

85. Der Einfluss von Vitamin E-Mangel auf die Aktivität der Cholin-esterase

von Hubert Bloch.

(23. V. 42.)

Im Anschluss an Untersuchungen über das Verhalten der Cholin-esterase (ChE) bei der o-Trikresylphosphatvergiftung¹⁾ ergab sich die Frage, ob auch bei den neuromuskulären Störungen, die als Folge einer E-Avitaminose auftreten, und die klinisch und histologisch in gewissem Sinne an die Veränderungen bei der genannten Vergiftung erinnern, Abweichungen im Verhalten der ChE zu beobachten seien. Obwohl die neuromuskulären Ausfallserscheinungen bei Vitamin E-Mangel schon von den verschiedensten Seiten untersucht worden sind, war bis jetzt über etwaige Störungen im Fermentsystem des Acetylcholinstoffwechsels des Muskels nichts bekannt geworden. Angesichts der Tatsache jedoch, dass durch den Vitamin E-Mangel der Muskelstoffwechsel direkt und unmittelbar tangiert zu sein scheint, durfte man annehmen, dass sich bei E-avitaminotischen Tieren Änderungen im ChE-Gehalt der Organe nachweisen lassen.

Die vorliegenden Versuche wurden an weiblichen Ratten gemacht. Es sollte der ChE-Gehalt verschiedener Organe von normalen Ratten, von Ratten, die sich in verschiedenen Stadien der E-Avitaminose befanden, und schliesslich von Tieren, die nach durchgemachter E-Avitaminose durch *d,l- α -Tocopherol-acetat* geheilt worden waren, untersucht werden.

Methodik.

Die Bestimmung der Fermentaktivität im Gehirn, in der Leber und im Serum erfolgte nach der manometrischen Methode von *Ammon*²⁾ im *Warburg*-Apparat. Die Organextrakte bzw. Serumverdünnungen wurden mit einer Hydrogencarbonat-*Ringer*-Lösung, nach *Krebs*³⁾ hergestellt, bei 3000 U./min. während 15' zentrifugiert, und vom Überstehenden mit einer Glaskapillare vorsichtig abpipettiert. Die so gewonnenen Extrakte sind weniger aktiv als die noch feine Organpartikel enthaltenden Gewebsemulsionen⁴⁾; da es bei diesen Bestimmungen jedoch nur darauf ankommt, unter sich konstante relative Werte zu erhalten, so hat sich uns diese Methode gut bewährt.

¹⁾ *H. Bloch*: *Helv. Med. Acta* **8**, Suppl. VII, 15 (1941), und weitere, bisher unveröffentlichte Versuche.

²⁾ *R. Ammon*: *Pflüger's Arch. ges. Physiol.* **233**, 486 (1934).

³⁾ *H. A. Krebs* und *K. Henseleit*: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Ch.* **210**, 33 (1932).

⁴⁾ *H. Birkhäuser*: *Helv.* **23**, 1071 (1940).

Von jedem Extrakt wurden 4—5 Parallelbestimmungen gemacht. Regelmässige Kontrollen mit Prostigmin, das die ChE praktisch vollständig hemmt, zeigten die Spezifität der Acetyl-cholinspaltung. Die Leerwerte und die Werte für die Eigenhydrolyse des Acetyl-cholins (Acetyl-cholin-chlorid „Roche“) wurden in Abzug gebracht.

Tiermaterial: Weibliche, virginelle Ratten im Gewicht von 170—220 g. Die Tiere, die aus einer sehr regelmässigen Zucht stammten, wurden durch Entbluten aus der Carotis ohne Narkose getötet und die Organe sofort verarbeitet. Es wurden fünf Gruppen von Tieren untersucht:

a) 8 normale, geschlechtsreife, weibliche Ratten (Alter ca. 10 Monate).

b) 2 Ratten (Alter 4 Monate), die seit 1 Monat Vitamin E-freies Futter erhalten hatten. Die Tiere wiesen keine sichtbaren Mangelerscheinungen auf.

c) 9 Ratten (Alter 8—10 Monate), die von ihrem 2. Lebensmonat an E-frei ernährt worden waren. Auch diese Tiere hatten keine sichtbaren Mangelsymptome.

d) 2 Ratten im Alter von 15 Monaten, seit 13 Monaten E-frei ernährt. Eines der beiden Tiere hatte ein graues, gesträubtes Fell und machte einen kranken Eindruck. Deutliche muskuläre Ausfallserscheinungen waren jedoch nicht zu sehen.

e) 6 Ratten von der gleichen Serie wie die sub c) genannten. Alter 10 Monate. Die Tiere erhielten seit ihrem 2. Lebensmonat ein E-freies Futter, dem während der letzten 4 Monate jedoch täglich 40 mg *d,l*- α -Tocopherol-acetat zugesetzt worden waren. Die Ratten waren klinisch gesund. Sie wurden im diöstrischen Zustand getötet.

Ergebnisse.

Die Resultate der ChE-Bestimmungen sind in den Tabellen 1—3 zusammengestellt.

