

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 123–128

Optimierte Bestimmung und Eigenschaften der NADPH-abhängigen Glutathion-Reduktase im Serum

Untersuchungen über die Glutathion-Reduktase im Serum, I. Mitteilung

Von G. Weidemann

Aus dem Chemischen Institut (Vorstand: Prof. Dr. G. Hillmann) der Städtischen Krankenanstalten Nürnberg

(Eingegangen am 22. November 1974/5. Februar 1975)

Für die Bestimmung der bisher nicht systematisch untersuchten Glutathion-Reduktase (EC 1.6.4.2) im Serum wurden die Reaktionsbedingungen optimiert. Imidazol erweist sich als die am besten geeignete Puffersubstanz, da mit Imidazol/HCl-Puffer stets die höchste Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum gemessen wurde und im Gegensatz zu allen anderen geprüften Pufferlösungen die maximale Enzymaktivität ohne Vorinkubation erreicht wurde. Die pH-Aktivitätskurve der Glutathion-Reduktase im Serum zeigt in Imidazol-Puffer ein breites pH-Optimum zwischen 6,5–6,9. Maximale Enzymaktivität und eine lineare Zeit-Umsatz-Kurve über 10 min bis 20 U/l Testlösung erhält man bei einer GSSG-Konzentration von 2 mmol/l und einer NADPH-Konzentration von 0,43 mmol/l Testansatz. Bei 100 klinisch gesunden Probanden wurde eine Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum zwischen 20–60 U/l gefunden. Im optimierten Bestimmungsansatz reagiert die Glutathion-Reduktase im Serum spezifisch mit GSSG und NADPH. Na-p-äthylmercuri-mercaptopbenzolsulfonat, 1,3 µmol/l, N-Äthylmaleimid, 12 µmol/l, und Zn⁺⁺, 0,4 mmol/l Testansatz hemmen die Enzymaktivität um 50%. Bei 4 °C ist die Glutathion-Reduktase im Serum mindestens 20 Tage, bei -20 °C länger als 6 Monate ohne Aktivitätsverminderung haltbar. Nach Inkubation des Serums 60 min bei 56 °C findet man keine Abnahme der Glutathion-Reduktase-Aktivität. In Gegenwart von NADPH ist die Stabilität der Glutathion-Reduktase bereits bei 37 °C deutlich vermindert.

Optimized determination and properties of NADPH-dependent glutathione reductase in serum Studies on serum glutathione reductase, I.

Reaction conditions were optimized for the determination of serum glutathione reductase, which has not yet been investigated systematically. Imidazole was found to be the most suitable buffer material; the highest glutathione reductase activity in serum was always obtained with imidazole/HCl buffer, which, in contrast to all other tested buffers, also resulted in the maximal enzyme activity without preincubation. In imidazole buffer, the pH-activity curve of serum glutathione reductase shows a broad optimum between pH 6.5 and 6.9. A GSSG concentration of 2 mmol/l and a NADPH concentration of 0.43 mmol/l gave maximal enzyme activity and a linear reaction over 10 min up to 20 U/l test solution. An investigation of serum glutathione reductase activity from 100 clinically healthy probands gave values between 20 and 50 U/l. In the optimized assay system the glutathione reductase in the serum reacts specifically with GSSG and NADPH.

1.3 µmol/l Na-p-ethyl-mercuri-mercaptop-benzene-sulphonate, 12 µmol/l N-ethylmaleimide, and 0.4 mmol/l Zn⁺⁺ in the assay system inhibit the enzyme by 50%. Glutathione reductase in serum can be stored without loss of activity for at least 20 days at 4 °C, and for longer than 6 months at -20 °C. There is no detectable decrease in the glutathione reductase activity after incubation of the serum for 60 min at 56 °C, whereas in the presence of NADPH the enzyme shows a marked decrease in activity even at 37 °C.

