

Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie

8. Jahrgang

Januar 1970

Heft 1 (S. 1—104)

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 1—8, Januar 1970

γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität im Urin¹⁾

Von G. SZASZ

Aus dem Institut für Klinische Chemie an den Universitätskliniken Gießen (Direktor: Prof. Dr. L. Róka)

(Eingegangen am 26. September 1969)

Es wird eine direkte kinetische Methode zur Bestimmung der γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität im Urin mit *L*- γ -Glutamyl-*p*-nitroanilid als Substrat beschrieben. Die optimalen Reaktionsbedingungen wurden ermittelt und mit denen für das Serumenzym verglichen. Die Unterschiede waren verschwindend gering.

Der Urin enthält hitzestabile und dialysierbare Inhibitoren. Im zellhaltigen Rückstand wurde zwar nach Zentrifugieren eine deutlich höhere Aktivität gefunden, jedoch blieb diejenige des Überstandes auch nach 24 Stdn. Lagerung bei Raumtemperatur, zusammen mit den zellulären Elementen, unverändert.

Die Aktivität (mU/ml) bei Gesunden war im Urin 2—4fach höher als im Serum. Die Normalwerte wurden bei 25° für 8-Stdn.-Nachturin ermittelt. Männer scheiden etwa 50% mehr aus als Frauen. Während der Nacht wurde eine höhere Ausscheidung beobachtet als tagsüber, die intraindividuelle Schwankung von Tag zu Tag hingegen gering.

Zwischen Transpeptidase-Ausscheidung einerseits und Harnmenge, Kreatinin-, Harnstoff-, Leucinaminopeptidase- und alkalischer Phosphatase-Ausscheidung andererseits wurde eine signifikante Korrelation festgestellt.

Gegen eine Filtration des Enzyms durch die Niere sprechen die Untersuchungen bei Urämie und bei hoher Aktivität im Serum. Am ehesten muß als Quelle des Urinenzyms die Niere angenommen werden.

γ -Glutamyl transpeptidase activity in urine¹⁾

A direct kinetic method is described for the determination of γ -glutamyl transpeptidase activity in urine with *L*- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide as substrate. The optimal reaction conditions are reported and compared with those for the serum enzyme. There is hardly any difference. The urine contains heat-stable, dialysable inhibitors. A markedly higher enzymic activity was found in the cell-containing sediment after centrifugation. The activity of the supernatant, however, remained unchanged when the urine was stored for 24 hours at room temperature, prior to centrifugation.

The activity (mU/ml) in healthy individuals was 2—4-fold higher in the urine than in the serum. The normal values at 25° are reported for an 8 hour night urine sample. Men excrete about 50% more than women. The excretion was higher in the night than in the day, while the variations from day to day for any individual were small.

A significant correlation was found between transpeptidase excretion on the one hand and urine volume and the excretion of creatine, urea, leucine aminopeptidase and alkaline phosphatase on the other hand.

Studies on uraemia and high serum enzyme activities indicate that the kidney itself is the earliest possible source of the urinary enzyme.

Die diagnostische Bedeutung der Bestimmung der γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität im Serum ist weitgehend bekannt (1—8); ihre Bestimmung im Urin hat dagegen bisher keine Verwendung gefunden (9). Dabei hat die γ -Glutamyltranspeptidase alle Eigenschaften, die zu einem erfolgreichen Einsatz in der Urin-Enzymdiagnostik Voraussetzung sind. Sie gehört zu den wenigen Enzymen, die im Urin Gesunder eine höhere Aktivität aufweisen als im Serum (10). Außerdem zeigt von den menschlichen Organen die Niere die weitaus höchste γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität. Sie ist hier vor allem im Bürstensaum der proximalen Tubuli und in den Henle-Schleifen lokalisiert (11—13).

In dieser Arbeit werden die methodischen Grundlagen zur Bestimmung der γ -Glutamyltranspeptidase im

Urin beschrieben. Als Substrat verwendeten wir *L*- γ -Glutamyl-*p*-nitroanilid²⁾. Diese 1963 von ORŁOWSKI und MEISTER (14) synthetisierte Substanz ist farblos, ihr Spaltprodukt *p*-Nitroanilin dagegen ist gelb. Damit ist die enzymatische Freisetzung von *p*-Nitroanilin bei 405 nm direkt kinetisch meßbar.

Methodik

Vorbereitung der Urine

Eine Urinprobe von etwa 20 ml wird zentrifugiert (10 Min. bei 3000 U./Min.) und der Überstand in einen Dialysierschlauch (25 mm Durchmesser, Fa. Kalle AG., Wiesbaden-Biebrich) überführt. Die Dialyse erfolgt 120 Min. gegen fließendes Leitungswasser und anschließend 60 Min. gegen demineralisiertes Wasser.

Die Verdünnung des Urins durch die Dialyse wurde durch Zusatz von Dextranblau (mittleres Molekulargewicht: 200000) zur

²⁾ Diese Substanz wurde von Boehringer Mannheim GmbH synthetisiert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

¹⁾ Der Inhalt dieser Arbeit wurde auszugsweise am VII. Internationalen Kongreß für Klinische Chemie in Genf (8.—13. 9. 1969) vorgetragen.

Urinprobe berücksichtigt: wir bestimmten die Extinktion vor und nach der Dialyse und ermittelten den Verdünnungsfaktor (F) aus der Extinktionsdifferenz:

$$F = \frac{\text{Extinktion vor der Dialyse}}{\text{Extinktion nach der Dialyse}}$$

Der Faktor bewegt sich zwischen 1,00 und 1,23 und ergab bei 30 Urinen einen Mittelwert von $1,12 \pm 0,07$. Wie Vergleiche mit und ohne Dextranblau zeigten, wird die Aktivität durch den Farbstoff nicht beeinflusst.

Aktivitätsbestimmung

Wie Vorversuche zeigten, konnte die für Serum vor einiger Zeit beschriebene γ -Glutamyltranspeptidase-Methode auch für Urin ohne jegliche Modifikation verwendet werden (15). Die für Bestimmungen im Serum verwendeten Leucinaminopeptidase³⁾- (16) und alkalische Phosphatase⁴⁾-Methoden (17) mußten dagegen wegen der erheblich geringeren Aktivität im Urin abgeändert werden. Die Ansätze und die wichtigsten methodischen Angaben sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tab. 1
Methodische Angaben für die Aktivitätsbestimmung von γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT), sogenannter Leucinaminopeptidase (LAP) und alkalischer Phosphatase (APh) im Urin

	γ -GT	LAP	APh
Urin (μ l)	50	100	100
Puffer-Substrat (μ l)	500*	500**	500***
Wellenlänge (nm)	405	405	405
Temperatur ($^{\circ}$ C)	25	25	25
Spreizung ($\Delta E = 1,0$ in cm)	40	40	20
Papiertransport (cm/Min.)	2	1	2
Faktor (mU/ml bei $\alpha = 45^{\circ}$)	55,6	15,2	32,4

* L- γ -Glutamyl-p-nitroanilid, 4,4 mM; Glycylglycin, 22 mM; $MgCl_2$, 11 mM in Ammediol-HCl-Puffer, 50 mM, pH 8,2 (15).
** L-Leucyl-p-nitroanilid, 1,6 mM in Tris-HCl-Puffer, 50 mM, pH 7,2 (16).
*** p-Nitrophenylphosphat, 15 mM; $MgCl_2$, 0,5 mM in Diäthanolamin-HCl-Puffer, 1,0M, pH 9,8 (17).

Die Bestimmungen erfolgten kinetisch in einem Eppendorf-Photometer mit Küvettenwechsellautomatik und Registrier-einrichtung bei 25° und die Aktivitäten ermittelten wir graphisch aus dem sogenannten Enzymwinkel (18). Sie wurden mit dem Verdünnungsfaktor (F) multipliziert und in mU/ml (19) oder unter Berücksichtigung des ausgeschiedenen Urinvolumens in mU/8 Stdn. bzw. mU/24 Stdn. angegeben.

