

Diese Zahlen sind in ausgezeichneter Übereinstimmung mit den Befunden von *Hall & Sprinkle*¹⁾: 7,82 (22°); 7,77 (25°) und 7,75 (26°), die mit einer weniger ausgedehnten Serie von Messungen an einer Kette mit fl.-flüssiger Phasengrenze erhalten wurden.

Für die Berechnung der pH-Werte von Triäthanolaminpuffern im Bereich der ionalen Stärke μ von 0,005 bis 0,1 und von Temperaturen zwischen 20 und 30° kann die folgende Gleichung (4) dienen:

$$p\text{aH} = p\text{K} + \log \frac{[\text{B}]}{[\text{HB}]} + \Phi(\mu) \quad (4)$$

[B] und [HB] bedeuten dabei die Konzentrationen von Triäthanolamin und dessen Salz. Das letzte Glied der Gleichung nimmt die folgenden Werte an:

| | | | | |
|---------------|------|------|------|--------|
| $\mu = 0,005$ | 0,01 | 0,02 | 0,05 | 0,1 |
| $\Phi = 0,03$ | 0,05 | 0,06 | 0,09 | (0,12) |

SUMMARY.

The thermodynamic acidity constant of triethanolammonium ion has been determined at 20, 25 and 30°. Triethanolamine is recommended as a buffer substance in the pH-region 7–8,5.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

169. Versuche zur Erfassung der Fett- und Glykogensynthese in der Leber cholinfrei ernährter Ratten mit Hilfe von ¹⁴C-Acetat und D-signiertem Glycerin

von Karl Bernhard, Gerhard Ulbrecht²⁾, Margarete Ulbrecht²⁾ und Heribert Wagner.
(9. VI. 54.)

Bei der zentralen Stellung, die der Leber innerhalb des Stoffwechsels zukommt, ist das Interesse an der Erhaltung ihrer Funktionstüchtigkeit sehr begreiflich. Letztere ist nach klinischer Auffassung bei bestehender Fettanhäufung bereits beeinträchtigt. In ausgedehnten Untersuchungen führten *Best* und Mitarb.³⁾ bei Ratten alimentär bedingte Verfettungen der Leber herbei und bezeichneten als lipotrope Faktoren Verbindungen, welche solche Erscheinungen zu verhindern bzw. einen erhöhten Leberfettgehalt auf die Norm zu reduzieren vermögen. Es sind dies in erster Linie das

¹⁾ *N. F. Hall & M. R. Sprinkle*, Am. Soc. 54, 3469 (1932).

²⁾ Stipendiaten der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

³⁾ *C. H. Best & C. C. Lucas*, Vitamins and Hormons 1, 1 (1945); s. a. *K. Bernhard*, Ann. de la Nutr. 7, 253 (1953).

Cholin, aber auch das Methionin, welches bekanntlich als Methyl-donor zur Synthese des ersten beiträgt. Indessen wurde ganz kürzlich durch *Elvehjem* und Mitarb.¹⁾ gezeigt, dass auch durch Füttern cholinhaltiger, aus 9 % Casein und hauptsächlich Zucker bestehenden Diäten Fettlebern auftreten, die ihrerseits durch gleichzeitige Gaben von Threonin oder Erhöhung der Eiweissquote beeinflussbar sind. Entstehung und Verhinderung von Leberverfettungen sind jedenfalls vorerst nicht leicht überblickbare Vorgänge und bestimmt durch zahlreiche exogene und endogene Faktoren beeinflussbar.

Die vermehrte Fettablagerung in der Leber kann generell betrachtet als Ausdruck gesteigerter synthetischer Tätigkeit bzw. geringeren Abbaues oder als Folge eines verminderten Abtransportes bzw. erhöhter Fettzufuhr interpretiert werden. Es schien uns aussichtsreich, unter Heranziehung der Isotopentechnik vorerst die synthetische Leistung der verfetteten Leber zu prüfen und z. B. nach Applikation von ¹⁴C-signiertem Acetat die Aktivität der Leberfettsäuren zu bestimmen. Letztere ist bekanntlich ein Mass für den Umsatz solcher Verbindungen im Tierkörper. Um gleichzeitig auch über die Fettsäuresynthese aus den Kohlenhydraten etwas zu erfahren, verabreichten wir als weiteren „precursor“ ein C₃-Bruchstück, d. h. deuteriertes Glycerin. Im Sinne einer wünschbaren Erweiterung der Untersuchung war auch das Ausmass der extrahepatogenen Fettbildung, wie es durch Isolierung und Aktivitätsbestimmung der Darm- und Depotfettsäuren ermittelt werden konnte, von Interesse.

Wir wollten uns aber nicht nur auf die Erfassung der Fettsynthese beschränken, sondern auch einen Einblick in den Glykogenaufbau gewinnen, da ja die Kohlenstoffatome des Acetates in die tierische Stärke eingebaut werden²⁾.

