

*Aus der Biochemisch-wissenschaftlichen Abteilung der Pharmazeutischen Werke
J. Pfrimmer + Co., Erlangen (Leiter: Dr. H. Beisbarth)
und der Chirurgischen Klinik an den Caritaskliniken St. Theresia,
Rastpfuhl, Saarbrücken (Leiter: Professor Dr. K. Schultis)*

Zinkmaskierung und Glykogensynthese in Rattenorganen

Von H. Schellberger und K. Schultis

Mit 2 Abbildungen und 2 Tabellen

(Eingegangen am 6. Juni 1972)

Im Postaggressions-Stoffwechsel ist eine Verminderung der Effektivität von Insulin nachweisbar (11). Neben anderen hierfür in Frage kommenden Ursachen ist der hemmende Einfluß von Cystein und Glutathion auf Insulin zu diskutieren (Geigy, 6. Aufl., S. 453). Über die Verminderung der i.v. Glucosetoleranz nach s.c. Gabe von Cystein bei Hunden berichteten wir schon früher (12).

Sowohl Cystein als auch Glutathion sind in Relation zu anderen Aminosäuren bzw. Peptiden des Intermediärstoffwechsels unter Schockbedingungen vermehrt nachgewiesen worden (1).

Obwohl die Bedeutung des Zinks für die Wirksamkeit des Insulins noch immer nicht eindeutig geklärt ist, erschien es uns naheliegend, zu prüfen, ob Metallkomplexbildner einen inhibitorischen Effekt für Insulin erkennen lassen. Hierfür boten sich neben den gegen die Oxydation nur schwer schützbaren Verbindungen Cystein und Glutathion, Dithioerytrit (DTE) und Dimerkaptopropanol (BAL oder Sulfactin) an.

Methodik

Die Glykogenaufbauraten wurden an isolierten Rattenzwerchfellen in zwei voneinander unterschiedlichen Versuchsanordnungen ermittelt.

I.

Einer Gruppe von Ratten beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht zwischen 180–220 g wurde am Abend und zehn Stunden später je 15 mg, dreizehneinhalb Stunden später 10 mg Sulfactin i.m. injiziert. 14 Stunden nach der ersten Injektion erfolgte die Tötung der Tiere durch Dekapitation. Während der Versuchszeit blieben die Tiere ohne Nahrungsangebot. Die Kontrollgruppe erhielt keine Injektion, blieb aber über den gleichen Zeitraum ohne Nahrung.

Einer anderen Gruppe von Ratten wurde Dithioerytrit in gleicher Weise wie oben mit jeweils 1 mg pro Applikation injiziert.

Einer weiteren Gruppe wurde morgens und zwei Stunden später je 15 mg Sulfactin intramuskulär injiziert. Die Nahrungspause dieser Tiere begann mit der ersten Injektion, viereinhalb Stunden danach wurden die Tiere getötet. Eine entsprechende Kontrollgruppe wurde untersucht.

Nach der Dekapitation wurden den Ratten die Zwerchfelle und die Leber entnommen. In je einem Zwerchfell wurde der Zinkgehalt nach der Atom-

absorptionsmethode geprüft, im jeweils zweiten Zwerchfell und in Leberschnitten wurde nach Homogenisierung in einem Pottermischgefäß die freie Glucose und der Glykogengehalt nach der Methode von Schmidt (10) quantitativ bestimmt. Der Glykogengehalt wurde aus der Differenz von freier Glucose und der nach Hydrolyse des Glykogens gemessenen Gesamtglucose berechnet.

II.

Bei der zweiten Versuchsserie wurden 14 Stunden nüchternen Tieren nach Tötung durch Dekapitation die Zwerchfelle entnommen. Jeweils ein Zwerchfell wurde für 30 Minuten in Ringerlösung und das kontralaterale Zwerchfell ebenfalls für 30 Minuten in 0,01prozentiger DTE-Ringerlösung bei 37 Grad im Wasserbad unter Durchströmung mit Sauerstoff inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation beider Zwerchfelle für 60 Minuten ebenfalls bei 37 Grad im Wasserbad unter Sauerstoffapplikation in einem Inkubationsmedium aus Ringerlösung mit 80–100 mg% Glucose, 5 mval pro Liter K⁺-Laktat und wenigstens 60 Mikro-einheiten zinkfreies Altinsulin¹⁾ pro ml.

