

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Freien Universität,
Berlin, Deutschland.

(Direktor: Prof. Dr. H. Bartelheimer)

INSULIN ALS ANTIGEN. III

Experimenteller Teil

Von

HERMANN MICHEL

1. SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN

Koordinierung und Vergleich der serologischen und immunbiologischen Arbeiten über den Nachweis, die Bedeutung der Antigen-Antikörperreaktion bei Entwicklung und Verlauf eines insulinresistent gewordenen Diabetes sind durch mehrere Umstände erschwert.

1. Auf die *Begriffsbestimmung* des insulinresistenten, -refraktären oder erhöht insulinbedürftigen Diabetes wurde bereits im klinischen Teil eingegangen. Die Auffassung über die Stoffwechselanomalien im Verlauf der Zuckerkrankheit hat grossen Einfluss auf die Systematik und Methodik der angewandten Untersuchungstechnik. Mit anderen Worten, der Insulinserologie wird nicht von allen Autoren, die sich mit diesen Fragenkomplexen beschäftigen, bei der Abwägung pathogenetischer Momente der Insulinresistenz der ihr gebührende Wert zuerkannt.

2. Empfindlichkeit, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der angewandten serologischen Methoden differieren sehr.

3. Es wird kein einheitlicher zeitlicher Abstand für die Durchführung der Reaktionen nach der letzten vorhergehenden Insulin-Injektion eingehalten und die Vorperiode nicht genügend berücksichtigt.

4. Es ist von Bedeutung, bei allen Versuchen die gleiche Antigenkonzentration anzuwenden. Antigenmengen, die weit oberhalb der physiologischen Schwankungsbreite der experi-

mentell ermittelten Insulinkonzentration liegen, entsprechen nicht der zu erwartenden Antikörperkonzentration und können daher negative serologische Reaktionen reproduzieren.

Für unsere serologischen Untersuchungen wandten wir die *passive Hämagglutination* und die *Komplementbindungsreaktion* an.

A. *Boyden-sche Hämagglutination.*

Middlebrook & Dubos inkubierten Tuberkulin-sensibilisierte Hammelerythrocyten mit dem Serum Tuberkulöser und konnten Agglutination der beladenen Erythrocyten beobachten. In Fortführung dieser Arbeiten überzog *Boyden* Hammelerythrocyten mit einem Tanninsäurefilm. Der *Adsorptionsprozess der Proteinantigene* an der *Oberfläche der tanninisierten Erythrocyten* läuft in zwei Phasen ab. Durch die Tanninsäure kommt es zu einer Art von „Aufrauhung“, d.h. Eiweissgerbung, -fällung und von osmotischen Veränderungen an der Erythrocytenoberfläche, an die sich die Proteinmoleküle anlagern. Zu den tanninisierten, antigenbeladenen Erythrocyten wird in der 2. Phase antikörperhaltiges Serum in Reihenverdünnungen gegeben. Bei Abbindung von Antigen und Antikörper kommt eine wechselnd starke Agglutination zustande, die sich makroskopisch oder mikroskopisch mit dem Agglutinoskop ablesen lässt. Da die *Erythrocytenagglutination* den Indikator einer stattgehabten Antigen-Antikörperbindung darstellt, wurde sie als *passiv* oder *indirekt* bezeichnet.

Stavitsky hat mehrere *Faktoren* angegeben, die die Hämagglutinationen in ihrer *Empfindlichkeit* und *Spezifität* beeinflussen können.

1. Die optimale *Fremderythrocyten-Menge* und *-Konzentration* beträgt 0,05 ml. Je grösser erstere ist, umso niedriger ist nach *Stavitsky* der Grenz-Agglutinationstiter. Da wir jedoch keine Titerunterschiede bei Versuchen mit verschiedenen Erythrocytenmengen feststellen konnten und viel Material für die mehrfachen Verdünnungsreihen benötigten, wurden (in Anlehnung an *Scheiffarth & Frenger*) einheitlich 0,25 ml ausgewählt.

2. *Grösse* bzw. *Durchmesser* der *Teströhrchen* sind für die Versuchsergebnisse belanglos. Jedoch ist auf eine gleichmässige Bodenrundung derselben besondere Sorgfalt zu verwenden.

3. *Temperaturunterschiede* können nach *Stavitsky* die Hämagglutinationsergebnisse nicht sichtlich beeinflussen, sodass die Reaktionsgemische grundsätzlich bei Zimmertemperatur angesetzt wurden.

4. *Stavitsky* liest, entsprechend den Angaben in seiner neuesten Mitteilung, das Agglutinationsergebnis das erstmal nach *drei Stunden* und dann nochmal *12 bis 19 Stunden* später ab. Innerhalb dieser Zeitspanne trat im allgemeinen keine Hämolyse ein.

5. Die *Antigenkonzentration* kann Empfindlichkeit und Spezifität der Reaktion wesentlich beeinflussen. Die Gesichtspunkte, die uns bei der Auswahl der in den Versuchen angewandten Insulin-Konzentrationen leiteten, werden bei Beschreibung der Technik im einzelnen ausinandergesetzt.

