

# Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie

7. Jahrgang

Mai 1969

Heft 3 (S. 225—312)

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
7. Jg., S. 225—238, Mai 1969

## Eignung der „klassischen“ Leucinaminopeptidase (LAP) als Indikator-Enzym bei Hepatitis epidemica acuta

(Differenzierung zwischen Leucinaminopeptidase<sup>1)</sup> und Arylamidase<sup>2)</sup> bei hepatobiliären Erkrankungen)

Von M. IWIG, D. GLÄSSER und H. HANSON

*Physiologisch-chemisches Institut der Universität Halle|Saale (Direktor: Prof. Dr. H. Hanson)*

(Eingegangen am 19. Dezember 1968)

Die Aktivitäten der Leucinaminopeptidase und der Arylamidase wurden im Serum von Gesunden und Kranken mit den Substraten Leucinamid bzw. Leucin-*p*-nitroanilid unter Optimalbedingungen bestimmt.

Für den eindeutigen Nachweis der unter pathologischen Bedingungen im Serum auftretenden LAP wird nach unseren Befunden außer dem Überschreiten der 3 S-Grenze — 52,5 mE/ml — unter LAP-Optimalbedingungen eine wenigstens 50proz. Aktivierung der Leucinamidhydrolyse durch 2 mm Manganchlorid bei pH 9,0 gefordert.

Während im Normalserum keine Manganchlorid-aktivierbare Leucinamidhydrolyse ermittelt werden konnte, fand sich eine bis zu 600fache Steigerung der Leucinamidhydrolyse bei der akuten Hepatitis epidemica unter LAP-Optimalbedingungen.

Mit immunologischer Methodik konnte die bei Hepatitis epidemica stark erhöhte Amino-peptidaseaktivität eindeutig als „klassische“ LAP identifiziert werden.

Die Bestimmung der Arylamidase-Aktivität ergab bei den untersuchten Erkrankungen mit der Literatur übereinstimmende Werte.

Die Bedeutung des LAP-Nachweises für die Früherfassung und die Verlaufskontrolle der Hepatitis epidemica sowie die Bedeutung der gleichzeitigen Bestimmung beider Enzyme (LAP und Arylamidase) für die Differentialdiagnose des Ikterus wird diskutiert.

### *The suitability of "classical" leucine aminopeptidase (LAP) as an indicator enzyme in Hepatitis epidemica acuta (Differentiation between leucine aminopeptidase and arylamidase in hepatobiliary illnesses)*

The activities of leucine aminopeptidase and arylamidase were determined under optimal conditions with the substrates leucinamide and leucine-*p*-nitroanilide respectively in the serum of patients and normal persons.

In addition to LAP values in excess of the 3 S-limit (52.5 mU/ml) under optimal conditions, there must also be at least a 50% activation of leucinamide hydrolysis by 2 mm manganous chloride at pH 9.0 for the unequivocal demonstration of increased serum LAP under pathological conditions.

While normal serum shows no detectable manganese chloride-activated leucinamide hydrolysis, a 600fold increase in leucinamide hydrolysis was found in acute hepatitis epidemica under optimal conditions for LAP.

The greatly increased aminopeptidase in hepatitis epidemica was shown clearly to be "classical" LAP by immunological methods.

The arylamidase activities measured in various patients agreed with those in the literature.

The determination of LAP can serve for the earlier diagnosis and for following the course of hepatitis epidemica, and the measurement of both enzymes (LAP and arylamidase) for the differential diagnosis of jaundice.

LINDERSTRØM-LANG (1, 2) war es 1929/30 bei Untersuchungen über das „Darmerepsin“ gelungen, eine „Leucylpeptidase“ von anderen Peptidasen abzugrenzen. In der Folgezeit war dieses Enzym — auch Leucinaminopeptidase (LAP) genannt — in zahlreichen Organen, Geweben und Körperflüssigkeiten des Menschen, jedoch auch in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen nachgewiesen worden (Literaturübersicht bei SMITH (3), HASCHEN (4), HANSON (5)). Durch die Gewinnung (6) und Charakterisierung (7) einer hochgereinigten LAP-Präparation aus Schweinenieren sowie die kristalline Darstellung aus Rinderaugenlinsen (8—10) wurde eindeutig erwiesen, daß es sich bei der LAP nicht um ein

Gemisch aus mehreren Peptidasen (11), sondern um ein definiertes cytoplasmatisches Mangan- und Magnesium-aktivierbares Enzym handelt (10). In den letzten Jahren konnte sogar eine immunologische Verwandtschaft der LAP verschiedener Species über einen phylogenetischen Zeitraum von etwa 300 Millionen Jahren (Frosch-Mensch) ermittelt werden (12, 58). Obgleich die LAP verschiedene synthetische Peptide — besonders solche mit L-Leucin in N-terminaler Position — zu hydrolysieren vermag, erwies sich Leucinamid als das spezifischste Substrat für den Nachweis derselben (7, 10, 13).

Schon in den 30er Jahren, also lange vor einer kristallinen Darstellung und genaueren Charakterisierung der LAP, war ihre Aktivität gegenüber D,L-Leucylglycin im Serum (14, 15), im Urin (16) und im Liquor (17, 18) bei

<sup>1)</sup> L-Leucylpeptid-Hydrolase (EC 3.4.1.1).

<sup>2)</sup> Im klinischen Sprachgebrauch vielfach fälschlicherweise LAP genannt.

verschiedenen Erkrankungen überprüft worden. Nur bei einzelnen Erkrankungen und in einem Teil der Fälle hatte sich eine Erhöhung der Enzymaktivität gefunden. Zu diesen Ergebnissen, die aus methodischen Gründen meist keine sichere quantitative Aussage erlaubten, wurden in den folgenden Jahren nur wenige für die Klinik bedeutsame Befunde beigetragen (19, 20).

Die Einführung der chromogenen Substrate durch GOMORI (21) und die Mitteilung von GREEN (22), daß Leucin- $\beta$ -naphthylamid die spezifischen Anforderungen eines Substrates zum Nachweis der LAP erfüllt, führten dazu, dieses Substrat in zunehmendem Maße zur Bestimmung der „LAP“-Aktivität heranzuziehen. Nachdem somit eine relativ einfache Bestimmungsmethode gegeben war, wurde durch den Nachweis eines erhöhten Serum-„LAP“-Spiegels beim Pankreaskarzinom (23, 24) das allgemeine Interesse für dieses Untersuchungsverfahren geweckt. Es stellte sich zwar bald heraus, daß die „LAP“-Bestimmung nicht die Diagnose eines Pankreaskarzinoms ermöglicht (25, 26), jedoch erlangte sie eine wesentliche Bedeutung bei der Diagnostik der Leber- und Gallenwegserkrankungen (26, 27).

Die Untersuchungen der letzten Jahre ergaben, daß bei Verwendung der chromogenen Substrate weniger die „klassische“ LAP, sondern andere Amino-peptidasen, die neben der LAP im Blutserum und in den Organen vorkommen und die diese Substrate bevorzugt hydrolysieren, erfaßt werden (13, 28—36). Zur Unterscheidung von der LAP wurden diese Aktivitäten Aminosäure-arylamidase genannt (29, 32, 37). Als Substrat für den Nachweis der Arylamidase war neben Leucin- $\beta$ -naphthylamid auch Leucin- $p$ -nitroanilid verwendet (38) und wegen der einfacheren Bestimmungsmethode zunehmend bevorzugt worden (37, 39, 40). Da gezeigt werden konnte, daß die Alanin-Verbindungen (Alanin- $\beta$ -naphthylamid, Alanin- $p$ -nitroanilid, Alanin-hydrazid) für den Nachweis der Arylamidase spezifischer sind als die entsprechenden Leucinverbindungen (32, 34, 35, 41—45), finden auch diese Verwendung. Obgleich Leucin- $\beta$ -naphthylamid von kristalliner LAP gespalten wird (10), ist es dennoch für den Nachweis der LAP im Serum ungeeignet, da die Arylamidasen dieses Substrat gleichzeitig und schneller hydrolysieren. Hingegen erwies sich Leucinhydrazid, das ebenfalls von LAP aus Rinderaugenlinsen hydrolysiert wird (46), als ein geeignetes Substrat zum Nachweis der „klassischen“ LAP im Blutserum (47).

Über das Verhalten der Arylamidase-Aktivität im Blutserum bei zahlreichen Erkrankungen liegt heute ein umfangreiches Untersuchungsmaterial vor (Literaturübersichten: 39, 40, 48). Hingegen ist die Aktivität der „klassischen“ LAP nur in wenigen Fällen, nämlich dann, wenn Leucinamid, Leucylglycin oder Leucinhydrazid als Substrate eingesetzt wurden (19, 20, 37, 40, 47, 49—52), auf ihre diagnostische Bedeutung hin überprüft worden. Doch auch diese Bestimmungen sind größtenteils unter nicht genügend LAP-spezifischen Bedingungen hinsichtlich Substrat, pH-Wert und Aktivatorén vorgenommen worden.

In der vorliegenden Arbeit wird dargelegt, daß bei Anwendung der für das aus Rinderaugenlinsen kristallisierte Enzym ermittelten Optimalbedingungen die „klassische“ LAP auch im menschlichen Serum weitgehend spezifisch erfaßt und von der Arylamidase bzw. anderen Amino-peptidasen abgegrenzt werden kann. Weiterhin wird gezeigt, daß der „klassischen“ LAP neben der Arylamidase eine große diagnostische Bedeutung für die Differentialdiagnose hepatobiliärer Erkrankungen zukommt.

## Methodik

### 1. Bestimmung der L-Leucin- $p$ -nitroanilid-Hydrolyse

Wir verfahren aus Vergleichsgründen entsprechend dem Vorgehen von WILLIG und Mitarbeitern (39), das auch der Zusammensetzung der Boehringer-Testpackung, TC-LAP/15952, entspricht.

#### Reagenzien

Phosphatpuffer, 0,05M, pH 7,2; L-Leucin- $p$ -nitroanilid, 0,025M (9,6 mg/1,5 ml absol. Methanol).

#### Bestimmungsansatz in einer 1 cm-Mikroküvette

0,30 ml Phosphatpuffer  
0,01 ml Substrat  
0,01 ml Serum

#### Kinetische Messung

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte bei 25° durch kontinuierliche Registrierung der Extinktionszunahme des freigesetzten  $p$ -Nitroanilins bei 405 nm (Eppendorf-Photometer mit Küvettenwechselautomatik und Kompensationsschreiber).

Berechnung der Enzymaktivität:

$\Delta E/\text{Min} \cdot 3240 = \text{mE}/\text{ml Serum}$  (nach WILLIG und Mitarbeiter (39)).

### 2. Bestimmung der Leucinamid-Hydrolyse

#### Reagenzien

Trispuffer 1M, pH 8,0 und 9,0; Manganchlorid ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 0,01M;

Standard: D,L-Leucin, 6,55  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ , entsprechend einer 10proz. Hydrolyse des Substrates;

Substrat: L-Leucinamidacetat, 0,25M (mit NaOH auf pH 8,3 eingestellt). Das Leucinamidacetat wurde synthetisiert nach (69); Schmelzpunkt 138° (Literatur: 139—141°), papierchromatographisch nur Spuren an freiem Leucin; durch Totalhydrolyse mit kristalliner Rinderaugenlinsen-LAP konnte eine Racemisierung ausgeschlossen werden.

#### Bestimmungsansätze

	a) pH 8,0	b) pH 9,0	c) pH 9,0 + $\text{MnCl}_2$
Trispuffer	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
$\text{MnCl}_2$	—	—	0,05 ml
bidest. Wasser	0,05 ml	0,05 ml	—
Serum	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml
Substrat	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml

Die Bestimmungsansätze wurden in Netheler-Röhrchen ausgeführt. Trispuffer und Manganchloridlösung wurden getrennt zum Bestimmungsansatz pipettiert, um eine stärkere Manganhydroxidbildung zu vermeiden. Vor Zugabe des Substrates wurden die Ansätze 30 Min. bei 40° präinkubiert. Normalseren wurden 180 Min., pathologische Seren 30 und 180 Min. bei 40° inkubiert. Bei starker Erhöhung der Enzymaktivität wurde das Serum 1:5 oder 1:20 mit bidest. Wasser verdünnt.

#### Papierchromatographische Auswertung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden dem Inkubationsansatz 10  $\mu\text{l}$  entnommen und auf Chromatographiepapier (FN 13 des

VEB Spezialpapierfabrik Niederschlag/Erzgeb.) aufgetragen. Zur Chromatographie diente sek. Butanol/85proz. Ameisensäure/Wasser (75:15:10 v/v) (53). Die Ninhydrinfärbung der Bögen und Messung der Farbintensität erfolgte nach der im Institut seit Jahren eingeführten Methode (54—56) in der von ANSORGE und Mitarbeitern (57) mitgeteilten Modifikation.

Zur Verringerung des methodischen Fehlers wurden aus jedem Bestimmungsansatz zwei Auftragungen auf verschiedene Papierbögen vorgenommen. Wegen der guten Übereinstimmung der Meßwerte in den ersten Versuchsreihen konnte auf einen doppelten Bestimmungsansatz verzichtet werden. Die Substrat- und Enzym-Leerwerte erwiesen sich bei mehrfachen Kontrollen weitgehend konstant; der Leucingehalt entsprach einer Hydrolyse von 0,2 bzw. 0,1% und wurde bei der Berechnung berücksichtigt.

