



Fig. 2. Photographische Aufnahmen der Oszillrogramme. a) Adenin (0,01 %) in Nährösung (der Einschnitt -A-); b) Hypoxanthin aus Adenin in 20 h. Kultur von *Escherichia coli* (der Einschnitt -Hx-).

logie; e) praktische Ausnützung der Analysen in der technischen Mikrobiologie. Die Oszillopolarographie der Bestandteile der Nucleinsäuren hat den Vorzug sowohl vor der klassischen Polarographie³ und laufend benutzten Spektrophotometrie als auch vor der zeitlich langsameren Papierchromatographie (Fig. 2a, b).

Summary. Oscillographic polarography with alternating current was used for following the course of utilisation and metabolism of some amino acids, purine and pyrimidine bases, similarly as their nucleosides and nucleotides in the washed suspensions of resting cells and in growing cultures of *Escherichia coli*. The 'Polaroscope P-524' was used with mercury dropping electrode. The method was described for the oscillopolarographic investigation of activity of some bacterial enzymes, as for example: asparaginase, some nucleosidases and enzymes involved in the cleavage of nucleosides.

D. KALÁB

Bioveta, Ivanovice (Forschungsstelle) na Hané (Tschechoslowakei), 15. Februar 1961.

STUDIORUM PROGRESSUS

Untersuchungen über den Fettstoffwechsel bei Ratten. (Kombinierte akute und chronische Fettüberfütterung bei normaler bzw. atherogener Grundkost)

Einleitung

Bei der zunehmenden Bedeutung der Abnützungs-krankheiten des Gefäßsystems ist das Studium aller mit dem Fettstoffwechsel in Zusammenhang stehenden Probleme stark in den Vordergrund getreten. Sein enger Zusammenhang mit der Atherosomatose ist unbestritten, wenn auch in steigendem Masse deutlich wird, dass ganz verschiedene pathogenetische Faktoren bei ihrer Entstehung mitwirken. Es ist zweifellos ebenso unrichtig, in der Gefäßwanderkrankheit nur eine Störung im Cholesterin- oder Phospholipoidstoffwechsel zu sehen, wie es auch nicht zutreffen kann, dass die Fettsäuren des Blutes in ihrer qualitativen und quantitativen Zusammensetzung, ihrem Sättigungsgrad, dem Anteil an reinen Fettsäuren bzw. ihren Estern mit Glycerin, Cholesterin oder Phosphatiden allein für das Ausmass der Gefäßwanddegeneration verantwortlich zu machen sind. Über die pathogenetische Bedeutung einer Störung im Gleichgewicht von Fibrinbildung und Fibrinolyse, also einer Störung im komplexen Mechanismus der Blutkoagulation für die Atheroskleroseentstehung, für die neue Anhaltpunkte beigebracht wurden, lässt sich heute auch nur aussagen, dass sie wohl einen Teilstoff, kaum aber die ausschliessliche Ursache darstellen kann. Die menschliche Atherosomatose ist für experimentelle Untersuchungen ein schlechtes Objekt. Die verfügbaren klinischen, nicht bioptischen Teste sind vieldeutig und quantitativ kaum auswertbar, Blut- und Plasmaanalysen geben zwangsläufig ein einseitiges Bild, da nur die kreisenden gelösten Stoffe, nicht aber die in der Gefäßwand eingelagerten Substanzen bzw. das Ausmass der Wandveränderungen

erfasst werden, und da wir über die wechselseitigen Austauschvorgänge nichts erfahren. So bleiben wir hauptsächlich auf den Tierversuch angewiesen, ein wesentliches Hindernis, weil auf wenigen Gebieten der experimentellen Biologie so grosse artspezifische Eigenheiten und Unterschiede vorhanden sind, weshalb bei Übertragung der Befunde auf die Verhältnisse beim Menschen grösste Zurückhaltung notwendig ist. Die spontane Arteriosklerose alter Hennen beispielsweise, die weitgehend reversibler Natur ist und offenbar der Abnahme der Östrogenproduktion parallel geht, liefert ein ganz andersartiges Studienobjekt als etwa die durchaus unphysiologische Atherosomatose beim Kaninchen nach massiver Cholesterinüberfütterung oder die Gefäßwandveränderungen, die nach eigentlicher Fettmast (mit sehr hohem Fettgehalt des Futters) bei Ratten zur Beobachtung kommen.

Versuchsanordnung und Methoden

In den vorliegenden Versuchen haben wir uns die Aufgabe gestellt, das Stoffwechselverhalten von Ratten zu untersuchen, die chronisch mit verschiedenen Fetten überfüttert wurden. Wir verwendeten dazu Jungratten verschiedener Provenienz, ergänzend wurden auch einige Bestimmungen an hyperlipämischen Kaninchen vorgenommen. Bei gesunden Tieren beschränkten wir uns auf die Untersuchung der Blutwerte; die histologische Kontrolle erfolgte nur bei den Tiergruppen, bei denen durch Vorbehandlung Arteriosklerose- bzw. Atherosomatose-artige Veränderungen erzeugt worden waren. Das für jeden Einzelversuch eingesetzte Rattenkollektiv betrug 80–100 Tiere im Anfangsgewicht von 120–180 g. Es wurden vorwiegend männliche Tiere verwendet. Da für die Analysen grössere Blutmengen erforderlich waren, wurde das Blut von jeweils 8–10 Tieren gepoolt. Dem Standardfutter (Futterwürfel der Nafag AG, Gossau) wurden je 10% Schweineschmalz bzw. Leinöl bzw. Rahm zugesetzt. Dabei schien es zweckmäßig, die chronische Fettüberfütterung noch mit einer akuten Fettbelastung zu kombinieren, und zwar in dem Sinne, dass die unbehandelten Kontrollen und die fettgefütterten Tiere am Untersuchungstag eine einmalige grössere Fettmenge erhielten.