Scheiffarth, Frenger, Berg & el Raheb untersuchten die Beeinflussung der Hämagglutination durch einzelne Serumproteinfraktionen und verglichen die Heterohämagglutination (*Hanganatziu-Deicher*) mit der *Boyden'schen* Hämagglutination und dem Verfahren nach *Waaler & Rose*. Während die letztere Reaktion in ihrer Empfindlichkeit durch Verschiebungen im Bluteiweissbild nicht beeinträchtigt wurde, kam es bei den ersteren Reaktionen zu Titererhöhungen bei Vermehrung der β_2 - und γ -Globuline, dagegen zur Abnahme bei Anstieg der α_1 -Fraktion. Das beweist auch die neueste Arbeit von *Scheiffarth, Frenger & Moeckel*, dass es bei Erkrankungen mit Verschiebung des Eiweisspektrums in Richtung der grobdispersen Phase im Sinne einer Dysproteinämie zu einer Proteinanlagerung an die Erythrocytenoberfläche kommt und dass es daher bei Diabetikern mit komplizierenden chronischen Erkrankungen zu pseudopositiven Hämagglutinationen kommt. Es sind daher Serumlabilitätsproben und die Elektrophorese für die Beurteilung der Hämagglutinationen von Wichtigkeit, falls neben dem Diabetes chronische Erkrankungen vorliegen, die entweder Komplikationen desselben darstellen oder parallel zu diesem ablaufen.

Bezüglich der *Technik* haben wir uns im wesentlichen an die Angaben von *Boyden, Borduas & Grabar* sowie *Stavitsky* angelehnt.

Stavitsky stellt eine 1 : 40 Verdünnung des *Erythrocytenzentrifugats* mit dem *Soerensen-Puffer* (pH 7,2) her; während letztere Erythrocytensuspension bei 5° C 2–3 Tage lang ohne stärkere Hämolyse haltbar ist, eine Verwendung jedoch innerhalb einer Frist von 18–24 Stunden nach *Stavitsky* angebracht erscheint, erlaubt die Verdünnung des Eryth-

rocytenbreis mit der obigen *Alsever*-Lösung eine schadloße Konservierung, sowohl nach Ansicht von *Scheiffarth & Frenger* als auch nach unseren Erfahrungen, für etwa 3 Wochen im Eisschrank. Die von uns angesetzte Erythrocytensuspension war ein 3 %iges Konzentrat. Während die prozentuale Verdünnung keinen ersichtlichen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Hämagglutinationen ausübte, beträgt die optimale Flüssigkeitsmenge der Erythrocytensuspension im gesamten Ansatz nach *Stavitsky* 0,05 ml. Damit wurden die besten Agglutinationsergebnisse erzielt. Auf die Bedeutung des verwandten Glasmaterials bezüglich der Bodenrundung wurde bereits oben hingewiesen. Bei Verwendung einer prozentuell genau eingestellten Erythrocytenverdünnung ist es nicht notwendig, eine Auszählung der roten Blutkörperchen durchzuführen, wie sie z.B. *Rauss & Kety* bei ihren Bakterienhämagglutinationen für erforderlich erachteten. Diese Autoren benutzten Erythrocytenbrei mit einer Konzentration von 400 000 Zellen pro cmm und stellten mit der Spiralöse nach *Takatsy* Verdünnungsreihen her.

Die *Tanninisierung der Hammelerythrocyten* wurde im Brutschrank bei 37° C während 20 min. durchgeführt, indem gleiche Teile der beiden Reaktionskomponenten, der Erythrocytensuspension und der Tanninsäure, zusammengegeben wurden. Zur Tanninisierung der roten Blutkörperchen wurde *Tannin DAB 6* (E. Merck, Darmstadt) verwandt. Als Stammlösung diente eine Verdünnung 1:100 in phys. Kochsalzlösung. *Boyden* hat speziell für seine Tuberkulinhämagglutinationen Verdünnungen von 1:15000, 20000, 80000 und 320000 angegeben, für die passive Hämagglutination zum Nachweis von Protein-Antikörpern hat sich die Standardverdünnung von 1:20000 bewährt. Nach der Tanninisierung wurde die überstehende Flüssigkeit abpipettiert, es erfolgte nochmaliges Waschen, um die letzten und nicht abgebundenen Tanninsäurereste zu entfernen.