#### Berechnung der Enzymaktivität

Die Angabe der Enzymaktivität erfolgt in internationalen Einheiten ( $\mu\text{Mol}$  Substratumsatz pro Min.). Da die Hydrolyse einer Kinetik erster Ordnung folgt, errechnet sich die initiale Spaltungsgeschwindigkeit nach der Formel:

$$v = k_1 \cdot S$$

$$k_1 = \frac{1}{t} \cdot 2,303 \cdot \log \frac{100}{100 - \% \text{ Hydrolyse}}$$

$$S = 50 \mu\text{Mol/m}$$

Zur Errechnung der Enzymkonzentration wurden entsprechend der eingesetzten Serummenge von 0,1 ml/0,25 ml Ansatz (= 0,4 ml/1 ml Ansatz) die initiale Spaltungsgeschwindigkeit  $v$  mit 2,5 multipliziert. Daraus ergibt sich:

$$k_1 \cdot 50 \cdot 2,5 = E/\text{ml}$$

$$\text{bzw. } k_1 \cdot 50 \cdot 2,5 \cdot 1000 = E/l = \text{mE/ml}$$

### 3. Immunologischer LAP-Nachweis

#### Gewinnung des Antiserums

Etwa 1 Jahr alte Kaninchen wurden über 7 Wochen alle 4—6 Tage durch i. m. Injektion von je 1 mg kristallisierter Rinderlinsen-LAP, in 0,5 ml komplettem Freund'schen Adjuvans emulgiert, immunisiert (58). 0,4 ml des gewonnenen Antiserums präzipitierten (s. u.) im Verdünnungsbereich 1:20 bis 1:40 0,26  $\mu\text{g}$  kristallisierte Rinderlinsen-LAP.

#### Präzipitationsansätze

0,4 ml Serum bzw. krist. LAP

0,4 ml Anti-LAP-Serum in steigender Verdünnung (1:20 bis 1:1280).

Der Präzipitationsansatz wurde 30 Min. bei 37° und anschließend 16 bis 20 Stdn. bei 4° belassen. Danach erfolgte Zentrifugation in der Kühlzentrifuge (Phywe) bei 12000 g über 15 Min. Die im Überstand vorhandene Restaktivität gegenüber Leucinamid wurde bei pH 9,0 mit  $\text{MnCl}_2$ -Zusatz, bei Verschlufikterusserum (S 304) außerdem bei pH 8,0 ohne Effektor bestimmt. Das Hepatitisserum (S 281) wurde wegen der hohen LAP-Aktivität in einer Verdünnung von 1:29 eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug beim Hepatitisserum 30 Min., beim Verschlufikterusserum 180 Min.

### Ergebnisse

Die durch Normalserum vom Menschen katalysierte Leucinamidspaltung wird durch  $\text{Co}^{++}$  aktiviert und zeigt bei pH 8,0 ein Optimum (4). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß LAP im Normalserum nicht oder nur in sehr kleinen Mengen enthalten ist und die geringe Leucinamidspaltung durch Arylamidase und andere Aminopeptidasen bedingt ist. Geht man von diesen Bedingungen (pH 8,0) auf LAP-Optimalbedingungen über (pH 9,0 bzw. pH 9,0 +  $\text{MnCl}_2$ ), muß man für den Fall, daß keine LAP vorhanden ist, eine Abnahme, bei Vorhandensein von LAP aber eine Zunahme der

Leucinamidspaltung erwarten. Deshalb haben wir die Leucinamidspaltung unter allen drei Bedingungen getestet:

- pH 8,0 ohne  $\text{MnCl}_2$ -Zusatz
- pH 9,0 ohne  $\text{MnCl}_2$ -Zusatz
- pH 9,0 mit  $\text{MnCl}_2$ -Zusatz

Außerdem wurde die Arylamidase mit Leucin-*p*-nitroanilid bei pH 7,2 erfaßt.

Vorher wurden Untersuchungen über Stabilität,  $\text{MnCl}_2$ -Präinkubation und Kinetik der Leucinamid-spaltenden Aktivitäten ausgeführt, um zu sichern, daß die Ergebnisse nicht durch Denaturierungseffekte verfälscht werden.

### 1. Untersuchungen zur Enzymstabilität

Während einer Lagerung von Normal- und Hepatitis-Serum bei +22°, +4° und -16° wurde die Höhe der Enzymaktivität über 7 und teilweise bis 20 Tage verfolgt. Eine Abnahme der hydrolytischen Aktivität gegenüber Leucinamid konnte in diesem Zeitraum nicht festgestellt werden (siehe auch Abb. 1).

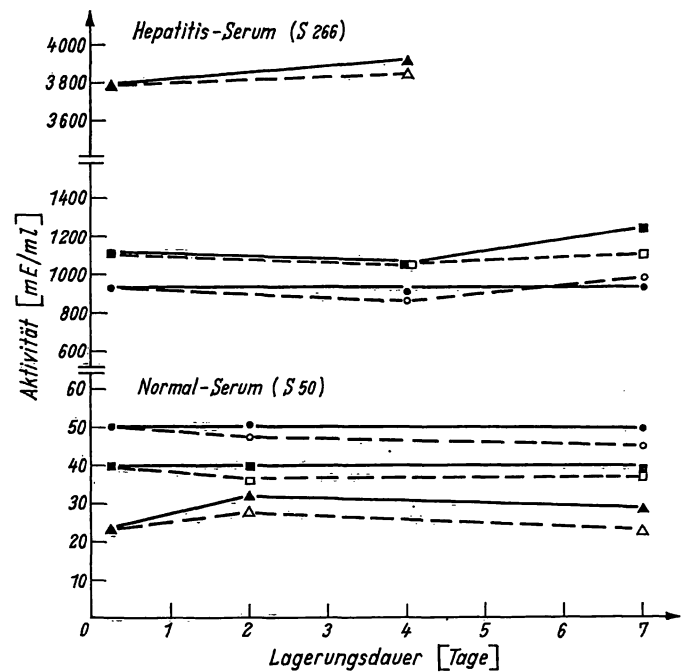


Abb. 1

Lagerungsstabilität der Leucinamid-spaltenden Aktivitäten in Normal- und Hepatitisserum

Die Seren wurden bis zu 7 Tagen bei +4 und +22° aufbewahrt und auf ihre Aktivität gegenüber Leucinamid bei pH 8 (•—• bei 22°, ○—○ bei 4°), pH 9 (■—■ bei 22°, □—□ bei 4°), pH 9 +  $\text{MnCl}_2$  (▲—▲ bei 22°, △—△ bei 4°) überprüft

Die Enzymstabilität von Normal- und Hepatitis-Serum unter Präinkubationsbedingungen (Trispuffer pH 8,0 und 9,0; mit und ohne  $\text{MnCl}_2$ -Zusatz) wurde bei +40° untersucht. Dabei erwies sich Hepatitis-Serum ohne  $\text{MnCl}_2$ -Zusatz bei pH 8,0 und 9,0 bis 540 Min. stabil, mit  $\text{MnCl}_2$ -Zusatz bis 300 Min. Normalserum wurde bei  $\text{MnCl}_2$ -Zusatz bis 240 Min. überprüft und zeigte sich in gleicher Weise stabil (Abb. 2).

Bei diesen Untersuchungen wurde auch der Zeitpunkt der vollständigen Aktivierung bzw. Hemmung der

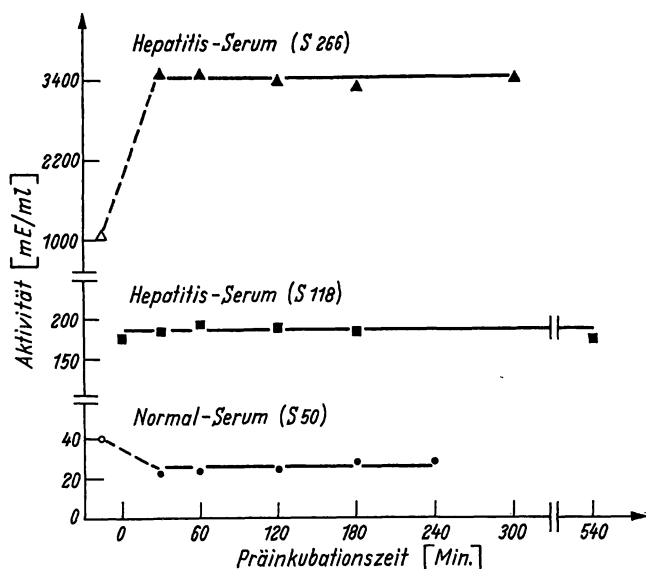


Abb. 2  
Stabilität der Leucinamid-spaltenden Aktivitäten in Normal- und Hepatitisserum unter Präinkubationsbedingungen

Die Seren wurden bei pH 9,0 mit  $MnCl_2$  (2,5 mM) bei 40° die angegebenen Zeiten präinkubiert und anschließend mit 0,05M Leucinamid bei 40° inkubiert (Normalserum 180 Min., Hepatitisserum 30 Min.). In zusätzlichen Ansätzen wurde Normalserum (o) bzw. Hepatitisserum ( $\Delta$ ) 30 Min. ohne Manganchlorid präinkubiert und anschließend mit Leucinamid ohne Manganchlorid inkubiert. Diese Vergleichswerte demonstrieren, daß sowohl die Hemmung des Normalserums wie auch die Aktivierung des Hepatitisserums durch Manganchlorid bei 40° nach 30 Min. optimal sind

Enzymaktivität durch  $MnCl_2$ -Zusatz ermittelt. Schon nach 30 Min. war der aktivierende bzw. inhibierende Effekt optimal (Abb. 2).

2. Untersuchungen zur Abhängigkeit der Enzymaktivität von der  $MnCl_2$ -Konzentration

Die Leucinamidhydrolyse durch Normalserum wird mit steigender  $MnCl_2$ -Konzentration zunehmend gehemmt (Abb. 3). Bei einer  $MnCl_2$ -Konzentration von 20 mM beträgt die Hemmung bei pH 8,0 70%, bei pH 9,0 61%. Die Enzymaktivität des Hepatitis-Serums wird dagegen durch  $MnCl_2$  gesteigert (Abb. 3). Die maximale Aktivierung wurde mit Konzentrationen zwischen 1 und 20 mM erreicht und betrug bei pH 8,0 um 270%, bei pH 9,0 um 200%.

3. Untersuchungen zur Bestimmung der Reaktionsordnung

Der Reaktionsablauf der hydrolytischen Spaltung von Leucinamid durch Hepatitis-Serum folgte bei pH 8,0 und pH 9,0 bis zu 240 Min. einer Kinetik 1. Ordnung; die Hydrolyse des Substrates betrug zu diesem Zeitpunkt 24,7 bzw. 27,9%. Bei pH 9,0 und  $MnCl_2$ -Zusatz konnte bis 120 Min. eine Kinetik 1. Ordnung ermittelt werden; in dieser Zeit waren 50,6% des Substrates umgesetzt worden (Abb. 4).

4. Normalwerte

Zur Ermittlung der Normalwerte wurde im Blutserum von 90 Blutspendern (67 Männer, 23 Frauen<sup>3)</sup>) im Alter von 18 bis 56 Jahren die Aktivität der Leucin-p-nitro-

<sup>3)</sup> Die Bestimmung der Leucinamidhydrolyse bei pH 9,0 ohne  $MnCl_2$ -Zusatz wurde nur bei 40 Personen (27 Männer, 13 Frauen) durchgeführt.

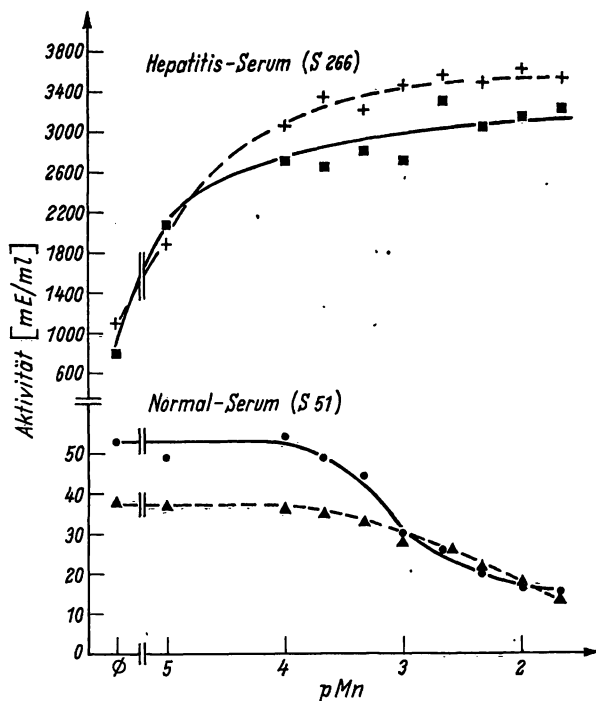


Abb. 3  
Leucinamidhydrolyse durch Normal- und Hepatitisserum als Funktion der Manganchlorid-Konzentration

Vor der Substratzugabe wurde 30 Min. bei 40° mit Manganchlorid präinkubiert. In den Präinkubationsansätzen waren die Manganchloridkonzentrationen um 20% höher als angegeben

•—• und ■—■ bei pH 8,0; +—+ und ▲—▲ bei pH 9,1;  $pMn = -\log [Mn^{++}]$

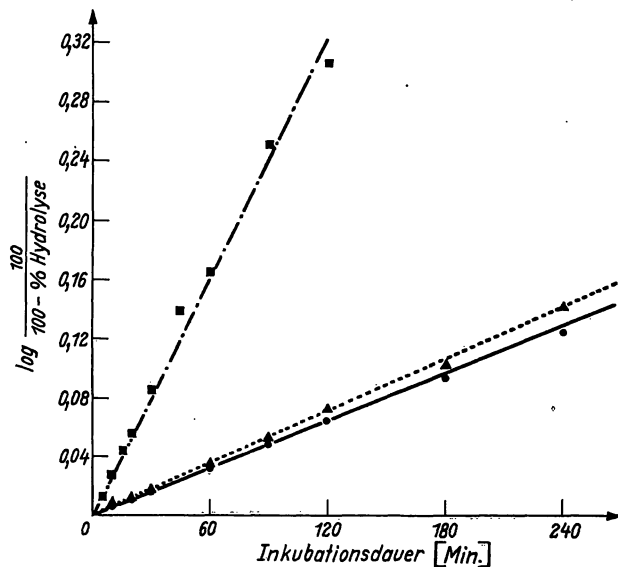


Abb. 4  
Ermittlung der Reaktionsordnung des Leucinamidumsatzes durch Hepatitisserum bei verschiedenen Inkubationsbedingungen  
■ S 149, pH 9,1,  $MnCl_2$ ; ▲ S 118, pH 9,1; • S 118, pH 8,0

anilid- und Leucinamid-spaltenden Enzyme bestimmt. Die statistische Bearbeitung des Materials brachte folgende Ergebnisse:

Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung (S) bei Normal-Personen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Das Histogramm (Abb. 5 u. 6) und die Darstellung der kumulativen Häufigkeit auf Wahrscheinlichkeitspapier ließen eine Normalverteilung der Leucin-p-nitroanilidhydrolyse bei pH 7,2 und der Leucinamidhydrolyse bei

Tab. 1  
Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung (S) der L-Leucin-p-nitroanilid (LEUPA)- und L-Leucinamid-(Leu-NH<sub>2</sub>)-Hydrolyse bei Normalpersonen unter Berücksichtigung von Geschlecht und Alter  
Die in Klammern gesetzten Werte markieren die obere und untere 3 S-Grenze

		LEUPA pH 7,2	pH 8,0	Leu-NH <sub>2</sub> pH 9,0	pH 9,0 + MnCl <sub>2</sub>
Männer und Frauen	(n = 90)	18,7 ± 4,3 (5,9 — 31,5)	49,4 ± 9,6 (20,6 — 78,2)	38,9 ± 9,4 (10,7 — 67,1)	28,3 ± 7,4 (6,1 — 50,5)
Männer	(n = 67)	19,6 ± 4,1	51,9 ± 8,8	41,1 ± 9,5	29,0 ± 7,5
Frauen	(n = 23)	16,1 ± 4,0	42,0 ± 8,2	34,3 ± 7,4	26,3 ± 7,8
Männer, 18—24 J.	(n = 15)	20,1 ± 4,3	51,4 ± 6,7		30,0 ± 5,4
Männer, 25—34 J.	(n = 30)	19,9 ± 3,8	54,8 ± 8,1		29,8 ± 8,3
Männer, 35—44 J.	(n = 15)	18,6 ± 4,0	47,7 ± 11,0		26,2 ± 8,4
Männer, 45—56 J.	(n = 7)	19,1 ± 4,9	49,8 ± 6,8		27,9 ± 5,2

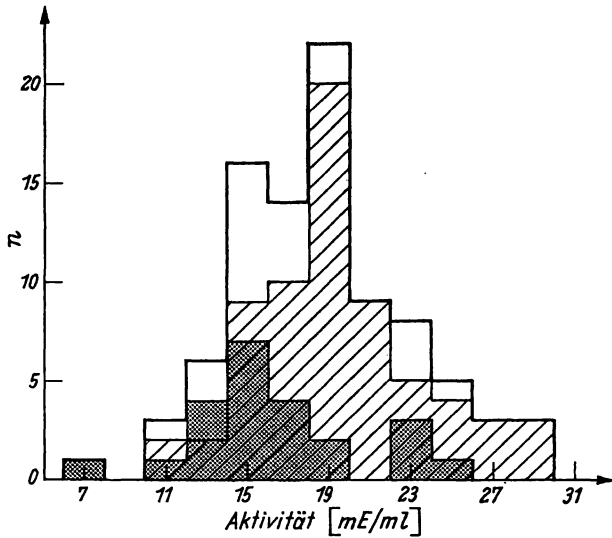


Abb. 5

Häufigkeitsverteilung der Normalwerte der Leucin-p-nitroanilid-Hydrolyse durch Seren von 23 weiblichen und 67 männlichen Blutspendern

- =  $\bar{x} \pm S = 16,1 \pm 4,0$  (n = 23)
  - ▨ =  $\bar{x} \pm S = 19,6 \pm 4,1$  (n = 67)
  - =  $\bar{x} \pm S = 18,7 \pm 4,3$  (n = 90)
- t = 3,51    p < 0,001

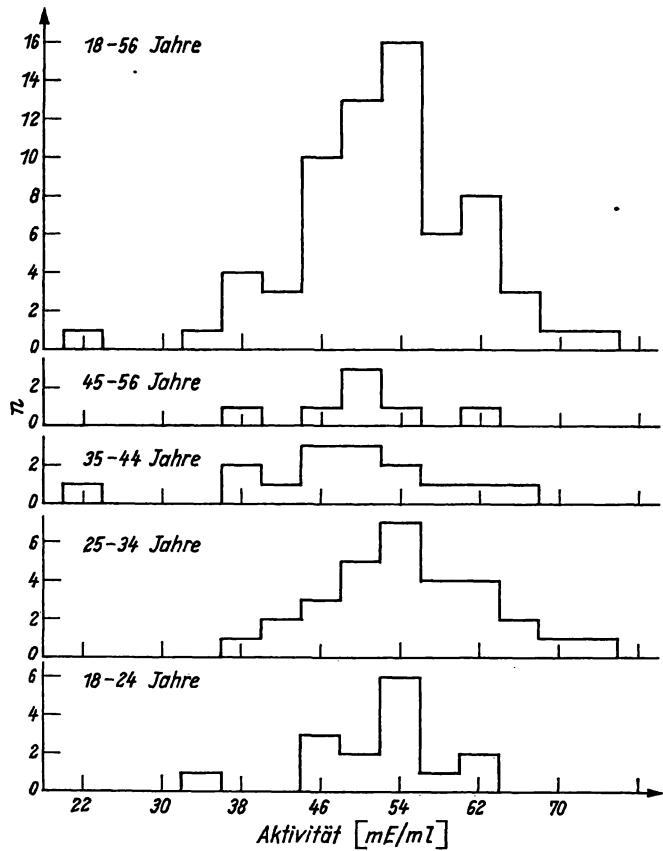


Abb. 7

Häufigkeitsverteilung der Normalwerte der Leucinamidhydrolyse (bei pH 8,0, ohne Manganchlorid-Zusatz) durch Seren von 67 männlichen Blutspendern in verschiedenen Altersgruppen

Fallzahl (n = 40) keine sichere Aussage über den Verteilungstyp.

Eine Aufschlüsselung der Normalwerte nach dem Geschlecht ergab bereits im Histogramm (Abb. 5 u. 6) deutliche Unterschiede zwischen Männern und Frauen. Dieser Unterschied war für die Leucin-p-nitroanilid- und Leucinamidhydrolyse (bei pH 8,0) statistisch signifikant (p < 0,001); bei pH 9,0 mit und ohne MnCl<sub>2</sub>-Zusatz im Histogramm zwar erkennbar, jedoch nicht statistisch zu sichern (p > 0,025 bzw. p > 0,1).

Zwischen Männern verschiedener Altersgruppen (18 bis 24 J., 25—34 J., 35—44 J., 45—56 J.) ergaben sich im Histogramm und beim t-Test keine signifikanten Unterschiede bei der Leucin-p-nitroanilid- und Leucinamidhydrolyse (Abb. 7). Eine Aufschlüsselung der Normalwerte von Frauen nach Altersgruppen mußte wegen der niedrigen Fallzahl unterbleiben.

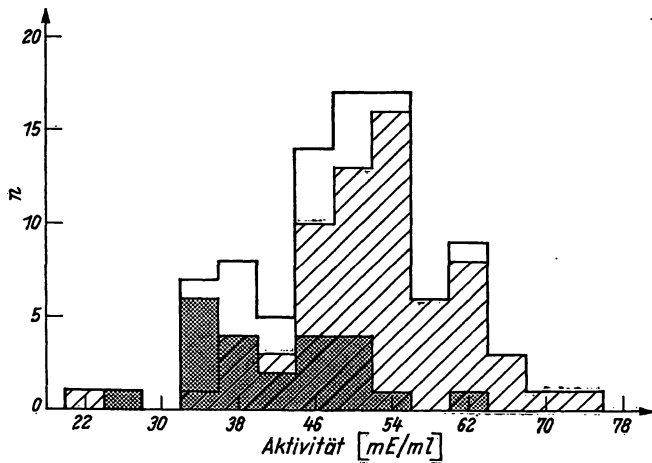


Abb. 6

Häufigkeitsverteilung der Normalwerte der Leucinamidhydrolyse (bei pH 8,0, ohne Manganchlorid-Zusatz) durch Seren von 23 weiblichen und 67 männlichen Blutspendern

- =  $\bar{x} \pm S = 42,0 \pm 8,2$  (n = 23)
  - ▨ =  $\bar{x} \pm S = 51,9 \pm 8,8$  (n = 67)
  - =  $\bar{x} \pm S = 49,4 \pm 9,6$  (n = 90)
- t = 4,76    p < 0,001

pH 8,0 erkennen. Ein gleiches Ergebnis wurde für die Leucinamidhydrolyse bei pH 9,0 mit MnCl<sub>2</sub>-Zusatz erhalten. Die Auswertung der Leucinamidhydrolyse bei pH 9,0 ohne MnCl<sub>2</sub>-Zusatz erlaubte wegen der niedrigen

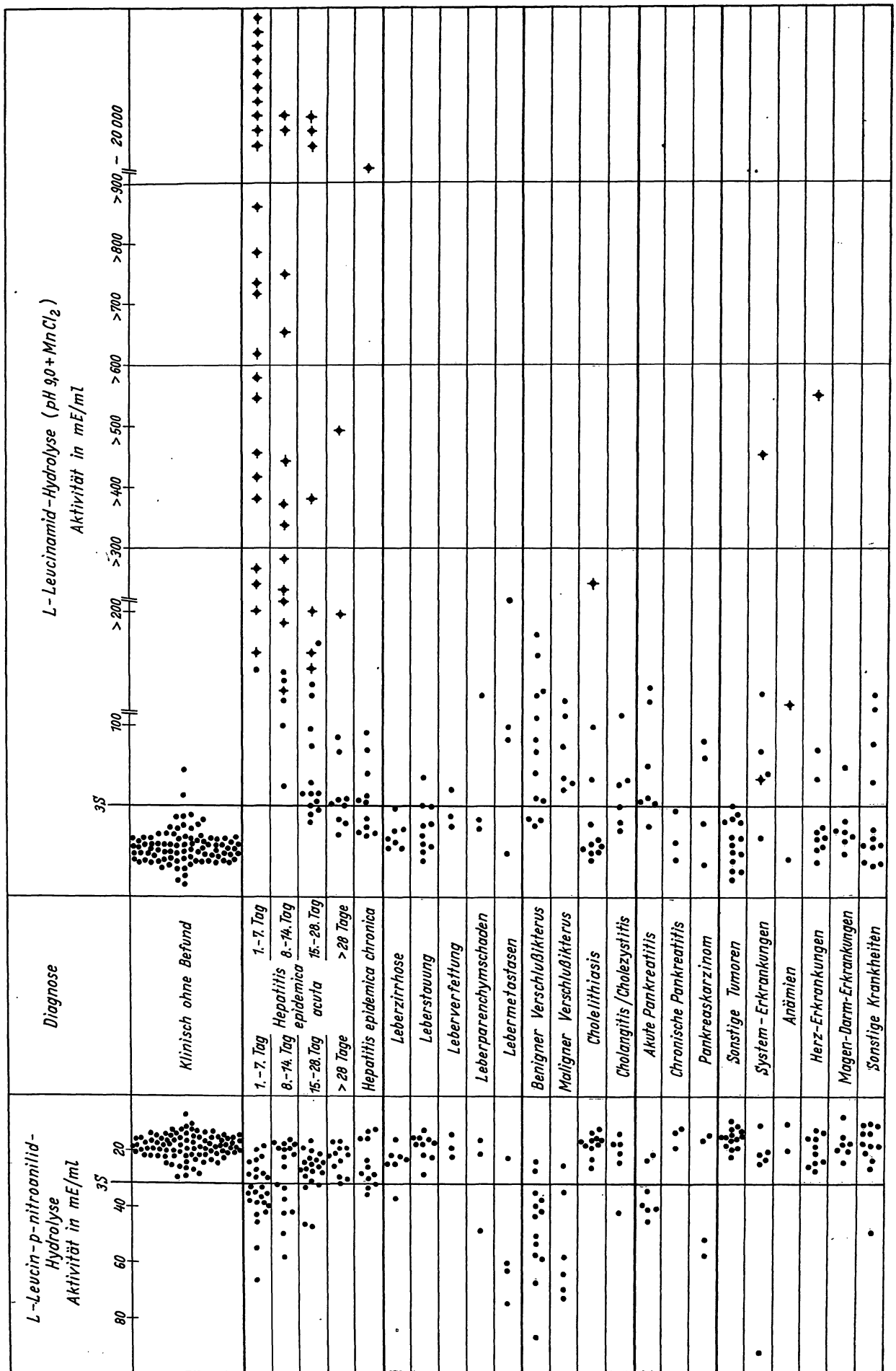


Abb. 8  
 Darstellung der bei Normalpersonen und Patienten ermittelten Hydrolyse von Leucin-p-nitroamid (linker Teil der Abb.) und von Leucinamid bei pH 9,0 und Manganchlorid-Zusatz (rechter Teil der Abb.)  
 Zur Kennzeichnung der erhöhten Werte wurde die 3 S-Grenze angegeben. Das Auftreten von „klassischer“ LAP im Serum (wenigstens 50proz. Aktivierung durch Manganchlorid) ist mit + markiert

### 5. Untersuchungen zur Leucin-*p*-nitroanilid- und Leucinamid-Hydrolyse bei Erkrankungen

Um einen Überblick über das Verhalten der LAP und Arylamidase bzw. anderer Aminopeptidasen bei verschiedenen Erkrankungen zu gewinnen, wurde die Aminopeptidaseaktivität im Serum bei Erkrankungen der Leber, der Gallenwege, des Pankreas, des Magendarmkanals, des Herzens sowie bei Tumoren, Systemerkrankungen, Anaemien und sonstigen Krankheiten untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 2 niedergelegt und in Abbildung 8 dargestellt. In der Tabelle wurden Werte über der 3 S-Grenze durch Kursivdruck hervorgehoben und der Grad der Aktivierung der Leucinamidhydrolyse durch Manganchlorid angegeben. Als beweisend für das Vorliegen der „klassischen“ LAP im Serum sehen wir das Überschreiten der 3 S-Grenze von 52,5 mE/m<sup>l</sup> unter LAP-Optimalbedingungen an, sofern eine wenigstens 50%ige Aktivierung durch 2 mM MnCl<sub>2</sub> bei pH 8,9 bis 9,1 erfolgt.

