Veränderungen des Gehaltes der freien Fettsäuren und der Ketonkörper im Blut alloxandiabetischer Ratten nach i. v. Fettbelastung und Heparinapplikation

HERMANN BAUMUNG, KLAUS REISSERT und BARBARA RUDAS

Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der Universität Wien (Vorstand: Prof. Dr. A. LINDNER)

Eingegangen am 27. Juli 1966

Changes in the serum levels of free fatty acids and ketone bodies in alloxan-diabetic rats after intravenous loading with fat and application of heparin.

Summary. Fat, with and without simultaneous heparin has been given intravenously to normal and to chronic alloxan-diabetic rats. The concentration of free fatty acids and ketone bodies in the blood was determined at several intervals after the injection. Although after the i. v. administration of fat the profile of the FFA-elevation in serum was parallel in both groups, the FFA-levels in diabetic rats were markedly lower. Addition of heparin to the fat caused a distinct rise of FFA in serum of both groups without any differences between them. Fat loading alone, leads to a moderate elevation of the blood ketone bodies in normal and diabetic rats. Combination of fat administration with heparin increases the ketone body content in the blood of the diabetic as well as of the normal rats. This increase, however, is significantly higher in alloxan diabetic animals at the end of the few hours after the fat loading.

Changements du taux des F.F.A. et des Corps cétoniques dans le sang de rats rendus diabétiques par l'alloxane après charge intra-veineuse de graisse et administration d'héparine.

Résumé. Nous avons examiné le taux des acides gras libres (FFA) et des corps cétoniques dans le sang de rats normaux et de rats souffrant d'un diabète alloxanique chronique après surcharge intraveineuse de graisse avec et sans héparine. Si le profil de l'élévation des FFA après l'application i. v. de graisse est parallèle pour les animaux diabétiques et les contrôles, les taux des FFA sont net-

tement plus bas chez les rats diabétiques. Après l'injection simultanée d'héparine et de graisse, les taux des FFA accusent une forte élévation, sans toutefois révéler aucune différence significative entre les deux groupes. L'injection de graisse sans héparine provoque une cétonémie faible et comparable chez les animaux diabétiques ou normaux. En présence d'héparine, cependant, la surcharge graisseuse mène à une augmentation supplémentaire du taux des corps cétoniques, augmentation significativement plus marquée chez les rats diabétiques, une heure après la surcharge.

Zusammenfassung. Untersucht wurde das Verhalten der freien Fettsäuren und der Ketonkörper im Blut stoffwechselgesunder und chronisch alloxandiabetischer Ratten nach i. v. Fettbelastung mit und ohne Heparinapplikation. Die Erhöhung des FFA-Serumspiegels nach i. v. Fettbelastung verläuft bei stoffwechselgesunden und diabetischen Ratten parallel, liegt jedoch bei letzteren deutlich niedriger. Heparin erhöht nach einer Fettbelastung den FFA-Gehalt im Serum beträchtlich. Der Zusatz von Heparin zur Fettbelastung führt zu keinem Unterschied im Verhalten des FFA-Serumspiegels bei diabetischen und normalen Ratten. Durch die Fettbelastung allein kommt es sowohl bei normalen als auch bei diabetischen Ratten zu einer geringgradigen Ketonämie, ohne daß ein Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen bestünde. Der Heparinzusatz zur Fettapplikation führt sowohl bei normalen als auch bei diabetischen Ratten zu einer zusätzlichen Erhöhung des BK-Spiegels, die bei diabetischen Tieren in der ersten Stunde nach der Belastung signifikant stärker ausgeprägt ist.

Bekanntlich sind in der ersten Woche nach der Alloxanapplikation, also im akuten Stadium des Alloxandiabetes, der Blutketonkörpergehalt (BK), der Cholesterin-, Gesamtlipid- und Phosphatidspiegel des Serums bei Ratten erhöht. Im chronischen Stadium normalisieren sich diese Werte und gleichen denen stoffwechselgesunder Tiere. In früheren Arbeiten wurde berichtet, daß nach kurzfristigen, peroralen Fettbelastungen chronisch diabetische Ratten mit einer viel ausgeprägteren Erhöhung obiger Werte reagieren als normale Kontrolltiere [10, 16, 17, 18]. Die Erhöhung des Gesamtlipidgehaltes diabetischer Ratten tritt besonders deutlich hervor und kommt auch in einer sichtbar stärkeren Lipämie zum Ausdruck.

