Zeitschrift: Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie suisse des sciences médicales = Bollettino dell' Accademia svizzera delle scienze mediche

Herausgeber: Schweizerische Akademie der Medizinischen Wissenschaften

Band: 21 (1965)

Artikel: Radioimmunologische Bestimmung des Insulins

Autor: Pfeiffer, E.F. / Melani, F. / Dirschuneit, H.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-307614

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 07.01.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

D.K.: 615.361.37:621.039.85:576.8.097

Aus der Abteilung für Klinische Endokrinologie (Leiter: Prof. E. F. Pfeiffer)
der I. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt am Main (Direktor: Prof. F. Hoff)

Radioimmunologische Bestimmung des Insulins

Von E. F. Pfeiffer[1], *F. Melani*[2], *H. Ditschuneit und K. Schöffling,*
Frankfurt am Main

Erst seit kurzem werden Antikörper zur Messung von Eiweißhormonen verwandt. Vorher kannte man sie im wesentlichen nur als störende Faktoren in der Endokrinologie. Sie waren dafür verantwortlich, daß Hormone, die von anderen Species stammten, inaktiviert wurden. Als klassisches Beispiel sei die immunologisch bedingte Insulinresistenz genannt.

Die Messung von Insulin im Blute mit Hilfe von Insulinantikörpern wurde dadurch möglich, daß einerseits weitgehend gereinigte, mehrfach kristallisierte Insuline zur Verfügung gestellt wurden, andererseits mit Hilfe von Freundschem Adjuvans hochaktive Antiseren bei empfindlichen Tierarten, wie den Meerschweinchen, kurzfristig zu erzeugen waren; schließlich wurde in Gestalt des radioimmunologischen Verfahrens eine Technik gefunden, die an Empfindlichkeit alles bisher Dagewesene übertraf. Bei diesem von *Yalow* und *Berson* (1959) entwickelten Verfahren wird die Bindung von I^{131}-markiertem Insulin an Insulinantikörper und die kompetitive Hemmung dieser Bindung durch das in der Serumprobe enthaltene endogene Insulin zur quantitativen Messung des Pancreashormons benutzt. Der Insulingehalt der Serumprobe ergibt sich aus dem Vergleich mit einer eingewogenen Menge kristallisierten Insulins, das an Stelle von Serum dem Gemisch aus I^{131}-Insulin und Antikörpern zugesetzt wurde.

Dieser unumgänglich notwendige, indirekte Vergleich stellt eines der Probleme dieses Verfahrens dar. Das andere Problem liegt in der Trennung des freien von dem durch Antikörper gebundenen I^{131}-Insulin. Tabelle 1 gibt die verschiedenen Techniken wieder, die zur Trennung

[1] Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg.

[2] Stipendiat der Alexander v. Humboldt-Stiftung 1964/65, Bad Godesberg.

Tabelle 1
Immunologische und radioimmunologische Methoden zur Messung von Insulin im Blut

Technik	Medium	Empfindlichkeit μU	Autor
Erythrocyten-Agglutination nach Sensibilisierung mit Bisdiazobenz.	Plasma	2500	Arquilla und Stavitsky (1956)
Erythrocyten-Agglutination nach Sensibilisierung mit Bisdiazobenz.	Plasmaextrakt	2500	Arquilla und Pellegrini (1958)
Verwertung der Relation geb. zu freies Insulin-I^{131} (B/F). Trennung durch:			
Papierelektrophorese	Plasma (1:10)	0,1	Yalow und Berson (1960)
Präzipitation mit Natriumhyposulfit	Plasmaextrakt	20	Grodsky und Forsham (1960)
Präzipitation mit Anti-γ-Globulin	Plasma (1:2, 1:4, 1:8)	6,25	Hales und Randle (1962)
Präzipitation mit Anti-γ-Globulin	Serum (1:10)	1	Lazarow und Morgan (1962)
Ionenaustauscher (Dowex 1-Amberlite)	Serum	3 6	Meade und Klitgaard (1962)
Agarelektrophorese	Serum (1:2)	10	Melani u. Mitarb. (1963a)
Ionenaustauscher (Dowex 1-Amberlite)	Serum (1:4, 1:8)	1	Melani u. Mitarb. (1963b)

benutzt wurden. Hierbei erfordert die elektrophoretische Separierung auf Papier eine hohe, kommerziell nicht erhältliche spezifische Aktivität von 150—300 mC/mg. Bei den anderen Verfahren reichen wesentlich geringere Aktivitäten von 10—20 mC/mg aus. Sie werden heute von verschiedenen Firmen angeboten (Hoechst-Frankfurt am Main, Deutschland; Amersham, England; Oak Ridge, USA).

In unserem Laboratorium (*Melani* u. Mitarb. 1963, 1964) wurde sowohl elektrophoretisch als auch mit Anionenaustauschern (Dowex 1 und Amberlite) getrennt. Kommerzielle sowie selbst markierte Insulin-

präparationen wurden verwandt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte nicht auf Papier, sondern im Agargel.

Material und Methodik

Die verwandten kristallisierten Insuline stammten vom Schwein, Rind und Menschen. Sie wiesen biologische Aktivitäten von 27 bzw. 23,5 E/mg auf. Das Insulin wurde mit Freundschem Adjuvans gemischt und in wöchentlichen Abständen 4mal subcutan 1 ml der Emulsion Meerschweinchen injiziert. Der Emulsion wurden 4 bis 1 mg abgetöteter Tuberkelbakterien in abfallender Menge zugesetzt.

Das jodmarkierte Schweine- und Rinderinsulin wurde mit spezifischer Aktivität von 8–20 mC/mg bezogen. Höhere spezifische Aktivitäten von 200–400 mC/mg, insbesondere jodmarkiertes menschliches Insulin (von Novo, Kopenhagen), wurden selbst hergestellt. Hierbei kam die von *Greenwood* und *Hunter* (1963) für die Markierung von Wachstumshormon angegebene Methode zur Anwendung. Das NaI^{131} wurde vom Radiochemical Center Amersham, England, gekauft. Als Ionenaustauscher wurden sowohl Dowex 1×8 (200–400 mesh) als auch Amberlite (CG-400 I) von Serva-Heidelberg verwandt. Die als Chlorid vorliegenden Harze müssen vor Gebrauch in die basische Form übergeführt werden.

Die papierelektrophoretische Serumeiweißtrennung erfolgte in der üblichen Weise auf Papierstreifen (Schleicher & Schüll) und Messung der Verteilung der Radioaktivität des zugesetzten jodmarkierten Insulins auf die einzelnen, mit Amidoschwarz angefärbten Proteinfraktionen. Bei der Trennung im Agargel wurde die Immunelektrophorese nach der Mikromethode von *Scheidegger* (1955) verwandt. Ein Filterpapierstreifen wurde in den Bestimmungsansatz getaucht und senkrecht zur Längsseite des Objektträgers in die Mitte der Agarschicht eingedrückt. Nach einer Laufzeit von 40 min bei 3 Volt/cm wurde die Lokalisation der einzelnen Proteinfraktionen mit einem Vergleichsobjektträger in 3%iger Essigsäure ermittelt. Nach dieser Schablone wurden die γ- und β-Globuline sowie die α-Globuline und Albumine aus den entsprechenden Zonen herausgeschnitten, das Gel durch Frieren und Auftauen zerstört und die Radioaktivität beider Anteile mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillationszählers (Tracerlab) gemessen.

Bei der Trennung des freien vom antikörpergebundenen I^{131}-Insulin mit Hilfe von Ionenaustauschern wurde zuerst die Gesamtaktivität des Bestimmungsansatzes ermittelt und dann nach Zusatz von 200 mg Harz eine Stunde lang bei Zimmertemperatur geschüttelt. Die im Überstand gefundene Radioaktivität entsprach der Hälfte des antikörpergebundenen Insulins (B ½), da das freie Insulin an das Harz gebunden wird. Es ist gleichgültig, ob man die Radioaktivität des gebundenen Insulins (B) von der Gesamtaktivität abzieht und daraus den freien Anteil (F) ermittelt oder umgekehrt den freien Anteil (F) direkt durch Bestimmung der Radioaktivität des zugesetzten und ausgewaschenen Harzes bestimmt.

Die Trennung erfolgte jeweils nach Aufbewahrung der Bestimmungsansätze bei $+4°$ C über 48 Std.

Ergebnisse

1. Technische Probleme

Sowohl für die Aufstellung von Eichkurven als auch die Messung des Insulingehaltes einer Serumprobe liegt die günstigste Konzentration für das I^{131}-Insulin zwischen 0,5 und 2,0 μE/ml. Bei der Trennung des freien vom gebundenen Insulin mittels Agarelektrophorese sind derartig kleine Insulinkonzentrationen nur dann verwendbar, wenn die

spezifische Aktivität 80–100 mC/mg beträgt. Arbeitet man mit kommerziell erhältlichen Radioinsulinen von 10–20 mC/mg, muß die Konzentration des eingesetzten Insulins entsprechend erhöht werden (auf 20 bis 25 μE/ml). Bei der Trennung mittels Papierelektrophorese sind noch weitaus höhere Konzentrationen erforderlich. Die relativ hohe Strahlung führt zur Spaltung des Insulinmoleküls und damit zu Verunreinigungen, die das Meßergebnis verfälschen. Das intakte Insulinmolekül bleibt am Startpunkt zurück, die Verunreinigungen wandern dagegen mit den α_2-Globulinen. Insulinantikörper reagieren nicht mit diesen Verunreinigungen. Sie binden im wesentlichen nur das intakte Insulinmolekül. Damit verschieben sie aber den Hauptgipfel der Radioaktivität vom Startpunkt zwischen die γ- und β-Globuline, ohne den Aktivitätsgipfel im α_2-Globulin-Bereich wesentlich zu beeinflussen. Je nach dem verwandten Verfahren der Trennung werden entweder F oder B erhöht.

