

- und C. J. WATSON, J. Lab. Clin. Med. 63, 597 (1964). — 10. HOERBURGER, W., Inaugural Dissertation, Erlangen (1933). — 11. FINK, H. und W. HOERBURGER, Naturwiss. 18, 292 (1934). — 12. WATSON, C. J., J. Clin. Invest. 15, 327 (1937). — 13. ZEILE, K. und B. RAU, Z. physiol. Chem. 250, 197 (1937). — 14. DOBRINER, K. und C. P. RHOADS, Physiol. Rev. 20, 416 (1940). — 15. SCHWARTZ, S., V. HAWKINSON, S. COHEN und C. J. WATSON, J. Biol. Chem. 168, 133 (1947). — 16. WATSON, C. J. und L. A. LARSON, Physiol. Rev. 27, 478 (1947). — 17. NEVE, R. A. und R. A. ALDRICH, Pediatrics 15, 553 (1955). — 18. GROTEPASS, W., Z. Physiol. Chem. 253, 276 (1938). — 19. WATSON, C. J., J. Clin. Invest. 14, 106 (1935). — 20. DOBRINER, K., J. Biol. Chem. 113, 1 (1936). — 21. VIGLIANI, E. C. und H. LIBOWITZKY, Klin. Wschr. 16, 1243 (1937). — 22. NESBITT, S. und A. M. SNELL, Arch. Int. Med. 69, 573 (1942). — 23. WATSON, C. J., D. SUTHERLAND und V. HAWKINSON, J. Lab. Clin. Med. 37, 8 (1951). — 24. KEHL, R., Z. klin. Med. 156, 405 (1960). — 25. SUTHERLAND, D. und C. J. WATSON, J. Lab. Clin. Med. 37, 29 (1951). — 26. ASKEVOLD, R., Scand. J. Clin. u. Lab. Invest. 3, 318 (1951). — 27. SAILLET, N. K., Rev. de Med. 16, 542 (1896). (zit. von WATSON, Pimenta de Mello, Schwartz, Hawkinson and Bossenmaier 1951). — 27a. WATSON, C. J., R. PIMENTA DE MELLO, S. SCHWARTZ, V. HAWKINSON und I. BOSSENMEIER, J. Lab. Clin. Med. 37, 831 (1951). — 28. SCHWARTZ, S. und H. M. WIKOFF, J. Biol. Chem. 194, 563 (1952). — 29. HEILMEYER, L., R. CLOTTEN und L. HEILMEYER, Bluthämsynthese Gg. Thieme, Stuttgart (1964). — 30. RIMINGTON, C. und S. L. SVEINSSON, Scand. J. Clin. u. Lab. Invest. 2, 209 (1950). — 31. WITH, T. K., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 7, 193 (1955). — 32. ERIKSEN, L., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 10, 319 (1958). — 33. SCHWARTZ, S., M. GLICKMAN, R. HUNTER und J. WALLACE, Studies of Porphyrin Metabolism III. The Relation of Erythropoiesis to the Excretion of Coproporphyrin by Dogs and Rabbits and to the Concentration of Coproporphyrin and Protoporphyrin in Rabbit Erythrocytes in Zirkle R. E., editor: Biologic effects of External x- and -Radiation, part 2 (August 1956), Atomic Energy Commission, p. 187.

Doz. Dr. R. Clotten  
78 Freiburg/Brg.  
Hugstetter Str. 55

## Urin-Arylamidase

Von W. JÖSCH und U. C. DUBACH<sup>1)</sup>

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Basel (Direktor: Prof. Dr. O. Gsell)

(Eingegangen am 7. März 1966)

Die Urin-Arylamidase („Leucinaminopeptidase“, „LAP“) wurde mit dem Substrat L-Leucin-p-nitroanilid spektrophotometrisch bei 405 m $\mu$  bestimmt. — Bei 37 männlichen Erwachsenen im Alter von 20 bis 63 Jahren ergaben sich Grenzwerte von 225—1170 mE im 8-Stdn.-Urin (bzw. 0,6—4,7 mE/ml) bei einem Mittelwert von  $602 \pm 262$  mE ( $2,2 \pm 0,9$  mE/ml). Bei 40 weiblichen Erwachsenen im Alter von 18 bis 33 Jahren fanden sich Grenzwerte von 30—798 mE im 8-Stdn.-Urin (bzw. 0,1—3,6 mE/ml) bei einem Mittelwert von  $337 \pm 238$  mE ( $1,3 \pm 0,84$  mE/ml).

