

UTILISATION EN SCINTILLATION LIQUIDE DU TRITON X-100 POUR LE COMPTAGE A HAUT RENDEMENT DU RADIOFER PLASMATIQUE

G. FILLET¹

*Institut de Médecine, Département de Clinique et de Pathologie Médicales
(Pr H. Van CAUWENBERGE, Pr Associé J. HUGUES), Université de Liège
Hôpital de Bavière, 66, Bd de la Constitution, 4000 - Liège (Belgique)*

RÉSUMÉ. — L'auteur présente une nouvelle méthode de mesure du ⁵⁹Fe plasmatique par scintillation liquide. En utilisant le triton X-100 comme agent émulsionnant et en travaillant à 4°C, le rendement obtenu se situe régulièrement entre 81 et 83 %, soit une valeur cinq fois supérieure à celle de la scintillation solide. Sans manipulation préalable, des volumes aussi importants que 4 ml de plasma peuvent être directement incorporés dans le milieu scintillant et comptés avec une bonne reproductibilité.

Les procédés de décoloration et de correction de l'affaiblissement lumineux sont discutés. La méthode proposée permet une étude plus précise de la cinétique du fer et de l'érythropoïèse chez l'Homme.

Mots-clés : Isotopes du fer * sang. — Scintigraphie. — Agents tensio-actifs. — Cinétique. — Erythropoïèse. — Techniques. — Spectrophotométrie.

FILLET G., 1972. — Utilisation en scintillation liquide du triton X-100 pour le comptage à haut rendement du radiofer plasmatique. *Path.-Biol.*, 20, n° 5-6, 227-230.

INTRODUCTION

LE test au fer est actuellement l'étude isotopique la plus complète explorant l'érythropoïèse (3, 11, 12, 14).

Les mesures de radioactivité sanguine chez l'Homme s'échelonnent sur un minimum de 15 jours suivant l'injection intraveineuse du fer marqué. Chez le sujet normal, la décroissance plasmatique est rapide, si bien qu'il ne subsiste en fin de test que quelques millièmes de l'activité initiale.

Cette chute peut encore être accentuée dans certains états pathologiques. Etant donné la longue

demi-vie physique et biologique du radiofer, la dose injectée ne dépasse habituellement pas 0,3 µc/kg. Dès lors, l'activité absolue est très faible et les prélèvements tardifs sont affectés d'une fluctuation statistique importante, rendant malaisée la mesure des différents paramètres de la cinétique du fer, quels que soient la méthode de calcul et le système métabolique adoptés.

Le comptage du ⁵⁹Fe se fait presque toujours en scintillation solide (émission de 1,1 et 1,3 MeV).

Lorsqu'on utilise un cristal d'iodure de sodium activé au thallium (3 pouces) et d'une fenêtre encadrant les deux Protopics du fer (meilleur réglage pour les faibles activités) le rendement est de l'ordre de 15 %. En fixant le taux de comptage à 10 000

¹ Aspirant au Fonds National Belge de la Recherche Scientifique.

Manuscrit reçu à la Rédaction le 3 mai 1971. Accepté le 10 juin 1971.

coups, les mesures d'activité plasmatique immobilisent, à elles seules, un passeur automatique d'échantillons pendant 2 à 3 jours. Si l'on y joint l'étude de l'incorporation globulaire du fer et de la survie des hématies marquées au ^{51}Cr , la durée totale de la mesure s'étend sur 4 ou 5 jours. Des comptages aussi longs constituent un obstacle sérieux pour l'exploitation du test en routine.

Le ^{59}Fe émet également un rayonnement β (énergie maximum de 0,17 et 0,46 MeV) favorable aux mesures de radioactivité par scintillation liquide. Cette dernière méthode n'a pas été retenue jusqu'à présent car elle exige généralement de longues manipulations pour la préparation des échantillons à compter. De plus, l'incorporation de volumes importants de plasma dans un milieu scintillant non polaire est difficile.

C'est donc surtout pour le ^{55}Fe , émetteur X mou (0,0059 MeV) que le procédé a été appliqué pour le comptage en simple ou double marquage avec le ^{59}Fe (2, 4, 5, 9). Cependant, les différentes techniques proposées sont fastidieuses et rendent leur utilisation sur une grande échelle très malaisée.

L'emploi du triton X-100 comme agent émulsifiant pour la mesure d'homogénats de tissus a été décrit pour la première fois par Meade et Stiglits en 1962 (10). Cette technique qui n'a retenu que peu l'attention à l'époque a été récemment reprise en détails par différents auteurs (1, 2, 8, 13, 15).

