Die Wirkung von Insulin auf den Stoffwechsel der isolierten perfundierten Leber normaler und alloxandiabetischer Ratten

I. Der Stoffwechsel isolierter perfundierter Lebern von normalen und alloxandiabetischen Ratten unter verschiedenen experimentellen Bedingungen*

H. D. SÖLING, R. KOSCHEL, W. DRÄGERT, P. KNEER und W. CREUTZFELDT

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Göttingen (Direktor: Prof. Dr. W. CREUTZFELDT) und der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg i.Br. (Direktor: Prof. Dr. L. HEILMEYER)

Eingegangen am 25. November 1965

The effect of insulin on the metabolism of isolated perfused livers of normal and alloxan-diabetic rats. I. The metabolism of isolated perfused livers of normal and alloxan-diabetic rats in various experimental conditions.

Summary. The metabolism of isolated perfused livers from alloxan-diabetic ketotic rats was compared with that of livers from normal animals. Perfusion media with different contents of nonesterified fatty acids (NEFA) were used. An increase in the concentration of glucose in the medium from 11.1 to 22.2 mmole/l augmented glucose uptake, glucose utilization and formation of glycogen, while the net production of inorganic phosphate decreased. During the 3 hours of perfusion, two phases could be observed in experiments with livers from normal rats: The first phase was characterized by both a greater gluconeogenesis and a greater oxidation of fatty acids. During the second phase fatty acid oxidation decreased while glucose utilization prevailed. Perfusion experiments with livers from diabetic rats yielded the following results when compared with livers from normal rats: the liver glycogen content at the beginning of the perfusion as well as the increase in the glycogen content during the perfusion was significantly increased; at the beginning of the experiments the medium concentrations of lactate were significantly higher and the concentrations of pyruvate significantly lower; the lactate/pyruvate ratio of the medium at the beginning of the experiments was significantly higher although it became the same as the normal during the perfusion. The net uptake of lactate and pyruvate, which could be observed under all conditions during the first 90 min of the perfusion, was distinctly increased in experiments with diabetic livers. The net production of urea and the release of potassium ions were significantly higher in experiments with diabetic livers. The kinetics of NEFA-uptake by normal and diabetic livers did not show a significant difference. The correlation between NEFA-uptake and ketone body-formation was the same in diabetics as in normal livers.

Effet de l'insuline sur le métabolisme des foies isolés perfusés de rats normaux et alloxane-diabétiques. I. Le métabolisme des foies isolés et perfusés des rats normaux et alloxane-diabétiques sous diverses conditions expérimentales.

Résumé. Le métabolisme des foies isolés perfusés des rats normaux et des rats alloxane-diabétiques céto-siques a été étudié et comparé. Des milieux de perfusion avec des concentrations différentes de NEFA ont été employés. — Si la concentration du glucose dans le milieu est élevée de 11.1 à 22.2 mmole/l, la captation et l'utilisation du glu-

cose ainsi que la formation de glycogène augmentent, la sécrétion de phosphate inorganique diminue. — On peut diviser les 3 heures de perfusion des foies normaux en deux phases: la première phase est caractérisée par une glyconeogenèse intensive et simultanément par une oxydation plus forte d'acides gras. Pendant la seconde phase, l'utilisation du glucose domine et l'oxydation des acides gras diminue. — Les perfusions des foies diabétiques comparés avec les foies normaux, donnent les résultats suivants: le glycogène au début est élevé, la production de glycogène est plus forte. Au début de la perfusion, la concentration de lactate dans le milieu est élevée, la concentration de pyruvate est abaissée. Le quotient lactate/pyruvate est élevé, mais il se normalise au cours de la perfusion; les différences sont significatives. La captation nette de lactate et de pyruvate pendant la première phase est encore plus forte dans les expériences avec des foies diabétiques. L'augmentation de la sécrétion nette d'urée et de potassium des foies diabétiques est significative. Il n'y a pas de différences significatives dans la captation de NEFA entre les foies normaux et diabétiques. Les rapports entre l'absorption des NEFA et la formation de corp cétoniques sont inchangés dans les foies diabétiques.

Zusammenfassung. Der Stoffwechsel isolierter perfundierter Lebern von normalen und alloxandiabetischen ketotischen Ratten wurde vergleichend untersucht. Dabei wurden Perfusionsmedien mit unterschiedlichem NEFA-Gehalt verwendet. — Glucoseaufnahme, Glucoseutilisation, Glykogenbildung nehmen zu, die Abgabe von anorganischem Phosphat ab, wenn die Glucosekonzentration im Medium von 11.1 auf 22.2 mMol/l erhöht wird. — Während der 3-stündigen Perfusion normaler Lebern lassen sich zwei Phasen unterscheiden: Die erste Phase wird bestimmt durch eine stärkere Gluconeogenese bei gleichzeitiger stärkerer Fettsäureoxydation, in der zweiten Phase überwiegt die Glucoseutilisation bei verminderter Fettsäureoxydation. Perfusionsversuche mit diabetischen Lebern lassen folgende Unterschiede erkennen: Der Ausgangsglykogengehalt ist ebenso signifikant erhöht wie der Glykogenzuwachs während der Perfusion. Die Lactatkonzentrationen im Medium sind zu Versuchsbeginn signifikant erhöht, die Pyruvatkonzentrationen signifikant erniedrigt. Der Lactat/Pyruvat-Quotient im Medium ist zu Versuchsbeginn signifikant erhöht, normalisiert sich aber im Verlauf der Perfusion. Die in der ersten Versuchshälfte nachweisbare Nettoaufnahme von Lactat und Pyruvat ist in Versuchen mit diabetischen Lebern verstärkt. Die Nettoabgabe von Harnstoff und Kalium durch diabetische Lebern ist signifikant verstärkt. Die Kinetik der NEFA-Aufnahme ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen normalen und diabetischen Lebern. Diabetische Lebern weisen keine signifikanten Änderungen der Beziehungen zwischen NEFA-Aufnahme und Ketonkörperbildung auf.

* Die vorliegende Arbeit wurde durch die dankenswerte Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

Die Beurteilung der direkten Insulinwirkung auf den Leberstoffwechsel ist unter in vivo-Bedingungen sehr erschwert, da eine Abgrenzung von Effekten, die über eine extrahepatische Insulinwirkung zustande kommen, oft nicht möglich ist. Dieses Problem wird andernorts ausführlich diskutiert [36]. Die Perfusion der isolierten Leber bietet gegenüber Untersuchungen von Leberschnitt- oder Leberhomogenatpräparaten den Vorteil, daß das Gewebe weniger geschädigt ist und Gas- und Stoffaustausch in annähernd normaler Weise ablaufen können.

Untersuchungen zur Wirkung von Insulin auf den Stoffwechsel isolierter perfundierter Lebern von normalen Tieren sind von verschiedenen Autoren [12, 24, 17, 27] vorgelegt worden. Ähnliche Untersuchungen an Lebern diabetischer Tiere (im folgenden als „diabetische Lebern“ bezeichnet) beschränken sich auf die Untersuchungen von HAFT und MILLER [12] sowie PENHOS und KRAHL [27].

Wir haben deshalb das Problem einer direkten hepatischen Insulinwirkung erneut aufgegriffen und versucht, durch Erfassung einer relativ großen Zahl verschiedener Parameter weitere Aufschlüsse zu erhalten.

Methodik

Die Untersuchungen wurden an männlichen Sprague-Dawley-Ratten eines Inzuchtstammes der „Gesellschaft für Versuchstierzucht, Hannover“ durchgeführt. Die Tiere befanden sich mindestens 8–10 Tage vor dem Versuch in unseren Stallungen. Zum Versuch wurden Tiere im Gewicht zwischen 180 und 260 g verwendet. Die Tiere wurden mit Altromin-R-Trockenkeks¹ und Wasser ad libitum ernährt. Normalen und diabetischen Tieren wurde das Futter 20 Stunden vor Versuchsbeginn entzogen.

