

Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt

Zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten für die intestinale Glucoseresorption bei Untersuchungen in vivo*)

Von H. FÖRSTER und B. MENZEL

Mit 7 Abbildungen und 5 Tabellen

(Eingegangen am 29. März 1971)

Bereits 1925 postulierte CORI einen sättigbaren Mechanismus für die intestinale Glucoseresorption, da er bei Erhöhung der Konzentration oral verabreichter Glucoselösungen über einen Grenzwert keine weitere Steigerung der Glucoseresorption mehr finden konnte. Nach den Ergebnissen von CORI wurde die Substratsättigung bei etwa 20%igen Glucoselösungen erreicht. Dieses Ergebnis wurde jedoch von RAVDIN und Mitarb. (1933) bereits kurz danach angezweifelt, da diese Autoren feststellten, daß die Glucosekonzentration im Darmlumen unabhängig von der Konzentration der oral zugeführten Lösungen immer etwa 4–5% betrug. VERZAR (1935) fand mit einer anderen Methode (ebenfalls *in vivo*) eine Substratsättigung schon bei wesentlich niedrigeren Glucosekonzentrationen.

Von FISHER und PARSONS wurde 1952 erstmals die MICHAELIS-MENTEN-Abteilung auch auf die intestinale Glucoseresorption angewendet. In der Folgezeit wurden die einfach zu handhabenden *in-vitro*-Methoden bevorzugt. Dagegen wurden die aufwendigeren Untersuchungen am lebenden Tier eher vernachlässigt.

Mit sehr unterschiedlichen Methoden wurde in den letzten Jahren die MICHAELIS-Konstante (Transportkonstante) für die intestinale Glucoseresorption von verschiedenen Arbeitsgruppen bestimmt. Bei einem Vergleich der Ergebnisse fällt die große Streubreite der angegebenen Werte auf. Die Angaben für die MICHAELIS-Konstante der Glucoseaufnahme aus dem Dünndarm schwanken von 1,5 mM–220 mM.

Fragestellung der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der MICHAELIS-Konstanten für die intestinale Glucoseresorption mit einer seit längerer Zeit verwendeten tierexperimentellen Methode. Die erhaltenen Werte sollten mit den in der Literatur angegebenen Werten verglichen werden.

Material und Methode

Die Untersuchungen wurden im Verlauf von mehreren Jahren mit männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt (siehe Tab. 1). Die Tiere hatten ein Gewicht von 200–250 g; sie wurden mindestens eine Woche vor den Versuchen vom Züchter bezogen und mit Fertigfutter (Hope-Farm) ernährt. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Tieren Nahrung und Wasser entzogen.

*) Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Tab. I. Zahl der durchgeführten Versuche: Dünndarmperfusion ohne gleichzeitige Infusion.
 Versuchsdauer: 60 Min Perfusionsmenge: 60 ml/60 Min

Prüfsubstanzkonzentration:	0,05%	0,1%	0,25%	0,5%	0,75%	1,0%	2,5%	5,0%	Verwendet in Abb.
Sonstige Zusätze									
—	12	18	11	20	—	18	11	13	1, 2, 4
$-/2 \times 10^{-3}$ M/l Phl.	—	12	11	12	—	12	12	12	2, 4
$-/2 \times 10^{-4}$ M/l Phl.	—	6	—	12	—	12	11	12	2
$-/2 \times 10^{-5}$ M/l Phl.	—	12	12	16	—	24	17	12	2
NaCl	12	25	21	34	12	18	18	13	1, 3, 5
NaCl/2 $\times 10^{-3}$ M/l Phl.	—	18	11	11	—	12	12	12	5
Xylit	12	24	18	29	—	12	17	18	1, 7
Xylit/2 $\times 10^{-3}$ M/l Phl.	—	6	12	12	—	12	18	18	7
MgSO ₄	—	18	18	28	—	11	12	12	1, 6
MgSO ₄ /2 $\times 10^{-3}$ M/l Phl.	—	12	12	18	—	12	12	12	6
Xylitresorption	—	9	12	18	—	18	12	18	3

Die Versuche wurden im allgemeinen in Serien von 3-6 Ratten durchgeführt. Jedes Ergebnis wurde mindestens 2-3mal im Abstand von Wochen bis Monaten kontrolliert.

1. Methodik der Tierversuche (FÖRSTER und MEHNERT, 1963)

Zur Narkose erhielten die Ratten 1 g Urethan pro kg Körpergewicht subcutan injiziert. Bei Bedarf wurde die Narkose mit Narkoseäther vertieft.

Mittels eines Medianschnittes wurde der Bauchraum eröffnet und eine Kanüle durch den Magen in den Pylorus eingebunden. Eine weitere Kanüle wurde 2 cm proximal vom Coecum in das Ileum eingelegt. Die vorerwärmte Versuchslösung wurde durch eine Rollenpumpe mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 ml/Minute über die im Duodenum liegende Kanüle in den Darm eingeleitet. Die aus der im unteren Ileum liegenden Kanüle abtropfende Flüssigkeit wurde gesammelt. Am Ende des Versuchs wurden verbliebene Flüssigkeitsreste mit Luft aus dem Darm ausgeblasen.

Bei den Versuchen wurde den Versuchslösungen Kollidon (Polyvinylpyrrolidon Molekulargewicht etwa 40000) als Leitsubstanz zugesetzt. Kollidon wird nur in Spuren resorbiert. Bei entsprechenden Experimenten konnte das zugesetzte Kollidon nach der Perfusion vollständig im Perfusat wiedergefunden werden. Daher ist Kollidon zur Berechnung der Wasserveränderung und damit zur Bestimmung der resorbierten Substanzmenge gut geeignet.

Die Resorptionskapazität des Darms für Glucose nimmt, wie mehrere Autoren berichtet haben (ANNEGERS, 1964, BAKER et al., 1961, CUMMINGS and JUSSILA, 1955, RIDER et al., 1966), von proximal nach distal ab. Trotzdem haben wir uns entschlossen, den gesamten Dünn darm bei den Resorptionsuntersuchungen zu verwenden. Dadurch wird eine nachfolgende Messung der Darmlänge und eine Berechnung pro cm Darm oder pro Darmgewicht mit den damit verbundenen Fehlern möglichkeiten überflüssig.

Das Perfusionsvolumen wurde mit 60 ml/Std. so gewählt, daß die Substanzresorption bei allen geprüften Konzentrationen gut meßbar war, und die Konzentrationsänderungen weit außerhalb der Fehlerbreite der Nachweismethoden lagen.

Auf eine Auswertung der Blutglucoseveränderungen in Beziehung zur Resorption wurde verzichtet. Wie auch eigene Untersuchungen bestätigt haben, führt bereits Narkose und Bauchoperation zu deutlichen Erhöhungen der Blutglucosekonzentration. Glucose, Fructose und auch Galaktose werden zudem rasch metabolisiert; ihre Konzentrationsänderungen im Blut sind daher kein sicheres Maß für Resorptionsvorgänge.

2. Chemische Nachweise

Die Nachweise zu den jeweiligen Versuchen wurden noch am gleichen Tag durchgeführt. Die Analysen erfolgten jeweils als Dreifach- bis Sechsfachbestimmungen.