Es wurde schon betont, dass die *Antigenverdünnungen* zum experimentellen Antikörpernachweis sich im Rahmen der physiologischen Konzentrationen bewegen sollen, wie sie bei natürlicher Sensibilisierung aufzutreten pflegen. Die Antigenkonzentrationen sind oft nicht exakt messbar. In unserem Falle sind auf Grund von Isotopenversuchen und der Rattenzwerchfellmethode gewisse Anhaltspunkte gegeben, dass die Insulinkonzentration um einen Mittelwert von 10^{-3} E/ml bzw. 10^{-4} E/ml Plasma schwankt. Als Stammlösung wurde reinstes, 5–7mal rekristallisiertes und glukagonfreies Insulin von Rind, Schwein und Pferd verwandt. Zwei Arbeiten von *Lapresle & Grabar* aus dem Pasteurinstitut (Paris) zeigen, dass auf den Reinheitsgrad der für die Hämagglu-

tion verwandten Insulinchargen grosser Wert zu legen ist. Die *Boyden'sche* Hämagglutinationstechnik mit Tanninisierung der Erythrocyten erlaubt mit ihrer starken Empfindlichkeit, die grösser ist als die Methodik mit bis-diazotiertem Benzidin, den Nachweis von antigen wirkenden Unreinheiten, die dann zu pseudopositiven Reaktionen im Serum hochinsulinierter Diabetiker führen können. Es ist daher notwendig glukagonfreies und mehrfach rekristallisiertes speciesspezifisches Insulin für die Untersuchungen heranzuziehen. Die Konzentration dieser *Insulinausgangslösung* betrug 1,77 mg Insulin als Substanz mit einem Wirkungseffekt von 40 E; es wird dabei vorausgesetzt, dass 1 mg kristallines Insulin wirkungsmässig 22,5 E entspricht. Auf Grund dieser Ueberlegungen wurden Antigenverdünnungsreihen mit den Stufen 1 : 200, 400, 600, 1200, 1600 und 2000 angesetzt und Zwischenverdünnungen (1 : 300, 500, 700 und 900) dann herangezogen, wenn man mit dem Agglutinations- bzw. Hämolysephänomen in diesen Bereichen zu rechnen hatte. Mit diesen Verdünnungsstufen kommt man den physiologischen Schwankungen der Insulinämie, wie sie nach der Nahrungsaufnahme auftreten, wohl am nächsten.

Das auf Antikörper zu untersuchende *Patientenserum* wurde $\frac{1}{2}$ Stunde im Wasserbad bei 56° C inaktiviert. Für das Serum wurden die Verdünnungen 1 : 2, 5, 10, 20, 40, 80 usw. gewählt. Da die gleichen Verdünnungsstufen des Patientensersums auch für die stets parallel laufende quantitative und abgestufte Komplementbindungsreaktion nach der *Kolmer-Technik* gewählt wurden, war eine gewisse Vergleichsmöglichkeit der bei beiden Reaktionen festgestellten Antikörpertiter gegeben.

Nach dem Tanninisierungsprozess der Hammelerythrocyten und der Entfernung nicht abgebundener Tanninsäurereste erfolgt die *Antigenbeladung* mit den obigen Insulinverdünnungen. Die Dauer dieser Antigenexposition wurde mit 30 min. bei 37° C festgesetzt. Auf die von *Scheiffarth & Frenger* angegebene nochmalige Waschung der bereits antigenbeladenen, tanninisierten Erythrocyten, wie sie auch *Boyden* bei den Tuberkulin-Hämagglutinationen vorgeschlagen hat, haben wir verzichtet, da bereits adsorbiertes Insulin durch zu heftige Manipulationen während des Zentrifugierens von der Oberfläche der tanninisierten roten Blutzellen „abgerissen“ werden kann. Die überstehende Flüssigkeit wurde zunächst lediglich abpipettiert und dann durch vorsichtiges, langsames Zentrifugieren (1000 Umdrehungen/min., 15 min. lang) der Rest entfernt.

Die Antiserum-Antigen-Tanninerythrocytenmischung wird 2 Stunden in den Brutschrank gegeben. Die *erste makroskopische Ablesung*

erfolgte nach dieser Zeit, eine *zweite mikroskopische Untersuchung im Agglutinoskop* wurde 12 und 24 Std. nach Aufenthalt im Eisschrank durchgeführt. Bezüglich der Ablesung der Bodensätze ist zu sagen, dass eine sicherere und eindeutigere Beurteilung am nächsten Tag möglich wird. Auch *Boyden* hebt hervor, dass man ein einigermaßen zufriedenstellendes Ergebnis bereits nach 2 Std. erhalten kann, dass aber eindeutigere und klarere Verhältnisse dann vorliegen, wenn man die Testansätze über Nacht im Eisschrank aufbewahrt und am nächsten Morgen abliest. *Stavitsky & Arquilla* legen sich bezüglich der Ablesetermine in ihrer neuesten Arbeit nicht fest und geben einen Zeitraum von 3 bis 12 Stunden bei Aufbewahrung der Verdünnungsreihen bei Zimmertemperatur an. Das von diesen Autoren vorgeschlagene Zentrifugieren zur Reaktionsbeschleunigung ist wohl speziell bei den Insulinversuchen mit Vorsicht nachzuahmen, auch wenn es nur bei 400 Umdrehungen 2 min. lang erfolgen soll. Da gelegentlich schon der Tanninsäurezusatz zu den resuspendierten und noch unbehandelten Erythrocyten eine falsche Agglutination hervorrufen kann, müsste man daran denken, dass bei dem erneuten Zentrifugieren nicht ganz mit Insulin besetzte Erythrocyten nunmehr pseudoagglutinieren.