Präzision der Methoden

Aus einem dialysierten Urin führten 3 medizinisch-technische Assistentinnen mit der Probe-Reagenz-Dosiereinheit und mit Marburg-Pipetten der Fa. Netheler-Hinz je 11 Bestimmungen durch. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tab. 2
Präzision der Methode
Die Untersuchungen wurden von 3 medizinisch-technischen Assistentinnen (MTA) durchgeführt. Den Mittelwerten liegen je 11 Einzelbestimmungen zugrunde. Die Variationskoeffizienten wurden nach der Formel:

$$V = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 (\%) \text{ errechnet}$$

	Probe-Reagenz-Dosiereinheit			Marburg-Pipetten		
	\bar{x} (mU/ml)	s (mU/ml)	V (%)	\bar{x} (mU/ml)	s (mU/ml)	V (%)
MTA 1	28,2	0,30	1,06	27,9	0,87	3,12
MTA 2	25,9	0,53	2,05	26,8	0,86	3,21
MTA 3	26,9	0,35	1,30	25,9	1,49	5,73

³⁾ Arylamidase (sog. Leucinaminopeptidase).

⁴⁾ EC 3.1.3.1.

Die Präzision in der Serie ist für den Verdünnungsautomaten sehr gut (1–2%) und für die Marburg-Pipetten ausreichend (3–6%).

Spezifität

Auf die Spezifität wurde in l. c. (15) ausführlich eingegangen.

Ergebnisse

Enzymkinetik

pH

Die Abhängigkeit der γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität vom pH wurde bei 3 Urinen in Tris- bzw. Ammediol-HCl-Puffer für den pH-Bereich 7,4–8,4 bzw. 7,8–9,3 untersucht. Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, wurde auch ein Mischserum mitgeführt. Sämtliche Proben zeigten einen ähnlichen Kurvenverlauf mit einem breiten Optimum zwischen 7,8–8,4. Die Aktivität war in beiden Puffern gleich (Abb. 1).

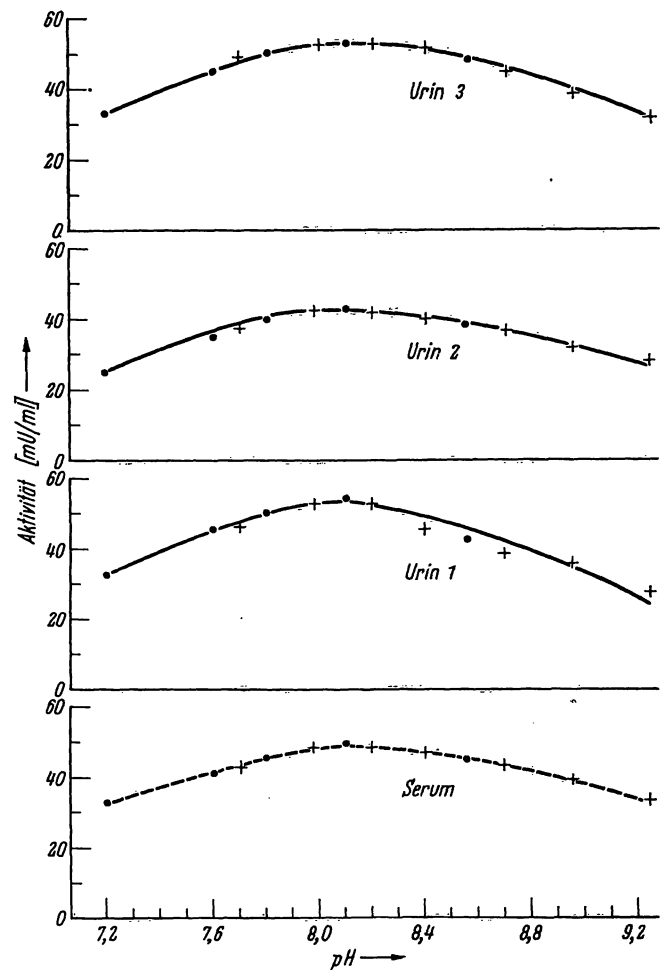


Abb. 1
Die Abhängigkeit der γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität vom pH und verschiedenen Puffern
• Tris- + Ammediol-HCl (jeweils 0,05M)

Die Eigenhydrolyse des Substrates ist ebenso pH-abhängig: in Ammediol-Puffer betrug sie bei pH 8,0 1–2 mU/ml und steigerte sich bis zu 3–4 mU/ml bei pH 9,2.

Substratkonzentration

Die Aktivität nimmt bis zu einer γ -Glutamyl-p-nitroanilid-Konzentration von 4,0 mM sowohl beim Urin- als

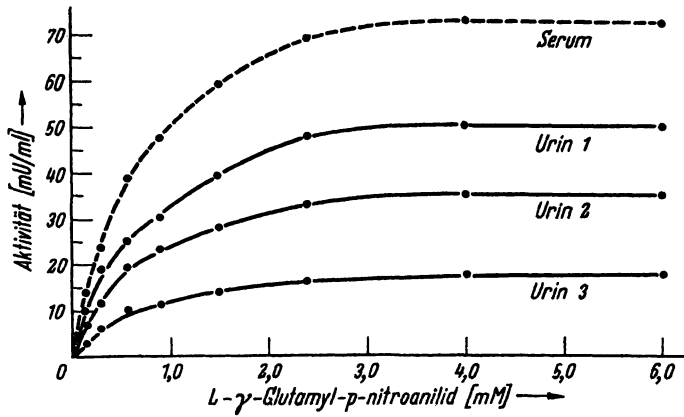


Abb. 2

Die Abhängigkeit der γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität von der L- γ -Glutamyl-p-nitroanilid-Konzentration bei gleichbleibender Glycylglycin-Konzentration (20 mM)

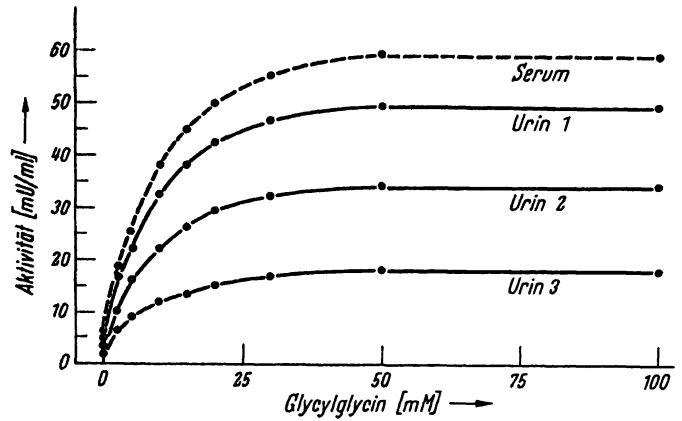


Abb. 4

Die Abhängigkeit der γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität von der Glycylglycin-Konzentration bei gleichbleibender L- γ -Glutamyl-p-nitroanilid-Konzentration (4 mM)

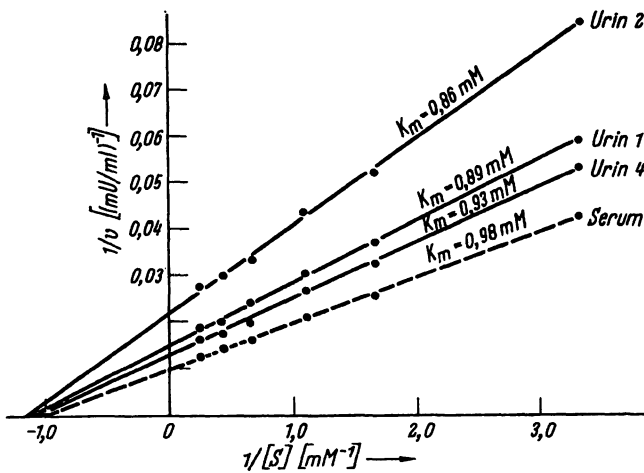


Abb. 3

Graphische Ermittlung der Michaelis-Konstante der γ -Glutamyltranspeptidase aus Humanurin und Humanserum für L- γ -Glutamyl-p-nitroanilid. Auftragung nach LINEWEAVER-BURK

