

Evaluation einer photometrischen Methode zur Bestimmung des Angiotensin-Converting-Enzymes

K. Mayr

Aus dem Zentrallaboratorium des Allgemeinen Krankenhauses Wels (Leiter: Prim. Dr. K. Mayr)

Zusammenfassung:

Eine photometrische Methode zur Messung der Aktivität des Angiotensin-Converting-Enzymes, welche Hippuryl-Glycyl-Glycin als Substrate einsetzt, wird beschrieben. Die Bedingungen der Methode wurden im Abschnitt der Enzymphase und der Indikatorreaktion schrittweise auf ihre Optimierung geprüft, sowie die Abhängigkeit der meßbaren Enzymaktivität von der Zusammensetzung und vom pH-Wert des Inkubationspuffers, von der Substratkonzentration, der Dauer der Inkubation, von der Chloridionenkonzentration und der Art der Proteinfällung. Die Michaelis-Konstante mit einem Wert von $7 \mu\text{mol}/\text{U}$, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit $250 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{l}^{-1}$ liegen günstig, eine Produkthemmung war nicht festzustellen, wohl eine Substrathemmung bei hoher Konzentration.

Die Nachweisreaktion mit Trinitrobenzolsulfonsäure erwies sich als spezifisch und empfindlich, jedoch stark pH-abhängig. Ein langsamer, hydrolytischer Zerfall des Farbkupplers in alkalischem Milieu hat zur Folge, daß die Farbreaktion keinen stabilen Endpunkt erreicht. Die Messung im Absorptionsmaximum bei 420 nm, aber auch bei den Spektrallinien 405 und 436 nm liefert vergleichbare Ergebnisse.

Hinsichtlich des Substratumsatzes und der Meßbedingungen wurde eine Optimierung erreicht. Die einfache Handhabung und gute Reproduzierbarkeit ermöglicht eine breite Anwendung der Methode.

Die Präzision von Tag zu Tag liegt bei 3%, die Richtigkeit wurde in dreifacher Weise geprüft: die Gültigkeit der Nachweisreaktion anhand einer Standard-Verdünnungskurve, die enzymgekoppelte Hauptreaktion mit Hilfe von Serumverdünnungskurven und die Richtigkeit durch Vergleich mit einer anderen Bestimmungsmethode. Die Ergebnisse bestätigten die Zuverlässigkeit der Methode.

Bei der Ermittlung des Referenzbereiches zeigten sich höhere Aktivitäten als mit anderen Methoden; signifikante Alters- und auch Geschlechtsunterschiede bei Jugendlichen und eine deutliche Abnahme der Enzymaktivität im höheren Alter bestehen.

Am Beispiel des Enzymverhaltens bei pulmonalen Erkrankungen werden die bekannten Tatsachen bestätigt, die Prüfung der ACE-Aktivitäten bei Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen soll einen Hinweis darauf liefern, daß bei erhöhten Enzymaktivitäten differentialdiagnostisch auch an das Vorliegen einer Hyperthyreose zu denken ist.

Schlüsselwörter:

Angiotensin-Converting-Enzyme – Bestimmungsmethode mit Hippuryl-Glycyl-Glycin als Substrat – Reaktionsbedingungen – Referenzbereiche – diagnostische Bedeutung

Summary:

A photometric method determination of Angiotensin-Converting-Enzyme in serum for the using Hippuryl-Glycyl-Glycin as a substrate is described.

The conditions of the method are examined step by step, trying to optimize the reaction of the enzyme-phase as well as the colorimetric detection. Thereby investigations of the measurable enzyme activity were made dependent on composition and pH-value of the buffer, on the concentration of the substrate, on the incubation-time and the concentration of chloride ions as well as on the type of deproteinisation. The value of $7 \mu\text{mol}/\text{U}$ of the Michaelis constant as well as the maximum reaction rate $250 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{l}^{-1}$ are convenient. No inhibition of the reaction product was stated, but however a substrate inhibition at high concentrations.

The reaction-detection with trinitrobenzolsulfonic acid proved to be specific and sensitive, but highly dependent on the pH-value. As a consequence of the slow hydrolytical decomposition of the coupling-dye under alkaline conditions the colour reaction does not reach a final point. Measurement at the absorption maximum of 420 nm, but also at the spectral lines 405 and 436 nm yields similar results.

Concerning the turnover of the substrate and the measuring conditions it was possible to reach optimization. Due to its simple handling and the good reproducibility, this method offers a broad field of application.

The day to day precision is about 3%, accuracy was verified in three different ways: the validity of the reaction-detection by means of a standard dilution curve, the enzyme-phase by means of serum dilution curves and the accuracy by comparison with another method. The results confirm the reliability of the method.

The determination of the reference range showed significantly higher enzyme-activities than resulted by other methods. There are considerable differences according to age and sex in the case of young people, and clearly decreasing enzyme activities for old people.

The known facts of enzyme-properties at pulmonary diseases were confirmed; the examination of ACE-activity of patients with diseases of the thyroid could indicate that at increased enzyme-activities considering differential-diagnosis, a hyperthyroidosis could also be possible.

Keywords:

Angiotensin-Converting-Enzyme – determination with Hippuryl-Glycyl-Glycin as a substrate – reaction conditions – reference values – diagnostic significance

Einleitung

Das Angiotensin-Converting Enzyme (E.C. 3.4.15.1) (ACE), eine Dipeptidyl-Carboxypeptidase, ist ein membran gebundenes Glykoprotein, vorwiegend in den Endothelzellen der Lungenkapillaren, in geringem Umfang auch in anderen Organen, speziell im Urogenitaltrakt lokalisiert (1, 2). Unter krankhaften Umständen findet man es vermehrt in granulomatösen Gewebsveränderungen (3, 4). ACE spaltet das endständige Dipeptid Histi-dyl-Leucin vom Angiotensin I ab und bildet dadurch das kreislaufwirksame Oktapeptid Angiotensin II; daneben bewirkt es auch die Degradation von Bradykinin.

Während nach der Entdeckung des ACE durch *Skeggs* et al. (5) im Jahre 1956 sich das Interesse an diesem Enzym in erster Linie seiner Wirkung auf den Kreislauf zuwandte, wurde nach 1975 im Anschluß an Publikationen von *Lieberman* et al. (6, 7) und anderer Forscher: *Studdy* et al. (3), *Rohatgi* (4), *Baur* et al. (8), *Schweisfurth* (9), die Bedeutung der ACE-Bestimmung für die Diagnose der Sarkoidose und anderer granulombildender Prozesse bekannt. Ihr Einsatz zur Verlaufs- und Therapiekontrolle solcher Erkrankungen wurde gefordert. Nach der Entwicklung von ACE-Inhibitoren ergibt sich die Möglichkeit mit Hilfe der ACE-Bestimmung die Wirksamkeit dieser Pharmaka zu überwachen (10).

Das natürliche Substrat (Angiotensin I) hat sich für eine breite Anwendung als nicht geeignet erwiesen. An dessen Stelle traten synthetische Substrate, Tripeptide, deren katalytischer Abbau als Maß für die Enzymaktivität gilt. Photometrische, fluorometrische, chromatographische, sowie radiochemische Bestimmungsmethoden wurden entwickelt.

Im folgenden wird eine von *H. M. Neels, M. E. von Sande* und *S. L. Scharpe* (11) entwickelte Methode beschrieben und auf ihre Grundlagen und Optimierung geprüft.

Referenzbereiche, getrennt nach Alter und Geschlecht, wurden mit Hilfe dieser Methode ermittelt, die diagnostische Relevanz der ACE-Bestimmung wurde am Beispiel des Enzymverhaltens bei Erkrankungen der Lunge und der Schilddrüse geprüft und in Relation zur klinischen Diagnose gestellt.

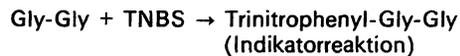
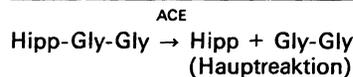
1. Abschnitt: Klinisch-chemische Grundlagen

1.1. Beschreibung der Methode

1.1.1. Reaktionsschema

Die Dipeptidyl-Carboxypeptidase ACE (E.C. 3.4.15.1.) bewirkt, daß das synthetische Substrat, das Tripeptid

Hippuryl-Glycyl-Glycin (Hipp-Gly-Gly, Mol.Gew. 293) katalytisch in Hippursäure und Glycyl-Glycin (Gly-Gly) gespalten wird. Das freigesetzte Dipeptid, welches in stöchiometrischem Verhältnis zur Hippursäure steht, bildet in alkalischem Milieu mit 2-4-6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) das photometrisch meßbare Trinitrophenyl-Gly-Gly. TNBS gilt als spezifisches Reagenz zum Nachweis von Aminen (12).



Eine Einheit (U/l) bedeutet die Freisetzung von $1 \mu\text{mol Hippursäure} \times \text{min}^{-1} \times \text{l}^{-1}$ bei 37°C .

1.1.2. Reagenzien und Lösungen

Gepufferte Substratlösung:
Hepespuffer, pH 8,0 bei 37°C ,
50 mmol/l Hepes*
300 mmol/l NaCl
400 mmol/l Na_2SO_4
61,4 mmol/l Hipp-Gly-Gly.

Borat-Puffer:
100 mmol/l $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ mit NaOH auf pH 9,6 gestellt.

TNBS-Lösung:
60 mmol/l TNBS (Mol.Gew. 329) in 96% Alkohol gelöst.

Proteinfällung nach Folin-Wu (13):
0,33 mol/l H_2SO_4
0,33 mol/l $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Die Reagenzien, die Zusammensetzung der Lösungen, sowie der Berechnungsmodus entsprechen der Testkombination „Angiotensin Converting Enzyme“ von Boehringer Mannheim.

1.1.3. Reaktionsansatz und Berechnung

Routinemäßig erfolgt die Durchführung der Analyse nach dem Schema in Tab. 1.

Die Berechnung erfolgt, basierend auf dem molaren Extinktionskoeffizienten für TNP-Gly-Gly, nach der Formel:

$$\frac{\Delta E}{\epsilon} \times \frac{10^6 \times 1310 \times 1800}{1 \times 30 \times 10 \times 750} = \frac{\Delta E}{\epsilon} \times 1,048 \times 10^7 [\text{U/l}].$$

* Hydroxyacetyl-1-Piperazin-Aethylsulfonsäure.

