

sont des plaques de verre de 18×3 cm, ou des lames porte-objet; les quantités de gélose coulées sur chaque lame sont respectivement de 9 ml et 3,5 ml. Le sérum ou tout autre échantillon est déposé directement sur la surface de la gélose à l'aide d'une micropipette graduée, à extrémité coudée et à pointe fine et rodée (Figure 1). La longueur du trait de dépôt est de 5 à 8 mm. Il est possible de répartir de façon homogène 1 à 20 μ l de l'échantillon, en ayant soin de laisser absorber progressivement le liquide. Dans le cas du sérum humain utilisé comme antigène, les quantités déposées sont généralement de 6 μ l pour les lames de 18×3 et de 3 μ l pour les lames porte-objet. La migration électrophorétique s'effectue dans une enceinte à atmosphère humide et réfrigérée, selon un dispositif analogue à ceux classiquement décrits. Après développement des arcs



Fig. 1

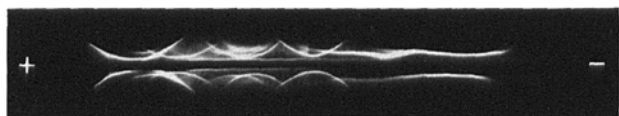


Fig. 2

de précipitation, les plaques de gel sont lavées, desséchées⁴, puis colorées selon la méthode d'URIEL⁷.

Résultats. La méthode d'application directe est utilisable pour l'étude immunoélectrophorétique de nombreuses variétés de protéines. Elle peut se prêter, par exemple, à la séparation des Immunoglobulines (β 2A, β 2M et γ Globulines). La Figure 2 reproduit deux immunoélectrophorèses. [Plaques 18×3 , tampon Michaelis dilué, immunsérum équin antisérum humain normal N° 223 (Serpasteur), coloration par l'azocarmin.] – En bas: sérum provenant d'un sujet normal (ligne de la β 2A, bien distincte de celle des γ globulines). – En haut: sérum d'un malade présentant une macroglobulinémie (double courbure de la β 2M, ligne de la β 2A peu visible)¹⁰.

Summary. A method of immunoelectrophoresis by direct application of the antigen on the surface of the gel is described. By this mode of procedure, the layer of gel presents no break. Consequently the electrophoretic migration and immunodiffusion are improved.

PH. GOULLET

Laboratoire de la M.G.E.N., Service H. Kaufmann,
Institut prophylactique¹¹, Paris (France),
le 27 septembre 1963.

¹⁰ Nous remercions vivement Mesdames J. CHAPELLIER et C. GAILLARD de leur collaboration.

¹¹ 36, rue d'Assas.

STUDIORUM PROGRESSUS

Der Einfluss der experimentellen Leberschädigung auf Gesamtfett und ungesättigte Fettsäuren in Serum und Leber

Über die Bedeutung der ungesättigten Fettsäuren bei der Prophylaxe und Therapie der Atherosklerose ist in den letzten Jahren sehr viel veröffentlicht worden. Die Zahl der Arbeiten, in denen, sei es auf experimentellem, sei es auf klinischem Gebiet eine Herabsetzung des Blutcholesteringehaltes und der Neutralfette durch exogene Zufuhr von Fettsäuren mit zwei oder mehreren Doppelbindungen behauptet wurde, überwiegt bei weitem diejenige, in denen eine solche Wirkung bezweifelt oder gar bestritten wird. In dieser Situation scheint es besonders wichtig, auf die grossen Lücken hinzuweisen, die heute noch in unseren Kenntnissen über Stoffwechsel und Wirkungsmechanismus dieser Verbindungen bestehen. Weder ist eindeutig festgelegt, wo der Ort der Sättigung bzw. Entsättigung der Fettsäuren im Organismus zu suchen ist – die Leber als das zentrale Stoffwechselorgan mit den meisten Fermenten gilt als wahrscheinlichster Sitz dieser biochemischen Prozesse – noch ist geklärt, welche Rolle der Grad der Entsättigung der Fettsäuren im Stoffwechsel spielt.

Es ist bekannt, dass die einfach ungesättigte Ölsäure vom Organismus synthetisiert werden kann und dass die zweifach ungesättigte Linolsäure, auch als essentielle Fettsäure bezeichnet, nicht im intermediären Stoffwechsel gebildet wird, sondern mit der Nahrung zugeführt werden muss. Auch ist für die vierfach ungesättigte

Arachidonsäure die endogene Bildungsmöglichkeit aus Linolsäure, nicht aber aus Ölsäure, erwiesen. Für die Linolensäure, auch eine sogenannte essentielle Fettsäure mit 3 Doppelbindungen, ist ungewiss, wie weit ihre Zufuhr lebensnotwendig bzw. wie weit sie den anderen ungesättigten Verbindungen gleichwertig ist. Das gleiche gilt für die hohen ungesättigten Säuren mit 5 und mehr Doppelbindungen.