Das im Darminhalt als Leitsubstanz verwendete Kollidon wurde modifiziert nach SCHUBERT und WAGNER (1959) nachgewiesen (MEHNERT und FÖRSTER, 1961). Glucose wurde im allgemeinen mit Glucoseoxydase/Peroxydase (HUGGETT und NIXON, 1957) bestimmt. Bei niedrigen Glucosekonzentrationen wurde zusätzlich der spezifischere Nachweis mit Hexokinase/Glucose-6-phosphatdehydrogenase verwendet (SCHMIDT, 1961). Auch bei hohen Phlorizinkonzentrationen mußte die Glucose mit diesem Nachweis bestimmt werden, da bei der Peroxydaseraktion Phlorizin als Wasserstoffdonator dienen kann. Polyole wurden über Formaldehyd (nach WEST und RAPOPORT, 1949) bestimmt. Der Nachweis von Natrium erfolgte am Flammenphotometer Eppendorf (Fa. Netheler und Hinz). Der osmotische Druck wurde mit einem elektronischen Gefrierpunktssmometer (Fa. Knauer, Heidelberg) bestimmt.

Alle für die Nachweise verwendeten Enzyme wurden von der Firma Boehringer bezogen. Glucose, Xylit und die übrigen Chemikalien stammen von der Firma Merck, Phlorizin von der Firma Calbiochem.

Von den einzelnen Versuchsreihen wurden jeweils die Mittelwerte (\bar{x}) und die mittleren Fehler der Mittelwerte ($S\bar{x}$) bestimmt. Die Zahl der jeweils durchgeführten Versuche ist Tab. 1 zu entnehmen.

Ergebnisse

1. Resorption von Glucose in Abhängigkeit von der Konzentration sowie vom Zusatz anderer Substanzen

Wie aus Abb. 1 zu ersehen ist, kann eine Sättigung der Resorption im untersuchten Konzentrationsbereich nicht festgestellt werden. Auch bei höheren Substanzkonzentrationen erfolgt eine weitere Zunahme der Substanzaufnahme (siehe VIDAL-SIVILLA, 1958 sowie bei FÖRSTER und MEHNERT, 1963). Eine Glucosekonzentration von 5% (278 mM) ist etwa blutisoosmotisch. Untersuchungen mit höheren Glucosekonzentrationen als 5% sollen hier nicht berücksichtigt werden, da gegenüber Blut hyperosmolare Lösungen zu Darmepithelschädigungen führen können (VIDAL-SIVILLA, 1958).

Bei Perfusion von hypotonen Glucoselösungen ohne weitere Zusätze ist eine erhebliche Wasserresorption zu beobachten (siehe bei FÖRSTER und MEHNERT, 1965), die einen Einfluß auf die Substanzresorption ausüben könnte (solvent drag). Außerdem könnte Perfusion des Dünndarms mit solchen Lösungen zu Schädigungen führen, die sich in Veränderungen der Substanzaufnahme auswirken müßten.

Zum Vergleich wurden daher Resorptionsversuche durchgeführt mit Lösungen, deren osmotischer Druck durch den Zusatz anderer Substanzen (Natriumchlorid, Magnesiumsulfat, Xylit) erhöht wurde. Als Basalmedium wurde 0,15 M Natriumchloridlösung, 0,15 M Magnesiumsulfatlösung oder 0,27 M Xylitlösung verwendet

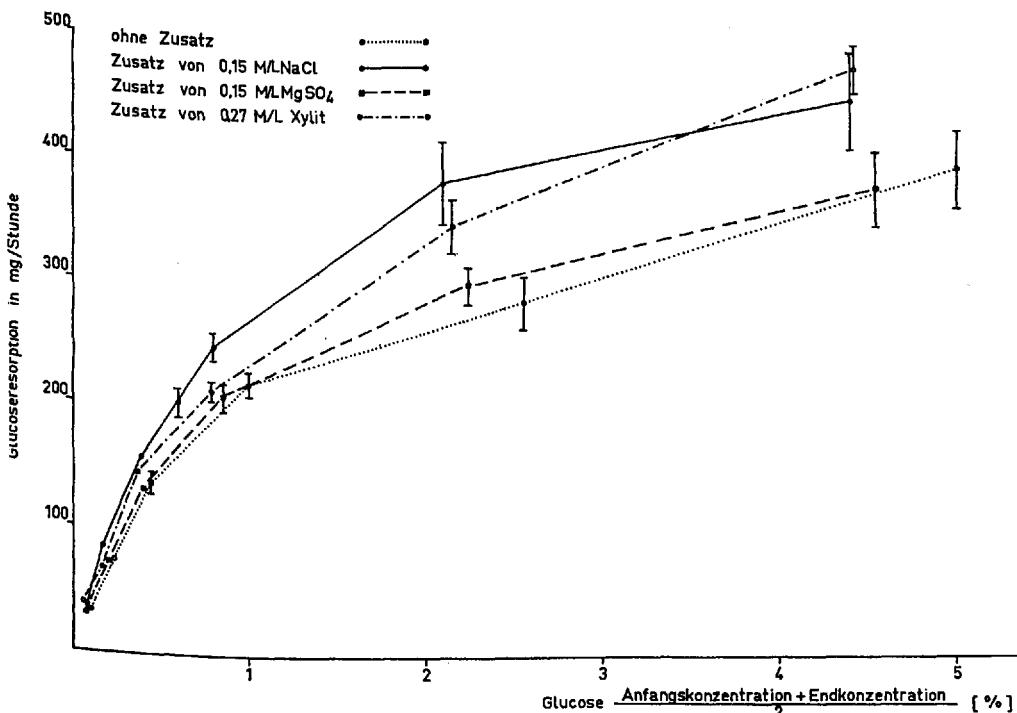


Abb. 1. Resorption von Glucose aus dem perfundierten Dünndarm der Ratte.

und dann die Glucose zugesetzt. Dadurch nahm der osmotische Druck der Lösungen mit der Glucosekonzentration entsprechend zu.

Magnesiumsulfatzusatz führt zu keinen Veränderungen der Glucoseresorption (siehe Abb. 1). Dagegen wird durch Zusatz von Natriumchlorid oder Xylit die Glucoseresorption signifikant ($p < 0,01$) gesteigert. Die Glucoseaufnahme unter Einfluß von Natriumchlorid unterscheidet sich nur unwesentlich von der Glucoseresorption unter Einfluß von Xylit. Die Beziehung zwischen Glucosekonzentration und Glucoseresorption wird durch Zusatz osmotisch wirksamer Substanzen nicht wesentlich verändert.

Diese Ergebnisse machen wahrscheinlich, daß Perfusion des Dünndarms mit hypoosmolaren Lösungen keine schweren Schädigungen des Darmepithels bewirkt. Die im Verhältnis geringe Zunahme der Resorption unter Einfluß von Xylit bzw. von Natriumchlorid gegenüber der Glucoseresorption aus Lösungen ohne weitere Zusätze könnte jedoch auf eine leichtere Beeinträchtigung der Resorption bei Verwendung von hypotonen Lösungen (oder auch von Lösungen mit Magnesiumsulfat) hindeuten.

Als niedrigste Glucosekonzentration wurde je nach Versuchsanordnung 0,05 % Glucose (2,8 mM) und 0,1 % Glucose (5,6 mM) untersucht. Da die Blutglucosekonzentrationen bei narkotisierten Ratten etwa 120 mg % (6,7 mM) beträgt, wird unter diesen Bedingungen ein Glucosebergautransport beobachtet (siehe auch CZAKY und HO, 1965). Die Glucoseaufnahme erfolgt bei dieser Versuchsanordnung auch ohne Zusatz osmotisch wirksamer Substanzen gegen ein Glucosekonzentrationsgefälle.