Sofort nach der Inkubation wurden die Zwerchfelle entnommen, mit Ringerlösung abgespült, homogenisiert und der Glykogengehaltsprüfung unterzogen.

Zur Beurteilung der Signifikanz der Ergebnisse wurde der t-Test für die Versuchsguppe I bei nicht gepaarten Daten und für die Versuchsguppe II bei Paaranalyse herangezogen.

Ergebnisse

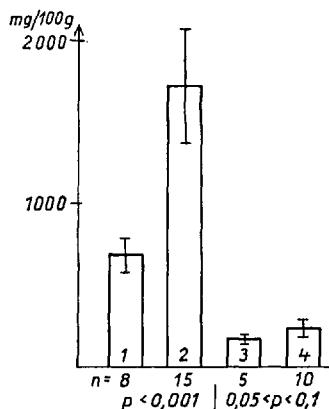
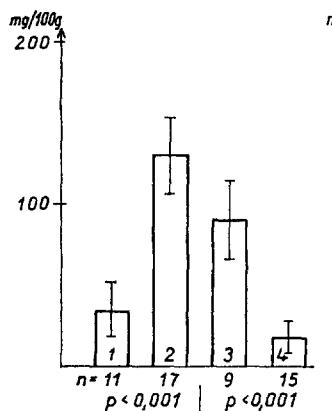


Abb. 1. Glykogengehalt in Leber und Zwerchfell mit und ohne BAL-Behandlung über Nacht.

Abb. 2. Glykogengehalt in Leber und Zwerchfell mit und ohne BAL-Behandlung über Tag. 1 = Leber beh. 2 = Leber unbeh. 3 = Zwerchfell beh. 4 = Zwerchfell unbeh.

Tab. 1. Zinkgehalte in Zwerchfell und Urin von über Nacht mit BAL behandelten und unbehandelten Ratten

BAL beh. γ/100 g Zwerchfell	Unbeh. γ/100 g Zwerchfell	BAL beh. γ/1000 ml Urin	Unbeh. γ/1000 ml Urin
̄ 334 s ₁ 51	̄ 324 s ₁ 34	̄ 249 s ₁ 39	̄ 88 s ₁ 7
0,04 < p < 0,553		p < 0,001	

¹⁾ für dessen Überlassung wir den Farbwerken Hoechst zu Dank verpflichtet sind.

Tab. 2. Glykogengehalte der mit und ohne DTE inkubierten Zwerchfelle

DTE beh. mg/100 g Zwerchfell	Unbeh. mg/100 g Zwerchfell	% Glykogen- minderung
\bar{x} 117 s_1 28	\bar{x} 160 s_1 51	\bar{x} 32 s_1 7
0,005 < p < 0,001		

Diskussion

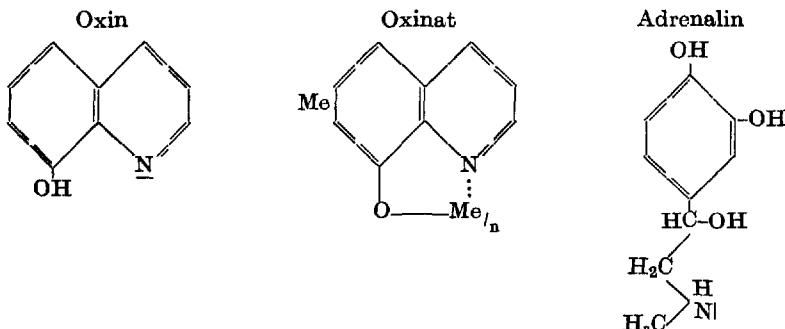
Oben aus (8) konnte mit seinen Untersuchungen eine hyperglykämisierende Wirkung von BAL feststellen. Die von uns beobachtete vermehrte Glykogenolyse mit signifikanter Differenz gegenüber den Proben von unbehandelten Tieren (Abb. 1 und 2) in der Leber ist durch eine vermehrte Adrenalinausschüttung aus dem Nebennierenmark zu erklären. Für den Zwerchfellmuskel bestehen zwischen den Tieren, die nachts und denen, die tagsüber behandelt wurden, Unterschiede im Glykogengehalt. Die über Nacht behandelten Tiere zeigten gegenüber den Kontrolltieren im Zwerchfell einen verstärkten Glykogenaufbau (Abb. 1), der sich aus der protrahierten Hungerphase, in der bereits Glykogensynthese aus Gluconeogenese mittels endogener Substrate stattfindet, erklärt.