Den Angaben von CONSTANTINIDES et al.¹ folgend, wurden hierfür 3 cm³/kg Maisöl mit der Schlundsonde verabreicht. Tötung der Tiere 120 min nach der Maisölgabe. In einigen Versuchen wurde das Maisöl durch Olivenöl ersetzt. Folgende Methoden kamen zur Anwendung:

Ketonkörper nach GREENBERG und LESTER²; Brenztraubensäure nach MARKEES³; Blutzucker nach HAGEDORN-JENSEN; Gesamtfettsäuren nach DE KAMER⁴; Gesamtlipide nach BLOOR⁵; Polyenfettsäuren nach HERB und RIEMENSCHNEIDER⁶; beide Methoden nach den modifizierten Angaben von SCHRADE et al.⁷

Versuchsergebnisse

a) *Normale Ratten*⁸. 1. Die erhaltenen Werte bei Verwendung der Teste: Blutketonkörper, Blutbrenztraubensäure und Blutzucker zeigten bei unregelmässiger Streuung in den Gruppen der fettüberfütterten Ratten im Vergleich zu normal ernährten Kontrollen keinerlei signifikante Unterschiede. Wir hatten erwartet, zumindest bei den Produkten der β -Oxydation eine dem gesteigerten Fettumsatz entsprechende Erhöhung der Blutwerte zu finden. Ihr Fehlen erlaubt unseres Erachtens den Schluss, dass der gesunde Rattenorganismus imstande ist, auch grosse tägliche Nahrungsfeftmengen (Schweineschmalz, Rahm, Leinöl), ebenso wie die akute zusätzliche Maisölbelaistung, ohne Auftreten einer Ketose intermediär umzusetzen. Auch der Blutgehalt an Brenztraubensäure, die als direktes Abbauprodukt der Kohlenhydrate und als Schlüsselsubstanz zum Krebszyklus einen Hinweis auf einen gestörten «turn-over» auch für den intermediären Fettumsatz abgeben kann, zeigte nur unregelmässige Schwankungen. Das Gleiche gilt für das Verhalten des Blutzuckerspiegels. Wir haben deshalb die drei genannten Teste als ungeeignet zur Erfassung von Fettstoffwechselreaktionen in unserer Versuchsanordnung aufgegeben.

Eine tabellarische Zusammenstellung der an grossem Material (etwa 400 Tiere) gewonnenen Einzelresultate kann weggelassen werden, da sie keine über das Gesagte hinausgehenden wesentlichen Aufschlüsse bringt.

2. Zu auswertbaren Resultaten führt die Bestimmung der Gesamtlipide bzw. der Gesamtfettsäuren und der Polyenfettsäuren im Blutserum bei gesunden Ratten, über die im folgenden zuerst berichtet werden soll:

Unter Beibehaltung der gleichen Versuchsanordnung mit chronischer Fettüberfütterung (Schweineschmalz bzw. Leinöl bzw. Rahm), kombiniert mit akuter Maisölbelaistung, haben wir die in Tabelle I und II eingetragenen Werte ermittelt. Es sind die Mittelwerte aus vier bis sechs Einzelbestimmungen angegeben, die oft erhebliche Streuung ist berücksichtigt. Die Daten beziehen sich auf ein Versuchsmaterial von 500 mit Schweineschmalz, 200 mit Rahm und 300 mit Leinöl belasteten Tieren. Im Fütterungsversuch mit Schweineschmalz (Tab. I) zeigen die *Gesamtfette* vor und nach Maisölbelaistung gegenüber den Kontrollen keine wesentliche Verschiebung, und zwar sowohl bei der Bestimmung nach 20 als auch nach 40 Tagen.

¹ P. CONSTANTINIDES, A. CAIRUS und A. WERNER, Arch. int. Pharmacodyn. 99, 384 (1954).

² L. A. GREENBERG und D. LESTER, J. biol. Chem. 134, 177 (1944).

³ S. MARKEES, Exper. 11, 205 (1955).

⁴ J. H. DE KAMER, Med. Chemie Hinsberg, Lang III, 421 (1951).

⁵ W. R. BLOOR, K. F. PELKAN und P. M. ALLEN, J. biol. Chem. 52, 201 (1922).

⁶ S. F. HERB und R. W. RIEMENSCHNEIDER, Analyt. Chem. 25, 953 (1953).

⁷ W. SCHRADE, R. BIEGLER und C. OH, Klin. Wschr. 34, 1242 (1956).

⁸ Für Tiermaterial und Arbeitsplatz, die uns für einen Teil dieser Versuche durch Herrn Prof. BERNHARD, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel, zur Verfügung gestellt wurden, möchte ich auch an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Tab. I. Kombinierte Fettbelastung bei *normalen* Ratten. Chronische Zulage von 10% *Schweineschmalz* zum Futter, akute Sondenfütterung mit 3 cm³/kg Maisöl. Gesamtfett und Gesamtfettsäuren in mg%; 2-4fach ungesättigte Polyenfettsäuren in % des Gesamtfettwertes. Werte jeweils vor und 120 min nach der Maisölgabe.

Zeit	Kontrolle (Normalfutter)					10% Schweineschmalz (im Normalfutter)				
	Gesamt-fett mg%	Fett-säuren mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach	3fach	4fach	Gesamt-fett mg%	Fett-säuren mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach	3fach	4fach
Ausgangswert <i>vor</i> Belastung	408	147	5,8	2,3	5,5					
Ausgangswert <i>nach</i> Belastung (Maisöl)	486	190	11,3	2,3	4,2					
Nach 20 Tagen <i>vor</i> Belastung	397	156	5,6	2,6	4,9	363	138	7,1	1,3	4,8
Nach 20 Tagen <i>nach</i> Belastung (Maisöl)	601	260	11,5	2,8	3,8	568	271	12,7	2,6	3,3

Tab. II. Kombinierte Fettbelastung bei *normalen* Ratten. Chronische Zulage von 10% *Leinöl* zum Futter, akute Sondenfütterung mit Maisöl 3 cm³/kg Tiergewicht. Gesamtfett und Gesamtfettsäuren in mg%; 2-4fach ungesättigte Polyenfettsäuren in % des Gesamtfettes. Werte jeweils vor und 120 min nach der Maisölgabe.

Zeit	Kontrolle (Normalfutter)					10% Schweineschmalz (im Normalfutter)				
	Gesamt-fett mg%	Fett-säuren mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach	3fach	4fach	Gesamt-fett mg%	Fett-säuren mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach	3fach	4fach
Ausgangswert <i>vor</i> Belastung	379	179	5,4	2,8	5,8					
Ausgangswert <i>nach</i> Belastung (Maisöl)	562	215	11,4	2,7	4,7					
Nach 20 Tagen <i>vor</i> Belastung	397	142	6,4	2,4	5,3	301	135	9,3	7,0	5,0
Nach 20 Tagen <i>nach</i> Belastung (Maisöl)	635	235	13,6	3,1	4,4	398	214	12,4	5,0	3,0

In der Tabelle fehlen die Werte für die 40tägige Bestimmung, da wir diese nur in den ersten Versuchen vorgenommen, später weggelassen haben, nachdem sich gezeigt hatte, dass die Werte keine wesentlichen Unterschiede gegenüber den Werten nach 20 Tagen ergaben.