Zur Erzeugung des Alloxandabetes wurden nach 24-stündiger Nüchternperiode 50 mg/kg Alloxan i.v. injiziert. Danach blieben die Tiere für weitere 24 Stunden nüchtern. Anschließend wieder Altromin-R-Standard-Kost ad libitum. 48 Stunden nach der Alloxangabe Bestimmung der Blutglucosekonzentration. Die Tiere erhielten dann für einige Tage täglich 1 E „Lente Insulin“ NOVO² pro 100 mg% Blutglucose. Später wurde die Dosis in Abhängigkeit von Blutglucosekonzentration und Glucosurie variiert. Sie lag im Mittel bei 4–6 E/Tier/Tag. Nach wenigstens 2–3 wöchiger Dauer des Diabetes kamen die Tiere in Stoffwechselkäfige, wo Glucosurie und Ketonurie bei konstanter, in Vorversuchen ermittelter Futtermenge gemessen wurden. 72 Stunden vor Versuchsbeginn erhielten die Tiere die letzte Insulingabe.

Die Apparatur zur Leberperfusion entsprach im Wesentlichen dem Modell von MILLER et al. [23].

Zur Perfusion verwendeten wir in Anlehnung an SCHIMASSEK [29] eine Aufschwemmung gewaschener Rindererythrocyten in Tyrodelösung. Der Tyrodelösung wurden Rinderalbumin, Glucose, Aminosäuren und Oxytetracyclin („Terravenös“) zugesetzt. Sofern nicht anders angegeben, enthielt das Perfusionsmedium auch

größere Mengen an unveresterten Fettsäuren, die aus dem zugegebenen Rinderalbuminkonzentrat stammten. Weitere Einzelheiten über die Herstellung des Perfusionsmediums s. [35]. Die Endkonzentrationen sind Tab. 1 zu entnehmen.

Tabelle 1. Zusammensetzung des Perfusionsmediums vor Beginn der Perfusion, also vor dem Einhängen der Leber in die Apparatur. Da die Versuche erst nach 20 Minuten langer Erholungszeit der Leber in der Apparatur begonnen wurden, hat sich die Konzentration einzelner Bestandteile bis zum Versuchsbeginn bereits mehr oder weniger stark verändert

Zusammensetzung des Mediums zur Perfusion isolierter Rattenlebern

Perfusionsvolumen zu Beginn der Perfusion	150 ml
Hämatokrit	ca. 33%
Hämoglobingehalt	ca. 11 g/100 ml Medium
Konzentration der übrigen wesentlichen Bestandteile im Medium:	
Rinderalbumin	2 g/100 ml Medium
Nichtveresterte Fettsäuren (NEFA) bei Verwendung des üblichen Rinderalbumin-Präparates „Povite“ 30% ig des Biotest-Serum Institutes, Frankfurt/Main	3,0–4,0 mval/l Perfusionsplasma
α -Amino-Stickstoff	ca. 45 mg/l Perfusionsplasma
(L-Arginin	ca. 24 mg/l P.Plasma
DL-Isoleucin	ca. 11 mg/l „
L-Leucin	ca. 23 mg/l „
L-Lysin	ca. 17 mg/l „
DL-Methionin	ca. 15 mg/l „
DL-Phenylalanin	ca. 24 mg/l „
DL-Threonin	ca. 21 mg/l „
DL-Tryptophan	ca. 6 mg/l „
DL-Valin	ca. 21 mg/l „
L-Histidin. HCl. H ₂ O	ca. 9 mg/l „)
D-Glucose	11,1 mMol/l Medium (soweit nicht anders erwähnt)
Natrium (Na ⁺)	152 mval/l Medium
Kalium (K ⁺)	3,5 mval/l Medium
Calcium (Ca ⁺⁺)	3,4 mval/l Medium
Anorgan. Phosphat (P _i)	ca. 0,50 mMol/l Perfusionsplasma
Terravenös (Oxytetracyclin)	ca. 6,5 mg/100 ml Medium

Einige Versuchsreihen wurden mit einem Medium durchgeführt, das weniger unveresterte Fettsäuren (0,30–0,65 mval/l) enthielt. In diesen Versuchen wurde anstelle des „Biotest“-Albumins das Präparat „Rinderalbumin, reinst“ der Firma Behringwerke/Marburg³ verwendet. Die Glucosekonzentration betrug in den Versuchen mit NEFA-armem Medium 11,1 mMol/l.

Die Operation wurde in Äthernarkose entsprechend den Angaben von BRAUER et al. [3] durchgeführt. Die Zeit vom Abklemmen der V. portae bis zum Ingangkommen der Durchblutung in der Perfusionsapparatur betrug 4–7 Minuten. Der Gallefluß setzte 2–3 Minuten nach dem Einsetzen des Blutdurchflusses ein.

Bestimmungsmethoden: Leberglycogengehalt mit einer Anthronmethode nach SEIFTER et al. [33]. Nichtveresterte Fettsäuren (NEFA) nach DOLE und MEINERTZ [5]. Gesamtketonkörper mit einer modifizierten GREENBERG-LESTER-Methode [11] nach O. HANSEN [13], Glu-

¹ Altromin-R-Trockenkeks-Zusammensetzung: Gerste 45%, Hafer 18%, Mais 10%, Fischmehl 6%, Fleischnahrungsmittel 6%, Bierhefe, getrocknet 5%, Luzerne-Grünmehl 4%, Weizenkeime 3%, Mineral- und Wirkstoffe (Vitamine, Spurenelemente) 3%.

² Wir danken der Firma NOVO Industrie GmbH, Mainz, für die Überlassung des Insulins.

³ Wir danken den Firmen „Biotest-Serum-Institut“, Frankfurt/Main u. Behringwerke, Marburg/Lahn für die Überlassung der Albuminchargen.

cose mit der Glucoseoxydase-Methode im Test der Firma C.F. Boehringer & Söhne, Mannheim-Waldhof, Fructose im enzymatisch-optischen Test mit Hexokinase, Phosphohexoseisomerase und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase nach SCHMIDT [30], Lactat und Pyruvat im enzymatisch-optischen Test nach HOHORST [14] bzw. modifiziert nach KUBOWITZ und OTT [19], Harnstoff mit Urease nach FAWCETT et al. [8], α -Amino-N mit einer Ninhydrinmethode nach STEGEMANN [38], anorganisches Phosphat mit einer Ammoniummolybdatmethode nach THEORELL [41], Kalium flammenphotometrisch, Hämoglobin als Cyanhämglobin entsprechend den Angaben von DRABKIN [7].

Die gefundenen Konzentrationsänderungen der verschiedenen Parameter wurden auf 10 g Feuchtleber und auf die Konzentration zu Versuchsbeginn, die = 0 gesetzt wurde, bezogen. Lediglich für Lactat und Pyruvat wurden die Originalkonzentrationen angegeben.

In den Tabellen wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen ($s = \pm \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x)^2}{n - 1}}$) angegeben. Varianzanalyse mit dem t-Test nach STUDENT.

Der geringe Anstieg der Konzentrationen von Lactat und Pyruvat bei fehlendem signifikantem Abfall der Glucosekonzentration weist auf die geringe Glykolyse der Rindererythrocyten im Vergleich zu Rattenerythrocyten hin. Dies kann im Hinblick auf die Fragestellung als Vorteil angesehen werden. Auch die Hämolyse ist geringer als bei Verwendung von Rattenerythrocyten.

