

## GEGENWIRKUNG VON INSULIN UND THYROXIN\*)

von

Nikša Allegretti und Stevan Milković

Die Gegenwirkung der physiologischen Tätigkeit des Insularapparates der Bauchspeicheldrüse und der Schilddrüse ist schon seit langem bekannt. Viele Forscher haben sich bemüht einzelne Fragen dieses Verhältnisses oder das ganze Problem zu lösen. Der Weg der zum erwähnten Ziel führen sollte, ging selbstverständlich auch durch die Untersuchungen von Eigenschaften und Wirkungen der vereinzelt Inkrete, die die genannten Drüsen absondern.

Schon lange wurde von Ducheneau<sup>1)</sup> und Bodansky<sup>2)</sup> beobachtet, dass Thyreoidektomie bei Tieren die Empfindlichkeit gegen Insulin erhöht. Hyperthyreoidismus auch künstlich erzeugt ist dagegen oft mit einer leichten Hyperglykämie begleitet.

Bodansky<sup>3)</sup> prüfte bei der simultanen oder vorhergehenden Injektion von Thyroxin die Geschwindigkeit des durch Insulin verursachten Blutzuckerabfalls und konnte nur eine verzögerte Wiederherstellung der normalen Blutzuckerwerte feststellen. Denselben Effekt beobachteten später auch Housay und Buss<sup>4)</sup>. Wenn dagegen die Thyroxininjektion gegen das Ende der durch Insulin verursachten Hypoglykämie verabfolgt wurde, konnten sie eine unmittelbar folgende Euglykämie nachweisen. Diese Effekte kann man einer durch Thyroxin erzeugten Verarmung der Leber an Glykogen zuschreiben, die aber im zweiten Falle nicht stattfindet. Bei normalen Tieren beobachteten sie ebenso beim Schaf dass nach der Insulinhypoglykämie Thyroxin die Rückkehr des Blutzuckers auf die normalen Werte beschleunigt.

Die Fütterung mit Schilddrüse erzeugt wie manche Autoren bestätigen konnten<sup>5, 6, 7, 8)</sup> eine erhöhte Resistenz gegen die Insulinwirkung. Nach ihren Angaben sind solche durch Insulin erzeugte Blutzuckerkurven im ganzen abgeflacht.

Asher und Okamura<sup>9)</sup> haben Tiere mit Schilddrüse-tabletten gefüttert und den Effekt der Tabletten durch die Anwendung von Insulin und Glukose gedämpft. Ein vermindelter Sauerstoffverbrauch nach Insulinzufuhr bei Basedowkranken bemerkte auch Mayer<sup>10)</sup>.

Die Auffassung von Siegel<sup>11)</sup> besteht darin, dass Thyroxin sowie Insulin ihre Wirkung auf die Leberzelle selbst ausüben

\*) Vortrag gehalten in der Gesellschaft für Exper. Medizin in Zagreb, am 5. Dezember 1949.

Er beobachtete auch bei Thyreotoxikose eine Verzögerung der durch Insulin ausgelösten Hypoglykämie. Gesunde Menschen, die Thyroxin bekommen hatten, zeigten eine Stunde später mit Insulin behandelt auch eine verzögerte Erniedrigung des Blutzuckerwertes.

Was den Mechanismus dieser Wirkung betrifft sind die Befunde von Althausen und Stockholm<sup>12)</sup> merkwürdig. Diese Autoren haben bestätigt, dass das Schilddrüsenhormon im Darmapparat die Resorption von Dextrose, Galaktose, Stärke und Oleinsäure verstärkt.

Es ist bekannt, dass Thyroxininjektionen einen Glykogenabfall in der Leber und im geringeren Ausmass auch im Muskel verursachen. Solche und ähnliche Ergebnisse führten zum Schluss, dass nicht nur der Angriffspunkt von Hormonen, sondern auch der Hormonantagonismus auf Stoffwechsel stattfindet.

