

zirrrose. Wien. klin. Wschr. 78, (im Druck) (1966b). — SEARCY, R. L., L. M. BERGQUIST, and R. C. JUNG: Rapid ultramicro estimation of serum total cholesterol. J. Lipid. Res. 1, 349—351 (1960). — TROUT, D. L., E. H. ESTES jr., and S. J. FRIEDBERG: Titration of free fatty acids of plasma: A

study of current methods and a new modification. J. Lipid Res. 1, 199—202 (1960).

Prof. Dr. H. BRAUNSTEINER
Med. Univ.-Klinik
A 6010 Innsbruck, Österreich

ACTH-Bestimmungen im Plasma aus dem Bulbus cranialis venae jugularis*

P. C. SCRIBA, R. HACKER, P. DIETERLE, F. KLUGE, W. HOCHHEUSER und K. SCHWARZ

II. Medizinische Klinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. Dr. G. BODECHTEL)

Das venöse Blut gelangt aus dem Hypophysenvorderlappen im wesentlichen über den Sinus cavernosus und die Sinus petrosi in die Bulbi craniales der beiden Venae jugulares. Ausgangspunkt für unsere Untersuchungen war die Überlegung, daß man im Bulbus cranialis venae jugularis höhere ACTH-Aktivitäten erwarten sollte als in der Peripherie (Vena cubitalis). Der Bulbus cranialis venae jugularis ist beim Menschen relativ einfach zu punktieren, wie das z. B. zur Messung der Hirndurchblutung üblich ist [1, 2]. Es war zu klären, ob die mangelnde Empfindlichkeit und die relative Ungenauigkeit, welche die biologische Bestimmung von ACTH-Spiegeln im nativen peripheren Plasma immer noch belastet, durch die zu erwartende größere Höhe des ACTH-Gehalts im Plasma aus dem Bulbus cranialis venae jugularis auszugleichen wären.

Methoden und Präparate

Die biologische Bestimmung von ACTH erfolgte mittels der von LIPSCOMB und NELSON angegebenen Methode [3] mit einigen Modifikationen anderer Autoren [4—6].

Männliche Sprague-Dawley-Ratten (190—230 g) wurden auf parapharyngealem Wege in Avertin®-Narkose hypophysektomiert [7—10]. Die Vollständigkeit der Hypophysektomie wurde nach jeder ACTH-Bestimmung in üblicher Weise durch Inspektion der Schädelbasis von oben verifiziert. — In Urethan®-Narkose wurde zuerst von der linken Fossa inguinalis aus ein Katheter in die Aorta thoracica geschoben, dann von der linken Vena femoralis aus nach Laparotomie die linke Nebennierenvene schlüssig katheterisiert und schließlich ein Katheter in die rechte Vena iliaca geschoben (Abb. 1). Nach den ACTH-Bestimmungen wurde die Lage der Katheter kontrolliert. Der Aortenkatheter lag sicher oberhalb des Abganges der Nebennierenarterien [11]. Alle ACTH-Gaben erfolgten über diesen Aortenkatheter, um die Empfindlichkeit der Methode gegenüber der intravenösen Injektion zu steigern. Die Tiere waren heparinisiert (50 E Heparin/100 g Ratte). Da nach der Hypophysektomie die Empfindlichkeit der Nebennierenrinde gegenüber ACTH-Gaben innerhalb von Stunden abnimmt [12, 13], wurden alle ACTH-Bestimmungen 90 min nach Hypophysektomie begonnen, denn zu diesem Zeitpunkt war die Corticosteroninkretion in jedem Fall auf eine Basisinkretion abgesunken [8—10].

Der Corticosterongehalt des aus der Nebennierenvene der Ratte stammenden Plasmas wurde fluorimetrisch nach ZENKER und BERNSTEIN [14], modifiziert nach PFEIFFER u. Mitarb. [4, 15] bestimmt. Doppelwerte der Plasmaproben wurden in zwei Reihen von Einzelwerten in der Reihenfolge der Extraktion gemessen [8, 9]. Außerdem wurden die sog. 11-Hydroxycorticosteroide im menschlichen Plasma fluorimetrisch bestimmt [16—18].

Von allen ACTH-Standardlösungen (Synacthen®, Ciba) oder menschlichen Plasmen wurde über den Aortenkatheter (Abb. 1) innerhalb von 94 sec jeweils genau 1 ml infundiert (Perfusor, Fa. Braun, Melsungen), da die Corticosteroninkretion der Rattennebeniere bei konstantem ACTH-Spiegel von der Nebennierendurchblutung abhängt [19, 20]. Größere Plasmavolumina [21—23] steigern die Nebennierendurch-

blutung erheblich. Die Wirkung von gleichen ACTH-Dosen ist aber nur bei möglichst gleicher Nebennierendurchblutung zu beurteilen.

Nach Vorversuchen [8, 10] wurde von der 3. bis zur 11. min nach Beginn der ACTH-Infusion, bzw. der Infusion des zu untersuchenden Plasmas, Blut aus der Nebennierenvene der Ratte gesammelt und davon der Plasma-Corticosterongehalt bestimmt. Diese relativ lange Sammelperiode

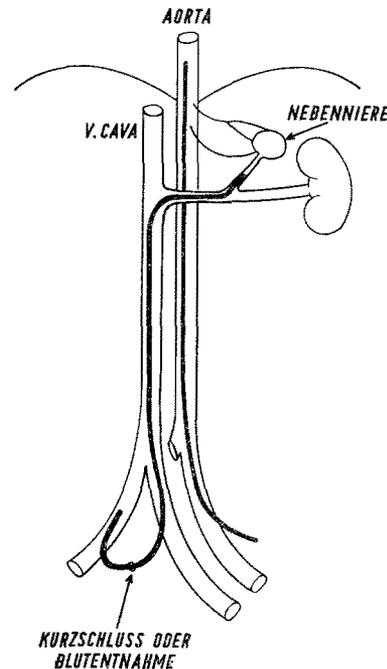


Abb. 1. Schema der Aorten- und Venenkatheterisation der Ratte. Die technische Durchführung der Katheterisationen ist unter *Methoden* beschrieben