II. *Der Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen auf den Stoffwechsel der isolierten perfundierten Leber normaler Ratten:* Verwendet wurden Konzentrationen von 11.1 mMol/l und 22.2 mMol/l Perfusionsmedium. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 sowie den Abb. 1 und 2 dargestellt. Die Nettoglucoseaufnahme sowie der Zuwachs an Leberglykogen sind bei Verwendung der höheren Glucosekonzentration größer, die Nettoabgabe von anorganischem Phosphat signifikant geringer. In den Versuchen mit der höheren Glucose-

Tabelle 2. Verhalten verschiedener Metabolitkonzentrationen, sowie der Konzentrationen von anorganischem Phosphat, Kalium und freiem Hämoglobin im Perfusionsmedium während 4 Stunden langer Durchströmung ohne Leber ($n = 5$). Die Harnstoffkonzentration wurde nur in 2 Versuchen bestimmt

Untersuchter Parameter	Zeit in Minuten				
	0	60	120	1280	240
Glucose (mMol/l)	10.58 ± 0.77	10.57 ± 0.83	10.43 ± 1.34	10.48 ± 0.92	10.32 ± 1.10
Lactat (mMol/l)	0.570 ± 0.411	0.639 ± 0.242	0.827 ± 0.260	1.008 ± 0.271	1.162 ± 0.381
Pyruvat (mMol/l)	0.036 ± 0.013	0.037 ± 0.023	0.065 ± 0.040	0.080 ± 0.052	0.095 ± 0.070
Lactat/Pyruvat-Quotient	15.8	17.2	12.7	13.5	12.2
unveresterte Fettsäuren (NEFA) (mval/l)	3.30 ± 0.34	3.31 ± 0.25	3.34 ± 0.26	3.35 ± 0.26	3.40 ± 0.27
Gesamtketonkörper (mMol/l)	1.57 ± 0.64	—	1.62 ± 0.57	—	1.47 ± 0.62
α -Amino-N (mg/l)	46 ± 9.7	46 ± 4.3	45 ± 10.2	46 ± 11.0	45 ± 9.9
Harnstoff-N (mMol/l)	0.25	0.27	0.29	0.47	0.32
Anorgan. Phosphat (P_i) (mMol/l)	0.50 ± 0.14	0.54 ± 0.16	0.60 ± 0.18	0.61 ± 0.21	0.64 ± 0.21
Kalium (mval/l)	3.6 ± 0.11	3.5 ± 0.21	3.6 ± 0.18	3.5 ± 0.20	3.6 ± 0.16
Hämoglobin (g/100 ml Plasma)	0.044 ± 0.030	—	—	—	0.295 ± 0.277

Ergebnisse

I. *Vorversuche ohne Leber:* Es wurden zunächst Leerversuche ohne Leber durchgeführt, um den Einfluß des Erythrocytenstoffwechsels auf die verschiedenen Parameter im Medium feststellen zu können. Die Befunde sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Lediglich die Konzentrationen von Lactat, Pyruvat und Hämoglobin zeigen eine signifikante Änderung.

konzentration ist es bereits in der 20 Minuten dauernden Vorperiode zu einer Glykogenanreicherung gekommen, so daß die Ausgangswerte in diesen Versuchen bereits höher liegen als bei Verwendung der niedrigeren Glucosekonzentration. Die Konzentrationen von Lactat und Pyruvat steigen ebenfalls bei Verwendung der höheren Glucosekonzentration stärker an. Der Unterschied ist allerdings noch nicht signifikant. Die Kinetik der NEFA-Aufnahme zeigt dagegen keine

Tabelle 3. Änderungen verschiedener Parameter bei Perfusion isolierter normaler Rattenlebern mit Medien unterschiedlicher Glucosekonzentration (22,2 und 11,1 mMol/l). Für Lactat, Pyruvat und Glykogen werden die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen angegeben. Die Änderungen der übrigen Parameter wurden auf 10 g Feuchtleber und auf die = 0 gesetzten Ausgangskonzentrationen bezogen

Untersuchter Parameter	Glucosekonzentration im Medium (mMol/l)	Zeit in Minuten						
		0	30	60	90	120	150	180
Glucose (mMol/l)	22.2	0	-0.09 ± 0.66	-0.32 ± 0.73	-0.57 ± 0.88	-0.98 ± 1.02	-1.36 ± 0.98	-1.77 ± 1.27
	11.1	0	+0.07 ± 0.56	+0.28 ± 1.40	+0.31 ± 1.51	+0.44 ± 1.39	+0.32 ± 1.51	+0.10 ± 1.26
Lactat (mMol/l)	22.2	0.696 ± 0.160	0.575 ± 0.171	0.593 ± 0.248	0.704 ± 0.335	0.874 ± 0.402	1.060 ± 0.519	1.232 ± 0.534
	11.1	0.730 ± 0.224	0.565 ± 0.123	0.406 ± 0.185	0.366 ± 0.162	0.441 ± 0.232	0.648 ± 0.331	0.932 ± 0.407
Pyruvat (mMol/l)	22.2	0.078 ± 0.019	0.086 ± 0.016	0.091 ± 0.058	0.143 ± 0.053	0.153 ± 0.059	0.186 ± 0.059	0.202 ± 0.069
	11.1	0.065 ± 0.022	0.045 ± 0.009	0.042 ± 0.006	0.053 ± 0.017	0.086 ± 0.034	0.117 ± 0.085	0.146 ± 0.058
Lactat/Pyruvat Quotient	22.2	8.9 ± 3.2	6.7 ± 2.5	6.5 ± 2.7	4.9 ± 2.1	5.7 ± 3.1	5.7 ± 2.0	6.1 ± 2.1
	11.1	11.2 ± 4.0	12.5 ± 4.0	9.7 ± 3.5	6.9 ± 6.1	5.1 ± 1.7	5.5 ± 1.1	6.4 ± 1.6
anorgan. Phosphat (P _i) (mMol/l)	22.2	0	—	+0.23 ± 0.11	—	+0.36 ± 0.14	—	+0.50 ± 0.17
	11.1	0	—	+0.47 ± 0.27	—	+0.68 ± 0.14	—	+0.98 ± 0.29
NEFA (mval/l)	22.2	0	—	-1.88 ± 0.91	—	-2.41 ± 1.34	—	-2.62 ± 1.47
	11.1	0	—	-1.36 ± 0.65	—	-2.54 ± 1.06	—	-2.61 ± 1.06
Glykogen (g/100 g Feuchtleber)	22.2	0.501 ± 0.348	—	0.697 ± 0.531	—	0.706 ± 0.407	—	1.200 ± 0.432
	11.1	0.066 ± 0.039	—	—	—	0.208 ± 0.127	—	0.239 ± 0.170

Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Medium.

III. Der Einfluß der NEFA-Konzentration auf den Stoffwechsel der isolierten Leber normaler Ratten: In den unter II. geschilderten Versuchen sank die NEFA-Konzentration innerhalb von ca. 90 Minuten von Ausgangswerten zwischen 2.5 und 3.5 mval/l auf Werte um 0.25–0.50 mval/l ab. Danach änderte sich die NEFA-Konzentration nur noch wenig. Innerhalb des 3-stündigen Versuches lagen also keine steady state-Bedingungen vor. Aus diesem Grunde prüften wir auch das Stoffwechselverhalten isolierter perfundierter Lebern bei Verwendung eines NEFA-armen Mediums (s. Methodik). In diesen Versuchen lag die NEFA-Anfangskonzentration bei 0.35–0.60 mval/l. Diese Versuche wurden im Unterschied zu den Versuchen mit NEFA-reicherem Medium direkt nach dem Einhängen der Leber in die Perfusionsapparatur begonnen. Die Ergebnisse der Perfusionen mit NEFA-armem Medium sind in Tab. 4 zusammengefaßt. Beim Vergleich der Ergebnisse mit den in Tab. 3 zusammen-

gefaßt ist also zu beachten, daß die Versuche mit NEFA-reicherem Medium erst nach Ablauf einer 20 Minuten dauernden Erholungsphase gestartet wurden.

