

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Heidelberg  
(Direktor: Prof. Dr. B. MUELLER)

## Die Bestimmung der Alkoholdehydrogenase- und Glutaminsäure-Oxalessigsäure-Transaminase-Aktivität der menschlichen Leber nach dem Tode

Von

H. KLEIN, H. FAHRIG und H. P. WOLF\*

MIRSKY u. NELSON (1939) wiesen experimentell am Kaninchen durch schrittweise Hepatektomie nach, daß die Abbaugröße von Alkohol in einem quantitativen Verhältnis zur Lebermenge steht. Die Fähigkeit, Alkohol abzubauen, käme nur der Leber zu. LARSON (1959) nimmt unter der Voraussetzung, Äthanol käme physiologisch im Blut nicht vor, einen extrahepatischen Alkoholstoffwechsel an. Die hierfür angeführten Befunde können aber kaum ein Beweis für einen Alkoholabbau außerhalb der Leber sein, da die Voraussetzung, Alkohol käme physiologisch im Blut nicht vor, nach den Untersuchungen von REDETZKI und JOHANNISMEIER (1956), WOLF und KLEIN (1959) sowie PFEIFFER (1961) nicht zutreffen kann. Für den Abbau von Äthanol zu Acetaldehyd dürfte das DPN-abhängige ADH-System allein von Bedeutung sein. Über die Aktivität der Alkoholdehydrogenase in der menschlichen Leber liegen bisher die Ergebnisse aus bioptischen Entnahmen von E. u. F. W. SCHMIDT und E. WILDHIRT (1958) vor. In den folgenden Untersuchungen sollte geprüft werden, wieweit eine Bestimmung der ADH-Aktivität nach dem Tode überhaupt möglich und ob Rückschlüsse aus der postmortalen Aktivität der ADH gezogen werden können.

### Abkürzungen:

ADH = Alkohol-Dehydrogenase  
DNA = Desoxy-Ribonucleinsäure  
DPN<sup>+</sup> = Diphosphopyridin-Nucleotid (oxydierte Form)  
DPN-H = Diphosphopyridin-Nucleotid (reduzierte Form)  
EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure  
GOT = Glutaminsäure-Oxalessigsäure-Transaminase  
MDH = Malat-Dehydrogenase (Äpfelsäure-Dehydrogenase)  
TRA-p = Triäthanolamin-Puffer

## A. Methodik

### I. Spezieller Teil

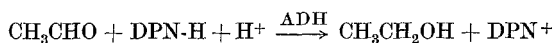
1. *Entnahme der Leberproben.* Die einzelnen Leberproben wurden nach der Sektion entnommen und die Probe so groß gehalten, daß zentrale Bezirke, nicht die

\* Leiter der physiol.-chem. Abtlg., Deutsche Laevosan-Ges., Mannheim.

Randbezirke, aufgearbeitet werden konnten. Voruntersuchungen bei Entnahmen aus der Leber hatten nämlich gezeigt, daß Ungenauigkeiten durch Austrocknung entstehen können. Es wurde deshalb auf möglichst gleichmäßige Feuchtigkeit der entnommenen Leberprobe geachtet. Eine Auswahl nach Krankheiten erfolgte nicht. Das Lebergewebe wurde abgetrocknet, 1 g abgewogen, rasch mit der Schere zerkleinert, im eisgekühlten Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM nach Zugabe von 10 ml 0,9% NaCl gleichmäßig 2 min homogenisiert. Das Homogenat wurde in vorgekühlte Zentrifugenröhrchen aufgenommen und bei  $25 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-2}$  und  $0^\circ \text{C}$  20 min zentrifugiert. Es wurde bei jeder Leberprobe auf möglichst strenge Einhaltung dieser Bedingungen geachtet. Das auf dem meist klaren Homogenat schwimmende Fetthäutchen wurde durch Filtration entfernt. Der Überstand wurde während der ganzen Bestimmungszeit auf  $0^\circ \text{C}$  gehalten. Die zwischen Tod und Entnahme verstrichene Zeit wurde als hpm (horae post mortem) bezeichnet. Eine Zeit von 3 Std wurde allerdings nicht überschritten. Die zwischen Entnahme und Aufarbeitung verstrichene Zeit wurde zu den hpm hinzugerechnet.

2. *Proteinbestimmung* erfolgte nach BEISENHERZ u. a. (1953).

3. *Bestimmung der ADH-Aktivität.* a) *Reaktionsgeschwindigkeit.* Die Messungen folgten dem Prinzip des optischen Testes nach WARBURG. Die Extinktionsdifferenz zwischen Anfang und Ende des Reaktionsablaufes betrug bei der Wellenlänge  $\lambda = 340 \text{ m}\mu$  ungefähr  $\Delta E = 0,600$ . Die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte bei fliegendem Start zwischen zwei festgesetzten Marken nahe dem Ausgangspunkt der Reaktion, um die geforderte Linearität zu garantieren (s. BEISENHERZ 1953). In Doppelbestimmungen wurde die Zeit ermittelt, welche die Reaktion für eine Extinktionsdifferenz von  $\Delta E = 0,100$  benötigte. Messungen bei  $22^\circ \text{C}$ , Schichtdicke 1 cm. Zum Ablauf der Reaktion



wurde folgender Ansatz vorbereitet:

2,0 ml TRA-p ( $5,0 \cdot 10^{-2} \text{ m}$ )  $\text{pH}$  7,5  
 0,3 ml DPN-H ( $1,1 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ )  
 0,05 ml Homogenat-Überstand.

Die Reaktion wurde ausgelöst mit 0,1 ml Acetaldehyd ( $2 \cdot 10^{-1} \text{ m}$ ). Dies entspricht einer Endkonzentration im Ansatz von  $0,82 \cdot 10^{-1} \text{ m}$ . Die Messung erfolgte gegen einen Leerwert von 2,4 ml TRA-Puffer und 0,05 ml Homogenat-Überstand.

b) *Berechnung der ADH-Aktivität.* Die Aktivität des Fermentes wurde in Anlehnung an BEISENHERZ (1953) auf 1 mg Protein des Homogenatüberstandes bezogen. Eine Einheit ist hier jene Fermentmenge, bezogen auf 1 mg Protein, welche in 100 sec im 1 ml-Ansatz bei  $340 \text{ m}\mu$  und  $22^\circ \text{C}$  eine Extinktionsänderung von  $\Delta E = 0,100$  bewirkt.

