

References

1. MATTENHEIMER, H. and E. C. ADAMS, jr., diese Z. 5, 48 (1967).
- 2. CONNELL, G. E. and O. SMITHIES, Biochem. J. 72, 115 (1959).
- 3. LUPOVITCH, A. and B. ZACK, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 9, 49 (1964).
- 4. TARUKOSKI, P. H., Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 18, 80 (1966).
- 5. STAUFFER, H. P., Dissert., Berne (1966).
- 6. MATTENHEIMER, H., J. Laborat. Clin. Med., S. Louis 58, 783 (1961).
- 7. JAYLE, M. F., C. R. Acad. Sci. 211, 574 (1940).
- 8. NYMAN, M., Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 11, Suppl. 39 (1959).
- 9. KEILIN, D. and E. F. HARTREE, Biochem. J. 49, 88 (1951).
- 10. ROBERT, L. and J. SERPICELLI, Protides of Biological Fluids, Ed. H. Peters, Am. Elsevier N. Y. 1959 p. 154.
- 11. MORETTI, J. and I. YON, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 46, 545 (1961).

Prof. H. Mattenheimer, M. D.
1753 West Congress Parkway
Chicago, Ill. 60612 / USA

Zur Bestimmung der „ α -Hydroxybutyratdehydrogenaseaktivität“ im Serum

Von G. MÜLLER und M. HÄUSLER

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. K. Seige)

(Eingegangen am 30. Juni 1967)

Durch methodische und klinische Untersuchungen an 117 Probanden wird gezeigt, daß die Bestimmung der LDH-Aktivität im Serum mit α -Ketobutyrat bei optimalen Substratkonzentrationen der mit Pyruvat entspricht. Hierdurch wird eindeutig bestätigt, daß die HBDH-Aktivität im Serum der Wirkung der LDH zuzuschreiben ist.

By methodical and clinical studies on 117 probands, it was shown that values for LDH activity, determined in serum with optimal concentrations of α -ketobutyrate, corresponded to those determined with pyruvate. This confirms that the HBDH activity in serum can be attributed to the action of LDH.

Lactatdehydrogenase¹⁾ besteht bekanntlich aus vier Monomeren. Durch Kombination der Untereinheiten H und M²⁾ entstehen die LDH³⁾-Isoenzyme LDH₁ bis LDH₅, der Zusammensetzung H₄, H₃M, H₂M₂, HM₃ und M₄, die in den einzelnen Organen in unterschiedlichen relativen Mengeneinheiten gebildet werden. Ein weiteres Isoenzym befindet sich in Hoden und Sperma (1).

Da sich Erhöhungen der LDH-Aktivität im Serum bei einer Vielzahl von Krankheitsbildern finden, besitzen Bestimmungen der einzelnen Isoenzyme für die Diagnostik großes Interesse. Eine Vermehrung von LDH₅ im Serum ist für Lebererkrankungen, von LDH₁ und LDH₂ für Herzinfarkt typisch (2).

Die Hydrierung von 2-Ketobutyrat durch Serum und NADH wird häufig von der LDH-Wirkung abgegrenzt und auf eine „ α -Hydroxybutyratdehydrogenase“ zurückgeführt, deren Aktivität kolorimetrisch (3)

¹⁾ Der Trivialname Lactatdehydrogenase wird hier gebraucht für das Enzym L-Lactat: NAD-Oxydoreduktase (EC1.1.1.27), Glutamat-Pyruvat-Transaminase für L-Alanin: 2-Oxoglutarat Amino transferase (EC 2.6.1.2), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase für L-Aspartat: 2-Oxoglutarat Aminotransferase (EC 2.6.1.1).

²⁾ Nach Cahn und Mitarbeiter wird die schnellste anodische Fraktion (H₄) als LDH₁, die kathodische Fraktion (M₄) als LDH₅ bezeichnet.

³⁾ Abkürzungen:

LDH = Lactatdehydrogenase, GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase, HBDH = α -Hydroxybutyratdehydrogenase. I. U. = Internationale Einheiten.

oder mit Hilfe des optischen Testes (4) bestimmt wird. Die Bestimmung der HBDH-Aktivität im Serum wird besonders zur Diagnose und Verlaufskontrolle des Herzinfarktes empfohlen, Erhöhungen werden jedoch auch bei Lebererkrankungen, Muskelerkrankungen, Leukämien, megaloblastischen Anämien, nephrotischem Syndrom, Lungenerkrankungen, Tumoren und anderen Erkrankungen beobachtet (5, 6, 7, 8).