In den Versuchen mit NEFA-armem Medium ist die Glucosebalance — nach vorübergehendem Anstieg der Glucosekonzentration innerhalb der ersten Minuten — in Richtung auf eine stärkere Nettoglucoseaufnahme verschoben. Die Nettoaufnahme von Lactat und Pyruvat in der ersten Versuchshälfte ist geringer, der Anstieg der Lactat- und Pyruvatkonzentrationen in der 2. Versuchshälfte stärker als in den Versuchen mit NEFA-reichem Medium — insbesondere, wenn man den späteren Beginn der Versuche mit NEFA-reichem Medium in Rechnung setzt. Der Glykogenzuwachs ist bei Verwendung des NEFA-armen Mediums im Mittel etwas, aber nicht signifikant geringer (s. Tab. 4).

IV. Der Stoffwechsel isolierter perfundierter Lebern alloxandiabetischer ketotischer Ratten: Durch den Entzug des Insulins trat bei allen Tieren eine mehr oder weniger ausgeprägte Ketose auf. Die Gesamtketonkörperkonzentration im Blut betrug im Mittel 9.6 mMol/l.

Abb. 1. Änderungen der Glucosekonzentration im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen Ratten. I = Glucoseausgangskonzentration im Medium 22.2 mMol/l. II = Glucoseausgangskonzentration im Medium 11.1 mMol/l. III = Leerversuch, Perfusion ohne Leber, Glucoseausgangskonzentration 11.1 mMol/l. Die Konzentrationsänderungen bei I und II sind auf 10 g Leber und in allen Versuchen (I, II, III) auf die = 0 gesetzten Ausgangskonzentrationen bezogen

Abb. 2. Änderungen der Konzentration von anorganischem Phosphat (P_i) im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen Ratten. I = Glucoseausgangskonzentration im Medium 22.2 mMol/l. II = Glucoseausgangskonzentration im Medium 11.1 mMol/l. III = Leerversuch, Perfusion ohne Leber, Glucoseausgangskonzentration 22.2 mMol/l. Die Konzentrationsänderungen sind bei I und II auf 10 g Leber und in allen Versuchen (I, II, III) auf die = 0 gesetzten Ausgangskonzentrationen bezogen

Die Ergebnisse sind in den Tab. 4 bis 15 sowie den Abb. 3 und 4 zusammengefaßt.

Die *Nettoglucoseabgabe* der diabetischen Lebern ist im Mittel im Vergleich zu den Kontrollexperimenten verstärkt. Wegen der starken Streuung der Einzelergebnisse ist der Unterschied jedoch nicht signifikant (s. Tab. 5).

Die *Lactatkonzentrationen* sind zu Versuchsbeginn signifikant höher, die *Pyruvatkonzentrationen* signifikant niedriger als in den Kontrollen (s. Tab. 6 u. 7). Dafür steigen die Konzentrationen beider Metabolite in den Experimenten mit diabetischen Lebern in der zweiten Versuchshälfte signifikant langsamer an.

Der *Lactat/Pyruvat-Quotient* (L/P-Q) im Medium ist in den Experimenten mit diabetischen Lebern zu Versuchsbeginn signifikant erhöht. Bis zur 3. Versuchsstunde ist der Quotient aber so weit abgefallen, daß er in etwa die Kontrollwerte erreicht (s. Tab. 8). Die Kinetik der *NEFA-Aufnahme* ergibt keinen Unterschied zwischen Lebern von normalen und von diabetischen Ratten (s. Abb. 3). Die absolute Aufnahme

während des dreistündigen Versuches war jedoch in den Experimenten mit diabetischen Lebern etwas größer (s. Tab. 9). Dies lag aber lediglich daran, daß in den Experimenten mit diabetischen Lebern der NEFA-Gehalt des verwendeten Albumins höher war als in den Kontrollexperimenten. Der höheren NEFA-Aufnahme entsprechend steigt der *Ketonkörperspiegel* im Medium in den Experimenten mit diabetischen Lebern auf höhere Werte an (s. Tab. 10). Weder die Steilheit des Anstiegs, noch die Steilheit des im letzten Versuchsteil nachweisbaren Konzentrationsabfalls zeigen dagegen einen Unterschied, so daß der in den Experimenten mit diabetischen Lebern länger anhaltende Anstieg der *Nettoketonkörperabgabe* lediglich als Folge der höheren NEFA-Aufnahme anzusehen ist.

Die α -Amino-N-Bilanz der isolierten perfundierten Leber ist sowohl in den Kontrollexperimenten als auch in den Versuchen mit diabetischen Lebern negativ, d.h. es ist eine kontinuierliche Nettoabgabe von α -Aminosäuren aus der Leber nachzuweisen. Signifikante Unterschiede zwischen normalen und diabetischen Lebern ergeben sich nicht (s. Tab. 11). Demgegenüber ist die *Nettoharnstoffabgabe* der diabetischen Lebern signifikant größer als diejenige der normalen Lebern (s. Tab. 12).

Diabetische und normale Lebern weisen auch eine Nettoabgabe von *anorganischem Phosphat* und *Kalium* auf. Während jedoch die *Nettophosphatabgabe* der diabetischen Leber nur gering und nicht signifikant höher ist als diejenige normaler Lebern, ist die *Nettoabgabe von Kalium* durch diabetische Lebern signifikant verstärkt (s. Tab. 13 u. 14).

Abb. 3. Änderungen der Konzentration der unveresterten Fettsäuren (NEFA) im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und alloxandiabetischen Ratten. Die Änderungen sind auf 10 g Leber bezogen. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert aus 6 bis 8 Einzelversuchen

Tabelle 4. Verhalten verschiedener Parameter bei Perfusion isolierter Lebern von normalen (N) und alloxandiabetischen, ketotischen (D) Ratten mit einem NEFA-armen Medium. Die Änderungen der Glucosekonzentrationen wurden auf 10 g Leber und die = 0 gesetzten Ausgangskonzentrationen bezogen. Angegeben werden die Mittelwerte mit Standardabweichungen, n = Anzahl der Versuche

Untersuchter Parameter		Zeit in Minuten						n
		0	30	60	100	140	180	
Glucose (mMol/l)	N	0	+0.88 ±0.91	+0.47 ±1.05	-0.04 ±1.11	-0.78 ±1.66	-0.79 ±1.53	8
	D	0	+0.71 ±0.72	+0.69 ±0.85	+0.67 ±1.32	+0.12 ±1.92	+0.18 ±1.61	11
Lactat (mMol/l)	N	0.686 ±0.214	0.493 ±0.256	0.503 ±0.304	0.782 ±0.281	0.984 ±0.504	1.027 ±0.593	6
	D	0.990 ±0.599	0.597 ±0.375	0.501 ±0.218	0.420 ±0.245	0.513 ±0.285	0.624 ±0.174	10
Pyruvat (mMol/l)	N	0.052 ±0.025	0.042 ±0.016	0.078 ±0.040	0.099 ±0.048	0.129 ±0.041	0.155 ±0.049	6
	D	0.043 ±0.025	0.033 ±0.017	0.042 ±0.099	0.060 ±0.055	0.068 ±0.029	0.093 ±0.056	10
Lactat/Pyruvat Quotient	N	13.2 ±4.0	11.7 ±9.5	6.5 ±2.9	7.9 ±2.6	7.6 ±4.6	6.6 ±3.0	6
	D	23.0 ±10.2	18.0 ±15.3	11.9 ±10.1	7.0 ±5.3	7.5 ±9.3	6.7 ±11.0	10
Glykogen (g/100 g Feucht-leber)	N	0.071 ±0.051					0.178 ±0.106	5
	D	0.434 ±0.417					1.004 ±0.577	8
Leber-durch-fluß (ml/10 g Leber/min)	N	22.1 ±9.0	33.3 ±14.3	38.7 ±14.8	36.2 ±14.6	35.2 ±14.2	32.2 ±12.7	5
	D	21.7 ±5.4	25.3 ±7.4	29.5 ±11.6	30.0 ±11.4	30.5 ±12.4	29.6 ±13.2	10