Der auffälligste Befund ist die bei akuter Hepatitis epidemica beobachtete starke Erhöhung der Leucinamidspaltung. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Tatsache, daß die Leucinamidspaltung durch Manganchlorid aktivierbar wird, während sie mit Normalserum durch MnCl<sub>2</sub> gehemmt wird und gleichzeitig die L-Leucin-*p*-nitroanilid-Hydrolyse nur in einem Teil der Hepatitisfälle mäßig erhöht ist (Tab. 2). Die Annahme, daß es bei der Hepatitis epidemica zu einer massiven Freisetzung der „klassischen“ LAP kommt, konnte schließlich immunologisch bestätigt werden (Abb. 9). Das Enzym, das bei Hepatitis epidemica acuta eine starke Manganchlorid-aktivierte Hydrolyse von Leucinamid bei pH 9,0 bedingt (S 281 = 20000 mE/m<sup>l</sup>), läßt sich vollständig mit einem gegen kristallisierte Rinderlinsen-LAP gerichteten Kaninchen-Antiserum präzipitieren. Dagegen bleibt die bei Verschlußikterus im Serum erhöhte Aktivität (S 304 = 90,8 mE/m<sup>l</sup>), bestimmt mit Leucinamid bei pH 8,0, unbeeinflusst.

In der ersten Woche nach dem Auftreten des Ikterus wurden 10 bis 600fache Erhöhungen der LAP (Leucinamidhydrolyse unter LAP-Optimalbedingungen) beobachtet. Verlaufskontrollen ergaben einen raschen Abfall noch innerhalb der ersten Woche. 3 Wochen nach dem Auftreten des Ikterus und nach Beginn der Behandlung lagen fast alle kontrollierten Hepatitisseren wieder innerhalb der 3 S-Grenze (Abb. 10), während die Aktivierbarkeit mit Manganchlorid meist noch sehr viel früher unter die 50%-Grenze sinkt (vgl. Tab. 2). Von 36 untersuchten Patienten, die an einer akuten Hepatitis epidemica erkrankt waren, zeigten 30 eine eindeutige Erhöhung der LAP-Aktivität, während in 6 Fällen (S 132, 153, 154, 158, 173, 174) die 50%ige Aktivierung mit Manganchlorid nicht erreicht wurde, obwohl die 3 S-Grenze meist noch überschritten war. Diese Seren kamen jedoch erst zwischen dem 12. und 35. Tag nach dem Auftreten des Ikterus zur Untersuchung. Zu diesem Zeitpunkt ist die LAP-Aktivität in

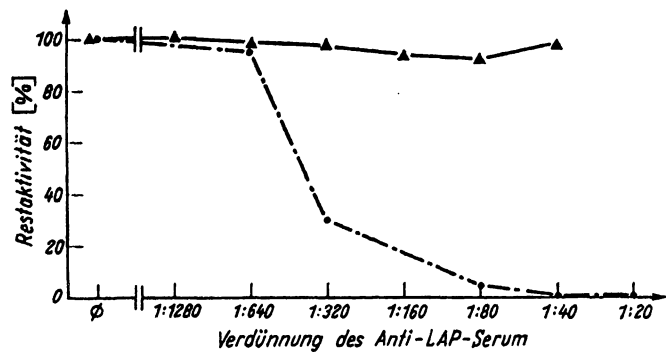


Abb. 9

Differenzierung zwischen LAP und Arylamidase mit immunologischer Methodik

Patientenserum und Anti-LAP-Serum wurden im Präzipitationsansatz wie in Methodik 3. Abschnitt beschrieben, behandelt. Nach dem Zentrifugieren wurde die im Überstand verbliebene Restaktivität bestimmt und mit derjenigen von Kontrollansätzen verglichen

•—• Hepatitis-Serum S 281    ▲—▲ Verschlußikterus-Serum S 304

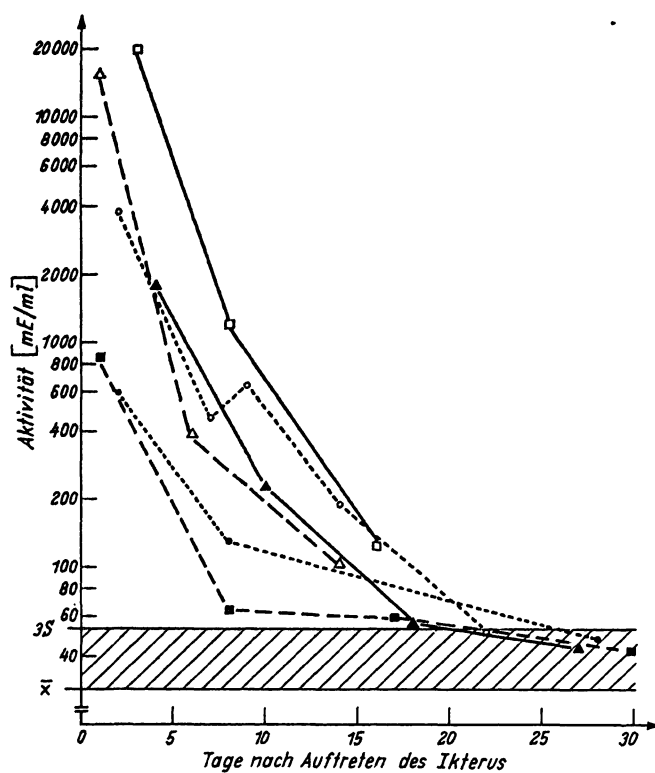


Abb. 10

Verlaufskontrollen der Leucinamidhydrolyse unter LAP-Optimalbedingungen im Serum von Patienten mit Hepatitis epidemica in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Auftretens des Ikterus

•—• S 139    ▲—▲ S 149    ■—■ S 171  
○—○ S 266    △—△ S 280    □—□ S 281

den meisten Fällen bereits wieder abgeklungen (vgl. Abb. 10). Die nachschleppende, nicht-Manganchlorid-aktivierbare Erhöhung der Leucinamidhydrolyse, die in wenigen Fällen vom Ende der ersten Woche, häufiger von der dritten Woche an, beobachtet werden konnte, möchten wir auf eine Erhöhung der Arylamidase (vgl. Tab. 2) und möglicherweise anderer, nicht näher charakterisierter Aminopeptidasen zurückführen. Bei 12 Patienten mit einer chronischen Hepatitis fanden sich nur in einem Fall (S 267) ausgeprägte Hinweise für einen LAP-Anstieg — stark gesteigerte Leucinamidhydrolyse bei gleichzeitiger Aktivierung mit Mangan-

Tab. 2

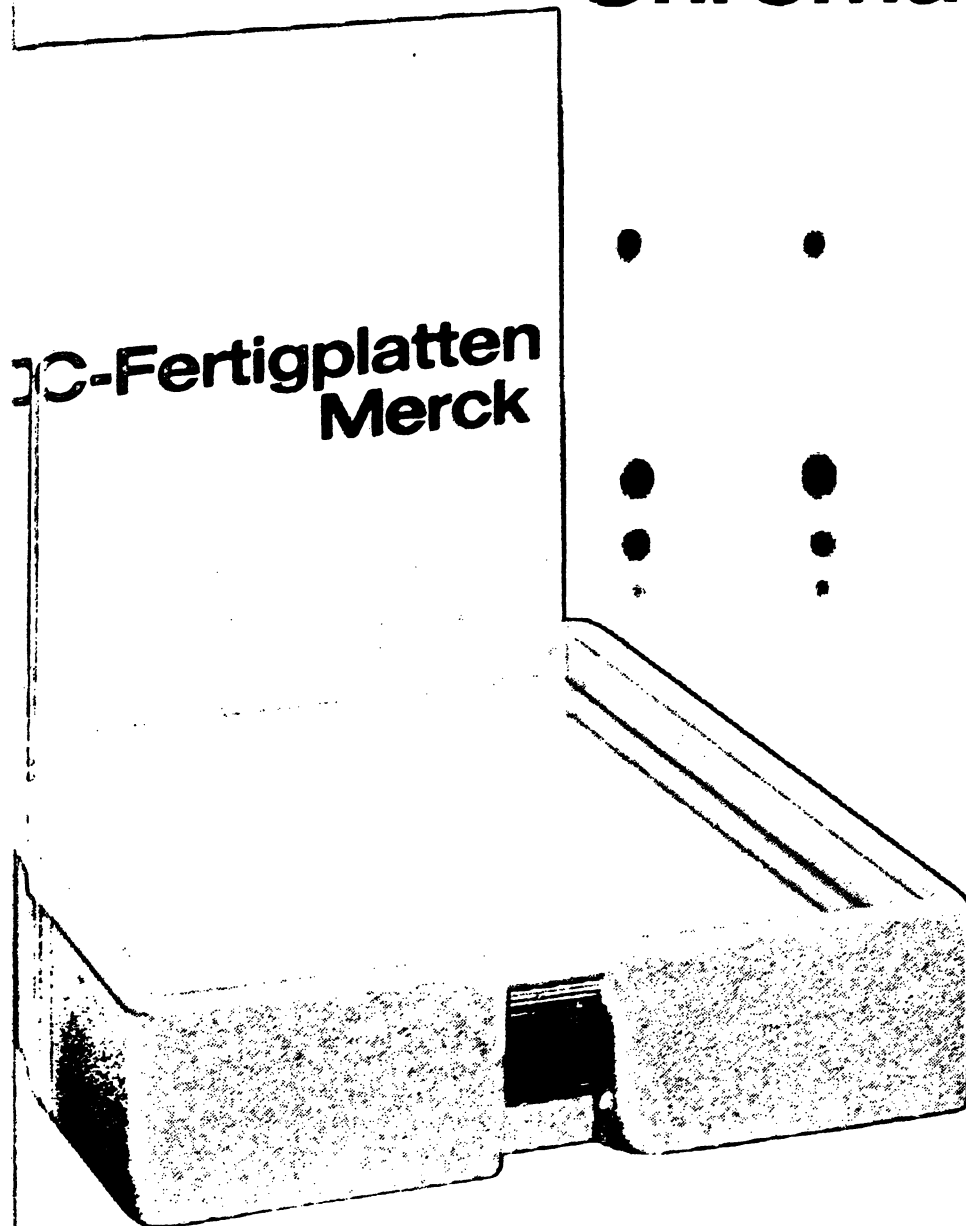
L-Leucin-p-nitroanilid-(LEUPA)- und L-Leucinamid-(Leu-NH<sub>2</sub>)-Hydrolyse durch pathologische Seren unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

Zur schnelleren Orientierung über die Manganaktivierbarkeit wurde das ungefähre Ausmaß der Aktivierung durch folgende Symbole gekennzeichnet: ∅ keine; (+) <50%; + 50—100%; ++ 100—150%; +++ >150%. Pathologische Werte sind kursiv gesetzt. Kontrolle bedeutet hier Verlaufskontrolle