Die Glutathion-Reduktase (EC 1.6.4.2) katalysiert die NADPH- bzw. NADH-abhängige Reduktion von oxidiertem Glutathion (GSSG):



Das Enzym wurde in vielen Mikroorganismen sowie in zahlreichen pflanzlichen und tierischen Geweben nachgewiesen. Von den menschlichen Organen enthalten, auf Frischgewicht bezogen, Leber und Niere die höchste Glutathion-Reduktase-Aktivität (1). Während vor allem über die Glutathion-Reduktase der menschlichen Blutzellen, insbesondere der Erythrocyten, zahlreiche Publikationen vorliegen, ist die Glutathion-Reduktase im Serum bisher nur vereinzelt untersucht worden (1–6).

Die diagnostische Relevanz einer erhöhten bzw. erniedrigten Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum ist unbekannt.

Bei Untersuchungen über eine Störung der mit reduziertem Glutathion aktivierten Creatin-Kinase-Bestimmung durch Glutathion-Reduktase wurde in einem ausgewählten Kollektiv bei 2% der Patienten eine erhöhte Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum beobachtet (7). Es erschien danach sinnvoll, die diagnostische Bedeutung der Glutathion-Reduktase-Bestimmung im Serum eingehend zu prüfen.

Die in der Literatur mitgeteilten Reaktionsbedingungen für die Bestimmung der Glutathion-Reduktase gleicher und verschiedener Provenienz im optischen Test diffe-

rieren erheblich. Es wurden daher für die Messung der NADPH-abhängigen Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum die Reaktionsbedingungen bezüglich Wahl des Puffers, Pufferkonzentration, pH-Optimum, Substrat- und Cosubstratkonzentration sowie EDTA-Zusatz optimiert. Mit dem optimierten Bestimmungsansatz wurden dann orientierende Untersuchungen über Eigenschaften der Glutathion-Reduktase im Serum durchgeführt.

Material und Methodik

Glutathion, oxydierte Form (GSSG), NADPH (15 502), NADH (15 297), Glutathion-Reduktase aus Hefe, Flavin-adenin-dinucleotid, Triäthanolamin-Hydrochlorid wurden von der Fa. Boehringer (Mannheim), N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure p. A. (Hepes), N-Äthylmaleimid, Jodessigsäure, Na-salz von der Fa. Serva (Heidelberg) und Na-p-äthylmercuri-mercaptobenzolsulfonat (Thiocid) von der Fa. Asid (München) bezogen. Die übrigen Reagenzien, p. A. Qualität, waren Produkte der Firmen Merck (Darmstadt) und Schuchardt (München).

Die Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum wurde durch kontinuierliche Messung im Filterphotometer Eppendorf mit Küvettenwechselautomatik und Schreiber oder mit dem Enzymautomaten 5020, Fa. Eppendorf, bei 25 °C bestimmt. Zur Ermittlung des optimalen Puffers für die Bestimmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum wurden Triäthanolamin-Hydrochlorid/NaOH-, Tris/Maleinat-, Phosphat-, Collidin/HCl-, Dimethylglutarsäure/NaOH-, Dimethylaminoäthylendiamin/HCl und Hepes-Puffer jeweils bei den pH-Werten 6,5, 6,7, 6,9, 7,1, 7,3, 7,5 und einer Pufferkonzentration von 50, 100, 150, 200 und 250 mmol/l Testansatz geprüft. Die Substrat- und Cosubstratkonzentration im Test betragen 2 mmol/l GSSG und 0,43 mmol/l NADPH. EDTA wurde in einer Konzentration von 0,3 mmol/l zugesetzt. Start der Reaktion erfolgte mit GSSG-Lösung 5 min nach Zugabe des Serums zur Puffer-EDTA-Cosubstrat-Lösung. Es wurden 5 Seren mit normaler und 10 Seren mit erhöhter Glutathion-Reduktase-Aktivität untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

Ermittlung der optimierten Reaktionsbedingungen

Wahl des Puffers, pH-Optimum und Pufferkonzentration

Die Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum wurde bei den unter „Material und Methodik“ angegebenen Reaktionsbedingungen in den dort angegebenen Pufferlösungen gemessen.

