

the protein repair accompanying cell multiplication by means of substances having an affinity for proteins. This was done to effect a condensation of protein elements before they reach the tumor, thus producing a return to the normal concentration of the free protein fraction, and, at the same time, a decrease in the turnover of these elements through the tumor. Electrophoretic measurements made with the TISELIUS apparatus have made it possible to follow protein affinity and to suggest the synthesis of compounds containing quinone and imine groups which may prove valuable in future investigations along these lines.

## STUDIORUM PROGRESSUS

### Über die Beziehungen zwischen Insulin und Zink in den Langerhansschen Inseln des Pankreas

Mit besonderer Berücksichtigung der blutzuckergesteuerten Insulinsekretion

Von H. MASKE<sup>1</sup>, München

Der Blutzucker wird im Wirbeltierorganismus konstant gehalten. Stärkere Abweichungen in der einen oder anderen Richtung bedingen Störungen der normalen Funktion. Einer der wichtigsten Faktoren zur Aufrechterhaltung der Blutzuckerkonstanz ist das Insulin. Das Wechselspiel zwischen Blutzuckerniveau und Sekretion des den Blutzucker senkenden Hormons ist seit langem Gegenstand der Diskussion. Im Laufe der Jahre wechselte die Ansicht über den Auslöser der Insulinsekretion mehrmals. Ein humoraler Mechanismus wurde von STAUB<sup>2</sup> und POLLAK<sup>3</sup> bereits 1921 bzw. 1923 vermutet. Den unmittelbaren Einfluss der Blutglukose auf die Insulinsekretion konnten GRAFE und MEYTHALER<sup>4</sup> als erste experimentell beweisen. GAYE<sup>5</sup>, FOGLIA und FERNANDEZ<sup>6</sup> zeigten am entnervten, homöotransplantierten Pankreas, dass dieser Einfluss ohne den Umweg über das Nervensystem ausgeübt wird. Zu derselben Zeit wiesen LA BARRE<sup>7</sup> und Mitarbeiter an Hand von komplizierten Tierversuchen eine unmittelbare Vaguswirkung auf die Insulinsekretion nach. Die inselspezifische Wirkung von Hypophysen-Vorderlappen-Injektionen (YOUNG<sup>8</sup>) fand ihre Aufklärung durch Untersuchungen insbesondere von LUKENS und Mitarbeitern<sup>9</sup> dahin-

gehend, dass HVL den Blutzucker erhöht und auf diesem Weg eine Insulinsekretion bis zur Erschöpfung und Zerstörung der  $\beta$ -Zellen erzwingt. Der unmittelbare Einfluss der Blutglukose auf die Inseln wurde von einer Reihe weiterer Autoren mit den verschiedensten Methoden bestätigt. Bemerkenswert erscheint in diesem Zusammenhang der direkte Nachweis des vermehrt abgegebenen Insulins im Blut durch ANDERSON, 1953. Ohne Zweifel besitzt der Organismus die Möglichkeit, die Insulinsekretion auch über das Nervensystem zu beeinflussen; der unmittelbaren Wechselbeziehung zwischen Blutzucker und Inseln scheint jedoch eine grössere Bedeutung zuzukommen. Die dabei in den Inselzellen ablaufenden Vorgänge sind bisher nicht diskutiert worden. Es besteht auch keine Möglichkeit, Vergleiche mit anderen endokrinen Drüsen anzustellen, da über intrazelluläre Stoffwechselprozesse bei der Inkretabgabe so gut wie nichts bekannt ist. Neuere, zum Teil eigene Arbeiten über das Verhalten des in den Inseln histochemisch nachweisbaren Zinks und über die Natur der Inselzellgranula erlauben es, die intrazellulären Vorgänge bei der blutzuckergesteuerten Insulinabgabe auf der Basis der bekannten chemischen Beziehungen zwischen Insulin und Zink zu diskutieren.

Als Beweise für die inkretorische Natur der Inseln lassen sich die folgenden Tatsachen anführen: die Insulingewinnung aus dem Pankreas, insbesondere aus den isolierten Inseln verschiedener Knochenfische, die Diabetesentstehung nach der selektiven Zerstörung der  $\beta$ -Zellen durch Alloxan und die Beseitigung des Hyperinsulinismus durch Entfernung von Inseladenomen. Zahlreiche anatomische bzw. histologische Untersuchungen haben sich mit den mikroskopisch darstellbaren Veränderungen der Inseln unter den verschiedensten Stoffwechselbedingungen befasst<sup>1</sup>. Es zeigte sich, dass die sogenannten  $\beta$ -Zellen und das Insulin in ihrem Verhalten enge Beziehungen zeigen. Die Zellgranula besitzen ähnliche chemische Eigenschaften wie Insulin; sie sind im Gegensatz zu den  $\alpha$ -Zellgranula in 70%igem Alkohol löslich und werden durch wässriges Chromsublimat gefällt<sup>2</sup>. Mehrtägiges Hungern, kohlenhydratarmer Kost und Insulininjektionen reduzieren sowohl die Zahl der  $\beta$ -Zellgranula als auch die Menge des aus der Drüse extrahierbaren Insulins<sup>3</sup>. An teilweise pankreatektomierten Tieren wurde gezeigt, dass die Inseln des Restpankreas zu einer Leistungssteigerung befähigt sind, die ein Mehrfaches beträgt. Dasselbe zeigt sich im Verlauf von längerdauernden Kohlenhydratbelastungen der Versuchstiere durch Glukoseinfusionen und nach Anwendung von Insulinantagonisten, zum Beispiel ACTH oder Wachstumshormon. Allerdings besitzt die Leistungsfähigkeit der Inseln eine Grenze, nach deren Überschreitung es durch Überanstrengung zur Erschöpfung und anschliessend zu reversiblen oder irreversiblen Schäden der Inselzellen mit Funktionsstörungen im Sinne eines Diabetes kommt. Bei verschiedenen experimentellen Diabetesformen und beim menschlichen Diabetes von

<sup>1</sup> II. Medizinische Universitätsklinik München.

<sup>2</sup> A. STAUB, *Biochem. Z.* 118, 93 (1921).

<sup>3</sup> H. POLLAK, *Ergebnisse inn. Med.* 23, 337 (1923).

<sup>4</sup> E. GRAFE und F. MEYTHALER, *Arch. exp. Path. Pharmak.* 125, 181 (1927); 131, 80 (1928); 136, 360 (1928).

<sup>5</sup> R. GAYET, *Le Fonctionnement endocrinien du Pancréas et sa régulation sans le concours du système nerveux* (Masson, Paris 1928).

<sup>6</sup> V. G. FOGLIA und J. FERNANDEZ, *C. r. séances Soc. biol. Buenos Aires* 121, 355 (1936).