Im folgenden soll über Experimente berichtet werden, in denen das Verhalten der zwei- bis vierfach ungesättigten Fettsäuren, quantitativ bezogen auf das Gesamtfett, nach experimenteller Leberschädigung untersucht worden ist. Dabei interessierte einerseits der Effekt der Leberschädigung selbst auf den Fettstoffwechsel, der durch Erfassung der Totalfette, des Cholesterins, und der Linol-, Linolen- und Arachidonsäure verfolgt wurde. Andererseits erwarteten wir, aus der parallelen Bestimmung dieser Stoffwechselgrössen im Serum und in der Leber Anhaltspunkte über die Herkunft der im Blut kreisenden Fettsubstanzen zu gewinnen. Auch schien es aufschlussreich, die Beziehungen zwischen Grad der Entsättigung der Fettsäuren und Schädigung ihres mutmasslichen Herkunftsortes zu verschiedenen Zeitpunkten zu studieren. Schliesslich haben wir durch gleichsinnige Untersuchungen bei Tieren, die vor 2 Monaten einer akuten Leberschädigung ausgesetzt waren, die Spätfolgen dieser Vergiftung auf den Fettstoffwechsel geprüft.

Als Lebergift wurde von uns Tetrachlorkohlenstoff verwendet. Der Angriffspunkt dieser für experimentelle Leberschädigung oft benutzten Substanz, die je nach Dosierung von reversiblen Zellveränderungen bis zu ausgehenden Nekrosen führen kann, wurde früher in den Mito-

chondrien gesehen, bei denen es zu einer primären Strukturschädigung komme. Neuere Enzymuntersuchungen haben jedoch ergeben, dass die erste Schädigung einer CCl_4 -vergifteten Leberzelle in einem Verlust cytoplasmatischer Enzyme besteht, und dass die Mitochondrienzerstörung erst ein Späteffekt ist, der der fettigen Degeneration nicht vorausgeht¹. Mit einer geeigneten Dosis von CCl_4 gelingt es sehr regelmässig, nicht-letale Leberschädigungen zu erzeugen, die sich bei der zentralen Rolle dieses Organs für alle Umsetzungen auch in Veränderungen des Fettstoffwechsels auswirken müssen.

Versuchsordnung und Methodik. Wir verwendeten für die vorliegenden Versuche weisse, weibliche Laboratoriumsratten im Gewicht zwischen 140 und 180 g. Für die 10 Versuche, in denen nur das Serum untersucht wurde, kamen insgesamt 240 Tiere zur Anwendung. Die Tiere erhielten 1mal 0,2 ccm/100 g Tier einer Paraffinlösung von CCl_4 (15:100) intraperitoneal. Zu den Zeitpunkten 0, 6, 12, 24, 48 und 72 h wurden je 4 Tiere getötet, das Blut gepoolt und im Serum folgende Bestimmungen vorgenommen: Gesamtfette gravimetrisch nach BLOOR et al.², 2-4fach ungesättigte Fettsäuren spektrophotometrisch nach HERB und RIEMENSCHNEIDER³ in der Modifikation von SCHRADER et al.⁴, Cholesterin nach SCHMIDT-THOMÉ et al.⁵ (dieses wurde nur im Serum bestimmt). Für die 3 Versuche, in denen die genannten Substanzen parallel in Serum und Leber bestimmt wurden, benützten wir Gruppen von je 60 Tieren. Diese Versuche wurden mit grösserer Tierzahl angesetzt, weil die Lebereinzelnwerte pro Tier ausserordentliche Schwankungen aufwiesen. Um jahreszeitliche Einflüsse auszugleichen, wurden die Versuche über das ganze Jahr verteilt.

Zwecks Erfassung möglicher Spätwirkungen der CCl_4 -Vergiftung auf den Fettstoffwechsel wurden schliesslich

in 3 Versuchen an je 10 Tieren im Serum und in der Leber wiederum die Gesamtfette, die 3 Polyensäuren und im Serum auch das Cholesterin bestimmt. Verglichen wurden hierbei die Werte vor und 2 Monate nach der CCl_4 -Vergiftung.

Versuchsergebnisse. Betrachtet man die in Figur 1 zusammengefassten Durchschnittswerte für die Serumbestimmungen bei 10 Versuchen, so ergibt sich hinsichtlich der Gesamtfette nach einem initialen Absinken in den ersten 6 h eine kräftige Vermehrung des Serumfettes mit einem Maximum bei 24 h. Auch nach 72 h liegen die Werte noch erheblich über dem Ausgangsniveau. Der anfängliche Abfall des Fettgehaltes im Serum ist nicht eine zufällige Folge der Durchschnittsberechnung, sondern eine regelmässige Beobachtung in allen Versuchen gewesen.