In allen untersuchten Seren wurde die höchste Enzymaktivität in Imidazol/HCl-Puffer bei pH 6,5–6,9 und einer Pufferkonzentration von 200 mmol/l gemessen.

Die Verwendung von Imidazol-Puffer für Glutathion-Reduktase-Bestimmungen wurde noch nicht beschrieben. Die Messung der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum erfolgte bisher ausschließlich in Phosphat-Puffer bei unterschiedlichen pH-Werten und Pufferkonzentrationen (Tab. 1).

Im Gegensatz zu Imidazol-Puffer wurde in sämtlichen anderen Pufferlösungen mit zunehmender Dauer der Vorinkubation bei fast allen Seren eine Zunahme der Glutathion-Reduktase-Aktivität gefunden. Nach dem Start mit GSSG verläuft die Reaktion unabhängig von der Dauer der Vorinkubation linear, d. h. in Gegenwart von GSSG erfolgt keine weitere Aktivitätszunahme.

Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, ist die Aktivitätszunahme durch längere Vorinkubation pH-abhängig. Das Maximum der Glutathion-Reduktase-Aktivität wurde in den verschiedenen Seren nach unterschiedlich langer Vorinkubation, die z. T. länger als 60 min betrug, erreicht. In keinem Fall wurde die in Imidazol-Puffer nach 5 min gemessene Glutathion-Reduktase-Aktivität übertroffen. Für die Bestimmung der Glutathion-Reduktase-

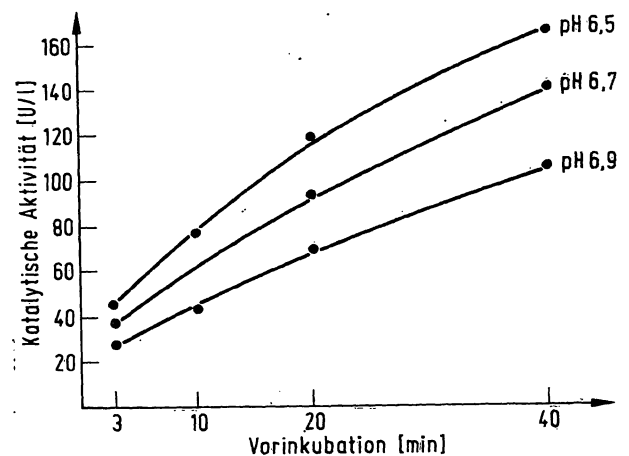


Abb. 1. pH-abhängige Zunahme der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum nach 3–40 min Vorinkubation bei 25 °C in Phosphat-Puffer, 200 mmol/l. Übrige Meßbedingungen s. „Methodik“.

Tab. 1. Reaktionsbedingungen verschiedener Autoren zur Bestimmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum.

Autor	Puffer	Pufferkonzentration im Test [mmol/l]	pH	Temperatur	Vorinkubation [min]	Start mit	GSSG-Konzentration im Test [mmol/l]	NADPH-Konzentration im Test [mmol/l]
Manso & Wroblewski (1)	Phosphat	115	7,6	Raumtemperatur (26 °C)	20	GSSG	2,2	0,30
Horn & Bruns (2)	Phosphat	35,7–53,6	6,5	25 °C	?	Serum	0,5	0,40
Kerppola et al. (3)	Phosphat	?	7,4	Raumtemperatur	?	?	3,5	0,96
West et al. (4)	Phosphat	8,6	7,5	37 °C	20	GSSG	11	0,67
Franken & Stork (5)	Phosphat	115	7,6	Raumtemperatur	20	GSSG	?	0,09
Kleine & Chlond (6)	Phosphat	86,6	6,5	25 °C	?	?	0,5	0,17