Dabei stellt 10^6 den Umrechnungsfaktor von mol/l in $\mu\text{mol/l}$ dar, 1310 μl beträgt das Gesamtvolumen des Ansatzes für die Hauptreaktion; 1800 μl das Gesamtvolumen für die Indikatorreaktion; 10 μl entspricht dem Volumen der eingesetzten Serumprobe und 750 μl dem Probenvolumen für die Indikatorreaktion; 30 min beträgt die Inkubationsdauer, 1 cm die Schichtdicke der Meßküvette. ΔE bildet die Differenz zwischen der Extinktion der Probe und des Probenleerwertes, ϵ hängt von der Wellenlänge ab, bei welcher gemessen wird.

Die molaren Extinktionskoeffizienten für TNP-Gly-Gly betragen nach eigenen Messungen

für 420 nm $15650 [\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$
 für 405 nm $13500 [\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$
 für 436 nm $14300 [\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$.

Davon abgeleitet errechnen sich beim angeführten Reaktionsansatz folgende Faktoren:

bei Messung 420 nm $\Delta E \times 670$
 405 nm $\Delta E \times 794$
 436 nm $\Delta E \times 733$.

1.2. Prüfung auf optimale Reaktionsbedingungen

1.2.1. Einfluß des pH-Wertes des Inkubationspuffers

Schon geringe Änderung des pH-Wertes beeinflussen die meßbare Enzymaktivität wesentlich. Die höchste Aktivität findet man bei pH 8,0 und einer Temperatur von 37°C (Abb. 1).

1.2.2. Einfluß der chemischen Zusammensetzung des Inkubationspuffers

Offensichtlich spielt die Zusammensetzung des Puffers eine wesentliche Rolle. Bei Verwendung eines Phosphat- oder Trispuffers von pH 8,0 sinkt die Enzymaktivität empfindlich ab (Tab. 2).

1.2.3. Einfluß der Chlorid-Ionen-Konzentration

Unterschiedliche Chlorid-Ionen-Konzentrationen bewirken offensichtlich durch ihren Einfluß auf die aktiven Zentren des Enzymmoleküls eine Änderung der meßbaren Enzymaktivität. Optimale Reaktionsbedingungen erreicht man bei einer Konzentration von 300 mmol/l Chlorid im Inkubationspuffer (Abb. 2).

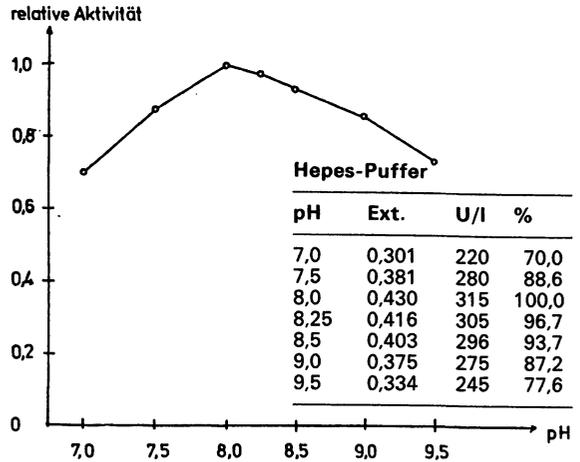


Abb. 1: Einfluß des pH-Wertes des Inkubationspuffers auf die ACE-Aktivität. 1 cm Schichtdicke, 436 nm Mittelwerte aus 3fach-Bestimmungen

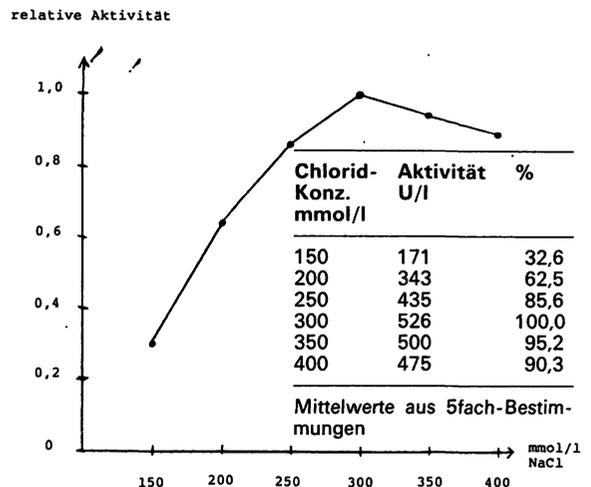


Abb. 2: Einfluß der Chloridionen-Konzentration

Tab. 1: Reaktionsansatz

a) Hauptreaktion:

100 μl gepufferte Substratlösung versetzt man mit
 10 μl Serum, mischt gründlich und inkubiert
 30 min lang im Wasserbad bei 37°C.

Unterbrechung der Enzymphase durch Proteinfällung mit:

100 μl Na-Wolframat-Lösung und
 100 μl 0,33 mol/l Schwefelsäure, Zugabe von
 1000 μl Aqua dest., Mischen und Zentrifugation.

b) Indikatorreaktion:

750 μl des eiweißfreien Überstandes und
 1000 μl Boratpuffer und
 50 μl TNBS-Lösung, inkubiert man 20 min lang im Wasserbad bei 37°C.

Zu jeder Probe führt man einen Probenleerwert mit, bei welchem das Serum erst nach dem Fällungsmittel zugegeben wird.

Messung im Spektralphotometer bei 420 nm, wahlweise bei 405 oder 436 nm.

Berechnung: $(\text{Ext. Probe} - \text{Ext. Leerwert}) \times \text{Faktor} = \text{U/I}$.

Tab. 2: Einfluß der Zusammensetzung des Inkubationspuffers (pH 8,0, 300 mmol/l NaCl, 61,4 mmol/l Hipp-Gly-Gly)

	Probe A	Probe B
Phosphat-Puffer	15	15 U/I
Tris-Puffer	80	96 U/I
Hepes-Puffer	546	312 U/I

Tab. 3: Einfluß der Proteinfällungsmethode

	Probe A	Probe B
Trichloressigsäure 10%	526	275 U/I
Uranylacetat 0,16%	575	124 U/I
Perchlorsäure 0,6 mol/l	668	327 U/I
Folin-Wu 0,33 mol/l	655	311 U/I

1.2.4. Einfluß der Substratkonzentration

Der Inkubationspuffer enthält 61,4 mmol/l Hipp-Gly-Gly, das entspricht einer Konzentration von 55,8 mmol/l im Reaktionsansatz. Unabhängig von der Aktivität einer Serumprobe kommt es bei Verdünnung der Substratkonzentration durch Hepespuffer zu einer Verminderung der meßbaren Aktivität. Bei einer Konzentration von 7 µmol/l Hipp-Gly-Gly je U/l ACE sinkt die gemessene Aktivität auf 50% des ursprünglichen Wertes ab (Abb. 3a).

Die Michaelis-Konstante (K_m) beträgt 7 µmol/l.

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht 250 µmol × min⁻¹ × l⁻¹ (Abb. 3b).

Im Reaktionsansatz ist eine Substratkonzentration vorgelegt, welche Linearität der Reaktion bis 1000 U/l gewährleistet. Erhöht man die Substratkonzentration, kommt es bei Werten oberhalb von 74 mmol/l Hipp-Gly-Gly zu einer signifikanten Abnahme der meßbaren Aktivität (Abb. 4).

1.2.5. Einfluß der Inkubationsdauer

Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 min oder Verkürzung auf 15 min verändert die errechenbare Aktivität nicht. Eine Erweiterung des Meßbereiches bei Serumproben mit geringer oder hoher Enzymaktivität ist durch Veränderung der Inkubationsdauer möglich (Abb. 5).

1.2.6. Einfluß der Proteinfällung

Die Art der Proteinfällung wirkt sich auf die Nachweisreaktion aus. Trichloressigsäure- oder Uranylacetat-Fällung liefern kein optimales Filtrat; Proteinreste, Peptide oder Amine stören die Farbreaktion, hohe Leerwertextinktionen beeinflussen die Messung. Reproduzierbare und verlässliche Ergebnisse liefert die Fällung nach Folin-Wu (13), ähnliche, vergleichbare Ergebnisse erreicht man durch Fällung mit 0,6 mol/l Perchlorsäure (Tab. 3).

1.2.7. Abhängigkeit der Indikatorreaktion vom pH-Wert des Puffers

Nach Unterbrechung der Enzymphase durch Proteinfällung wird durch Einsatz eines Boratpuffers die alkalische Reaktion des Ansatzes wieder hergestellt. Die Farbentwicklung mit TNBS ist stark pH-abhängig und weist ein

Optimum bei pH 9,5 auf. Das bedeutet, daß bei diesem pH-Wert die Differenz zwischen den Extinktionen von Probe und Probenleerwert am größten ist. Mit steigendem pH nimmt die Höhe der Leerwertextinktion rasch zu (Abb. 6).

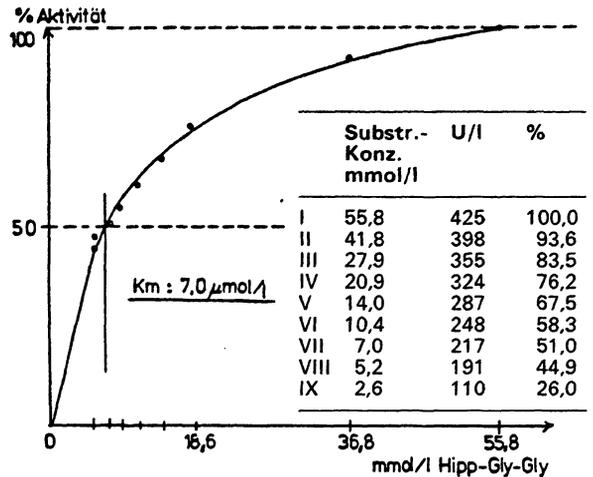


Abb. 3a: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration

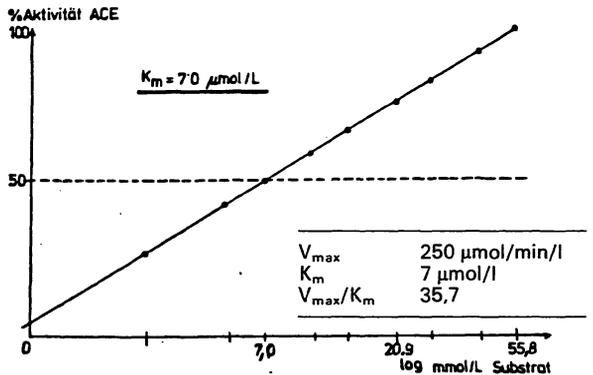


Abb. 3b: Ermittlung der Michaelis-Konstante für Hipp-Gly-Gly

Tab. 4: Vergleich der Aktivitätsbestimmung von 10 Serumproben (U/l) gemessen bei 405, 420 und 436 nm

