

Wasser (10 : 15) umkristallisiert. 6-Nitroveratrumaldehyd fällt in hellgelben Nadeln an. Ausbeute 174 mg (74% bez. auf Veratrumaldehyd, 66% bez. auf Vanillin) vom Schmp. 132–134°. Der Hypobromitabbau erfolgt wie oben beschrieben, 6-Nitroveratrumaldehyd löst sich in der alkalischen Hypobromit-Suspension nicht auf und reagiert nur langsam und unvollständig. Die Ausbeute an Brompikrin bzw. an BaCO₃ ist gering. 85 mg BaCO₃ (52% bez. auf 6-Nitroveratrumaldehyd).

Messung der Radioaktivität: Die Radioaktivitäts-Bestimmung erfolgte in der vorliegenden Arbeit durchwegs an Hand fester Meßpräparate in einem Geiger-Müller-Gerät mit Endfenster-Zählrohr. Vanillin (als *m*-Nitrobenzhydrazon), Vanilloylacetyl

(als Nickelsalz seines Dioxims) und Tetramethylammonium-Reineckat wurden in „endlicher“ Schichtdicke in Substanz gemessen; die Selbstabsorption wurde durch Korrekturkurven berücksichtigt. Alle anderen Verbindungen sowie die Holzproben wurden mittels nasser Oxydation in BaCO₃ überführt, das in „unendlich“ dicker Schicht gemessen wurde²³. Die angegebenen Aktivitäten sind Durchschnittswerte aus 4–6 Bestimmungen.

Diese Arbeit wurde durch Mittel der Österreichischen Gesellschaft für Holzfor-schung unterstützt, wofür auch an dieser Stelle bestens gedankt sei.

²⁸ H. SCHMID u. K. SCHMID, *Helv. chim. Acta* 36, 498 [1953].

Die intestinale Vitamin B₁₂-Resorption und ihre Strukturspezifität beim Meerschweinchen

Von M. STAAK und H. C. HEINRICH

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Hamburg (Direktor: Prof. Dr. J. KÜHNAU)
(Z. Naturforschg. 15 b, 11–16 [1960]; eingegangen am 3. September 1959)

Die am Meerschweinchen durchgeführten Studien über den physiologischen Bereich und den zeitlichen Verlauf der intestinalen Vitamin B₁₂-Resorption zeigen, daß im Bereich einer Testdosis von 10 ng bzw. 30 ng ⁶⁰Co-B₁₂ die absolute Leber-Inkorporation noch annähernd linear-proportional zur oralen Testdosis verläuft und sich bei einer Testdosis von 50 ng ⁶⁰Co-B₁₂ bereits der Übergang in den Sättigungsbereich deutlich abzeichnet. 4 Stdn. nach oraler Applikation einer B₁₂-Testdosis von 30 ng erreicht die ⁶⁰Co-B₁₂-Inkorporation in den Dünndarm ihr Maximum und nimmt dann schnell ab, während die Leber-Inkorporation nach 8 Stdn. ein Plateau erreicht, das mit längerer Testdauer (bis 48 Stdn.) nur noch unwesentlich ansteigt. Resorptionsort ist beim Meerschweinchen das gesamte Intestinum, jedoch bevorzugt dessen distaler Abschnitt.

Die intestinale Vitamin B₁₂-Resorption des Meerschweinchens ist ebenfalls hochgradig strukturspezifisch. Das 5,6-Dimethylbenzimidazolcyanocobamid, das 5,6-Dichlorbenzimidazolcyanocobamid, das Benzimidazolcyanocobamid und das 5-Methoxybenzimidazolcyanocobamid werden fast in gleichem Ausmaß wie das Vitamin B₁₂ resorbiert, während die Resorption des 5-Hydroxybenzimidazolcyanocobamids wesentlich geringer ist und für das 3,5,6-Trimethylbenzimidazolcyanocobamid und Dicyanocorphinamid keine oder nur eine minimale Resorbierbarkeit nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse stimmen mit den am Menschen und am Schwein erhaltenen Resultaten gut überein. Auf Grund der vorliegenden Untersuchungen am Meerschweinchen müssen für eine optimale Vitamin B₁₂-Resorption folgende struktur-chemische Bedingungen im Vitamin B₁₂-Molekül erfüllt sein:

1. Das Vorhandensein einer Nucleotid-Seitenkette. Ferner muß die koordinative Bindung zwischen dem zentralen Co-Atom und dem Benzimidazolring des Vitamin B₁₂-Moleküles intakt sein.
2. Der Benzimidazolring des Vitamin B₁₂-Moleküles darf in 5-Position nicht mit einer freien phenolischen Hydroxylgruppe substituiert sein. Verätherung der phenolischen OH-Gruppe des 5-Hydroxybenzimidazolcyanocobamids mit einer CH₃-Gruppe beseitigt den Hemmungseffekt des Phenolhydroxyls.

Die Ursache der Strukturspezifität der intestinalen Vitamin B₁₂-Resorption wurde an Hand von radio-papierchromatographischen Untersuchungen diskutiert. Es wurde festgestellt, daß einer ausgesprochenen Strukturspezifität der intestinalen Vitamin B₁₂-Resorption eine durchaus strukturspezifische Bindungsfähigkeit von rohen und gereinigten Intrinsic Factor-Präparaten für die einzelnen Vitamin B₁₂-Analoga gegenübersteht. Es kann daher angenommen werden, daß die Strukturspezifität der Resorbierbarkeit des Vitamin B₁₂-Moleküles durch den eigentlichen an der Intestinal-Mucosazelle ablaufenden und noch weitgehend unbekannten Resorptionsmechanismus bedingt ist, dem dann eine hohe Spezifität in der Auswahl der angebotenen Vitamin B₁₂-Strukturen zukommen müßte.

Neben dem eigentlichen Vitamin B₁₂, dem 5,6-Dimethylbenzimidazolcyanocobamid, finden sich als Produkte bakterieller Biosynthese im Darminhalt von Säugern und Vögeln, in Abwässern sowie im Belebt- und

Faulschlamm Vitamin B₁₂-Analoga, deren biologische Bedeutung noch ungeklärt ist. Bei Angebot geeigneter Benzimidazol- oder Purinbasen können *E. coli*, Pansen-Anaerobier, Propionsäurebakterien und Streptomyces-

arten viele verschiedene Purin- oder Benzimidazol-Vitamin B₁₂-Analoga produzieren. Diese teils auch natürlich vorkommenden, teils nur biosynthetisch herstellbaren Vitamin B₁₂-Faktoren leiten sich strukturell von dem ebenfalls im Panseninhalt und in den Faeces von Kälbern, in den Fermentationsprodukten von *Streptomyces aureofaciens* und auch anderweitig vorkommenden Grundkörper der Vitamin B₁₂-Analoga, dem Dicyanocorphanamid (= Faktor B) ab, der keine Nucleotid-Seitenkette enthält und keine antiperniciöse Wirksamkeit besitzt (Literatur und Übersicht in „Vitamin B₁₂ und Intrinsic Factor“, 1956)¹.

Die experimentelle und klinische Vitamin B₁₂-Forschung hat sich während der letzten fünf Jahre besonders intensiv mit den Strukturanalogen des Vitamin B₁₂ beschäftigt. Im Vordergrund stand dabei besonders die Frage nach der Existenz eines Vitamin B₁₂-Analogons, das in seiner klinischen Aktivität noch wirksamer und somit für therapeutische Zwecke geeigneter ist als das Vitamin B₁₂ selbst. Außerdem wurde an die Möglichkeit gedacht, durch chemische oder biosynthetische Abwandlung der B₁₂-Struktur ein B₁₂-Analogon zu gewinnen, das Anti-Vitamin B₁₂-Charakter besitzt und damit möglicherweise als Antagonist bzw. Antimetabolit des B₁₂ bei neoplastischen Erkrankungen, insbesondere des hämatopoetischen Systems von zumindest palliativem Interesse ist.

Schließlich ist die Frage der eigentlichen „in vivo“ wirksamen Struktur des Vitamin B₁₂, in der es in den Intermediärstoffwechsel essentiell und regulativ eingreift, noch ungeklärt, während über die Strukturspezifität einzelner Phasen des B₁₂-Stoffwechsels bereits einige Ergebnisse vorliegen. So wurde insbesondere die Strukturspezifität der intestinalen Vitamin B₁₂-Resorption am Menschen, am Schwein und an der Ratte eingehend untersucht und eine hochgradige Strukturspezifität hinsichtlich der Resorbierbarkeit der angebotenen verschiedenen Vitamin B₁₂-Strukturen festgestellt.