Unter den 3 untersuchten Polyenfettsäuren lässt sich für die Linolsäure eine mässiggradige Vermehrung mit einem Maximum nach 48 h feststellen. Die Schwankungen der Linolensäurewerte sind innerhalb der Beobachtungszeiten nur geringfügig. Eindeutig ist aber das kontinuierliche Absinken der Arachidonsäure im Gefolge

¹ K. R. REES, Ciba Foundation Symposium: *Enzymes and Drugs Action* (1961), p. 344.

² W. R. BLOOR, K. F. PELKAN und P. M. ALLEN, *J. biol. Chem.* **52**, 201 (1922).

³ S. F. HERB und R. W. RIEMENSCHNEIDER, *Analyt. Chem.* **25**, 953 (1953).

⁴ W. SCHRADER, R. BIEGLER und C. OTT, *Klin. Wschr.* **34**, 1242 (1956).

⁵ J. SCHMIDT-THOMÉ und H. AUGUSTIN, *Z. physiol. Chem.* **275**, 190 (1942).

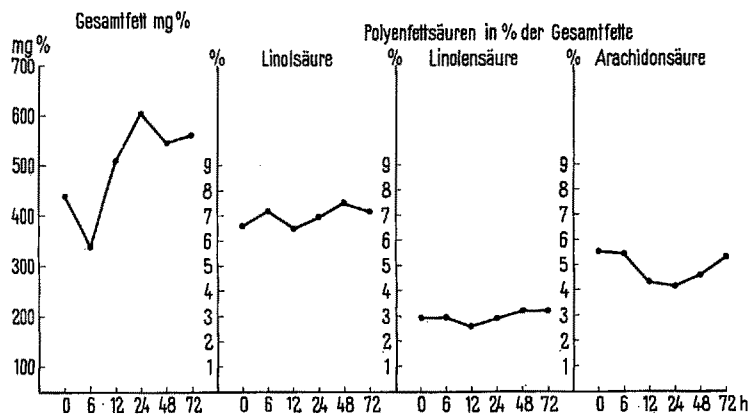


Fig. 1. Durchschnittswerte aus 10 Versuchen. Serumwerte für Gesamtfett (in mg %) und 2-4fach ungesättigte Polyenfettsäuren (in % der Gesamtfette).

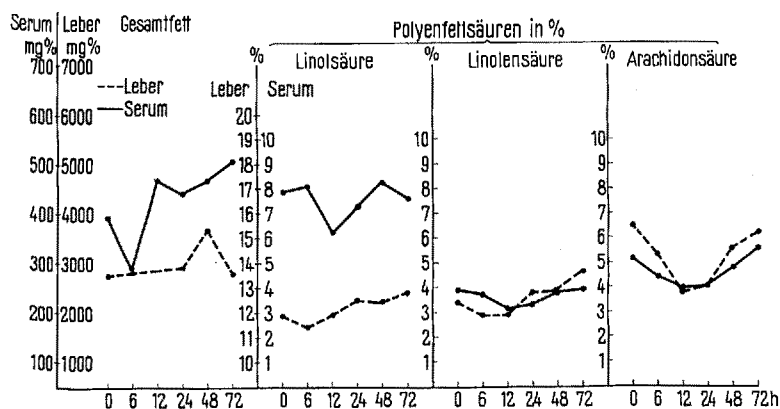


Fig. 2. Gesamtfett und 2-4fach ungesättigte Polyenfettsäuren Durchschnittswerte von 3 Versuchen mit je 60 Tieren für Serum und Leber (Gesamtfett in mg %; Polyenfettsäuren in % der Gesamtfette).

der CCl_4 -Vergiftung zu Versuchsbeginn mit einem Minimum bei 24 h und langsamem Wiederanstieg zum Ausgangswert nach 72 h ($P = < 0,001$).

In Figur 2 sind die Werte für die Gesamtfette und die Polyenfettsäuren der 3 Versuche zusammengestellt, in denen Parallelbestimmungen in Serum und Leber ausgeführt wurden. Aus der kurvenmässigen Darstellung wird klar ersichtlich, dass für alle untersuchten Stoffwechselgrössen ein weitgehender Parallelismus besteht. Die absoluten Fettmengen in der Leber betragen pro Gewichtseinheit rund das 10-fache der Serumwerte. Die Linolsäurewerte haben im Serum und in der Leber ein verschiedenes hohes Niveau – die Leberwerte liegen deutlich höher. Sie zeigen im Ablauf der CCl_4 -Vergiftung geringfügige, meist gleichsinnige Schwankungen. Die leichte Linolsäurevermehrung mit Maximum nach 48 h, die für die vorigen Versuche beschrieben wurde, ist in den vorliegenden 3 Versuchen nur angedeutet. Die Linolensäure zeigt wiederum nur unbedeutende Verschiebungen und zwar identisch in Leber und Serum. Übereinstimmend verlaufen schliesslich auch die Kurven für Leber- und Serum-Arachidonsäure mit deutlich parallelen Tiefwerten bei 12 bis 24 h und nachfolgendem Wiederanstieg zum

Anfangsniveau. Der anfängliche Abfall der Arachidonsäurewerte ist für das Serum ($P = > 0,025$) bzw. für die Leber ($P = < 0,001$) hoch signifikant.

