Photometrische Bestimmung der Myeloperoxydase mittels *p*-Phenylendiamin

Von W. VORMITTAG und H. PIETSCHMANN

Aus der II. Medizinischen Universitätsklinik in Wien (Vorstand: Prof. Dr. K. Fellingner)

(Eingegangen am 26. Januar 1970)

In einem photometrisch-kinetischen Test unter Verwendung von *p*-Phenylendiamin als Wasserstoffdonator wurde eine Reihe kinetischer Parameter sowohl für die Myeloperoxydase als auch für die Meerrettichperoxydase untersucht.

Unter bestimmten Versuchsbedingungen erwies sich die einfach und rasch durchführbare Methode zur Bestimmung des Peroxydasegehaltes der Leukocyten des peripheren Blutes als sehr geeignet. Bei zehn ausgewählten Patienten führte der Peroxydasegehalt pro myeloischer Zelle zu einer durchschnittlichen Extinktionsänderung von dE/dt ($t = 15$ Sek.) $= 4,23 \pm 1,14 \cdot 10^{-7}$; dieser Wert entsprach der Aktivität von $0,2777 \pm 0,152$ ng Meerrettichperoxydase.

The photometric determination of myeloperoxidase with p-phenyldiamine

The kinetics of myelo- and horseradish peroxidase have been investigated by means of a photometric-kinetic test using *p*-phenyldiamine as the H-Donor. Under certain conditions this assay seemed very suitable for the estimation of the peroxidase content of the peripheral blood leucocytes. A mean value of dE/dt ($t = 15$ sec) $= 4.23 \pm 1.14 \cdot 10^{-7}$ ($= 0.2777 \pm 0.152$ ng horseradish peroxidase) per single myeloid cell was found in ten patients.

Bei hoher Substratspezifität (H_2O_2 , Methyl- und Äthylperoxid) besitzen die Peroxydasen ein weites Spektrum oxydabler H-Donatoren: Amine, Phenole, Guajakol, Leukofarbstoffe usw. Die Oxydationsgröße dieser Verbindungen ist für die einzelnen Peroxydasearten verschieden. *p*-Phenylendiamin kann von der Myeloperoxydase der Leukocyten sehr leicht oxydiert werden (1). *p*-Phenylendiamin wurde jedoch, soweit uns bekannt, für quantitativ biochemische Bestimmungen nur zum Nachweis peroxydatischer Aktivität in Milch und Gewebehomogenaten verwendet (2). Da es sich dabei um eine einfach und rasch durchführbare Methode handelt (2), sollte ihre Verwendbarkeit zur Bestimmung des Myeloperoxydasegehaltes der Leukocyten des peripheren Blutes untersucht werden. Dies schien uns besonders deshalb angezeigt, weil die Funktion dieses Fermentes trotz der sehr hohen Konzentration in den Granulocyten derzeit noch weitgehend unklar ist (3).

Methodik

Bereitung der Enzymproben: Zur Isolierung der Leukocyten wurden etwa 15 ml Heparinblut (bei sorgfältiger Präparation sind wenige ml ausreichend) zur Spontansedimentation bei Raumtemperatur aufgestellt. Nach ungefähr $1\frac{1}{2}$ Std. wurde das überstehende Plasma abpipettiert. Restliche Erythrocyten wurden durch osmotischen Schock (30 Sek.) entfernt, die Leukocyten bei niedriger Tourenzahl (110 g) abzentrifugiert und in 3 bis 5 ml 0,9proz. NaCl-Lösung suspendiert. Die Leukocytenzahl wurde durch Mehrfachzählung in der BÜRKER-TÜRKSCHE Zählkammer bestimmt und anschließend auf 5000—10000 Leukocyten/mm³ eingestellt. Die Homogenisierung der Leukocytenisolate erfolgte mittels eines Ultra-Turrax (Typ 18/2; Janke & Kunkel KG.). Es wurden jeweils 2 ml Suspension eingesetzt und 2 mal 60 Sek. im Eisbad homogenisiert.

