

2 gr. de caryophyllène ont été coules peu à peu à 0° dans le mélange de 1,1 gr. d'acide sulfurique à 100 % et de 2 cm³ d'éther. Le produit de la réaction, traité par un courant de vapeur d'eau en milieu neutre, a livré 0,35 gr. d'alcool caryophyllénique β , qui, recristallisé dans le méthanol, puis dans l'éther acétique a F. 95—96°. Le résidu d'entraînement, entraîné en présence d'acide sulfurique, a donné 0,2 gr. d'alcool caryophyllénique α , F. 117°¹⁾ après recristallisations dans l'éther de pétrole.

Le produit présumé renfermer du benzoate de benzyle (0,9 gr.) a été nitré selon *Pfau*²⁾; il a donné du m-nitrobenzoate de p-nitrobenzyle, F. 143—144° (essai de mélange) après cristallisations dans l'acide acétique, puis dans l'alcool.

RÉSUMÉ.

L'extrait obtenu en traitant les bourgeons floraux du giroflier par le benzène ne renferme pas de caryophyllène mais bien de l'époxy-dihydrocaryophyllène (Caryophylloxyd de *Treibs*), tandis que le tourteau libre, sous l'action de l'eau bouillante, une huile essentielle constituée en majeure partie de caryophyllène. Ce dernier n'est donc pas un produit biologique.

Laboratoires de Recherches de *L. Givaudan & Cie, S.A.*,
Vernier-Genève.

60. Die Aktivität der Lipase und der Cholinesterase bei fettfreier Diät und bei E-Avitaminose.

5. Mitteilung über das Verhalten der essentiellen Fettsäuren im Tierkörper³⁾
von W. Hess und G. Viollier.
(24. I. 48.)

In der vorangehenden Mitteilung wurde gezeigt, wie die Verabreichung von Sonnenblumenöl bei fettfrei ernährten Ratten eine sehr ausgeprägte Synthese von Fettsäuren, vor allem von gesättigten Fettsäuren und von Ölsäure, verursacht. Im Anschluss an diese Untersuchungen haben wir uns bemüht, einen Einblick in den Reaktionsmechanismus dieser Fettsynthese zu gewinnen. Dies wurde zunächst anhand von Lipasebestimmungen in der Leber von fettfrei ernährten Ratten und von (auf Zuchtfutter gehaltenen) Kontrolltieren zu erfassen versucht, ohne aber zu einem verwertbaren Resultat zu führen. Die Streuung der Werte war für die Leberesterase — wie auch für die Pankreaslipase — so gross, dass die Unterschiede nicht als signifikant betrachtet werden konnten. Da die Leber- und Pankreasextrakte sich somit zur Erzielung einheitlicher Ergebnisse als ungeeignet erwiesen, wurden später die Lipasebestimmungen mit Serum bzw. Plasma und auch mit Gehirnextrakten ausgeführt.

¹⁾ *Asahina, Tsukamoto, J. pharm. soc. Japan* 1922, 463; cf. *Ruzicka, Gibson, Helv.* 14, 573 (1931); *Shintre, Rao, J. Indian Inst. Sc.* 15 A, 86 (1933).

²⁾ *Helv.* 21, 1529 (1938).

³⁾ 4. Mitteilung: *Z. für Vitaminforschung*, im Druck.

Neben der eigentlichen Lipase kommen im Plasma bekanntlich auch andere Esterasen vor, die sich je nach Tierart durch einen wechselnden Spezifitätsbereich unterscheiden. So vermag z. B. die „Pseudocholinesterase“ nach *Mendel, Mundell und Rudney*¹⁾ neben Acetylcholin auch Tributyrin und Methylbutyrat zu hydrolysieren. Obschon auch die „Pseudocholinesterase“ durch Eserin hemmbar ist, kann sie der eigentlichen „spezifischen“ Cholinesterase gegenübergestellt werden. Nach *Zeller und Bissegger*²⁾ ist die Serumcholinesterase weitgehend unspezifisch. Sie wird durch verschiedene Pharmaka (Lokalanästhetica, Sulfonamide und Antipyrrinderivate) gehemmt, was bei den Esterasen verschiedener Organe nicht der Fall ist. *Mendel und Rudney*³⁾ betrachten die Abnahme der Aktivität mit steigender Substratkonzentration als eines der wichtigsten Kriterien der echten Cholinesterase.