Um die bereits am Menschen, an Schweinen und Ratten erhaltenen Ergebnisse zu ergänzen, wurde das Meerschweinchen als neuer Testorganismus herangezogen. Mit Hilfe ⁶⁰Co-markierter Vitamin B₁₂-Analoga wurde die Strukturspezifität der durch den Intrinsic Factor bewirkten intestinalen Vitamin B₁₂-Resorption und die sich an den Resorptionsprozeß anschließende Organ-Inkorporation getestet. Vorangehende Studien über den physiologischen Resorptionsbereich und den zeitlichen Verlauf der intestinalen B₁₂-Resorption beim Meerschweinchen ermöglichten es, diese Untersuchungen hinsichtlich der Wahl von Testdosis und Testdauer unter optimalen, d. h. physiologischen Bedingungen durchführen zu können.

Methodik

Versuchstechnik und Organaufbereitung

Die vorliegenden Untersuchungen der intestinalen Vitamin B₁₂-Resorption beim Meerschweinchen wurden mit Hilfe eines indirekten Resorptionstestes (Messung

des nicht resorbierten Radio-B₁₂ im Darminhalt und in den Faeces) und des Leber-Inkorporations-Testes (Messung der Radioaktivität der Gesamtleber im Bohrloch-Scintillations-Detektor) durchgeführt.

Die einzelnen Versuchsgruppen setzten sich aus männlichen Meerschweinchen mit einem Durchschnittsgewicht von ca. 500 g zusammen. Die Versuchstiere wurden 24 Std. vor Versuchsbeginn nüchtern gesetzt, um durch eine weitgehende Entleerung des Magen-Darm-Kanals von Nahrungsbestandteilen für alle Versuchsgruppen möglichst vergleichbare Bedingungen zu erhalten und um außerdem eine reibungslose orale Applikation der Testlösung zu ermöglichen. Das oral verabfolgte Vitamin B₁₂ bzw. die getesteten Vitamin B₁₂-Analoga waren auf biosynthetischem Wege mit ⁶⁰Co markiert worden oder wurden durch chemische Umwandlung aus ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂ gewonnen und besaßen eine spezifische Radioaktivität, die bei der jeweiligen Versuchsgruppe angegeben ist. Die orale Applikation der vorher gegebenen ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂-Testdosis erfolgte mit einer Oesophagussonde aus Gummi. Das Volumen der Belastungslösung betrug einschließlich der Nachspülflüssigkeit insgesamt ca. 8 ml. Nach der oralen Belastung wurden die Meerschweinchen einzeln in Stoffwechselkäfige gesetzt und nach 24 Std. durch Kopfschlag getötet.

Die Eviszeration erfolgte in der Weise, daß sämtliche Organe des Brust- und Bauchraumes herauspräpariert wurden. Der verbliebene Schlachtkörper wurde zur Radioaktivitäts-Messung in eine Spezial-Glasschale gebracht und in toto gemessen, jedoch konnte, wegen der für den benutzten Detektor in diesem Spezialfall nicht definierbaren geometrischen Verhältnisse, die gemessene Aktivität nicht quantitativ ausgewertet werden und wurde daher nur semiquantitativ angegeben. Dünn- und Dickdarm wurden in Segmente von ca. 5 cm Länge geteilt, der Länge nach aufgeschnitten und gründlich in isotonischer Kochsalzlösung gespült. Anschließend wurden sie abgetrocknet und dann einzeln oder zusammen ebenso wie die übrigen herauspräparierten und zerkleinerten Organe (Leber, Niere, Lunge, Milz, Nebennieren) in Bohrlochgläser zur Radioaktivitäts-Messung gebracht (vgl. unten). Vor der Radioaktivitäts-Messung erfolgte die Bestimmung des Frischgewichtes der Organe.

Die im Stoffwechselkäfig gesammelten Faeces und das Darmspülwasser wurden zusammen feucht verascht mit konz. H₂SO₄ ($d = 1,84$) unter tropfenweisem Zusatz von HNO₃ ($d = 1,4$). Von der erhaltenen Lösung, deren Volumen 60–80 ml betrug, wurden jeweils 20,0 ml zur radiometrischen Bestimmung in ein Bohrlochglas pipettiert.

Radioaktivitätsmessung

Die Messung der γ -Strahlung des ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂ und der mit ⁶⁰Co markierten Analoga erfolgte in einer hochempfindlichen Meßanordnung, bestehend aus einem kombinierten Ringbecher-Bohrloch-Scintillations-Detektor in 10 cm allseitiger Bleiabschirmung und einem Zählgerät. Der Detektor bestand aus einem direkt ohne

Lichtleiter auf eine 10-stufige großflächige Sekundärelektronen-Vervielfacher-Röhre (SEV-Röhre) vom Typ Dumont 6363 gesetzten NaJ(Tl)-Kristall von 60·60 mm ϕ in einer allseitigen Aluminium-Fassung, deren optischer Kontakt durch eine Schicht von Silikonöl DC 200 hergestellt wurde. Die Ausgangsimpulse der SEV-Röhre wurden über einem Kathodenfolger mittels Anschlußkabel einem handelsüblichen Zählgerät zugeführt.

Als Bohrlochmeßgläser dienten kaliumarme Spezialgläser mit flachem Boden, einem mittleren Außendurchmesser von 17,5 mm, einer Länge von 120 mm und einem nutzbaren Meßvolumen von 20,0 ml. Die auf einem Gehalt von ⁴⁰K beruhende Radioaktivität mancher Gläserchargen betrug bis zu 25 Ipm ($=0,4\%$ K im Glas) und wurde bei der Messung berücksichtigt. Mit dem angewandten Zählverfahren betrug bei einer Meßzeit $T_t=1$ Stde. und einem mittleren statistischen Fehler von $p=\pm 10\%$ die kleinste noch meßbare Gesamtaktivität $3,6 \cdot 10^{-11}$ C/ml. Der in meßfreien Nachtzeiten bestimmte Nulleffekt zeigte bei einer Impulsvorwahl $N_n=4 \cdot 10^5$ extreme Konstanz: $R_n=575 \pm 2$ Ipm. Bei der Messung des Probeneffektes ist die Größe der Impulsvorwahl vom Probenwert abhängig. Bei einer Impulsvorwahl für alle Proben $N_t=1 \cdot 10^4$ wurden alle Probeneffekte von $R_t < 582$ Ipm als inaktiv bezeichnet. Probeneffekte von 582 bis 619 Ipm wurden mit einer Impulsvorwahl $N_n=4 \cdot 10^4$ wiederholt. Nach dieser Messung erhaltene Probeneffekte von $R_t < 597$ Ipm wurden dann als inaktiv bezeichnet. (Ausf. Darst. bei PFAU und HEINRICH, 1959².)

Aus der gemessenen Radioaktivität und der Aktivität der ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂-Testdosis wurde die gefundene Vitamin B₁₂-Menge in Gewichtseinheiten ($1 \text{ ng} = 10^{-9} \text{ g}$) und in % der Testdosis berechnet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mittels der „t“-Verteilung nach Student statistisch ausgewertet (vgl. LINDNER³, 1945).

Ergebnisse

Bestimmung des physiologischen Vitamin B₁₂-Resorptionsbereiches beim Meerschweinchen

Um für die nachfolgenden Untersuchungen der Strukturspezifität der intestinalen Vitamin B₁₂-Resorption beim Meerschweinchen eine noch optimal meßbare und außerdem im physiologischen Resorptionsbereich liegende orale ⁶⁰Co-B₁₂-Standard-Testdosis festzulegen, wurden 7 Meerschweinchen mit 10, 30 und 50 ng ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂ oral belastet und die Leber-Inkorporation nach einem zunächst willkürlich festgelegten Zeitraum von 24 Stdn. gemessen.

Aus der obenstehenden Tab. 1 und der Abb. 2 geht hervor, daß bei einer oralen Testdosis von 10 ng Vitamin B₁₂ die relative, d. h. auf die Testdosis bezogene, Leber-Inkorporation am größten ist und im Bereich der Testdosis von 10 ng und 30 ng

Orale Testdosis [ng]	Zahl der Versuchstiere	Leber-Inkorporation	
		(absolute) in ng Vitamin B ₁₂	(relative) in % d. Testdosis
10	2	2,05	20,5
30	3	4,98	16,6
50	2	5,60	11,2

Tab. 1. Übersicht über die absolute und relative Leber-Inkorporation 24 Stdn. nach oraler Applikation von 10, 30 und 50 ng ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂ beim Meerschweinchen.

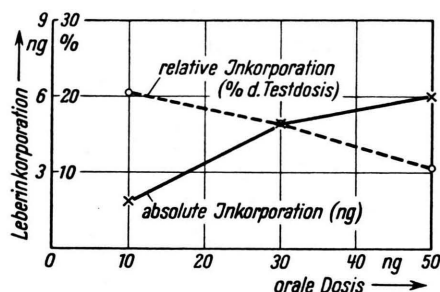


Abb. 1. Bestimmung des physiologischen Vitamin B₁₂-Resorptionsbereiches. Darstellung des Überganges in den Sättigungsbereich der Vitamin B₁₂-Resorption bei Erhöhung der oralen Vitamin B₁₂-Testdosis.

die absolute Leber-Inkorporation noch annähernd linear, proportional zur oralen Testdosis verläuft, während sich zwischen der Testdosis von 30 ng und 50 ng bereits der Übergang in den Sättigungsbereich deutlich abzeichnet.