garantiert, daß bei kleinsten ACTH-Dosen die Steigerung der Corticosteroninkretion vollständig erfaßt wird. Nach höheren ACTH-Dosen wird das Maximum der Steigerung der Corticosteroninkretion etwas später erreicht [8, 10, 12]. Eine Sammelperiode von 8 min erfaßt also nur einen in Abhängigkeit von der Dosis ACTH wechselnd kleinen Teil der Steigerung der Corticosteroninkretion [8, 10]. Bei dieser Sammelperiode fand sich eine lineare Beziehung zwischen den logarithmisch aufgetragenen ACTH-Dosen und der ebenfalls logarithmisch aufgetragenen Steigerung der Corticosteroninkretion pro 8 min (Abb. 2), welche nach Abzug der Basisfluoreszenz der gemessenen Plasmavolumina als Differenz der Corticosteroninkretion pro 8 min vor und nach ACTH-Infusion ermittelt wurde. Diese lineare Kurve wurde erst oberhalb von 1,0 mE ACTH flacher. Der Regressionskoeffizient der Eichkurve (0,01—0,5 mE ACTH) betrug $b = 0,75$ [8—10, 24], der Index der Genauigkeit [6, 25] der Methode war $\lambda = 0,07$. Der Korrelationskoeffizient, $r = 0,421$, war bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,001 signifikant [24] von 0 verschieden. — Die Prüfung der Empfindlichkeit der Methode zeigte, daß zwischen der Dosis 0,01 mE ACTH ($n = 95$) und einer NaCl-Infusion ($n = 10$) ein kaum signifikanter [24] Unterschied bestand ($0,15 > p > 0,10$). Dagegen fand sich eine signifikante Differenz zwischen der Wirkung von 0,025 mE ACTH ($n = 23$) und 0,01 mE ACTH ($p < 0,0025$) sowie zwischen der Wirkung von 0,025 mE ACTH und einer NaCl-Infusion ($p < 0,01$). Die

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Stiftung VW-Werk (R. H.), der CB-Stiftung und der F. Baur-Stiftung.

Empfindlichkeitsgrenze der Methode liegt also zwischen 0,10 und 0,015 mE ACTH.

Vor jeder Bestimmung eines ACTH-Plasmaspiegels — korrekter ist die Bezeichnung ACTH-Gehalt im Plasma — wurde der Ratte 1 ml einer ACTH-Standardlösung (0,05 mE ACTH) infundiert. 20 min später war die Corticosteroninkretion wieder auf den Basiswert abgesunken, wie durch Blutentnahme aus der Nebennierenvene von der 20.—24. min kontrolliert wurde [8, 10]. Darauf konnte dann das zu untersuchende Plasma infundiert und die Steigerung der Corticosteroninkretion pro 8 min wie oben gemessen werden. Dieses Vorgehen erlaubt eine Berücksichtigung der individuellen Empfindlichkeit der Ratten in Einzelfällen. — Wegen der bekannten jahreszeitlichen Schwankungen der Empfindlichkeit der Ratte sei erwähnt, daß alle Plasmabestimmungen in

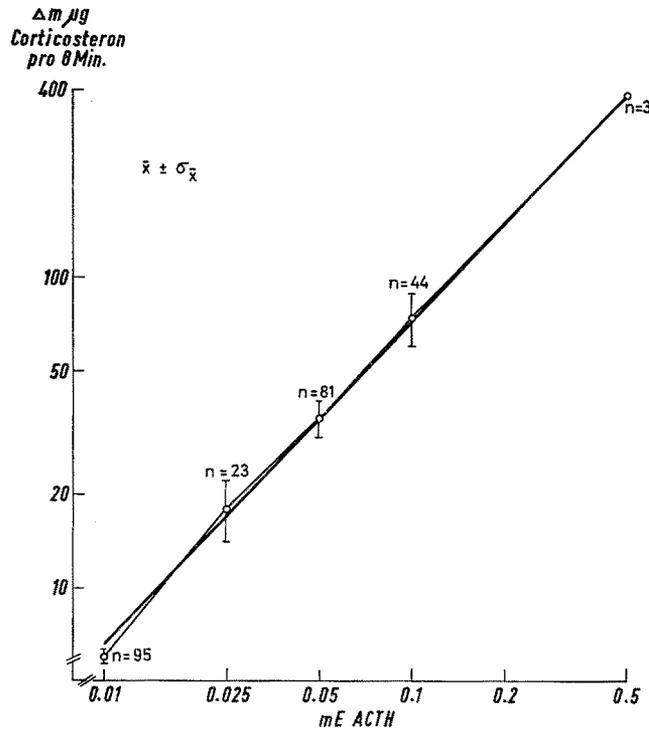


Abb. 2. Eichkurve von Dosis ACTH und Anstieg der Corticosteroninkretion. Angegeben sind die Mittelwerte (\bar{x}) und die Standardabweichung der Mittelwerte ($\sigma_{\bar{x}}$) von (n) als technisch geglückt anzusehenden Bestimmungen (vgl. Methoden). Über diese Eichkurve wurden die unter *Ergebnissen* mitgeteilten ACTH-Plasmaspiegel ermittelt

der Zeit von Anfang November bis Ende März durchgeführt wurden. — Die Zahl der Bestimmungen von Plasmawerten ist einerseits durch den großen Zeitaufwand der Methode und andererseits durch die beschränkte Haltbarkeit der ACTH-Aktivität [3, 10] in eingefrorenen (-18°C) Plasmaproben oder Standardlösungen begrenzt. Alle ACTH-Lösungen und Plasmaproben wurden bei ca. $+2^{\circ}\text{C}$ möglichst schnell gewonnen, um Aktivitätsverluste zu vermeiden. — Wegen des bekannten Tagesrhythmus der ACTH-Inkretion wurden alle Blutentnahmen bei den Patienten um 6 Uhr morgens begonnen.

Ergebnisse

Nach den Untersuchungen verschiedener Autoren [3—6, 12, 15, 21—23, 26—32] nimmt man heute an, daß der ACTH-Spiegel im Plasma des Normalen zwischen 0,003 und 0,006 mE/ml liegt. Es war daher nicht besonders überraschend, daß mit der beschriebenen biologischen Bestimmungsmethode normale ACTH-Spiegel im Plasma aus der Vena cubitalis nicht zu erfassen waren (Tabelle 1). Aber auch im Plasma aus dem Bulbus cranialis venae jugularis fanden wir keine sicher meßbaren ACTH-Spiegel (Tabelle 1). Die zur Erhaltung des normalen peripheren ACTH-Spiegels erforderliche ACTH-Inkretion des Hypophysenvorderlappens ist demnach offenbar zu gering, um zu einer

Tabelle 1. ACTH-Plasmaspiegel bei 7 Nebennierengesunden

Angegeben sind die Mittelwerte von (n) als technisch gelungen anzusehenden Bestimmungen für jeden einzelnen Patienten. Die Mittelwerte aller Patienten wurden aus den mittleren Corticosteronanstiegen im Nebennierenvenenplasma der Ratte nach Infusion von 1 ml menschlichem Plasma, wie unter *Methoden* beschrieben, berechnet. Bei diesen Patienten wurden außerdem die sog. 11-Hydroxycorticosteroide im Plasma bestimmt. Der Mittelwert lag mit 29,4 $\mu\text{g}\%$ (6 Uhr morgens) etwas höher als der Normalbereich für 9 Uhr von 5—22 $\mu\text{g}\%$ (18). Eine Stunde nach Injektion von 4 mg Dexamethason war der Mittelwert der sog. 11-Hydroxycorticosteroide auf 16,9 $\mu\text{g}\%$ abgesunken. Der mittlere ACTH-Plasmaspiegel war zu diesem Zeitpunkt, um ca. 7.30 Uhr, ebenfalls $< 0,01$ mE/ml ($n = 18$). Die Diagnosen sind Abschlußdiagnosen.