2. Wirkung von Phlorizin auf die Glucoseresorption

Die Hemmung der Glucoseresorption durch Phlorizin ist von der Glucosekonzentration abhängig. Während bei einer Glucosekonzentration von 0,1 % (5,6 mM) Phlorizin in einer Konzentration von 2×10^{-3} M die Glucoseresorption um mehr als 90 % hemmt, beträgt die Resorptionshemmung bei 5 % Glucose und der gleichen Phlorizinkonzentration nur noch etwa 50 % (siehe Abb. 2). Dieses Verhalten wäre mit einem kompetitiven Mechanismus zu erklären, wenn nicht bei einer um eine Zehnerpotenz niedrigeren Phlorizinkonzentration (2×10^{-4} M) etwa die gleiche Hemmung der Glucoseresorption beobachtet würde (siehe Abb. 2). D. h., die Resorptionshemmung läßt sich durch Erhöhung des Phlorizinzusatzes nicht mehr steigern. Aus diesem Verhalten ist abzuleiten, daß die phlorizinhemmbarer Glucoseresorption bei 2×10^{-3} M Phlorizin wahrscheinlich vollständig gehemmt ist. Bei Verringerung der Phlorizinkonzentration auf 2×10^{-5} M wird die kompetitive Wirkung des Phlorizins auf die Glucoseaufnahme erkennbar, bei hoher Glucosekonzentration ist die Hemmung schwächer als bei niedriger Glucosekonzentration. Man kann nach diesen Ergebnissen annehmen, daß die Glucoseresorption über zwei verschiedene Mechanismen verläuft, über einen phlorizinhemmabaren und über einen phlorizinunempfindlichen Mechanismus. Bei Zusatz von Natriumchlorid oder Magnesiumsulfat ist eine ähnliche Beziehung zwischen Phlorizinkonzentration und Glucoseresorption zu beobachten, jedoch ist hier die Phlorizinwirkung bei 2×10^{-4} M Phlorizin etwas schwächer (FÖRSTER, 1966).

Die durch Phlorizin nicht hemmbarer Glucoseresorption hat Ähnlichkeiten mit der Resorption von Substanzen, die wahrscheinlich durch Diffusion resorbiert werden. Die Pentosen Arabinose und Ribose und die Polyalkohole Sorbit oder Xylit werden proportional zur Substanzkonzentration aus dem Darmlumen aufgenommen (FÖR-

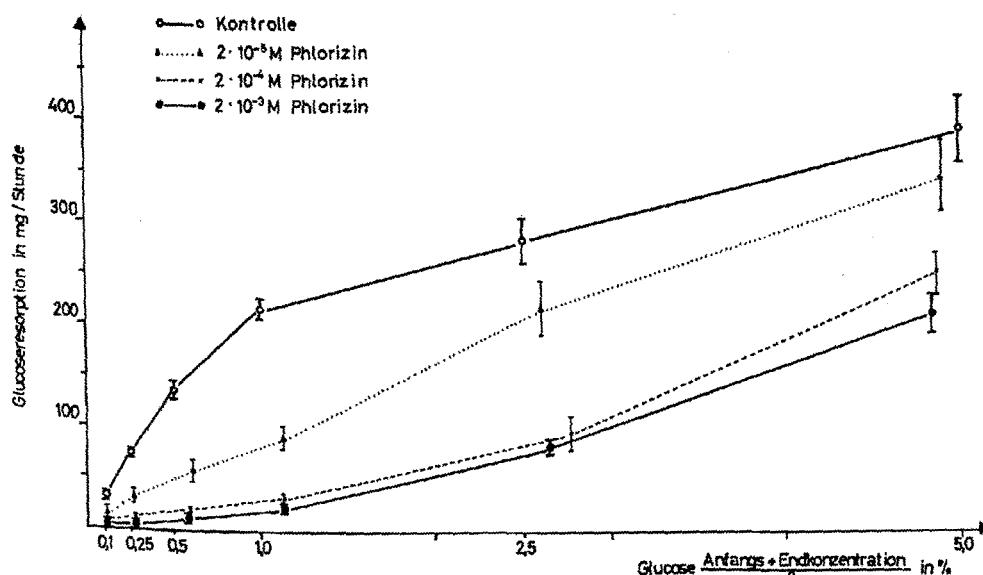


Abb. 2. Einfluß von Phlorizin auf die Glucoseresorption aus dem perfundierten Dünndarm der Ratte.

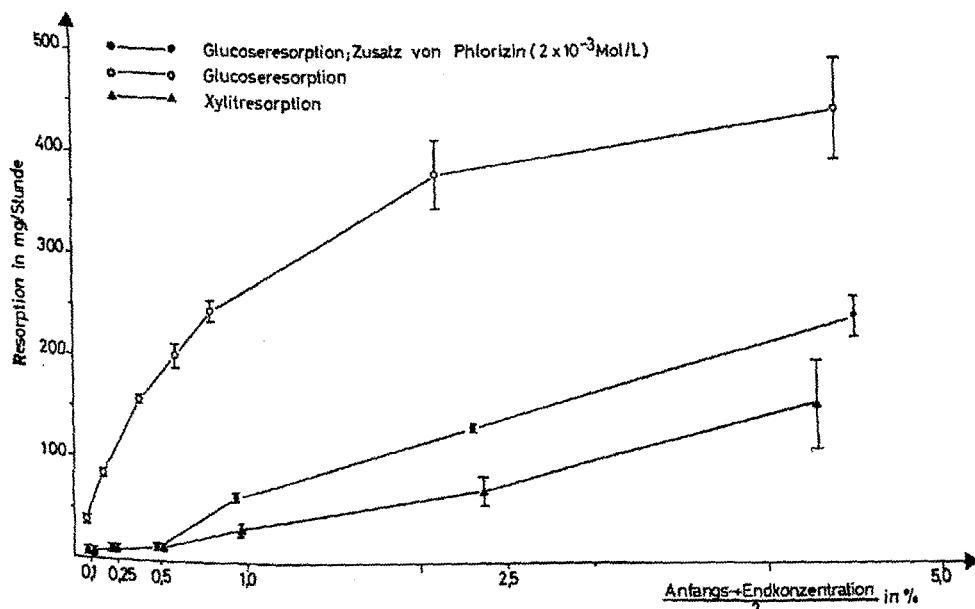


Abb. 3. Resorption von Glucose mit und ohne Zusatz von Phlorizin und von Xylit aus dem perfundierten Dünndarm der Ratte. Zusatz von 0,15 Mol/L NaCl zum Perfusionsmedium bei der Prüfung der Glucoseresorption.

STER, unveröffentlicht, siehe auch bei CRANE 1960, WILSON, 1962). In Abb. 3 ist als Beispiel die Resorption von Xylit der Glucoseresorption gegenübergestellt.

Die Tatsache, daß die Resorption von Glucose aus Lösungen mit sehr niedrigem osmotischen Druck (weniger als 50 mosmol) durch Phlorizin zu hemmen ist, kann als Beweis dafür angesehen werden, daß der Transportmechanismus auch unter diesen Bedingungen noch funktionsfähig ist. Da Zusatz von Phlorizin (2×10^{-4} M) zu einer fast vollständigen Hemmung der Glucoseaufnahme führt (bei niedrigen Glucosekonzentrationen), die unter diesen Bedingungen zu beobachtende Wasseraufnahme (10–20 ml pro Stunde bei 220 g schweren Ratten, siehe bei FÖRSTER und MEHNERT, 1965) aber nur unwesentlich verändert wird, kann gefolgert werden, daß dem solvent drag keine wesentliche Bedeutung zukommt.