Extinktion	Abgelesene Zeiten sec	Zeitdifferenz sec	Extinktion	Abgelesene Zeiten sec	Zeitdifferenz sec
0,6—0,5	17—34	17	0,6—0,5	46—02	16
0,5—0,4	34—53	19	0,5—0,4	02—19	17
0,4—0,3	53—14	21	0,4—0,3	19—40	21
0,3—0,2	14—40	26	0,3—0,2	40—04	24

Mittelwert der Anfangsgeschwindigkeiten:  $0,6—0,5 = 16,5 \text{ sec}$ .

Biuretreaktion: Abgelesene Extinktion

c) *Beispiel für Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit und Berechnung der Fermentaktivität.* Start der Reaktion bei 0,65. Volumen des Gesamt-Ansatzes 2,45 ml.

$$0,27 - 0,28 \quad \text{Mittelwert: } 0,275 \cdot 1,7 = 0,467 \frac{\text{mg Protein}}{0,05 \text{ ml } \bar{U}}$$

$$\text{Spezifische Aktivität: } \frac{100}{16,5} \cdot \frac{2,45}{0,467} = \frac{246}{7,7} = 31,8 \frac{\text{E}}{\text{mg Protein}}$$

4. *Bestimmung der GOT-Aktivität.* Nach demselben Prinzip erfolgte die Bestimmung der Aktivitätsberechnung der Transaminase.

1.  $\alpha$ -Ketoglutar säure + Asparaginsäure  $\xrightarrow{\text{GOT}}$  Glutaminsäure + Oxalessigsäure.

2. Oxalessigsäure + DPN-H + H<sup>+</sup>  $\xrightarrow{\text{MDH}}$  Äpfelsäure + DPN<sup>+</sup>.

Die Reaktionen 1. und 2. wurden in folgendem Ansatz durchgeführt:

2,2 ml Phosphat-Puffer (1,0 · 10<sup>-2</sup> m, p<sub>H</sub> 7,4)

0,3 ml DPN-H (1,1 · 10<sup>-3</sup> m)

0,05 ml MDH

0,05 ml Gesamthomogenat

0,1 ml Asparaginsäure (1,0 · 10<sup>-1</sup> m)

Der Start erfolgte mit 0,05 ml  $\alpha$ -Ketoglutar säure (5 · 10<sup>-2</sup> m) nach einer Wartezeit von 5 min. Die Messung erfolgte bei 25° C, Wellenlänge 340 m $\mu$ , Schichtdicke 1 cm, gegen einen Leerwert von: 2,7 ml Phosphatpuffer, 0,05 ml Gesamthomogenat.

## II. Allgemeiner Teil

1. Die *Homogenisierungszeit* wurde in Anlehnung an SCHMIDT u. SCHMIDT auf 2 min festgesetzt. Es konnte angenommen werden, daß die ADH als leichtlösliches Enzym, ähnlich wie die von SCHMIDT u. SCHMIDT in diesem Zusammenhang untersuchte Milchsäure-Dehydrogenase, nach dieser Zeit sich bereits vollständig im Überstand befinden würde. Wieweit dies zutrifft, wurde nicht näher untersucht, da es lediglich darauf ankam, reproduzierbare Bedingungen einzuhalten. Der Blutgehalt des Lebergewebes kann nach HOLZER (1956) bei diesen Untersuchungen vernachlässigt werden.

2. Bei der *Aktivitätsbestimmung* zeigte sich, daß unter den eingehaltenen Bedingungen, bevor die Reaktion ausgelöst wurde, nur eine äußerst geringe Extinktionsänderung festzustellen war. Sie betrug bei der ADH-Bestimmung in 5 min etwa 0,035. Da nach dem Start durch Acetaldehyd gewöhnlich in weniger als 60 sec eine Extinktionsdifferenz von 0,100 abzulesen war, konnte der geringe vorausgehende Extinktionsabfall unberücksichtigt bleiben. Bei der Messung geringerer Aktivitäten — wenn die Reaktion mehr als 2 min für eine Extinktionsänderung von 0,100 benötigte — wurde er aber gesondert gemessen und berücksichtigt. Bei der Bestimmung der Transaminase wurde, durch eine Wartezeit von 5 min vor dem Start mit  $\alpha$ -Ketoglutar säure, der Gang bis zum Stillstand abgewartet und erst dann mit dem Substrat ausgelöst. In den späteren Autolyse-Versuchen zeigte sich, daß im Gegensatz zu frischer Leber bei zunehmender Autolyse der vorangehende Extinktionsabfall geringer war. Während bei frischer Leber in 5 min 0,035 gemessen wurden, konnten nach einer Autolyse von 32 Std bei 37° C nur 0,020 festgestellt werden.

3. *Bezugspunkt der Fermentaktivitäten.* Die Fermentaktivitäten wurden jeweils auf 1 mg Protein bezogen und auf 1 g Leberfeuchtgewicht umgerechnet.

4. *Autolyse.* Die nicht sicher einzuschätzenden qualitativen und quantitativen Veränderungen des Proteins unter postmortalen Bedingungen — vor allem durch

Autolyse — gaben Anlaß zu Untersuchungen über die Beziehung zwischen Proteingehalt der Leber und Fermentaktivität, um zu klären, ob der Bezugspunkt, das Protein, durch Autolyse verändert wird.

a) *Autolyse von Rattenleber bei 37° C.* Bestimmung der ADH- und GOT-Aktivität. Sofort nach Tötung durch Genickschlag wurde die gesamte Leber entnommen. Um gleiche Versuchsbedingungen hinsichtlich Zutritt von Luft, Verdunstung und Durchwärmung zu schaffen, wurden die Leberstückchen beim Abwiegen so zugeschnitten, daß sie annähernd gleiche Form hatten und als zusammenhängendes Stück je 1 g wogen. Die Stückchen wurden einzeln in Glasschälchen von 3 cm Durchmesser gelegt und ein mit physiologischer NaCl-Lösung getränkter Zellstoffbausch am Deckel des Schälchens befestigt. Die erste Bestimmung wurde sofort nach der Tötung durchgeführt. Die Leberstückchen in den Glasschälchen wurden bei konstant 37° C der Autolyse unterworfen.