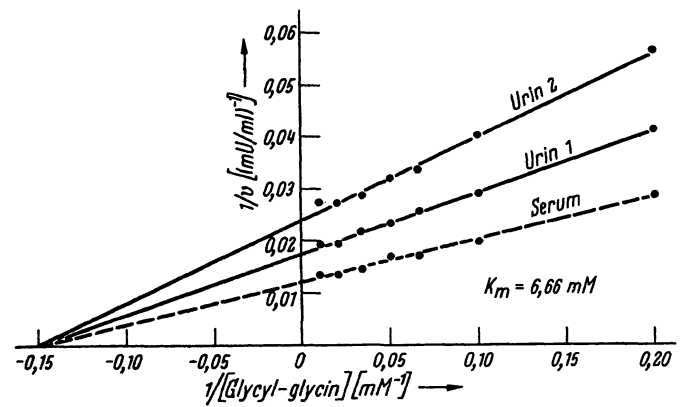


Abb. 5

Graphische Ermittlung der Michaelis-Konstante der γ -Glutamyltranspeptidase aus Humanurin und Humanserum für Glycylglycin. Auftragung nach LINEWEAVER-BURK

auch beim Serumenzym zu. Darüberhinaus fanden wir keine weitere Aktivitätszunahme (Abb. 2).

Die Michaelis-Konstante wurde nach LINEWEAVER-BURK graphisch ermittelt (Abb. 3). Sie zeigte eine geringe Streuung für die 3 Urine mit einem durchschnittlichen K_m -Wert von 0,89 mM (0,86–0,93 mM). Dieser Wert wich geringfügig von der Michaelis-Konstanten der γ -Glutamyltranspeptidase aus Serum ab ($K_m = 0,98$ mM), wobei letztere eine gute Übereinstimmung mit dem früher ermittelten Wert ($K_m = 0,96$ mM) zeigte (15).

Glycylglycin-Konzentration

Die Abhängigkeit der γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität von der Glycylglycin-Konzentration als Acceptor des freigesetzten Glutamylrestes ist in Abbildung 4 dargestellt. Sowohl das Serum- als auch das Urinenzym ist erst bei einer Konzentration von 50,0 mM gesättigt. Da es jedoch bereits bei einer Glycylglycin-Konzentration von 30,0 mM spätestens am nächsten Tag zu einer Ausflockung kommt, verwenden wir routinemäßig eine Konzentration von 20,0 mM.

Die Michaelis-Konstante der γ -Glutamyltranspeptidase aus Humanurin zu Glycylglycin, ermittelt nach

LINEWEAVER-BURK, ergab: $K_m = 6,66$ mM (Abb. 5) und ist mit dem K_m -Wert, der früher für Humanserum gefunden wurde (15), identisch.

Einfluß von $MgCl_2$

6 Urine von gesunden Personen wurden 2 Stdn. lang gegen demineralisiertes Wasser dialysiert. Die Dialyse wurde 24 Stdn. lang gegen eine EDTA-Lösung (10 mM in Ammediol-Puffer 0,05M, pH 8,2) fortgesetzt. Anschließend erfolgte eine 4stdg. Dialyse gegen Ammediol-Puffer und diese wurde nach Erneuerung des Puffers weitere 12 Stdn. lang fortgesetzt.

Die so vorbehandelten Urinproben wurden auf ihren γ -Glutamyltranspeptidase-Gehalt untersucht. Die Bestimmungen wurden mit und ohne Mg^{++} -Zusatz (10 mM) durchgeführt. Die Mittelwerte von jeweils 6fach-Bestimmungen lassen eine geringe Aktivitätssteigerung durch Mg^{++} erkennen, die im Durchschnitt 7% beträgt (Tab. 3).

Frühere, weniger groß angelegte Untersuchungen, erbrachten keine Aktivierung des Serumenzym durch Magnesiumionen (15).

Tab. 3

Einfluß von Mg-Ionen auf die γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität des Urins. Die angegebenen Einheiten sind Mittelwerte von je 6 Einzelbestimmungen

Urin	γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität		Aktivierung (%)
	ohne $MgCl_2$ (mU/ml)	mit $MgCl_2$ (mU/ml)	
1	34,5	37,5	8
2	19,5	20,8	7
3	29,7	31,0	5
4	32,5	35,4	9
5	36,1	38,4	6
6	90,9	98,0	8

Enzymkonzentration

Die Beziehung zwischen Enzymkonzentration (d. h. Urinmenge) und Enzymaktivität ist bereits in 2 Abbildungen dargestellt (Abb. 8 und 9). Sie verläuft bei dialysiertem Urin zwischen 0—120,0 mU/m/ linear.

Inkubationszeit

Bei dialysiertem Harn war zwischen Substratumsatz und Inkubationszeit ebenfalls eine lineare Beziehung nachweisbar. Bei einem Urin mit einer Aktivität von 100 mU/m/ verlief die Reaktion bis zu 10 Min. nullter Ordnung; darüberhinaus kam es zu einer zunehmenden Aktivitätsabnahme.

Temperaturabhängigkeit

Die γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität, gleich ob es sich um Serum- oder Urinenzym handelt, nimmt bei Erhöhung der Inkubationstemperatur bis etwa 45° zu; darüberhinaus ist eine rapide Aktivitätsabnahme feststellbar. Bei 60° ist noch eine geringe Aktivität meßbar, bei 65° kann jedoch keine Aktivität mehr nachgewiesen werden (Abb. 6).

Im Temperaturbereich von 15—30° haben wir eine lineare Beziehung zwischen den Logarithmen der Anfangsaktivität ($\log v_0$) und den Reziproken der absoluten Temperatur ($1/T$) gefunden, über 30° dagegen war eine deutliche Krümmung der Kurve nach unten feststellbar (Abb. 7).

Dementsprechend wurde die Aktivierungsenergie (E) nur für den Bereich 15—25° abgeleitet. Die durchschnittliche Aktivierungsenergie wurde für je 5 Urine und

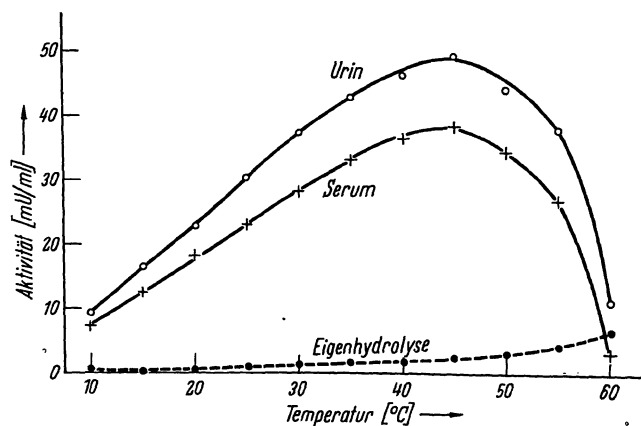


Abb. 6

Die Abhängigkeit der γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität und der Eigenhydrolyse des Substrates von der Inkubationstemperatur