Der Einfluß der zelligen Elemente des Urins auf die Arylamidase-Aktivität wurde geprüft: obwohl nach Zentrifugieren im zellhaltigen Rückstand mit zunehmender Zahl von Leukocyten und Rundepithelien eine steigende Aktivität gefunden wurde, blieb diejenige des Überstandes unverändert. — Aspirin steigerte die Ausscheidung von Epithelien aus dem Tubulusapparat um mehr als das Hundertfache. Die Arylamidase-Aktivität des Urins blieb dabei innerhalb der Normgrenzen.

Urinary arylamidase („leucine aminopeptidase“, „LAP“) was determined spectrophotometrically at 405 m $\mu$  with the substrate L-leucine-p-nitroanilide. For 37 adult males, aged 20 to 63 years, the values varied between 225 and 1170 m $\mu$  per 8 hr. urine (i. e. 0.6—4.7 mU/ml), with an average value of  $602 \pm 262$  m $\mu$  ( $2.2 \pm 0.9$  mU/ml). For 40 adult females, aged 18 to 33 years, the values varied between 30 and 798 m $\mu$  per 8 hr. urine (i. e. 0.1—3.6 mU/ml), with an average value of  $337 \pm 238$  m $\mu$  ( $1.3 \pm 0.84$  mU/ml).

The effect of urinary cellular constituents on the arylamidase activity was tested: although the activity in the cellular material sedimented by centrifugation was increased with increasing numbers of leucocytes and renal tubular cells, the activity of the supernatant remained unchanged. Aspirin increased the excretion of epithelia from the uriniferous tubules by more than a hundred fold, but the arylamidase activity of the urine remained within the normal limits.

Als Arylamidase bezeichnen wir ein Enzym, welches die Arylamide L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid und L-Leucin-p-nitroanilid spaltet. Andere Bezeichnungen sind Leucinaminopeptidase („LAP“), „sogenannte“ Leucinaminopeptidase, Aminosäurepeptidase und Aminosäurearylamidase (1—3). — Arylamidase kann regelmäßig im Urin nachgewiesen werden. Den größten Teil dieser normalen Ausscheidung soll das bei der physiologischen Mauserung der Tubulusepithelien aus den Zellen freigesetzte Enzym darstellen (4). Neuere Untersuchungen über eine klinische Bedeutung der Arylamidase-Bestimmung im Urin richten sich vor allem auf die Möglichkeit, akute Schädigungen der proximalen Tubuli anhand erhöhter Werte zu erfassen (5—10). Weitgehend

ungeklärt sind jedoch noch Fragen der Abhängigkeit der Enzymaktivität von zelligem Sediment, Proteinurie, pH des Urins, Diuresezustand und möglichen weiteren Faktoren.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Methodik der Arylamidase-Bestimmung im Urin und gibt die mit einer kommerziell erhältlichen Test-Kombination bestimmten Normalwerte an. Daneben wird der Einfluß der zellulären Elemente des Urinsediments einschließlich medikamentös herbeigeführter Steigerung der Ausscheidung von Epithelien der Nierenkanälchen auf die Arylamidase-Aktivität des Urins untersucht.

### Methodik

#### Nachweis der Arylamidase

Bis 1964 wurde die Arylamidase im allgemeinen durch die Spaltung von L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid nachge-

<sup>1)</sup> Diese Arbeit wurde ermöglicht durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung (Beitrag Nr. 3337 und 3540).

wiesen. Eine einfachere Methode mit dem Substrat L-Leucin-p-nitroanilid wurde von TUPPY, WIESBAUER und WINTERSBERGER (11) eingeführt und von NAGEL, WILLIG und SCHMIDT (1) auf ihre Brauchbarkeit für Serum untersucht. Hier wie bei Untersuchungen am Rattenharn (12) fanden sich bei vergleichender Prüfung von L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid und L-Leucin-p-nitroanilid parallele Beziehungen für die enzymatische Spaltung der beiden Substrate. Da bei der Spaltung von L-Leucin-p-nitroanilid in Leucin und in p-Nitroanilin letzteres aufgrund seiner gelben Eigenfarbe spektrophotometrisch direkt erfaßt werden kann, vereinfacht sich die praktische Durchführung der Arylamidase-Bestimmung gegenüber der L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid-Methode wesentlich.

