

*Aus dem Institut für Tierzucht und Tierfütterung der Universität Bonn
(Direktor Prof. Dr. H. Havermann)*

Kobalt- und Vitamin B₁₂-Stoffwechsel beim Huhn

I. Dialysierbarkeit von ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂ aus dem Caecum in vitro

Von K. H. MENKE

Mit 3 Abbildungen und 2 Tabellen

(Eingegangen am 9. September 1960)

Es ist seit langem bekannt, daß auch im Intestinum des Nichtwiederkäuers eine mikrobielle Synthese von B-Vitaminen stattfindet (SCHWEIGERT u. a. 1945). Der Ort der Vitamin B₁₂-Synthese ist beim Huhn das Caecum (MENKE 1960a)¹. Ob die hier gebildeten Vitamine aber auch resorbiert und verwertet werden können, ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Während die Fütterungsversuche von MORGAN und JUDKIN (1957) und HAENEL u. a. (1959) eine Verwertung aus dem Caecum möglich erscheinen lassen, konnten JACKSON und Mitarb. (1955) bei Hühnern nach Injektion von radioaktivem Vitamin B₁₂ in abgebundene Caeca keine nennenswerte Resorption feststellen. Auch wir fanden nach Verabreichung von radioaktivem CoCl₂ nach 12 Stunden nur 0,02% der verabreichten Radioaktivität als Cobalamine in der Leber, obwohl die Caeca zur gleichen Zeit 10% der Dosis in Cobalaminbindung, davon ein sechstel als reines Vitamin B₁₂, enthielten (MENKE 1960a)¹.

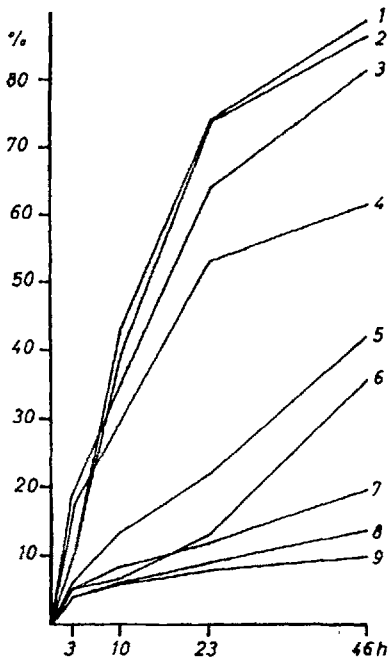
In Versuchen über die Extrahierbarkeit von Cobalaminen aus tierischem Gewebe und aus Darminhalt und Kot von Hühnern fanden wir in letzteren Substanzen eine wesentlich bessere Dialysierbarkeit als in den Organen und Geweben (MENKE 1960b). Die ⁶⁰Co-markierten Cobalamine im Caecum-Inhalt konnten z. B. zu 98% abdialysiert werden, während im Darmgewebe selbst nur etwa 20% der Cobalamine (65% der radioaktiven Verbindungen, also vornehmlich ⁶⁰CoCl₂) dialysierbar waren. Die Tatsache, daß dennoch nur verschwindend geringe Mengen aus dem Darminhalt in das Gewebe übergehen, führen LEE und WOLTERINK (1955) auf eine starke Fixierung von Kobalt und Cobalaminen an Bakterien im Darm-Lumen zurück. Diese Deutung legt die Vermutung nahe, daß die wachstumstimulierende Wirkung einiger Antibiotika mit einer verringerten Bindung von selbstsynthetisiertem Vitamin B₁₂ an die Bakterien des Caecums zusammenhängt, so daß nach Verfütterung von

¹) Nach letzten Untersuchungen ist es zweifelhaft, ob die im Ionenaustauschchromatogramm der Cobalamine aus dem Caecum in der Position des Cyanocobalamins gefundene Substanz mit dem Vitamin identisch ist, da diese sich im Elektropherogramm bei pH 8 und pH 10 unterschiedlich verhalten. Die biologische Aktivität der gefundenen Substanz konnte noch nicht nachgeprüft werden.