Für die Berechnung des Myeloperoxydasegehaltes/myeloische Zelle wurden die Leukocytenisolate nach MAY-GRÜNWALD-GIEMSA gefärbt und jeweils 500 Zellen ausdifferenziert.

Photometrische Bestimmung¹⁾:

Verwendete Reagenzien und Herstellung der Lösungen:

1. Wasserstoffperoxid, 30proz. (w/v)
2. *p*-Phenylendiamin
3. Kaliumdihydrogenphosphat nach SÖRENSEN
4. Di-Natriumhydrogenphosphat-2-Hydrat nach SÖRENSEN.

a) Wasserstoffperoxid (6 mM)

Stammlösung (30 mM): 0,66 ml 30proz. H_2O_2 -Lösung mit bidest. Wasser auf 200 ml verdünnen. Genaue Einstellung auf 0,03M (10 ml $0,03$ M $H_2O_2 \cong 6$ ml $0,1$ N $KMNO_4$). Stammlösung vor Gebrauch mit bidest. Wasser im Verhältnis 1:5 verdünnen (1 Teil Stammlösung + 4 Teile bidest. Wasser).

b) *p*-Phenylendiaminlösung (1proz. w/v) Fa. British Drug Houses Ltd., Vertr. Schneider Chemie.

100 mg *p*-Phenylendiamin in 10 ml heißem bidest. Wasser lösen, filtrieren und rasch abkühlen.

c) Phosphatpuffer 1/15M, pH 7,3

M/15 KH_2PO_4 : 9,078 g/l

M/15 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$: 11,876 g/l

77,7 Vol.-% M/15 Di-Natriumhydrogenphosphat im Gemisch.

Bestimmungsansatz

Meßstrahlung 492 nm (Photometer Eppendorf)

Meßtemperatur 25° (thermokonstanter Küvettenhalter)

Meßvolumen 3 ml, Schichtdicke 1 cm.

Nacheinander in die Küvette pipettieren:

1. 2,5 (5) ml Phosphatpuffer pH 7,3 (c)
2. (0,05) 0,1 ml Leukocytenhomogenat
3. 0,2 ml *p*-Phenylendiaminlösung (b)
4. 0,2 ml H_2O_2 -Lösung (a);

rasch (etwa 3 Sek.) mischen und Extinktionszunahme alle 5 Sek. 15—30 Sek. lang messen. — Die Peroxydaseaktivität ergibt sich als dE/dt .

¹⁾ Bei der Herstellung der Lösungen wurde gegenüber den Angaben von H. LÜCK (2) lediglich die H_2O_2 -Konzentration geändert.

Standardmethoden für biochemische Trennungen

Gelfiltration mit Sephadex und Sepharose

zur Trennung von Molekülen bis MW 40×10^6 . Die Gelfiltration

gestattet Trennungen labiler biologischer Substanzen unter sehr schonenden Bedingungen.

Ionenaustauscher-Chromatographie mit Sephadex-Ionenaustauschern,

die die Vorzüge von Cellulose- und Kunstharzaustauschern ver-

einigen. Charakteristisch sind hohe Kapazität, niedrige unspezifische Adsorption und ausgezeichnete Reproduzierbarkeit.

Verteilung in wäßrigen Phasen-Systemen mit Dextran und Dextran-Derivaten

zur Fraktionierung sehr hochmolekularer Stoffe wie Viren, Nukleinsäuren und Zellpartikeln unter sehr milden Bedingungen.

Chromatographierohre.

Unsere Chromatographierohre, die wir speziell für Gelfiltration und Ionenaustausch-Chromato-

graphie entwickelt haben, ermöglichen reproduzierbare Trennergebnisse. Sie stehen Ihnen in großer Auswahl mit diversem Zubehör zur Verfügung.