Der thyroide und metathyroide Diabetes mellitus sind nach Houssey<sup>13)</sup> Ausdrücke einer reversiblen und irreversiblen Schädigung der  $\beta$ -Inselzellen von Pankreas durch die Schilddrüse. Der erste besteht aus extrapankreatischen Störungen wie: erhöhte Glukoseabsorption, Abfall des Leberglykogens, erhöhte Resistenz auf Insulin, erhöhter Grundumsatz und erhöhte Labilität auf Ketonämie und Ketonurie. Das zweite weist neben diesen Erscheinungen auch eine Hyperglykämie bedingt durch eine irreversible Schädigung der  $\beta$ -Inselzellen auf.

Um das Problem auch von chemischer Seite zu beleuchten soll man einige Eigenschaften der genannten Substanzen Thyroxin und Insulin in Betrachtung ziehen. Wie wir beobachtet haben<sup>14)</sup>, reagiert Thyroxin wahrscheinlich mit Thrombin indem es die durch Thrombin ausgelöste Fibrinogengerinnung verzögert. Es ist nicht bewiesen, dass Thrombin Disulfidgruppen in seinem Molekül besitzt aber voraussetzend, dass Thyroxin eben mit diesen Gruppen reagiert, sollte sich derselbe Effekt mit Insulin wiederholen.

Wie schon bekannt, besitzt reduziertes Insulin keine Fähigkeit Blutzucker zu erniedrigen<sup>15, 16)</sup> und viele Reduktionsmittel zerstören seine Wirksamkeit. Niemann und Redemann<sup>17)</sup> haben festgestellt, dass nur diejenigen Thyroxinanaloge thyroxinartige Eigenschaften besitzen, die imstande sind sich chionid umzusetzen und dass ihre Wirksamkeit abhängig von der Einstellung des Gleichgewichtes ist d. h. »vom Redoxpotential des Systems als ganzes«.

Damit haben die erwähnten Autoren die Befunde von manchen anderen Forschern bestätigt und erweitert. Die vorhergegangenen Arbeiten von Gaddum<sup>18)</sup> verdienen eine besondere

Aufmerksamkeit. Er hat gezeigt dass Thyronin,  $\beta\beta$ -Di(3,5-dijod-4-hydroxyphenyl)-alanin und 3,5-Dijodtyrosin ohne irgendeinen Einfluss auf die Kaulquappenmetamorphose und auf den Sauerstoffverbrauch der Raten sind. Er verlangte, dass eine Verbindung, um thyroxinartige Wirksamkeit zu entfalten, in ihrem Molekül das Sauerstoffatom zwischen zwei Phenolringen als Ether, vier Jodatome (in jedem Phenolring auf 3,5-Stelle) und auf einem Ring Alanin in para-Stellung besitzt.

Endlich haben Frieden und Winzler<sup>19)</sup> ebenfalls mit dem Kaulquappenmetamorphosetest gezeigt, dass diejenigen Verbindungen thyroxinartige Wirksamkeit besitzen, die orthodihalogenphenoldiphenylethersche Konfiguration, eine Hydroxylgruppe in ortho- oder para-Stellung bezüglich des Ethersauerstoffs und eine Seitenkette (ohne eine genaue Beschreibung) besitzen.

Voraussetzend dass das Thyroxin imstande ist als Reduzens die noch unbewiesenen Disulfidgruppen in Thrombin zu reduzieren, wollten wir dies auch mit Insulin prüfen. Roche und Michel<sup>20)</sup> haben gezeigt, dass in tierischen hypertrophierten Schilddrüsen der Cystingehalt mit dem sinkenden Thyroxingehalt parallel verläuft.

Es ist ganz klar, dass solch eine Vereinfachung der Problemlösung nicht imstande ist, das ganze Problem zu umfassen, aber auf diesem Wege arbeitend hofften wir, dass viele Ereignisse in diesem Hormongegenspiel aufs Licht gebracht werden könnten.

