

Determinarea hormonilor tiroidieni L-T₄ si L-T₃ liberi din sange, utilizand un sistem bazat pe analiza secventiala si imunosenzori

Raluca-Ioana van Staden^{*}, Jacobus Frederick van Staden, Ionel Balcu, Marius Constantin Mirica si Nicolae Mirica

Laboratorul de Electrochimie din Bucuresti, Institutul National de Cercetare-Dezvoltare pentru Electrochimie si Materie Condensata Timisoara, Str. Splaiul Independentei Nr. 202, 060021, Bucuresti, Romania; e-mail: justinavanstaden@yahoo.com

Rezumat

Un sistem bazat pe analiza secventiala si imunosenzori a fost realizat in vederea determinarii hormonilor tiroidieni liberi L-T₄ si L-T₃ direct din probe de sange. Domeniile de concentratie in care pot fi utilizati sunt: 2.0 - 720.0 pmol/L si 2.0 - 340.0 pmol/L pentru L-T₄ si respectiv L-T₃, cu limite de detectie de 1.0 si respectiv 1.7 pmol/L. Selectivitatea imunosenzorilor si testele de determinare efectuate pentru L-T₄ si L-T₃ ($99.90 \pm 0.01 \%$ ($n = 10$) si respectiv $99.94 \pm 0.02 \%$ ($n = 10$)), au facut ca sistemul propus sa fie utilizat cu succes la determinarea acestor hormoni direct din probele de sange. Avantajele acestei metode fata de ELISA (metoda standard) sunt: simplitatea analizei, fiabilitatea crescuta a analizei, timpul scurt in care rezultatele sunt disponibile si costul extrem de redus – incomparabil cu acela necesar utilizarii metodei standard.

1. Introducere

Hormonii tiroidieni au un rol foarte important in organism. Sinteza hormonilor L-T₃ si L-T₄ necesita iod care este in mod normal asimilat din hrana¹. In organism exista un echilibru intre acesti hormoni controlat de TSH²⁻⁴. Dat fiind rolul acestor hormoni in organism, zilnic sunt recomandate de catre medici analize in special de L-T₄ si TSH. Metoda standard utilizata este foarte costisitoare, costul fiind datorat in special consumului mare de reactivi.

^{*}Autorul pentru corespondenta.

Literatura de specialitate recomanda pe langa metoda standard, ELISA, metode cromatografice (e.g., HPLC^{5,6}, LC-ICP-MS⁷, CZE⁸), radioimunoanaliza⁹⁻¹² si chemiluminescenta pentru determinarea L-T₄ si L-T₃ liberi. Senzorii amperometrici bazati pe L-AAOD au o selectivitate destul de mica atunci cand sunt utilizati pentru determinarea directa a acestor hormoni in sange¹⁴. Stefan a propus folosirea imunosenzorilor pentru determinarea acestor hormoni direct din sange^{15,16}; sensibilitatea si selectivitatea acestor imunosenzori face posibila utilizarea lor ca detectori in sisteme in flux pentru determinarea directa a lor in probele de sange.

In aceasta lucrare se propune un sistem de analiza secventiala avand ca detectori doi imunosenzori, unul pentru determinarea L-T₃-ului liber si altul pentru determinarea L-T₄-ului liber.

2. Parte experimentală

Design-ul senzorilor amperometrici. Solutia de anticorp a fost diluata cu tampon fosfat salin (0.01 mol/L, pH = 7.4, continand NaN₃ in concentratie de 0.1%). Pudra de grafit a fost lasata intr-un cuptor la 700°C pentru 15 s si racita la temperatura ambianta intr-un exicator. Uleiul de parafina si pudra de grafit au fost amestecate intr-un raport de 1:4 (m/m); la aceasta pasta s-a adaugat solutia de anti-L-T₄ (pentru imunosenzorul care determina L-T₄) sau anti-L-T₃ (pentru imunosenzorul care determina L-T₃) astfel incat procentul de anticorp din pasta finala sa fie 0.9% (m/m). Un varf de micropipeta a fost umplut cu pasta de grafit nemodificata (ulei de parafina si pudra de grafit) lasand in varf 3-4 mm pentru a fi umpluti cu pasta de grafit modificata cu anticorp. Diametrul senzorului astfel obtinut este de 3 mm. Contactul electric s-a obtinut cu ajutorului unui fir din Ag/AgCl care are si rol de electrod de