Nr.	Name	Diagnose	Tage nach Auftreten des Ikterus	LEUPA				MnCl <sub>2</sub> -Aktiv.
				pH 7,2	pH 8,0	pH 9,0	pH 9,0 + MnCl <sub>2</sub>	
1. Hepatitis epidemica								
96	Ge	Hepatitis epidemica	14	17,5	625,0	695,0	1460,0	++
100	Ge	Hepatitis epidemica (Kontrolle)	22	24,8	127,0	119,0	199,0	+
97	Lu	Hepatitis epidemica	23	21,9	120,0	111,0	157,0	+
123	Lu	Hepatitis epidemica (Kontrolle)	67	32,5	150,0	137,0	199,0	+
101	Sch	Hepatitis epidemica	2	29,1	343,0	357,0	785,0	++
110	Sch	Hepatitis epidemica (Kontrolle)	9	33,1	312,0	343,0	730,0	++
111	Ki	Hepatitis epidemica	2	34,6	123,0	105,0	163,0	+
112	Ku	Hepatitis epidemica	3	42,4	343,0	348,0	715,0	++
118	Kö	Hepatitis epidemica	8	32,8	163,0	173,0	375,0	++
211	Kö	Hepatitis epidemica (Kontrolle)	100	19,1	60,9	55,1	57,0	(+)
119	Na	Hepatitis epidemica	1	38,6	168,0	163,0	258,0	+
131	Na	Hepatitis epidemica (Kontrolle)	28	25,4	83,5	70,0	61,0	∅
122	Ho	Hepatitis epidemica	9	58,0	321,0	294,0	451,0	++
132	Kö	Hepatitis epidemica	12	49,7	159,0	136,0	132,0	++
133	Ma	Hepatitis epidemica	18	24,4	70,8	61,0	52,8	∅
139	Gi, M	Hepatitis epidemica	2	37,4	353,0	317,0	590,0	+
163	Gi, M	Hepatitis epidemica (1. Kontrolle)	8	42,2	147,0	105,0	131,0	(+)
204	Gi, M	Hepatitis epidemica (2. Kontrolle)	28	20,7	69,3	50,2	48,8	∅
225	Gi, M	Hepatitis epidemica (3. Kontrolle)	35	16,8	60,9	55,1	58,5	(+)
149	Gi, C	Hepatitis epidemica	4	45,4	758,0	805,0	1770,0	++
168	Gi, C	Hepatitis epidemica (1. Kontrolle)	10	41,9	186,0	145,0	231,0	+
197	Gi, C	Hepatitis epidemica (2. Kontrolle)	18	25,0	103,0	82,8	55,8	∅
205	Gi, C	Hepatitis epidemica (3. Kontrolle)	27	27,2	59,6	53,0	45,1	∅
224	Gi, C	Hepatitis epidemica (4. Kontrolle)	34	23,7	60,1	53,0	36,4	∅
233	Le	Hepatitis epidemica	14	15,6	108,0	146,0	245,0	+
150	Th	Hepatitis epidemica	1	66,4	578,0	622,0	1224,0	+
169	Th	Hepatitis epidemica (1. Kontrolle)	7	36,3	168,0	114,0	150,0	(+)
194	Th	Hepatitis epidemica (2. Kontrolle)	15	31,1	156,0	120,0	159,0	(+)
206	Th	Hepatitis epidemica (3. Kontrolle)	24	25,6	90,1	73,0	88,3	(+)
236	Th	Hepatitis epidemica (4. Kontrolle)	37	16,8	73,8	58,1	54,0	∅
153	Wo	Hepatitis epidemica	27	47,4	186,0	114,0	124,0	(+)
155	Ru	Hepatitis epidemica	7	35,0	155,0	129,0	199,0	++
156	He	Hepatitis epidemica	22	46,7	222,0	186,0	379,0	++
157	Ha	Hepatitis epidemica	29	21,4	68,5	43,8	45,2	(+)
158	Ma	Hepatitis epidemica	31	25,6	75,2	49,8	55,8	(+)
162	Sch	Hepatitis epidemica	16	27,8	407,0	503,0	1380,0	+++
170	Sch	Hepatitis epidemica (1. Kontrolle)	20	26,8	537,0	650,0	1515,0	+++
193	Sch	Hepatitis epidemica (2. Kontrolle)	28	23,4	379,0	415,0	930,0	+++
207	Sch	Hepatitis epidemica (3. Kontrolle)	37	29,5	213,0	199,0	499,0	+++
237	Sch	Hepatitis epidemica (4. Kontrolle)	50	21,7	71,5	80,0	92,8	(+)
171	Vo	Hepatitis epidemica	1	27,9	307,0	343,0	860,0	++
198	Vo	Hepatitis epidemica (1. Kontrolle)	8	22,0	87,2	68,5	64,8	∅
208	Vo	Hepatitis epidemica (2. Kontrolle)	17	23,6	75,1	54,5	60,6	(+)
239	Vo	Hepatitis epidemica (3. Kontrolle)	30	18,8	80,6	63,5	43,6	∅
172	Ne	Hepatitis epidemica	9	18,8	93,4	71,5	124,0	+
173	Go	Hepatitis epidemica	35	30,1	116,0	82,8	84,2	(+)
174	Ot	Hepatitis epidemica	26	29,2	111,0	67,0	60,2	∅
195	De	Hepatitis epidemica	3	28,5	507,0	560,0	2574,0	+++
229	De	Hepatitis epidemica (Kontrolle)	19	20,8	114,0	94,3	142,0	+
196	Wo	Hepatitis epidemica	4	35,6	808,0	840,0	2530,0	+++
226	St	Hepatitis epidemica	4	27,2	713,0	794,0	2080,0	+++
227	Li	Hepatitis epidemica	2	33,7	1160,0	1070,0	3330,0	+++
238	Li	Hepatitis epidemica (Kontrolle)	8	25,9	168,0	168,0	335,0	++
228	Re	Hepatitis epidemica	2	38,3	628,0	720,0	2060,0	+++
230	Ka	Hepatitis epidemica	1	55,3	499,0	474,0	710,0	+
266	Kau	Hepatitis epidemica	2	19,7	880,0	1170,0	3780,0	+++
273	Kau	Hepatitis epidemica (1. Kontrolle)	7	23,3	162,0	168,0	462,0	+++
277	Kau	Hepatitis epidemica (2. Kontrolle)	9	17,2	241,0	240,0	641,0	+++
285	Kau	Hepatitis epidemica (3. Kontrolle)	14	17,2	101,0	114,0	189,0	+
290	Kau	Hepatitis epidemica (4. Kontrolle)	22	16,2	77,0	56,6	51,6	∅
274	We	Hepatitis epidemica	4	42,0	347,0	344,0	607,0	+
278	We	Hepatitis epidemica (1. Kontrolle)	6	39,2	271,0	295,0	545,0	+
286	We	Hepatitis epidemica (2. Kontrolle)	11	37,2	200,0	128,0	263,0	++
291	We	Hepatitis epidemica (3. Kontrolle)	19	32,7	142,0	131,0	97,7	∅
275	Sch	Hepatitis epidemica	1	29,1	225,0	349,0	410,0	+
279	Sch	Hepatitis epidemica (1. Kontrolle)	3	22,0	194,0	174,0	257,0	+
287	Sch	Hepatitis epidemica (2. Kontrolle)	8	18,8	97,0	81,4	101,0	(+)
292	Sch	Hepatitis epidemica (3. Kontrolle)	16	19,1	75,3	73,8	63,8	∅
280	Pe	Hepatitis epidemica	1	23,9	2736,0	2100,0	15100,0	+++
288	Pe	Hepatitis epidemica (1. Kontrolle)	6	18,8	161,0	185,0	391,0	++
293	Pe	Hepatitis epidemica (2. Kontrolle)	14	18,5	106,0	104,0	120,0	(+)
281	Sch	Hepatitis epidemica	3	33,0	480,0	4350,0	20000,0	+++
289	Sch	Hepatitis epidemica (1. Kontrolle)	8	21,0	284,0	383,0	1220,0	+++
294	Sch	Hepatitis epidemica (2. Kontrolle)	16	33,0	154,0	158,0	125,0	∅
2. Chronische Hepatitis								
165	H. H.	Chron. Hepatitis	15,4	59,5	59,5	47,5	55,0	(+)
166	G. S.	Chron. Hepatitis	23,3	67,0	67,0	49,0	58,8	(+)
267	Sch	Chron. Hepatitis + Diabetes mellitus	29,5	348,0	407,0	895,0	+	
272	H	Chron. Hepatitis, exazerbiert; Präkoma hepaticum	35,6	110,0	101,0	72,5	∅	
296	Di	Chron. Hepatitis (biliäre Zirrhose?)	25,8	69,5	50,9	36,1	∅	
297	Bä	Chron. Hepatitis	33,3	88,9	83,2	96,4	(+)	
298	Pä	Chron. Hepatitis	28,2	67,5	62,8	46,2	∅	
299	Ki	Chron. Hepatitis	15,6	60,7	49,7	41,0	∅	
300	Wa	Chron. Hepatitis	13,0	49,5	41,2	36,8	∅	
301	Gr	Chron. Hepatitis	12,3	50,5	39,1	37,3	∅	
302	Bo	Chron. Hepatitis (histolog.)	28,2	87,4	74,5	84,5	(+)	
303	Re	Chron. Hepatitis	32,7	81,1	72,5	55,7	∅	



# Für die Dünnschicht- Chromatographie



**Kieselgel F<sub>254</sub>** Formate: 20 x 20 cm, 10 x 20 cm, 5 x 20 cm, 5 x 10 cm

**Kieselgel ohne Fluoreszenzindikator** Formate: 20 x 20 cm, 5 x 20 cm

**PSC-Fertigplatten Kieselgel F<sub>254</sub>** Format: 20 x 20 cm (Schichtdicke 2 mm)

**Aluminiumoxid (Typ E) F<sub>254</sub>** Formate: 20 x 20 cm, 5 x 20 cm

**Aluminiumoxid (Typ T) F<sub>254</sub>** Formate: 20 x 20 cm, 5 x 20 cm

**PSC-Fertigplatten Aluminiumoxid (Typ T) F<sub>254</sub>** Format: 20 x 20 cm (Schichtdicke 1,5 mm)

**Cellulose F** Formate: 20 x 20 cm, 10 x 20 cm

**Cellulose ohne Fluoreszenzindikator** Formate: 20 x 20 cm, 10 x 20 cm

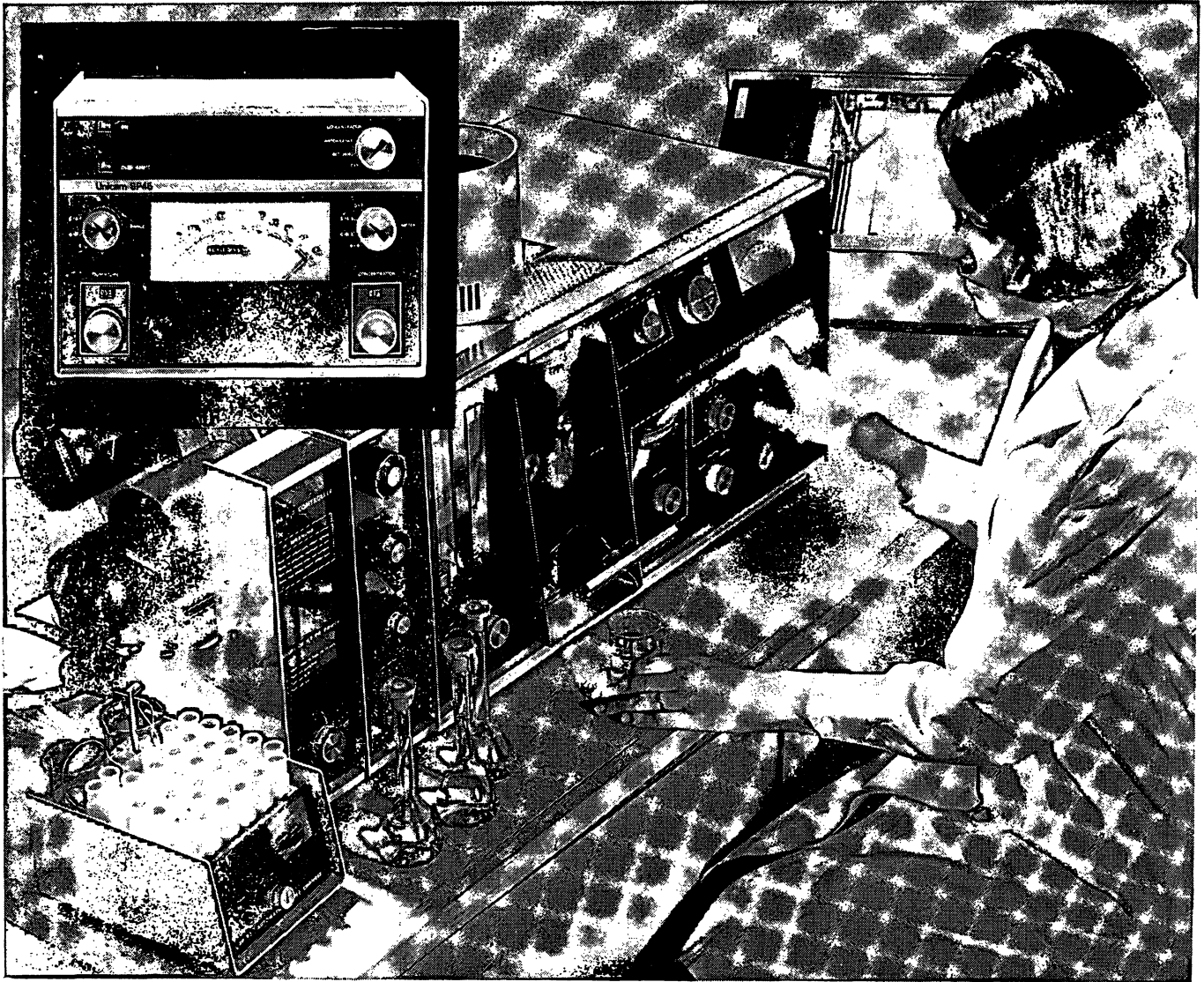
**PEI-Cellulose F** Format: 20 x 20 cm

Bitte verlangen Sie unsere Spezialprospekte.

**E. MERCK AG**



**DARMSTADT**



Atomabsorption

606

## Konzentrationswerte direkt ablesen

Dafür sorgt der neue Konzentrationswandler SP 45 beim Absorptions-Spektralphotometer SP 90 aus dem Programm **PYE UNICAM**

Er wandelt die Durchlässigkeitsausgabe des Grundgerätes direkt in Konzentrationswerte um, die dann auf einem Anzeigeinstrument, einem Zweitschreiber oder einem Digitaldrucker mit hoher Genauigkeit abgelesen oder dargestellt werden können. Das Gerät hat je 4 lineare Bereiche für Konzentration und Extinktion. Mit einem Drehknopf für Kur-

venkorrektur läßt sich der Verlauf der Eichung korrigieren. Der neue Durchlässigkeits-Konzentrationswandler SP 45 erübrigt das mühsame Aufzeichnen und Auswerten von Eichkurven.

Und hier die wichtigsten Daten:

Atomabsorptions-Spektrophotometer SP. 90: Wellenlängenbereich 190 nm bis

770 nm bzw. 190 nm bis 852 nm; Drehkopf für schnellen Lampenwechsel mit Vorheizung, eingebaute Skalendehnung; Anschluß für lin/log-Schreiber oder Konzentrationswandler; Umschaltmöglichkeit für Flammenemissionsbetrieb; Lachgas-Azetylen-System, Mehrschlitzbrenner. Ausführliches Informationsmaterial liegt für Sie bereit. Bitte fordern Sie es an.

