

## Experimentelle Untersuchungen über die blutzuckersenkende Wirkung von Rinder-Proinsulin

W. PULS u. G. KRONEBERG

Institut für Pharmakologie der Farbenfabriken Bayer AG, Werk Elberfeld

Eingegangen am 10. Dezember 1968

### *Experimental investigations of the hypoglycaemic action of bovine proinsulin*

**Summary.** Proinsulin obtained from bovine insulin (SCHMIDT and ARENS [6]) lowered the blood sugar level of rats and mice. The activity ratio proinsulin : insulin was 1 : 4 in fed rats and fasted mice, and 1 : 2 in fasted rats, based on an equimolar dosage and measuring the effect in terms of maximum lowering of the blood sugar value. After proinsulin the decrease of the blood sugar was more protracted than after insulin. Proinsulin which was incubated with trypsin *in vitro*, resembled insulin in degree and onset of action. In *pancreatectomized*, *nephrectomized* and *two-thirds hepatectomized* rats proinsulin acted as in normal animals. *Alloxan-diabetic* mice responded to proinsulin like intact mice. The reason why the onset of the hypoglycaemic action of proinsulin was delayed is probably due to the fact that the active insulin must first be produced by a time-dependent proteolytic process. This may also be the cause of the ineffectiveness of proinsulin in the mouse convulsion test which was quoted by RUBENSTEIN et al. [5].

### *Etude expérimentale de l'action hypoglycémisante de la pro-insuline de boeuf*

**Résumé.** Chez les rats et les souris le taux du sucre sanguin est abaissé par une proinsuline obtenue à partir de l'insuline bovine (SCHMIDT et ARENS [6]). Chez les rats alimentés et les souris à jeun, le rapport d'activité proinsuline : insuline est de 1 : 4, chez les rats à jeun de 1 : 2, dans le cas de dose équimolaire et en mesurant l'abaissement maximum du sucre sanguin. L'abaissement du sucre sanguin évolue de façon plus lente après proinsuline qu'après insuline. La proinsuline, incubée *in vitro* avec la trypsine, agit quantitativement et au point de vue temps, comme l'insuline. Chez les rats *pancréatectomisés*, chez les

rats *néphrectomisés* ainsi que chez ceux *hépatectomisés aux deux tiers*, l'action de la proinsuline est la même que chez les animaux normaux. Les souris rendues *diabétiques par l'alloxane* répondent également à la proinsuline comme les souris intactes. L'action hypoglycémisante de la proinsuline se manifeste de façon retardée probablement parce que l'insuline active doit tout d'abord se former par un processus protéolytique dépendant du facteur temps. Ceci pourrait être aussi la raison pour laquelle, RUBENSTEIN et coll. [5] signalent l'absence d'effet de la proinsuline dans le test de convulsion chez la souris.

**Zusammenfassung.** An Ratten und Mäusen wird der Blutzucker durch ein aus Rinderinsulin gewonnenes Proinsulin (SCHMIDT und ARENS [6]) gesenkt. Bei gefütterten Ratten und nüchternen Mäusen ist das Wirkungsverhältnis Proinsulin : Insulin = 1 : 4, bei nüchternen Ratten 1 : 2, wenn äquimolar dosiert und das Maximum der Blutzuckersenkung gewertet wird. Die Blutzuckersenkung verläuft nach Proinsulin protrahierter als nach Insulin. Proinsulin, welches *in vitro* mit Trypsin inkubiert wurde, wirkt quantitativ und zeitlich wie Insulin. Bei *pankreatektomierten*, bei *nephrektomierten* und bei *zweidrittelhepatektomierten* Ratten wirkt Proinsulin ebenso wie an Normaltieren. Auch *alloxandiabetische* Mäuse sprechen auf Proinsulin wie intakte Mäuse an. Die hypoglykämische Wirkung des Proinsulins tritt wahrscheinlich deshalb verzögert ein, weil das aktive Insulin in einem zeitabhängigen proteolytischen Prozeß erst entstehen muß. Dies könnte auch die Ursache für eine von RUBENSTEIN et al. [5] zitierte, fehlende Wirkung von Proinsulin im Mäusekrampf-test sein.

**Key-words:** Insulin, proinsulin, blood sugar, mice, rats, pancreatectomy, nephrectomy, hepatectomy (partial) alloxan diabetes.