Vorliegende Arbeit soll zur Methodik und klinischen Bedeutung dieses Enzymtestes einen Beitrag liefern.

Methodik

Die LDH-Aktivität wurde nach WROBLEWSKI und LADUE (9, 10) mit Hilfe des optischen Tests bei 340 nm im 3 ml Testansatz bestimmt. Die Pyruvatkonzentration betrug 0,3 mM. Die Messung der HBDH-Aktivität erfolgte analog mit Natrium- α -ketobutyrat, das aus α -Ketobuttersäure hergestellt wurde.

Mit verschiedenen Konzentrationen an α -Ketobutyrat wurde die optimale Substratkonzentration zur Aktivitätsbestimmung der HBDH in Normals Serum, Serum nach Herzinfarkt und bei Hepatitis ermittelt und bei den folgenden Messungen angewandt.

Die NADH-Lösung wurde jede Woche frisch hergestellt (11,12). Das Serum der Blutproben wurde sofort gewonnen, da sonst Erhöhungen der Fermentaktivität auftreten (13). Die Standardabweichung für die LDH- und HBDH-Aktivität wurde aus 10 Bestimmungen an einem Serum zu $s = \pm 4,8$ I. U. ermittelt.

Das Verhalten verschiedener Inhibitoren auf die LDH- und HBDH-Aktivität wurde von uns vergleichend untersucht.

Sulfitionen zeigen besonders große Inhibitorwirkung auf die LDH. Das Herzmuskelisozym wird durch Bindung von Hydro-pyridin-4-sulfonsäure am stärksten gehemmt (14). Oxalat besitzt eine ähnliche Wirkung (15).

Durch Schütteln mit Chloroform werden vor allem die elektrophoretisch langsam wandernden LDH-Isoenzyme (LDH_5) gehemmt (16).

Wir haben hierzu 0,2 ml Serum und 0,8 ml dest. Wasser mit 2 ml Chloroform 10 Min. geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Die wäbr. Phase wurde zur Bestimmung der LDH- und HBDH-Aktivität verwendet.

Harnstoff, Guanidin, Zinksulfat und β -Mercaptoäthanol hemmen vor allem die LDH_4 und LDH_5 (17, 18). Durch 2,6M Harnstofflösung werden nach HARDY (19) die LDH-Isoenzyme aus Leber, Skelettmuskulatur und Erythrocyten zu etwa 99%, die Herzmuskelisoenzyme dagegen nur zu etwa 40% gehemmt.

Bei der relativ hohen angewendeten Harnstoffkonzentration ist es wichtig, daß der optische Test mit der Enzymlösung gestartet wird. In einer Harnstoff-Puffer-Coenzym-Lösung nimmt die Aktivität von zugesetztem Serum beim Stehen rasch ab. Nach diesen Methoden haben wir die Hemmung der LDH- und HBDH-Aktivität bei über 30 Patienten der in Tabelle 3 aufgeführten Krankheitsgruppen gemessen.

106 Patienten mit verschiedenen internen Erkrankungen und 11 Kontrollpersonen wurden untersucht. Durch eingehende klinische, elektrokardiographische und klinisch-chemische Untersuchungen wurde die Diagnose des Herzinfarktes gestellt und bei den übrigen Patienten sicher ausgeschlossen. Bei allen Patienten wurden die HBDH-, LDH-, GOT- und GPT-Aktivität im Serum bestimmt. Hierbei sollte das Verhalten der HBDH-Aktivität bei optimaler Substratkonzentration bei den einzelnen Erkrankungen untersucht werden.

Die Konzentration an α -Ketobutyrat betrug 10 mM, bei der Untersuchung von Seren leberkranker Patienten 20 mM.

Die Bestimmung der GOT- und GPT-Aktivität erfolgte nach REITMANN und FRANKEL (20).