Tabelle 5. Änderungen der Glucosekonzentration im Medium in mMol/l bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten (die Änderungen sind auf die Ausgangskonzentrationen bei $t = 0$ und auf 10 g Leber bezogen)

Glucose		Zeit in Minuten						n
		0	30	60	90	120	150	
Normal	0	+0.07 ±0.56	+0.28 ±1.40	+0.31 ±1.51	+0.44 ±1.39	+0.32 ±1.51	+0.10 ±1.26	8
	0	+0.27 ±0.69	+0.46 ±0.81	+0.74 ±1.64	+0.63 ±2.39	+1.15 ±2.50	+1.10 ±3.60	5
p-Wert							>0.10	

Tabelle 6. Verhalten der Konzentration von Lactat im Medium in mMol/l bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten

Lactat		Zeit in Minuten						n
		0	30	60	90	120	150	
Normal		0.730 ±0.224	0.565 ±0.123	0.406 ±0.185	0.366 ±0.162	0.441 ±0.232	0.648 ±0.331	8
		1.330 ±0.690	0.950 ±0.450	0.650 ±0.185	0.330 ±0.082	0.260 ±0.118	0.270 ±0.114	5
p-Wert		<0.05					<0.01	

Tabelle 7. Verhalten der Konzentration von Pyruvat in mMol/l im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten

Pyruvat	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal	0.065 ± 0.022	0.045 ± 0.009	0.042 ± 0.006	0.053 ± 0.017	0.086 ± 0.034	0.117 ± 0.085	0.146 ± 0.058	8
Diabetisch	0.047 ± 0.011	0.036 ± 0.006	0.040 ± 0.015	0.029 ± 0.011	0.029 ± 0.012	0.049 ± 0.017	0.077 ± 0.042	5
p-Wert	<0.01			<0.005		<0.0025		

Tabelle 8. Verhalten des Lactat/Pyruvat-Quotienten (L/P-Q) im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten

L/P-Q	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal	11.2 ± 4.0	12.5 ± 4.0	9.7 ± 3.5	6.9 ± 6.1	5.1 ± 1.7	5.5 ± 1.1	6.4 ± 1.6	8
Diabetisch	28.2 ± 11.6	26.4 ± 13.5	16.3 ± 7.6	11.4 ± 3.4	9.0 ± 4.4	5.5 ± 2.8	5.6 ± 1.7	5
p-Wert	<0.01		<0.01		>0.10			>0.25

Tabelle 9. Änderungen der Konzentration unveresterter Fettsäuren (NEFA) im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten. (Die Änderungen sind bezogen auf die Ausgangskonzentrationen bei t = 0 und auf 10 g Leber)

NEFA (mval/l)	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal	0	-1.36 ± 0.65	-2.25 ± 0.80	-2.39 ± 0.86	-2.54 ± 1.06	-2.58 ± 1.01	-2.61 ± 1.06	8
Diabetisch	0	-1.71 ± 0.30	-2.71 ± 0.45	-3.00 ± 0.56	-3.25 ± 0.56	-3.21 ± 0.59	-3.27 ± 0.57	5
p-Wert							>0.05	

Tabelle 10. Änderungen der Konzentration der Gesamtketonkörper im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten. (Die Änderungen sind bezogen auf die Ausgangskonzentrationen bei t = 0 und auf 10 g Leber)

Gesamt-Keton-Körper (mMol/l)	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal	0	+2.90 ± 0.057	+4.65 ± 0.91	+4.75 ± 0.48	+4.16 ± 0.87	+3.65 ± 0.90	+3.25 ± 0.82	8
Diabetisch	0	+2.63 ± 1.05	+5.06 ± 1.17	+5.45 ± 0.98	+5.61 ± 1.31	+5.01 ± 1.29	+4.35 ± 1.38	5
p-Wert				<0.05		<0.005		<0.01

Tabelle 11. Änderungen der Konzentration des α -Amino-N in mg/l im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten. (Die Änderungen sind bezogen auf die Ausgangskonzentrationen bei t = 0 und auf 10 g Leber)

α -Amino-N	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal	0	+4.1 ± 2.7	+6.8 ± 3.2	+13.5 ± 3.4	+15.7 ± 3.1	+20.2 ± 6.0	+26.3 ± 5.8	8
Diabetisch	0	+2.2 ± 1.9	+7.7 ± 2.9	+9.6 ± 2.8	+16.6 ± 5.0	+23.6 ± 6.3	+32.5 ± 4.8	5
p-Wert							>0.05	

Das Verhalten des *Leberglykogengehaltes* weist von Versuch zu Versuch mehr oder weniger starke Schwankungen auf. Trotzdem ist ersichtlich, daß die diabetischen Lebern nicht nur einen signifikant höheren Ausgangsglykogengehalt, sondern auch einen stärkeren Glykogenzuwachs während des Versuches aufweisen (s. Abb. 4).

Abb. 4. Änderungen des Glykogengehaltes in isolierten perfundierten Lebern normaler und alloxandiabetischer Ratten bei Verwendung von Perfusionsmedien mit unterschiedlichem Gehalt an unveresterten Fettsäuren (NEFA) (Einzelheiten s. Methodik)

Der *Gallefluß* der diabetischen Lebern war etwas, aber nicht signifikant niedriger als in den Kontroll-experimenten (Kontrollen: 1.60 ± 0.73 ml/3 Std/10 g Leber, diabetische Lebern: 1.20 ± 0.30 ml/3 Std/10 g Leber).

Der *Blutdurchfluß* durch die isolierte perfundierte Leber war in Experimenten mit diabetischen und normalen Lebern nicht signifikant verschieden (s. Tab. 15).

Bei Perfusion isolierter diabetischer Lebern mit *NEFA-armem Medium* ergaben sich gegenüber den oben beschriebenen Ergebnissen keine wesentlichen Abweichungen (s. Tab. 4): Auch in diesen Versuchen ist die Nettoglucoseabgabe der diabetischen Lebern größer, wenn auch wiederum nicht signifikant wegen der großen Unterschiede in den einzelnen Versuchen. Die Veränderungen der Konzentrationen von Lactat und Pyruvat, wie auch des Lactat/Pyruvat-Quotienten verhalten sich wie in den oben angeführten Experimenten mit NEFA-reichem Medium. Das gleiche gilt für die Veränderungen des Leberglykogengehaltes. Der Unterschied zwischen normalen und diabetischen Lebern ist in diesen Versuchen sogar noch stärker ausgeprägt (s. Abb. 4).

Der Leberdurchfluß weist wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen normalen und diabetischen Lebern auf (s. Tab. 4). Die Galleproduktion der diabetischen Lebern im Verlauf der 3-stündigen Perfusion ist mit 1.41 ± 0.47 ml/10 g Leber nicht signifikant von derjenigen normaler Lebern (1.27 ± 0.46 ml/10 g Leber) unterschieden.