Wir haben in den wiedergegebenen Kurven die Werte für die Polyenfettsäuren in Prozenten des Gesamtfettes angegeben. Diese Darstellung haben wir gewählt, weil unter Zugrundelegen der berechneten Absolutwerte in mg für die Polyensäuren die Verschiebungen der einzelnen Grössen weniger anschaulich zum Ausdruck kommen. In den Tabellen I und III, die das gesamte Zahlenmaterial der 10 Serumversuche und der 3 kombinierten Serum-Leberversuche mit der Streuung wiedergeben, sind die Absolutwerte jeweils in Klammern gesetzt. In Tabelle I sind ausserdem die Cholesterinwerte angegeben, die bis zur 24. Stunde leicht ansteigen und dann langsam wieder absinken.

Um von möglichen Spätfolgen der CCl_4 -Vergiftung im Fettstoffwechsel ein Bild zu erhalten, haben wir in 3 getrennten Versuchen wiederum Gesamtfett und die 3 Polyenfettsäuren parallel in Serum und Leber bestimmt. Die Tiere wurden nach Überstehen der akuten Vergiftung 2 Monate lang auf Normalkost gehalten. Sie liessen äusserlich keine Schädigungszeichen erkennen, ihre Gewichts-

Tabelle I. Durchschnittswerte von 10 Versuchen im Serum
Gesamtfette in mg%; Polyensäuren in % der Gesamtfette und in Absolutwerten (mg) mit Angabe der Streuung

Zeit	Gesamtfette		Linolsäure		Linolensäure		Arachidonsäure		Cholesterin
	mg%	%	mg	%	mg	%	mg	mg%	
0	442,5 ($\pm 33,0$)	6,67 ($\pm 0,6$)	28,7 ($\pm 2,87$)	2,96 ($\pm 0,4$)	13,1 ($\pm 1,8$)	5,54 ($\pm 0,4$)	24,1 ($\pm 1,8$)	55,1 ($\pm 2,2$)	
6	336,0 ($\pm 18,8$)	7,23 ($\pm 0,6$)	24,0 ($\pm 2,0$)	2,97 ($\pm 0,3$)	9,8 ($\pm 0,7$)	5,45 ($\pm 0,3$)	18,8 ($\pm 1,8$)	55,1 ($\pm 1,7$)	
12	512,0 ($\pm 31,2$)	6,50 ($\pm 0,5$)	32,8 ($\pm 1,3$)	2,62 ($\pm 0,3$)	12,9 ($\pm 0,9$)	4,34 ($\pm 0,3$)	21,7 ($\pm 1,6$)	60,8 ($\pm 3,6$)	
24	605,1 ($\pm 61,0$)	6,92 ($\pm 0,2$)	42,1 ($\pm 6,1$)	2,93 ($\pm 0,3$)	17,0 ($\pm 1,9$)	4,25 ($\pm 0,4$)	26,2 ($\pm 1,9$)	64,4 ($\pm 3,3$)	
48	546,3 ($\pm 39,1$)	7,52 ($\pm 0,6$)	40,1 ($\pm 2,6$)	3,24 ($\pm 0,5$)	17,0 ($\pm 2,3$)	4,60 ($\pm 0,4$)	24,9 ($\pm 1,9$)	62,0 ($\pm 4,1$)	
72	566,0 ($\pm 38,0$)	7,30 ($\pm 0,6$)	40,7 ($\pm 2,5$)	3,25 ($\pm 0,5$)	17,7 ($\pm 1,8$)	5,39 ($\pm 0,3$)	32,7 ($\pm 1,0$)	59,4 ($\pm 7,7$)	

Tabelle II. CCl_4 -Vergiftung bei Ratten. Untersuchung nach 2 Monaten. Durchschnittswerte für Serum (A) und Leber (B). Anfangsgewicht 180–200 g; Endgewicht 290–310 g

(A) Gesamtfette in mg%; Polyensäuren in % der Gesamtfette				
Gesamtfette		Linolsäure		Arachidonsäure
mg %		%	%	%
Kontrolle	385	7,3	2,6	5,3
Versuch I	300	6,7	7,3	3,1
Versuch II	376	9,0	8,3	3,1
Versuch III	331	8,7	8,3	2,9