Wir interessieren uns für die beschriebenen Spektralphotometer SP 90 und bitten um

- Zusendung ausführlicher Unterlagen
- ein Angebot
- Besuch Ihres Beratungsingenieurs

Gewünschtes bitte ankreuzen oder ergänzen

und hier die Rufnummer der Technischen Büros:

Berlin 30, Telefon [0311] 24 59 08  
 Essen-Altenessen, Telefon [02141] 29 40 81  
 Frankfurt am Main, Telefon [0611] 7 91 31  
 Hannover, Telefon [0511] 2 68 59

München 12, Telefon [0811] 76 77 31  
 Stuttgart-Bad Cannstatt, Telefon [0711] 56 50 03

**PHILIPS**   
**industrie elektronik**

Philips Industrie Elektronik GmbH, Hamburg 63  
 Röntgenstraße 22, Telefon [0411] 50 10 31

Tab. 2 (Fortsetzung)

Nr.	Name	Diagnose	LEUPA		Leu-NH <sub>2</sub>		MnCl <sub>2</sub> - Aktiv.
			pH 7,2	pH 8,0	pH 9,0	pH 9,0 + MnCl <sub>2</sub>	
<b>3. Leberzirrhose</b>							
201	St	Atrophische Leberzirrhose, dekompensiert	15,9	60,2	41,5	33,2	∅
202	Ru	Atrophische Leberzirrhose, kompensiert	37,3	64,8	55,0	39,2	∅
203	Ro	Pigmentzirrhose (histolog.)	24,6	101,0	73,0	51,2	∅
210	Wu	Atrophische Leberzirrhose	22,0	71,8	46,8	28,0	∅
260	Wu	Atrophische Leberzirrhose	21,7	71,0	55,9	29,4	∅
259	Ri	Dekompensierte Leberzirrhose	22,7	77,3	60,9	31,6	∅
255	Bl	Biliäre Leberzirrhose	24,6	83,4	65,6	40,4	∅
<b>4. Leberstauung</b>							
136	St	Herzdekompensation mit Leberstauung	21,4	64,8	55,8	41,5	∅
137	Ke	Zustand nach Herzinfarkt. Leberstauung	17,6	41,5	37,8	31,8	∅
144	Ba	Herzdekompensation bei Mitralklappen	28,6	66,2	44,5	53,5	(+)
176	We	Herzdekompensation bei Mitralklappen (post op.)	15,5	61,0	42,2	52,0	(+)
185	En	Herzdekompensation mit Stauungsleber	17,5	45,6	31,0	21,6	∅
245	Ze	Schwere Herzdekompensation mit Stauungsleber	16,9	52,5	61,8	70,3	(+)
252	Ro	Herzdekompensation mit Leberstauung	12,6	38,3	30,2	25,5	∅
261	Sch	Herzdekompensation mit Leberstauung	16,8	55,4	43,6	27,9	∅
262	Ku	Herzdekompensation mit Leberstauung	22,3	81,4	64,1	42,3	∅
283	Wi	Dekompensiertes Mitralklappen mit Leberstauung	15,6	67,3	54,0	35,9	∅
<b>5. Leberverfettung</b>							
113	Bö	Leberverfettung bei allg. Adipositas	22,0	55,8	46,0	41,5	∅
270	Wu	Leberverfettung bei Diabetes mellitus	14,2	70,3	54,0	45,8	∅
249	Ka	Leberverfettung bei Diabetes mellitus; Coma diabeticum	19,1	59,4	46,8	62,5	(+)
<b>6. Cholestatische Hepatose/ Leberparenchymschaden</b>							
164	Sch	Cholestat. Hepatose (Chlorpromazinikterus)	48,7	122,4	94,4	130,1	(+)
251	Se	Leberparenchymschaden bei Herzdekompensation	21,4	73,2	57,7	44,7	∅
184	Re	Leberparenchymschaden bei Zustand nach Cholecystektomie	16,2	77,6	39,8	39,8	∅
<b>7. Lebermetastasen (LM) / primäres Leberzell-Karzinom</b>							
161	La	LM bei Magenkarzinom und Peritoneal-Karzinom	60,0	186,0	116,0	100,0	∅
183	Ma	LM bei Bronchialkarzinom (kein Ikterus)	62,8	209,0	187,0	211,0	(+)
216	Hö	LM bei Rektumkarzinom (kein Ikterus)	74,5	281,0	199,0	92,6	∅
134	De	Primäres Leberzellkarzinom bei Lebercirrhose	22,6	67,8	51,2	25,8	∅
<b>8. Verschlussikterus (VI) (benigner)</b>							
141	Se	VI durch Choledocholithiasis (1 Tag post op.)	43,2	150,0	80,5	41,5	∅
160	Ot	VI durch narbige Stenosierung des D. choledochus	27,2	108,0	71,5	58,8	∅
180	Tö	VI durch Choledocholithiasis	41,5	127,0	81,9	57,9	∅
181	Il	VI durch Choledocholithiasis (inkomplett); Pankreatitis	67,4	245,0	144,0	92,8	∅
182	Sch	VI durch Choledocholithiasis	57,1	186,0	117,0	73,3	∅
215	Bu	VI durch Choledocholithiasis (inkomplett)	58,6	213,0	141,0	105,0	∅
235	Pe	VI durch Choledocholithiasis (inkomplett)	39,6	185,0	146,0	130,0	∅
218	Sa	VI durch Choledocholithiasis (inkomplett)	23,6	82,0	59,5	46,0	∅
109	St	VI durch Choledocholithiasis	53,6	191,0	150,0	84,2	∅
179	Ku	Zustand nach Ureterstein-Operation (Ursache des post op. aufgetretenen Ikterus nicht geklärt)	50,2	245,0	156,0	132,0	∅
200	Ku	post op. aufgetretenen Ikterus nicht geklärt	34,7	177,0	155,0	177,0	(+)
304	Ro	VI durch Choledocholithiasis	37,3	90,8	78,4	47,2	∅
154	Be	VI durch Choledocholithiasis? Cholelithiasis	87,2	334,0	199,2	163,2	∅
<b>9. Verschlussikterus (VI) (maligner)</b>							
159	De	VI bei Oberbauchtumor (Gallengangskarzinom?)	64,2	173,0	101,0	70,0	∅
231	Mü	VI unklarer Genese (Gallengangskarzinom?)	25,3	115,0	87,0	63,5	∅
242	He	VI bei Magenkarzinom	72,5	367,0	289,0	104,0	∅
250	Sch	VI bei Oberbauchtumor mit Lebermetastasen	69,7	261,0	213,0	119,0	∅
253	Kö	VI bei Spindelzellsarkom mit Einbruch in den D. choledochus	34,7	135,0	106,0	67,5	∅
217	La	VI bei Gallenblasenkarzinom mit Lebermetastasen	58,0	199,0	135,0	87,7	∅
<b>10. Cholelithiasis</b>							
186	De	Cholelithiasis	16,2	52,2	33,5	26,5	∅
189	Ba	Cholelithiasis; 10 Tage nach Cholecystektomie	26,2	108,0	83,5	100,0	(+)
191	Za	Cholelithiasis	23,6	71,5	51,2	43,0	∅
188	Be	Cholelithiasis	18,5	52,0	42,2	31,8	∅
212	Sch	Cholelithiasis	18,1	55,3	38,3	27,0	∅
219	Sch	Cholelithiasis	13,6	48,2	37,0	33,2	∅
220	Zi	Cholelithiasis	18,1	61,0	39,2	22,8	∅
221	Hi	Cholelithiasis	15,9	37,0	31,8	28,8	∅
222	Sch	Cholelithiasis	16,8	47,5	37,8	28,0	∅
223	Ph	Cholelithiasis u. chron. Cholecystitis (kein Ikterus)	12,0	112,0	114,0	231,0	++
232	Ph	Cholelithiasis (12 Tage nach Cholecystektomie)	16,2	83,0	60,9	69,3	(+)
<b>11. Cholangitis — Cholecystitis</b>							
142	Sch	Chronische Cholangitis	20,8	84,2	64,0	67,0	(+)
167	La	Akute Cholangitis (im Abklingen)	42,2	130,0	88,8	104,0	(+)
177	Fr	Akute Cholecystitis; subphrenischer Abszess	17,4	68,5	49,8	44,5	∅
234	Fi	Akute Cholecystitis und Pericholecystitis	24,0	88,5	69,7	68,4	∅
254	Fi	Gallenblasenhydrops	17,4	76,8	60,5	52,8	∅
268	Fu	Gallenblasenhydrops	13,6	51,4	43,9	40,6	∅
<b>12. Akute Pankreatitis (AP)</b>							
130	Mo	AP; Cholelithiasis (kein Ikterus)	41,0	102,0	67,0	41,5	∅
209	He	AP; Narbige Stenosierung des D. choledochus (kein Ikterus)	23,6	75,7	59,8	58,7	∅

Tab. 2 (Fortsetzung)

Nr.	Name	Diagnose	LEUPA	Leu-NH <sub>2</sub>			MnCl <sub>2</sub> - + Aktiv.
			pH 7,2	pH 8,0	pH 9,0	pH 9,0 + MnCl <sub>2</sub>	
241	St	AP; Cholelithiasis (Ikterus abgeklungen)	21,4	112,0	87,5	56,1	∅
243	Lo	AP (kein Ikterus)	45,7	178,0	140,0	118,0	∅
276	Pi	AP (kein Ikterus)	34,0	146,0	117,0	56,8	∅
190	Ky	AP nach Cholecystektomie; Cholelithiasis (kein Ikterus)	40,8	180,0	132,0	127,0	∅
192	Po	AP nach Cholecystektomie; Cholelithiasis (kein Ikterus)	39,2	128,0	95,0	77,5	∅
13. Chronische Pankreatitis / Pankreasinsuffizienz							
271	Sch	Chronische Pankreatitis	13,2	66,7	55,9	32,4	∅
146	Wo	Pankreasinsuffizienz	12,0	49,8	37,0	50,5	(+)
151	Sch	Pankreasinsuffizienz; Zustand nach Cholecystektomie	19,1	47,5	29,5	22,8	∅
14. Pankreaskarzinom							
94	Tr	Pankreaskarzinom; Cholecystojejunostomie (Ikterus abgeklungen)	13,6	60,2	49,8	43,8	∅
187	Sch	Pankreaskopfkarzinom (kein Ikterus)	14,3	46,0	25,8	19,0	∅
257	Ha	Pankreastumor? (kein Ikterus)	51,8	152,0	119,0	82,0	∅
269	Ha	Pankreastumor? (kein Ikterus)	57,8	222,0	164,0	91,7	∅
15. Sonstige Tumoren							
104	Sp	Magenkarzinom	19,3	59,5	49,8	46,8	∅
105	Ko	Magenkarzinom	16,1	47,5	39,2	27,2	∅
106	Tr	Magenkarzinom	12,0	25,8	22,0	14,5	∅
93	Ek	Rektumkarzinom	15,3	61,8	50,5	44,5	∅
99	Ca	Analkarzinom	11,0	54,2	42,2	34,8	∅
117	Wi	Oesophaguskarzinom	14,5	29,5	22,8	11,0	∅
95	Be	Harnblasenkarzinom	14,3	55,8	42,2	34,8	∅
115	Ru	Harnblasenkarzinom	14,7	37,0	31,0	15,2	∅
116	Gü	Harnblasenkarzinom	19,1	40,0	39,2	22,0	∅
98	Ge	Harnblasensarkom	9,6	45,2	36,2	31,0	∅
92	Mi	Melanocytoblastom	18,0	67,0	58,0	48,2	∅
107	Sch	Melanocytoblastom	22,1	46,8	39,2	26,5	∅
108	Wa	Melanocytoblastom	13,5	46,8	40,8	43,8	(+)
178	Po	Retothelsarkom	15,5	64,0	49,8	53,5	(+)
16. Systemerkrankungen							
140	Be	Retikulose	21,1	67,0	45,2	35,5	∅
199	Be	Retikulose (Kontrolle)	24,6	125,0	97,5	126,0	(+)
121	He	Akute Leukose	23,0	62,5	60,2	85,8	(+)
135	He	Myeloische Leukämie; Anaemie; Ikterus	92,7	253,0	217,0	73,8	∅
175	Bu	Lymphogranulomatose, (Ascites)	10,7	52,0	41,5	70,0	+
244	Al	Lymphogranulomatose (histolog.)	20,4	213,0	222,0	468,0	++
17. Anaemien							
102	Me	Perniziöse Anämie (geringe Hepatomegalie)	10,4	67,8	70,8	120,0	+
145	We	Eisenmangel-Anämie	19,8	57,2	30,2	23,5	∅
18. Herzerkrankungen							
91	He	Myocardinfarkt-Rezidiv	24,1	67,8	50,5	27,2	∅
114	Bö	Myocardinfarkt	12,4	33,2	33,2	30,2	∅
126	Wi	Myocardinfarkt	15,8	47,5	37,8	21,2	∅
138	Zi	Myocardinfarkt	13,2	44,5	38,5	38,5	∅
214	Ku	Myocardinfarkt, nicht dekompensiert	23,6	70,0	59,5	70,0	(+)
256	Ot	Myocardinfarkt (unter Streptokinasetherapie)	27,2	67,0	78,2	84,2	(+)
103	Ri	Angina pectoris. Zustand nach Thrombophlebitis*)	18,1	276,0	285,0	541,0	+
128	Jo	Vitium cordis, nicht dekompensiert	25,4	58,0	52,0	34,8	∅
129	Be	Vorhofseptumdefekt, nicht dekompensiert	20,2	56,5	48,2	42,2	∅
240	Sa	Zustand nach Einpflanzung einer Mitralklappe (1 Tag post op.)	14,9	53,7	42,3	36,2	∅
19. Magen-Darm-Erkrankungen							
143	Ri	Akute Gastritis	17,5	52,0	37,8	37,8	∅
265	Wi	Akute Gastritis	17,2	50,6	45,3	45,4	∅
282	Ot	Magenstumpfgastritis	7,8	74,4	60,0	77,6	(+)
127	Al	Ulcus ventriculi	19,8	54,2	41,5	25,8	∅
247	Mü	Ulcus duodeni (Rezidiv)	15,2	60,4	47,5	34,0	∅
248	Le	Ulcus ventriculi penetrans	24,0	63,2	50,5	35,5	∅
120	Ma	Colitis	20,3	55,0	46,0	40,0	∅
20. Sonstige Krankheiten							
124	Kr	Pleuropneumonie, Rechtsschenkelblock	13,3	62,5	52,0	30,2	∅
125	Sch	Pneumonie	18,2	55,0	48,2	40,8	∅
213	Bo	Bronchopneumonie	10,4	35,5	22,8	19,0	∅
148	Gü	Abszedierende Virus-pneumonie; Tracheobronchitis	20,8	79,0	91,8	89,5	∅
147	Kr	Suicid-Versuch (Arzneimittelvergiftung)	13,6	40,0	29,5	36,2	(+)
152	Be	Chronische Adnexitis	10,7	32,5	20,5	21,2	(+)
263	Wa	Chronische Nephritis; Präuraemie	18,2	57,7	45,4	31,6	∅
264	Ha	Chronische Nephritis mit nephrotischem Einschlag	17,2	60,7	47,8	31,6	∅
246	Bi	Dermatomyositis	23,6	180,0	142,0	105,0	∅
258	We	Apoplexie (vor 7 Tagen)	49,6	175,0	138,0	115,0	∅
284	We	Apoplexie (vor 5 Wochen)	26,5	124,0	100,0	68,6	∅
295	Pa	Apoplexie (vor 5 Tagen)	11,0	46,6	38,1	20,9	∅

\*) Klinisch kein Anhalt für eine Lebererkrankung

chlorid. Bei weiteren 124 Patienten mit Erkrankungen verschiedener Genese (Tab. 2) fanden sich nur 2 Seren bei Lymphogranulomatose (S 175, 244) und je ein Serum bei chronischer Cholezystitis (S 223), perniziöser Anaemie (S 102) und Angina pectoris (S 103), die einen eindeutigen LAP-Anstieg erkennen ließen. Bei diesen Fällen liegt auf Grund des klinischen Befundes — z. B. granulomatöse Infiltration der Leber bei Lymphogranulomatose — eine Leberzellschädigung im Bereich des Möglichen.