Literaturdienst

Als Hilfe für Wissenschaftler geben wir einen umfassenden Literaturdienst heraus. Eine jährlich erscheinende Referenzliste enthält etwa 1000 neue

Literaturstellen. Bitte schreiben Sie uns, wenn wir Sie in unseren Verteiler aufnehmen sollen. Fordern Sie auch Broschüren über unsere Separationsprodukte und das Literaturverzeichnis an.

Deutsche Pharmacia GmbH
6 FRANKFURT AM MAIN 50
Kurhessenstraße 95
Haus am Schwalbenschwanz

Pharmacia

AMINOSÄUREN-ANALYSATOR

LC 4010

ein Analysator, der den Anforderungen eines modernen Laborbetriebes für Forschung und Routine gerecht wird.

Baukastenprinzip

- * leicht austauschbare Baueinheiten
- * keine Raumprobleme
- * einfache Bedienung

Zwei-Kanal-Photometer

höchster Präzision · 10 mm Küvette · 5 nmol geben einen Ausschlag von 0,05 Extinktions-einheiten · garantierte Lampenbrenndauer ohne Abfall 2000 Stunden

Matrix-Programmer

Einfache und genaue Probenaufgabe mit Injektor

Interessante Ausbaumöglichkeiten:

- * UV-Photometer 280 + 254 nm
- * Probengeber für 10 und 20 Proben
- * Präparativsystem
- * Elektronischer Integrator

Unser Applikationslabor in Frankfurt wird Sie gerne von der Leistungsfähigkeit überzeugen.

Teilen Sie uns einen Termin mit, wir sind immer für Sie da.

BIOTRONIK

Wissenschaftliche Geräte GmbH

6 Frankfurt/Main,
Borsigallee 22, Tel. 0611/4112-16

8 München 13, Dewetstraße 13, Tel. 0811/35 69 31 · 4 Düsseldorf, Erich-Klausener-Straße 55, Tel. 0211/431423

Magnetrührer

in dreizehn verschiedenen Variationen.

Zum Beispiel:

Kleinmagnetrührer, Combimag Magnetrührer ohne Heizung, mit Heizplatte und Heizwart, mit Heizplatte und transistorgesteuertem Kontaktthermometer - Anschluß, mit Leuchtplatte, mit rheostatischer Drehzahlregelung, mit mechanischer Drehzahlregelung und sogar vollelektronische.

Informationsmaterial liegt für Sie bereit.

Wir
stellen vor:

IKA-WERK · JANKE & KUNKEL KG

Chemisch physikalische Geräte, Apparate u. Maschinen

7813 Staufen / Br., Neumagenstr. 16, Tel. 07633/6036
Telex 772922

Kontrollansätze: Die Extinktionsänderung ohne Zusatz von H_2O_2 betrug im Durchschnitt 1,7% des H_2O_2 -haltigen Ansatzes. Ohne Zusatz von *p*-Phenylendiamin ergab sich keine Extinktionsänderung.

Meerrettichperoxydase

Verwendet wurde gereinigte Meerrettichperoxydase der Fa. Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim (Nr. 15301 EPAA). Am oben angeführten Bestimmungsansatz der Myeloperoxydase wurde zur Bestimmung der Meerrettichperoxydase-Standardkurve lediglich der pH-Bereich des Phosphatpuffers auf pH 5,2 geändert.

Ergebnisse

Einfluß der Homogenisierungsdauer auf die Myeloperoxydase-Aktivität der Leukocytenhomogenate

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, wurde die höchste Aktivität nach einer Homogenisierungsdauer von 2mal 60 Sek. erreicht. Das eingesetzte Volumen der Leukocyten suspension betrug 2 ml, die Zellzahl lag zwischen 4400 und 12000 Leukocyten/ mm^3 . Längere Homogenisierungsdauer führte in einzelnen Fällen zu geringem Aktivitätsverlust. Bei einer Zellzahl unter 5000/ mm^3 wurde das Aktivitätsmaximum schon nach einer Homogenisierungsdauer von 60 Sek. erreicht.