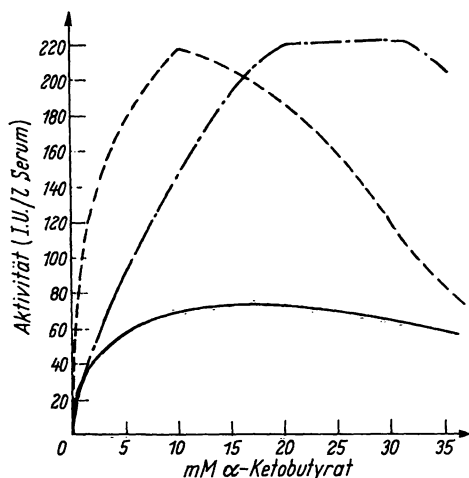


Abb. 1

Optimale Konzentrationen an Natrium- α -ketobutyrate für die Aktivitätsbestimmung der HBDH in Normalserum (—), Serum nach Herzinfarkt (---) und Hepatitis (- · - · -)

Ergebnisse

Bestimmung der optimalen Substratkonzentration

Über die optimale Pyruvatkonzentration zur Messung der LDH-Aktivität liegen bereits exakte Untersuchungen vor. Normalserum, Serum nach Herzinfarkt und bei Hepatitis besitzen bekanntlich ein unterschiedliches Substratoptimum (10). Analoge Meßergebnisse erhielten wir bei der Bestimmung der optimalen α -Ketobutyratekonzentration.

Für die Aktivitätsbestimmung in Normalserum und Serum nach Herzinfarkt werden erst bei etwa 10 mM Ketobutyrate optimale Bedingungen erreicht.

Tab. 1

Ermittlung der optimalen α -Ketobutyratekonzentration zur Messung der HBDH-Aktivität von 6 Hepatitisseren

Serum	Ketobutyratekonzentration (mM)						
	2,5	5	10	20	30	40	
1	48	73	145	218	222	—	I. U.
2	73	97	218	387	379	—	I. U.
3	10	24	120	218	218	—	I. U.
4	73	97	116	116	97	78	I. U.
5	48	145	155	135	116	97	I. U.
6	53	120	155	174	174	155	I. U.

Tabelle 1 zeigt die HBDH-Aktivitäten im Serum von 6 Patienten mit akuter Hepatitis bei verschiedenen Substratkonzentrationen, wobei sich erst eine Konzentration von etwa 20—30 mM als optimal erweist.

In der Literatur werden zur Bestimmung der HBDH-Aktivität in 0,1 ml Serum folgende α -Ketobutyratekonzentrationen verwendet:

0,12 mM (2,7 ml Testansatz) (4)

3,3 mM (3,0 ml Testansatz) (21)

18,7 mM (3,2 ml Testansatz) (7)

Unsere Messungen mit verschiedenen NADH-Konzentrationen ergaben ebenso wie bei der LDH ein breites Aktivitätsmaximum.

Versuche mit Inhibitoren

Durch Zusatz von Na_2SO_3 konnten wir zwischen der Hemmung der LDH- und HBDH-Aktivität keine signifikanten Unterschiede finden.

Tab. 2

% Hemmung der LDH- und HBDH-Aktivität im Serum durch Sulfitionen

Serum	$\mu g Na_2SO_3/3 ml$ Testansatz					
	LDH ⁵	HBDH ⁵	LDH ²⁵	HBDH ²⁵	LDH ⁵⁰	HBDH ⁵⁰
1	6	6	23	22	40	34
2	9	8	17	21	35	25
3	24	26	28	26	38	38

Nach Schütteln mit Chloroform konnten wir bei Untersuchung einer großen Anzahl der in Tabelle 3 aufgeführten Erkrankungen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Hemmung der HBDH- und LDH-Aktivität erhalten.

Bei der Verwendung von Harnstoff als Inhibitor war mit α -Ketobutyrate als Substrat eine etwas größere, aber nicht signifikant größere Hemmung der Aktivität als mit Pyruvat zu beobachten, die durch den stabilisierenden Einfluß des Pyruvats auf das aktive Zentrum im LDH-Molekül erklärt werden kann (18). Bei allen Versuchen mit Inhibitoren zeigte sich somit ein *gleichsinniges* Verhalten der LDH- und HBDH-Aktivität im Serum.

Klinisch-chemische Untersuchungen

Unter den von uns angewendeten Versuchsbedingungen gehen, wie Tabelle 3 zeigt, bei allen untersuchten Krankheitsgruppen die HBDH- und LDH-Aktivitäten weitgehend parallel.