<sup>7</sup> J. LA BARRE, *Arch. internat.* 29, 227, 238, 257 (1927). – E. ZUNZ und J. LA BARRE, *Arch. internat. Physiol.* 29, 265, 281 (1927); 31, 162 (1929); *C. r. Soc. Biol.* 99, 631 (1928).

<sup>8</sup> F. G. YOUNG, *Lancet* 2, 372 (1937); *Biochem. J.* 32, 513 (1938).

<sup>9</sup> F. D. W. LUKENS und F. C. DOHAN, *Science* 92, 222 (1940). – F. D. W. LUKENS, F. C. DOHAN und M. W. WOLCOTT, *Endocrinology* 32, 475 (1943).

<sup>1</sup> Zusammenfassung der Literatur bei W. BARGMANN, *Handbuch mikroskopischer Anatomie*, 6. Bd., 2. Teil (J. Springer, Berlin 1939). – H. FERNER, *Das Inseln des Pankreas* (Thieme-Verlag, Stuttgart 1952).

<sup>2</sup> C. H. BEST, *On the Islets of Langerhans Experimental Diabetes*, A. Symposium (Blackwell, Oxford 1954).

<sup>3</sup> S. ST. BARRON und D. STATE, *Arch. Pathol.* 48, 297 (1949). – C. H. BEST, R. E. HAIST und J. H. RIDEOUT, *J. Physiol.* 97, 107 (1939). – C. H. BEST und R. E. HAIST, *J. Physiol.* 100, 142 (1941). – G. GOMORI, N. B. FRIEDMANN und D. W. CALDWELL, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 41, 567 (1939). – S. T. NERENBERG, *Amer. J. Clin. Path.* 23, 340 23, 999 (1953). – C. A. WOERNER, *Anat. Rec.* 71, 33 (1938); 75, 91 (1939).

Jugendlichen fehlen dementsprechend ebenfalls die  $\beta$ -Zellgranula<sup>1</sup>. Das Resultat der histologischen Untersuchungen lässt sich dahingehend zusammenfassen, dass Produktion, Speicherung und Sekretion des Insulins in die  $\beta$ -Zellen der Inseln verlegt werden müssen und dass die Granula dieser Zellen das morphologische Äquivalent für den Insulingehalt der Inseln sind.

Über die Bedeutung der  $\alpha$ -Zellen besteht bis heute wesentlich weniger Klarheit. Erst Untersuchungen aus den letzten Jahren lassen annehmen, dass dort ein dem Insulin entgegengesetzt wirkendes Hormon, das Glukagon, gebildet wird.

Insulin ist das erste in seiner Struktur weitgehend bekannte Protein. Das Grundmolekül mit einem Molekulargewicht von 11464 besteht nach SANGER aus vier untereinander durch Disulfidbrücken über Zystin verbundenen Peptidketten, von denen jeweils zwei identisch sind<sup>2</sup>. Bekannt ist die Zahl und die Reihenfolge der Aminosäuren in den Peptiden. Diskutiert wird bisher noch die Lage der Peptide zueinander. In Abhängigkeit vom pH, von der Ionenstärke des Puffers, der Temperatur und der Konzentration wird eine unterschiedliche Molekülgrösse gefunden, die durch eine Aggregation von Grundmoleküleinheiten zu Polymeren zustande kommt<sup>3</sup>. Bemerkenswert ist, dass das Insulin von verschiedenen Tierarten nicht immer identisch zu sein scheint<sup>4</sup>.

Unsere Kenntnisse über die Wirkung des Insulins sind bisher recht allgemeiner Art. Insulin setzt als einziges Hormon den Blutzuckerspiegel herab, indem es unter gleichzeitiger Bereitstellung von energiereichem Phosphat die Oxydation von Glukose in der Peripherie steigert<sup>5</sup>; ausserdem fördert es unter entsprechenden Bedingungen den Aufbau von Leberglykogen, Fett, Aminosäuren und Eiweiss aus Glukose. Über den Wirkungsmechanismus gaben im einzelnen bisher nur die Ergebnisse der Arbeiten aus dem Kreis um CORI Aufschluss, nach denen das im gesamten Organismus vorkommende Ferment Hexokinase durch Insulin aktiviert bzw. die Hemmung der Hexokinase durch Hypophysenvorderlappenextrakt aufgehoben wird. Hexokinase katalysiert die Bildung von Glukose-6-Phosphat aus Glukose und Adenosintriphosphat und macht den Zucker dadurch einem weiteren Abbau leichter zugänglich.

Nachdem die histologischen Untersuchungen gezeigt haben, dass sich die Insulinabgabe aus den Langerhansschen Inseln weitgehend dem Bedarf des Organismus anpasst, blieb es den Physiologen überlassen, den Vorgang der Bedarfssteuerung dieser inkretorischen Drüse weiter aufzuklären. Von den vielen Untersuchungen können hier nur einige angeführt werden. FOÄ und Mitarbeiter haben die aus dem Pankreas abfliessende Vene (V. pancreaticoduodenalis) eines Spenderhundes mit der V. femoralis eines Empfängerhundes anastomosiert und aus Blutzuckeränderungen des letzteren Rückschlüsse auf eine Abgabe von blutzuckerregulierenden

Hormonen aus dem Pankreas des ersten gezogen. Im Anschluss an eine Blutzuckersteigerung beim Spenderhund kam es regelmässig zu einer Senkung beim Empfänger<sup>1</sup>. ANDERSON konnte zeigen, dass der Insulinspiegel im Blutplasma, der bei normalen, fastenden Hunden im Mittel 17 Mikro-E beträgt, nach Verabreichung von Glukose in Mengen, wie sie beim Glukosetoleranztest verwendet werden, auf durchschnittlich 39 Mikro-E je cm<sup>3</sup> ansteigt. Der Anstieg des Plasma-insulins ist nach Glukosebelastungen in gleicher Höhe zu beobachten, wenn das Mittelhirn oder das Rückenmark zwischen C6 und D3 durchschnitten wurde, obwohl die Glukosetoleranz durch diese Eingriffe herabgesetzt wird. Die Änderung der Glukosetoleranz wird also unter den angeführten Bedingungen nicht durch Störungen der Insulinsekretion hervorgerufen<sup>2</sup>.

Eine Blutzuckersteigerung führt zu einer vermehrten Abgabe des blutzuckersenkenden Insulins aus den Inseln. Über den Weg, auf dem die vermehrte Blutglukose eine Insulinausschüttung bewirkt, bestand lange Zeit Unklarheit. Die Hypophyse und das vegetative Nervensystem wurden als notwendige Schaltstellen angenommen.