Aus meßtechnischen und physiologischen Gründen wurde eine einheitliche orale Testdosis von 30 ng festgelegt, da hierbei mit vernünftigen Meßzeiten von < 1 Stde. bei einem mittleren statistischen Fehler von $< 10\%$ gearbeitet werden konnte.

Zeitlicher Verlauf der Vitamin B₁₂-Resorption beim Meerschweinchen

Ausgehend von der Annahme, daß nach einmaliger oraler Applikation von ⁶⁰Co-B₁₂ die Leber-Inkorporation des ⁶⁰Co-B₁₂ nach einem bestimmten Zeitraum ein Plateau erreicht und dann weiterhin keine oder eine nur geringfügige Zunahme der Inkorporation stattfindet, wurden Meerschweinchen mit 30 ng ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂ belastet und nach verschiedenen Zeitintervallen durch Kopfschlag getötet. Es wurden die Leber-Inkorporation und die ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂-Aktivität in fortlaufenden Dünndarmsegmenten von je 5 cm Länge bestimmt.

Dabei zeigte sich, daß bereits 10 Min. nach oraler

Applikation der Testdosis in den vorderen Dünndarmabschnitten, die anatomisch dem Duodenum und Jejunum entsprechen dürften, die Vitamin B₁₂-Resorption begonnen hat. Mit Verlängerung des Zeitintervalls zwischen oraler Belastung und Tötung des Tieres verschob sich das Maximum der in den einzelnen Segmenten enthaltenen ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂-Aktivität in Richtung auf weiter distal gelegene Dünndarmsegmente (Abb. 3). Nach 4 Stdn. war die Gesamtaktivität des Dünndarmes an ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂ am größten und nahm dann mit zunehmender Zeit wieder ab. Noch nach 48 Stdn. war im Dünndarm eine Radio-Vitamin B₁₂-Aktivität sicher nachweisbar (Tab. 2).

Während das Maximum der Radio-Vitamin B₁₂-Aktivität im Dünndarm bereits 4 Stdn. nach der oralen Belastung erreicht wurde, kam es in der Leber erst nach 10 Stdn. zu einem maximalen Anstieg des

Zeit nach oraler Applikation der Testdosis	Anzahl der Versuchstiere	Organ-Inkorporation (% d. Testdosis)	
		Leber	Dünndarm
10 } Min.	1	0,2	4,8
30 }	1	0,8	14,9
60 }	1	1,0	29,1
4 }	1	9,3	38,4
8 }	3	7,8	19,3
12 }	3	15,2	8,7
24 }	3	16,6	9,1
48 }	1	17,5	4,7

Tab. 2. ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂-Gehalt von Leber und Dünndarm in Abhängigkeit von dem nach der oralen Applikation der Testdosis von 30 ng ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂ verstrichenen Zeitraum.

⁶⁰Co-Vitamin B₁₂-Gehaltes, der sich auch nach längerer Zeitspanne zwischen der Durchführung der Untersuchung und der oralen Belastung (bis 48 Stdn.) nur noch unwesentlich erhöhte (Abb. 4 und

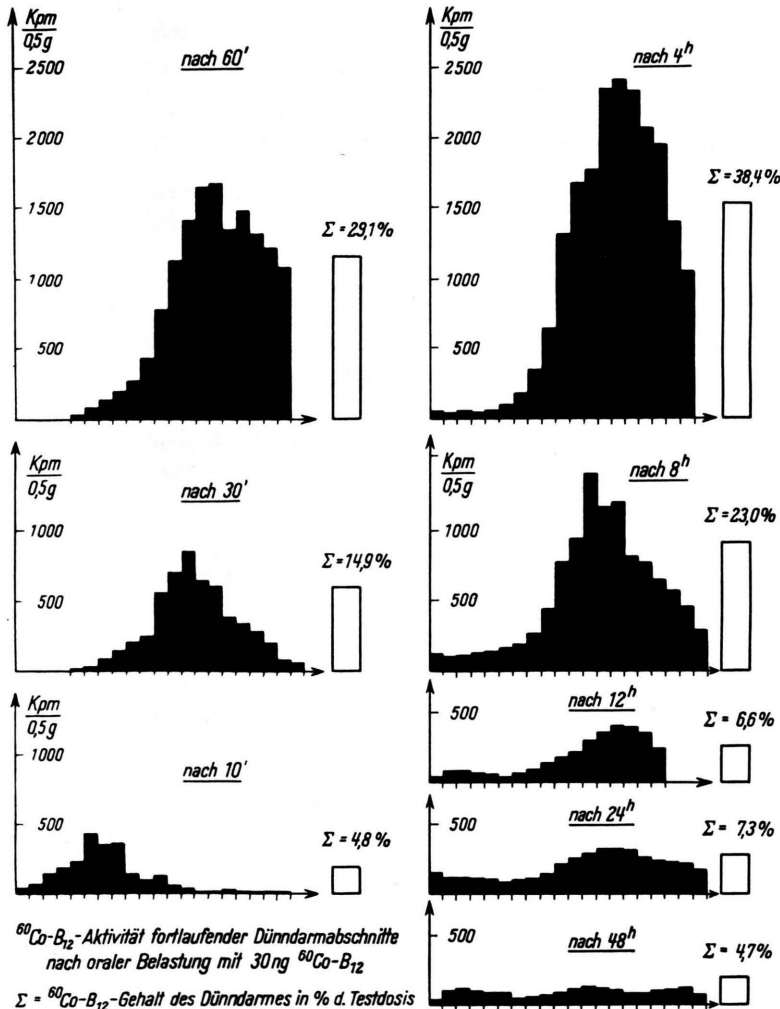


Abb. 2. ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂-Aktivität fortlaufender Dünndarmsegmente von 5 cm Länge in Abhängigkeit von der Testdauer. Orale Testdosis: 30 ng ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂. Die für die einzelnen Darmsegmente bei der Aktivitätsbestimmung im Bohrloch des Scintillations-Detektors erhaltenen Impulsfrequenzen (Impulse pro Minute = Ipm) wurden unter Berücksichtigung der für die unterschiedlichen Füllvolumina im Bohrlochmeßglas verschiedenen absoluten Wirkungsgrade (PFAU und HEINRICH, 1959)² in die tatsächlichen ⁶⁰Co-Kernumwandlungen pro Zeiteinheit (Kpm) umgerechnet und pro 0,5 ng Darmfrischgewicht angegeben.

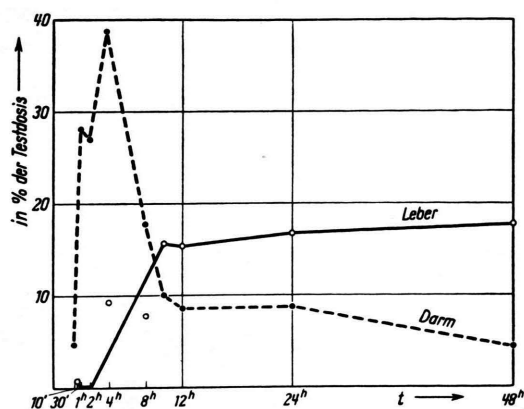


Abb. 3. Darstellung des zeitlichen Verlaufes der ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂-Inkorporation in die Leber und den Dünndarm des Meerschweinchens nach oraler Applikation von 30 ng ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂.

Tab. 2), da das Plateau der Radio-Vitamin B₁₂-Inkorporation in die Leber dann erreicht war. Als optimale Versuchsdauer vom Zeitpunkt der Belastung bis zur Tötung des Tieres wurde daher für die folgenden experimentellen Untersuchungen eine Testdauer von 24 Stdn. gewählt.

Die Strukturspezifität der intestinalen Vitamin B₁₂-Resorption beim Meerschweinchen

Für die Untersuchung der Strukturspezifität der intestinalen Vitamin B₁₂-Resorption wurden auf biosynthetischem Wege mit ⁶⁰Co markierte bzw. durch chemische Umwandlung aus ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂ gewon-

nene Vitamin B₁₂-Analoga verwendet, und zwar Dicyanocorphanamid (= Faktor B), 3.5.6-Trimethyl-Benzimidazolcyanocobamid (= B₁₂ Nm), 5.6-Dichlorbenzimidazolcyanocobamid, Benzimidazolcyanocobamid, 5-Hydroxybenzimidazolcyanocobamid (= Faktor III) und 5-Methoxybenzimidazolcyanocobamid (Faktor III_m). Die Resorption, Organ-Inkorporation, Faecesexkretion und Aktivität des Schlachtkörpers wurden gemessen und mit den entsprechenden Werten der mit ⁶⁰Co-markierten 5.6-Dimethylbenzimidazolcyanocobamid (= Vitamin B₁₂) belasteten Kontrollgruppe verglichen.