Nach Reinigung des markierten Materials mittels Sephadex-G-75 bleibt dagegen die gesamte, einem Normalserum zugesetzte Radioaktivität am Startpunkt liegen, während zugesetztes Antiserum den gleichen Gipfel allein zwischen γ- und β-Globulinen auftreten läßt.

Die Bindung der durch die Markierung entstandenen Verunreinigungen läßt sich auch mittels Anionenaustauschern zeigen. Tabelle 2 faßt die Ergebnisse nach Eigenmarkierung zusammen: Vor der Reinigung verbleiben nach Serumzusatz 25% im Überstand an Proteine gebunden, und nur 75% werden an den Anionenaustauscher adsorbiert. Nach der Reinigung bindet Amberlite dagegen 96% des freien Insulins, und nur 4% erscheinen im Serum. Die α_2-Globuline, hatten wir gesagt, enthalten den höchsten Anteil an Verunreinigungen. Von dieser Fraktion bindet das Serumprotein sogar ca. 70% und nur 30% der Anionenaustauscher. Setzt man das Insulinantiserum zu, so bleiben weniger als 10% des

Tabelle 2
Einfluß von Serum und Anti-Menschen-Insulin-Serum auf die adsorbierte Radioaktivität von ungereinigtem und gereinigtem I^{131}-markiertem Menscheninsulin (10 μE) an Amberlite*

	Puffer	Serum 1:4	Anti-Menschen-Insulin-Serum
I^{131}-Menschen-Insulin (460 mC/mg) ungereinigt	90% (10%)	75% (25%)	24% (76%)
I^{131}-Menschen-Insulin (460 mC/mg) gereinigt	99% (1%)	96% (4%)	5% (95%)

* ( ) Radioaktivität im Überstand.

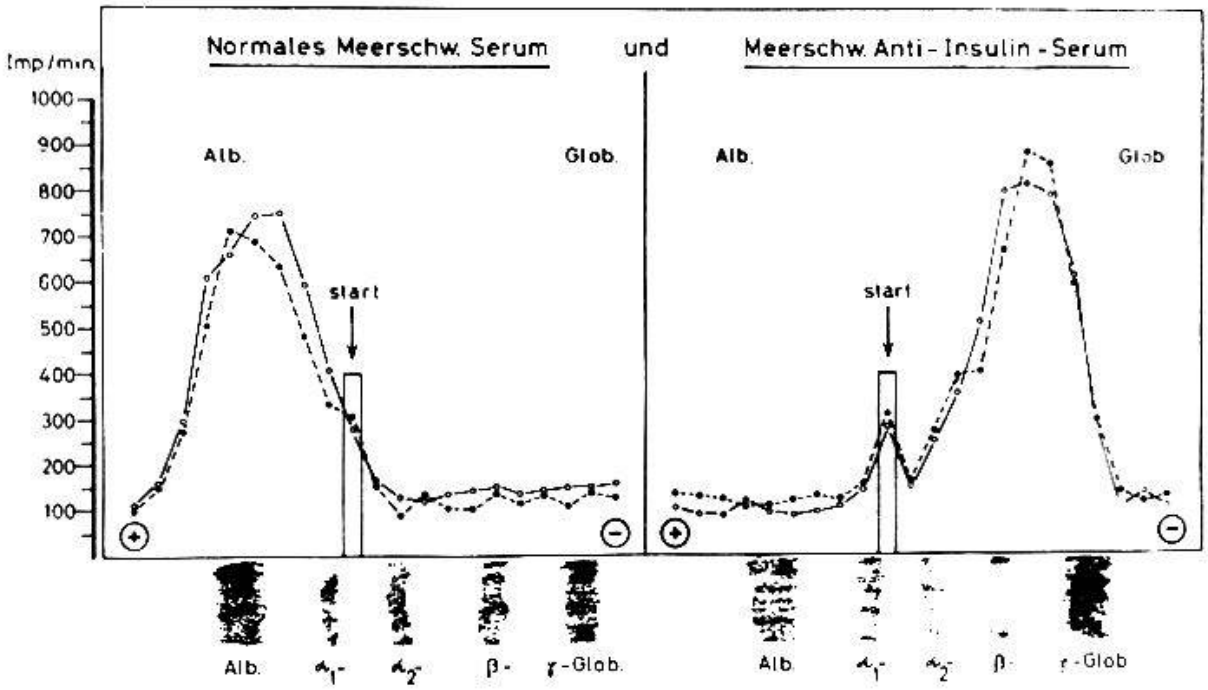

Abb. 1. Verteilung der Radioaktivität von I^{131}-Rinder- und -Schweine-Insulin nach zonenelektrophoretischer Trennung in Agargel zusammen mit normalem Meerschweinchenserum und Meerschweinchen-Anti-Insulin-Serum.

gereinigten Materials im Anionenaustauscher zurück, mehr als 90% sind infolge Bindung an die Antikörper im Überstand zu finden. Bei ungereinigten Präparationen fanden wir nur bis zu 80% im Überstand und etwa 20% an Amberlite gebunden. Es sollten nicht mehr als 5% des radioaktiven Insulins unspezifisch an Serumproteine gebunden werden. Bei den kommerziellen I^{131}-Insulinen ist dieser Anteil manchmal höher.

Bei mangelhafter Reinigung steigt der Anteil der unspezifisch an Serumproteine gebundenen Insulinmoleküle in Abhängigkeit von Zeit und Serumkonzentration an. Da man frühestens 48 Stunden nach Ansetzen der Probe die Trennung des freien vom gebundenen Insulin durchführen kann, empfiehlt es sich, den Faktor Serumkonzentration durch Verdünnung herabzusetzen. Nach unseren Erfahrungen ist eine mindestens 4fache Verdünnung notwendig.

Bei der elektrophoretischen Trennung im Agargel wandert das radioaktive Insulin im Normalserum mit den Albuminen (Abb. 1).

Im 1:20 verdünntem Meerschweinchen-Anti-Insulin-Serum findet sich das Maximum der Aktivität im Bereich der Antikörperglobuline zwischen γ- und β-Globulinen. Der zweite, kleinere Gipfel an der Auftragsstelle wird durch den Überschuß an freiem, markiertem Hormon hervorgerufen. Er wird vom Filtrierpapierstreifen adsorbiert. Bei größerem Überschuß von Jodinsulin oder zu starker Verdünnung des Antiserums erscheint ein zusätzlicher Gipfel von freiem Hormon bei den Albuminen.

Man muß ihn der Radioaktivität des Albuminbereichs zurechnen bzw. die Radioaktivität beider zusammen bestimmen, um das Verhältnis B/F zu erfassen.

Abb. 2 gibt das Ergebnis der Eichkurve wieder, die mit verschiedenen Insulinkonzentrationen hergestellt wurde. Es wurde I^{131}-Schweine-Insulin «Hoechst» mit einer spezifischen Aktivität von 10–20 mC/mg verwandt. Die eingesetzte Insulinmenge betrug 25 μE/ml und die Antiserumverdünnung 1:2500. Bei zunehmender Konzentration von unmarkiertem Schweineinsulin vergrößert sich der Anteil des radioaktiven freien und umgekehrt. Die Meßpunkte der 45 Einzelmessungen unterschiedlicher Insulinkonzentrationen weisen eine Streuung um die Gerade auf, und das Verhältnis von Standardabweichungen der Meßpunkte zum Anstieg der Geraden (Genauigkeitsindex) beträgt $\lambda = 0{,}20$. Dieser Streubereich von 20% für den Logarithmus einer unbekannten Insulinkonzentration entspricht dem auch am Rattenfettgewebe unter Verwendung von an C-1 markierter Glukose erreichbaren Werte (*Ditschuneit* u. Mitarb. 1962). Das immunologische Verfahren ist jedoch empfindlicher.

Die Trennung mittels Anionenaustauschern bietet gegenüber der elektrophoretischen Auftrennung im Agargel den Vorteil 1. des geringeren Arbeitsaufwandes und 2. der Verwendung von geringer aktiven Insulinen.