STEINER et al. konnten vor kurzem einen einkettigen Vorläufer des Insulins, das *Proinsulin*, bei der Inkubation von Insulinomgewebe [8] und isolierten  $\beta$ -Zellen aus Rattenpankreas [9] nachweisen. Nach Untersuchungen von SCHMIDT und ARENS [6] ist im Proinsulin vom Rind das Aminoende der Insulin-A-Kette mit dem Carboxylende der Insulin-B-Kette durch ein aus 29 Aminosäuren bestehendes Verbindungsglied verknüpft. In *in vitro*-Untersuchungen an isolierten Fettzellen und am Froschmuskel zeigte Proinsulin nur eine sehr geringe Insulinwirkung (zit. bei RUBENSTEIN et al. [5]). Die Inkubation von Proinsulin *in vitro* mit Trypsin ergibt Des-Ala-Insulin als Umwandlungsprodukt, das sich elektrophoretisch [6] und biologisch im Mauskrampf test [3] nicht vom Insulin unterscheidet. Über die Umwandlung von Proinsulin *in vivo* ist noch nichts bekannt. Auch Untersuchungen über die Blutzuckerwirkung sind bisher nicht durch-

geführt worden. Wir hatten Gelegenheit, das von SCHMIDT und ARENS gewonnene Proinsulin auf seine Blutzuckerwirkung an Ratten und Mäusen zu untersuchen und möchten im Folgenden darüber berichten.

### *Material und Methoden*

**Tiermaterial.** Es wurden Ratten beiderlei Geschlechts vom Stamm Wistar/Winkelmann-SPF und weibliche Mäuse des Stammes NMRI/Hann.-SPF verwendet. Sie erhielten Leitungswasser und Standardfutter Altomin-R *ad libitum*. „Gefütterten“ Ratten wurde das Futter unmittelbar, „nüchternen“ Ratten und Mäusen 16 Std vor Versuchsbeginn entzogen. Die Stalltemperatur betrug  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , die Beleuchtungszeit (hell/dunkel) 12/12 Std. Das Körpergewicht der intakten weiblichen Ratten betrug 110–130 g, der pankreatektomierten männlichen Versuchstiere 175–195 g, der hepatektomierten männlichen sowie nephrektomierten weiblichen Ratten 130–160 g bzw. 120–145 g.

**Substanzen:** Als Standard wurde ein Mischinsulin von Rind und Schwein mit 24 IE/mg (int. Standard IV 1958) verwendet. Proinsulin stellte Dr. D.D. SCHMIDT/Biochemisches Laboratorium der Farbenfabriken Bayer AG, Werk Elberfeld, zur Verfügung, wofür wir ihm herzlich danken. Insulin und Proinsulin wurden in Phosphat-Zitrat-Puffer pH 8 gelöst. Das Injektionsvolumen betrug 2 ml/kg Ratte bzw. 10 ml/kg Maus. Trasylol® lag als Trockensubstanz mit 4900 KIE/mg vor. Es wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Das Injektionsvolumen betrug 10 ml/kg Ratte. In den Versuchen mit Blutentnahmen nach 10, 20 und 30 Min. (Abb. 1 und Tabelle 7) wurde zu jedem Zeitpunkt ein anderes Tierkollektiv benutzt. Die übrigen Versuche wurden an jeweils demselben Tierkollektiv durchgeführt. Dieses unterschiedliche Vorgehen war notwendig, weil die Höhe des Blutzuckers durch so schnell aufeinanderfolgende Punctionen, wie es bei den 10-Minutenabständen der Fall ist, bereits verändert werden kann.

**Methoden:** Blutzuckerbestimmungen wurden mit dem Auto-Analyzer/Technicon nach der von HOFFMAN [4] angegebenen Kaliumferricyanid-Methode durchgeführt. Das Blut wurde dem retroorbitalen Venenplexus entnommen. — Die Pankreatektomie erfolgte in Evipan®-Narkose (100 mg/kg i.p.) nach Cox et al. [2] durch Ligatur von Pankreas, angrenzender Duodenalschleife und Milz. Leberarterie und Pfortader blieben intakt. — Die Zweidrittelhepatektomie wurde in Äthernarkose vorgenommen. Die beiden großen ventralen Leberlappen wurden nacheinander ligiert und reseziert. Kontrollversuche an 10 Ratten ergaben, daß bei diesem Vorgehen  $69 \pm 2.0\%$

