Insulinsekretion in vitro.

II. Hemmung der glucoseinduzierten Insulinabgabe durch Diazoxide* **

H. FRERICH, R. GERBER und W. CREUTZFELDT

Medizinische Universitätsklinik, Göttingen

Eingegangen am 16. September 1966

Insulin Secretion in vitro. II. Inhibition of Glucose Induced Insulin Release by Diazoxide.

Summary. The nondiuretic, hyperglycemia-producing thiazide derivative Diazoxide, inhibits the glucose-stimulated insulin release from the isolated pancreas of the rat, the rabbit, and the miniature pig *in vitro*. Tolbutamide prevents the inhibitory Diazoxide effect. The lowest concentrations of Diazoxide (5 $\mu\text{g/ml}$) necessary for the inhibition of insulin release are in the same range as therapeutic doses. Five thiazide preparations, commonly used as diuretics and known for their possible so-called diabetogenic side effect, did not have any influence on the insulin release from the isolated rabbit pancreas. The results of our experiments indicate an inhibition of insulin secretion as an important etiological factor in the mechanism of Diazoxide-hyperglycemia. They do not corroborate those observations that show the inhibition of insulin secretion to be induced by a Diazoxide-mediated epinephrine release.

Sécrétion d'insuline in vitro. II. Inhibition par le diazoxide de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose.

Résumé. Le diazoxide, dérivé des thiazides et sans effet diurétique, dont l'action hyperglycémisante est connue depuis longtemps, empêche la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose, du pancréas isolé du rat, du lapin et du cochon-nain *in vitro*. La concentration la plus faible nécessaire pour l'inhibition de la sécrétion d'insuline correspond aux doses thérapeutiques. Le tolbutamide

abolit l'inhibition par le diazoxide. 5 préparations de thiazides employées comme diurétiques auxquelles on a attribué une action diabétogène n'avaient pas d'influence sur la sécrétion d'insuline du pancréas isolé du lapin. — Nos recherches démontrent que l'inhibition de la sécrétion d'insuline doit être une des causes essentielles de l'hyperglycémie provoquée par le diazoxide. En même temps, elles sont en contradiction avec l'opinion que cette inhibition de la sécrétion soit seulement la conséquence d'une libération d'adrénaline stimulée par le diazoxide.

Zusammenfassung. Das nichtdiuretisch wirkende Thiazidderivat Diazoxide, dessen hyperglykämische Wirkung seit langem bekannt ist, hemmt *in vitro* die mit Glucose stimulierte Insulinabgabe des isolierten Pankreas der Ratte, des Kaninchens und des Zwergschweins. — Die für die Hemmung der Insulinabgabe notwendige Konzentration (ab 5 $\mu\text{g/ml}$) des Diazoxide liegt in einem Bereich, der auch bei der Gabe therapeutisch wirksamer Dosen erreicht wird. Tolbutamid hebt die Hemmwirkung des Diazoxide auf. Fünf Thiazidpräparate, die als Diuretika Verwendung finden und denen ebenfalls eine sogenannte diabetogene Nebenwirkung zugeschrieben wird, hatten keinen Einfluß auf die Insulinabgabe des isolierten Kaninchenpankreas. — Unsere Untersuchungen zeigen, daß die Hemmung der Insulinsekretion eine wesentliche Teilersache der Diazoxide-Hyperglykämie sein muß. Sie sprechen gleichzeitig gegen die Ansicht, die Sekretionshemmung sei nur Folge einer durch Diazoxide gesteigerten Adrenalinfreisetzung.

In einer ersten Mitteilung konnte gezeigt werden, daß man mit dem relativ groben Modell des isolierten und *in vitro* inkubierten Rattenpankreas Ablauf und Steuerung der Insulinsekretion studieren kann. So konnte beispielsweise die von anderen Untersuchern aufgrund klinischer Beobachtungen und tierexperimenteller Befunde ausgesprochene Vermutung, das Insulin sei an der Regulation seiner Sekretion selbst beteiligt, unterstützt werden [13]. Im folgenden soll über Inkubationsstudien mit dem isolierten Pankreas verschiedener Spezies berichtet werden, durch die eine Hemmung der Insulinsekretion durch Diazoxide nachgewiesen werden konnte.

Diazoxide ist ein nicht-diuretisch wirkendes Antihypertensivum, dessen hyperglykämische Nebenwirkung bereits in den pharmakologischen Prüfungen bekannt wurde und erstmals von OKUN et al. [29, 43],

LANGDON et al. [22], DOLLERY et al. [8] sowie HUTCHESON et al. [19] beschrieben worden war.

Die Ergebnisse der seither bekannt gewordenen Untersuchungen mit Diazoxide weisen im wesentlichen auf zwei Punkte hin, an denen oder über die Diazoxide die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels beeinflusst. Einerseits kommt es zu einer Stimulierung des adrenergen Systems mit Erhöhung der Katecholamine im Blut und Hyperglykämie als Folge einer verstärkten Glykogenolyse [38, 39, 40]. In diesem Zusammenhang wird von SCHULTZ et al. [33] ein direkter Effekt des Diazoxide auf die Aktivität der Leberphosphorylase diskutiert, da Diazoxide in der Leber adrenaletomierter Ratten die Glykogenphosphorylase-Aktivität steigert und gleichzeitig die Glykogensynthetase hemmt. Andererseits haben Therapieversuche bei Patienten mit Hyperinsulinismus, leucinempfindlicher Hypoglykämie und Glykogenspeicherkrankheit gezeigt, daß Diazoxide entweder direkt oder ebenfalls über erhöhte Adrenalininkretion die Insulinsekretion hemmen kann [9, 11, 15, 34, 37]. Wir selbst konnten bisher 4 Patienten mit B-Zelladenomen präoperativ

* Ein Teil der Ergebnisse wurde erstmalig auf der I. Tagung der European Association for the Study of Diabetes vorgetragen (Montecatini Terme, April 1965).

** Herrn Prof. Dr. W. BARGMANN zum 60. Geburtstag gewidmet.

erfolgreich mit Diazoxide behandeln. Unsere Befunde sprechen in diesen Fällen ebenfalls für eine Hemmung der Insulinsekretion durch Diazoxide [14]. Die hier vorgelegten Untersuchungsergebnisse von Studien am isoliert inkubierten Pankreas stützen diese Ansicht.

Methodik

Versuchstiere: Männliche Sprague-Dawley Ratten entstammten einem Inzuchtstamm der Farbwerke Hoechst¹. Über Haltung, Fütterung sowie das Gewicht der Tiere, denen Pankreas zur Inkubation und Nebenhodengewebe zum Insulinnachweis entnommen wurde, haben wir bereits in der vorhergehenden Arbeit berichtet [13].