Diskussion

Der Eigenstoffwechsel der verwendeten Rinder-erythrocyten ist nach den durchgeführten Vorversuchen nicht sehr aktiv. Die bei der Leberperfusion festgestellten Metabolitverschiebungen im Medium können also im wesentlichen auf Änderungen des Leberstoffwechsels bezogen werden.

Die Untersuchung normaler Lebern mit verschiedenen Glucosekonzentrationen zeigt, daß Nettoglucoseaufnahme und Glykogenbildung mit steigender Glucosekonzentration im Portalvenenblut zunehmen. Der verstärkten Glucoseutilisation entspricht eine signifikante Verminderung der Nettoabgabe von anorganischem Phosphat (s. Abb. 2). Die von SOSKIN et al. [38] zuerst beschriebene und später von SEARLE und CHAIKOFF [32] bestätigte „homöostatische“ Blutzuckerregulation, d.h. die Abhängigkeit der hepatischen Glucoseaufnahme von der Glucosekonzentration im einströmenden Blut, läßt sich also auch am isolierten Organ nachweisen. Der Befund erklärt sich aus der relativ geringen Affinität der Glucose zur Glucokinase ($K_M = 1.3 - 1.5 \cdot 10^{-2}$ M/l) [28; 28a]. Die verwendete Konzentration von 11.1 mMol/l liegt also im Bereich der Halbsättigung des Enzyms. Eine Aktivitätssteigerung der Glucokinase-Reaktion durch Erhöhung der Glucosekonzentration ist also ohne weiteres verständlich.

Das Verhalten der Metabolitkonzentrationen läßt 2 Phasen im Verlauf der 3-stündigen Versuche erkennen (s. Abb. 5), die besonders bei Verwendung der niedrigeren Glucosekonzentration (11.1 mMol/l) deutlich werden: In der ersten Versuchshälfte steigt die Glucosekonzentration im Mittel etwas an, während die Konzentrationen von Lactat und Pyruvat abfallen

Abb. 5. Synoptische Darstellung der Konzentrationsänderungen einiger Metabolite bei Perfusion isolierter Lebern von normalen Ratten

Tabelle 12. Änderungen der Konzentration des Harnstoff-N in mMol/l im Medium bei Perfusion isolierter Leber von normalen und diabetischen Ratten. (Die Änderungen sind bezogen auf die Ausgangskonzentrationen bei $t = 0$ und auf 10 g Leber)

Harnstoff-N	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal	0	+0.35 ±0.16	+0.86 ±0.48	+1.15 ±0.39	+1.85 ±0.30	+2.33 ±0.80	+2.62 ±0.52	8
Diabetisch	0	+0.96 ±0.58	+1.61 ±0.97	+2.53 ±1.20	+3.47 ±1.32	+4.06 ±1.48	+5.07 ±1.51	5
p-Wert							<0.005	

Tabelle 13. Änderungen der Konzentration an anorganischem Phosphat (P_i) in mMol/l im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten. (Die Änderungen sind bezogen auf die Ausgangskonzentrationen bei $t = 0$ und auf 10 g Leber)

P_i	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal	0	+0.32 ±0.11	+0.47 ±0.27	—	+0.68 ±0.14	—	+0.98 ±0.29	8
Diabetisch	0	+0.30 ±0.05	+0.62 ±0.10	—	+0.80 ±0.22	—	+1.18 ±0.28	5
p-Wert							>0.10	

Tabelle 14. Änderungen der Konzentrationen an Kalium in mval/l im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten. (Die Änderungen sind bezogen auf die Ausgangskonzentrationen bei $t = 0$ und auf 10 g Leber)

Kalium	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal	0	+0.13 ±0.32	+0.66 ±0.60	+1.35 ±0.64	+1.86 ±0.73	+2.33 ±0.74	+2.59 ±1.03	8
Diabetisch	0	+0.52 ±0.25	+0.90 ±0.35	+2.24 ±0.81	+2.90 ±0.65	+3.31 ±0.77	+3.60 ±0.80	5
p-Wert				<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	

Tabelle 15. Leberdurchfluß in ml/10 g Leber/min bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten

Leberdurchfluß	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal	21.0 ±3.3	24.6 ±6.4	27.6 ±6.9	28.1 ±7.0	27.5 ±7.7	24.1 ±4.8	23.6 ±3.5	8
Diabetisch	23.0 ±7.0	28.1 ±11.0	30.2 ±10.0	31.0 ±9.1	30.9 ±9.2	31.0 ±9.0	29.1 ±11.2	5
p-Wert				>0.25			>0.10	

oder unverändert bleiben. Gleichzeitig findet eine deutliche Aufnahme nichtveresterter Fettsäuren und eine Nettoabgabe von Ketonkörpern statt. Der Leberglykogenzuwachs ist in der ersten Versuchshälfte stärker als in der zweiten. Demgegenüber lassen die Konzentrationsänderungen von Harnstoff, α -Amino-N, Kalium und anorganischem Phosphat keine Änderungen in den zwei Versuchshälften erkennen.

In der ersten Versuchshälfte herrscht offenbar eine stärkere Gluconeogenese vor als in der zweiten: Die Nettoglucoseabgabe ist deutlicher bei gleichzeitigem Anstieg des Leberglykogengehaltes. Während dieser Zeit werden C_3 -Bruchstücke (Lactat, Pyruvat) aufgenommen und — offenbar für die Neubildung von Glucose verwendet. Die verstärkte Gluconeogenese ist wahrscheinlich Folge der in der ersten Versuchshälfte

gesteigerten Fettsäureoxydation. Durch die hieraus resultierende Erhöhung der stationären Acetyl-CoA-Konzentration [48] kommt es zu einer Aktivierung der Pyruvatcarboxylase-Reaktion [41a] und damit zu einer beschleunigten Glucoseresynthese aus Pyruvat. Hierfür spricht, daß wir eine deutliche Nettoaufnahme von C_3 -Bruchstücken durch isolierte perfundierte Lebern nach Zugabe einer rasch oxydierbaren Fettsäure (Na-Capronat) beobachten konnten [37]. Eine Stimulierung der Gluconeogenese durch Fettsäuren ist inzwischen auch von STRUCK, ASHMORE und WIELAND [40a] beschrieben worden. — In den Versuchen mit NEFA-armem Medium sind die 2 Phasen weniger deutlich ausgeprägt, d.h. die Nettoaufnahme von Lactat und Pyruvat sowie der Glykogenzuwachs sind geringer. Die Glucosebilanz ist mehr im Sinne einer Nettoaufnahme verschoben. Der geringeren Aufnahme unveresterter Fettsäuren in den Versuchen mit NEFA-armem Medium entspricht also eine weniger ausgeprägte gluconeogenetische Phase, was der Vorstellung vom Zusammenhang zwischen Fettsäureoxydation und Glucoseresyntheserate entspricht.

In den Versuchen mit diabetischen Lebern sind die Zeichen der Gluconeogenese besonders deutlich ausgeprägt: Der Ausgangsglykogengehalt ist signifikant höher, der Glykogenzuwachs während der Perfusion signifikant stärker. Die Glucosenettoabgabe ist im Mittel größer, die Nettoaufnahme von C_3 -Kohlenhydraten (Lactat, Pyruvat) verstärkt und länger anhaltend. Gleichzeitig ist die Nettoharnstoffabgabe signifikant gesteigert, was den Angaben von HAFT und MILLER [12] entspricht. Die Steigerung der Gluconeogenese in der isolierten perfundierten diabetischen Leber dürfte das Resultat einer in der diabetischen Vorperiode aufgetretenen Steigerung der gluconeogenetischen Enzymaktivitäten [1, 2, 6, 9, 10, 20, 26, 32, 38, 40, 42, 43] sein. Diese durch gesteigerte de novo-Enzymsynthese eingetretene Veränderung in der diabetischen Leber bleibt auch in vitro bzw. bei isolierter Perfusion bestehen.