bzw. 26 Prozent, bezogen auf die Kontrollgruppe. Nach 20 Min. ist die Blutglucose stärker, nämlich um 15 bzw. 41 Prozent (Abb. 1B) und nach 30 Min. um 24 bzw. 44 Prozent (Abb. 1C) vermindert. Demgegenüber führen annähernd äquimolare Dosen Proinsulin<sup>1</sup> (0.8 bzw. 2.0 nmol/kg s.c.) während der ersten 30 Min. nach der Applikation zu keiner signifikanten Veränderung des Blutzuckers. Erst nach einer Stunde besteht eine signifikante Differenz zur Kontrolle. Auch die etwa fünffach höhere Proinsulindosis, nämlich 4.1 nmol/kg s.c., ist nach 10 Min. noch unwirksam. Nach 20 Min., ein Zeitpunkt, zu dem Insulin in der halben äquimolaren Menge den Blutzucker um 41% senkt, ist die Wirkung des Proinsulins nur eben so stark wie die Wirkung von 0.7 nmol/kg Insulin. Erst nach 30 und 60 Min. ist der hypoglykämische Effekt dieser Proinsulindosis ausgeprägt, allerdings nicht stärker als der mit der halben Insulindosis erreichte. Proinsulin wirkt demnach verzögert und quantitativ schwächer als Insulin.

## 2. Gefütterte Ratten

Erwartungsgemäß wirkt Insulin, wie ein Vergleich der Werte in Tabelle 1 mit denen der Abb. 1 zeigt, an gefütterten Ratten deutlich schwächer als an nüchter-

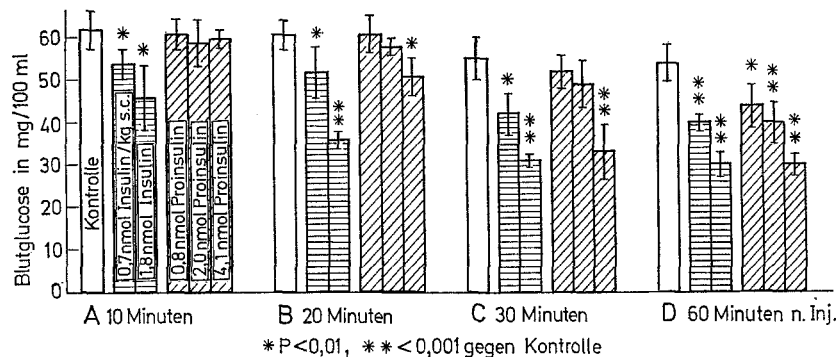


Abb. 1. Blutzuckerwerte in mg/100ml  $\pm 1s$  von nüchternen Ratten zu verschiedenen Zeiten nach subcutaner Injektion verschiedener Dosen Insulin bzw. Proinsulin (nmol/kg): n = 6. Zu jedem Zeitpunkt der Blutzuckeruntersuchung wurden jeweils andere Tierkollektive verwendet (s. Methode)

der Leber entfernt werden. — An weiblichen Ratten erfolgte die *Nephrektomie* in üblicher Weise durch Ligieren der zu- und abführenden Gefäße und Entfernen der Nieren. Alle Operationen wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn ausgeführt. — Zur Erzeugung eines *Alloxandiabetes* erhielten Mäuse 100 mg/kg Alloxantetrahydrat/10 ml Zitratpuffer pH 5 in 30 sec i.v. injiziert. Es wurden nur solche Tiere verwendet, bei denen 4 Tage später eine Nüchternglucosurie (Glukotest®-Streifen) nachweisbar war. — *Signifikanzberechnungen* erfolgten nach STUDENT.

## Ergebnisse

### 1. Nüchterne Ratten

Wie die Abb. 1A zeigt, senken 0.7 und 1.8 nmol Insulin den Blutzucker nüchterner Ratten schon 10 Min. nach subcutaner Injektion signifikant um 13

nen. Auch der Effekt von Proinsulin ist reduziert: 4.1 nmol/kg, die in den Versuchen an nüchternen Tieren stark wirksame Dosis, hat noch keine Wirkung. Das gilt selbst für die doppelte Dosis von 8.2 nmol/kg (Tabelle 1). Erst 16.5 nmol/kg Proinsulin haben eine mit 3.7 nmol/kg Insulin etwa vergleichbare Wirksamkeit. Auf molarer Basis entspricht dies einem Wirksamkeitsverhältnis von ca. 1:4.

<sup>1</sup> Das aus der Aminosäureanalyse berechnete Molekulargewicht unseres Proinsulins beträgt nach SCHMIDT u. ARENS [6] 8621, das Molekulargewicht von Rinderinsulin 5733. In unseren Untersuchungen sind nur annähernd äquimolare Dosen von Insulin und Proinsulin benutzt, da für unser Proinsulin ursprünglich ein höheres Molekulargewicht, nämlich 9500, angenommen wurde.