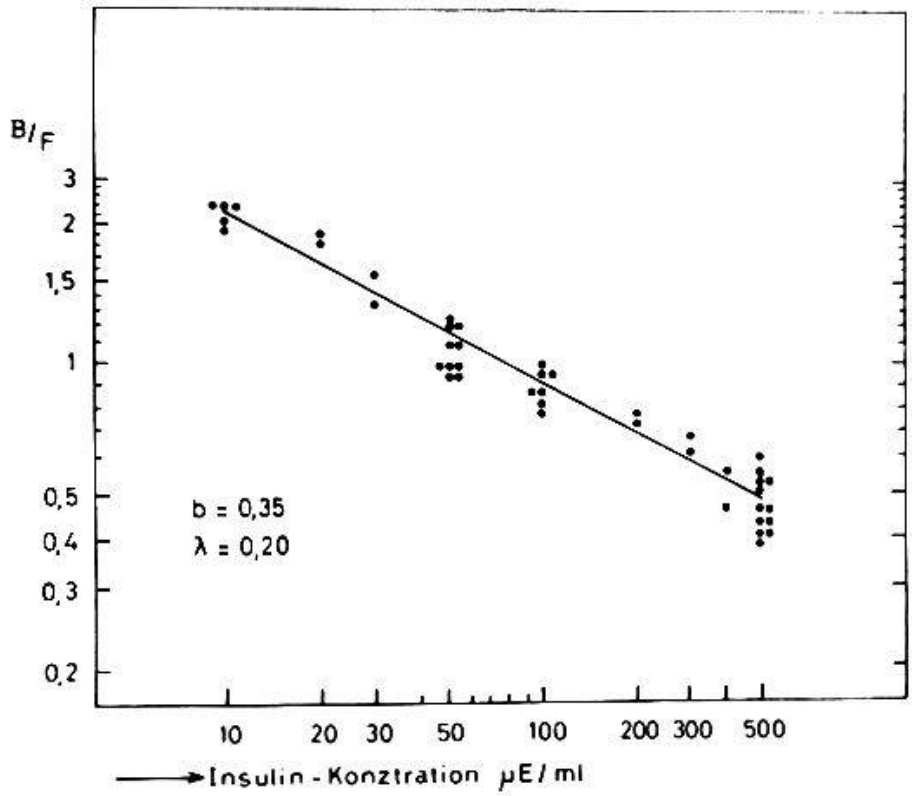

Abb. 2. Einfluß steigender Konzentrationen von nicht markiertem Schweineinsulin auf das Verhältnis von gebundenem zu freiem I^{131}-Schweine-Insulin.

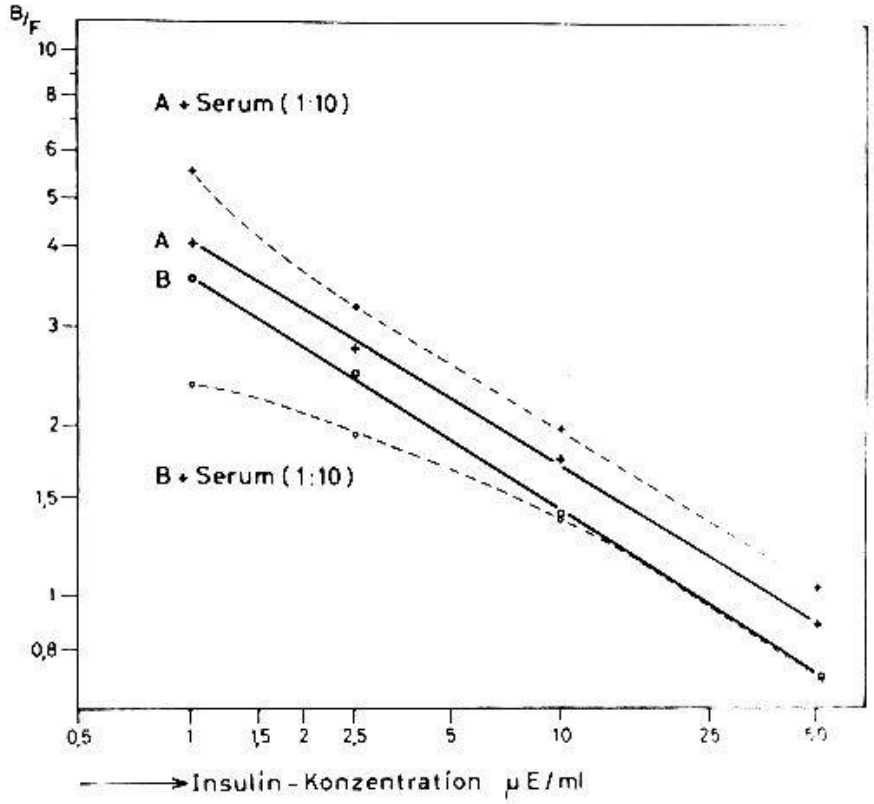

Abb. 3. Einfluß von Verunreinigungen auf das Verhältnis B/F. Trennung mit Amberlite.

Während bei der Elektrophorese nur immer 0,01–0,03 ml Testserum aufgetragen werden können, lassen sich jetzt Volumina von mehreren Millilitern und damit die etwa 400fach größere Menge von I^{131}-Insulin messen. Menge und Aktivität des einzelnen Radioinsulins können daher kleiner gewählt werden. Hierdurch wächst die Empfindlichkeit der Bestimmung.

Ebenfalls erhöht wird die Genauigkeit. Bei einem Meßbereich zwischen 0,5 und 25 μE/ml Insulin betrug der Genauigkeitsindex 0,04, d. h., daß für einen Meßwert von 2 μE/ml die obere Vertrauensgrenze bei 2,06 und die untere bei 1,94 μE/ml liegt. Bei einer 8fachen Verdünnung des Serums beträgt das Verläßlichkeitsintervall bei einem Insulingehalt einer Serumprobe von 20 μE/ml nur 0,96 μE/ml. Für einen Insulingehalt von 100 μE/ml resultiert ein Verläßlichkeitsintervall von 13 μE/ml. Im Vergleich hierzu muß bei der biologischen Bestimmung am isolierten Fettgewebe bei einem Meßwert von 100 μE/ml mindestens ein Verläßlichkeitsintervall von 130 μE/ml berücksichtigt werden (*Ditschuneit* u. Mitarb. 1962).

Auch bei der Trennung in Amberlite ist den Verunreinigungen des markierten Insulins Beachtung zu schenken. In Abb. 3 entspricht Kurve A ungereinigtem, B gereinigtem I^{131}-Insulin. Beide Kurven ergeben eine Gerade. Löst man dagegen die Insulinstandards nicht in

Pufferlösung, sondern in 1:10 verdünntem Serum, dann resultiert sowohl eine Verschiebung der Eichkurven als auch eine Änderung des Kurvenverlaufs. Mit ungereinigtem Insulin wird die lineare Beziehung besonders im unteren Meßbereich verändert und außerdem die gesamte Eichkurve nach oben verschoben. Die Ursache stellt die Bindung der Insulinverunreinigungen an Serumproteine dar. Hierdurch wird der Anteil des gebundenen Insulins erhöht. Besonders kleinere Meßwerte werden somit durch die Verwendung von ungereinigtem Radioinsulin verfälscht. Mit gereinigtem Insulin wird dagegen durch Serumzusatz der Verlauf der Eichkurve ebenfalls im unteren Bereich, aber diesmal nach unten verschoben. Diese Änderung ruft das endogene Insulin der zugesetzten Serumprobe hervor. Es verschiebt das Verhältnis B:F entsprechend der Erwartung zugunsten von F. Mit ansteigender Konzentration des Standardinsulins nimmt dann die Menge des zugesetzten endogenen Hormons relativ ab, so daß sich die Kurven im höheren Meßbereich langsam nähern.

Unabhängig davon, ob man Radioinsulin vom Menschen, Schwein oder Rind verwendet, verschiebt sich das Verhältnis B:F durch eine Erhöhung der Standardinsulinkonzentrationen um wenige μE schon beträchtlich. Das gegen menschliches Insulin gerichtete Antiserum reagiert somit gleich stark mit Rinder-, Schweine- und Menscheninsulin. Damit kann man auf das nicht immer verfügbare menschliche Insulin verzichten und mit gleich gutem Erfolg das leicht erhältliche Schweineinsulin verwenden. Nach *Yalow* und *Berson* (1960) soll es sogar möglich sein, mit einem Anti-Schweine-Insulin-Serum und I^{131}-Schweine-Insulin allein auszukommen.

2. *Biologische und klinische Kriterien der Spezifität des radio-immunologischen Verfahrens im Vergleich zur biologischen Messung am Fettgewebe*

Von *Berson* und *Yalow* (1964) wurde kürzlich zugunsten ihres Verfahrens die praktisch absolute Spezifität angeführt. Die Wiedergewinnung des zugesetzten Insulins sei vollständig, die Verdünnung des Plasmas führe zu entsprechender Verminderung der Werte, endogenes Insulin in einer Serumprobe und I^{131}-Insulin werde in gleicher Weise von Cystein zerstört, an Cellulose adsorbiert und in der Ultrazentrifuge sedimentiert.