Tabelle 1.
Acetyl-cholinspaltung durch Gehirnextrakte.

| Tiergruppe | Anzahl Versuchstiere | mm ³ CO ₂ /Std. (Mittelwerte) | Mittlere Abweichung der Einzelbeobachtung $\sigma =$ | Mittlerer Fehler $\varepsilon =$ |
|--|----------------------|---|--|----------------------------------|
| Normale Ratten | 8 | 106,5 | 15,9 | 5,6 |
| 1 Monat E-frei ernährt | 2 | 94 | — | — |
| 5—7 Monate E-frei ernährt | 9 | 78,5 | 17,1 | 5,7 |
| 13 Monate E-frei ernährt | 2 | 70 | — | — |
| Mit <i>d,l</i> - α -Tocopherol-acetat geheilt | 6 | 98,6 | 15,3 | 6,2 |

Tabelle 2.
Acetyl-cholinspaltung durch Leberextrakte.

| Tiergruppe | Anzahl Versuchstiere | mm ³ CO ₂ /Std. (Mittelwerte) | Mittlere Abweichung der Einzelbeobachtung $\sigma =$ | Mittlerer Fehler $\varepsilon =$ |
|---|----------------------|--|---|-------------------------------------|
| Normale Ratten | 8 | 89 | 25,7 | 9,1 |
| 1 Monat E-frei ernährt | 2 | 87 | — | — |
| 5—7 Monate E-frei ernährt | 9 | 60 | 19,1 | 6,4 |
| 13 Monate E-frei ernährt | 2 | 65 | — | — |
| Mit <i>d, l</i> - α -Tocopherol-acetat geheilt | 6 | 89,5 | 20,1 | 8,2 |

Tabelle 3.
Acetyl-cholinspaltung durch Serum 1:4 verdünnt.

| Tiergruppe | Anzahl Versuchstiere | mm ³ CO ₂ /Std. (Mittelwerte) | Mittlere Abweichung der Einzelbeobachtung $\sigma =$ | Mittlerer Fehler $\varepsilon =$ |
|---|----------------------|--|---|-------------------------------------|
| Normale Ratten | 8 | 83,5 | 22,5 | 7,8 |
| 1 Monat E-frei ernährt | 2 | 79 | — | — |
| 5—7 Monate E-frei ernährt | 9 | 61,7 | 11,6 | 3,9 |
| 13 Monate E-frei ernährt | 2 | 75 | — | — |
| Mit <i>d, l</i> - α -Tocopherol-acetat geheilt | 6 | 73,3 | 31 | 12,6 |

Es geht daraus hervor, dass bei einem homogenen Tiermaterial von ungefähr gleichaltrigen weiblichen Ratten Tiere, die seit 5—7 Monaten eine Vitamin E-Mangelkost erhielten, in Gehirn und Serum einen gegenüber der Norm deutlich herabgesetzten ChE-Gehalt aufweisen. Die gefundenen Differenzen sind signifikant¹⁾. Gleichartig wie im Gehirn und im Serum verhält sich die ChE auch in der Leber, jedoch ist hier die beobachtete Differenz nicht signifikant. Das röhrt daher, dass bei Leberextrakten die Streuung der Werte so gross ist, dass bei der relativ geringen Anzahl von Tieren, die zur Verfügung stand, keine absolute Sicherheit zu erzielen war. Die grossen individuellen Schwankungen bei der Leber-ChE gehen übrigens auch aus den Versuchsprotokollen anderer Untersucher hervor²⁾. Ähnlich wie bei den Ratten, die seit einem halben Jahr eine Vitamin E-Mangelkost erhielten, lagen die Werte bei den Tieren, die schon über 1 Jahr

¹⁾ R. A. Fisher: Statistical Methods for Research Workers, 6th Edit. London 1936.

²⁾ H. Birkhäuser und E. A. Zeller: Helv. **23**, 1460 (1940).

E-frei ernährt wurden, während die erst seit 1 Monat auf Mangelkost gesetzten Ratten nicht von der Norm abwichen. Es scheint somit, dass zu einem Zeitpunkt, der zwischen dem 1. und dem 5. Monat der E-Karenz liegt, der ChE-Spiegel absinkt und sich dann lange, auch bei fortschreitenden Mangelerscheinungen, auf dieser Höhe hält. Leider war es nicht möglich, eine grössere Anzahl von Tieren mit ausgebildeteren Mangelsymptomen zu untersuchen, und Ratten, welche deutliche muskuläre Ausfallserscheinungen aufgewiesen hätten, standen gar keine zur Verfügung. Bei der Serie von Ratten, die seit 8 Monaten E-frei ernährt wurden und denen während der letzten 4 Monate zu ihrer E-Mangelkost zusätzlich täglich 40 mg *d,l- α* -Tocopherol-acetat verfüttert wurden, legen die ChE-Werte etwas unterhalb der Norm, jedoch deutlich näher bei den Normal- als bei den Mangelwerten.

Diskussion.