Im einzelnen betrug die Radioaktivität (1 nC = 10⁻⁹ C) der oral applizierten ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂-Analoga für

[ng]	[nC]
30 5.6-Dimethylbenzimidazolcyanocobamid (= Vit. B ₁₂)	= 3,9
30 Dicyanocorphanamid	= 21,3
30 3.5.6-Trimethylbenzimidazolcyanocobamid	= 3,5
30 5.6-Dichlorbenzimidazolcyanocobamid	= 3,5
30 Benzimidazolcyanocobamid	= 4,0
30 5-Hydroxybenzimidazolcyanocobamid	= 3,9
30 5-Methoxybenzimidazolcyanocobamid	= 3,5

Wegen der äußerst geringen Radioaktivität der oral verabfolgten noch physiologischen Testmengen konnten die Untersuchungen über die Strukturspezifität der intestinalen Vitamin B₁₂-Resorption nur mit Hilfe der oben genannten hochempfindlichen Meßanordnung durchgeführt werden.

In den Tab. 3 – 9 sind die bei den verschiedenen Testgruppen erhaltenen Endergebnisse mit dem daraus errechneten arithmetischen Mittel sowie der mitt-

Organ-Inkorporation (% d. Testdosis)											
Nr. des Tieres	Leber	Nieren	Magen	Dünndarm	Dickdarm	Lunge	Milz	Nebennieren	Schlachtkörper [Ipm]	Faeces und Darminhalt (% d. Testdosis)	Resorbiert
L ₃₆	14,9	1,6	—	2,9	0,7	0,9	0,6	—	84	—	—
L ₃₇	22,8	2,2	—	14,4	9,1	1,3	0,8	—	—	—	—
L ₃₈	24,6	1,9	—	7,8	6,4	0,7	0,7	—	99	—	—
L ₄₄	9,1	0,6	1,3	5,0	3,0	0,3	0,2	—	84	—	—
L ₄₅	13,0	0,9	1,7	5,8	4,7	0,2	0,2	—	71	—	—
L ₄₆	9,2	0,5	1,0	3,9	3,3	0,2	0,0	—	49	—	—
L ₆₄	7,3	0,2	0,5	2,0	1,7	0,0	0,0	0,0	27	72,6	27,4
L ₆₅	9,2	0,6	0,7	3,4	3,1	0,0	0,0	0,0	30	65,6	34,4
L ₆₆	13,5	0,8	1,4	6,3	3,5	0,0	0,0	0,0	86	58,0	42,0
$\bar{m} \pm s$	13,7 ±6,2	1,0 ±0,7	1,1 ±0,5	5,7 ±3,7	3,9 ±2,7	0,4 ±0,4	0,3 ±0,3	0,0	66 ±27	65,4 ±7,3	34,6 ±7,3

Tab. 3. Resorption und Organ-Inkorporation von ⁶⁰Co-5.6-Dimethylbenzimidazolcyanocobamid (= Vitamin B₁₂) 24 Stdn. nach oraler Applikation von 30 ng = 3,9 nC.

Organ-Inkorporation (% d. Testdosis)											
Nr. des Tieres	Leber	Nieren	Magen	Dünndarm	Dickdarm	Lunge	Milz	Nebennieren	Schlachtkörper [Ipm]	Faeces und Darminhalt	Resorbiert
										(% d. Testdosis)	
LE-1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	0,0	0,0	—	—	93,5	6,49
LE-2	0,2	0,0	0,10	0,2	0,2	0,1	—	—	—	93,1	6,95
LE-3	0,1	0,0	0,0	0,2	0,2	0,1	0,0	—	—	94,4	6,6
LE-4	0,2	0,0	0,0	0,4	0,4	0,6	0,1	—	—	94,1	5,9
LE-5	0,3	0,2	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0	—	—	96,7	3,3
$\bar{m} \pm s$	0,2 $\pm 0,1$	(0,03)	(0,02)	0,2 $\pm 0,1$	0,3 $\pm 0,1$	0,1 $\pm 0,1$	(0,03)	—	—	94,1 $\pm 1,5$	5,9 $\pm 1,5$

Tab. 4. Resorption und Organ-Inkorporation von ^{60}Co -Dicyanocorphanamid (= Faktor B) 24 Stdn. nach oraler Applikation von 30 ng=21,3 nC.

Organ-Inkorporation (% d. Testdosis)											
Nr. des Tieres	Leber	Nieren	Magen	Dünndarm	Dickdarm	Lunge	Milz	Nebennieren	Schlachtkörper [Ipm]	Faeces und Darminhalt	Resorbiert
										(% d. Testdosis)	
L ₆₇	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10	99,0	1,0
L ₆₈	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15	92,9	7,1
L ₆₉	0,0	0,0	0,0	0,4	0,5	0,0	0,0	0,0	12	94,0	6,0
$\bar{m} \pm s$	0,0	0,0	0,0	0,1 $\pm 0,1$	0,2 $\pm 0,2$	0,0	0,0	0,0	12 ± 3	95,3 $\pm 3,4$	4,7 $\pm 3,4$

Tab. 5. Resorption und Organ-Inkorporation von ^{60}Co -3.5.6-Trimethylbenzimidazolcyanocobamid (= B₁₂ Nm) 24 Stdn. nach oraler Applikation von 30 ng=3,5 nC.

Organ-Inkorporation (% d. Testdosis)											
Nr. des Tieres	Leber	Nieren	Magen	Dünndarm	Dickdarm	Lunge	Milz	Nebennieren	Schlachtkörper [Ipm]	Faeces und Darminhalt	Resorbiert
										(% d. Testdosis)	
L ₃₀	17,9	0,3	—	7,6	5,8	0,9	0,6	—	81	—	—
L ₃₁	7,6	0,6	—	4,5	2,1	1,3	0,8	—	54	—	—
L ₃₂	18,6	0,7	—	5,1	1,4	0,7	0,7	—	74	—	—
L ₄₇	12,9	1,2	2,2	8,4	4,5	0,5	0,4	—	65	—	—
L ₄₈	11,5	1,1	1,5	7,9	3,7	0,4	0,3	—	69	—	—
L ₅₂	17,9	0,8	1,6	8,5	5,1	0,4	0,0	0,0	74	41,0	59,0
L ₅₃	22,0	0,8	0,8	9,3	2,2	0,0	0,0	0,0	56	51,2	48,2
L ₅₄	7,4	0,7	1,3	4,7	3,9	0,0	0,0	0,0	55	59,0	41,0
$\bar{m} \pm s$	14,5 $\pm 5,4$	0,8 $\pm 0,5$	1,5 $\pm 0,7$	7,0 $\pm 1,9$	3,6 $\pm 1,6$	0,5 $\pm 0,4$	0,4 $\pm 0,4$	0,0	66 ± 10	50,4 $\pm 9,0$	49,6 $\pm 9,0$

Tab. 6. Resorption und Organ-Inkorporation von ^{60}Co -5.6-Dichlorbenzimidazolcyanocobamid 24 Stdn. nach oraler Applikation von 30 ng=3,5 nC.

leren quadratischen Streuung ($m \pm s$) für jedes B₁₂-Analogon angegeben.

Eine Gesamtübersicht über die Ergebnisse der in den einzelnen Versuchsgruppen getesteten B₁₂-Ana-

loga und zugleich eine Übersicht über die Struktur des substituierten Benzimidazolringes bei den verschiedenen B₁₂-Analoga gibt Tab. 10. Alle Ergebnisse sind in % der Testdosis angegeben.

Organ-Inkorporation (% d. Testdosis)											
Nr. des Tieres	Leber	Nieren	Magen	Dünndarm	Dickdarm	Lunge	Milz	Nebennieren	Schlachtkörper [Ipm]	Faeces und Darminhalt (% d. Testdosis)	Resorbiert
L ₂₅	14,0	2,2	—	11,6	6,2	0,8	0,0	—	109	—	—
L ₂₆	12,3	1,5	—	8,7	4,4	0,2	0,4	—	59	—	—
L ₂₇	14,6	1,2	—	6,5	4,1	0,4	0,4	—	84	—	—
L ₅₁	7,3	1,0	1,2	6,2	3,8	0,5	0,0	—	39	—	—
L ₅₅	23,6	1,4	1,5	9,9	4,8	0,3	0,0	0,0	88	37,5	62,5
L ₅₆	9,7	0,7	1,1	5,9	3,1	0,4	0,3	0,3	60	58,6	41,4
L ₅₇	19,2	1,5	1,6	9,2	3,6	0,4	0,0	0,4	70	46,5	53,5
$\bar{m} \pm s$	14,4 ±5,6	1,4 ±0,5	1,3 ±0,2	8,3 ±2,2	4,3 ±1,0	0,4 ±0,2	0,2 ±0,2	0,2 ±0,2	73 ±23	47,5 ±10,6	52,7 ±10,6

Tab. 7. Resorption und Organ-Inkorporation von ⁶⁰Co-Benzimidazolcyanocobamid 24 Stdn. nach oraler Applikation von 30 ng=4,0 nC.