Während 22 Tagen erhielten junge männliche Ratten eine ali-potrope Diät nach *Best*³⁾, die wir für einen Teil derselben durch Cholin ergänzten. Nach Ablauf dieser Fütterungsperiode wurde beiden Gruppen per os radioaktives Acetat und deuteriertes Glycerin verabreicht. Vier Stunden später haben wir die Ratten getötet und nach sorgfältiger Autopsie aufgearbeitet. Von allen Lebern wurden Präparate zur späteren histologischen Prüfung angefertigt. Aus den Tab. 1 und 2 ergeben sich die experimentellen Daten der chemischen Untersuchung, wobei nur diejenigen Lebern berücksichtigt wurden,

¹⁾ *A. E. Harper, W. J. Monson, D. A. Benton, M. E. Winje & C. A. Elvehjem*, *J. Biol. Chem.* **206**, 151 (1954).

²⁾ *J. M. Buchanan, A. B. Hastings & F. B. Nesbett*, *J. Biol. Chem.* **150**, 413 (1943); *H. G. Wood, N. Lifson & V. Lorber*, *ibid.* **159**, 475 (1945); *V. Lorber, N. Lifson & H. G. Wood*, *ibid.* **161**, 411 (1945).

³⁾ *C. H. Best, C. C. Lucas, J. H. Ridout & J. M. Patterson*, *J. Biol. Chem.* **186**, 317 (1950).

die ausser dem hohen Fettgehalt keinerlei makroskopisch oder mikroskopisch fassbare pathologische Veränderungen, also nicht etwa irgendwelche Leberschäden zeigten.

Es ist ersichtlich, dass bei Mangel an Cholin die Lebern 10,4 bis 23,0 %, im Mittel 17,4 % Fett enthielten, während bei den Cholin-Tieren (Nr. 13–29) die diesbezüglichen Werte im Bereiche von 2,6–6,7 % (Mittel 3,6 lagen). Die Leberfettsäuren wiesen hier 1,33 bis 7,15 % (Mittel 4,6), bei den Mangel-Tieren 1,29–9,2 % oder im Mittel 3,6 % der mit dem Acetat applizierten Aktivität auf. Der Deuterium-Einbau betrug bei den letzteren 2,8–9,9, im Mittel 5,1; bei den Cholin-Tieren hingegen 5,7–14,3 (Mittel 9,7). Einem hohen Deuterium-Einbau entspricht zumeist auch ein höherer prozentualer Anteil an applizierter Aktivität. Bei beiden Versuchsreihen war bei Gehalten von 0,4–6,2 bzw. 0,4–7,7 % (Mittel 2,4 bzw. 3,6 %) die Aktivität des Glykogens ungleichmässig und zumeist nur sehr gering. Offenbar wiesen die Tiere zu Versuchsbeginn hinreichende Leberglykogenmengen auf, so dass kein Grund zu intensiver Neubildung vorlag. Die Glykogensynthese ist bei der Ratte biorhythmischen Schwankungen unterworfen. Gegen 3 Uhr morgens stellten wir in Übereinstimmung mit *Forsgren* und Mitarb.¹⁾ die höchsten Werte fest, nachdem die Tiere während der Nacht reichlich Futter konsumiert hatten. Um den Glykogengehalt im Zeitpunkt der Acetat-Applikation auf ein Minimum oder jedenfalls auf einen einigermassen einheitlichen Ausgangswert zu reduzieren, unterwarfen wir die Tiere in der Folge einem Stress (Schwimmen). Darauf erfolgten Fütterung mit Glucose und orale Gabe des aktiven Acetates. Auf ein Glycerin-Angebot haben wir verzichtet. Aus der Tab. 3 geht hervor, dass unter solchen Bedingungen bei Cholinmangeltieren (Nr. 30–48) der mittlere Glykogengehalt 3,5 % (1,3–9,8), der mittlere Leberfettgehalt 13,6 % (9,6–20,8) betrugen. Die Fettsäuren enthielten im Mittel 4,2 % (2,28–6,37) und das Glykogen 0,37 % (0,15–0,71) der applizierten Aktivität. Ein analoger Versuch wurde mit 5 völlig normal gefütterten Ratten durchgeführt (Tab. 4).

Vergleicht man die Aktivitäten der Fettsäuren aus den Lebern der Cholintiere (Nr. 13–29) mit den bei den Mangelratten (Nr. 1–12) gemessenen, so ergibt sich kein signifikanter Unterschied. Die Mittelwerte sind einander bei stark streuenden Einzelwerten genähert. Das trifft auch für die Fettsäureaktivitäten der Tiere Nr. 13–29 und Nr. 30–48 zu. Es sei aber nochmals hervorgehoben, dass die histologische Untersuchung der Lebern aller dieser Ratten keine oder jedenfalls keine deutlichen Schäden erkennen liess. Letzteres war nicht mehr der Fall bei einer Gruppe von Tieren (Nr. 49–56, Tab. 5),

¹⁾ *E. Forsgren, O. Wilander, G. Ågren & Hj. Holmgren, Skand. Arch. Physiol.* **55**, 144 (1929).