Bei der Ratte sind diese Verhältnisse noch nicht endgültig geklärt. Nach *Mundell*⁴⁾ soll die Acetylcholinspaltung des männlichen Rattenserums der „Pseudocholinesterase“ zuzuschreiben sein, während *Nachmannsohn und Rothenberg*⁵⁾ im Nervengewebe nur echte Cholinesterase fanden. Auf jeden Fall muss bei der Untersuchung der Tributyrinspaltung in Plasma und Gehirnbreiextrakten von fettfrei ernährten Ratten auch das Verhalten der Cholinesterase berücksichtigt werden.

In den nachstehend beschriebenen Fermentbestimmungen wurden daher beide Substrate in parallelen Ansätzen mitgeführt. Auf eine weitere Charakterisierung der Plasmacholinesterase der Ratte wurde verzichtet. In dieser Arbeit sollte lediglich festgestellt werden, ob bei einer bestimmten Substrat- und Enzymkonzentration zwischen den fettfrei und den normal ernährten Ratten Unterschiede in der Spaltungsgeschwindigkeit von Tributyrin und Acetylcholin durch verdünntes Plasma oder durch Gehirnbrei vorhanden sind, und ob nach Zufuhr von kleinen Mengen von Linolsäure (in Form von Sonnenblumenöl) eventuell vorhandene Abweichungen wieder korrigiert werden können.

Tatsächlich sinkt nach langdauerndem, völligem Fettentzug das Tributyrinspaltungsvermögen des Plasmas (gegenüber demjenigen von gleichaltrigen, mit gewöhnlichem Zuchtfutter ernährten Tieren) etwa auf die Hälfte herab, um nach Zusatz von wöchentlich 12 Tropfen Sonnenblumenöl in 4—5 Wochen wieder nahezu den normalen Wert zu erreichen. Wir haben also hier zweifellos eine Anpassung der Gewebsenzyme an den gesteigerten Fettstoffwechsel zu verzeichnen, was mit der in der vorangehenden Mitteilung geäußerten Ansicht über die Funktion der essentiellen Fettsäuren im Tierkörper gut übereinstimmt.

¹⁾ *B. Mendel, D. B. Mundell und H. Rudney*, Biochem. J. **37**, 473 (1943).

²⁾ *A. E. Zeller und A. Bissegger*, Helv. **26**, 1619 (1943).

³⁾ *B. Mendel und R. Rudney*, Science **100**, 499 (1944).

⁴⁾ *D. B. Mundell*, Nature **153**, 557 (1944).

⁵⁾ *D. Nachmannsohn und M. A. Rothenberg*, Science **100**, 454 (1944).

Methodik.

Die Enzymbestimmungen wurden mit Hilfe der *Warburg*-Apparatur nach der manometrischen Methode von *Ammon*¹⁾ durchgeführt. Die Ratten wurden durch Dekapitieren getötet, und das Blut in einem kleinen Stutzen aufgefangen, in dem sich einige Krystalle Natrium citr. puriss. befanden. Es wurde unter rotierenden Bewegungen und leichtem Schwenken gemischt, hierauf mit einer Vollpipette 2 cm³ entnommen, in ein 50 cm³ Zentrifugenglas übergeführt, 8 cm³ Bicarbonat-*Ringer* (R_{20}) zugesetzt und während 10 Minuten zentrifugiert. Die Citratmenge war so gering, dass manchmal während des Zentrifugierens des mit R_{20} verdünnten Plasmas Gerinnung eintrat. Von der überstehenden Flüssigkeit wurden zur Cholinesterasebestimmung 0,5 cm³ und zur Tributyrasebestimmung 0,3 cm³ verwendet. Die Enzymlösung brachten wir in das Hauptgefäß. In den Anhang kamen 0,5 cm³ Substratlösung: Acetylcholin oder Tributyrin in R_{20} . Flüssigkeitsvolumen 2,5 cm³. Im Gasraum befand sich N₂, dem 5% CO₂ beigemischt waren. Versuchsdauer 1 Stunde, Ablesung nach 15, 30, 45 und 60 Minuten. Die Leerwerte (Substrat allein und Enzym allein) wurden jedesmal von den eigentlichen Fermentspaltungs-werten (Enzym + Substrat) abgezogen.