Tab. 1

Einfluß der Homogenisierungsdauer auf die Myeloperoxydase-Aktivität

Proband Nr.	Extinktionsänderung dE/dt nach Homogenisierungsdauer in Sek.						Zellzahl pro mm^3
	20	40	60	120	180	240	
1	0,15	0,30	0,365	0,37	0,37	0,37	8100
2	0,20	0,25	0,34	0,35	0,35	0,34	9000
3	0,17	0,31	0,44	0,50	0,50	0,47	7500
4	0,27	0,37	0,39	0,39	0,385	0,39	4400
5	0,155	0,35	0,44	0,47	0,435	0,43	8000
6	0,29	0,37	0,39	0,435	0,42	0,42	6500
7	0,19	0,34	0,39	0,42	0,40	0,40	12000

Kinetische Untersuchungen

Es wurde eine Reihe von Versuchsbedingungen, welche die *p*-Phenylenumsetzung beeinflussen, sowohl für die Myeloperoxydase als auch für die Meerrettichperoxydase geprüft.

Myeloperoxydase

Zeitumsatzkurve und Abhängigkeit der Aktivität vom pH

Der Verlauf der Zeitumsatzkurve ist vom pH abhängig (Abb. 1). Bei pH 7,3 nimmt die Extinktionsänderung $dE/5$ Sek. schon während der ersten 15 Sek., wenn auch nur gering, so doch stetig ab. Lediglich bei pH 6,6 verläuft die Reaktion während der ersten 10 Sek. linear. Bei pH 7,8 und pH 8,0 ist die Extinktionsänderung der ersten 5 Sek. kleiner als die nächst folgenden Meßwerte.

Die Extinktionsänderung nach 15 Sek. ist bei pH 8,0 eben so groß wie bei pH 5,4. Nach einer Versuchsdauer von 30 Sek. ist jedoch der im Alkalischen gemessene Wert bereits wesentlich höher; dieser Unterschied wird bis zum Versuchsende immer größer (Abb. 2a).

Dementsprechend ist der Verlauf der pH-Aktivitätskurven je nach Reaktionsdauer verschieden (Abb. 2a und 2b). Nach 5 Sek. sind 2 Aktivitätsgipfel, und zwar bei

Abb. 1

Zeitumsatzkurven bei verschiedenen pH-Versuchsbedingungen: M/15 Phosphatpuffer; *p*-Phenylendiamin-Endkonzentration 6,13 mM; H_2O_2 -Endkonzentration 0,4 mM; 100 μl Leukocytenhomogenat (5000 Leukocyten/ mm^3).

Abb. 2a

Verlauf der pH-Aktivitätskurven in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Messung. Versuchsbedingungen: M/15 Phosphatpuffer; *p*-Phenylendiamin-Endkonzentration 6,13 mM; H_2O_2 -Endkonzentration 0,4 mM; Enzymmenge 100 μl Leukocytenhomogenat (Zellzahl 5000/ mm^3).

Abb. 2b

Verlauf der pH-Aktivitätskurve nach einer Meßdauer von 5 Sek. Versuchsbedingungen: siehe Abb. 2a

pH 5,6—6,0 und bei pH 7,2—7,4 zu erkennen (Abb. 2b). Bei weiterer Beobachtung zeigt sich nur mehr das Aktivitätsoptimum im alkalischen Bereich. Der Aktivitätsverlust bei pH-Werten über 7,4 wird jedoch mit zunehmender Versuchsdauer gegenüber der Aktivitätszunahme von pH 5,2—7,3 immer geringer.