Schon sehr früh konnte jedoch gezeigt werden, dass das an eine andere Stelle des Organismus überpflanzte und vorher sorgfältig von allen Nerven freipräparierte Pankreas den Blutzucker konstant erhalten kann, während die Entfernung der Drüse einen Diabetes zur Folge hat. GRAFE und MEYTHALER haben den physiologischen Nachweis einer direkten Beziehung zwischen Blutzuckerspiegel und Insulinabgabe der Inseln führen können, indem sie nach Glukose-Infusionen in die den Inseln unmittelbar vorgeschaltete Arterie (A. pancreaticoduodenalis) eine durch die vermehrte Insulinausschüttung bedingte allgemeine Senkung des Blutzuckers fanden<sup>3</sup>. Die Tatsache, dass der erhöhte Blutzucker allein – ohne Zwischenschaltung anderer neurohormonaler Zwischenglieder – ausreicht, um eine Abgabe von Insulin aus den Inseln hervorzurufen, ist von anderen Forschern mit subtileren Untersuchungsanordnungen bestätigt worden. ANDERSON und LONG haben isolierte Bauchspeicheldrüsen von Ratten in einem eigens konstruierten Apparat durchströmt. Bei Glukosekonzentrationen von 141 bis 569 mg % beobachteten sie eine Insulinabgabe, bei niedrigeren Glukosekonzentrationen nicht<sup>4</sup>.

Es sei darauf hingewiesen, dass SOSKIN die dargestellte Meinung über eine durch den Blutzucker regulierte Insulinabgabe nicht teilt<sup>5</sup>. Er schliesst aus Versuchen an pankreatektomierten Tieren, dass das Insulin unter physiologischen Bedingungen unbeeinflusst von der Höhe des Blutzuckers gleichmässig von den Inseln abgegeben und dass der Blutzuckerspiegel in erster Linie durch die Leber konstant gehalten wird. Da aber auf Grund der zahlreichen anderen Untersuchungen eine Variation der Insulinsekretion in Abhängigkeit von der Blutzuckerhöhe mit Sicherheit angenommen werden muss, bleibt lediglich die Frage nach der Höhe der Blutzuckersteigerung offen, die zu einer zusätzlichen Insulinabgabe führt.

<sup>1</sup> E. T. BELL, Amer. J. Path. 22, 631 (1946). – C. H. BEST, J. CAMPBELL und R. E. HAIST, J. Physiol. 97, 200 (1939). – C. H. BEST, J. CAMPBELL, R. E. HAIST und A. W. HAM, J. Physiol. 101, 17 (1942). – M. G. GOLDNER und G. GOMORI, Endocrinology 33, 297 (1943). – R. E. HAIST, Amer. J. Med., Symposium on Diabetes mellitus (1949). – J. H. HOMANS, J. Med. Research 33, 1 (1915/16). – K. C. RICHARDSON, Proc. Roy. Soc. London 128, 153 (1939).

<sup>2</sup> F. SANGER und H. TUPPY, Biochem. J. 49, 463 (1951). – F. SANGER und E. O. P. THOMPSON, Biochem. J. 53, 366 (1953).

<sup>3</sup> H. GUTFREUND, Biochem. J. 42, 544 (1948); 50, 564 (1952). – B. LOW, Nature 169, 955 (1952). – R. F. STEINER, Arch. Biochem. Biophys. 39, 333 (1952). – D. WRINCH, Science 116, 562 (1952).

<sup>4</sup> J. LENS und A. EVERTZE, Biochem. Biophys. Acta 8, 332 (1952).

<sup>5</sup> C. H. BEST, Ann. int. Med. 39, 433 (1953).

<sup>1</sup> P. P. FOÄ, H. R. WEINSTEIN und J. A. SMITH, Amer. J. Physiol. 157, 197 (1949). – P. P. FOÄ, L. SANTAMARIA, H. R. WEINSTEIN, S. BERGER und J. A. SMITH, Amer. J. Physiol. 171, 32 (1952).

<sup>2</sup> E. ANDERSON, M. YENERMEN, R. W. BATES, A. LASKY und D. MCK. RICK, I. internat. neuroveget. Symposium, Florenz (1953).

<sup>3</sup> E. GRAFE und F. MEYTHALER, Arch. exp. Path. Pharmacol. 125, 181 (1927); 131, 80 (1928); 136, 360 (1928).

<sup>4</sup> E. ANDERSON und J. A. LONG, Endocrinology 40, 92 (1947).

<sup>5</sup> S. SOSKIN, Proc. Amer. Diabetes Assoc. 6, 349 (1946).

Weitere Faktoren, die den Kohlenhydratstoffwechsel unmittelbar ohne den Umweg über das Insulin beeinflussen – wie andere Hormone, Resorption, Verbrauch und Speicherung – sollen an dieser Stelle nicht diskutiert werden.

Wahrscheinlich besitzt der hochentwickelte Säugetierorganismus über die skizzierte direkte Steuerung hinaus weitere Möglichkeiten, Einfluss auf die Insulinabgabe zu nehmen. Für eine Beziehung des Nervensystems zur Regulation des Insulins (oder anderer in den Inseln produzierter Hormone) spricht das regelmässige Vorkommen von Vagusfaserendigungen in den Inseln. Die früher häufig postulierte direkte insulotrope Wirkung des Hypophysenvorderlappens ist bis heute noch nicht eindeutig nachgewiesen. Nach DE JONGH besteht die Möglichkeit, dass das Wachstumshormon unter bestimmten Voraussetzungen insulotrop wirksam ist<sup>1</sup>.

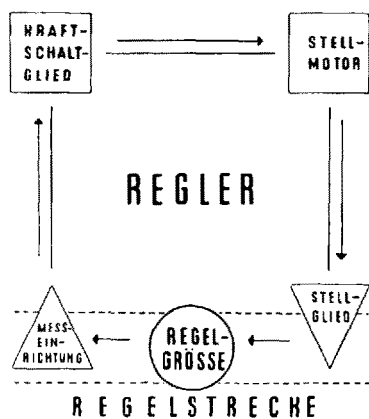


Abb. 1. Aufbau des technischen Regelkreises. Nach DRISCHEL<sup>2</sup>.

Die Konstanzhaltung biologisch wichtiger Größen ist in letzter Zeit häufiger mit den Prinzipien technischer Vorgänge verglichen worden. Während die Regelung des Blutdruckes, der Körpertemperatur und des Blut-pH mehrfach in der Literatur besprochen worden ist, wurde auf die Beziehungen zwischen Blutzucker und Insulin in diesem Zusammenhang bisher kaum eingegangen. Und doch bestehen, wie aus dem Gesagten hervorgeht, sehr enge wechselseitige Beziehungen: Insulin ist das einzige Hormon, das den Blutzucker senkt. Die Ausschüttung des Hormons wird in erster Linie unmittelbar durch die Höhe des Blutzuckers beeinflusst. Dieser Vorgang entspricht dem Prinzip eines geschlossenen Regelkreises, in dem die «Regelgrösse» der Blutzucker ist – wobei die «Messeinrichtung», das «Kraftschaltglied» und der «Stellmotor» in den Inseln enthalten sein müssen –, während das «Stellglied» dem Insulin entspricht<sup>2</sup>. Unbekannt ist bisher, auf welchem Wege die Inselzellen die Blutzuckerhöhe registrieren und wie sie auf den als zu hoch registrierten Blutzucker mit einer Insulinabgabe antworten (Abb. 1).