ALVARADO (1967) und DIEDRICH (1966) haben bei Untersuchungen *in vitro* festgestellt, daß Phlorizin die Glucoseresorption kompetitiv hemmt. Die Affinität von Phlorizin zum Transportsystem ist nach diesen Untersuchungen mehr als tausendfach größer als die Affinität von Glucose. Auch wenn man diese Werte zugrunde legt ist eine annähernd vollständige Blockierung der Glucoseaufnahme in dem von uns geprüften Konzentrationsbereich zu errechnen.

Tab. 2. Transportkonstanten (K_T) und maximale Transportkapazität (T_{max}) für die phlorizinhemmbarer Glucoseresorption bei Dünndarmperfusion von Ratten *in vivo*

Versuchsanordnung	K_T	T_{max}
Kein Zusatz	20 mM	1,1 mMol/Std.
Zusatz von 0,15 M/l NaCl	18 mM	1,4 mMol/Std.
Zusatz von 0,15 M/l MgSO ₄	17 mM	1 mMol/Std.
Zusatz von 0,27 M/l Xylit	16 mM	1 mMol/Std.

3. Bestimmung von K_T und V_{max}

Wie bereits ausgeführt, ist unter unseren Versuchsbedingungen keine Sättigung der Glucoseresorption zu erreichen. Die in Abb. 1 dargestellten Ergebnisse können allerdings als Überlagerung von zwei verschiedenen nebeneinander ablaufenden Reaktionen gedeutet werden, nämlich als Überlagerung eines nicht zu sättigenden Vorganges (Diffusion?) und eines sättigbaren Vorganges, der mit der MICHAELIS-MENTEN-Ableitung erklärt werden könnte (Transport?).

Der phlorizinhemmbarer Anteil der Glucoseresorption, den man erhält, wenn man von der Gesamtresorption die durch Phlorizin nicht zu hemmende Glucoseresorption abzieht, zeigt eine Substratsättigung. Die Transportkonstante (K_T) sowie die maximale Resorptionskapazität (V_{max}) sind aus der resultierenden Kurve zu bestimmen.

Die phlorizinhemmbarer Glucoseresorption, die einem Sättigungsvorgang entspricht, wurde in Abb. 4 bis Abb. 7 als „aktiv resorbierte“ Glucose bezeichnet. Diese phlorizinhemmbarer Glucoseresorption wird etwas beeinflußt von zugesetzten osmotisch wirksamen Substanzen. Besonders bei Zusatz von Xylit sind Abweichungen zu beobachten. Da sich die Versuche über mehrere Jahre erstreckten, sind jedoch Unterschiede im verwendeten Tiermaterial nicht vollständig auszuschalten.

Die Sättigung der phlorizinhemmbarer Glucoseresorption ist bei den von uns durchgeführten Versuchen zwischen 1% (55,6 mM) und 2,5% (139 mM) zu beobachten. Die V_{max} für den aktiven Anteil der Glucoseresorption beträgt zwischen 1 Millimol Glucose pro Stunde und Ratte bei Zusatz von Xylit und 1,4 Millimol Glucose

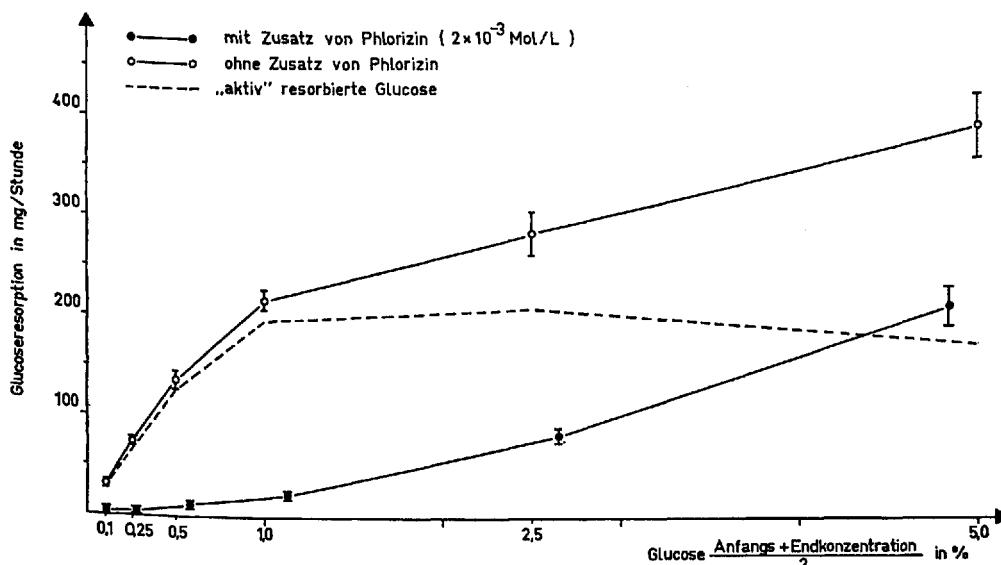


Abb. 4. Einfluß von Phlorizin auf die Glucoseresorption aus dem perfundierten Dünndarm der Ratte.

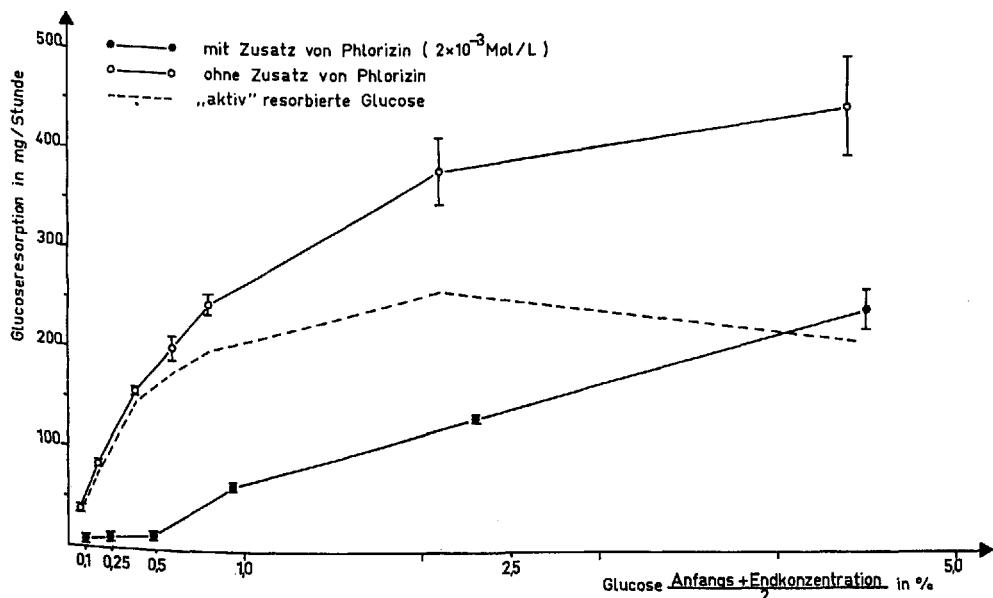


Abb. 5. Einfluß von Phlorizin auf die Glucoseresorption aus dem perfundierten Dünndarm der Ratte. Zusatz von 0,15 Mol/L Na Cl zum Perfusionsmedium.