Abbildung 2 zeigt die Aktivitäten von LDH, HBDH, GOT und GPT bei der Verlaufskontrolle der von uns

Tab. 3. Aktivitäten von HBDH, LDH, GOT und GPT im Serum bei verschiedenen internen Erkrankungen (Angabe der Aktivitäten in I. U.)

	Gesunde Personen		Nieren-krankheiten		Leber-krankheiten		Herz- und Gefäßkrankheiten												
	Mittelwert	Beobachteter Bereich	Mittelwert	Beobachteter Bereich	Mittelwert	Beobachteter Bereich	Myokardschaden	Angina pectoris	Myokarditis rheum.	Vitium und funktionelle	akute Durchblutungsstörungen	chron. Durchblutungsstörungen	Blutkrankheiten	Leukosen	Carcinome	Pneumonie und Tuberkulose	Entzündungen (Pancreas, Galle, Erysipel)	Magen- und Darmkrankheiten	Endokrinologische Erkrankungen
GOT	19,9	6 bis 37	35,3	17,9 bis 57,5	283,3	49,5 bis 435	19,8	31,8	29	14,5	44,7	24,2	24,7	56,2	28,5	25,5	20,1	34,2	35,2
	6	37	37	57,5	625	435	6	13		11	13	16,5	16,5	12,5	19,5	13	8,5	11	11
GPT	11,8	3,5 bis 37	33,0	26,2 bis 48,5	425,3	46,3 bis 335	26	44,8	23	18	44,3	20,8	29,1	35,8	31,5	24,6	20,1	23,8	28,1
	3,5	37	37	48,5	625	335	14	11,5		14	14	11,5	20	13	23	14	13	6	14
LDH	85,9	91 bis 117	150	117,1 bis 188	805	280 bis 425	114,3	109,4	53	96,4	149,3	76,3	118,1	200,7	176,1	88,6	125	69,1	80,1
	69	117	150	188	805	425	112	69		84,5	67,6	34	74	112	72,5	48,3	53	26	48,3
HBDH	64,6	43,5 bis 106,2	132,2	94,2 bis 169,1	72,5	107 bis 338	98,8	76,5	48,3	86,2	117,6	67,5	109,2	156,6	128,1	74,1	86,2	63,3	79,2
	48,3	106,2	72,5	169,1	218	338	48,3	43,5		79,7	62,8	58	67,6	60,8	58	43,5	38,6	11,5	48,3
Zahl der Fälle	11	3	9	6	24	24	5	6	1	3	3	5	5	4	4	6	6	3	5

zus. 117 Fälle

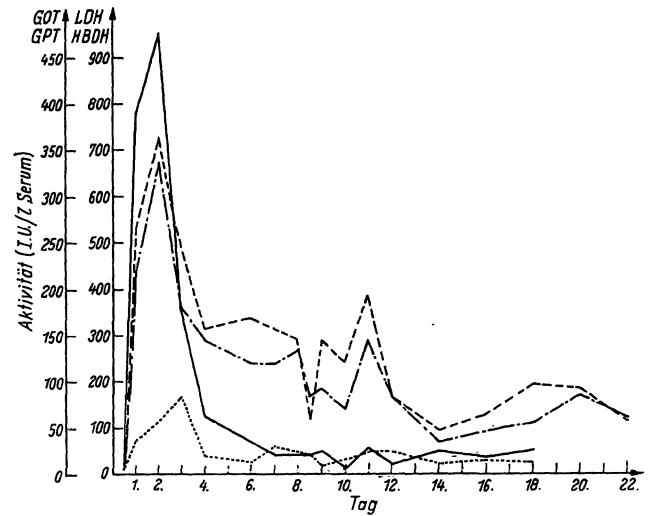


Abb. 2

Enzym-Aktivitäten bei der Verlaufskontrolle des Herzinfarktes
 — GOT ···· GPT - - - - LDH - · - · - HBDH

untersuchten Seren von Patienten mit frischem Herzinfarkt. Die GOT-Aktivität steigt bereits 4—8 Stdn. nach dem Infarkt an, erreicht ihren Gipfel nach 24—48 Stdn. und normalisiert sich nach etwa 6 Tagen. Die LDH- bzw. HBDH-Aktivität steigt etwas später an und bleibt meist bis zum 10.—15. Tag erhöht. Aktivitätserhöhungen der GPT sind weniger charakteristisch und typisch.