Im Gegensatz zu den Befunden mit Schweineschmalz liegen die Absolutwerte in den Leinölversuchen (Tab. II) für die Gesamt-fette niedriger als in den Kontrollen und die Differenzen zwischen Ausgangswert vor und Wert nach Maisölbelastung ist signifikant kleiner. Die einzelnen Grossversuche wurden zu verschiedenen Jahreszeiten und in gewissen Zeitabständen wiederholt, das Ergebnis fiel einheitlich gleich aus.

Der Unterschied in der Stoffwechselreaktion der Ratte auf gesättigte bzw. ungesättigte Fette scheint uns wesentlich. Der normale Rattenorganismus ist offensichtlich fähig, sich einer langdauernden, reichlichen Zufuhr eines vorwiegend gesättigten Fettes so anzupassen, dass keine verzögerte intermediäre Abbaugeschwindigkeit entsteht. Dies beweisen das unveränderte Niveau des Fettspiegels im Blut und der fehlende Mehranstieg der Gesamtfettwerte nach der Maisölbelastung im chronischen Fütterungsversuch mit Schweineschmalz gegenüber den Kontrollen. Im Unterschied dazu führt die chronische Belastung mit dem an ungesättigter Linolsäure reichen Leinöl zu einer deutlichen Verminderung des Gesamtfettgehaltes, und wir beobachten, wohl als Zeichen der Umsatzbeschleunigung, einen geringeren Anstieg nach der akuten Maisölbelastung.

Die Betrachtung der Durchschnittswerte für die *Polyenfettsäuren*, die in Prozenten der Gesamt-fette angegeben werden, ergibt ebenfalls wichtige Aufschlüsse. Im Vergleich zu den Kontrollen liegen im Schweineschmalzversuch die Werte für die 2fach ungesättigte Linolsäure vor der Maisölbelastung eindeutig höher. Die Maisölbedingten Anstiege erfolgen nach 20 bzw. 40 Tagen in etwa gleicher Proportion wie bei den nicht fettiüberfütterten Tieren. Bei der 3fach ungesättigten Linolensäure war kein einheitliches Verhalten zu beobachten, die Absolutwerte liegen beträchtlich niedriger als bei Linolsäure, der Schwankungsbereich hält sich stets niedrig. Ganz regelmässig fielen in allen Versuchen die Werte für die 4fach ungesättigte Arachidonsäure nach der Maisölbelastung ab.

In den Leinölversuchen liegt das Ausgangsniveau für die 2- und 3fach ungesättigten Fettsäuren regelmässig hoch, was sich zwanglos aus dem hohen Gehalt an Polyenen im chronisch zugefütterten Fett erklären lässt. Die Maisölbelastung führt zu einem eher kleinen Linolsäureanstieg, während die Arachidonsäure wiederum regelmässig absinkt. Zu erwähnen bleibt hier noch der Ausfall der Fütterungsversuche mit Rahm. Wir haben ihre tabellarische Wiedergabe weggelassen, da sie prinzipiell genau das gleiche Resultat ergeben haben wie die mit Schweineschmalzbelastung. Der Organismus bewältigt die Rahmzufütterung von 10% ohne Zeichen der Fettstaung, der Linolsäurespiegel erfährt eine Steigerung, die Reaktion von Gesamtlipoiden und Polyenen auf die akute Fettbelastung erfolgt in typischer Weise.

Als wesentlich möchten wir für das geschilderte Verhalten der Polyenfettsäuren festhalten, dass chronische Überfütterung sowohl mit gesättigten als auch mit ungesättigten Fetten zu einer Steigerung der Polyenfettsäuren des Blutes, speziell der Linolsäure führt, und dass es zu einer Verschiebung im Verhältnis der einzelnen ungesättigten Verbindungen zueinander kommt. Von besonderer Bedeutung scheint uns dabei die Abnahme des Sättigungsgrades (regelmässige Verminderung der Arachidonsäure) als Folge der akuten Maisölbelastung. Um dem Einwand zu begegnen, die Wahl von Maisöl zur

akuten Fettbelastung sei darum ungeeignet, weil dieses selbst als stark ungesättigtes Öl mit hohem Linolsäuregehalt zwangsläufig die Polyensäurewerte des Blutes verändere, haben wir einige Kontrollversuche mit Olivenöl durchgeführt. Das von uns verwendete Maisöl enthielt 28-34% Linolsäure gegenüber dem Olivenöl mit 2-4%, den gleichen Wert, den wir für Schweineschmalz fanden. Die Wirkung der akuten Olivenölbelastung ($3 \text{ cm}^3/\text{kg}$) war nur hinsichtlich der Höhe des Linolsäureanstieges, der erwartungsgemäss kleiner ausfiel, unterschieden vom Maisöl-Effekt. Gesamt-fette und Fettsäuren erfuhren die gleiche Vermehrung durch die Ölzufluss, die Arachidon-säure nahm in analoger Weise ab.

b) *Ratten mit experimentellen Arteriosklerose- bzw. Atherosomatose-artigen Veränderungen.* Die bisher beschriebenen Versuche wurden mit normalen Ratten angestellt. Im folgenden soll über die Resultate berichtet werden, die unter gleichen allgemeinen Versuchsbedingungen an Ratten mit experimenteller Mediasklerose und ernährungsbedingter Lipoidose gewonnen wurden⁹. Zur Erzeugung einer Mediasklerose erhielten die Tiere entsprechend den Angaben von LOUSTALOT et al.¹⁰ in einer Vorperiode 10 Tage lang je 5 mg/kg Calciferol + Parathormon $0,25 \text{ cm}^3/\text{Tier}$. Zur diätetischen Lipoidoseerzeugung wurden die Tiere 28 Tage auf einer Protein- und Cholesterin-reichen Diät (Diät I) bzw. Stärke- und Cholesterin-reichen, Protein-armen Kost (Diät II) gehalten und dann der chronischen Verfütterung mit Schweineschmalz sowie der akuten Maisölbelastung unterzogen. Bezuglich der genauen Zusammensetzung von Diät I und II siehe bei LOUSTALOT¹¹. In Tabelle III haben wir 2 Versuche an mit Calciferol-Parathormon vorbehandelten Tieren zusammengefasst. Es sind die Werte für jeden Einzelversuch jeweils in den einzelnen Rubriken untereinander eingesetzt. Es ergeben sich bei grosser Streuung der Absolutwerte folgende Gemeinsamkeiten:

1. Der Gesamtlipidgehalt ist zu Versuchsbeginn deutlich erhöht im Vergleich zu den Normaltieren.

2. Nach Ablauf von 20 Tagen ist dieser Wert wieder zur Norm abgefallen.

3. Die Linolsäurewerte liegen anfanglich auffällig hoch und verändern sich durch die erste Maisölbelastung einmal geringfügig, einmal gar nicht.