Organ-Inkorporation (% d. Testdosis)											
Nr. des Tieres	Leber	Nieren	Magen	Dünndarm	Dickdarm	Lunge	Milz	Nebennieren	Schlachtkörper [Ipm]	Faeces und Darminhalt (% d. Testdosis)	Resorbiert
L ₄₁	8,5	0,9	—	4,6	2,0	0,6	0,3	0,0	95	—	—
L ₄₂	10,0	0,4	—	4,8	3,1	0,3	0,3	0,0	55	—	—
L ₄₃	7,2	0,0	—	3,1	2,1	0,3	0,0	0,0	41	—	—
L ₅₈	3,7	0,4	0,7	2,6	1,3	0,0	0,0	0,0	43	76,3	23,7
L ₅₉	7,3	0,8	0,5	4,1	1,4	0,0	0,0	0,0	52	64,8	35,2
L ₆₀	6,4	0,5	0,7	4,0	1,8	0,0	0,0	0,0	65	64,5	35,5
$\bar{m} \pm s$	7,2 ±2,1	0,5 ±0,3	0,6 ±0,1	4,9 ±1,9	1,9 ±0,7	0,2 ±0,2	0,1 ±0,1	0,0	59 ±20	68,5 ±6,5	31,5 ±6,5

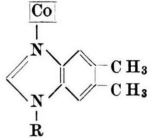
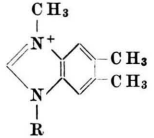
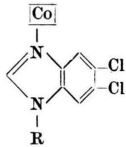
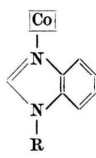
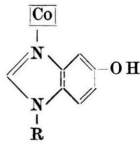
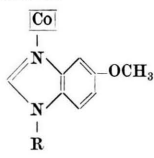
Tab. 8. Resorption und Organ-Inkorporation von ⁶⁰Co-5-Hydroxybenzimidazolcyanocobamid (Faktor III) 24 Stdn. nach oraler Applikation von 30 ng=3,9 nC.

Organ-Inkorporation (% d. Testdosis)											
Nr. des Tieres	Leber	Nieren	Magen	Dünndarm	Dickdarm	Lunge	Milz	Nebennieren	Schlachtkörper [Ipm]	Faeces und Darminhalt (% d. Testdosis)	Resorbiert
L ₂₃	18,6	1,2	—	6,6	3,5	0,5	0,0	—	122	—	—
L ₂₄	12,2	1,7	—	12,8	6,5	0,9	0,5	—	135	—	—
L ₄₀	14,5	1,9	—	9,9	5,6	0,3	0,6	—	113	—	—
L ₆₁	7,7	0,6	0,1	4,2	2,7	0,6	0,4	0,0	72	68,8	31,2
L ₆₂	10,0	0,4	1,1	3,2	3,2	0,0	0,0	0,0	51	60,1	39,9
L ₆₃	11,0	1,1	1,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	10	59,0	41,0
$\bar{m} \pm s$	12,3 ±3,8	1,2 ±0,6	0,7 ±0,5	6,2 ±4,5	3,6 ±2,3	0,4 ±0,4	0,3 ±0,3	0,0	84 ±48	62,6 ±3,4	37,4 ±3,4

Tab. 9. Resorption und Organ-Inkorporation von ⁶⁰Co-5-Methoxybenzimidazolcyanocobamid (Faktor III m) 24 Stdn. nach oraler Applikation von 30 ng=3,5 nC.

Aus den Tabellen geht hervor, daß die Leber mit Abstand den größten Teil des resorbierten Vitamin B₁₂ bzw. der Vitamin B₁₂-Analoga inkorporiert, so daß in dem unterschiedlichen Gehalt der Leber an ⁶⁰Co-B₁₂-Aktivität ein Unterschied in der Resorbierbarkeit der Vitamin B₁₂-Analoga am besten zum Ausdruck kommt.

Die Leber-Inkorporation betrug für Vitamin B₁₂

Radio-Vitamin B ₁₂ -Analoge		Organ-Inkorporation (% d. Testdosis)								Schlacht- körper [Ipm]	Faeces u. Darminhalt % d. Testdosis	Resorption
orale Testdosis	Struktur der Benzimidazol- gruppe	Leber	Nieren	Magen	Dün- darm	Dick- darm	Lunge	Milz	Neben- nieren			
5.6-Dimethyl-benzimidazol- cyanocobamid (= Vit. B ₁₂) 30 ng = 3,9 nC		13,7 ±6,2	1,0 ±0,7	1,1 ±0,7	5,7 ±3,7	3,9 ±2,7	0,4 ±0,4	0,3 ±0,3	0,0	66 ±27	65,4 ±7,3	34,6 ±7,3
Dicyanocorphanamid (= Fakt. B) 30 ng = 21,3 nC		0,2 ±0,1	0,0	0,0	0,2 ±0,1	0,3 ±0,1	0,1 ±0,1	0,0	—	—	94,1 ±1,5	5,9 ±1,5
3.5.6-Trimethyl-benzimidazol- cyanocobamid (= B ₁₂ N _m) 30 ng = 3,5 nC		0,0	0,0	0,0	0,1 ±0,1	0,2 ±0,2	0,0	0,0	0,0	12 ±3	95,3 ±3,4	4,7 ±3,4
5.6-Dichlor-benzimidazol- cyanocobamid 30 ng = 3,5 nC		14,5 ±5,4	0,8 ±0,5	1,5 ±0,7	7,0 ±1,9	3,6 ±1,6	0,5 ±0,4	0,4 ±0,4	0,0	66 ±10	50,4 ±9,0	49,6 ±9,0
Benzimidazol- cyanocobamid 30 ng = 4,0 nC		14,4 ±5,6	1,4 ±0,2	1,3 ±0,2	8,3 ±2,2	4,3 ±1,0	0,4 ±0,2	0,2 ±0,1	0,2 ±0,2	73 ±23	47,5 ±10,6	52,7 ±10,6
5-Hydroxy-benzimidazol- cyanocobamid (= Fakt. III) 30 ng = 3,9 nC		7,2 ±2,1	0,5 ±0,3	0,6 ±0,1	4,9 ±1,9	1,9 ±0,7	0,2 ±0,2	0,1 ±0,1	0,0	59 ±20	68,5 ±6,5	31,5 ±6,5
5-Methoxy-benzimidazol- cyanocobamid = Fakt. III _m) 30 ng = 3,5 nC		12,3 ±3,8	1,2 ±0,6	0,7 ±0,5	6,2 ±4,5	3,6 ±2,3	0,4 ±0,4	0,3 ±0,3	0,0	84 ±48	62,6 ±3,4	37,4 ±3,4

Tab. 10. Vergleichende Übersicht über die Strukturspezifität der intestinalen Vitamin B₁₂-Resorption (Organ-Inkorporation und Resorption der ⁶⁰Co-B₁₂-Analoge; $m \pm s$).

= 13,7%, 5.6-Dichlorbenzimidazolcyanocobamid für 5-Methoxybenzimidazolcyanocobamid 12,3% der
= 14,5%, Benzimidazolcyanocobamid 14,4% und Testdosis und lag damit bei diesen Vitamin B₁₂-Ana-

Oral verabfolgte Testdosis an Radio-Vitamin B ₁₂ -Analoga: 30 ng	Leber-Inkorporation		Statist. Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe
	in % d. Testdosis ($\bar{m} \pm s$)	in % d. Kontroll- gruppe	
5.6-Dimethylbenzimidazol- cyanocobamid (= Vitamin B ₁₂)	13,7 $\pm$ 6,2	100,0	—
Dicyanocorphanamid (= Faktor B)	0,2 $\pm$ 0,1	1,5	$P < 0,001$
3.5.6-Trimethylbenzimidazol- cyanocobamid (= B ₁₂ Nm)	0,0	0,0	$P < 0,001$
5.6-Dichlorbenzimidazol- cyanocobamid	14,5 $\pm$ 5,4	106,0	kein signifk. Unterschied
Benzimidazolcyanocobamid	14,4 $\pm$ 5,6	105,1	kein signifk. Unterschied
5-Hydroxybenzimidazol cyanocobamid (= Faktor III)	7,2 $\pm$ 2,1	52,5	$P < 0,05$; gegenüber Faktor IIIIm: $P < 0,05$
5-Methoxybenzimidazol- cyanocobamid (= Faktor IIIIm)	12,3 $\pm$ 3,8	90,0	kein signifk. Unterschied

Tab. 11. Signifikanz der Unterschiede mit dem ⁶⁰Co-B₁₂-Leber-Inkorporationstest bestimmten intestinalen Resorption ⁶⁰Co-markierter Benzimidazol-B₁₂-Analoga.

loga in der gleichen Größenordnung. Bei statistischer Auswertung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Dagegen betrug die für das inkomplette Vitamin B₁₂-Analogon Dicyanocorphanamid im Leber-Inkorporationstest nachweisbare Radioaktivität in der Leber nur 0,2% der applizierten Testdosis, für das 3.5.6-Trimethylbenzimidazolcyanocobamid war eine Leber-Inkorporation überhaupt nicht nachweisbar. Der Gehalt von Faeces und Darmspülwasser an diesen beiden nicht resorbierten Vitamin B₁₂-Analoga zeigte keinen signifikanten Unterschied und betrug etwa 95% der Testdosis.