Für die Fettgewebsmethode als der gebräuchlichsten Methode der biologischen Insulinbestimmung gelten teilweise die gleichen Kriterien, teilweise ist man gezwungen, eine bunte Mischung von biologischen in vitro

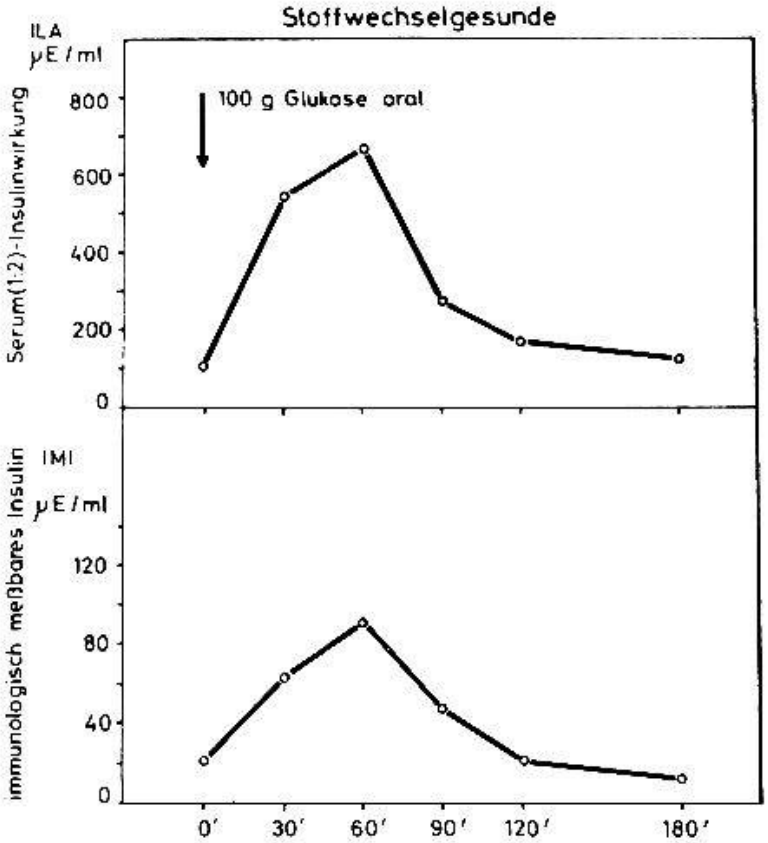

Abb. 4. Einfluß von Glukosebelastungen (100 g oral) auf die Insulinwirkung des Serums (ILA) und das immunologisch gemessene Insulin (IMI) bei 6 Stoffwechselgesunden.

und in vivo erhaltenen Resultaten und zusätzlich noch eine Reihe von klinischen Beobachtungen als Kriterien der Spezifität dieser Art von Aktivitätsmessung zu verwenden (*Pfeiffer* 1964a). Vergleicht man beide Verfahren der Insulinbestimmung miteinander — und hiermit wollen wir uns im folgenden befassen — und fügt noch einiges hinzu, so ergibt sich etwa folgendes Bild:

a) Mit Ausnahme der absolut immer niedrigeren Werte des immunologisch bestimmten Insulins (im folgenden IMI genannt) verhalten sich IMI und insulinähnliche Wirkung (im folgenden ILA genannt) zeitlich und quantitativ nach Stimulierung der Insulinreaktion mittels 100 g Glukose oral beim Menschen etwa gleich (Abb. 4). Das Maximum des Insulinanstieges ist für beide Methoden etwa 1 Std. nach der Zuckergabe erreicht; wenn man einen Unterschied sehen möchte, so liegt er darin, daß die IMI-Werte nur etwa auf das 4fache des Ausgangswertes ansteigen, die ILA sich dagegen mitunter bis auf das 6-7fache des Nüchternspiegels erhöhen.

Wendet man sich direkt dem Orte der Insulinbildung zu und prüft die Insulinsekretion isolierter Pancreasstückchen von Tieren in vitro (Abb. 5), so ist für beide Methoden die gleiche Abhängigkeit von der

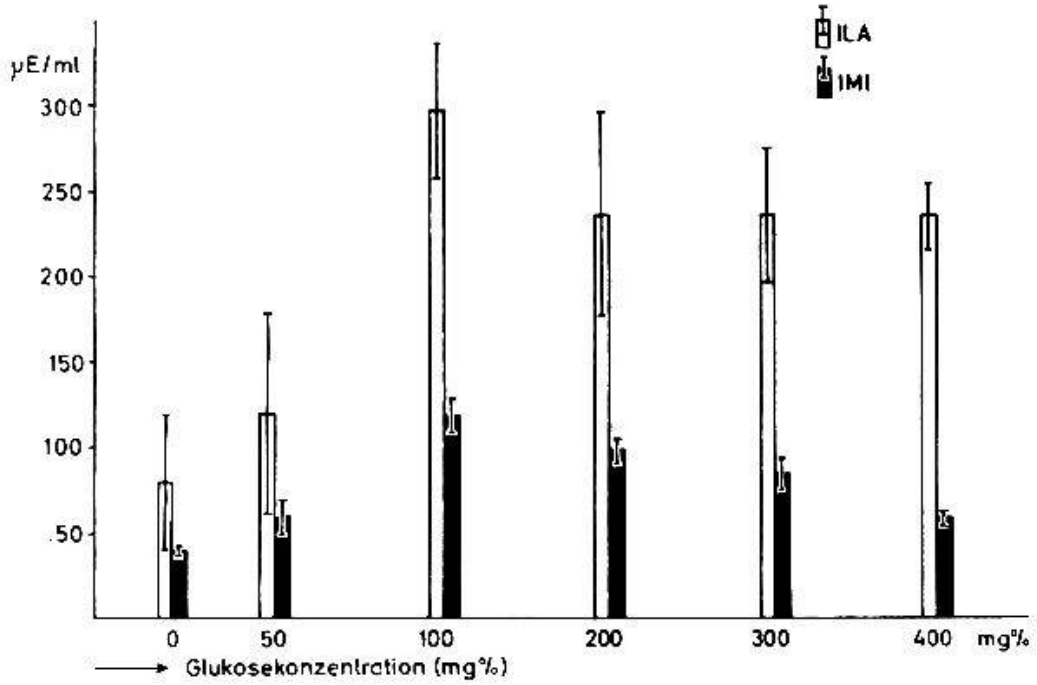

Abb. 5. Einfluß von unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (50–400 mg%) auf die Freisetzung von Insulin (ILA und IMI) aus isolierten Pancreasstückchen von Kaninchen in vitro.

Glukosekonzentration im Medium festzustellen. Die Anregung der Insulinsekretion läßt sich nur bis zu Konzentrationen von 100 mg% Zucker beobachten. Höhere Glukosekonzentrationen haben keine weitere Steigerung der Insulinabgabe zur Folge. Wiederum ist der Anstieg des IMI relativ niedriger als der der ILA.

Dieser Unterschied verschwindet, wenn man am isolierten Pancreas des Hundes, das in situ belassen wurde, die Insulinkonzentration in dem ausfließenden Pancreasvenenblut nach Glukosegabe prüft. Hier verhalten sich ILA und IMI auch relativ gleich.

b) Die wesentliche, zuerst mit der biologischen Insulinmessung gewonnene Erkenntnis der letzten Jahre besteht wohl darin, daß der frisch aufgetretene Diabetes des Menschen, und besonders der sogenannte Prädiabetes, höhere als normale Nüchterninsulinspiegel aufweist (*Renold* und *Steinke* 1962; *Ditschuneit* u. Mitarb. 1962). Dieses erstaunliche Ergebnis ist sowohl mit der biologischen als auch der immunologischen Methode der Insulinbestimmung zu erzielen (Abb. 6). Hierbei fällt auf, daß die extremen Anstiege der ILA, die die Prädiabetiker aufweisen können, von den IMI-Werten niemals erreicht werden. Sie liegen etwa in dem Bereich, der auch beim manifesten Diabetiker im Nüchternserum zu messen ist.

Führt man nach dem Vorschlag von *Conard* (1955) Glukose in kleineren Quantitäten zur Messung des Assimilationskoeffizienten k in der

Peripherie intravenös zu, so steigen beim Stoffwechselgesunden die ILA-Werte innerhalb von 15 min signifikant an, während das IMI sich nicht deutlich vom Nüchternwert unterscheidet (Abb. 7). Das Verhalten des immunologisch bestimmbaren Insulins entspricht damit der Voraussetzung der Messung der Glukoseassimilation nach intravenöser Zufuhr als Maßstab für die im peripheren Blute vorhandene biologische Insulinaktivität, nämlich dem Ausbleiben einer wesentlichen Sekretion pankreatischen Insulins, eher als das der ILA. Ihr Anstieg steht in keinem Verhältnis zum Ausmaß der Glukoseassimilation. Die aus ihr berechnete Menge frisch zugeführten Insulins müßte einen weitaus höheren Koeffizienten k ergeben (*Ditschuneit* 1964).

Beim Prädiabetiker bleiben dagegen ILA wie auch IMI von der Glukosezufuhr völlig unberührt. Sie entsprechen damit einer Störung der Insulinsekretion, die wir bereits früher für das Verhalten oraler Zuckergabe beim manifesten Diabetes beschrieben hatten (*Pfeiffer* u. Mitarb. 1959/61). In dieser (von *Steinke* u. Mitarb. 1963 bestätigten) «Sekretionsstarre» hatten wir einen Defekt gesehen, der schon den frühesten Formen und sogar den Vorstufen der menschlichen Zuckerkrankheit eigen sei und zur schlechteren Verwertung zugeführter Glukose beitragen müsse.