b) *Autolyse von Menschenleber.* In diesen Versuchen wurde die Leber in situ belassen, nur jeweils zu den angegebenen Zeiten nach Eröffnung der Bauchhöhle ein Leberstück entnommen. Zwischen den Entnahmen wurde die Bauchhöhle wieder verschlossen. Es wurden ADH und GOT bestimmt. *Leiche 1*, männlich, 55 Jahre, Suicid durch Halsschnitt. 1. Entnahme: 7 hpm, Lebertemperatur 32° C. Nach der 1. Entnahme wurde die Leiche bei +3° C im Kühlschrank aufbewahrt. 2. Entnahme: 31 hpm, Lebertemperatur 12° C. Nach der 2. Entnahme wurde die Leiche weiter bei +3° C aufbewahrt. 3. Entnahme: 53 hpm, Lebertemperatur 9° C. *Leiche 2*, männlich, 22 Jahre, Autounfall, Berstungsbruch des Schädels. 1. Entnahme: 27 hpm, Lebertemperatur 23° C. Die Leiche war bis zur 1. Entnahme bei 20° C Außentemperatur gelegen. Nach der 1. Entnahme wurde die Leiche weiterhin bei 20° C aufbewahrt. 2. Entnahme: 51 hpm, Lebertemperatur 21° C. Nach der 2. Entnahme wurde die gesamte Leber herausgenommen und in verschlossenem Glas bei 20° C aufbewahrt. 3. Entnahme: 75 hpm, Lebertemperatur 20° C (beginnende Fäulnis).

5. Die *Messung von Fermentaktivitäten* aus der Reaktionsgeschwindigkeit ist an bestimmte Voraussetzungen gebunden. Nach LEUTHARDT (1959) ist die sich aus dem annähernd geradlinig verlaufenden Anfangsteil der Zeit-Umsatz-Kurve ergebende Reaktionsgeschwindigkeit der Fermentkonzentration proportional unter der Voraussetzung, das Ferment sei substratgesättigt; dies gilt auch umgekehrt, wenn die Rückwärtsreaktion mit meßbarer Geschwindigkeit verläuft. Die Aktivitätsbestimmungen wurden meist nach den von SCHMIDT u. SCHMIDT angegebenen Konzentrationen vorgenommen (1958a). Ein Zusatz von EDTA zum ADH-Ansatz erfolgte nicht, da er im Falle der ADH zu falschen Werten führt (Komplexbildung mit  $Zn^{+2}$ ). Durch Zugabe von  $Zn^{+2}$  war die Reaktionsgeschwindigkeit nicht zu steigern. Wenn unter Sättigungsbedingungen auf die Fermentkonzentration geschlossen werden darf, kann ebenso, durch eine nachgewiesene umgekehrte Proportionalität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Fermentkonzentration, der Schluß gezogen werden, daß im benutzten Ansatz tatsächlich Sättigungsbedingungen vorgelegen haben. Die Prüfung der Sättigungsbedingungen durch Einsatz doppelter Mengen an Überstand ergab die Hälfte der bei einfacher Menge gemessenen Reaktionszeiten unter sonst gleichen Bedingungen.

6. *Zur Bewertung der histologischen Untersuchungen.* Die Beurteilung des Leberzustandes erfolgte, um mit Absicht eine nosologische Diagnose zu vermeiden, unter Berücksichtigung der Kapselbreite, des Zwischengewebes (wobei unter Zwischengewebe das von der Kapsel und dem Gefäßgewebe ausgehende Bindegewebe sowie das Begleitgewebe der Gallengänge verstanden wurde) und des perilobulären Gewebes. Weiterhin wurde darauf geachtet, ob das Leberläppchen insgesamt erhalten oder vom Bindegewebe bereits durchbrochen war. Zugleich

wurde der Zellgehalt überprüft und nach Stärkegraden eingeteilt. Eine Übersicht über den Fettgehalt sollte durch Einteilung in diffuse, periphere und zentrale Fettanreicherung erreicht werden. Auf cytologische Einzelheiten wurde zunächst nicht Rücksicht genommen. Mit dieser Einteilung sollte eine möglichst allgemeine Erfassung des Leberzustandes erreicht werden.

## B. Einzelergebnisse

### *I. Bestimmung der ADH-Aktivität in der menschlichen Leber nach dem Tode*

Die in Tabelle I zusammengestellten Ergebnisse wurden nach folgenden Gesichtspunkten geordnet: Zeitpunkt der Entnahme nach dem Tode = hpm, Proteingehalt, ADH-Aktivität, Alter und Geschlecht, pathologisch-anatomische Diagnose und histologischer Befund (für 32 Fälle). Die Fälle sind nach steigender Aktivität geordnet. Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß unter den gegebenen Bedingungen kein deutlicher Zusammenhang zwischen ADH-Aktivität und den hpm besteht. Aktivitäten von 80,5 E nach 53 Std pm stehen solchen von 9,2 nach 4 Std pm gegenüber. Die Ferment-Inaktivierung dürfte im Falle der ADH in besonders hohem Maße temperaturabhängig sein (worauf noch näher einzugehen sein wird). Die zu den vorliegenden Versuchen verwandten Leichen wurden unter unterschiedlichen und unkontrollierbaren Temperaturbedingungen aufbewahrt. Die Leichen wurden entweder unmittelbar nach dem Tode oder erst einige Stunden später in Kühlräumen bei  $3 \pm 1^{\circ}\text{C}$  gelagert. Ein Vergleich zwischen Fermentaktivität und den hpm ist daher aus diesem Grunde problematisch. Wenn auch die ADH-Aktivität nach dem Tode abfällt, wie die Autolyseversuche beweisen, so wird der Abfall bei den vorliegenden Bedingungen quantitativ überdeckt von anderen Faktoren. Es dürfte schwierig sein, jeden einzelnen Faktor näher zu bestimmen. Die Aktivität der ADH scheint außerdem nicht nur durch intrahepatische Bedingungen bestimmt zu werden (FAZEKAS 1961). Die Aktivitätsbestimmungen erlauben nur eine Aussage über den Kurvenverlauf nach dem Tode, über die Todeszeit kann auf Grund der aufgefundenen Aktivitäten nichts ausgesagt werden. Eine Abhängigkeit der Fermentaktivität von pathologisch-anatomisch festgestellten Todesursachen ist ebenfalls nicht erkennbar. Chronische Erkrankungen mit relativ hohen Aktivitäten stehen plötzlichen Todesfällen mit niedrigeren gegenüber. SCHMIDT u. WILDHIRT (1958) fanden bei Untersuchungen von 10 Leberbiopsien eine Mittelwertigkeit von  $499 \pm 418$  Bücher-Einheiten je 1 g Leber. Es zeigt sich demnach sowohl in den eigenen Bestimmungen wie in den vitalen Punktaten eine bemerkenswert hohe Schwankungsbreite der ADH-Aktivität überhaupt. Weiterhin ist aus Tabelle I ersichtlich, daß eher zwischen der ADH-Aktivität und dem Ausmaß der mesenchymalen Reaktion des Lebergewebes ein Zusammenhang zu bestehen scheint. Schon eine grobe Übersicht zeigt bei niederen Aktivitäten häufiger Bindegewebe und Zellen in den

