

(Aus der Universitäts-Kinderklinik Göttingen [Direktor: Prof. *Beumer*].)

Über die Bestimmung der Cerebroside in der Leber und im Gehirn mit Hilfe von Reduktionsmethoden.

Von

H. Fasold.

(Eingegangen am 6. Mai 1932.)

Der Stoffwechsel der Cerebroside konnte bis jetzt nur am Zentralnervensystem mit einigermaßen zureichenden Methoden beobachtet werden (*Koch, Smith u. Mair, Thierfelder, Winterstein*). Um so beachtenswerter schien die Mitteilung einer Methode von *Kimmelstiel*, mit welcher die Bestimmung der Cerebroside in beliebigen Organen und in sehr kleinen Substanzmengen schnell und sicher möglich sein soll. Das Prinzip der Methode besteht in der Bestimmung des Reduktionsvermögens des alkoholischen Organextraktes vor und nach der Hydrolyse mit Salzsäure. Die Cerebroside spalten unter der Säurewirkung Galaktose ab, die eine Zunahme des anfänglichen Reduktionsvermögens bedingt. Die Differenz zwischen Anfangs- und Endwert gestattet an Hand einer von *Kimmelstiel* aufgestellten konventionellen Reduktionstabelle, den Cerebrosidegehalt zu berechnen. Die Bestimmungen geschehen mit der Methode von *Hagedorn-Jensen*.

Diese Methode hat gegenüber den älteren Verfahren den theoretischen Nachteil, daß schon vor der Hydrolyse ein Reduktionswert bestimmt werden muß. Nach den Methoden von *Thierfelder* und *Winterstein*, die die Reduktionskraft nach *Bertrand* messen, ist das nicht der Fall. Die *Fehlingsche* Lösung wird von dem alkoholischen Auszug des Gehirnes nicht reduziert. Das Reduktionsvermögen entsteht erst bei der Hydrolyse mit starken Säuren. Blieb es auch hier ungewiß, ob nicht noch andere reduzierende Körper als die Galaktose der Cerebroside entstehen, so hat man bei der *Kimmelstielschen* Methode noch einen zweiten Unsicherheitsfaktor in der Frage, ob die anfänglichen reduzierenden Valenzen nicht durch die Säurewirkung zerstört werden. Jedoch konnte *Kimmelstiel* in seinen Versuchen am Gehirn brauchbare Ergebnisse mitteilen.

Die Betrachtung der Ergebnisse, die der Verfasser bei der Anwendung seiner Methode auf Leberuntersuchungen gewann, erweckte aber gewisse

Bedenken. Er verfütterte an Kaninchen täglich 5 cem einer 3%igen öligen Lösung von Cholesterin und glaubt bei der Untersuchung der Leber als Folge des steigenden Cholesteringehaltes eine vermehrte Phosphatid- und Cerebrosidspeicherung zu finden. Seine Werte für Cerebroside in der Leber sind zum Teil erstaunlich hoch, bis zu 3,93% der Trockensubstanz. Derartige Befunde erinnern an die Cerebrosidspeicherung in der Milz und Leber bei Morbus Gaucher. Dabei ist der von *Kimmelstiel* geschilderte Verlauf seiner Cholesterinversuche dazu angetan, eine Cholesterinspeicherung überhaupt ablehnen zu lassen. Alle seine Versuchstiere starben zwischen dem 3. und 7. Tag der Cholesterinfütterung unter Verdauungsstörungen. Nun tritt in dieser kurzen Zeit wohl kaum eine Cholesterinspeicherung ein. Ferner ist bekannt, daß das Cholesterin bei Verdauungsstörungen nicht aufgesaugt wird, sondern den Darmkanal mit den Stühlen verläßt.

Diese Tatsachen ließen uns vermuten, daß *Kimmelstiel* einem Irrtum zum Opfer gefallen sei, und es erschien wünschenswert zu prüfen, ob seine Methode auf die Leber anwendbar ist.

Versuchsanordnung.

Wir bestimmten zunächst den Cerebrosidgehalt der normalen Rind-leber nach *Kimmelstiel* und verglichen das Ergebnis dieser Methode mit der Bestimmung des Reduktionsvermögens nach *Bertrand*. Da der alkoholische Leberauszug die *Fehlingsche* Lösung reduziert, wurde auch hier ein Anfangs- und Endwert bestimmt. Weiterhin wurde nach beiden Methoden der Cerebrosidgehalt der Leber eines cholesterinkranken Kaninchens und eines gesunden Vergleichstieres untersucht.