Gesamtfette in % des Lebergewichts und in Absolutwerten (mg); Polyensäuren in % der Gesamtfette und in Absolutwerten (mg)
(B)

Gesamtfette			Linolsäure		Linolensäure		Arachidonsäure	
%	mg		%	mg	%	mg	%	mg
Kontrolle	2,7	318	13,1	42,6	4,9	15,3	7,3	23,2
Versuch I	3,8 (± 0,4)	361 (± 41,5)	10,5 (± 0,9)	38,3 (± 5,8)	9,8 (± 0,5)	35,9 (± 5,4)	5,3 (± 0,4)	18,4 (± 1,4)
Versuch II	3,1 (± 0,2)	312 (± 20,4)	11,5 (± 0,9)	35,5 (± 2,2)	7,6 (± 0,5)	21,8 (± 2,6)	5,7 (± 0,5)	17,5 (± 1,2)
Versuch III	2,9 (± 0,2)	245 (± 21,5)	13,1 (± 0,8)	32,1 (± 3,5)	6,9 (± 0,4)	16,9 (± 1,6)	5,4 (± 0,2)	15,8 (± 1,7)

Tabelle III. Einzelwerte von 3 Versuchen für Serum und Leber. (Für das Serum: Angabe für das gepoolte Serum. Für die Leber: Angabe des Durchschnitts von je 8 Lebern)
Gesamtfette in Serum und Leber in mg% und in Absolutwerten (mg), Polyensäuren für Serum und Leber in % der Gesamtfette und in Absolutwerten (mg) mit Angabe der Streuung