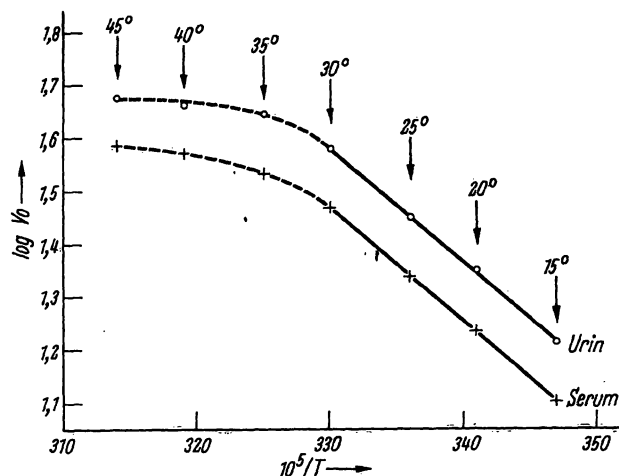


Abb. 7

Die Abhängigkeit der γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität von der Inkubationstemperatur. Aufgetragen nach ARRHENIUS
Ordinate: \log der Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion v_0 (mU/m/).
Abszisse: reziproke Inkubationstemperatur in Grad Kelvin

Tab. 4

Aktivierungsenergien und Temperaturkoeffizienten der γ -Glutamyltranspeptidase aus Urin und Serum. Die Angaben sind Mittelwerte (\bar{x}) und Streuungen (s) von jeweils 5 Proben

	Aktivierungsenergie (cal.)		Temperaturkoeffizient	
	15—20°	15—25°	15—25°	25—35°
Urin	\bar{x} 11280 s 1900	10870 580	1,91 0,09	1,44 0,05
Serum	\bar{x} 10810 s 850	10400 390	1,84 0,04	1,45 0,06

Seren nach der ARRHENIUSschen Gleichung errechnet (Tab. 4). Die E-Werte für Serum sind nur unwesentlich niedriger als für Urin. Vergleiche zwischen den Bereichen 15—20° und 15—25° zeigten bereits eine geringfügige Abnahme der E-Werte für beide Körperflüssigkeiten im höheren Temperaturbereich.

Für den Temperaturkoeffizienten wurden ebenfalls Durchschnittswerte von jeweils 5 Proben ermittelt (Tab. 4). Die Q_{10} -Werte sind zwischen 25—35° wesentlich geringer als zwischen 15—25°. Die Unterschiede zwischen Serum- und Urinenzym sind im niedrigen Bereich nur unwesentlich und im höheren Bereich sogar verschwindend gering.

Stabilität der γ -Glutamyltranspeptidase

Die Stabilität der γ -Glutamyltranspeptidase bei +4° wurde bei 7 gesunden Personen (Urinstatus ohne pathologischen Befund, pH 5,0—7,0) untersucht, bei 4 wurden die Untersuchungen wiederholt. Bei 3 Personen wurde innerhalb von 8 Tagen sowohl im dialysierten als auch im nicht dialysierten Urin ein Aktivitätsverlust von höchstens 5% gemessen. Bei den restlichen 4 Personen kam es bereits nach 3 Tagen zu einer Abnahme der γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität von 44% (14%), 34% (19%), 24% (0%) und 15% (0%). Diese Ergebnisse sind aufgrund von Doppelbestimmungen ermittelt worden. Die Zahlen in den Klammern geben den Aktivitätsverlust im dialysierten Harn an. Bei 2 von ihnen

var ein paar Tage später bei der Wiederholung des Versuches kein Aktivitätsverlust nachweisbar.

Demnach sollten die γ -Glutamyltranspeptidase-Bestimmungen im Urin möglichst am selben Tag durchgeführt werden. Falls das nicht möglich ist, empfiehlt es sich, mindestens die Urinproben zu dialysieren und diese dialysierte Harnprobe aufzuheben, wobei die Dialylen Aktivitätsverlust lediglich verringern, nicht aber verhindern kann.

Einfluß von Urinbestandteilen auf die γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität im Urin

Inhibitoren

Im Morgenurin von 12 Personen (Laboratoriumspersonal mit unauffälligem Urinstatus; 7 Frauen, 5 Männer) wurde vor und nach der Dialyse die γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität bestimmt. Diese Untersuchung wurde bei 6 davon an einem anderen Tag wiederholt (Tab. 5). Eine Aktivitätszunahme nach der Dialyse konnte beim Routineansatz (50 μ l Urin) nur bei 5 der 12 Probanden festgestellt werden. Die Erhöhung der Urinmenge im Ansatz auf 100 μ l führte jedoch bei sämtlichen Personen zu einer mehr oder weniger deutlichen Aktivitätszunahme. Demnach muß im Urin mit dialysierbaren Inhibitoren prinzipiell gerechnet werden.

Die Hemmung im Nativharn zeigt eine große inter- und intraindividuelle (von Tag zu Tag) Schwankung. Sie war bei Männern ausgeprägter als bei Frauen und betrug maximal 70% (Tab. 5).

Die Beziehung zwischen Enzymaktivität und Urinmenge verläuft im dialysierten Harn im weiten Bereich linear. Im Nativharn mit Hemmwirkung wird die Aktivitäts-

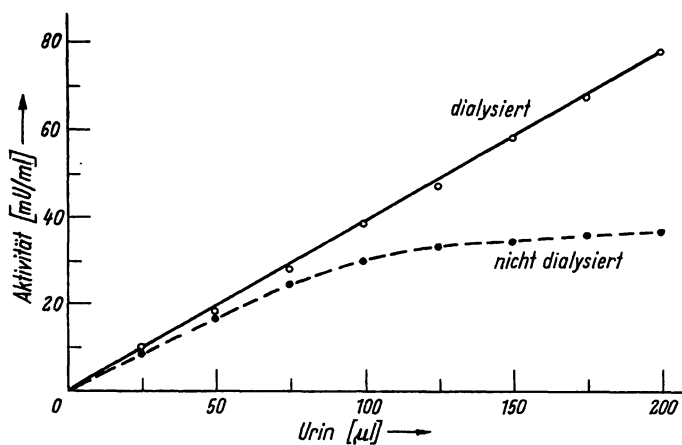


Abb. 8

Die Abhängigkeit der γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität von der Urinmenge im Ansatz

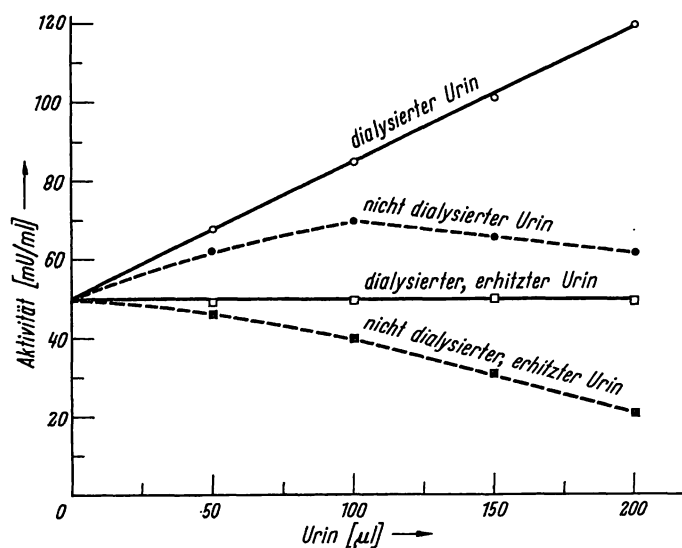


Abb. 9

Die Hemmung der γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität durch nicht dialysierten Urin. Zu 10 μ l Serum wurde dialysierter und nicht dialysierter Urin, jeweils erhitzt und nicht erhitzt, zugefügt

Tab. 5

Die γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität im Urin bei 12 gesunden Personen vor und nach Dialyse