Patient	mE ACTH pro ml Plasma	
	Bulbus cran. ven. jugul.	Vena cubitalis
K. M., 36 Jahre, ♂ Verdacht auf Myopathie	$< 0,01$ (2)	$< 0,01$ (2)
B. O., 47 Jahre, ♂ vegetative Beschwerden	0,015 (1)	$< 0,01$ (2)
R. M., 20 Jahre, ♂ Zustand nach Schädeltrauma	$< 0,01$ (2)	$< 0,01$ (2)
H. P., 19 Jahre, ♂ alimentäre Adipositas (60)	0,01 (2)	$< 0,01$ (2)
K. J., 49 Jahre, ♂ Jackson-Anfälle	$< 0,01$ (3)	0,01 (2)
B. J., 46 Jahre, ♂ traumatische Epilepsie	—	$< 0,01$ (6)
W. B., 52 Jahre, ♂ Prostatahypertrophie	$< 0,01$ (3)	0,02 (2)
Mittelwerte aller Patienten	$< 0,01$ ($n = 13$)	$< 0,01$ ($n = 18$)

von uns sicher meßbaren Erhöhung des ACTH-Spiegels im Bulbus cranialis venae jugularis zu führen.

Eindeutig zu erfassen sind dagegen die erhöhten ACTH-Spiegel im Plasma von Patienten mit bestimmten Erkrankungen (Tabelle 2). Beim Morbus Addison sind die ACTH-Werte im Plasma kurz nach Absetzen der Substitutionsbehandlung stark erhöht [4, 12, 21, 33, 34]. Diese ACTH-Spiegel sind weit höher als die z. B. in einer Stress-Situation beim Normalen zu beobachtenden [12]. Das ist zunächst erstaunlich, da alle diese Patienten ja im allgemeinen unter einer als ausreichend anzusehenden Substitutionsbehandlung mit Cortisol stehen. Bedenkt man aber die relativ kurze Halbwertszeit oral applizierter Corticosteroide [35], so kann man sich vorstellen, daß bei einer oralen Substitutionsbehandlung, mit z. B. morgens 20 mg und nachmittags 10 mg Cortisol, erhebliche Schwankungen des Plasmacortisolspiegels auftreten. Diese Behandlung kann das feine Spiel der physiologischen Cortisolinkretion der Nebennierenrinde eben nicht vollwertig ersetzen. So wird es auch bei „korrekt“ durchgeführter Substitutionsbehandlung im Laufe der 24 Std eines Tages immer wieder zu Phasen des relativen Cortisolmangels kommen. Die Antwort des Reglers der Cortisolinkretion ist durch seine ständige Überbeanspruchung pathologisch gesteigert. Das sollte der Kliniker im Hinblick auf die bekannten extraadrenalen Wirkungen des ACTH [36] bei der Behandlung von Patienten mit Morbus Addison nicht vergessen.

Der erste Patient der Tabelle 2 (B. S.) litt seit 1952 an einem tuberkulös bedingten Morbus Addison und wurde bis zur Aufnahme im Jahre 1964 mit Desoxycorticosteron behandelt. Intensive Pigmentation und verkalkte Ohrknorpel

Tabelle 2. ACTH-Plasmaspiegel bei Patienten mit Erkrankungen des „Hypophysen-Nebennierensystems“

Angegeben sind die Mittelwerte von (*n*) Bestimmungen für jeden Patienten sowie die Werte der sog. 11-Hydroxycorticosteroide (s. *Methoden*). Bei den Patienten B. S., G. J., E. L., M. E. und W. L. fand sich um 6 Uhr morgens ein mittlerer ACTH-Plasmaspiegel von 0,206 mE/ml (*n* = 13) in der Vena cubitalis und von 0,368 mE/ml (*n* = 14) im Bulbus c. v. j. Das mittlere Körpergewicht dieser 5 Patienten betrug 61,1 kg. — Eine Stunde nach Injektion von 4 mg Dexamethason betrug der mittlere ACTH-Plasmaspiegel im Bulbus c. v. j. 0,086 mE/ml (*n* = 12), womit er also um etwas mehr als die Hälfte gegenüber dem Ausgangswert in der V. cubitalis abgesunken war. Nimmt man wie (30) an, daß das Dexamethason die ACTH-Inkretion des Hypophysenvorderlappens sofort und vollständig supprimiert, was nicht ohne weiteres berechtigt erscheint, so paßt diese Abnahme größenordnungsmäßig zu der von uns berechneten Halbwertszeit für endogenes ACTH von ca. 40 min (s. *Diskussion*). Die Krankengeschichten der Patienten sind im Text kurz besprochen. Die Patienten mit Nebenniereninsuffizienz erhielten bis 22 Std vor Versuchsbeginn ihre übliche Substitutionsbehandlung.

Patient	mE ACTH pro ml Plasma		sog. Plasma-11-OHCS µg-%
	Bulbus cran. ven. jugul.	Vena cubitalis	
B. S., 48 Jahre, ♂, 67,3 kg M. Addison	0,45 (4)	0,28 (3)	4,0
G. J., 18 Jahre, ♂, 55,5 kg M. Addison	0,26 (2)	0,24 (2)	7,0 —
E. L., 19 Jahre, ♂, 50,5 kg Zustand nach totaler Adrenalektomie	0,27 (4)	0,04 (3)	5,0 —
M. E., 44 Jahre, ♀, 82,0 kg Zustand nach totaler Adrenalektomie	0,06 (2)	0,03 (2)	(10,0?) —
W. L., 21 Jahre, ♀, 50,0 kg Adrenogenitales Syndrom	0,80 (2)	0,44 (3)	„22,0“ —
L. J., 61 Jahre, ♂ Bronchial-Ca, HVL- Metastasen, sek. NNR- Insuffizienz	< 0,01 (4)	< 0,01 (3)	3,0 —

(Thorns Zeichen, [61], sprachen für eine nicht ganz ausreichende Substitution der Nebennierenrindeninsuffizienz. Wir fanden sehr hohe ACTH-Spiegel in der Vena cubitalis. Der ACTH-Spiegel im Bulbus cranialis venae jugularis war noch höher. — Der zweite Patient mit einem Morbus Addison (G. J.) erkrankte Ende 1964 mit einer Nebennierenrindeninsuffizienz, deren erstes Zeichen ein deutliches Nachlassen der Konzentrations- und Merkfähigkeit war [37].