Tabelle 1

1	2	3	4	5	6	7
Nr.	♀ ♂	Alter Jahre	hpm	Protein g FG mg	ADH-E mg Protein	Todesursache
1	♂	74	63	82	1,7	Lungenembolie
2	♂	—	24	85	4,7	Pickwick-Syndrom
3	♂	84	40	75	4,8	Nur Leberprobe
4	♂	62	24	88	6,0	Bronchopneumonie
5	♂	60	32	82	6,9	Hirntumor, Zustand nach Operation
6	♂	4	48	76	7,4	Retikulose, Hepato- megalie
7	♂	2 Mon.	36	88	7,8	Toxikose
8	♂	44	42	99	8,6	Gallenblasencarcinom, Stauungsikterus
9	♂	33	35	102	8,8	Lungenembolie
10	♂	54	4	56	9,2	Leberdystrophie
11	♂	82	20	68	9,8	Urämie
12	♂	65	41	100	10,3	Unfall, Schädel- fraktur
13	♂	65	35	66	11,0	Subdurales Hämatom
14	♂	23	40	63	11,1	Aortenisthmusstenose
15	♂	66	71	77	11,6	Schädelfraktur
16	♂	71	38	71	12,5	Myokardinfarkt
17	♂	72	20	117	12,9	Myokardinfarkt
18	♂	50	23	87	15,9	Subarachnoidalblutung
19	♂	41	22	87	16,1	Lungenembolie
20	♂	70	46	54	16,5	Akute myeloische Leukose
21	♂	32	72	80	17,5	Suicid, Kopfschuß
22	♂	48	25	119	18,3	Hirntumor
23	♂	9	66	109	18,3	Schädelfraktur
24	♂	62	25	125	91,5	Encephalitis
25	♂	79	41	132	21,2	Myokardinfarkt
26	♂	15	11	104	25,4	E 605-Vergiftung
27	♂	1	22	77	28,1	Blasengehirn
28	♂	65	43	97	28,8	Plötzlicher Tod, Ursache unbekannt
29	♂	55	7	94	31,8	Suicid, Halsschnitt
30	♂	22	27	71	32,7	Berstungsbruch des Schädels
31	♂	63	31	73	43,0	Ovarialcarcinom
32	♂	26	48	77	45,7	Unfall, Schädelbruch
33	♂	5	53	72	80,5	Pneumonie, Emphy- sem
34	♂	79	30	87	4,9	Magencarcinom, Kachexie
35	♂	0	19	65	5,0	Asphyxie
36	♂	80	31	72	6,7	Lungenembolie, Rectumcarcinom
37	♂	56	38	94	7,0	Bronchialcarcinom, Operation
38	♂	56	24	75	21,8	Mediastinaltumor, Hirnmetastasen und Hirndruck
39	♂	80	20	82	109,0	Barbituratvergiftung, Pneumonie

Tabelle 1

1 Kapsel	2 Zwischen- gewebe	3 Perilobu- läres Binde- gewebe	4 Intralobu- läres Binde- gewebe	5 Zellen				6 Fett		
				1.	2.	3.	4.	d.	p.	z.
+	+	+++	+			+	+		+	
++	++	+++	++	++		++			+	
+	++	+++	+	++	+	++			+	
0	++	+++	+	++		+	+			+
+	+	++	+			++			+	
0	+	+++	++			++	++		+	
0	0	+	+			++			+	
+	0	+	0			+			+	
+	0	+	0			+			+	
0	0	++	0			++				
+	+	++	0							
0	0	++	0			+			++	+
0	0	0	0							
+	+	+	0			+				
+	0	+	0			+				
0	0	+	0						++	
0	0	+	0						++	
0	0	++	0			++			+	
0	0	+	0		+	+		++		
0	0	0	0						+	
0	0	0	0							
0	0	0	0			+				
+	0	+	0							
0	0	+	0							
+	+	+	0		+				+	0
0	+	0	0						+	+
+	0	+	0							
+	0	+	0							
0	0	0	0							

bezeichneten Bezirken als bei höheren Aktivitäten. Da die spezifische Aktivität auf eine konstante Proteinmenge bezogen wird, ist sie unabhängig von dem absoluten Eiweißgehalt des Gewebes. Deshalb kann die im Verhältnis zum Lebergewebe geringfügige Zunahme des Bindegewebes keine mengenmäßige so ausgeprägte Variation der Aktivität bedingen, wohl aber ein Symptom eines veränderten Leberzustandes sein. Die spezifische Aktivität gibt in einem gewissen Ausmaß deshalb Auskunft über die Qualität.