Zeit	Gesamtfette				Linolsäure				Linolensäure				Arachidonsäure			
	Serum		Leber		Serum		Leber		Serum		Leber		Serum		Leber	
	mg%	mg	mg%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg
0	545	3037 (± 425)	2441 (± 163)	169 (± 21)	5,7	31	9,8 ($\pm 1,0$)	16,0 (± 2)	2,6	14	3,5 ($\pm 0,3$)	5,7 ($\pm 0,8$)	5,3	29	7,1 ($\pm 0,5$)	11,7 ($\pm 1,3$)
6	393	2441 (± 163)	2441 (± 163)	286 (± 25)	7,6	30	12,6 ($\pm 0,5$)	36,3 ($\pm 4,0$)	6,1	24	3,2 ($\pm 0,1$)	7,9 ($\pm 1,0$)	4,8	19	5,1 ($\pm 0,5$)	14,2 ($\pm 1,1$)
	245	2907 ($\pm 45,6$)	2907 ($\pm 45,6$)	218 (± 16)	10,4	25	12,6 ($\pm 1,1$)	28,7 ($\pm 4,9$)	2,9	7,1	3,6 ($\pm 0,5$)	7,7 ($\pm 0,8$)	5,5	13	7,3 ($\pm 0,4$)	15,9 ($\pm 0,8$)
	357	4085 (± 262)	4085 (± 262)	285 (± 17)	7,4	26	11,6 ($\pm 0,7$)	34,0 ($\pm 2,3$)	1,9	6,1	3,6 ($\pm 0,2$)	27,6 ($\pm 1,1$)	4,6	16	5,5 ($\pm 0,6$)	16,0 ($\pm 1,7$)
	240	1906 (± 67)	1906 (± 67)	345 (± 15)	6,3	15	11,5 ($\pm 0,3$)	39,5 ($\pm 1,0$)	5,1	12	2,8 ($\pm 0,1$)	9,7 ($\pm 0,3$)	4,4	11	4,0 ($\pm 0,3$)	15,7 ($\pm 1,3$)
12	278	2425 (± 276)	2425 (± 276)	265 (± 20)	10,7	30	18,9 ($\pm 0,6$)	49,9 ($\pm 4,3$)	4,0	17	2,4 ($\pm 0,2$)	6,2 ($\pm 0,6$)	4,2	18	6,5 ($\pm 0,8$)	16,9 ($\pm 1,0$)
	627	5714 (± 464)	5714 (± 464)	444 (± 28)	5,6	35	12,7 ($\pm 0,7$)	57,0 ($\pm 5,7$)	1,9	12	4,1 ($\pm 0,2$)	18,0 ($\pm 1,7$)	4,6	29	4,1 ($\pm 0,2$)	19,0 ($\pm 2,0$)
	363	1435 (± 106)	1435 (± 106)	558 ($\pm 5,4$)	4,6	17	11,9 ($\pm 1,0$)	67,7 (± 13)	3,3	12	2,2 ($\pm 0,8$)	12,0 (± 2)	3,0	11	2,5 ($\pm 0,2$)	14,0 ($\pm 2,0$)
	430	1534 (± 65)	1534 (± 65)	436 (± 37)	8,3	36	21,2 ($\pm 1,1$)	93,2 ($\pm 9,2$)	4,0	17	2,5 ($\pm 0,1$)	10,2 ($\pm 0,5$)	4,2	18	4,5 ($\pm 0,3$)	19,2 ($\pm 1,4$)
24	626	4620 (± 308)	4620 (± 308)	375 (± 23)	8,0	50	13,7 ($\pm 0,8$)	52,0 (± 5)	2,9	18	4,1 ($\pm 0,3$)	15,0 ($\pm 1,1$)	5,8	36	4,6 ($\pm 0,3$)	17,0 ($\pm 1,6$)
	368	2323 (± 220)	2323 (± 220)	373 (± 36)	4,6	17	10,7 ($\pm 0,9$)	39,1 ($\pm 4,8$)	3,3	12	3,5 ($\pm 0,4$)	12,8 ($\pm 2,0$)	3,0	11	3,9 ($\pm 0,4$)	13,4 ($\pm 1,2$)
	340	1843 (± 272)	1843 (± 272)	422 (± 81)	9,3	38	18,2 ($\pm 1,8$)	56,7 (± 7)	3,8	13	3,1 ($\pm 0,2$)	11,6 ($\pm 2,8$)	3,2	11	3,6 ($\pm 0,8$)	13,0 ($\pm 2,3$)
	535	3780 (± 485)	3780 (± 485)	268 (± 35)	6,2	23	10,2 ($\pm 1,0$)	30,0 ($\pm 6,9$)	2,5	13	4,2 ($\pm 0,3$)	12,0 ($\pm 1,5$)	4,9	26	6,2 ($\pm 0,3$)	17,0 ($\pm 1,8$)
48	450	2028 (± 244)	2028 (± 244)	415 (± 42)	8,3	37	12,2 ($\pm 0,4$)	51,8 ($\pm 6,1$)	3,8	17	4,2 ($\pm 0,3$)	17,5 ($\pm 1,8$)	5,0	22	4,7 ($\pm 0,4$)	19,3 ($\pm 1,8$)
	410	5223 (± 1230)	5223 (± 1230)	353 (± 71)	10,4	43	17,5 ($\pm 1,0$)	64,8 (± 17)	5,2	21	3,2 ($\pm 0,2$)	10,9 ($\pm 2,8$)	4,1	17	5,6 ($\pm 0,5$)	16,9 ($\pm 1,8$)
	602	3650 (± 432)	3650 (± 432)	216 (± 29)	5,9	36	9,7 ($\pm 1,3$)	23,0 ($\pm 5,5$)	2,6	16	4,2 ($\pm 0,4$)	10,1 ($\pm 1,5$)	6,3	38	6,6 ($\pm 0,5$)	14,0 ($\pm 2,0$)
	526	2232 (± 289)	2232 (± 289)	255 (± 22)	7,6	40	11,2 ($\pm 0,5$)	26,5 ($\pm 3,2$)	4,4	23	4,2 ($\pm 0,7$)	9,7 ($\pm 1,1$)	4,9	26	4,8 ($\pm 0,9$)	10,8 ($\pm 0,9$)
72	397	2418 (± 250)	2418 (± 250)	236 (± 27)	9,3	37	18,6 ($\pm 1,5$)	46,4 ($\pm 0,7$)	4,6	18	5,3 ($\pm 0,3$)	12,5 (± 2)	5,2	21	7,0 ($\pm 0,4$)	16,0 ($\pm 1,2$)

kurve deckt sich mit der der Kontrollen. In Tabelle II ist das Zahlenmaterial eingetragen. Erwartungsgemäß liegen die Gesamtfettwerte für Serum und Leber im Normalbereich. Der Cholesteringehalt im Serum ist ebenfalls unverändert. Unter den Polyenfettsäuren sind hingegen erhebliche Verschiebungen eingetreten. Während die Werte für die Linolsäure keine konstanten Veränderungen erkennen lassen, ist die Arachidonsäure deutlich gegenüber den Kontrollen vermindert. Am auffälligsten ist jedoch das Verhalten der Linolensäure, die unter deutlichem Parallelismus für Serum und Leber eine starke Erhöhung zeigt. Diese findet sich konstant in allen 3 Versuchen. Eine signifikante relative Vermehrung von Linolensäure ist eine Beobachtung, für die wir in keinem unserer ausgedehnten früheren Experimente über den Polyenfettsäuregehalt bei Ratten eine Analogie gefunden haben.