Zwergschweine bezogen wir aus dem Institut für Tierzucht und Haustiergenetik der Universität Göttingen. Es handelt sich bei diesen Schweinen um eine Kreuzung amerikanischer Zwergschweine (miniature pigs der Hormel Foundation, Austin/Minnesota), vietnamesischer Hängebauchschweine und einer sehr kleinen Variante des deutschen veredelten Landschweines [16]. Unsere Schweine waren 6–12 Wochen alt und wogen im allgemeinen 2,5–5 kg. Die Fütterung erfolgte einmal täglich mit einer Mischung aus käuflichem Ferkelaufzuchtfutter und Küchenabfällen.

Die Kaninchen waren, mit wenigen Ausnahmen, in unserem eigenen Tierstall gezogene junge mischrasige Hauskaninchen.

Pankreasinkubation: Die Tötung der Ratten erfolgte durch Dekapitation mit einer Miniaturguillotine. Aus dem dünnen magennahen Anteil des Pankreas wurden unter größtmöglicher Schonung des Gewebes 100–150 mg schwere Stücke herausgeschnitten. Das Pankreas der nach einem Genickschlag durch Entbluten getöteten Kaninchen wurde auf puffergetränktem Filterpapier mit einer feinen Schere in 6 etwa gleichgroße Stücke (150–200 mg) zerteilt. Die weitere Aufteilung mit Bildung eines sogenannten pools zur Verringerung der Streubreite [4] hat sich uns nicht bewährt. Die Zwergschweine wurden ebenfalls nach Schußbetäubung durch Entbluten getötet. Aus dem fingerdicken milznahen Pankreaschwanz wurden dann mit einem STADIE-RIGGS Mikrotom 0,5–0,7 mm dicke Scheiben herausgeschnitten und anschließend in 150–200 mg schwere Stücke aufgeteilt. Die Dicke dieser Schnitte aus dem Zwergschweinpankreas liegt, wie auch die Dicke des Pankreas junger Kaninchen (0,4–0,6 mm), noch unterhalb der im Versuch mit dem Rattenpankreas gefundenen kritischen Grenzschnittstärke (0,8 mm bei 95% O₂). Sobald als möglich wurden die Pankreasstücke dann in 3,0 ml KREBS-HENSELEIT Bikarbonatpuffer (pH 7,35–7,45 bei 37°C, Gasgemisch 5% CO₂/95% O₂, 2 mg Gelatine/ml) mit Glucose und weiteren Zusätzen inkubiert. Zur Inaktivierung proteolytischer Enzyme wurden Proben des Inkubates sofort nach Ende der Inkubation mit 1 n HCl auf etwa pH 2,5 eingestellt und bis zur Insulinbestimmung nicht länger als 48 Stunden bei 4°C aufbewahrt.

In den jeweils angegebenen Konzentrationen wurden folgende Benzothiadiazin-Derivate dem Puffer zugesetzt: Diazoxide² (3-methyl-7-chloro-1,2,4 benzothiadiazin-1,1-dioxid, MW 230,7. Charge 3153–69. Schering Co., Bloomfield/NJ). Cyclothiazid² (6-chloro-3,4 dihydro-3-(norbornen-2-yl)-7-sulfamoyl-1,2,4-benzothiadiazin-1,1-dioxid, MW 389,9 Charge TLV 554 A. Dr. K. Thomae GmbH. Biberach). Flumethiazid² (MW 281,3. Chemische Fabrik von Heyden AG. München). Hydrochlorothiazid²

(MW 297,7. CIBA AG. Wehr/Baden). Polythiazid² (MW 425,8. Charge 1.0476–04. Pfizer and Co., Inc. New York/NY). Trichlormethiazid² (MW 380,6. Charge 501855. E. Merck AG., Darmstadt). Die Präparate lagen als kristalline Reinsubstanzen vor und wurden ohne weitere Aufbereitung verwendet. Ihre Wasserlöslichkeit ist im physiologischen pH-Bereich äußerst gering, jedoch wurde die Löslichkeitsgrenze im vorliegenden Puffersystem bei Konzentrationen bis zu 50 µg/ml nicht überschritten. Wenn die Diazoxide-Konzentration 200 bzw. 500 µg/ml betrug, war der Bikarbonatpuffer auf pH 7,6 bei 37°C eingestellt. Von Diazoxide und den anderen Thiaziden wurden durch wiederholtes Titrieren mit NaOH und HCl Stammlösungen hergestellt, in denen in einem pH-Bereich von 8,2–8,4 die jeweilige Substanz völlig gelöst war. Zur Erzielung der benötigten Endkonzentration wurden dann 100 µl der Stammlösung dem vorher auf ein genügend erniedrigtes pH eingestellten Bicarbonat-Glucose/Gelatine-Puffer zugegeben. Im allgemeinen reichte eine vorherige Einstellung auf etwa pH 7,25 (20°C), um nach Zugabe der in NaOH gelösten Thiazide das endgültige pH auf 7,35–7,45 (37°C, 5% CO₂) zu bringen.

Bei dem Zusatz von Tolbutamid² (Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt-Hoechst), das auch nur im alkalischen Bereich gut wasserlöslich ist, wurde in ähnlicher Weise verfahren.

Insulinbestimmung: Im Pankreasinkubat wurde Insulin biologisch (ILA) und immunologisch (IMI) bestimmt, die ILA mit der von BALL et al. [1] vorgeschlagenen manometrischen Methode am epididymalen Fettgewebe der Ratte. Diese Bestimmungsmethode hat sich zum Insulinnachweis in dem von uns verwendeten serumfreien Puffer als sehr zuverlässig und genau erwiesen. Einzelheiten zur Methodik sind früher beschrieben worden [13]. Die Angaben über die ILA-Abgabe aus dem isolierten Pankreas (mE/100 mg Feuchtgewicht) müssen auf einen Rinderinsulin-Standard bezogen werden (10fach krist. glucagon-freies Rinder-Zinkinsulin, 24,8 E/mg. Charge 05462. NOVO-Industrie GmbH., Mainz). Die Bestimmung des IMI erfolgte im Prinzip nach der von MELANI et al. [27] angegebenen Methode mit einigen labor-technischen Modifikationen. Die Trennung des sogenannten freien vom Antikörper-gebundenen Insulin erfolgte durch Adsorption an Amberlite-CG-400 II. (¹²⁵J-Insulin, Meerschweinchen-Antikörper gegen Schweineinsulin, 10fach krist. Schweine-Zinkinsulin als Standard. Charge S 8563. NOVO-Industrie GmbH., Mainz. Ionenaustauscher in der OH-Form). Die immunologisch gemessene Insulinkonzentration des Pankreasinkubates lag konstant um etwa $\frac{2}{3}$ niedriger als die biologisch gemessene. Die mit einer der beiden Nachweismethoden gefundenen Werte waren daher vergleichbar.