Experimentelle Beobachtungen über das Verhalten von Insulin und histochemisch nachweisbarem Zink in den Langerhansschen Inseln haben enge Beziehungen

in deren funktionellem Verhalten gezeigt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass das bei physiologischem pH leicht lösliche Insulin mit Zink allein oder zusammen mit basischen Proteinen unlösliche Komplexe bildet, gewinnen diese Beobachtungen im Hinblick auf den geschilderten Regelvorgang vermehrtes Interesse. Im folgenden sollen die Zusammenhänge zwischen Insulin und Zink unter dem Gesichtswinkel der blutzucker-gesteuerten Insulinabgabe diskutiert werden.

OKAMOTO beobachtete mit einer von ihm ausgearbeiteten histochemischen Methode, dass die Menge des histochemisch nachweisbaren Zinks von der Ernährung der Versuchstiere abhängt. Nach kohlenhydratreicher Fütterung fand er weniger Zink in den Inseln als bei kurzfristig hungernden oder bei mit Fett und Eiweiss ernährten Tieren<sup>1</sup>. OKAMOTOS Beobachtungen wurden durch eine Reihe weiterer Untersuchungen ergänzt. Zink wurde bisher regelmässig u. a. in den Inseln von Mensch, Kaninchen, Hund, Pferd, Schwein, Maus, Ratte, Huhn, Taube, Frosch und bei verschiedenen Fischen histochemisch nachgewiesen. Das Metall kommt auch in allen anderen Organen vor. Die Möglichkeit der histochemischen Darstellung gibt jedoch Hinweise auf eine besonders hohe Konzentration und vielleicht auf die Art der vorliegenden Bindung.

In den Inseln enthalten allerdings nicht nur die Insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen Zink, sondern auch die  $\alpha$ -Zellen; bei der Ratte weisen die letzteren sogar wesentlich mehr auf als die ersteren. Auf Beziehungen zwischen Zink und  $\alpha$ -Zellen soll hier nicht näher eingegangen werden, da über die Zusammensetzung und die physiologische Bedeutung des blutzuckersteigernden Hormons aus den  $\alpha$ -Zellen, das Glukagon, bisher zu wenig Gesichertes bekannt ist.

Durch protrahierte Blutzuckersteigerungen mit Hilfe von wiederholten Glukosebelastungen oder Adrenalininjektionen wurde erreicht, dass histochemisch regelmässig kaum noch Zink in den Inseln nachzuweisen war<sup>2</sup>.

Der Zinkgehalt der Inseln wurde weiter zur Erklärung der organspezifischen Wirkung diabeteserzeugender Verbindungen herangezogen. Durch Injektion verschiedener Substanzen, die mit Metallen und besonders mit Zink Komplexe bilden, konnten Inselzellschäden und bei einigen Tierarten auch ein Diabetes erzeugt werden, zum Beispiel mit Dithizon, Oxin u. a.<sup>3</sup>.

Die geschädigten Inseln dithizon- und alloxandiabetischer Tiere haben die Fähigkeit zur physiologischen Zinkspeicherung weitgehend verloren. Nur gesundes Inselgewebe besitzt diese Eigenschaft in vollem Umfange<sup>4</sup>.

Nach einer nativen Anfärbung des Gewebes zinks durch intravenöse Dithizoninjektionen konnte die feinere Verteilung des Zinks innerhalb der Zellen an Gefrierschnitten studiert werden. Dieses liegt in den Inseln im Gegensatz zu verschiedenen anderen Organen in Granulaform vor. Die zinkhaltigen und mit Dithizon gefärbten Granula sind etwa so gross wie die mit anderen Färbe-

<sup>1</sup> K. OKAMOTO, Transact. Soc. path. jap. 32, 99 (1942); 33, 247 (1943).

<sup>2</sup> H. MASKE, B. STAMPFL und H. GAHN, Z. klin. Med. 152, 68 (1953). – H. MASKE, Z. Naturforsch. 8b, 96 (1953). – H. MASKE, H. WOLFF und B. STAMPFL, Klin. Wschr. 31, 79 (1953).

<sup>3</sup> I. KADOTA, J. Labor. Clin. Med. 35, 568 (1950). – I. KADOTA und T. ABE, J. Labor. Clin. Med. 43, 375 (1954). – H. WOLFF, H. MASKE, B. STAMPFL und F. BAUMGARTEN, Arch. exper. Path. Pharmacol. 216, 440 (1952).

<sup>4</sup> H. MASKE, H. WOLFF, B. STAMPFL und F. BAUMGARTEN, Arch. exper. Path. Pharmacol. 216, 457 (1952). – H. WOLFF, H. MASKE, H. STAMPFL und F. BAUMGARTEN, Arch. exper. Path. Pharmacol. 216, 440 (1952).

<sup>1</sup> S. E. DE JONGH, *Insulin and growth Hormone; Experimental Diabetes*. A. Symposium (Blackwell, Oxford 1954).

<sup>2</sup> H. DRISCHEL, *Bausteine einer dynamischen Theorie der vegetativen Regulation*. Wiss. Z. Univ. Greifswald, Mathem.-naturwiss. Reihe Nr. 2 (1952/53).

methoden darstellbaren und als morphologisches Insulinäquivalent aufgefassten Inselzellgranula (siehe oben). Unter extremen Stoffwechselbedingungen, zum Beispiel bei fastenden Tieren, nach Glukosebelastungen und beim Diabetes, verhalten sich die mit den verschiedenen Methoden darstellbaren Granula auch im Hinblick auf ihre Menge gleich<sup>1</sup> (Abb. 2).

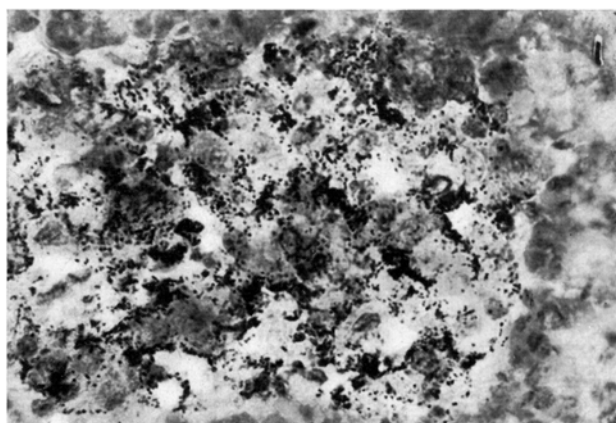


Abb. 2. Langerhanssche Insel. – Die schwarzgefärbten zinkhaltigen Granula sind deutlich zu erkennen (natürliche Farbe rot). Nativfärbung mit Dithizon, Nachfärbung des Gefrierschnittes mit Hämalaun. Vergrößerung etwa 480fach, Panphot-Leitz.