Nr.	Proband	Urinmenge im Ansatz (μ l)	Aktivität im Urin (mU/ml)		Hemmung (%)
			vor Dialyse	nach Dialyse	
1	♀ 33 J.	100	90,4	100,0	10
		100	158,0	199,0	21
2	♀ 21 J.	100	29,8	32,6	9
		100	34,0	36,0	6
3	♀ 19 J.	50	74,5	89,0	16
		100	60,0	160,0	62
		100	91,5	99,0	8
4	♀ 34 J.	100	49,6	49,4	0
		100	77,5	88,8	13
5	♀ 20 J.	100	99,5	146,0	32
		100	72,0	88,6	19
6	♀ 21 J.	20	16,6	18,3	9
		50	36,0	44,5	19
		100	35,6	83,0	57
7	♀ 20 J.	20	16,6	18,3	9
		50	36,0	44,5	19
		100	35,6	83,0	57
		20	10,9	27,5	63
		50	24,0	66,8	64
		100	39,7	134,0	70
8	♂ 42 J.	100	52,4	61,0	16
		50	41,0	50,2	18
		100	47,0	98,0	52
		20	18,1	22,8	21
		50	42,6	57,4	26
9	♂ 35 J.	100	52,8	94,0	44
		100	113,0	138,0	18
		100	103,0	165,0	38
10	♂ 19 J.	50	41,9	43,4	4
		100	46,7	75,0	38

zunahme mit der Erhöhung der Urinmenge im Ansatz immer geringer (Abb. 8).

Der Inhibitor (oder die Inhibitoren) sind hitzebeständig. Urine, vor und nach der Dialyse, wurden 10 Min. lang in ein siedendes Wasserbad gestellt. Anschließend wurde zu 10 μ l Serum mit hoher γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität (etwa 250 mU/ml) steigende Mengen Urin (50, 100, 150 und 200 μ l) zugesetzt, und zwar dialysierter und undialysierter Urin, jeweils erhitzt und nicht erhitzt (Abb. 9). Undialysierter Urin, sowohl erhitzt als nicht erhitzt, hemmt die γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität des Serums; dialysierter, erhitzter dagegen verändert sie nicht.

Untersuchungen zur näheren Charakterisierung des Hemmstoffes sind im Gange; es wird darüber an anderer Stelle ausführlich berichtet werden.

Sediment

Je Patient wurden 2 Röhrchen mit jeweils 10 ml Urin 10 Min. bei 4000 U./Min. zentrifugiert. Aus dem einen wurde der Überstand bis auf 0,5 ml mit der Pipette vor-

sichtig abgehoben. Im verbleibenden Rückstand wurde eine γ -Glutamyltranspeptidase- und eine Sediment-Bestimmung durchgeführt. Gleichzeitig bestimmten wir im Überstand des zweiten Röhrchens die γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität. Dieses Röhrchen wurde anschließend aufgeschüttelt und 24 Std. bei Raumtemperatur (25–30°) aufbewahrt. Nach erneuter Zentrifugation wurde im Überstand eine zweite γ -Glutamyltranspeptidase-Bestimmung durchgeführt. Anschließend wurde der Überstand bis auf 0,5 ml, wie beim ersten Röhrchen, entfernt und die γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität auch im Rückstand gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tab. 6

γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität im Überstand und im Rückstand von zentrifugierten Urinen, sofort gemessen und nach 24 Std. Lagerung bei Raumtemperatur

Patient	pH	Sediment			γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität (mU/ml)			
		Erythrocyten	Leuko-cyten	Platten-u. Rundepithelien	Überstand Tag 1	Überstand Tag 2	Rückstand Tag 1	Rückstand Tag 2
1	5,5	0–1	0–3		25,2	27,2	56,6	68,7
2	6,0		0–1		29,4	30,8	45,0	55,6
3	6,0	0–2	10–15	0–2	35,5	36,1	111,0	153,0
4	5,5	0–5	10–15	5–10	6,8	8,8	24,0	32,1
5	5,5		0–5	0–5	32,3	32,1	71,2	73,7
6	6,5	0–5	50	0–5	28,4	25,2	71,2	114,0

Demnach ist die γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität im Rückstand 2–4fach größer als im Überstand. Die γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität im Überstand nimmt trotzdem nicht, oder nur geringfügig zu, auch wenn er 24 Std. bei Raumtemperatur mit dem Sediment zusammen steht.

Erythrocyten

Humanerythrocyten wurden 4mal mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen und zu einem dialysierten Normalurin in steigenden Mengen zugesetzt. Das Verhältnis Erythrocytensuspension zu Urin betrug von 1:1000 bis 1:25. γ -Glutamyltranspeptidase-Bestimmungen wurden sofort und nach 24 Std. jeweils im zentrifugierten Überstand durchgeführt. Die Proben wurden nach der Bestimmung wieder aufgeschüttelt und bei Raumtemperatur (25–30°) aufbewahrt. Die Erythrocytenzahl bestimmten wir in einem Doppelansatz gleich nach Zusetzen der Zellen, ebenso im zweiten Röhrchen nach 24 Std. (Tab. 7).

Tab. 7

Die γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität im Urin mit Zusatz von Erythrocyten

Erythrocyten · 10 ⁶ in 10 ml Urin		γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität im Überstand (mU/ml)	
Tag 1	Tag 2	Tag 1	Tag 2
4,70	4,82	45,0	46,7
10,20	9,22	45,0	45,0
18,50	17,40	45,0	46,4
36,70	36,00	45,0	45,0
44,00	42,20	46,7	46,4
50,50	50,10	46,7	46,7

Die γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität war weder von der zugesetzten Menge an Erythrocyten abhängig noch hat sie sich in 24 Std. verändert.

Leukocyten

Zu einem dialysierten Normalurin wurden Humanleukocyten (20) zugesetzt. Dieses Konzentrat wurde mit demselben Urin weiterverdünnt. Die Leukocyten wurden im gut aufgeschüttelten Urin in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gezählt. Die 11 Urinproben wurden bei Raumtemperatur (25–30°) 24 Std. gelagert. Anschließend erfolgte in den aufgeschüttelten Urinproben eine zweite Zellzählung. Danach wurden die Proben hochtourig (16 000 U./Min.) 2 Min. zentrifugiert und im Überstand die γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität gemessen (Tab. 8).

Tab. 8

Die γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität im zentrifugierten Überstand eines Urins, 24 Std. nach Zugabe von steigenden Mengen an Leukocyten

Leukocyten pro mm ³ Urin	γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität (mU/ml)
0	18,1
42	18,1
97	18,6
163	18,1
380	17,5
860	17,0
1520	17,5
3300	17,5
7200	17,5
15000	18,0
50600	18,6

Die γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität war im zentrifugierten Überstand von der Zellzahl vollkommen unabhängig.

Untersuchungen an Gesunden

Normalwerte

Die normale γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung im 8-Stdn.-Nachturin wurde bei einer Kontrollgruppe, bestehend aus Laboratoriumspersonal, Ärzten und Studenten, ermittelt. Es wurden nur Personen mit unauffälligem Urinstatus berücksichtigt. Die Kontrollgruppe setzte sich aus 21 Frauen im Alter von 17–46 Jahren (Durchschnitt: 25 Jahre) und aus 23 Männern im Alter von 14–40 Jahren (Durchschnitt: 27 Jahre) zusammen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Männer zeigten im Durchschnitt eine fast 50% höhere γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung als Frauen; dieser Unterschied erwies sich als hochsignifikant ($t = 3,70$, $p < 0,001$). Die Normbereiche wurden deshalb

Tab. 9

Normbereich der γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung im 8-Stdn.-Nachturin

	Frauen	Männer
Anzahl der Fälle	21	23
Mittelwert (mU/8 Stdn.)	7470	10900
Normbereich ($\bar{x} \pm 2s$)	2130–12800	3880–17900

für Männer und Frauen getrennt berechnet. Es ergab sich für beide Geschlechter eine weitgehende Normalverteilung, wenn eine diesbezügliche Aussage bei einer so geringen Probandenzahl überhaupt statthaft ist.