Ergebnisse

I. Diazoxide hemmte die durch eine ausreichend hohe Glucosekonzentration (20 mM) maximal stimulierte Insulinabgabe des isolierten Rattenpankreas (Abb. 1). Dabei scheint, zumindest in dem Bereich zwischen 500–50 µg/ml, eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung nicht zu bestehen. Konzentrationen von 500, 200 und 50 µg/ml führten im Mittel zu einer Verringerung der Sekretion auf 34%, 29% bzw. 47% bezogen auf den Kontrollwert. Eine Hemmung um mehr als 70–75% konnte nicht erzielt werden. 5 µg/ml war die geringste Konzentration, mit der eine hemmende Wirkung des Diazoxide noch nachweisbar war. In 8 Versuchen mit jeweils zwei Stücken aus einem Pankreas war zwar die Insulinabgabe in dem Diazoxide enthaltenden Ansatz zumeist geringer als der entspre-

¹ Wir danken den Farbwerken Hoechst, Frankfurt-Hoechst, für die großzügige Belieferung mit Tieren.

² Wir danken den genannten Firmen für die Überlassung der Präparate. Insbesondere danken wir Herrn Dr. J. BLACK von der Schering Co., Bloomfield/NJ, für die Überlassung von Diazoxide.

chende Kontrollwert, die Differenz der Mittelwerte (5.99 ± 2.72 mE gegenüber 7.63 ± 3.54 mE/100 mg/90 min. Hemmung 22%) erwies sich jedoch im üblichen statistischen Verfahren als nur zufällig. 50 μ g/ml hatten dagegen einen signifikant hemmenden Effekt (3.32 ± 0.42 mE gegenüber 7.10 ± 2.34 mE/100 mg/90 min).

Abb. 1. Hemmung der Insulinsekretion (mE / 100 mg / 90 min) des isolierten Rattenpankreas mit Diazoxide (5 – 500 μ g/ml). Jeweils zwei Stücke (100 – 150 mg) aus einem Pankreas. Inkubation in Bikarbonat-Puffer mit 20 mM Glucose. Eingezeichnet sind die Mittelwerte, die Standardabweichung sowie der Wahrscheinlichkeitsfaktor p

Bei der Ratte hatten wir, selbst bei dem Vergleich mehrerer Stücke aus einem Pankreas, eine erhebliche Variation der Insulinsekretion gefunden [13]. Die mit Diazoxide erzielte Hemmung hätte also, wenn dies auch wenig wahrscheinlich ist, zum Teil durch die wechselnde Empfindlichkeit des jeweiligen Pankreasstückes vorgetäuscht sein können. Dieser Fehler kann ausgeschaltet werden, wenn ein einzelnes Pankreasstückchen mehrfach aufeinander folgend inkubiert wird und damit seine eigene Kontrolle ist. Abb. 2 zeigt am Beispiel zweier Einzelversuche die Versuchsanordnung: Nach einer Vorinkubationsperiode (15 min) wurde das Pankreasstück zunächst in Puffer mit niedriger (2.5 mM, 30 min) und dann mit hoher (20 mM, 30 min) Glucosekonzentration inkubiert. Nach einer Zwischeninkubation (15 min) folgte dann erneut der Wechsel von 2.5 mM zu 20 mM Glucosepuffer. Ein Vergleich des Anstiegs bzw. der Geschwindigkeit der Insulinsekretion in jedem der beiden Wechsel dieser Wechselinkubation zeigt, daß die Sekretionsgeschwindigkeit nach vorübergehender Basalsekretion nahezu unverändert wieder erreicht wird (Abb. 2). Als Quotienten Maximalsekretion/Basalsekretion, der als Index für die Zunahme der Sekretionsgeschwindigkeit bezeichnet werden kann, fanden wir in Kontrollversuchen ($n = 4$) den Wert 6.20 für den ersten und 6.63 für den zweiten Wechsel. In einer weiteren Versuchsserie ($n = 8$) verringerte sich dann die Sekretionsge-

schwindigkeit nach Zusatz von Diazoxide wie auch in den vorausgegangenen Experimenten (Abb. 1) um nahezu 70%. Der Index der Insulinsekretion fiel vom Kontrollwert 7.19 auf 2.35. Während also bei dem ersten Wechsel (2.5 mM auf 20 mM Glucose) die Insulinabgabe von 0.64 ± 0.35 auf 4.60 ± 2.45 mE/Pankreasstück/30 min anstieg, erreichte sie während des zweiten Wechsels ausgehend von 1.26 ± 0.70 nur 2.96 ± 2.08 mE/Pankreasstück/30 min.

II. Auch die Insulinsekretion aus Schnitten vom Pankreas junger Zwergschweine war mit Diazoxide hemmbar. Im Vergleich zum Ratten- und Kaninchenpankreas – dort ist eine glucosestimulierte Insulinabgabe erst bei Konzentrationen über 5 mMol/l nachzuweisen – ist das Schweinepankreas sehr viel glucoseempfindlicher und reagiert schon auf 2.5 mM Glucose mit einer um das 5fache erhöhten Insulinabgabe (Abb. 3). Hier mag jedoch das Präparat selbst und die unterschiedlichen Bedingungen für die Diffusion der Glucose eine Rolle spielen: Im Gegensatz zu den kaum größere Schnittflächen aufweisenden Ratten- und Kaninchenpankreasstücken hatten die mit dem Mikrotom gewonnenen Pankreasstücke des Schweines ausgedehnte Schnittflächen. Die

maximale Stimulation war mit einer Glucosekonzentration von 20 mM erreicht. In drei verschiedenen Versuchsreihen wurden im Mittel 9.2 ($n = 10$),

Abb. 2. Beispiel für die Insulinabgabe (mE / Pankreasstück / 30 min) bei der Wechselinkubation (Einzelheiten dazu im Text). Ein Rattenpankreasstück wurde in 2 Wechseln nach einer kurzen Vorinkubation (15 min) 30 Min mit 2.5 mM und anschließend mit 20 mM Glucosepuffer inkubiert. In den beiden hier gezeigten Versuchen wurde das erste Stück in beiden Wechseln nur mit Glucose inkubiert, bei der Inkubation des zweiten Stückes war in dem 2. Wechsel dagegen Diazoxide (50 μ g/ml) zugesetzt worden.

15.6 ($n = 16$) und 22.0 mE/100 mg/120 min ($n = 16$) abgegeben. Diazoxide hemmte in denselben Versuchsreihen die Sekretion des Insulin gleichfalls bis zu 70%. Und zwar war die Insulinabgabe bei einer Diazoxide-Konzentration von 500 μ g/ml von 15.62 auf 8.51 (Hemmung 46%) bzw. von 22.00 auf

5.96 mE/100 mg/120 min vermindert (Hemmung 73%) (Abb. 3). Mit 50 μ g/ml ließ sich ebenfalls noch eine Hemmung von 53% erreichen, im Vergleich zum Kontrollwert 9.22 war die Sekretion auf 4.35 mE/

Abb. 3. Hemmung der Insulinsekretion (mE / 100 mg / 120 min) des Zwerghschweinpankreas (Dünnschnitte, 150 — 200 mg) mit Diazoxide. Inkubation in Bikarbonat-Puffer mit wechselnder Glucosekonzentration, wie angegeben. Eingezeichnet sind Einzelwerte sowie Mittelwerte

100 mg/120 min erniedrigt (Tab. 1). Eine bemerkenswerte nicht zu erklärende Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert fand sich beim Schweinepankreas genauso wie bei dem Ratten- und Kaninchenpankreas.

