

Neue Beiträge zur Chemie und Physiologie der konjugiert- ungesättigten Fettsäuren.

II. Mitteilung: Physiologisch-chemische und physiologische
Problemstellungen.

Von

K. L. Zirm und E. Schauenstein.

Aus dem Forschungslaboratorium der Lannacher Heilmittel G. m. b. H.,
Lannach/Steiermark, und dem Institut für Theoretische und Physikalische
Chemie der Universität Graz.

Mit 6 Abbildungen.

(Eingelangt am 9. Mai 1952. Vorgelegt in der Sitzung am 5. Juni 1952.)

Die in der Natur vorkommenden Fette sind von sehr verschiedener Zusammensetzung; die jeweils im Fett enthaltenen Mengen an verschiedenen Fettsäuren charakterisieren nicht nur die physikalischen und chemischen Eigenschaften, sondern bestimmen auch die Möglichkeit ihrer Verwertung im Organismus. Die meisten der natürlich vorkommenden Fettsäuren zählen zu den für die Ernährung wichtigsten Energie spendern, sie haben keine bisher bekannte spezifische Aufgabe. Nur die essentiellen Fettsäuren, zu welchen wir die Linol-, Linolen- und Arachidonsäure rechnen, erscheinen in einem ausgezeichneten Maße lebensnotwendig. Diese Fettsäuren mit isolierten Doppelbindungen, von welchen die Linolsäure 2, die Linolensäure 3 und endlich die Arachidonsäure 4 Doppelbindungen hat, sind für den normalen Lebensablauf des Säugetieres unbedingt erforderlich.

Bereits im Jahre 1927 machten *H. M. Evans* und *G. O. Burr*¹ die Beobachtung, daß Mangelercheinungen auftreten, wenn man Ratten bei fettarmer Kost hält. Eine große Zahl von Untersuchungen, so von *G. O. Burr* und *M. M. Burr*², verweisen auf schwere Stoffwechselstörungen, wie Wachstumsstillstand, Laktationshemmung und Nierenschäden, welche sich als Folgeerscheinungen fettarmer Kost zeigten. Weiters möchten wir kurz

¹ *H. M. Evans* und *G. O. Burr*, Proc. Soc. Biol. Med. **25**, 41 (1927).

² *G. O. Burr* und *M. M. Burr*, J. biol. Chemistry **82**, 345. (1929).

auf die entscheidenden Versuche und Arbeiten von *F. Grandel*³, *Hume* und Mitarbeiter⁴, wie *A. E. Hansen*⁵ hinweisen. Letzterer Autor führte die ersten Versuche am Menschen durch und stellte fest, daß nach Verabreichung von ungesättigten Fettsäuren bei hautkranken Kindern die Jodzahl im Serum anstieg.

In welchem besonderen Maße die essentiellen Fettsäuren in den Organen vorkommen, geben uns Untersuchungen von *L. W. Bruce* und *F. B. Shorland*⁶ wieder. Auf Grund dieser Arbeiten, welche an der Pferdeleber durchgeführt wurden, ergab sich, daß die gesättigten Fettsäuren von relativ untergeordneter Bedeutung sind, während die ungesättigten Säuren und im besonderen die der C₁₈-Reihe weitaus im Vordergrund stehen. Sehr aufschlußreich sind die Feststellungen dieser beiden Autoren, daß die C₁₈-ungesättigten Fettsäuren der Pferdeleber zum weitaus größten Teil Linol- und Linolensäure sind, während nur ein Drittel der vorhandenen ungesättigten C₁₈-Säuren als Ölsäure errechnet wurde.

Wir wissen, daß gerade die Linol- und Linolensäure für den normalen Stoffwechsel erforderlich sind und daß bei fettfreier Kost Versuchstiere, wie z. B. Ratten, sehr bald an charakteristischen Veränderungen der Pfötchen und des Schwanzes erkranken. Die Tiere weisen bald schwere innere Störungen auf, trinken auffallend viel Wasser und gehen gewöhnlich an den Nierenveränderungen, welche mit Hämaturie einhergehen, zugrunde. Zusammenfassend berichtet in letzter Zeit *H. P. Fiedler*⁷ über die Bedeutung der ungesättigten Fettsäuren für den Stoffwechsel.