Es wurde die „Biochemica-Test-Kombination Boehringer“<sup>1)</sup> verwendet, welche die Substanzen zur Herstellung der Pufferlösung (0,05M Phosphatpuffer, pH 7,2) und der Substratlösung (0,01M L-Leucin-p-nitroanilid in Methanol) enthält. Bei einem Bestimmungsansatz von 3,0 ml Pufferlösung, 0,1 ml Substratlösung und 0,1 ml der zu untersuchenden Flüssigkeit wurde die Extinktionszunahme nach 30-min. Inkubation im thermostabilen Wasserbad von 25° gegenüber einem mitinkubierten Leerwert mit 0,1 ml H<sub>2</sub>O anstelle der Testflüssigkeit gemessen (Spektrophotometer „Beckman DU“, Wellenlänge 405 m $\mu$ , Schichtdicke 1 cm). Bei serienmäßigen Bestimmungen wurden die einzelnen Proben fortlaufend im Abstand von 2 Min. angesetzt und abgelesen. Alle Proben wurden im Doppel bestimmt.

#### Technik

Nach Zentrifugieren einer Urinportion von etwa 10 ml (10 Min. bei 3000 U./Min. und +4°) wurde der Überstand bis auf 1–2 ml oberhalb des Sediments vorsichtig und ohne Zellmaterial aufzuwirbeln mit einer Pipette abgehoben und anschließend in einem Dialysierschlauch von 20 mm Durchmesser (Fa. Kalle AG, Wiesbaden-Bieberich) während 90 Min. gegen fließendes, entionisiertes Wasser dialysiert. Vor und nach Dialyse wurde der außen mit saugfähigem Papier gut abgetrocknete Schlauch auf 1,0 mg abgewogen. Die Enzymaktivität wurde im kurz rezentrifugierten Dialysat bestimmt. — Beim Vergleich der Enzymaktivität vor und nach Dialyse zeigten von 9 verschiedenen Urinproben 8 nach Dialyse höhere Werte (im Mittel um 15%).

#### Berechnung

Unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten von p-Nitroanilin bei 405 m $\mu$  ( $9,9 \times 10^6$  cm<sup>2</sup>/Mol), des Bestimmungsansatzes mit 0,1 ml enzymhaltiger Flüssigkeit bei einem Gesamtvolumen von 3,2 ml und einer Reaktionszeit von 30 Min. ist die Extinktionsdifferenz  $\Delta E$  ( $E_2 - E_1$ ) mit dem Faktor 108 zu multiplizieren, um die Anzahl mE/ml untersuchter Flüssigkeit zu erhalten (mE gemäß I. U. B.).

Für Urin ist die Dialyse durch Multiplikation mit dem Quotienten

$$Q = \frac{\text{Gewicht nach Dialyse}}{\text{Gewicht vor Dialyse}} \text{ zu berücksichtigen.}$$

Die Gesamtaktivität eines 8-Stdn.-Urins berechnet sich nach folgender Formel:

$$A = \Delta E \cdot 108 \cdot Q \cdot V$$

A = Gesamtaktivität des 8-Stdn.-Urins (mE)

$\Delta E$  = Extinktionsdifferenz  $E_2 - E_1$  nach 30-min. Inkubation

Q = Dialysequotient

V = 8-Stdn.-Urinvolumen (ml).

10-malige Bestimmung derselben Urinprobe ergab bei einem Mittelwert von  $3,7 \pm 0,15$  mE/ml einen Variationskoeffizienten von 4,0%.

<sup>1)</sup> Die Test-Packungen TC-LAP wurden uns von der Fa. C. F. Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

## Ergebnisse

### Normalwerte

Die Bestimmung der Arylamidase-Aktivität bei 77 gesunden Erwachsenen im eiweiß- und zuckerfreien Urin mit normalem Sedimentbefund (Probe auf Eiweiß mit „Albustix“, auf Zucker mit „Tes-Tape“) zeigte für Männer höhere Werte als für Frauen (Abb. 1). Bei

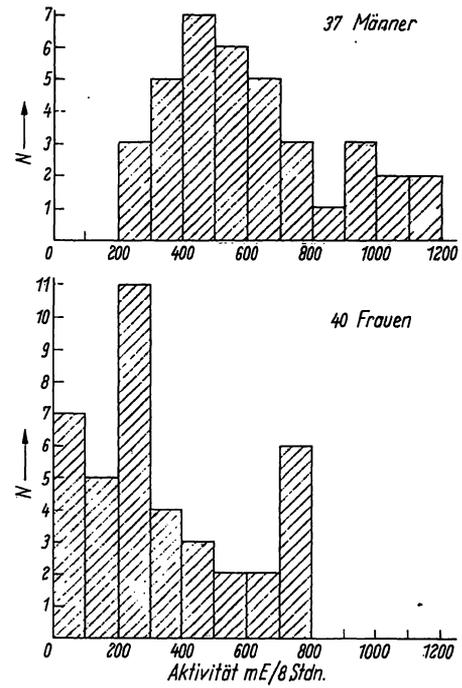


Abb. 1

Normalwerte der Arylamidase-Gesamtaktivität im 8-Stdn.-Nachturin bei 37 gesunden Männern und 40 gesunden Frauen