Tabelle 1.
Einmalige Gaben von Acetat-1- ^{14}C und Deuterio-Glycerin an cholinfrei ernährte Ratten.

| Tier Nr. | Leberfettsäuren | | | | Leberglykogen | | | | Aktivität der Kohlensäure aus der Exspirationsluft | |
|-----------|------------------------|---------------------------|--------------------------|--------|------------------------|-------------|--------------------------|--------|--|------------------|
| | Aktivität | | Deuterium | | Aktivität | | Deuterium | | μ Curie | Deuterium-Einbau |
| | in % des Lebergewichts | ¹⁾ μ Curie | in % der appl. Aktivität | D-Wert | in % des Lebergewichts | μ Curie | in % der appl. Aktivität | D-Wert | | |
| 1 | 14,2 | 1,52 | 8,2 | 0,48 | 6,8 | 6,2 | 0,0007 | 0,004 | 0,46 | 2,8 |
| 2 | 16,8 | 1,69 | 9,2 | 0,36 | 6,0 | 4,7 | 0,0005 | 0,003 | 0,74 | 3,5 |
| 3 | 13,8 | 1,46 | 8,0 | 0,48 | 6,6 | 3,9 | 0,0006 | 0,003 | 0,48 | 1,9 |
| 4 | 10,4 | 0,24 | 1,9 | 0,18 | 1,9 | 0,6 | — | — | — | 9,9 |
| 5 | 24,4 | 0,27 | 1,5 | 0,30 | 7,3 | 1,3 | 0,15 | 0,82 | 18,50 | 24,1 |
| 6 | 20,5 | 0,46 | 2,5 | 0,48 | 9,9 | 1,1 | — | — | 2,32 | 2,4 |
| 7 | 22,9 | 0,57 | 3,1 | 0,24 | 5,5 | 0,4 | — | — | — | 11,8 |
| 8 | 17,6 | 0,33 | 1,8 | 0,18 | 3,2 | 2,0 | — | — | 0,83 | 1,7 |
| 9 | 13,8 | 0,33 | 1,8 | 0,30 | 4,1 | 3,2 | 0,0034 | 0,018 | 0,48 | 1,5 |
| 10 | 23,0 | 0,28 | 1,4 | 0,12 | 2,8 | 0,9 | — | — | — | 12,9 |
| 11 | 17,5 | 0,24 | 1,3 | 0,18 | 3,2 | 2,2 | 0,12 | 0,66 | 11,00 | 13,5 |
| 12 | 14,0 | 0,27 | 1,8 | 0,30 | 4,2 | 1,9 | — | — | 2,14 | 12,8 |
| im Mittel | 14,7 | — | 3,6 | — | 5,1 | 2,4 | — | — | — | 69 |
| | | | | | | | | | | 80 |
| | | | | | | | | | | 70 |

1) Stosszahl pro Min. der gesamten Leberfettsäuren ausgedrückt in μ Curie.

2) Gesamt-Stosszahl der gesamten Leberfettsäuren $\times 100$.

3) D-Wert \times prozentualer Leberfettgehalt bzw. Glykogengehalt.

Tabelle 2.
Einmalige Gaben von Acetat-1-¹⁴C und Deuterio-Glycerin an mit cholinhaltigem Futter ernährte Ratten.

| Tier Nr. | Leberfettsäuren | | | Leberglykogen | | | Deuterium | | | Aktivität der Kohlensäure aus der Exspirationsluft | | |
|-----------|------------------------|-----------------------|------------------|------------------------|-----------------------|------------------|------------------|--------|------------------|--|--------------------------|--------------------------|
| | in % des Lebergewichts | Aktivität μ Curie | Deuterium D-Wert | in % des Lebergewichts | Aktivität μ Curie | Deuterium D-Wert | Deuterium-Einbau | D-Wert | Deuterium-Einbau | μ Curie | in % der appl. Aktivität | in % der appl. Aktivität |
| 13 | 3,0 | 0,79 | 4,6 | 3,40 | 10,2 | 6,5 | 0,024 | 0,14 | 2,14 | 13,9 | 13,4 | 78 |
| 14 | 3,5 | 1,16 | 6,8 | 1,63 | 5,7 | 3,8 | 0,0005 | 0,003 | 2,23 | 8,6 | 14,3 | 33 |
| 15 | 3,3 | 0,36 | 2,1 | 1,76 | 5,8 | 1,2 | 0,0004 | 0,002 | — | — | 14,6 | 85 |
| 16 | 3,6 | 0,81 | 4,7 | 3,14 | 11,6 | 3,5 | 0,007 | 0,041 | 2,26 | 7,9 | — | — |
| 17 | 3,1 | 0,89 | 5,2 | 4,15 | 12,9 | 4,9 | 0,009 | 0,05 | 2,39 | 11,7 | 11,0 | 64 |
| 18 | 3,1 | 0,69 | 4,0 | 3,14 | 9,7 | 3,7 | 0,008 | 0,048 | 2,26 | 8,4 | 15,8 | 92 |
| 19 | 3,3 | 0,45 | 2,6 | 4,90 | 16,2 | 0,8 | 0,011 | 0,064 | — | — | 15,7 | 91 |
| 20 | 3,6 | 1,22 | 7,1 | 2,90 | 10,4 | 1,9 | — | — | 1,26 | 2,4 | 13,8 | 80 |
| 21 | 4,3 | 0,77 | 4,5 | 2,76 | 11,9 | 2,6 | — | — | 2,39 | 6,2 | — | — |
| 22 | 3,0 | 0,45 | 2,6 | 4,00 | 12,0 | 4,6 | 0,0032 | 0,019 | 1,51 | 6,9 | 14,7 | 86 |
| 23 | 4,2 | 0,44 | 2,6 | 3,40 | 14,3 | 1,0 | 0,0070 | 0,041 | — | — | 14,8 | 86 |
| 24 | 6,7 | 0,23 | 1,3 | 1,02 | 6,8 | 0,4 | 0,0004 | 0,002 | — | — | 15,8 | 92 |
| 25 | 4,1 | 1,23 | 7,2 | 2,26 | 9,3 | 4,7 | 0,015 | 0,086 | 2,14 | 10,1 | 13,1 | 76 |
| 26 | 3,5 | 0,83 | 4,9 | 2,40 | 8,4 | 2,0 | — | — | 2,01 | 3,9 | 15,5 | 90 |
| 27 | 3,1 | 0,84 | 4,9 | 1,88 | 5,8 | 3,4 | 0,018 | 0,105 | 4,65 | 15,8 | 13,8 | 80 |
| 28 | 2,8 | 1,16 | 6,7 | 2,76 | 7,7 | 7,7 | 0,050 | 0,29 | 2,64 | 20,3 | 12,7 | 74 |
| 29 | 2,6 | 1,07 | 6,2 | — | 6,7 | 0,025 | 0,15 | 1,64 | 11,0 | 14,9 | 87 | — |
| im Mittel | 3,6 | — | 4,6 | — | 9,7 | 3,6 | — | — | — | — | — | 82 |