Zur Gewinnung der Gehirnsuspension wurde wie folgt verfahren. Das Gehirn wurde aus der Schädelhöhle herausgenommen, gewogen, mit der fünffachen Menge glasdestillierten Wassers und feinem Seesand verrieben, zentrifugiert, und das Überstehende vorsichtig abpipettiert. Nach nochmaliger Zugabe von glasdestilliertem Wasser (und zwar genau die gleiche Menge wie abpipettiert) würde mit einem Glasstab gut aufgewirbelt und von dieser Suspension je 0,2 cm³ verwendet — sowohl zur Cholinesterasebestimmung als zur Tributyrasebestimmung.

Die Substratlösung wurde folgendermassen hergestellt: Eine Trockenampulle von 0,1 g Acetylcholinhydrochlorid „Roche“ wurde in 5 cm³ R_{20} aufgelöst. Von dieser Lösung wurden für jeden Versuch 0,5 cm³ benützt. Auf ein Flüssigkeitsvolumen von 2,5 cm³ gebracht, ergibt dies eine Konzentration von 0,4% Acetylcholinhydrochlorid. Die Lösung wurde für jeden Versuch frisch bereitet, Tributyrin (säurefrei) wurde in 4-proz. Emulsion in R_{20} verwendet (0,5 cm³ Tributyrin auf 12,5 cm³ Bicarbonat-*Ringer*). Die Emulsion kann im Eisschrank 8—10 Tage aufbewahrt werden und ist vor Gebrauch jedesmal gut zu schütteln. Für jeden Versuch wurden 0,5 cm³ dieser Emulsion benützt.

Untersucht wurden männliche Albinoratten, die während 3—4 Monaten ein fettfreies *Burr*-Futter erhalten hatten. Die B-Vitamine wurden in folgenden Wochendosen verabreicht: 50 γ Aneurin, 100 γ Lactoflavin, 100 γ Adermin, 150 γ Pantothenäsäure, 1 mg Nicotinsäureamid, 20 mg Cholinchlorid. Die fettlöslichen Vitamine wurden wie üblich in wenig Cocosöl gelöst, so dass die Tiere wöchentlich höchstens 10 Tropfen der Lösung erhielten. Die Menge der pro Woche verfütterten fettlöslichen Vitamine betrug: 280 γ Carotin, 35 γ Calciferol, 140 γ Tocopherol. Als Kontrolltiere dienten ebenfalls Männchen der gleichen Zucht und gleichen Alters, welche während 3—4 Monaten normales Zuchtfutter erhielten.

Ergebnisse.

Aus den Werten der Tabelle 1 geht hervor, dass bei völligem Fettentzug aus der Nahrung die Lipasewerte im Plasma der weissen Ratte eine auffallende Senkung erfahren. Der durchschnittliche Lipasewert der normalen Tiere beträgt 135, der der fettfrei ernährten 73 mm³ pro Stunde. Keinen Unterschied zeigt hingegen die Cholinesterase.

Mit dieser Senkung der Lipasewerte ist erwiesen, dass bei Mangel an essentiellen Fettsäuren der Fettstoffwechsel in einer Weise beeinflusst wird, die mit unseren Fettsäureanalysen des Körperfettes von Ratten bei fettfreier Diät übereinstimmt.

¹⁾ *R. Ammon*, Pflüger's Arch. Physiol. **233**, 486 (1933).

Tabelle 1.

Verhalten der Plasmaesterasen bei fettfreier Diät und nach Zufuhr von Sonnenblumenöl. (mm³ CO₂ pro Stunde.)

Art und Zahl der Tiere	Ach.*	Trb.**
6 normale ♂	31 ± 2,8 (30 — 42)	135 ± 14,3 (95 — 182)

Zahl der Tiere und Behandlung	Ach.*	Trb.**	Zahl der Tiere und Behandlung	Trb.**
10 ♂ fettfrei ernährt	43 ± 6,1 (26 — 91)	73 ± 8,5 (46 — 115)	5 ♂ sonnenblumenölbehandelt	112 ± 11,1 (89 — 141)

* Acetylcholinspaltung.