Le présent article a pour but de montrer que cette substance peut être avantageusement utilisée pour le comptage du radiofer dans de grands volumes de plasma.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Toutes les mesures ont été faites sur un spectromètre Inter-technique ABAC SL 40 avec amplificateur logarithmique commun aux différents canaux. Le calculateur intégré de l'appareil permet l'introduction en mémoire des courbes de correction du quenching sous forme de polynome du troisième degré et fournit automatiquement l'activité d'un échantillon quelconque en d.p.m. (désintégrations par minute). La même information peut être imprimée sur bande perforée.

Au cours des essais, l'amplificateur logarithmique de l'appareil a été connecté à un analyseur multicanaux afin de visualiser les spectres. Des fioles de verre d'une capacité de 20 ml et de faible teneur en ^{40}K ont été utilisées.

Le plasma hépariné est pipeté directement dans les fioles à scintillation et incubé en présence de radiofer pendant 1/2 heure à 37°C afin de permettre la fixation de l'isotope sur la transférine. Le liquide scintillant est ensuite ajouté à température ordinaire et le mélange agité vigoureusement à la main. Les fioles sont placées immédiatement dans le réfrigérateur de l'appareil et agitées à nouveau 3 fois pendant le début de la période d'équilibration thermique (1 heure). Le comptage se fait à 4°C (16).

RÉSULTATS

Choix d'un milieu scintillant.

Après réfrigération, la préparation doit présenter les qualités suivantes :

- stabilité de l'émulsion,

- taux de comptage en fonction du temps,
- rendement élevé.

En faisant varier les proportions de plasma, de triton et de toluène dans 50 mélanges différents, tout en conservant une concentration de PPO de 5,5 g et de POPOP de 0,1 g par litre de triton-toluène, nous avons obtenu pour le ^{59}Fe un rendement et une stabilité optimum avec la composition suivante :

Plasma hépariné	: 21,1 %
Triton X-100	: 26,3 %
Toluène	: 52,6 %

En pratique, ce mélange correspond à 4 ml de plasma additionné de 15 ml de triton-toluène (1/3-2/3). L'émulsion obtenue, d'aspect laiteux, est parfaitement stable à 4°C et son taux de comptage reste constant pour le ^{59}Fe pendant une semaine au moins.

Le butyl PBD, scintillateur secondaire réputé pour sa résistance au quenching, a également été testé sur ce mélange à des concentrations variant entre 5 et 15 g/l de triton-toluène. Pour le ^{59}Fe , le rendement n'est pas supérieur à celui obtenu en PPO/POPOP. Il est inférieur pour le ^{55}Fe .

Décoloration des échantillons.

La teinte de l'émulsion dépend de l'intensité initiale de la coloration du plasma. L'adjonction de quelques gouttes d'eau oxygénée à 30 % ne donne pas de résultat satisfaisant.

Le meilleur agent décolorant est le peroxyde de benzoyle en solution dans le triton-toluène (1/3-2/3) à la concentration de 10 g pour 100 ml. Deux gouttes de cette solution suffisent pour 4 ml d'un plasma normal. Il en résulte une élévation appréciable du rendement (fig. 1 et 2).

Correction de l'affaiblissement lumineux (quenching).

Même si c'est toujours l'activité plasmatique d'un même malade qui est mesurée au cours d'un test, l'affaiblissement lumineux des différents échantillons ne reste pas nécessairement constant. La composition du plasma peut varier au cours des 15 jours de l'épreuve, particulièrement sa coloration et sa transparence, qui peuvent se modifier de façon sensible d'un jour à l'autre.

Plutôt que de quencher un pool unique de plasma par des concentrations variables d'une substance affaiblissante, il est préférable d'utiliser une large gamme de prélèvements sanguins provenant d'individus sains et d'individus atteints de diverses affections modifiant la composition plasmatique. A partir de cet échantillonnage, la correction de l'affaiblissement lumineux par la mesure du rapport des voies donne d'excellents résultats. Dans ce cas cependant, un temps de comptage trop court conduirait pour des activités faibles à une mauvaise statistique sur le rapport des voies, particulièrement dans des expé-

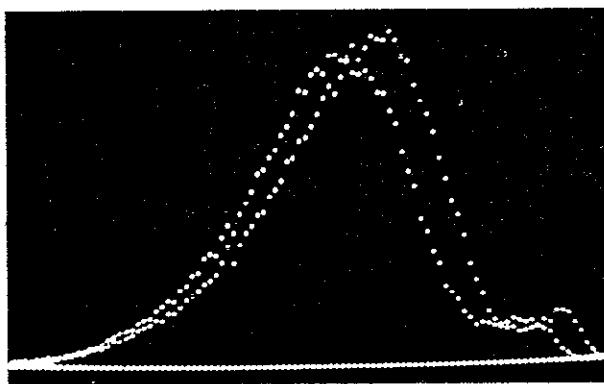


Fig. 1. — Spectre β du ^{59}Fe en plasma normal avant et après action du peroxyde de benzoyle. L'enregistrement a été obtenu en connectant la sortie de l'amplificateur logarithmique du spectromètre à un analyseur multicanaux.