Das 5-Hydroxybenzimidazolcyanocobamid wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe in wesentlich geringerem Ausmaß resorbiert und in die Leber inkorporiert = 7,2% der Testdosis. Die sowohl gegenüber der B₁₂-Kontrollgruppe als auch der mit 5-Methoxybenzimidazolcyanocobamid belasteten Versuchs-

gruppe geringere Leber-Inkorporation des 5-Hydroxybenzimidazolcyanocobamides war in beiden Fällen bei $P < 0,05$ statistisch signifikant.

Eine zusammenfassende Darstellung der Leber-Inkorporation der getesteten Vitamin B₁₂-Analoga gibt Abb. 4.

In der folgenden Tabelle sind noch einmal die Ergebnisse der Leber-Inkorporation für die einzelnen Vitamin B₁₂-Analoga zusammengestellt und werden mit der Kontrollgruppe (= 100,0) verglichen unter Angabe der statistischen Signifikanz (vgl. Tab. 11).

Die Unterschiede in der Inkorporation der ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂-Analoga in Nieren, Dünndarm und Dickdarm als Folge der Strukturspezifität der intestinalen Resorption waren nicht so ausgeprägt wie bei der Leber. Abgesehen von Dün- und Dickdarm ent-

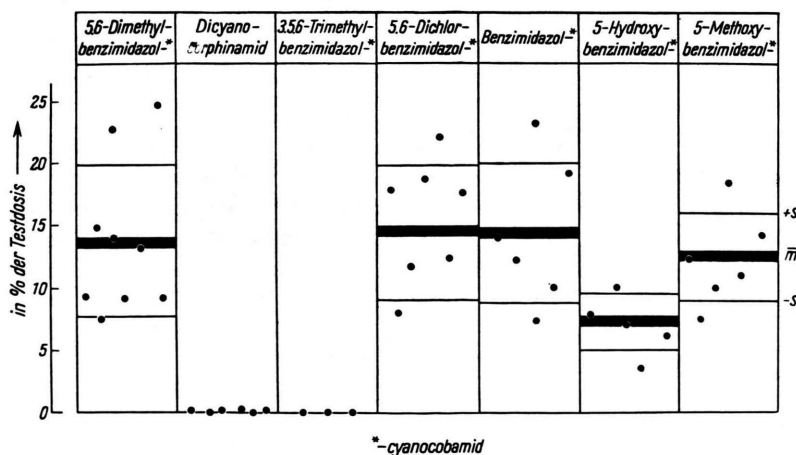


Abb. 4. Strukturspezifität der intestinalen Vitamin B₁₂-Resorption beim Meerschweinchen (⁶⁰Co-B₁₂-Leber-Inkorporation, 24 Stdn. nach oraler Gabe von 30 ng ⁶⁰Co-B₁₂-Analogon; arithm. Mittel $\bar{m} \pm s$ (=mitt. quadr. Streuung).

hielten die Nieren noch einen gewissen, wenn auch geringen Anteil der resorbierten Vitamin B₁₂-Analoga, der bei Vitamin B₁₂, Dichlorbenzimidazolcyanocobamid, Benzimidazolcyanocobamid und 5-Methoxybenzimidazolcyanocobamid etwa 1,0% der Testdosis betrug, während bei Dicyanocorphanamid und bei 3.5.6-Trimethylbenzimidazolcyanocobamid keine Nieren-Inkorporation nachzuweisen war. Die ⁶⁰Co-Aktivität von Dünndarm und Dickdarm entsprachen den für die einzelnen Vitamin B₁₂-Analoga an der Leber gefundenen Verhältnissen (Abb. 6).

Da in Magen, Lunge und Milz nur sehr geringe Mengen an ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂-Analoga nachgewiesen werden konnten, war an diesen Organen eine unterschiedliche Inkorporation der einzelnen Analoga kaum zu erkennen. Die Nebennieren zeigten weder für ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂ noch für eines der Vitamin B₁₂-Analoga eine Inkorporation.

gesprochene Strukturspezifität der intestinalen B₁₂-Resorption bedingt wird.

Diskussion

Da für das Meerschweinchen keine Unterlagen über den Vitamin B₁₂-Stoffwechsel vorlagen, wurden durch die Untersuchungen des physiologischen Resorptionsbereiches und des zeitlichen Verlaufes der Vitamin B₁₂-Resorption erst die experimentellen Voraussetzungen für die folgenden Studien über die Strukturspezifität der intestinalen Vitamin B₁₂-Resorption geschaffen.

TAYLOR und Mitarbb. (1958)⁴ untersuchten die intestinale Resorption steigender Vitamin B₁₂-Mengen bei Ratten und konnten zeigen, daß bei einer oralen Dosis von 1,0–10,0 ng die intestinale Resorption linear zur Testdosis anstieg. Bei einer Test-

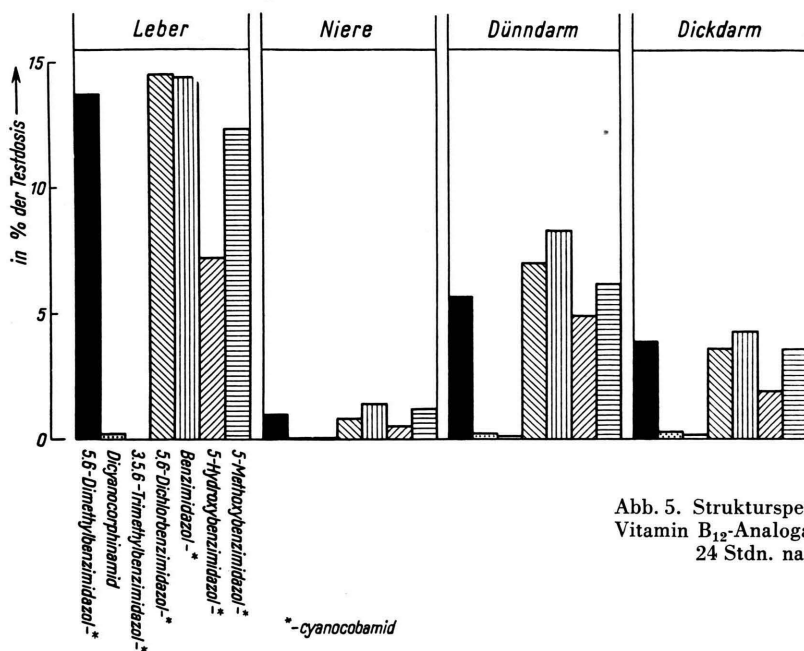


Abb. 5. Strukturspezifität der Organ-Inkorporation von ⁶⁰Co-Vitamin B₁₂-Analoga in Leber, Nieren, Dünndarm und Dickdarm 24 Std. nach oraler Applikation von 30 ng.

Insgesamt gesehen kann gesagt werden, daß der Verteilungsmodus der Inkorporation der verschiedenen B₁₂-Analoga in Nieren, Dünndarm und Dickdarm mit dem Einlagerungsschema in die Leber qualitativ und semiquantitativ identisch ist und somit allein durch die auch beim Meerschweinchen aus-

dosis von 100 ng war der Sättigungsbereich der intestinalen B₁₂-Resorption erreicht. Damit ist eine Parallele gegeben zu den am Meerschweinchen gemachten Beobachtungen, und es dürfte erwiesen sein, daß die für die weiteren Untersuchungen am Meerschweinchen festgesetzte ⁶⁰Co-B₁₂-Testdosis von 30 ng

¹ „Vitamin B₁₂ u. Intrinsic Factor, 1956“, 1. Europäisches Symposium, Hamburg, 23.–26. 5. 1956, F. Enke-Verlag, Stuttgart 1957.

² A. PFAU u. H. C. HEINRICH, *Atompraxis* 5, 14 [1959]; 5, 100 [1959]; 5, 160 [1959].

³ A. LINDNER, *Statist. Meth. f. Naturwiss. Med. Ing.*, Basel 1945.

⁴ K. B. TAYLOR, B. J. MALLETT, L. J. WITTS u. W. H. TAYLOR, *Brit. J. Haem.* 4, 63 [1958].

im physiologischen Bereich der intestinalen Vitamin B₁₂-Resorption für Versuchstiere dieser Größe liegt.