Wellenlänge	405 nm	420 nm	436 nm
1	576	572	570
2	389	372	376
3	262	245	248
4	226	214	212
5	353	348	352
6	352	345	340
7	455	451	453
8	299	291	292
9	316	300	305
10	208	190	177
Mittelwerte aus 5 Bestimmungen je Serumprobe			
	103,2%	100,0%	99,0%

Tab. 5: Messung der spontanen Hydrolyse der TNBS (Freisetzung von Pikrinsäure) bei pH 9,5

Extinktion einer 0,12 mmol Pikrinsäure-Lösung gemessen in 1 cm Schichtdicke gegen Wasser als Leerwert

Wellenlänge nm	405	420	436
Extinktion	0,760	0,595	0,342
Verhältnis	1,27:	1,00:	0,575

Extinktionszunahme eines Probenleerwertansatzes mit TNBS nach 15 und 30 min bei Raumtemperatur

Zeit	nm	405	420	436
15 min		0,056	0,046	0,027
30 min		0,109	0,087	0,050
Verhältnis		1,25:	1,00:	0,575
$\Delta E/\text{min}$		0,0036	0,0028	0,0018

In jedem Fall zuverlässig

Unser umfangreiches Diagnostik-Programm

Autoantikörper

- **ANA Screening**
mittels HEp-2-Zellen oder Rattenleberschnitten
- **ANA Differenzierung**
mit HEp-2-Zellen, Crithidia luciliae und ENA Test (Sm, RNP, SS-A, SS-B, Scl-70) mittels Immunfluoreszenz, radialer Immundoppel-Diffusion und Enzymimmunoassay
- **ANA/AMA/ASMA und PCA Screening**
mittels Kombinations-Gewebeschnitten (Leber/Niere/Magen)
- **Speziesspezifische Autoantikörper**
für HMA, SKMA, GBM, ATA, AHA-Bestimmung mittels Affengewebeschnitten: Herzmuskel, Skelettmuskel, Niere, Lunge, Speiseröhre, Schilddrüse, Nebenniere, Pankreas...

Daneben verfügen wir über ein umfangreiches Programm zur Diagnostik von **Viren-, Bakterien- und Protozoen-Infektionen.**

Neu in unserem Programm

- **Borrelia burgdorferi**
Immunfluoreszenz-Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern bei Erythema chronicum migrans (Lyme Disease)
- **Herpes simplex 1+2**
Antigen-Nachweis mittels visuell oder photometrisch auswertbarem ELISA
- **Immunkomplexe**
Quantitativer Nachweis mittels ELISA (C1q und C3d)

Wir stellen aus:
Medica 86. 26.-29.11.86
Halle 4, Stand 4 G 05

Bios GmbH
Riesheimer Str. 52, D-8032 Gräfelfing/München
Telefon (089) 8 54 50 63-65, Teletex 8 98 484 = Bios

The logo for Bios GmbH, featuring the word "bios" in a stylized, lowercase, rounded font with a thick outline.

Abb.: ANA positiv gefärbte auf HEp-2-Zellen

Planen Sie Ihren neuen EIA-Meßplatz

Labsystems bietet Ihnen dazu alles, was Sie brauchen:

Diagnostika

Eine große Palette von EIA-Test-Packungen, die sich ständig erweitert. Zusammen mit qualitativ hochwertigen Mikrotiterplatten bzw. Küvettenblöcken.

Folgende Methoden erhalten Sie:

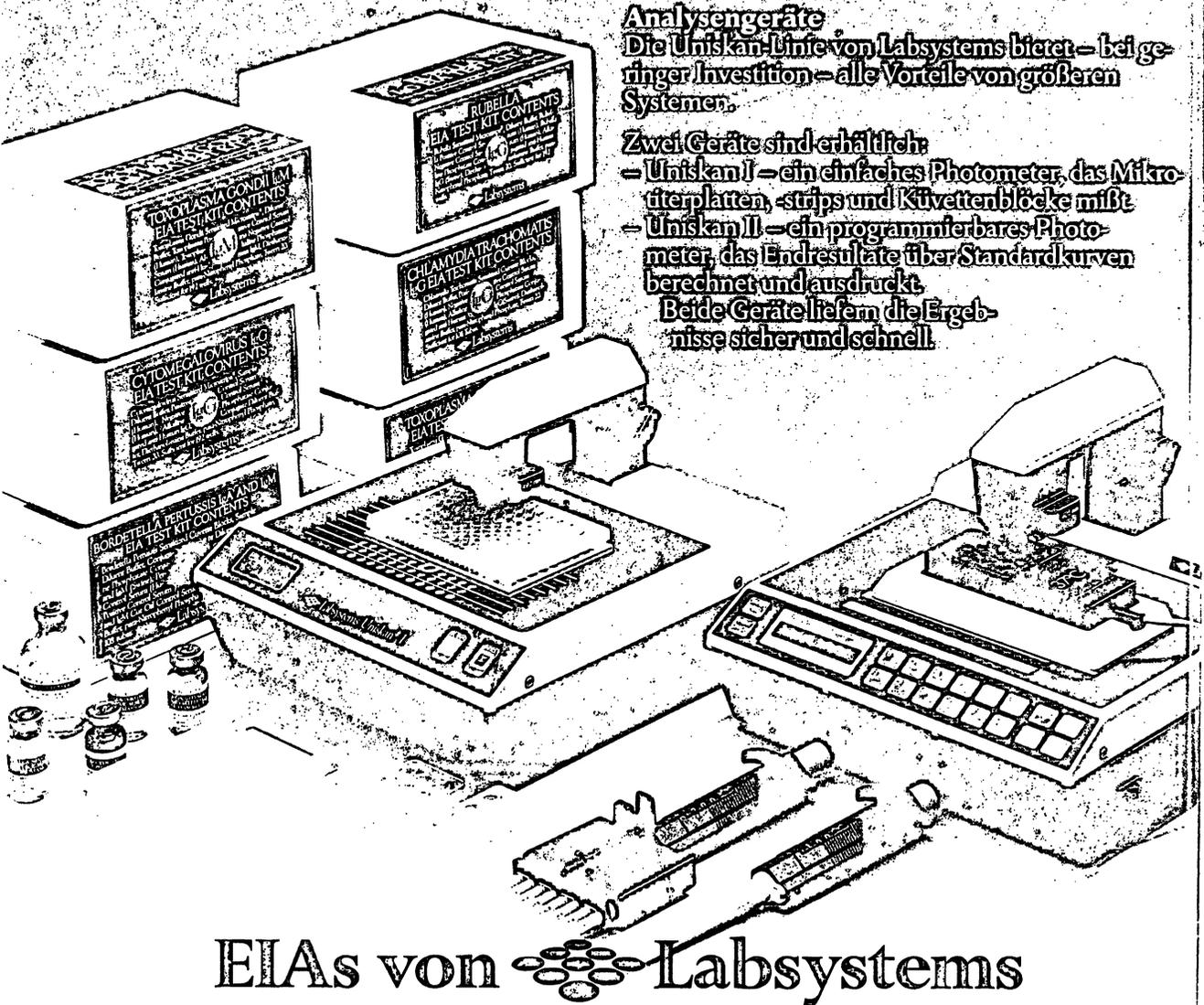
- Toxoplasma gondii IgG und IgM
- CMV IgG und IgM
- Rubella IgG und IgM
- Chlamydia IgG
- Bordetella Pertussis IgG und IgA + IgM
- Tetanus toxoid IgG

Analysengeräte

Die Uniskan-Linie von Labsystems bietet - bei geringer Investition - alle Vorteile von größeren Systemen.

Zwei Geräte sind erhältlich:

- Uniskan I - ein einfaches Photometer, das Mikrotiterplatten, -strips und Küvettenblöcke mißt
 - Uniskan II - ein programmierbares Photometer, das Endresultate über Standardkurven berechnet und ausdruckt
- Beide Geräte liefern die Ergebnisse sicher und schnell.



EIAs von  Labsystems

Medica '86
Hall 1 Stand D 11

Fordern Sie Unterlagen oder direkt eine
Vorführung an bei:
Labsystems GmbH - Laborsysteme Vertrieb
Postfach 12 09 07 - D 8000 München 12
☎ 0 89 / 5 02 60 27 9

Coupon Bitte ausfüllen, ausschneiden und an:
Labsystems GmbH, Postfach 12 09 07,
D 8000 München 12

Ja, senden Sie mir kostenlos und unverbindlich
Unterlagen über den EIA-Meßplatz

Name _____
Position _____
Straße _____
PLZ/Ort _____



1.2.8. Einfluß der Konzentration der TNBS-Lösung

Bei Zugabe der vorgesehenen Menge (50 µl) einer 60 mmol TNBS-Lösung kommt es zu einer optimalen Farbentwicklung im Derivatisationsprozeß. Dies entspricht einer Konzentration von 1,67 mmol/l TNBS im Reaktionsansatz. Geringere Konzentrationen vermindern die meßbare Absorption, eine Steigerung führt zu keiner weiteren Zunahme der Absorption und damit der meßbaren Aktivität (Abb. 7).

1.3. Aufzeichnung des Spektrums von Probe und Leerwert

Trinitrophenyl-Gly-Gly zeigt ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 420 nm (Abb. 8). Bei Messung unter Verwendung der Hg-Linien 405 und 436 nm vermindert sich die Extinktion um den Faktor 0,8626 bzw. 0,9114. Die Extinktion des Reagenzienleerwertes sinkt mit zunehmender Meßwellenlänge. Pikrinsäure zeigt bei den genannten Wellenlängen noch Absorption (Tab. 4).

1.4. Der zeitliche Ablauf des Derivatisationsprozesses

Es besteht eine Abhängigkeit des Reaktionsablaufes von der Temperatur und der Zeitdauer der Einwirkung.