R. Holman und Mitarbeiter⁸ zeigten in sehr schönen Tierexperimenten, daß die durch Monate fettfrei ernährten Ratten sich durch Linolensäurefütterung bald völlig erholten. Aber auch die Linolen- und Arachidonsäure, als Äthylester verfüttert, bessern den schweren Krankheitszustand der Versuchstiere bald. Die Wirkung der Linolensäure bei diesen Versuchen war immer von besonderem Eindruck. *R. Holman* kommt zu dem Schluß, daß streng genommen nur die Linolensäure als die essentielle Fettsäure zu bezeichnen ist. Nur sie allein erfüllt von den pflanzlichen Fettsäuren alle Funktionen einer essentiellen.

Von besonderem Interesse sind für uns die Feststellungen dieses Autors bezüglich der Verfütterung konjugierter Linolensäure bei monatelang fettfrei ernährten Ratten. Er konnte im Gegensatz zu den ausgezeichneten Erfolgen bei der Verabreichung der isolierten Linolensäure bei der konjugierten Form keine Besserung des schweren Krankheitsbildes feststellen. Ja, es verschlechterte sich der Zustand der Versuchstiere zusehends, das Wachstum war weiter gehemmt, der letzte Fettvorrat der Organe ging verloren und die Tiere gingen an dem fortschreitenden Fettmangel zugrunde.

³ *F. Grandel*, Fette u. Seifen **46**, 150 (1939).

⁴ *E. Hume*, *L. Nunn*, *J. McLean* und *H. Smith*, Biochemic. J. **32**, 2162 (1938).

⁵ *A. E. Hansen*, Proc. Soc. Biol. Med. **31**, 160 (1933).

⁶ *L. W. Bruce* und *F. B. Shorland*, Nature (London) **167**, 236 (1951).

⁷ *H. P. Fiedler*, Arzneimittelforschg. **2**, 23 (1952).

⁸ *R. T. Holman* und *G. O. Burr*, Arch. Biochem. **19**, 474 (1948). — *R. T. Holman*, Symposium on Biol. Significance of Lipids, Robert Gould Res. Fndn. 1950. — *J. G. Rieckehoff*, *R. T. Holman* und *G. O. Burr*, Arch. Biochem. **20**, 331 (1949). — *C. Widmer* und *R. T. Holman*, Arch. Biochem. **25**, 1 (1950). — *R. T. Holman*, Fette u. Seifen **53**, 332 (1951).

Die von *R. Holman* festgestellte grundsätzliche Unterschiedlichkeit in der Stoffwechselwirkung der isolierten und konjugierten Form der Linol-säure weist darauf hin, daß der konjugierten Form im Stoffwechselgeschehen eine prinzipiell andere Bedeutung zukommt.

Wir haben in ausgedehnten Untersuchungen gemeinsam mit *A. Musger*⁹ den Gehalt des menschlichen Blutes an konjugiert-unge-sättigten Fettsäuren untersucht. Die als Spender des Nüchternblutes herangezogenen Menschen wählten wir sorgfältig aus, so daß nur klinisch Gesunde zu den Untersuchungen herangezogen wurden, wobei wir in besonderem Maße auf eventuelle Störungen im Leber- und Fettstoff-wechsel achteten. Wir konnten feststellen, daß die im Blutserum vor-handenen Mengen an konjugierten Diene, konjugierten Triene und konjugierten Tetraene innerhalb einer geringen Schwankungsbreite konstante Nüchternwerte vorstellen, welche den Charakter eines Blut-spiegels haben.

Tabelle 1.