Tabelle 3.

Einmalige Gaben von Acetat- $1-^{14}\text{C}$ an cholinfrei gefütterte Ratten.

| Tier Nr. | Leberfettsäuren | | | Leberglykogen | | | Aktivität der Kohlensäure aus der Exspirationsluft | |
|-------------|-------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------|--------------------------------|--|--------------------------------|
| | in % des Leber- gew. | Aktivität | | in % des Leber- gew. | Aktivität | | μ Curie | in % der appl. Aktivität |
| | | μ Curie | in % der appl. Aktivität | | μ Curie | in % der appl. Aktivität | | |
| 30 | 11,8 | 0,76 | 3,0 | 5,0 | 0,063 | 0,25 | 11,4 | 46 |
| 31 | 10,5 | 1,04 | 4,2 | 5,2 | 0,076 | 0,31 | 12,2 | 49 |
| 32 | 9,6 | 0,57 | 2,3 | 3,1 | 0,073 | 0,29 | 9,3 | 37 |
| 33 | 12,7 | 1,03 | 4,1 | 2,4 | 0,063 | 0,25 | 10,4 | 41 |
| 34 | 13,0 | 0,94 | 3,8 | 2,7 | 0,037 | 0,15 | 11,6 | 47 |
| 35 | 12,9 | 1,18 | 4,7 | 3,7 | 0,066 | 0,26 | 11,4 | 46 |
| 36 | 12,8 | 1,37 | 5,5 | 9,8 | 0,14 | 0,56 | 14,4 | 57 |
| 37 | 12,4 | 0,62 | 2,5 | 2,1 | 0,073 | 0,29 | 17,7 | 71 |
| 38 | 13,8 | 1,17 | 4,7 | 2,0 | 0,11 | 0,44 | 15,6 | 63 |
| 39 | 15,0 | 1,21 | 4,8 | 1,8 | 0,06 | 0,24 | 18,3 | 73 |
| 40 | 9,8 | 1,49 | 5,8 | 2,8 | 0,11 | 0,44 | 12,4 | 50 |
| 41 | 11,1 | 1,07 | 4,3 | 5,5 | 0,086 | 0,35 | 7,3 | 29 |
| 42 | 13,6 | 1,59 | 6,4 | 1,3 | 0,08 | 0,33 | 11,8 | 47 |
| 43 | 20,5 | 1,07 | 4,3 | 2,5 | 0,18 | 0,71 | 11,5 | 46 |
| 44 | 20,8 | 0,94 | 3,7 | 3,8 | 0,058 | 0,23 | 9,7 | 39 |
| 45 | 14,7 | 0,66 | 2,6 | 3,6 | 0,11 | 0,42 | 16,3 | 65 |
| 46 | 13,9 | 1,24 | 4,9 | 2,2 | 0,14 | 0,58 | 18,5 | 74 |
| 47 | 13,6 | 0,93 | 3,7 | 1,5 | 0,022 | 0,09 | 16,7 | 67 |
| 48 | 15,7 | 1,31 | 5,2 | 4,7 | 0,20 | 0,80 | 17,3 | 69 |
| im Mittel | 13,6 | — | 4,2 | 3,5 | — | 0,37 | — | 53 |

Tabelle 4.

Einmalige Gabe von ^{14}C -Acetat an normal gefütterte Ratten.

| Tier Nr. | Leberfettsäuren | | | Leberglykogen | | | Aktivität der Kohlensäure aus der Exspirationsluft | |
|-------------|-------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------|--------------------------------|--|--------------------------------|
| | in % des Leber- gew. | Aktivität | | in % des Leber- gew. | Aktivität | | μ Curie | in % der appl. Aktivität |
| | | μ Curie | in % der appl. Aktivität | | μ Curie | in % der appl. Aktivität | | |
| 58 | 2,3 | 1,27 | 4,4 | 10,6 | 0,063 | 0,22 | 9,9 | 34 |
| 59 | 2,2 | 1,01 | 3,5 | 12,0 | 0,060 | 0,20 | 9,4 | 33 |
| 60 | 3,5 | 1,16 | 4,0 | 1,2 | 0,070 | 0,23 | 17,2 | 60 |
| 61 | 2,8 | 2,26 | 7,9 | 9,6 | 0,050 | 0,18 | — | — |
| 62 | 2,1 | 1,46 | 5,1 | 13,6 | 0,090 | 0,33 | 12,6 | 44 |
| im Mittel | 2,6 | — | 5,0 | — | — | 0,23 | — | 57 |

Tabelle 5.
Leberfettsäuren und Leberglykogen bei cholinfrei ernährten Ratten, welche durch histologische Prüfungen festgestellte Leberschäden aufwiesen.

| Tier Nr. | Leberfettsäuren | | | | Leberglykogen | | | | Aktivität der Kohlensäure aus der Exspirationsluft | | | |
|----------|--------------------------|----------------------------------|-----------|------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------|------------------|--|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | Aktivität | | Deuterium | | Aktivität | | Deuterium | | Deuterium-Einbau | | μ Curie in % der appl. Aktivität | |
| | in % des Leber- gewichts | μ Curie in % der appl. Aktivität | D-Wert | Deuterium-Einbau | in % des Leber- gewichts | μ Curie in % der appl. Aktivität | D-Wert | Deuterium-Einbau | Deuterium-Einbau | μ Curie in % der appl. Aktivität | Deuterium-Einbau | μ Curie in % der appl. Aktivität |
| 49 | 6,6 | 0,22 | 1,2 | 0,24 | 1,6 | — | — | — | — | — | — | 10,1 |
| 50 | 21,5 | 0,12 | 0,65 | 0,18 | 3,9 | — | — | — | — | — | — | — |
| 51 | 19,5 | 0,14 | 0,76 | 0,18 | 3,5 | 0,2 | 0,021 | 0,12 | — | — | — | 12,6 |
| 52 | 18,9 | 0,19 | 1,4 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 53 | 13,3 | 0,13 | 0,7 | 0,30 | 4,0 | — | — | — | — | — | — | 11,7 |
| 54 | 15,5 | 0,18 | 1,2 | 0,12 | 1,9 | 0,3 | 0,034 | 0,23 | — | — | — | 85 |
| 55 | 14,9 | 0,35 | 1,9 | 0,24 | 3,6 | 3,2 | — | — | — | — | — | 12,8 |
| 56 | 3,9 | 0,08 | 0,47 | — | — | — | — | — | — | — | — | 70 |
| | | | | | | | | | 0,78 | 2,5 | — | 9,4 |
| | | | | | | | | | — | — | — | 64 |
| | | | | | | | | | — | — | — | 85 |
| | | | | | | | | | — | — | — | 77 |
| | | | | | | | | | — | — | — | 12,7 |

die zu der ersten Versuchsreihe gehörten, d. h. genau gleich lang mit cholinfreier Diät wie die Tiere 1–12 gefüttert wurden. Bei sehr schwankenden Leberfettgehalten betrug die Aktivität der Leberfettsäuren im Mittel nur 1,3 % der applizierten Dosen. Auch der Deuterium-Einbau war niedrig, die Fettbildung ausgehend vom C₃-Precursor also gering. Die diesbezüglichen, aus der Tab. 5 ersichtlichen Ergebnisse lassen sich auf Grund der histologischen Befunde erklären. Von 15 Tieren mit geringem Acetat- und D-Einbau in die Leberfettsäuren wiesen 3 ausgedehnte Zirrhosen bzw. Nekrosen auf. Bei weiteren 3 zeigten die Lebern multiple, schwere Zellinfiltrationen (Leukozyten, Histiozyten, Lymphozyten, kleine Blutungen) und bei 5 anderen leichte bis mittlere Zellinfiltrate. Nur bei 4 Tieren bestanden gar keine Infiltrate in der Leber.

Tabelle 6.
Aktivität der Depot-Fettsäuren cholinfrei ernährter Ratten
nach einmaliger Gabe von Acetat-1-¹⁴C.

| Tier Nr. | Depotfettsäuren in % des Körpergewichtes | Aktivität | |
|-----------|--|-----------|--------------------------------|
| | | μ Curie | in % der appl. Aktivität |
| 30 | 3,55 | 0,41 | 1,6 |
| 31 | 3,35 | 0,60 | 2,4 |
| 32 | 5,08 | 0,63 | 2,6 |
| 33 | 4,45 | 0,90 | 3,6 |
| 34 | 5,55 | 1,63 | 5,4 |
| 36 | 3,60 | 0,96 | 3,8 |
| 37 | 4,55 | 0,76 | 3,0 |
| 38 | 4,98 | 0,78 | 3,1 |
| 39 | 4,88 | 0,98 | 3,9 |
| 40 | 4,12 | 0,95 | 3,8 |
| 41 | 5,05 | 0,77 | 3,1 |
| 42 | 4,40 | 0,80 | 3,2 |
| 43 | 5,32 | 1,06 | 4,2 |
| 44 | 5,21 | 0,86 | 3,5 |
| 45 | 4,50 | 1,13 | 4,5 |
| 46 | 5,66 | 1,22 | 4,9 |
| 47 | 4,18 | 0,69 | 2,8 |
| 48 | 4,93 | 0,98 | 3,9 |
| im Mittel | 4,63 | — | 3,5 |

Während des 4 Std. dauernden Versuches haben wir bei allen Tieren die Kohlensäure der Exspirationsluft aufgefangen und auf ihre Aktivität geprüft. Letztere umfasst bei den Ratten 1–12 und 13–29 im Mittel 70 bzw. 82 % der mit dem Acetat applizierten Menge. Signifikante Unterschiede sind bei den beiden Gruppen nicht vorhanden. Das aufgenommene Acetat wurde also in Übereinstimmung

mit den Befunden anderer Autoren¹⁾²⁾ sehr rasch zu Kohlensäure und Wasser oxydiert, nur ein kleiner Teil trug zur Signierung des „Acetat-pools“ bei, aus dem Fett- und Glykogensynthese gespeist werden. Bei den Stress-Tieren (Nr. 30–48 und 58–62) ist dieser Anteil aber deutlich höher, indem hier im Mittel nur 53 bis 57 % der aufgewendeten Aktivität in der Exspirationsluft vorlagen.

Tabelle 7.

Aktivität der Depot-Fettsäuren normal ernährter Ratten
nach einmaliger Gabe von Acetat- 1^{14}C .

| Tier Nr. | Depotfettsäuren in % des Körpergewichtes | Aktivität | |
|-----------|--|-------------|--------------------------------|
| | | μ Curie | in % der appl. Aktivität |
| 58 | 3,85 | 1,52 | 5,3 |
| 59 | 3,30 | 1,00 | 3,5 |
| 60 | 5,05 | 1,48 | 5,2 |
| 61 | 4,30 | 1,48 | 5,2 |
| 62 | 5,40 | 1,35 | 4,7 |
| im Mittel | 4,38 | — | 4,8 |

Tabelle 8.

Aktivität der Fettsäuren und des Unverseifbaren aus dem Intestinaltraktus
von Cholin-Mangelratten (Nr. 30–42) und Normalratten (Nr. 58–62).

| | Tiere Nr. 30–42 | Tiere Nr. 58–62 |
|--|--------------------|--------------------|
| Fettsäuren | | |
| g pro Tier | 0,41 | 0,67 |
| Aktivität pro Tier | | |
| in μ Curie | 1,96 | 1,66 |
| in % der appl. Aktivität . . . | 7,9 | 5,8 |
| Na-Salze der wasserdampf- flüchtigen Fettsäuren | | |
| mg pro Tier | 4,7 | 13,7 |
| Aktivität pro Tier | | |
| in μ Curie | 0,093 | 0,11 |
| in % der appl. Aktivität . . . | 0,37 | 0,4 |
| Unverseifbares | | |
| mg pro Tier | 24 | 45 |
| Aktivität pro Tier | | |
| in μ Curie | 0,19 | 0,31 |
| in % der appl. Aktivität . . . | 0,77 | 1,08 |

¹⁾ R. Gould, F. M. Sinex, I. N. Rosenberg, A. K. Salomon & A. B. Hastings, J. Biol. Chem. **177**, 295 (1949).

²⁾ J. T. Van Bruggen, T. T. Hutchens, C. K. Claycomb & E. S. West, J. Biol. Chem. **200**, 31 (1953).

Die extrahepatogene Fettbildung wurde bei den Tieren 30–48 durch Isolierung der Depotfettsäuren untersucht, indem letztere gleichfalls zur Aktivitätsmessung gelangten. Diese Ratten enthielten 1,74–5,66 % oder im Mittel 4,63 % Fettsäuren, bezogen auf das Gesamtkörpergewicht. Die Aktivität ergab sich zu 1,6–4,9 % bezogen auf die applizierten Aktivitäten (Tab. 6). Bei den Normal-Tieren (Tab. 7) betrugen diese Werte im Mittel 4,35 bzw. 3,5–5,3 %.

Die Darmfettsäuren einschl. Mesenterialfettsäuren und das Unverseifbare (Cholesterin) des Intestinaltraktus prüften wir bei den Fettlebtierchen Nr. 30–42 und den Normal-Ratten Nr. 58–62 (vgl. Tab. 8).

Diskussion der Ergebnisse.

Die mitgeteilten Versuche erfolgten in der Absicht, die Dynamik des Fett- und Glykogenstoffwechsels der stark verfetteten Rattenleber zu erforschen und mit den entsprechenden Vorgängen in der durch diätetische Massnahmen (Cholin-Gaben) vor der Verfettung bewahrten Leber zu vergleichen.

Bei Ratten weisen Fettsäuren und Cholesterin schon vor Ablauf von 30 Min. nach einer einmaligen Acetatgabe an zuvor normal gefütterte Tiere maximale Aktivitäten auf, die sich in den nächsten 4 Std. kaum verändern¹⁾²⁾. Die möglichen Höchstwerte wurden daher bei der von uns gewählten Versuchsdauer ohne Zweifel erreicht.

Auf Grund der Aktivitäten und der D-Gehalte der Leberfettsäuren scheinen Fettsynthese aus Acetat und aus einem C₃-Bruchstück (Glycerin) einigermassen parallel zu verlaufen. Eine wichtige Voraussetzung ist dabei eine nicht oder jedenfalls morphologisch nicht fassbar geschädigte Leber. Unter solchen Bedingungen fanden wir auch bei hohen Fettgehalten der Leber Fettneubildungen, die sich von den diesbezüglichen Leistungen fettärmer Lebern nicht wesentlich unterschieden. Cholinfrei ernährte Tiere verhielten sich, wie aus der Tab. 9 deutlich hervorgeht, ganz ähnlich wie Ratten, denen mit dem Futter Cholin zur Verfügung stand. Traten indessen Leberschädigungen wie Zirrhosen, Nekrosen etc. auf, so beobachteten wir niedrige Aktivitäten, d. h. sowohl in bezug auf Fett- als auch auf Glykogenbildung geringere Leistungen.

Um weitere Vergleichsmöglichkeiten zu schaffen, haben wir einer Gruppe von 5 mit einer normalen Zucht-Diät ernährten Tieren gleichfalls Acetat appliziert. Die Aufarbeitung der Fett- und Glykogenbestände führte zu den in der Tab. 4 mitgeteilten Ergebnissen.

¹⁾ R. Gould, F. M. Sinex, I. N. Rosenberg, A. K. Salomon & A. B. Hastings, *J. Biol. Chem.* **177**, 295 (1949).

²⁾ J. T. Van Bruggen, T. T. Hutchens, C. K. Claycomb & E. S. West, *J. Biol. Chem.* **200**, 31 (1953).

Die mittlere Aktivität der Leberfettsäuren betrug bei allerdings nur 5 Tieren 5,0 % der applizierten Menge; für das Glykogen lagen diese Werte bei einem mittleren Gehalt von 11,5 % (ohne Tier Nr. 60) bei 0,23 %. Von ausgeprägten Unterschieden gegenüber den Befunden bei den Cholin- und Cholinmangel-Tieren kann nicht gesprochen werden.

Tabelle 9.

| Fütterung | Anzahl der Tiere | Leberfettsäuren | |
|----------------|---------------------|-----------------------|----------------------------------|
| | | in % des Lebergew. | Aktivität in % der appl. Akt. |
| Normal . . . | 5 | 2,5 | 5,0 |
| Mit Cholin . | 17 | 3,6 | 4,6 |
| Cholinfrei . . | 12 | 17,4 | 3,5 |
| Cholinfrei . . | 19 | 13,6 | 4,2 |

Die extrahepatische Fettsynthese (Ratten Nr. 30–48) erwies sich als beträchtlich. Bereits nach 4 Std. wurden 3,5 % der applizierten Aktivität in peripherem Fett angetroffen gegenüber 4,2 % in den Leberfettsäuren. Die spezifischen Aktivitäten der letzteren sind selbstverständlich viel grösser als diejenigen der ersteren, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen unter Heranziehung von Deuterium als Indikator¹⁾. Bei den erwähnten Normaltieren waren die Aktivitäten der Depotfettsäuren und der Leberfettsäuren sehr ähnlich (im Mittel 4,8 bzw. 5,0 %) (Tab. 4 und 7).

Auch die Fettsäuren aus dem Intestinaltraktus zeigten hohe Aktivitäten und liessen eine im Darm stattfindende intensive Fettbildung erkennen, Beobachtungen, die unsere früheren Befunde²⁾ bestätigten und erweiterten.

Die Glykogensynthese verlief bei den Tieren Nr. 30–48 verhältnismässig einheitlich; im Mittel fanden sich aber nur 0,37 % der applizierten Aktivität im Glykogen vor, also bedeutend weniger als in den Leberfettsäuren. Im gleichen Sinne verhielten sich die Normaltiere. Dieser Befund ist begreiflich, wenn man sich vergegenwärtigt, dass das aktive Acetat erst über den Zitronensäurezyklus zu einem Baustein des Glykogens wird.

Die unter Cholinmangel eintretende Leberverfettung ist nicht die Folge einer gesteigerten synthetischen Leistung. Ob, wie eingangs diskutiert wurde, verminderter Fettabbau oder Abtransport als Ursache zu betrachten sind, bleibt zu beweisen. Cholinmangel führt nach einiger Zeit unfehlbar zu Leberschädigungen und

¹⁾ K. Bernhard & R. Schoenheimer, J. Biol. Chem. **133**, 707 (1940).

²⁾ K. Bernhard & F. Bullet, Helv. **30**, 1784 (1947). – G. Popják & M. L. Beeckmans, Biochem. J. **47**, 233 (1950).

damit geringeren Fett- und Glykogenbildungen. Wir möchten im Cholin daher vielmehr einen Faktor erblicken, der für den Eiweissstoffwechsel der Leber von grosser Bedeutung ist, also zum geordneten Aufbau des Leberparenchyms und erst indirekt zum normalen Ablauf weiterer synthetischer Vorgänge beiträgt. Hinweise über Veränderungen in der Eiweiss-Zusammensetzung des Serums bei Cholinmangel-Tieren haben bereits *Fischer & Garrity*¹⁾ erbracht. Fehlt das Cholin, so treten nach einiger Zeit bei nicht gesteigerter Fettsäuresynthese Fettanhäufungen und schliesslich Schädigungen ein. Nehmen letztere ein ernstes Ausmass an, so vermindern sich sowohl die Fett- als die Glykogenbestände als Ausdruck eingeschränkter synthetischer Tätigkeit des Organes.

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen, welch letztere sich als notwendig erwiesen, sollen an anderer Stelle mitgeteilt werden. Ohne die histologischen Befunde wäre die Interpretation unserer chemischen Resultate sehr erschwert gewesen.

Experimentelles.

Als Versuchstiere dienten durchwegs männliche Ratten unseres einheitlichen Stammes von 50—80 g Anfangsgewicht. Sie erhielten während 22 bzw. 18 Tagen (Nr. 30—48) eine Diät bestehend aus 8% gereinigtem fett- und vitaminfreiem Casein, 12% fettfreier Gelatine, 73% reinem Rohrzucker, 5% Salzmischung nach *McCollum*, 2% Agar-Agar und 0,015% Lebertran, ferner genügend Vitamine des B-Komplexes (*Becozym Roche*). Gleich ernährte Tiere bekamen zusätzlich 0,5% Cholin. Alle wurden zur Wachstumskontrolle wiederholt gewogen. Die Applikation des radioaktiven Acetates und des deuterierten Glycerins erfolgte mittels Magensonde. Die Tiere verblieben darauf in einem gläsernen Stoffwechselkäfig, wobei die Raumtemperatur auf 24° gehalten und an Futter etwas Zucker, einige Maiskörner und Wasser zur Verfügung standen. Wir leiteten dabei einen mässigen Luftstrom durch den Käfig und brachten die Kohlensäure der Exspirationsluft in mit Kalilauge beschickten Türmen zur Absorption. Die Ratten 30—62 liessen wir vor Beginn des Versuches, gegen 8 Uhr abends, zur Reduktion des Leberglykogens während 10—15 Min. in Wasser von 20° schwimmen und trockneten sie gründlich mit Warmluft und Zellstoff. Sie erhielten darauf mit der Magensonde 1 ml einer 50-proz. Glucoselösung und nach 1stündiger Pause je 2 mg signiertes Acetat in 25-proz. Glucoselösung.

Die Aktivitäten betragen

| | | | | | |
|-------------------|-------|--------------|-------------------|-------|--------------|
| für die Tiere Nr. | 1—12 | 18,4 μ C | für die Tiere Nr. | 49—56 | 18,4 μ C |
| | 13—29 | 17,2 μ C | | 57—62 | 28,8 μ C |
| | 30—48 | 25,0 μ C | | | |

Alle Ratten wurden durch Dekapitieren getötet und autopsiert.

Aufarbeitung: Aus jeder Leber isolierten wir möglichst quantitativ die Fettsäuren und das Glykogen. Der Intestinaltraktus wurde direkt in Lauge aufgelöst, desgleichen der verbleibende Tierkörper; durch Extraktion mit Petroläther wurden das Unverseifbare und, nach Ansäuern, die Fettsäuren gewonnen.

Die Aktivitätsmessungen erfolgten nach nasser Verbrennung aller Fraktionen (Fettsäuren, Glykogen, Unverseifbares) und Fällung der Kohlensäure als Bariumcarbonat wie bei früheren Versuchen.

¹⁾ *M. A. Fischer & G. C. Garrity, J. Biol. Chem.* **204**, 759 (1953); **206**, 345 (1954).

SUMMARY.

By using ^{14}C -acetate and labeled glycerol we have investigated the degree of fat and glycogen synthesis in the livers of rats fed with a diet containing insufficient choline, and in the livers of rats fed with excessive choline.

No significant differences were observed in this experiment, since in a normal organ, fat and glycogen formation take place without considerable difference with regard to the lipid content.

The accumulation of fat in the liver which takes place during a deficiency of choline is not the result of an increased fat synthesis.

If, however, under the influence of a choline deficiency a clearly observed histological damage to the liver results, then the synthesis of fatty acids and the formation of glycogen are each affected to a certain degree respectively, i. e. reduced.

Choline is apparently only indirectly related to the liver-fat-metabolism, and should rather affect the formation and the decomposition of the proteins in this organ.

Wir danken der *Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz* für ihre finanzielle Unterstützung dieser Untersuchungen.

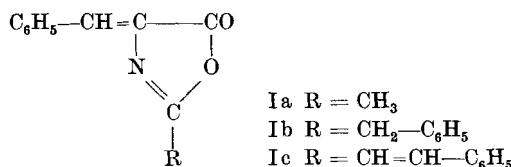
Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Basel.

170. 2-Styryl-4-benzal-oxazolon-(5)

von K. Rüfenacht.

(10. VI. 54.)

Kürzlich konnte gezeigt werden¹⁾, dass 2-Methyl- und 2-Benzyl-4-benzal-oxazolon-(5) (Ia) bzw. (Ib) farblos sind, während das bei der Erlenmeyer'schen Azlacton-Synthese gelb anfallende 2-Methyl-azlacton Ia durch hartnäckig anhaftendes, leuchtend gelbes 2-Styryl-4-benzal-oxazolon-(5) (Ic) verunreinigt ist. Wir geben im folgenden Einzelheiten über Herstellung bzw. Trennung dieser Azlactone.



¹⁾ K. Rüfenacht, Experientia 10, 247 (1954).