Das Maximum der Differenz zwischen Proben- und Leerwertextinktion wird bei Raumtemperatur (20°C) innerhalb von 20 min erreicht, bei 37°C schon nach etwa 15 min (Abb. 9). Nach Abschluß des Derivatisationsprozesses beobachtet man eine konstante, langsame Zunahme der Extinktion, die in Abhängigkeit von Zeit und Meßwellenlänge in Probe und Leerwert in gleichem Maß erfolgt. Dieses Verhalten ist zurückzuführen auf die spon-

tane Hydrolyse des Farbkupplers im alkalischen Milieu. Die Freisetzung der Pikrinsäure folgt einer Kinetik 1. Ordnung und führt bei 420 nm Meßwellenlänge zu einer Extinktionszunahme um $2,8 \times 10^{-3} \times \text{min}^{-1}$, das entspricht dem Abbau von etwa 10% der ursprünglichen Konzentration der TNBS im Reaktionsansatz pro Stunde. Bei Messung mit 405 nm erhöht sich die Extinktionszunahme auf das 1,25fache, bei 436 nm verringert sie sich im Vergleich zu 420 nm auf das 0,57fache. Dieses Verhalten steht in Abhängigkeit vom spektralen Verhalten der Pikrinsäure. Das bedeutet aber auch, daß die Messung bei 436 nm von der Spontanhydrolyse in geringerem Maß beeinflusst wird (Tab. 5).

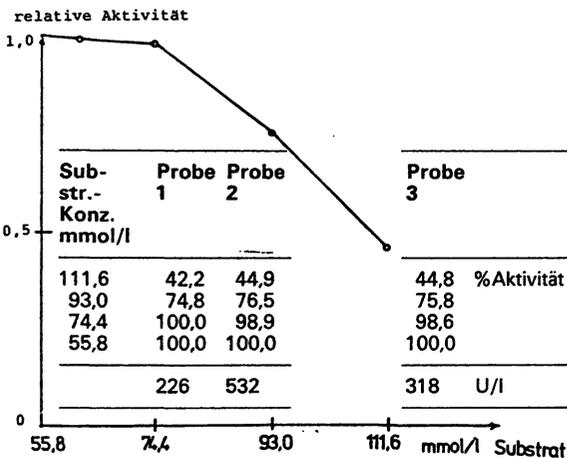


Abb. 4: Abnahme der gemessenen Enzymaktivität mit steigender Substrat-Konzentration

Tab. 6: Präzisionskontrolle

a) Präzision in der Serie			
n=12	$\bar{X} = 225$ U/l	s= 6,25	VK=2,78%
	$\bar{X} = 530$ U/l	s=10,20	VK=1,94%
b) Präzision von Tag zu Tag			
n=12	$\bar{X} = 315$ U/l	s=10,1	VK=3,12%

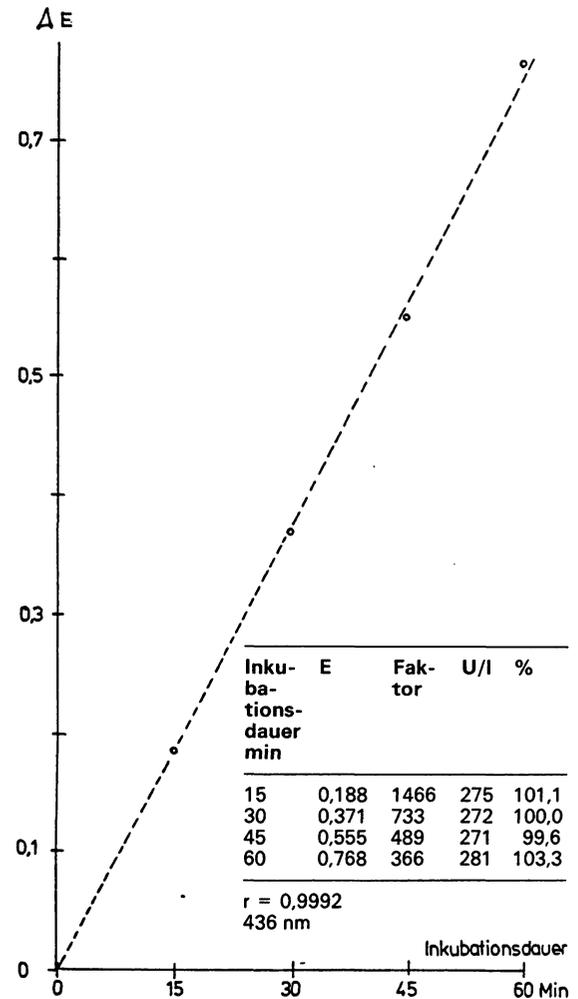


Abb. 5: Einfluß der Inkubationsdauer auf den enzymatischen Substratumsatz

Tab. 7: Substrat-Stabilität

Vergleich der Aktivitäten (U/l) von 10 Seren, gemessen bei 436 nm

a) mit frisch gelöstem Substrat
b) mit 2 Monate lang tiefgefrorenem Substrat

a:	235	193	259	334	410	405	298	428	307	510
b:	237	182	257	328	406	398	306	425	298	516

$r = 0,9982$
 $y = 1,018x - 6,5$

1.5. Prüfung der Zuverlässigkeit

1.5.1. Kontrolle der Präzision in Serie und von Tag zu Tag

Gemessen an Serumproben von niedriger und hoher Aktivität findet man gute Präzision in der Serie. Die Kontrolle von Tag zu Tag wurde an einer gepoolten, tiefgefrorenen Serumprobe ausgeführt. Die Reproduzierbarkeit bei Anwendung unserer Methode ist bei manueller Durchführung des Analysenansatzes ausgezeichnet (Tab. 6).

Die Stabilität der ACE-Aktivität einer tiefgefrorenen Serumprobe ist ausreichend (14); im Laufe von Wochen ist nur ein unbedeutendes Absinken der Aktivität zu erwarten (etwa um 5%). Den Versuch eine gepufferte Substratlösung

durch Tiefrieren gebrauchsfähig zu erhalten, zeigt Tab. 7.

Der Vergleich der Ergebnisse mit frisch gelöster und 2 Monate lang tiefgefrorener Substratlösung weist nur geringe zufallsbedingte Unterschiede auf.

Anders verhält es sich mit der TNBS-Lösung. Infolge der spontan einsetzenden, langsamen Hydrolyse des gelösten Farbkupplers an der Luft, beträgt die Haltbarkeit nur etwa 10 Tage. An den ersten Tagen beobachtet man eine gleichsinnige Zunahme der Extinktion von Probe und Leerwert, später aber nimmt die Extinktionsdifferenz, damit die gemessene Aktivität, ab. Ein Maß für den Zer-

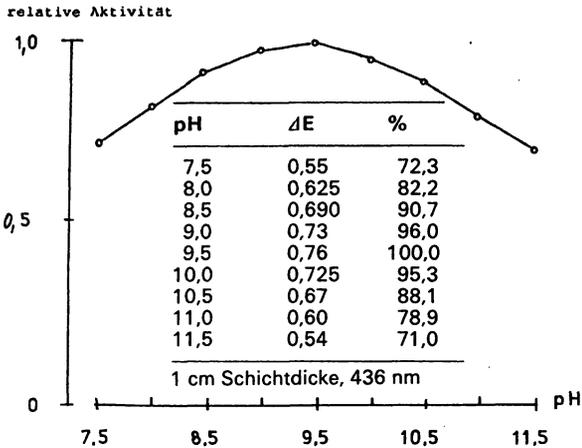


Abb. 6: Abhängigkeit der Indikatorreaktion mit TNBS vom pH-Wert

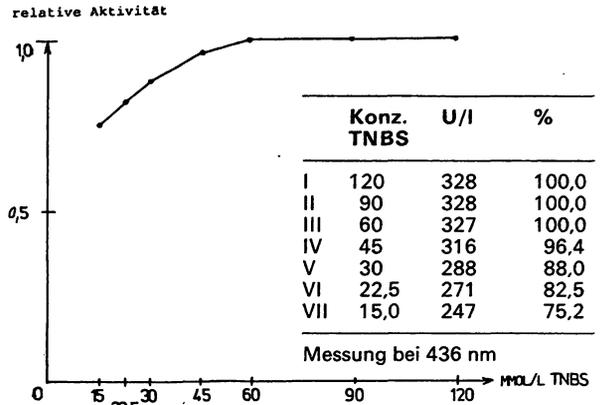


Abb. 7: Einfluß der TNBS-Konzentration

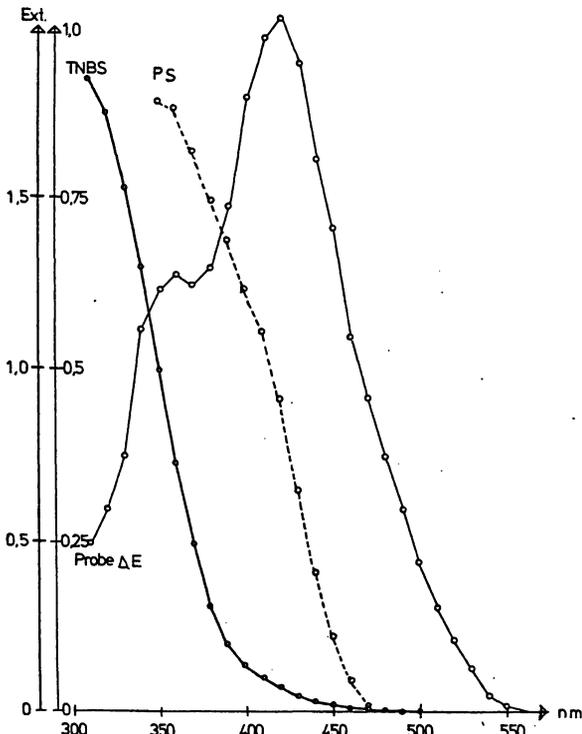


Abb. 8: Spektrum von Probe, Leerwert und Pikrinsäure bei pH 9,6.

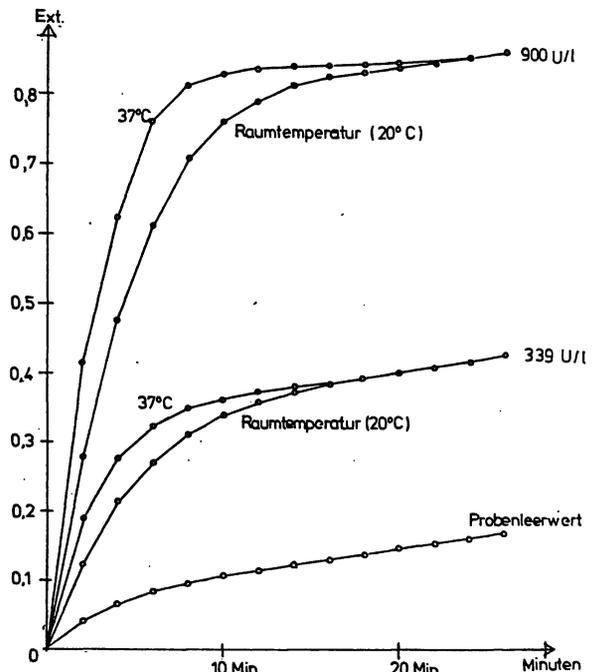


Abb. 9: Farbentwicklung in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur

setzungsprozeß gibt der Anstieg der Extinktion des Reagenzleerwertes.