Im Jahre 1958 beschrieben NELSON u. Mitarb. den ersten Fall, bei dem man die Entwicklung eines chromophoben Adenoms des Hypophysenvorderlappens nach totaler Adrenalektomie wegen eines Cushing-Syndroms mit bilateraler NNR-Hyperplasie beobachtete und exzessiv hohe ACTH-Spiegel im Plasma fand [38]. Seither wurden wiederholt Beobachtungen solcher Fälle mitgeteilt (z. B. [39, 40]). Die gesteigerte ACTH-Inkretion bei diesen adrenalektomierten Patienten ist nicht ohne weiteres mit der von Addison-Kranken vergleichbar, da unseres Wissens bei letzteren die Entstehung von Hypophysenvorderlappenadenomen nicht beobachtet wurde [41]. Aus Tierexperimenten [42] kennt man allerdings das Wachstum von ACTH-produzierenden HVL-Adenomen nach Entfernung der Nebennieren.

Ein 19jähriger Mann (E. L.) ist seit dem 15. Lebensjahr in unserer Beobachtung. Er wurde seinerzeit wegen eines typischen Cushing-Syndroms mit bilateraler Hyperplasie der Nebennierenrinde totaladrenalektomiert. Das führte zu einer vollständigen Remission des Krankheitsbildes und zu einer

Umkehr der vorher latent diabetischen Stoffwechsellage in eine erhöhte Glucosetoleranz [37, 43]. Jetzt findet sich bei dem Patienten eine intensive Pigmentation und ein doppelt konturierter Sellaboden. Nach der Tomographie ist die Sella einseitig vergrößert, so daß wir den Patienten unter dem Verdacht auf das Vorliegen eines sog. chromophoben Adenoms bzw. R-Zellen-Adenoms [44] weiter beobachten. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, waren die ACTH-Spiegel bei diesem Patienten sehr hoch.

Auch beim adrenogenitalen Syndrom, bei dem es sich bekanntlich in typischen Fällen zumeist um eine unvollständige Blockierung der 21-Hydroxylierung [45] handelt, was zu einer verminderten Cortisolproduktion, einer vermehrten ACTH-Ausschüttung und einer erhöhten Androgenproduktion in der Nebenniere führt, kann man erhöhte ACTH-Spiegel messen [12]. Eine 23jährige Patientin (W. F.), bei der die Diagnose schon vor Jahren gestellt worden war, infolge ihrer Indolenz jedoch keine Behandlung erfolgte, hatte extrem hohe ACTH-Spiegel im Bulbus cranialis venae jugularis und etwa um die Hälfte niedrigere Spiegel in der Vena cubitalis.

Klinisch interessante Gesichtspunkte bot die Krankengeschichte des Patienten L. J. (Tabelle 2). Dieser Patient wurde wegen eines Bronchialcarcinoms (Plattenepithelcarcinom) beobachtet. Adynamie, ausgeprägte Hypotonie, Erbrechen und Hyponatriämie ließen eine Nebennierenrindeninsuffizienz annehmen. Die „Plasmacortisolwerte“ waren erniedrigt. Überraschenderweise fanden sich weder im Bulbus cranialis venae jugularis noch in der Vena cubitalis meßbare ACTH-Plasmaspiegel, die bei den Addison-Patienten deutlich erhöht waren. Bei der Autopsie ergab sich die Erklärung dieses Ergebnisses. Der Hypophysenvorderlappen war durch Metastasen des Bronchialcarcinoms vollständig zerstört, während die Nebennieren nur kleine Metastasen aufwiesen. Es handelte sich somit um eine sekundäre Nebennierenrindeninsuffizienz. Während der klinischen Beobachtung war daran auch schon gedacht worden, da dieser Patient mit einer ausgeprägten Kälteempfindlichkeit und Bradykardie sowie einer Verlangsamung der Achillessehnenreflexe die Zeichen einer sekundären Hypothyreose aufwies.

Diskussion

Die gesamte im Körper zu einem beliebigen Zeitpunkt befindliche Menge an ACTH berechnet sich durch Multiplikation des fiktiven Verteilungsvolumens für ACTH mit dem ACTH-Spiegel in der Peripherie (Vena cubitalis). Durch Multiplikation mit 0,5 erhält man die Menge an ACTH, die in einer Halbwertszeit für ACTH eliminiert bzw. von der Hypophyse produziert wird (Zähler von Gleichung 1). Diese ACTH-Menge wird im Gleichgewicht pro Halbwertszeit von der Hypophyse ersetzt und verteilt sich zunächst auf diejenige Plasmamenge, die in einer Halbwertszeit durch das Hirnkreislaufgebiet fließt. Diese Plasmamenge kann im Bulbus cranialis venae jugularis erfaßt werden und läßt sich aus Hirndurchblutungsvolumen pro Minute, Hämatokrit und Halbwertszeit für endogenes ACTH berechnen:

$$\Delta \text{ACTH} = \frac{0,5 \times \left[\frac{\text{Verteilungsvolumen}}{\text{ACTH}} \right] \times \left[\frac{\text{ACTH Plasmaspiegel}}{1} \right]}{\left[\frac{\text{Cerebraler Plasmafluß pro Minute}}{1} \right] \times \left[\frac{\text{Halbwertszeit}}{\text{ACTH}} \right]} \left[\frac{1 \times \frac{\text{mE}}{1}}{\frac{1}{\text{min}} \times \text{min}} \right]$$

Dabei ist: Δ ACTH = Zunahme des ACTH-Spiegels im Hirnkreislauf in mE/Liter, Verteilungsvolumen für ACTH = 43% des Körpergewichtes nach WOLF u. Mitarb. [46] für ^{131}I -Jod- β^{1-24} -Corticotrophin. Bei einem mittleren Körpergewicht von 61,1 kg der fünf Patienten mit erhöhten ACTH-Spiegeln (Tabelle 2) ist ihr mittleres Verteilungsvolumen für ACTH also 26,3 Liter.

$$\begin{aligned} \text{Cerebraler Plasmafluß pro Minute} = \\ \text{Hirndurchblutung (0,8 Liter/min nach [1, 2])} \times \\ \times \left[\frac{100 - \text{Hämatokrit}}{100} \right] = \frac{0,8 \cdot 55}{100} \left(\frac{1}{\text{min}} \right) \end{aligned}$$

Folgende Voraussetzungen haben zu gelten, damit die angegebene Gleichung gültig sein kann. Der ACTH-Spiegel im Plasma aus der Vena cubitalis muß repräsentativ für das gesamte Verteilungsvolumen sein. Diese Annahme ist ja Voraussetzung für die Berechnung des fiktiven Verteilungsvolumens durch retrograde Extrapolation aus dem Abfall der Plasmakonzentration des $^{131}\text{Jod-ACTH}$ [46]. Das fiktive Verteilungsvolumen ist eine rechnerische Größe, die anatomisch nicht ohne weiteres zu definieren ist. Für Parathormon wurde ein ähnliches Verteilungsvolumen, nämlich 36,4% des Körpergewichtes [47], angegeben. Weiter muß man voraussetzen, daß alles ACTH den Schädelinnenraum über die Bulbi craniales venae jugularis verläßt [48, 49] und sich in der kurzen Zeit bis zur Passage des Bulbus cranialis venae jugularis lediglich im Plasma und nicht z.B. auf die Erythrocyten verteilt. Sollte ein ins Gewicht fallender Teil des venösen Blutes aus dem Hypophysenvorderlappen auf anderen Wegen (z.B. Rete venosum foram. oval.) das Schädelinnere verlassen, so würden sich zu lange Halbwertszeiten für endogenes ACTH berechnen. Weitere Voraussetzungen sind, daß der Verteilungsraum von endogenem ACTH gleich dem von $^{131}\text{Jod-ACTH}$ ist, und die Plasmaspiegel im venösen Blut nach Passage der terminalen Hirnstrombahn nicht höher oder niedriger als z.B. in der Vena cubitalis sind.