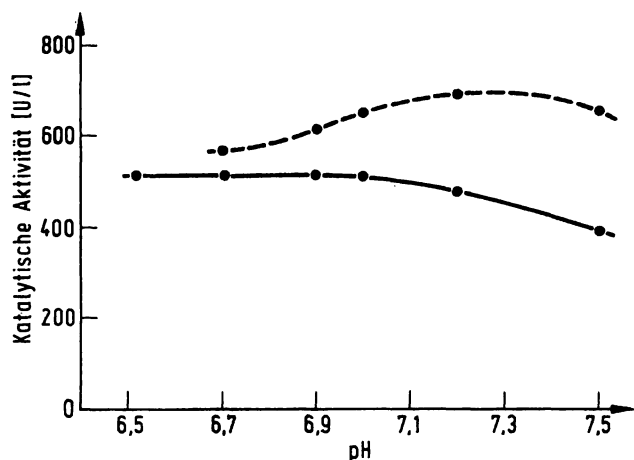


Abb. 2. Abhängigkeit der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum und der Hefe-Glutathion-Reduktase-Aktivität vom pH-Wert des Imidazol-Puffers. Übrige Meßbedingungen: s. optimierter Bestimmungsansatz. Seren mit höherer und niedrigerer Glutathion-Reduktase-Aktivität ergeben einen analogen Kurvenverlauf. Glutathion-Reduktase im Serum: ———, Hefe-Glutathion-Reduktase: - - - - -.

Aktivität im Serum erweist sich somit Imidazol als die am besten geeignete Puffersubstanz. Über die Ursache der Aktivitätszunahme der Glutathion-Reduktase während längerer Vorinkubation in den verschiedenen Pufferlösungen, mit Ausnahme von Imidazol-Puffer, wird an anderer Stelle berichtet.

In Imidazol/HCl-Puffer ergibt sich für die Bestimmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum ein breites pH-Optimum bei pH 6,5–6,9 (Abb. 2). Für gereinigte Hefe-Glutathion-Reduktase liegt das pH-Optimum bei 7,2. Die optimale Imidazol-Konzentration beträgt 200 mmol/l Testansatz (Abb. 3).

Substrat- und Cosubstratkonzentration

Maximale Enzymaktivität und eine lineare Zeit-Umsatz-Kurve über 10 min bis 20 U/l Testlösung erhält man bei einer GSSG-Konzentration von 2 mmol/l und einer NADPH-Konzentration von 0,43 mmol/l Testansatz.

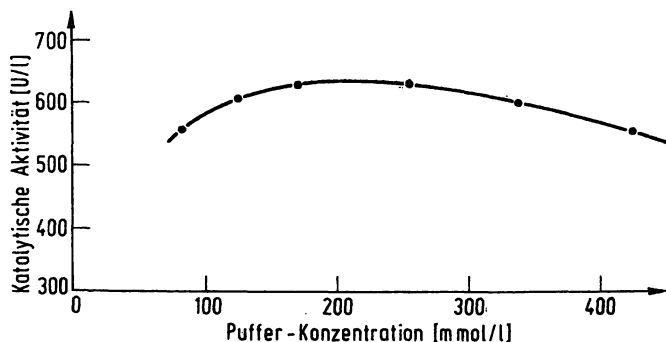


Abb. 3. Abhängigkeit der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum von der Konzentration des Imidazol-Puffers. Übrige Meßbedingungen: s. optimierter Bestimmungsansatz.

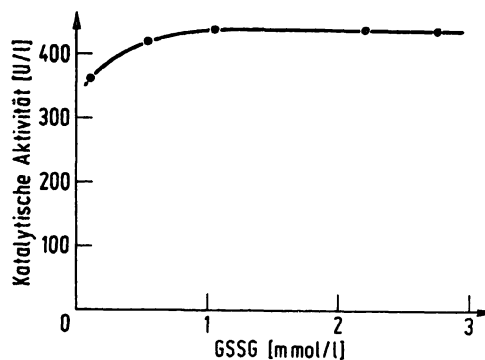


Abb. 4. Abhängigkeit der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum von der GSSG-Konzentration. Übrige Meßbedingungen: s. optimierter Bestimmungsansatz.