III. Durch Tolbutamid ließ sich am inkubierten Kaninchenpankreas die Diazoxide-Hemmung der Insulinsekretion völlig aufheben (Tab. 2). Nach Zusatz von 50 μ g/ml Diazoxide war die Insulinabgabe mit 2.52 mE im Vergleich zum Kontrollwert (6.04 mE/100 mg/120 min) deutlich erniedrigt und entsprach der sogenannten Basalsekretion (1.42 mE/100 mg/120 min bei 5 mM Glucose). In der Versuchsserie mit Diazoxide plus Tolbutamid (200 μ g/ml) war sogar eine über den Glucoseeffekt hinausgehende Stimulierung der Insulinsekretion nachweisbar. Sie erreichte jetzt mit 8.96 mE fast den bei der Kontrollinkubation mit Tolbutamid und 20 mM Glucose gefundenen Wert von 10.60 mE/100 mg/120 min. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß wir im Gegensatz zum Kaninchen- und Zwerghschweinpankreas am isolierten Pankreas der Ratte die Insulinsekretion mit Tolbutamid und ande-

ren Sulfonylharnstoffderivaten nicht oder nur unerheblich steigern konnten. Die durch Diazoxide hervorgerufene Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion ließ sich dagegen auch am Rattenpankreas mit Tolbutamid aufheben.

Einen gewissen Hinweis auf die Bindung des Diazoxide an die B-Zelle oder eine Aufnahme in die Zelle gaben die Ergebnisse der Wechselinkubation (Tab. 3). Wurde zunächst zur Kontrolle und dann während des 2. Wechsels mit Diazoxide inkubiert, so fiel der Insulinsekretionsindex einer völligen Hemmung entsprechend von 4.09 auf 1.02. War aber schon in dem 1. Wechsel Diazoxide dem Puffer zugesetzt worden und folgte dann die Kontrollinkubation, so blieb die

Tabelle 1. Hemmung der Insulinsekretion aus Schnitten vom Zwerghschweinpankreas mit 50 μ g/ml Diazoxide.

Zwerghschweinpankreas	ILA mE / 100 mg / 120 min	
Diazoxide μ g/ml	—	50
Glucose mM	20	20
	15.04	1.40
	8.54	7.45
	6.63	2.05
	7.73	3.62
	6.00	3.47
	6.20	3.30
	5.43	2.77
	14.26	5.30
	8.34	5.86
	14.00	8.24
$\bar{x}$	9.22	4.35
$\pm$ SD	3.75	2.28
p	(0.010)	

Tabelle 2. Glucoseinduzierte Insulinsekretion des isolierten Kaninchenpankreas (Reihe 1 und 2), Hemmung der Sekretion mit 50 μ g/ml Diazoxide (Reihe 3) und die den Diazoxide-Effekt aufhebende Wirkung von Tolbutamid (Reihe 4)

Kaninchenpankreas	ILA mE / 100 mg / 120 min						
Diazoxide μ g/ml	—	—	50	50	—	—	—
Tolbutamid μ g/ml	—	—	—	200	200	200	200
Glucose mM	5	20	20	20	20	20	5
	1.33	9.21	2.42	7.42	4.71	4.76	
	1.63	6.72	4.07	8.46	9.02	8.52	
	1.77	6.12	1.77	11.18	4.24	3.90	
	0.91	3.21	1.77	2.68	6.55	1.11	
	1.36	3.12	1.95	3.69	15.23	5.15	
	1.49	7.87	2.18	5.14	22.59	4.09	
			3.51	24.49	11.84		
				8.63			
$\bar{x}$	1.42	6.04	2.52	8.96	10.60	4.59	
$\pm$ SD	0.30	2.46	0.91	6.87	7.33	2.39	
p	(0.005)		(0.010)	(0.025)	(NS)	(0.050)	

Insulinsekretion trotz des mehrfachen Pufferwechsels fast unverändert gehemmt. Der Index stieg von 1.46 nur auf 1.98 statt bis zu dem erwarteten, zumindest über 2.60 liegenden Kontrollwert. Mit Tolbutamid

konnte diese persistierende Sekretionshemmung wiederum aufgehoben werden. Der Index, der in dieser Serie mit Diazoxide-Zusatz 1.63 betrug, stieg bei der Inkubation mit Tolbutamid auf 4.66 (Tab. 3).

Tabelle 3. *Insulinsekretion des isolierten Kaninchenpankreas bei zweifachem Wechsel der Glucosekonzentration des Puffers von 2.5 auf 20 mM (Einzelheiten im Text). Die mit Diazoxide erzielte Hemmung der Sekretion überdauert auch den mehrfachen Pufferwechsel (Zeile 3), sie kann mit Tolbutamid jedoch aufgehoben werden (Zeile 5)*

Kaninchenpankreas		Insulinsekretionsindex ($\frac{\text{Maximalsekretion}}{\text{Basalsekretion}}$) bei der Wechselinkubation	
I. Wechsel		II. Wechsel	
1. Kontrolle*	4.29	Kontrolle*	2.61 (n= 6)
2. Kontrolle*	4.09	Diazoxide**	1.02 (n= 6)
3. Diazoxide**	1.46	Kontrolle*	1.98 (n= 6)
4. Kontrolle*	3.64	Tolbutamid***	2.58 (n= 7)
5. Diazoxide**	1.63	Tolbutamid***	4.66 (n= 10)

* Wechselinkubation 2.5 mM Glucose/20 mM Glucose.

** Wechselinkubation 2.5 mM Glucose/20 mM Glucose + 50 µg/ml Diazoxide.

*** Wechselinkubation 2.5 mM Glucose/20 mM Glucose + 200 µg/ml Tolbutamid.

IV. Die im Gegensatz zum Diazoxide diuretisch wirkenden Benzothiadiazine Hydrochlorothiazid, Polythiazid, Flumethiazid, Cyclothiazid und Trichlormethiazid hatten weder eine sekretionshemmende noch eine sekretionsfördernde Wirkung. An dem auf 50 µg/ml Diazoxide sehr empfindlich reagierenden Kaninchenpankreas fand sich nach Zusatz von 50 µg/ml des jeweiligen Thiazids keine Änderung der glucosestimulierten Insulinabgabe. Ein Hemmeffekt wäre, trotz der im Vergleich zur Diazoxide-Konzentration nicht äquimolaren Konzentration der Thiazide, sicher nachweisbar gewesen. 50 µg/ml entsprechen jeweils 0.22 mM Diazoxide, 0.17 mM Hydrochlorothiazid, 0.12 mM Polythiazid, 0.18 mM Flumethiazid, 0.13 mM Cyclothiazid und Trichlormethiazid (Tab. 4).