37 männlichen Erwachsenen im Alter von 20 bis 63 Jahren ergaben sich Grenzwerte von 225–1170 mE im 8-Stdn.-Urin (bzw. 0,6–4,7 mE/ml) bei einem Mittelwert von  $602 \pm 262$  mE ( $2,2 \pm 0,9$  mE/ml). Bei 40 weiblichen Erwachsenen im Alter von 18 bis 33 Jahren fanden sich Grenzwerte von 30–798 mE im 8-Stdn.-Urin (bzw. 0,1–3,6 mE/ml) bei einem Mittelwert von  $337 \pm 238$  mE ( $1,3 \pm 0,84$  mE/ml). Es ergab sich keine Normalverteilung. Eine Beziehung zwischen Arylamidase-Aktivität und dem 8-Stdn.-Urinvolumen konnte nicht gefunden werden. — Die Normalwerte wurden bei durchschnittlicher Diurese (Trinkmenge ohne besondere Vorschrift) bestimmt. Mit Konzentrations- und Verdünnungsversuchen konnte kürzlich eine Abhängigkeit der Enzymurie vom Diuresezustand nachgewiesen werden (19).

### Bedeutung des zelligen Sediments für die Arylamidase-Aktivität im Urin

In den folgenden Untersuchungen wurden jeweils 10 ml Urin während 10 Min. bei 3000 U./Min. und +4° zentrifugiert. Bei den einzelnen Versuchen wurde die Aktivität/ml des bis auf 0,5 ml mit der Pipette vorsichtig abgehobenen Überstandes derjenigen der aufgeschüttelten 0,5 ml sediment- bzw. zellhaltigen Rückstandes gegenübergestellt. Zellzahlen ergaben sich durch Berechnung nach Auszählung in der Spencer-Zählkammer. Die Her-

stellung einer Leukocytensuspension ist andernorts beschrieben (13). Die Erythrocytensuspension wurde folgendermaßen erhalten: Citratblut wurde 3mal mit 0,9-proz. NaCl-Lösg. gewaschen und jeweils nach Zentrifugieren (2000 U./Min., 6 Min.) Überstand, Leukocyten und oberste Erythrocytenschichten gut abgesaugt. 0,5 ml des Erythrocytensediments wurden zu 9,5 ml 0,9-proz. NaCl-Lösg. gegeben.

*Aktivität im Urinsediment*

Verschiedene Patientenurine wurden zentrifugiert und die Arylamidase-Aktivität in Überstand und Rückstand bestimmt. Daneben wurde für die zellreicheren Urine die Aktivität einer entsprechenden nicht zentrifugierten Probe gemessen. Die in Tabelle 1 zusammengestellten Resultate zeigen für die zellreichen Urinproben (Nr. 4—7) gegenüber dem Überstand eine bis mehr als 2,5-fache Aktivität im Rückstand. Auch die für die nicht zentrifugierten Urinproben erhaltenen Werte weisen auf die höhere Aktivität des Sediments hin.

*Zusatz von Leukocyten*

Dialysiertem Überstand eines Normalurins wurden steigende Mengen einer Leukocytensuspension zugesetzt. Nach 4 Stdn. Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurde zentrifugiert und der Arylamidase-Gehalt bestimmt. Während die Aktivität im zellhaltigen Rückstand mit zunehmender Leukocytenkonzentration ganz erheblich anstieg, blieb der Arylamidase-Gehalt des Überstandes auch bei massivem Leukocytenzusatz unverändert (Abb. 2).

*Zusatz von Erythrocyten*

Dialysiertem Überstand eines Normalurins wurden steigende Mengen einer Erythrocytensuspension zugesetzt im Verhältnis Erythrocytensuspension zu Urin von 1:1000 bis 1:20. Nach 4 Stdn. Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurde zentrifugiert und die Enzym-Aktivität bestimmt. Bei praktisch unveränderter Aktivität im Überstand fand sich im Rückstand mit steigender Erythrocytenzahl eine scheinbare Abnahme der Aktivität (Abb. 3). Ähnliche Resultate zeigten Versuche mit Zusatz von Hämolysat zu Urin. Da sich aber bei 405  $\mu$  Absorption von Hämoglobin und p-Nitroanilin überlagern, kann die Methode nicht zur Bestimmung der Arylamidase-Aktivität von Erythrocyten oder Urin mit Beimengung von hämolysiertem Blut verwendet werden.

