

Ein kontinuierlicher Test zur Bestimmung der N-Acetyl- β -D-glucosaminidase-Aktivität im Harn mit dem Substrat 3,3'-Dichlorphenolsulfonphthaleinyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid: ein Vergleich mit anderen Methoden ohne Probenvorbereitung

New Kinetic Test for Determination of N-Acetyl- β -D-glucosaminidase Activity in Urine with 3,3'-Dichlorophenolsulfonphthaleinyl N-Acetyl- β -D-glucosaminide: Comparison to Various Methods without Pretreatment of Samples

K. Jung¹, F. Priem², Sabjane Becker¹, Silke Klotzek¹, W. Henke¹

Abteilung für Experimentelle Organtransplantation, Urologische Klinik¹ und Institut für Pathologische und Klinische Biochemie² der Medizinischen Fakultät (Charité) der Humboldt-Universität, Berlin

Einleitung

Die N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG; 2-Acetamido-deoxy- β -glucoside acetamidodeoxyglucohydrolase, EC 3.2.1.30) hat sich in der quantitativen Harnanalytik als eine Kenngröße erwiesen, die geeignet ist, die konventionelle Nierendiagnostik zu verbessern (1). Die klassische kolorimetrische Methode der NAG-Aktivitätsbestimmung verwendet das Substrat 4-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid (PNP-Methode) und setzt für eine zuverlässige Messung die Entfernung störender Enzyminhibitoren des Harns durch Gelfiltration oder Dialyse voraus (2). In der Zwischenzeit sind Substrate für die NAG synthetisiert worden, die wegen ihrer geringen K_m -Werte, der guten Löslichkeit und des hohen molaren Absorptionskoeffizienten des Aglykonrestes eine Bestimmung auch ohne aufwendige Probenvorbereitung ermöglichen (3-5). Diese Verfahren, mit Ausnahme der kürzlich von Makise et al. (5) beschriebenen Methode, beruhen auf einer diskontinuierlichen Messung und können damit nicht auf modernen Analysengeräten adaptiert werden. Seit kurzem wird von Boehringer-Mannheim GmbH eine Testkombination angeboten, die auf der Basis einer kontinuierlichen Messung eine Aktivitätsbestimmung direkt im Nativharn erlaubt (6, 7). Da bisher nur wenige Daten über den Einsatz dieses Testes vorliegen, haben wir die Methode

1. mit bisher empfohlenen diskontinuierlichen Verfahren, die gleichfalls auf eine Probenvorbereitung verzichten, verglichen und
2. den Einfluß von Harnbestandteilen, insbesondere von Harnstoff, als mögliche Störgrößen auf die NAG-Bestimmung in verschiedenen Spezies (Mensch, Affe, Hund, Ratte) untersucht.

Methodik und Material

Material

Für die NAG-Bestimmungen beim Menschen wurde 2. Morgenharn nach Zentrifugation und bei den entsprechenden Untersuchungen nach Gelfiltration über Sephadex G50 (8) eingesetzt. Die Harnproben von Affe,

Hund und Ratte wurden von gesunden Tieren gewonnen, gelfiltriert, über Ultrafiltration eingeeignet und zur Ermittlung des Harnstoffeinflusses auf die NAG-Aktivität mit Harnstoff versetzt, so daß Konzentrationen von 0 bis 1000 mmol/l in der Probe vorlagen.

Testmethode: CPR-Methode (6, 7)

Zugrunde liegt die von Boehringer Mannheim GmbH eingeführte Testkombination („Farbtest zur Bestimmung von N-Acetyl- β -D-glucosaminidase im Urin“). Als Substrat dient das 3,3'-Dichlorphenylsulfonphthaleinyl-Derivat des N-Acetyl- β -D-glucosaminids. Durch die NAG-Aktivität wird der Farbstoff Chlorphenolrot (deshalb CPR-Methode) freigesetzt und bei 575 nm gemessen. Als pH-Wert im Reaktionsansatz wurde pH 6,25 gewählt. Damit wird zwischen dem pH-Optimum der NAG (pH 5,20) und der pH-Abhängigkeit der Absorption des Aglykonrestes ein praktikabler Kompromiß erzielt, der eine genügend empfindliche kontinuierliche Messung des freigesetzten Farbstoffes in der Reaktionslösung ermöglicht. Die Bestimmungen wurden am Hitachi 717 bei 575 nm (2 min Meßzeit; 37°C) mit 15 μ l als Probe- und 300 μ l als Reagensvolumen vorgenommen. Die Kalibrierung erfolgte der Vorschrift entsprechend mit einem NAG-Standard auf der Basis des molaren Absorptionskoeffizienten von Chlorphenolrot.