WEITZEL fand in den weitgehend isoliert liegenden Inselorganen von Knochenfischen 100–600  $\gamma$  Zink/1 g Frischgewebe gegenüber 20–30  $\gamma$ /1 g im exokrinen Pankreasanteil. Gleichzeitig durchgeführte Bestimmungen des Insulingehaltes ergaben ein Verhältnis von 2 bis 9 Teilen Zink auf 100 Teile Insulin<sup>2</sup>. Derartige Untersuchungen waren bei Säugetieren, die die Inseln im exkretorischen Gewebe verteilt enthalten, nicht durchführbar. Differenzen, die SCOTT und FISHER im Zinkgehalt von Bauchspeicheldrüsen stoffwechselgesunder und diabetischer Menschen gefunden zu haben glaubten<sup>3</sup>, konnten infolgedessen durch Nachuntersucher auch nicht bestätigt werden<sup>4,5</sup>.

Zinkfütterung führt nach Untersuchungen derselben Forscher<sup>6</sup> und nach DRINKER und Mitarbeitern bei Katzen zu einer Pankreasfibrose, zur Reduzierung des exkretorischen Gewebes und zu einer Anreicherung von Zink im Pankreas auf etwa das 7fache normaler Werte<sup>7</sup>. Radioaktives  $Zn^{65}$  wurde von SHELIN und Mitarbeitern<sup>8</sup>, von SHERRILL und WICK<sup>9</sup> und von ODENTHAL und

Mitarbeitern<sup>1</sup> an Mäuse, Hunde, Ratten und Kaninchen verabreicht. Dabei fand sich in den ersten Stunden nach der Applikation die höchste Konzentration im Pankreas, später jedoch wurde mehr Zink in Leber und Nieren gefunden<sup>2</sup>. Kohlenhydratstoffwechselstörungen in Form von Blutzuckererhöhung oder Zuckerausscheidung mit dem Harn wurden bei keinem Tier beobachtet. LOWRY und Mitarbeiter untersuchten die Verteilung von  $Zn^{65}$  vergleichsweise bei normalen und bei alloxandibetischen Ratten. Sie fanden 24 h nach der Injektion von  $Zn^{65}Cl_2$  im Pankreas diabetischer Tiere signifikant weniger  $Zn^{65}$  als bei den Kontrollen<sup>3</sup>. Diese Beobachtung lässt darauf schliessen, dass das Zink in den Langerhansschen Inseln schneller umgesetzt und ausgetauscht wird als im exkretorischen Gewebe, wo die Konzentration des Metalls an und für sich wesentlich geringer ist.

Die engen Beziehungen, die demnach zwischen dem Zink und den nativen Insulindepots – bzw. der unmittelbaren Vorstufe des Insulins in den Inselzellgranulis – bestehen, erlauben es, Vergleiche mit dem Verhalten von Insulin und Zink *in vitro* anzustellen. Das Hormon kristallisiert nur in Gegenwart verschiedener Metalle, wie Zink, Kobalt, Nickel oder Kadmium<sup>4</sup>. Kristallisiertes Insulin enthält etwa 0,5% Zink und kann unter entsprechenden Bedingungen wesentlich mehr binden<sup>5</sup>. Höheres pH als 6,0 begünstigt und zinkbindende Bestandteile im wässrigen Medium reduzieren die zusätzliche Zinkbindung. Über die Art der Bindung wurden Untersuchungen von EISENBRAND und Mitarbeitern<sup>6</sup>, SCOTT und FISHER<sup>7</sup>, WEITZEL und Mitarbeitern<sup>8</sup>, COHN und Mitarbeitern<sup>9</sup> durchgeführt. Der für die Kristallisation benötigten Mindestmenge von 0,5% entspricht 1 Atom Zink im Grundmolekül des Insulins mit dem Molekulargewicht von etwa 12000. Dieses Zink ist sehr fest in Form von Scherenkomplexen an Carboxyl- und Aminogruppen gebunden. Insulin kann bis zur Sättigung etwa 2,5% Zink aufnehmen. Über 0,5% hinaus gebundenes Zink kann durch Komplexbildner aus suspendierten Insulinkristallen entfernt werden. Ausführliche Versuche mit Serumalbumin haben gezeigt, dass Zink bei neutralem pH vorwiegend von den Imidazolgruppen der Eiweisse gebunden wird<sup>10</sup>. Diese Art der

<sup>1</sup> F. ODENTHAL, W. BEIGLÖCK, R. CLOTTEN und W. CREUTZFELDT, *Klin. Wschr.* 31, 864 (1953).

<sup>2</sup> Eine Unterscheidung zwischen exkretorischem und inkretorischem Pankreasgewebe wurde bei diesen Versuchen nicht vorgenommen.

<sup>3</sup> J. R. LOWRY, R. R. BALDWIN und R. V. HARRINGTON, *Science* 119, 219 (1954).

<sup>4</sup> D. A. SCOTT, *Biochem. J.* 28, 1592 (1934).

<sup>5</sup> E. J. COHN, J. D. FERRY, J. LIVINGOOD und M. H. BLANCHARD, *J. Amer. Chem. Soc.* 63, 17 (1941). – K. HALLAS-MÖLLER, K. PETERSEN und J. SCHLICHTKRÜLL, *Science* 116, 394 (1952); *Ugeskr. Laeger* 113, 1761 (1951). – D. A. SCOTT und A. M. FISHER, *Biochem. J.* 29, 1048 (1935).

<sup>6</sup> J. EISENBRAND und M. SIENZ, *Z. physiol. Chem.* 268, 1 (1941). – J. EISENBRAND und F. WEGEL, *Z. physiol. Chem.* 268, 26 (1941).

<sup>7</sup> A. M. FISHER und D. A. SCOTT, *J. Pharmacol.* 58, 93 (1936). – D. A. SCOTT und A. M. FISHER, *J. Pharmacol.* 58, 78 (1936).

<sup>8</sup> G. WEITZEL, *Naturwissenschaften* 40, 285 (1953). – G. WEITZEL, A. M. FRETZDORFF, F. J. STRECKER und U. ROESTER, *Z. physiol. Chem.* 293, 190 (1953).