Serum-gesamtfett mg %:	Gesamt- cholesterin mg %:	Serumjod- zahl	mg % konjugiert-ungesättigter		
			Diene	Triene	Tetraene
319	222	101	5,0	1,3	0,8
467	216	100	5,6	1,7	0,8
330	220	103	5,1	1,3	0,9
508	200	102	5,1	—	—
368	240	112	4,9	1,1	—
364	228	108	5,7	1,3	0,8
640	280	100	5,7	1,1	—
406	244	104	5,8	1,4	0,8
724	276	95	5,7	1,3	—
270	228	107	5,9	—	—
401	232	112	5,4	1,2	0,9
366	184	106	4,8	—	—

Die Tabelle 1 gibt einen Teil der Untersuchungsbefunde von ins-gesamt 34 klinisch Gesunden wieder. Die Serum-Nüchternwerte kon-jugiert-ungesättigter Fettsäuren dieser Reihe beim Gesunden zeigen, daß der Blutspiegel mit großer Konstanz eingehalten wird. Die Streuung der Werte konjugierter Diene betrug $\pm 0,5$ mg% und ist damit etwa doppelt so groß als der apparative Meßfehler. Die von uns gefundenen Mittelwerte im Nüchternserum gesunder Menschen sind:

Konjugiert-ungesättigte Diene 5,4 mg%;
 konjugiert-ungesättigte Triene 1,3 mg%;
 konjugiert-ungesättigte Tetraene 0,8 mg%.

⁹ *A. Musger, K. L. Zirm und E. Schauenstein, Hautarzt 3, 170 (1952).*

Versuchsmethodik.

Nach der Nüchternentnahme des Blutes aus der Cubitalvene wurde baldmöglichst das Serum abgetrennt und zentrifugiert. 9 ccm Serum wurden mit 141 ccm Alkohol:Äther (3:1) langsam unter Schütteln versetzt und kurz bis zum Aufkochen erwärmt. Nach dem Stehen durch 1½ Stdn. wurde filtriert.

20 ccm Filtrat, welche 1,2 ccm Serum entsprechen, wurden vorsichtig bis zur Trockene am Wasserbad abgedampft und mit Petroläther (30 bis 50°) das Serumfett durch mehrmalige Behandlung extrahiert und in ein Wiegekölbehen filtriert. Nach dem Abdampfen des Petroläthers wurde 24 Stdn. lang über NaOH im Exsikkator getrocknet.

Die Auswaage ergibt unter Berücksichtigung der Serumausgangsmenge nach Abzug des Gesamtcholesterinwertes den Serumfettgehalt.

Die Bestimmung des Cholesterins erfolgte nach der Methode von *Schoenheimer-Sperry*¹⁰, nach einer Modifikation von *F. F. Foldes* und *B. C. Wilson*¹¹.

Zur Bestimmung der Jodzahl bedienen wir uns der Methode nach *W. Trappe*¹², einer für Mikromengen in biologischen Substraten modifizierten Methode nach *H. P. Kaufmann*.

Zur Bestimmung der Konjuene im Serum dampften wir 80 ccm Filtrat, entsprechend 4,8 ccm Serum, am Wasserbad vorsichtig unter Stickstoff, welcher durch eine alkalische Pyrogallollösung und Schwefelsäure gereinigt wurde, ein. Nach dem Verdampfen des Alkohol-Äther-Gemisches wurde der Rückstand sofort in 5 ccm optisch reinem Heptan aufgenommen. Diese Lösung wurde nun spektrographiert, wobei sich Kurven vom Typ der Abb. 1 ergaben. Als Grundlage für die Berechnung des Prozentgehaltes an konjugierten Systemen dienten die Extinktionskoeffizienten von 9,11-Linolsäure, Eläostearinsäure und Parinarsäure. Die derart ermittelten Prozentwerte beruhen somit auf der Annahme, daß es sich auch im Serum um konjugierte Fettsäuren der C₁₈-Reihe handelt. Der maximale apparative Meßfehler betrug ± 3 bis 5% der angegebenen Werte (*E. Schauenstein*¹³).

Die gefundenen Werte konjugierter Fettsäuresysteme im Blut geben naturgemäß noch keinen Aufschluß über das physiologische Verhalten dieser Fettsäuren im Stoffwechselgeschehen. Deshalb untersuchten wir das Verhalten des Fettspektrums im Blut bei Belastungen. Zunächst wurden Belastungskurven mit Olivenöl (30 g) durchgeführt. Wie zu

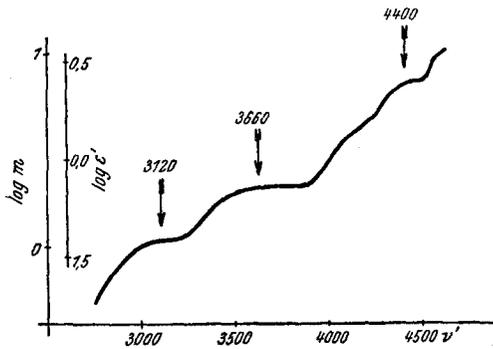


Abb. 1.