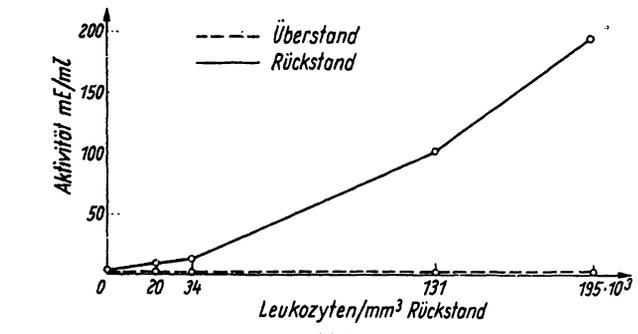


Abb. 2  
Normalurin mit Zusatz von Leukocyten

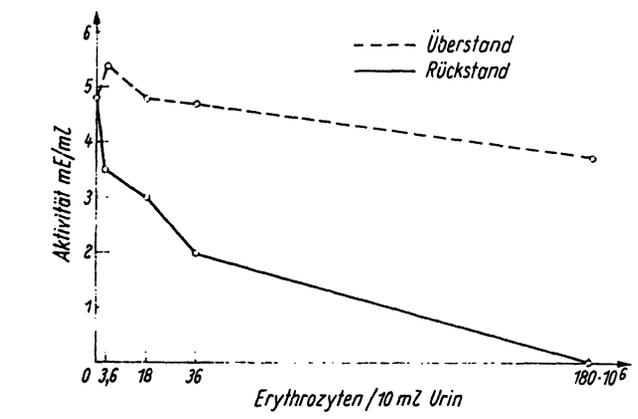


Abb. 3  
Normalurin mit Zusatz von Erythrocyten

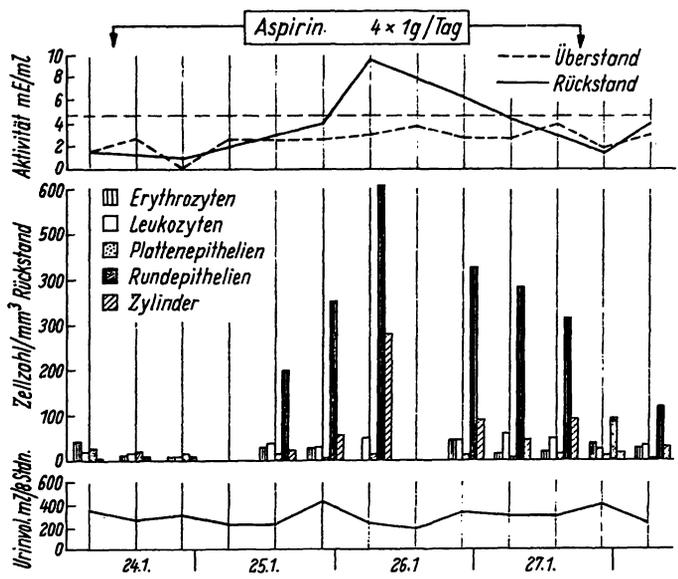


Abb. 4

Aspirinwirkung auf die Ausscheidung von Tubuluszellen bei einem 28-jg. gesunden Mann. Die Arylamidase-Aktivität im Überstand bleibt innerhalb der Normgrenzen, während sie im Rückstand eine Abhängigkeit von der Zahl der Tubuluszellen zeigt

ausgezählt. Aus der zentrifugierten Urinmenge und dem 8-Stdn.-Urinvolumen konnte die zahlenmäßige Ausscheidung der verschiedenen Zellen pro 8 Stdn. berechnet werden. Nach Beginn der Aspirineinnahme war die nach 24—32 Stdn. einsetzende Steigerung der Ausscheidung von Rundzellen besonders augenfällig, quantitativ allerdings nur unvollständig erfassbar, da die Zellen z. T. in Form kleiner Zylinder zusammengeballt waren. Die Zahl der Einzelzellen stieg bis auf ein Hundertfaches an (Abb. 4). Die Auswirkung von Aspi-

rin auf die Ausscheidung von Leukocyten und Erythrocyten war unterschiedlich, nirgends jedoch so auffällig wie für die Rundepithelien. Die Urin-Arylamidase-Aktivität im Überstand zeigte in allen Fällen Schwankungen innerhalb der Normgrenzen. Dagegen fand sich im Rückstand eine deutliche Abhängigkeit der Aktivität von der Zahl der Rundzellen.

