

(± 11). Es ist uns nicht gelungen, eine Gesetzmäßigkeit dieser Streuung, in Beziehung zu den Flokulationstesten und dem klinischen Bild der Erkrankung nachzuweisen.

Diskussion

Im Gegensatz zu der Lactatdehydrogenase ist die GOT im Serum Gesunder weitgehend thermostabil. Untersuchungen über die Thermolabilität der Transaminasen in wäßrigen Gewebsextrakten aus Organhomogenaten sind Gegenstand einer weiteren Mitteilung. Bei erhöhter Transaminasenaktivität im Serum, wie dies bei Leberparenchymschäden am deutlichsten zu beobachten ist, ist ein Teil der GOT thermolabil. Dies äußert sich in

einer regelmäßigen statistisch gesicherten und reproduzierbaren Verringerung der Gesamtaktivität nach Inkubation bei 58° auf die empirisch gewählte Dauer von 60 Minuten. Die Frage, ob es dabei um einen allgemeinen Denaturierungsprozeß des Enzymproteins oder um die selektive Inaktivierung eines wärmeempfindlicheren Isoenzym der GOT geht, bleibt offen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß im Serum Hepatitiskranker thermolabile Aktivatoren der GOT zugegen sind. Die große Streuung dieser Ergebnisse sowie das Fehlen einer Korrelation zwischen Thermolabilität und anderen Befunden bei der Hepatitis nötigt uns, diese wärmeempfindliche GOT-Fraktion genauer zu definieren.

Literatur

1. KELLEN, J., Zschr. exper. Med. 18, 326 (1963). — 2. FLEISHER, G. A., C. S. POTTER und K. G. WAKIM, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 103, 229 (1960). — 3. LATNER, A. L. und A. W. SKILLEN, Proc. Ass. Clin. Biochem. 2, 100 (1963). — 4. WÜST, H., H. SCHÖN und G.

BERG, Klin. Wschr. 40, 1169 (1962). — 5. BERGMAYER, H. U., Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie GmbH, Weinheim Bergstr. (1962).

Dr. J. Kellen
Bratislava, Svidnická 9, ČSSR

Thermolabile Isoenzyme der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase bei Hepatitis

II. Mitteilung

Von Z. ZÁZVORKA

Technische Mitarbeit J. KAMARÝT und VL. KARFÍK

Aus dem Zentrallaboratorium des Kreiskrankenhauses Most, Tschechoslowakei (Vorstand: Dr. med. Z. Zázvorka)

(Eingegangen am 16. August 1965)

Die Thermolabilität des anodischen und kathodischen Isoenzym der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase im Serum bei *Hepatitis epidemica* wurde mit Hilfe der Agarelektrophorese untersucht. Die kathodische GOT-Fraktion zeigte sich deutlich thermolabiler. Dies ist durch Wärmeinaktivierung des teilweise abgebauten Enzymproteins zu erklären. Bei Transaminasen aus Gewebshomogenaten wurde in keiner Fraktion Thermolabilität gefunden. Umgekehrte Verhältnisse wurden bei dem Carcinomkranken mit Lebermetastasen gefunden.

The thermolability of anodic and cathodic isoenzymes of glutamate-oxaloacetate transaminase in the serum during *Hepatitis epidemica* was studied with the aid of agar electrophoresis. The cathodic GOT fraction was markedly more thermolabile. This can be explained by the heat inactivation of the partly degraded enzyme protein. No thermolabile fraction was found in the transaminases from tissue homogenates. The relationship was reversed in carcinoma patients with liver metastases.

Bei der Bestimmung der Gesamtaktivität der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase („GOT“) im Serum ist bei erhöhten GOT-Werten ein deutlicher Aktivitätsverlust infolge von Erhitzung auf 58° zu verzeichnen. In dieser Mitteilung wird der Versuch unternommen, die Frage zu klären, ob diese Erscheinung die Folge einer Hitze-denaturierung des ganzen Enzymproteins oder der spezifischen Inaktivierung eines thermolabilen Isoenzym der GOT ist.

Da es mit Hilfe der Agar-Elektrophorese reproduzierbar möglich ist, die GOT in zwei Fraktionen (1—5, 8,

11—15), d. i. eine kathodische und eine anodische, aufzuteilen, stellen wir uns die Frage, welche dieser beiden Fraktionen diejenige ist, die unter Temperatureinfluß absinkt.

