

Die den einzelnen Protonen und dem Stickstoffkern des Cycl[3,2,2]azins zugeordneten Kopplungskonstanten sind im Schema S. 2264 zusammengefasst.

Wir danken Herrn Prof. V. BOEKELHEIDE für die uns zur Verfügung gestellte Probe von Cycl[3,2,2]azin. Ausserdem möchten wir Herrn Dr. I. BERNAL für die Mitteilung seiner Resultate und Herrn R. SITTERS für die Mithilfe bei den Messungen unseren Dank aussprechen.

Die vorliegende Arbeit wurde vom SCHWEIZ. NATIONALFONDS (Projekt 2766) sowie von der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, unterstützt.

SUMMARY

The electron spin resonance spectrum of the mononegative radical ion of cycl-[3,2,2]azine has been measured under conditions in which ionic association is negligible. Some of the apparent degeneracies observed previously were due to overlapping of lines and have been removed by improving the resolution.

The anion of 1,4-dideutero-cycl[3,2,2]azine has also been investigated. Its hyperfine structure confirms the theoretical assignment of the 1,4 proton coupling constant.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich und
Laboratorium voor Fysische Chemie der
Universiteit van Amsterdam

252. Lipide des Zentralnervensystems bei Wirbeltieren und einigen Wirbellosen

von C. G. Honegger und T. A. Freyvogel

(24. VIII. 63)

I. Einleitung. - Es ist bekannt, dass die experimentelle Demyelinisierung (EAE) mit Nervengewebe und FREUND'schem Adjuvans bei Säugern und Vögeln gelingt, dass sie hingegen bei Schlangen und anderen Poikilothermen nicht zustande kommt¹⁾. Es stellt sich die Frage, ob zwischen dieser Erscheinung und der Zusammensetzung der Lipide im Zentralnervensystem eine Korrelation gefunden werden kann, da ein EAE auslösender Faktor in der besonders lipidreichen Myelinscheide lokalisiert ist. Wir untersuchten deshalb mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie die Lipide verschiedener Wirbeltiere, bei welchen eine Myelinscheide durchwegs vorhanden ist²⁾ (bei *Cyclostomata* allerdings ist eine solche nur bei den Kolossalfasern bekannt), und im Vergleich dazu die Lipide einiger Wirbellosen, bei welchen eine eigentliche Myelin-

1) E. C. ALVORD, in Allergic Encephalomyelitis, ed. by M. W. KIES & E. C. ALVORD, p. 220, Thomas Publ. 1959.

2) S. R. CAJAL, Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés, Band I, p. 276, Instituto Roman y Cajal, Madrid 1955.

scheide nicht nachgewiesen wurde³⁾ (wenngleich besonders bei Anneliden Myelinscheiden-ähnliche Strukturen mehrfach beschrieben sind⁴⁾).

II. Material und Methodé. - Zur Untersuchung dienten ganze Gehirne von weissen Mäusen (Ma), jungen Leghorn-Hühnern (Hu), Sandrennattern (*Psammophis sibilans*) (Ps) oder Juravipern (*Vipera aspis*) (Vi), Fröschen (*Rana esculenta*) (Fr) und Forellen (Fi); bei den Wirbellosen Ober- und Unterschlundganglion mit anhaftenden Teilen der Ganglienketten von Kakerlaken (*Psephenus americana*) (Ka), Hummern (Hm) sowie der Weinbergschnecke (Schn). Das Zentralnervensystem wurde trocken präpariert; Mäuse und Kakerlaken wurden zuvor mit Äther narkotisiert; Hummer und Schnecken wurden in Kältestarre seziert; die übrigen Tiere wurden dekapitiert.

Das frische, in 2 Serien gewonnene Material wurde sogleich mit Chloroform:Methanol (2:1), wie bereits beschrieben⁵⁾, extrahiert und Teile der erhaltenen Lösungen auf Kieselgel G-Platten (MERCK) aufgetragen, bei Kammersättigung aufgetrennt und angefärbt. Als Laufmittel wurden Chloroform:Methanol:H₂O = 65:25:4 (Laufmittel 1), Chloroform:Methanol:2,5 N NH₃ = 60:35:8⁶⁾ (Laufmittel 2) (Auftrennung von Gangliosiden), Chloroform:Methanol = 4:1 (Laufmittel 3) (Auftrennung von Cerebrosiden) und Chloroform (Laufmittel 4) verwendet. Die Anfärbung der Ganglioside gelang mit Resorcin⁶⁾. Die gelbgrünliche Untergrundfärbung nach der Farbentwicklung mit Phosphormolybdänsäure wurde durch NH₃-Dämpfe entfernt⁷⁾. Weitere Angaben siehe ⁵⁾. Für die Bestimmung von Cholesterin nach HUANG *et al.*⁸⁾ wurden Chloroform-Methanol-Extrakte und für die Wasserbestimmung nach BRANTE⁹⁾ Frischgewebe verwendet.