** Tributyrinspaltung.

Es war nach diesen Ergebnissen von Interesse, das Verhalten der Plasmalipase auch nach der Heilung, d. h. nach Zufuhr von Sonnenblumenöl zu studieren. Wir haben deshalb 5 Tiere untersucht, die zu dem fettfreien Grundfutter wöchentlich 12 Tropfen Sonnenblumenöl erhielten. Dabei zeigte sich, dass nach 3 Wochen die Lipasewerte nahezu die Norm erreicht hatten. Aus diesem Heilungsversuch ist also deutlich zu entnehmen, dass die beobachtete Stoffwechselanomalie bei Zufuhr von mehrfach ungesättigten Fettsäuren wieder hergestellt werden kann¹⁾.

*Bloch*²⁾³⁾ hat vor einiger Zeit nachgewiesen, dass bei weiblichen Ratten das Vitamin E einen ausgesprochenen Einfluss auf das Verhalten der Cholinesterase besitzt, indem bei E-avitaminotischen Ratten die Cholinesterasewerte des Serums gegenüber der Norm deutlich vermindert sind. Diese herabgesetzte Enzymaktivität wird, wie *Bloch* (l. c.) gezeigt hat, durch Zugabe von Tocopherolacetat wieder annähernd normalisiert. Um einen Vergleich dieser Feststellungen mit unseren Beobachtungen über die Beeinflussbarkeit der Plasmalipase durch essentielle Fettsäuren durchführen zu können, haben wir in gleicher Weise das Verhalten der Cholinesterase und der Plasmalipase bei E-avitaminotischen Ratten untersucht.

In der Tabelle 2 sind die Resultate der Untersuchung von 22 E-avitaminotischen und von 18 gleichaltrigen weiblichen Ratten gegenübergestellt. Die Tiere wurden während 5—6 Monaten Vitamin E-frei ernährt und waren E-avitaminotisch, wie durch Kontrollversuche festgestellt werden konnte. Aus den gefundenen Werten ist die Beeinflussung

¹⁾ Die mittleren Abweichungen ε der Mittelwerte in Tabelle 1 wurden aus der Differenza media Δ von *Corrado Gini* (zitiert nach *H. Schorer*, Statistik, Bern 1946, S. 157) nach der Formel $\varepsilon = \frac{\Delta}{\sqrt{n}}$ berechnet.

²⁾ *H. Bloch*, Helv. **25**, 793 (1942).

³⁾ *H. Bloch*, Helv. **26**, 733 (1943).

der Plasmaesterasen und der Gehirnlipase bei E-Avitaminose deutlich zu ersehen. Während aber bei den fettfrei ernährten männlichen Ratten nur die Lipase des Plasmas absinkt und die Cholinesterasespaltung unbeeinflusst bleibt, ist bei den E-avitaminotischen Weibchen auch eine deutliche Verminderung der Plasmacholinesterase festzustellen.

Tabelle 2.

Verhalten der Esterasen im Plasma und Gehirn bei fettfreier Diät und E-Avitaminose. (mm³ CO₂ pro Stunde.)

Tiergruppen	Anzahl Versuchs- tiere	Plasma		Gehirn	
		Ach.*	Trb.**	Ach.*	Trb.**
Normale ♂	10	55 (34—65)	168 (129—241)	262 (212—360)	165 (100—255)
Fettfrei ernährte ♂ .	12	58 (51—73)	76 (45—94)	237 (159—314)	153 (114—225)
Mit 12 Tr. Sonnen- blumenöl pro Woche behandelte ♂	9***	59 (39—78)	133 (82—168)	238 (213—288)	154 (121—198)
Fettfrei ernährte ♂ .	6	57 (37—82)	83 (70—97)	246 (203—265)	167 (135—204)
Normale ♀	18	96 (61—145)	145 (107—192)	253 (223—311)	163 (135—229)
E-Avitaminotische ♀	22	59 (39—82)	88 (45—155)	238 (160—319)	124 (72—179)

* Acetylcholinspaltung. ** Tributyrylinspaltung.

*** Während 4—5 Wochen mit Sonnenblumenöl behandelt.

Diskussion.