referinta intern. Solutia interna aleasa este de KCl 0.1mol/L. Cand nu se utilizeaza, imunosenzorii se pastreaza la 5°C.

Aparatura. Un PGSTAT 12 controlat printr-un software versiunea 4.9 a fost utilizate pentru toate masuratorile amperometrice. Un electrod din platina si unul de Ag/AgCl (0.1 mol/L KCl) au fost utilizati drept electrozi auxiliari si de referinta in celula electrochimica. Un Multiplexer module SCNR16A a fost conectat la PGSTAT-ul 12 pentru a putea determina sequential hormonii tiroidieni.

Sistemul de injectie secventiala (SIA)

Imunosenzorii au fost utilizati drept detectori in SIA asa cum se observa in Figura 1. Sistemul este compus din: o pompa peristaltica Gilson Minipuls; o valva cu 10 canale (Model ECSD10P, Valco Instruments, Houston, Texas). Tuburi de tygon (0.89 mm d.i.) au fost folosite pentru transportul lichidelor. O solutie de NaCl 0.1 mol/L a fost folosita pentru transport. Controlul sistemului a fost asigurat de un calculator printr-o interfata PC30-B (Eagle Electric, Cape Town, South Africa)¹⁷.

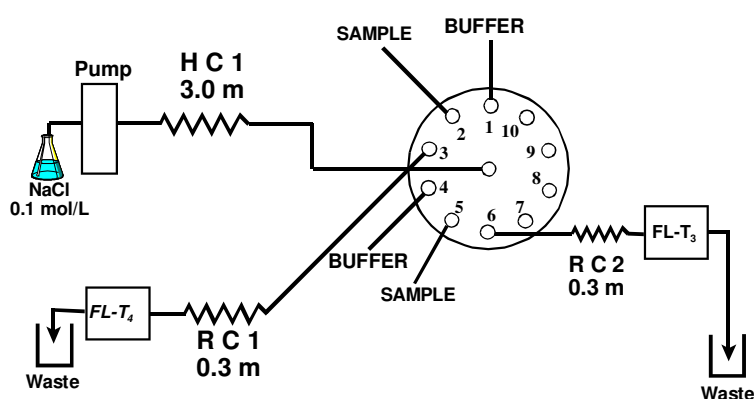


Figura 1. Sistemul SIA utilizat la determinarea simultana a hormonilor tiroidieni.

Procedeeul recomandat.

Amperometria directa.

Tehnica utilizata pentru amperometria directa a fost cronoamperometria, potentialele de lucru fiind +450 mV vs Ag/AgCl pentru determinarea hormonului L-T₄ si +650 mV vs Ag/AgCl pentru determinarea hormonului L-T₃.

Parametrii de operare a sistemului SIA

Viteza de curgere optima a fost 3.61 ml/min pentru toate solutiile. Consumul de proba si tampon este de 40 μ L. Capacitatea de analiza a sistemului este de 38 probe/h.

Rezultate si discutii

Raspunsul electrozilor

Ecuatiile de calibrare ale electrozilor sunt urmatoarele:

$$\text{L-T}_4: H = 1.21 + 0.33 c ; r = 0.9999; \langle H \rangle = \text{pA}; \langle c \rangle = \text{pmol/L}$$

$$\text{L-T}_3: H = 0.43 + 0.61 c ; r = 0.9999; \langle H \rangle = \text{pA}; \langle c \rangle = \text{pmol/L}$$

unde H este inaltimea picului si c este concentratia hormonilor L-T₄ sau L-T₃.