## II. Autolyseversuche

Zur Klärung dieser Ergebnisse, besonders hinsichtlich der Aktivitätsabnahme nach dem Tode, wurden Autolyseversuche an Ratten- und Menschenleber unter kontrollierbaren Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 2. *Autolyse: Rattenleber 37° C, ADH- und GOT-Aktivität bezogen auf 1 mg Protein*

N	hpm	Protein 1 g Frischgewicht	ADH-E mg Protein	GOT-E mg Protein
1	0	107 mg = 100 %	8,1 = 100 %	19,4 = 100 %
	4	99 mg = 92 %	7,1 = 88 %	41,2 = 212 %
	8	78 mg = 73 %	1,8 = 22 %	50,4 = 260 %
	24	34 mg = 32 %	0,64 = 8 %	8,2 = 42 %
	28	17 mg = 16 %		4,5 = 23 %
	32	15 mg = 14 %		4,0 = 21 %
2	0	87 mg = 100 %	17,1 = 100 %	28,1 = 100 %
	4	80 mg = 92 %	10,2 = 60 %	38,2 = 136 %
	8	85 mg = 86 %	2,2 = 13 %	52,5 = 187 %
	24	53 mg = 61 %	0,3 = 2 %	22,0 = 79 %
	28	49 mg = 56 %		15,5 = 55 %
	32	14 mg = 16 %		11,9 = 42 %
3	0	82 mg = 100 %	14,2 = 100 %	26,1 = 100 %
	12	73 mg = 89 %	0,9 = 6 %	37,5 = 144 %
	16	61 mg = 74 %	0,5 = 3 %	32,0 = 123 %
	20	41 mg = 50 %	0,3 = 2 %	34,6 = 133 %
4	0	100 mg = 100 %	9,8 = 100 %	23,0 = 100 %
	12	89 mg = 89 %	0,6 = 6 %	43,0 = 187 %
	16	75 mg = 75 %	0,3 = 3 %	32,0 = 139 %
	20	56 mg = 56 %	0,3 = 3 %	31,5 = 137 %

1. *Autolyse: Ratte.* Während der Autolyse nimmt die Proteinmenge nahezu regelmäßig ab. Nach 32 Std ist die Proteinmenge auf etwa 15% des Ausgangswertes abgesunken (Tabelle 2 und 3). Die Aktivität der ADH bezogen auf jeweils 1 mg des noch vorhandenen Proteins ist nach 8 Std bereits auf 22 bzw. 13% und nach 24 Std auf 8 bzw. 1,8% des Ausgangswertes abgesunken (Tabelle 2). Die Aktivität der GOT bezogen auf jeweils 1 mg des noch vorhandenen Proteins steigt zunächst an bis auf über 200% des Ausgangswertes in den ersten 12 Std und fällt



dann ab, unterschiedlich rasch, auf 21 bzw. 42% des Ausgangswertes nach 32 Std (Tabelle 2).

Die Aktivität der ADH bezogen auf 1 g Leberfeuchtgewicht ist nach 8 Std auf 16 bzw. 11% und nach 24 Std auf 2,3 bzw. 0,9% des Aus-

Tabelle 3. *Autolyse: Rattenleber 37° C, ADH- und GOT-Aktivität bezogen auf 1 g Leber (Feuchtgewicht)*

N	hpm	Protein	ADH-E	GOT-E
		1 g Feuchtgewicht	1 g Feuchtgewicht	1 g Feuchtgewicht
1	0	107 mg = 100%	870 = 100%	2080 = 100%
	4	99 mg = 92%	690 = 73%	4070 = 194%
	8	78 mg = 73%	140 = 16%	3930 = 189%
	24	34 mg = 32%	20 = 2%	278 = 13%
	28	17 mg = 16%		71 = 3%
	32	15 mg = 14%		61 = 3%
2	0	87 mg = 100%	1480 = 100%	2440 = 100%
	4	80 mg = 92%	820 = 55%	3060 = 125%
	8	75 mg = 86%	167 = 11%	3930 = 161%
	24	53 mg = 61%	14 = 1%	1060 = 43%
	28	49 mg = 56%		760 = 31%
	32	14 mg = 16%		153 = 16%
3	0	82 mg = 100%	1150 = 100%	2240 = 100%
	12	73 mg = 89%	68 = 6%	2750 = 123%
	16	61 mg = 74%	28 = 2%	1970 = 88%
	20	41 mg = 50%	14 = 1%	1410 = 63%
4	0	100 mg = 100%	980 = 100%	2300 = 100%
	12	89 mg = 89%	49 = 5%	3800 = 165%
	16	75 mg = 75%	23 = 2%	2390 = 104%
	20	56 mg = 56%	17 = 2%	1720 = 75%

Tabelle 4. *Autolyse: Menschenleber. Entnahme jeweils in situ. ADH- und GOT-Aktivität*

N	hpm	Leber Temperatur ° C	Protein mg	ADH-E	GOT-E
1	7	32	94	2970 = 100%	2530 = 100%
	31	12	100	2450 = 82%	2660 = 105%
	53	9	98	2040 = 69%	3330 = 132%
2	27	23	71	2330 = 100%	5500 = 100%
	51	21	68	1460 = 62%	3470 = 63%
	75	20	68	1110 = 47%	3800 = 69%

gangswertes abgesunken. Die Aktivität der GOT bezogen auf 1 g Leberfeuchtgewicht steigt zunächst an bis auf 175% des Ausgangswertes in den ersten 8—12 Std und ist nach 32 Std auf 2,9 bzw. 16% abgefallen (Tabelle 3).

2. *Autolyse: Mensch.* Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Es zeigt sich ein Abfall der ADH-Aktivität,

ein Anstieg der GOT-Aktivität bei nahezu gleichbleibendem Proteingehalt. Der Abfall der ADH-Aktivität ist in gleichen Zeiten bei verschiedenen Leichen unterschiedlich. Die GOT-Aktivität hat das Maximum ihres Anstieges nach etwa 27 Std wahrscheinlich bereits erreicht und fällt nun ab. Der Schluß, den Anstieg der GOT immer in die ersten 27 Std zu verlegen, ist jedoch nicht gerechtfertigt, da dies nur unter kontrollierbaren Autolysebedingungen beobachtet wurde.

Tabelle 5. Ratte. ADH-Aktivität: Leber

N	Protein 1 g Feucht- gewicht	ADH-E 1 mg Protein
A 9	87 mg	14,3
B 10	92 mg	13,9

untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Die Gruppe B umfaßt 10 Ratten, die 1—5 Tage vorher, einige mehrmals, ein Barbitursäurepräparat erhalten hatten. Ein Unterschied in der Aktivität war nicht festzustellen.