Methodik

Die Serum-GOT wurde auf 1-proz. Agargel auf 76×26 mm Objektträgern elektrophoretisch aufgeteilt. *Versuchsbedingungen:* Veronalnatrium-Puffer pH = 8,2, Ionenstärke 0,05; Stromintensität 5—6 mA je Platte,

Potentialabfall 4,5—5,0 V/cm; Trennungsdauer 75 Minuten. Die Detektionsschicht (1-proz. Agar in Phosphatpuffer pH = 7,5, Ionenstärke 0,05) enthält 10 mMol α -Ketoglutarsäure, 80 mMol Asparaginsäure, 0,01 m/MDH (Malatdehydrogenase Boehringer) d. i. 5,0 μ g Enzymprotein mit spezifischer Aktivität von 2000 Bücher-Einheiten und 1 mMol DPN-H (Na-Salz Boehringer).

Diese Schicht wird nach durchgeführter Elektrophorese auf die Agarplatte mit Serum gelegt und 90 Minuten bei 37° in einer feuchten Kammer inkubiert. Bei hohen Aktivitäten ist es von Vorteil, die Inkubationsdauer entsprechend zu kürzen. Nach der Inkubation werden die Extinktionen in situ auf einem adaptierten, direkt-schreibenden Registriergerät im ultravioletten Bereich bei 366 m μ gemessen. Nähere Angaben sind in einer früheren Arbeit zu finden (15, 16). Mit dieser Methode ist es möglich, die GOT in ein anodisch und ein kathodisch wanderndes Isoenzym aufzuteilen.

Dieser Untersuchung wurden Serumproben von 35 Patienten unterworfen, von denen 26 an *Hepatitis epidemica* erkrankt waren. Ein Fall litt an einem generalisierten Uteruscarcinom mit Lebermetastasen und ausgeprägter Bilirubinämie, 3 Fälle an Magencarcinom, 5 Fälle an Lungencarcinom. Das Serum wurde jeweils parallel untersucht, eine Bestimmung erfolgte im frischen Serum, die zweite nach einstündiger Inkubation im Wasserbad bei 58°, wohlverschlossen.

Ergebnisse

Bei den 26 akuten Hepatitisfällen betrug die Residualaktivität (nach Inkubation) 82,2—95,5% der anodischen und 54,1—86,4% der kathodischen Fraktion, in Bezug auf die Anfangsaktivitäten. Bei den zwei Patienten, die sich schon im Stadium der Remission nach überstandener Hepatitis befanden, konnte im Serum vor und nach Inkubation ausschließlich die anodische Fraktion festgestellt werden. Bei dem Fall mit generalisiertem Uteruscarcinom und Lebermetastasen registrierten wir eine hohe Aktivität beider GOT-Isoenzyme, wobei die kathodische Fraktion gegen Erhitzung resistenter war als die anodische, also gerade umgekehrt, wie dies bei der Hepatitis der Fall ist. Die Restaktivität des anodischen Isoenzym betrug 64,2—79,4%, die des kathodischen 78,4—86,2%.

Im weiteren versuchten wir diese Thermolabilität in Bezug auf die Herkunft der Transaminase aus verschiedenen Organen näher zu definieren. Bei Vergleichsuntersuchungen mit wäßrigen Extrakten aus Gewebhomogenaten (Leber und Myocard) fanden wir eine überraschende Diskrepanz: GOT aus Organextrakten ist bis 58° vollkommen thermostabil. Diese Diskrepanz könnte folgendermaßen erklärt werden:

Entweder üben gewisse Serumproteine eine Schutzwirkung auf die GOT aus, wobei diese Wirkung bei Erhitzen des Serums verloren geht oder der Proteinanteil der im Serum vorhandenen GOT ist schon zum Teil degradiert und dadurch thermolabiler als das frisch aus Gewebe gewonnene Enzym geworden. — Die Möglich-

keit einer Zerstörung oder Aktivierung verschiedener Inhibitoren durch Wärmeeinwirkung ist ebenfalls in Erwägung zu ziehen.