Es ist klar, daß nicht alle diese Voraussetzungen ohne weiteres zu akzeptieren sind. Berechnet man trotzdem aus den Mittelwerten der gemessenen ACTH-Spiegel in der Vena cubitalis (206 mE/Liter) und der mittleren Erhöhung des ACTH-Spiegels im Bulbus cranialis venae jugularis (162 mE/Liter) nach Gleichung 1, in der das Verteilungsvolumen und der cerebrale Plasmafluß bei bekanntem Körpergewicht konstante Größen sind und die einzige Unbekannte die Halbwertszeit für ACTH ist, diese Halbwertszeit für endogenes ACTH, so ergibt sich — bei Berücksichtigung der fünf Patienten (B. S., G. J., E. L., M. E. und W. F., Tabelle 2) — eine Halbwertszeit von 38 min. In Anbetracht der nicht unerheblichen Voraussetzungen und der relativ kleinen Zahl der untersuchten Patienten möchten wir diese Halbwertszeit lediglich als größenordnungsmäßige Abschätzung und nicht als genaue Bestimmung verstanden wissen.

Die in der Literatur angegebenen Werte für die Halbwertszeit von exogenem, markiertem oder nicht markiertem, also biologisch gemessenem ACTH sind zum Teil erheblich kürzer [4, 30, 46, 47, 50—59]. Allerdings fanden PFEIFFER u. Mitarb. [4] bei Infusion von 25 E artfremdem ACTH über 4 Std unter Verwendung einer biologischen Bestimmungsmethode, welche der unseren ähnlich ist, eine Halbwertszeit von 29 min und berichteten ferner, daß die Halbwertszeit von schnell injiziertem ACTH kürzer und dosisabhängig sei. NELSON u. Mitarb. [34, 51] fanden ebenfalls eine Halbwertszeit für Schweine-ACTH, die etwas länger als nur wenige Minuten war.

Bei Patienten, die nach den klinischen Befunden keine Störungen der Nebennierenrindenfunktion aufwiesen, fanden wir weder in der Vena cubitalis noch im Bulbus cranialis venae jugularis meßbare ACTH-Spiegel. Nimmt man willkürlich einen normalen ACTH-Spiegel von 6 mE/Liter Plasma an und berücksichtigt, daß die Empfindlichkeitsgrenze der Bestimmungsmethode bei etwa 0,01 mE (obere Grenze des 95% Vertrauensbereiches = 0,05 mE, s. Methoden) liegt, so läßt sich nach Umformung von Gleichung 1 errechnen, daß die Halbwertszeit für endogenes ACTH

kleiner als 4 min sein müßte, damit die Spiegel im Bulbus cranialis venae jugularis signifikant höher als in der Vena cubitalis sein könnten. Dieser Berechnung, aus der umgekehrt geschlossen werden kann, daß die biologische Halbwertszeit von endogenem ACTH größer als 4 min sein muß, wurde ebenfalls ein Verteilungsvolumen für ACTH von 26,3 Litern zugrunde gelegt.

Es ist von anderen Autoren versucht worden, mit etwas anderen Methoden den Normalspiegel von ACTH zu bestimmen. Die Arbeitsgruppe von LITTLE hat ein Verfahren angegeben, ACTH aus größeren Plasmamengen anzureichern und mit einer biologischen Methode zu bestimmen [12, 22, 27]. Auch andere Autoren haben diese Möglichkeit untersucht [21, 28]. Die Ausbeuten liegen bei diesem Anreicherungsverfahren zwischen 44 und 124%. Zu diesem Fehler addiert sich der Fehler der biologischen Bestimmungsmethoden. Immerhin verdankt man diesen Untersuchungen die Vorstellung, daß der normale Plasmaspiegel an ACTH zwischen 3 und 6 mE je Liter Plasma liegt. — Einen ganz anderen Weg gingen Untersucher, die sich des Prinzips der radioimmunologischen Bestimmung von Peptidhormonen für die ACTH-Bestimmung bedienten [30—32]. Diese Autoren berichteten über eine ganz ausgezeichnete Empfindlichkeit dieses Verfahrens (0,1 μE). Es wurden zunächst allerdings um drei Zehnerpotenzen höhere Normalspiegel gefunden, als sie bei den biologischen Bestimmungsmethoden geschätzt wurden [31]. Ein weiterer Einwand gegen dieses Verfahren kommt aus der Arbeitsgruppe von FORSHAM [32]. Ein synthetisches Peptid aus den Aminosäuren Nr. 22—39 der Sequenz des vollständigen β^{1-39} Corticotrophins zeigte die volle immunologische Aktivität, ohne daß eine biologische Aktivität nachweisbar war.

Bei den fünf Patienten mit erhöhten ACTH-Spiegeln (Tabelle 2) wurde ein mittlerer ACTH-Plasmaspiegel von 0,206 mE ACTH/ml Plasma in der Vena cubitalis gefunden. Im Plasma aus dem Bulbus cranialis venae jugularis waren die ACTH-Spiegel im Mittel um 0,162 mE ACTH/ml höher (Signifikanz der mittleren Differenz: $p < 0,05$). Unter der Annahme einer Hirndurchblutung von 0,8 Liter/min [1, 2] läßt sich für diese Patienten, ohne Berücksichtigung des Tagesrhythmus, eine ACTH-Inkretion von ca. 100 E je Tag errechnen. Die naturgemäß wesentlich niedrigere ACTH-Inkretionsrate bei normalen ACTH-Spiegeln ist aus unseren Daten nicht zu berechnen.

Es ist zu hoffen, daß Verbesserungen der Methoden der ACTH-Bestimmung in Zukunft die Kenntnis um die dynamischen Verhältnisse der ACTH-Inkretion erweitern werden.

Die Autoren danken Frau D. SEIBERT und Frä. F. SEDLMAIER für ihre sorgfältige technische Assistenz. Wesentliche Teile dieser Arbeit werden von R. HACKER und F. KLUGE der Medizinischen Fakultät der Universität München in ihren Dissertationsarbeiten vorgelegt.