4. Die Werte für die Linolsäure nach 20tägiger Schweineschmalzbelastung zeigen keine wesentlichen Abweichungen von den Zahlen bei gesunden Tieren.

Im ganzen betrachtet fällt auf, dass die Reaktion der Gesamt-fette und der Linolsäure im Gefolge der Calciferol-Parathormon-Vorbehandlung eine gewisse reaktive Starre aufweist, die sich nur langsam zurückbildet. Das Verhalten der Arachidonsäure ist nicht einheitlich, zeigt sowohl den oben beschriebenen Abfall nach der Maisölbelastung als auch einen Anstieg. Besonders eindrücklich war der Ablauf in einem Versuch, dessen Daten wir nicht in die Tabelle aufgenommen haben. Hier kam es nämlich 20 Tage nach Versuchsbeginn (das heisst nach Abschluss der Calciferolvorbehandlung) zu einer weiteren gewaltigen Steigerung des Gesamtfettwertes (von 720 auf 2407 mg%) und gleichzeitig zum fast vollständigen Verschwinden der Linolsäure (von 12,0 auf 0,3%) aus dem Blut. Der Grad der Mediasklerose war in diesem Versuch nicht ausgeprägter als bei den andern Calciferolversuchen. Sehr auffällig war auch die Reaktion der mit Schweineschmalz über-

⁹ Für die Vorbereitung und Überlassung der zu diesen Versuchen benötigten sowie für eine grosse Anzahl normaler Tiere bin ich der Ciba zu grossem Dank verpflichtet.

¹⁰ P. LOUSTALOT, W. SCHULER und W. ALBRECHT, im Druck.

¹¹ P. LOUSTALOT, Helv. physiol. pharmacol. Acta 18, 343 (1960).

fütterten Gruppe in diesem Versuch: Die Gesamtfatte lagen hier mit 1210 mg% ebenfalls sehr hoch, wenn auch nur noch halb so hoch wie bei den Kontrollen (trotz der Fettzufuhr)! Der Linolsäurespiegel lag mit 2,2% ebenfalls sehr niedrig, reagierte dann aber normal auf die Maisölbelastung (Anstieg auf 6,6%). Es ist bestimmt unzulässig, aus diesem in unseren Versuchen bisher einmalig gebliebenen totalen Zusammenbruch der Fettstoffwechselregulation allgemeingültige Schlüsse zu ziehen. Immerhin scheint uns der Hinweis auf den möglichen kausalen Zusammenhang zwischen progressiver Hyperlipidämie und nahezu totalem Schwund der quantitativ wichtigsten Polyensäure bei einer Tiergruppe mit Calciferol-bedingter Mäusklerose gerechtfertigt.

Bei Verfütterung von Diät I (Protein- und Cholesterinreiche Kost) beobachteten wir ebenfalls eine hochgradige Steigerung der Gesamtlipoide, die durch den Maisölstoss noch beträchtlich zunahm. Das Nativserum war meist stark lipämisch. Die wesentliche Ursache der Hyperlipidämie besteht im Cholesterinüberschuss in der Diät I. Über die Durchschnittswerte von drei Versuchen orientiert Tabelle IV (wieder unter Angabe der untereinander eingesetzten Einzelwerte); in einer besonderen Rubrik sind, soweit mitbestimmt, die Cholesterinwerte angegeben. Die

unter c in der Tabelle aufgeführten Zahlen entsprechen einem Versuch mit Protein-reicher Kost ohne Cholesterinzusatz.

Folgende Einzelheiten im Versuchsergebnis sind für die Polyensäuren hervorzuheben: Unmittelbar nach Abschluss der Diätvorbehandlung ändern sich in den Versuchen mit Cholesterin-reicher Diät I die eher niedrigen Linolsäurewerte als Folge der Maisölbelastung nur geringfügig bei gleichzeitiger starker Zunahme der Gesamtlipoide, die sehr tiefen Arachidonsäurewerte fallen geringfügig ab. Nach 20 Tagen ist die Hyperlipidämie verschwunden, die Linolsäure ist mässig, die Arachidonsäure stark angestiegen. Die Maisölbelastung bedingt jedoch nur eine geringe Zunahme der Linolsäure und beide Male ein weiteres Ansteigen der Arachidonsäure. Im Zusatzversuch mit Schweineschmalz finden wir ein ganz unregelmässiges Verhalten der Polyenfettsäuren und der Gesamtfettwerte. Der dritte Versuch mit Cholesterin-freier Diät I ist durch eine anfänglich mässige Steigerung der Gesamtfettwerte und Abfallen zur Norm nach 20 Tagen, durch unregelmässiges Verhalten der Linolsäure, hohe Arachidonsäureanfangswerte und Fehlen der Normalisierung des Polyensäureverhaltens durch die Schweineschmalzzufütterung gekennzeichnet.

Tab. III. Kombinierte Fettbelastung bei Ratten, die mit *Calciferol-Parathormon* vorbehandelt wurden. Chronische Zulage von 10% *Schweineschmalz*, akute Sondenfütterung mit Maisöl, 3 cm³/kg Tiergewicht. Gesamtfett und Gesamtfettsäuren in mg%; 2-4fach ungesättigte Polyenfettsäuren in % des Gesamtfettes. Werte jeweils vor und 120 min nach der Maisölgabe.