Abhängigkeit der Reaktion von der H_2O_2 -Konzentration

Die Zeiteinsatzkurven sind auch, wie aus Abbildung 3 ersichtlich, je nach H_2O_2 -Konzentration verschieden. Dies ist zum Teil auf eine durch überschüssiges H_2O_2 verursachte Hemmung der Myeloperoxydase zurückzuführen. Das Ausmaß des Hemmeffektes ist von der Versuchsdauer abhängig (Abb. 4). Bei einer Endkonzentration von 0,1 mM (Zusatz von 0,05 ml der 6 mM H_2O_2 -Lösung) wird der maximale Extinktionswert schon nach 90 Sek. erreicht, da die H_2O_2 -Konzentration den Umsatz limitiert. Die optimale Substratkonzentration ist von der Meßdauer unabhängig und liegt unter den angegebenen Bedingungen bei 0,4 mM (Zusatz von 0,2 ml der 6 mM H_2O_2 -Lösung) (Abb. 3 und Abb. 4).

Abb. 3

Abhängigkeit der Myeloperoxydaseaktivität von der H_2O_2 -Konzentration: Zeiteinsatzkurven. Bedingungen: M/15 Phosphatpuffer; pH 7,3; *p*-Phenylendiamin-Endkonzentration 6,13 mM; H_2O_2 -Konzentration 0,1—0,6 mM; Enzymmenge 50 μ l Leukocytenhomogenat (Zellzahl 11500/mm³)

Abb. 5

Abhängigkeit der Reaktionsgröße dE/dt ($t = 15$ Sek. und 30 Sek.) von der *p*-Phenylendiaminkonzentration. Bedingungen: M/15 Phosphatpuffer pH 7,3; H_2O_2 -Endkonzentration 0,4 mM; *p*-Phenylendiamin-Konzentration von 3,07—36,8 mM; Enzymmenge 100 μ l Leukocytenhomogenat (Leukocytenzahl 4000/mm³)

Abhängigkeit der Reaktion von der *p*-Phenylendiaminkonzentration

Unter den gewählten Bedingungen wird die *p*-Phenylendiamin-Sättigungsdosis bei Zusatz von 0,5 ml einer 2proz. *p*-Phenylendiaminlösung (30,7 mM Endkonzentration) erreicht, und zwar sowohl für eine Versuchsdauer von 15 Sek. als auch von 30 Sek. (Abb. 5). Die eingesetzte Enzymmenge führte dabei zu einer Extinktionsänderung von $dE/15$ Sek. = 0,33. Unter Standardbedingungen (0,2 ml einer 1proz. *p*-Phenylendiaminlösung) führt dieselbe Enzymkonzentration zu einer Extinktionsänderung von 0,15. Als Michaeliskonstante K_m ergibt sich eine *p*-Phenylendiamin-Endkonzentration von 7,36 mM.

Abhängigkeit der Reaktion von der Enzymkonzentration

Bei Einsatz von 25—200 μ l Probe aus Leukocyten-suspensionen mit einer Zellzahl zwischen 5500 und 6500 Zellen/mm³ war die Extinktionszunahme der Enzymkonzentration unter den gewählten Bedingungen während der ersten 15 Sek. direkt proportional. Bei einer Versuchsdauer von 30 Sek. kam es ab $dE/30$ Sek. größer als 0,45 zur Abweichung von der Linearen (Abb. 6).

Abb. 4

Abhängigkeit der Myeloperoxydaseaktivität von der H_2O_2 -Konzentration. Beobachtungsdauer 15—120 Sek. Bedingungen siehe Abb. 3

Abb. 6

Abhängigkeit der Extinktionsänderung dE/dt von der Myeloperoxydasekonzentration. Versuchsbedingungen: M/15 Phosphatpuffer pH 7,3; *p*-Phenylendiamin-Endkonzentration 6,13 mM; H_2O_2 -Endkonzentration 0,4 mM; Enzymkonzentration: 25—200 μ l Leukocytenhomogenat (Zellzahl 5500/mm³)

Meerrettichperoxydase

Zur Bestimmung einer Standardkurve wurden entsprechende Untersuchungen auch für Meerrettichperoxydase durchgeführt. Das pH-Optimum lag für Meerrettichperoxydase bei pH 5,2–5,4 (Abb. 7). Die Aktivitätsabnahme bei steigendem pH wurde mit zunehmender Versuchsdauer immer größer. Der Bereich des pH-Optimum blieb bis zu einer Versuchsdauer von 120 Sek. unverändert.