Die γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität im Urin schwankte in der Kontrollgruppe zwischen 8,0–53,5 mU/ml mit einem Durchschnitt von 28,0 mU/ml. Man kann also im Urin mit einer 2–4fach höheren Aktivität rechnen als im Serum.

Tagesschwankung

Bei 6 gesunden Personen (3 Frauen und 3 Männer) wurde der Urin von 7–15, 15–23 und 23–7 Uhr gesammelt und die γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung während der einzelnen Perioden bestimmt (Tab. 10). Sie

Tab. 10

Die Tagesschwankung der γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung bei 6 gesunden Personen

		γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung	
		\bar{x}	s
		mU/8 Stdn.	mU/8 Stdn.
Vormittag:	7–15 Uhr	5430	\pm 860
Nachmittag:	15–23 Uhr	6430	\pm 1520
Nacht:	23–7 Uhr	7230	\pm 1290

war im Durchschnitt während der Nacht am größten und vormittags am geringsten. Die Ergebnisse der 3 Perioden wurden miteinander mittels Varianzanalyse nach dem Dreifaktorenplan mit wiederholten Messungen bei einem Faktor (Tageszeiten) (21) verglichen: die F-Probe ergab eine signifikante Abweichung ($F = 10,67$; $p < 0,01$). Der t-Test zeigte lediglich zwischen Vormittags- und Nachtausscheidung einen signifikanten Unterschied ($t = 3,28$; $p < 0,05$).

Eine Umrechnung der γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung vom 8-Stdn.-Nachturin auf 24-Stdn.-Urin sollte demnach statt durch Multiplikation mit 3,00 besser mit 2,64 erfolgen.

Schwankung von Tag zu Tag

Bei 3 Personen wurde die γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung im 8-Stdn.-Nachturin 5 Tage lang hintereinander bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengestellt. Demnach ist die intraindividuelle Schwankung von Tag zu Tag relativ gering.

Tab. 11

Die Schwankung der γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung von Tag zu Tag. Untersucht bei 3 gesunden Personen über 5 Tage

	γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung		
	\bar{x}	s	(%)
	(mU/24 Stdn.)	(mU/24 Stdn.)	
♀ 34 J.	5160	330	6,4
♀ 33 J.	6800	968	14,2
♂ 35 J.	7870	957	12,2

Die Beziehung zwischen γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität und Lebensalter sowie Urinmenge und anderen Urinbestandteilen

Die γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung wurde zum Lebensalter der 44 Probanden der Kontrollgruppe,

zur Urinmenge, zur Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen (Kreatinin und Harnstoff) sowie zu 2 weiteren Enzymen (Leucinaminopeptidase und alkalische Phosphatase) in Beziehung gesetzt. Die Abhängigkeit der einzelnen Parameter zueinander ist mit dem Regressions- und Korrelationskoeffizienten charakterisiert (Tab. 12).

Tab. 12

Die Abhängigkeit der γ -Glutamyltranspeptidase-(γ -GT)-Aktivität von Lebensalter, Diurese und anderen Urinbestandteilen

Y	X	a	b	r	p
γ -GT	Lebensalter	9970	26,50	-0,055	> 0,05
γ -GT	Harnmenge	6040	9,50	0,464	< 0,01
γ -GT	Kreatinin	2080	13,80	0,675	< 0,001
γ -GT	Harnstoff	5020	0,60	0,502	< 0,001
γ -GT	Leucinaminopeptidase	7230	2,14	0,375	< 0,05
γ -GT	alkalische Phosphatase	5520	1,73	0,560	< 0,001

a Schnittpunkt der Regressionsgerade mit der Y-Achse

b Steigung der Regressionsgerade

r Korrelationskoeffizient

p Signifikanz der Korrelationskoeffizienten gegen Null

Eine Altersabhängigkeit der γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung konnte nicht nachgewiesen werden, der Wert des Korrelationskoeffizienten war praktisch Null. Zwischen γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung und Diurese war eine signifikante Korrelation feststellbar. Auch die beiden harnpflichtigen Substanzen zeigten eine hochsignifikante Korrelation zur γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung, wobei der r-Wert für Kreatinin deutlich höher war. Die γ -Glutamyltranspeptidase- und Leucinaminopeptidase-Ausscheidung zeigte eine relativ geringe, jedoch signifikante und die γ -Glutamyltranspeptidase- und alkalische Phosphatase-Ausscheidung eine hochsignifikante Korrelation.

Wechselbeziehung zwischen γ -Glutamyltranspeptidase im Serum und im Urin

Die γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität im Serum bei Patienten mit Urämie

Die γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität im Serum war bei 9 Patienten mit schwerer Urämie (Harnstoff: 290 bis 440 mg/100 ml, Kreatinin: 9,4–22,8 mg/100 ml) normal oder nur gering erhöht.

Die γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung bei hoher Aktivität im Serum

Die γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung im 8-Stdn.-Nachturin wurde bei 6 Patienten mit extrem hoher γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität (über das 10fache der oberen Grenze der Norm) bestimmt. Die γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung blieb bei sämtlichen Fällen im angegebenen Normbereich.

Diskussion

Die Bestimmung der γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität im Urin bereitet keine methodischen Schwierigkeiten. Die Methode erlaubt bei guter Präzision eine Frequenz von 50–60 Proben/Std. Aufwendiger ist die Vorbereitung der Urinproben: sie müssen unbedingt

zentrifugiert und dialysiert werden. Die zellulären Bestandteile des Urins beinhalten eine hohe γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität, die allerdings auch bei längerer Lagerung bei Raumtemperatur nicht in die Urinflüssigkeit übertritt. Diese Fehlermöglichkeit kann damit durch Zentrifugieren beseitigt werden. Außerdem enthält Nativharn wechselnde Mengen an hitzestabilen, niedermolekularen Inhibitoren, die durch Dialyse entfernt werden können.

Die optimalen Reaktionsbedingungen für das Urin- und das Serumenzym weichen voneinander — wenn überhaupt — nur geringfügig ab. Einen Beweis für einen unterschiedlichen Aufbau des Urin- bzw. Serumenzym konnte damit nicht erbracht werden.

Die Normalwerte sind für 8-Stdn.-Nachturin ermittelt worden. Statt 24-Stdn.-Urin hat sich diese Angabe in der letzten Zeit immer mehr verbreitet (22). Männer scheiden im Durchschnitt fast 50% mehr γ -Glutamyltranspeptidase aus als Frauen. Es war eine tageszeitliche Schwankung in der γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung zu verzeichnen: sie nimmt in der Reihenfolge: Vormittag, Nachmittag und Nacht zu. Die Schwankung von Tag zu Tag bei ein und derselben Person war mit 5—15% relativ gering.

Interessante Ergebnisse brachte die Korrelierung der γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung mit anderen Parametern. Sie war vom Alter der Probanden unabhängig. Einschränkend muß erwähnt werden, daß die Kontrollgruppe in dieser Hinsicht nicht repräsentativ war, da sich das Lebensalter der Probanden zwischen 20—40 Jahren bewegte.

Zwischen Enzymurie und Diurese war eine signifikante Korrelation nachweisbar; damit können wir die diesbezüglichen Ergebnisse von JÖSCH und DUBACH (23) bestätigen. Sowohl Kreatinin als auch Harnstoff zeigten

eine hochsignifikante Korrelation zur γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung. Die Korrelation war bei Kreatinin enger, aber auch hier kann von einer direkten Beziehung nicht die Rede sein. Eine Angabe der γ -Glutamyltranspeptidase-Ausscheidung, bezogen auf den Kreatiningehalt, erscheint deshalb sehr fragwürdig. Zwischen γ -Glutamyltranspeptidase- und alkalischer Phosphatase-Ausscheidung ergab sich eine wesentlich engere Korrelation als zwischen γ -Glutamyltranspeptidase und Leucinaminopeptidase.