V. Um einen Vergleich der hier vorgelegten Befunde mit den Ergebnissen der 1. Mitteilung zu ermöglichen, wurden bei der Darstellung die bei der biologischen Bestimmung gefundenen und auf einen Rinderinsulin-Standard zu beziehenden Werte für die Insulinsekretion angegeben (ILA). In zahlreichen Experimenten wurde gleichzeitig mit der biologischen Insulinbestimmung auch eine immunologische Bestimmung (IMI) durchgeführt. Da beide Bestimmungsmethoden jedoch (abgesehen von den methodisch bedingten Unterschieden der Größenordnung) hinsichtlich der Fragestellung übereinstimmende Ergebnisse lieferten, wurde bei einem Teil der Versuche auf die IMI-Bestimmung verzichtet. Die Berechtigung hierzu sei an einem Versuchsansatz demonstriert: In Tab. 5 ist die Wirkung von Tolbutamid und Diazoxide auf die Insulinabgabe des Kaninchenpankreas mit den

ILA-Werten in gleicher Weise zu zeigen wie mit den IMI-Werten. Die Werte für die IMI betragen lediglich ein Drittel der ILA-Werte, verhalten sich aber unter den verschiedenen Versuchsbedingungen parallel zur ILA.

Tabelle 4. *Die diuretisch wirksamen Benzothiadiazin-Derivate Hydrochlorothiazid (HCZ), Polythiazid (PTZ), Flumethiazid (FMZ), Cyclothiazid (CTZ) und Trichlormethiazid (TMZ) haben keinen Einfluß auf die Insulinsekretion des isolierten Kaninchenpankreas*

Kaninchenpankreas		ILA mE / 100 mg / 120 min				
Thiazidkonzentration 50 µg/ml						
Glucose 20 mM						
		HCZ	PTZ	FMZ	CTZ	TMZ
—		17.63	10.95	5.02	11.83	15.93
13.44		17.63	10.95	5.02	11.83	15.93
16.91		13.79	22.82	16.34	15.89	11.16
15.36		12.55	14.68	13.72	11.28	17.70
15.94		13.20	11.56	20.68	11.35	10.28
12.01		11.44	17.92	15.50	14.19	24.03
$\bar{x}$	14.73	13.72	15.58	14.25	12.91	15.82

Tabelle 5. *Gleichzeitige biologische (ILA) und immunologische (IMI) Insulinbestimmung in Versuchsansätzen, die die Wirkung von Diazoxide und/oder Tolbutamid auf die Insulinsekretion des isolierten Kaninchenpankreas zeigen sollen*

Kaninchenpankreas		ILA bzw. IMI		mE/100 mg / 120 min	
Diazoxide	µg/ml	—	50	50	—
Tolbutamid	µg/ml	—	—	200	200
Glucose	mM	20	20	20	20
		3.21	1.95	3.69	4.71
		9.21	4.07	7.42	9.02
	ILA	6.72	2.42	8.46	4.24
		7.87	1.77	8.63	15.23
$\bar{x}$		6.75	2.55	7.05	8.30
p		(0.050)	(0.020)	(NS)	
		0.61	0.51	1.47	1.97
		3.28	1.13	2.66	3.32
	IMI	2.78	0.81	2.28	1.81
		2.32	1.21	3.04	2.54
$\bar{x}$		2.25	0.91	2.36	2.41
p		(0.050)	(0.010)	(NS)	

Erörterung der Befunde

Die aufgrund von in vitro Versuchen mit Chlorothiazid geäußerte Ansicht [42], auch Diazoxide könne die Insulinwirkung auf die Glucoseaufnahme des Fett- und Muskelgewebes direkt hemmen, ließ sich nicht bestätigen. Wir haben wie FIELD et al. [12] sowie BARNETT et al. [2] in einer Versuchsreihe, die dieser Arbeit vorbereitend vorausging, einen Einfluß von Diazoxide (in Konzentrationen bis zu 500 µg/ml) auf die insulinstimulierte Glucoseaufnahme des epididymalen Fett-

gewebes und des Zwerchfellmuskels der Ratte nicht nachweisen können (Tab. 6). Gegen einen peripher angreifenden insulinantagonistischen Effekt des Diazoxide spricht auch, daß Tolbutamid die Diazoxide-Hyperglykämie vollkommen aufzuheben vermag [44].

Tabelle 6. *Durch Diazoxide wird die Wirkung von Rinderinsulin auf das epididymale Fettgewebe der Ratte nicht beeinflusst. Die Werte der gleichzeitig unter Zusatz von Diazoxide (500 µg/ml) bestimmten Insulinstandard-Reihe (25, 75 und 100 µE/ml) weichen nur geringfügig von den erwarteten Werten ab (n=4)*

erwartet	25	75	100 µE/ml
gefunden	23	85	92 µE/ml

Ausgehend von der antihypertensiven Wirkung der Substanz war in der Diskussion über die Ursachen der Diazoxide-Hyperglykämie zunächst ein Angriff des Diazoxide am adrenergen System mit vermehrter Inkretion von Katecholaminen angenommen worden. TABACHNICK et al. [39] zeigten, daß die Wirkung des Diazoxide nicht an eine intakte endokrine Pankreasfunktion gebunden ist und bei alloxandiabetischen Mäusen sowie pankreatektomierten Hunden unverändert schnell und stark eintritt. Bei nebennierenlosen und nebennierenmarklosen Ratten und Mäusen beeinflusst Diazoxide den Blutglucosespiegel nicht oder nur wenig [39, 40]. Bei nebennierenlosen Hunden ist der Glucoseanstieg deutlich vermindert, aber noch nachweisbar [25]. Dementsprechend reagiert auch nach Vorbehandlung mit Ergotamin oder Beta-Rezeptoren Blockern der Glucosespiegel nur geringfügig [21, 28, 39, 46]. Vor kurzem haben dann ZARDAY et al. [47] bei Ratten einen der Hyperglykämie parallel gehenden Anstieg der Katecholamine im Blut nach oraler Diazoxidegabe nachweisen können. Die dabei verwendete fluorimetrische Methode erfaßt jedoch Adrenalin, Noradrenalin und Hydroxytyramin insgesamt. Die Frage, ob Diazoxide über verstärkte Inkretion oder verzögerten Abbau zu erhöhten Adrenalinpiegeln führt und damit die Hyperglykämie einer gesteigerten Glykogenolyse folgt, ist daher noch nicht beantwortet. Auch bleibt offen, ob Diazoxide direkt auf die chromaffinen Zellen wirkt oder die Katecholamine als Antwort auf die nach Diazoxide akut einsetzende Blutdruckerniedrigung ansteigen [47].