Bei Einsatz von 0,2 μg Meerrettichperoxydase wurde die *p*-Phenylendiamin-Sättigungsdosis unter den angeführten Bedingungen bei einer Konzentration von 3,07 mM erreicht (0,1 ml einer 1proz. *p*-Phenylendiamin Lösung) (Abb. 6).

Bei steigender H_2O_2 -Konzentration (Endkonzentration 0,1 mM bis 1,0 mM) war bei Einsatz von 0,2 μg Meerrettichperoxydase keine Hemmung der Aktivität zu erkennen. Bei Einsatz von 0,1 μg wurden nach Zusatz von 0,3 ml, 0,4 ml und 0,5 ml H_2O_2 -Lösung (6 mM) die gleichen Extinktionsänderungen gemessen (Abb. 9a, 9b und 9c).

Standardkurve: Zur Bestimmung der dE/dt Abhängigkeit von der eingesetzten Meerrettichperoxydasemenge wurde im Bestimmungsansatz der Myeloperoxydase (siehe Methodik) nur der pH-Bereich entsprechend dem pH-Optimum der Meerrettichperoxydase geändert. Die Aktivitätskurven für eine Versuchsdauer von 15 Sek. und 30 Sek. sind in Abbildung 10 dargestellt. Es sind dies die Bezugskurven für die Angaben der Myeloperoxydaseaktivität in ng Meerrettichperoxydase.

Peroxydasegehalt myeloischer Zellen des peripheren Blutes

Unter den eingangs angeführten Versuchsbedingungen wurde der Myeloperoxydasegehalt/myeloischer Zelle bei zehn Patienten im Alter von 18–76 Jahren, deren Blut-

Abb. 7

Verlauf der pH-Aktivitätskurve in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Messung. Bedingungen: m/15 Phosphatpuffer; pH 7,3; *p*-Phenylendiamin-Endkonzentration 6,13 mM; H_2O_2 -Endkonzentration 0,4 mM; Enzymmenge 0,1 μg Meerrettichperoxydase

Abb. 8

Abhängigkeit der Reaktionsgröße dE/dt ($t = 15$ Sek.) von der *p*-Phenylendiaminkonzentration. Bedingungen: m/15 Phosphatpuffer pH 5,2; H_2O_2 -Endkonzentration 0,4 mM; Enzymmenge 0,2 μg Meerrettichperoxydase; *p*-Phenylendiamin-Endkonzentration von 0,765 bis 6,13 mM

Abb. 9a

Abhängigkeit der Aktivität der Meerrettichperoxydase von der H_2O_2 -Konzentration. Meßdauer 15 Sek. und 30 Sek.; Bedingungen: m/15 Phosphatpuffer pH 5,2; *p*-Phenylendiamin-Endkonzentration 6,13 mM; H_2O_2 -Endkonzentration von 0,1–1,0 mM; Enzymkonzentration 0,1 und 0,2 μg Meerrettichperoxydase/Ansatz

Abb. 9b

Zeitumsatzkurven bei verschiedener H_2O_2 -Konzentration. Bedingungen: m/15 Phosphatpuffer pH 5,2; *p*-Phenylendiamin-Endkonzentration 6,13 mM; Enzymkonzentration 0,2 μg Meerrettichperoxydase; H_2O_2 -Endkonzentration von 0,1–1,0 mM

Abb. 9c

Zeitumsatzkurven bei verschiedener H_2O_2 -Konzentration. Enzymkonzentration 0,1 μg Meerrettichperoxydase; i. ü. gegenüber Legende zu Abb. 9b unverändert.

