

only if one or more of them or their degradation products permeate into the cells of the target organs. As to CoA, its uptake by cells after in vivo administration has not been demonstrated until now. An in vitro permeation of CoA or DPCoA through biological membranes has been demonstrated by BREMER et al.<sup>11</sup> on isolated mitochondria and by us on liver slices<sup>3,5</sup>.

The experiments reported here demonstrate a significant elevation of hepatic CoA in rats after i.v. administration of CoA. Both concentration and content of CoA in liver were increased by about 40%, corresponding to 5% of the amount injected. Since no rise in CoA blood concentration could be demonstrated after CoA injection, the gradual increase in hepatic CoA concentration during the first 15–60 min after injection seems not to be caused by a permeation into liver cells of intact CoA, but rather by some degradation product, possibly DPCoA.

In rat brain, no increase in content or concentration of CoA is observed after i.v. injection. The improvement in the stage of consciousness often observed in patients with endogenous liver coma shortly after initiation of treatment with cofactor, may therefore, be a result of an improved liver function rather than of an improvement in brain function due to an increase in cerebral CoA concentration.

Even though a marked increase in hepatic CoA content occurs in rats after injection of high doses of CoA, this permits no definite conclusion on what happens in human patients with severely decreased liver function. Regarding, however, the disturbances in cell wall function, which are generally connected with liver diseases<sup>9,12,13</sup>, a permeation of nucleotidic cofactors into cells of liver and even of brain would more likely take place in patients with liver coma than in healthy individuals.

The results of the experiments reported here, together with the clinical improvements observed after infusions of cofactors to our patients, suggest that administration of CoA could be responsible for the amelioration of consciousness in endogenous liver coma.

<sup>10</sup> CH. TREY and CH. S. DAVIDSON, in *Progress in Liver Diseases* (Eds. H. POPPER and F. SCHAFFNER; Grune & Stratton, New York 1970), vol. 3, p. 282.

<sup>11</sup> J. BREMER, A. WOJTCZAK and S. SKREDE, *Eur. J. Biochem.* 25, 190 (1972).

<sup>12</sup> TH. BÉRAUD and A. VANNOTTI, *Schw. med. Wschr.* 12, 281 (1955).

<sup>13</sup> G. LAUDAHN, *Z. ges. exp. Med.* 132, 346 (1959).

## Isoenzyme der alkalischen Phosphatase - Referenzwerte im jugendlichen Alter und Einfluss der Eiweissernährung

### Isoenzymes of Alkaline Phosphatase - Reference Values in Young People and Effects of Protein Diet

J. ŠTĚPÁN, H.-J. GRAUBAUM, W. MEURER und C. WAGENKNECHT

*Laboratorium für Endokrinologie und Metabolismus, 3. Medizinische Klinik, U nemocnice 1, CS-128 21 Praha 2 (Tschechoslowakei); 1. Institut für medizinische Chemie der Karls-Universität, Praha (Tschechoslowakei); und Institut für Physiologische und Biologische Chemie der Humboldt-Universität, Hessische Strasse 3-4, DDR-104 Berlin (Deutsche Demokratische Republik), 20. November 1975.*

**Summary.** In 260 normal students, 20–25 years old, the variation in the activities of serum alkaline phosphatase and its isoenzymes with sex, ABO blood groups, and protein intake were studied. The values are on the whole higher in males than in females. The activity of the intestinal isoenzyme was higher in subjects taking protein-rich diet than in those taking protein poor diet.

Die Bestimmung der Isoenzyme der alkalischen Phosphatase (EC 3.1.3.1) kann für die Früherkennung, differentialdiagnostische Abgrenzung und Verlaufskontrolle – vor allem bei Leber- und Knochen-Erkrankungen – von Bedeutung sein<sup>1–3</sup>. Die Abhängigkeit der Gesamtaktivität als auch der Isoenzyme der alkalischen Phosphatase von Alter, Geschlecht, Blutgruppenzugehörigkeit und fettreicher Ernährung ist in der Literatur beschrieben worden<sup>4–6</sup>. In dieser Arbeit wird das Verhalten der Isoenzyme bei unterschiedlicher Eiweissernährung unter Prüfung der Geschlechts- und Blutgruppenabhängigkeit berichtet.