Alle anderen Seren, z. B. von Infarkt- und Tumor-Patienten — auch bei vorhandenen Lebermetastasen —, insbesondere aber von allen 19 untersuchten Patienten mit Verschlussikterus benigner und maligner Genese sowie von 11 untersuchten Fällen mit Cholelithiasis, 7 Patienten mit Leberzirrhose, 13 Patienten mit Leberstauungen und Leberverfettung sowie 10 Patienten mit akuter und chronischer Pankreatitis, zeigten keinen LAP-Anstieg entsprechend den oben formulierten Kriterien. Die in diesen Seren zum Teil erhöhte Leucinamidhydrolyse kann bedingt sein durch:

- a) Arylamidase (Tab. 2, 8 u. 9),
- b) nicht näher charakterisierte Aminopeptidasen,
- c) Arylamidase plus kleinere Mengen LAP.

a) dürfte vor allem dann gegeben sein, wenn eine eindeutige  $MnCl_2$ -Hemmung vorliegt und c) dann, wenn eine geringe Hemmung, keine Wirkung oder eine geringe Aktivierung durch  $MnCl_2$  erreicht wird, bedingt durch das jeweilige Arylamidase-LAP-Verhältnis. Von differentialdiagnostischer Bedeutung dürften zur Zeit jedoch nur jene Ergebnisse sein, die in eindeutiger Weise auf eine LAP- oder eine Arylamidaseerhöhung schließen lassen.

Die *Arylamidase-bedingte Leucin-p-nitroanilidhydrolyse* war in 84% der Fälle von *Verschlussikterus* erhöht, teilweise bis zum 2 bis 3fachen. Normale Werte fanden sich bei Verschlussikterus infolge narbiger Stenosierung des Ductus choledochus (S 160), bei inkomplettem Verschlussikterus infolge Choledocholithiasis (S 218) und bei einem Verschlussikterus unklarer Genese (Gallengangskarzinom?) (S 231). Bei Hepatitis, akuter Pankreatitis, Pankreaskarzinom sowie Tumoren mit Lebermetastasen wurde eine unterschiedlich starke Erhöhung in einem Teil der Fälle gefunden. Außerdem zeigte sich ein Anstieg der Arylamidase bei je einem Fall von Leberzirrhose, Leberparenchymschaden, Cholangitis, myeloischer Leukämie und frischer Apoplexie. Zwei Fälle von Pankreaskarzinom hatten normale Arylamidasewerte. Bei beiden bestand zur Zeit der Untersuchung kein Verschlussikterus. Bei einem Patienten (S 94) war der Ikterus nach einer Cholezystojejunostomie abgeklungen, bei dem zweiten (S 187) hatte das Pankreaskarzinom (histologisch gesichert!) nicht zu einer Stenosierung der Gallenwege geführt.

Bei einigen Patienten gab die *vergleichende Bestimmung* der LAP und Arylamidase wertvolle Hinweise zur *Differentialdiagnose*.

a) Im Blutserum einer Patientin (S 233) mit der klinischen Diagnose Verschlussikterus war eine eindeutige Erhöhung der LAP-Aktivität erkennbar, während die Arylamidase normale Werte zeigte. Die auf Grund des biochemischen Befundes gestellte Diagnose einer Hepatitis erfuhr ihre Bestätigung dadurch, daß bei der vorgenommenen Operation keine Ursache für einen Verschlussikterus nachgewiesen werden konnte und in der gleichen Zeit auch ein Kind der Patientin an Hepatitis erkrankte.

b) In einem anderen Fall (S 230) war nach Auftreten von Schmerzen im Oberbauch mit Erbrechen und einem leichten Ikterus die Klinikaufnahme wegen Verdachtes auf Hepatitis erfolgt. Der Ikterus war nach kurzer Zeit wieder abgeklungen. Trotz eines Anstiegs der Transaminasen wurde wegen der nachgewiesenen Erhöhung der alkalischen Phosphatase im Blutserum eine Gallenwegserkrankung vermutet. Diese Vermutung schien zunächst durch ein negatives Cholezystogramm bestätigt. Wegen Verdachtes auf Cholezystitis bei Zystikverschluss und passagerem Choledochusverschluss war eine Operation vorgesehen. Eine Kontrolle des Cholezystogramms ergab jedoch eine völlig normale Darstellung des Gallenwegssystems. Die im Anfang der Erkrankung nachgewiesene LAP-Erhöhung konnte retrospektiv als deutlicher Hinweis auf eine subikterisch verlaufende Hepatitis angesehen werden.

c) Bei einer weiteren Patientin (S 154) mit der klinischen Diagnose Hepatitis war der Ikterus nach starken Schmerzen im Oberbauch aufgetreten, die sich auch im weiteren Verlauf der Erkrankung wiederholten. Die Transaminasen waren nur gering erhöht. Eine spätere Röntgenuntersuchung ergab eine kinderfaustgroße wandverdickte steinverdächtige Gallenblase, so daß der Patientin die Cholezystektomie angeraten wurde. Der starke Anstieg der Arylamidase bei fehlender Erhöhung der LAP und der klinische Verlauf legten nahe, daß es sich bei der Patientin um einen partiellen Verschlussikterus auf dem Boden einer Cholelithiasis handelte.

## 6. Untersuchungen zur Differenzierung der bei Erkrankungen erhöhten Serum-Aminopeptidaseaktivitäten

### *Identifizierung der bei akuter Hepatitis erhöhten Serum-Aminopeptidase mit der LAP*

Mit Anti-Rinderlinsen-LAP-Serum vom Kaninchen konnte die Manganchlorid-aktivierbare hydrolytische Aktivität von Hepatitisserum gegenüber Leucinamid vollständig durch Präzipitation des Enzymproteins gehemmt werden. Das Serum (S 281) wurde wegen seiner hohen Aktivität (20000 mE/m<sup>l</sup>) in einer Verdünnung von 1:29 eingesetzt und zeigte ohne Zugabe von Anti-Serum eine Hydrolyse des Substrates von 14% in 30 Min. Nach Zugabe von Anti-Serum in einer Verdünnung von 1:20 und 1:40 war unter gleichen Bedingungen eine Hydrolyse des Substrates nicht mehr meßbar (Abb. 9).

### Abgrenzung der bei Verschlußikterus erhöhten Serum-Amino-peptidase von der „klassischen“ LAP

Die Leucinamidhydrolyse (bei pH 8,0 ohne  $MnCl_2$ ) durch Verschlußikterusserum (S 304) wurde mit Anti-Rinderaugenlinsen-LAP-Serum im Verdünnungsbereich von 1:1280 bis 1:40 nicht beeinflusst (Abb. 9). Die maximale Abnahme der Aktivität von 6% (= 0,8% Hydrolyse) liegt im Bereich des methodischen Fehlers. Die Aktivität des Serums gegenüber Leucinamid wurde durch Manganchlorid gehemmt. Den gleichen inhibierenden Effekt zeigte Manganchlorid auch bei den übrigen Verschlußikterusseren. Die Leucinamidhydrolyse mit Verschlußikterusserum ist somit nicht auf die LAP, sondern auf die Arylamidase bzw. andere Amino-peptidasen zurückzuführen.

### Nachweis einer signifikanten Korrelation zwischen der Hydrolyse von Leucin-*p*-nitroanilid und Leucinamid bei pH 8,0 mit Normal- und Verschlußikterusserum

Zwischen der Hydrolyserate von Leucin-*p*-nitroanilid und Leucinamid mit Serum von Normalpersonen und Patienten mit benignem und malignem Verschlußikterus wurde eine statistisch signifikante Korrelation nachgewiesen (Abb. 11). Der Korrelationskoeffizient  $r$

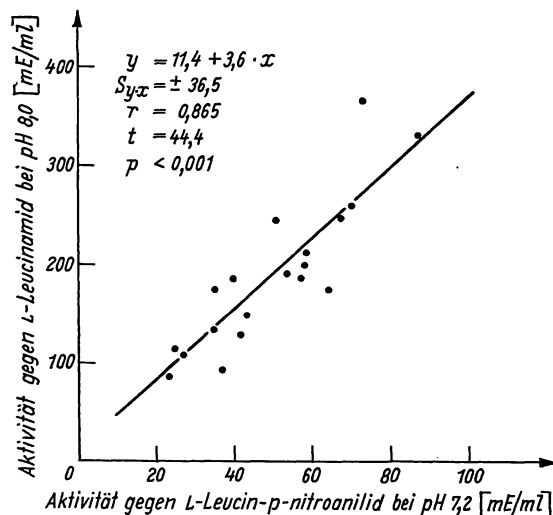


Abb. 11

Graphische Darstellung der Korrelation der Hydrolyse von L-Leucin-*p*-nitroanilid (bei pH 7,2) und L-Leucinamid (bei pH 8,0) durch Serum von Patienten mit Verschlußikterus

betrug bei Normalpersonen +0,529, bei Patienten mit Verschlußikterus +0,865. Der t-Test ergab in beiden Gruppen eine signifikante Korrelation mit einem  $p < 0,001$ . Diese Befunde legen nahe, daß Leucinamid (bei pH 8,0) und Leucin-*p*-nitroanilid entweder durch die gleiche Amino-peptidase, d. h. durch die Arylamidase, hydrolysiert werden, oder daß zwei Enzyme — die Arylamidase und eine nicht näher charakterisierte Amino-peptidase — bei Verschlußikterus im gleichen Verhältnis freigesetzt werden und in das Blutserum gelangen.

### Diskussion

In zahlreichen Untersuchungen ist gezeigt worden, daß die Bestimmung von Amino-peptidasen im Serum einen

beträchtlichen diagnostischen Wert haben kann. Hierbei sind allerdings durch die Anwendung verschiedener Substrate und Inkubationsbedingungen Unsicherheiten bei der Deutung der Ergebnisse entstanden. Diese Unsicherheiten werden auch dadurch erhöht, daß zu den Amino-peptidasen eine größere Anzahl von Enzym-individuen mit einem zum Teil sehr breiten und sich gegenseitig überlagernden Substratspektrum gehören (5, 31, 33, 34, 70). Von den verschiedenen Amino-peptidasen sind bisher die „klassische“ LAP (7, 10, 70) und die Arylamidase(n) (42—44, 71, 72) am besten untersucht und charakterisiert. Nach diesen Untersuchungen ist die LAP ein phylogenetisch altes (12), im tierischen Organismus weit verbreitet vorkommendes, zytoplasmatisch lokalisiertes Enzym vom Molekulargewicht 326000 (73), das mit 0,05M L-Leucinamid bei pH 8,9 bis 9,1 unter  $MnCl_2$ -Aktivierung in spezifischer Weise erfaßt werden kann. Das LAP-spezifische Gen ist in der Phylogenie offenbar nur langsam mutiert worden — gegen Rinder-LAP gerichtete Kaninchen-Antikörper präzipitieren auch die LAP zahlreicher anderer Species einschließlich der von Mensch und Frosch (12, 58). Nach den bisherigen Untersuchungen scheinen in der Rinderaugenlinse (12) keine LAP-Isoenzyme vorzuliegen. Aus immunologischen Versuchen ist zu schließen, daß auch beim Menschen immunologisch voneinander unterscheidbare LAP-Isoenzyme nicht vorhanden sind (12, 58).

Die LAP läßt sich eindeutig von Arylamidase(n) nicht nur hinsichtlich der zellulären Lokalisation, des Substratspektrums und physiko-chemisch, sondern auch immunologisch abgrenzen. LAP und Arylamidase zeigen keine immunologische Verwandtschaft (70). Die Arylamidase(n) sind früher in Mikrosomen oder Mitochondrienfraktionen nachgewiesen worden, da Lysosomen nicht abgetrennt wurden. In einer neueren Arbeit (71) wurden sie in Lysosomen lokalisiert. Außerdem wurden sie in Membranen aufsitzenden Partikeln (74) gefunden. Von verschiedenen Autoren wurde die Arylamidaseaktivität in Isoenzyme aufgetrennt (42 bis 44, 59—68).

Besonders die Befunde von (74), die zeigen konnten, daß die Arylamidase in der Leber in besonderen, der Leberzellmembran knopfartig aufsitzenden Partikeln, die in die Gallengänge hineinragen, angereichert ist, lassen verstehen, warum eine Erhöhung dieses Enzyms im Serum vor allem bei Cholestasen beobachtet wird. Demgegenüber hat sich in unseren Untersuchungen gezeigt, daß die cytoplasmatisch lokalisierte LAP in sehr spezifischer Weise in frühen Stadien der Hepatitis epidemica im Serum auftritt, während sie in keinem einzigen Fall von Verschlußikterus beobachtet werden konnte. Damit erweist sich das Verhalten der im Serum nachweisbaren LAP als besonders nützlich für die Differentialdiagnose des Ikterus. Von Vorteil ist, daß die LAP im Normalserum nicht oder nur in nicht nachweisbaren Mengen (Hemmung durch Manganchlorid bei pH 9,0) vorhanden ist. Dadurch ergeben sich in pathologischen Fällen bis zu 600fache Steigerungen der

unter LAP-Optimalbedingungen gemessenen Leucinamidspaltung, bei der Arylamidase finden sich nur bis zu 3fache Aktivitätsanstiege.