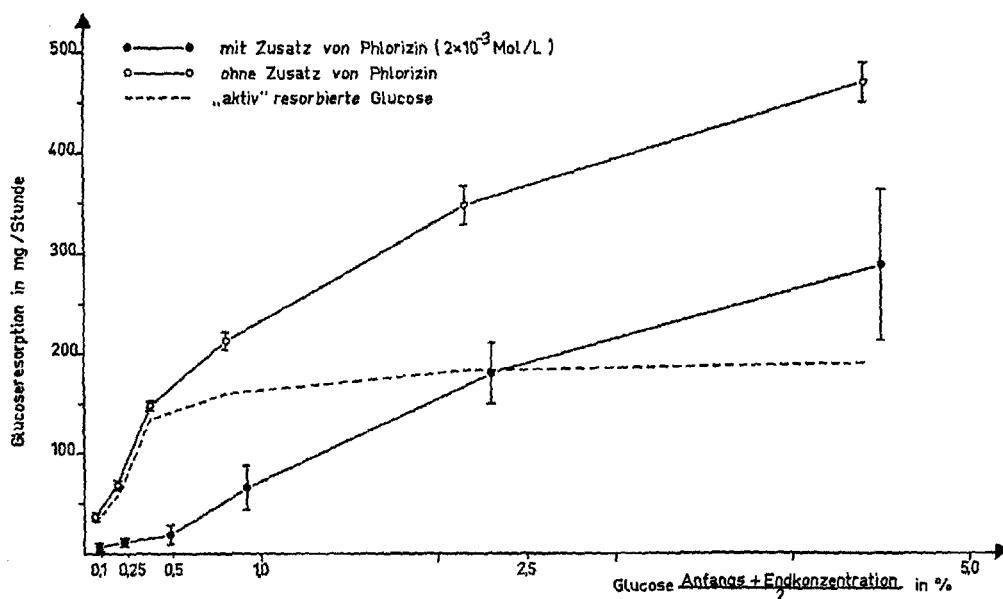


Abb. 6. Einfluß von Phlorizin auf die Glucoseresorption aus dem perfundierten Dünndarm der Ratte. Zusatz von 0,27 Mol/L Xylit zum Perfusionsmedium.

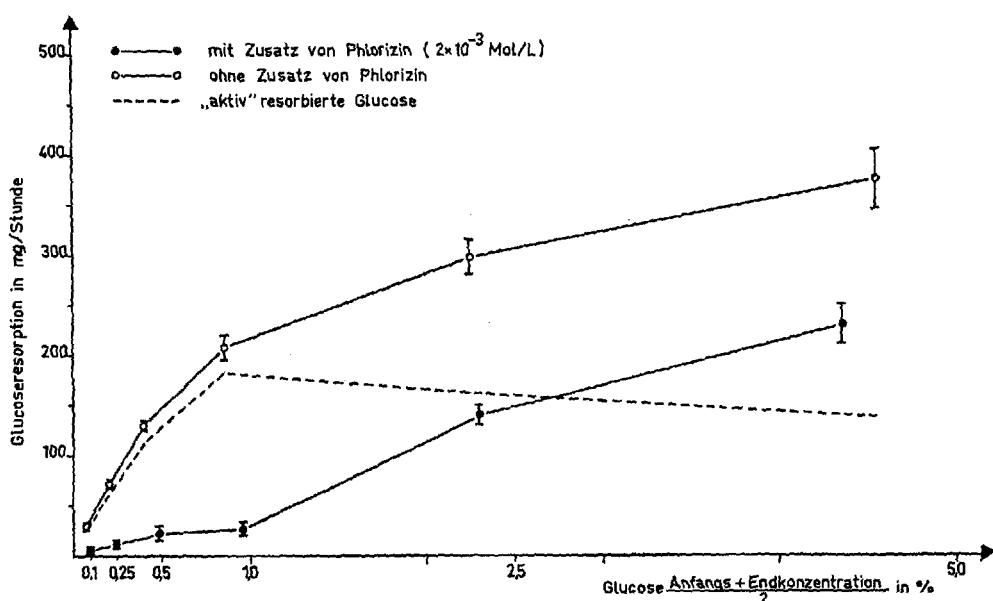


Abb. 7. Einfluß von Phlorizin auf die Glucoseresorption aus dem perfundierten Dünndarm der Ratte. Zusatz von 0,15 Mol/L MgS₄ zum Perfusionsmedium.

pro Stunde und Ratte bei Zusatz von Natriumchlorid. Die Transportkonstante beträgt zwischen 16 mM (bei Zusatz von Xylit) und 20 mM (ohne Zusatz von anderen Substanzen).

4. Veränderung des osmotischen Druckes und der Natriumkonzentration während der Perfusion des Dünndarmes

Aus Tab. 3 sind die Ergebnisse der Messungen für einige Konzentrationen ersichtlich. Auf die Angabe der übrigen Werte wurde aus Platzgründen verzichtet. Bei den Experimenten mit Zusatz von Magnesiumsulfat waren die entsprechenden Untersuchungen nicht durchgeführt worden.

Bei einem größeren Teil der Versuchsreihen wird im Perfusat ein osmotischer Druck gemessen, der um etwa 20–30 mosmol höher ist als der mit dem gleichen Instrument gemessene osmotische Druck im Blut (281 ± 11 mosmol). Nur bei extremen Ausgangsbedingungen werden erhebliche Abweichungen beobachtet. Dies gilt sowohl für die Verwendung von Lösungen mit einem osmotischen Druck von weniger als 100 mosmol als auch für solche mit einem osmotischen Druck von mehr als 500 mosmol. Unter solchen Bedingungen ist offenbar die Durchströmungsgeschwindigkeit des Darms zu groß, als daß sich ein Gleichgewichtszustand einstellen könnte.

Die Na^+ -Konzentration im Perfusat beträgt bei Verwendung von primär natriumfreien Lösungen ohne sonstige Zusätze maximal 25 % der Natriumkonzentration im Blut. Durch Zusatz von osmotisch wirksamen Substanzen (Xylit, Magnesiumsulfat) wird die Wasserresorption vermindert und zusätzlich auch die Natriumausscheidung eingeschränkt. Die unter diesen Bedingungen gemessenen Na^+ -Konzentrationen betragen etwa 10 % der Na^+ -Konzentration im Serum (bei Ratten 142 ± 5 mval/l). Wie orientierende Messungen ergeben haben, nimmt die Natriumkonzentration während der Darmperfusion fast gleichmäßig zu: in den oberen Darmabschnitten ist die Natriumkonzentration wesentlich geringer als in den unteren Darmabschnitten (FÖRSTER, unveröffentlicht). Da im Darmepithel eine Na^+ -Konzentration von etwa 50 mval/l gemessen wurde (SCHULTZ, S. G. et al., 1966), besteht während der gesamten Darmpassage bei Verwendung natriumfreier Perfusionslösungen ein Konzentrationsgefälle für Natrium vom Darmepithel zum Darmlumen.