Verschiedene Angaben aus der Literatur bestätigen, daß nach langdauernder Fettfütterung bei chronisch alloxandiabetischen Ratten [2, 11] sowie nach einer i. v. Fettbelastung bei pancreatectomierten [22, 3] oder alloxandiabetischen Hunden [6] exogenes Fett langsamer aus dem Blut verschwindet. Dieses Phänomen

wird häufig darauf zurückgeführt, daß beim Alloxan- oder Pankreasdiabetes sowohl die Lipoproteinlipase (LPL)-Aktivität des Fettgewebes [15, 20, 7], als auch die Postheparin-LPL-Aktivität des Plasmas [12] vermindert ist.

Bei Patienten mit Diabetes mellitus konnte jedoch keine Verminderung der Postheparin-LPL-Aktivität im Serum festgestellt werden [19, 4].

Es schien uns daher interessant, bei chronisch alloxandiabetischen Ratten den Ablauf der Freisetzung der freien Fettsäuren (FFA) aus einer Fett-emulsion *in vivo* zu untersuchen und gleichzeitig den Einfluß von Heparin auf diesen Vorgang zu studieren. In der uns zugänglichen Literatur wurden ähnliche Versuche nur bei Hunden im akuten oder subakuten Stadium des Diabetes durchgeführt [3, 6]. In diesen Studien ist, wie aus den Angaben der Autoren hervorgeht, der FFA-Gehalt des Blutes schon vor der Fettinfusion erhöht. Außerdem wurde die Wirkung des Heparins nicht untersucht.

Eine Erhöhung des FFA-Gehaltes im Blut ist die Voraussetzung für eine verstärkte Ketogenese. Ungeklärt ist jedoch, ob ein erhöhter BK-Spiegel in quantitativer Abhängigkeit zu der Erhöhung des FFA-Gehaltes steht.

Methodik

Als Versuchstiere wurden männliche Albinoratten eines Sprague-Dawley Stammes verwendet. Zur Erzeugung des Diabetes erhielten die Tiere pro kg Körpergewicht 150 mg Alloxan „Loba-Chemie“ ($C_4H_2O_4N_2 + H_2O$) subcutan in 7.5%iger Lösung, die mit 0.9%iger Kochsalzlösung jeweils frisch zubereitet wurde. Die Fettbelastungen wurden 4–8 Wochen nach der Alloxanapplikation vorgenommen. Nur solche Ratten wurden als diabetisch gewertet, die innerhalb von 24 Stunden mehr als 80 ml Harn ausschieden und mehr als 20 g von den ad libitum angebotenen Rattenkeks (Zusammensetzung nach LEMBECK [9]) verzehrten.

Die Verabreichung des Fettes erfolgte in die Schwanzvene. Wir verwendeten die Fettemulsion „Intralipid 20% Vitrum“¹ in einer Dosierung von 2.5 ml/100 g Tiergewicht.

Heparin „Novo“ wurde gemeinsam mit dem Fett in einer Dosierung von 50 E/100 g Körpergewicht appliziert.

Die Bestimmung der FFA im Serum erfolgte nach der Methode von DOLE [5] modifiziert von TROUT et al. [21]; als Indikator diente Nilblau A [23].

Der Blutketonkörpergehalt wurde im Vollblut nach der Methode von BESSMAN und ANDERSON [1] bestimmt.

Entsprechend den in der Einleitung geschilderten zwei Fragestellungen wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt:

Im Rahmen der Versuchsreihe I erfolgte die Untersuchung des zeitlichen Ablaufs der FFA-Freisetzung. 36 stoffwechselgesunde und 42 chronisch alloxan-diabetische Ratten erhielten Intralipid 20% i.v.; die Hälfte der Tiere beider Kollektive erhielt gleichzeitig mit dem Fett Heparin. Somit ergaben sich vier Gruppen. Von jeder Gruppe wurde je ein Drittel 1, 2½ und 4 Stunden nach der i.v. Belastung durch Entbluten getötet und die Konzentration der FFA im Serum bestimmt.

Die Überprüfung des FFA-Gehaltes von „Intralipid“ ergab eine gute Übereinstimmung mit dem Literaturwert [13].