¹⁰ *R. Schoenheimer* und *W. M. Sperry*, *J. biol. Chemistry* **32**, 745 (1934).

¹¹ *F. F. Foldes* und *B. C. Wilson*, *Analytical Chem.* **22**, 1210 (1950).

¹² *W. Trappe*, *Biochem. Z.* **296**, 180 (1938).

¹³ *E. Schauenstein*, *Österr. Chemiker-Ztg.* (1952), im Druck.

erwarten, blieben nach oraler Verabreichung die Werte des Serumspiegels an konjugierten Fettsäuresystemen völlig unverändert. Die Abb. 2 veranschaulicht das Verhältnis während eines solchen Versuches.

Die Belastungskurven mit Leinöl ergaben ein deutlich differentes Bild. Das für unsere Versuche verwandte Öl enthielt 0,3% konjugiert-

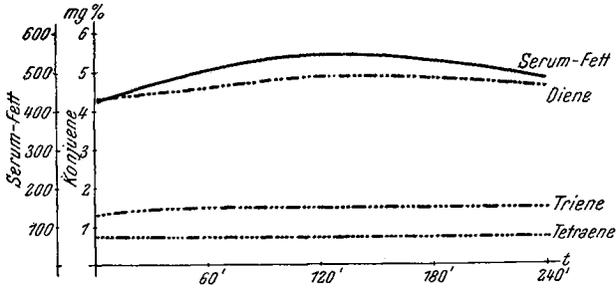


Abb. 2.

ungesättigte Diene. Die Abb. 3 gibt die Ergebnisse von 2 Belastungskurven nach Oleum Lini (30 g) beim gesunden Menschen wieder. Es erscheint uns beim Vergleich dieser Belastungskurven bemerkenswert,

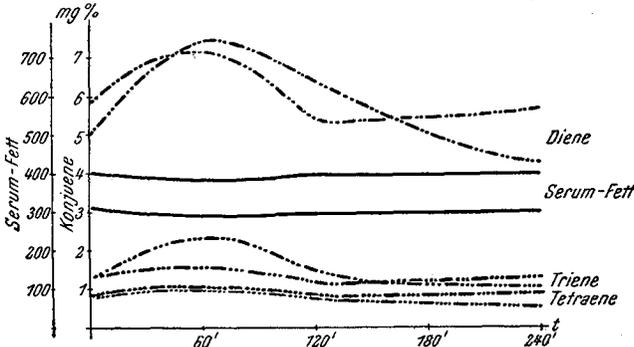


Abb. 3.

daß einerseits das Gesamtfett des Blutes nach Olivenöl deutlich ansteigt, nach 2 Stdn. das Maximum erreicht, um nach 4 Stdn. wieder abzusinken. Im Gegensatz dazu steigt der Gesamtfettgehalt des Blutes nach Belastung mit Leinöl nicht an, während die konjugiert-ungesättigten Diene, Triene und Tetraene deutlich ansteigen, um nach 4 Stdn. den Nüchternspiegel wieder sicher zu erreichen.

In der Folgezeit haben wir eine große Zahl von Belastungskurven am Gesunden durchgeführt, wobei wir uns eines Öles bedienten, welches in 30 g Leinöl 1 g konjugiert-ungesättigte Fettsäuren enthielt. Eine Be-

lastungskurve dieser Art gibt Abb. 4 wieder, aus welcher hervorgeht, daß sowohl die Diene wie auch die Triene beim Gesunden deutlich ansteigen, um nach ungefähr 2 Stdn. das Maximum zu erreichen, während die Werte des Gesamtfettgehaltes des Serums in der ganzen Zeit nahezu unverändert blieben.