## 3. Pankreatektomierte Ratten

Der Blutzucker von gefütterten Ratten steigt nach Ausschaltung des Pankreas kontinuierlich an (Tabelle 2). Durch 7.3 nmol Insulin/kg s. c. läßt sich der Anstieg signifikant hemmen. Eine annähernd äquimolare Dosis Proinsulin, 8.2 nmol, ist wirksam, aber deutlich schwächer. Die vierfache Dosis Proinsulin führt zu einer

## 4. Zweidrittelhepatektomierte Ratten

Die Injektion von 5.5 nmol Insulin/kg s. c. führt bei zweidrittelhepatektomierten, gefütterten Ratten zu einer signifikanten Verminderung der Blutglucose (Tabelle 3). Eine äquimolare Dosis Proinsulin (6.2 nmol/kg s. c.) senkt den Blutzucker nicht signifikant, die vierfache Menge hingegen etwa ebenso stark wie 5.5 nmol

Tabelle 1. Blutzuckersenkende Wirkung von Insulin und Proinsulin an gefütterten Ratten zu verschiedenen Zeiten nach subcutaner Applikation; n = 6

Dosis/kg s. c.	Blutglucose in mg/100 ml $\pm$ ls			
	0	30	60	90 Min. n. Appl.
Kontrolle	101 $\pm$ 5.5	112 $\pm$ 8.0	118 $\pm$ 7.8	117 $\pm$ 8.3
3.7 nmol Insulin	96 $\pm$ 3.8	<u>79 <math>\pm</math> 7.5</u>	<u>101 <math>\pm</math> 12</u>	<u>107 <math>\pm</math> 5.8</u>
7.3 nmol Insulin	101 $\pm$ 2.3	<u>61 <math>\pm</math> 4.7</u>	<u>68 <math>\pm</math> 8.4</u>	<u>89 <math>\pm</math> 15</u>
4.1 nmol Proinsulin	102 $\pm$ 2.3	112 $\pm$ 3.4	118 $\pm$ 2.1	124 $\pm$ 13
8.2 nmol Proinsulin	103 $\pm$ 3.5	<u>102 <math>\pm</math> 3.9</u>	112 $\pm$ 3.0	112 $\pm$ 3.4
16.5 nmol Proinsulin	99 $\pm$ 8.1	<u>79 <math>\pm</math> 10</u>	<u>86 <math>\pm</math> 13</u>	101 $\pm$ 16

—  $P < 0.05$   
 =  $P < 0.001$  } gegen Kontrolle

Tabelle 2. Blutzuckersenkende Wirkung von Insulin und Proinsulin an gefütterten pankreatektomierten Ratten. Der Nullwert wurde unmittelbar nach der Operation bestimmt. n = 4, Kontrolle n = 6

Dosis/kg s. c.	Blutglucose in mg/100 ml $\pm$ ls				
	0	30	60	90	120 Min. n. Appl.
Kontrolle	114 $\pm$ 11	157 $\pm$ 17	178 $\pm$ 29	225 $\pm$ 41	253 $\pm$ 49
7.3 nmol Insulin	115 $\pm$ 14	<u>79 <math>\pm</math> 13</u>	<u>95 <math>\pm</math> 34</u>	<u>128 <math>\pm</math> 58</u>	<u>143 <math>\pm</math> 50</u>
8.2 nmol Proinsulin	116 $\pm$ 16	<u>125 <math>\pm</math> 12</u>	<u>138 <math>\pm</math> 13</u>	175 $\pm$ 8.0	179 $\pm$ 45
33.0 nmol Proinsulin	112 $\pm$ 4.0	<u>61 <math>\pm</math> 13</u>	<u>49 <math>\pm</math> 9.2</u>	<u>58 <math>\pm</math> 5.3</u>	<u>70 <math>\pm</math> 3.5</u>

—  $P < 0.05$   
 =  $P < 0.01$   
 =  $P < 0.001$  } gegen Kontrolle

Tabelle 3. Blutzuckersenkende Wirkung von Insulin und Proinsulin an gefütterten zweidrittelhepatektomierten Ratten zu verschiedenen Zeiten nach subcutaner Applikation. Der Nullwert wurde unmittelbar nach der Operation bestimmt. n = 6