Wenn somit ein Einfluß auf das adrenale System als Teilursache der akuten Hyperglykämie nach Diazoxide gesichert erscheint, so ist es doch unwahrscheinlich, daß eine mehrstündige Hyperglykämie allein über adrenerge Mechanismen unterhalten wird. Beispielsweise führt die i.v. Injektion von 150–200 mg/kg Diazoxide bei fastenden Ratten zu einer mehr als 6 Stunden dauernden Blutglucosesteigerung, die im Mittel Werte zwischen 400–500 mg/100 ml erreicht. Auch die bei der Langzeittherapie von Patienten mit einem insulinproduzierenden B-Zelladenom schon mit einer Dosierung von 3×100 mg Diazoxide erreichbare Erhöhung der Glucosespiegel spricht für eine zumindest

zusätzliche Wirkung auf die Insulinsekretion [14]. DOLLERY et al. [8] beobachteten an Patienten, die mit einer Chlorothiazid/Diazoxide Kombination behandelt wurden, gemessen an den erhöhten Glucosewerten auffällig niedrige Plasmainsulinspiegel. Aus den Arbeiten anderer Autoren läßt sich ferner entnehmen, daß Diazoxide im Tierversuch oder bei Patienten mit einem Hyperinsulinismus das Seruminsulin (ILA oder IMI) zwar nicht senkt, andererseits aber die der Hyperglykämie entsprechende Hyperinsulinämie verhindert [3, 10, 21, 31]. Inzwischen ist dann auch in Untersuchungen an gesunden Probanden und an Patienten mit einem B-Zelladenom oder -Karzinom eindeutig die Hemmung der glucose- oder leucininduzierten Insulinsekretion sowohl im Kurzzeitversuch als auch unter der Langzeitbehandlung mit Diazoxide nachgewiesen worden [11, 15, 34, 37]. LOSERT et al. [23] fanden bei Ratten 2 Stunden nach i.v. Injektion von 200 mg/kg Diazoxide eine Verringerung der Seruminsulinkonzentration (IMI) auf 30% des Kontrollwertes. Desgleichen beobachteten LOUBATIERES et al. [25] im Pankreasvenenblut von Hunden während der Infusion von Diazoxide eine deutliche Verminderung der ILA, die sich erst 90 Minuten nach Ende der Infusion wieder normalisierte.

In eigenen Untersuchungen, die während der präoperativen Behandlung von vier Patienten mit insulinproduzierenden B-Zelladenomen vorgenommen werden konnten, haben wir ebenfalls die erhebliche Verminderung der Insulinsekretion (IMI) während der Dauer der oralen Diazoxidebehandlung nachweisen können. Dies zeigte sich am Nüchtern-Insulinspiegel des Blutes allerdings nur in denjenigen Fällen, in denen ständig pathologisch erhöhte Insulinwerte gefunden wurden. Eindeutiger ließ sich die Sekretionshemmung bei der Stimulierung der B-Zellen mit Glucose oder Glucagon nachweisen [14].

Im Einklang mit diesen für die insulinsekretionshemmende Wirkung von Diazoxide sprechenden Befunden stehen die Ergebnisse unserer Versuche mit dem isolierten Pankreas. Sie sind vor kurzem im Prinzip von HOWELL und TAYLOR [18] bestätigt worden.

Diazoxide hemmt die glucoseinduzierte Insulinabgabe des in vitro inkubierten isolierten Pankreas dreier Tierarten: Der Ratte, des Kaninchens und des Zwergschweines. Obgleich die Diffusionsverhältnisse an inkubierten Pankreasstücken sicher ungünstig sind, liegt die gerade noch wirksame Konzentration (5 µg/ml) in einer Größenordnung, die bei Patienten nach i.v. Gaben von 150–300 mg Diazoxide durchaus kurzzeitig im Extrazellulärraum erreicht wird. Hervorgehoben werden muß ferner, daß sich die Insulinsekretion nicht völlig, sondern nur bis zu der auch bei niedrigen Glucosekonzentrationen stets vorhandenen Basalsekretion verringern läßt (Abb. 3, Tab. 2). Dies entspricht den Verhältnissen bei Patienten mit B-Zelladenomen, bei denen es nach der Gabe von Diazoxide ja auch nicht zur Erniedrigung der Nüchtern-Insulinwerte unter den Normbereich kommt.

Eine irreversible Hemmung des Insulinsekretionsmechanismus oder des Glucosestoffwechsels der B-Zellen scheint Diazoxide nicht herbeizuführen, da in vitro mit Tolbutamid die Hemmung völlig aufgehoben werden konnte (Tab. 2, Tab. 3). Denn auch für eine Stimulierung der Insulinsekretion durch Tolbutamid ist eine gewisse Glucosekonzentration Voraussetzung. In den Versuchen mit Kaninchenpankreas fanden wir erst bei Glucosekonzentrationen ab 5 mM einen sekretionsfördernden Tolbutamideffekt. Die Insulinabgabe erreichte jedoch nicht den mit 20 mM Glucose, und bei weitem nicht den mit 20 mM Glucose plus 200 µg/ml Tolbutamid trotz Diazoxidezusatz erzielten Wert von 8,96 mE/100 mg/120 min (Tab. 2). Nach unseren klinischen Beobachtungen an Patienten mit Inseladenom wird nicht nur der Glucoseeffekt auf die Insulinsekretion, sondern auch der Glucagoneffekt durch Diazoxide gehemmt, während der Tolbutamideffekt erhalten bleibt [14]. Auch diese Beobachtung spricht für die Annahme, daß Tolbutamid auf einem anderen Wege als die physiologischen Stimuli die Insulinsekretion steigert.

Die Sekretionshemmung bleibt auch nach Entfernung des Diazoxide aus dem Puffer längere Zeit fast unverändert bestehen, wie die Inkubationen mit mehrfachem Pufferwechsel zeigten (Tab. 3). Dies könnte für eine relativ feste Bindung an die B-Zellmembran oder eher noch für einen intrazellulären Angriffspunkt sprechen. Sichere Rückschlüsse auf den Ort der Diazoxidwirkung lassen sich aus unseren Ergebnissen aber nicht ziehen.