Die Ablesung erfolgt unter folgenden Gesichtspunkten:

- ++++ kompaktes, granuläres Agglutinat;
- +++ Bodensatz mit eingefalteten und eingerollten Ecken;
- ++ Bodensatz mit aufgerauhten, eingerissenen Abrundungen;
- + scharf begrenzter, dichter Erythrocytenring um einen dünneren schleierigen Bodensatz;
- ± Verkleinerung dieses Rings mit geringerem Durchmesser;
- kleiner, dichter, undurchsichtiger und roter Bodensatz in der Kuppe des Teströhrchens.

Es ist eine in der Serologie bekannte Tatsache, dass die „*provozierende*“ *Antigen-Injektion* (wenn man diesen Ausdruck in diesem Zusammenhang wählen darf) zu einer *Antikörper-Ausschwemmung* aus den Produktionsstätten in den Kreislauf führt. *Berson & Yalow*, die diese Beobachtung mit der Radioisotopentechnik bestätigen konnten, fanden, dass sich bei der Insulinresistenz *zwei Antikörperkomplexe* zu verschiedenen Zeiten, je nach dem Mengenverhältnis des verabreichten Insulins zur Antikörperkonzentration, bilden. Ein hoher Antikörpertiter bindet Insulin sofort quantitativ maximal, es ist kein freies Insulin vorhanden, das in den Geweben seine physiologischen Funktionen ausüben könnte. Wird dagegen Insulin in grösseren Mengen verabreicht

als dem vorhandenen Antikörpertiter entspricht, dann steht ein „überschüssiger“, durch die Antikörper nicht abgebundener Insulinbetrag für den Stoffwechsel zur Verfügung. Da der rasch sich bildende Antigen-Antikörperkomplex auf Grund dieser Radioisotopenversuche auch schnell nach neuerlicher Insulin-Injektion in seine Komponenten dissoziiert, ist es notwendig, bald nach der Insulinverabreichung die serologischen Untersuchungen durchzuführen, um den Zeitpunkt dieser Antigen-Antikörperdissoziation zu erfassen.

Es wurde daher Blut in festgesetzten Zeitabständen nach der morgendlichen Insulin-Injektion, zwischen letzterer und der Nahrungsaufnahme, abgenommen und serologisch untersucht. Als Abnahmezeiten wurden 5, 10, 15, 20 und 30 min. nach der Insulinspritze gewählt. Bei jedem Versuch wurden *Kontrollreihen* in verschiedenen Kombinationen angesetzt, wobei die eine oder andere Reaktionskomponente bei den Ansätzen weggelassen wurde, z. B. die Tanninisierung der Erythrocyten oder deren Insulinbeladung. Ausserdem sind *Vergleichsuntersuchungen* bei Gesunden und mit Seren von rein diätetisch bzw. mit geringen Insulinmengen eingestellten Diabetikern notwendig.

B. *Quantitative Komplementbindungsreaktion.*

Zur *quantitativen Auswertung der Komplementbindungsreaktion* stehen folgende Möglichkeiten zur Verfügung:

1. *Abstufung des Komplements* bei unveränderter Patientenserum-, Antigen und Amboceptormenge;
2. *Abstufung des Patientenserums* bei einheitlicher Komplement-, Antigen- und Amboceptormenge;
3. *Abstufung des Antigens* bei konstanten Mengenverhältnissen von Patientenserum, Komplement und Amboceptor.

Zu den Untersuchungen wurden Verdünnungsreihen von Patientenserum und Antigenkonzentrationen herangezogen. Hammelblut wird vom Tier steril in der *Alsever-Lösung* als Stabilisator aufgefangen, deren pH durch eventuelle Zugabe von Natr.citr. auf 6,1 bis 6,2 eingestellt wurde. Bei dieser Konservierung erwies sich die Blutkörperchenaufschwemmung bis zu 4 Wochen als haltbar und gebrauchsfähig. Der hämolytische Amboceptor und das Meerschweinchenkomplement wurden von den Behringwerken Marburg/Lahn bezogen. Aus bereits dargelegten Gründen haben wir gleiche Insulin- und Patientenserumverdünnungen sowohl beim *Boyden-Test* als auch für die abgestufte Komplement-

bindungsreaktion gewählt, um beide Tests vergleichen zu können. Die Insulinverdünnungen betrugen ebenso 1 : 200, 400, 600 und 800 (der Stammlösung von 1 mg Substanz in 0,562 ml Lösungsmittel), die Verdünnungen des Patientenserums entsprechend dem Hauptversuch nach der *Kolmer-Technik* 1 : 2,5, 5, 10 und 20. *Rausch-Stroomann & Sauer*, die die Komplementbindungsreaktion bei den Immunisierungsversuchen an Tieren anwandten, wählten als Antigen eine Stammlösung mit 0,2 E pro ml in der Verdünnung 1 : 100.