#### *Einfluß eines möglichen Zellzerfalls im Urin auf die Enzym-Aktivität*

Von frisch gelösten Patientenurinen mit verschiedenem Zellgehalt wurde jeweils eine Probe sofort zentrifugiert und der Überstand zusammen mit einer zweiten nicht zentrifugierten Probe während 5 Stdn. bei + 37° stehen gelassen. Anschließend wurde nach Zentrifugieren der zweiten Probe in beiden Überständen die Arylamidase-Aktivität bestimmt. In keinem der Fälle fand sich ein Unterschied von mehr als 10% in der Enzym-Aktivität der beiden Proben.

#### Diskussion

Die Normalwerte der Arylamidase-Aktivität im Urin wurden mit einer für Serum und Urin empfohlenen Test-Kombination bestimmt. Der Variationskoeffizient war mit 4,0% annehmbar. Die Tatsache, daß im *dialysierten Urin* eine höhere Arylamidase-Aktivität nachweisbar ist als im undialysierten, läßt vermuten, daß bei der Dialyse ein oder mehrere kleinmolekulare Inhibitoren eliminiert werden, deren Natur unbekannt bleibt. Das Mittel der Gesamtaktivität im 8-Stdn.-Nachturin lag für Männer um rund 80% höher als für Frauen. Ähnliche Verhältnisse fanden GOLDBARG und RUTENBURG (15) sowie GOLISCH (16) im 24-Stdn.-Sammelurin, während BERGMANN (6) für Männer um etwa 40% höhere Werte angibt.

Neben wenigen Untersuchungen anderer Autoren über eine klinische Bedeutung der Arylamidase-Bestimmung im Urin (4, 15—18) sind die in letzter Zeit von BERGMANN (5—10) auf diesem Gebiet veröffentlichten Arbeiten von besonderem Interesse. In der Annahme, daß das im Urin nachweisbare Enzym im wesentlichen den Zellen der proximalen Tubulusepithelien entstammt (4), konzentrieren sich die klinischen und tierexperimentellen Untersuchungen auf die Möglichkeit der Erfassung akuter Schädigungen der proximalen Nierentubuli anhand erhöhter Arylamidasewerte im Urin. Als Mechanismus der Enzymfreisetzung wird dabei eine schon bei geringer Zellläsion auftretende Störung der Membranpermeabilität angesehen.

Bevor eine praktisch-klinische Verwertbarkeit der Arylamidase-Bestimmung im Urin beurteilt werden kann, bedarf es neben der weiteren Abklärung der physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen der Enzymfreisetzung ergänzender Untersuchungen über den Einfluß verschiedenster Faktoren auf die Enzymaktivität des Urins. So konnte z. B. kürzlich eine Abhängigkeit der Enzymurie vom Diuresezustand aufgezeigt werden (19). Die Bedeutung der zelligen Elemente des Urins wird in vorliegender Arbeit ge-

prüft. Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen deuten:

Im *zellhaltigen Rückstand* kann eine höhere Enzymaktivität nachgewiesen werden als im Überstand (Tab. 1). Der

Tab. 1  
Arylamidase-Aktivität in nicht zentrifugiertem Urin, Überstand und Rückstand (s. Text)

Pat.	Sediment		Plattenep. u. Rundep.	Arylamidase-Aktivität nicht zentrifugiert	Arylamidase-Aktivität zentrifugiert	
	Ery.	Leuko.			Überstand	Rückstand
1	(+)				1,9	4,0
2		(+)	+		2,4	2,5
3	+	+	+		4,8	5,0
4	+	++(+)		10,8	10,8	20,4
5		++(+)	+	4,2	4,2	7,0
6		++(+)	++	7,2	6,1	16,0
7	+++	++++!		12,9	11,8	22,0