Weiterhin konnten wir zeigen, daß der Einbau der Glucose durch einen Metallkomplexbildner gehemmt wird. Unsere Inkubationsversuche zeigen eine eindeutige, hochsignifikante Hemmung des Glykogenaufbaus, die wir auf die gehemmte Glucoseaufnahme in die Zelle durch DTE zurückführen (Tab. 2).

Überraschenderweise zeigten sich bei den Untersuchungen über den Zinkgehalt im Zwerchfell zwischen Tieren, die mit Metallkomplexbildnern behandelt und solche, die nicht behandelt wurden, keine Unterschiede (Tab. 1). Urinuntersuchungen hinsichtlich des Zinkgehaltes bei den gleichen Tieren zeigten aber deutlich gesteigerte Zinkausscheidungen bei den behandelten Tieren (Tab. 1). Es wäre zu untersuchen, inwieweit eine Erhöhung des Plasmazinkgehaltes mit der des Urins einhergeht. Wir vermuten, daß hier der gleiche Befund wie beim Diabetes mellitus vorliegt (2, 6).

Es ist bekannt, daß BAL die hypoglykämisierende Eigenschaft des Insulins aufhebt (5). Da viele Beobachtungen dafür sprechen, daß das Zink in vivo eine Rolle bei der Insulinwirkung spielt, vermuten wir, daß BAL als stärkerer Komplexbildner das Zink maskiert und dem Organismus entzieht. Die gleiche Wirkung dürfte dem DTE und entsprechenden Verbindungen, wie Glutathion, Cystein, Oxin (8-Hydroxy-chinolin), Dithizon usw. zukommen.

Es wirft sich die Frage auf, ob die Hemmwirkung des Adrenalins auf die Insulinsekretion (14) auf dem gleichen Prinzip einer Zinkmaskierung wie bei anderen Komplexbildnern beruht. Eine ähnliche komplexe Bindung zum Metall wäre für das Adrenalinmolekül denkbar. Adrenalin senkt den Zinkgehalt der Inselzellen (15).



Wolf und Mitarb. konnten zeigen, daß in den Inselzellen Zink an Granula gebunden vorliegt (15). Das Pankreas wirkt als Zinkdepot. Maske (7) beobachtete, daß nach Glucosebelastung zwar das Inselzink abnimmt, die Summe von Insel- und Pankreaszink aber die gleiche bleibt. Unter anomalen Verhältnissen, hier gegeben durch die Zuführung von Komplexbildnern, kann Zink aus dem Pankreas entfernt werden, die gebildeten wasserlöslichen Zinkchelate werden mit den Körperflüssigkeiten abgeführt. Es kann im Bedarfsfall nicht mehr genügend Zink in die Inselzelle nachgeführt werden, und damit wird die Insulinsekretion unterbrochen. Beim Diabetes mellitus liegt wahrscheinlich eine mangelnde Fähigkeit der Inselzelle, Zink zu binden, vor, bei gleichzeitiger Verkürzung der biologischen Halbwertzeit des Zinks (3).

Wir möchten der Frage weiter nachgehen, ob das Insulin die Inselzelle nur als Insulin-Zink-Komplex verläßt und auch nur als solcher Komplex am Wirkungsort funktionsfähig ist. Nach einer Spaltung dieses Insulin-Zink-Komplexes aus der Inselzelle könnte das Zink im Pankreas verbleiben, das Insulin ins Blut gelangen.

Obwohl ein Teil der vorangegangenen Betrachtungen noch rein hypothetischen Charakter trägt, kann mit Sicherheit gesagt werden, daß Metallkomplexbildner Zink aus dem Organismus entfernen können und hemmend auf die Insulinsekretion (2) wirken. Ob darüber hinaus die Bindung von Zink außerhalb des Pankreas einen Einfluß auf die Wirksamkeit des Insulins und damit auf den Glucosetransport in die Zelle hat, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Die Inaktivierung der Seruminsulinaktivität durch Cystein und Gluthation, wie sie Groen (4), Randle (9), Vallance-Owen und Hurllock (13) erreichen konnten, deuten darauf hin.