Dosis/kg s. c.	Blutglucose in mg/100 ml $\pm$ ls				
	0	30	60	90	120 Min. n. Appl.
Kontrolle	106 $\pm$ 8.6	121 $\pm$ 16	118 $\pm$ 19	119 $\pm$ 15	119 $\pm$ 12
5.5 nmol Insulin	108 $\pm$ 5.2	<u>62 <math>\pm</math> 11</u>	<u>62 <math>\pm</math> 11</u>	<u>67 <math>\pm</math> 12</u>	<u>73 <math>\pm</math> 19</u>
6.2 nmol Proinsulin	110 $\pm$ 4.7	110 $\pm$ 8.1	107 $\pm$ 14	115 $\pm$ 15	116 $\pm$ 17
24.7 nmol Proinsulin	107 $\pm$ 4.4	<u>70 <math>\pm</math> 10</u>	<u>60 <math>\pm</math> 7.2</u>	<u>61 <math>\pm</math> 7.7</u>	<u>61 <math>\pm</math> 11</u>

====  $P < 0.001$  gegen Kontrolle

stärkeren und länger andauernden Hypoglykämie als 7.3 nmol Insulin. Proinsulin wirkt demnach auch an pankreaslosen Ratten, und zwar eher stärker und anhaltender als an intakten. Für eine Wirkung des Proinsulins *in vivo*, möglicherweise als Aktivierungsorgan, ist das Pankreas also nicht erforderlich.

Insulin. Das Wirkungsverhältnis Insulin:Proinsulin ist wiederum 1:4 wie bei intakten Tieren. Für die Wirkung des Proinsulins hat die Leber offensichtlich keine entscheidende Bedeutung, wenn auch nicht ausgeschlossen werden kann, daß der verbliebene Leberrest genügt, um das applizierte

Proinsulin zur wirksamen Insulinform umzuwandeln.

licherweise nur partiell, so daß eine ausreichende Proteinase-Restaktivität noch vorhanden ist.

### 5. Nephrektomierte Ratten

An nephrektomierten Ratten wurde der Blutzucker durch 4.1 nmol/kg Proinsulin (Tabelle 4) ebenfalls stark und verzögert gesenkt. Vergleicht man die Werte der Tabelle 4 mit den als „Kontrollen“ anzusehenden

### 6. Intakte nüchterne Mäuse

Bei Mäusen steigt der Blutzucker an sich schon während des Versuchsablaufs an (Kontrolle in Tabelle 5). Es dürfte sich um die Folge der in kurzen Intervallen vorgenommenen Venenpunktionen im Orbital-

Tabelle 4. *Blutzuckersenkende Wirkung von Proinsulin an nephrektomierten nüchternen Ratten zu verschiedenen Zeiten nach subcutaner Applikation*

Proinsulin wurde 1 Std nach der Operation s.c., Trasylol unmittelbar nach der Operation i.p. injiziert. Der Nullwert wurde 1 Std nach der Operation bestimmt.  $n = 5$

Dosis/kg	Blutglucose in mg/100 ml $\pm$ ls				
	0	30	60	90	120 Min. n. Appl.
Kontrolle	70 $\pm$ 12	66 $\pm$ 9.5	59 $\pm$ 8.1	59 $\pm$ 10	60 $\pm$ 9.4
4.1 nmol Proinsulin s.c.	69 $\pm$ 6.8	<u>53 <math>\pm</math> 6.8</u>	<u>33 <math>\pm</math> 2.9</u>	<u>32 <math>\pm</math> 3.4</u>	<u>35 <math>\pm</math> 4.7</u>
4.1 nmol Proinsulin s.c. + 200 000 KIE Trasylol i.p.	76 $\pm$ 5.1	56 $\pm$ 9.7	<u>34 <math>\pm</math> 17</u>	41 $\pm$ 16	42 $\pm$ 16

—  $P < 0.05$   
 =  $P < 0.001$  } gegen Kontrolle

Tabelle 5. *Blutzuckersenkende Wirkung von Insulin und Proinsulin an intakten nüchternen Mäusen zu verschiedenen Zeiten nach subcutaner Applikation.  $n = 7$*