Eine Antigenverdünnungsreihe schien uns vor allem wegen der Gefahr des *Prozonenphänomens* wichtig, das bekanntlich bei einem Missverhältnis der Antigen- zur Antikörpermenge aufzutreten pflegt. Besonders bei relativ zu grossem Antikörperüberschuss kann eine Reaktion der Komponenten ausbleiben. *Steigerwald & Spielmann* haben dieser Möglichkeit ebenfalls Rechnung zu tragen versucht und benutzten die Verdünnungen 1 : 20 und 1 : 400 einer Insulinstammlösung (1 mg/ml). Nach unseren Erfahrungen sind jedoch Reihenverdünnungen des Antigens unbedingt notwendig, da bei Anwendung nur der beiden obigen Verdünnungsstufen die Gefahr von Prozonenphänomenen nicht ganz ausgeschlossen ist.

Die ganze Reaktion setzt sich aus zwei Vorversuchen und einen Hauptversuch zusammen.

Der erste Vorversuch hat zum Ziele, den geeigneten Amboceptortiter bei einem Ausgangstiter von 1 : 1000 festzustellen. Mengenmässig verteilen sich die Reaktionskomponenten folgendermassen :

Amboceptor	<i>Kolmer</i> Salzlösung	Komplement 1 : 30	Hammelblutkörperchen, 2% 1g
0,5 ml 1 : 1000 bis 1 : 8000	1,7 ml	0,3 ml	0,5 ml

Die Ablesung des optimalen Titers erfolgte nach einstündigem Wasserbadaufenthalt bei 37° C.

Der zweite Vorversuch diente zur Ermittlung des Komplementtiters. Die Antigenverdünnungen betrugen 1 : 200, 400, 600, 800, sodass dieser Vorversuch jeweils in diesen vier Varianten anzusetzen war.

Das Gesamtvolumen beträgt bei der *Kolmer-Technik* 3,0 ml, d.h. das Volumen des Komplements ist 1,0 ml und das der übrigen Bestandteile (Antigen, Patientenserum, Amboceptor und Hammelblutkörperchen) je 0,5 ml. Leitgedanke für dieses Mengenverhältnis der einzelnen Re-

aktionskomponenten ist, dass das Komplement in diesem grösseren Gesamtvolumen exakter zu dosieren ist.

Die Patientenserum wurden wie üblich $\frac{1}{2}$ Stunde bei 56° C inaktiviert, eventuell war nochmaliges Nachinaktivieren von 10 min. notwendig, falls die Proben nicht am Tag der ersten Inaktivierung zur Untersuchung verwandt wurden. Auch hier war bei den 4 Antigenverdünnungsstufen jeweils der viermalige Ansatz des *Hauptversuchs* notwendig.

Einheitliche Kontrollversuche zur Prüfung der angewandten Reaktionskomponenten und Kontrolle des hämolytischen Systems wurden jeweils durchgeführt. Zu Vergleichszwecken wurden ebenso wie beim *Boyden-Test* Seren von Diabetikern mit angesetzt, deren Stoffwechsel entweder rein diätetisch eingestellt war oder mit geringen Insulinmengen gut beherrscht werden konnte. *Steigerwald & Spielmann*, die die Komplementbindungsreaktion mit dem Serum eines schweren Insulin-Hautallergikers und einer insulinresistenten Patientin durchführten, erzielten mit dieser Reaktion negative Ergebnisse. Sie beobachteten eine verstärkte Komplementhämolysen in allen insulinhaltigen Rörchen anstelle der erwarteten Hämolysenhemmung als Zeichen der stattgehabten spezifischen Antigen-Antikörperbindung. Durch Zusatz von Cholesterin und Lecithin, die zur Aufhebung des komplementhemmenden Effekts des Cardiolipins in der serologischen Luesdiagnostik zugesetzt werden, liess sich zwar der hämolysenverstärkende Effekt weitgehend kompensieren, sichere positive Ergebnisse konnten obige Autoren jedoch nicht reproduzieren.

In Analogie zu den Blutabnahmezeiten beim Hämagglutinationstest wurden auch hier Proben 5, 10, 20 und 30 min. nach der Insulin-Injektion entnommen. Bei allen serologischen Untersuchungen wurden gleichzeitig die passive Hämagglutination und die Komplementbindungsreaktion angesetzt.

2. KLINISCHE UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

Insgesamt wurden durchgeführt 438 *passive Hämagglutinationen* bei 140 und 447 *Komplementbindungsreaktionen* bei 136 Personen. Davon waren 33 *gesunde Kontrollpersonen* oder *Patienten mit leichteren Erkrankungen*.

Unter den Patienten befanden sich 32 *Diabetiker* (26

Frauen und 6 Männer), die auf Grund ihres Alters, Habitus, ihrer dekompensierten Kohlenhydratstoffwechsellaage mit schlechter Insulinansprechbarkeit (im Sinne einer relativen Insulinresistenz) als *Altersdiabetes*, „maturity-onset diabetes“, anzusprechen sind. Endokrin-hypophysäre Korrelationsstörungen waren in wechselndem Ausmass vorhanden. Die durchschnittliche Tagesinsulinmenge schwankte zwischen 60 und 152 E. Die *positiven serologischen Ergebnisse* verteilen sich folgendermassen:

	Männer	Frauen
Boyden-Test	2	7
Kolmer-Test	1	1

Bei 11 von 32 *Altersdiabetikern*, deren Kohlenhydratstoffwechsel dekompensiert war und hohe Insulindosen, teilweise über 100 E, zur Rekompensation benötigte, waren demnach *hämagglutinierende* und bzw. oder *komplementfixierende Antikörper* vor und in bestimmten Abständen nach der Insulin-Injektion nachzuweisen.