Tab. 2
Peroxydasegehalt myeloischer Zellen des peripheren Blutes

Proband Nr.	Alter (Jahre)	Geschlecht	Diagnose	Myeloperoxydasegehalt $dE/dt (t = 15 \text{ Sek}) \cdot 10^{-7}$	pro myeloischer Zelle entspr. ng Meerrettich- peroxydase
1	39	♀	Ulcus duodeni	2,20	0,125
2	57	♂	Dumping Syndrom	3,05	0,227
3	56	♀	Diabetes mellitus	3,10	0,195
4	76	♀	Osteoporose	4,44	0,288
5	38	♀	Gastritis	4,37	0,292
6	68	♀	Mitralstenose	4,46	0,298
7	61	♀	Myocardinfarkt	4,92	0,366
8	73	♀	Adipositas	5,00	0,433
9	18	♀	Anorexia nervosa	6,15	0,630
10	27	♂	Gastritis	4,70	0,410

Abb. 10

Abhängigkeit der Extinktionsänderung dE/dt ($t = 15$ Sek. und 30 Sek.) von der Meerrettichperoxydase-Konzentration. Bedingungen: $M/15$ Phosphatpuffer pH 5,2; p -Phenylendiamin-Endkonzentration 6,13 mM; H_2O_2 -Endkonzentration 0,4 mM; Meerrettichperoxydase-Konzentration von 0,05–0,4 μ g Meerrettichperoxydase

bild der Norm entsprach, bestimmt (Tab. 2). Es fand sich ein durchschnittlicher Wert von $dE/15 \text{ Sek.} = 4,23 \pm 1,14 \cdot 10^{-7}$; dies entsprach der Aktivität von $0,277 \pm 0,152 \text{ ng Meerrettichperoxydase}$.

Diskussion

Zur quantitativen Bestimmung der Peroxydaseaktivität kann der Substratverbrauch oder die Oxydation eines H-Donators herangezogen werden: Guajakol (3, 12, 9), Leukofarbstoffe (10, 16), α -Naphthol-Benzidin (4), Dimethyl- p -Phenylendiamin (14, 6), Pyrogallol (15) usw. p -Phenylendiamin wurde schon von K. AGNER, der als erster die Peroxydase der Leukocyten isolierte, als leicht oxydabler H-Donator der Myeloperoxydase beschrieben (1). Es wird dabei in eine farbige Molekülverbindung aus Diamin und Diimin umgewandelt (2). p -Phenylendiamin wurde bis jetzt, soweit uns bekannt, für quantitative Messungen nur zur Bestimmung der Peroxydase in Milch und Gewebehomogenaten verwendet (2, 7, 13, 14). Unter bestimmten Versuchsbedingungen erwies sich nun diese photometrische Bestimmungsmethode auch zur quantitativen Er-

fassung der Myeloperoxydase sehr geeignet: Innerhalb bestimmter Grenzen herrscht strenge Linearität zwischen Enzymkonzentration und Extinktionsänderung, die Durchführung der Messung erfolgt rasch und einfach.

Die Enzymkonzentration ergibt sich als dE/dt . Da gereinigte Myeloperoxydase kaum erhältlich ist, wurde zur Gewinnung einer Standardkurve Meerrettichperoxydase verwendet (siehe l. c. (9)). Myeloperoxydase und Meerrettichperoxydase sind jedoch nicht nur in ihren physikalischen Eigenschaften, sondern auch in ihrer Kinetik verschieden. In unseren Versuchen zeigte sich dies bezüglich der Lage des pH-Optimum, der in keinem pH-Bereich nachweisbaren initialen Hemmung der Meerrettichperoxydase, der bei steigender H_2O_2 -Konzentration später einsetzenden Hemmung der Meerrettichperoxydase und der viel höheren p -Phenylendiamin-Sättigungsdosis für die Myeloperoxydase. Im Gegensatz zur Meerrettichperoxydase besteht zwischen der Extinktionsänderung dE und der Myeloperoxydasekonzentration innerhalb bestimmter Grenzen strenge Linearität.