Die von SCHULTZ et al. [33] in Versuchen mit der Skelettmuskulatur der Ratte und mit gereinigten Enzympräparaten gefundene Diazoxide-bedingte Hemmung der 3',5'-AMP Phosphodiesterase als Hinweis auf die Diazoxide-Wirkung in den B-Zellen anzusehen, ist ebenfalls nicht möglich. Es stünde dann die Theorie einer *Verminderung* der Insulinabgabe als Folge intrazellulär erhöhter 3',5'-AMP Konzentration [33] der einer *Sekretionssteigerung* durch 3',5'-AMP gegenüber. Denn ein anderer Stimulator der Insulinsekretion, das Glucagon [7, 32, 41], führt in der Leber über eine Aktivierung der Adenylat-Cyclase [17] zur vermehrten Bildung des cyclischen AMP. Ob daraus der Schluß gezogen werden kann, daß Glucagon auch in der Inselzelle wie Glucose wirkt, also entweder über einen erhöhten Durchsatz von Glucose-6-Phosphat oder, wie aus den Ergebnissen der Arbeiten von COORE et al. [5] geschlossen werden könnte, über eine gesteigerte Umsetzung von UDP-Glucose zu UDP-Glucuronat, ist bis heute nicht entschieden.

Fraglich bleibt weiterhin, ob die Diazoxidehemmung der Insulinsekretion durch Adrenalin als Effektor vermittelt wird. Denn Adrenalin kann in vivo und auch in vitro die Insulinabgabe des Pankreas hemmen [5, 20, 30]. Es müßte dann in Anbetracht der Ergebnisse unserer Untersuchungen am isolierten Pankreas gefordert werden, daß Diazoxide Adrenalin direkt aus den im Pankreas vorhandenen chromaffinen Zellen freisetzt. Chromaffine Zellen sind im Pankreas reichlich vorhanden. Sie sind wahrscheinlich der Häufigkeit der Inseln entsprechend auf die verschiedenen Pankreasabschnitte verteilt [24]. Wir glauben aber in In-

kubationsstudien mit transplantiertem foetalen Hamsterpankreas, das neben inselähnlich zusammenliegenden B-Zellen nur noch Fett- und Bindegewebszellen enthält, auch diese Frage beantworten zu können. Die bisherigen Ergebnisse sprechen auch an diesem Präparat für eine Hemmung der mit Glucose verstärkten Insulinabgabe (IMI) durch Diazoxide.

Die im Gegensatz zum Diazoxide diuretisch wirkenden Thiazide Hydrochlorothiazid, Polythiazid, Flumethiazid, Cyclothiazid und Trichlormethiazid hatten weder eine hemmende noch eine zusätzlich stimulierende Wirkung auf die mit Glucose maximal angeregte Insulinabgabe des Kaninchenpankreas (Tab. 4). Daß auch diese als Diuretika gebräuchlichen Substanzen, deren potentielle sogenannte diabetogene Nebenwirkung seit langem bekannt und vielfach beschrieben worden ist, ebenfalls die Insulinsekretion hemmen können, wurde zwar durch die Arbeiten von SAMAN et al. [31] nahegelegt, ist jedoch noch nicht bestätigt worden. Die Thiazide üben ihre Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel wahrscheinlich nicht unmittelbar über die B-Zellen aus, sondern wirken möglicherweise über Änderungen der Kalium-Konzentration [35, 45].

Als Schlußfolgerung ergibt sich, daß eine Hemmung der Insulinsekretion (in vivo am Menschen und Versuchstier und in vitro am isolierten Pankreas eindeutig nachweisbar) neben einer Verstärkung adrenerger Mechanismen eine wesentliche Teilursache der Diazoxide-Hyperglykämie ist. Die Ergebnisse aller bis heute vorgelegten Untersuchungen lassen eine Aussage über den molekularen Angriffspunkt des Diazoxide jedoch nicht zu. Denn bei der Diskussion über Einflüsse auf intrazelluläre enzymatisch vermittelte Reaktionen muß bisher noch vom Verhalten der Zellen anderer Organe auf das Verhalten der B-Zellen geschlossen werden.

Gleichermaßen schwierig ist die Interpretation der Wirkungen von Mannoheptulose [4, 6, 36] und D-Glucosamin [26], die wie Diazoxide die Insulinsekretion in vivo und in vitro hemmen. Dabei läßt sich am isolierten Pankreas die Wirkung von Mannoheptulose und Diazoxide nicht unterscheiden, Tolbutamid hebt die durch sie verursachte Hemmung völlig auf. Im Unterschied hierzu ist die mit D-Glucosamin erzielte Sekretionshemmung mit Tolbutamid nicht zu beeinflussen.

Literatur

- [1] BALL, E. G., and M. A. MERRILL: A manometric assay of insulin and some results of the application of the method to sera and islet-containing tissues. *Endocrinology* **69**, 596 (1961).
- [2] BARNETT, C. A., and J. E. WHITNEY: The effect of Diazoxide and chlorothiazide on glucose uptake in vitro. *Metabolism* **15**, 88 (1966).
- [3] BLEICHER, S. J., F. CHOWDHURY and M. G. GOLDNER: Thiazide therapy in hypoglycemia of metastatic insulinoma. (Abstr.) *Clin. Res. Proc.* **12**, 456 (1964).
- [4] COORE, H. G., and P. J. RANDLE: Block of insulin secretion from the pancreas by D-mannoheptulose. *Biochem. J.* **91**, 56 (1964).
- [5] — — — Insulin secretion from rabbit pancreas in vitro. in: *The structure and metabolism of the pancreatic islets*. S. E. Brodin, B. Hellman, H. Knutson. Hrsg. Pergamon Press, Oxford (1964).

