

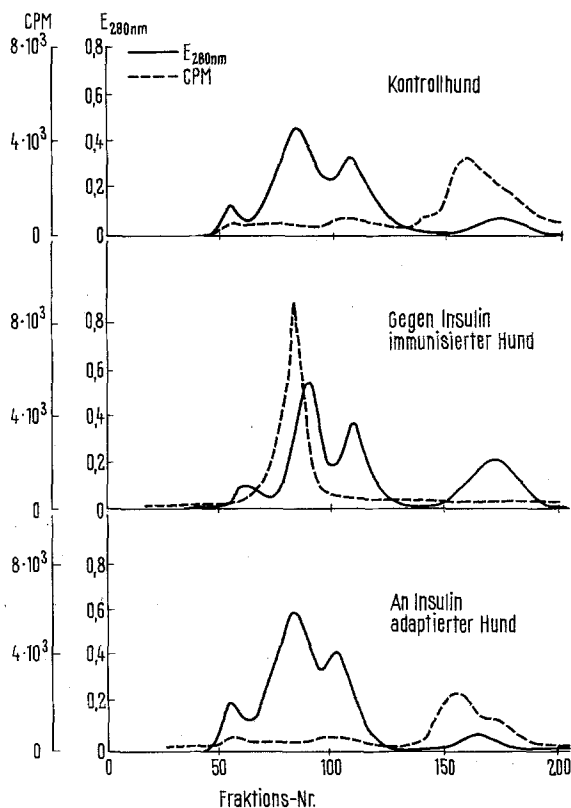
Fehlende immunogene Wirkung exogenen Insulins bei Hunden nach langsamer Adaptation an Insulin

Tierexperimentelle Arbeiten von MOHNIKE et al.^{1,2} hatten bewiesen, dass durch einschleichende Insulinierung eine Adaptation an grosse Insulindosen möglich ist. Durch die vorliegenden Untersuchungen sollte überprüft werden, inwieweit Insulinantikörper (IAK) an den Adaptationsvorgängen beteiligt sind.

Material und Methoden. Zwei Bastardhunde erhielten s.c. 3×14 E/die kommerzielles Alt-Insulin³, nachdem sie durch eine wöchentliche Erhöhung der täglichen Menge um 2 E an diese Enddosis (3,5 bzw. 4,2 E/kg/die) adaptiert wurden. Wegen gehäufte hypoglykämischer Reaktionen war eine weitere Steigerung nicht möglich. Nach

Applikation von insgesamt 31100 E/27 Monate bzw. 21150 E/18 Monate wurde das Serum dieser Hunde auf IAK im Vergleich zum Serum nichtinsulinierter bzw. gegen Insulin immunisierter⁴ Geschwistertiere untersucht. Zum Nachweis der IAK wurde die Präzipitation von unmarkiertem Insulin im Agardiffusionstest nach OUCHTERLONY^{4,5} untersucht und die Lokalisation sowie die Kapazität der ¹²⁵J-Insulinbindung⁶ (IBC) des Serums bestimmt. Zur Lokalisation der ¹²⁵J-Insulinbindung verwandten wir die Autoradiografie⁴ nach Immunelektrophorese⁷ und nach einfacher Agargelelektrophorese des mit ¹²⁵J-Insulin inkubierten Serums sowie die Gel-Filtration an Sephadex G 200 nach CHAO et al.⁸ (Inkubation 1 h, 37 °C, 1 ml Serum, 0,1 ml ¹²⁵J-Insulin $\pm$ 50 μ E, spezifische Aktivität ca. 60 mCi/mg). In den Eluatfraktionen wurden die Proteinkonzentration am Unicam SP 800 bei 280 nm und die Radioaktivität im Bohrlochkristall gemessen. Die Bindungskapazität der Sera für ¹²⁵J-Insulin ermittelten wir grafisch aus der durch Inkubation von 2,5 μ E ¹²⁵J-Insulin mit zunehmender Serummenge (maximal 200 μ l) erhaltenen Titerkurven. Die Verdünnung des Serums und des ¹²⁵J-Insulins erfolgte in 0,04 M Phosphatpuffer, pH 8, der 0,25% HSA und 0,2% NaCl enthielt. Die Trennung von freiem und gebundenem ¹²⁵J-Insulin erfolgte durch die Alkoholpräzipitation⁹⁻¹¹.

