

Eine einfache Methode zur Bestimmung der - Aminolävulinsäuredehydrase-Aktivität im Blute und in der Leber

Autor(en): **Grogg, E.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Medicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze Mediche**

Band (Jahr): **16 (1960)**

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-307454>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Eine einfache Methode zur Bestimmung der Δ -Aminolävulinsäuredehydrase-Aktivität im Blute und in der Leber

Von E. Grogg, Basel

Δ -Aminolävulinsäure ist eine Vorstufe des Häms (*Shemin und Russel, 1953*) und der Porphyrine (*Neuberger und Scott, 1953; Dresel und Falk, 1953*); die Δ -Aminolävulinsäure wird durch eine Dehydrase in Porphobilinogen umgewandelt. Gibt man einem Kranken mit akuter Porphyrie Δ -Aminolävulinsäure, so kommt es zu einer gegenüber der Norm stark vermehrten Porphobilinogenausscheidung im Urin (*Scott, 1955*). *Gibson (1955)* zeigte, daß Kaninchen, welche mit Allylisopropylacetamid chronisch vergiftet werden und größere Mengen Porphyrin im Urin ausscheiden, eine erhöhte Δ -Aminolävulinsäuredehydrase-Aktivität in der Leber aufweisen. Im Blute ist die Dehydraseaktivität nicht vermehrt. Daraus folgt eine wichtige Fragestellung für die Porphyriepathogenese: Beruht die akute menschliche Porphyrie oder die experimentelle Porphyrie des Kaninchens auf einer Fermentanomalie, die an ein bestimmtes Organ gebunden ist? Um diesem Problem näher zu treten, braucht es in erster Linie eine einfache Bestimmungsmethode für die Δ -Aminolävulinsäuredehydrase. Methodisch gingen wir von den Arbeiten von *Gibson (1955)* und von *Dresel und Falk (1954)* aus.

a) Bestimmung im Blute

Das Prinzip der Methode besteht darin, daß das Substrat, also Δ -Aminolävulinsäure, mit hämolysierten Erythrocyten bei 38° C über 24 Stunden inkubiert wird. Nach Inkubation wird mit essigsauerm Äther die Gesamtporphyrinmenge ausgeschüttelt, in 10%iger HCl-Lösung gelöst und die rote Fluoreszenz mit einem Hämatoporphyrin-Standard verglichen. Als Substrat benützten wir chemisch reine Δ -Aminolävulinsäure¹. Nach zahlreichen Versuchen ergab sich, daß eine vorgelegte Menge von 100 γ Δ -Aminolävulinsäure genügte, um eine leicht erkennbare Fluoreszenz nach Inkubation und Extraktion zu erzeugen.

¹ Von der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co., AG, Basel, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Aus den Untersuchungen von *Gibson* (1955) geht hervor, daß die Fermentaktivität im Bereiche von pH 6–8 sich gleich bleibt. Wir wählten durch geeignete Puffer ein konstantes pH von 7,4, also Blutbedingungen.

Was die Menge des Blutes anbelangt, so ließ sich mit steigenden Blutmengen eine zunehmende Fluoreszenz nachweisen. Zuverlässige Resultate sind bereits mit 2,5 cm³ Blut vermischt mit 0,5 cm³ Heparin (2500 E) zu erzielen.

Um die Zellbarriere, die zwischen Erythrocytendehydrase und Substrat liegt, zu überwinden, stellten wir nach *Dresel* und *Falk* (1954) Hämolysate her. Die Erythrocyten wurden durch Zentrifugieren vom Plasma getrennt, mit eisgekühlter physiologischer Kochsalzlösung mehrmals gewaschen und schließlich mit Aqua dest. bei 0° C und mechanischem Rühren vollständig zerstört.

Inkubiert wird bei 38° C während 24 Stunden. Durch Extraktion mit essigsaurem Äther und 10%iger Salzsäure haben wir die Gesamtporphyrine des hämolysierten Blutes bestimmt. Laut den Arbeiten von *Shemin* (1955) geht das aus Δ -Aminolävulinsäure gebildete Protoporphobilinogen in Protoporphyrin über. Wir konnten uns daher erlauben, die einfachere Bestimmung der Gesamtporphyrine durchzuführen. Mit 10%iger Salzsäure lassen sich praktisch die gesamten freien Porphyrine aus der inkubierten Lösung extrahieren (*Sümegei* und *Szodoray*, 1944).

b) Bestimmung in der Leber

Im Prinzip wird die Bestimmung mit Leber in ähnlicher Weise durchgeführt wie im Blut. Es wird eine bestimmte Gewichtsmenge (Feuchtwicht) der entbluteten Kaninchenleber im Mörser mit Quarzsand und eisgekühlter Aqua dest. zerrieben. Zu den zerstörten Leberzellen werden Puffer und Δ -Aminolävulinsäure zugegeben. Bei der Extraktion mit essigsaurem Äther begegneten wir einer Schwierigkeit: Beim Ausschütteln bildete sich zuweilen ein zähes Gel (bei Leber- wie Blutextraktion). Mit einem Netzmittel, wie Lissin Geigy (Fettalkohol-äther-sulfat) ließ sich dieses Hindernis überwinden.