Falls in der Leber überhaupt nennenswerte Vorkommen an Cerebrosiden sind, mußten sie auch mit dem präparativen Verfahren von *Lieb* darzustellen sein. Wir haben deshalb in jedem Versuch auch diesen Weg eingeschlagen, wobei wir — es mag hier vorweggenommen sein — niemals Cerebroside, nicht einmal spurenweise, nachweisen konnten.

Die Organe wurden zerkleinert, in warmer Luft bei 40° getrocknet, feinst gepulvert und im Exsiccator über Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz aufbewahrt. Dann wurde das Leberpulver im Soxhlet 8 Stunden mit Äther und dann 24–36 Stunden mit absolutem Alkohol extrahiert und das alkoholische Extrakt mit Alkohol auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Davon wurden aliquote Teile zur Bestimmung des Reduktionsvermögens nach *Kimmelstiel* und nach *Bertrand* entnommen. Der Rest diente zur Durchführung des präparativen Verfahrens nach *Lieb*. Wir achteten sorgfältig darauf, daß bei den Bestimmungen der Alkohol restlos verjagt wurde, und eine Beeinflussung des Reduktionsvermögens von dieser Seite aus ausgeschlossen war. Jeder Ansatz wurde 3mal mit 5 cem Wasser zur Trockene im Wasserbad eingedampft. Vergleichsversuche mit Wasser-Alkoholmischungen zeigten, daß dann nach *Hagedorn-Jensen* keinerlei Reduktion festzustellen war.

1. Ansatz.

500 g Rindsleber, Trockengewicht 166 g, 8 Stunden mit Äther, dann 36 Stunden mit absolutem Alkohol extrahiert. Der alkoholische Extrakt mit Alkohol auf 1000 cem aufgefüllt, mit je 1 cem die Reduktionsbestimmungen nach *Kimmelstiel* vor und nach der Hydrolyse, ebenso mit je 20 cem mit der *Bertrandschen* Methode durchgeführt, ergibt auf das Anfangsvolumen umgerechnet, nach *Kimmelstiel*:

vor der Hydrolyse (Anfangswert)	1,208 g Galaktose,
nach der Hydrolyse (Endwert) . .	3,500 g „
also Cerebrosidzucker	2,392 g, „

woraus sich 11,0 g Cerebroside errechnen. Das entspricht einem Cerebrosidgehalt von 2,2%, auf die feuchte Leber bezogen.

Das Reduktionsvermögen, in je 20 cem nach *Bertrand* bestimmt, ergibt:

Vor der Hydrolyse	40,3 mg Galaktose
nach „ „	26,0 mg „

Die Hydrolyse wurde nach *Thierfelder* mit 15%iger Schwefelsäure während 3 Stunden auf dem siedenden Wasserbad unterm Rückflußkühler vorgenommen.

Das Reduktionsvermögen ist also durch die Säurewirkung nach *Bertrand* gemessen, kleiner geworden. Eine Berechnung des Cerebrosidgehaltes nach diesem Verfahren ist demnach nicht möglich. Würde man den Wert nach der Hydrolyse benützen, wozu keinerlei Berechtigung gegeben ist, so errechnet sich ein Cerebrosidgehalt von 1,3 g in 500 g roher Rindsleber. Da das Prinzip beider Methoden, nämlich die Bestimmung der reduzierenden Kraft, das gleiche ist, dürften sich, wenn es überhaupt anwendbar wäre, nicht derartige Unterschiede ergeben.

Auf jeden Fall mußten sich die relativ großen Mengen an Cerebroside, die nach *Kimmelstiel* erhalten wurden, und auch der nur fiktive Wert von 1 g nach *Bertrand* mit der präparativen Methode von *Lieb* leicht darstellen lassen.

Die restlichen 900 cem des alkoholischen Extraktes wurden zur Trockene eingedampft. Gewicht des Rückstandes 5 g, also weniger als die nach *Hagedorn-Jensen* bestimmten Cerebroside.

Nach Aufnahme mit 200 cem heißem Alkohol, Filtrieren im Heißwassertrichter wurde das Filtrat mit 30 cem kalt gesättigter Mercurichloridlösung versetzt. Es bildet sich eine geringe Menge eines gelben, schleimigen Niederschlages. Nach Abzentrifugieren und dreimaligem Waschen mit 70% Alkohol wurde der Niederschlag in heißem Alkohol suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Quecksilbersulfidniederschlag zeigte auch nach weitgehendem Einengen keinerlei Krystallisation. Schließlich wurde es zur Trockene eingedampft und der Rückstand nach *Thierfelder* hydrolysiert. Das neutralisierte Hydrolysegemisch gab keine Reduktion nach *Bertrand*. Damit war die Abwesenheit von Cerebroside bewiesen.