### Versuchsanordnung und Ergebnisse

Die Versuche führten wir mit dem amorphen Insulin (»Pliva«<sup>\*)</sup>) der 20 internationale Einheiten in 1 mg enthielt durch. Vom Hormon wurde eine 0,5<sup>0</sup>/oige Lösung im gepufferten Wasser pH 8 angefertigt.

Thyroxin, das wir benutzt haben, war dl-Thyroxin (Roche) in einer  $0,5 \times 10^{-3}$  molaren Lösung die auch im gepufferten Wasser bei pH 8 gelöst wurde.

Die Molarität von Insulin (unter der Voraussetzung dass seine Molekulargewicht 35000 beträgt) war ungefähr zwölf mal kleiner als jene von Thyroxin. Die Rechtfertigung dafür fanden wir in der Behauptung von Sangre<sup>21)</sup>, nach der ein Insulinmolekül sechs Disulfidbrücken besitzt. Zwei Moleküle von Thyroxin, aber, haben die Fähigkeit, nach unseren Vorstellungen mit einer Disulfidbrücke des Insulinmoleküls zu reagieren.

\*) Wir sprechen Herrn Dr. Ing. M. Piantanida von der Arzneimittelfabrik »Pliva«, der uns das Insulin für unsere Untersuchungen zu Verfügung gestellt hat, auch an dieser Stelle unseren Dank aus.

Für biologische Versuche haben wir dasselbe Insulinpräparat benützt, dass wir gelöst haben in der Weise, dass 1 ccm 0,4 Einheiten enthielt. Thyroxin »Roche« in Ampullen war in 1%iger Konzentration.

Die biologischen Versuche führten wir mit Meerschweinchen von cca 200 g Körpergewicht durch. Blut für die Blutzuckerbestimmung haben wir aus dem Herz entnommen indem wir »Liquoid« (Roche) in Pulver als antikoagulans benützt haben. Nach der Methode von Haagedorn und Jensen bestimmten wir die Blutzuckerwerte.

Zuerst wiederholten wir mit Insulin die Versuche, die wir schon mit Thrombin durchgeführt hatten. Wir stellten neun Proben ein, die aus 2 ccm Insulinlösung und 2 ccm Thyroxinlösung von pH 8 bestanden. Je fünfzehn Minuten titrierten wir eine Probe. Die erste Probe titrierten wir sobald wir die Mischung eingestellt hatten. Vor der Titration wurde die Mischung mit 0,5 ccm Eisessig angesäuert. Dabei fiel Thyroxin aus der Lösung. Parallel stellten wir auch Kontrollproben ein, die aus Insulin oder Thyroxin allein bei demselben pH bestanden. In der Mischung bestimmten wir mit einer centinormalen Thiosulfatlösung rücktitrierend unter der Zugabe einer centinormalen Jodlösung in Überschuss die entstandenen reduzierten Gruppen im System. Die Kontrollproben führten wir durch um eventuelle Fehler auszuschliessen, unter der Annahme dass Insulin in einer alkalischen Lösung reduziert wird. Die Ergebnisse sind in der Tabelle I. dargestellt. Die Zahlen bezeichnen Kubikcentimeter der verbrauchten centinormalen Jodlösung nach dem Zusammenstehen von 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 und 120 Minuten.

Tabelle I

	ccm der verbrauchten $\frac{n}{100}$ Jodlösung nach Minuten:								
	0	15	30	45	60	75	90	105	120
Thyroxin	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Insulin	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Insulin + Thyroxin	0	0,021	0,058	0,082	0,171	0,160	0,165	0,173	0,169

Wie aus der Tabelle I. und Abb. 1. ersichtlich ist, entsteht im System eine Reduktion, die sich im vermehrten Verbrauch der Jodlösung äussert. Dass es sich dabei um eine Reduktion

von Disulfidbrücken handelt, konnten wir mit dem Nachweis der entstandenen Sulfhydrylgruppen mittels der Nitroprussidreaktion bestätigen.