<sup>9</sup> E. J. COHN, F. R. N. GURD, D. M. SURGENOR, B. BARNES, A. BROWN, DEROUAUX, J. GILLESPIE, F. KAHNT, W. LEVER, C. LIU, D. MITTELMANN, R. MOUTON, K. SCHMID und E. UROMA, *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 465 (1950). – E. J. COHN, D. M. SURGENOR, K. SCHMID, W. H. BATCHELOR und H. C. ISLIKER, *Faraday Soc.*, London (1952).

<sup>10</sup> F. R. N. GURD und D. S. GOODMAN, *J. Amer. Chem. Soc.* 74, 670 (1952). – I. M. KLOTZ, I. L. FALLER und J. M. URQUHART, *J. Phys. Colloid. Chem.* 54, 18 (1950). – C. H. TANFORD, *J. Amer. Chem. Soc.* 74, 211 (1952).

<sup>1</sup> H. MASKE, *Z. Naturforsch.* 8b, 96 (1953).

<sup>2</sup> G. WEITZEL, F. J. STRECKER, U. ROESTER, A. M. FRETZDORFF und E. BUDDECKE, *Z. physiol. Chem.* 295, 83, 1953.

<sup>3</sup> D. A. SCOTT und A. M. FISHER, *J. Clin. Investig.* 17, 725 (1938).

<sup>4</sup> J. EISENBRAND, M. SIENZ, F. WEGEL, *Med. u. Chem.* 4, 259 (1942).

<sup>5</sup> Anmerkung bei der Korrektur: Es gelang uns in der Zwischenzeit, Inselzellgranula durch fraktionierte Zentrifugierung anzureichern. Insulin- und Zinkkonzentrationen verhielten sich in den verschiedenen Fraktionen parallel. Die höchsten Insulin- und Zinkkonzentrationen fanden sich in korpuskulären Bestandteilen von der Grössenordnung der Mitochondrien bzw. etwas kleiner. (Noch nicht veröffentlicht.)

<sup>6</sup> D. A. SCOTT und A. M. FISHER, *Amer. J. Physiol.* 121, 253 (1938).

<sup>7</sup> K. R. DRINKER, P. K. THOMPSON und M. MARSH, *Amer. J. Physiol.* 80, 31 (1937).

<sup>8</sup> G. E. SHELIN, J. L. CHAIKOFF, H. B. JONES und M. L. MONTGOMERY, *J. Biol. Chem.* 149, 139 (1943).

<sup>9</sup> J. W. SHERRILL und A. N. WICK, *J. Lab. a. Clin. Med.* 41, 40 (1953).

Bindung muss nach COHN und Mitarbeitern auch für das weniger fest gebundene Insulinzink angenommen werden. Das Insuligrundmolekül enthält vier Moleküle Histidin. An dessen Imidazolresten gebundenes Zink kann sich zum Beispiel noch mit Glyzin verbinden, so dass gemischte ternäre Komplexe entstehen. Diese Ergebnisse erklären vielleicht die Befunde von SCOTT und FISHER, nach denen Zink eine wesentliche Rolle bei der Bindung von basischen Stoffen, zum Beispiel von Protamin an Insulin, spielt. Auch die Beobachtung von WEITZEL über die Fähigkeit des Insulins, organische Zinkkomplexe – zum Beispiel Zink-Asparagin, Zink-Asparaginsäure und Zink-Arginin – aufzunehmen<sup>1</sup>, ist vielleicht auf diese Art der Zinkbindung im Insulin zurückzuführen<sup>2</sup>.

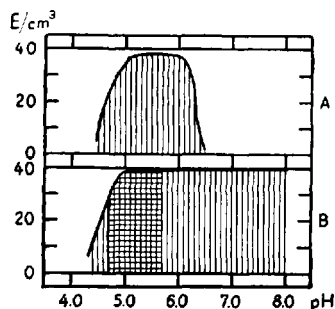


Abb. 3. Löslichkeit von Insulin bei verschiedenem pH nach HALLAS-MØLLER<sup>3</sup>. Ordinate: gefälltes Insulin in E/cm<sup>3</sup>. Abszisse: pH. A Insulin in 0,01 m Na-Azetat. B Insulin in 0,01 m Na-Azetat mit 2 mg Zink (als Chlorid)/1000 E.

Während die ersten 0,5 % Zink weder die Wirksamkeit des Hormons noch dessen Löslichkeit ausserhalb des isoelektrischen Bereiches beeinflussen, verändert ein höherer Zinkgehalt die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Insulin ganz erheblich. Bei einem Überschuss von Zink im Lösungsmittel und beim Fehlen anderer Komplexbildner wird das Insulin als Zinkkomplex bei pH-Werten höher als 6,0 vollständig ausgefällt (Abb. 3). Diese Eigenschaft wurde von HALLAS-MØLLER neuerdings zur Herstellung eines Depotinsulins ausgewertet. Der Zinkgehalt der insulinhaltigen Granula in den Inselzellen muss nach den vorher berichteten Eigenschaften von Insulin-Zink-Komplexen als Ursache oder Teilursache für deren schlechte Löslichkeit und für die Speicherung neu gebildeten Insulins in Granulaform angenommen werden. In welcher Form das physiologische Insulindepot vorliegt, ob bereits als wirksames Hormon oder in einer unwirksamen Vorstufe, ob als reiner Zinkkomplex oder mit dem Zink an basische zelleigene Eiweisse gebunden, lässt sich solange nicht entscheiden, bis die  $\beta$ -Zellgranula isoliert und analysiert worden sind. LINDNER fand im Insulinrohextrakt regelmässig eine einheitliche niedermolekulare basische Eiweissfraktion. Insulin bildet mit diesem Protein eine im physiologischen pH-Bereich schlechtlösliche Verbindung,

das sogenannte «Nativinsulin». Die Verzögerung der Wirkung, die nach der Injektion dieses Präparates beobachtet wurde, konnte durch Zusatz von Zink- oder Magnesiumionen weiter protrahiert werden<sup>1</sup>.

Nach den eingangs angeführten Untersuchungen verlassen geringe Mengen Insulin in gleichmässigem Fluss die  $\beta$ -Zellen; bei vermehrtem Bedarf, zum Beispiel bei vermehrtem Glukoseangebot bzw. erhöhtem Blutzuckerspiegel, wird mehr Insulin abgegeben. Dieser zusätzlichen Ausschüttung muss eine Überführung des in Granulaform vorliegenden, zinkhaltigen Hormondepots in eine lösliche Form vorangehen. Die Möglichkeiten dazu sind beschränkt. Eine intrazelluläre pH-Änderung, die zur Lösung des Insulins führen könnte, müsste unphysiologisch niedrige Werte erreichen.