Abbildung 4 zeigt, daß unter den angegebenen Reaktionsbedingungen die Enzymaktivität bei Substratsättigung gemessen wird. Bei zehnfacher Substratkonzentration und 0,43 mmol NADPH/l erhält man eine um etwa 10% niedrigere Enzymaktivität. Cosubstratkonzentrationen über 0,5 mmol/l ergeben eine initiale Hemmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität, die durch GSSG-Erhöhung bis 20 mmol/l nicht aufgehoben wird.

EDTA-Zusatz

Durch Zugabe von EDTA zum Bestimmungsansatz wird eine Erhöhung der Glutathion-Reduktase-Aktivität um maximal 5% erreicht. In Imidazol-Puffer verläuft die Reaktion auch ohne EDTA-Zusatz linear.

Optimierter Bestimmungsansatz

Für die Bestimmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum ergeben sich folgende optimierte Reaktionsbedingungen:

a) manuelle Methode

			Konzentration im Test
Imidazol/HCl-Puffer	pH 6,9	2,4 ml	200 mmol/l
EDTA-Lösung		0,1 ml	0,3 mmol/l
NADPH-Lösung		0,1 ml	0,43 mmol/l
Serum		0,1 ml	

5 min Inkubation bei 25 °C

Startreagenz:			
GSSG-Lösung (pH etwa 6,9)	0,05 ml	2,0 mmol/l	
Meßtemperatur: 25 °C			
Meßstrahlung: 334 (340,366) nm			
Schichtdicke: 1 cm			
Konzentration der Enzymaktivität = 4583 · Δ E ₃₃₄ /min [U/l]			

b) Eppendorf-Enzymautomat 5020

Die Konzentrationen im Test und der pH-Wert der Lösungen entsprechen denen für die manuelle Methode.

Analysenschema:

Reaktionsgemisch (Imidazol/HCl-Puffer, NADPH, EDTA)	500 μ l
Serum	20 μ l
Startreagenz (GSSG)	20 μ l

Vorinkubation: 5 min
 Meßstrahlung: 334 nm
 Faktor für Enzymrechner Eppendorf: 3750

Präzision von Tag zu Tag

Bei Werten um 50 U/l beträgt die Standardabweichung bei manueller Bestimmung ± 3 U/l, VK = 6%, bei Bestimmung mit dem Enzymautomaten ± 2 U/l, VK = 4% (n = 25). Bei Seren mit erhöhter Glutathion-Reduktase-Aktivität erniedrigt sich der VK:

- manuelle Methode: $\bar{x} = 365 \pm 12$ U/l, VK = 3,3% (n = 25)
- Enzymautomat: $\bar{x} = 380 \pm 11$ U/l, VK = 2,9% (n = 25)

Normalbereich

Vorläufiger Normalbereich, ermittelt an 100 klinisch gesunden Personen: 20–60 U/l. Eine Alters- oder Geschlechtsabhängigkeit des Normalbereiches wurde bisher nicht beobachtet.

Einfluß der Hämolyse auf die Glutathion-Reduktase-Bestimmung im Serum

Da die Erythrocyten Glutathion-Reduktase enthalten, wurde der Einfluß der Hämolyse auf die Glutathion-Reduktase-Bestimmung im Serum untersucht. Wie die Abbildung 5 zeigt, wird pro 1 g Hämoglobin/l Plasma eine um etwa 10% zu hohe Glutathion-Reduktase-Aktivität gemessen.