Die Extinktion der Probenleerwerte verschiedener Serumproben schwanken in derselben Serie nur in geringem Maß. In 2 Tagesserien von jeweils 20 Analysen betrug der VK 5,6 bzw. 4,2%. Ein störender Einfluß durch Serumtrübung, Hämoglobingehalt oder Bilirubin war nicht festzustellen.

1.5.2. Richtigkeitskontrolle

Sie wurde in 3 Stufen durchgeführt.

1.5.2.1. Prüfung der Linearität der Indikatorreaktion

Gly-Gly-Lösungen mit fallender Konzentration wurden bereitet, in die Reaktion eingesetzt und die Absorption in Beziehung zur Konzentration der Standardlösung gebracht. Eine ausgezeichnete Korrelation ($r = 0,9991$) und Regression ($x = 1,01 \times -3$) über den ganzen Meßbereich bestand und bestätigte die Eignung der Indikatorreaktion (Abb. 10).

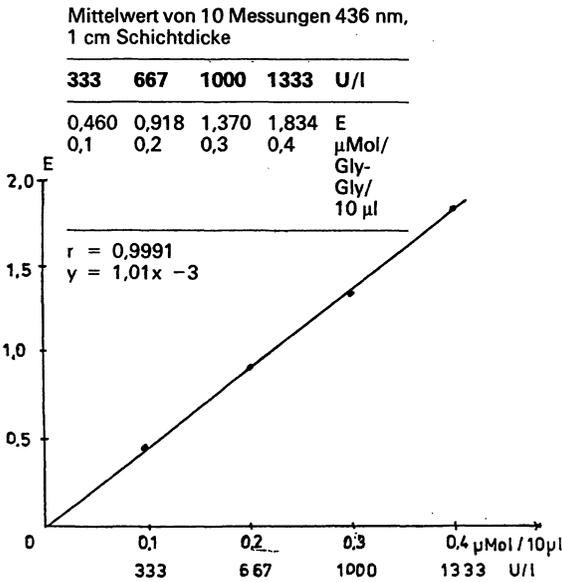


Abb. 10: Linearitätsprüfung der Indikatorreaktion, gemessen an einer Verdünnungsreihe von Gly-Gly-Standard

1.5.2.2. Prüfung der Linearität der Enzymreaktion

Von einer Serumprobe mit hoher ACE-Aktivität wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. In einem weiten Bereich war eine gute Übereinstimmung der erwarteten und gemessenen Aktivität festzustellen. Durch entsprechende Modifikation der eingesetzten Probenmenge und Inkubationsdauer sind auch extrem niedrige Aktivitäten (bis 10 U/l) einwandfrei meßbar (Abb. 11).

1.5.2.3. Prüfung der Richtigkeit durch Vergleich mit einer anderen Bestimmungsmethode

An 100 verschiedenen Serumproben wurde nach Verfahren die ACE-Aktivität bestimmt und miteinander verglichen:

1. nach der von Neels et al. (11) entwickelten Methode (y) und

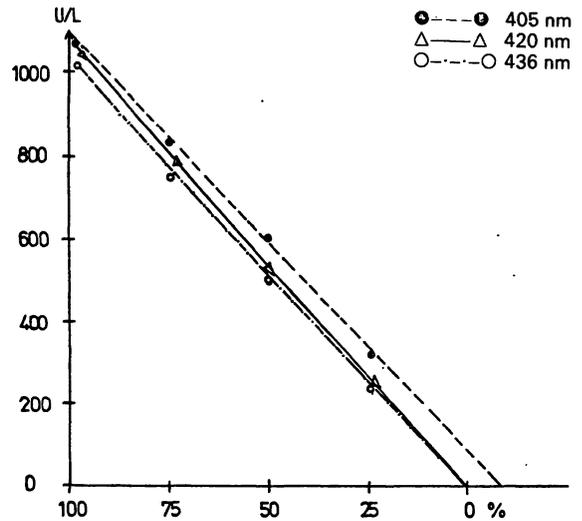


Abb. 11: Linearitätsprüfung an einer Serumverdünnungsreihe gemessen bei 405, 420 und 436 nm

Sollwert	405 nm	420 nm	436 nm
100%	1085 %	1082 %	1026 %
75%	840 77,4	771 71,2	772 75,2
50%	605 55,7	539 49,8	505 49,2
25%	327 30,1	253 23,4	255 24,9
r	0,9993	0,9986	0,9999

Tab. 8: Referenzbereiche (Median U/l und 95% Perzentile)

Alter in Jahren	Männer			Frauen		
	n	\bar{x}	95%	n	\bar{x}	95%
1-10	20	348	270-410	20	325	271-376
11-20	25	377	321-475	25	338	249-423
1-20	45	364	283-462	45	328	263-401
21-30	25	307	246-380	25	296	246-347
31-40	15	301	253-370	15	303	233-327
41-50	10	300	221-368	10	298	286-363
21-50	50	302	246-370	50	298	246-347
51-60	15	266	235-327	15	283	262-307
61-70	10	268	247-327	10	277	260-294
71-80	10	252	214-319	10	277	226-299
51-80	35	260	230-236	35	277	248-295

2. nach einer Methode von *Lieberman*, modifiziert von *Hurst et al.* (15), welche Hippuryl-Histidyl-Leucin als Substrat einsetzt und die abgespaltene Hippursäure quantitativ bestimmt (x).

Die errechnete Korrelation ($r = 0,960$) ist zufriedenstellend, die Regression, ausgedrückt durch die Gleichung

$$y = 8,15x + 15,$$

zeigt eine gute Vergleichbarkeit beider Methoden in einem weiten Bereich (Abb. 12).

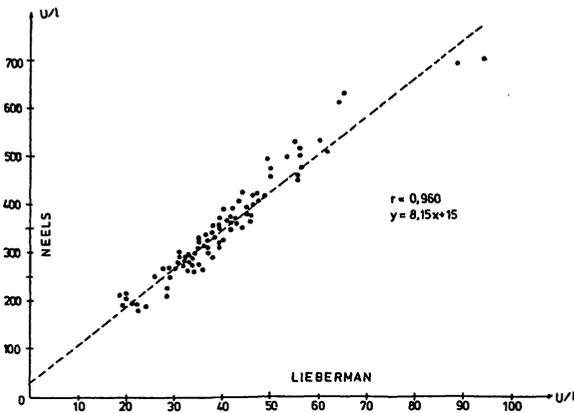


Abb. 12: Methodenvergleich

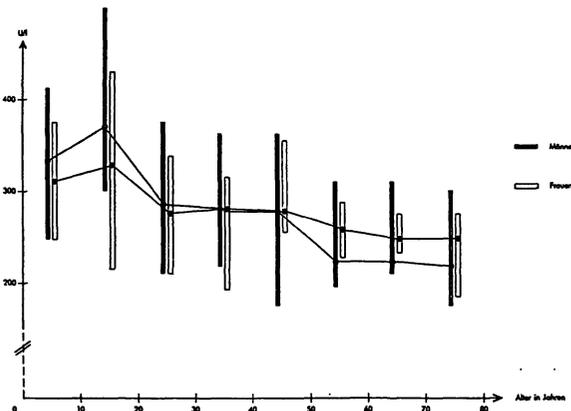


Abb. 13: Referenzbereich in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht

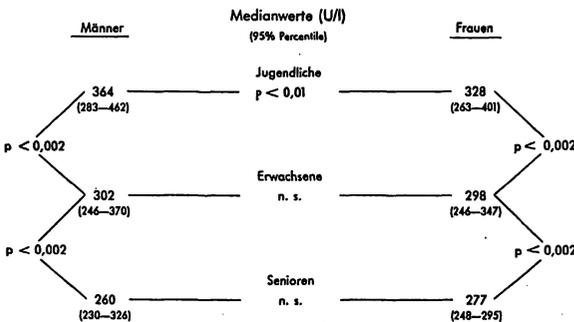


Abb. 14: Signifikanz der Alters- und Geschlechtsdifferenzen

2. Abschnitt: Ermittlung der Referenzbereiche, getrennt nach Alter und Geschlecht

An einem Kollektiv von Blutspendern und Patienten des Krankenhauses, bei denen aufgrund der klinischen Diagnose und der erhobenen Befunde Erkrankungen ausgeschlossen werden konnten, welche die ACE-Aktivität beeinflussen, wurden, getrennt nach Altersgruppen und Geschlecht, aufgrund einer repräsentativen Zahl von Beobachtungen die Referenzbereiche (Median und 95% Perzentile) ermittelt und signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen berechnet (Tab. 8).

2.1. Referenzbereich für Jugendliche, Erwachsene und Senioren

Bei Kindern und Jugendlichen liegen, wie zu erwarten war, die Enzymaktivitäten deutlich höher als bei den Erwachsenen. Ein signifikanter Unterschied zwischen Knaben und Mädchen während der Pubertät zeichnet sich ab (Abb. 13).

Das Kollektiv der Erwachsenen besteht fast ausschließlich aus gesunden Blutspendern. Im Gegensatz zu Mitteilungen anderer Autoren (16) fanden wir zwischen Männern und Frauen im Erwachsenenalter keine signifikanten Unterschiede der ACE-Aktivität. Normale endokrine Verhältnisse der Reifezeit führen demnach zu keinen differenten Einflüssen auf das Enzymverhalten.

Nach dem 50. Lebensjahr ist bei beiden Geschlechtern ein Absinken der Enzymaktivität festzustellen. Ob dabei endokrine Faktoren oder ob die Reduzierung der Lungenstrombahn für dieses Verhalten eine Rolle spielen, läßt sich aufgrund der vorliegenden Daten nur vermuten. Zur Verminderung der ACE-Aktivität kommt es synchron mit der Bildung eines altersbedingten, physiologischen Emphysems der Lunge (17).

2.2. Signifikanz von Alters- und Geschlechtsunterschieden

Die Prüfung auf Signifikanz der unterschiedlichen Enzymaktivität zwischen den einzelnen Kollektiven wurde unter Anwendung des zweiseitigen U-Tests nach Wilcoxon, Mann and Whitney (18) (Rangsummentest zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben) durchgeführt. Signifikante Differenzen der Medianwerte ergaben sich zwischen den einzelnen Altersgruppen, bei den Jugendlichen auch zwischen den Geschlechtern (Abb. 14).