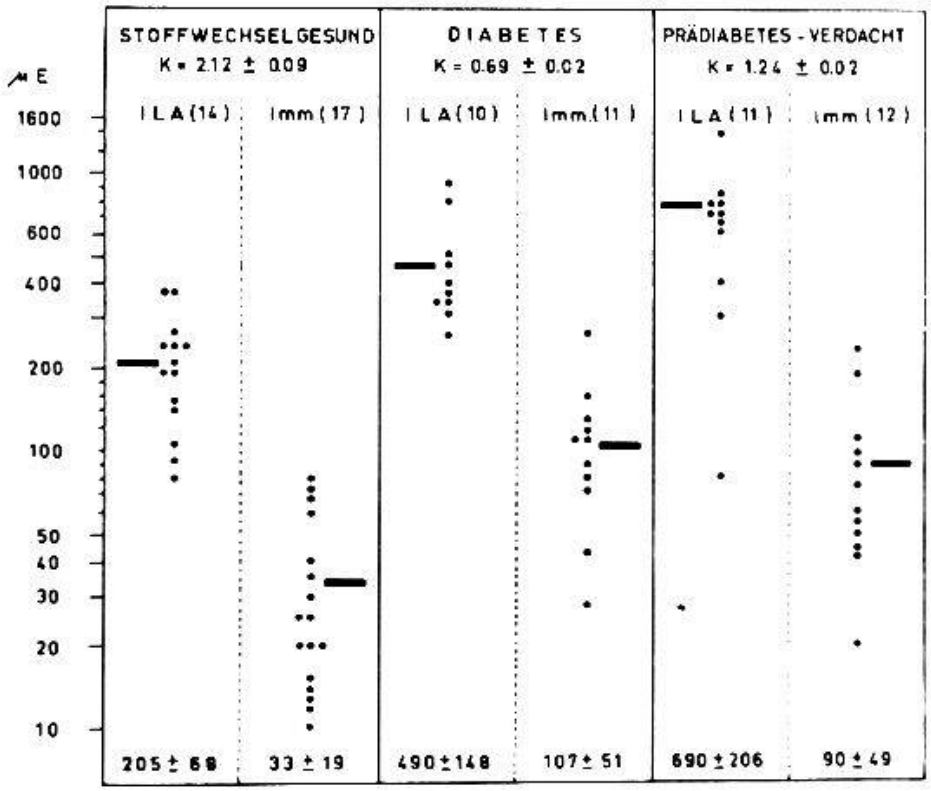

Abb. 6. Insulinwirkung (ILA) und Immunoinsulin im Nüchternserum von Stoffwechselgesunden, Diabetikern und bei Verdacht auf Prädiabetes.

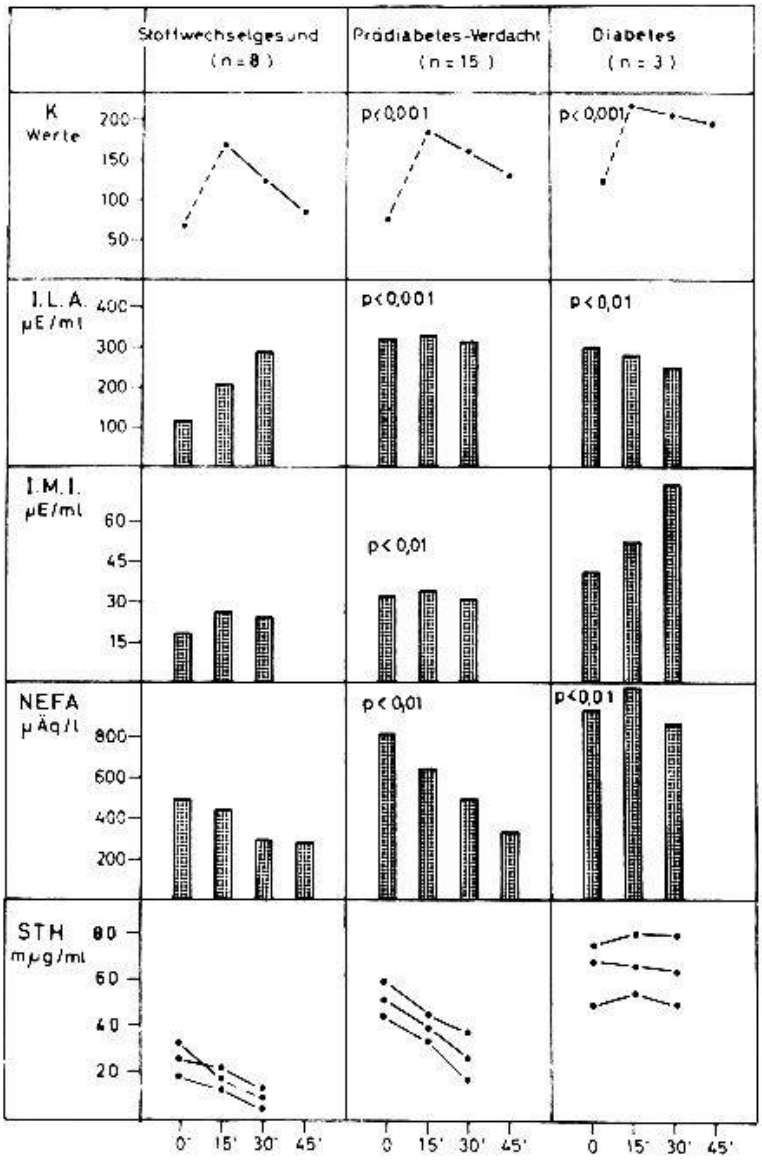

Abb. 7. Verhalten von k-Wert der Glukoseassimilation, Seruminsulinwirkung (ILA), Immunoinsulin (IMI), unveresterten Fettsäuren (NEFA) und STH im Serum bei der intravenösen Glukosebelastung (0,33 g/kg).

Ein deutlicher Unterschied liegt dagegen für beide Methoden beim manifesten Zuckerkranken vor (Abb. 7, letzte Spalte). Hier läßt sich bereits 30 min nach der intravenösen Glukosegabe der gleiche Anstieg der IMI beobachten, den *Yalow* und *Berson* (1960) erstmals für das Verhalten des Insulins 2 Std. nach oraler Glukosegabe beschrieben hatten. Vom biologischen Standpunkt muß man auf diese Diskrepanz zwischen markant gesteigertem Insulinspiegel und deutlich herabgesetzter Glukoseassimilation (vgl. k-Wert in der obersten Spalte der Abb. 7 rechts) aufmerksam machen. Hier spiegelt die ILA-Messung die biologische Realität zweifellos besser wieder als die immunologische Bestimmung des Insulinmoleküls.

Auf die Besprechung der Verhältnisse beim organisch bedingten Hyperinsulinismus und nach Zufuhr von Sulfonylharnstoffen möchte ich verzichten, um zwei Punkte noch eingehender behandeln zu können.

c) Einerseits handelt es sich um den Effekt des hypophysären Wachstumshormons (STH) auf die Insulinsekretion von Tieren und Menschen (*Pfeiffer* 1964). In Abb. 8 ist das Verhalten von ILA und IMI im Pancreasvenenblut der isolierten Bauchspeicheldrüse des Hundes wiedergegeben. Die IMI-Werte liegen in Ruhe in jedem Fall sehr niedrig und zeigen mit dem massiven Anstieg nach Wachstumshormon einen weitaus größeren (relativen) Unterschied zu den Ausgangswerten als die ILA.

Ähnliches läßt sich beim stoffwechselgesunden Menschen 18 Std. nach der in fraktionierten Dosen zugeführten Gabe von 10 mg STH human beobachten. Die IMI-Werte steigen stärker als die ILA aus dem Ausgangsbereich heraus an. Beim Prädiabetes liegt dagegen die ILA, wie bereits gesagt, spontan immer höher als das IMI. Beim Akromegalen