Bei unseren Untersuchungen gingen wir von der Vorstellung aus, daß die LAP als ein in zahlreichen Organen vorkommendes Enzym bei Erkrankungen, die mit einer Zellmembranschädigung oder einer Zellzerstörung einhergehen, einen Anstieg im Serum zeigen müßte (75, 76, 77). Es ist zunächst nicht ohne weiteres verständlich, warum die LAP in sehr spezifischer Weise fast ausschließlich bei Hepatitis epidemica acuta bzw. bei Leberzellschädigungen im Serum erscheint. Immerhin bleibt nicht ausgeschlossen, daß genauere Verlaufskontrollen bei derartigen Erkrankungen wie Infarkte, Tumoren usw. doch noch kurzfristige LAP-Anstiege aufdecken. Diese Frage bedarf einer weiteren Abklärung von klinischer Seite. Weiterhin sollten eingehendere Verlaufskontrollen der LAP bei Hepatitis epidemica durchgeführt werden. Da wir bereits einen Tag nach dem Auftreten des Ikterus eine bis zu 500fache Erhöhung der LAP-Aktivität bestimmt haben, kann vermutet werden, daß es bereits vor dem Auftreten des Ikterus bei akuter Hepatitis epidemica zu einem LAP-Anstieg im Serum kommt (leider konnten wir Hepatitisfälle zu einem derartig frühen Zeitpunkt nicht erfassen). Unter dieser Voraussetzung dürfte sich der LAP-Nachweis als ein Screening-Test für Hepatitis epidemica eignen.

Für den eindeutigen Nachweis von „klassischer“ LAP im menschlichen Serum halten wir den Befund einer wenigstens 50%igen Aktivierung mit Manganchlorid bei pH 9,0 für ein unerlässliches Kriterium. Der Nachweis des Anstiegs der Leucinamidhydrolyse über die 3 S-Grenze hinaus genügt nicht, da er auch durch die

Arylamidase (vgl. z. B. Tab. 2/8) sowie anderer Amino-peptidasen bedingt sein kann. Durch das Kriterium der 50proz. Aktivierung mit Manganchlorid werden offenbar auch geringfügige LAP-Anstiege, die bei anderen Erkrankungen vorhanden sein können, vgl. z. B. Tab. 2/2, 4, 11, eliminiert.

Die papierchromatographische Auswertung der Leucinamidhydrolyse stößt in verschiedenen Laboratorien auf Schwierigkeiten. In der hier angegebenen und in (57) näher beschriebenen Ausführung stellt sie jedoch eine sehr zuverlässige, wenn auch etwas arbeitsaufwendige Methode dar. Für klinische Laboratorien dürfte daher die Bestimmung der LAP mit Leucinhydrazid (46, 47) von Interesse sein. Hier bleibt allerdings abzuwarten, ob sich dieses Substrat in gleicher Weise als LAP-spezifisch erweist wie Leucinamid.

Wir danken für das bereitgestellte L-Leucin-*p*-nitroanilid

Herrn Dipl.-Chem. Dr. H.-G. MANNSFELDT, Physiologisch-chemisches Institut, Halle (Saale),

für die Überlassung von Untersuchungsmaterial

Herrn Oberarzt Dr. BECKER, Innere Abteilung des Stadt-Krankenhauses Poliklinik Süd, Halle (Saale), (Chefarzt: Obermedizinalrat Dr. SCHULZ),

Herrn Oberarzt Dr. KORMANN, Chirurg. Abteilung des St. Elisabeth-Krankenhauses, Halle (Saale), (Chefarzt: Prof. Dr. CORDES).

Herrn Chefarzt Dr. KÜHNEL, Innere Abteilung des St. Elisabeth-Krankenhauses, Halle (Saale),

Herrn Prof. Dr. KROSCHE, Direktor der I. Medizin. Klinik der Martin-Luther-Universität, Halle (Saale),

Herrn Prof. Dr. SCHÖBER, Direktor der Chirurg. Klinik der Martin-Luther-Universität, Halle (Saale),

Herrn Obermedizinalrat Dr. SCHUBERT, Leiter des Zentralinstituts für Blutspende- und Transfusionswesen, Halle (Saale),

Herrn Dozent Dr. WELLER, Leiter der Inneren Abteilung des Diakonissenkrankenhauses, Halle (Saale).

## Literatur

1. LINDERSTRØM-LANG, K., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 182, 151 (1929). — 2. LINDERSTRØM-LANG, K., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 188, 48 (1930). — 3. SMITH, E. L. und R. L. HILL, Leucine aminopeptidase. In: Boyer-Lardy-Myrbäck: The Enzymes, Vol. IV, p. 37—62. Academic Press New York-London (1960). — 4. HASCHEN, R., Exopeptidasen des menschlichen Serums. Wiss. Z. Univ. Halle, Math.-Nat. XI/1, S. 57—124 (1962). — 5. HANSON, H., Peptidasen (Exopeptidasen). In: Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. B VI/C, S. 1—228. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966). — 6. SPACKMAN, D. H. und E. L. SMITH, J. biol. Chemistry 212, 255 (1955). — 7. SMITH, E. L. und D. H. SPACKMAN, J. biol. Chemistry 212, 271 (1955). — 8. GLÄSSER, D. und H. HANSON, Naturwissenschaften 50, 595 (1963). — 9. GLÄSSER, D. und H. HANSON, Naturwissenschaften 51, 110 (1964). — 10. HANSON, H., D. GLÄSSER und H. KIRSCHKE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 340, 107 (1965). — 11. WALDTSCHMIDT-LEITZ, E. und L. KELLER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 309, 228 (1957). — 12. GLÄSSER, D., Die Augenlinse als biochemisches Untersuchungsobjekt. Habilitationsschrift Halle 1968. — 13. HANSON, H., P. BOHLEY und H.-G. MANNSFELDT, Clin. chim. Acta Amsterdam 8, 555 (1963). — 14. ABDERHALDEN, E. und S. BUADZE, Fermentforschung 10, 455 (1929). — 15. HANSON, H., Fermentforschung 14, 189 (1935). — 16. STEINBRÜCK, P., Fermentforschung 15, 121 (1938). — 17. HEYDE, W., Z. Neurol. 138, 536 (1932). — 18. ABDERHALDEN, R., Fermentforschung 17, 173

(1945). — 19. FLEISHER, G. A., H. R. BUTT und K. A. HUIZENGA, Proc. Mayo Clin. 32, 410 (1957). — 20. FLEISHER, G. A., H. R. BUTT und K. A. HUIZENGA, Ann. N. Y. Acad. Sci. 75, 363 (1958). — 21. GOMORI, G., Proc. Soc. exp. Biol. Med. N. Y. 87, 559 (1954). — 22. GREEN, M. N., K. C. TSOU, R. BRESSLER und A. M. SELIGMAN, Arch. Biochem. Biophysics 57, 458 (1955). — 23. GOLDBERG, J. A. und A. M. RUTENBURG, Cancer 11, 283 (1958). — 24. RUTENBURG, A. M., J. A. GOLDBERG und E. P. PINEDA, N. England J. Med. 259, 469 (1958). — 25. HARKNESS, J., B. W. ROPER, J. A. DURANT und H. MILLER, Brit. med. J. 1787 (1960). — 26. GÖGEL, K. H., W. CREUTZFELDT und J. MURUCAS, Dtsch. med. Wschr. 85, 1757 u. 1808 (1960). — 27. KOWLESSAR, O. D., L. G. HAEFFNER, E. M. RILEY und M. H. SLEISENGER, Amer. J. Med. 31, 231 (1961). — 28. GLENNER, G. G., M. S. BURSTONE und D. B. MEYER, J. nat. Cancer Inst. Wash. 23, 857 (1959). — 29. PATTERSON, E. K., A. KEPPEL und S.-H. HSIAO, J. Histochem. Cytochem. 9, 609 (1961). — 30. PATTERSON, E. K., S.-H. HSIAO und A. KEPPEL, J. biol. Chemistry 238, 3611 (1963). — 31. PATTERSON, E. K., S.-H. HSIAO, A. KEPPEL und S. SOROF, J. biol. Chemistry 240, 710 (1965). — 32. NACHLAS, M. M., T. P. GOLDSTEIN und A. M. SELIGMAN, Arch. Biochem. Biophysics 97, 223 (1962). — 33. BEHAL, F. J., R. D. HAMILTON, C. B. KANAVAGE und E. C. KELLY, Arch. Biochem. Biophysics 100, 308 (1963). — 34. BEHAL, F. J., R. D. HAMILTON, F. B. DAWSON und L. C. TERRELL, Arch. Biochem. Biophysics 108, 207 (1964). — 35. BEHAL, F. J., B. ASSERSON, F. DAWSON und J. HARDMAN, Arch. Biochem. Biophysics 111, 335

- (1965). — 36. SMITH, E. E., J. T. KAUFMAN und A. M. RUTENBURG, *J. biol. Chemistry* 240, 1718 (1965). — 37. NAGEL, W., F. WILLIG und F. H. SCHMIDT, *Klin. Wschr.* 42, 447 (1964). — 38. TUPPY, H., U. WIESBAUER und E. WINTERSBERGER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 329, 278 (1962). — 39. WILLIG, F. und I. GREINER, *Klin. Wschr.* 45, 474 (1967). — 40. BRUNNER, G., J. SOMMER und R. KATTERMANN, *Klin. Wschr.* 46, 541 (1968). — 41. KLAUS, D., *Ärztl. Forschg. Wörishofen* 15, 548 (1961). — 42. HASCHEN, R. J., N. REHFELD und H. GIESECKE, *Naturwissenschaften* 53, 434 (1966). — 43. REHFELD, N., J. E. PETERS, H. GIESECKE, L. BEIER und R. J. HASCHEN, *Acta biol. med. german.* 19, 809 (1967). — 44. REHFELD, N., J. E. PETERS, H. GIESECKE und R. J. HASCHEN, *Acta biol. med. german.* 19, 819 (1967). — 45. FARR, W., N. REHFELD, D. REICHELDT und R. J. HASCHEN, *Z. med. Labor-techn.* 9, 78 (1968). — 46. WERGIN, A., *Naturwissenschaften* 52, 34 (1965). — 47. HASCHEN, R. J., W. FARR und D. REICHELDT, *diese Z.* 6, 11 (1968). — 48. RUTENBERG, A. M., B. M. BANKS, E. P. PINEDA und J. A. GOLDBARG, *Ann. Int. Med.* 61, 50 (1964). — 49. HAMMOND, J. B., B. D. ROSENAK und EC KHOO, *Amer. J. Digest. Diss.* 5, 233 (1960). — 50. O'CONNELL, W. und R. J. WINZLER, *Cancer Res.* 23, 78 (1963). — 51. FLEISHER, G. A., M. PANKOW und C. WARMKA, *Clin. chim. Acta Amsterdam* 9, 259 (1964). — 52. NAKAGAWA, S. und H. TSUJI, *Clin. chim. Acta Amsterdam* 13, 155 (1966). — 53. FITTKAU, S., D. GLÄSSER und H. HANSON, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 322, 101 (1961). — 54. HANSON, H. und M. WENZEL, *Naturwissenschaften* 39, 403 (1952). — 55. HASCHEN, R. J., *Clin. chim. Acta Amsterdam* 1, 242 (1956). — 56. BOHLEY, P., *Naturwissenschaften* 49, 326 (1962). — 57. ANSORGE, S. und P. BOHLEY, *Pharmazie Berlin* 22, 574 (1967). — 58. JOHN, M., *Immunologische Untersuchungen mit der kristallisierten Leucinaminopeptidase aus Rinderaugen-* linsen. *Diss. Med. Fak. Halle* 1968. — 59. KOWLESSAR, O. D., L. J. HAEFFNER und M. H. SLEISENGER, *J. clin. Invest.* 39, 671 (1960). — 60. DUBBS, C. A., C. VIVONIA und J. M. HILBURN, *Nature (London)* 191, 1203 (1961). — 61. SCHOBEL, B. und F. WEWALKA, *Klin. Wschr.* 40, 1048 (1962). — 62. BEHAL, F. J., C. B. KANAVAGE und R. D. HAMILTON, *Proc. Soc. exper. Biol. (N. Y.)* 109, 411 (1962). — 63. BEHAL, F. J., R. D. HAMILTON, F. B. DAWSON und L. C. TERRELL, *Arch. Biochem. Biophysics* 108, 207 (1964). — 64. SCHOBEL, B., N. STEFANELLI, F. WEWALKA und J. H. HOLZNER, *Klin. Wschr.* 42, 628 (1964). — 65. PATTERSON, E. K., S.-H. HSIAO, A. KEPPL und S. SOROF, *J. biol. Chemistry* 240, 710 (1965). — 66. RYBÁK, M., V. MANSFELD, M. PETÁKOVÁ und E. SIMONIANOVÁ, *Physiol. Bohemoslov.* 15, 276 (1966). — 67. KLEINER, H. und E. SCHRAM, *Clin. chim. Acta Amsterdam* 14, 377 (1966). — 68. ARTURSON, G., L. BECKMAN und B. H. PERSSON, *Nature (London)* 214, 1252 (1967). — 69. CHAMBERS, R. W. und F. H. CARPENTER, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 1522 (1955). — 70. HANSON, H., D. GLÄSSER, M. LUDEWIG, H.-G. MANNSFELDT, M. JOHN und H. NESVADBA, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 348, 689 (1967). — 71. MAHADEVAN, S. und A. L. TAPPEL, *J. biol. Chemistry* 242, 2369 (1967). — 72. PFLEIDERER, G. und P. G. CELLIERS, *Biochem. Z.* 339, 186 (1963). — 73. KRETSCHMER, K. und H. HANSON, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 340, 126 (1965). — 74. EMMELDT, P., A. VISSER und E. L. BENEDETTI, *Biochim. biophysica Acta Amsterdam* 150, 364 (1968). — 75. BLECH, W., H. HANSON, P. HERMANN und R. KLEINE, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 337, 196 (1964). — 76. BOHLEY, P., R. KLEINE, M. FROHNE, H. KIRSCHKE, J. LANGNER und H. HANSON, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 344, 55 (1966). — 77. BLECH, W., *Enzymol. biol. clin.* 8, 176 (1967).

Dr. M. Iwig  
 Dr. D. Glässer  
 Prof. Dr. H. Hanson  
 Physiologisch-chemisches Institut der  
 Universität  
 X 402 Halle (Saale), DDR  
 Hollystraße 1