Dosis/kg s.c.	Blutglucose in mg/100 ml $\pm$ ls			
	0	30	60	90 Min. n. Appl.
Kontrolle	68 $\pm$ 10	112 $\pm$ 20	135 $\pm$ 23	164 $\pm$ 24
1.8 nmol Insulin	64 $\pm$ 7.5	<u>76 <math>\pm</math> 13</u>	<u>89 <math>\pm</math> 29</u>	<u>119 <math>\pm</math> 37</u>
3.7 nmol Insulin	71 $\pm$ 8.4	<u>63 <math>\pm</math> 11</u>	<u>48 <math>\pm</math> 13</u>	<u>69 <math>\pm</math> 26</u>
7.3 nmol Insulin	65 $\pm$ 11	<u>34 <math>\pm</math> 2.6</u>	<u>30 <math>\pm</math> 6.4</u>	<u>37 <math>\pm</math> 8.5</u>
4.1 nmol Proinsulin	70 $\pm$ 7.5	93 $\pm$ 16	113 $\pm$ 24	136 $\pm$ 26
8.2 nmol Proinsulin	78 $\pm$ 9.2	94 $\pm$ 40	<u>99 <math>\pm</math> 30</u>	<u>111 <math>\pm</math> 45</u>
16.5 nmol Proinsulin	72 $\pm$ 14	<u>61 <math>\pm</math> 21</u>	<u>53 <math>\pm</math> 5.8</u>	<u>57 <math>\pm</math> 13</u>

—  $P < 0.05$   
 =  $P < 0.01$   
 =  $P < 0.001$  } gegen Kontrolle

der Abb. 1, so könnte Proinsulin an nephrektomierten Tieren eher wirksamer sein als bei den intakten. Die Niere ist also für die Umwandlung des Proinsulins zum aktiven Produkt nicht verantwortlich. Durch sie geht Proinsulin und Insulin, wie RUBENSTEIN et al. [5] zeigten, im Harn verloren.

Zu der Frage, ob Trasylol-hemmbar Proteinase an der Umformung von Proinsulin beteiligt sind, haben wir Trasylol und Proinsulin kombiniert verabfolgt: zunächst erhielten die Tiere 200 000 KIE Trasylol/kg i.p., 60 Min. später das Proinsulin s.c. Wie die Werte der Tabelle 4 demonstrieren, bleibt die Proinsulinwirkung unter Trasylol unverändert. Dieser „negative“ Befund berechtigt allerdings nicht zu der Schlußfolgerung, daß Proteinase an der Proinsulinumwandlung nicht beteiligt sind. Die Hemmwirkung des Trasylol ist mög-

plexus handeln. — Subcutane Injektionen von 1.8, 3.7 bzw. 7.3 nmol/kg Insulin s.c. senken den Blutzucker dosisabhängig (Tabelle 5). Die kleinste applizierte Dosis Proinsulin, 4.1 nmol/kg, beeinflusst die Blutglucose nicht signifikant. Die Erhöhung der Dosis auf 8.2 bzw. 16.5 nmol/kg Proinsulin führt zu einer dosisabhängigen Verminderung der Glucose im Blut. 16.5 nmol/kg Proinsulin sind ungefähr ebenso wirksam wie 3.7 nmol/kg Insulin. — Das Wirkungsverhältnis Insulin:Proinsulin ist 1:4.

### 7. Alloxandiabetische nüchterne Mäuse

Der erhöhte Blutzucker alloxandiabetischer Mäuse wird durch 5.5 nmol/kg Insulin s.c. innerhalb einer Stunde sehr stark vermindert (Tabelle 6). Proinsulin führte in einer Dosierung von 12.4 nmol/kg s.c. eben-

falls zu einer signifikanten, aber nicht so ausgeprägten Hypoglykämie. Die doppelte Dosis Proinsulin, nämlich 24.7 nmol, sind eine Stunde nach ihrer Injektion nicht stärker wirksam. Alloxandiabetische Mäuse sind sowohl gegen Insulin als auch Proinsulin sehr empfindlich. Auffällig ist die größere Streuung der Proinsulinwerte (s. Tab. 6, 60-Min.-Werte).

Tabelle 6. *Blutzuckersenkende Wirkung von Insulin und Proinsulin an alloxandiabetischen nüchternen Mäusen nach subcutaner Applikation. n = 6*

Dosis/kg s.c.	Blutglucose in mg/100 ml $\pm$ ls	
	0	60 Min. n. Appl.
Kontrolle	450 $\pm$ 45	380 $\pm$ 59
5.5 nmol Insulin	410 $\pm$ 30	<u>66 <math>\pm</math> 22</u>
12.4 nmol Proinsulin	418 $\pm$ 80	<u>137 <math>\pm</math> 123</u>
24.7 nmol Proinsulin	504 $\pm$ 36	<u>171 <math>\pm</math> 98</u>

—  $P < 0.01$  } gegen Kontrolle  
 =  $P < 0.001$  }

#### Diskussion

STEINER et al. [9] zeigten, daß die Biosynthese des Insulins über Proinsulin führt. Proinsulin kann aber nur in geringen Mengen aus kristallinem Insulin [6, 7, 1] gewonnen werden. Das Pankreas enthält und sezerniert offenbar überwiegend biologisch aktives Insulin und relativ wenig Proinsulin. Dementsprechend ist zu folgern, daß die Herausspaltung des aus 29

solches sowohl an *isolierten* Fettzellen als auch am *isolierten* Froschmuskel praktisch keine insulinartige Wirkung hat.