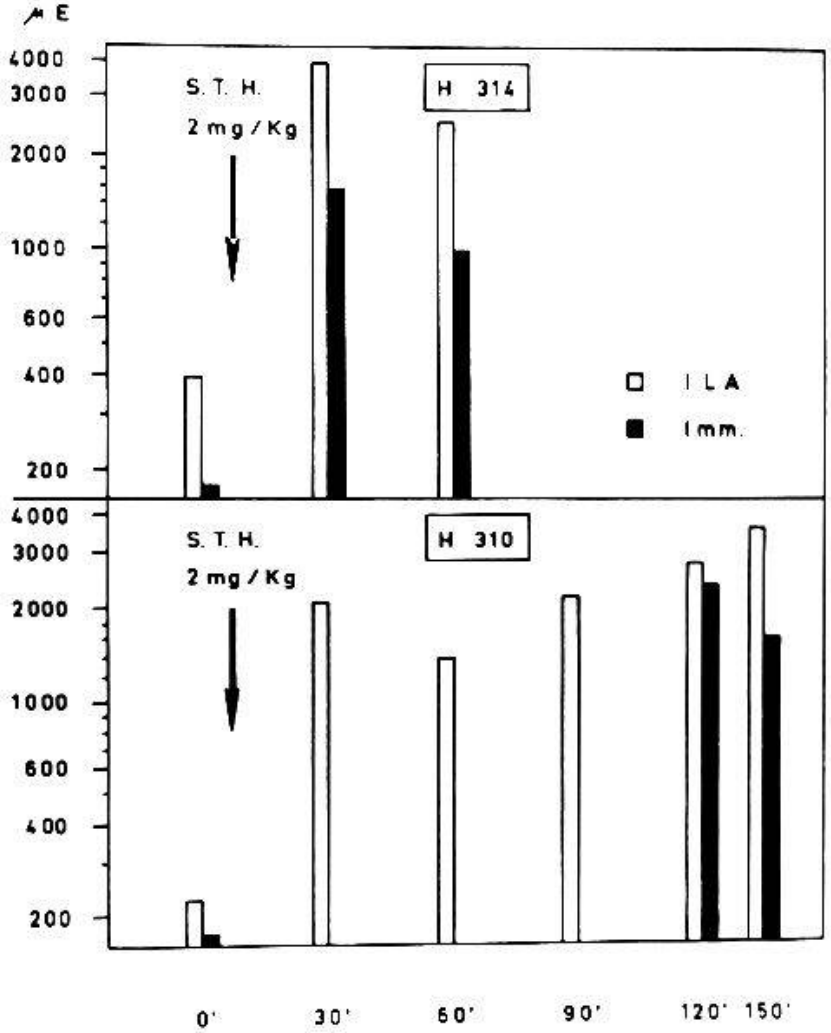

Abb. 8. Seruminsulinwirkung (ILA) und Immunoinsulin (IMI) in der V. pancreatica nach intravenöser Belastung mit 2 mg/kg Human-STH bei Hunden.

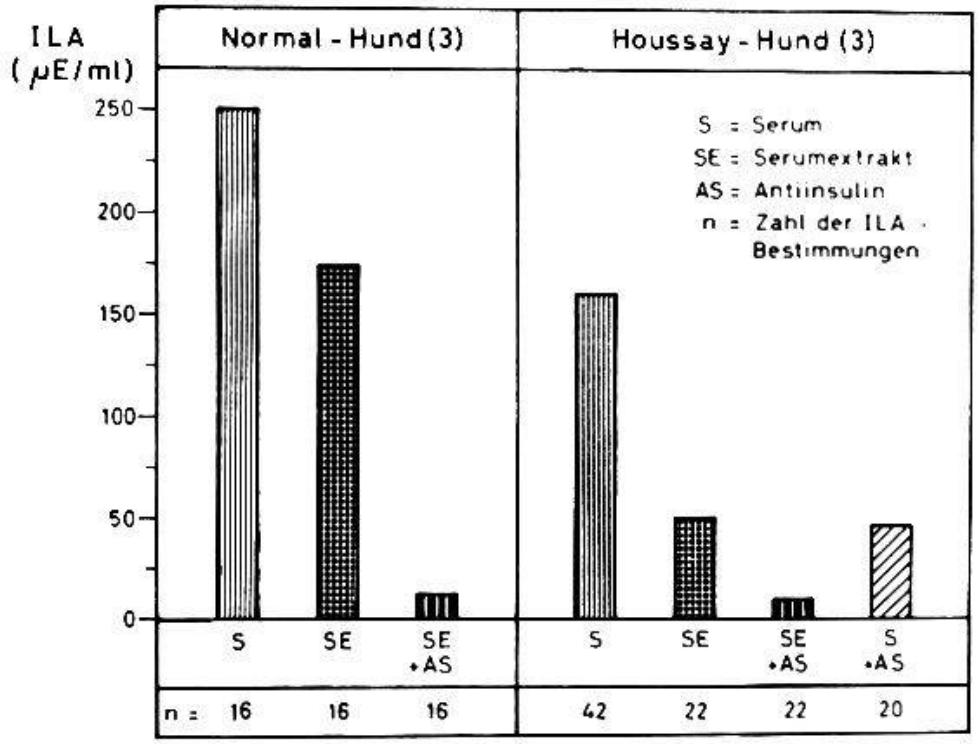

Abb. 9. Einfluß von Extraktion und AS-Zusatz auf die ILA von Normal- und Houssay-Hunden.

ist die Situation umgekehrt. Diese in der Regel schlanken Personen weisen meist nur normale ILA-Werte auf, während die des IMI sich bis auf das Doppelte des Normalen erhöhen können. Ebenso bewegen sich die Werte der freien Fettsäuren (NEFA) beim Akromegalen im Gegensatz zum Prädiabetiker im Bereiche der Norm. Es ist naheliegend, das gleichartige Verhalten von ILA und freien Fettsäuren im Blute mit der vorhandenen oder fehlenden Übergewichtigkeit der verschiedenen Probandengruppen zu korrelieren und hieraus bestimmte Schlüsse zu ziehen (*Pfeiffer* 1964c).

d) Der schwerstwiegende Einwand gegen die biologische Messung der Insulinaktivität am Rattenfettgewebe, nämlich die Persistenz der ILA nach Pankreatektomie, entfällt bei radioimmunologischer Messung. Dies konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, die zunächst gemeinsam mit *A. Sirek* und *O. V. Sirek* (Toronto) begonnen (*Sirek* u. Mitarb. 1963, *Schöffling* u. Mitarb. 1963, 1965a) und später in unserer Abteilung allein fortgeführt wurden (*Schöffling* u. Mitarb. 1965b). Die ILA war bei Houssay-Hunden bis zu 4 Monaten nach Hypophysektomie und Pankreatektomie noch zu messen, wobei die Hypophysektomie beinahe einen größeren Einfluß als die Entfernung der Bauchspeicheldrüse auf den Abfall der ILA ausgeübt hatte. In einigen Seren

Tabelle 3
Nüchternblutzucker sowie Insulinwirkung (ILA) und Immunoinsulin (IMI) im Serum von normalen, hypophysektomierten und Houssay-Hunden

	Normalhund	Hyp-X-Hund	Houssay-Hund
Nü-BZ	62 (17)	50 (14)	227 (14)
ILA	118 (13)	113 (9)	106 (17)
IMI	16 (6)	7 (6)	0 (4)*

( ) = Zahl der untersuchten Tiere.
* = Houssay-Stadium 10, 11, 31 und 94 Tage.

konnte auch mit Hilfe der Rattenfettgewebsmethode Insulinaktivität gefunden werden. Nach den üblichen Kriterien muß diese persistierende Insulinaktivität tatsächlich als Insulin angesprochen werden (Abb. 9). Sie war mit Salzsäure-Alkohol in vernünftiger Relation zum Serumwert zu extrahieren, der Extrakt konnte durch Antiserum praktisch vollständig am Fettgewebe gehemmt werden. Allein der völlige Fehlschlag der radioimmunologischen Messung dieser Insulinaktivität zeigt, daß es sich hier nicht um Insulin gehandelt haben kann (Tab. 3). Während nach der Hypophysektomie nur ein Abfall auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes eintrat, war nach zusätzlicher Pankreatektomie das völlige Verschwinden von IMI zu beobachten. Nach einer der Grundregeln der Endokrinologie, daß ein Hormonnachweis im Blut nur dann spezifisch ist, wenn die Entfernung des Mutterorgans von seinem Verschwinden begleitet ist, muß hier der radioimmunologischen Bestimmung allein Spezifität zuerkannt werden.

Es ist eine andere Frage, ob damit in jedem Fall die biologische Situation erfaßt wird. Hier scheinen die biologischen Verfahren, besonders die Bestimmung am Fettgewebe, ein beinahe feineres Indiz zu sein, um eine Problematik zu enthüllen, mit der wir uns auseinanderzusetzen haben. Lange Zeit werden wir wohl noch mit Profit *beide* Verfahren in *einem* Laboratorium nebeneinander anzuwenden haben.

Zusammenfassung

Die radioimmunologische Bestimmung von Insulin im Blute erfolgte mittels Trennung des freien von dem durch Antikörper gebundenen I^{131}-Insulin mittels Agar-Elektrophorese und Anionenaustauschern (Dowex 1 und Amberlite). Insuline von Schwein, Rind und Mensch, die zum Teil

mit Chloramin T und NaI^{131} selbst markiert wurden, fanden Verwendung. Es ließ sich zeigen, daß mit bestimmten gemischten Antiseren Schweineinsulin sowohl zur Sensibilisierung der Antiserumspender als auch als markiertes Antigen zur Messung von endogenem menschlichem Insulin in einer Serumprobe verwandt werden kann. Die große Bedeutung von Verunreinigungen, die durch die Jodmarkierung entstehen, wurde an typischen Beispielen demonstriert. Die Insulinbruchstücke binden sich an α_2-Globuline und werden nicht vom Antikörper erfaßt. Nach Reinigung mittels Sephadex-G-75 lassen sich reine Lösungen von I^{131}-Insulin herstellen, die sowohl bei der Trennung im Agargel als auch mittels Ionenaustauschern brauchbare Resultate liefern (Genauigkeitsindex von 0,039 bei Trennung in Amberlite).