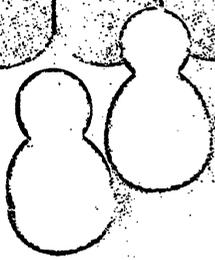
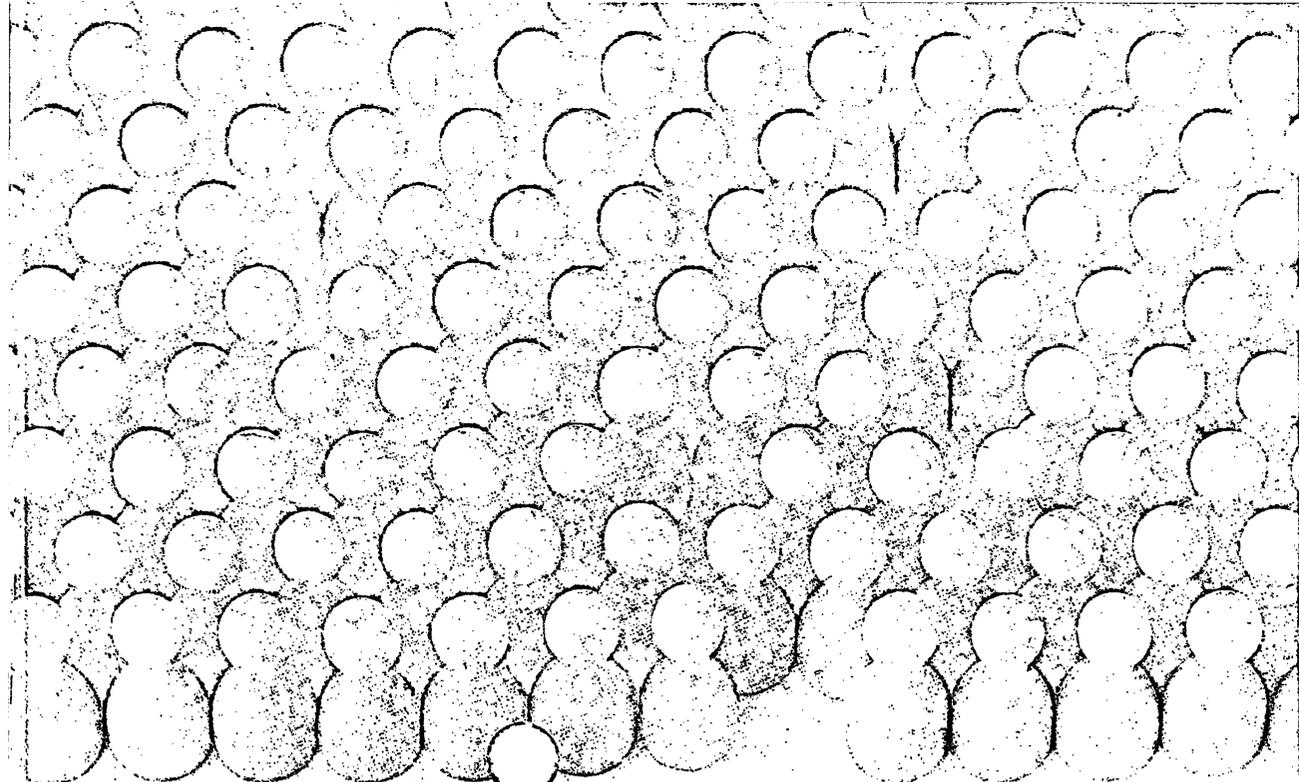
Zur Beurteilung, ob im Einzelfall eine gesteigerte oder verminderte ACE-Aktivität vorliegt, müssen Alter und Geschlecht des Probanden ins Kalkül gezogen werden.

3. Abschnitt: Welche diagnostische Information liefert die Bestimmung der ACE-Aktivität im Serum?

Dargestellt am Beispiel des Enzymverhaltens bei pulmonalen Erkrankungen und Schilddrüsenfunktionsstörungen.

3.1. ACE und pulmonale Erkrankungen

Seit den Publikationen von *Lieberman et al.* (6, 7) und einer Reihe anderer Autoren (8, 9, 10) gilt die Bestim-



MEDICA '86
Halle 4/Stand B 36



Hyperthyreosen spielend erkennen

Die durch eine Hybridation von Myeloblasten und Lymphozyten entstehenden Hybridomas sind mit den Eigenschaften beider Zellarten ausgestattet – dem schnellen Wachstum von Krebszellen und der spezifischen Antikörperproduktion von Lymphozyten. Nach der Zellselktion der gewünschten Hybridoma (Mono-Clone) wird eine Zellkultur angelegt und für die Antikörperproduktion eingesetzt.

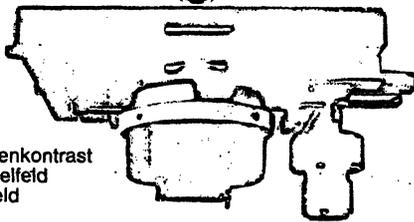
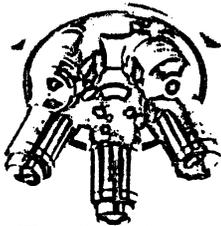
MAGIC MAB
TSH
monoclonal

Der TSH-Test bietet viele Vorteile:

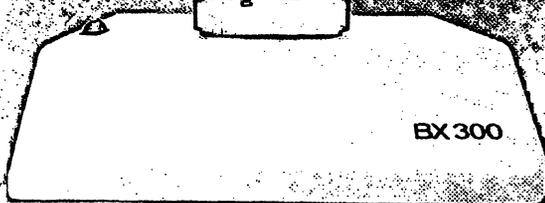
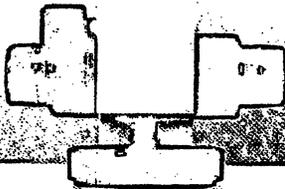
- supersensitiv und hochspezifisch
- differentialdiagnostisch treffsicher bei Eu-, Hyper- und Hypothyreose
- monoclonale Antikörper
- gebrauchsfertige Reagenzien
- kurze Inkubationszeit
- ohne Zentrifugation

Phasenkontrast- Mikroskop für die problemlose Schnelldiagnose

NEU

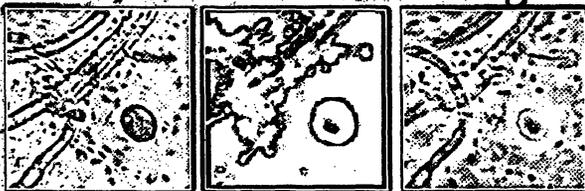


Phasenkontrast
Dunkelfeld
Hellfeld



Wilozyt

Präzision
made in Germany



im Hellfeld im Dunkelfeld im Phasenkontrast

Dieses Phasenkontrast-Mikroskop ist eine praxisgerechte Geräteinheit, die betriebsfertig für die Phasenkontrast-Mikroskopie und das Arbeiten im Dunkelfeld eingestellt ist.

WILL-Mikroskope bieten mehr als einen guten Namen.

Ausführliches Informationsmaterial senden wir Ihnen gerne zu.



WILL WEIZLAR GMBH • Optische Werke
Wilhelm-Will-Straße 7 • Postfach 21 01 61
6330 Weizlar 21 Nauborn
Telefon 06441/20 01-0

Verunsichert?

inch oder cm
läßt die Entfernung
unbeeindruckt,

HbA_{1c} oder **HbA₁**
die Stoffwechsellage
unbeeinflußt.

DIABCONTROL mit
ALDIMIN ELIMINATOR
und **VERIFICATOR**
setzt Maßstäbe. Mit
weniger sollten Sie nicht zu-
frieden sein!

GLYCOPAN –
das Opti-Sep System
zur Erfassung aller **GHb's**
oder **Glycoproteine**,
auch bei abnormen
Hämoglobinmustern oder
Temperaturproblemen.

Auch hier sind wir innovativ
und haben den Vorsprung.
DIABCONTROL
und
GLYCOPAN gibt es für
20 und 100 Bestimmungen.



Bezug und Information durch:

panchem
ges. f. chemische produkte mbh

Schloßstraße 3
Postfach 50

D-8751 Kleinwallstadt
Tel. 06022/21005
Telex 04188144 panc-d

mung der ACE-Aktivität im Serum bei entsprechendem klinischen Befund als sensitiver Marker für die Feststellung einer aktiven Sarkoidose in ihren verschiedenen Erscheinungsformen, unabhängig vom röntgenologischen Stadium der Erkrankung (19, 20). Der Krankheitsverlauf, Spontanremissionen oder der Effekt einer Corticoidtherapie werden indikatorisch durch wiederholte ACE-Kontrollen aufweisbar. Für das Therapiemanagement und die Prognose liefert die Enzymbestimmung brauchbare Anhaltspunkte, wobei die einfache Durchführung der Untersuchung, die geringe Belastung für die Patienten und die beliebige Wiederholbarkeit sich als vorteilhaft erweisen. Zu beachten ist aber, daß nicht nur die Sarkoidose zu einer gesteigerten Enzymaktivität führen kann, sondern auch andere granulombildende Erkrankungen (z. B. bestimmte Formen von Tuberkulose, Silikose und andere mehr), besonders dann, wenn sie mit einer Hepatopathie kombiniert und kompliziert sind (Abb. 15). Der Umstand, daß diese Erkrankungen mit höherer Inzidenz als die Sarkoidose auftreten und daß bei ruhenden Formen der Boeckschen Erkrankung eine Zunahme der Enzymaktivität unterbleibt, schränkt die Verwendung der ACE-Bestimmung als Suchtest ein. Trotz der hohen Sensitivität für eine aktive Sarkoidose kommt ihr wegen der geringen Prävalenz der Erkrankung nur ein geringer prädiktiver Wert zu. Der Vorteil der hohen Sensitivität und Spezifität kommt erst bei gezieltem Einsatz in Verbindung mit einer typischen Symptomatik und entsprechenden klinischen Befunden voll zur Geltung.

Chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen, Pneumonien, das Bronchialcarcinom und chronische Lungengestauung (21, 22), Zustände mit Einschränkung der Lun-

genstrombahn, bewirken eine Verminderung der ACE-Aktivität im Serum.

Klinische Daten, Befunde und Diagnosen, welche dieser Zusammenstellung zugrunde liegen, stammen von Patienten der Pulmologischen Abteilung unseres Krankenhauses.