Domeniile lineare de concentratie in care se pot utiliza imunosenzorii sunt: 2.0 - 720.0 pmol/L pentru L-T₄ si 2.0 - 340 pmol/L pentru L-T₃. Limitele de detectie obtinute au fost: 1.0 pmol/L pentru L-T₄ si 1.7 pmol/L pentru L-T₃. Domeniile lineare de concentratie si limitele de detectie au demonstrat ca imunosenzorii propusi sunt adecvati pentru analiza secventiala a hormonilor tiroidieni.

Raspunsul imunosenzorilor a fost stabil si reproductibil timp de doua saptamani (DRS << 0.1% pentru sensibilitatea imunosenzorilor).

Selectivitatea imunosenzorilor

Selectivitatea imunosenzorilor a fost determinata utilizand metoda solutiilor mixte, fata de L-T₄, D-T₄, L-T₃, proteine si cationi anorganici de interes. Coeficientii amperometrici de selectivitate au fost calculati utilizand metoda propusa de Wang¹⁸. Pentru toate masuratorile, concentratia ionului interferent s-a ales sa fie de 4 ori mai mare decat a analitului. Tabelul 1 arata selectivitatea imunosenzorilor propusi fata de interferentii alesi. Proteinele si cationii anorganici cum ar fi Na⁺, K⁺, Ca²⁺ nu interfera in determinarea hormonilor tiroidieni.

Tabelul 1

Coeficientii amperometrici de selectivitate ai imunosenzorilor.

Interferentul (J)	L-T ₄	D-T ₄	L-T ₃
L-T ₄	-	11.10	7.43
L-T ₃	7.80	6.24	-

N=10

Aplicatii analitice

Imunosenzorii pot fi utilizat pentru detectia simultana a hormonilor tiroidieni intr-un sistem SIA. Rezultatele obtinute sunt prezentate in Tabelul 2.

Tabelul 2

Determinarea hormonilor tiroidieni in sange, utilizand imunosenzorii ca detectori intr-un sistem SIA si metoda standard folosita in laboratoarele de analiza.

L-T₄ (pmol/L)		L-T₃ (pmol/L)	
Imunosenzori/SIA	Metoda standard	Imunosenzori/SIA	Metoda standard
8.40	8.38	12.20	12.10
8.63	8.70	11.80	11.81
9.02	9.00	11.12	11.16
12.80	12.80	4.73	4.74
17.00	17.02	5.51	5.48
19.70	19.80*	2.44	2.47*
21.23	21.20	6.20	6.22
25.20	25.23	8.20	8.28
27.80	27.20	9.00	8.90

*Pentru aceasta proba TSH \ll 0.015.

Asa cum reiese din tabel, aceste rezultate sunt in concordanta cu acelea obtinute prin metoda standard de analiza utilizata in laboratoarele patologice. De asemenea, se poate observa ca imunosenzorii pot detecta atat hipo si hipertiroidismul cat si o functionare normala a glandei tiroide.

Concluzii

Principalele avantaje ale utilizarii imunosenzorilor intr-un sistem SIA pentru determinarea simultana a hormonilor tiroidieni liberi direct din sange sunt: posibilitatea determinarii hormonilor liberi direct din sange, fara o prelucrare prealabila a probelor de sange; 100 μ L de sange vor fi suficienti pentru analiza; consumul de reactivi este redus; informatia analitica

este fiabila; metoda propusa este simpla, rapida, usor de operat si foarte ieftina comparativ cu metoda standard utilizata in mod curent in laboratoarele patologice.