Après décoloration, déplacement du spectre vers les hautes énergies, et sommet plus élevé. L'élévation de rendement obtenue avec des plasmas normaux se situe entre 3 et 9 %. Elle peut atteindre 20 % pour des plasmas très colorés.

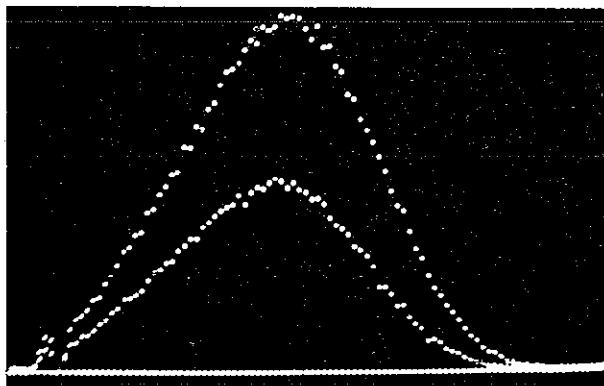


Fig. 2. — Spectre du ^{55}Fe en plasma normal avant et après action du peroxyde de benzoyle. Le rendement est pratiquement doublé.

riences en double marquage. C'est la raison pour laquelle la correction du quenching par étalonnage externe a été étudiée. Bien qu'elle soit théoriquement critiquable dans les cas d'émulsions (1), son application à la correction de l'activité plasmatique repose sur les hypothèses suivantes :

- l'affaiblissement lumineux secondaire aux effets purement chimiques varie peu ;
 - la plupart des variations sont en rapport avec la couleur de l'émulsion ;
 - la réduction d'efficacité non dépendante de la coloration est due pour la plus large part à l'auto-absorption.
- Celle-ci ne doit pas beaucoup se modifier si la préparation des échantillons est correcte.

De fait, pour une série de plasmas normaux ou pathologiques, on observe que les points exprimant le rendement en fonction du rapport de standardi-

sation externe définissent une courbe continue pour le ^{59}Fe . Cette courbe est reproductible et traitable par un polynôme du 3^e degré.

Rendement du comptage en scintillation liquide.

Le rendement du ^{59}Fe se situe régulièrement entre 81 et 83 % pour des plasmas normalement colorés au départ. Dans les mêmes conditions, le rendement du ^{55}Fe est de l'ordre de 7 %.

CONCLUSION

C'est avant tout sur l'allure de la décroissance de la radioactivité plasmatique qu'ont été élaborés les modèles mathématiques complexes quantifiant la cinétique du fer et de l'érythropoïèse (3, 11, 14). La précision du tracé dépend du nombre de points expérimentaux et de la confiance que l'on peut accorder à chacun de ces points. Habituellement, la courbe est suffisamment jalonnée par les nombreux prélèvements réalisés lors des études cinétiques complètes. Compte tenu du faible niveau d'activité plasmatique, c'est donc la précision statistique des mesures tardives qu'il convient d'améliorer. Bien que nous l'utilisons dans ce but depuis deux ans (7), le triton X-100 a été récemment recommandé pour l'étude du radiofer (2). Cependant, les auteurs l'emploient pour le comptage du sang total, et les manipulations restent complexes.

Par contre, notre méthode fournit pour le ^{59}Fe un rendement qui dépasse toutes les valeurs citées jusqu'à présent dans la littérature. Par rapport aux techniques classiques, l'efficacité exceptionnelle du comptage permet d'accélérer les mesures tout en augmentant leur précision, de diminuer le volume des prélèvements (test au fer chez l'enfant), ou de réduire la dose injectée et par conséquent l'irradiation du sujet.

La scintillation liquide s'indique donc pour l'analyse quantitative des échanges du fer dans l'organisme (décomposition de la courbe de clearance en une somme d'exponentielles, étude de la densité de séjour des particules de fer dans différents compartiments, etc.). La sortie des résultats sur bande perforée se prête très bien au traitement direct des données par ordinateur. Sur le plan pratique, les manipulations sont presque aussi simples qu'en scintillation solide et de dépassent pas quelques minutes par échantillon (6).

La méthode peut être utilisée pour tout isotope β énergétique dont on désire suivre la trace dans le plasma ou le sérum. Le comptage du ^{55}Fe , plus délicat en raison de son émission X, mérite des investigations complémentaires.

REMERCIEMENTS.