Diskussion

Von den verschiedenen Arbeitsgruppen wurde mit unterschiedlichen Methoden die maximale Resorptionskapazität (V_{max}) und die Transportkonstante (K_T) für die intestinale Glucoseresorption bestimmt. Die Verwendung von unterschiedlichen Methoden erschwert einen Vergleich der Ergebnisse. Insbesondere die maximale Resorptionskapazität (V_{max} oder T_{max}) ist kaum vergleichbar, verschiedene Autoren haben daher auch auf diese Angabe verzichtet. Die Transportkonstante als charakteristische Kenngröße für den Transportvorgang müßte dagegen von der Versuchsanordnung weitgehend unabhängig sein.

Vergleicht man bei Untersuchungen *in vivo* erhaltene MICHAELIS-Konstanten, so fällt auf, daß sich die Ergebnisse um etwa eine Zehnerpotenz unterscheiden. Verschiedene Autoren wiesen darauf hin, daß bei Untersuchungen *in vivo* keine sichere Substratsättigung festzustellen ist (ANNEGERS, 1964, FÖRSTER und MEHNERT, 1965, RIDER et al. 1967). Bei allen diesen Untersuchungen wurde für die Halbsättigungs- konstante eine Konzentration weit oberhalb der Blutglucosekonzentration (Blut-

Tab. 3. Veränderung der Na^+ -Konzentration und des osmotischen Druckes während Perfusion des Rattendünndarmes.
 Perfusionsvolumen: 60 ml/60 Min Perfusionsdauer: 60 Min (Angaben: $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Glucosekonzentration	Zusatz	Na^+ -Konzentration	osmotischer Druck	Nach Perfusion		Nach Perfusion	
				Vor Perfusion	Nat.-Konzentration	osmotischer Druck	Nat.-Konzentration
0,1%	—	—	6 mosmol	41 \pm 4 mval/l	118 \pm 29 mosmol	—	—
0,5%	—	—	30 mosmol	42 \pm 5 mval/l	128 \pm 31 mosmol	—	—
1,0%	—	—	58 mosmol	38 \pm 7 mval/l	174 \pm 35 mosmol	—	—
5,0%	—	—	295 mosmol	16 \pm 4 mval/l	315 \pm 14 mosmol	—	—
0,1%	Xylit 0,27M	—	270 mosmol	17 \pm 3 mval/l	302 \pm 20 mosmol	—	—
0,5%	Xylit 0,27M	—	298 mosmol	19 \pm 4 mval/l	312 \pm 18 mosmol	—	—
1,0%	Xylit 0,27M	—	320 mosmol	16 \pm 3 mval/l	318 \pm 18 mosmol	—	—
5,0%	Xylit 0,27M	—	540 mosmol	12 \pm 3 mval/l	445 \pm 26 mosmol	—	—
0,1%	NaCl 0,15M	150 mval/l	273 mosmol	152 \pm 12 mval/l	290 \pm 19 mosmol	—	—
0,5%	NaCl 0,15M	150 mval/l	304 mosmol	160 \pm 10 mval/l	315 \pm 26 mosmol	—	—
1,0%	NaCl 0,15M	150 mval/l	322 mosmol	155 \pm 11 mval/l	314 \pm 18 mosmol	—	—
5,0%	NaCl 0,15M	150 mval/l	533 mosmol	124 \pm 16 mval/l	436 \pm 27 mosmol	—	—

glucosekonzentration: 120 mg % Glucose entsprechend 6 mM) gefunden. Das bedeutet, daß im geprüften Konzentrationsbereich auch Diffusionsvorgänge ablaufen können, da bei den Untersuchungen meistens ein deutliches Konzentrationsgefälle vom Darm zum Blut besteht. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, daß unter bestimmten Bedingungen bei hoher Blutglucosekonzentration Glucose vom Blut in den Darm übertragen kann (FÖRSTER, KAISER und MEHNERT, 1965, FÖRSTER, MEHNERT und HASLBECK, 1966). Auch dieses Ergebnis würde für eine mögliche Bedeutung von Diffusionsvorgängen sprechen.

Lediglich von LEVITT et al. (1969) wurde bisher versucht, die Glucoseresorption in verschiedene Komponenten zu zerlegen. Diese Autoren haben als Beispiel für die Diffusion die Pentose Arabinose verwendet, und in einem Modell die Arabinoseaufnahme für die wahrscheinliche Diffusion von Glucose eingesetzt. Wir haben bereits früher die aktive Komponente der Glucoseresorption von der passiven Komponente abtrennen können (FÖRSTER, 1968, FÖRSTER, 1969). Dazu verwendeten wir Phlorizin, das als kompetitiver Inhibitor des Glucosetransportes bekannt ist. Nach Untersuchungen von DIEDRICHS (1966) sowie von ALVARADO (1967) ist die Affinität von Phlorizin zum Glucosetransportsystem um etwa drei Zehnerpotenzen höher als die von Glucose. Wie aus Abb. 2 zu ersehen ist, führt Verzehnfachung der Phlorizinkonzentration nur noch zu einer geringfügigen weiteren Zunahme der Resorptionshemmung. Daraus ist zu folgern, daß wahrscheinlich bereits durch 2×10^{-4} M Phlorizin die aktive Glucoseresorption vollständig gehemmt wird.

Durch Zusatz von Phlorizin ist daher die Glucoseresorption in zwei Komponenten zu zerlegen. Die phlorizinhemmbarer Glucoseresorption sollte der aktiv resorbierten Glucoseresorption entsprechen, während die durch Phlorizin nicht zu hemmende Glucoseresorption einem Diffusionsvorgang entsprechen könnte. Für diese Annahme spricht auch, daß die Glucoseausscheidung in das Darmlumen bei hoher Blutglucosekonzentration etwa von der Größenordnung der durch Phlorizin nicht zu hemmenden Glucoseresorption ist (FÖRSTER, KAISER und MEHNERT, 1965). Damit wird gleichzeitig auf das Fehlen eines Transports gegen einen Konzentrationsgradienten für diese Komponente der Glucoseaufnahme hingewiesen. Die gleichen Charakteristiken wären auch bei einer erleichterten Diffusion mit Substratsättigung bei sehr hoher Glucosekonzentration zu erwarten. Für einen solchen Mechanismus liegen jedoch keinerlei Hinweise vor. Es konnte dagegen nachgewiesen werden, daß die passive Aufnahme von hydrophilen Substanzen aus dem Darm sehr stark vom Molekulargewicht abhängig ist. Aethanol und Glycerin werden z. B. sehr rasch mittels eines nicht zu sättigenden Vorganges aus dem Darmlumen aufgenommen (FÖRSTER, unveröffentlicht). Größere Moleküle, wie Pentosen sowie die Polyole Sorbit oder Xylit werden demgegenüber nur sehr langsam resorbiert. Wie aus Abb. 3 zu ersehen ist, kann die Resorption von Xylit ebenfalls am einfachsten durch Diffusion erklärt werden. Obwohl das Glucosemolekül größer ist als das Xylitmolekül, verläuft die durch Phlorizin nicht zu hemmende Glucoseresorption rascher als die Xylitresorption. Das könnte darauf beruhen, daß das Glucosemolekül als Pyranose vorliegt, während das Xylitmolekül nicht zur Ringbildung befähigt ist. Eine andere Möglichkeit wäre, daß die aktive Glucoseresorption nicht vollständig durch Phlorizin blockiert wird.