Vergleichsmethoden

a) MCP-Methode (3): Diese Methode wurde von Noto et al. (3) eingeführt und verwendet das Substrat m-Cresolsulfonphthaleinyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid (deshalb MCP-Methode). Kommerziell wird der Test von Boehringer Mannheim vertrieben. Die Bestimmungen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers bei 37°C durchgeführt.

b) MNP-Methode (4): Diese Methode benutzt das Substrat 2-Methoxy-4-(2-nitrovinyl)phenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid (4). Der Test wird kommerziell von Thames Generalink Ltd., Guildford (U.K.) vertrieben. Entsprechend den vorliegenden Angaben haben wir die Reagenslösungen selbst zubereitet, die Bestimmungen mit 20 μ l Probe und 300 μ l Substratlösung (30 min Inkubation; 37°C) ausgeführt und die Aktivitäten mit Hilfe des molaren Absorp-

Tab. 1: Präzisionsdaten der angewendeten NAG-Bestimmungsmethoden. Für die intraserielle Präzisionskontrolle wurde Sammelharn von Nierentransplantierten, für die Tag-zu-Tag-Überprüfung lyophilisiertes Kontrollmaterial von Boehringer Mannheim GmbH verwendet.

Impräzision	Methode			
	CPR	MCP	MNP	PNP
Intraseriell (n = 20)				
x, U/l	4,99	7,11	5,80	19,0
s, U/l	0,08	0,24	0,23	0,67
s %	1,60	3,38	3,97	3,53
Tag-zu-Tag (n = 20)				
x, U/l	4,76	—	—	13,9
s, U/l	0,15	—	—	0,59
s %	3,20	—	—	4,24

tionskoeffizienten bei 505 nm errechnet. Als Stopplösung wurde anstelle des in der Vorschrift empfohlenen Karbonatpuffers 1 mol/l TRIS/HCl-Puffer (pH 10.0) verwendet, da dadurch eine längere Stabilität des Farbstoffs erreicht wird.

c) PNP-Methode (9, 10): Diese Methode verwendet das Substrat 4-Nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminid in einer Endkonzentration von 8 mmol/l. Die kompetitive Hemmung der NAG-Aktivität durch im Harn vorhandene Inhibitoren wird durch die hohe Substratkonzentration und das geringe Probenvolumen (20 µl Harn und 200 µl Reagens; 30 min Inkubation bei 37°C) vermieden (9). Die Gelfiltration der Harnproben ist damit im Gegensatz zu PNP-Methoden, die geringere Substratkonzentrationen vorsehen (2), nicht erforderlich.

Statistische Berechnungen

Die Methodenvergleiche wurden mit dem Regressionsverfahren nach Passing und Bablok (11) ausgewertet. Die Signifikanz von Mittelwertsunterschieden wurde durch den t-Test nach Student für gepaarte Daten überprüft.

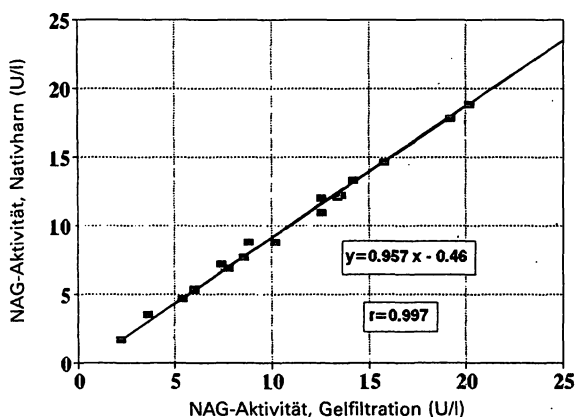


Abb. 1: Vergleichende Bestimmung der NAG-Aktivität mit der CPR-Methode in nativen und gelfiltrierten Harnproben (n = 20).

Ergebnisse

Impräzision

In Tabelle 1 sind Präzisionsdaten für die eingesetzten Methoden aufgeführt. Daraus wird ersichtlich, daß der neue kinetische Test hohen analytischen Anforderungen gerecht wird.

Interferenz

Ein Vergleich der Bestimmungen an menschlichen Nativharnproben und entsprechend gelfiltrierten Aliquots mit der CPR-Methode ist in Abbildung 1 dargestellt. Die im Nativharn gemessenen Aktivitäten sind signifikant niedriger (t-Test; $p < 0,05$), wobei der Unterschied jedoch nur ca. 5% beträgt. Als wesentlicher Inhibitor der NAG-Aktivität wird Harnstoff angesehen (12). Abbildung 2 verdeutlicht, daß bei diesem Test Harnstoff erst oberhalb der schon relativ hohen Konzentrationen von 250 mmol/l geringfügig die NAG-Aktivität hemmt. Dies gilt sowohl für die NAG des Menschen als auch verschiedener Tierspezies. Damit bestehen für die empfohlene Analytik ohne Probenvorbereitung mit der CPR-Methode ähnlich günstige Verhältnisse wie bei der MCP-Methode.