Besprechung der Resultate. Die wesentlichsten Befunde unserer Tetrachlorkohlenstoffversuche lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Als Folge der akuten Lebervergiftung findet sich in den ersten 72 h nach vorübergehendem Abfall ein konstanter Anstieg der Gesamtfette. Bei der von uns gewählten CCl_4 -Dosis ist der akute Effekt auf den Fettstoffwechsel flüchtig und nach 72 h im Abklingen begriffen. Unter den Polyenfettsäuren erfährt die Linolsäure einen leichten Anstieg, die Linolensäure bleibt praktisch unverändert. Für die Arachidonsäure ist eine starke vorübergehende Verminderung zu Versuchsbeginn charakteristisch. Alle Veränderungen verlaufen in Serum und Leber parallel. Als Spätwirkung der CCl_4 -Vergiftung (nach 2 Monaten) lässt sich eine deutliche Verschiebung innerhalb des Sättigungsgrades der einzelnen Polyenfettsäuren feststellen, indem die Arachidonsäure deutlich abgenommen, vor allem aber die Linolensäure stark zugenommen hat.

Die geschilderten Befunde erlauben, mit aller Vorsicht folgende 2 Schlüsse zu ziehen:

(1) Die Veränderungen der Werte von Gesamtfett und Polyenfettsäuren im Serum nach Tetrachlorkohlenstoffvergiftung sind offensichtlich bedingt durch gleichzeitige und gleichartige Zu- oder Abnahme der entsprechenden Werte in der Leber. Bei der bekannten Rolle der Leber für den Fettstoffwechsel, zum Beispiel für die β -Oxydation der Fettsäuren, stand diese Parallelität für die Gesamtfette von vornherein zu erwarten. Für die ungesättigten Fettsäuren bedeutet der Befund einen Anhaltspunkt dafür, dass der Ort der Sättigung bzw. Entsättigung der Fettsäuren ebenfalls in der Leber zu suchen sein dürfte.

(2) Die höchst ungesättigte der von uns bestimmten Polyenfettsäuren, die Arachidonsäure, zeigt im Gefolge der toxischen Leberschädigung akut eine vorübergehende signifikante Verminderung in Serum und Leber. Sie liegt auch 2 Monate nach der CCl_4 -Vergiftung wesentlich unter dem Normalbereich. Offenbar verliert also die Leber als Folge der Schädigung die Fähigkeit zur Entsättigung der Fettsäuren in normalem Umfang, in unserem Falle also der Bildung von Arachidonsäure mit 4 aus Linolsäure mit 2 Doppelbindungen. Auch an die Möglichkeit einer verminderten Speicherfähigkeit für Arachidonsäure (siehe ihre Verminderung als Spätwirkung der CCl_4 -Vergiftung) muss hier gedacht werden. Auf eine tiefgreifende und bleibende Veränderung in der Bildung ungesättigter Fettsäuren weist ferner der Befund der starken Erhöhung der Linolensäurewerte 2 Monate nach der CCl_4 -Vergiftung hin.

Über die besonderen funktionellen Aufgaben der einzelnen Polyensäuren lässt sich auf Grund der von uns nachgewiesenen Verschiebungen des Entsättigungsgrades

nichts Gesichertes aussagen. Es ist immerhin sehr auffällig, dass der Leberschädigung eine Verminderung der hoch ungesättigten Arachidonsäure parallel geht. In diesem Zusammenhang interessiert das Ergebnis von Fütterungsversuchen bei Ratten, die 3% Cholesterin, 1% Cholsäure und 30% Rahm, ein Fett mit vorwiegend gesättigten Fettsäuren, in ihrer Kost erhielten. Nach zweimonatiger Beobachtungszeit haben wir bei unveränderten Linol- und Linolensäurewerten ebenfalls einen sehr beträchtlichen Rückgang des Arachidonsäuregehaltes im Serum festgestellt – 5,6mg% vor und 1,8 mg% im Durchschnitt nach der Rahmperiode. Von Beobachtungen am Menschen sei nur die Arbeit von NOTHMAN und PROGER⁶ angeführt, die nach Zufuhr von Arachidonsäure eine wesentlich stärkere und in kleineren Dosen wirksame Senkung der Serumlipide gefunden haben als nach Linol- und Linolensäure. Wir möchten aber die Schlussfolgerung, dass den hochungesättigten Ölen in der Prophylaxe und Therapie der Atherosklerose der Vorzug zu geben sei, solange offen lassen, bis die postulierte Steigerung der Fettumsetzungen – Senkung der Lipide und Neutralfette im Blut – durch die ungesättigten Fettsäuren in Abhängigkeit von ihrem Sättigungsgrad experimentell und klinisch eindeutig erwiesen ist⁷.

Summary. In experiments on rats with CCl_4 -induced liver damage the total lipids and the di- to tetra-enoic fatty acids were estimated. The acute experiment of 72 h duration showed a strong augmentation of total lipids and a transitory diminution of arachidonic acid in serum and liver which two months after the intoxication still persisted together with a marked rise in linolenic acid. The parallelism of changes of saturation of the fatty acids in serum and liver being statistically significant indicates that the process of desaturation is most probably localized in the liver itself.