Aus unserem Krankengut werden einige charakteristische Krankheitsverläufe herausgegriffen:

1. H. H. (II. Medizinische Klinik der Freien Universität, Nr. 281/58), Alter 62 Jahre, „Diabetes seit 10 Jahren. Anfängliche Einstellung auf 64 E Depot-Insulin; zunächst urticarielle Insulinüberempfindlichkeit, die nach Desensibilisierung verschwand.

10.4.58: Blutzuckerwerte (im Tagesprofil) 190 – 304 – 236 mg%

Urinzucker 8,6 g, Aceton negativ. 64 E Depot-Insulin Hoechst.

11.4.58: Boyden-Test, Rinder-Insulin als Antigen.

Vor I.-Injektion: alle Antigen- und Serumverdünnungen negativ.

10 min. nach I.-Injektion:	Antigen 1: 200	Serum 1: 2,5 +
	1: 400	1: 2,5 +
	1: 600	1: 2,5 +

15.4.58: Boyden-Test, Rinder-Insulin als Antigen.

Vor I.-Injektion: Alle Antigen- und Serumverdünnungen negativ.

15 min. nach I.-Injektion:	Antigen 1: 200	Serum 1: 2,5 +
	1: 400	1: 2,5 +
20 min. nach I.-Injektion:	1: 200	1: 5 +
	1: 400	1: 2,5 +
	1: 600	1: 2,5 ±

Komplementbindungsreaktionen vor und nach Insulin in allen Antigen- und Serumverdünnungen negativ.

17.4.58: Blutzuckerwerte 180 - 276 - 206 mg%

Urinzucker 7,5 g, Aceton neg. 56 E Depot-Insulin Hoechst.

Kost: 144 g Kh, 80 g Eiweiss, 50 g Fett.

21.4.58: Blutzuckerwerte 155 - 234 - 142 mg%

Urinzucker 6,4 g, Aceton neg. 48 E Depot-Insulin Hoechst.

Kost: 144 g Kh, 80 g Eiweiss, 50 g Fett.

25.4.-5.5.58: Einstellungsversuch mit Rastinon.

5.5.58: Blutzuckerwerte (im Tagesprofil) 278 - 325 - 284 mg%

Urinzucker 27,8 g, Aceton neg.

Auf Grund der serologischen Ergebnisse Verabreichung von Schweine-Insulin 12 + 12 E.

9.5.58: Blutzuckerwerte 261 - 336 - 222 mg%

Zusammenfassend liegt ein charakteristischer *Altersdiabetes* vor, der vor 10 Jahren bei dem jetzt 62jährigen Patienten entdeckt wurde und sofort hohe Insulindosen benötigte. Offensichtlich ist in den vergangenen Jahren keine wesentliche Stoffwechselverschlechterung eingetreten, die Insulindosis der Ersteinstellung liess sich beibehalten. Die nachweisbaren *hämagglutinierenden Antikörper* gegenüber 7 fach rekristallisiertem, glukagonfreiem *Rinderinsulin* 10, 15 und 20 min. *nach der therapeutischen Insulinverabreichung* haben hier wohl *keine entscheidende pathogenetische Bedeutung für den Ablauf des Diabetes*. Denn das für eine Insulinresistenz charakteristische Verhalten der Zuckerstoffwechselstörung, der laufend ansteigende Insulinbedarf, war nicht vorhanden. Bei dem Patienten waren zu Beginn der Insulintherapie vorübergehend Hautallergien aufgetreten, die allerdings sehr rasch wieder zurückgingen und seitdem nicht mehr zu beobachten waren. Es lässt sich rückschauend nicht entscheiden, ob neben den hautsessilen damals auch gleichzeitig zirkulierende Antikörper vorhanden waren, da in den vergangenen Jahren keine insulinserologischen Untersuchungen durchgeführt wurden. Dazu kommt noch, dass die *Verabreichung* von fünffach rekristallisiertem *Schweine-Insulin*, auf Grund der serologischen Ergebnisse, hier *keine* ersichtliche *Stoffwechselverbesserung* gebracht hat, sodass auch dieses Symptom im Sinne einer nur geringen pa-

thogenetischen Bedeutung der nachgewiesenen Antikörper gegenüber Rinderinsulin zu werten ist.

Bei dem folgenden, bezüglich des Stoffwechsels ähnlich gelagertem Fall, haben die nachgewiesenen Insulinantikörper pathogenetisch eine andere Bedeutung.

2. F. C. (Städtisches Krankenhaus Berlin-Hohengatow, Nr. 3444/57), Alter 76 Jahre, Grösse 150 cm, Gewicht 72 kg.

Diabetes mit 59 Jahren entdeckt, von Anfang an bestand Insulinbedürftigkeit, zunächst 30 + 12 E Depot-Insulin, 1953 40 + 20 E Depot-Insulin Hoechst; Stoffwechselverschlechterung seit November 1957.