Ergebnisse und Diskussion (Tabelle und Figur). Das Serum der an Insulin adaptierten Hunde unterscheidet



Elutionsdiagramme einer Gelfiltration über Sephadex G 200 der mit ¹²⁵J-Insulin inkubierten Hundesera.

- ¹ G. MOHNIKE, Z. ges. exp. Med. 120, 23 (1952).
- ² G. KRÜGER, Diss. Med. Fak. Greifswald (1969).
- ³ VEB Berlin-Chemie, Mischinsulin von Rind und Schwein.
- ⁴ R. MENZEL und M. ZIEGLER, Endokrinologie 56, im Druck (1970).
- ⁵ G. OUCHTERLONY, Progr. Allergy 6, 30 (1962).
- ⁶ Wir danken den Herren Dr. B. JOHANNSEN und J. GENS, Zentralinstitut für Kernforschung Rossendorf für die freundliche Überlassung des ¹²⁵J-Insulins.
- ⁷ P. GRABAR und P. BURTIN, Immunelektrophoretische Analyse (Elsevier Verlag, Amsterdam 1964).
- ⁸ P. J. CHAO, J. M. KARAM and G. M. GRODSKY, Diabetes 14, 27 (1965).
- ⁹ L. G. HEDING, Proc. of the Conference on Problems Connected with the Preparation and Use of Labelled Proteins in Tracer Studies. Pisa 1966, p. 345.
- ¹⁰ M. ZIEGLER, U. KARG und H. G. LIPPMANN, Wiss. Z. Karl-Marx-Univ. Leipzig, Math.-Naturwiss. R. 18, 609 (1969).
- ¹¹ Dem Medizinisch-technischen Personal Frl. RENATE NITSCHKE und Herrn D. KLATT danken wir für die technische Assistenz.

Untersuchung von Hundeseren auf Insulinantikörper mit differentiellen Nachweismethoden

	Präzipitation von Insulin im Agardiffusionstest nach OUCHTERLONY ⁷	¹²⁵ J-Insulinbindung an γ -Globuline		Insulinbindung an Serum ¹²⁵ J-Insulin/ml Serum
		Autoradiografie nach Agargelelektrophorese	Gelfiltration Sephadex G 200 (Figur)	
Kontrollhunde n = 3	—	—	—	< 5 μ E
An Insulin adaptierte Hunde n = 2	—	—	—	< 5 μ E
Gegen Insulin immunisierte Hunde n = 3	—	+	+	49,4 μ E
	—	+	+	20,0 μ E
	+	+	./.	./.

sich bei den von uns angewandten IAK-Nachweismethoden nicht von dem Serum der Kontrolltiere, welche niemals Insulin erhielten. Eine Beteiligung der IAK an den Adaptationsvorgängen ist deshalb nicht anzunehmen. Als Ursache für das Fehlen von IAK könnte an die Induktion einer Immunotoleranz¹² durch die einschleichende Insulinapplikation gedacht werden, zumal über die gute immunologische Reaktivität dieser Spezies gegen Insulin⁴, insbesondere gegen das therapeutisch beim diabetischen Hund verabreichte identische Insulinpräparat¹³, erst kürzlich berichtet wurde. Für das Entstehen einer IAK-bedingten Insulinresistenz ist deshalb ausser den bekannten Faktoren (unter anderem Reaktivität des Individuums, Reinheit des Insulins) auch der Modus der initialen Insulinierung entscheidend. Dies sollte bei der Diskussion über die Ursachen von IAK bei Patienten, wie auch bei der Behandlung der Diabetiker, berücksichtigt werden.

Summary. Subcutaneous injection of exogenous insulin always results in a production of antibodies against insulin. But after a slowly increased dose of insulin (a daily end dose of 3.5–4.2 U/kg) insulin antibodies could not be found in the serum of 2 dogs. This failure of immunogenic action of insulin is discussed as an induction of immunotolerance by the modus of initial antigen application.

RUTH MENZEL und M. ZIEGLER

Zentralinstitut für Diabetes «Gerhard Katsch»,
Karlsburg bei Greifswald (DDR-2201), 26. Februar 1970.

¹² L. KERP, J. LANGER, H. KASEMIR und S. STEINHILBER, *Klin. Wschr.* 47, 492 (1969).

¹³ U. FISCHER, H. HOMMEL, S. KNOSPE, R. MICHAEL und M. ZIEGLER, *Hormon Metab. Res.*, im Druck (1970).