quantitative Unterschied vergrößert sich mit zunehmender Zellzahl im Rückstand, so daß den Sedimentzellen eine hohe Aktivität zukommen muß. Sicher weisen die *Leukocyten* dieses Enzym auf, wie die mit steigendem Leukocytenzusatz zunehmende Aktivität der Arylamidase im Rückstand zeigt (Abb. 2). Auch *Rundepithelien* enthalten Arylamidase, was aus dem Aktivitätsanstieg im Rückstand mit vermehrter Anzahl solcher Zellen hervorgeht (Abb. 4). Über einen Enzymgehalt von *Erythrocyten* ist keine Aussage möglich, da sich Absorption von Hämoglobin und p-Nitroanilin bei 405 m $\mu$  überlagern. Aus dem gleichen Grunde kann die Arylamidase-Aktivität von bluthaltigem Urin mit der verwendeten Methode nicht bestimmt werden. — Obwohl somit zumindest in Leukocyten und Rundepithelien Arylamidase nachweisbar ist, wird durch die zelligen Elemente des Urins die Aktivität im Überstand normalerweise nicht beeinflusst: die für sofort zentrifugierten Urin erhaltenen Werte unterschieden sich von dem während 5 Stdn. bei 37° aufbewahrten und erst dann zentrifugierten in keinem der untersuchten Fälle um mehr als 10%. Die Feststellung wird ferner unterstützt durch die praktisch unveränderte Aktivität des Überstandes von Urin, der mit massivem Leukocytenzusatz in vitro 4 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen wurde (Abb. 2) und durch die unbeeinflusste Aktivität bei hohem Rundepithelgehalt des Urins in vivo (Abb. 4).

Zu den Untersuchungen über die Arylamidase-Aktivität der Zellen durch Bestimmung der Aktivität im zellhaltigen Rückstand ist zu bemerken, daß die exakte quantitative Bestimmung der intrazellulären Enzymaktivität eine vorherige Zytolyse bedingt. Da hier die Zellen nicht vorbehandelt wurden, dürfte lediglich ein Teil des Zellenzym erfaßt worden sein. Bei Enzymbestimmungen im sedimenthaltigen Rückstand muß ferner in Betracht gezogen werden, daß darin neben den Zellen Makromoleküle vorhanden sind, welche die Enzymaktivität des Rückstandes beeinflussen könnten. Die auf *Aspiringabe* ausgeschiedenen Rundepithelien werden von PRESCOTT (14) als renale Tubuluszellen bezeichnet. Da einerseits in der menschlichen Niere die Arylamidase nur in den proximalen Tubuli histochemisch nachgewiesen werden kann (20), andererseits mit zunehmendem Gehalt des Sediments an Rundzellen dessen

Arylamidase-Gehalt deutlich ansteigt, darf angenommen werden, daß zumindest ein beträchtlicher Teil dieser Zellen den proximalen Tubuli entstammt. Bei Annahme der physiologischen Mauserung der Tubulusepithelien als Hauptquelle der normalen Arylamidase-Ausscheidung im Urin (4) sollte bei Steigerung der Zellabschilferung um ein mehr als Hundertfaches eine entsprechende Zu-

nahme der Aktivität des Überstandes eintreten. Eine solche konnte jedoch nicht festgestellt werden: die Werte blieben innerhalb der Normgrenzen (Abb. 4). Demnach scheint die Urin-Arylamidase zumindest für eine durch Aspirin erheblich gesteigerte Abschilferung von Tubulusepithelien nicht das erhoffte empfindliche Maß darzustellen.

### Literatur

1. NAGEL, E., F. WILLIG und F. H. SCHMIDT, *Klin. Wschr.* 42, 447 (1964). — 2. PATTERSON, E. K., A. KEPPEL und SHU-HSI HSIAO, *J. Histochem. Cytochem. (Baltimore)* 9, 608 (1961). — 3. PATTERSON, E. K., SHU-HSI HSIAO und A. KEPPEL, *J. biol. Chemistry* 238, 3611 (1963). — 4. KLAUS, D., *Aerzt. Forschg., Wörishofen* 15, 548 (1961); 16, 9 und 18 (1962). — 5. BERGMANN, H., *Arch. klin. exp. Derm.* 219, 500 (1964). — 6. BERGMANN, H., *Habilitationsschr. Göttingen* (1965). — 7. BERGMANN, H. und G. F. KLOSTERMANN, *Arch. klin. exp. Derm.* 218, 603 (1964). — 8. BERGMANN, H. und F. SCHELER, *Klin. Wschr.* 42, 275 (1964). — 9. BERGMANN, H. und F. TRUSS, *Med. Welt.* 34, 1760 (1964). — 10. BERGMANN, H., S. ESTRICH, F. SCHELER und M. SCHMIDT, *Aerzt. Labort.* 9, 255