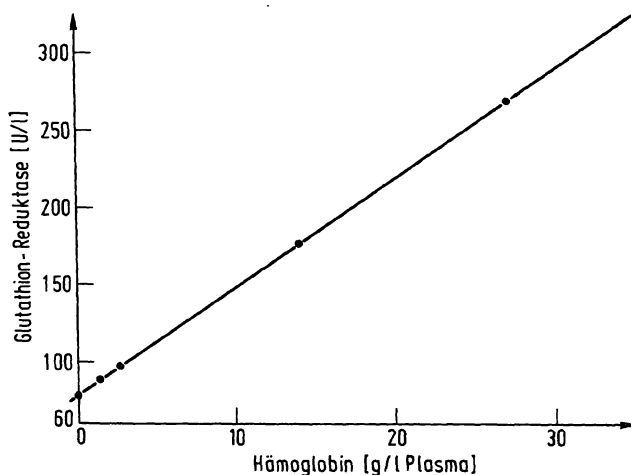


Abb. 5. Einfluß der Hämolyse auf die Bestimmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum. Ein Teil einer EDTA-Blutprobe wurde durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen hämolytisiert. Aus dem Hämolyt wurden mit dem Plasma des anderen Teiles Proben mit verschiedener Hämoglobin-Konzentration hergestellt.

Eigenschaften der Glutathion-Reduktase im Serum

Spezifität, Isoenzyme und K_m -Werte

Im Vergleich zu GSSG beträgt die Umsatzgeschwindigkeit der Glutathion-Reduktase mit CoASSG etwa 10%, mit anderen symmetrischen und gemischten Disulfiden sowie Thiosulfateestern nur weniger als 1% (8). Erwartungsgemäß fanden wir in Seren mit erhöhter Glutathion-Reduktase-Aktivität bei Verwendung von Cystin, Cysteamin und Dithiodiglykolsäure als Substrat keine Enzymaktivität. Bei Ersatz von NADPH durch äquimolare Mengen NADH im optimierten Bestimmungsansatz betrug die Glutathion-Reduktase-Aktivität weniger als 2%.

K_m -Werte der Glutathion-Reduktase im Serum wurden bisher nur von *Horn & Bruns* mitgeteilt (2). Sie erhielten für GSSG = 70 μ mol/l und für NADPH = 25 μ mol/l, gemessen in Phosphat-Puffer bei niedriger Pufferkonzentration.

Staal & Veeger (9) haben darauf hingewiesen, daß sich bei Bestimmung der K_m -Werte der Erythrocyten-Glutathion-Reduktase in Phosphat-Puffer bei verschiedener Pufferkonzentration unterschiedliche K_m -Werte ergeben. Die von diesen Autoren bei entsprechend niedriger Pufferkonzentration gemessenen Werte für Erythrocyten-Glutathion-Reduktase liegen mit $K_m = 19$ μ mol/l für GSSG und $K_m = 9,5$ μ mol/l für NADPH deutlich niedriger als die der Glutathion-Reduktase im Serum. Bei der Bestimmung der K_m -Werte der Glutathion-Reduktase im Serum für GSSG und NADPH ist zu berücksichtigen, daß im Serum regelmäßig zwei, in einigen Fällen auch drei NADPH-abhängige Glutathion-Reduktase-Fractionen elektrophoretisch nachweisbar sind (in Vorbereitung). Über die K_m -Werte der isolierten und gereinigten Isoenzyme der Glutathion-Reduktase im Serum sowie weitere enzymkinetische Untersuchungen wird gesondert berichtet.

Aktivatoren und Inhibitoren

Wie in-vitro-Untersuchungen zeigten, wird die Glutathion-Reduktase-Aktivität der Erythrocyten, Leukozyten und Thrombocyten durch Flavin-adenin-dinucleotid (FAD) beeinflusst: während die Glutathion-Reduktase-Aktivität der Leukozyten und Thrombocyten bei Gesunden und Patienten mit einem Mangel an Erythrocyten-Glutathion-Reduktase gehemmt wird, wurde bei Enzymmangelträgern eine deutliche, bei Gesunden eine geringe Aktivierung der Erythrocyten-Glutathion-Reduktase durch FAD gefunden (10–13). Die Glutathion-Reduktase im Serum wird dagegen nach eigenen Untersuchungen durch FAD weder gehemmt noch aktiviert.