Zusammenfassung. Der Anstieg der Corticosteroninkretion in das Nebennierenvenenblut frisch hypophysectomierter Ratten diente zur Bestimmung von ACTH-Spiegeln in 1 ml nativen, menschlichen Plasma. Normale ACTH-Plasmaspiegel sind sowohl bei Punktion der Vena cubitalis als auch des Bulbus cranialis venae jugularis durch diese Methode nicht oder nur ungenau zu erfassen. Bei Patienten mit pathologisch erhöhten ACTH-Spiegeln in der Vena cubitalis sind die ACTH-Spiegel im Bulbus cranialis venae jugularis signifikant höher. Es ließ sich eine Beziehung zwischen ACTH-Spiegel in der Peripherie (Vena cubitalis), Differenz der ACTH-Spiegel zwischen Bulbus cranialis venae jugularis und Vena cubitalis und biologischer Halbwertszeit von endogenem ACTH aufstellen. Nach den Ergebnissen der Bestimmung von ACTH-Spiegeln bei Nebennierengesunden läßt sich folgern, daß die

biologische Halbwertszeit von endogenem ACTH größer als 4 min sein muß. Bei Patienten mit erhöhten ACTH-Spiegeln ließ sich die biologische Halbwertszeit von endogenem ACTH größenordnungsmäßig mit ca. 40 min berechnen. Bei diesen Patienten betrug die mittlere tägliche ACTH-Inkretion ca. 100 E.

Summary. ACTH-contents of 1 ml specimens of human plasma were assayed by measurement of increases of corticosterone output in the adrenal vein of acutely hypophysectomized rats. This procedure is not sensitive enough to measure normal ACTH-levels accurately, neither when blood was drawn from the bulbous cranialis venae jugularis, nor from the vena cubitalis. In patients having pathologically elevated ACTH-levels, the ACTH-content of plasma is significantly higher in the bulbous cranialis venae jugularis than in peripheral venous blood. An equation is presented formulating the relation of peripheral ACTH-levels, differences of ACTH-levels between bulbous cranialis venae jugularis and vena cubitalis, and of the biological half-life of endogenous ACTH. On the basis of the results of the determinations of so-called normal ACTH-levels it can be concluded, that the biological half-life of endogenous ACTH is longer than 4 min. From the data of patients with elevated ACTH-levels a half-life of approximately 40 min and a mean ACTH-secretion of approx. 100 units per day could be calculated.

Literatur. [1] KETY, S. S., and C. F. SCHMIDT: The nitrous oxide method for the quantitative determination of cerebral blood flow in man: Theory, procedure and normal values. *J. clin. Invest.* **27**, 476 (1948). — [2] BERNSTEIN, A., U. GOTTSCHALK, U. W. RUDOLPH: Herzkrankheiten als Ursache cerebraler Zirkulationsstörungen. *Dtsch. med. Wschr.* **87**, 16 (1962). — [3] LIPSCOMB, H. S., and D. H. NELSON: A sensitive biologic assay for ACTH. *Endocrinology* **71**, 13 (1962). — [4] PFEIFFER, E. F., F. GARMENDIA, E. VAUBEL u. K. RETIENE: Exogene und endogene ACTH-Aktivitäten im nativen Plasma des Menschen. *Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. N. F.* **20**, 127 (1963). — [5] GIRARD, F., and V. K. VANCE: Modification of the Lipscomb-Nelson bioassay for ACTH. *Endocrinology* **71**, 325 (1962). — [6] RETIENE, K., H. DITSCHUNEIT, M. FISCHER, K. KOPP u. E. F. PFEIFFER: Corticotropin-Bestimmung anhand des Corticosteron-Anstieges in Nebennierenvenenblut hypophysektomierter Ratten. Vergleich von Dexamethasonblockade und Hypophysektomie. *Acta endocr. (Kbh.)* **41**, 24 (1962). — [7] FREUD, J.: Die Hypophysektomie. In: *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*. Hrsg. E. ABDERHALDEN, Abt. V, Teil 3, B II, S. 1442. Berlin: Urban & Schwarzenberg 1938. — [8] HACKER, R.: Diss. Universität München, 1966. — [9] KLUGE, F.: Diss. Universität München, 1967 (in Vorbereitung). — [10] SCRIBA, P. C.: Habilitationsschrift Universität München, 1966. — [11] HARRISON, R. G., and M. J. HOEY: The adrenal circulation. Oxford: Blackwell Sci. Publ. 1960. — [12] LIDDLE, G. W., D. ISLAND, and C. K. MEADOR: Normal and abnormal regulation of corticotropin secretion in man. *Recent Progr. Hormone Res.* **18**, 125 (1962). — [13] OHSAWA, N.: Effect of administration of ACTH on adrenal responsiveness of hypophysectomized rats. *Endocrinology* **77**, 461 (1965). — [14] ZENKER, N., and D. E. BERNSTEIN: The estimation of small amounts of corticosterone in rat plasma. *J. biol. Chem.* **231**, 695 (1958). — [15] PFEIFFER, E. F., W. E. VAUBEL, K. RETIENE, D. BERG u. H. DITSCHUNEIT: ACTH-Bestimmung mittels Messung des Plasma-Corticosterons der mit Dexamethason hypophysenblockierten Ratte. *Klin. Wschr.* **38**, 980 (1960). — [16] DE MOOR, P., and O. STEENO: Comparison of three techniques for the fluorimetric determination of plasma corticosteroids. *J. Endocr.* **28**, 59 (1963). — [17] MATTINGLY, D., P. M. DENNIS, J. PEARSON, and C. L. COPE: A simple fluorimetric method for the estimation of free 11-hydroxycorticoids in human urine. *Lancet* **1964 II**, 1046. — [18] HOCHHEUSER, W., M. MÜLLER-BARDORFF, P. C. SCRIBA u. K. SCHWARZ:

Fluorimetrische Bestimmung der 11-Hydroxycorticosteroide im Plasma unter der Therapie mit Corticoiden. 12. Sympos. Dtsch. Ges. Endokrinol., Wiesbaden. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966 (im Druck). — [19] URQUHART, J.: Adrenal blood flow and the adrenocortical response to corticotropin. *Amer. J. Physiol.* **209**, 1162 (1965). — [20] PORTER, J. C., and M. S. KLAIBER: Corticosterone secretion in rats as a function of ACTH input and adrenal blood flow. *Amer. J. Physiol.* **209**, 811 (1965). — [21] VANCE, V. K., W. J. REDDY, D. H. NELSON, and G. W. THORN: ACTH in human plasma. *J. clin. Invest.* **41**, 20 (1962). — [22] NEY, R. L., N. SHIMIZU, W. E. NICHOLSON, D. P. ISLAND, and G. W. LIDDLE: Correlation of plasma ACTH concentration with adrenocortical response in normal human subjects, surgical patients, and patients with Cushing's disease. *J. clin. Invest.* **42**, 1669 (1963). — [23] RETIENE, K., A. ESPINOZA, K. H. MARX u. E. F. PFEIFFER: Über das Verhalten von ACTH und Cortisol im Blut von Normalen und von Kranken mit primärer und sekundärer Störung der Nebennierenrindenfunktion. *Klin. Wschr.* **43**, 205 (1965). — [24] DIEM, K.: *Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen*, 6. Aufl. Basel: J. R. Geigy S. A. 1960. — [25] GADDUM, J. H.: Bioassay and mathematics. *Pharmacol. Rev.* **5**, 87 (1953). — [26] SYDNOR, K. L., and G. SAYERS: Blood and pituitary ACTH in intact and adrenalectomized rats after stress. *Endocrinology* **55**, 621 (1954). — [27] WILLIAMS, W. L., D. ISLAND, R. A. A. OLDFIELD, and G. W. LIDDLE: Blood corticotropin (ACTH) levels in Cushing's disease. *J. clin. Endocr.* **21**, 426 (1961). — [28] DAVIES, B. M. A.: Blood corticotrophin in normal adults and in patients with Cushing's syndrome. *Acta endocr. (Kbh.)* **45**, 55 (1964). — [29] PÜRVEŠ, H. D., and N. E. SIRETT: Assay of corticotrophin in dexamethasone-treated rats. *Endocrinology* **77**, 366 (1965). — [30] YALOW, R. S., S. M. GLICK, J. ROTH, and S. A. BERSON: Radioimmunoassay of human plasma ACTH. *J. clin. Endocr.* **24**, 1219 (1964). — [31] FELBER, J. P., A. J. MOODY, A. VILLANUEVA et A. VANOTTI: Determination radio-immunologique de l'insuline et de l'ACTH en clinique. *Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss.* **21**, 261 (1965). — [32] IMURA, H., L. L. SPARKS, G. M. GRODSKY, and P. H. FORSHAM: Immunologic studies of adrenocorticotrophic hormone (ACTH). Dissociation of biologic and immunologic activities. *J. clin. Endocr.* **25**, 1361 (1965). — [33] GRABER, A. L., J. R. GIVENS, W. E. NICHOLSON, D. P. ISLAND, and G. W. LIDDLE: Persistence of diurnal rhythmicity in plasma ACTH concentrations in cortisol-deficient patients. *J. clin. Endocr.* **25**, 804 (1965). — [34] NELSON, D. H.: Corticotropin in human plasma: Clinical endocrinology, vol. I, p. 626. New York: Grune & Stratton, Inc. 1960. — [35] RATH, L., u. H. J. KARL: Biologische Halbwertszeit, Abbau und Ausscheidung von 16-Methylenprednisolon. *Klin. Wschr.* **44**, 298 (1966). — [36] ENGEL, F. L.: Extraadrenale actions of adrenocorticotropin. In: *Vitamins and hormones*, p. 194. New York: Academic Press 1961. — [37] SCHWARZ, K., u. P. C. SCRIBA: Endokrin bedingte Encephalopathien. *Ref. Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* **72** (1966) (im Druck). — [38] NELSON, D. H., J. W. MEAKIN, J. B. DEALY, D. D. MATSON, K. EMERSON, and G. W. THORN: ACTH-producing tumor of the pituitary gland. *New Engl. J. Med.* **259**, 161 (1958). — [39] NELSON, D. H., J. W. MEAKIN, and G. W. THORN: ACTH-producing pituitary tumors following adrenalectomy for Cushing's syndrome. *Ann. intern. Med.* **52**, 560 (1960). — [40] MARGUTH, F.: Differentialdiagnostik der Geschwülste im Bereich des Türkensattels. *Dtsch. med. Wschr.* **89**, 1839 (1964). — [41] KRACHT, J.: Das Hypophysennebennierenrinden-System bei Cushing-Syndrom. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **47**, 280 (1963). — [42] TAKEMOTO, H., K. YOKORO, J. FÜRTH, and A. I. COHEN: Adrenotropic activity of mammo-somatotropic tumors in rats and mice. *Cancer Res.* **22**, 917 (1962). — [43] SCHWARZ, K., P. C. SCRIBA u. G. G. HOFMANN: Die intravenöse Glucose-Belastung und die Erfassung einer latenten Nebennierenrindensuffizienz während und nach Corticosteroidtherapie. *Verh. Dtsch. Ges. inn. Med.* **71**, 360 (1965). — [44] KRACHT, J., H. D. ZIMMERMANN u. U. HACHMEISTER: Immunhistologischer ACTH-Nachweis in einem R-Zellen-Adenom des Hypophysenvorderlappens bei M. Cushing. *Virchows Arch. path. Anat.* **340**, 270 (1966). — [45] BARTTER, F. C., F. ALBRIGHT, A. P. FORBES, A. LEAF, E. DEMPSEY, and E. CARROLL: The effects of adrenocorticotrophic hormone and cortisone in the adrenogenital syndrome associated with congenital adrenal hyperplasia: an attempt to explain and correct its disordered hormonal pattern. *J. clin. Invest.* **30**, 237 (1951). — [46] WOLF, R. L., M. MENDLOWITZ, L. J. SOFFERS, J. ROBOZ,

and S. E. GILTOW: Metabolism of corticotropin in man. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **119**, 244 (1965). — [47] MELICK, R. A., G. D. AURBACH, and J. T. POTTS: Distribution and half-life of ^{131}I -labeled parathyroid hormone in the rat. *Endocrinology* **77**, 198 (1965). — [48] HARRIS, G. W.: Entwicklung und heutiger Stand der Neuroendokrinologie. *Dtsch. med. Wschr.* **90**, 61 (1965). — [49] ANDERSON, E.: The hypothalamus and adrenocorticotrophic hormone release. In: The adrenal cortex (ed. H. D. MOON), p. 189. New York: P. B. HOEBER Inc. 1961. — [50] BRAUNSTEINER, H., G. GIEBISCH, H. KOLDER u. G. WERNER: Untersuchungen über die Freisetzung und Verteilung von adrenocorticotropem Hormon in Parabiosetieren. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* **215**, 210 (1952). — [51] MEAKIN, J. W., J. E. BETHUNE, R. H. DESPOINTE u. D. H. NELSON: The rate of disappearance of ACTH activity from the blood of humans. *J. clin. Endocr.* **19**, 1491 (1959). — [52] MEAKIN, J. W., W. H. TINGEY, and D. H. NELSON: The catabolism of ACTH: Stability in blood, plasma, serum, saline. *Endocrinology* **66**, 59 (1960). — [53] MEAKIN, J. W., and D. H. NELSON: The catabolism of ACTH: Some characteristics of an ACTH inactivating system in plasma. *Endocrinology* **66**, 73 (1960). — [54] RICHARDS, J. B., and G. SAYERS: Fate and excretion of adrenocorticotrophic hormone. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **77**, 87 (1951). — [55] VAN DYKE, D. C., M. E. SIMPSON, C. H.