3.2. ACE bei Schilddrüsenerkrankungen

In Zusammenarbeit mit der nuklearmedizinischen Abteilung unseres Krankenhauses haben wir begonnen Daten der ACE-Aktivität bei Patienten mit Erkrankungen, bzw. Funktionsstörungen der Schilddrüse zu sammeln (Abb. 16). Im Vordergrund des Interesses stand das Enzymverhalten bei Hyperthyreoten vor und nach der Behandlung. Unzweifelhaft bilden Anamnese, klinischer Befund, die Bestimmung der Hormonwerte, Szintigraphie, Biopsie und serologische Untersuchungen die Grundlage der Diagnostik.

Doch sollte man nicht übersehen, daß nach Mitteilungen der Literatur (23, 24) bei vielen Hyperthyreoten auch eine erhöhte ACE-Aktivität besteht. Nach Czernobilsky et al. (24) spielt dabei nicht die Pathogenese der Thyreotoxikose eine Rolle, vielmehr geht die Zunahme der Schilddrüsenhormone parallel mit einer Steigerung der ACE-Aktivität einher.

Diese Feststellung sollte nicht dazu führen eine Hyperthyreose aufgrund einer ACE-Zunahme diagnostizieren zu wollen, vielmehr zu der Überlegung anregen, bei ungeklärter ACE-Erhöhung an das Vorliegen einer Hyperthyreose zu denken, zumal als Zeichen einer erfolgreichen The-

n	100	55	21	20	45	31	12	11	12	11
\bar{x}	300	536	276	388	293	254	394	258	217	269 U/l

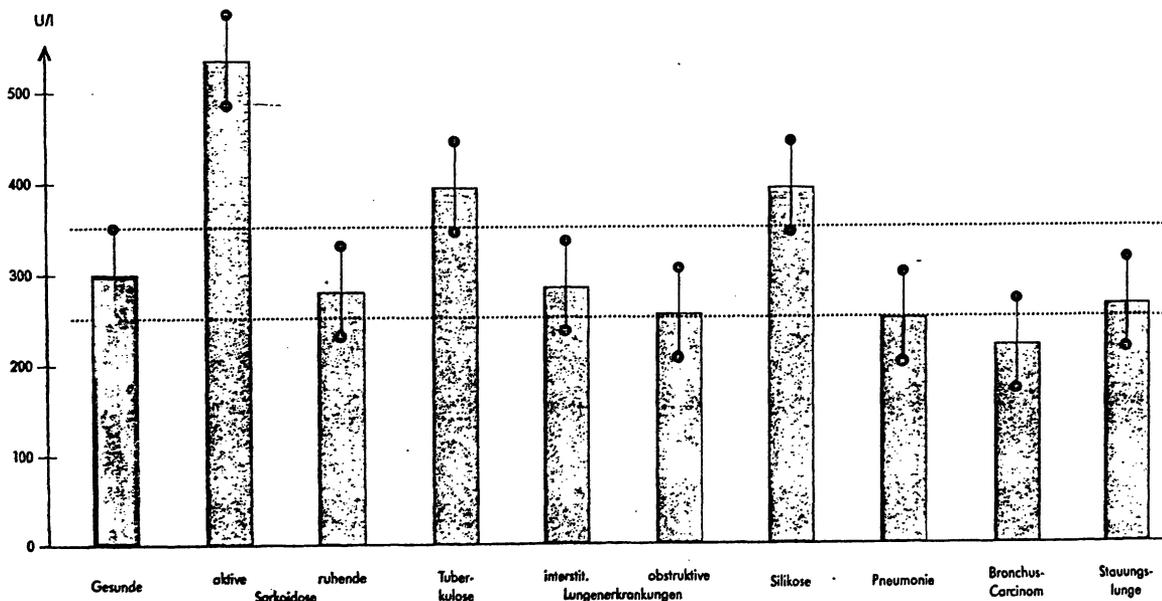


Abb. 15: ACE-Aktivität bei pulmonalen Erkrankungen

rapie sich nicht nur die Hormonwerte normalisieren, sondern auch die ACE-Aktivität absinkt. Die Mitteilungen in der Literatur (23), daß nur ein Teil der Hyperthyreoten erhöhte ACE-Aktivität zeigt, dürfte damit zusammenhängen, daß das Alter der Patienten und die Schwere der Erkrankungen unberücksichtigt blieb.

Das Enzymverhalten bei Patienten mit vermindertem Thyroxin- und/oder Trijodthyroninspiegel im Blut ist nicht einheitlich. Offenbar besteht ein Zusammenhang mit der Genese und der Dauer des Zustandes (genuine Hypothyreose oder Folge therapeutischer Eingriffe). Berücksichtigt man nur die Fälle primärer Hypothyreose, beobachtet man parallel mit den erniedrigten Hormonwerten auch eine Verminderung der ACE-Aktivitäten. Hormontherapie beeinflusst beide Größen gleichsinnig.

Diskussion

Das von uns geprüfte Verfahren nach Neels et al. (11) zur Bestimmung der ACE-Aktivität im Serum ist einfach in der Handhabung, verwendet keine flüchtigen giftigen und aggressiven Substanzen und kann an jedem Routinephotometer gemessen werden. Der Gebrauch von Pipettierhilfen erleichtert und beschleunigt das Vorgehen. Eine Automatisierung ist jedoch nicht möglich. Die gepufferte Substratlösung ist in tiefgefrorenem Zustand über lange Zeit haltbar.

Die Prüfung der Reaktionsbedingungen der Enzym- und Nachweisphase erstreckte sich auf den Einfluß der Konzentration des Substrates, der Zusammensetzung der Pufferlösungen und Eigenschaften des Farbkupplers. Ein Einfluß der Chloridionen-Konzentration und der Art der Proteinfällung war festzustellen. Die Ermittlung der K_m und V_{max} zeigten eine hohe Affinität des Substrates zum

Enzym und damit günstige Voraussetzungen für die Messung. Bei hoher Konzentration von Hipp-Gly-Gly tritt eine Substrathemmung ein.

Das Reaktionsprodukt Trinitrophenol-Gly-Gly zeigt maximale Absorption bei 420 nm, eine Messung mit etwas geringerer Empfindlichkeit ist aber auch bei 405 oder 436 nm (Quecksilberlinien) möglich. Die Spontanhydrolyse der TNBS im alkalischen Milieu führt dazu, daß mit zunehmender Inkubationsdauer durch Freisetzung von Pikrinsäure die Absorption von Probe und Leerwert in gleichem Maß langsam ansteigt, ein Umstand, der bei Messung bei 405 nm besonders ins Gewicht fällt.

Die Prüfung der Zuverlässigkeit, beurteilt an der Präzision und der Richtigkeit erfolgte in 3 Stufen: Prüfung der Linearität der Farbreaktion, Prüfung der Linearität und des Umfanges der Enzymreaktion und am Vergleich mit Ergebnissen einer anderen Methode. Alle Prüfungen fielen befriedigend aus.

Optimale Reaktionsbedingungen und hohe Zuverlässigkeit kommen der beschriebenen Methode zu.

Die Ermittlung von Referenzbereichen, getrennt nach Alter und Geschlecht, sowie Beispiele des Enzymverhaltens bei pulmonalen Erkrankungen und bei Schilddrüsenfunktionsstörungen erweisen die Zweckmäßigkeit der ACE-Bestimmung im Rahmen klinisch-diagnostischer Fragestellungen.

Schrifttum:

1. VAN SANDE, M. E., SCHARPÉ, S. L., NEELS, H. M., VAN CAMP, K. O.: Distribution of Angiotensin Converting Enzyme in human tissues. Clin. Chim. Act. 147, 255-260 (1985).
2. VAN SANDE, M. E., SCHARPÉ, S. L., NEELS, H. M.: Multiple Forms of Angiotensin Converting Enzyme in human tissues and fluids. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. Vol. 23, 381-386 (1985).

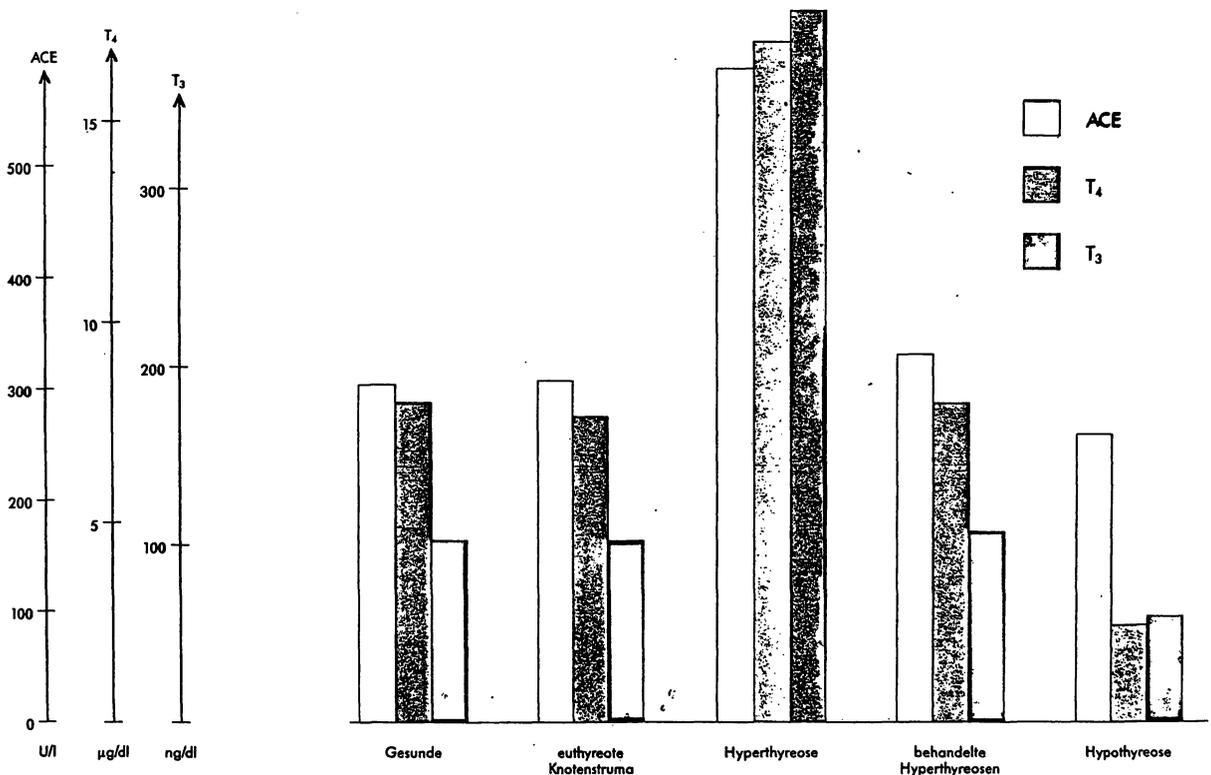


Abb. 16: ACE, Thyroxin und Trijodthyronin bei Schilddrüsenerkrankungen

3. STUDDY, P. R., LAPWORTH, R., BIRD, R.: Angiotensin Converting Enzyme and its clinical significance - a review. *J. Clin. Pathol.* **36**, 938-947 (1983).