Zusammenfassung

Der Einfluß von Chelatbildnern auf Zinkgehalt und Glykogensynthese in Zwerchfell und Leber von Ratten sowie deren Zinkausscheidung wurden geprüft. Dithioerythrit verminderte die Glykogensynthese in vitro, Dimerkapto-propanol (BAL) wirkte dasselbe in Leber und Zwerchfell in vivo.

Während unter BAL die renale Zinkausscheidung erhöht war, blieb der Gehalt des Zwerchfelles an Zink unter DTE unverändert.

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der Annahme, daß auch in der Phase eines akuten Stresses endogene Chelatbildner an der Glukosetoleranz-Störung beteiligt sind, indem das notwendige Zink maskiert wird.

Summary

We proved the influence of chelating agents on the content of zinc and the synthesis of glycogen in diaphragms and livers of rats and on their renal zinc excretion. Dithioerythritol (DTE) decreased the synthesis of glycogen in vitro as did dimercaptopropanol (BAL) in vivo in the liver and diaphragm. Whereas the renal excretion of zinc with BAL was increased, the content of zinc in diaphragms with DTE remained unchanged.

These observations are in accordance with the assumption that endogenous chelating agents are involved also in the impairment of glucose tolerance after acute stress by masking the zinc necessary for insulin action.

Literatur

1. La Brosse, E. H., J. A. Beech, J. S. McLaughlin, A. R. Mausberger, W. D. Keene, R. A. Cowley, *Surgery, Gynecology Ostetrics* **125**, 516 (1967). – 2. Constam, G. R. u. Mitarb., *Schweiz. Med. Wschr.* **88**, 1103 (1964). – 3. Glaubitt, D., J. G. Rausch-Stroomann, H. G. Klippel, *Die Untersuchungen des Stoffwechsels von ^{65}Zn bei alloxandiabetischen Ratten: Die Pathogenese des Diabetes mellitus; die endokrine Regulation des Stoffwechsels*, 12. Symp. Dtsch. Gesellschaft für Endokrinologie, S. 99 (New York-Berlin-Heidelberg 1967). – 4. Groen, J., C. E. Kamminga, A. F. Willebrands, J. R. Blickman, *J. clin. Invest.* **31**, 97 (1952). – 5. Jørgensen, G., *Ärzt. Wschr.* **12**, 264 (1957). – 6. Mähr, G., H. Paulsen, *Med. Welt* **19**, 716 (1968). – 7. Maske, H., *Zur Physiologie und Pathophysiologie des Inselzinks*, Verh. Dtsch. Ges. Verdauungs- und Stoffwechselkrankh. 16. Tagg. 24.-27. 9. 1952, Hrsg. H. W. Bansi, S. 54 (Lübeck 1953). – 8. Obenau, H., *Arch. exper. Path. u. Pharmak.* **243**, 201 (1962). – 9. Randle, P. J., *Brit. Med. Bull.* **1954/I**, 1237. – 10. Schmidt, F. H., *Klin. Wschr.* **39**, 1244 (1961). – 11. Schultis, K., *Veränderungen im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel nach Operationen und Traumata*, Habilitationsschrift (Gießen 1970). – 12. Schultis, K., *Beziehungen zwischen Glucosetoleranz und Mineralhaushalt unter Stressbedingungen*. In: *Biochemische Eigenschaften und Möglichkeiten der klinischen Anwendung von Kalium-Magnesium-Aspartat*. Arzneimittel-Forschung **22**, Beiheft S. 15 (Aulendorf 1971). – 13. Valance-Owen, J. and B. Hurlock, *Lancet* **1954/I**, 68. – 14. Walaas, E. and O. Walaas, *Biochim. biophys. Acta* **20**, 77 (1956). – 15. Wolff, H. P., D. Ringleb, R. Amann, *Z. ges. exp. Med.* **126**, 390 (1955).

Anschrift der Verfasser:

Frau Dr. H. Schellberger, Biochem. Wissenschaftl. Abt. d. Pharmazeut. Werke Pfrimmer + Co., 8520 Erlangen;
Prof. Dr. K. Schultis, Chirurg. Klinik an den Caritaskliniken
St. Theresia, Rastpfuhl, 66 Saarbrücken