Aus dem klinischen Befund: Starke Adipositas, adipöse Bauchdecken mit Fettschürzenbildung.

RR 215/105 mm Hg. Normaler Urinbefund.

25.2.58: Blutzuckerwerte 280 - 226 - 244 mg%

Urinzucker 4,5 % = 22,5 g, Aceton neg. Kost 108 g Kh.

Insulin: 6 - 16 - 12 - 12 E Alt-Insulin.

1.3.58: Blutzuckerwerte 296 - 288 - 192 mg%

Urinzucker 2,4 % = 43,2 g, Aceton neg. Kost 108 g Kh.

Insulin 8 - 16 - 20 - 20 E Alt-Insulin.

18.3.58: Blutzuckerwerte 210 - 272 - 262 mg%

Urinzucker 3 bzw. 2 % = 18 g.

20.3.58: *Komplementbindungsreaktion*, Rinder-Insulin als Antigen.

Vor I.-Injektion: Alle Antigen- und Serumverdünnungen negativ.

10 min. nach I.-Injektion:	Antigen 1:200	Serum 1: 2,5 +
----------------------------	---------------	----------------

15 min. nach I.-Injektion:	1:200	1: 2,5 +
----------------------------	-------	----------

	1:400	1: 2,5 +
--	-------	----------

20 min. nach I.-Injektion:	1:200	1:10 +
----------------------------	-------	--------

	1:20 ±
--	--------

	1:400	1: 2,5 +
--	-------	----------

	1: 5 ±
--	--------

	1:600	1: 2,5 +
--	-------	----------

Kontrollen durchweg negativ.

Boyden-Test: Rinder-Insulin als Antigen.

Vor I.-Injektion: Alle Antigen- und Serumverdünnungen negativ.

10 min. nach I.-Injektion:	Antigen 1:200	Serum 1: 2,5 +
----------------------------	---------------	----------------

	1:10 ±
--	--------

	1:400	1: 2,5 +
--	-------	----------

	1:10 ±
--	--------

15 min. nach I.-Injektion:	1:200	1: 2,5 +
----------------------------	-------	----------

	1: 5 +
--	--------

	1:10 ±
--	--------

20 min. nach I.-Injektion: Alle Antigen und Serumverdünnungen negativ.

31.3.58: Blutzuckerwerte 162 - 174 - 246 mg%

Urinzucker 1,2 % = 12 g. Kost 120 g Kh.

Insulin 44 + 36 E Comb-Insulin.

Komplementbindungsreaktion, Rinder-Insulin als Antigen.

Vor I.-Injektion: Alle Antigen- und Serumverdünnungen negativ.

10 min. nach I.-Injektion:	Antigen 1:400	Serum 1:10	±
		1:20	+

Kontrollen negativ.

Boyden-Test: Rinder-Insulin als Antigen.

Vor I.-Injektion	Antigen 1:200	Serum 1:5	+
		1:10	±
	1:600	1:2,5	±
		1:5	±
10 min. nach I.-Injektion:	1:200	1:2,5	+
		1:5	+
		1:10	±

Zusammenfassend liegt ein stenischer *Altersdiabetes* vor, kombiniert mit Fettsucht. Der Diabetes, beginnend mit 59 Jahren, verschlechterte sich in den folgenden Jahren, sodass ständige Insulinerhöhung nötig war, zuletzt wurden 44 E morgens und 36 E Comb-Insulin abends verabreicht. Die hier nachgewiesenen *hämagglutinierenden* und *komplementbindenden Antikörper* gegenüber *rein-kristallisiertem Rinderinsulin*, teilweise mit Titeranstiegen nach der therapeutischen Insulin-Injektion, sprechen in Zusammenhang mit der klinisch auffälligen, langsam progredienten Stoffwechselverschlechterung zumindest für eine pathogenetische *Mitbeteiligung* eines *Antigen-Antikörpermechanismus* bei dieser Diabetesform. Allerdings ist mit zu berücksichtigen, dass gewisse hypophysäre Züge im Sinne eines Ueberfunktionsdiabetes (*Bartelheimer*) hier vorliegen.

Diesen ausgewählten Fällen von Zuckerkrankheit, die entweder im Alter in Form des sog. Altersdiabetes manifest wurde oder in den Jahren der Involution zunehmende Resistenz zeigte, werden Fälle von *jugendlichem Diabetes* gegenübergestellt. Unser Krankengut im Zeitraum von November 1957 bis November 1958 umfasste 9 *jugendliche Diabetiker*, die zwischen 60 und 128 E Insulin täglich zur Aufrechterhal-

tung eines einigermaßen zufriedenstellenden Stoffwechselgleichgewichts benötigten. Während bei vier Patienten auch bei Kontrollen weder vor noch nach Insulin-Injektionen Antikörper nachzuweisen waren, boten die restlichen fünf Anhaltspunkte für einen im zuckerkranken Organismus ablaufenden Antigen-Antikörpermechanismus. Hier einige ausgewählte Krankheitsfälle:

1. P.R. (Städtisches Auguste Viktoria-Krankenhaus Berlin-Schöneberg, Nr. 7459/57). Alter 16 Jahre, Grösse 163 cm, Gewicht 56,8 kg. Vor 2 Jahren Diabetes festgestellt, der sofort insulinbedürftig war, letzte Einstellung vor Krankenhausaufnahme 48 E bzw. 40 E Novolente und 8 E Semilente.