#### Allgemeine Ergebnisse

Bei vergleichenden Bestimmungen der Aktivität eines Fermentes, besonders eines der Leber, ergeben sich Schwierigkeiten dadurch, daß die Bezugspunkte sich verändern können, etwa durch wechselnden Wasser- oder Proteingehalt der Parenchymzelle. Wenn unter physiologischen Bedingungen die Bezugspunkte als verhältnismäßig gleichbleibend vorausgesetzt werden können, sind sie in einer krankhaft veränderten Leber und, in noch höherem Maße, unter postmortalen Bedingungen nicht von vornherein als konstant anzusehen. Die Problematik dieser Bezugspunkte wurde von E. und F. W. SCHMIDT und E. WILDHIRT (1958a) ausführlich erörtert bei den Bestimmungen der Aktivität verschiedener Fermente in Leberpunkaten bei unterschiedlichen Krankheiten. Eine festgestellte Aktivität könnte 1. auf den DNA-Gehalt des Gewebes, 2. auf das Leberfeuchtgewicht (FG) und 3. den löslichen Anteil des Leberproteins bezogen werden. Der DNA-Gehalt des Gewebes als Bezugsgröße der Fermentaktivität ist bei Organen mit stark wechselndem Bindegewebsanteil deshalb als unzuverlässig anzusehen, weil dem DNA-Gehalt die Gesamtkernzahl eines Gewebes zugrunde liegt, bei Lebergewebe aber neben den Kernen der Parenchymzellen alle Zellkerne, auch mesenchymaler Herkunft, in die Berechnung eingehen würden. Für die Leber, deren bindegewebige Anteile besonders unter pathologischen Bedingungen stärker schwanken, wäre die gemessene Fermentaktivität, bezogen auf den DNA-Gehalt einer bestimmten Lebermenge, zu sehr abhängig vom wechselnden

3. Bestimmung der ADH-Aktivität in der Rattenleber. Um eine Kontrolle über die unter postmortalen Bedingungen beobachteten ADH-Aktivitäten zu erhalten, wurden bei 19 Ratten die Leber unmittelbar nach dem Tode (durch Geniekschlag)

Bindegewebsgehalt der Leber. SCHMIDT, SCHMIDT und WILDHIRT (1958a) fanden in mesenchymalen Gewebsanteilen der Leber niedrige Aktivitäten. Wenn als Bezugspunkt der Fermentaktivität das Feuchtgewicht herangezogen würde, könnte auch eine Zunahme des Bindegewebes einen inkonstanten Bezugspunkt bedingen. Wird die Fermentaktivität der einzelnen Parenchymzelle als eine bestimmte Größe angesehen, muß jede Art von Wasseraufnahme der Zelle oder Speicherung anderer Substanzen das Verhältnis von Feuchtgewicht zu Zellzahl beeinflussen zuungunsten der Fermentaktivität. Bei Untersuchungen unter postmortalen Bedingungen — wenn ohne Auswahl jede Leber untersucht wird — treten noch weitere Fehlermöglichkeiten auf. Zu diesen gehören nicht nur vermehrter Blutgehalt, etwa bei Stauungszuständen, verminderter Blutgehalt, Eiweißspeicherung, trübe Schwellung, sondern noch andere postmortale Veränderungen wie wechselnder Flüssigkeitsgehalt des Lebergewebes durch Austrocknung. Deshalb kann auch das Feuchtgewicht nicht in jedem Falle als ein konstanter Bezugspunkt angesehen werden. Diese Fehlermöglichkeiten entfallen, wenn anstatt des Feuchtgewichtes das Protein als Bezugspunkt eingesetzt wird. Dieser Bezugspunkt könnte nur dadurch inkonstant sein, daß die Proteinmenge der Parenchymzelle durch Zu- oder Abnahme wechselt. Bei akuter Hepatitis ist mit einem niedrigeren Proteingehalt in der Leber zu rechnen. Diese Möglichkeit muß bei vitalen Bestimmungen berücksichtigt werden, aber auch postmortal sinkt der mit der Biuret-Reaktion erfaßbare Proteingehalt ab, besonders unter Bedingungen der Autolyse. Dies belegen die durchgeführten Autolyseversuche. Der beträchtliche Abfall des Proteingehaltes während der Autolyse stand in keinem Verhältnis zur Abnahme der ADH-Aktivität oder Zunahme der GOT-Aktivität. Hier wäre deshalb die Bezugnahme auf das ursprüngliche Leberfeuchtgewicht vor Beginn der Autolyse am geeignetsten. Deshalb wurde auch in diesen Versuchen das Feuchtgewicht als Bezugspunkt eingesetzt. Durch Vergleich der Bezugspunkte, Proteingehalt und Feuchtgewicht, wird die unterschiedliche Höhe der Aktivitäten deutlich. Ein Anstieg des Proteingehaltes einer gewichtsmäßig bestimmten Lebermenge wurde häufig beobachtet, wenn mehrere Entnahmen aus der menschlichen Leber in situ vorgenommen wurden. Während kurz nach dem Tode bei Einschnitten in die Leber gewöhnlich flüssiges Blut abstreifbar ist und die Leber eine pralle Konsistenz aufweist, erscheint die Leber zum Zeitpunkt des beobachteten Proteinanstieges trockener und schlaffer. Der Anstieg des Proteingehaltes wird also nur vorgetäuscht durch die Wahl des Feuchtgewichtes als Bezugspunkt.

Eine quantitative Bestimmung von Ferment-Aktivitäten ist nicht nur abhängig von den Methoden, die für die Messung benützt werden (GRAY 1960), sondern auch von der vorhergehenden Präparation des Gewebes.

Verschiedene Faktoren, wie die intracelluläre Lokalisation der Fermente, Coenzyme, Aktivatoren und Inhibitoren werden ebenso von Bedeutung sein wie die Permeabilität der Zellmembranen. Diese und wahrscheinlich noch weitere kaum erfaßbare Faktoren spielen eine Rolle für den Effekt, den die Präparation des Gewebes auf das Ausmaß der Fermentaktivität hat. So haben BONTING und ROSENTHAL (1960) die Aktivitäten der alkalischen Phosphatase und der Milchsäuredehydrogenase in Leber und Pankreas bestimmt und das Gewebe durch unterschiedliche Präparation zur Messung vorbereitet. Die höchsten Werte ergaben sich bei gefriergetrockneten Schnitten von 16  $\mu$ . Die Werte lagen 2—8mal höher als die durch andere Methoden erzielten. Bei Aktivitätsbestimmungen, die eine Aussage über die „Gesamtaktivität“ in der Zelle ergeben sollen, wären grundsätzlich die Methoden zu benutzen, mit der die höchsten Aktivitäten festgestellt werden.