Während die isoliert-ungesättigten Fettsäuren essentielle Bestandteile des kalorischen Stoffwechsels sind, ohne welche ein normaler Ablauf des biologischen Geschehens nicht denkbar ist, verhalten sich die konjugiert-ungesättigten Fettsäuren völlig anders. Sie zeigen einen exakten Blutspiegel, welcher beim Gesunden mit nur geringer Streuung eingehalten wird und können, wie es scheint, in den Energiestoffwechsel

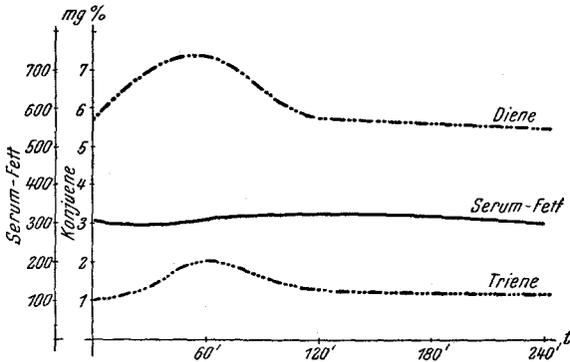


Abb. 4.

selbst nicht eingreifen. Es war daher zu erwarten, daß auch der Nüchternspiegel bei pathologischer Stoffwechsellage für die konjugiert-ungesättigten Fettsäuren im Vergleich zum Normalspiegel ein anderer ist. So konnten wir in gemeinsamen Untersuchungen mit *A. Musger* (l. c.) feststellen, daß bei der Psoriasis der Blutspiegel häufig deutlich herabgesetzt ist. Es ist bemerkenswert, daß bei dieser Erkrankung mit der therapeutischen Verabreichung von Konzentraten konjugiert-ungesättigter Fettsäuren der C_{18} -Reihe gute Heilungserfolge erzielt werden.

In weiterer Verfolgung krankheitsbedingter Schwankungen des Serumspiegels konjugiert-ungesättigter Fettsäuren haben wir in Zusammenarbeit mit *H. Axenfeld* sowohl bei Nüchternwerten als auch bei Belastungen mit einem Gramm konjugierter Fettsäuren der C_{18} -Reihe charakteristische Veränderungen feststellen können. Diese beziehen sich vor allem auf Untersuchungen bei Hepatopathien, Blut- und Stoffwechselkrankheiten. Über die Ergebnisse wird in Kürze an anderer Stelle berichtet werden.

Es kann als sicher angenommen werden, daß die essentiellen Fettsäuren vom Säugetierkörper nicht gebildet werden, sondern durch die

Nahrung aufgenommen werden müssen. In diesem Sinne dienen wohl die isolierten Fettsäuren als Vorstufe der konjugiert-ungesättigten Systeme. Es ist anzunehmen, daß der Organismus in der Lage ist, die Isomerisation durchzuführen. *H. O. Kunkel*¹⁴ konnte feststellen, daß in vitro Methylinolat in gepufferter Lösung als Emulsion von Lipoxydasen bei ausreichender Belüftung und 20° konjugiert wird. Wir glauben, daß möglicherweise in der Haut die Konjugation der isoliert-ungesättigten Fettsäuren erfolgt, wenn auch der Konjuengehalt des Blutes bei Hepato-

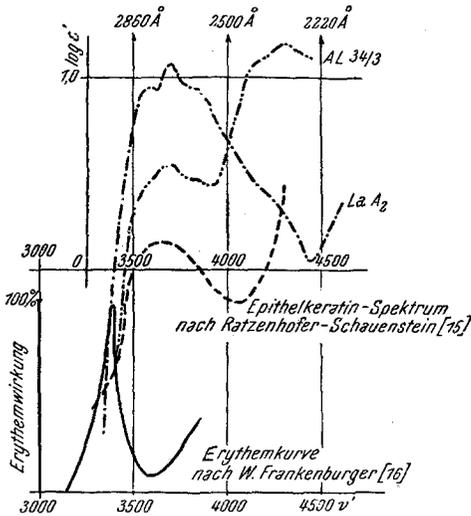


Abb. 5.