S. MARKEES

Medizinische Poliklinik Basel (Schweiz),
25. September 1963.

⁶ M. M. NOTHMAN und S. PROGER, Fed. Proc. 19, 221 (1960).

⁷ Die Untersuchungen wurden durch ein Forschungsstipendium der Ciba ermöglicht. Die Cholesterinbestimmungen wurden in den Ciba-Laboratorien (Prof. SCHULER, Dr. ALBRECHT) ausgeführt. Frl. M. SCHLUCHTER bin ich für die sorgfältigen übrigen Bestimmungen zu grösstem Dank verpflichtet.

Zur kristallmorphologischen Eiweisstestung von Samen

Als Testmethode für Eiweissubstanzen ist die Pfeiffersche Kupfer-II-chlorid-Kristallisation¹ von der diagnostischen Blutuntersuchung her bekannt (SELAWRY² dort weitere Literatur). Bei mässigem Aufwand ist das Verfahren für eine grosse Probenzahl geeignet. Das vorhandene Erfahrungsgut beweist, dass die Reproduzierbarkeit bei normierter Technik gut ist. NEUHAUS^{3,4} nimmt an, dass sich die Methode «vom kristallographischen Blickpunkt für den Versuch einer systematischen, kristallmorphologischen Eiweisstestung empfiehlt». Inwiefern diese Ansicht von biologischer Seite bestätigt werden kann, lässt sich beurteilen, wenn einige wohl definierte Objekte vielseitig durchuntersucht sind.

Es wird hier über 3818 Serien mit mehr als 22800 Einzelplatten berichtet, die Untersuchungen aus den Jahren 1957–62 entstammen. Wir verwendeten Samen und Samenteile einer Reihe von Leguminosen und Gramineen, aus denen nach vorhergehender Zerkleinerung wässrige Extrakte hergestellt wurden. Im übrigen wurde die in der Literatur beschriebene Versuchsanstellung beibehalten^{5,6}.

Die Kristallisationsplatten wurden nach morphologischen Merkmalen vergleichend ausgewertet. Bekanntlich zeigt ein normales Kristallisationsbild Kristallnadelzüge, die von einem oder einigen wenigen Keimpunkten ausgehend, mit wechselnder Textur, Nadelung, Krümmung, Verzweigungswinkel usw. zum Rande der Platte hin verstrahlen. Man unterscheidet daher für die Auswertung zwischen Keim- oder Zentralzone, Mittel- und Randzone, mit ihren jeweils charakteristischen Eigenschaften. Für die einzelnen Objekte besteht ein optimales Verhältnis von Menge an Zusatz (0,02 g): Menge an Kupferchlorid (0,2 g) je Platte, das erforderlichenfalls im Vorversuch ermittelt wird.

Ergebnisse. (1) Leguminosen- und Gramineen-Typen: Samen von Leguminosen (Bohne, *Phaseolus vulgaris* L.; Erbse, *Pisum sativum* L.; Esparsette, *Onobrychis viciae*-

Gehalt der Extrakte in mg je g Ausgangssubstanz, Mahlung: 2 min Schwingmühle, Substanz: Wasser = 1:10, 2 mal Filtration

Saatgut	Trockensubstanz mg	N mg	% N in der Trockensubstanz
Weizen	45,5	1,66	3,6
Hafer	55,7	1,76	3,2
Gerste	69,6	1,57	2,3
Erbsen	124,2	6,27	5,0
Bohnen	176,9	6,70	3,8

Keimlings- reihe		mg Trocken- substanz je g Einwaage	mg N je g Einwaage	% N in der Trocken- substanz
5 h Quellung	Embryo	57,6	2,62	4,6
	Cotyledonen	69,6	1,77	2,5
nach 4 Tagen	Keimling	49,7	2,62	5,3
	Cotyledonen	62,8	2,83	4,5
nach 8 Tagen	Keimling	42,9	2,83	6,6
	Cotyledonen	54,5	2,85	5,2

¹ Kupfer-II-Chlorid wird im Text als CuCl_2 abgekürzt.

² A. SELAWRY und O. SELAWRY, *Kupferchlorid-Kristallisation in Naturwissenschaft und Medizin* (Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart 1957).

³ A. NEUHAUS, in SELAWRY, *Kupferchlorid-Kristallisation in Naturwissenschaft und Medizin* (1957).

⁴ A. NEUHAUS, Umschau 16, 486 (1960).

⁵ A. SELAWRY, Hippokrates 31, 454 (1960).

⁶ A. SELAWRY, *Neue Einblicke in die Samenkeimung* (Dornach 1961).