Gibt man Proinsulin *intakten Tieren*, so erhält man, wie wir zeigen konnten, eindeutige Senkungen des Blutzuckers. Der Unterschied zum Insulin liegt in einer zeitlichen Verschiebung des Wirkungseintritts und einer geringeren, das Maximum betreffenden Wirkungsintensität. Beides ist aus der Vorstellung heraus verständlich, daß Proinsulin innerhalb einer gewissen Zeit erst zu Insulin umgewandelt werden muß; denn infolge der konstanten Inaktivierungsbedingungen wird bei langsamerem „Anfluten“ aktiven Materials nie die gleich hohe Maximalkonzentration wie bei Gabe eines von vornherein fertigen Insulins erreicht. Für die Richtigkeit dieser Vorstellung sprechen vor allem Befunde über die Wirkung von *in vitro* aktiviertem Proinsulin, die in Tabelle 7 zusammengefaßt sind: während Proinsulin erwartungsgemäß mit deutlicher Latenz wirksam wird, verhält es sich nach vorheriger *in vitro*-Inkubation mit Trypsin genau wie die äquimolare Menge reinen Insulins. (Wegen Substanzmangel konnten die Versuche nur mit *einer* Dosis durchgeführt werden.) Da sich Proinsulin also durch Trypsin vollständig zu aktivem Insulin (Des-Ala-Insulin!) umwandeln läßt, wird infolgedessen auch der Einwand entkräftet, daß die im Vergleich mit Insulin schwächere hypoglykämische Proinsulinwirkung die Folge einer partiellen Denaturierung des benutzten Proinsulins sei. — An welchem Ort injiziertes Proinsulin zu Insulin aktiviert

Tabelle 7. *Blutzuckersenkende Wirkung von Insulin, mit Trypsin inkubiertem Proinsulin bzw. Proinsulin an nüchternen Ratten zu verschiedenen Zeiten nach subcutaner Applikation*

Proinsulin wurde 22 Min. lang bei 37°C in Trispuffer pH 8 inkubiert. n = 6. Zu jedem Zeitpunkt der Blutzuckeruntersuchung wurden jeweils andere Tierkollektive verwendet (s. Methode)

Dosis/kg s.c.	Blutglucose in mg/100 ml $\pm$ ls		
	10	20	30 Min. n. Appl.
Kontrolle	66 $\pm$ 4.7	66 $\pm$ 5.7	63 $\pm$ 4.4
1.8 nmol Insulin	60 $\pm$ 7.2	<u>40 <math>\pm</math> 1.8<sup>b</sup></u>	<u>38 <math>\pm</math> 2.2<sup>a</sup></u>
2.0 nmol mit Trypsin inkub. Proinsulin	<u>58 <math>\pm</math> 4.4</u>	<u>40 <math>\pm</math> 2.0<sup>b</sup></u>	<u>39 <math>\pm</math> 5.7<sup>a</sup></u>
2.0 nmol Proinsulin	65 $\pm$ 8.3	<u>60 <math>\pm</math> 2.6</u>	<u>46 <math>\pm</math> 5.3</u>

—  $P < 0.05$  } gegen Kontrolle  
 =  $P < 0.001$  }  
<sup>a</sup>  $P < 0.05$  } gegen Proinsulin-Gruppe  
<sup>b</sup>  $P < 0.001$  }

Aminosäuren bestehenden und die beiden Insulinketten verbindenden Peptids in den  $\beta$ -Zellen erfolgen muß. Nach STEINER (pers. Mitteilung) ist es in hohem Grade unwahrscheinlich, daß Insulin im pharmazeutischen Herstellungsprozeß aus Proinsulin entsteht.