Die an 39 Leichen zu verschiedenen Zeiten nach dem Tode durchgeführten Bestimmungen der ADH-Aktivität ergaben recht unterschiedliche Werte. Aus Tabelle 1 geht — ohne daß eine nähere Erörterung notwendig ist — hervor, daß ein Zusammenhang zwischen der festgestellten ADH-Aktivität und der Zeit, die seit dem Tode vergangen war, nicht zu erkennen ist. So waren oft 10 Std nach dem Tode geringere Aktivitäten als in anderen Fällen nach 50 oder 60 Std festzustellen. Ein sicherer Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt des eingetretenen Todes und der ADH-Aktivität besteht nicht. Möglicherweise sind hier die Ausgangsbedingungen von Bedeutung. Die untersuchten Leichen hatten verschiedene Todeszeiten, waren nach dem Tode unter nicht-einheitlichen Bedingungen gehalten worden. Wenn jede Leiche unter gleichartigen Verhältnissen nach dem Tode aufbewahrt worden wäre, etwa der Temperaturabfall bei allen konstant gewesen wäre, wären wohl andere Aktivitäten anzunehmen. Ein Zusammenhang zwischen Aktivität und Temperatur ergab sich in den Beobachtungen, in denen fortlaufend, einige Zeit nach dem Tode beginnend, die Aktivität bestimmt und gleichzeitig die Temperatur der Leiche, auch die der Leber, gemessen werden konnte. Die ADH-Aktivität fiel verhältnismäßig langsam ab, die GOT-Aktivität stieg über längere Zeit anhaltend an. Es kann damit gerechnet werden, daß die Aktivität nach dem Tode länger erhalten bleibt, wenn die Temperatur schnell abfällt. Wenn in einer Leber 24 Std nach dem Tode noch eine hohe Aktivität bestehen würde, könnte angenommen werden, daß wesentliche postmortale Veränderungen nicht vorgegangen sein können. Die Höhe der ADH-Aktivität ist deshalb, sofern sie nicht, wie noch erörtert werden soll, eine Diagnose des individuellen Leberzustandes bedeutet, mehr von äußeren Bedingungen nach dem Tode abhängig als etwa von der Todeszeit.

Dagegen ergab sich ein Zusammenhang zwischen ADH-Aktivität (ausgedrückt in Einheiten/mg extrahierbares Protein) und der Masse

des Bindegewebes in der Leber. Eine niedrigere Aktivität ging zusammen mit einem erhöhten Gehalt an Bindegewebe bei gleichzeitig strukturell veränderten Leberläppchen. Dies kann deshalb als sicher angesehen werden, weil die festgestellte Aktivität unbeeinflusst ist von einem möglichen Fehler durch den Bezugspunkt. Da nämlich die ADH-Aktivität auf das lösliche Protein bezogen wurde, kann sie nicht abhängig sein von einer Veränderung des Bezugspunktes durch wechselnden Bindegewebsgehalt. Eine Zunahme des Bindegewebes hat nur Einfluß auf Zu- oder Abnahme des *gesamten* löslichen Proteins. Die sog. mesenchymale Reaktion — es könnte auch von einer Aktivität des Bindegewebes gesprochen werden — zeigt einen Verlust spezifischer Qualitäten der Parenchymzelle an. Bei aktiver Cirrhose stellte FRENCH (1960) histochemisch niedrigere Enzymaktivitäten, als sie der Masse des wuchernden Bindegewebes entsprachen, fest.

Während in den Autolyseversuchen unter konstanten Bedingungen zwischen GOT- und ADH-Aktivität insofern eine eindrucksvolle Beziehung bestand, als die GOT innerhalb kürzerer Zeit bei einsetzender Autolyse stark anstieg, die ADH entsprechend rasch abfiel, konnten postmortal in der Leber so eindeutige Unterschiede nicht festgestellt werden. Über ein ähnliches Verhalten berichten HARTMANN und KLETT (1960) hinsichtlich Milch- und Glutaminsäuredehydrogenase, deren Aktivitäten zwischen der 3. und 10. Autolysestunde ansteigen, während die des Baranowski-Enzyms abfällt. Wenn also zu einem bestimmten Zeitpunkt hohe GOT- und niedrigere ADH-Aktivitäten bestehen würde, wäre ein Rückschluß sowohl auf den Grad der Autolyse wie auf den Zeitpunkt ihres Beginns möglich. Die Zunahme der GOT-Aktivität, der gleichzeitige Abfall der ADH-Aktivität, sowohl während der Autolyse wie in der Leber *in situ*, sind insofern aufschlußreich, als sie anzeigen — dies heben auch HARTMANN und KLETT (1960) für ihre Beobachtungen hervor, — daß die Autolyse kein ausschließlicher Zerstörungsprozeß ist, sondern ihren eigenen Stoffwechsel hat, der mit einem Zusammenbruch der Zelleistungen nicht identisch ist.

Über das postmortale Verhalten der ADH hinaus ergeben die Untersuchungen noch einen weiteren Gesichtspunkt. Die von E. und F. W. SCHMIDT u. WILDHIRT (1958) in vitalen Leberpunktaten gemessenen Werte zeigen, verglichen mit den post mortem festgestellten, daß auch bei vitalen Bestimmungen mit großen Schwankungen der ADH-Aktivität gerechnet werden muß. Nun erlauben enzymatische Messungen — Bestimmung der Enzymaktivität im isolierten Gewebe — nur einen bedingten Rückschluß auf die Aktivität bei bestehenden Gewebs- und Funktionszusammenhängen *in vivo*. Die beträchtliche Schwankungsbreite der gemessenen Aktivitäten erinnert jedoch an die ebenfalls großen Schwankungen der individuellen Abbau- und Ausscheidungsgröße des Alkohols. Zur Erklärung der unterschiedlichen Abbaugröße des Alkohols

wurden bisher mehr extra- als intrahepatische Bedingungen herangezogen. Die hier festgestellten von Fall zu Fall wechselnden ADH-Aktivitäten scheinen die Möglichkeit einer auch nur annähernden Vorberechnung eines zu erwartenden Alkoholumsatzes auszuschließen. Diese unterschiedlichen ADH-Aktivitäten wurden in allen untersuchten Fällen festgestellt. Zwischen vorausbestehenden Krankheiten, Todesursache und ADH-Aktivität war kein Zusammenhang erkennbar. Unterschiedliche Aktivitäten, oft sogar niedrigere, wurden auch bei plötzlich eingetretenem Tod durch Unfall gemessen. Die Bestimmung der ADH-Aktivität — auch nach dem Tode — scheint somit eine von Fall zu Fall stellbare individuelle Diagnose zu sein.