4. ROHATGI, P. K.: Serum Angiotensin Converting Enzyme in pulmonary disease. *Lung* **160**, 287-301 (1982).

5. SKEGGS, L. T., KAHN, J. R., SHUNWAY, N. P.: The preparation and function of the hypertension converting enzyme. *J. Exp. Med.* **103**, 295-309 (1956).

6. LIEBERMAN, J.: Elevation of serum Angiotensin Converting Enzyme (ACE) level in sarcoidosis. *Am. J. Med. Vol.* **59**, 365-372 (1975).

7. LIEBERMAN, J., NOSAL, A., SCHLESSNER, L. A., SASTRE-FOKEN, A.: Serum Angiotensin Converting Enzyme for diagnosis and therapeutic evaluation of sarcoidosis. *Am. Ref. Respir. Dis. Vol.* **120**, 329-335 (1979).

8. BAUR, X., FRUHMANN, G., KÖNIG, R., RIENMÜLLER, R., KNONSALLA, M., DAHLHEIM, H.: Die Bedeutung des Angiotensin I-Converting Enzyms für die Diagnose einer Sarkoidose. *Klin. Wochenschr.* **58**, 199-206 (1980).

9. SCHWEISFURTH, H.: Das Angiotensin I-Converting Enzym. Physiologische Aspekte und klinische Bedeutung. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **47**, 1815-1818 (1982).

10. SIEMS, W. E., HALLE, W.: Das Angiotensin I-Converting Enzym. Eigenschaften, Funktionen, Nachweismöglichkeiten. *Die Pharmazie* **37**, 539-544 (1982).

11. NEELS, H. M., VAN SANDE, M. E., SCHARPÉ, S. L.: Sensitive colorimetric assay for Angiotensin Converting Enzyme in serum. *Clin. Chem.* **29**, 1399-1403 (1983).

12. SNYDER, S. L., SOBOCINSKI, P. Z.: An improved 2,4,6-Trinitrobenzensulfonic acid method for the determination of amines. *Analyt. Biochem.* **64**, 284-288 (1975).

13. FOLIN, O., WU, H.: *J. Biol. Chem.* **28**, 81-85 (1919).

14. MAYR, K., ASPÖCK, G.: Stabilität tiefgefrorener Serumproben. Unveröffentlicht, Mitteilung vor der ÖGKC.

15. HURST, P. L., LOVELL-SMITH, C. J.: Optimized assay for serum Angiotensin Converting Enzyme activity. *Clin. Chem.* **27**, 2048-2052 (1981).

16. BEUTLER, E.: Sex and age-related differences in activity of Angiotensin Converting Enzyme in serum. *Clin. Chem.* **29**, 1570 (1983).

17. EHRSAM, R. E., PERRUCHOUD, A., OBERHOLZER, M., BURKHART, F., HERZOG, H.: Influence of age on pulmonary hemodynamics. *Clin. Sci.* **65**, 653-660 (1983).

18. SACHS, L.: Statistische Auswertungsmethoden. 3. Aufl., 1971, Verlag Springer, Berlin.

19. ZORN, St. K., STEVENS, C. A., SCHACHTER, E. N., GEE, J. B. L.: The Angiotensin Converting Enzyme in pulmonary sarcoidosis and the relative diagnostic value of serum lysozyme. *Lung* **157**, 87-94 (1980).

20. RÜHLE, K. H., BURMEISTER, P., VOLK, A., COSTABEL, U., MATTHYS, H.: Klinische Bedeutung des Angiotensin convertierenden Enzyms (ACE) im Serum bei Sarkoidose. *Prax. Klin. Pneumol.* **36**, 466-470 (1982).

21. MAYR, K., ASPÖCK, G., MAYER, K. H., WAIBEL, K., LEITNER, L.: Das Angiotensin Converting Enzyme bei Lungenerkrankungen. *Wien. Med. Wochenschr.* **135**, 109-113 (1985).

22. SCHWEISFURTH, H., HEINRICH, J., BRUGGER, E., STEINL, C., MAIWALD, L.: The value of Angiotensin I-Converting Enzyme determinations in malignant and other diseases. *Clin. Physiol. Biochem.* **3**, 184-192 (1985).

23. SMALLRIDGE, R. C., ROGERS, J., VERMA, P. S.: Serum Angiotensin Converting Enzyme. Alterations in hyperthyroidism, hypothyroidism and subacute thyroiditis. *JAMA*, Vol. **250**, 2489-2493 (1983).

24. CZERNOBILSKY, H., FIEHN, W., ZIEGLER, R.: Comparison of serum Angiotensin Converting Enzyme in Graves disease, toxic nodular goiter and other thyroid conditions. *Klin. Wochenschr.* **63**, 518-522 (1985).

Danksagung

Meinen Mitarbeitern, Dr. G. Aspöck, Dr. Chr. Artmann und Dr. G. Ruthensteiner danke ich für die Mithilfe bei der Durchführung der Analysen, meinen Kollegen Prim. Dr. K. H. Mayer von der Pulmologischen Abteilung und Prim. Dr. M. Stockhammer von der Nuklearmedizinischen Abteilung unseres Krankenhauses für die Überlassung klinischer Daten und der Fa. Boehringer Mannheim für die Unterstützung meines Vorhabens.

Anschrift des Verfassers:

Prim Dr. Konrad Mayr
Kroatengasse 2
A-4020 Linz/Österreich



Buchbesprechung

Methods of Enzymatic Analysis

Von H. U. Bergmeyer. Third Edition, Vol. IX: *Proteins and Peptides*. XXV, 571 pages, 112 figures, 12 tables, bind. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel, 1986. ISBN 3-527-26049-8. Series price DM 270,-. Individual volume price DM 310,-.

Band IX dieser Reihe setzt eine Marke in der Kontinuität der Bände I-XII. Die vorangegangenen 8 Bände umfassen die enzymatische Analyse im „klassischen“ Sinn. Die Gegenstände der folgenden Bände: Proteine, Peptide, Antigene, Antikörper, Arzneimittel und Pestizide greifen in andere Fachdisziplinen über und haben sich mit deren spezifischen Anforderungen auseinandersetzen. Format, Aufbau und Darstellung werden beibehalten, was zu Schwierigkeiten bei der spezifischen Einbindung in die übergeordneten Prinzipien führen kann. Als verknüpfendes Prinzip dient der Enzymimmunoassay.

Band IX beinhaltet EIA-Methoden zur Bestimmung von Proteohormonen und Peptidhormonen, biologisch wichtige Proteine ohne bekannte Enzymaktivität. Der Stoff gliedert sich in die Gruppen Transportproteine, Carcinomembryonale- und Schwangerschafts-Proteine, Struktur- und regulatorische Proteine, hormone Proteine und Peptide. - Abgehandelt werden: Harn-Albumin, Retinol-bindendes Protein, Lactoferrin, Ferritin, Thyroglobulin und antithyreoidale Antikörper, Thyroxin-bindendes Globulin, α 1-Fetoprotein, carcinoembryonales Antigen, schwangerschaftsspezifisches β -Glykoprotein, schwangerschaftsassoziertes Plasmaprotein A, Kollagen, Fibronectin, Myoglobin, Myosinschwerketten-Isoforme, Interferon, β 2-Mikroglobulin, Komplement C5a-Antigen, geschlechtsspezifisches Antigen (H-Y), α 1-Mikroglobulin, Kininogene, Calmodulin, Geringungsprotein C, ACTH, hGH, Prolaktin, FSH, LH, TSH, hCG,

Glukagon, Insulin, Sekretin, Gastrin, Angiotensin I, Calcitonin, Triiodthyronin und L-Thyroxin. - Der Aufbau dieser Kapitel folgt den Prinzipien der Reihe: Allgemeines - Bestimmung (Prinzip, Selektivitäts- und Anpassungskriterien, Ausrüstung, Reagenzien und -lösungen, Testdurchführung, Messung, Kalibrierung, Berechnung) - Validität (Präzision, Richtigkeit, Nachweisgrenzen, Empfindlichkeit, Spezifität, Fehlerquellen, Referenzbereiche) - Appendices (Herstellung von Antisera, Reinigung der Antikörper, Synthetisierung der Konjugate, Coating der Mikro-ELISA-Platten, Herstellung von Standards). Die einleitenden allgemeinen Kapitel behandeln die Bedeutung der Enzymimmunoassays in der Biologie und Medizin, beleuchten praktische Probleme anhand eines Modellsystems und diskutieren Probleme bei der Standardisierung der Enzymimmunoassays für Antigene. - Hier wäre Kritisches anzumerken. Zwar werden Bedeutung, Vorteile, Nachteile, Grenzen und Nutzen der EIAs erörtert sowie ELISA und EMIT definiert und abgegrenzt. Dies erfolgt aber in nur einer einzigen Seite. Der Stellenwert der EIA-Technologie gegenüber konventionellen und modernen Analysenmethoden der klinischen Immunologie, wie Radio-, Fluoreszenz-, Lumineszenz-Immunoassays, zeitaufwendige Immunofluoreszenz, Immunonephelometrie und -turbidimetrie, Latex-Methoden, KBR- und Hämagglutinationsteste, Agglutinationsreaktionen oder Komplexfixation werden nur erwähnt. Eine kritische Auseinandersetzung, Abgrenzung und Herausarbeiten des spezifischen Stellenwertes der EIAs wäre erforderlich - anbetrachts der Behandlung von 4 Bänden, d. h. einem Viertel des Gesamtwerkes, Teststreifenmethoden, z. B. für Schwangerschaftsteste fehlen. Nichtsdestoweniger stellt bereits dieser Band ein wertvolles Compendium dieser Methoden dar, deren Gewichtigkeit recht verschieden ausgefallen ist. Eine wertende Beurteilung soll fairerweise erst nach dem Erscheinen der weiteren Bände erfolgen. Man wird darauf mit Spannung warten.

W. Appel, Karlsruhe