Durch die Wahl des Anions im Imidazol-Puffer wird die Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum beeinflusst (Tab. 2). Acetat-, Sulfat- und Phosphat-Ionen hemmen die NADPH-abhängige Enzymaktivität.

Tab. 2. Einfluß des Puffer-Anions auf die Aktivität der Glutathion-Reduktase im Serum. Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Seren mit höherer und niedrigerer Aktivität ergeben analoge Resultate.

Pufferkation Imidazol		
Pufferanion	Enzymaktivität [U/l]	Enzymaktivität [%]
Chlorid	433,5	100
Bromid	437,4	100,9
Sulfat	397,6	91,7
Acetat	362,2	83,6
Phosphat	360,0	83,0

Tab. 3. Temperaturstabilität der Glutathion-Reduktase im Serum. Inkubation des Serums bei 56 °C 0–100 min und anschließende Bestimmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität bei 25 °C. Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Seren mit höherer und niedrigerer Aktivität ergeben analoge Resultate.

Inkubation bei 56 °C [min]	Enzymaktivität [U/l]
0	311,8
15	310,2
45	308,4
60	307,2
100	311,8

Im Bestimmungsansatz *ohne EDTA* wurde der Einfluß von Zn-Ionen, Jodessigsäure, N-Äthylmaleimid und einer organischen Hg-Verbindung auf die Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum geprüft. Durch Jodessigsäure, 75 µmol/l, wird die Enzymaktivität nicht verändert; Zn-Ionen, 0,4 mmol/l, und N-Äthylmaleimid, 12 µmol/l Testansatz, hemmen die Glutathion-Reduktase-Aktivität um 50%. Die Hemmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum durch Thiocid zeigt Abbildung 6.

Haltbarkeit und Temperaturstabilität

Die Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum ist bei niedrigen Temperaturen lange haltbar. Bei -20 °C können die Proben länger als 6 Monate, bei 4 °C mindestens 20 Tage ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden. Im Gegensatz zu *Manso & Wroblewski* (1), die nach Inkubation des Serums bei 56 °C bereits nach 5 min eine Verminderung der Glutathion-Reduktase-Aktivität um 50% fanden, konnten wir auch nach 60 min noch keine Abnahme der Enzymaktivität nachweisen (Tab. 3).

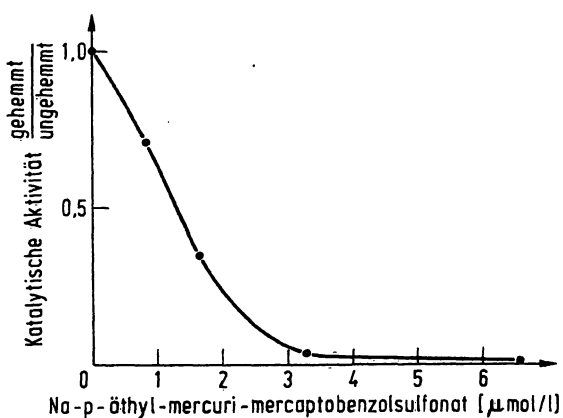


Abb. 6. Hemmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum durch Na-p-äthyl-mercuri-mercaptobenzolsulfonat (Thiocid). Anstelle von EDTA-Lösung wurde dem Bestimmungsansatz 5 min vor dem Start der Reaktion mit GSSG das entsprechende Volumen Thiocid-Lösung zugesetzt.

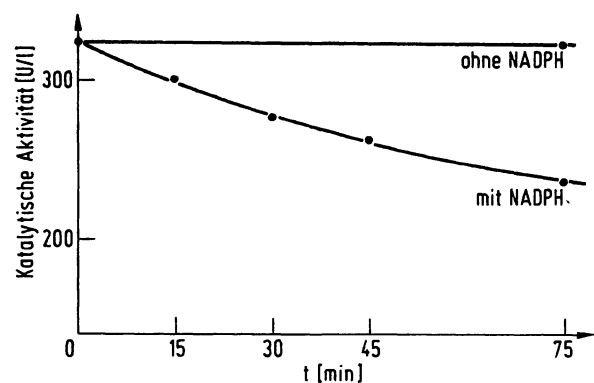


Abb. 7. Einfluß von NADPH auf die Stabilität der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum bei 37 °C. Inkubation des Serums im Bestimmungsansatz mit und ohne NADPH 0–75 min bei 37 °C. Anschließend Messung der Glutathion-Reduktase-Aktivität bei 25 °C.