Unsere Untersuchungen ergeben dagegen keinen Hinweis darauf, daß die Steigerung der Ketonkörperbildung in der diabetischen Leber Folge eines Insulinmangels in der Leber ist. Vielmehr hängt das Ausmaß der Ketonkörperbildung ausschließlich von der Menge der angebotenen unveresterten Fettsäuren ab. Damit stimmt überein, daß die nach intraportaler Na-Capronat-Infusion an der isolierten perfundierten Rattenleber nachweisbare Steigerung der Ketonkörperbildung bei Verwendung diabetischer Lebern nicht stärker war als bei Perfusion normaler Lebern [37]. Unsere Befunde decken sich mit Untersuchungen von SCOW und CHERNICK [31], die ebenfalls keine verstärkte Ketonkörperbildung durch isolierte perfundierte Lebern total pankreatektomierter Ratten feststellen konnten. — Demgegenüber fanden LOSSOW et al. [21] eine deutliche Beschleunigung der ^{14}C -Bilddung durch diabetische Rattenlebern nach Gabe von $1-^{14}C$ -Palmitat. JONES und BLECHER [18] stellten auch

eine beschleunigte $1-^{14}C$ -Palmitat-Oxydation durch Mitochondrien aus diabetischen Rattenlebern fest. Da LOSSOW et al. keinen Unterschied zwischen diabetischen und normalen Lebern hinsichtlich der Oxydation von ^{14}C -Caprylat feststellen konnten, vermuten diese Autoren, daß die von ihnen gefundene gesteigerte Oxydation von ^{14}C -Palmitat Folge einer verminderten Veresterung langkettiger Fettsäuren sein könnte, d.h. letztlich Folge der verminderten Glucoseutilisation. WIELAND [45] konnte in der Tat durch Gabe von Glycerin die Ketonkörperbildung isolierter perfundierter Lebern verringern. Andererseits sahen wir keine Verminderung der Ketonkörperbildung durch isolierte perfundierte Lebern, wenn das Medium äquimolare Mengen von Fructose anstelle von Glucose enthielt (SÖLING [35]). Von CHERNICK und SCOW [4] konnte außerdem keine verzögerte Bildung von α -Glycerophosphat in der diabetischen Leber festgestellt werden. — Insgesamt bestätigen unsere Befunde die Richtigkeit der Ansicht, daß die im Diabetes nachweisbare gesteigerte Ketogenese in erster Linie Folge des gesteigerten NEFA-Angebotes an die Leber ist. Die gesteigerte Ketogenese wäre damit Ausdruck eines Insulinmangels im Fettgewebe und nicht in der Leber. Unsere in vitro-Untersuchungen schließen allerdings eventuelle in vivo-Beeinflussungen der hepatischen Fettsäureoxydation durch Hypophysenvorderlappenhormone oder andere humorale Faktoren nicht aus.

Die Erhöhung des Lactat/Pyruvat-Quotienten im Medium zu Versuchsbeginn bei Perfusion diabetischer Lebern entspricht der unter in vivo-Bedingungen nachweisbaren Erhöhung dieses Quotienten in der diabetischen Leber (HOHORST et al. [15, 16], WIELAND und EGER-NEUFELD [46], SÖLING et al. [37]). Dagegen spricht das Verhalten des L/P-Q im weiteren Verlauf der Perfusion gegen die von WIELAND [46, 47] geäußerte Vermutung, daß die Erhöhung des L/P-Q Folge der verstärkten NEFA-Oxydation sei: In der ersten Versuchshälfte fällt der L/P-Q in Experimenten mit normalen und diabetischen Lebern kontinuierlich ab, obwohl in dieser Phase die Fettsäureoxydation besonders ausgeprägt ist — kenntlich am Anstieg der Ketonkörperkonzentration im Medium. Das genannte Problem ist an anderer Stelle ausführlich erörtert worden [37]. Trotz einer gesteigerten Nettoglykogenbildung ist die Nettokaliumabgabe diabetischer Lebern gesteigert. Die vermehrte Kaliumabgabe dürfte also in erster Linie Folge eines im Diabetes gestörten Membrantransportmechanismus sein. Weitere Aussagen sind ohne zusätzliche Untersuchungen nicht möglich.

Literatur

- [1] ASHMORE, J., A.B. HASTINGS and F.B. NESBETT: The effect of diabetes and fasting on liver glucose-6-phosphatase. *Proc. nat. Acad. Sci.* **40**, 673 (1954).
- [2] — S.R. WAGLE and T. UETE: Studies on gluconeogenesis. *Advanc. Enzyme Regulation* **2**, 101 (1964).
- [3] BRAUER, R.W., R.L. PESSOTTI and P. PIZZOLATO: Isolated rat liver preparation. Bile production and