**Material und Methoden.** 260 Medizinstudenten (93 Männer, 167 Frauen, Alter 20–25 Jahre, im Durchschnitt 22 Jahre) ernährten sich über zwei Wochen je eine Woche eiweissreich und eiweissarm. Als Sollwerte für eiweissreiche Ernährung waren über 20% Eiweiss-kcal, für eiweissarme unter 10% Eiweiss-kcal unabhängig vom Körpergewicht der Probanden vorgegeben. Richtlinie für tägliche Kalorienzufuhr: Männer 2600–3000, Frauen 2000–2500 kcal. Nach jeder Woche und vor der Versuchsdurchführung erfolgte je eine Blutentnahme.

Die Aktivitäten der Isoenzyme der alkalischen Phosphatase wurden bei 37°C in einem kombinierten Test-einsatz mittels L-Phenylalanin-Hemmung und Hitze-

inaktivierung bestimmt<sup>3</sup>. Die Präzision in der Serie wurde anhand von 84 Doppelwertbestimmungen ermittelt. Die Streuung beträgt für die Gesamtaktivität 0.6, Darmphosphatase 0.2, Leberphosphatase 0.4 und Knochenphosphatase 0.5 U/l. Die Daten wurden vor der statistischen Auswertung 3 Gruppen zugeordnet: Normalernährte, eiweissreichernährte und eiweissarmernährte Probanden. Die Verteilungsprüfung erfolgte mit dem  $\chi^2$ -Anpassungstest. Mittelwert und Streuung wurden anhand der transformierten Werte berechnet. Prüfungen auf Signifikanz wurden mit der Varianzanalyse und Duncan-Test sowie dem *t*-Test durchgeführt.

**Ergebnisse.** Die Verteilungsprüfung, getrennt nach Geschlecht und Ernährungsform, ergab für die Gesamt- und Isoenzymaktivitäten eine log-normale Verteilung.

<sup>1</sup> W. H. FISCHMAN, *Am. J. Med.* 56, 617 (1974).

<sup>2</sup> J. OHLEN, H. PAUSE and J. RICHTER, *Eur. J. clin. Invest.* 1, 445 (1971).

<sup>3</sup> J. ŠTĚPÁN, V. VOLEK and J. KOLÁŘ, *Clin. chim. Acta* 69, 1 (1976).

<sup>4</sup> F. C. SITZMANN und WENDLER, *Tägl. Praxis* 13, 105 (1972).

<sup>5</sup> W. THEFELD, H. HOFFMEISTER und E. W. BUSCH, *Dt. med. Wschr.* 99, 343 (1974).

<sup>6</sup> D. O'CARROLL, B. E. STATLAND, B. W. STEELE and M. D. BURKE, *Am. J. clin. Path.* 63, 564 (1975).

Die Mittelwerte und Streuungen der transformierten Verteilung sind für die Geschlechter in den Tabellen I und II angegeben. Die Enzymaktivitäten liegen bei den Männern signifikant höher ( $t$ -Test,  $p < 0.05$ ) als bei den Frauen. Die Probanden der Blutgruppe 0 und B haben jeweils eine höhere Darmphosphataseaktivität als die der Blutgruppe A und AB ( $p < 0.05$ ). Zu signifikanten Veränderungen unter dem Ernährungseinfluss kommt es nur bei der Darmphosphatase. Die Werte liegen bei eiweissreicher Ernährung höher als bei eiweissarmer. Da kein weiterer Ernährungseinfluss nachgewiesen werden

konnte, wurden die Enzymaktivitäten bei normaler Ernährung zur Angabe von Referenzwerten verwendet (Tabelle III). Aufgrund der grossen biologischen Streuung der Darmphosphatase ist von der Angabe ernährungsabhängiger Bereiche abzusehen.  
*Diskussion.* Die Veränderungen im Isoenzymmuster der alkalischen Phosphatase können auch bei unveränderter Gesamtaktivität Hinweise auf Krankheitsherde und -verläufe geben<sup>2,3,6</sup>. Die Grundlage für das Erkennen von Abweichungen im Isoenzymmuster bilden die Referenzwerte.