Über eine rasche Inaktivierung der NADPH- und NADH-abhängigen Erythrocyten-Glutathion-Reduktase bei 62 °C und 76 °C in Gegenwart der reduzierten Cosubstrate wurde von *Icen* (14) berichtet. Nach eigenen Untersuchungen zeigt die Glutathion-Reduktase im Serum im Bestimmungsansatz mit NADPH bereits bei 37 °C eine verminderte Stabilität: Während nach 75 min Vorinkubation des Serums im Bestimmungsansatz ohne NADPH keine Abnahme der Glutathion-Reduktase-Aktivität gefunden wurde, tritt mit NADPH im Ansatz eine deutliche Inaktivierung auf (Abb. 7). Inkubation bei 56 °C ergibt in Anwesenheit von NADPH nach 30 min vollständigen Aktivitätsverlust, in Abwesenheit von NADPH dagegen keine Aktivitätsabnahme. Die Inaktivierung der Glutathion-Reduktase durch NADPH ist nicht ausschließlich auf das reduzierte Cosubstrat zurückzuführen. Es fand sich nämlich keine Abnahme der Enzymaktivität in Gegenwart von NADPH, wenn Serum mit wäsr. NADPH-Lösung im Verhältnis 1 + 1 60 min bei 56 °C inkubiert wurde. Die noch eingehend zu prüfende inaktivierende Wirkung des reduzierten Cosubstrates ist wahrscheinlich von der Ionenkonzentration der Inkubationslösung abhängig.

Literatur

1. Manso, C. & Wroblewski, F. (1958), *J. Clin. Invest.* **37**, 214–218.
2. Horn, H.-D. & Bruns, F. H. (1958), *Biochem. Z.* **331**, 58–64.
3. Kerppola, W., Nikkila, E. A. & Pitkänen, E. (1959), *Acta Med. Scand.* **164**, 357–365.
4. West, M., Berger, C., Romy, H. & Zimmermann, H. J. (1961), *J. Lab. Clin. Med.* **57**, 946–954.
5. Franken, F. H. & Stork, W. (1962), *Med. Welt*, 589–595.
6. Kleine, T. O. & Chlond, H. (1966), *Clin. Chim. Acta* **13**, 407–411.
7. Weidemann, G. (1973), *diese Z.* **11**, 134–135.
8. Mannervik, B. & Erikson, St. A. (1974), in *Glutathione* (Flohe, L., Benöhr, H. Ch., Sies, H. & Waller, H. D., Hrsg.) 1. Aufl. S. 120–131, Thieme Verlag, Stuttgart.
9. Staal, G. E. J. & Veeger, C. (1969), *Biochim. Biophys. Acta* **185**, 49–62.
10. Staal, G. E. J., Helleman, P. W., Milligen-Boersma, P. W. & Verloop, M. C. (1968), *Ned. Tijdschr. Geneesk.* **112**, 1008–1009.
11. Beutler, E. (1969), *J. Clin. Invest.* **48**, 1957–1966.
12. Glatzle, D., Weber, F. & Wiss, O. (1968), *Experientia* **24**, 1122.
13. Benöhr, H. Ch. & Waller, H. D. (1974), in *Glutathione* (Flohe, L., Benöhr, H. Ch., Sies, H. & Waller, H. D., Hrsg.) 1. Aufl. S. 184–191, Thieme Verlag Stuttgart.
14. Icen, A., (1967), *Scand. J. Clin. Lab. Invest., Suppl.* **96**, 1–67.

Dr. G. Weidemann
Städt. Krankenanstalten
85 Nürnberg 5
Postfach