Für die bereits im Pankreas stattfindende Umwandlung von Proinsulin sprechen auch die von RUBENSTEIN [5] zitierten Befunde, daß Proinsulin als

wird, ließ sich in unseren Versuchen nicht ermitteln. Da Proinsulin auch an *pankreatektomierten* und *alloxandiabetischen* Tieren im gleichen quantitativen Verhältnis zu Insulin wie an Normaltieren wirksam war, kann es offenbar auch extrapankreatisch voll aktiviert werden. Ebenso unabhängig scheint die Umwandlung auch von der Niere zu sein, da Proinsulin an *nephrektomierten* Tieren die volle Wirkung hatte. Sie war eher stärker

als bei intakten Kontrollen, offensichtlich deshalb, weil Insulin und Proinsulin durch die Niere in den Harn eliminiert werden [5]. Mit Sicherheit läßt sich die Niere als *partieller* Umwandlungsort allerdings nicht ausschließen, da die beim nephrektomierten Tier weniger gebildete Insulinmenge durch fehlende Ausscheidung des an anderen Orten entstehenden Insulins kompensiert werden kann.

Leider haben die Versuche an *zweidrittelhepatektomierten* Ratten kein verwendbares Ergebnis gebracht, da die Proinsulinwirkung auch bei diesen Tieren unbeeinträchtigt war, obwohl anzunehmen ist, daß die Leber zur Umwandlung von Proinsulin befähigt ist. Offensichtlich reicht dazu aber ein Drittel des Organs aus. Die Frage müßte unter anderen experimentellen Bedingungen untersucht werden.

Unsere Ergebnisse stehen in scheinbarem Widerspruch zu Äußerungen von RUBENSTEIN et al. [5]. Die Autoren zitieren eine persönliche Mitteilung, nach der Proinsulin im Mäusekrampf test eine „extrem niedrige biologische Wirksamkeit“ hat. Da wir die methodischen Bedingungen der betreffenden Untersuchungen nicht kennen, läßt sich die Diskrepanz schwer beurteilen. Wir möchten aber annehmen, daß deren wesentliche Ursache in der relativ langsamen Entstehung des aktiven Insulins liegt, da ein *schneller* Abfall des Blutzuckers die entscheidende Voraussetzung für das Auftreten eines Insulinschocks ist.

Schließlich möchten wir nicht unerwähnt lassen, daß wir ein weiteres, von SCHMIDT und ARENS [6] isoliertes Peptid aus Rinderinsulin geprüft haben — soweit es die geringe, zur Verfügung stehende Menge erlaubte. Es handelt sich um die „Fraktion b<sub>2</sub>“ [6], bei der die vorher kontinuierliche Aminosäurekette

durch Abspaltung von Lys-Arg an der A-Kette unterbrochen und zweikettig wurde. An nüchternen Ratten senkte dieses Peptid den Blutzucker eine halbe Stunde nach subcutaner Injektion von 10 bzw. 25 nmol/kg signifikant um 12 bzw. 22 Prozent der Kontrollwerte.

#### Literatur

1. CHANCE, R. E., and R. M. ELLIS: Isolation and characterization of porcine proinsulin. *Fed. Proc.* **27**, 392 (1968).
2. COX, W., E. D. HENLEY, and R. H. WILLIAMS: Sulfonylureas and diabetes mellitus. II. Preliminary studies of the mechanism of action. *Diabetes* **5**, 366—371 (1956).
3. HARRIS, J. I., and C. H. LI: The biological activity of enzymatic digests of insulin. *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 2945—2946 (1952).
4. HOFFMAN, W. S.: A rapid photoelectric method for the determination of glucose in blood and urine. *J. biol. Chem.* **120**, 51—55 (1937).
5. RUBENSTEIN, A. H., S. CHO, and D. F. STEINER: Evidence for proinsulin in human urine and serum. *Lancet* **1968 I**, 1353—1355.
6. SCHMIDT, D. D., und A. ARENS: Proinsulin vom Rind. Isolierung, Eigenschaften und seine Aktivierung durch Trypsin. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **349**, 1157—1168 (1968).
7. STEINER, D. F.: Evidence for a precursor in the biosynthesis of insulin. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **30**, 60—68 (1967).
8. —, and P. E. OYER: The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **57**, 473—480 (1967).
9. —, D. CUNNINGHAM, L. SPIGELMAN, and B. ATEN: Insulin biosynthesis: Evidence for a precursor. *Science* **157**, 697—700 (1967).

Dr. W. PULS und Prof. Dr. G. KRONEBERG  
 Institut für Pharmakologie der  
 Farbenfabriken Bayer AG,  
 56 Wuppertal-Elberfeld  
 Friedrich-Ebert-Straße 217