BIBLIOGRAFIE

1. Neal MJ. "Medical Pharmacology at a Glance", 2nd Edition, 1992, University Press, Cambridge.
2. Greenspan FS, Dong BJ. "Thyroid and Antithyroid Drugs" in "Basic and Clinical Pharmacology" (Katzung BG, Ed.), USA, 1989, Appleton & Lange.
3. Hay ID, Bayer MF, Kaplan MM, Klee GG, Larsen PR, Spencer CA. Clin Chem 1991; 37: 2002-8.
4. Lopez-Achigar E, Collazo C, Blanco R, Raymondo S. Supporting the cost-effectiveness of a thyroid testing algorithm. Clin Chim Acta 2000; 296: 213-5.
5. Samanidou VF, Gika HG, Papadoyannis IN. Rapid HPLC analysis of thyroid gland hormones tri-iodothyronine (T₃) and thyroxine (T₄) in human biological fluids after SPE. J Liq Chromatogr Relat Technol 2000; 23: 681-92.
6. Loun B, Hage DS. Characterization of thyroxine-albumin binding using high-performance affinity chromatography. II. Comparison of the binding of thyroxine, tri-iodothyronines and related compounds at the warfarin and indole sites of human albumin. J Chromatogr B, Biomed Appl 1995; 665: 303-14.
7. Simon R, Tietge JE, Michalke B, Degitz S. Iodine species and the endocrine system: thyroid hormone levels in adult *Danio rerio* and developing *Xenopus laevis*. Anal Bioanal Chem 2002; 372: 481-5.

8. Schmalzing D, Kountny LB, Taylor TA, Nashabeh W, Fuchs M. Immunoassay for thyroxine (T₄) in serum using capillary electrophoresis and micromachined devices. *J Chromatogr B, Biomed Appl* 1997; 697: 175-80.
9. van Blerk M, Smitz J, Rozenski E, Mees M, Roelandt P, Laermans L, Callewaert M, van Steirteghem AC. Four radioisotopic immunassays of free thyroxine compared. *Ann Clin Biochem* 1996; 33: 335-43.
10. Chomard P, Autissier N. Measurement of thyroid hormone in the rat thyroid gland by radio-immunoassay. *Anal Biochem* 1991; 192: 298-302.
11. Pillai MRA, Nagvekar UH, Desai CN, Mani RS. A simplified radio-immunoassay for tri-iodothyronine (T₃) using pre-incubated labelled antigen and antibody. *J Radioanal Nucl Chem* 1986; 102: 435-41.
12. Georgiou S, Christofidis I. Radioimmunoassay of free thyroxine (T₄) using 125I-labelled T₄-IgG complex with very large molecular weight. *Clin Chim Acta* 1996; 244: 209-20.
13. Christofides ND, Sheehan CP. Enhanced chemiluminescence labelled-antibody immunoassay (Amerlite-MAB) for free thyroxine: design, development, and technical validation. *Clin Chem* 1995; 41: 17-23.
14. Aboul-Enein HY, Stefan RI, Litescu S, Radu LG. Biosensor for the enantioselective analysis of the thyroid hormones (+)-3,3',5-triiodo-L-thyronine (T₃) and (+)-3,3',5,5'-tetraiodo-L-thyronine (T₄). *J Immunoassay & Immunochem* 2002; 23: 181-90.
15. Stefan RI, Aboul-Enein HY. The construction and characterization of an amperometric immunosensor for the thyroid hormone (+)-3,3',5,5'-tetraiodo-L-thyronine (T₄). *J Immunoassay & Immunochem.* 2002; 23: 429-37.

16. Aboul-Enein HY, Stefan RI, Radu GL, Baiulescu GE. The construction of an amperometric immunosensor for the thyroid hormone (+)-3,3',5-triiodo-L-thyronine (T₃). *Anal Lett* 1999; 32: 447-55.
17. Marshall GD, van Staden JF. Computer - aided flow - analysis for laboratory use and process analysis. *Anal Instrum* 1992; 20: 79-100.
18. Wang J. Selectivity coefficients for amperometric sensors. *Talanta* 1994; 41: 857-63.