Die Diskrepanz der von verschiedenen Autoren mitgeteilten Transportkonstanten für Untersuchungen *in vivo* kann teilweise dadurch erklärt werden, daß die Diffusion (passive Glucoseresorption) bei der Bestimmung der Konstanten nicht berücksichtigt wurde. Dadurch wurden je nach dem geprüften Konzentrationsbereich zu hohe MICHAELISKonstanten gefunden. Zieht man die durch Phlorizin nicht zu hemmende

Glucoseresorption von der Gesamtresorption ab, so erhält man die phlorizinhemmbarer Glucoseresorption (Abb. 4-7). Diese korrigierte Glucoseresorption zeigt eine deutliche Substratsättigung, sie entspricht wahrscheinlich der aktiv resorbierten Glucose. Die bei diesem Vorgehen erhaltenen MICHAELIS-Konstanten sind die niedrigsten in vivo ermittelten MICHAELIS-Konstanten, wenn man von den Untersuchungen von OLSEN und INGELFINGER absieht. Die höchste von diesen Autoren verwendete Glucosekonzentration betrug jedoch 27,8 mM (= 0,5% Glucose).

Das heute meistdiskutierte Modell des intestinalen Glucosetransports ist der von CRANE inaugurierte symmetrische Carrier. Dieser Carrier hat zwei Bindungsstellen, eine für Natriumionen und eine zweite für das Substrat. Durch einen allosterischen Mechanismus ist in Abhängigkeit von der Konzentration der Natriumionen die Affinität des Carriers zum Substrat erhöht. Bei diesem Modell dient letzten Endes die Natriumpumpe als indirekter Energielieferant für den Glucosebergautransport. Bei der von uns gewählten Versuchsanordnung wird jedoch im allgemeinen nur ein Glucosebergabtransport gemessen. Wie aus Abb. 1 zu ersehen ist, erhält man zwar die größte Glucoseaufnahme in Anwesenheit von Natriumchlorid. Wenn man jedoch Natriumchlorid durch isoosmolare Xylitlösung ersetzt, erhält man annähernd die gleiche Glucoseresorption. Bei diesen Untersuchungen ist die Natriumkonzentration im Darmlumen sicher niedriger als diejenige im Darmepithel. Es besteht also bei Verwendung primär natriumfreier Lösungen ein umgekehrter Natriumkonzentrationsgradient als bei Verwendung natriumchloridhaltiger Perfusionslösungen. Wenn man auf weitere Zusätze verzichtet, also teilweise mit stark hypoosmolaren Lösungen arbeitet, so erhält man nur eine leichte Hemmung der Glucoseresorption. Auch Ersatz von NaCl durch Magnesiumsulfat führt nur zu einer mäßigen Resorptionshemmung. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von CSAKY und HO (1965) überein, die ebenfalls darüber berichtet haben, daß bei Ratten in vivo für die Glucoseresorption kein Natriumkonzentrationsgradient erforderlich ist. Zur gleichen Schlußfolgerung kamen auch OLSEN und INGELFINGER (1968) bei ihren Untersuchungen am Menschen.

Für die phlorizinhemmbarer Glucoseresorption lassen sich die aus Tab. 2 ersichtlichen Halbsättigungskonstanten errechnen. Diese Konstanten liegen immer noch etwa um den Faktor 10 höher als in vitro ermittelte MICHAELIS-Konstanten (vgl. Tab. 4 und Tab. 5). Eine mögliche Erklärung wäre, daß bei Durchströmungsversuchen bei niedrigen Glucosekonzentrationen die Konvektion zu gering ist. Bei Bestehen eines Konzentrationsgradienten zum Bürstensaum würde eine zu hohe MICHAELIS-Konstante gefunden. Von FISHER und PARSONS (1952) wurde bei in-vitro-Durchströmung des Dünndarms eine höhere MICHAELIS-Konstante gefunden als von anderen Autoren bei Inkubation in vitro (siehe Tab. 4). Eine andere Möglichkeit wäre, daß sich der gemessene begrenzende Vorgang bei Untersuchungen in vivo bzw. in vitro unterscheidet. Aufgrund des derzeitigen Standes der Resorptionsuntersuchungen kann zwischen diesen beiden Möglichkeiten nicht unterschieden werden.

Nach oraler Verabreichung von hochprozentigen Glucoselösungen (z. B. oraler Glucosetoleranztest) wird durch die Magenentleerung und durch Verdünnungsvorgänge im Dünndarm eine blutisotone Lösung erreicht (FORDTRAN et al., 1961, REYNEL und SPRAY, 1956, RAVDIN et al. 1933). Aus einer blutisotonen Glucoselösung von etwa 5% würde nach vorliegenden Ergebnissen etwa die Hälfte der Glucose mittels eines aktiven Vorganges resorbiert werden, der Rest würde durch massive Vorgänge aufgenommen werden (Abb. 4-7).

Der Anteil des aktiven Vorganges wird um so größer, je niedriger die Glucosekonzentration wird. Bei 1% Glucose würde er z. B. 80% und mehr betragen. Die aktive

Tab. 4. Transportkonstanten für Glucose- und Galaktoseresorption. Untersuchungen *in vitro*

Autoren	Methode	Tierspezies	Bestimmter Parameter	K_r Glucose	K_r Galaktose
BARNETT et al. (1968)	Darmringe	Ratte	Akkumulation	—	10 mM
BARNETT et al. (1968)	Darmringe	Hamster	Akkumulation	—	9 mM
CRANE (1960)	Darmringe	Ratte?	Akkumulation	1,5 mM	2,2 mM
DIEDRICH (1967)	Darmringe	Hamster	Akkumulation	1,25 mM	—
LYON (1967)	Darmringe	Ratte	Akkumulation	1,4 mM	3,8 mM
SAHAGIAN (1965)	Darmstreifen	Meerschweinchen	Akkumulation	3,8 mM	—
JORGENSEN et al. (1960)	Segmentperfusion	Goldhamster	Aufnahme	2,5 mM	12,0 mM
FISHER und PARSONS (1953)	Segmentperfusion	Ratte	Aufnahme	8,3 mM	35 mM
RUKLIS und QUASTEL (1958)	Darmsäckchen	Meerschweinchen	Transfer	7 mM	—

Tab. 5. Transportkonstanten für Glucose- und Galaktoseresorption. Untersuchungen *in vivo*

Autoren	Methode	Tierspezies	K_r Glucose	K_r Galaktose	Lokalisation
ANNEGERS (1964)	Thiry-Vella	Hund	74 mM	145 mM	Jejunum
ANNEGERS (1964)	Fistel	—	17 mM	42 mM	Ileum
CsAKY und HO (1966)	Segmentperfusion	Ratte	ca. 30 mM	—	Jejunum
CsAKY und HO (1966)	Segmentperfusion	Ratte	ca. 35 mM	—	Jejunum
RIDER et al. (1967)	Segmentperfusion	Ratte	48 mM	—	Jejunum
RIDER et al. (1967)	Segmentperfusion	Ratte	6,5 mM	—	Ileum
MANOME und KURIAKI (1961)	Perfusion	Ratte	110 mM	—	Gesamtdarm
HOLDSWORTH und DAWSON (1964)	Darmsonde	Mensch	220 mM	—	Jejunum
OLSEN und INGELFINGER (1968)	Darmsonde	Mensch	9-15 mM	—	Jejunum

Glucoseaufnahme würde insbesondere dafür verantwortlich sein, daß Glucose restlos aus dem Darm aufgenommen wird.