2. Ansatz.

250 g frische Rindsleber, Trockengewicht 75 g, nach 8stündiger Ätherextraktion 36 Stunden mit absolutem Alkohol extrahiert. Extrakt auf 370 cem mit Alkohol aufgefüllt. Die Reduktionsbestimmung nach *Kimmelstiel* zeigte in einem Ansatz, daß das Fericyanid bei der Bestimmung des Anfangswertes vollkommen verbraucht war, so daß eine Titration nicht möglich war. Die Bestimmung des Endwertes dagegen ergab noch unverbrauchtes Cyanid. Da verabsäumt wurde, genügend Material in Reserve zu halten, war eine Wiederholung des Ansatzes nicht möglich. Es kann

aber gesagt werden, daß der Endwert in diesem Falle kleiner war als der Anfangswert.

Nach *Bertrand* ergibt sich von 10 ccm Extrakt:

vor der Hydrolyse	35 mg Galaktose
nach „ „	28 „ „

Dieser Versuch ergibt also ebenfalls einen kleineren Endwert, so daß eine Berechnung der Cerebroside nicht möglich ist. Auch hier führte die präparative Methode von *Lieb* zu einem vollkommen negativen Ergebnis.

Cholesterinversuche.

Es wurden 2 gleich schwere Kaninchen, Männchen, mit einem Körpergewicht von 3,25 kg und 3,29 kg in den Versuch genommen. Das eine, das Versuchstier, erhielt täglich 0,2 g Cholesterin in 5 ccm warmem Erdnußöl gelöst während 24 Tagen mit der Sonde verabreicht. Das Vergleichstier bekam auf dieselbe Weise die gleiche Menge Öl. Die Nahrung war für beide Tiere genau gleich. Das Versuchstier hatte vor der Tötung, 24 Stunden nach der letzten Cholesteringabe eine Cholesterinämie von 240 mg-%. Die Tiere zeigten während des Versuches unverändertes Wohlbefinden.

Bei der Sektion findet sich im Versuchstier eine stark vergrößerte gelb gefleckte Leber, während das Vergleichstier nichts Besonderes bietet. Die angeführten Zahlen zeigen, daß die Leber des Versuchstieres nicht nur 2mal so groß war, sondern auch einen fast doppelt so hohen Cholesteringehalt hatte, als das Vergleichstier. Das Cholesterin der Leber wurde mit 0,5 g Trockenpulver im Unverseifbaren mit der Digitoninfallung bestimmt.

Cholesterintier:

Lebergewicht naß	155 g,	Milzgewicht naß	2 g,
„ trocken	40,8 g,	„ trocken	0,39 g.

Vergleichstier:

Lebergewicht naß	89 g,	Milzgewicht naß	2 g,
„ trocken	21,5 g,	„ trocken	0,25 g.

Cholesteringehalt der Trockensubstanz:

Cholesterintier	Leber 1,7%,	Milz 1,4%
Vergleichstier	„ 1 %,	„ 0,7%.

Die Cholesterinämie und diese Zahlen beweisen, daß das Versuchstier Cholesterin gespeichert hatte.

Während die bisherigen Ergebnisse nicht unmittelbar mit denen *Kimmelstiels* verglichen werden können, da es sich um Versuche an normalen Lebern handelt und *Kimmelstiel* die Werte für das normale Vergleichstier nicht wiedergibt, oder vielleicht nicht erkennbar bezeichnet, so geraten wir nun mit ihm in Widerspruch hinsichtlich der Resultate seiner Cholesterinversuche.

Von der Cholesterinleber wurden 39,3 g, von der Vergleichsleber 20,5 g Trockenpulver 8 Stunden mit Äther, dann 24 Stunden lang im Soxhlet mit absolutem Alkohol extrahiert und die alkoholischen Extrakte jeweils auf ein Volumen von 150 ccm verbracht. Davon wurden

je viermal 10 ccm für die Bestimmungen nach *Bertrand* entnommen und je 10 ccm für die Cerebrosidbestimmungen nach *Kimmelstiel* bereitgestellt. Nachstehend die Ergebnisse, auf das Anfangsvolumen umgerechnet.