Methodenvergleiche

Der Vergleich zu den anderen Methoden (Abb. 3A-C) zeigt eine zufriedenstellende Korrelation (Korrelationskoeffizienten zwischen 0,953 und 0,977). Die mit der CPR-Methode ermittelten Aktivitäten sind geringer als die mit den drei Vergleichsmethoden erhaltenen Aktivitäten.

Schlußfolgerung

Der von Boehringer Mannheim GmbH neu eingeführte NAG-Test gestattet eine zuverlässige Aktivitätsbestimmung dieses Enzyms nach dem kontinuierlichen Meßprinzip im Nativharn des Menschen und von Tieren. Damit besteht die Möglichkeit, die Analytik in das normale klinisch-chemische Laboratorium aufzunehmen und eine nicht nur auf Speziallaboratorien begrenzte Erweiterung der Nierendiagnostik für Klinik und Forschung anzustreben.

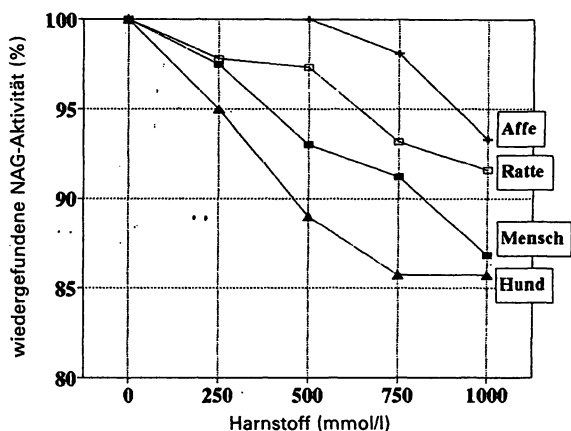


Abb. 2: Einfluß von Harnstoff auf die NAG-Bestimmung mit der CPR-Methode.

Gelfiltrierte Sammelharn von Mensch, Ratte, Hund und Affe wurden mit Harnstoff versetzt (Konzentrationen auf der X-Achse) und dann als Probenmaterial eingesetzt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen; sie geben die prozentualen Veränderungen gegenüber der Aktivitätswerten in den gelfiltrierten Harnproben (100%) wieder.

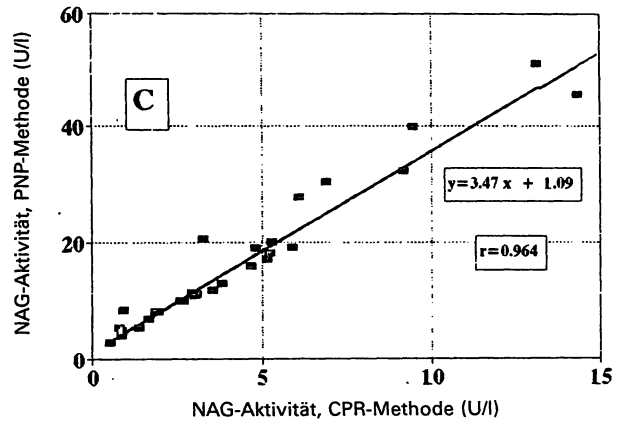
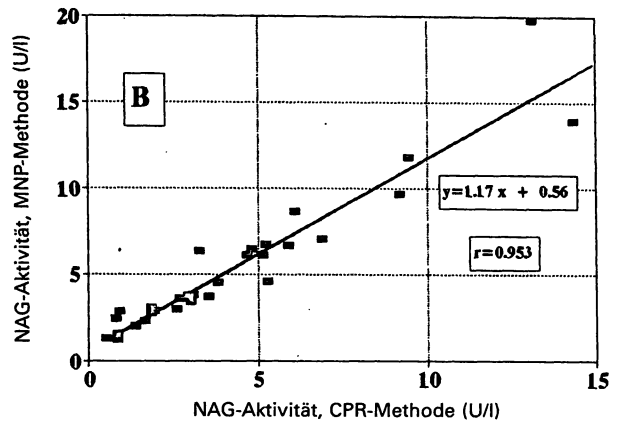
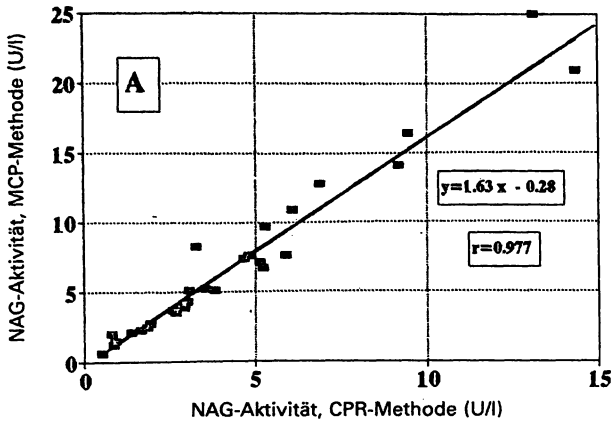