Tabelle I. Mittelwert und Streuung der transformierten Verteilung der Männer ( $\lg \bar{x}$  in U/l)  
 $\pm s$

| Alkalische Phosphatase | n  | normal           | Ernährungsform |                    |    |                    |
|------------------------|----|------------------|----------------|--------------------|----|--------------------|
|                        |    |                  | n              | eiweissreich       | n  | eiweissarm         |
| Gesamt-                | 93 | 1.5717<br>0.1080 | 82             | 1.5641<br>0.1050   | 81 | 1.5566<br>0.1890   |
| Darm- (0 + B)          | 47 | 0.7243<br>0.2200 | 40             | 0.7250 *<br>0.2100 | 42 | 0.5797 *<br>0.2118 |
| Darm- (A + AB)         | 46 | 0.3796<br>0.3300 | 42             | 0.3622 *<br>0.3045 | 39 | 0.3310 *<br>0.3245 |
| Leber-                 | 93 | 1.1322<br>0.1010 | 82             | 1.1188<br>0.0820   | 81 | 1.1272<br>0.1700   |
| Knochen-               | 93 | 1.2739<br>0.1740 | 82             | 1.2831<br>0.1450   | 81 | 1.2829<br>0.1300   |

\* Signifikanter Ernährungsunterschied ( $p < 0.05$ ) nach Varianzanalyse und Duncan-Test.

Tabelle II. Mittelwert und Streuung der transformierten Verteilung der Frauen ( $\lg \bar{x}$  in U/l)  
 $\pm s$

| Alkalische Phosphatase | Ernährungsform |                  |     |                    |     |                    |
|------------------------|----------------|------------------|-----|--------------------|-----|--------------------|
|                        | n              | normale          | n   | eiweissreich       | n   | eiweissarm         |
| Gesamt-                | 167            | 1.4829<br>0.1080 | 159 | 1.4711<br>0.1020   | 154 | 1.4653<br>0.1100   |
| Darm (0 + B)           | 84             | 0.5948<br>0.2300 | 77  | 0.6166 *<br>0.2200 | 74  | 0.4906 *<br>0.2600 |
| Darm (A + AB)          | 83             | 0.2666<br>0.3890 | 82  | 0.3499 *<br>0.2751 | 80  | 0.2720 *<br>0.3291 |
| Leber-                 | 167            | 1.0830<br>0.0850 | 159 | 1.0637<br>0.0800   | 154 | 1.0728<br>0.0900   |
| Knochen-               | 167            | 1.1661<br>0.1700 | 159 | 1.1457<br>0.1650   | 154 | 1.4757<br>0.1650   |

\* Signifikanter Ernährungsunterschied ( $p < 0.05$ ) nach Varianzanalyse und Duncan-Test.

Tabelle III. Referenzwerte der Aktivität der alkalischen Phosphatase und ihrer Isoenzyme für Männer und Frauen im Alter von 20–25 Jahren (im Durchschnitt 22 Jahre) (U/l)

| Alkalische Phosphatase | Männer |             |            | Frauen |             |            |
|------------------------|--------|-------------|------------|--------|-------------|------------|
|                        | n      | $\bar{x}_g$ | 2s Bereich | n      | $\bar{x}_g$ | 2s Bereich |
| Gesamt-                | 93     | 37.3        | 22.7–61.3  | 167    | 30.4        | 18.5–50.0  |
| Darm- (0 + B)          | 47     | 5.3         | 1.9–14.6   | 84     | 3.9         | 1.4–11.3   |
| Darm- (A + AB)         | 46     | 2.4         | 0.0–11.0   | 83     | 1.9         | 0.0–11.1   |
| Leber-                 | 93     | 13.5        | 8.5–21.6   | 167    | 12.1        | 8.2–17.9   |
| Knochen-               | 93     | 18.8        | 8.4–41.9   | 167    | 14.7        | 6.7–32.1   |

Verteilungsform: log-normal, T. 37 °C.