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Ernährungszustand ist besonders ausführlich bei Pflanzen studiert worden. Ein oft genanntes Beispiel ist das des ruhenden Samens. In diesem findet man bekanntlich keine oder sehr schwache Fermentwirkungen. Beim Keimen, wenn der Embryo die bereitgestellten Reservestoffe verwenden soll, beginnen die nötigen Enzyme in Erscheinung zu treten: Proteasen, Amylasen, Lipasen usw. Dass auch Tiere bei fleischfreier bzw. bei ausschliesslicher Brotahrung ähnliche Anpassungerscheinungen zeigen, hat *Pawlow*¹⁾ am Verhalten der Enzyme des Magensaftes und des Pankreassekretes, d. h. also an Fermenten, die von den Zellen nach „aussen“ abgegeben werden, nachgewiesen. Aus unseren Versuchen geht hervor, dass auch Gewebsenzyme im gleichen Sinne beeinflusst werden können.

¹⁾ I. P. *Pawlow*, Die Arbeit der Verdauungsdrüsen, Wiesbaden 1898.

Das Absinken der Lipasewerte des Plasmas bei fettfreiem Futter und ihr Ansteigen nach Zufuhr von essentiellen Fettsäuren schienen uns deshalb einer besonderen Mitteilung wert, weil diese Fermentuntersuchungen mit unseren in der vorangehenden Arbeit beschriebenen Ergebnissen weitgehend übereinstimmen. Sie bilden gewissermassen das enzymatische Spiegelbild der durch Analyse der Körperfette festgestellten Fettsäurensynthese nach Verfütterung von Sonnenblumenöl. Ausserdem bilden diese Lipasebestimmungen einen weiteren Hinweis auf die Funktion der mehrfach ungesättigten hochmolekularen Fettsäuren im Organismus der weissen Ratte.

Die hier mitgeteilten Versuche zeigen, dass entweder die Cholinesterase und die Tributyrase des Rattenplasmas nicht identisch sind oder dass das Enzym „Pseudocholinesterase“ von *Mundell*¹⁾ durch langdauernden Fettmangel so verändert wird, dass die Affinität zum Tributyrin abnimmt, ohne dass diejenige zum Acetylcholin beeinflusst wird.

Ferner geht aus den mitgeteilten Resultaten hervor, dass die Plasmalipase durch Vitamin E-Mangel in ähnlicher Weise wie durch das Fehlen der mehrfach ungesättigten Fettsäuren beeinflusst wird.

Man könnte daran denken, dass bei Mangel an Vitamin E die ungesättigten Fettsäuren im Körper der Versuchstiere durch Oxydation rascher zerstört würden, und dass deshalb die Lipaseaktivität bei E-Mangel vermindert sei. Doch wäre damit noch nicht erklärt, weshalb bei E-Avitaminose auch die Acetylcholinspaltung herabgesetzt ist. Ein endgültiger Entscheid in dieser Frage kann durch weitere Untersuchungen der Tributyrin- und Acetylcholinspaltung bei fettfrei ernährten weiblichen Ratten — oder bei E-avitaminotischen Männchen — erreicht werden.

Zusammenfassung.

1. Es wird der Lipase- und Cholinesterasegehalt im Plasma von fettfrei ernährten männlichen Ratten untersucht. Dabei zeigt sich, dass bei völligem Fettentzug die Lipaseaktivität (gemessen an der Tributyrinspaltung) gegenüber der Norm stark herabgesetzt ist.
2. Nach Zufuhr von 12 Tropfen Sonnenblumenöl pro Woche wird diese verminderte Lipaseaktivität wieder annähernd normalisiert.
3. Der Cholinesterasegehalt im Plasma von fettfrei ernährten männlichen Ratten wird — im Gegensatz zur Lipase — nicht vermindert gefunden.
4. Bei E-avitaminotischen weiblichen Ratten sind sowohl die Lipase- als auch die Cholinesterasewerte (gegenüber gleichaltrigen normalen Weibchen) deutlich herabgesetzt.

Medizinische Klinik und Chirurgische Klinik
der Universität Basel.

¹⁾ *D. B. Mundell*, *Nature*, **153**, 557 (1944).