Nous remercions vivement M. C. PALAIS (Intertechnique, Plaisir, France) pour ses conseils éclairés et M. L. BALDELLI pour sa collaboration technique.

USE OF TRITON X-100 FOR HIGH EFFICIENCY LIQUID SCINTILLATION COUNTING OF PLASMA Fe⁵⁹

by G. FILLET

Institut de Médecine, Département de Clinique et de Pathologie Médicales

(Pr H. Van CAUWENBERGE, Pr Associé J. HUGUES),

Université de Liège, Hôpital de Bavière,

66, bd de la Constitution, 4 000 - Liège (Belgique)

(Path.-Biol., 1972, 20, no 5-6, 227-230)

SUMMARY. — A new method for liquid scintillation counting of plasma ⁵⁹Fe is presented. Using Triton X-100 as an emulsifying agent at 4°C, the efficiency is in the 81-83 % range and is five times greater than that achieved with crystal systems. Without previous manipulation, volumes as great as 4 ml of plasma may be directly incorporated into the scintillation medium and counted with good reproducibility. Bleaching procedure and quench correction are discussed. The method allows a more precise study of iron kinetics and erythropoiesis in humans.

Key-words : Iron isotopes * blood. — Radioisotope scanning. — Surface-active agents. — Kinetics. — Erythropoiesis. — Methods. — Spectrophotometry.

RÉFÉRENCES

1. BENSON R. H., 1966. — Limitation of tritium measurement by liquid scintillation counting of emulsion. *Analyt. Chem.*, 38, 1353-1356.
2. CAMPBELL C. B., POWELL L. W., 1970. — Use of triton X-100 in a simple method for the simultaneous assay of ⁵⁵Fe and ⁵⁹Fe by liquid scintillation counting. *J. clin. Path.*, 23, 304-309.
3. COOK J. D., MARSAGLIA G., ESCHBACH J. W., FUNK D. D., FINCK C. A., 1970. — Ferrokinetics : a biological model for plasma iron exchange in man. *J. clin. Invest.*, 49, 197-205.
4. DERN R. J., HART W. L., 1961. — Studies with doubly labeled iron. — I. Simultaneous liquid scintillation counting of isotopes ⁵⁵Fe and ⁵⁹Fe as ferrous perchlorate. *J. Lab. clin. Med.*, 57, 322-330.
5. EAKINS J. D., BROWN D. A., 1966. — An improved method for the simultaneous determination of iron 55 and iron 59 in blood by liquid scintillation counting. *Int. J. appl. Radiat.*, 17, 391-397.
6. FILLET G., 1971. — Routine liquid scintillation counting technique for plasma ⁵⁹Fe. *J. nucl. Med.*, 12, 270.
7. FILLET G., 1970. — Exposé présenté à la 12^e Table ronde sur l'Exploration fonctionnelle par les isotopes radioactifs. (Strasbourg, mai 1970).
8. GREEN R. C., PATTERSON M. S., ESTES A. M., 1966. — Use of alkylphenol surfactants for liquid scintillation counting of aqueous tritium samples. *Analyt. Chem.*, 38, 2035-2037.
9. KATZ J. H., ZOUKIS M., HART W. L., DERN R. J., 1964. — A simplified procedure for the simultaneous assay of ⁵⁵Fe and ⁵⁹Fe in a liquid scintillation system. *J. Lab. clin. Med.*, 63, 885-893.
10. MEADE R. C., STIGLITZ R. A., 1962. — Improved solvent systems for liquid scintillation counting of body fluids and tissues. *Int. J. appl. Radiat.*, 13, 11-14.
11. NAJÉAN Y., DRESCH C., ARDAILLOU N., BERNARD J., 1967. — Iron metabolism. Study of different kinetic models in normal conditions. *Amer. J. Physiol.*, 213, 533-546.
12. NAJÉAN Y., ARDAILLOU N., DRESCH C., TUBIANA M., 1965. — Technique d'étude de l'érythropoïèse à l'aide du fer radioactif. *Rev. franç. Etud. clin. biol.*, 10, 321-331.
13. PATTERSON M. S., GREENE R. C., 1965. — Measurement of low energy β -emitters in aqueous solution by liquid scintillation counting of emulsions. *Analyt. Chem.*, 37, 854-857.
14. POLLYCOVE M., MORTIMER R., 1961. — The quantitative determination of iron kinetics and hemoglobin synthesis in human subjects. *J. clin. Invest.*, 40, 753-782.
15. VAN DER LAARSE J. D., 1967. — Experiment with emulsion counting of tritium. *Int. J. appl. Radiat.*, 18, 485-491.
16. WILLIAMS P. M., FLORKOWSKI T., 1967. — Radioactive dating and methods of low level counting. I.A.E.A., Vienne, 703.