Zuletzt versuchten wir Anhaltspunkte für die Herkunft der γ -Glutamyltranspeptidase im Urin zu finden. Gelangt sie infolge Filtration durch die Glomerula aus dem Serum in den Urin oder stammt sie aus dem Nierenepithel? Die Aktualität dieser Frage wird dadurch unterstrichen, daß uns keine Angaben über das Molekulargewicht der γ -Glutamyltranspeptidase im Serum bekannt sind.

Falls es sich um eine Filtration handelt, müßte bei der Urämie ein Aktivitätsanstieg im Serum stattfinden bzw. bei hoher Aktivität im Serum und bei intakter Niere müßte es infolge des wesentlich höheren Konzentrationsgradienten zu einer vermehrten Ausscheidung im Urin kommen. Nach unseren Untersuchungen war weder bei Patienten mit schwerer Urämie ein Aktivitätsanstieg im Serum zu verzeichnen, noch schieden Patienten mit extrem hoher γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität im Serum vermehrt das Enzym im Urin aus. Das Serum als Quelle der γ -Glutamyltranspeptidase im Urin scheint demnach unwahrscheinlich zu sein. Eine Ausnahme dürfte das nephrotische Syndrom im Rahmen einer erheblichen Proteinurie bilden (24).

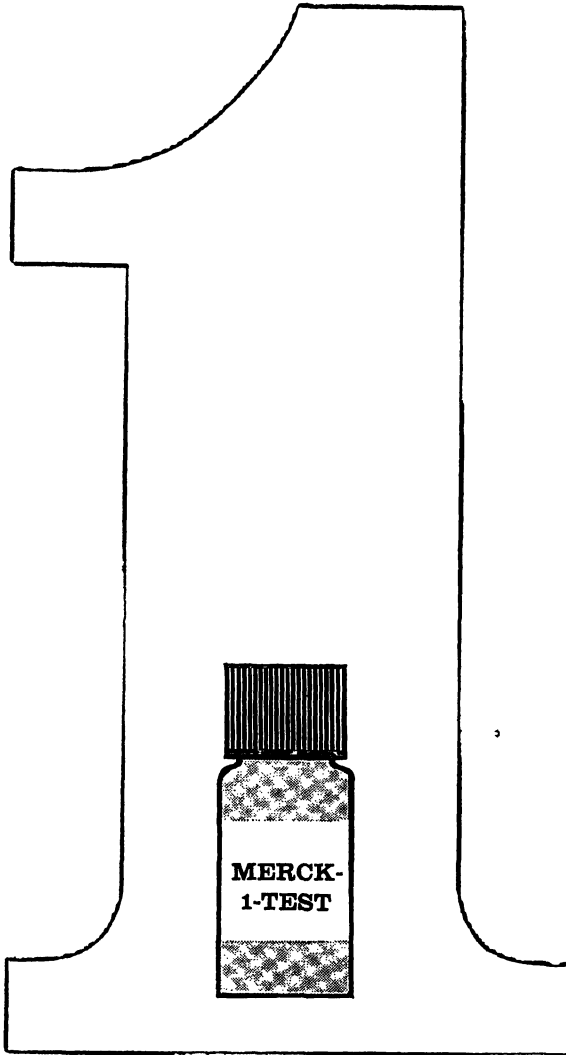
Fr. E. KINNE bin ich für die gewissenhafte technische Mitarbeit und Herrn Dr. D. BECKMANN für die Durchführung der statistischen Berechnungen zu Dank verpflichtet.

Literatur

1. SZCZEKLIK, E., M. ORLOWSKI und A. SZEWCZUK, *Gastroenterology*, Baltimore 41, 353 (1961). — 2. RUTENBURG, A. M., J. A. GOLDBARG und E. P. PINEDA, *Gastroenterology* Baltimore 45, 43 (1963). — 3. KOKOR, F., J. KUSKA und J. MARASZEK, *Z. inn. Med.* 18, 851 (1963). — 4. GIBIŃSKI, K., R. SZATOŃ und J. MARASZEK, *Gastroenterologia*, Basel 99, 237 (1963). — 5. VILLA, L., N. DIUGUARDI, A. AGOSTINI, G. IDEO und R. STABILINI, *Enzymol. biol. clin.* 7, 109 (1966). — 6. LUKASIK, S., R. RICHTERICH und J.-P. COLOMBO, *Schweiz. med. Wschr.* 98, 81 (1968). — 7. SZASZ, G., P. ROSENTHAL und W. FRITZSCHE, *Schweiz. med. Wschr.* 99, 606 (1969). — 8. SZASZ, G., P. ROSENTHAL und W. FRITZSCHE, *Dtsch. med. Wschr.* 94, 1911 (1969). — 9. RAAB, W. P., in Dubach, U. C. „Enzymes in Urine and Kidney“, Hans Huber, Bern-Stuttgart (1968). — 10. ORLOWSKI, M. und A. SZEWCZUK, *Clin. chim. Acta*, Amsterdam 7, 755 (1962). — 11. ALBERT, Z., M. ORLOWSKI und A. SZEWCZUK, *Nature*, London 191, 767 (1961). — 12. GLENNER, G. G. und J. E. FOLK, *J. Histochem. Cytochem.* 9, 624 (1961). —
13. GLENNER, G. G., J. E. FOLK und P. J. McMILLAN, *J. Histochem. Cytochem.* 10, 481 (1962). — 14. ORLOWSKI, M. und A. MEISTER, *Biochim. biophysica Acta*, Amsterdam 73, 679 (1963). — 15. SZASZ, G., *Clin. Chem.*, New York 15, 124 (1969). — 16. SZASZ, G., *Amer. J. Clin. Path.* 47, 607 (1967). — 17. HAUSAMEN, T.-U., R. HELGER, W. RICK und W. GROSS, *Clin. chim. Acta*, Amsterdam 15, 241 (1967). — 18. WEBER, H. und R. RICHTERICH, *Klin. Wschr.* 41, 665 (1963). — 19. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry, I. U. B. Sympos. Series 20, Pergamon Press, Oxford (1961). — 20. ENGLHARDT, A., G. SCHMIDT-SODINGEN und H. LANGE, *Enzymol. biol. clin.* 10, 258 (1969). — 21. WINER, B. J., *Statistical methods in experimental design*, McGraw-Hill, New York (1962). — 22. MATTENHEIMER, H., in Schmidt, F. W. „Praktische Enzymologie“, Hans Huber, Bern-Stuttgart (1968). — 23. JÖSCH, W. und U. C. DUBACH, *Clin. chim. Acta*, Amsterdam 15, 325 (1967). — 24. SZASZ, G., P. BARANYAI, Z. CZIRBESZ und P. CSAKI, *Klin. Wschr.* 43, 783 (1965).