Die Kontrollproben zeigen, dass dies keine Wirkung der alkalischen Reaktion auf Insulin ist.

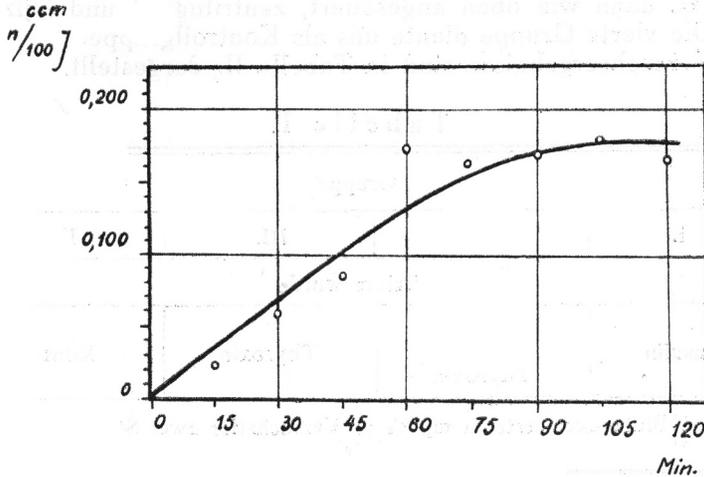


Abb. 1.

Die Ordinate bezeichnet den Verbrauch der centinormalen Jodlösung in Kubikcentimeter, die Abszisse die Berührungsdauer von Insulin mit Thyroxin in Minuten (siehe Text).

Nach diesen Versuchen können wir uns der früheren Behauptungen zuwenden, dass Thyroxin im Falle einer unmittelbarer Berührung auf das Insulin als Reduzens wirkt.

Nach früheren Angaben wird Insulin nach Berührung mit einem Reduzens reduziert und dabei auch inaktiviert. Den obigen Ergebnissen zufolge muss man sich fragen, ob nach einer solchen Thyroxinwirkung in vitro, Insulin ebenso in seiner Tätigkeit inaktiv wird.

Um das zu prüfen, haben wir Versuche mit Meerschweinchen durchgeführt indem wir bei ihnen die Erniedrigung der Blutzuckerwerte zwei Stunden nach der Verabfolgung von Insulin, Thyroxin oder einer Mischung beider bestimmten.

Der ersten Gruppe von Meerschweinchen haben wir subkutan Insulin injiziert, das vorher zwei Stunden lang bei Zimmertemperatur und pH 8 stand. Die Hormonlösung enthielt 0,4 Einheiten pro 1 ccm. Vor der Anwendung wurde die Lösung mit Eisessig bis zum pH 3,5 angesäuert.

Die zweite Gruppe bekam eine gleiche Menge von Insulin, das vorher unter denselben Bedingungen als oben diesmal aber

mit Thyroxin inkubiert wurde. Beim Ansäuern fiel das Thyroxin aus, die Lösung wurde zentrifugiert und die oberstehende Flüssigkeit injiziert.

Die dritte Gruppe bekam Thyroxin im gleichen Ausmasse wie die zweite, nur wurde diesmal das Thyroxin mit Wasser inkubiert, dann wie oben angesäuert, zentrifugiert und injiziert.

Die vierte Gruppe diente uns als Kontrollgruppe.

Versuchsergebnisse sind in Tabelle II. dargestellt.