Eine zweite, eher im Bereich der Wahrscheinlichkeit liegende Möglichkeit besteht darin, dass den insulinhaltigen Granulis Zink durch stärkere Komplexbildner entzogen wird. Die Glukose selber als Auslöser dieses Vorganges bildet keine entsprechenden Zinkkomplexe, und doch muss die Glukose den Anstoss für die Bildung konkurrierender Komplexbildner geben. Eine Steigerung des Blutzuckerspiegels führt, wie STIER kürzlich zeigen konnte, zu einer ungewöhnlichen Intensivierung des Zellstoffwechsels in den Langerhansschen Inseln, die mit Hilfe von supravitalen Triphenyltetrazoliumchlorid-Injektionen nachgewiesen wurde. Bei normalen unvorbehandelten Tieren war in den Inseln eine noch geringere Formazanbildung zu finden als in dem auch nur wenig angefärbten umliegenden exkretorischen Gewebe. Nach vorhergehenden Glukosebelastungen der Versuchstiere zeigten die Inseln jedoch eine starke Formazanbildung, (Abb. 4). Die spezifische Empfindlichkeit der Inselzelle gegenüber dem Blutzucker als der Regelgrösse, die die

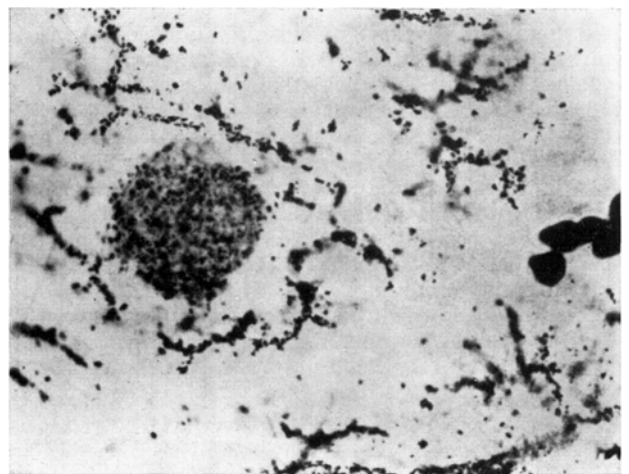


Abb. 4. Supravitale Färbung mit Triphenyltetrazoliumchlorid. Pankreas nach Zuckerbelastung. Eine Insel mit starker Formazan-einlagerung. Nach STIER<sup>2</sup>.

erste Voraussetzung für die Regelfunktion der Zelle ist, wurde mit der Stoffwechselsteigerung nachgewiesen. Die Glukose trifft in den Inseln auf das spezifisch ihren Stoffwechsel intensivierende Hormon, von dem entsprechend der Dissoziationsgleichung von Komplexen ein Teil gelöst ist:

<sup>1</sup> G. WEITZEL, F. J. STRECKER, U. ROESTER, Z. physiol. Chem. 292, 286 (1953).

<sup>2</sup> In der Zwischenzeit haben TANFORD und EPSTEIN durch Wasserstoffionentrationen an zinkfreiem und zinkhaltigem Insulin nachgewiesen, dass Zink bei physiologischem pH an die Imidazolreste des im Insulin enthaltenen Histidins gebunden ist. (C. TANFORD und J. EPSTEIN, J. Amer. Chem. Soc. 76, 2163, 2170 [1954]).

<sup>3</sup> K. HALLAS-MØLLER, K. PETERSEN und J. SCHLICHTKRÜLL, Science 116, 394 (1952).

<sup>1</sup> F. LINDNER, Med. u. Chem. 4, 248 (1942).

<sup>2</sup> A. STIER, Z. Anat. Entwicklungsgesch. 116, 399 (1952).

$$\frac{(\text{Insulin}^{--})(\text{Zink}^{++})}{(\text{Insulin-Zink})} = k.$$

Es wäre nun festzustellen, ob Substanzen aus dem intermediären Zellstoffwechsel, besonders aber aus dem Glukosestoffwechsel, einen Einfluss auf die Insulin-zink-Bildung besitzen. Nach eigenen Untersuchungen lässt sich schwerlösliches Zink-Insulin *in vitro* mit verschiedenen Aminosäuren, anorganischen und organischen Phosphaten und mit Gliedern des Zitronensäure-Zyklus in Lösung bringen<sup>1</sup>.

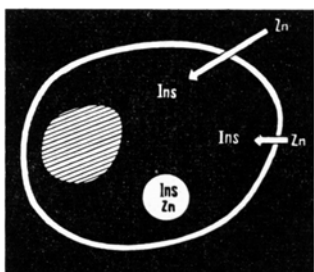


Abb. 5

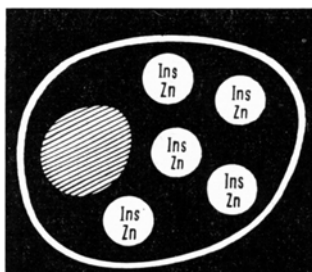


Abb. 6

Abb. 5 und 6. Schematische Darstellung: Aus neugebildetem Insulin und Zink entstehen schwerlösliche Komplexe in den  $\beta$ -Zellen der Langerhansschen Inseln.

Die verhältnismässig geringe Konzentration derartigen Stoffe in den Zellen ist nach NEUBERG<sup>2</sup> und BERSIN<sup>3</sup> kein Beweis gegen ihre physiologische Bedeutung in dieser Richtung, da infolge der ständigen biochemischen Neubildung der Substanzen auch bei kleinen Konzentrationen erhebliche Transportleistungen zustande kommen können. Grundsätzlich kann natürlich eine grosse Anzahl verschiedener komplexbildender Substanzen als Stellmotor des Regelkreises fungieren (siehe oben). Die Art dieser Substanz bzw. Substanzen ist durch den Eigenstoffwechsel der Inselzellen bestimmt. Wenn man von deren Eigenschaft, Insulin zu produzieren, und von ihrer besonderen Empfindlichkeit gegenüber einem vermehrten Glukoseangebot ausgeht, wird man in erster Linie an Bausteine des Insulins bzw. an Abbauprodukte der Glukose denken. Vorläufig bleibt hier jedoch eine Lücke in der Vorstellung über die Regelfunktion der Inselzellen.