- [6] — — E. SIMON, P.F. KRAICER and M.C. SHELES-
NYAK: Block of insulin secretion from the pancreas
by D-mannoheptulose. *Nature (Lond.)* **197**, 1264
(1963).
- [7] CROCKFORD, P.M., D. PORTE, F.C. WOOD and R.H.
WILLIAMS: Glucagon stimulation of insulin release.
Clin. Res. Proc. **14**, 147 (1966).
- [8] DOLLERY, C.T., B.L. PENTECOST and N.A. SAMAN:
Drug-induced diabetes. *Lancet* **1962 II**, 735.
- [9] DRASH, A., F.W. WOLFF, H. LANGS and R.M. BLIZ-
ZARD: Diazoxide-induced diabetes mellitus in a hypo-
pituitary dwarf. *Diabetes* **15**, 319 (1966).
- [10] ERNESTI, M., M. MITCHELL, M.S. RABEN and Y.
GILBOA: Control of hypoglycemia with diazoxide and
human growth hormone. *Lancet* **1965 I**, 628.
- [11] FAJANS, S.S., J.C. FLOYD, R.F. KNOPF, J. RULL,
E.M. GUNTSCH and J.W. CONN: Benzothiadiazine
suppression of insulin release from normal and ab-
normal islet tissue in man. *J. clin. Invest.* **45**, 481
(1966).
- [12] FIELD, J.B., and S. MANDELL: Effects of thiazides
on glucose uptake and oxidation of rat muscle and
adipose tissue. *Metabolism* **13**, 959 (1964).
- [13] FRERICHS H., U. REICH and W. CREUTZFELDT: In-
sulinsekretion in vitro. I. Hemmung der glucose-
induzierten Insulinabgabe durch Insulin. *Klin.
Wschr.* **43**, 136 (1965).
- [14] —, und W. CREUTZFELDT: Der Einfluß von Diazoxide
auf die Insulinsekretion bei Patienten mit einem
Hyperinsulinismus. *Diabetologia*, (1967), in Vorbereitung.
- [15] GRABER, A.L., D. PORTE and R.H. WILLIAMS: Clinical
use of diazoxide and mechanism for its hyper-
glycemic effects. *Diabetes* **15**, 143 (1966).
- [16] HARING, F., R. GRUHN, D. SMIDT und B. SCHEVEN:
Züchtung eines Miniaturschweines als Versuchs- und
Laboratoriumstier. *Zbl. Bakt.* **189**, 521 (1963).
- [17] HAYNES, R.G., E.W. SUTHERLAND and T.W. RALL:
The role of cyclic adenylic acid in hormone action.
Recent Progr. Hormone Res. **16**, 121 (1960).
- [18] HOWELL, S.L., and K.W. TAYLOR: Effects of dia-
zoxide on insulin secretion in vitro. *Lancet* **1966 I**,
128.
- [19] HUTCHESON, D.E., and K.S. BARTHALMUS: Anti-
hypertensive action of diazoxide. A new benzothia-
diazine with antidiuretic properties. *Brit. med. J.*
1962 II, 159.
- [20] KRIS, A.O., R.E. MILLER, F.E. WHERRY and J.W.
MASON: Inhibition of insulin secretion by infused
epinephrine in rhesus monkeys. *Endocrinology* **78**,
87 (1966).
- [21] KVAM, D.C., and H.C. STANTON: Studies on diazo-
xide hyperglycemia. *Diabetes* **13**, 639 (1964).
- [22] LANGDON, R.G., and F.W. WOLFF: Diabetogenic ac-
tion of diazoxide. *Brit. med. J.* **1962 II**, 926.
- [23] LOSERT, W., G. SENFT, R. SITT, G. SCHULTZ und H.
KAESS: Die Beteiligung des Insulins an der Diazoxid-
Hyperglykämie. *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **253**, 388
(1966).
- [24] LOUBATIERES, A., et M.M. MARIANI: Pancréas et
catécholamines. *J. Physiol. (Paris)* **56**, 395 (1964).
- [25] — — et R. ALRIC: Libération de catécholamines et
freination de l'insulino-sécrétion dans l'action hyper-
glycémisante du diazoxide. II. Tagung der European
Soc. for the Study of Diabetes. (Aarhus, Juli 1966).
- [26] MARTIN, J.M., and G. BAMBERS: Insulin secretion
in glucosamine-induced hyperglycemia in rats. *Amer.
J. Physiol.* **209**, 797 (1965).
- [27] MELANI, F., H. DITSCHUNEIT, K.M. BARTELT, H.
FRIEDRICH und E.F. PFEIFFER: Über die radio-
immunologische Bestimmung von Insulin im Blut.
Klin. Wschr. **43**, 1000 (1965).
- [28] MENG, K., und G. KRONEBERG: Untersuchungen an
der Ratte zur Frage der diabetogenen Wirkung von
Saluretica. *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **251**, 433
(1965).
- [29] OKUN, R., R.P. RUSSELL and W.R. WILSON: Use
of diazoxide with trichlormethiazide for hyperten-
sion. *Arch. intern. Med.* **112**, 120 (1963).
- [30] PORTE, D., A.L. GRABER, T. KUZUYA and R.H.
WILLIAMS: The effects of epinephrine on immuno-
reactive insulin levels in man. *J. clin. Invest.* **45**, 228
(1966).
- [31] SAMAN, N., C.T. DOLLERY and R. FRASER: Dia-
betogenic action of benzothiadiazines. *Lancet* **1963
II**, 1244.
- [32] SAMOLS, E., G. MARRI and V. MARKS: Promotion of
insulin secretion by glucagon. *Lancet* **1965 II**, 415.
- [33] SCHULTZ, G., G. SENFT, W. LOSERT und R. SITT:
Biochemische Grundlagen der Diazoxide-Hypergly-
kämie. *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **253**, 372 (1966).
- [34] SELTZER, H., and E.W. ALLEN: Inhibition of insulin
secretion in diazoxide-diabetes. *Diabetes* **14**, 439
(1965).
- [35] SENFT, G.: Beeinflussung hormonaler und enzymati-
scher Regulationen des Kohlenhydratstoffwechsels
bei Anwendung von Benzothiadiazinen. *Internist* **7**,
426 (1966).
- [36] SIMON, E., and P.F. KRAICER: Effect of pretreat-
ment of rats with mannoheptulose on the glucose
tolerance. *Nature (Lond.)* **206**, 942 (1965).
- [37] SPERGEL, G., and S.J. BLEICHER: Effects of diazoxide
administration on plasma glucose, insulin, and lipids
in von Gierke's disease. *Diabetes* **15**, 406 (1966).
- [38] STAQUET, M., R. YABO, J. VICTORA and F.W.
WOLFF: An adrenergic mechanism for hyperglyce-
mia induced by diazoxide. *Metabolism* **14**, 1000
(1965).
- [39] TABACHNICK, I.I.A., A. GULBENKIAN and F. SEID-
MAN: The effect of a benzothiadiazine, diazoxide, on
carbohydrate metabolism. *Diabetes* **13**, 408 (1964).
- [40] — — — Further studies on the metabolic effects of
diazoxide. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **150**, 455 (1965).
- [41] TURNER, D.S., and N. MCINTYRE: Stimulation by
glucagon of insulin release from rabbit pancreas in
vitro. *Lancet* **1966 I**, 351.
- [42] WELLER, J.M., and P.E. BORONDY: Effects of ben-
zothiadiazine drugs on carbohydrate metabolism.
Metabolism **14**, 708 (1965).
- [43] WILSON, W.R. and R. OKUN: The acute hemody-
namic effects of diazoxide in man. *Clin. Res. Proc.*
10, 184 (1962).
- [44] WOLFF, F.W.: Diazoxide hyperglycemia and its
continued relief by tolbutamide. *Lancet* **1964 I**, 309.
- [45] — Clinical and physiological implications of diabetes
induced by benzothiadiazines. *Diabetes* **13**, 203
(1964).
- [46] YABO, R., J. VICTORA, M. STAQUET and F.W.
WOLFF: Studies concerning the hyperglycemic effects
of diazoxide and its mode of action. *Diabetes* **14**, 591
(1965).
- [47] ZARDAY, Z., J. VICTORA and F.W. WOLFF: The
effect of diazoxide on catecholamines. *Metabolism*
15, 257 (1966).

Prof. Dr. W. CREUTZFELDT
Dr. H. FRERICHS
Medizinische Universitätsklinik
3400 Göttingen