Tabelle II

Gruppe			
I.	II.	III.	IV.
injiziert wurde			
Insulin	Insulin + Thyroxin	Thyroxin	Kontrolle
Blutzuckerwerte in mg % je Versuchstier zwei Stunden nach Injektion			
52	63	68	110
97	144	80	108
47	175	93	113
41	84	66	108
104	143	92	88
54	109	124	127
70	88	94	94
73	139	134	92
70	108	89	94
87	145	97	
72	63	100	
88	132	92	
81	134		
	86		
71,5±5,3*)	115,2±8,6*)	94,1±5,7*)	103,8±4,2*)

Das stark ausgeprägte P berechnet für die Werte der Gruppe I. und IV. bestätigt uns die bekannte Tatsache, dass nämlich Insulin auf Blutzucker erniedrigend wirkt. Bei der Errechnung von P für die I. und II. Spalte der Tabelle II. bekommt man wieder P stark ausgeprägt ( $P < 0,001$ ) was unsere Voraussetzung von der Inaktivierung von Insulin durch Thyroxin unzweifelhaft

\*) Standardfehler

bestätigt. Abbildung 2. stellt diese Ergebnisse graphisch dar. Zwischen den Werten der Spalten II., III. und IV. besteht dagegen kein augenscheinlicher Unterschied, obwohl man nach dem ersten Blick denken könnte, dass das Thyroxin allein die Blutzuckerwerte erniedrige, mit Insulin aber dieselben erhöhe.

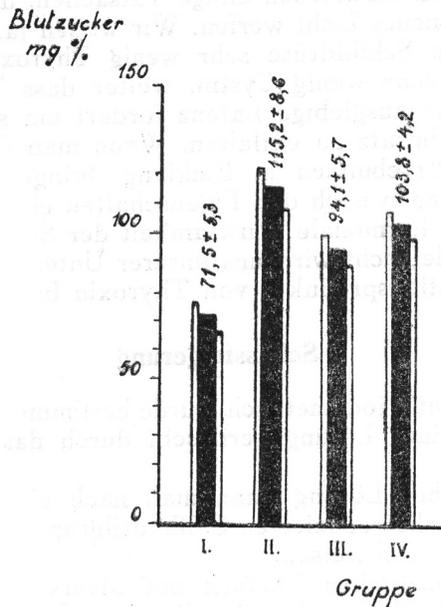


Abb. 2.

Inzwischen ist Thyroxin nie einverleibt geworden weil die Lösung vor der Injektion angesäuert und zentrifugiert wurde und der Niederschlag bestehend aus unlöslichem Thyroxin verworfen wurde.

### Besprechung der Ergebnisse

Nach den beschriebenen Versuchen kann man behaupten, dass Insulin in Berührung mit Thyroxin reduziert und damit auch in seiner Wirkung inaktiviert wird. Diese Reduktion spielt sich an den Disulfidgruppen ab, was aus dem Auftritt der positiven Nitroprussidreaktion im System bestehend aus Insulin und Thyroxin geschlossen werden kann. Zum Schluss könnten wir nach einer groben Analogie mit unseren Resultaten mit Thrombin<sup>13)</sup>, sagen, dass Thyroxin die Fähigkeit besitzt im Eiweissmolekül die Disulfidbrücken zu spalten und zu reduzieren.

Es kann an dieser Stelle auch die Frage nach dem Schicksal des Thyroxin gestellt werden. Die Antwort ist dieselbe wie sie in unserer Arbeit über Thrombin formuliert wurde.

Die erwähnten Ergebnisse von Roche und Michel können nach unseren Angaben sehr plausibel erklärt werden.

Es bestehen inzwischen einige Tatsachen, die auf das Problem ein ganz neues Licht werfen. Wir wissen ja, dass die überfunktionierende Schilddrüse sehr wenig Thyroxin enthält und parallel auch sehr wenig Cystin, weiter dass Thyroxin wenn einverleibt eine ausgiebige Latenz fordert um seine Wirksamkeit auf den Umsatz zu entfalten. Wenn man diese Tatsachen mit unseren Ergebnissen in Einklang bringen wollte, dann müsste man fragen nach den Eigenschaften eines aktiven Prinzip das für die hormonale Wirksamkeit der Schilddrüse verantwortlich ist. Vielleicht wird uns unserer Untersuchungsweg eben auf die Oxydationsprodukte von Thyroxin bringen.