Die von uns benutzte Modifikation der Inaktivierungs-Inhibitions-Methode ist mit der elektrophoretischen Trennung der Isoenzyme der alkalischen Phosphatase gut vergleichbar und ihre Resultate waren mit dem Knochen- und Leberfunktionszustand ( $^{85}\text{Sr}$ -Test und  $\gamma$ -Glutamyl-transpeptidaseaktivität) korreliert<sup>3</sup>. Dieselbe Methodik wurde früher für die Ermittlung von Referenzwerten bei Erwachsenen (20–60 Jahren) und älteren Menschen (61–76 Jahre) benutzt. Im Vergleich dieser Werte ist eine Altersabhängigkeit gut nachweisbar.

Der von uns gefundene Geschlechtsunterschied und Verteilungstyp der Gesamtaktivität, als auch die Blutgruppenabhängigkeit der Darmphosphataseaktivität im Serum stimmen mit den Ergebnissen anderer Autoren überein<sup>7–9</sup>. Auffällig sind die hohen Knochenphosphatasewerte, die vermutlich den Abschluss der Wachstumsphase bei den Studenten widerspiegeln. Daraus resultiert wahrscheinlich die log-normale Verteilung der Knochenphosphatase und – da die Knochenphosphatase den Hauptanteil an der Gesamtaktivität stellt – die der Gesamtaktivität. Die log-normale Verteilung der Darm- und Leberphosphatase könnte auf Ernährungseinflüsse zurückzuführen sein.

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Qualität und Quantität der zugeführten Eiweiße ist für einige Enzyme nachgewiesen worden<sup>10,11</sup>, diese Befunde lassen sich aus den Stoffwechselprozessen erklären. Die Aufgabe der Darmphosphatase in den Absorptionsprozessen und ihr Ansteigen im Serum nach fettreicher Ernährung sind gut bekannt<sup>9,11,12</sup>. Ein Ansteigen der Darmphosphatase im Serum fanden wir auch bei eiweissreicher Ernährung, ohne den Fettanteil der Nahrung streng zu kontrollieren. Beide Ernährungseinflüsse auf die Darmphosphatase sind in Tierexperimenten nachgewiesen worden<sup>13</sup>.

<sup>7</sup> R. I. A. FENUKU and A. K. FOLI, Clin. chim. Acta 60, 303 (1975).

<sup>8</sup> M. WERNER und R. E. TOLLS, Z. klin. Biochem. 8, 105 (1970).

<sup>9</sup> L. BECKMAN, T. OLIVECRONA and O. HERNELL, Hum. Hered. 20, 569 (1970).

<sup>10</sup> B. WIRTHGEN, H. BERGNER und H. MÜNCHOW, Arch. Tierernähr. 17, 281 (1967).

<sup>11</sup> H.-J. GRAUBAUM, D. BECKER, B. NACK und C. WAGENKNECHT, Zbl. Pharmak. 114, 793 (1975).

<sup>12</sup> B. A. WALKER, L. C. EZE, M. C. K. TWEEDIE and D. A. PRICE EVANS, Clin. chim. Acta 35, 433 (1971).

<sup>13</sup> K. ONO, Acta histochem. 51, 124 (1974).

## Changes in Dopamine $\beta$ -Hydroxylase Activity of Monkey Plasma with Age

T. KATO, K. IKUTA, T. NAGATSU<sup>1</sup> and K. TAKAHASHI<sup>2</sup>

Department of Biochemistry, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University, Chikusa-ku, Nagoya 464 (Japan); and Department of Biochemistry, Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama, Aichi 484 (Japan), 22 December 1975.