Im Rahmen der Versuchsreihe II untersuchten wir den zeitlichen Ablauf der Ketonämie nach Fettbelastung. Wir verwendeten 22 Kontrollen und 20 diabetische Ratten. Die Gruppeneinteilung war dieselbe, wie in der Versuchsreihe I. Bei jedem Tier wurde 1, 2½, 4, 8 und 24 Stunden nach der Fettbelastung retrobulbär Blut entnommen und der BK-Gehalt bestimmt.

¹ „Intralipid 20% Vitrum“ enthält in 100 ml der Emulsion 20 g Sojabohnenöl, 1,2 g Eilecithin und 2,5 g Glycerin. Wir erhielten das Präparat durch die Freundlichkeit von Dr. E. MOSETTIG, Wien.

Ergebnisse

Der zeitliche Ablauf der FFA-Freisetzung nach Fettbelastung.

„Intralipid 20%“ enthielt 1850 Abs. μ Eq FFA/l.

Die mittleren FFA-Werte bei den einzelnen Gruppen sind zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Fettbelastung in Abb. 1 wiedergegeben.

Die Verlaufskurven des FFA-Serumspiegels bei nicht mit Heparin behandelten stoffwechselgesunden und diabetischen Ratten sind nach Fettbelastung nahezu parallel. Bei den diabetischen Tieren liegt jedoch der FFA-Spiegel deutlich niedriger als bei den stoffwechselgesunden. Der Unterschied ist nur eine Stunde nach der Fettbelastung statistisch wahrscheinlich ($p < 0,05$).

Abb. 1. Verlauf des FFA-Serumspiegels nach i.v. Fettbelastung

— normale Ratten
 - - - normale Ratten mit Heparin behandelt
 diabetische Raten
 - - - diabetische Ratten mit Heparin behandelt

Bei den mit Heparin behandelten Ratten sind keine deutlichen Unterschiede im Verlauf des FFA-Serumspiegels bei diabetischen und Kontrolltieren nach Fettbelastung festzustellen. Heparin führt zu einer beträchtlichen initialen Erhöhung des FFA-Spiegels. 2½ Stunden nach der Fettbelastung ist der FFA-Spiegel jedoch unter jene Werte abgesunken, die bei den nicht mit Heparin behandelten Tieren gefunden wurden.

Der zeitliche Ablauf der Ketonämie nach Fettbelastung.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind aus der Abbildung 2 zu ersehen. Die Mittelwerte der BK-Bestimmungen sind in mg% Aceton angegeben. Die Ketonämie nach einer i.v. Fettbelastung ist weder bei

den Kontrolltieren noch bei den alloxandibetischen Ratten besonders hoch. Mit Ausnahme der 4-Stundenwerte ist der mittlere BK-Gehalt bei beiden Gruppen annähernd gleich. Das bei den Kontrolltieren 8 Stunden nach der Fettbelastung auftretende Maximum der Ketonämie ($8.7 \text{ mg}\% \pm 1.3$), wird bei den diabetischen Tieren 4 Stunden früher beobachtet und liegt etwas höher ($9.2 \text{ mg}\% \pm 1.0$). Diese Unterschiede erwiesen sich jedoch als nicht signifikant.

Abb. 2. Verlauf des BK-Spiegels nach i.v. Fettbelastung

— normale Ratten
 normale Ratten mit Heparin behandelt
 ----- diabetische Ratten
 - · - · - diabetische Ratten mit Heparin behandelt

Die gleichzeitige Verabreichung von Fett und Heparin bedingt sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den diabetischen Ratten eine bedeutende und zu den meisten Zeitpunkten des Verlaufs signifikante Erhöhung des mittleren BK-Gehaltes. Während aber bei den Kontrollen diese Erhöhung 8 Stunden nach der Applikation am stärksten ausgeprägt ist, sehen wir bei den diabetischen Ratten 7 Stunden früher einen besonders hohen Anstieg des mittleren BK-Gehaltes.

Eine Stunde nach der Belastung mit Fett bestehen bezüglich des Ketonkörperspiegels signifikante Unterschiede zwischen den gleichzeitig mit Heparin behandelten diabetischen Tieren und allen übrigen ($p < 0.01$).

Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß bei stoffwechselgesunden und chronisch alloxandibetischen Ratten der FFA-Spiegel nach Fettbelastung ungefähr den gleichen zeitlichen Verlauf aufweist. Obwohl nur nach einer Stunde ein signifikanter Unterschied zwischen den FFA-Konzentrationen diabetischer und stoffwechselgesunder Tiere besteht, ist bemerkenswert, daß die FFA-Werte diabetischer Ratten zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung deutlich tiefer liegen. Eine Erklärung für diesen Befund wäre, daß die lipolytische Aktivität des Serums diabetischer Tiere geringer ist als die stoffwechselgesunder. Wie in der Einleitung erwähnt, wird diese Möglichkeit in der Literatur häufig diskutiert [6, 12].

Auch KESSLER [6] beobachtete bei diabetischen Hunden nach Fettinfusion den gleichen zeitlichen Verlauf des FFA-Gehaltes wie bei den Kontrollen. Allerdings waren die von ihm gefundenen FFA-Werte bei den diabetischen Tieren zu jedem Zeitpunkt höher als bei den Kontrollen. Im Gegensatz zu uns verwendete KESSLER als Kontrollen mit Insulin behandelte diabetische Hunde. CASTILLO et al. [3] beschreiben bei pancreatectomierten Hunden schon vor der Fettinfusion einen über dem Normalwert dreifach erhöhten FFA-Gehalt, der sich bis zu 6 Stunden nach Fettapplikation nicht veränderte.

Wird zusammen mit Fett Heparin verabreicht, so finden wir keinen Unterschied zwischen den FFA-Konzentrationen diabetischer und stoffwechselgesunder Ratten. Dies bedeutet, daß der Heparin-Effekt bei alloxandibetischen Ratten in vollem Umfang auftritt.

In einer früheren Arbeit wurde beschrieben [10], daß es bei alloxandibetischen Ratten nach peroraler Fettbelastung zu einer ausgeprägteren Ketonämie kommt als bei stoffwechselgesunden. Die vorliegenden Versuchsergebnisse weisen darauf hin, daß nach i.v. Fettapplikation keine wesentlichen Unterschiede im Verhalten des Blutketonkörperspiegels bei diabetischen und normalen Ratten auftreten. Für diese Divergenz haben wir zunächst keine Erklärung. Wir haben bei diabetischen Tieren nach i.v. Fettzufuhr die Entstehung einer besonders intensiven Ketonämie erwartet. Allerdings bestehen sicherlich zwischen dem Zustand des Fettes im Blut nach der Resorption und einer künstlichen Fettemulsion beträchtliche Unterschiede. KORN und QUIGLEY [8] stellten fest, daß künstliche Fettemulsionen kein ideales Substrat für das lipolytische Enzymsystem darstellen. Durch die Annahme einer schlechteren Verwertung von Fettemulsionen könnte auch das Ausbleiben einer verstärkten Ketonämie bei diabetischen Tieren nach i.v. Fettbelastung erklärt werden.

Ein Zusammenhang zwischen Ketonämie und Erhöhung des FFA-Spiegels wurde in neuerer Zeit von ONTOKO und ZILVERSMIT [14] diskutiert. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß alle Maßnahmen, die zur Erhöhung des FFA-Spiegels im Blut führten, auch eine Vermehrung des BK-Gehaltes hervorriefen. Aller-

dings vermißten wir eine strenge gegenseitige Abhängigkeit dieser beiden Blutbestandteile.

Unter Verwendung von Heparin kommt es sowohl bei alloxandibetischen als auch bei normalen Ratten zu einer beträchtlichen Verstärkung der durch die Fettbelastung bedingten Erhöhung des FFA-Serumspiegels. Dabei kommt es zu einem signifikanten Unterschied im Verhalten der BK-Werte bei alloxandibetischen und normalen Tieren. Das stärkere Ansteigen des BK-Spiegels bei diabetischen Ratten unter diesen Bedingungen deutet entweder auf eine vermehrte Ketogenese oder eine verminderte Utilisation der Ketonkörper hin.

Jedenfalls ist die diabetische Ketonämie eine komplexe Resultante, die nicht allein vom FFA-Serumspiegel bestimmt wird.