### Schlussfolgerung

1) Quantitativ jodometrisch wurde bestimmt, dass Insulin mit Thyroxin in einer Lösung vermischt durch das letztere reduziert wird.

2) In solcher Lösung kann man nach einem kurzem Zusammenstehen die reduzierten Sulfhydrylgruppen mit der Nitroprusidreaktion nachweisen.

3) Im biologischen Versuch mit Meerschweinchen wurde unzweifelhaft bestätigt, dass Insulin nach Berührung mit Thyroxin seine Wirksamkeit eingebüsst hat.

### LITERATUR

- 1) Duchenu L., Rev. Asoc. med. Argent., 36, 944 (1923), (nach loc. cit. 13).
- 2) Bodansky A., Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 20, 538 (1922).
- 3) Bodansky A., Amer. J. Physiol., 69, 498 (1924).
- 4) Houssay, B. A. und Busso R., C. R. Soc. Biol., 91, 1037 (1924).
- 5) Marks H. P., J. Physiol., 60, 402 (1925).
- 6) Burn J. H. und Marks H. P., J. Physiol., 60, 131 (1925).
- 7) Magenta M. A. und Biasotti A., C. R. Soc. Biol., 89, 1125 (1920).
- 8) Ehrismann O., Arch. exp. Pathol. Pharm., 121, 299 (1927).
- 9) Asher R. und Okamura T., Biochem. Z., 176, 325 (1926).
- 10) Meyer H., Z. klin. Med., 102, 250 (1926).
- 11) Siegel R., Klin. Wschr., 8, 1069, 1655 (1929).
- 12) Althausen T. L. und Stockholm M., Amer. J. Physiol., 123, 755 (1938).
- 13) Houssay B. A., Accion de la tiroides sobre el metabolismo de los hidratos de carbono y en la diabetes. Buenos Aires 1945.

- <sup>14)</sup> Allegretti N., Buta S. und Milković S., Arhiv kem. 22, 207 (1950).
- <sup>15)</sup> Freudenberg K., Dürscherl W. und Eyer H., Z. physiol. Chem., 187, 89 (1930).
- <sup>16)</sup> Freudenberg K. und Wegmann T., Z. physiol. Chem., 233, 189 (1935).
- <sup>17)</sup> Niemann C. und Redemann C. E., J. Amer. Chem. Soc., 63, 1549, 2685 (1941).
- <sup>18)</sup> Gaddum J. H., J. Physiol., 64, 246 (1927).
- <sup>19)</sup> Frieden E. und Winzler R. J., J. Biol. Chem., 176, 155, (1948).
- <sup>20)</sup> Roche J. und Michel R., Biochem. et Biophys. Acta, 1, 335 (1947).

PHYSIOLOGISCHES INSTITUT  
MEDIZINISCHE FAKULTÄT  
ZAGREB, KROATIEN

Eingegangen am 9. Juni 1950.

## IZVOD

### Međusobno djelovanje inzulina i tiroksina

Nikša Allegretti i Stevan Milković

Pretpostavivši da tiroksin reagira sa disulfidnim skupinama trombina, ponovili smo pokuse sa inzulinom, za koji je dokazano, da u svojoj molekuli sadrži disulfidne mostove i da je njegova aktivnost o njima ovisna.

Pokazalo se, da se inzulin stajanjem sa tiroksinom reducira, i kod titracije troši to više joda, što je dulje stajao u dodiru sa tiroksinom.

Što se tiče aktivnosti takovog inzulina, proveli smo na zamorcima pokuse, koji su pokazali, da inzulin stajanjem sa tiroksinom in vitro gubi potpuno svoju aktivnost ( $p < 0,001$ ).

ZAVOD ZA FIZIOLOGIJU  
MEDICINSKI FAKULTET  
ZAGREB

Primljeno 9. lipnja 1950.