Nach *Hagedorn-Jensen* ergibt sich:

Cholesterinleber:		Kontrolleber:
vor der Hydrolyse	0,956 g Galaktose	0,393 g Galaktose
nach „ „	0,797 g „	0,322 g „
Nach <i>Bertrand</i> :		
vor der Hydrolyse	0,630 g Galaktose	0,105 g Galaktose
nach „ „	0,476 g „	0,072 g „

Nach beiden Verfahren ist also der Endwert kleiner als der Anfangswert. Es entfällt damit die Möglichkeit, die Berechnung eines etwaigen durch die Hydrolyse freigewordenen Cerebrosidzuckers.

In den restlichen 100 ccm der alkoholischen Extrakte wurde die präparative Darstellung nach *Lieb* durchgeführt. Die Ausgangsmenge entspricht im Cholesterinversuch 26,2 g Leberpulver. *Kimmelstiel* findet in seinen Cholesterinversuchen einen durchschnittlichen Cerebrosidgehalt von 2,5% der trockenen Leber. Bei Benutzung dieses Wertes mußte in unserem Extrakt noch 0,65 g Cerebrosid zugegen sein, eine Menge, die mit der *Liebschen* Methode noch mit Leichtigkeit einen positiven qualitativen Nachweis ergibt. Es gelang aber auch auf diesem Wege nicht — nicht einmal spurenweise — eine Cerebrosidkrystallisation nachzuweisen. Schließlich wurde die Lösung nach Schwefelwasserstoff-Fällung zur Trockene eingedampft und der Rückstand auf sein Reduktionsvermögen vor und nach der Hydrolyse nach *Thierfelder* geprüft. Es zeigte sich keine Reduktion. Damit ist die Abwesenheit von Cerebrosiden auch in der Leber eines einwandfrei cholesterinkranken Kaninchens bewiesen.

In einem Kontrollversuch wurden 0,6 g eines nach *Thierfelder* dargestellten phosphorfreen Cerebrosidgemisches in 100 ccm Alkohol gelöst und die präparative Methode von *Lieb* durchgeführt. Nach Zersetzen des Quecksilberniederschlags und Eindampfen des Filtrates wurden nach *Bertrand* 87% der Einwaage wiedergefunden. Der Rückstand reduzierte vor der Hydrolyse nicht die *Fehlingsche* Lösung. Wir sind somit sicher, daß in keinem der Versuche das fragliche Cerebrosid dem Nachweis entgangen sein konnte.

Die Unstimmigkeit zwischen unseren und *Kimmelstiels* Ergebnissen können wir uns nicht erklären. Da wir in jedem Falle die Abwesenheit der Cerebroside präparativ bewiesen haben, sind wir geneigt, anzunehmen, daß *Kimmelstiel*, der die Cerebroside nicht präparativ nachwies, einem unbekannten, zu Irrtümern führenden experimentellen Faktor zum Opfer gefallen ist. Seine Methode gibt in unseren Händen stets unbrauchbare Werte. Auch bei der Anwendung auf das Gehirn kommen wir zu dem gleichen Ergebnis. So finden wir zum Beispiel bei einem Rindshirn einen Cerebrosidgehalt von 1,88% auf das feuchte Gehirn bezogen. Das gleiche

Gehirn getrocknet ergibt, die Cerebroside nach *Kimmelstiel* bestimmt, einen Cerebrosidgehalt von 0,7% der Trockensubstanz. Der letztere Wert müßte aber ein Vielfaches des Feuchtgehaltes sein.

Zusammenfassung.

Die Übertragung der Methode von *Kimmelstiel* zur Bestimmung der Cerebroside in der Leber führt zu unbrauchbaren Ergebnissen.

Bei der Cholesterinkrankheit des Kaninchens wird kein Cerebrosid gespeichert. Eine derartige Speicherung konnte weder durch Reduktionsmethoden, noch durch die präparative Methode von *Lieb* nachgewiesen werden.

Die Brauchbarkeit der Cerebrosidbestimmung im Gehirn nach *Kimmelstiel* konnte nicht bestätigt werden.

Schrifttum.

Kimmelstiel: Mikrochemie. *Pregl-Festschrift* 1929, 165; *Virchows Arch.* 282, 402 (1931). — *Koch*: *Amer. J. Physiol.* 11, 303 (1904). — *Loening* u. *Thierfelder*: *Hoppe-Seylers Z.* 77, 202 (1912). — *Winterstein* u. *Hirschberg*: *Biochem. Z.* 159, 312 (1925).