Literatur

- [1] BESSMAN, S.P., and M. ANDERSON: Estimation of citric acid and ketone bodies by the salicylaldehyde-acetone reaction. *Fed. Proc.* **16**, 154 (1957).
- [2] CAGAN, R.N., R. NICHOLS and L. LOEWE: Serum lipids in diabetic and non diabetic rats. *Diabetes* **5**, 112—115 (1956).
- [3] CASTILLO, E.J., M.E. CALLI, A. ROLDAN, C.T. RIETTI and B.A. HOUSAY: Decrease in ketonemia due to infusion of lipids in pancreatectomized dogs. *Diabetes* **14**, 33—35 (1965).
- [4] DENBOROUGH, M.A. and B. PATTERSON: Clearing factor, fibrinolysis and blood lipids in diabetes mellitus. *Clin. Sci.* **23**, 485—488 (1962).
- [5] DOLE, V.P.: A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *J. clin. Invest.* **35**, 150—154 (1956).
- [6] KESSLER, J.I.: Effect of insulin on release of plasma lipolytic activity and clearing of emulsified fat intravenously administered to pancreatectomized and alloxanized dogs. *J. Lab. clin. Med.* **60**, 747—755 (1962).
- [7] — Effect of diabetes and insulin on the activity of myocardial and adipose tissue lipoprotein lipase of rats. *J. clin. Invest.* **42**, 362—367 (1963).
- [8] KORN, E.D., and T.W. QUIGLEY: Lipoprotein lipase of chicken adipose tissue. *J. biol. Chem.* **226**, 833—839 (1957).
- [9] LEMBECK, F.: Die Wartung und Fütterung von Ratten im Laboratorium. *Arzneimittel-Forsch.* **3**, 50—52 (1953).
- [10] LINDNER, A., und B. RUDAS: Das Verhalten der Ketonkörper im Blut nach Fettbelastung bei normalen und alloxandibetischen Ratten. *Med. exp.* **11**, 285—288 (1964).
- [11] MARUHAMA, Y.: Diet and blood lipids in normal and diabetic rats. *Metabolism* **14**, 78—87 (1965).
- [12] MENG, H.C., and J.L. GOLDFARB: Heparin-induced lipämie clearing factor in rats. *Diabetes* **8**, 211—217 (1959).
- [13] —, and B. EDGREN: Source of plasma free fatty acids in dogs receiving fat emulsion and heparin. *Amer. J. Physiol.* **204**, 691—695 (1963).
- [14] ONTKO, J.A., and D.B. ZILVERSMIT: Correlation between concentrations of circulating free fatty acids and ketone bodies. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **121**, 319—321 (1966).
- [15] PAV, J., and J. WENKEOVA: Significance of adipose tissue lipoprotein lipase. *Nature* **185**, 926—927 (1960).
- [16] RUDAS, B.: Serumcholesteringehalt bei alloxandibetischen Ratten in Zusammenhang mit Ketose und Fettbelastung. *Wien. klin. Wschr.* **77**, 938—939 (1965).
- [17] — Serum cholesterol levels in alloxan diabetic rats after loading with various alimentary fats. *Nature* **211**, 320—321 (1966).
- [18] — Serumlipidgehalt alloxandibetischer Ratten nach kurzfristiger peroraler Belastung mit verschiedenen Fettarten. Zweite Tagung der Europäischen Gesellschaft für Diabetologie. Aarhus 6.—8. Juli 1966.
- [19] SANDHOFER, F., S. SAILER und H. BRAUNSTEINER: Untersuchungen über die Lipoproteinlipase. *Klin. Wschr.* **39**, 968—971 (1961).
- [20] SCHNATZ, J.D., and R.H. WILLIAMS: Lipoprotein lipase and tributyrinase in rat adipose tissue. *Metabolism* **11**, 349—354 (1962).
- [21] TROUT, D.L., E.H. ESTES and S.J. FRIEDBERG: Titration of free fatty acids of plasma: a study of current methods and a new modification. *J. Lipid Res.* **1**, 199—204 (1960).
- [22] WADELL, W.R., and R.P. GEYER: Effect of insulin on clearance of emulsified fat from the blood in depancreatized dogs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **96**, 251—255 (1957).
- [23] ZÖLLNER, N., und D. EBERHAGEN: Untersuchung und Bestimmung der Lipide im Blut. Berlin-Heidelberg, Springer-Verlag, S. 340 (1965).

Dr. BARBARA RUDAS
Institut für allgemeine und
experimentelle Pathologie
der Universität Wien
Währinger Str. 13
1090 Wien, Austria