III. Resultate. - Der Wassergehalt des Zentralnervensystems hält sich bei allen untersuchten Tieren in verhältnismässig engen Grenzen, wie aus der folgenden Aufstellung hervorgeht. Ein Vergleich mit den Werten von ELDREDGE *et al.*¹⁰⁾ zeigt eine gute Übereinstimmung.

Wasser- und Cholesteringehalt des untersuchten Materials in g/100 g Frischgewebe

| Gehirngewebe | Wassergehalt | | | Cholesteringehalt | |
|-------------------|--------------|---------------------|---------|-------------------|--|
| | | Lit. ¹⁰⁾ | Serie I | Serie II | |
| Maus | 77,2 | 79 | 1,79 | 1,6 | |
| Huhn | 80,8 | 80 | 1,53 | 1,6 | |
| <i>Psammophis</i> | | | 3,65 | 2,54 | |
| Schlange | | 80 | | | |
| Viper | 76,0 | | 1,55 | | |
| Frosch | | 85 | 1,31 | | |
| Forelle | 80,1 | 80 | 2,06 | 1,39 | |
| Krabbe | | 83 | | | |
| Kakerlake | | | 0,38 | | |
| Schnecke | 83,5 | | 0,32 | | |

Bei der Besprechung der Dünnschichtchromatogramme (Fig. 1-4) ordnen wir den einzelnen Flecken oder Flecken-Gruppen die Buchstaben A-I zu. Es lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, welche chemischen Substanzen den verwendeten Buchstaben entsprechen; auf Grund von Ver-

³⁾ C. U. A. KAPPERS, G. C. HUBER & E. C. CROSBY, The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates including man, Vol. I, p. 9, Hafner Publ. Company 1960.

⁴⁾ B. HANSTRÖM, Vergleichende Anatomie des Nervensystems der wirbellosen Tiere, p. 257, Springer-Verlag 1928; R. HESSE & F. DOFLEIN, Tierbau und Tierleben, Band I, p. 673, Gustav Fischer 1935.

⁵⁾ C. G. HONEGGER, *Helv.* 45, 281, 2020 (1962).

⁶⁾ J. R. WHERETT & J. N. CUMINGS, *Biochem. J.* 86, 378 (1963).

⁷⁾ H. JORK, *Deutsch. Apotheker-Ztg.* 102, 1263 (1962).

⁸⁾ T. C. HUANG, C. P. CHEN, V. WEFLE & A. RATTERY, *Analyt. Chemistry* 33, 1405 (1961).

⁹⁾ G. BRANTE, *Acta physiol. scand.* 78, Suppl. 63 (1949).

¹⁰⁾ N. T. ELDREDGE, G. READ & W. CUTTING, *Med. exp.* 8, 265 (1963).

gleichssubstanzen und von Erfahrungen aus früheren Arbeiten⁵⁾ dürfte folgendes gelten: A = Ganglioside, B = Sphingomyeline, C = Lecithine, D = Sulfatide, E = Kephaline und Acetalphosphatide, F = Cerebroside, G = freie Fettsäuren, H = Cholesterin, I = Cholesterinester und Neutralfette. Die für A, B und E angegebenen Stoffgruppen dürften noch weitere, zur Zeit nicht näher erfassbare Substanzen enthalten.

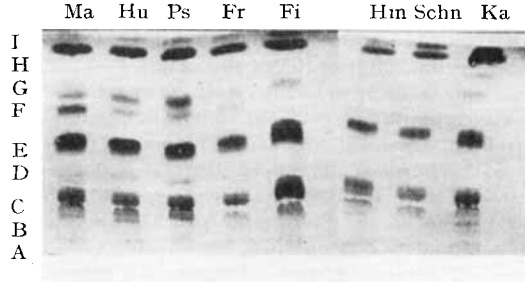


Fig. 1. Dünnschichtchromatogramme und Bezeichnung der aufgetrennten Flecke im Laufmittel 1
Anfärbung: Phosphormolybdänsäure; aufgetrennte Lipidextrakte Ma-Fi je 30 mm³, Ka-Schn je 100 mm³