Zeit	Kontrolle (Calciferol)					10% Schweineschmalz (im Normalfutter)				
	Gesamt-fett mg%	Fett-säuren mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach	3fach	4fach	Gesamt-fett mg%	Fett-säuren mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach	3fach	4fach
Ausgangswert vor Belastung	877	291	14,0	1,8	4,4					
	783	290	13,5	1,5	4,7					
Ausgangswert nach Belastung (Maisöl)	850	379	14,2	2,0	4,7					
	1113	553	16,3	0,0	2,6					
Nach 20 Tagen vor Belastung	580	256	5,8	1,7	4,1	325	285	4,6	2,4	4,4
	496	171	9,5	2,4	2,9	506	257	8,6	2,4	4,6
Nach 20 Tagen nach Belastung (Maisöl)	610	314	8,0	2,3	3,7	640	385	9,1	1,4	4,2
	566	371	11,0	2,0	4,6	809	470	11,5	1,7	4,9

Tab. IV. Kombinierte Fettbelastung bei Ratten, die mit Diät I (Protein-Cholesterin-reich) vorbehandelt wurden. Versuch c ohne Cholesterinvorfütterung. Chronische Zulage von 10% Schweineschmalz zum Futter, akute Sondenfütterung mit Maisöl, 3 cm³/kg Tiergewicht. Gesamtfett, Gesamtfettsäuren und Cholesterin in mg% (Cholesterin: Gesamt/frei). 2-4fach ungesättigte Polyenfettsäuren in % des Gesamtfettes. Werte jeweils vor und 120 min nach Maisölgabe.

Zeit	Kontrolle (Diät I)					10% Schweineschmalz (im Normalfutter)						
	Gesamt-fett mg%	Fett-säuren mg%	Chole-sterin mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach	3fach	4fach	Gesamt-fett mg%	Fett-säuren mg%	Chole-sterin mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach		
Ausgangswert vor Belastung	a 1543	613	—	5,6	1,0	1,9						
b 1823	627	149/236	3,6	1,3	1,7							
c 631	185	77/37	4,0	2,0	8,8							
Ausgangswert nach Belastung (Maisöl)	a 2236	869	—	6,1	1,1	1,7						
b 2323	741	159/195	3,5	0,9	1,3							
c 723	285	45/36	6,6	2,5	4,7							
Nach 20 Tagen vor Belastung	a 488	185	—	7,8	1,9	4,7	453	171	—	5,4	1,4	3,7
b 418	210	57/20	3,8	2,1	4,8		565	299	23/60	7,1	2,5	4,3
c 370	171	31/16	7,4	3,4	6,3		363	157	19/36	2,9	1,9	3,9
Nach 20 Tagen nach Belastung (Maisöl)	a 535	288	—	9,7	2,1	5,4	674	285	—	8,0	1,6	4,3
b 483	213	65/22	5,0	1,9	5,6		620	305	25/74	4,4	2,3	3,3
c 498	242	35/19	6,2	2,2	5,8		600	299	17/32	3,2	1,7	4,4

In Tabelle V sind schliesslich 2 Versuche mit Rattenkollektiven dargestellt, die 4 Wochen mit Diät II (Protein-arm, Kohlenhydrat- und Cholesterin-reich) vorbehandelt wurden. Das Gesamtbild entspricht dem zu Tabelle IV gegebenen Kommentar, nur liegen die Werte für die Gesamtfatte noch höher, es kommt zu einem ausgesprochen starren Verhalten der Linolsäure und niedrigen Werten für die Arachidonsäure. Nach 20 Tagen ist die Hyperlipidämie ebenfalls verschwunden, das Verhalten der Linolsäure beginnt sich zu normalisieren, die Arachidonsäure zeigt (mit einer Ausnahme) den normalen typischen Abfall nach der Maisölbelastung.

Zu den histologischen Befunden möchten wir in der vorliegenden Arbeit nicht näher Stellung nehmen, möchten nur auf die sehr auffällige Diskrepanz hinweisen, die in dem Vorkommen eindeutiger Veränderungen im Lipoidhaushalt, beurteilt nach den Serumbefunden einerseits und dem Fehlen von Lipoidablagerung und Cholesterinvermehrung in der Gefässwand andererseits, bei der Mediasklerose besteht. Auch die Frage nach der Reversibilität experimenteller Gefässwandschäden nach atherosgener Kost lässt sich noch nicht zuverlässig beantworten.

Schlussfolgerungen

Unsere Versuche an mit Fett überfütterten Ratten, die zusätzlich einer akuten Maisöl- bzw. Olivenölbelastung unterworfen wurden, lassen hinsichtlich des Verhaltens der Gesamtlipoide sowie der Polyenfettsäuren im Blut folgende Schlüsse zu: Der gesunde Rattenorganismus ist fähig, auch über längere Zeit eine Zugabe von 10% Fett mit vorwiegend gesättigten Fettsäuren (Schweineschmalz, Rahm) in der Kost zu bewältigen, ohne dass Zeichen einer Fettstaung, einer Ketose oder einer sonstigen Fettumsatzstörung nachweisbar wären. Wird das gesättigte Fett durch Leinöl mit hohem Linolsäuregehalt ersetzt, so lässt sich eine Beschleunigung der Fettverwertung an einer Verminderung des Gesamtgefäßgehaltes und einem geringeren Anstieg nach akuter zusätzlicher Fettbelastung erkennen. Für die Polyenfettsäuren ist eine regelmässige Verschiebung des Sättigungsgrades nach Mais- bzw. Olivenöl charakteristisch, die in einer Steigerung der Linolsäure- bei gleichzeitiger Verminderung der Arachidonsäurewerte besteht. Solange wir keine exakten Kenntnisse über die physiologische Bedeutung von Sättigung und Entsättigung der Fettsäuren im intermediären Stoffwechsel besitzen, sind wir wohl nur berechtigt, eine wesentliche Funktion der Polyensäuren in der raschen

Umsetzungsgeschwindigkeit zu sehen, die ganz allgemein Verbindungen mit reaktionsfähigen Doppelbindungen im Stoffumsatz zukommt. Dies hat für den Fettsäuretransport, die akute Bereitstellung von Brennmaterial sowie für die Bindungsgeschwindigkeiten an Lipoide, Phosphatide oder Glyceride bestimmt eine sehr wesentliche Bedeutung. Ob man jedoch berechtigt ist, Veränderungen des quantitativen Verhältnisses von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren mit der Entstehung und dem chronischen Ablauf des Atheromatoseprozesses in aetiologischen Zusammenhang zu bringen, ist eine ganz andere Frage.