Die vergleichende Messung von Insulinwirkung (biologisch an Hand der Umwandlung von 1-C^{14}-markierter Glukose zu $C^{14}O_2$ durch das isolierte Fettgewebe der Ratte bestimmt) und Immunoinsulin unter verschiedenen Bedingungen ergab: Bei absolut immer niedrigeren Konzentrationen des immunologisch bestimmbaren Insulins relativ höhere Anstiege der Insulinwirkung nach Glukosezusatz zum Inkubationsmedium isolierter Pancreasgewebestückchen in vitro, nach intravenöser Glukoseinjektion in vivo im Pancreasvenenblut gesunder Hunde sowie nach intravenöser und oraler Glukosebelastung im peripheren Blut stoffwechselgesunder Menschen; gleichsinnige Erhöhungen von Insulinwirkung und Immunoinsulin im Nüchternblut von Prädiabetikern; fehlender Anstieg der biologischen Insulinaktivität nach Glukosegabe beim Prädiabetiker und Altersdiabetiker, jedoch markante und nur zeitlich verspätete Erhöhung der Konzentration des immunologisch gemessenen Insulins beim Altersdiabetes. Auf Wachstumshormon stiegen dagegen umgekehrt beim stoffwechselgesunden Hund und Menschen im Pancreas- und peripheren Blut die Immunoinsulin-Spiegel relativ höher an als die Insulinaktivitäten. Beim Houssay-Hund (nach Hypophysektomie und Pankreatektomie) waren Insulinaktivitäten noch 4 Monate nach der Entfernung der Bauchspeicheldrüse zu messen, mit Salzsäure-Alkohol aus dem Serum zu extrahieren und durch Antiserum zu neutralisieren; immunologisch ließ sich dagegen kein Insulin mehr bestimmen.

Es wird der Schluß gezogen, daß die radioimmunologische Insulinbestimmung zwar genauer und empfindlicher als jede der verfügbaren biologischen Meßtechniken ist, lange Zeit jedoch noch die biologische Bestimmung der Insulinwirkung mit Gewinn dazu benutzt werden kann, am besten unter Vergleich mit einem immunologischen Verfahren, um klinisch und biologisch interessante Probleme anzugehen.

Résumé

La détermination radio-immunologique de l'insuline dans le sang a lieu en séparant l'insuline I^{131} libre de l'insuline I^{131} fixée sur les anticorps par l'agar-électrophorèse et les séparateurs d'anions (Dowex I et Amberlite). On utilisa les insulines de porc, de bœuf et humaine que nous avions marquées nous-mêmes partiellement par la chloramine T et Na I^{131}. On a montré que l'insuline de porc, additionnée de certains antisera mélangés, peut servir à la sensibilisation des donneurs d'antisérum ainsi que d'antigène marqué pour mesurer l'insuline humaine endogène dans un échantillon de sérum. Quelques exemples caractéristiques démontrent la grande importance des impuretés qui sont produites lors du marquage à l'iode. Des fragments d'insuline se fixent à l'α_2-globuline et ne sont pas touchés par l'anticorps. Après purification avec le Sephadex-G-75, on obtient des solutions pures d'insuline I^{131} qui fournissent des résultats valables aussi bien par séparation dans l'Agar-gel que par l'emploi de séparateurs d'ions (index d'exactitude: 0,039 par séparation avec amberlite).

La mesure comparative de l'activité de l'insuline (biologiquement mesurée par transformation de glucose marquée ^{1}-C^{14} en $C^{14}O_2$ dans le tissu graisseux isolé du rat) et de l'immuno-insuline sous différentes conditions donna comme résultats: avec des concentrations toujours plus basses d'insuline selon détermination immunologique, on obtient des effets insuliniens relativement plus élevés après addition de glucose *in vitro* au milieu d'incubation de fragments isolés de tissu pancréatique, après injection intraveineuse de glucose *in vivo* dans le sang du pancréas du chien normal ainsi qu'après injection intraveineuse ou administration per os dans le sang périphérique de l'homme à métabolisme normal; chez les prédiabétiques à jeun, le sang donne des élévations parallèles de l'activité de l'insuline et de l'immuno-insuline; en outre on ne trouve pas d'augmentation de l'activité biologique de l'insuline après administration de glucose chez les prédiabétiques et le diabète sénile, par contre une élévation nette et légèrement retardée de la concentration de l'insuline immunologique dans le diabète sénile. L'administration d'hormone de croissance provoque d'autre part chez le chien et l'homme normal un niveau plus élevé de l'immuno-insuline que de l'insuline dans le sang pancréatique et périphérique du chien et de l'homme à métabolisme normal. Le chien de Houssay (hypophysectomie et pancréatectomie) donnait encore quatre mois après l'ablation du pancréas une activité insulinienne mesurable, et l'insuline a pu être extraite avec de l'alcool-acide chlorhydrique et neutralisée par antisérum; par voie immunologique on ne décelait cependant aucune insuline.

Conclusion: La mesure radioimmunologique de l'insuline est plus exacte et plus sensible que toute méthode biologique de mesure, mais la mesure biologique de l'insuline sera néanmoins toujours employée avec succès en comparaison avec la méthode immunologique pour l'étude des problèmes cliniques et biologiques.

Riassunto

La determinazione radio-immunologica dell'insulina nel sangue, fu realizzata separando l'insulina-iodio^{131} libera da quella fissata agli anticorpi servendosi dell'elettroforesi su agar e di sostanze separatrici di anioni (Dowex 1 e amberlite). Furono adoperate insuline di maiale e di bue come pure insuline umane marcate con cloramina T ed il Na-I^{131}.

Si potè dimostrare così, che con certe determinate miscele di antisieri l'insulina di maiale può essere adoperata, sia per sensibilizzare i donatori di antisiero, sia come antigene per la determinazione dell'insulina endogena nel siero umano. Alcuni esempi illustrano la grande importanza di certe impurità provenienti dal marcamento con iodio radioattivo. I frammenti di insulina si legano alla frazione alfa 2 delle globuline e non vengono captate dall'anticorpo. Mediante purificazione col Sephadex-G-75 si possono ottenere soluzioni pure di insulina-iodio^{131}, le quali danno poi buoni risultati, sia per la separazione in agar allo stato di gel, che per quello mediante separatori di ioni (titolo di approssimazione 0,039 nella separazione con l'amberlite).

Le misure comparative dell'azione insulinica (biologicamente misurate mediante trasformazione di glucosio marcato con 1-C^{14} in $C^{14}O_2$ nel tessuto adiposo isolato di topo) e dell'immuno-insulina in condizioni diverse diedero i seguenti risultati: con concentrazioni decrescenti di insulina determinata immunologicamente, si osservano *in vitro* reazioni più forti di attività insulinica aggiungendo del glucosio al mezzo d'incubazione che consiste in frammenti di pancreas isolati, mentre *in vivo* le stesse reazioni si osservano, o iniettando glucosio nella vena pancreatica di cane normale, oppure mediante carico di glucosio per via orale o parenterale nel sangue periferico di uomo sano; nel sangue dei prediabetici si poterono constatare aumenti paralleli dell'azione insulinica e dell'immuno-insulina; nei casi di prediabete e di diabete senile non si constatò un aumento dell'attività biologica dell'insulina dopo somministrazione di glucosio; nei casi di diabete senile invece, si constatò un aumento significante e ritardato della concentrazione d'insulina misurata immunologicamente.

Dopo somministrazione dell'ormone somatotropo si potè constatare al contrario nel cane e nell'uomo sano un aumento più significante dell'im-

muno-insulina nel pancreas e nel sangue periferico che non quello dell'attività insulinica. Nel cane trattato secondo il metodo di Houssay (asportazione dell'ipofisi e del pancreas) si poterono misurare delle insuline attive quattro mesi dopo l'intervento sul pancreas mediante estrazione con alcool e acido cloridrico e neutralizzazione con antisiero; col metodo immunologico invece non si potè più trovare dell'insulina.

Concludendo si può affermare che, la determinazione radio-immunologica dell'insulina è più esatta ed anche più sensibile di quella biologica.

La determinazione biologica dell'attività insulinica però, potrà essere ancora adoperata a lungo con profitto per studiare problemi clinico-biologici, se verrà comparata a quella immunologica.

Summary

Radio-immunological determination of insulin in blood was performed by separating free and antibody-bound insulin ^{131}J utilizing agar-electrophoresis and anion exchange resins (Dowex I and Amberlite). Porcine, bovine, and human insulins, some of them labelled by ourselves using $Na^{131}J$ and Chloramin T, were employed. In combination with certain mixed antisera, porcine insulin was capable to serve both for sensitization of antiserum donors as well as a labelled antigen for determination of endogeneous human insulin in serum samples. The significant role of the impurities arising from the iodine-labelling procedure was demonstrated in some typical examples. The insulin fragments bind to α_2-globulins and will not react with antibody. Purification by means of Sephadex G-75 yields pure ^{131}J-insulin solutions, giving satisfactory results both in agar-gel and ion exchange resin separation (accuracy index for separation on Amberlite ± 0.039).