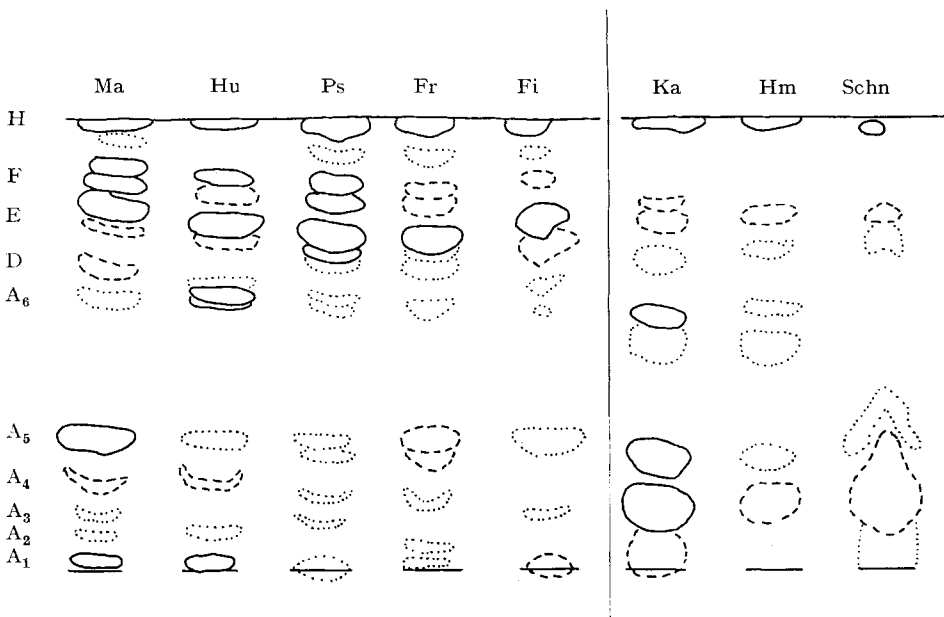


Fig. 2. Dünnschichtchromatogramme und Bezeichnung der aufgetrennten Flecke im Laufmittel 2
Anfärbung: Orcin; aufgetrennte Lipidextrakte Ma-Fi je 100 mm³, Ka-Schn je 200 mm³

Zum Vergleich der Resultate mit den verschiedenen Tierarten wird jeweils auf die Lipidverteilung der *Maus* bezogen. Die Flecke A–H in Fig. 1 (Laufmittel 1) sind bei ihr normalerweise in charakteristischer Intensität vorhanden. I fehlt bei gesunden Tieren, wenigstens im untersuchten Konzentrationsbereich. Beim *Huhn* stellt man bei Gruppe F eine Umkehr der Intensität fest G erscheint vermindert. Für die *Psammophilis* gilt im Bereich F dasselbe in erhöhtem Mass, für die *Viper* allerdings nicht; überdies tritt D stärker in Erscheinung. Beim *Frosch* sind B, D und F schwächer. Der *Fisch* zeigt einerseits eine starke Erhöhung der Intensität, andererseits eine Ver-

mehrung der Fleckenzahl in den Bereichen C und E. Besonders fällt hier auch I auf. Für alle untersuchten Wirbellosen scheint das Fehlen von D und F charakteristisch. Bei der *Kakerlake* lässt sich zusätzlich eine starke Intensitätssteigerung von I und in schwächerem Masse auch von G beobachten. Beim *Hummer* erscheint im Vergleich zur Maus E vermindert. Dasselbe lässt sich für die *Schnecke* aussagen; bei ihr tritt eine Substanzverminderung im Bereiche B und eine Vermehrung im Bereich von I auf.

