weigele: Science 178 (1972) 871.
- 7 D. Gillesen und W. Lergier: wird publiziert.
- 8 Ch. Wolf, C. Ehrig und H. Brunner: Schweiz. med. Wschr. 111 (1981) 343.
- 9 I. Witt: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15 (1977) 239.
- 10 H. F. Bunn, D. N. Haney, K. H. Gabbey und P. M. Gallop: Biochem. Biophys. Res. Commun. 67 (1975) 103.
- 11 R. Flückiger und K. H. Winterhalter: FEBS Lett. 71 (1976) 356.
- 12 B. E. Glatthaar: Tagung Hämoglobin A_{1c}-Bestimmung, München, 25./26. April 1980.
- 13 R. S. Yalow und S. A. Berson: J. Clin. Invest. 30 (1960) 1157.
- 14 P. Nakane und A. Kawaoi: J. Histochem. Cytochem. 22 (1974) 1084.
- 15 J. H. Kennedy, L. J. Kricka und P. Wilding: Clin. Chem. Acta 70 (1976) 1.
- 16 A. H. W. M. Schuurs und B. K. Van Weeman: Clin. Chim. Acta 81 (1977) 1.
- 17 H. Gallati: wird publiziert.
- 18 E. A. Fischer: wird publiziert.
- 19 I. H. Silman, M. Albu-Weissenberg und E. Katchalski: Biopolymer. 4 (1966) 441.