Die Angabe der Myeloperoxydaseaktivität in ng Meerrettichperoxydase ist somit u. a. von den — willkürlich festgelegten — Versuchsbedingungen zur Erstellung der Meerrettichperoxydase-Standardkurve abhängig. Für die Bestimmung des Myeloperoxydasegehaltes pro myeloischer Zelle — Lymphocyten sind peroxydase-negativ (15) — wurden Patienten ausgewählt, deren peripheres Blutbild der Norm entsprach, und die nicht an einem Malignom erkrankt waren (5). Es wurde ein Durchschnittswert entsprechend $0,277 \pm 0,152 \text{ ng Meerrettichperoxydase/myeloischer Zelle}$ errechnet. Die Abweichung der Einzelergebnisse vom Mittelwert ist, wenn man von den Fällen 1 und 9 (18 Jahre — s. (5)) bei unserem ausgewählten Patientengut nicht größer als bei den Normalfällen von N. KATSUSHIMA (9); die gefundenen Werte dürften Normalwerten entsprechen. Ein Vergleich mit den Angaben anderer Autoren (9, 3) ist auf Grund der unterschiedlichen Methodik leider unmöglich. Bei Verwendung des Guajakoltestes wurden nach einer Reaktionszeit von 60 Sek. zwei pH-Optima der Myeloperoxydase nachgewiesen (17). Das Vorliegen eines pH-Optimum im sauren Bereich führte zu verschiedenen Vermutungen über die intrazelluläre Funk-

tion der Myeloperoxydase. Bei unseren Versuchen war ein solches pH-Optimum im Säuren nur am Beginn des Reaktionsablaufes festzustellen; es scheint demnach eher methodisch bedingt zu sein.

Unter Verwendung der beschriebenen Methode werden zur Zeit umfangreiche Untersuchungen des Peroxydasegehaltes der Leukocyten verschiedener klinischer Krankheitsbilder durchgeführt.

Literatur

1. AGNER, K., *Acta physiol. Scand.* 8, 1 (1941). — 2. LÜCK, H., in: *Methoden der enzymatischen Analyse*, hrsg. von H.-V. Bergmeyer Verlag Chemie, Weinheim (1962). — 3. SCHULTZ, J. und K. KAMINKER, *Arch. Biochem. Biophysics* 96, 465 (1962). — 4. CHANCE, B. und A. C. MAEHLY, in: Colowick, S. P. und N. O. Kaplan, Vol. II., *Method in Enzymology* Academic Press, New York (1955). — 5. SCHULTZ, J., A. GORDON und N. SHAY, *J. Amer. chem. Soc.* 79, 1932 (1957). — 6. LOEB, H. G. und R. DONIGER, *Brit. J. Cancer* 12, 669 (1958). — 7. NEUFELD, H. A., F. V. LUCAS, A. P. MARBIN und E. STOTZ, *Cancer Res.* 15, 550 (1955). — 8. WILLSTÄTTER, R. und A. WEBER, *Liebigs Ann. Chem.* 449, 156 (1926). — 9. KATSUSHIMA, N., *Tohoku J. Exper. Med.*

78, 339 (1963). — 10. STRAUS, W., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 541 (1958). — 11. KELENYI, G., J. PONGRATZ, S. ORBAN und G. DEAK, *Blood* 18, 417 (1961). — 12. WILLSTÄTTER, R. und A. STOLL, *Liebigs Ann. Chem.* 21, 416 (1918). — 13. AURAND, L. W., M. W. ROBERTS und J. T. CARDWELL, *J. Dairy Sci.* 39, 568 (1956). — 14. KIERMEIER, F. und C. KAYSER, *Z. Lebensmittelunters. und -Forsch.* 112, 481 (1960). — 15. WINTROBE, M. M., *Clinical Hematology*, 5th edition, Lea & Febiger, Philadelphia, Pennsylvania (1961). — 16. KATSUSHIMA, N., *Tohoku J. Exper. Med.* 79, 250 (1963). — 17. ROHRER, G. F., J. P. WARTBURG und H. AEBI, *Biochem. Z.* 344, 492 (1966).

Doz. Dr. H. Pietschmann
A 1095 Wien
Garnisongasse 13