Zusammenfassung

Mittels einer Perfusionsmethode wurde die intestinale Glucoseresorption im Tierversuch *in vivo* geprüft. Da die verwendeten Glucosekonzentrationen im allgemeinen höher als die Blutglucosekonzentration waren, wird ein Glucosebergabtransport gemessen.

Durch Phlorizin läßt sich der Glucosebergabtransport in zwei Komponenten trennen: eine sättigbare phlorizinempfindliche Komponente, die der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik gehorcht, und eine phlorizinunempfindliche Komponente, die nicht zu sättigen ist. Es ist anzunehmen, daß dieser Anteil der Glucoseresorption einer freien Diffusion entspricht.

Die MICHAELIS-Konstante für die phlorizinhemmbarer Glucoseresorption beträgt um 20 mM. Sie ist damit niedriger, als andere *in vivo* bestimmte MICHAELIS-Konstanten, bei denen die Glucoseresorption nicht um den phlorizinunempfindlichen Anteil korrigiert wurde.

Bei dem von uns geprüften Glucosebergabtransport hat die Anwesenheit von Natriumionen im Perfusionsmedium keinen wesentlichen Einfluß auf die Glucoseresorption.

Nach den vorliegenden Ergebnissen kann unter physiologischen Bedingungen (z. B. orale Glucosebelastung) der Anteil der phlorizinhemmbarer (aktiver) Glucoseresorption auf etwa 50% der Gesamtresorption absinken, im allgemeinen wird er aber mehr als 50% betragen.

Summary

The intestinal glucose absorption *in vivo* was studied in experimental animals using a perfusion method. Since the intestinal glucose concentrations used in the experiments were higher than the blood glucose concentration a downhill transport of glucose was measured. In the presence of phlorizin the transport of glucose can be divided into two components:

a saturable phlorizin sensitive component, which follows the MICHAELIS-Menten kinetics, and a phlorizin insensitive component which is not saturable. One may assume that the later part of glucose absorption represents free diffusion.

The MICHAELIS constant of the phlorizin sensitive glucose absorption was found to be 20 mM. This value is lower than the value of other *in vivo* estimations in which the phlorizin insensitive glucose absorption was not taken into consideration. Our experiments on the downhill transport of glucose have shown that the presence of sodium ions in the perfusion medium does not influence the glucose absorption.

Our present results indicate that under certain physiological condition (e. g. oral glucose tolerance test) the fraction of phlorizin sensitive glucose absorption may be as low as 50 percent of the total absorption of glucose; Usually this fraction is more than 50 per cent.

Literatur

1. ALVARADO, F., Biochim. biophys. Acta **135**, 483 (1967). — 2. ANNEGERS, J. H., Amer. J. Physiol. **206**, 1095 (1964). — 3. BAKER, R. D., G. W. SEARLE and A. S. NUNN, Amer. J. Physiol. **200**, 301 (1961). — 4. BARNETT, J. E. G., W. T. S. JERVIS and K. A. MUNDAY, Biochem. J. **190**, 61 (1968). — 5. CORI, C. F., J. biol. Chem. **66**, 691 (1925). — 6. CRANE, R. K., Physiol. Rev. **40**, 789 (1960). — 7. CRANE, R. K., Feder. Proc. **24**, 1000 (1965). — 8. CRANE, R. K., D. MILLER and BIHLER, I. in: Symposium on membrane transport and metabolism. Ed. by KLEINZELLER and A. KOTYK, p. 439 (London 1961). — 9. CSAKY, T. Z. and P. M. HO, J. gen. Physiol. **50**, 113 (1966). — 10. CSAKY, T. Z. and P. M. HO, Pflügers Arch. **291**, 63 (1966). — 11. CUMMINGS, A. J. and R. JUSSILA, Ges. Physiol. Gastroenterology **29**, 982 (1955). — 12. DIEDRICH, D. F., Arch. Biochem. Biophys. **117**, 248 (1966). — 13. FISHER, R. B. and D. S. PARSONS, J. Physiol. **119**, 210 (1953). — 14. FISHER, R. B. and D. S. PARSONS, J. Physiol. **119**, 224 (1953). — 15. FORDTRAN, J. S., R. LEVITAN, V. BIKERMAN, B. A. BURROWS, F. J.

- INGELFINGER, Trans. Ass. Amer. Phys. **74**, 195 (1961). — 16. FÖRSTER, H., Herbsttagung Ges. Physiol. Chem. 1966. — 17. FÖRSTER, H., Herbsttagung Ges. Biol. Chemie 1968. — 18. FÖRSTER, H., Proc. Fed. Europ. Biochem. Soc. **6** (1969). — 19. FÖRSTER, H. und H. MEHNERT, Klin. Wschr. **41**, 1167 (1963). — 20. FÖRSTER, H., H. MEHNERT, M. HASLBECK, Klin. Wschr. **44**, 786 (1966). — 21. FÖRSTER, H., KAISER, W. und H. MEHNERT, Klin. Wschr. **43**, 844 (1965). — 22. HOLDSWORTH, C. D. and A. M. DAWSON, Clin. Sci. **27**, 371 (1964). — 23. HUGGETT, A. S. G. and D. A. NIXON, Biochem. J. **66**, 12 P (1957). — 24. LEVITT, D. G., A. A. HAKIM, N. LIFSON, Amer. J. Physiol. **217**, 777 (1969). — 25. MANOME, S. H. and K. KURIAKI, Arch. int. pharmacodyn. **130**, 187 (1961). — 26. MEHNERT, H. und H. FÖRSTER, Klin. Wschr. **39**, 596 (1961). — 27. OLSON, W. A. and F. J. INGELFINGER, J. Clin. Invest. **47**, 1133 (1968). — 28. RAVDIN, I. S., C. G. JOHNSTON and P. J. MORRISON, Amer. J. Physiol. **104**, 700 (1933). — 29. REYNELL, P. C. and G. H. SPRAY, J. Physiol. **134**, 531 (1956). — 30. RIDER, A. K., H. P. SCHEDL, G. NOKES and S. SHINING, J. Gen. Physiol. **50**, 1171 (1967). — 31. RIKLIS, E. and J. H. QUASTEL, Canad. J. Biochem. Physiol. **36**, 347 (1958). — 32. SAHAGIAN, B. M., Canad. J. Biochem. Physiol. **43**, 851 (1965). — 33. SCHMIDT, F. H., Klin. Wschr. **39**, 1244 (1961). — 34. SCHUBERT, R. und H. WAGNER, Z. ges. exp. Med. **131**, 90 (1959). — 35. SCHULTZ, S. G., R. E. FUIZ, P. F. CURRAN, J. General. Physiol. **49**, 849 (1966). — VERZAR, F., Biochem. Z. **276**, 17 (1935). — 37. VIDAL-SIVILLA, S., Pflügers Arch. ges. Physiol. **265**, 389 (1958). — 38. WEST, C. D. and S. RAPORT, Proc. soc. exp. Biol. (N. Y.) **70**, 141 (1949). — 39. WILSON, T. H., Intestinal absorption (Philadelphia/London 1962).

Anschrift der Verfasser:

Priv. Doz. Dr. HARALD FÖRSTER und BEATE MENZEL
Institut für vegetative Physiologie, Chemisch-physiologisches Institut
Johann-Wolfgang-Goethe Universität
6 Frankfurt am Main, Ludwig-Rehn-Straße 14, (Theodor-Stern-Haus)