Antibiotika dem Tier mehr von diesem Vitamin zugeführt würde. Voraussetzung wäre allerdings, daß das Darmgewebe keine Barriere für die Diffusion des Vitamins darstellt, da eine aktive Resorption in diesen Darmabschnitten ja nicht mehr stattfindet. Um diese Frage näher zu untersuchen, wurden Dialyserversuche mit frischen Caeca unter variierenden Bedingungen vorgenommen.

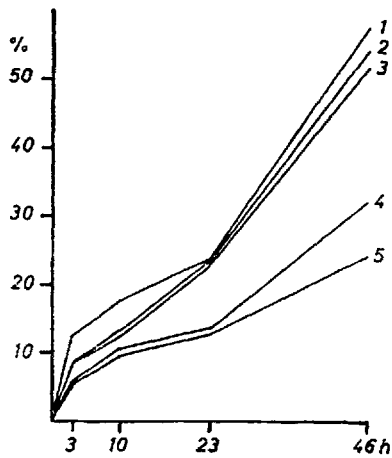
Versuchsordnung

Der erste Versuch (Abb. 1) wurde mit den Caeca von 9 frisch geschlachteten Legehennen durchgeführt. Nach Entnahme der Caeca injizierten wir je 0,1 ml H₂O mit 15000 cpm ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂ in das Lumen, massierten die Lösung vorsichtig ein und banden die Darmöffnung ab. Je ein Darm wurde in ein Reagensglas der Größe 200x 30 mm, enthaltend 80 ml Tyrode-Lösung bzw. Citrat-Puffer (Zusammensetzung s. Tab. 1) gelegt, mit einem Gummistopfen verschlossen und in eine langsam rotierende Apparatur gespannt, die



- 1 pH 4,25, Citr. Ph. Pen. Str.
- 2 pH 4,25, Citr. Ph.
- 3 pH 6,0, Tyr. Aur. - 20°
- 4 pH 6,0, Tyr. o.Z. - 20°
- 5 pH 6,0, Tyr. Ph. Pen. Str.
- 6 pH 6,0 Tyr. Ph.
- 7 pH 6,0 Tyr. Pen.
- 8 pH 6,0 Tyr. Aur.
- 9 pH 6,0 Tyr. o. Z.

Abb. 1. Dialysierbarkeit aus den Caeca von Legehennen in Prozent des in das Darmlumen injizierten ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂ (1. Versuch)



- 1 pH 6,0 Tyr. 500 mg Aur./litr. + Injektion
- 2 pH 6,0 Tyr. 500 mg Aur./litr.
- 3 pH 6,0 Tyr. 100000 I.E. Pen./litr.
- 4 pH 6,0 Tyr. 100 mg Aur./litr.
- 5 pH 6,0 Tyr. o. Z.

Abb. 2. Dialysierbarkeit aus den Caeca von Junghennen. (2. Versuch). Mittel aus 3 Parallelen

in einem auf 40° einregulierten Trockenschrank stand. Die verwendeten Lösungen waren ebenfalls auf 40° vorgewärmt, um ein Abkühlen der Blinddärme zu vermeiden. Die Caeca eines Huhnes wurden so auf die verschiedenen Gruppen verteilt, daß niemals 2 Därme desselben Huhns in die gleiche Versuchsgruppe kamen. Nach 3, 10, 23 und 46 Stunden gossen wir die Dialysate ab und füllten mit der gleichen Menge frischer Lösung nach. Die Messung der Dialysate und des nach 46 Stunden in den Därmen noch enthaltenen radioaktiven Restes geschah mit einem Szintillationszähler mit flachem Kristall.