Nach der Auftrennung im Laufmittel 2 lassen sich mit Resorcin Substanzen in für Ganglioside typischer blauvioletter Färbung bei *Maus*, *Huhn* und in etwas vermindertem Mass bei der *Schlange* (*Psammophis*) nachweisen, während sie bei *Frosch* und *Forelle* nur mehr in Spuren sichtbar werden¹¹⁾. Bei *Hummer* und *Schnecke* werden zwar Stoffe im selben Chromatogramm-Bereich angefärbt; dies jedoch in atypischer Weise (gelblich), so dass es hier fraglich erscheint, ob man es mit Gangliosiden zu tun hat. Mit dem unspezifischeren Färbemittel *Orcin* (Laufmittel 2) lässt sich abgesehen von Gangliosiden, Cerebrosiden und Sulphatiden eine Reihe weiterer, noch unbekannter Substanzen nachweisen (siehe Fig. 2). In allen Extrakten treten im Bereiche E Substanzen gelblichbrauner Färbung auf. Im Bereich der Substanzgruppe A (Ganglioside) lassen sich 5 Flecke A_1 – A_5 voneinander trennen. Flecke im Bereich A_1 – A_4 können aber von Substanzen hervorgerufen werden, welche zwar denselben Wanderungswert aufweisen, sich jedoch mit *Orcin* und Resorcin verschieden anfärben lassen. Besonders deutlich tritt dies in Extrakten von *Kakerlaken* in Erscheinung, etwas schwächer auch bei der *Schnecke*, und in noch geringerem Masse beim *Hummer*. A_5 , mit bezeichnend graublauer Tönung, kommt in kleinen Mengen auch in menschlichen Lipid-Extrakten vor. In wesentlich erhöhtem Masse trifft man diese Substanz bei *Maus* und *Kakerlake*, abgeschwächt auch bei *Frosch* und *Schnecke* an. Abgesehen von den Substanzen A_1 – A_5 , lässt sich mit *Orcin* noch ein weiterer Stoff A_6 nachweisen, allerdings im Wanderungsbereich der Sulphatide. A_6 erinnert in seiner Anfärbbarkeit stark an A_5 . A_6 fällt namentlich bei *Huhn* und *Kakerlake* auf.

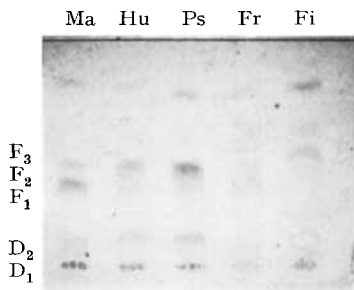


Fig. 3. *Dünnschichtchromatogramm und Bezeichnung der aufgetrennten Flecke im Laufmittel 3*
Anfärbung: *Orcin*; aufgetrennte Lipidextrakte Ma, Hu, Ps je 25 mm³, Fr-Fi je 50 mm³

Wie bei der Besprechung der Fig. 1 bereits erwähnt wurde, sticht nach der Trennung im Laufmittel 3 und Anfärbung mit *Orcin* im Vergleich zur Maus beim *Huhn*, und in noch vermehrtem Mass bei der *Schlange* (*Psammophis*), die Intensitätserhöhung von F_2 gegenüber F_1 hervor. Bei der *Schlange* (Ps) beobachtet man eine Intensitätssteigerung auch bei D_2 . Bei *Frosch* und *Fisch* tritt erstmals F_3 , ein bisher scheinbar noch unbekanntes Cerebrosid, auf. Bei der *Forelle* ist F_1 wesentlich vermindert, D_2 hingegen verstärkt.

Die weitere Auftrennung von Cholesterin, Cholesterinestern und Neutralfetten wurde im Laufmittel 4 Chloroform erreicht.

Der *Cholesteringehalt* (vgl. Tabelle) ist bei den Wirbeltieren etwa viermal so hoch wie bei den Wirbellosen. Da die Myelinscheide einen besonders hohen Cholesteringehalt aufweist, mag der

¹¹⁾ Herr Prof. Dr. W. KLENK, Vorsteher des Physiologisch-chemischen Instituts der Universität Köln, stellte uns in verdankenswerter Weise aus Menschenhirn gewonnene, gereinigte Ganglioside als Vergleichssubstanz zur Verfügung.

gefundene Unterschied mit dem Fehlen dieser Scheide zusammenhängen. Im übrigen sind sowohl von Tier zu Tier als auch innerhalb einzelner systematischer Gruppen z.T. beträchtliche Unterschiede zu beobachten. Diese Substanzgruppe I lässt sich im Laufmittel 4 in die Gruppen I₁ und I₂ auftrennen. Dabei dürfte es sich bei I₁ um *Neutralfette*, bei I₂ um *Cholesterinester* handeln. Letztere kommen in Spuren vor, wobei *Schlange (Psammophis)*, *Frosch*, *Forelle* und *Kakerlake* etwas höhere Konzentrationen aufweisen. *Neutralfette* (I₁) lassen sich mit Sicherheit bei *Forelle*, *Kakerlake* und *Schnecke* nachweisen, wobei sie bei Forelle und Kakerlake in verhältnismässig hohen Quantitäten vorhanden sind.