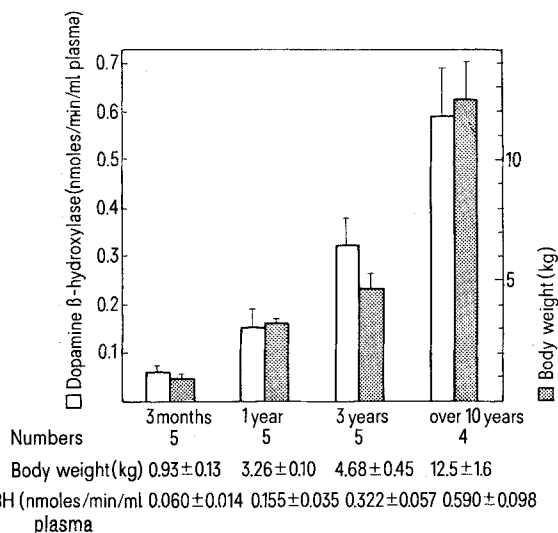
**Summary.** Plasma dopamine  $\beta$ -hydroxylase activity of Japanese monkeys (*Macaca fuscata fuscata*) increased with age, and the developmental changes were similar to those of human beings. However, the adult level plasma DBH activity of various monkey species was much lower than that of human beings.

Dopamine  $\beta$ -hydroxylase (DBH) activity in human blood (activity per ml serum or plasma) is relatively high, compared with that in other animals<sup>3,4</sup>, and increases with age for the first 2 or 3 years of life to a constant adult level<sup>5,6</sup>. Rat blood DBH activity per ml serum also increases after birth, but reaches a peak at 2–3 weeks of age, then decreases up to about 10 weeks to a constant

adult level (about 1% of human level)<sup>7,8</sup>. The rapid rise in development and relatively high adult level of DBH activity in human blood is considered to be attributed to the erect posture in human beings.

We have examined developmental changes in DBH activity of monkey blood in order to examine whether or not the developmental changes in human beings are similar to those in other primates.

Plasma samples were obtained by venipuncture with heparin as anticoagulant. DBH activity was determined by sensitive dual-wave-length spectrophotometry based on the spectrophotometric method of NAGATSU and UDENFRIEND<sup>4</sup>, as described by KATO et al.<sup>9</sup>. The incubation mixture (total volume 1.0 ml) contained: 400  $\mu\text{l}$  of 4-fold diluted plasma, 200  $\mu\text{mol}$  of sodium acetate buffer, pH 5.0, 10  $\mu\text{mol}$  of *N*-ethylmaleimide, 1 nmol of



Developmental changes of plasma dopamine  $\beta$ -hydroxylase activity in Japanese monkeys (*Macaca fuscata fuscata*). Values are expressed in mean  $\pm$  SEM.

<sup>1</sup> We thank Dr. K. NOZAWA, Dr. O. TAKENAKA and Mr. T. SHOTAKE (Primate Research Institute, Kyoto University) for their help in collecting monkey blood samples.

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama, Aichi 484, Japan.

<sup>3</sup> R. WEINSHILBOUM and J. AXELROD, Circulation Res. 28, 307 (1971).

<sup>4</sup> T. NAGATSU and S. UDENFRIEND, Clin. Chem. 18, 980 (1972).

<sup>5</sup> R. M. WEINSHILBOUM and J. AXELROD, N. Engl. J. Med. 285, 938 (1971).

<sup>6</sup> L. S. FREEDMAN, T. OHUCHI, M. GOLDSTEIN, F. AXELROD, I. FISH and J. DANCIS, Nature, Lond. 236, 310 (1972).

<sup>7</sup> T. NAGATSU, T. KATO, Y. NUMATA (Sudo), K. IKUTA, H. UMEZAWA, M. MATSUZAKI and T. TAKEUCHI, Nature, Lond. 251, 630 (1974).

<sup>8</sup> H. KUZUYA, T. IKENO, K. IKENO, T. KATO and T. NAGATSU, Experientia 32, 16 (1976).

<sup>9</sup> T. KATO, H. KUZUYA and T. NAGATSU, Biochem. Med. 10, 320 (1974).