Im 2. und 3. Versuch (Abb. 2 und Tab. 2) behandelten wir die Caeca von Junghennen nach dem gleichen Verfahren. Zur Kontrolle diente ein 4. Versuch (Abb. 3) mit Dialysierschläuchen, die Caecum-Inhalt und radioaktives Vitamin B₁₂ enthielten.

Tabelle 1

Zeichenerklärung und Zusammensetzung der verwandten Dialysierflüssigkeiten

Citr.	= 0,2-m-Na-Citrat-Puffer, pH 4,25 (105 g Zitronensäure, 40 g NaOH, 250 ml 1-n-HCl, ad 5 ltr. mit H ₂ O) eingestellt mit NaOH und HCl.
Tyr.	= Tyrode-Lösung (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g CaCl ₂ , 0,1 g MgCl ₂ X 6 H ₂ O, 0,05 g NaH ₂ PO ₄ , 1 g Glucose, 0,7 g NaHCO ₃ , 1100 ml H ₂ O) eingestellt mit NaOH und HCl.
Ph	= 2 g Phenol/ltr.
Pen	= 100000 I. E. Penicillin/ltr.
Str	= 15 mg Streptomycin-Sulfat/ltr.
Aur.	= 50 mg Aureomycin/ltr. (soweit nicht anders angegeben).
o. Z.	= ohne Zusätze
—20°	= Caeca vor Beginn der Dialyse 24 h bei —20° aufbewahrt.

Tabelle 2

Dialysierbarkeit aus den Caeca von Junghennen in Prozent der in das Darmlumen injizierten Menge ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂. 3. Versuch. (r = rechtes Caecum, l = linkes Caecum)

Tier Nr.	Tyrode-Lösung	abdialysiert nach			
		3 Std.	10 Std.	23 Std.	46 Std.
1r)	pH 6,5 o. Z.	0,1	4,4	34,9	77,7
1 l)	pH 6,5 Aur	0,3	5,5	29,9	79,9
2r)	pH 6,5 o. Z.	0,9	9,2	35,3	61,1
1 l)	pH 6,5 Aur	0,3	3,8	21,5	51,3
3r)	pH 6,0 o. Z.	0,3	2,9	29,3	67,9
1 l)	pH 6,0 Aur	0,3	2,6	14,9	51,3
4r)	pH 6,0 o. Z.	0,3	0,8	3,2	28,2
1 l)	pH 6,0 Aur	0,1	0,2	4,5	48,8
5r)	pH 5,5 o. Z.	0,4	2,4	20,0	75,0
1 l)	pH 5,5 Aur	1,4	4,1	18,6	63,7
6r)	pH 5,5 o. Z.	0,8	6,9	40,0	75,3
1 l)	pH 5,5 Aur	1,8	3,7	25,9	81,9
7r)	pH 5,0 o. Z.	2,5	5,4	7,8	12,7
1 l)	pH 5,0 Aur	1,7	4,8	7,6	10,5
8r)	pH 4,0 o. Z.	0,6	2,6	10,6	42,2
1 l)	pH 4,0 Aur	0,6	2,5	11,0	50,9
9r)	pH 4,0 o. Z.	0,6	1,6	2,5	7,9
1 l)	pH 4,0 Aur	0,5	1,3	2,9	15,4