Versuchen wir im folgenden, die Beziehungen zwischen Insulin und Zink in den Langerhansschen Inseln des Pankreas zusammenzufassen:

Es ist eine besondere Eigenschaft der Inselzellen, Zink anzureichern. Eine Schädigung der Inseln – zum Beispiel durch diabeteserzeugende Substanzen – führt auch zur Beeinträchtigung der Zinkanreicherung. Als Erklärung für die Fähigkeit zur Zinkspeicherung ist womöglich die Tatsache der Insulinproduktion ausreichend. Neugebildetes Insulin bzw. dessen Vorstufe bindet in der Umgebung ausreichend zur Verfügung stehendes Zink und bildet schwerlösliche Komplexe entweder mit Zink allein oder gleichzeitig mit anderen Zellbestandteilen. Die Dissoziation des Komplexes unter

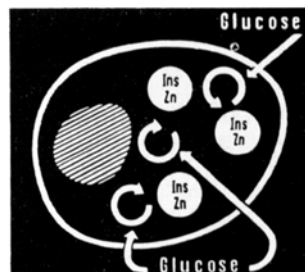


Abb. 7

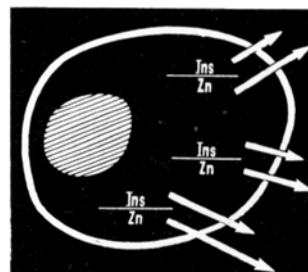


Abb. 8

Abb. 7 und 8. Schematische Darstellung: Vermehrt angebotene Glukose wird in den  $\beta$ -Zellen durch die primäre Anwesenheit von Insulin schnell umgesetzt. Substanzen aus dem intermediären Stoffwechsel bringen Insulin auf dem Weg über eine konkurrierende Komplexbildung in Lösung, Insulin und Zink werden an das Blut abgegeben.

den intrazellulären Bedingungen bestimmt das Ausmass der ständigen Insulinabgabe (Abb. 5 und 6).

Bei einem Anstieg der Blutglukose wird den  $\beta$ -Zellen vermehrt Glukose angeboten und durch die primäre Gegenwart von Insulin auch in stärkerem Ausmass umgesetzt als in anderen Geweben. Substanzen aus dem intermediären Stoffwechsel vermögen Insulin auf dem Weg über eine konkurrierende Komplexbildung mit dessen Zink in Lösung zu bringen. Das gelöste Insulin wird an das Blut abgegeben (Abb. 7 und 8).

Eine neurogen verursachte Insulinausschüttung könnte analog mit einer Intensivierung des Stoffwechsels der Inselzellen durch Endprodukte der Nervenreizung erklärt werden.

Die Höhe des Blutzuckers und die Dauer der Blutzuckersteigerung, die zu einer zusätzlichen Abgabe von Insulin aus den Langerhansschen Inseln über die basale Sekretion hinaus führen, sind bisher nicht bekannt. Durch diese Faktoren würde die «Reizschwelle» des reflektorisch anmutenden Geschehens charakterisiert. Nach eigenen Untersuchungen scheint die Dauer der Blutzuckersteigerung einen grösseren Einfluss auszuüben als die absolute Blutzuckerhöhe. Erst die Kenntnis

<sup>1</sup> H. MASKE, dtsch. Ges. physiol. Chem., Kiel, 1954.

<sup>2</sup> C. NEUBERG, Angew. Chem. 66, 60 (1954).

<sup>3</sup> TH. BERSIN, Angew. Chem. 62, 246 (1950).

der normalen Reizschwelle würde Vergleiche mit den veränderten Verhältnissen unter verschiedenen pathologischen Bedingungen erlauben. Beim Diabetes mellitus mit ständig erhöhtem Blutzucker ist sicher eine Änderung der Reizschwelle anzunehmen. Nach den klinischen Erfahrungen funktioniert der Regelvorgang hier zumindest wesentlich träger. Vielleicht ist die Fähigkeit der Inseln, bei vermehrtem Bedarf zusätzlich Insulin abzugeben, ganz erloschen, vorausgesetzt, dass überhaupt noch Insulin produziert wird. Einen Hinweis dafür, dass der Vorgang der blutzuckerinduzierten Insulinausschüttung bereits in der prädiabetischen Phase gestört ist, gibt die Feststellung von KATSCH, dass hypoglykämische Zustände häufig vor dem Manifestwerden eines Diabetes beim Menschen vorkommen<sup>1</sup>. Derartige Hypoglykämien werden sonst nur bei einer pathologischen Vermehrung des Inselgewebes, zum Beispiel bei  $\beta$ -Zelladenomen und bei Pankreaskarzinomen, beobachtet. Da bei Hypoglykämien in der prädiabetischen Phase mehr Insulin abgegeben wird, als dem tatsächlichen Bedarf entspricht, muss man also die Ursache der Hypoglykämien in Störungen des Regelvorganges suchen. Alle Faktoren, die den «Regelkreis» an irgendeiner Stelle über längere Zeit stärker aus dem

Gleichgewicht bringen, können wahrscheinlich auch zu einer Schädigung der insulinproduzierenden Zellen führen.

Die eigenen experimentellen Untersuchungen wurden mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

### Summary

A collection is made of the findings of morphological and physiological investigations on the behaviour of the LANGERHANS islands of the pancreas, with regard to their regulating function. Histo-chemical investigations on the zinc content of the islands are especially described. On the basis of the chemical and physico-chemical relationships between insulin and zinc, an influence of this metal on the formation of intra-cellular insulin depots is presumed. Under the appropriate conditions, insulin, which is slightly soluble at physiological pH, forms an insoluble complex with zinc alone or together with basic proteins. Since insulin and zinc disappear from the islands after an increase of glucose, it follows that the glucose must be the indirect cause of a change in the insulin-zinc combination in the hormone depot. The metabolic processes which are involved in the insulin output induced by the blood sugar are discussed.

<sup>1</sup> G. Katsch, Deutsche Med. Wschr. 40, 1331 (1950).

## Congressus

### SUISSE

26–31 mai 1955 à Lausanne: Congrès international de Pathologie comparée. Secrétaire général: Prof. P. HAUDUROY, Institut d'Hygiène, 19, rue César-Roux, Lausanne.

21–27 juillet à Zürich: Union internationale de Chimie pure et appliquée. Secrétaire général: Conseil de la Chimie suisse, Dr MORF, Sandoz S.A., Bâle.

27–31 juillet à Zurich: Symposium sur la Chimie macromoléculaire. Secrétaire général: Prof. SADRON, 3, rue de l'Université, Strasbourg (France).

### AUTRICHE

12–18 juillet à Vienne: Symposium de Micro-analyse organique. Secrétaire général: Prof. ZACHERL, Institut de Chimie, Université Vienne.

### ITALIE

12–16 juin à Pise: Union internationale de Physique pure et appliquée. – Colloque sur les particules élémentaires. Secrétaire général: Prof. G. POLVANI, Via Saldini 50, Milan.

### BELGIQUE

28–30 juillet à Gand: Colloque international sur les Problèmes biochimiques des Lipides. Secrétaire: Prof. R. RUYSEN, Laboratoire de Chimie médicale de l'Université, Sint-Jansvest, 12, Gand.

1–6 août à Bruxelles: Union internationale de Biochimie. Secrétaire général: Prof. C. LIÉBECQ, 17, Place Delcour, Liège.

### U.S.A.

June 6–13, New York: 20th Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology (Population Genetics). Director: Dr M. DEMERC, The Biological Laboratory Cold Spring Harbor, New York.