c) Kontrollen

Mit steigender Blutmenge muß eine intensiver werdende Fluoreszenz nachweisbar sein. Damit läßt sich die Gleichmäßigkeit der Extraktion kontrollieren. Wird die Inkubation ohne Δ -Aminolävulinsäure durchgeführt, so wird keine Fluoreszenz beobachtet, selbst wenn große Mengen Blut inkubiert werden. Wird das Hämolysat durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt, so wird keine Fluoreszenz vor dem Wood-Licht gesehen. Eine Fermenthemmung durch Dinatrium-äthylendiamintetra-

acetat (Gibson, 1955) haben wir nicht vorgenommen. Wir haben versucht, mit Glutathion die Fermentaktivität zu steigern. Wir konnten keine Zunahme der Fluoreszenz nachweisen.

d) Zusammenfassung des Arbeitsganges für Blut

1. 2,5 cm³ Blut werden mit 0,5 cm³ Heparin (2500 E) in die Spritze aufgesogen.
2. Das heparinisierte Blut wird zentrifugiert, das Plasma abgesaugt.
3. Die Erythrocyten werden zweimal mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Dabei soll nach dem Zentrifugieren jeweils die überstehende Flüssigkeit samt Leukocytenschicht abgesaugt werden.
4. Die zweimal gewaschenen Erythrocyten werden auf 0° C gekühlt.
5. Es werden 3 cm³ eisgekühlte Aqua dest. zugegeben und das Gemisch bei 0° C mit Glasstab während 5 Min. gerührt. Anschließend werden noch 0,5 cm³ einer 0,15molaren KH₂PO₄/Na₂HPO₄-Pufferlösung (pH 7,4) zugefügt.
6. 2 cm³ Hämolytat werden in ein Erlenmeyer-Kölbchen verbracht, und 14 cm³ Sörensen-Puffer (pH 7,4) werden zugegeben.
7. Das Gemisch wird mit 100 γ Δ -Aminolävulinsäure bei 38° C während 24 Stunden inkubiert.
8. Nach der Inkubation wird die Extraktion der freien Porphyrine in der Lösung vorgenommen. Es werden 80 cm³ Äther und 4 cm³ Eisessig zugegeben, und die Mischung wird während 4 Min. geschüttelt. Wenn sich während des Schüttelns ein Gel bildet, wird tropfenweise Lissin Geigy zugegeben.
9. Das Ganze wird in Scheidetrichter filtriert. Zur braun gefärbten Ätherlösung werden 2 cm³ 10%ige HCL-Lösung zugefügt; es werden die freien Porphyrine aus der Ätherlösung in die Salzsäurephase ausgeschüttelt und abgetrennt.
10. Vergleich der Fluoreszenz mit bekanntem Hämatorporphyrin-Standard.

e) Zusammenfassung des Arbeitsganges für Leber

1. Entblutete Leberstückchen (Kaninchen) werden mit Quarzsand und 10 cm³ eisgekühlter Aqua dest. durch Mörser zerrieben.
2. Es werden 5 cm³ KH₂PO₄/Na₂HPO₄-Pufferlösung (pH 7,4) und 10 cm³ Sörensen-Puffer (pH 7,4) zugegeben und mit 100 γ Δ -Aminolävulinsäure während 24 Stunden inkubiert.

f) Normalwerte

Der Durchschnittswert aus 20 Blutbestimmungen an Normalkaninchen ist 23 γ pro 1ml Blut; die Schwankungsbreite beträgt 0–90 γ pro 1ml Blut. Im menschlichen Blut von 15 gesunden Versuchspersonen haben wir einen Durchschnittswert von 9 γ pro 1ml Blut gefunden. Schwankungsbreite 0–30 γ pro 1ml Blut.

Der Durchschnittswert von 7 normalen Kaninchenlebern beträgt für 2 g Feuchtgewicht 68 γ Hämatorporphyrin-Standard; Schwankungsbreite 20–100 γ .

Zusammenfassung

In Anlehnung an englische Arbeiten wurde eine einfache Bestimmungsmethode der Δ -Aminolävulinsäuredehydrase im Blut und in der Leber ausgearbeitet.

Résumé

En se basant sur des travaux anglais, l'on a pu mettre au point une méthode simple de détermination de la déshydrase de l'acide Δ -amino-laevulinique dans le sang et dans le foie.

Riassunto

Sulla base di lavori inglesi venne elaborato un semplice metodo di determinazione della deidrogenasi dell'acido Δ -amino-levulinico nel sangue e nel fegato.

Summary

On the basis of English publications, a simple method of determination of Δ -amino-laevulinic acid dehydrase in the blood and in the liver was worked out.

Dresel, E. I. B., and Falk, J. E.: Nature (Lond.) **172**, 1185 (1953); Biochem. J. **56**, 156 (1954). – *Gibson, K. D.:* Ciba Foundation, Symposium on Porphyrin Biosynthesis and Metabolism. Churchill, London 1955, S. 27. – *Neuberger, A., and Scott, J. J.:* Nature (Lond.) **172**, 1093 (1953). – *Shemin, D., and Russell, C. S.:* J. Amer. chem. Soc. **75**, 4873 (1953). – *Shemin, D.:* Ciba Foundation, Symposium on Porphyrin Biosynthesis and Metabolism. Churchill, London 1955, S. 4. – *Sümegei, S., and Szodoray, L.:* Dermatologica (Basel) **90**, 233 (1944).