- other basic properties. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **78**, 174 (1951).
- [4] CHERNICK, S.S., and R.O. SCOW: Synthesis in vitro of glyceride-glycerol by the liver of normal and pancreatectomized rats. *J. biol. Chem.* **239**, 2416 (1964).
 - [5] DOLE, V.P., and H. MEINERTZ: Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J. biol. Chem.* **235**, 2595 (1960).
 - [6] DOLKART, R.E., E.E. TOROK and P.H. WRIGHT: Hepatic enzyme activities in rats made diabetic with alloxan and with guinea pig anti-insulin serum. *Diabetes* **13**, 78 (1964).
 - [7] DRABKIN, D.L., and J.H. AUSTIN: Standard methods of clinical chemistry. Academic Press, New York (N.Y.) 1958.
 - [8] FAWCETT, J.K., and J.E. SCOTT: A rapid and precise method for the determination of urea. *J. clin. Path.* **13**, 156 (1960).
 - [9] FITCH, W.M., and I.L. CHAIKOFF: Directions and patterns of adaption induced in liver enzymes of the diabetic rat by the feeding of glucose and fructose. *Biochim. biophys. Acta* **57**, 588 (1962).
 - [10] FREEDMAN, A.D., and L. KOHN: Pyruvate metabolism and control: Factors affecting pyruvic carboxylase activity. *Science* **145**, 58 (1964).
 - [11] GREENBERG, L.A., and D. LESTER: A micromethod for the determination of acetone and ketone bodies. *J. biol. Chem.* **154**, 177 (1945).
 - [12] HAFT D. E., and L. L. MILLER: Alloxan diabetes and demonstrated direct action of insulin on metabolism of isolated perfused rat liver. *Amer. J. Physiol.* **192**, 33 (1958).
 - [13] HANSEN, O.: A specific, sensitive and rapid micro-method for determination of ketone bodies in blood. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* **11**, 259 (1960).
 - [14] HOHORST, H.J.: Enzymatische Bestimmung von L(+)-Milchsäure. *Biochem. Z.* **328**, 509 (1957).
 - [15] — F.H. KREUTZ and M. REIN: The oxidation/reduction state of the extramitochondrial DPN/DPNH system in rat liver and the hormonal control of substrate levels *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **4**, 163 (1961).
 - [16] — D. STRATMANN und H. BARTELS: Über die Wirkung von Insulin auf den Reduktionszustand des DPN-Systems und die Phosphorylierung der Adeninnucleotide in der Leber. *Klin. Wschr.* **42**, 245 (1964).
 - [17] HUSTON, C.J.W., L.C. ADAMS, R.A. FIELD and W.V. McDERMOTT jr.: Effect of insulin on glucose uptake by the isolated perfused canine liver. *Lancet* **1962 I**, 357.
 - [18] JONES, J.A., and M. BLECHER: On the mechanism of β -oxidation of long chain fatty acids by liver mitochondria from normal and alloxan-diabetic rats. *J. biol. Chem.* **240**, 68 (1965).
 - [19] KUBOWITZ, F., and O. OTT: Isolierung und Kristallisation eines Gärungsfermentes aus Tumoren. *Biochem. Z.* **314**, 94 (1943).
 - [20] LANGDON, R.G., and D.R. WEAKLEY: The influence of hormonal factors and of diet upon hepatic glucose-6-phosphatase activity. *J. biol. Chem.* **214**, 167 (1955).
 - [21] LOSSOW, W.J., G.W. BROWN, jr., and I.L. CHAIKOFF: The action of insulin in sparing fatty acid oxidation: A study with palmitic acid-1-C¹⁴ and octanoate-1-C¹⁴. *J. biol. Chem.* **220**, 839 (1956).
 - [22] LUNDSGAARD, E., N.A. NIELSON and S.L. ORSKOV: Carbohydrate metabolism of the isolated cat liver. *Skand. Arch. Physiol.* **73**, 296 (1936).
 - [23] MILLER, L.L., C.G. BLY, M.L. WATSON and F.W. BALE: The dominant role of the liver in plasma protein synthesis. *J. exp. Med.* **94**, 431 (1951).
 - [24] MORTIMORE, G.E.: Effect of insulin on release of glucose and urea by the isolated perfused rat liver. *Amer. J. Physiol.* **204**, 699 (1963).
 - [25] OSTASHEVER, A.S., I. GRAY and S. GRAFF: Metabolic characteristics of the isolated perfused rat liver. *Amer. J. Physiol.* **199**, 395 (1960).
 - [26] PATRICK, S.J., and J.A. TULLOCH: Liver glutamic-aspartic transaminase activity in diabetes. *Lancet* **1959 I**, 757.
 - [27] PENHOS, J.S., and M.E. KRAHL: Stimulus of leucine incorporation into perfused liver protein by insulin. *Amer. J. Physiol.* **204**, 140 (1963).
 - [28] SALAS, J., M. SALAS, E. VIÑUELA and A. SOLS: Glucokinase of rabbit liver. Purification and properties. *J. biol. Chem.* **240**, 1014 (1965).
 - [28a] SALAS, M., E. VIÑUELA and A. SOLS: Insulin-dependent synthesis of liver glucokinase in the rat. *J. biol. Chem.* **238**, 3535 (1963).
 - [29] SCHIMASSEK, H.: Metabolik des Kohlenhydratstoffwechsels der isoliert perfundierten Rattenleber. *Biochem. Z.* **336**, 460 (1963).
 - [30] SCHMIDT, F.H.: Die enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose nebeneinander. *Klin. Wschr.* **39**, 1244 (1961).
 - [31] SCOW, R.O., and S.S. CHERNICK: Hormonal control of protein and fat metabolism in the pancreatectomized rat. *Recent Progr. Hormone Res.* **16**, 497 (1960).
 - [32] SEARLE, G.L., and I.L. CHAIKOFF: Inhibitory action of hyperglycemia on delivery of glucose to the blood stream by liver of the normal dog. *Amer. J. Physiol.* **170**, 456 (1952).
 - [33] SEITZER, S., S. DAYTON, B. NOVIC and E. MUNTWYLER: The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Arch. Biochem.* **25**, 191 (1950).
 - [34] SHRAGO, E., H.A. LARDY, R.C. NORDLIE and D.O. FORSTER: Metabolic and hormonal control of phosphoenolpyruvate carboxykinase and malic enzyme in rat liver. *J. biol. Chem.* **238**, 3188 (1963).
 - [35] SÖLING, H.D.: Der Stoffwechsel der alloxandiabetischen Rattenleber und seine Beeinflussung durch Insulin und orale Antidiabetica; gleichzeitig ein Beitrag zum Problem der Entstehung der diabetischen Ketose. Habilitationsschrift, Univ. Göttingen 1965.
 - [36] — Wirkungsmechanismus des Insulins: Die Insulinwirkung auf das Lebergewebe, in „Diabetes mellitus, Pathophysiologie und Klinik“ (im Druck).
 - [37] — R. KATTERMANN, H. SCHMIDT and P. KNEER: The redox-state of NAD⁺/NADH-systems in rat liver during ketosis and the so-called „Triosephosphate-Block“. *Biochim. biophys. Acta* **115**, 1 (1966).
 - [38] SOSKIN, S., H. E. ESSEX, J. F. HERRICK and F. C. MANN: The mechanism of regulation of blood sugar by the liver. *Amer. J. Physiol.* **124**, 558 (1938).
 - [39] STEGEMANN, H.: Bestimmung von Aminosäuren mit dithionit-reduziertem Ninhydrin. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **319**, 102 (1960).
 - [40] STRUCK, E., S. GEYER und O. WIELAND: Zur Bedeutung der Pyruvatecarboxylase als Schrittmacher der Gluconeogenese. Vortrag auf der 1. Tagung der Europ. Ges. f. Diabetologie, Montecatini Terme, 1965.
 - [40a] — J. ASHMORE und O. WIELAND: Stimulierung der Gluconeogenese durch langkettige Fettsäuren und Glucagon. *Biochem. Z.* **343**, 107 (1965).
 - [41] THEORELL, T.: Spektrophotometrische Mikrobestimmung des Phosphors. *Biochem. Z.* **230**, 1 (1931).
 - [41a] UTTER, M.F., D.B. KEECH and M.C. SCRUTTON: A possible role for acetyl-CoA in the control of gluconeogenesis. *Advanc. Enzyme Regulation* **2**, 49 (1964).
 - [42] WAGLE, S.R., and J. ASHMORE: Studies on experimental diabetes, III. Effects of acute insulin-

- insufficiency on ^{14}C -glucose formation from labelled substrates. *J. biol. Chem.* **239**, 1289 (1964).
- [43] WEBER, G., R.L. SINGHAL and S.K. SRISTAVA: Enzyme synthesis and RNA metabolism under influence of diabetes and insulin. Vortrag auf dem 5. Kongreß der International Diabetes Federation, Toronto 1964.
- [44] — — — Insulin: Suppressor of biosynthesis of hepatic gluconeogenetic enzymes. *Proc. nat. Acad. Sci.* **53**, 96 (1965).
- [45] WIELAND, O.: Diabetic Acidosis: Biochemical Aspects, in: *On the Nature and Treatment of Diabetes*. 5. Congr. Internat. Diabetes Feder., Excerpta Medica, Internat. Congr. Series **84**, 553 (1965).
- [45a] in: 4^e Congrès de la Fédération Internationale du Diabète, Vol. I, 137. Editions Médecine et Hygiène Genève 1961.
- [46] —, und I. EGER-NEUFELDT: Zur Hemmung der Lipidsynthese der Leber beim Diabetes. *Biochem. Z.* **337**, 349 (1963).
- [47] —, und G. LÖFFLER: Über den Mechanismus der gesteigerten Ketonkörperbildung. I. Redoxstatus des Leber-DPN unter Ketosebedingungen in vivo. *Biochem. Z.* **339**, 204 (1963).
- [48] —, and L. WEISS: Increase in liver acetyl-CoA during ketosis *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**, 333 (1963).

Priv.-Doz. Dr. HANS-DIETER SÖLING
Medizinische Universitätsklinik
34 Göttingen