The comparison of insulin activity (measured by the conversion of 1-^{14} C-labelled glucose to $C^{14}O_2$ in isolated rat fatty tissue) and immuno-insulin under different conditions gave the following results: whereas the immunologically determinable insulin remains at an absolutely lower concentration, a relatively high increase of insulin activity will follow the *in vitro* addition of glucose to incubated pancreas slices, the intravenous injection of glucose into pancreatic vein of healthy dogs as well as the intravenous and oral glucose loading in the peripheral blood of normal human beings: insulin activity and immuno-insulin are equally elevated in the blood of fasting prediabetics; no rise in biological activity was observed following glucose administration in pre-diabetics and elderly diabetics, however, a striking and delayed increase in immuno-insulin was noted in the latter group. In contradiction, growth

hormone administration caused an increase in the immuno-insulin level rather than insulin activity in pancreatic and peripheral blood of normal dogs and humans. Houssay dogs (hypophysectomized and pancreatectomized) still showed measurable insulin activity four months following the removal of the pancreas; the active principle could be extracted with acid acetone and was neutralized by antiserum, but no insulin was found by immunological methods.

In conclusion, the radio-immunological insulin determination seems to be more exact and more sensitive than any of the present biological methods; however, biological insulin determination—preferably in comparison with immunoassay—will still be a valuable tool for clarifying problems of clinical and biological interest.

Berson S. A. und *Yalow R. S.:* Immunoassay of protein hormones. The Hormones. Academic Press, New York/London 1964.

Conard V.: Mesure de l'assimilation du glucose. Acta gastro-ent. belg. *18*, 655 (1955).

Ditschuneit H., *Faulhaber J. D.* und *Pfeiffer E. F.:* Verbesserung der Methode zur Bestimmung von Insulin im Blut mit Hilfe radioaktiver 1-C^{14}-Glukose und dem epididymalen Rattengewebe. Atompraxis *8*, 172 (1962a).

Ditschuneit H., *Pfeiffer E. F.*, *Cuendet R.*, *Kolb H.*, *Wahl Ch.* und *Rott W. H.:* Über die Seruminsulinwirkung bei Stoffwechselgesunden und Diabetikern. I. Sympos. dtsch. Diab. Kon., Düsseldorf 1962 (b), S. 37–43 (*Jahnke-Oberdisse*, Hgb.). Thieme, Stuttgart 1963.

Ditschuneit H.: Die biologische und klinische Bedeutung der Insulinwirkung von Blut und Bluteiweißfraktionen. Habil.-Schrift. Frankfurt/M. 1963.

Greenwood F. C. und *Hunter W. M.:* The preparation of ^{131}I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. *89*, 114 (1963).

Melani F., *Ditschuneit H.*, *Ditschuneit H. H.*, *Mucci A.* und *Pfeiffer E. F.:* Immunologische Bestimmung von Insulin im Blut mit Hilfe von Insulinantikörpern und I^{131}-markiertem Insulin. X. Sympos. dtsch. Ges. Endokr. Wien 1963, S. 252.

Melani F., *Ditschuneit H.*, *Bartelt K. M.*, *Friedrich H.* und *Pfeiffer E. F.:* Über die radioimmunologische Bestimmung von Insulin im Blut. Klin. Wschr. *1964* (im Druck).

Pfeiffer E. F., *Pfeiffer M.*, *Ditschuneit H.* und *Chang-Su Ahn:* Clinical and experimental studies of insulin secretion following tolbutamide and metahexamide administration. Ann. N.Y. Acad. Sci. *82*, 479–495 (1959a).

Pfeiffer E. F., *Pfeiffer M.*, *Ditschuneit H.* und *Chang-Su Ahn:* Tierexperimentelle und klinische Studien zur Insulinsekretion. VI. Sympos. dtsch. Ges. Endokr. Kiel 1959 (b), 265. Springer, Berlin 1960.

Pfeiffer E. F., *Pfeiffer M.*, *Ditschuneit H.* und *Chang-Su Ahn:* Über die Bestimmung von Insulin im Blute am epididymalen Fettanhang der Ratte mit Hilfe markierter Glukose. II. Experimentelle und klinische Erfahrungen. Klin. Wschr. *37*, 1239–1245 (1959c).

Pfeiffer E. F., *Ditschuneit H.* und *Ziegler R.:* Über die Bestimmung von Insulin im Blute am epididymalen Fettanhang der Ratte mit Hilfe markierter Glukose. IV. Die Dynamik der Insulinsekretion des Stoffwechselgesunden und des Altersdiabetikers nach wiederholter Belastung mit Glukose, Sulfonylharnstoffen und menschlichem Wachsstumshormon – ein Beitrag zur Pathogenese des menschlichen Altersdiabetes. Klin. Wschr. *39*, 415–426 (1961a).

Pfeiffer E. F., Ditschuneit H., Ziegler R., Böhle E. und *Biegler R.:* Menschliches Wachstumshormon. Med. Welt *16*, 865–873 (1961b).

Pfeiffer E. F.: Was gibt es Neues in der Diabetesforschung. Vom Standpunkt des Endokrinologen. 22. Tgg. dtsch. Ges. Verdau.- u. Stoffwechselkr. Wiesbaden 1964 (a) (im Druck).

Pfeiffer E. F.: Wachstumshormon und Insulinsekretion: Die Verhältnisse unter normalen und pathologischen Bedingungen. 11. Sympos. Endokr. Düsseldorf 1964 (im Druck). 1964 (b).

Pfeiffer E. F.: Anerkannte diabetogene Hormone und Zuckerkrankheit des Menschen. Ref. V. Congr. int. Diab. Fed. Toronto 1964 (c) (im Druck).

Renold A. E., Martin D. B., Dagenais Y. M., Steinke J., Nickerson R. J. und *Sheps M. C.:* Measurement of small quantities of insulin-like-activity using rat adipose tissue. I. A proposed procedure. J. clin. Invest. *39*, 1487 (1960).

Schöffling K., Beyer J., Ditschuneit H., Melani F., Böhle E., Walther A. und *Althoff P.:* Über die Beeinflussung der biologischen und der immunologischen Seruminsulinaktivitäten des Hundes durch Hypophysektomie und STH-Belastung. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 1965 (in Vorbereitung).

Schöffling K., Ditschuneit H., Petzoldt R., Beyer J., Pfeiffer E. F., Sirek A. und *Sirek O. V.:* Insulin-like activity in Houssay-dogs. Diabetes *1965* (im Druck).

Schöffling K., Sirek A., Ditschuneit H., Petzoldt R., Sirek O. V. und *Pfeiffer E. F.:* Insulinaktivitäten in Houssay-Hunden. I° Simpos. int. Diabete, Modena 1963 (im Druck).

Scheidegger J. J.: Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse. Int. Arch. Allergy *7*, 103–110 (1955).

Sirek A., Schöffling K. und *Ditschuneit H.:* Seruminsulin-like activity in Houssay-dogs. 23rd ann. Meeting Amer. Diabetes Ass. Atlantic City 1963.

Steinke J., Soeldner J. St., Camerini-Davalos R. A. und *Renold A. E.:* Studies on serum insulin-like activity in prediabetes and early overt diabetes. Diabetes *12*, 501–506 (1963).

Yalow R. S. und *Berson S. A.:* Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature (Lond.) *21*, 1648 (1959).

Yalow R. S. und *Berson S. A.:* Immuno-assay of endogenous plasma insulin in man. J. clin. Invest. *39*, 1157 (1960).

Diskussion

G. Wolf-Heidegger (Basel): Die interessanten Ergebnisse, über die der Autor berichtet hat, dürfen meines Erachtens beim jetzigen Stand der Dinge noch nicht als Beweis für eine unmittelbar den Inselapparat stimulierende Wirkung des somatotropen Hormons gewertet werden. Die beobachteten Effekte könnten auch über eine Einwirkung des somatotropen Hormons auf allgemeine Stoffwechselvorgänge oder als eine indirekte Wirkung des Hormons – auf dem Wege der Beeinflussung anderer Organe – zustande kommen. Die allgemeinen Stoffwechselwirkungen des somatotropen Hormons sind viel komplexer, als man gemeinhin annimmt; dies haben u. a. Untersuchungen aus dem Institut des Sprechenden über die Einwirkung des somatotropen Hormons auf das lymphatische System gezeigt. Beobachtungen über einen direkten Einfluß des somatotropen Hormons auf das Inselgewebe stehen jedenfalls noch aus; diesbezügliche Untersuchungen wären zur Ergänzung durchzuführen.

E. F. Pfeiffer (Frankfurt a. M.) an *G. Wolf-Heidegger*: Wenn ich den Eindruck erweckt haben sollte, daß *der* Effekt des STH die direkte Anregung der Insulinsekretion darstelle, so würde ich dies bedauern. STH hat sicher mehrere Effekte. Was den Kohlenhydratstoffwechsel und das pankreatische Insulin angeht, so erhöht es 1. (wenn auch nur vorübergehend) die Glukoseproduktion der Leber, 2. hemmt es die Glukoseutili-

sation in der Peripherie und 3. stimuliert es möglicherweise direkt die Insulinsekretion der B-Zellen. Über eine Erhöhung des Blutzuckers mögen 1 und 2 indirekt ebenfalls an der Insulinsekretion nach STH beteiligt sein. Es bleibt abzuwarten, wie sich Pancreasschnitte in vitro nach Zusatz von STH verhalten. Sollte das Wachstumshormon bei niedriger Glukosekonzentration im Medium dann ebenfalls noch eine Insulinabgabe bewirken, so wäre der 3. Effekt gesichert. Derartige Experimente führen wir zur Zeit durch.