In der Literatur sind hierfür äusserst divergente Tatsachen und Meinungen zu finden. Unumstritten bei allen Forschern ist nur die Tatsache, dass die Linolsäure die quantitativ wichtigste 2fach ungesättigte physiologische Fettsäure ist, die sich sowohl im Blut als auch in den verschiedensten Organen, in Haut (BERNHARD¹²) und Carrass (WAGNER¹³) neben anderen mehrfach ungesättigten Fettsäuren findet. In den atheromatösen Plaques der grossen Körpergefässe werden ungesättigte Fettsäuren ebenfalls gefunden. Bei Hühnern nimmt ihr prozentualer Anteil proportional mit der Schwere des Atheromatosebefalls nach FISHER und FEIGENBAUM¹⁴ zwar ab, die Ernährung mit Linolsäure-reichem Maisöl über längere Zeit verhindert aber die Plaquebildung in keiner Weise. Von den Untersuchungen an menschlichem Material erscheinen die Arbeiten von BÖTTCHER et al.¹⁵ über die Fettsäureverteilung in den Lipoiden der menschlichen Aortenwand von besonderem Interesse. Hier nach steigt der Gehalt an Polyenen in der Cholesterinester-Faktion mit zunehmender Atherosklerose an unter gleichzeitiger Abnahme der Cholesterinester gesättigter Fettsäuren. Die gleichen Autoren haben in einer Publikation allerjüngsten Datums¹⁶ über ihre Befunde in anderen Gefässgebieten berichtet. Danach zeigt die Lipoid- und Fettsäurezusammensetzung der Intima und Media von Coronar- und Hirn-

¹² K. BERNHARD, F. WYLER, O. WAGNER und H. WAGNER, Schweiz. Med. Wschr. 89, 787 (1959).

¹³ H. WAGNER, E. SEELIG und K. BERNHARD, Schweiz. Med. Wschr. 87, 1423 (1957).

¹⁴ H. FISHER und A. S. FEIGENBAUM, Nature 186, 85 (1960).

¹⁵ C. J. F. BÖTTCHER, F. P. WOODFORD, C. CH. TER HAAR ROMENY-WACHTER, E. BOELSMA-VAN HOUTE und C. M. VAN GENT, Lancet I 1960, 1378.

¹⁶ C. J. F. BÖTTCHER, E. BOELSMA-VAN HOUTE, C. CH. TER HAAR ROMENY-WACHTER, F. P. WOODFORD und C. M. VAN GENT, Lancet II 1960, 1162.

Tab. V. Kombinierte Fettbelastung bei Ratten, die mit Diät II (Protein-arm, Stärke-Cholesterin-reich) vorbehandelt wurden. Akute Sonderfütterung mit Maisöl, 3cm³/kg Tiergewicht. Gesamtgefäß und Gesamtgefäßsäuren in mg%, 2-4fach ungesättigte Polyenfettsäuren in % des Gesamtgefäßes. Werte jeweils vor und 120 min nach Maisölgabe. Cholesterin in mg%. Gesamt/frei.

Zeit	Kontrolle (Diät II)						10% Schweineschmalz (im Normalfutter)					
	Gesamt-fett mg%	Fett-säuren mg%	Chole-sterin mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach	3fach	4fach	Gesamt-fett mg%	Fett-säuren mg%	Chole-sterin mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach	3fach	4fach
Ausgangswert	2452	940	203/176	5,4	1,2	1,3						
vor Belastung	4024	1425	—	5,7	0,8	3,3						
Ausgangswert nach Belastung (Maisöl)	2705	1040	207/165	6,6	1,3	1,7						
Nach 20 Tagen vor Belastung	2880	—	—	6,0	1,0	1,7						
Nach 20 Tagen nach Belastung (Maisöl)	367	171	64/30	3,5	2,6	5,2	483	242	30/58	6,8	3,7	5,1
	488	185	—	5,9	2,0	4,5	500	171	—	6,8	2,0	5,3
	581	257	67/31	3,9	2,6	4,0	593	299	30/58	7,8	2,2	4,6
	701	299	—	8,3	1,8	4,5	666	356	—	10,5	1,7	4,8

gefässen (*Circulus arteriosus* Willisi) wohl die gleiche Tendenz der Veränderungen mit zunehmender Atheromatose wie bei der Aorta, es kommen jedoch teilweise sehr grosse quantitative Unterschiede und bezüglich einzelner Komponenten sogar gegensinnige Verschiebungen zur Beobachtung. Offenbar spielen also lokale Verschiedenheiten einzelner Gefässgebiete bei der Atheromatoseentstehung eine sehr wichtige Rolle.

Ebenso uneinheitlich wie beim atheromatösen Gefäß sind die Literaturbefunde über Bestimmungen der Blutlipide. SCHETTLER¹⁷ findet eine signifikante Serum-lipoid-senkende Wirkung langfristiger Leinölgaben im Vergleich zu Butter oder Cocosfett beim Menschen, lehnt aber einen pathogenetischen Zusammenhang von Linolsäremangel für die Entstehung der menschlichen Atheromatose ab. Nach GLATZEL¹⁸ ist ein Zusammenhang von Fettköst und Atheromatose bzw. Herzinfarkt sehr zweifelhaft, Cholesterinfütterungsversuche am Tier werden von ihm als gänzlich irreleitend verworfen. ANTONIS et al.¹⁹ finden im Serum von Europäern im Vergleich zu Bantunegern, deren Nahrung sehr fettarm und relativ Linolsäure-reich ist und bei denen atherosklerotische Veränderungen selten gefunden werden, in allen Altersstufen niedrige Triglyceride und hohe Dien- sowie Tetraenwerte im Blut. Im Vergleich hierzu gehen beim Europäer mit der bekannten gemischten Kost und häufiger Atherosklerose mit fortschreitendem Alter eine ständige Zunahme von Triglyceriden einer Abnahme von Dienen und Tetraenen parallel. Zu einem gleichen Resultat sind PATIL et al.²⁰ bei ihren Studien an Indern gelangt. In sehr systematischen Untersuchungen haben sich SCHRADE und sein Arbeitskreis²¹ mit der Analyse der Blutlipide des Menschen befasst; wir kommen auf diese Arbeiten unten noch zurück.

Die Liste der Publikationen, die *pro* oder *contra* einen pathogenetischen Zusammenhang zwischen Atheromatose und Gehalt der Nahrung an ungesättigten Fettsäuren bzw. ihrem Vorkommen in Blut und Geweben sprechen, liesse sich unschwer beliebig verlängern. Wir möchten an dieser Stelle nur festhalten, dass jede Übereinstimmung der Ansichten fehlt und dass sich rein theoretisch je nach Auswahl der Literatur ein ganz verschiedenartiger Standpunkt ableiten liesse.