LI, and S. M. EVANS: Survival in the circulation of the growth and adrenocorticotrophic hormone as evidenced by parabiosis. *Amer. J. Physiol.* **163**, 297 (1950). — [56] GREENSPAN, F. S., C. H. LI, and H. M. EVANS: Disappearance rate of ACTH from rat's plasma after i.v. injection. *Endocrinology* **46**, 261 (1950). — [57] SYDNOR, K. L., and G. SAYERS: Biological half-life of endogenous ACTH. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **83**, 729 (1953). — [58] RETTENE, K., M. FISCHER, H. DITSCHUNEIT u. E. F. PFEIFFER: Biologische Halbwertszeit von exogenem ACTH im menschlichen Blut. 9. Symp. Dtsch. Ges. Endokrinol. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1962. — [59] PORTER, J. C., and M. S. KLAIBER: Relationship of input of ACTH to secretion of corticosterone in rats. *Amer. J. Physiol.* **207**, 789 (1964). — [60] SORGE, F., H. E. MENTZEL, G. SCHUMANN, A. BRENDL u. E. F. PFEIFFER: Sekretionsrhythmik von ACTH und Cortisol im Blute von Stoffwechselfgesunden, Prädiabetikern und Fettsüchtigen. *Diabetologia* **1**, 151 (1965). — [61] THORN, G. W.: The diagnosis and treatment of adrenal insufficiency, 2nd ed. Springfield (Ill.): Ch. C. Thomas 1951 Publ.

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

Immunologische Darstellung zweier verschiedener Anti- γ -Globulin-Faktoren (Rheumafaktoren)

H. MATHIES, I. IMRE und H. GAEDICKE

Rheumatiker-Ambulanz der Medizinischen Poliklinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. W. SEITZ)

Immunologische Untersuchungen des Rheumafaktors setzen seine Isolierung und die Gewinnung eines spezifischen Antiserums voraus, um die gefundenen Präcipitationslinien determinieren zu können. Die Isolierung der Rheumafaktoren aus verschiedenen Polyarthritiseren wurde nach einer von uns bereits beschriebenen Methodik [4, 5, 2] durchgeführt. Nach Reaktion des Rheumafaktors im Polyarthritiserum mit γ -Globulin-beladenen Latexpartikeln wurde zentrifugiert und der Rückstand mehrfach gewaschen. Nach Auffüllen mit Pufferlösung erfolgte dann die Abspaltung des Rheumafaktors durch Erhitzen auf 63–65° C. Nach Abzentrifugieren der Latexpartikel bei gleicher Temperatur verbleibt der nach Abkühlen wieder reaktionsfähige Rheumafaktor im Überstand. Im noch in der Wärme abgehobenen Überstand liegt also der Rheumafaktor isoliert vor und kann durch Dialyse weiter konzentriert werden.

Wir haben den Rheumafaktor aus verschiedenen Polyarthritiseren isoliert und durch Immunisierung von Kaninchen Antiseren gewonnen [5]. Mit den Rheumafaktoren und spezifischen Antiseren wurden dann immunologische Untersuchungen mit der Doppeldiffusionsmethode nach OUCHTERLONY und mit der Immunelektrophorese durchgeführt.

Untersuchungen

Materialien, Reagentien und apparative Ausrüstung. a) Rheumafaktorpositive (RA-Test), hochtitrige Polyarthritiseren. b) Isolierte Rheumafaktoren (Isolierung nach früher mitgeteilter Methodik [2, 4, 5]). c) Antirheumafaktorseren (Gewinnung nach früher mitgeteilter Methodik [5]). d) Antihumanserum (Vollserum) von Ziegen (Hyland Laboratories). e) Anti- β_2 -Makroglobulinserum (neuere Nomenklatur: Anti- γ_M -Globulinserum) von Ziegen (Hyland Laboratories). f) Anti- γ_S -Globulinserum (neuere Nomenklatur: Anti- γ_C -Globulinserum) von Ziegen (Hyland Laboratories).

g) Anti-Cohn-Fraktion II-(γ -Globulin-)Serum von Kaninchen (Hyland Laboratories). h) Reinagar (Behring-Werke). i) Phosphatpufferlösung 0,15 molar pH 7,1 zur Herstellung des Agargels für Doppeldiffusionstest. k) Cialit (Acid-Institut) zur Beigabe zum Agar als Bacteriostaticum. l) Veronalpuffer pH 8,6 zur Herstellung des Agargels für Immunelektrophorese. m) Veronalpuffer pH 8,6 als Brückenpuffer. n) Amidoschwarzlösung zur Färbung der Präparate. o) Acetatpuffer für Amidoschwarzlösung. p) 2%ige Essigsäure (Entfärber). q) Immunelektrophoresegerät Agafor 1 (Egaton A.G.).

Methodiken. 1. Doppeldiffusion in Agargel, modifiziert nach OUCHTERLONY [7]: Beschicken von in Petrischalen liegenden Glasplatten (Diagläser 50 × 50 mm) mit 0,8%igem Agar. Einstanzen von Antigen- bzw. Antikörperlager von 8 mm Durchmesser im Abstand von ebenfalls 8 mm und Einfüllen der betreffenden Seren. Lagerung der mit Deckel verschlossenen Präparate für 48 Std bei Zimmertemperatur. Umschneiden der Agarschicht am Rande der Glasplatten und Entnahme der Platten mit der darauf befindlichen Agarschicht, Waschen (24–48 Std), Färben (10–20 min) und Entfärben.

2. Immunelektrophorese, Mikromethodik, gering modifiziert nach SCHEIDEGGER [8]: Beschicken von Objektträgern (26 × 76 mm) mit 1,2%igem Agar und Ausstanzen der betreffenden Antigen- und Antikörperlager mit speziell angefertigten Stanzen. Einfüllen der zu untersuchenden Antigene und Einlegen in die Immunelektrophoresekammer, Auftrennungszeit 45 min bei 6 Volt/cm. Nach Herausnahme Einfüllen der Antiseren in die Antikörperlager und Lagerung in feuchter Kammer für 16–18 Std bei Zimmertemperatur. Waschen (24 Std), Trocknen (im Brutschrank bei 37° C), Färben (10–20 min) und Entfärben.

Ergebnisse und Diskussion

Abb. 1 demonstriert zunächst ein Rheumatikerserum, das in der Ouchterlony-Platte gegen drei verschiedene Antirheumafaktorseren eine sehr starke Präcipitationslinie mit β_2 -Makroglobulincharakter zeigt. Das Rheumatikerserum ergibt gegen die drei Antirheumafaktorseren und gegen ein spezifisches Anti- β_2 -Makroglobulinserum eine identische Linie. Alle drei