Reduced Lymphatic Drainage from Hamster Cheek Pouch: A Proposed Explanation of its Immunologically Privileged Character

The question of whether or not the cheek pouch of the hamster contains lymph vessels for the egression of foreign antigen to the regional seats of host sensitization in the evocation of an immunological response has come to be a central issue in the elucidation of its immunologically privileged character. While the classical methods of injecting carbon and vital dyes have failed to demonstrate lymphatic channels in the cheek pouch connective tissue or leading therefrom to its regional cervical lymph nodes^{1,2}, the recent histological verification of lymph vessels in the pouch³ and of a retarded blackening of the ipsilateral submental nodes after India ink injection to the pouch⁴ support the existence of a lymphatic drainage from this organ. By depositing an iron compound into the cheek pouch wall and later histochemically staining the regional lymph nodes for iron at regular intervals, additional evidence is here presented for a delayed and reduced lymphatic drainage from this site.

Eight golden hamsters (*Mesocricetus auratus*), obtained commercially (Hilltop Lab Animals, Scottdale, Pa.), of both sexes and weighing 70–80 g, were anesthetized with sodium amobarbital (100 mg/kg i.p.), their left cheek pouches everted and pinned to a corkboard, and injected with 0.1 ml of a 1:1 water dilution of cadmium-free ferritin (Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland, Ohio) into the cheek pouch wall. The pouches were then wiped clean of any excess ferritin and replaced in the hamsters' mouths. 2 hamsters were sacrificed by overdosing with anesthesia at intervals of 2, 4, 6, and 24 h post injection and their left cheek pouches, left and right submental lymph nodes, and livers removed, fixed in 10% neutral formalin, and sectioned in paraplast; hematoxylin-eosin and Gomori's iron stains were performed on all specimens. Another group of 8 hamsters, serving as controls, received 0.1 ml of the ferritin solution intracutaneously to the left part of their upper lips. These animals were sacrificed and their tissues processed as in the cheek pouch group.

The presence of stainable iron in the ipsilateral submental lymph node prior to any systemic dissemination of this compound was considered as indicative of a lymphatic drainage from the cheek pouch. It was found that histochemically demonstrable iron was present only in a

few foci of the ipsilateral nodes in the group sacrificed at 24 h post implantation of ferritin in the cheek pouch (Figure A). In comparison, the same nodes already contained a greater amount and distribution of stainable iron at 2 h after injection to the lip (Figure B), but did not appear to increase measurably in quantity during the first 24 h. In both cases, stainable iron was essentially limited to the lymph nodes' sinusoidal system. No iron deposition was found in the livers of the animals of either group.

This reduced and delayed egression of ferritin from the hamster cheek pouch agrees well with our previous results using India ink injected into an isolated cheek pouch chamber assembly⁴. In fact, the reduced drainage by a factor of about 10 is identical with that obtained with carbon⁴. It would seem, then, that molecules ranging from 9 to 13 nm, or their conglomerates, drain from the cheek pouch to its regional ipsilateral submental lymph node at 1/10 the rate as from adjacent areas of the head. This finding thus militates against the view¹ that no direct route exists between the cheek pouch and its regional lymph nodes. Since lymph vessels have been demonstrated in histological sections of the cheek pouch³, our results might reflect 1. an impeded spread of such particulate matter within the cheek pouch connective tissue thus not bringing a sufficient number of molecules to the lymph channels, in accordance with BILLINGHAM and SILVERS⁵ connective tissue 'barrier' hypothesis, 2. a paucity of lymph vessels in the cheek pouch, and/or 3. lymph vessels in the pouch which are of a different functional character than those elsewhere in the hamster.

¹ D. SHEPRO, N. KULA and J. A. E. HALKETT, *J. exp. Med.* 117, 749 (1963).

² S. WITTE, D. M. GOLDENBERG and K. T. SCHRICKER, *Z. ges. exp. Med.* 148, 72 (1968).

³ R. LINDENMANN and P. STRÄULI, *Transplantation* 6, 557 (1968).

⁴ D. M. GOLDENBERG and W. STEINBORN, submitted for publication (1970).

⁵ R. E. BILLINGHAM and W. K. SILVERS, in *Transplantation* (Eds. G. E. W. WOLSTENHOLME and M. P. CAMERON; Churchill, London 1962), p. 90.