

Zur Anwendung des schweren Wasserstoffes in der Biochemie

Autor(en): **Bernhard, Karl**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Médicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze Mediche**

Band (Jahr): **5 (1949)**

Heft 5-6: **Introduction à l'étude d'isotopes utilisés en biologie, clinique et thérapeutique : travaux édités par la Commission des Isotopes de l'Académie Suisse des Sciences Médicales = Einführung in die Anwendung der Isotopentechnik in Biologie, Klinik und Therapie : Veröffentlichungen der Isotopenkommission der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften**

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-309187>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Zur Anwendung des schweren Wasserstoffes in der Biochemie

Von **Karl Bernhard**, Basel

1. Einleitung

Zu den ersten Isotopen von Bioelementen allgemeiner Bedeutung, die zu Signierungen verwendet wurden, gehört der *schwere Wasserstoff*. Urey nannte das von ihm im Jahre 1932 entdeckte Isotop der Masse 2 *Deuterium* und entwickelte Verfahren zur Gewinnung hochkonzentrierten schweren Wassers (1). Dieses kann heute industriell in großer Reinheit hergestellt werden und weist folgende physikalische Konstanten auf, wobei vergleichsweise die entsprechenden Daten für gewöhnliches Wasser angeführt sind:

	H ₂ O	D ₂ O
Dichte bei 20°	0,99823	1,10530
Dichtemaximum bei	4°	11,6°
Schmelzpunkt	0°	3,82°
Siedepunkt	100°	101,42°
Viskosität bei 20°	10,09	12,6
Oberflächenspannung	72,75	67,8

Infolge der Massenverdoppelung besteht die Möglichkeit der *gravimetrischen Bestimmung* des schweren Wasserstoffes, während die quantitative Ermittlung aller übrigen stabilen Isotopen wohl nur mit dem *Massenspektrometer* oder *Massenspektrographen* gelingt. Es sind die verschiedenen bekannten Verfahren für die Bestimmung des spezifischen Gewichtes D-haltigen Wassers angewendet worden. Wenn genügend große Mengen der zu untersuchenden Substanzen vorhanden sind, verbrennt man eine Probe und ermittelt die Deuterium-Konzentration des Verbrennungswassers durch Bestimmung seiner Dichte mit dem *Pyknometer*, der *Schwimmermethode* oder mit Hilfe des «fallenden Tropfens». Dabei wird die Fallgeschwindigkeit eines Tropfens konstanter Größe in einer mit demselben nicht mischbaren Flüssigkeit von nur wenig geringerer Dichte gemessen. Diese Fallgeschwindigkeit ist innerhalb gewisser Grenzen proportional der Differenz der Dichte des Tropfens und derjenigen der Flüssigkeit. Auf dieser Basis arbeiteten *Barbour* und *Hamilton* (2), *Vogt* und *Hamilton* (3), *Fenger-Eriksen*, *Krogh* und *Ussing* (4) Methoden zur Bestimmung des Deuteriumgehaltes von Wasser aus.

Wir haben mit geringen Abweichungen die Angaben von *Keston*, *Rittenberg* und *Schoenheimer* (5) befolgt, die sich sehr bewährten und serienmäßige Bestimmungen mit guter Genauigkeit ermöglichen.

Die ersten biologischen Versuche mit Deuteriumoxyd wurden im Hinblick auf mögliche toxische Wirkungen desselben unternommen. In 92%igem, nicht aber 30%igem schwerem Wasser gehen gewisse Protozoen, kleine Fische und Würmer zugrunde (6). Hefegärungen verlaufen in 100%igem Deuteriumoxyd etwa 10mal langsamer als in gewöhnlichem Wasser (7). *Hevesy* und *Hofer* (8) beobachteten bei Fischen in 10%igem schwerem Wasser nicht nur einen rasch eintretenden Austausch zwischen der Körperflüssigkeit der Tiere und dem sie umgebenden Wasser, sondern auch hinsichtlich des labil gebundenen Wasserstoffes der Gewebsbestandteile. In Selbstversuchen stellten die Autoren fest, daß bei geringen D-Konzentrationen der Organismus zwischen Deuterium und Protium nicht zu differenzieren vermag. Von aufgenommenem D-haltigem Wasser hatte die Hälfte erst nach 9 Tagen den Körper verlassen; die mittlere Verweilzeit eines Wassermoleküls im menschlichen Körper beträgt nach diesen Untersuchungen 14 Tage (9).

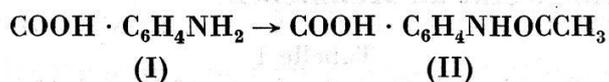
Signierungen mit Deuterium sind vor allem für die Erforschung des *Lipidstoffwechsels* sehr wertvoll. Der schwere Wasserstoff wurde am häufigsten und wohl auch am erfolgreichsten auf diesen Gebieten angewendet. In den Fettsäuren sind die C-H-Bindungen verhältnismäßig stabil. Es ist aber nicht nur möglich, chemische Reaktionen, die dieselben betreffen, zu studieren, sondern darüber hinaus auch das Schicksal der C-Ketten zu verfolgen.

In grundlegender Weise haben *Rudolf Schoenheimer* (†1941) und *D. Rittenberg* am Department of Biochemistry der Columbia-Universität in New York seit 1934 den schweren Wasserstoff und später den schweren Stickstoff für die Bearbeitung biologischer Probleme, insbesondere solcher des intermediären Stoffwechsels, angewandt. Als Schüler *Schoenheimers* und Fellow der *Rockefeller Foundation* hatte ich 1938/39 die Möglichkeit, mit der Isotopentechnik vertraut zu werden und später, durch den Krieg allerdings behindert, Signierungen mit schwerem Wasserstoff im Hinblick auf biologische Fragestellungen auch in Zürich vorzunehmen. Die vorliegenden Ausführungen betreffen Arbeiten, die in der Hauptsache am Physiologisch-chemischen Institut der Universität ausgeführt wurden.

2. Acetylierungen *in vivo* mit Essigsäure

Der *Essigsäure* als Produkt des intermediären Stoffwechsels wurde bis vor einigen Jahren wenig Interesse entgegengebracht. Man hielt sie für

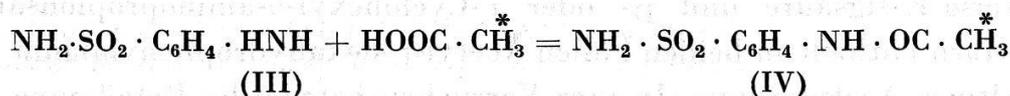
eine inerte Verbindung, was dadurch begründet schien, daß ihr Umsatz bzw. ihre Reaktionsfähigkeit in isolierten Geweben verhältnismäßig gering ist. Zudem sind Nachweis und quantitative Bestimmung kleiner Mengen Essigsäure schwierig. Näher bekannt waren indessen die im Tierkörper stattfindenden *Acetylierungen* körperfremder Amine, z. B. der p-Aminobenzoesäure (I) zu Acetyl-p-aminobenzoesäure (II)



und der Phenylaminoessigsäure oder Phenylaminobuttersäure zu den entsprechenden Acetyl-Verbindungen. Man nahm dabei an, daß diese Reaktionen unter Beteiligung der *Brenztraubensäure* als Acetyl-Donator verlaufen. In welchem Ausmaße sie vor sich gehen, hängt weitgehend von der Art und der Menge der applizierten körperfremden Amine und vor allem von der Tierart ab. Hunde acetylieren aromatische Amine nicht. Auch diese Paarungsreaktionen faßte man, ausgehend von pharmakologischen Gesichtspunkten, unter dem Begriff «Entgiftungen» zusammen und sah darin eine zweckmäßige Veränderung der Eigenschaften gewisser Substanzen etwa im Sinne einer besseren Löslichkeit in den Körperflüssigkeiten und damit verminderter Verweilzeit, oder maß den sich bildenden Derivaten eine geringere Affinität zu den Fermentsystemen des Körpers bei. Solche Voraussetzungen treffen aber in den wenigsten Fällen zu, Toxizität und Schwerlöslichkeit sind mitunter für die Paarungsprodukte ausgeprägter als für die ursprünglichen Substanzen.

Damit sich der Organismus mit einer zugeführten Verbindung umsetzt, ist eine gewisse Affinität derselben zu den Enzymen Bedingung. Es scheint indessen wenig wahrscheinlich, daß die sogenannten Entgiftungsreaktionen durch streng substratspezifische Fermente katalysiert werden. Die Acetylierungen körperfremder Amine werden offenbar viel eher durch ein Enzymsystem ermöglicht, dessen normale Funktion in der Acetylierung natürlich vorkommender Amine liegt.

Wir konnten beweisen (10), daß diese Reaktionen im Tierkörper mit *Essigsäure* erfolgen, Feststellungen, die in der Folge für die Erforschung des intermediären Stoffwechsels dieser Verbindung von großem Nutzen waren. Nach Gaben von Sulfanilamid (III) und Deuterio-Essigsäure, CD_3COOH , an Kaninchen wurde das im Harn ausgeschiedene Acetylsulfanilamid (IV) isoliert. Es erwies sich als D-haltig:



$\overset{*}{\text{H}} = \text{H} + \text{D}$.

Aus der eingetretenen Isotopen-Verdünnung ließ sich berechnen, daß sich die verfütterte Essigsäure im Mittel zu 12% an der Acetylierung beteiligt hatte; die Hauptmenge stammte, wie zu erwarten, aus anderen Quellen. Zu einem analogen Resultat führten ein Selbstversuch, woraus hervorgeht, daß also auch der Mensch Acetylierungen solcher Amine mit Essigsäure vornimmt, ferner die Verabreichung von p-Aminobenzoesäure und Deuterio-Acetat an Kaninchen.

Tabelle 1

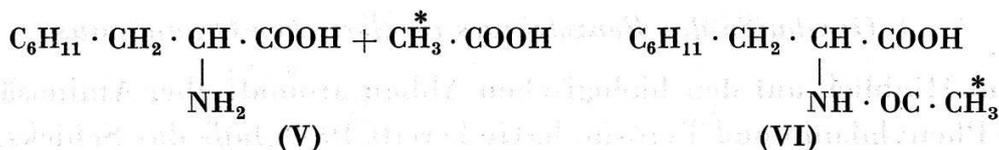
Fütterung von Sulfanilamid und Deuterio-Acetat ($6,06 \pm 0,15$ Atomprozent D) an Kaninchen (pro 1 g Sulfanilamid 1,05 g Deuterio-Essigsäure)

Versuch Nr.	Sulfanilamid		Acetylverbindung		Beteiligung der Deuterio-Essig- säure an der Ace- tylierung in %
	total g	mg/kg die	Ausbeute %	Atom-% D in der Acetylgruppe	
1	1	220	30,2	0,30	5
2	1	398	29,3	0,97	16
3	1	398	36,0	0,76	13
4	2	424	29,7	0,53	9
5	2	615	33,3	1,13	19
6	3	574	34,7	0,33	5
7	3	474	27,8	0,83	14

Nach Fütterung von Sulfanilamid und *Deuterio-Bernsteinsäure* war im Acetylprodukt der schwere Wasserstoff nicht vorhanden (11). Dieses Ergebnis ist, gestützt auf die heutigen Kenntnisse über den Bernstein-säureabbau zu Oxalessigsäure, verständlich.

F. Knoop hatte 1910 die Entstehung von Aminosäuren aus Ketosäuren und Ammoniak gezeigt, indem er nach Fütterung von β -Benzylbrenztraubensäure ein Acetylprodukt des Benzalanins isolierte. Die beobachtete Acetylierung wurde als wichtige Intermediärreaktion des Aminosäureauf- und -abbaues gedeutet. Sowohl nach Verabreichung von L-, DL- oder D-Phenylaminobuttersäure an Hunde isolierten *du Vigneaud* und *Irish* (12) Acetyl-L-(+)-phenylaminobuttersäure und diskutierten erneut die Acetylierung durch Brenztraubensäure als Zwischenreaktion der Aminosäurebildung.

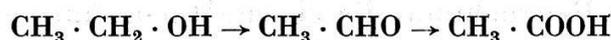
Wir hatten bereits 1938 (13) nach Gaben von *Hexahydrophenylalanin* (V) als Racemat oder L-Form an Hunde im Harn *Acetyl-L-hexahydrophenylalanin* (VI) aufgefunden. In der Absicht, eine mit Essigsäure erfolgende Acetylierung von Aminosäuren zu beweisen, erhielt ein Hund Deuterio-Essigsäure und D- oder L-Cyclohexyl- α -aminopropionsäure. Der Harn enthielt in beiden Fällen Acetyl-L-hexahydrophenylalanin mit D-haltiger Acetylgruppe. In vier Versuchen betrug die Beteiligung der verabreichten Essigsäure 13, 18, 20 und 25% (14).



Die Kriegszustände verunmöglichten uns in der Folge die weitere Beschaffung signierter Essigsäure. *Rittenberg* und *Bloch* (15) haben später unsere Ergebnisse über Acetylierungen bestätigt und erweitert, ferner den Nachweis der Beteiligung der Essigsäure als wichtigen Baustein für verschiedene im Organismus vor sich gehende Synthesen erbracht.

3. Abbau des Alkohols im Tierkörper

Die Eigenschaft der Essigsäure, in vivo als Acetyl-Donator zu wirken, ermöglichte uns auch die Aufklärung des Schicksals des Alkohols im Tierkörper. *Aethylalkohol* wird selbst in großen Dosen von Mensch und Tier rasch oxydiert. Im Harn läßt sich höchstens eine geringe Vermehrung der flüchtigen Säuren, aber kein Abbauprodukt nachweisen. Es war anzunehmen, die Oxydation verlaufe über Acetaldehyd bzw. Essigsäure:



War dies der Fall, so bestand die Möglichkeit, letztere durch Acetylierung abzufangen. Wir gaben daher Kaninchen gemeinsam mit Sulfanilamid Deuterio-äthylalkohol, $\text{CD}_3\text{CD}_2\text{OD}$, und erhielten aus dem Harn ein stark D-haltiges Acetylprodukt (16); die intermediär gebildete Essigsäure beteiligte sich in 8 Versuchen zu einem Sechstel bis zu einem Drittel an den Acetylierungen (vgl. Tab. 2).

Tabelle 2
Fütterung von Deuterio-Alkohol¹⁾ und Sulfanilamid
(1,6 ± 2,0 g in 48 Std.) an Kaninchen

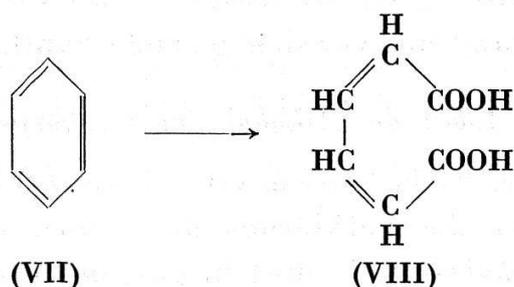
Versuch Nr.	Alkohol mg/kg/die	Acetylverbindung		Beteiligung der intermediär gebildeten Essigsäure an der Acetylierung in %
		Ausbeute %	Atom-% D in der Acetylgruppe	
1	29,4	42,5	1,60	29
2	41,0	43,0	1,43	26
3	32,8	—	1,43	26
4	30,0	29,7	0,86	16
5	38,1	23,4	0,90	17
6	31,3	27,9	1,16	22
7	31,5	34,6	1,37	26
8	31,3	33,6	1,50	29

¹⁾ D-Gehalt bei den Versuchen 1–4: 11,0 ± 0,19 Atomprozent
D-Gehalt bei den Versuchen 5–8: 10,5 ± 0,08 Atomprozent

²⁾ $\overset{*}{\text{H}} = \text{D} + \text{H}$.

4. Oxydation des Benzolringes im tierischen Organismus

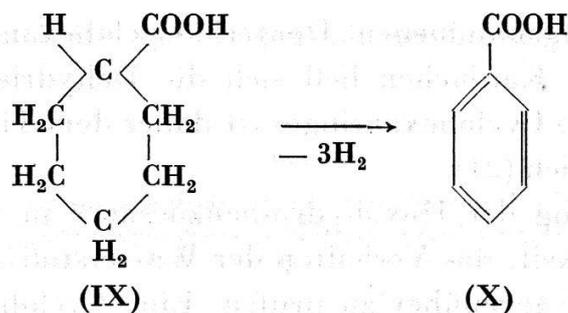
Im Hinblick auf den biologischen Abbau aromatischer Aminosäuren, wie Phenylalanin und Tyrosin, hatte bereits 1909 *Jaffé* das Schicksal des *Benzols* im Tierkörper untersucht und aus dem Harn von Hunden oder Kaninchen, denen peroral oder intraperitonäal Benzol verabreicht wurde, geringe Mengen *Muconsäure* (VIII) isoliert:



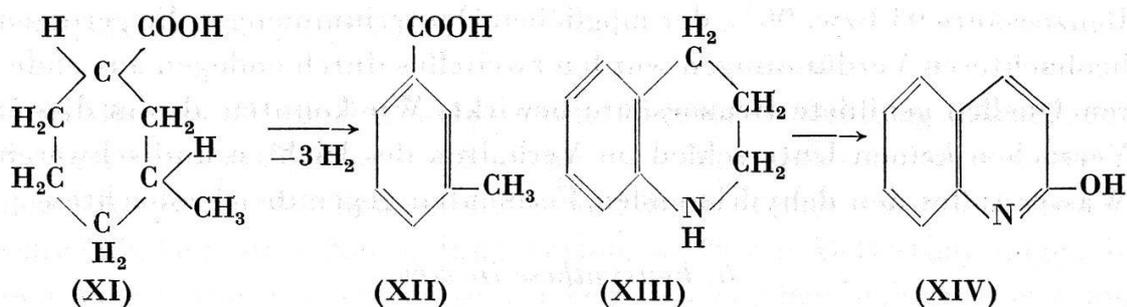
Verschiedene Autoren konnten diese Befunde nicht bestätigen; *Boeseken* und *Slooff* machten geltend, daß aus Benzol in Analogie zur Oxydation von *o*-Benzochinon die *cis-cis*-Muconsäure entstehen müßte, während im Harn die *trans-trans*-Form vorlag. Es wurde daher angenommen, letztere stamme aus anderen Quellen, also nicht aus dem Benzol. Wir injizierten intraperitonäal an Kaninchen Deuterio-Benzol C_6D_6 und konnten geringe Quantitäten D-haltige Muconsäure isolieren (17). Die oxydative Ringspaltung ist damit erwiesen. Heute wissen wir aus Untersuchungen von *Felix*, daß der Benzolring des Phenylalanins und Tyrosins durch Nierenbrei zu Acetessigsäure aufgespalten wird, was kürzlich auch mit Hilfe des Kohlenstoff-Isotopen C^{14} bestätigt wurde.

5. Aromatisierung alizyklischer Verbindungen: Dehydrierung der Hexahydro-benzoessäure im Tierkörper

In früheren Arbeiten studierten wir *Aromatisierungen alizyklischer Verbindungen* im Tierkörper, da anzunehmen ist, analoge Vorgänge lägen der Entstehung bestimmter Hormone und vielleicht auch cancerogener Verbindungen aus Sterinen oder Gallensäure zugrunde. Die Follikelhormone Östron, Östradiol, Equilin und Equilenin weisen aromatische Ringe auf, für deren Bildung wohl dehydrierende Fermente verantwortlich sind. Wir haben das Schicksal einer Reihe hydrozyklischer Verbindungen geprüft (18). Die Aromatisierung des Cyclohexanringes konnte durch Verabreichung von Hexahydro-benzoessäure (IX) an Hunde nachgewiesen werden, Befunde, welche *F. Dickens* kürzlich bestätigte, indem er die Entstehung von Benzoessäure (X) aus Hexahydro-benzoessäure in Leberschnitten und Leberhomogenat von Kaninchen zeigte (19).



Eine Dehydrierung ließ sich auch für die Hexahydro-m-toluylsäure (XI) beweisen, welche als m-Toluylsäure (XII) ausgeschieden wird (18). Von Verbindungen mit heterozyklischen Ringen erfährt das 1,2,3,4-Tetrahydro-chinolin (XIII) nach subcutaner Injektion an Hunde eine Umwandlung in 2-Oxychinolin (XIV) (20).



Mit Hilfe des schweren Wasserstoffes gelang auch der Nachweis der Dehydrierung von Hexahydro-benzoesäure durch Menschen und solche Tiere, welche wechselnde Mengen Benzoe- bzw. Hippursäure als normale Stoffwechselprodukte ausscheiden. Eine Vermehrung der letzteren nach Gaben von Cyclohexancarbonsäure könnte hier nicht als sicherer Beweis stattfindender Aromatisierung gelten. Nach Aufnahme wechselnder Mengen signierter Hexahydro-benzoesäure durch Versuchspersonen verschiedenen Alters und Geschlechtes fanden wir im Harn stets D-haltige Benzoesäure, etwa $\frac{3}{4}$ der auftretenden Mengen waren durch Dehydrie-

Tabelle 3
Ausscheidung D-haltiger Benzoesäure nach Aufnahme
D-haltiger Hexahydro-benzoesäure durch Menschen

Alter der Versuchsperson	Menge D-haltiger Hexahydrobenzoesäure mg/kg/die	D-Werte der ausgeschiedenen Benzoesäure
18	45,8	60
24	50,1	57
16	47,5	70
41	45,8	78
47	44,3	78
52	40,0	72

rung aus der aufgenommenen Deuterio-Cyclohexancarbonsäure entstanden. Auch an Kaninchen ließ sich die Dehydrierung zeigen. Die Aromatisierung des Cyclohexanringes ist daher dem Tierkörper in vielen Fällen leicht möglich (21).

Die Dehydrierung der Hexahydro-benzoesäure *in vivo* bot eine erwünschte Möglichkeit, das Verhalten der Wasserstoffisotopen dehydrierenden Fermenten gegenüber zu prüfen. Eine Cyclohexancarbonsäure, die durch Hydrierung von Benzoesäure mit Deuterium erhalten wurde und die Hälfte ihres Wasserstoffes als H_1^2 aufwies, mußte zu einer Benzoesäure mit demselben Verhältnis H:D führen oder aber, im Falle, daß der leichte Wasserstoff sich anders verhielte als der schwere, den ersteren oder letzteren angereichert enthalten. Nach Gaben von Deuterio-Hexahydro-benzoesäure an Hunde fanden wir in der ausgeschiedenen Benzoesäure 93 bzw. 96% der möglichen Deuteriummenge; die geringen beobachteten Verdünnungen wurden zweifellos durch endogen aus anderen Quellen gebildete Benzoesäure bewirkt. Wir konnten also in diesen Versuchen keinen Unterschied im Verhalten des leichten und schweren Wasserstoffes den dehydrierenden Fermenten gegenüber beobachten.

6. Fettsynthese *in vivo*

Wenn wir biochemische Vorgänge mit Hilfe der Isotopen als Indikatoren verfolgen, beweisen eintretende Änderungen des Isotopengehaltes der Substrate den Ablauf sich vollziehender Reaktionen. Die Isotopenkonzentration der gebildeten Verbindungen ist ein Maß für die Geschwindigkeit der Umsetzungen. Die Erkenntnis des *dynamischen Zustandes* der Körperbestandteile (*Schoenheimer*) ist einer der wichtigsten Befunde, die wir der Isotopentechnik verdanken. Die Möglichkeit, die *in vivo* kontinuierlich verlaufenden chemischen Vorgänge zu verfolgen, hat zuerst auf dem Gebiete des *Lipidstoffwechsels* zu wertvollen Ergebnissen geführt. Wenn wir die Körperflüssigkeit eines Tieres mit schwerem Wasser anreichern, so wird als Folge stattfindender Reduktionen von Carbonyl- und Hydroxylgruppen oder Hydrierung ungesättigter Bindungen der schwere Wasserstoff in Fettsäuren und Cholesterin aufgenommen. Unter physiologischen Bedingungen ist, wie bereits erwähnt, die Wasserstoff-Kohlenstoff-Bindung der aliphatischen Ketten im Gegensatz zu den H—O-, H—N- oder H—S-Bindungen stabil. Der C-ständige Wasserstoff der Fettsäuren erleidet keinen enzymatischen oder anderweitigen Austausch, wohl aber der Wasserstoff an polaren Gruppen infolge Dissoziation.

Geben wir Tieren, z. B. Mäusen oder Ratten, D-haltiges Trinkwasser oder injizieren wir ihnen subcutan schweres Wasser, so gelingt, wie aus

Tabelle 4 ersichtlich ist, eine gleichmäßige Anreicherung der Körperflüssigkeiten an D₂O (22).

Tabelle 4
Deuteriumgehalt des Körperwassers von Mäusen
nach Gaben eines D-haltigen Trinkwassers

Versuch	Dauer Tage	Atom-% D im Trinkwasser	Atom-% D im Körperwasser			
			Gruppe ¹⁾ I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV
A	2	6,75	3,68	3,50	3,22	3,46
B	3	6,75	4,21	—	4,32	—
C	6	4,00	2,53	2,27	—	—
D	15	4,00	2,91	3,00	2,95	2,90

¹⁾ Jede Gruppe umfaßt 5 Tiere

In diesem Milieu sich abspielende Fettsäuresynthesen führen zum Einbau von stabil gebundenem, schwerem Wasserstoff in die entstehenden Fettsäuren. Wir können auf Grund des D-Gehaltes deutlich die Geschwindigkeit ihrer Neubildung verfolgen. Durch D-Bestimmungen in den Fettsäuren aus den einzelnen Organen ergeben sich Hinweise auf deren synthetische Leistungen und Aktivität innerhalb des Gesamtorganismus. Die höchsten D-Werte werden vor allem in den gesättigten Leberfettsäuren angetroffen (vgl. Tab. 5).

Tabelle 5
Deuteriumgehalt der Fettsäuren von Mäusen nach Gaben von schwerem Trinkwasser und kohlenhydratreichem, fettarmem Futter

Ver- such	Anzahl der Tiere	D-Gehalt (Atom-%) D der Fettsäuren aus						
		Depotfett			Leber		Darm	
		total	gesättigt	ungesätt.	gesättigt	ungesätt.	gesättigt	ungesätt.
A	20	0,36	0,55	0,26	1,35	0,61	0,72	0,35
B	10	0,64	0,98	0,50	2,06	1,49	1,41	1,07
C	10	0,39	0,50	0,32	1,35	1,06	0,82	0,50
D	20	0,62	0,76	0,49	1,41	0,80	1,02	0,57

Die Fettsäure-Regeneration verläuft also in der Leber sehr rasch, es läßt sich für die gesättigten Fettsäuren dieses Organs eine Halbwertszeit von 2 Tagen berechnen. Eine erhebliche diesbezügliche Aktivität des Darmtractus ergaben Versuche an 10 Ratten, deren Körperflüssigkeit wieder an D₂O angereichert und denen als alleinige Nahrung extrahiertes

Brot gefüttert wurde (23). Die D-Werte der erhaltenen Fettsäuren waren nur wenig oder nicht von denjenigen der Leberfettsäuren verschieden:

Tabelle 6
Fettsynthese im Intestinal-Tractus und in der Leber von Ratten

Tier Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dauer der Versuche, Tage . . .	3	3	6	6	9	9	9	12	21	21
D-Werte der Fettsäuren aus dem Intestinal-Tractus	15	15	27	34	—	28	39	16	36	39
D-Werte der Fettsäuren aus der Leber	21	18	31	26	24	27	29	19	34	37

Die D-Gehalte der Leber- und Darmfettsäuren sind also sichere Kriterien für stattfindende Fettsynthesen. Wurden Ratten *eiweißreich*, aber fettarm, also nur mit Casein und den nötigen Mineralsalzen, gefüttert, so trat nur mäßige Fettbildung ein, erhielten die Tiere aber reichliche Zusätze an den *Vitaminen des B-Komplexes*, so erfolgte die Regeneration der Leber- und Darmfettsäuren auf Grund ihrer D-Werte annähernd mit derselben Halbwertszeit wie bei Kohlenhydratfütterung (29).

Wir haben die Lipidsynthese bei Ratten auch unter *Hungerbedingungen* verfolgt (25). Bekanntlich werden bei solchen Zuständen die Glykogen- und anschließend die Fettdepots rasch verbraucht. Man weiß indessen, daß auch nach Hungertod der Körper außer in Gehirn und Herz noch geringe Fettmengen aufweist. Zweifellos ist ein bestimmtes Minimum an Lipiden lebensnotwendig. Zur Induzierung der Körperflüssigkeit wurde normal gefütterten Tieren schweres Wasser injiziert. Nach sechstägigem Hunger töteten wir die Ratten, welche 21–37% ihres Gewichtes eingebüßt hatten, und isolierten aus der Leber, dem Magendarmtractus und dem übrigen Tierkörper die Fettsäuren. Die folgende Tabelle enthält die D-Werte der letzteren:

Tabelle 7
Fettsynthese bei Inanition (Ratten)

Versuch Nr.	Gesamt-Fettsäuregehalt der Tiere	D-Wert der Fettsäuren aus			
		Leber	Darmtractus	Depots	
				gesamt	gesättigt
1	0,6	26	28	17	27
2	0,9	26	29	20	39
3	1,1	11	13	8	12
4	1,4	9	11	5	10
5	2,5	10	9	7	9
6	2,6	5	—	4	6

Es geht daraus deutlich hervor, daß auch im Hunger, d. h. bei völligem Nahrungsentzug noch Lipide gebildet werden. Diese Synthese nimmt zu, sobald der Organismus an Fett stark verarmt ist. Bei den Versuchen 1 und 2, wo der Gesamt-Fettsäuregehalt der Tiere bereits weniger als 1% beträgt, ergaben sich – wiederum für die Gesamt-Fettsäuren aus der Leber und dem Darmtractus – die höchsten D-Werte. Andererseits sind dieselben aber auch für die gesättigten Fettsäuren des Depotfettes beträchtlich; es ist dies leicht verständlich, da eine Verdünnung durch bereits vorhandenes Fett bei diesen Hungertieren nicht eintrat. Weit geringere D-Werte fanden wir bei den Versuchen 5 und 6. Diese Tiere waren bei Gehalten von 2,5 und 2,6% Gesamt-Fettsäuren offenbar weit weniger auf Fettneubildung angewiesen. Es ist anzunehmen, daß diese Fettsynthesen aus Eiweiß erfolgten. Auch das Unverseifbare aus dem Depotfett erwies sich als D-haltig, demzufolge werden im Hunger auch *Sterine* gebildet. Die Versuche sprechen deutlich für die unbedingte Notwendigkeit gewisser Lipidmengen für den Organismus und weisen darauf hin, daß selbst unter Hungerbedingungen Energiegewinnungen für den Organismus über den Fettstoffwechsel verlaufen.

Auch chemische Probleme der *Embryologie* wie stoffliche Veränderungen im Verlaufe der fötalen Entwicklung sind dank der Isotopentechnik der erfolgreichen Bearbeitung zugänglich. Wir injizierten in befruchtete Hühnereier 0,5–1,0 cm³ reines schweres Wasser und trennten nach einer Bebrütungszeit von 17½ Tagen die normal entwickelten Hühnchen vom Ei-Inhalt, dessen Deuteriumgehalt 1,13–1,49 Atomprozent betrug. Aus den Kücken wurde das Unverseifbare und die Fettsäuren gewonnen. Erstere wurden in flüssige und feste bzw. ungesättigte und gesättigte Säuren zerlegt und aus diesen die Palmitinsäure isoliert. Alle diese Fraktionen, auch das abgetrennte Cholesterin, erwiesen sich als D-haltig. Es steht damit fest, daß der Hühnerembryo sowohl Fettsäuren als Cholesterin aufbaut, obwohl ihm im Eidotter beträchtliche Lipidmengen zur Verfügung stehen. Die Fettsäuren aus dem Ei-Inhalt waren frei von Deuterium; es findet somit während der Bebrütung kein Austausch statt, nur die synthetisch neu gebildeten Lipide enthalten den schweren Wasserstoff (26).

Schimmelpilze und *Hefen* vermögen unter geeigneten Kultivierungs- und Ernährungsbedingungen erhebliche Lipidmengen zu synthetisieren und in ihren Zellen zur Ablagerung zu bringen. Wir haben den Mikroorganismus *Phycomyces Blakesleanus* nach den Angaben von *W. H. Schopfer* gezüchtet und ein Pilzmycel erhalten, das etwa 20% Lipide vielseitiger Zusammensetzung aufwies (27). Um im Gegensatz zu den Verhältnissen bei den Tieren von einem völlig fettfreien Milieu, also von

Tabelle 8

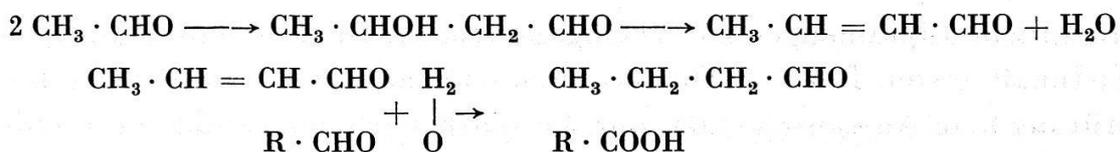
Fettbildung beim Schimmelpilz *Phycomyces Blakesleeanus*

Versuch Nr.	Atom% Deuterium			D-Werte der Fettsäuren und des Ergosterins	
	Nährlösung	Fettsäuren	Ergosterin	Fettsäuren	Ergosterin
1	4,61	2,90	2,59	63	56
2	3,51	2,16	—	62	—
3	2,75	1,64	1,51	60	55
4	1,61	0,99	—	62	—
5	1,41	0,91	—	64	—

vereinfachten Verhältnissen ausgehen zu können, untersuchten wir die Fettsynthese unter Anwendung von Deuterium als Indikator bei diesem Mikroorganismus. Wir kultivierten ihn in einer Glukose- und D_2O -haltigen Nährlösung und extrahierten aus den Mycelen von 5 Versuchen die Lipide. Es wurde der Deuteriumgehalt der Fettsäuren und des Ergosterins bestimmt (28). Die Ergebnisse, welche aus der Tabelle 8 ersichtlich sind, zeigen in einer für biologische Versuche sehr guten Übereinstimmung D-Werte von rund 62, die für das Ergosterin mit 56 und 55 etwas tiefer sind. Daß die Fettsynthese aus Glukose über kleine Bruchstücke erfolgt, dürfte heute nicht mehr anzuzweifeln sein; den eigentlichen, viel diskutierten chemischen Mechanismus dieses Aufbaues kennen wir noch nicht. Es ist denkbar, die Reaktion beginne mit den ersten Stufen der alkoholischen Gärung, d. h. mit der Bildung von Glycerin und *Brenztraubensäure*



Diese Ketosäure würde zu Acetaldehyd decarboxyliert, aus dem sich durch Kondensation und Oxydoreduktion über Aldol, Crotonaldehyd, α, β -Hexylen-Aldehyd, Capronaldehyd aufbauen würde:



Durch erneute Anlagerung von Acetaldehyd könnte sich die Reaktion fortsetzen. Ein anderer Weg ginge von der Bildung von *Milchsäure* aus, aus welcher Acetaldehyd und Ameisensäure entstünden. Auch hier träte Kondensation des Acetaldehyds ein, wobei die Ameisensäure den zur Hydrierung der ungesättigten Aldehyde erforderlichen Wasserstoff liefern könnte. Die beiden Möglichkeiten unterscheiden sich also vor allem durch die Beschaffung des Wasserstoffes, welcher im ersten Fall

durch Oxydoreduktion aus Wasser, im zweiten Fall aber aus Ameisensäure stammt. In beiden Fällen müssen nach *Günther* und *Bonhoeffer* (29) etwa 60% der Wasserstoffatome des fertigen Fettes in neue Kohlenstoffbindung treten. Das Verhältnis D/H (Fett):D/H (Wasser) müßte demnach gleich 0,6 sein. Unsere Versuche ergaben Werte von 0,62, 0,62, 0,58, 0,61 und 0,64. Unter Heranziehung des schweren Wasserstoffes als Indikator wurde demnach eine wesentliche Stützung der oben entwickelten Vorstellungen über die Fettsynthese bei Pflanzen erbracht.

Wir haben eine Trennung des durch den Pilz synthetisierten Fettes in die einzelnen Fettsäuren vorgenommen und 10 verschiedene Komponenten isoliert und auf Deuterium geprüft. Die im Pilzfett vorkommenden Säuren enthielten im Gegensatz zu den Verhältnissen bei den Tieren (Mäusen, Ratten) annähernd gleiche D-Mengen, wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich ist; die geringen Unterschiede liegen im Bereiche der möglichen Fehlerquellen der Bestimmungen. Da oft nur kleine Materialmengen zur Verfügung standen, mußten die Säuren zur Gewinnung genügender Wassermengen mit «nicht-isotopen» Verbindungen verdünnt werden.

Tabelle 9
D-Gehalte der Fettsäuren aus den *Phycomyces*-Lipiden

		Atom% D
C ₁₆	Palmitinsäure	1,72
C ₁₈	Stearinsäure	1,79
	Ölsäure	1,69
	Linolsäure	1,79
	γ-Linolensäure	1,69
C ₂₂	Behensäure	1,73
C ₂₄	n-Tetracosansäure	1,85
C ₂₆	n-Hexacosansäure	1,80
	n-Hexacosensäure	1,75

Die Aufnahme von stabil gebundenem Wasserstoff aus dem Milieu in die sich bildenden Fettsäuren ist nicht nur ein sicherer Beweis für stattfindende Fettsynthesen; sie erlaubt auch das Ausmaß letzterer festzustellen und liefert wertvolle Hinweise zu einer Formulierung des Reaktionsmechanismus. *Essigsäure* und *Brenztraubensäure* dürfen jedenfalls für die Fettbildung im Tierkörper als gesicherte Vorläufer gelten, das eigentliche, reaktionsfähige Zwischenprodukt ist indessen noch nicht bekannt. Daß die Fettbildung bei Mikroorganismen durch Kondensation von Acetaldehyd oder eine reaktionsfähige Form desselben verläuft, wird durch die genannten Untersuchungen an *Phycomyces* wahrscheinlich gemacht.

7. Essentielle Fettsäuren

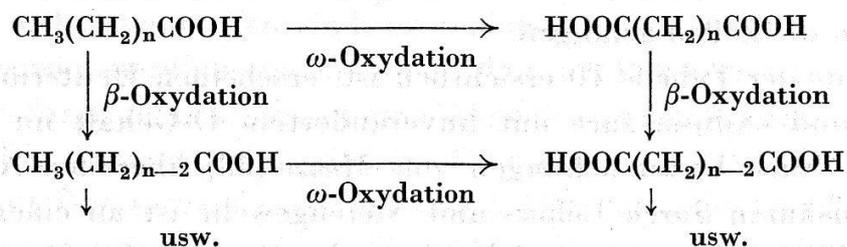
Bei unseren Versuchen über Fettbildung bei Tieren enthielten die gesättigten Fettsäuren stets mehr Deuterium als die ungesättigten, Palmitin- und Stearinsäure indessen immer gleichviel, was beweist, daß diese beiden Verbindungen trotz ihrer verschiedenen quantitativen Verteilung in den Körperfetten in gleichem Ausmaße regeneriert werden.

Die Ursache der niedrigen D-Gehalte der ungesättigten Fettsäuren liegt vor allem darin, daß die stärker ungesättigten Verbindungen wie Linol- und Linolensäure keinen schweren Wasserstoff enthalten. In Versuchen an Mäusen und Ratten, die nach Signierung ihrer Körperflüssigkeiten mit extrahiertem Brot gefüttert wurden, beobachteten wir nie schweren Wasserstoff in den höher ungesättigten Säuren. Wir haben dabei die Linolsäure als Tetrabromstearinsäure vom Schmelzpunkt 123° isoliert, d. h. auf Grund des für die cis-cis-9,12-Linolsäure charakteristischen Tetrabromides identifiziert und die Linolensäure als Hexabromid abgeschieden (30). Im Gegensatz zu den übrigen Fettsäuren werden die genannten ungesättigten Säuren vom Tier nicht aufgebaut. Unsere Versuche fanden unter völlig physiologischen Bedingungen statt. Wir haben kein völlig fettfreies Futter verabreicht und mit ausgewachsenen, jedenfalls nicht jungen, vor Beginn der Versuche normal gefütterten Ratten gearbeitet. Die Versuchstiere wiesen also bereits einen gewissen Gehalt an Linol- und Linolensäure auf. Die Tatsache, daß in den genannten ungesättigten Säuren nach Beendigung der Versuche schwerer Wasserstoff nicht enthalten war, beweist, daß sie sich völlig inert verhalten, d. h. nicht regeneriert wurden. Dieser Befund ist eine wichtige Bestätigung, daß der Wasserstoff von $-\text{CH}_3$ -, $-\text{CH}_2$ - und $=\text{CH}$ -Gruppen unter physiologischen Bedingungen nicht ausgetauscht wird mit dem Wasserstoff aus den Körperflüssigkeiten. Einführung von Wasserstoff aus den Körperflüssigkeiten findet nur im Verlaufe chemischer Umsetzungen in neu gebildete Verbindungen statt. Bereits 1929 hatten *Burr* und *Burr* (31) gezeigt, daß Ratten bei völlig fettfreier Kost an schweren, zum Tode führenden Erscheinungen erkrankten, indessen durch Gaben von Linolsäure oder linolsäure-haltigen Fetten geheilt werden können. Diese Befunde wurden durch zahlreiche Autoren in den letzten Jahren bestätigt (32). Mangelsymptome nach ungenügender Versorgung mit essentiellen Fettsäuren konnten auch bei Mäusen und Hunden beobachtet werden. Muttertiere, die während der Gravidität fettfrei ernährt wurden, aber noch über gewisse Reserven an cis-cis-9,12-Linolsäure verfügten, gaben, wie wir feststellten (33), diese essentiellen Fettsäuren an die saugenden Jungratten nicht ab, welche nach kurzer Zeit an typischen Symptomen zugrunde gingen (34).

Wir sind demnach auf einem ganz anderen Wege, nämlich durch Verfolgung der Fettsynthese im Tierkörper mit Hilfe der Isotopentechnik, zu analogen Befunden gelangt wie *Burr* und *Burr* durch Fütterungsversuche an Ratten.

8. Biologischer Fettsäure-Abbau

Bekanntlich hat *F. Knoop* im Jahre 1904 für den Abbau der Fettsäuren im Tierkörper das Gesetz der β -Oxydation aufgestellt. Auf Grund des Verhaltens phenylsubstituierter Fettsäuren wurde geschlossen, der oxydative Angriff erfolge stets am zur COOH-Gruppe β -ständigen C-Atom. Untersuchungen über die Oxydation von Fettsäuren in vitro mit Wasserstoffsperoxyd führten *Dakin* zu analogen Beobachtungen. Der β -oxydative Abbau von C-Ketten konnte in zahlreichen Fällen mit anderen Modell-Verbindungen bestätigt werden; indessen wurde von verschiedener Seite ein solcher Abbau für die Fettsäuren der Nahrungsfette bestritten (35). Quantitative Bestimmungen der Acetonkörper nach Fettgaben an hungernde Tiere oder Zusätzen niederer Fettsäuren zu Leberschnitten führten zur Annahme einer *multiplen alternativen Oxydation*, d. h. zu unmittelbarem Zerfall der Fettsäurekette in C_4 -Bruchstücke. Andererseits machte *Verkade* (36) geltend, die ω -Oxydation, gefolgt von bilateraler β -Oxydation nach dem Schema



wäre der vorherrschende Abbauweg. Tatsächlich werden nach reichlichen Gaben gewisser Fettsäuren oder Fette an Menschen und Hunde im Harn geringe Mengen von Dicarbonsäuren ausgeschieden. Es ist dies der Fall für Capryl-, Nonyl-, Caprin- und Undecylsäure, Verbindungen, die indessen in den üblichen Nahrungsfetten keine Rolle spielen. Für die Hauptkomponenten derselben, die Fettsäuren mit 16 und 18 C-Atomen, ist eine Methyloxydation nicht bewiesen.

Eingehende Untersuchungen ergaben, daß Sebacin-, Azelain-, Kork- und Adipinsäure, also Dicarbonsäuren mit 10, 9, 8 und 6 C-Atomen vom Menschen und Hund sehr schwer oxydierbar sind und, auch in kleinen Mengen aufgenommen, im Harn unverändert auftreten. Eine Ablagerung bzw. Deponierung findet nicht statt. *Verkade* machte dagegen geltend, daß sich intermediär entstehende Dicarbonsäuren nicht analog zu verhalten brauchen wie mit der Nahrung zugeführte und wohl

abgebaut werden könnten, der Harn also trotz ausgedehnter ω -Oxydation der Fettsäuren keine Dicarbonsäuren zu enthalten brauche. Es besteht die Möglichkeit, mit Hilfe der Isotopentechnik zu entscheiden, ob eine Verbindung zu den Intermediärprodukten des Stoffwechsels zu zählen ist oder nicht. Letzteres ist der Fall, wenn sie, mit einer «Marke» versehen dem Gesamt- oder Teilorganismus zugefügt, ihren Isotopengehalt nicht ändert, d. h. also nicht durch bereits vorhandene oder entstehende Moleküle der gleichen, nicht isotopen Verbindung verdünnt wird. Wir hatten auf Grund unserer Arbeiten über Fettabbau die ω -Oxydation stets als einen speziellen Fall von Methyloxydation aufgefaßt und als Auswegsreaktion ohne quantitative Bedeutung für die Fettsäureoxydation bezeichnet. Um zu einer gesicherten Entscheidung hinsichtlich der Bildung von Dicarbonsäuren aus normalem Nahrungsfett zu gelangen, fütterten wir Hunden gleichzeitig mit Fett *Deuterio-Dicarbonsäuren* von bekanntem D-Gehalt, ausgehend von der Überlegung, daß eine solche signierte Säure, z. B. die Sebacinsäure oder Korksäure, nach *Verkade* im Organismus mit Molekülen aus dem Fettstoffwechsel gebildeter Sebacin- oder Korksäure zusammentreffen müßte. Dabei träte eine Verminderung des Isotopengehaltes ein, und es müßten im Harn Deuterio-, Sebacin- oder Deuterio-Korksäure von geringer D-Konzentration ausgeschieden werden (37). Bedingung ist natürlich, daß die Dicarbonsäuren in die Zellen gelangen.

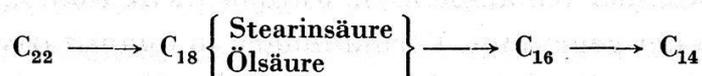
Wie aus der Tabelle 10 ersichtlich ist, erscheinen Deuterio-Sebacin-, -Kork- und -Adipinsäure mit unverändertem D-Gehalt im Harn des Hundes. Nach Untersuchungen von *Mazza* (38) über den Abbau von Dicarbonsäuren durch Leber- und Nierengewebe ist an einer gewissen Permeabilität nicht zu zweifeln, denn der Sauerstoffverbrauch betrug bei Bebrütung von Adipin-, Kork-, Azelain- oder Sebacinsäuren für Leberschnitte 30–100%, für Nierenschnitte 15–50% gegenüber den Kontrollen. Man darf daher wohl aus den geschilderten Versuchen mit

Tabelle 10
Fütterung von Fett und Deuterio-Dicarbonsäuren an Hunde

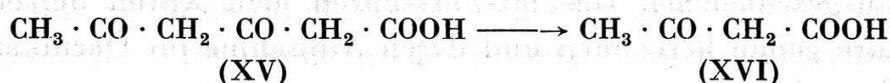
Fett g/kg/die	Deuterio-Säuren					
		verfüttert		ausgeschieden		
		mg/kg/die	Atom-%D	Atom-%D	Ausbeute	
				roh	rein	
0	Adipinsäure	108	11,8	11,9	28,0	20,0
1,46	Adipinsäure	109	12,0	12,0	50,9	33,5
1,47	Korksäure	74	7,6	7,7	69,4	59,0
1,74	Korksäure	44	7,6	7,4	70,1	45,0
1,67	Sebacinsäure	125	3,7	3,7	17,2	8,3

den signierten Verbindungen schließen, die Fettsäureoxydation verlaufe im Tierkörper praktisch nicht ω -oxydativ, d. h. nicht über höhere Dicarbonsäuren als Intermediärprodukte.

Es war im Hinblick auf die wiederholten Versuche, für den Fettsäureabbau andere als β -oxydative Vorgänge verantwortlich zu machen, bedeutungsvoll, die β -Oxydation natürlicher Fettsäuren, also nicht von Fettsäure-Derivaten, unter physiologischen Bedingungen zu beweisen. *Schoenheimer* und *Rittenberg* (39) fanden nach Gaben deuterierter *Stearinsäure* an Mäuse nach Ablauf einiger Tage in den Körperfetten D-haltige *Palmitinsäure*. Wir hydrierten die im Rapsöl reichlich vorhandene *Erucasäure*, welche in Stellung 13, 14- eine Doppelbindung aufweist, mit schwerem Wasserstoff zu *Deuterio-Behensäure* und fütterten deren Äthylester während einigen Tagen in kleinen Dosen an Ratten. Die Aufarbeitung der Gesamt-Fettsäuren der Tiere führte zur Auffindung von D-haltiger *Stearin-, Öl-, Palmitin- und Myristinsäure*; der β -oxydativ erfolgende Abbau der C-Kette



ist damit auch für die natürlichen Fettsäuren bewiesen (40). Ob er weiter über die niederen Homologen, die bekanntlich im tierischen Depot- und Organfett nicht anzutreffen sind, in analoger Weise verläuft, ist nicht sicher. Es wird neuerdings angenommen, daß sich Polyketosäuren bilden, die anschließend unter alternierender Abspaltung von C_2 -Bruchstücken zerfallen. Die Tatsache, daß niedrige Fettsäuren wie *Caprin-, Capryl-, Capron- und Buttersäure* nicht zur Ablagerung gelangen, schließt ihre Entstehung nicht aus und die Beobachtung von *Breusch* (41), daß β, δ -*Diketo-capronsäure* (XV) durch Lebergewebe leicht zu *Acetessigsäure* (XVI) abgebaut wird:



zwingt nicht zur Annahme der generellen Bildung von Polyketosäuren und ihrer Oxydation über das C_2 -Bruchstück zu *Acetessigsäure*.

Wir dürfen den β -oxydativen Abbau höherer Fettsäuren unter sukzessiver Abspaltung eines C_2 -Bruchstückes und Entstehung einer um 2 C-Atome kürzeren Fettsäure als gesichert betrachten. Ob er bis zur völligen Oxydation der C-Kette analog verläuft, steht nicht fest, vielleicht treten mit zunehmender Verkürzung letzterer im Sinne von *Breusch* Polyketosäuren auf, welche alternierend in C_2 -Bruchstücke zerfallen. Hier sind weitere Forschungen notwendig.

Auch zur Aufklärung der Vorgänge, welche zur endgültigen Oxydation des C₂-Bruchstückes oder der Acetessigsäure zu CO₂ und H₂O über den *Tricarbonsäurezyklus* führen, hat die Isotopentechnik in entscheidender Weise beigetragen.

9. Zur Fettresorption

Die Ausnützung eines Fettes im Darmkanal wird allgemein so ermittelt, daß man nach bekannten Fettgaben den Lipidgehalt der Faeces bestimmt und diesen Anteil als nicht resorbiertes Fett bezeichnet. Aus einer Reihe von Beobachtungen folgt indessen, daß die Fettsäure-Zusammensetzung der Faeceslipide offenbar mit derjenigen des Nahrungsfettes nicht identisch ist. Deutlich beeinträchtigt wird die Resorption eines Fettes durch seinen Gehalt an *höheren gesättigten Fettsäuren*. Angaben über das diesbezügliche Verhalten der Stearin- oder Arachinsäure beschränken sich aber nur auf ermittelte Gesamt-Lipidgehalte der Faeces, die einzelnen Komponenten wurden nicht isoliert, so daß über die Resorption der genannten Verbindungen in quantitativer Beziehung keine Klarheit herrscht. Es erschienen uns daher Untersuchungen solcher Verhältnisse nicht zuletzt auch im Hinblick auf die praktische Bedeutung des Problems für wünschenswert. Wir fütterten Ratten, die sich für eine Übertragung der Resultate auf die Vorgänge beim Menschen in diesem Falle als gute Versuchstiere erweisen, Behensäureäthylester mit Olivenöl der Nahrung beigemischt, um den Einfluß dieser 22 C-Atome aufweisenden Fettsäure auf die Fettresorption kennenzulernen. Die Isolierung der Behensäure aus kleinen Mengen Faeceslipiden wäre indessen umständlich und quantitativ kaum durchführbar gewesen. Wir nahmen daher Zuflucht zur Isotopentechnik und benützten eine signierte Behensäure. Dadurch konnten wir, nach Bestimmung des D-Gehaltes der mit den Faeces ausgeschiedenen Gesamt-Fettsäuren, den Anteil derselben an Behensäure genau berechnen und deren Aufnahme im Darmkanal einwandfrei ermitteln.

Wir fanden, daß Behensäureäthylester in Mengen von 4,9 bzw. 5,3 g pro kg/die verabreicht zu 40% resorbiert wurde. Gemische mit Olivenöl im Verhältnis von 1,4:1 oder 1:1 erfuhren eine Ausnützung im Ausmaße von 35 und 37%. Die Beteiligung anderer Fettsäuren an den Faeceslipiden nahm in dem Ausmaße zu, als der Gehalt der Nahrung an Olivenöl, also Fett, größer wurde. Die Ausnützung eines Nahrungsfettes wurde durch eine höhere gesättigte Fettsäure als Komponente insofern beeinflußt, als letztere, teilweise zur Ausscheidung gelangend, die gleichzeitige Exkretion anderer, sonst leicht resorbierbarer Fettsäuren bedingt. Die

Verwendung von Deuterio-Behensäure hatte diese Feststellungen sehr vereinfacht.

Die selektive Exkretion höherer gesättigter Fettsäuren konnten wir auch in Versuchen am *Gallenfistelhund* beobachten (43). Nach Gaben eines durch Hydrierung mit schwerem Wasserstoff gewonnenen, also hauptsächlich in der Stearinsäure markierten Fettes an einen Hund mit gut funktionierender Gallenfistel, fanden wir in den Lipiden der völlig acholischen Faeces, Fettsäuren mit höheren D-Gehalten als im Nahrungsfett. Das Tier erhielt in zwei Versuchen 1,3 und 1,4 g Fett pro kg/die, welches zu etwa 70% resorbiert wurde.

Schoenheimer u. Mitarb. (44) hatten nach Verabreichung eines gleichfalls durch Deuterierung gewonnenen signierten Fettes an *Gallenfistelpatienten* in den Faeces Fettsäuren mit bedeutend niedrigerer D-Konzentration angetroffen. Aus diesen Befunden wurde geschlossen, die bei Abwesenheit der Galle stark vermehrt auftretenden Faeceslipide stammten nur zu einem geringen Teil aus dem Nahrungsfett, vielmehr in der Hauptsache aus in das Darmlumen sezerniertem *Depotfett*. Man wäre somit versucht anzunehmen, die Rolle der Galle bzw. der Gallensäuren bestünde in erster Linie in einer Verhinderung der Fettsekretion in den Darm und nicht in einer direkten Begünstigung der Resorption des Nahrungsfettes. Unsere Versuche am Gallenfistelhund, welche die bereits von *Munk* im Jahre 1890 erhobenen Befunde, daß auch in Abwesenheit der Galle 70% des Nahrungsfettes ausgenützt werden, bestätigten, ließen keine Rückschlüsse auf eine Sezernierung von Depotfett in das Darmlumen zu. Die Faeceslipide stellten modifiziertes Nahrungsfett dar. Eine Beteiligung der Galle an der Fettresorption im Sinne einer Verhinderung der Sezernierung von Depotfett in den Darm ist durch weitere Versuche sicherzustellen. Wenn auch die Verhältnisse beim Gallenfistelhund und beim Gallenfistelpatienten nicht die gleichen zu sein brauchen, scheint es uns, gestützt auf unsere eigenen Versuche, verfrüht, in den bei Abwesenheit der Galle immer wieder beobachteten Fettausscheidungen mit dem Kote etwas anderes als modifiziertes Nahrungsfett zu sehen.

10. Über die Herkunft der Lipide in Körperergüssen

Wir hatten Gelegenheit, den schweren Wasserstoff auch für klinisch-diagnostische Zwecke zu verwenden (45). Ein 45jähriger Kranker zeigte schwere Ergüsse, die eine regelmäßige Entlastung der Pleura- und Peritonäalhöhle notwendig machten, wobei milchig aussehende, stark fett haltige Punktate erhalten wurden. Es bot sich die Möglichkeit, diese Ausscheidungen während längerer Zeit chemisch zu untersuchen. Im Ver-

laufe von 127 Tagen erhielten wir 56 Pleura-Punktate (59 Liter) und 23 Ascites-Proben (65 Liter) mit ziemlich regelmäßigem Fettgehalt, der im Mittel pro 100 cm³ 1,416 bzw. 1,271 g betrug. Diese Ausscheidung von Lipiden war wenig abhängig von der Ernährung. Enthielten die Ergüsse Chylus oder stammte das Fett aus anderen Quellen? Nach Gaben einer bestimmten Menge deuterierten Fettes an den Kranken waren sowohl die Lipide aus den Pleura-Punktaten als diejenigen aus dem Ascites deuteriumhaltig. Damit war bewiesen, daß Nahrungsfett vorlag. Dieser Befund wurde ergänzt durch Verabreichung von Butterfett an den Patienten, das durch seinen Gehalt an Laurin- und Myristinsäure vom menschlichen und tierischen Depotfett deutlich verschieden ist. Diese beiden Komponenten waren in den Gesamt-Fettsäuren der Ergüsse etwa im selben Ausmaße vorhanden wie im Butterfett, während niedermolekulare Säuren wie Buttersäure und Capronsäure fehlten. Die chylöse Natur der Höhlenergüsse war damit eindeutig sichergestellt.

11. Anwendung der Isotopen-Verdünnungsmethode

Auch für analytische Zwecke kann die Isotopentechnik recht gute Dienste leisten. Quantitative Untersuchungen von biochemischem Material vielseitiger Zusammensetzung sind mit den üblichen Methoden oft schwierig durchzuführen. Beispielsweise ist die Analyse eines Fettgemisches, d. h. die exakte Ermittlung der Fettsäure-Zusammensetzung, sehr zeitraubend und nur bei genügend großen Mengen Ausgangsmaterial durchführbar.

Es interessierte uns die Frage, ob das *menschliche Knochenmark* auf Grund seines chemischen Aufbaues als ein Depotfett oder ein Organfett anzusprechen sei. Nach den Literaturangaben wäre, gestützt auf die angeführten hohen Phosphatidgehalte, letzteres der Fall gewesen. Wir sammelten von zahlreichen Leichen unmittelbar nach dem Tode Proben des *Fettmarkes*, wie es aus dem Diaphysen-Inhalt des Femurs erhältlich war, ferner Proben des *subcutanen*, *mesenterialen* und *Netz-Fettgewebes*. Unter anderem bestimmten wir in den Fettsäuren aus den gewonnenen Lipiden den *Stearinsäuregehalt* nach dem Verfahren der Isotopenverdünnung von *Rittenberg* (43). Zu diesem Behuf fügten wir einer gewogenen Menge des Fettsäuregemisches eine bestimmte Quantität Deuterio-Stearinsäure zu. Anschließend wurde methyliert und das Estergemisch fraktioniert destilliert, wobei wir uns lediglich auf die Gewinnung einer Probe reiner Stearinsäure und die Ermittlung ihres Deuteriumgehaltes zu beschränken brauchten. Aus der eingetretenen Isotopenverdünnung ließ sich nach der Gleichung

$$y = \left(\frac{c_0}{c} - 1 \right) x$$

- wobei x = Menge der zugefügten Stearinsäure
 c_0 = D-Gehalt der zugefügten Stearinsäure
 c = D-Gehalt der isolierten Stearinsäure
 y = Menge der im Gemisch ursprünglich vorhandenen Stearinsäure

bedeuten, der gesuchte Stearinsäuregehalt berechnen. Unsere Ergebnisse führten zur Schlußfolgerung, daß menschliches Knochenmarkfett auf Grund seines chemischen Aufbaues ein Depotfett darstellt und von den übrigen Depotfetten nicht unterschieden ist (44).

Zusammenfassung

Es wird eine Übersicht eigener Arbeiten auf dem Gebiete des intermediären Stoffwechsels unter Anwendung von Deuterium als Indikator gegeben. Der schwere Wasserstoff kann als Signierungsmittel auf breiter Basis verwendet werden.

Summary

A survey is given on the authors own research-work with respect to the intermediate metabolism with Deuterium as tracer element. Heavy Hydrogen as a label can be applied on a wide scale.

1. Urey, H. C., Brickwedde, H. G., und Murphy, G. M.: *Physiol. Rev. (Am.)* **39**, 164, 40, 1 (1932) usw. – 2. Barbour, H. G., und Hamilton, W. F.: *Amer. J. Physiol.* **69**, 654 (1924); *J. biol. Chem. (Am.)* **69**, 625 (1926). – 3. Vogt, E., und Hamilton, W. F.: *Amer. J. Physiol.* **113**, 135 (1935). – 4. Fenger-Eriksen, K., Krogh, A., und Ussing, H.: *Biochem. J. (Brit.)* **30**, 1264 (1936). – 5. Keston, A. S., Rittenberg, D., und Schoenheimer, R.: *J. biol. Chem. (Am.)* **122**, 227 (1937); Bernhard, K.: *Verh. Ver. Schweiz. Physiol. Jan.* 1941. – 6. Taylor, H. S., Swingle, W. W., Eyring, H., und Frost, A. A.: *J. Chem. Phys.* **1**, 751 (1933). – 7. Pacsu, E.: *J. amer. Chem. Soc.* **56**, 245 (1934). – 8. Hevesy, G. von, und Hofer, E.: *Z. physiol. Chem.* **225**, 28 (1933). – 9. Hevesy, G. von, und Hofer, E.: *Nature* **134**, 879 (1934). – 10. Bernhard, K.: *Z. physiol. Chem.* **267**, 91 (1940). – 11. Bernhard, K.: *Z. physiol. Chem.* **271**, 208 (1941). – 12. du Vigneaud, V., und Irish, O. J.: *J. biol. Chem. (Am.)* **122**, 349 (1937). – 13. Bernhard, K.: *Z. physiol. Chem.* **256**, 49 (1938). – 14. Bernhard, K., und Steinhauser, H.: *Z. physiol. Chem.* **273**, 31 (1942). – 15. Bloch, K., und Rittenberg, D.: *J. biol. Chem. (Am.)* **155**, 243 (1944); **159**, 45 (1945); Bloch, K.: *Physiol. Rev.* **27**, 574 (1947). – 16. Bernhard, K.: *Z. physiol. Chem.* **267**, 99 (1940). – 17. Bernhard, K., und Gressly, E.: *Helv. Chim. Acta* **24**, 83 (1940). – 18. Bernhard, K.: *Z. physiol. Chem.* **248**, 256 (1937). – 19. Dickens, F.: *Nature* **159**, 839 (1947). – 20. Bernhard, K.: *Z. physiol. Chem.* **258**, 96 (1939). – 21. Bernhard, K., und Caflisch-Weill, H.: *Helv. Chim. Acta* **28**, 1697 (1945). – 22. Bernhard, K., und Schoenheimer, R.: *J. biol. Chem. (Am.)* **133**, 713 (1940). – 23. Bernhard, K., und Bullet, F.: *Helv. Chim. Acta* **30**, 1784 (1947). – 24. Bernhard, K., Steinhauser, H., und Matthey, A.: *Helv. Chim. Acta* **27**, 1134 (1944). – 25. Bernhard, K., und Steinhauser, H.: *Helv. Chim. Acta* **27**, 207 (1944). – 26. Bernhard, K.: *Helv. Chim. Acta* **24**, 1094 (1941). – 27. Bernhard, K., und Albrecht, H.: *Helv. Chim. Acta* **31**, 977 (1948). – 28. Bernhard, K.: *Cold Spring Harbor Symposium* **13**, 26 (1948); Bernhard, K., und Albrecht, H.: *Helv. Chim. Acta* **31**, 2214 (1948). – 29. Günther, G., und Bonhoeffer, K. F.: *Z. physikal. Chem.* **183**, 1 (1939). – 30. Bernhard, K., und Schoenheimer, R.: *J. biol. Chem. (Am.)* **133**, 707 (1940); Bernhard, K., Steinhauser, H., und

Bullet, F.: Helv. Chim. Acta **25**, 1313 (1942). – 31. *Burr, G. O.*, und *Burr, M. M.*: J. biol. Chem. (Am.) **82**, 345 (1929); **86**, 587 (1930) usw. – 32. Vgl. *Bullet, F.*: Zur Biologie der ungesättigten Fettsäuren. Diss. med., Zürich 1943; *Bernhard, K.*: Z. Vit.-, Hormon- u. Fermentforsch. **1**, 199 (1947). – 33. *Bernhard, K.*, und *Bodur, H.*: Helv. Chim. Acta **29**, 1782 (1946). – 34. *Guggenheim, M.*, und *Jürgens, R.*: Helv. Physiol. Acta **2**, 417 (1944). – 35. Vgl. *Bernhard, K.*, und *Lincke, H.*: F Schr. Chem. organ. Naturstoffe **4**, 188 (1945); *Breusch, F. L.*: Adv. Encymol. **8**, 343 (1948). – 36. *Verkade, P. E.*, und *van der Lee, J.*: Chem. Weekbl. **33**, 163 (1936); *Verkade, P. E.*: Bull. Soc. Chim. biol. **18**, 989 (1936); Fette und Seifen **46**, 521 (1939); J. Soc. Chem. a. Ind. **57**, 704 (1938). – 37. *Bernhard, K.*: Helv. Chim. Acta **24**, 1412 (1941). – 38. *Mazza, F. P.*: Arch. Sci. biol. (It.) **22**, 307 (1936). – 39. *Schoenheimer, R.*, und *Rittenberg, D.*: J. biol. Chem. (Am.) **120**, 155 (1937). – 40. *Bernhard, K.*, und *Vischer, E.*: Helv. Chim. Acta **29**, 929 (1946). – 41. *Breusch, F. L.*, und *Ulusoy, E.*: Arch. Biochem. **14**, 183 (1947). – 42. *Bernhard, K.*, Helv. Physiol. Acta **6**, 826 (1948). – 43. *Bernhard, K.*, *Schlöpfer, E.*, und *Wilk, S.*: Helv. Physiol. Acta **7**, 189 (1949). – 44. *Shapiro, A.*, *Koster, H.*, *Rittenberg, D.*, und *Schoenheimer, R.*: Amer. J. Physiol. **117**, 525 (1936). – 45. *Bernhard, K.*, und *Bodur, H.*: Helv. Physiol. Acta **6**, 68 (1948); *Bubb, W.*: Gastroenterologia **74**, 42 (1948). – 46. *Rittenberg, D.*, und *Foster, G. L.*: J. biol. Chem. (Am.) **133**, 737 (1940). – 47. *Bernhard, K.*, und *Korrodi, H.*: Helv. Chim. Acta **30**, 1786 (1947).