Diskussion

Der H-Typ der LDH entstammt überwiegend Geweben mit hoher Sauerstoffaufnahme (Herzmuskel) und überführt daher bevorzugt Lactat in Pyruvat. Überschüssiges Pyruvat bewirkt eine nichtkompetitive Hemmung (22). Der M-Typ wird vorwiegend in Geweben mit überwiegend anaerobem Stoffwechsel (Muskulatur des Skeletts, Leber) gebildet und hydriert daher bevorzugt Pyruvat zu Lactat. Die Isoenzyme der LDH unterscheiden sich also deutlich in ihrer Substrataffinität, wodurch eine Differenzierung der leber- und herzspezifischen Isoenzyme möglich ist (23—25). Als Substrat zur Bestimmung der LDH-Aktivität können auch unverzweigte Homologe der Brenztraubensäure und Milchsäure mit L(+)-Konfiguration, z. B. α -Ketobutyrat und α -Hydroxybutyrat, dienen.

Tabelle 4 zeigt die von NISSELBAUM, PACKER und BODANSKY (28) bestimmten Michaeliskonstanten (pH 7,4) der menschlichen Isoenzyme aus Herz und Leber für diese 4 Substrate.

Tab. 4
 Michaeliskonstanten von LDH-Isoenzymen aus Herz und Leber nach (28)

Substrat	Herzisoenzym K _m (mM)	Leberisoenzym K _m (mM)
Pyruvat	0,12	0,46
α -Ketobutyrat	1,7	6,3
L-Lactat	4,1	14,3
α -Hydroxybutyrat	4,4	4,8

Durch Vergleich der LDH-Aktivität bei verschiedenen Konzentrationen an Pyruvat (29, 30) oder Lactat (31) ist somit der Rückschluß möglich, ob eine Erhöhung der LDH-Aktivität hepatogener oder kardialer Genese ist.

Diese Tatsache wird für die Bestimmung der „ α -Hydroxybutyratdehydrogenase“ mit α -Ketobutyrat als Substrat angewendet.

Durch eine niedrige Substratkonzentration wird eine bevorzugte Umsetzung des α -Ketobutyrrats durch die für Herzerkrankungen typische LDH₁ erreicht. Je nach ihren Anteilen an der Gesamtaktivität sind aber auch die anderen Isoenzyme an der „HBDH-Aktivität“ beteiligt

(23). Die Bestimmung bei nichtoptimaler Substratkonzentration ergibt nichtoptimale Aktivitätswerte.

Bei optimaler Substratkonzentration ist nach unseren Untersuchungen die mit Pyruvat und α -Ketobutyrat gemessene LDH-Aktivität gleich groß. Unsere Versuche mit Inhibitoren bestätigen ebenfalls die völlige Übereinstimmung.

Eine Bestimmung der LDH-Aktivität mit α -Ketobutyrat sollte daher auch *nicht* mehr als α -Hydroxybutyratdehydrogenase-Aktivität bezeichnet werden, da sich für die Existenz einer „ α -Hydroxybutyratdehydrogenase“ im Serum *kein* Anhalt ergibt.