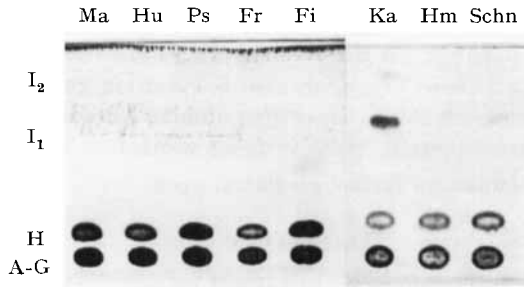


Fig. 4. *Dünnschichtchromatogramme und Bezeichnung der aufgetrennten Flecke im Laufmittel Chloroform*

Anfärbung: Phosphormolybdänsäure; aufgetrennte Lipidextrakte Ma-Fi je 50 mm³, Ka-Schn je 100 mm³

IV. Diskussion. - Die angeführten Untersuchungen fussen auf einem verhältnismässig geringen Material. Verallgemeinernde Schlüsse sind daher mit Vorsicht zu bewerten.

Beim Überblick der gegebenen Resultate fällt auf, dass bei verhältnismässig kleinen Unterschieden im Wassergehalt die Cerebroside und Sulfatide vom Säugetier zum Fisch abnehmen und dass sie bei Wirbellosen auch noch in 8facher Lipidextraktmenge fehlen. Da es sich um Stoffe handelt, die für die Myelinscheide als typisch angesehen werden, erstaunt ihre Abwesenheit bei den Wirbellosen ohne diese Scheide nicht. Diese Aussage steht im Gegensatz zu derjenigen von ASHURST¹²⁾, welche von der Möglichkeit spricht, die Lipocondrien der Neuronen bei *Periplaneta americana* enthielten Cerebroside. ASHURST arbeitete allerdings mit histochemischen Methoden, welche in dieser Hinsicht als nicht ganz spezifisch bezeichnet werden müssen. Andererseits wurde in unserer Arbeit das Vorhandensein von Bindegewebsmaterial in engstem Kontakt mit den Neuronen und Glia-Zellen¹³⁾ nicht berücksichtigt; durch eine Verdünnung des Nervenmaterials im engeren Sinne könnte uns die Anwesenheit in Spuren von Cerebrosiden entgangen sein. Immerhin dürfte feststehen, dass für die Cerebroside ein quantitativ bemerkenswert grosser Unterschied zwischen Wirbeltieren und Wirbellosen besteht. Die mengenmässigen Unterschiede der Cerebroside und Sulfatide innerhalb der Wirbeltiere könnten einerseits auf ein ungleiches Verhältnis von weisser und grauer Substanz zurückzuführen sein, andererseits aber auf eine qualitativ verschiedene Ausbildung der Myelinscheide bei den Wirbeltierordnungen hindeuten.

¹²⁾ DOREEN E. ASHURST, Quart. J. micr. Sci. 102, 399 (1961).

¹³⁾ A. HESS, J. biophys. biochem. Cytol. 4, 731 (1958).

In ähnlicher Weise beobachtet man auch eine fortlaufende Verminderung der Ganglioside von der Maus zur Forelle und weiter zu den Wirbellosen. Dafür treten bei den letzteren andere Substanzen auf. Es könnte sich dabei um andere Glykolipide oder eventuell um Mucopolysaccharide handeln, die in kleinen Mengen vom Menschen her bekannt sind¹⁴). In einer eben erschienenen Arbeit von ELDREDGE *et al.*¹⁰) wurde u. a. der Gangliosidgehalt im Zentralnervensystem verschiedener Tierarten (in mg% N-Acetylneuraminsäure) bestimmt. Auch diese Autoren fanden die höchsten Werte für Maus (64) und Huhn (59), eine Abnahme bei Schlange (32), Frosch (22), Fisch (37) und eine starke Verminderung bei der Krabbe (1).

Die eingangs aufgeworfene Frage, ob eine Korrelation zwischen dem Zustandekommen der experimentellen Demyelinisierung und der Zusammensetzung der Lipide des Zentralnervensystems besteht, muss verneint werden.

Frl. M. BERNHARDT danken wir für ihre geschickte experimentelle Mithilfe.

SUMMARY

1) The brains and nervous systems of various vertebrates and invertebrates have been examined for the presence of lipids.

2) Water and cholesterol have been determined quantitatively; the other lipids have been investigated semiquantitatively with the help of thin-layer chromatography.

3) Only slight differences are found in the water content.

4) The amount of cholesterol in vertebrates is approximately four times higher than in invertebrates.

5) In contrast to the vertebrates cerebrosides, sulphatides and also the common gangliosides were not found in invertebrates.

6) Correlation of the results obtained and the occurrence of a myelin sheath are discussed.

Forschungslaboratorien der
Neurologischen Universitätsklinik und des
Schweizerischen Tropeninstitutes, Basel,
Socinstrasse 55 und 57

¹⁴) G. BRANTE, in *Biochemistry of the Developing Nervous System*, ed. by H. WAELSCH, p. 153, Academic Press 1955.