In unseren Versuchen zu diesem Problem haben wir bei Ratten, die durch eine viel Cholesterin enthaltende, Protein- oder Kohlenhydrat-reiche Diät bzw. durch Calciferol-Parathormon vorbehandelt wurden, typische Veränderungen im Gesamtlipoidgehalt bzw. im relativen Polyensäureanteil beobachtet. Bei hochgradiger Hyperlipidämie infolge Diätvorbehandlung zeigt der relative Anteil an Linolsäure keine entsprechende Steigerung, die Anstiege nach akuter Maisölbelastung fallen kleiner aus als bei Normaltieren, die Verschiebung im Sättigungsgrad unter den Polyensäuren haben anderen Charakter, indem zum Beispiel die Arachidonsäure nach einem 20tägigen Intervall ungewöhnlich hoch liegt und nach Belastung sogar noch zunimmt. Eine Rückbildung der Stoffwechselverhältnisse zur Norm erfolgt in der von uns verfolgten Zeitspanne von 20 (40) Tagen nicht, und zwar weder in der ohne noch in der mit zusätzlicher Fettzulage überfütterten Gruppe.

Auch bei Calciferol-behandelten Tieren, bei denen sich eine Mediasklerose entwickelt, treten auffällige Veränderungen im Fettstoffwechsel auf: Die anfängliche Steigerung der Gesamt-fette erstreckt sich auch auf die Polyenfettsäuren Linol- und Arachidonsäure. Die Reaktion auf die Maisölbelastung ist träge, nach Ablauf von 20 Tagen sind meist wieder normale Verhältnisse eingetreten. Gelegentlich kann es zu vollständigem Zusammenbruch der intermediären Fettumsetzung mit progressiver Hyper-

lipidämie und hochgradigem relativem Polyensäuremangel kommen. Die beiden von uns untersuchten Formen von Gefässwandschädigungen bieten also hinsichtlich ihres Stoffwechsels ein eindeutig verschiedenes Bild.

Zieht man, im Bestreben, auf mögliche Analogien der Verhältnisse bei der tierexperimentellen und menschlichen Atheromatose zu schliessen, die sehr ausgedehnten Untersuchungen von SCHRADE et al.²¹ heran, so kann man feststellen, dass auch beim Menschen mit manifester Atheromatose ein relatives Absinken der Linolsäure (als der quantitativ wichtigsten Polyensäure) nachweisbar ist. Diese Autoren haben charakteristische Unterschiede der relativen Fettsäureanteile in den 4 Lipidfraktionen – Cholesterin, Phosphatide, Glyceride und freie unveresterte Fettsäuren – nachgewiesen und, was hier besonders interessiert, bei Arteriosklerotikern und Diabetikern mit Hyperlipidämie eine regelmässige absolute Verminderung der ungesättigten Fettsäuren speziell im Cholesterinester-, aber auch im Phosphatidanteil gefunden. In ihren ersten Arbeiten sind SCHRADE et al. methodisch gleich vorgegangen wie wir, in ihren letzten Publikationen haben sie sich der Gaschromatographie bedient und damit die genaue Verteilung der Polyensäuren auf die einzelnen Lipoidbestandteile sowie die quantitativen Verhältnisse für alle im menschlichen Blut vorhandenen Fettsäuren differenziert. Sie betonen ausdrücklich hinsichtlich der Gesamtlipid- und Polyenfettsäurebestimmung die völlige Übereinstimmung ihrer jetzigen gaschromatographischen Befunde mit ihren früheren spektrophotometrisch gewonnenen. – Es sei hier nur erwähnt, dass auch die SCHRADESchen Ergebnisse nicht unbestritten geblieben sind, und dass zum Beispiel von KAUFMANN und SCHMIDT²² eine Polyenfettsäureverminderung im Serum bei den von ihnen untersuchten Arteriosklerotikern nicht gefunden wurde.

In der Frage, ob die bis heute vorliegenden experimentellen Befunde bei Tier und Mensch schon dazu berechtigen, Konsequenzen für die Einbeziehung der ungesättigten Fettsäuren in die Prophylaxe und Therapie der menschlichen Atheromatose zu ziehen, möchten wir zu grosser Zurückhaltung raten. Wohl sind genügend Belege für die Beeinflussung des Cholesteringehaltes im Blut durch Zugabe ungesättigter Fettsäuren beigebracht worden. Die bekannten *in vitro*-Versuche von RUTSTEIN et al.²³ an überlebenden menschlichen Aortenfibroblasten, die in der Zellkultur Cholesterin aufnehmen bzw. abgeben, je nach Zusatz von gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren zum Nährmedium, sind der sinnfälligste experimentelle Beweis für solche Beziehungen. Atheromatose ist aber, wie schon oben betont, nicht reine Folge oder Begleiterscheinung der Hypercholesterinämie und bei der Vielfalt der Entstehungsfaktoren für degenerative Gefäss-

¹⁷ G. SCHETTLER, Bull. Schweiz. Akad. Med. Wissenschaft. 13, 301 (1957). – G. SCHETTLER und M. EGGSTEIN, Klin. Wschr. 37, 485 (1959).

¹⁸ H. GLATZEL, Dtsch. med. Wschr. 85, 1296 (1960).

¹⁹ A. ANTONIS und I. BERSOHN, Lancet I 1960, 998.

²⁰ V. S. PATIL und N. G. MAGAR, Biochem. J. 76, 417 (1960).

²¹ W. SCHRADE, R. BIEGLER und C. OH, Klin. Wschr. 34, 1242 (1956). – W. SCHRADE, E. BÖHLE und R. BIEGLER, Klin. Wschr. 37, 1101 (1959). – W. SCHRADE, E. BÖHLE, R. BIEGLER, V. MEDE and R. TEICKE, Klin. Wschr. 38, 126, 707 (1960). – W. SCHRADE, E. BÖHLE, R. BIEGLER, R. TEICKE und B. ULLRICH, Klin. Wschr. 38, 739 (1960). – W. SCHRADE, E. BÖHLE und R. BIEGLER, Lancet II 1960, 1409.

²² H. P. KAUFMANN und G. SCHMIDT, Fette, Seifen, Anstrichmittel 62, 399 (1960).