Literatur

1. WILKINSON, J. H. und W. A. WITHYCOMBE, *Biochem. J.* 97, 663 (1965). — 2. FREEMANN, J. und A. W. OPLER, *Amer. J. med. Sci.* 250, 131 (1965). — 3. ROSALKI, S. B., *J. Clin. Path.* 15, 566 (1962). — 4. ROSALKI, S. B. und J. H. WILKINSON, *Nature (London)* 188, 1110 (1960). — 5. DUBACH, U. C. und L. MARGRETH, *Dtsch. med. Wschr.* 90, 1429 (1965). — 6. STUART, J., J. C. GRAWFORD, J. FORSHALL und I. A. OWEN, *Brit. Med. J.* I 423 (1965). — 7. FORSTER, G. und S. FEISLI, *Helvet. med. Acta* 31, 389 (1964). — 8. SCHNEIDER, K. W., F.-G. LEHMANN und G. HORNING, *Arch. Kreislaufforsch.* 46, 306 (1965). — 9. WROBLEWSKI, F. und J. S. LA DUE, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 90, 210 (1965). — 10. BERGMAYER, H.-U., *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. (1962). — 11. PAWCETT, C. P. und M. M. CIOTTI, *Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)* 54, 210 (1961). — 12. RICHTERICH, R., P. SCHAFROTH und H. AEBI, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 8, 178 (1963). — 13. HSIEH, K. M. und H. T. BLUMENTHAL, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 91, 626 (1956). — 14. WIELAND, T., G. PFLEIDERER und F. ORTANDERL, *Biochem. Z.* 331, 103 (1959). — 15. EHERSON, P. M. und J. H. WILKINSON, *J. Clin. Path.* 18, 803 (1965). — 16. WARBURTON, F. G. und D. SMITH, *Enzymologia* 26, 125 (1963/64). — 17. PLUMMER, D. T., J. H. WILKINSON und W. A. WITHYCOMBE, *Biochem. J.* 89, 48P (1963). — 18. KONTTINEN, A. und S. LINDY, *Nature (London)* 208, 782 (1965). — 19. HARDY, S. M., *Nature (London)* 206, 933 (1965). — 20. REITMANN, S. und S. FRANKEL, *Amer. J. Clin. Path.* 28, 56 (1957). — 21. ELLIOTT, B. A. und J. M. WILKINSON, *Lancet (London)* I, 698, 1961. — 22. STAMBOUGH, R. und D. POST, *J. biol. Chemistry* 241, 1462 (1966). — 23. ROSALKI, S. B., *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 8, 415 (1963). — 24. PLUMMER, D. T., B. A. ELLIOTT, K. B. COOKE und J. H. WILKINSON, *Biochem. J.* 87, 416 (1963). — 25. WITHYCOMBE, W. A. und J. H. WILKINSON, *Biochem. J.* 89, 48P (1963). — 26. HULE, V., *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 13, 431 (1966). — 27. CZOK, R. und T. BÜCHER, *Advances Protein Chem.* 15, 365 (1960). — 28. NISSELBAUM, J. S., D. E. PACKER und O. BODANSKY, *J. biol. Chemistry* 239, 2830 (1964). — 29. PLAGEMANN, P. G. W., K. F. GREGORY und F. WROBLEWSKI, *J. biol. Chemistry* 235, 2288 (1960). — 30. CAHN, R. D., N. O. KAPLAN, L. LEVINE und E. ZWILLING, *Science (Washington)* 136, 962 (1962). — 31. BABSON, A. L. und G. E. PHILLIPS, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 12, 210 (1965).

Dr. rer. nat. G. Müller
X 402 Halle/Saale
Leninallee 2

Experimentelle Untersuchungen zum Verfahren der in-vitro-Lipolyse

Von P. SCHWANDT, M. KNEDEL und R. LINDLBAUER

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. H. Schwiegl) und dem Klinisch-Chemischen Institut des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching (Chefarzt: Priv.-Doz. Dr. M. Knedel)

(Eingegangen am 24. August 1967)

Am epididymalen Fettgewebe der Ratte wurde die Wirkung verschiedener Inkubationsbedingungen auf die spontane und hormoninduzierte *in-vitro*-Lipolyse untersucht. Nach genauer Beschreibung des Versuchsansatzes werden die Einflüsse von Temperatur, Fettgewebemenge, Inkubationszeit, Albuminkonzentration und Pufferzusammensetzung mitgeteilt. Daraus ergeben sich optimale Versuchsbedingungen für die *in-vitro*-Lipolyse, deren Standardisierung als notwendig erachtet wird.

Investigations are reported on the influence of different incubation conditions on the spontaneous and hormone-induced lipolysis in epididymal fat pads of the rat. The incubation technique is described in detail, and the effects of temperature, quantity of adipose tissue, incubation time, concentration of albumin and the ionic composition of the buffer are reported. The optimal conditions were thus established and their standardisation is recommended for the *in vitro* study of lipolysis.

Das Fettgewebe ist metabolisch hoch aktiv, relativ uniform und leicht zugänglich. Es bietet sich daher für die Durchführung von Stoffwechseluntersuchungen als geeignetes Material an. Wegen seiner Struktur trifft das vor

allem auf das epididymale Fettgewebe der Ratte zu, das besonders häufig für die Untersuchung lipolytischer Vorgänge *in vitro* herangezogen wurde. Die ursprünglich von GORDON und CHERKES (1) und WHITE und