Ergebnisse

Im ersten Versuch mit Caeca von Legehennen (Abb. 1) wurden in Tyrode-Lösung vom pH 6,0, ohne Zusätze, nach 4 Dialyseschritten und 46 Stunden nur 10% des injizierten Vitamin B₁₂ abdialysiert. Nach Zusatz von Aureomycin oder Penicillin stieg die Dialyserate geringfügig (auf 14 bzw. 19%), während Phenol einen deutlichen Anstieg verursachte (auf 36%). Im zweiten Versuch mit Junghennen (Abb. 2) bewirkten 100 mg Aureomycin je ltr. ebenfalls nur eine geringe Steigerung der Dialysierbarkeit, die nicht gesichert sein dürfte, während 500 mg Aureomycin je ltr. oder eine zusätzliche Injektion von gesättigter, wässriger Aureomycin-Lösung in das Darmlumen ebenso wie die penicillinhaltige Lösung die Dialyserate verdoppeln. Im dritten Versuch (Tab. 2) ist kein eindeutiger Effekt des Aureomycins erkennbar. Hingegen fällt auf, daß die Dialyserate von Tier zu Tier sehr stark schwankt. Die Caeca der Hennen 4, 7 und 9 ließen sowohl mit als auch ohne Aureomycinzusatz in 3 Dialyseschritten weniger als 10% des Vitamins durchdiffundieren, während zum gleichen Zeitpunkt die Dialyserate bei den Tieren 1, 2, 3, 5 und 6 zwischen 15 und 40% lag. Inwieweit der pH-Wert der Tyrode-Lösung die Dialysierbarkeit des Vitamins im 3. Versuch beeinflußt hat, ist nicht sicher erkennbar. Ansich läßt sich Vitamin B₁₂ bei pH 4–5 besser extrahieren als bei pH 6, in Tyrode-Lösung scheint dieser Effekt jedoch nicht aufzutreten. In Citrat-Puffer vom pH 4,25 mit Phenolzusatz fanden wir im 1. Versuch (Abb. 1) eine Dialyserate von 87% nach 4 Schritten.

Werden die Caeca vor Beginn der Dialyse 24 Stunden bei –20° aufbewahrt, so ist ihre Durchlässigkeit für Vitamin B₁₂ deutlich gestiegen (60%). Aureomycinzusatz bewirkt eine weitere Steigerung auf 80% (Abb. 1).

Nimmt man an Stelle frischer Caeca einfachen Dialysierschlauch, füllt diesen mit Caecum-Inhalt und setzt radioaktives Vitamin B₁₂ zu (Abb. 3), so ergibt sich eine maximale Dialyserate, die im 4. Schritt schon über 90% erreicht. Dabei ist die Zusammensetzung des Dialysemediums (pH-Wert, Antibiotika-Zusätze) weitgehend ohne Einfluß.

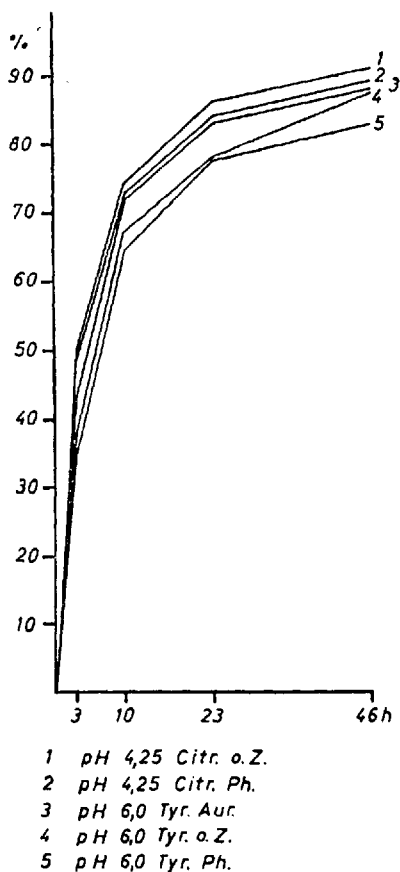


Abb. 3. Dialysierbarkeit von ¹⁴C-Vitamin B₁₂ aus Caecum-Inhalt in Dialyserschläuchen in Prozent der eingesetzten Radioaktivität. (4. Versuch). Mittel aus 3 Parallelen.

Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, daß die Permeabilität des frischen Caecumgewebes für Vitamin B₁₂ sehr gering ist. Antibiotikazusätze zum DialysemEDIUM erhöhen die Diffusion nur wenig. Offenbar ist die Bindung des Vitamins B₁₂ an Bakterien im Darmlumen nur von sekundärer Bedeutung für die Resorption. Bei Verwendung von Dialysierschlauch (Abb. 3) wurden in Tyrode-Lösung vom pH 6,0, ohne Zusätze, sogar 83% in 4 Schritten abdialysiert, gegenüber 89% nach Zusatz von Phenol und 90% in Citrat-Puffer pH 4,25 + Phenol. Aus frischen Caeca diffundieren im gleichen Zeitraum in Tyrode-Lösung pH 6,0, ohne Zusätze, nur 10%. Die Wirkung des Phenols auf die Dialysierbarkeit dürfte in erster Linie auf der Denaturierung des Darmgewebes beruhen, nicht so sehr auf dem antibakteriellen Effekt. Da das Gewebe in Citrat-Puffer pH 4,25 ebenfalls schneller abstirbt als in Tyrode-Lösung pH 6,0, kann auch die höhere Dialyserate in ersterem Medium so erklärt werden. Schließlich bewirkt auch die Unterkühlung der Caeca auf -20° ein früheres Denaturieren des Gewebes.

Die starken Schwankungen in den Einzelergebnissen, wie sie besonders in der Tab. 2 erkennbar sind, dürften ebenfalls darauf hindeuten, daß die Überlebensdauer der Caeca, die einmal von der nie ganz konstant zu haltenden Behandlung und zum anderen von individuellen Eigenschaften des Tieres abhängt, der entscheidende Faktor für die Dialysierbarkeit des Vitamin B₁₂ aus dem Caecum darstellt. Es ist somit unwahrscheinlich, daß Antibiotikazusätze zum Futter die Verfügbarkeit von im Caecum synthetisiertem Vitamin B₁₂ erhöhen, da das entscheidende Hindernis in der geringen Permeabilität des lebenden Caecumgewebes liegen dürfte.

Für die technische Mitarbeit sei Fräulein URSULA UMBERG gedankt.

Zusammenfassung

Nach Injektion von radioaktivem Vitamin B₁₂ in frisch entnommene Caeca wurden in Tyrode-Lösung ohne Zusätze (pH 6,0, bei 40°), in 4 Schritten und 46 Stunden nur 10% des Vitamins abdialysiert. Nach Zusatz von Aureomycin oder Penicillin stieg die Dialyserate geringfügig oder garnicht, in phenolhaltigen Lösungen oder in Citrat-Puffer vom pH 4,25 jedoch deutlich bis auf 90%. Vorheriges Unterkühlen der Caeca auf -20° erhöhte ebenfalls die Durchlässigkeit. Es wird gefolgert, daß die Verwertung von selbstsynthetisiertem Vitamin B₁₂ aus dem Caecum nicht so sehr durch die Bindung des Vitamins an Bakterien als durch die geringe Permeabilität des lebenden Caecumgewebes behindert wird.

Schrifttum

- HAENEL, H., RUTLOFF, H. und ACKERMANN, H., *Biochem. Z.*, **331**, 209 (1959). — JACKSON, J., MANGAN, G. F., MACHLIN, L. J. und DENTON, C., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **89**, 225 (1955). — LEE, C. C. und WOLTERINK, L. F., *Poultry Sci.* **34**, 764 (1955). — MENKE, K. H.: Die intestinale Synthese von Vitamin B₁₂ und Analogen nach oraler Verabreichung von $^{60}\text{CoCl}_2$. *Habil.-Schrift* (Bonn 1960a). — MENKE, K. H., *Arch. Geflügelk.* **24**, 137 (1960b). — MORGAN, T. B. und JUDKIN, J., *Nature (L)*, **180**, 543 (1957). — SCHWEIGERT, B. S., MCINTIRE, J. M., HENDERSON, L. M. und ELVEIHEM, C. A., *Arch. Biochem.* **6**, 403 (1945).

Anschrift des Verfassers:

Dr. K. H. MENKE, Univ.-Inst. f. Tierzucht und Tierfütterung, Bonn