Während beim Meerschweinchen 4 Stdn. nach oraler Gabe der ⁶⁰Co-B₁₂-Testdosis eine maximale B₁₂-Inkorporation in den Dünndarm zu beobachten war, konnten LATNER und RAINE (1956)⁵ an der Ratte bereits 15 Min. nach oraler Applikation von 15 ng ⁶⁰Co-B₁₂ einen maximalen Anstieg des ⁶⁰Co-B₁₂-Gehaltes des Dünndarmes zeigen. Ähnliche Untersuchungen von VULLEMIN-WEIS (1957)⁶ an Ratten mit einer allerdings bereits unphysiologisch hohen B₁₂-Testdosis von 100 ng ergaben, daß nach 1 Stde. die in der Wand des Dünndarmes befindliche ⁶⁰Co-B₁₂-Aktivität am größten ist. Abgesehen von der zeitlichen Verschiebung der Maxima der B₁₂-Dünndarm-Inkorporation bei Meerschweinchen und Ratte, stimmt der weitere Verlauf der mit zunehmender Testdauer ansteigenden B₁₂-Leber-Inkorporation und des synchron zu ihr abnehmenden ⁶⁰Co-B₁₂-Gehaltes der Dünndarmwand beider Tierspecies gut überein. Sowohl beim Meerschweinchen als auch bei der Ratte geht die B₁₂-Leber-Inkorporation bereits vor Ablauf von 24 Stdn. nach oraler Gabe der B₁₂-Testdosis in ein Plateau über, das sich mit längerer Testdauer nur noch unwesentlich erhöht. Wie aus der Abb. 2 hervorgeht, findet die intestinale Vitamin B₁₂-Resorption im gesamten Dünndarm statt, allerdings verschiebt sich das Maximum des ⁶⁰Co-B₁₂-Gehaltes in der Wand des Dünndarmes mit zunehmender Testdauer nach distal.

Bereits 60 Min. nach oraler Gabe der ⁶⁰Co-B₁₂-Testdosis ist der ⁶⁰Co-B₁₂-Gehalt der distalen Dünndarmabschnitte höher als der proximalen, so daß sich die intestinale B₁₂-Resorption bevorzugt an den Darmabschnitten abzuspielen scheint, die anatomisch dem Ileum entsprechen dürften. REYNELL und Mitarbb. (1957)⁷ konnten an Ratten zeigen, daß die intestinale Vitamin B₁₂-Resorption ebenfalls im gesamten Intestinum stattfindet, aber das 2. und 3. Viertel des in 4 Segmente geteilten Dünndarmes anscheinend bevorzugt werden.

Beim Menschen konnten CITRIN und Mitarbb. (1957)⁸ nach Applikation von 0,5 µg ⁶⁰Co-B₁₂ durch

eine Sonde in das Duodenum, Jejunum und Ileum mit Hilfe des Radio-B₁₂-UET in jedem Fall eine ausreichende B₁₂-Resorption bei Gesunden und nach Intrinsic Factor-Zusatz auch bei Perniciosa-Patienten beobachten, während nach rektaler Applikation von 0,5 – 3,0 µg ⁶⁰Co-B₁₂ auch bei Intrinsic Factor oder Antibiotica-Zusatz keine B₁₂-Resorption nachzuweisen war. BOOTH und MOLLIN (1957/1959)⁹ beobachteten, daß bei Patienten mit mehr oder weniger vollständig reseziertem Ileum die intestinale B₁₂-Resorption stark herabgesetzt und durch Intrinsic Factor- oder Aureomycin-Zugabe nicht normalisierbar war, während durch Resektion des Jejunums die B₁₂-Resorption nicht gestört wurde. Demnach scheint die intestinale B₁₂-Resorption beim Menschen überraschenderweise auf den distalen Dünndarm beschränkt zu sein.

JACKSON und Mitarbb. (1955)¹⁰ beobachteten nach direkter ⁶⁰Co-B₁₂-Injektion in das Caecum von Hennen, daß höchstens 8% der allerdings unphysiologisch hohen Testdosis (4 und 15 µg ⁶⁰Co-B₁₂) aus dem Caecum resorbiert und zu einem sehr geringen Teil in Leber und Nieren eingelagert werden. Auch beim Meerschweinchen konnte nach Injektion einer Testdosis von 100 ng ⁶⁰Co-B₁₂ in das Caecum eine extrem niedrige Leber-Inkorporation von 0,1% der Testdosis beobachtet werden (HEINRICH und STAACK, 1959)¹¹.

Es kann somit grundsätzlich gesagt werden, daß bei warmblütigen Wirbeltieren eine B₁₂-Resorption im gesamten Dünndarm möglich ist, wobei aber das Ileum gegenüber den weiter proximal gelegenen Dünndarmabschnitten bevorzugt wird. Dagegen ist im Dickdarm eine nennenswerte Vitamin B₁₂-Resorption nicht möglich.

Die Abhängigkeit der Resorbierbarkeit des Vitamin B₁₂-Moleküles von der Struktur des Benzimidazolringes konnte auch von anderen Untersuchern beobachtet werden. Mit Hilfe des kombinierten Radio-Vitamin B₁₂-Faeces-Urin-Exkretionstestes konnte HEINRICH (1958)¹² zeigen, daß beim Menschen das Dichlorbenzimidazolcyanocobamid fast so

⁵ A. L. LATNER u. L. RAINE, „Vitamin B₁₂ und Intrinsic Factor“, 1. Europäisches Symposium, Hamburg 1956, S. 243 (1957).

⁶ J. VULLEMIN-WEIS, Diss., Nancy 1957.

⁷ P. C. REYNELL, G. H. SPRAY u. K. B. TAYLOR, Clin. Sci. **16**, 663 [1957].

⁸ Y. CITRIN, C. DE ROSA u. J. A. HALSTED, J. Lab. clin. Med. **50**, 667 [1957].

⁹ C. C. BOOTH, J. CHANARIN, B. B. ANDERSON u. D. L. MOLLIN,

Brit. J. Haem. **3**, 253 [1957]; C. C. BOOTH u. D. L. MOLLIN, Lancet **2**, 18 [1959].

¹⁰ J. T. JACKSON, G. F. MAUGAN, L. J. MACHLINE u. CH. A. DENTON, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **89**, 255 [1955].

¹¹ H. C. HEINRICH u. M. STAACK, unveröffentlichte Ergebnisse 1959.

¹² H. C. HEINRICH, Naturwissenschaften **45**, 269 [1958]; H. C. HEINRICH, Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. **9**, 385 [1958].

gut wie Vitamin B₁₂ resorbiert wird, während B₁₂ Nm, für das beim Meerschweinchen keine intestinale Resorption gefunden wurde, um den Faktor 5 schlechter resorbiert wird. Außerdem war die intestinale Resorption des an der 5-Position mit einer phenolischen OH-Gruppe am Benzimidazolring substituierten Faktors III stark herabgesetzt (auf 25% im Vergleich zu Vitamin B₁₂) und konnte durch Maskierung der phenolischen OH-Gruppe mit einer CH₃-Gruppe um das Dreifache gesteigert werden. Das Benzimidazolcyanocobamid wurde zwar ebenfalls gut resorbiert (Faeces-Exkretionstest), jedoch wurde durch eine nur teilweise erfolgende Ausschwemmung nach einer Sättigungs- und Ausschwemmungsdosis von 3·1 mg Vitamin B₁₂ im Harn (Urinexkretion) eine geringere Resorption vorgetäuscht.

ROSENBLUM und Mitarb. (1955, 1956, 1957)¹³⁻¹⁵ konnten zeigen, daß für die intestinale Resorption des Vitamin B₁₂-Moleküles die am zentralen Co-Atom befindliche CN-Gruppe unerläßlich ist und fanden außerdem, daß der Ersatz der beiden CH₃-Gruppen in 5.6-Position des Benzimidazolringes durch 2 Cl-Atome die Resorption des B₁₂-Moleküles um 30–50% herabsetzt.

Auf Grund der vorliegenden experimentellen Ergebnisse kann gesagt werden, daß für eine vollständige Resorption des Vitamin B₁₂-Moleküles die koordinative Bindung zwischen dem N₃ des Benzimidazolringes und dem zentralen Co-Atom erhalten sein muß. Durch Substitution des Benzimidazolringes in 5-Position mit einer phenolischen OH-Gruppe wird die Vitamin B₁₂-Resorption erheblich herabgesetzt, kann aber durch Maskierung der OH-Gruppe mit einer CH₃-Gruppierung wieder wesentlich gesteigert werden.