Abb. 5 läßt dies auch verständlich erscheinen. Man entnimmt zunächst aus dieser, daß das Absorptionsmaximum der konjugierten Triene (LaA 2 siehe Abb. 5) fast genau bei der gleichen Wellenzahl liegt (3670 ν') wie das des Epithelkeratins (3620 ν'), das auf dessen Tyrosin- bzw. Tryptophangehalt zurückgeht. Die Absorptionskurve AL 34/3 der Abb. 5 entspricht einem Gemisch konjugierter Diene und Triene.

Nachdem nun die Anwesenheit konjugierter Triene in der menschlichen Haut in gemeinsamen Untersuchungen mit *A. Musger* sichergestellt werden konnte, kann man sagen, daß sowohl die Triene wie das Keratin infolge der gleichen Maximumlage ihrer Absorption an dem Zustandekommen des Erythemminimums bei 3700 ν' beteiligt sind. Auf Grund

¹⁴ *H. O. Kunkel*, Arch. Biochem. **30**, 306 (1951).

¹⁵ *M. Ratzenhofer*, *E. Schauenstein* und *W. Berndt*, Z. Biol. **104**, 384 (1951).

¹⁶ *W. Frankenburger*, Naturwiss. **21**, 116 (1933).

pathien vermuten läßt, daß die Bildung konjugierter Fettsäuren aus isolierten in diesem Organ stattfinden könnte. Es bleibt auf jeden Fall bemerkenswert, daß, selbst wenn in der Haut die Bildung konjugierter Fettsäuren nicht erfolgen sollte, diese im Hautorgan beim Lichtschutz gegen ultraviolette Strahlen von besonderer Bedeutung zu sein scheinen. Wir konnten feststellen, daß konjugierte Triene als Konzentrat selbst als Film von ungefähr 0,05 mm auf die Haut aufgetragen, ein außerordentlich wirksamer Schutz gegen die erythem erzeugenden Strahlen sind.

der Absorption konjugierter Triene und des Keratins versteht man ohne weiteres das rapide Absinken der Erythemwirkung des Lichtes ab 3400 ν' , deren Minimum bei 3600 ν' liegt, sowie schließlich den Wiederanstieg ab 3700 ν' , der durch das Absorptionsminimum bei zirka 400 ν' des Keratins bedingt ist.

Mit Hilfe eines dünnen Filmes konjugierter Triene auf der Haut ist selbst nach einer Bestrahlung von 10 Min. Dauer bei einer Entfernung von 25 cm mit einer 300-W-Quarzlampe kein Erythem feststellbar, was Abb. 6 anschaulich wiedergibt. Während durch eine Blende im Feld eins und drei der Rückenhaut bei einem Film von Paraffinöl ein starkes Erythem nach 12 Stdn. bestand, zeigt Feld zwei unter dem Film konjugierter Triene keinerlei Hautveränderung.

Es wäre denkbar, daß ein verschiedener Gehalt an konjugierten Trienen in der Haut ursächlich mit der Empfindlichkeit dieser gegen das kurzwellige Licht in Zusammenhang zu bringen ist. Auch die jahreszeitlich verschiedene Empfindlichkeit des Hautorgans könnte mit diesem Umstand zusammenhängen.

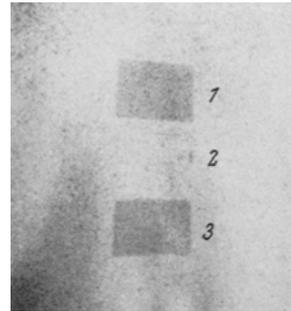


Abb. 6.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß im menschlichen Nüchternserum ein konstanter Spiegel konjugierter Fettsäuren besteht. Bei Belastungsversuchen mit Olivenöl blieb der Blutspiegel an Konjuenen unverändert. Stoffwechselgesunde zeigen nach peroraler Belastung mit konjugierten Fettsäuren einen charakteristischen Anstieg dieser Systeme. Auf die Bedeutung konjugierter Fettsäuren im Stoffwechsel Gesunder und Kranker wurde hingewiesen. Die Filterung erythem erzeugender Strahlen des Ultraviolett durch konjugierte Triene wurde beschrieben und diskutiert.