²³ D. RUTSTEIN, E. FASOLINO INGENTIO, J. M. CRAIG und M. MARTINELLI, Lancet I 1958, 545.

wandveränderungen kann mit einer Senkung des Cholesterinspiegels allein das Problem niemals gelöst werden. Es scheint uns aber unter Berücksichtigung der bereits vorliegenden Literatur und unserer eigenen Befunde unbestreitbar, dass die Erforschung des Verhaltens von ungesättigten Fettsäuren in ihren gegenseitigen qualitativen und quantitativen Beziehungen und in ihrer Verteilung auf die verschiedenen Lipoidfraktionen unter den Bedingungen des Tierexperiments sowie beim Menschen sinnvoll und notwendig ist, käme doch der Aufklärung der Rolle der ungesättigten Fettsäuren für Biochemie, Physiologie und Pathologie des Gesamtstoffwechsels grösste Bedeutung zu.

Summary. The influence of chronic overfeeding of rats with saturated (lard, cream) and unsaturated (linseed oil) fats was studied by estimating total lipids and polyunsaturated fatty acids in the serum. Preliminary assays had shown that the determination of β -ketoacids, pyruvic acid and blood sugar gave no useful information on the regulation of the intermediate fat metabolism. Using an additional acute loading with corn oil, and comparing the blood fat values before and after this procedure, the following results were obtained:

Normal rats showed no changes of the values for total lipids after chronic overfeeding with saturated fat in comparison with the untreated controls. After linseed oil the lipid level is significantly lower and the rise after acute corn oil-feeding becomes smaller, most probably as a sign of an acceleration of the fat metabolism. Characteristic changes were seen by examining the 2 and 4 times unsaturated linoleic and arachidonic acids. Whilst linoleic acid shows a rise after feeding both saturated and un-

saturated fat, still increasing after corn oil, arachidonic acid remains nearly unchanged by chronic fat-feeding but falls regularly after acute corn oil loading. Here we have a typical alteration of the saturation degree of polyunsaturated fatty acids after longer periods of overfeeding with fats.

If we produced a sclerosis of the media of the aortic wall in rats by treating them with calciferol-parathormone, we observed a strong hyperlipemia which became still more pronounced after corn oil. The values for linoleic acid were also high but did not rise after corn oil; the behaviour of arachidonic acid was not uniform. 20 days later the untreated controls, as well as the lard-fed animals, showed normal data. By pretreating the rats with a diet rich in cholesterol and protein (diet I), or rich in cholesterol and carbohydrate but poor in protein (diet II), atherosclerosis-like changes developed. In the serum of these animals, the lipids were still more accumulated and were highest after acute corn oil loading. The values for linoleic acid were scarcely altered by corn oil; the arachidonic acid was low after diet I and II and increased after 20 days to an unusually high level. Total lipid values and the reaction to lard feeding were normalized after 20 days.

Our findings are discussed and compared with some facts to be found in the literature. Even if the importance of polyunsaturated fatty acids for human atherosclerosis is not yet to be judged, further investigation in this field seems highly justified, considering the complete lack of exact knowledge of the functional significance of these substances for basic metabolic processes under physiological and pathological conditions.

S. MARKEES

Medizinische Poliklinik Basel, 27. März 1961.

STUDIORUM PROGRESSUS

The Adrenal Cycle in Men on Different Schedules of Motor and Mental Activity¹

The circadian^{2–5} cycle of the mammalian adrenal cortex, an endocrine entity intimately related to over-all motor and mental activity^{6,7}, is not a direct or immediate 'response' to the activities of everyday life. First, the rhythm of blood eosinophils, admittedly an indirect index, persists in men active more or less continuously for two consecutive days in the absence of overt sleep, on a demanding schedule of sampling and laboratory work, carried out with rest periods of only short duration for eating and other essential needs⁸. Second, the onsets of the circadian periodic decrease in blood eosinophils⁸ and of the rise in the corticosterone content of mouse serum^{9,10}, which are preparatory to activity⁷, usually lead-in-phase the major daily bursts in gross motor behavior. Apart from the direct and well-known adrenal cortical 'reactions' to environmental stimuli eliciting activity, the spontaneous physiologic activation of this gland seems to occur during sleep or rest⁹. Other aspects of the relation between circadian periodic body activity and the adrenal cortical cycle, such as phase-shifts and phase-drifts, also have been explored, at least in the mouse^{9,11,12}, by eosinophil counts, and, more recently and more directly, by hormone determinations in the blood^{9,10} and the adrenal gland itself¹³ of the same species.

In the mouse, hormone rhythms, among others, can be studied by serially independent sampling¹⁴ in the absence of effects from sampling as such, which in itself is a power-

ful environmental stimulus. Through the use, at consecutive time points, of separate groups of animals that are comparable in terms of strain, sex, age, and history, highly significant sampling effects¹⁵ can be controlled in this species.

¹ Supported by grants from the Teagle Foundation, through Dr. M. COHEN, the U.S. Public Health Service (No. C-4359(C1), No. 1A-1573(C3), No. H-1983(C3), the American Cancer Society (No. E-155B), and the Minnesota State Department of Public Welfare.

² Circadian is derived from *circa* = about and *dies* = day.

³ C. S. PITTEENDRIGH, Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 25, 159 (1960).

⁴ F. HALBERG, Z. Vitamin- Hormon- Fermentforsch. 10, 225 (1959).

⁵ F. HALBERG, Perspectives in Biology and Medicine 3, 491 (1960).

⁶ F. HALBERG, M. B. VISSCHER, E. B. FLINK, K. BERGE, and F. BOCK, Lancet 71, 312 (1951).

⁷ F. HALBERG, Lancet 73, 20 (1953).

⁸ F. HALBERG, R. ENGEL, E. A. TRELOAR, and R. J. GULLY, Arch. Neurol. Psych. 69, 462 (1953).

⁹ F. HALBERG, E. HALBERG, C. P. BARNUM, and J. J. BITTNER, *Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals* (R. B. WITTHOW, Ed. Publ. No. 55 of the Amer. Assoc. Adv. Sci., Washington D.C. 1959), p. 803.

¹⁰ F. HALBERG, R. E. PETERSON, and R. H. SILBER, Endocrinology 64, 222 (1959).

¹¹ F. HALBERG, M. B. VISSCHER, and J. J. BITTNER, Amer. J. Physiol. 174, 313 (1953).

¹² F. HALBERG, M. B. VISSCHER, and J. J. BITTNER, Amer. J. Physiol. 175, 229 (1954).

¹³ F. HALBERG, P. G. ALBRECHT, and J. J. BITTNER, Amer. J. Physiol. 197, 1083 (1959).

¹⁴ F. HALBERG and M. B. VISSCHER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 75, 846 (1950).

¹⁵ F. HALBERG, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 82, 160 (1953).