(1963). — 11. TUPPY, H., U. WIESBAUER und E. WINTERSBERGER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 329, 279 (1962). — 12. RAAB, W., *diese Z.* 4, 56 (1966). — 13. DUBACH, U. C., *Helvet. med. acta* 33, 139 (1966). — 14. PRESCOTT, L. F., *Lancet* II, 91 (1965). — 15. GOLDBARG, J. A. und A. M. RUTENBURG, *Cancer, N. Y.* 11, 283 (1958). — 16. GOLISCH, G., *Klin. Wschr.* 38, 968 (1960). — 17. RUTENBERG, A. M., J. A. GOLDBARG und E. P. PINEDA, *N. England J. Med.* 259, 469 (1958). — 18. SZASZ, G., P. BARANYAI, Z. CZIRBESZ und P. CSAKI, *Klin. Wschr.* 43, 783 (1965). — 19. JÖSCH, W. und U. C. DUBACH (in Vorbereitung). — 20. NACHLAS, M. M., B. MONIS, D. ROSENBLATT und A. M. SELIGMAN, *J. biophysic. biochem. Cytol.* 7, 261 (1960).

Priv.-Doz. Dr. U. C. Dubach  
CH 4056 Basel, Hebelstr. 1

## Die Bilirubinbestimmung nach FERRO und HAM im Serum

Von E. GLADTKE

*Aus der Kinderklinik der Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr. F. H. Dost)*

(Eingegangen am 25. März 1966)

Die Bestimmung des Bilirubins nach FERRO und HAM, die auf einer Oxydation des Bilirubins im sauren Milieu zu einem blauen Farbstoff mit Hilfe von Ferrichlorid beruht, kann wegen unterschiedlicher Adsorption des Farbstoffes an den Eiweißniederschlag sowohl bei verschiedenen Serumeiweißkonzentrationen als auch bei verschiedenen Bilirubinkonzentrationen *nicht* empfohlen werden.

The determination of bilirubin according to FERRO and HAM, which depends upon an oxidation of bilirubin with ferric chloride in acid medium to give a blue colour, *cannot* be recommended: there is an adsorption of the coloured material onto the protein precipitate, which varies both with the concentration of serum protein and with the concentration of bilirubin.

In der Pädiatrie besteht vor allem seit Kenntnis der kausalen Zusammenhänge zwischen Bilirubinkonzentration und Kernikterus und der Möglichkeit der Verhütung des Letzteren ein großes Interesse an der Bestimmung des Bilirubins im Serum. Insbesondere jede Möglichkeit zur Vereinfachung der Analyse ist von Nutzen. Wir haben deshalb die von FERRO und HAM (1) empfohlene Methode zur Bestimmung des sog. gesamten Bilirubins kritisch untersucht, da sie den Vorteil hat, mit einem stabilen Misch-Reagenz, also mit zwei Pipettierungen (Serum bzw. Standard- oder Leerwert und Reagenz) pro Ansatz auszukommen.

### Methodik

Die Methode beruht darauf, daß Bilirubin bei saurer Reaktion in einen blauen Farbstoff übergeht, dessen Konzentration photometrisch bestimmt wird. Die Umsetzung wird durch Ferrichlorid (offenbar katalytisch) beschleunigt.

FERRO und HAM säuern mit Trichloressigsäure an, verwenden Isopropanol zur Extraktion der Farbe aus dem Eiweißniederschlag und bringen mit Äthylenglycolmonomethyläther die Lipide in Lösung. Diese drei Reagenzien werden zusammen mit Ferrichlorid zu einem Reagenz angesetzt (90 g Trichloressigsäure, Isopropanol auf 900 ml, 100 ml Äthylenglycolmonomethyläther und 1 ml einer 7,2-proz. wäbr. Lösung von  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), das im Verhältnis 10 zu 1 (10 Teile Reagenz, 1 Teil Serum) mit Serum vermischt, nach 5 Min. filtriert und nach 30 Min. bei 660 m $\mu$  gemessen wird.

Da uns nur eine relativ geringe Menge Originalreagenz zur Verfügung stand, wir außerdem nur kleine Serum-mengen einzusetzen beabsichtigten, adaptierten wir die Methode zunächst an den Mikrolitermaßstab, in dem wir 20  $\mu\text{l}$  Serum mit 200  $\mu\text{l}$  Reagenz versetzten; wir blieben damit beim vorgeschriebenen Mengenverhältnis. Die Filtration wurde durch Zentrifugation ersetzt. FERRO und HAM empfehlen in einer zweiten Publikation (2) ein ähnliches Vorgehen mit allerdings etwas größeren Men-