### *Zusammenfassung*

1. Die ADH und GOT-Aktivität der menschlichen Leber wurde zu verschiedenen Zeiten nach dem Tode bestimmt:

a) Nach dem Tode sind über verhältnismäßig lange Zeiten mehr oder weniger hohe ADH-Aktivitäten zwischen 2—100 E/mg Protein nachzuweisen.

b) Die Höhe der ADH-Aktivität ist mehr von äußeren Bedingungen nach dem Tode als vom Zeitpunkt des eingetretenen Todes abhängig.

c) Die Körper- und Lebertemperatur haben je nach dem Zeitpunkt der Bestimmung den größten Einfluß auf die Höhe der ADH-Aktivität.

2. Die Abhängigkeit der ADH- und GOT-Aktivitäten von postmortalen Bedingungen wurde durch Autolyseversuche überprüft.

a) Die ADH-Aktivität fällt bei 37° C ab, die GOT-Aktivität steigt primär an.

b) Anstieg und Abfall erfolgen bei niedrigerer Temperatur langsamer.

3. Die ADH-Aktivität nach dem Tode unterscheidet sich, abgesehen von extremen postmortalen Bedingungen, nicht wesentlich von der Aktivität in vitalen Leberpunkaten.

4. Die Höhe der ADH-Aktivität pro mg extrahierbares Protein wird von der Zunahme des Bindegewebes und seiner Beziehung zur Struktur des Leberläppchens mitbestimmt.

5. Die Möglichkeit einer individuellen Diagnose der ADH-Aktivität aus dem postmortalen Zustand wird erörtert.

### **Literatur**

- BEISENHERZ, G., H. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MAYER-AHREND u. G. PFLEIDERER: Diphosphofruktaldolase, Phosphoglyzerinaldehyddehydrogenase, Milchsäuredehydrogenase, Glycerophosphatdehydrogenase und Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. *Z. Naturforsch.* 8b, 555 (1953).
- BONNICHSEN, R. K., and H. THEORELL: An enzymatic method for the microdetermination of ethanol. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 3, 58—62 (1951).

- BONTING, L., and I. M. ROSENTHAL: Effects of the method of tissue preparation on the assay of tissue enzyme activities. *Nature (Lond.)* **185**, 686—687 (1960).
- FAZEKAS, I. G., B. RENGEI u. A. G. J. FAZEKAS: Die Wirkung der Nebennierenrindenfunktion auf die Aktivität der Alkoholdehydrogenase der Leber. *Arch. Toxikol.* **19**, 229—236 (1961).
- FRENCH, S. W.: Liver dehydrogenase activity in chronic alcoholism. *A.M.A. Arch. Path.* **69**, 303—313 (1960).
- GRAY, C. H.: Einige Interpretationsprobleme in der Enzymologie. I. Europ. Symposium, Klinische Enzymologie, Mailand 1960. Karger: Basel 1960.
- HARTMANN, F., u. H. J. KLETT: Histochemische, lipidbiochemische und enzymatische Untersuchungen während der Autolyse der Rattenleber. *Dtsch. Z. Verdau.- u. Stoffwechsellkr.* **20**, 250—256 (1960).
- HOLZER, H., SEDLMAYER u. M. KLESE: Bestimmung des Blutgehaltes von Leberproben zur Korrektur biochemischer Analysen. *Biochem. Z.* **328**, 176 (1956).
- LA DUE, J. S., and F. WROBLEWSKI: Clinical significance of SGO-Transaminase in heart and liver disease. *Circulation* **11**, 871 (1955).
- LARSEN, J. A.: Extrahepatic metabolism of ethanol in man. *Nature (Lond.)* **184**, 1236 (1959).
- LEUTHARDT, F.: Lehrbuch der physiologischen Chemie, 14. Aufl., S. 178. Berlin: W. de Gruyter & Co. 1959.
- MIRSKY, I. A., and N. NELSON: The rôle of the liver in ethyl alcohol oxidation. *Amer. J. Physiol.* **126**, 587 (1939).
- — The influence of the pancreas and the liver on the oxidation of ethyl alcohol. *Amer. J. Physiol.* **127**, 308—314 (1939).
- PFIEFFER, J.: Enzymatic determination in blood of so-called normal alcohol and its behaviour in blood in vitro. *Acta physiol. pol.* **12**, 309—318 (1961).
- REDETZKI, H., u. K. JOHANNSMIEIER: Grundlagen und Ergebnisse der enzymatischen Äthylalkoholbestimmung. *Arch. Toxikol.* **16**, 73—78 (1956).
- SCHMIDT, E., F. W. SCHMIDT u. E. WILDHIRT: (a) Vergleichende Aktivitätsbestimmungen von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels in der menschlichen und in der Rattenleber. *Klin. Wschr.* **36**, 172—176 (1958).
- — — (b) Vergleichende Aktivitätsbestimmungen von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels in der menschlichen Leber bei der akuten Hepatitis und ihren Ausheilungszuständen. *Klin. Wschr.* **36**, 227—233 (1958).
- — — (c) Vergleichende Aktivitätsbestimmungen von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels im menschlichen Serum und in Leberpunktaten bei Lebererkrankungen. *Klin. Wschr.* **36**, 280—287 (1958).
- — — (d) Vergleichende Aktivitätsbestimmungen von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels bei chronischen Leberentzündungen. *Klin. Wschr.* **36**, 611—616 (1958).
- THEORELL, H.: Kinetics and equilibria in the liver alcohol dehydrogenase system. *Advanc. Enzymol.* **20**, 31—48 (1958).
- , and R. BONNICHSEN: Studies on liver alcohol dehydrogenase. I. Equilibria and initial reaction velocities. *Acta chem. scand.* **5**, 1105—1126 (1951).
- WOLF, H. P., u. H. KLEIN: Zur Berechnung des DPN:DPNH-Quotienten im extramitochondrialen Raum der Leberzelle. Vortrag. Tagung der franz., deutschen u. schweiz. Biochemiker. Zürich 1959.

Prof. H. KLEIN, 69 Heidelberg, Voßstr. 2