Um diese Fragen einigermaßen zu klären, führten wir folgende Versuchsserie durch:

a) Der wäßrige Gewebsextrakt aus frischem Leberhomogenat wird geteilt, ein Teil sofort untersucht (A-Extrakt), der andere Teil erst 60 Minuten bei 58° inkubiert (I-Extrakt).

b) Normales Serum (Aktivität bis 40 Karmen-Einheiten) wird ebenfalls geteilt und demselben Verfahren unterworfen (A-Serum und I-Serum). Dann wurden 10 elektrophoretische Analysen durchgeführt, in folgenden *Kombinationen*:

1. Extrakt A 0,5 ml/ mit 1,5 ml/ Wasser (Leerwert)
2. Extrakt I 0,5 ml/ mit 1,5 ml/ Wasser (Leerwert)
3. Extrakt A 0,5 ml/ mit 1,5 ml/ Serum A
4. Extrakt I 0,5 ml/ mit 1,5 ml/ Serum A*
5. Extrakt A 0,5 ml/ mit 1,5 ml/ Serum I
6. Extrakt A 0,5 ml/ mit 1,5 ml/ Serum I*
7. Extrakt I 0,5 ml/ mit 1,5 ml/ Serum A
8. Extrakt I 0,5 ml/ mit 1,5 ml/ Serum A*
9. Extrakt I 0,5 ml/ mit 1,5 ml/ Serum I
10. Extrakt I 0,5 ml/ mit 1,5 ml/ Serum I*

Die mit * bezeichneten Proben sind nach Vermischung beider Anteile des Testes nochmals 60 Minuten bei 58° inaktiviert worden.

Nach Elektrophorese, Detektion und Auswertung dieser Serie fanden wir in keiner einzigen Kombination Änderungen im Sinne eines Aktivitätsverlustes der GOT. Die Aktivität beider Isoenzyme ist in allen 10 Proben unverändert geblieben. Daraus folgt, daß im Serum Gesunder *kein* thermolabiles Protein mit Schutzwirkung auf die Transaminasenaktivität zugegen ist.

Diskussion

Aus den Arbeiten von FLEISHER und Mitarbeitern (6, 7, 9, 10) über die Clearancewerte der intravenös applizierten anodischen und kathodischen GOT (bei Hunden) geht hervor, daß das anodische Isoenzym im Kreislauf länger verweilt. Die kathodische Fraktion wird schneller abgebaut und eliminiert. Diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung mit unseren Befunden im Serum Hepatitiskranker.

Die erhöhte Thermolabilität der GOT ist dem Anteil des teilweise abgebauten, infolge des pathologischen Prozesses freigewordenen Enzyms zuzuschreiben. Diese GOT weist zwar nativ ihre spezifische Aktivität auf, verliert diese jedoch nach Erhitzung. Bei den Hepatitis-Sera ist deutlich zu ersehen, daß der Anteil des kathodischen Isoenzym — welches nach FLEISHER auch höhere Clearancewerte aufweist — an der Thermolabilität größer als bei der anodischen Fraktion ist. Die umgekehrten Verhältnisse bei dem Carcinomkranken mit Lebermetastasen bedürfen weiterer Nachprüfung.

Literatur

1. BOYD, J. W., *Biochem. J.* 81, 434 (1961). — 2. BOYD, J. W., *Clin. chim. Acta* (Amsterdam) 7, 424 (1962). — 3. DECKER, L. E. und E. M. RAU, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 112, 144 (1963). — 4. FLEISHER, G. A., C. S. POTTER und K. G. WAKIM, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 103, 229 (1960). — 5. FLEISHER, G. A. und K. G. WAKIM, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 106, 283 (1961). — 6. FLEISHER, G. A. und K. G. WAKIM, *J. Laborat. Clin. Med., S. Louis* 61, 76 (1963). — 7. FLEISHER, G. A. und K. G. WAKIM, *J. Laborat. Clin. Med., S. Louis* 61, 98 (1963). — 8. SCHWARTZ, M. K., J. S. NISSELBAUM und O. BODANSKY, *Amer. J. Clin. Path.* 40, 103 (1963). — 9. WAKIM, K. G. und G. A. FLEISHER, *J. Laborat. Clin. Med., S. Louis*, 61, 86 (1963). 10. WAKIM, K. G. und G. A. FLEISHER, *J. Laborat. Clin. Med., S. Louis* 61 107 (1963). — 11. ZÁZVORKA, Z. und J. KAMARÝT, *Čsl. Gastroenterol.* 19, 39 (1965). — 12. ZÁZVORKA, Z. und J. KAMARÝT, *Čes. lék. česk.* (im Druck). — 13. ZÁZVORKA, Z. und J. KAMARÝT, *J. Laborat. Clin. Med., S. Louis* (im Druck) — 14. KAMARÝT, J. und Z. ZÁZVORKA, Die Geltung der simultanen Agar-Gel-Enzym-Elektrophorese in der präventiven Medizin, in: *Ergebnisse der Laboratoriumsmedizin*, Bd. II S. 185 Medicus-Verlag GMBH, Berlin (1965). — 15. ZÁZVORKA, Z. und J. KAMARÝT, LDH, MDH und GOT-Isoenzyme in der Früh-Diagnostik der Leber-, Herz- und Bluterkrankungen; in: *Ergebnisse der Laboratoriumsmedizin*, Bd. II, S. 41, Medicus-Verlag GMBH, Berlin (1965). — 16. KELLEN, J. und V. ROMANČÍK, diese Z. (im Druck).