Hinsichtlich der Resorption von Dicyanocorphanamid und 3.5.6-Trimethylbenzimidazolcyanocobamid stimmen die Ergebnisse am Meerschweinchen und am Menschen nicht völlig überein. Während am Menschen die allerdings sehr geringe Resorption dieser beiden Vitamin B₁₂-Analoga für das 3.5.6-Trimethylbenzimidazolcyanocobamid etwas besser war als beim Dicyanocorphanamid, liegen die Verhält-

nisse beim Meerschweinchen gerade umgekehrt, insofern, als sich für das 3.5.6-Trimethylbenzimidazolcyanocobamid überhaupt keine und für das Dicyanocorphanamid nur eine minimale Leber-Inkorporation nachweisen ließ. Da die spezifische Radioaktivität des Dicyanocorphanamids etwa um den Faktor 5 größer als die des 3.5.6-Trimethylbenzimidazolcyanocobamides war, dürfte die Ursache dieser divergierenden Ergebnisse in der Erreichung der Grenze der Empfindlichkeit unserer Meßanordnung für derartig geringe Aktivitäten im Falle des 3.5.6-Trimethylbenzimidazolcyanocobamides liegen.

Zur Klärung der Frage, ob die Strukturspezifität der intestinalen Vitamin B₁₂-Resorption auf einer unterschiedlichen Bindung der einzelnen Analoga beruht, sind von HEINRICH und Mitarb. (1958)¹⁶ radio-papierchromatographische Untersuchungen angestellt worden, wobei die „in vitro“-Bindung von Vitamin B₁₂-Analoga an rohe und gereinigte Intrinsic Factor-Präparate untersucht wurde. Die Untersuchungen ergaben, daß alle getesteten Vitamin B₁₂-Analoga in gleicher Weise gebunden wurden, so daß sich keine qualitativen und quantitativen Unterschiede feststellen ließen. Das würde bedeuten, daß die Ursache der Strukturspezifität der intestinalen Vitamin B₁₂-Resorption nicht von der Bindungsfähigkeit an Intrinsic Factor abhängig ist, sondern auf einem möglicherweise in der Darmschleimhaut lokalisierten noch unbekannten Mechanismus beruhen könnte, dem eine hohe Spezifität in der Auswahl der angebotenen Vitamin B₁₂-Strukturen zuzuschreiben wäre. Damit ist eine Parallele gegeben zwischen dem schon vor Jahren aufgefundenen und inzwischen vielfach bestätigten Fehlern einer Korrelation zwischen biologischer Aktivität und Vitamin B₁₂-Bindungsfähigkeit roher und gereinigter Intrinsic Factor-Konzentrate [Übersicht bei HEINRICH und LAHANN (1954)¹⁷; WIJMENA (1956)¹⁸].

Die Strukturspezifität der Vitamin B₁₂-Resorption ist auch von Bedeutung für die Frage der Verwertbarkeit von durch endogene Biosynthese im Darm entstandenen kompletten und inkompletten Vitamin B₁₂-Faktoren. Im Gegensatz zu den Darmbakterien, die in ihrem Vitamin B₁₂-Bedürfnis struk-

¹³ CH. ROSENBLUM, D. T. WOODBURY, J. P. GILBERT, K. OKUDA u. B. F. CHOW, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **89**, 63 [1955].

¹⁴ CH. ROSENBLUM, R. S. YANAMOTO, R. WOOD, D. T. WOODBURY, K. OKUDA u. B. F. CHOW, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **91**, 364 [1956].

¹⁵ CH. ROSENBLUM, R. L. DAVIS u. B. F. CHOW, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **95**, 30 [1957].

¹⁶ H. C. HEINRICH, G. RÄDEL u. R. SKIBBE, Rad. Isotop. Klin. Forsch. **III**, 218 [1958].

¹⁷ H. C. HEINRICH u. H. LAHANN, Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. **6**, 126 [1954].

¹⁸ H. G. WIJMENA, „Vitamin B₁₂ und Intrinsic Factor“, 1. Europäisches Symposium, Hamburg 1956, S. 156 (1957).

turell nicht sehr spezialisiert sind, kann beim Menschen und bei anderen Wirbeltierorganismen das essentielle Vitamin B₁₂-Bedürfnis nur mit einer kleinen Zahl von Vitamin B₁₂-Analoga befriedigt werden. Da die Vitamin B₁₂-Resorption beim Wirbeltierorganismus hochgradig strukturspezifisch ist und die Darmbakterien vorwiegend für den Wirtsorganismus nicht verwertbare Vitamin B₁₂-Faktoren produzieren, außerdem die vom Intrinsic Factor abhängige Vitamin B₁₂-Resorption im Dünndarm stattfindet im Gegensatz zu der im Caecum lokalisierten bakteriellen Biosynthese, kann der Vitamin B₁₂-Bedarf des Menschen und anderer Wirbeltierorganismen wohl kaum auf dem Wege einer endogenen Vitamin B₁₂-Synthese durch die Darmflora gedeckt werden.

Wenn auch nach den vorliegenden Ergebnissen die Nichtverwertbarkeit der endogen gebildeten Vitamin B₁₂-Strukturen für die Deckung des Vitamin

B₁₂-Bedarfes des Menschen und des Säugetierorganismus geklärt sein dürfte, so ist die Bedeutung ihres Vorkommens im Darm jedoch noch weitgehend ungeklärt. Es wird der Gegenstand zukünftiger Forschungen sein, festzustellen, inwieweit den vom Wirtsorganismus nicht resorbierbaren, intestinal biosynthetisierten Vitamin B₁₂-Analoga eine Bedeutung als essentielle und regulativ auf die übrige, den Vitaminhaushalt des Wirtes beeinflussende Darmflora wirkende Biotika zukommt.

Den Herren Dr. CH. ROSENBLUM und Dr. H. MOLITOR (Forschungslaboratorien Merck & Co., Rahway/N.J., USA) verdanken wir die freundliche Überlassung biosynthetisch markierter Vitamin B₁₂-Analoga und den Herren Prof. K. BERNHAUER und Dr. W. FRIEDRICH (Aschaffburger Zellstoffwerke, Stockstadt/Main) die chemische Umwandlung einiger Vitamin B₁₂-Analoga. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die gewährte Sachbeihilfe.

Chemische und elektronenoptische Untersuchungen über die Reaktion von Chrom (III)-komplexen mit Kollagen

VON K. KÜHN UND ELISABETH GEBHARDT

Aus dem Eduard-Zintl Institut der Technischen Hochschule Darmstadt

(Z. Naturforsch. 15 b, 23—30 [1960]; eingegangen am 20. November 1959)

Kollagenfibrillen zeigen nach Behandeln mit gerbenden Chrom(III)komplexen im Elektronenmikroskop ein unterteiltes Querstreifungsmuster.

Es wird gezeigt, daß dabei die Ausbildung der Querstreifen auf eine ordnende Quervernetzung der Protofibrillen über die Seitenketten der sauren Aminosäuren zurückzuführen ist.

Kollagenfibrillen zeigen sowohl nach Behandeln mit Phosphorwolframsäure (PWS) als auch nach Behandeln mit gerbend wirkenden Chrom(III)-salzlösungen im Elektronenmikroskop eine hochunterteilte Querstreifung¹. Die relativen Lagen der einzelnen Querstreifen längs der Periode sind nach PWS- und nach Chrombehandlung gleich², obwohl die PWS eine Polysäure ist, während die für die Gerbung bevorzugten Sulfatochrom(III)-komplexe Polybasen sind und obwohl bei PWS-Behandlung über zehnmal mehr Masse eingelagert wird als bei Behandlung mit Chrom(III)-salzlösungen^{1,3}.

Nach Untersuchungen von KÜHN, GRASSMANN und HOFMANN¹ über die Bindung der PWS an Kollagen

ist die Ausbildung einer unterteilten Querstreifung nicht so sehr ein Masseffekt, durch die Einlagerung von Kontrastmitteln in die Dunkelteile verursacht, sondern mehr ein Ordnungseffekt.

Die Grundeinheiten oder die dünnsten Fibrilleneinheiten des Kollagens bestehen nach den Vorstellungen von RICH und CRICK⁴ sowie COWAN und MCGAVIN⁵ aus drei zusammengewundenen Polypeptidspiralen, die durch Wasserstoffbrücken-Bindungen miteinander verbunden sind und deren Aminosäure-Seitenketten nach außen ragen. Diese dünnsten Fasereinheiten des Kollagens werden nach SCHMITT „Protofibrillen“ genannt⁶. Die Aminosäuren sind längs der Peptidketten der Protofibrillen so

¹ K. KÜHN, W. GRASSMANN u. U. HOFMANN, Z. Naturforsch. 13b, 154 [1958].

² K. KÜHN, U. HOFMANN u. W. GRASSMANN, Naturwissenschaften 45, 521 [1958].

³ K. KÜHN, Leder 9, 217 [1958].

⁴ A. RICH u. F. H. C. CRICK, Nature [London] 176, 915 [1955].

⁵ P. M. COWAN u. S. MCGAVIN, Nature [London] 176, 501 [1955].

⁶ F. O. SCHMITT, C. E. HALL u. M. A. JAKUS, J. cellular comp. Physiol. 20, 11 [1942].