Wie schon eingangs erwähnt, wurden diese Versuche im Anschluss an Untersuchungen über den Mechanismus der o-Trikresylphosphatvergiftung unternommen. Wie hatten erwartet, entsprechend der Hemmung der ChE durch o-Trikresylphosphat und den im Verlauf dieser Vergiftung auftretenden muskulären Störungen auch bei E-avitaminotischen Tieren, die auf Grund ihrer Avitaminose ähnliche muskuläre Ausfallserscheinungen zeigten, ebenfalls Änderungen im ChE-Gehalt der Organe feststellen zu können. Dies war auch tatsächlich der Fall. Nun haben die Arbeiten Zeller's und seiner Mitarbeiter¹⁾ gezeigt, dass bei weiblichen Ratten die Sexualhormone einen ausgesprochenen Einfluss auf das Verhalten der ChE besitzen, indem bei geschlechtsreifen oder bei kastrierten und mit Follikelhormon behandelten Tieren die ChE-Werte bedeutend höher liegen als bei juvenilen oder unbehandelten kastrierten Ratten. Bei E-avitaminotischen Tieren tritt nun gewissermassen eine Konkurrenz der beiden Systeme, bei welchen die ChE eine Rolle spielt, auf: des Muskelstoffwechsels einerseits, der Geschlechtshormone andererseits, und es fällt schwer, zu entscheiden, wo die Ursache der festgestellten Abnahme der ChE-Aktivität zu suchen sei. Da jedoch bisher noch nie — trotz der bekannten Fertilitätsstörungen — bei E-Mangel eine Störung der Follikelhormonproduktion einwandfrei festgestellt werden konnte²⁾, neigen wir eher dazu, anzunehmen, dass die Herabsetzung der Aktivität der ChE bei der E-Avitaminose mit den gleichzeitig auftretenden muskulären Veränderungen im Zusammenhang steht.

¹⁾ H. Birkhäuser und E. A. Zeller: loc. cit.; E. A. Zeller und H. Birkhäuser: Helv. **24**, 120 (1941); E. A. Zeller, H. Birkhäuser, H. v. Wattenwyl und R. Wenner: Helv. **24**, 962 (1941); E. A. Zeller, H. Birkhäuser, H. v. Wattenwyl und R. Wenner: Helv. **24**, 1465 (1941).

²⁾ C. Bomskov und K. N. v. Kaulla: Klin. Wschr. **20**, 334 (1941).

Zusammenfassung.

1. E-avitaminotische, weibliche Ratten weisen in Gehirn, Serum und Leber einen gegenüber der Norm verminderten ChE-Gehalt auf.

2. Diese verminderte ChE-Aktivität wird durch Zugabe von *d,l*- α -Tocopherol-acetat zu einem im übrigen E-freien Futter wieder annähernd normalisiert.

Ich danke auch an dieser Stelle Herrn Dr. *M. Guggenheim* von der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G.* für seine wertvollen Anregungen sowie für die Überlassung des ganzen Tiermaterials und der für diese Versuche notwendigen Chemikalien. Die Aufzucht der E-avitaminotischen Ratten leitete Herr Prof. Dr. *V. Demole*.

Basel, Hygienisches Institut der Universität.

86. Über Gallensäuren und verwandte Stoffe.

12. Mitteilung¹⁾.

Vereinfachte präparative Herstellung reiner Desoxy-cholsäure und einiger ihrer Derivate

von T. Reichstein und M. Sorkin.

(3. VI. 42.)

Für Untersuchungen in der Reihe der Gallensäuren benötigten wir grössere Mengen verschiedener Derivate der Desoxy-cholsäure, zu deren präparativer Herstellung nachstehend einige vereinfachte Vorschriften angegeben werden. Um die räumliche Lage der Hydroxylgruppe in 12-Stellung eindeutig bezeichnen zu können, wählen wir die folgende Nomenklatur, die sich auf die röntgenologischen Befunde von *G. Giacomello*²⁾ stützt. Wir bezeichnen Desoxy-cholsäure als 3α , 12β -Dioxy-cholansäure, ebenso werden alle anderen Sterin-derivate, die in 12-Stellung eine Hydroxylgruppe in derselben räumlichen Lage besitzen, als 12β -Oxy-Derivate bezeichnet. Die Haftstelle dieser Hydroxylgruppe wird mit einem ausgezogenen Strich formuliert; die epimeren 12α -Formen erhalten einen punktierten Strich.

Schon die Beschaffung reiner Desoxy-cholsäure (I) stösst auf Schwierigkeiten, da die im Handel erhältlichen Produkte, auch die als „purissimum“ bezeichneten, meistens weit davon entfernt sind, einheitlich zu sein.

¹⁾ Die ersten 11, nicht nummerierten Mitteilungen über diesen Gegenstand finden sich: *Helv.* **20**, 3, 949, 992, 1040 (1937); **21**, 926 (1938); **22**, 75, 741, 753, 1160 (1939); **23**, 747 (1940); **24**, 1127 (1941).

²⁾ *G. Giacomello*, *G.* **69**, 790 (1939).