Abb. 3: Vergleichende Bestimmungen zwischen der CPR-Methode und anderen NAG-Bestimmungsmethoden ohne Probenvorbereitung. Untersuchungen an 31 menschlichen Harnproben. Berechnung der Methodenvergleiche nach Passing und Bablok (12).

- a) MCP-Methode, Bestimmung mit dem Substrat *m*-Cresolsulfonphthaleinyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid;
 b) MNP-Methode, Bestimmung mit dem Substrat 2-Methoxy-4-(2-nitrovinyl)phenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid;
 c) PNP-Methode, Bestimmung mit dem Substrat 4-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid.

Schrifttum:

1. PRICE, R. G.: Urinary enzymes, nephrotoxicity and renal disease. *Toxicology* 23, 99-134 (1982).
2. MARUHN, D.: Rapid colorimetric assay of β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase in human urine. *Clin. Chim. Acta* 73, 453-461 (1976).
3. NOTO, A., OGAWA, Y., MORI, S., YOSHIOKA, M., KITAKAZE, T., HORI, T., NAKAMURA, M., MIYAKE, T.: Simple, rapid spectrophotometry of urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase, with use of a new chromogenic substrate. *Clin. Chem.* 29, 1713-1716 (1983).
4. YUEN, C. T., KIND, P. R. N., PRICE, R. G., PRAILL, P. F. G., RICHARDSON, A. C.: Colorimetric assay for N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) in pathological urine using the ω -nitrostyryl substrate: the development of a kit and the comparison of manual procedure with the automated fluorimetric method. *Ann. Clin. Biochem.* 21, 295-300 (1984).
5. MAKISE, J., SAITO, E., OBUCHI, M., KANAYAMA, M., HARAKAWA, K., YOSHIDA, K.: Improved kinetic assay of urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase with 2-chloro-4-nitrophenyl- β -D-glucosaminide as substrate. *Clin. Chem.* 36, 319-326 (1990).
6. KLEIN, G.: Ergebnisse der multizentrischen Erprobung eines neuen Tests zur Messung von β -N-Acetylglucosaminidase im Urin. *Wien. Klin. Wschr.* 103, Suppl. 189, 31-38 (1991).
7. JUNG, K., PRIEM, F., KLEIN, G.: Eine neue kinetische Methode zur Bestimmung der Aktivität der N-Acetyl- β -D-glucosaminidase im Harn. *Wien. Klin. Wschr.* 103, Suppl. 189, 39-44 (1991).
8. WERNER, M., MARUHN, D., ATOBA, M.: Use of gel filtration in the assay of urinary enzymes. *J. Chromatogr.* 40, 254-263 (1969).
9. JUNG, K., NESENER, E.: Bestimmung der N-Acetyl- β -D-glucosaminidase-Aktivität im Urin mit einem kolorimetrischen und fluorimetrischen Test. *Z. Med. Labor-Diagn.* 29, 254-262 (1988).
10. JUNG, K., KLOTZEK, S.: More about determination of N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in urine without pretreatment of samples. *Clin. Chem.* 34, 1002 (1988).
11. PASSING, H., BABLOK, W.: A new biometrical procedure for testing the equality of measurement from two analytical methods. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21, 709-720 (1988).
12. BONDIOU, M.-T., BOURBOUZE, R., BERNARD, M., PERCHERON, F., PEREZ-GONZALEZ, N., CABEZAS, J.-A.: Inhibition of A and B N-acetyl- β -D-glucosaminidase urinary isoenzymes by urea. *Clin. Chim. Acta* 149, 67-73 (1985).

Anschrift der Verfasser:

Doz. Dr. sc. Klaus Jung
 Sabine Becker
 Silke Klotzek
 Dr. rer. nat. Wolfgang Henke
 Abteilung für experimentelle Organtransplantation
 Urologische Klinik der Medizinischen Fakultät (Charité)
 der Humboldt-Universität Berlin
 Leninallee 49
 O-1017 Berlin

Dipl.-Chem. Friedrich Priem
 Institut für Pathologische und Klinische Biochemie
 Medizinische Fakultät (Charité) der Humboldt-Universität Berlin
 Schumannstraße 20/21
 O-1040 Berlin