Dr. med. Zd. Zázvorka,
Most, Palackého 1837, ČSSR

Schnellreaktion auf p-Nitrophenol im Harn zum Nachweis einer E 605-Vergiftung¹⁾

Herrn Prof. Dr. Dr. F. TIMM zum 70. Geburtstag gewidmet

Von M. GELDMACHER-V. MALLINCKRODT und K. DEINZER

*Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Weinig)*

(Eingegangen am 23. September 1965)

Der p-Nitrophenol-Nachweis im Harn nach v. EICKEN wird als Schnellreaktion zum Nachweis einer E 605-Vergiftung ausgebaut. Die Arbeitszeit wird dabei von 2 Stunden auf 15 Minuten reduziert.

The detection of p-nitrophenol in urine after v. EICKEN has been developed as a rapid test for E 605 poisoning. The operation time is reduced from 2 hours to 15 minutes.

Vergiftungen mit dem Schädlingsbekämpfungsmittel „E 605“ spielen nach wie vor eine große Rolle. Sie haben auf Grund der heutigen therapeutischen Möglichkeiten eine wesentlich bessere Prognose als früher. Voraussetzung ist allerdings die schnell und sicher gestellte Diagnose. Hierfür haben SCHWERD und SCHMIDT schon 1952 eine Schnellreaktion im Blut angegeben, die auf der durch p-Nitrophenol-Na hervorgerufenen Gelbfärbung nach Spaltung des im Serum vorhandenen E 605 beruht (1). Es besteht aber die Gefahr der Täuschung durch eine unspezifische Gelbfärbung (2, 3). Sicherer und spezifischer erscheint der Nachweis von p-Nitrophenol im Harn. Schon 1951 haben MOUNTAIN, ZLOTOW und O'CONNOR darauf hingewiesen, daß im Organismus als Spaltprodukt des E 605 das p-Nitrophenol auftritt und mit der Indophenolblau-Reaktion im Urin nachweisbar ist (4). O'BRIEN (5) gibt ein Stoffwechselschema für die Kuh an, das alle bekannten Umwandlungen des E 605-Moleküls im Organismus enthält und das wohl allgemein für Warmblüter gelten dürfte; danach wird p-Nitrophenol zum Teil an Glucu-

ronsäure gepaart im Harn ausgeschieden. Daneben dürfte noch eine Kupplung an Schwefelsäure und Essigsäure vorliegen (3, 4, 6).

Für den Nachweis von p-Nitrophenol im Harn sind eine Reihe von Verfahren angegeben worden. KAISER und HAAG (2) schlagen z. B. den papierchromatographischen Nachweis des p-Nitrophenols und eine anschließende photometrische Auswertung vor. FISCHER und KLINGELHÖLLER (7) verseifen 30 ml Harn mit äthanolischer Kalilauge zwei Stunden am Rückflußkühler und prüfen in dem Ätherextrakt des angesäuerten Ansatzes dünn-schichtchromatographisch auf p-Nitrophenol und Diäthylthiophosphorsäure. v. EICKEN (3) hydrolysiert 1 ml der zu untersuchenden Harnprobe eine Stunde im sauren Milieu, extrahiert das freigesetzte p-Nitrophenol und bestimmt es über die Indophenolblau-Reaktion. ELLIOT und Mitarbeiter (8) arbeiteten ähnlich wie v. EICKEN, setzten aber bis zu 100 ml Harn ein, wodurch sie noch geringere p-Nitrophenolmengen erfassen können. Die genannten Verfahren sind sehr sicher, haben jedoch einen Zeitbedarf von einigen Stunden. Sie sind deshalb für die p-Nitrophenolbestimmung im Harn bei akuten E 605-Vergiftungen nicht ohne Modifikationen anwendbar. WEINIG hat 1956 eine

¹⁾ Die Arbeit wurde mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, wofür wir auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen.