

40. Über die Umwandlung von Glycerin in Glykogen bei normalen und Alloxan-diabetischen Ratten¹⁾

von Karl Bernhard und Heribert Wagner.

(14. XII. 51.)

Glycerin gehört als Komponente der Fette zu den natürlichen Nahrungsbestandteilen und mit Phosphorsäure verestert zu den Intermediärprodukten des Kohlehydratstoffwechsels.

Für sein Schicksal im Tierkörper haben sich bereits frühzeitig *Weiss*²⁾, *Luchsinger*³⁾ und *Munk*⁴⁾ interessiert. Aber auch neuere Untersuchungen führten nur zu geringen Informationen über das Stoffwechselverhalten dieser Verbindung. Grössere Mengen davon werden nicht ohne Störungen ertragen und subkutane Injektion selbst geringer Dosen führen zu Hämaturie.

Nachdem die Isotopentechnik uns erlaubt, auch kleine Bruchstücke hinsichtlich ihrer Beteiligung an den chemischen Umsetzungen der Zelle zu prüfen und es offenbar kleine Bausteine sind, welche der Organismus bevorzugt für seine synthetischen Leistungen verwendet und andererseits aus grösseren Einheiten durch Abbau gewinnt, versuchten wir eine Signierung des Glycerins in der Absicht, das Verhalten dieser Verbindung in vivo verfolgen zu können.

Die Gewinnung eines Glycerin-1-C¹⁴ hat ganz kürzlich *Doerschuk*⁵⁾ beschrieben. Wir haben ein im mittleren C-Atom signiertes Glycerin dargestellt und werden später über biologische Versuche mit dieser Verbindung berichten. Vorerst wollen wir indessen Untersuchungen über Glykogenbildung aus Glycerin unter Verwendung eines D-signierten Trioxypropans mitteilen.

Ein Austausch des C-gebundenen Wasserstoffes im Glycerin gegen Deuterium etwa durch Erwärmen in schwerem Wasser unter Druck und in Gegenwart eines Katalysators findet offenbar nicht leicht statt. Vor einigen Monaten haben *Favarger*, *Cherbuliez* & *Collet*⁶⁾ durch Reduktion von Dioxyceton mit Natriumamalgam in schwerem Wasser Deuterio-Glycerin mit einem Gehalt von 11—12 Atom-% D erhalten. Die Ausbeute scheint dabei 30% kaum zu übersteigen.

¹⁾ Teilweise vorgetragen anlässlich des Einführungskurses über die Anwendung der Isotopen in Physiologie und Pharmakologie der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Frankfurt a/M. am 4. Oktober 1951.

²⁾ *N. Weiss*, Sitzungsberichte der Wiener Akademie, Math. naturw. Klasse **67**, 5 (1873).

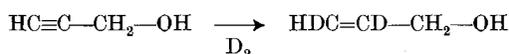
³⁾ *Luchsinger*, Diss. Med. Zürich, 1877.

⁴⁾ *I. Munk*, Virchow's Arch. **76**, 119 (1879).

⁵⁾ *A. P. Doerschuk*, Am. Soc. **73**, 821 (1951); J. Biol. Chem. **193**, 39 (1951).

⁶⁾ *P. Favarger*, *R. A. Collet* & *E. Cherbuliez*, Helv. **34**, 1641 (1951).

Im Propargylalkohol fanden wir ein geeignetes Ausgangsmaterial. Durch Hydrierung erhält man daraus Allylalkohol:



Da jedoch auch unter Verwendung partiell vergifteter Katalysatoren die Wasserstoffaufnahme unverändert weitergeht, entstehen Nebenprodukte, welche die Ausbeute beeinträchtigen. Aus dem deuterierten Allylalkohol gelangten wir durch Hydroxylierung mit Wasserstoffperoxyd und Osmiumtetroxyd als Katalysator zu einem 18,8 Atom-% D enthaltenden Glycerin. Damit war eine geeignete D-Signierung dieser Verbindung erreicht.

Die Möglichkeit der Beteiligung des Glycerins am Aufbau des Glykogens wurde von *Munk*¹⁾ verneint. Andere Autoren²⁾, z. B. *Catron* und *Lewis*³⁾, bestimmten es in der Leber von Ratten, welche nach vorangegangenem Hunger nur Glycerin bekamen. Die starken Schwankungen, die der Leberglykogengehalt stets aufweist und die zahlreichen nicht übersehbaren Faktoren, die ihn zu beeinflussen vermögen, lassen solche bilanzmässigen Versuche für die Herbeiführung einer sicheren Entscheidung ungeeignet erscheinen. Der Beweis der Glykogensynthese aus Glycerin konnte nur mit Hilfe der Isotopensignierung erbracht werden.

Wir haben an gut ernährte normale Ratten in Abständen von wenigen Stunden kleine Mengen Deuterio-Glycerin mit einem normalen Futter verabreicht, aus der Leber das Glykogen isoliert und auf seinen D-Gehalt geprüft. Dieser war, wie aus der Tab. 1 hervorgeht, nur unerheblich. Der leicht und rasch resorbierbare 3wertige Alkohol wurde nicht zur Bildung von Glykogen benötigt, dessen mengenmässiges Vorkommen in der Leber der gleichartig gefütterten Tiere recht verschieden war.

Tabelle 1.

Fütterung von Deuterio-Glycerin (18,8 Atom-% D) an normal ernährte Ratten.

Tier Nr.	A	B	C	D	E
mg Leberglykogen	254	127	320	162	867
% Leberglykogen	2,68	1,32	2,98	1,71	7,49
Atom % D im Leberglykogen .	0,03	0,07	0,58	0,02	0,02

Gingen wir indessen bei unseren Versuchen von Ratten aus, welche 48 Std. gehungert hatten und die dann zusammen mit Normalfutter 0,6 g signiertes Glycerin erhielten, so konnte in allen Fällen

¹⁾ *I. Munk*, *Virchow's Arch.* **76**, 119 (1879).

²⁾ Vgl. *E. F. W. Pflüger*, *Das Glykogen und seine Beziehungen zur Zuckerkrankheit*, Bonn 1905.

³⁾ *L. F. Catron & H. B. Lewis*, *J. Biol. Chem.* **84**, 553 (1929).

D-haltiges Glykogen nachgewiesen werden (vgl. Tab. 2). Aus den vereinigten Lebern wurden die Lipide extrahiert. Ihr D-Gehalt betrug 0,23 Atom-%, derjenige der daraus gewonnenen Fettsäuren nur 0,02 Atom-%. Das Glycerin wurde somit auch zur Veresterung von Fettsäuren verwendet, ein Vorgang, der sich bei der Resorption oder in der Leber selbst abspielen dürfte.

Tabelle 2.

Fütterung von Deuterio-Glycerin (18,8 Atom-% D) an hungernde Ratten bei gleichzeitigen Gaben von Normalfutter.
Leberglykogen.

Tier Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
mg . . .	173	136	172	124	256	133	150	202	162	241
% . . .	2,33	2,51	2,92	2,10	3,93	2,63	2,68	3,34	3,24	3,95
At.-% D.	2,47	2,06	1,71	2,44	1,70	3,01	1,81	2,52	1,78	1,61

Glycerin ist demnach ein Intermediärprodukt der Glykogenbildung. Auf Grund des D-Gehaltes des Leberglykogens ist es indessen nicht möglich, zu quantitativen Aussagen über das Ausmass der Verwendung des verfütterten Glycerins zur Synthese der tierischen Stärke zu gelangen. Wir haben nicht ausschliesslich Glycerin verfüttert, sondern dieses nur in einer kleinen Menge einem normalen Futter beigemischt, das in der Hauptsache aus Kohlehydraten bestand. Damit blieben wir im Rahmen natürlicher, d. h. biologischer Bedingungen. Es soll indessen später über die Glykogen-Bildung bei alleiniger Glycerin-Fütterung nach einer Hungerperiode berichtet werden.

Bei Zuckerkranken ist nach klinischen Auffassungen die Fähigkeit des Aufbaues von Glykogen aus Glucose gestört. Wir haben an Alloxan-diabetischen Ratten zu prüfen versucht, ob die gezeigte Glykogensynthese aus Glycerin ausbleibe und die oben erwähnten Versuche an solchen Tieren wiederholt. Dabei fanden wir in den Lebern aller Ratten (vgl. Tab. 3) deuteriumhaltiges Glykogen, was uns zur Annahme berechtigt, die Ausnützung des Trioxypropans zur Bildung tierischer Stärke sei bei der diabetogenen Erkrankung nicht gestört. Der Futtermittelverzehr war bei diesen Tieren im Vergleich zu den gesunden Ratten stark gesteigert und betrug rund das dreifache, daher müsste sich auch die Verdünnung des „Glycerin-Glykogens“ durch aus den Kohlehydraten der Nahrung gebildete tierische Stärke intensiver auswirken. Trotz der reichlichen Kohlehydratversorgung wird aus dem verabreichten Glycerin Glykogen gebildet.

Nach *Stetten & Boxer*¹⁾ ist bei Alloxan-diabetischen Ratten die Fettbildung stark herabgesetzt; etwa zwei Drittel der mit dem Harn ausgeschiedenen Glucose stammen aus der Nahrung, ein Drittel aus dem Stoffwechsel. Die Glucose-Synthese überstieg auf Grund von Ver-

¹⁾ *D. Stetten & G. E. Boxer, J. Biol. Chem. 156. 271 (1944).*

Tabelle 3.

Fütterung von Deuterio-Glycerin (18,8 Atom-% D) an hungernde Alloxan-diabetische Ratten bei gleichzeitigen Gaben von Normalfutter.

Tier Nr.	Leberglykogen			Ausgeschiedene Glucose in g
	mg	%	Atom-% D	
1	91	1,26	0,72	4,92
2	32	0,39	1,27	0,49
3	383	3,70	1,30	2,28
4	436	4,10	1,18	1,15
5	171	1,58	1,60	3,36
6	166	1,81	2,00	9,10
7	167	1,90	2,21	7,05
8	154	1,40	1,96	7,08
9	210	2,60	2,60	2,92
10	93	0,82	2,51	5,97
11	298	3,50	1,30	0,98
12	295	3,00	1,15	4,10

suchen mit einem in allen C-Atomen signierten Zucker um einen Viertel das bei normalen Tieren festgestellte Ausmass, während der Glucose-Abbau um die Hälfte hinter den üblichen Werten zurückblieb¹⁾. Unsere Beobachtungen über die Glykogen-Bildung aus Glycerin bei Alloxan-diabetischen Tieren weisen gleichfalls im Sinne der Befunde *Stetten's* auf eine gesteigerte Kohlehydrat-Synthese bei der Zuckerkrankheit hin.

Experimentelles.

Herstellung von D-Glycerin.

1. *Versuche über den Austausch der C-gebundenen Wasserstoffatome in Glycerin.* 50 g Glycerin und 100 g schweres Wasser (50 Atom-% D) wurden mit einem Platinkatalysator nach *Adams* in einem Schüttelautoklaven 14 Tage ununterbrochen auf 130° erhitzt. Das so behandelte Glycerin enthielt 1,64 Atom-% D. Wir erwärmten es zur Entfernung des labilgebundenen Wasserstoffes (Hydroxylwasserstoff) während 10 Std. mit 400 cm³ Wasser auf Rückfluss. Hierauf ging der D-Gehalt auf 1,28% zurück. Es darf somit angenommen werden, dass im Glycerin der an die C-Atome gebundene Wasserstoff unter biologischen Bedingungen nicht austauscht.

2. *Hydrierung von Propargylalkohol mit D₂.* Zu 20 g reinem Propargylalkohol in 150 cm³ Methanol fügten wir 3 g *Raney-Nickel* (W₄) zu und hydrierten mit Deuteriumgas bis zur Aufnahme der berechneten Menge D₂ (für 1 Mol Propargylalkohol 1 Mol). Dauer 3–8 Std. Hierauf trennten wir den Katalyten ab und entfernten das Lösungsmittel durch Destillation über eine *Widmer-Kolonne*. Das hydrierte Produkt behandelten wir unter Eiskühlung mit 36 cm³ 30-proz. Wasserstoffperoxyd und 7,5 mg Osmiumtetroxyd und liessen es 2–3 Tage im Eisschrank bis zum Verschwinden des Allylalkohol-Geruches stehen. Das überschüssige Wasserstoffperoxyd zersetzten wir mit 0,5 g Braunstein, wobei die Temperatur 0° nicht überstieg. Aus der mit 300 cm³ Wasser verdünnten und filtrierten Lösung eliminierten wir als Nebenprodukte gebildete organische Säuren durch Adsorption an Amberlite IR 4B.

Nach Einengung der Lösung des Glycerins im Vakuum nahmen wir den Rückstand mit absolutem Alkohol auf und entfernten diesen wieder im Vakuum. Zwecks weiterer Entwässerung erwärmten wir das Glycerin 4 Std. auf 100° im Vakuum der Wasserstrahl-

¹⁾ *D. Stetten, I. D. Welt, D. J. Ingle & E. H. Morley, J. Biol. Chem.* **192**, 817 (1951).

pumpe. Wir erhielten durch Hochvakuumdestillation, z. B. 10,2 g reines Glycerin vom Sdp. 122°/0,01 mm (Ausbeute 30%).

Eine Probe wurde acetyliert. Im reinen Triacetin fanden wir 10,71 Atom-% D; das Glycerin enthielt somit 18,8 Atom-% D.

4,411 mg Subst. gaben 8,02 mg CO₂ und 2,55 mg H₂O
C₉H₁₄O₆ (218) Ber. C 49,54 H 6,47% Gef. C 49,80 H 6,47%

Fütterungsversuche mit D-Glycerin.

Die verwendeten weissen männlichen Ratten von 250—300 g befanden sich in Stoffwechsellkäufigen und erhielten ad libitum Trinkwasser.

Nach subkutaner Injektion von 2 cm³ Glycerin trat nach 3—4 Std. Hämaturie auf, die nach etwa 24 Std. abklang. Nach subkutaner Injektion von 2 cm³ Triacetin gingen die Ratten nach etwa 30 Min. unter Lähmungserscheinungen der Extremitäten zugrunde. Wir haben deshalb das Glycerin mit der Schlundsonde verfüttert und den Tieren eine bekannte Menge Normalfutter verabreicht. Einmalige tägliche Dosen von 2 cm³ verursachten keine unliebsamen Erscheinungen. Bei Fortsetzung solcher Gaben während mehreren Tagen traten indessen Diarrhöen auf.

A. *Normal ernährte Ratten* erhielten je 500 mg der signierten Verbindung, worauf wir sie nach 4 Std. töteten und aus den Lebern nach Angaben von *Stetten* und Mitarb.¹⁾ das Glykogen isolierten. Körper- und Lebergewichte s. Tab. 4.

Tabelle 4.

Tier	A	B	C	D	E
Körpergewicht g	355	350	377	295	285
Lebergewicht g	9,5	9,6	10,7	9,5	11,7
Atom-% D im Körperwasser .		0,02		0,03	

B. *Gesunde Ratten* bekamen während 48 Std. kein Futter, sondern lediglich Trinkwasser. Die Glyceringaben, total 600 mg, erfolgten darauf in Abständen von 2 Std. in jeweiligen Mengen von 200 mg. Mit der ersten Glycerindosis erhielt jedes Tier 10 g Normalfutter, dessen Aufnahme kontrolliert wurde. Die Isolierung des Leberglykogens erfolgte 6 Std. nach Beginn der Fütterung, und zwar im Hinblick auf eine gleichzeitige Gewinnung der Leberlipide nach den Angaben von *Terriere & Butts*²⁾. Die diesbezüglichen Befunde ergeben sich aus der Tab. 5.

Tabelle 5.

Tier Nr.	Körpergewicht g	Lebergewicht g	Konsumiertes Futter g	Atom-% D im Körperwasser
1	185	7,4	10	0,03
2	182	5,8	10	0,02
3	187	5,8	10	0,03
4	196	5,9	10	0,04
5	182	6,5	10	0,04
6	173	5,1	6	0,06
7	167	5,6	9	0,01
8	164	6,0	9	0,05
9	161	5,0	7	0,04
10	178	6,1	4	0,04

¹⁾ D. *Stetten & G. E. Boxer*, J. Biol. Chem. **155**, 231 (1944).

²⁾ L. C. *Terriere & J. S. Butts*, J. Biol. Chem. **190**, 2 (1951).

Die vereinigten Leberlipide wogen 753 mg. Nach Bestimmung ihres D-Gehaltes gewannen wir durch Verseifung der Fettsäuren, welche wir gleichfalls auf ihren Gehalt an schwerem Wasserstoff prüften.

C) Bei 12 *Alloxan-diabetischen Ratten* bestimmten wir die Zuckerausscheidung und liessen die Tiere 48 Std. hungern. Dann verabreichten wir wieder mit der Schlundsonde dreimal in 2stündigen Abständen je 200 mg signiertes Glycerin. Mit jeder Glycerindosis erhielt jede Ratte 10 g Normalfutter, welches sehr rasch gefressen wurde. Aufarbeitung und Isolierung des Glykogens erfolgten wie beim vorangehenden Versuch. Körper- und Lebergewicht, Harnmenge und Glucosekonzentration, ferner D-Gehalt der Körperflüssigkeit, s. Tab. 6.

Tabelle 6.

Tier Nr.	Körpergewicht g	Lebergewicht g	Harn-Menge pro 24 Std. cm ³	Atom-% D im Körperwasser	% Glucose im Harn
1	264	7,2	54	0,03	9,1
2	267	8,2	25	0,03	2,0
3	345	10,3	42	0,01	5,4
4	342	9,6	31	0,02	3,7
5	350	10,8	38	0,04	6,2
6	340	9,2	100	0,05	9,1
7	290	8,8	78	0,05	9,0
8	340	11,0	70	0,02	10,1
9	290	8,1	53	0,05	5,5
10	330	10,5	64	0,05	9,3
11	290	8,6	49	0,04	2,0
12	300	9,7	50	0,04	8,2

SUMMARY.

1. Through the deuteration of propargylalcohol and hydroxylation of deuterioallyl alcohol, a deuterioglycerol with 18.8 atom-% D was prepared.

2. Healthy rats, after a 48-hour starving period were given a normal diet containing a small amount (total 600 mg) of D-glycerol after which a glycogen containing 1.6—3.01 atom-% D was extracted from the liver. Glycerol therefore was employed in the synthesis of animal starch.

3. Alloxan-diabetic rats also are able to produce glycogen from glycerol. With an abundant carbohydrate-rich diet all the rats showed, after a dose of 600 mg deuterioglycerol, a liver glycogen of 0.72—2.60 atom-% D. Diabetes often does not seem to affect this synthesis unfavourably.

4. The labelled glycerol has also been identified in the lipids of the liver.

Physiol.-chemisches Institut der Universität Basel.