Dr. G. Szasz
63 Gießen
Klinikstr. 32b

MERCK



MERCK

TEST

Ein Test in einem Glas

Cholinesterase

GOT (UV)

GPT (UV)

HBDH (UV)

LDH (UV)

**Eine neue Konzeption für Sicherheit
und Zeitersparnis in Klinik- und
Praxislabor**

**Öffnung der 1-Test-Gläser
im Handumdrehen**

**Lösungsmittel in der Packung
enthalten; daher kein destilliertes
Wasser notwendig**

E. MERCK · DARMSTADT



SIGMA bietet jetzt an

TRINUCLEOSID-DIPHOSPHATE

Vorrätig zur sofortigen Auslieferung

ADENYLYL (3'→5') ADENYLYL (3'→5')CYTIDIN (ApApC)
 ADENYLYL (3'→5') CYTIDYLYL (3'→5')CYTIDIN (ApCpC)
 CYTIDYLYL (3'→5') CYTIDYLYL (3'→5')ADENOSIN (CpCpA)
 CYTIDYLYL (3'→5') CYTIDYLYL (3'→5')CYTIDIN (CpCpC)
 GUANYLYL (3'→5')CYTIDYLYL (3'→5')CYTIDIN (GpCpC)

1 mg \$ 20,00 10 mg \$ 142,25
 5 mg 85,25 25 mg 237,50

Wir hoffen, den Preis wesentlich senken zu können, wenn es die Nachfrage rechtfertigt. Folgende Trinucleosid-Diphosphate sind augenblicklich „in der Herstellung“ und werden bald bei Sigma erhältlich sein.

ADENYLYL (3'→5') ADENYLYL (3'→5')ADENOSIN (ApApA)
 ADENYLYL (3'→5') ADENYLYL (3'→5') URIDIN (ApApU)
 ADENYLYL (3'→5') URIDYLYL (3'→5')GUANOSIN (ApUpG)
 URIDYLYL (3'→5') URIDYLYL (3'→5')GUANOSIN (UpUpG)
 URIDYLYL (3'→5') URIDYLYL (3'→5') URIDIN (UpUpU)

Eine weitere Neuigkeit von Sigma!

THYMIDYLYL (3' → 5') THYMIDIN (TpT)

Etwa 90—95%

1 mg \$ 11,00 5 mg \$ 37,50 10 mg \$ 62,50 25 mg \$ 125,00

Sigma bietet bereits folgende

DINUCLEOSID-PHOSPHATE an

Adenylyl(3'→5')adenosin	Adenylyl(2'→5')adenosin
Adenylyl(3'→5')cytidin	Guanylyl(2'→5')cytidin
Adenylyl(3'→5')guanosin	1 mg \$ 6,50 10 mg \$ 37,50
Adenylyl(3'→5')uridin	5 mg 21,50 25 mg 75,00
Cytidylyl(3'→5')adenosin	Inosylyl(3'→5')uridin
Cytidylyl(3'→5')cytidin	1 mg \$ 9,00 5 mg \$ 30,00
Cytidylyl(3'→5')guanosin	10 mg \$ 50,00
Cytidylyl(3'→5')uridin	Adenylyl(2'→5')cytidin
Guanylyl(2'→5')adenosin	1 mg \$ 11,50 10 mg \$ 57,50
Guanylyl(3'→5')adenosin	5 mg 38,00 25 mg 115,00
Guanylyl(3'→5')guanosin	Guanylyl(3'→5')cytidin
Guanylyl(3'→5')uridin	1 mg \$ 5,50 10 mg \$ 28,25
Uridylyl(3'→5')adenosin	5 mg 18,00 25 mg 60,00
Uridylyl(3'→5')cytidin	Uridylyl(3'→5')uridin
Uridylyl(3'→5')guanosin	1 mg \$ 4,75 10 mg \$ 20,00
1 mg \$ 5,50 10 mg \$ 25,00	5 mg 12,00 25 mg 40,00
5 mg 15,00 25 mg 44,00	100 mg \$ 145,00

Sigma-Reagenzien sind in der ganzen Welt durch den Fachhandel oder direkt aus St. Louis beziehbar.

Telegramme: SIGMACHEM, St. Louis, Missouri

Die Forschungslaboratorien von

SIGMA CHEMICAL COMPANY

3500 DE KALB ST. • ST. LOUIS 63118, MO. • U.S.A.

MANUFACTURERS OF THE FINEST BIOCHEMICALS AVAILABLE

Vertretung in England:

SIGMA LONDON Chem. Co. Ltd. ● 12, Lattice St., London S. W. 6 ENG. ● Telephone: RENown-5823 (Rückberechnung)

ANLEITUNGEN

KOSTENLOS ERHÄLTICH

Die nachstehenden Verfahren, die ursprünglich für Bestimmungen im Serum oder Urin veröffentlicht wurden, eignen sich hervorragend auch für Forschungsarbeiten.

Äthylalkohol in Blut und Serum, enzymatisch (340 nm) Bulletin 330-UV
 Aldolase im Serum (540 nm) Bulletin 750
 Amylase in Serum und Urin, visuelles Verfahren, Bulletin 700
 Chlorid in Serum oder anderen biologischen Flüssigkeiten, titrimetrisch, Bulletin 830
 Cytochromoxydase, histochemisch, Bulletin 185
 Formimino-L-Glutaminsäure (FIGLU), im Harn (365 nm) Bulletin 365-UV
 Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase, für die Diagnose der Galaktosämie (340 nm) Bulletin 600-UV
 Glucose in Blut und Serum (540 nm) Bulletin 14 dasselbe Filtrat kann für die Bestimmung des Harnstoff-N verwendet werden
 Glucose im Plasma, enzymatisch kolorimetrisch (490 bis 510 nm) Bulletin 510
 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in Erythrocyten, sehr einfache visuelle Methode, erfordert kein Instrument, Bulletin 400
 Harnstoff-N in Blut oder Serum (400—420 nm) Bulletin 14 dasselbe Filtrat kann für die Glucosebestimmung verwendet werden
 Harnsäure im Serum, enzymatisch (650—750 nm) Bulletin 680
 α-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase im Serum, kolorimetrisch (um 500 nm) Bulletin 495
 α-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase im Serum, UV-Test (340 nm) Bulletin 20-UV
 Isocitrat-Dehydrogenase im Serum, kolorimetrisch (340 nm); UV-Test (340 nm) Bulletin 175/150-UV
 Kreatinphosphokinase (CPK) im Serum, kolorimetrisch (500—540 nm) Bulletin 520
 Kreatinphosphokinase (CPK) im Serum, unter Verwendung von Sulfhydrylgruppen, kolorimetrisch (um 660 nm) Bulletin 661
 Kreatinphosphokinase (CPK) im Serum, UV-Test (340 nm) Bulletin 40-UV
 L-(+)-Lactat im Blut, enzymatisch (340 nm) Bulletin 825-UV
 Lactat-Dehydrogenase in Serum und Harn einschl. der Isoenzyme (400—550 nm) Bulletin 550
 Lactat-Dehydrogenase im Serum (340 nm) Bulletin 340-UV
 Leucin-Amino-peptidase im Serum (580 nm) Bulletin 250
 Lipase im Serum, titrimetrisch, Bulletin 800
 Malat-Dehydrogenase im Serum (340 nm) Bulletin 340-UV
 Ornithin Transcarbamylase (OCT) im Serum, erfordert Ammoniakbestimmung, Bulletin 108
 Phenylalanin in Serum und anderen Flüssigkeiten, fluorometrisch, Bulletin 60-F
 Phosphatase, alkalische und saure in Blutausstrichen und Gewebsschnitten, histochemisch, Bulletin 85
 Phosphatase im Serum, alkalische, saure und Prostata-sowie im Harn, alkalische (410 nm) Bulletin 104
 Phosphohexose Isomerase im Serum (490 nm) Bulletin 650
 Phosphor, anorganischer in Serum und Urin, kolorimetrisch (um 620—700 nm) Bulletin 670
 Pyruvat in Blut, Plasma und anderen Flüssigkeiten, enzymatisch (340 nm) Bulletin 725-UV
 Sorbit-Dehydrogenase (SDH) im Serum, UV-Test (340 nm) Bulletin 50-UV
 Transaminasen (GOT u. GPT) im Serum (505 nm) Bulletin 505
 Transaminasen (GOT u. GPT) im Serum (340 nm) Bulletin 410-UV
 Vanillinmandelsäure (VMA) im Harn, kolorimetrisch (470—510 nm) Bulletin 480