Im allgemeinen klinischen Untersuchungsbefund keine wesentlichen Auffälligkeiten.

9.1.58: Insulinbelastung (9 E Alt-Insulin i.v.)

Nüchternblutzucker 152 mg%

Insulin-Injektion

10 min. nach	150 „	100 min.	96 mg%
20 „ „	142 „	120 „	100 „
30 „ „	124 „	140 „	90 „
40 „ „	112 „	160 „	86 „
60 „ „	62 „	180 „	102 „
80 „ „	100 „	200 „	84 „

Urinzucker 2,2 % = 20 g, Aceton negativ.

Kost: 210 g Kh, Insulin: 12 + 12 + 16 E Alt-Insulin.

14.1.58: Tagesprofil.

Nüchternblutzucker 8 Uhr 158 mg%

28 E Depot-Insulin	10 „	192 „	14 Uhr	182 mg%
	12 „	214 „	16 „	152 „
16 E Depot-Insulin	19 „	220 „		
	21 „	200 „	24 „	130 „

28.1.58: Boyden-Test, Rinder-Insulin als Antigen.

Vor I.-Injektion: Alle Antigen- und Serumverdünnungen negativ.

10 min. nach I.-Injektion:	Antigen 1:200	Serum 1: 5 ±
		1: 10 +
	1: 400	1: 2,5 +
		1: 5 ++
		1: 20 ±
	1: 600	1: 2,5 ++
		1: 5 ++
		1: 10 ++
	1: 800	1: 5 ++
		1: 20 ±

3.2.58: Blutzucker 102 mg%

Urinzucker 1,5 % = 8,0 g. Aceton negativ.

Kost: 260 g Kh, Insulin 40 E + 20 E Comb-Insulin.

Zusammenfassend liegt ein mittelschwerer jugendlicher Diabetes bei einer 16 Jährigen vor, der keine Zeichen einer relativen Insulinresistenz bot, wohl aber Symptome einer Gegenregulation (s. Blutzuckertagesprofil!) aufwies. Der hier geführte Nachweis von hämagglutinierenden Antikörpern spricht dafür, dass trotz der endokrinen Regulationsstörungen der Pubertätsjahre auch ein Antigen-Antikörpermechanismus eine pathogenetische Rolle spielt. Diese hier beobachtete Verlaufsförmung weist zugleich darauf hin, dass zirkulierende Insulinantikörper als Symptom eines immunbiologischen Vorgange nicht unbedingt mit dem klinischen Zeichen einer relativen Insulinresistenz einherzugehen brauchen.

2. W. E. (Medizinische Poliklinik der Freien Universität). 13jähriges Mädchen, Grösse 153 cm, Gewicht 48 kg. Seit dem 5. Lebensjahr Diabetes, von Anfang an mit Insulin eingestellt.

15.1.58: Blutzucker 240 mg%, Urinzucker 1,2 %. Aceton +.
40 E Depot- + 32 E Comb-Insulin.

1.2.58: Blutzucker 197 mg%, Urinzucker 1,4 %. Aceton: neg.
40 E Depot- + 32 E Comb-Insulin.

15.3.58: Blutzucker 177 mg%, Urinzucker negativ. Aceton: neg.
40 E Depot- + 32 E Comb-Insulin.

2.4.58: Blutzucker 106 mg%, Urinzucker neg. Aceton: neg.
40 E Depot- + 32 E Comb-Insulin.

10.4.58: Blutzucker 179 mg%, Urinzucker neg. Aceton: neg.

12.4.58: Boyden-Test, Rinder-, Kalbs- und Schweine-Insuline als Antigene.

Vor I.-Injektion:

Rinderinsulin	Antigen 1:200	Serum 1:10	±
	1:400	1:2,5	±
Kalbsinsulin	1:200	1:10	±
	1:400	1:2,5	±
Schweineinsulin	1:400	1:2,5	±
		1:5	±
	1:600	1:2,5	±

10 min. nach I.-Injektion: Mit Schweineinsulin alle Antigen- und Serumverdünnungen negativ.

Rinderinsulin	Antigen 1:200	Serum 1: 2,5 ±
		1: 5 +
	1:400	1: 2,5 ++
		1: 5 +
	1:600	1: 2,5 +
		1: 5 +
		1:20 ±
Kalbsinsulin	1:200	1: 2,5 ±
		1: 5 +
	1:400	1: 2,5 ++
		1: 5 +
	1:600	1: 2,5 +
		1: 5 +
		1:20 ±

Komplementbindungsreaktion, Rinder- u. Kalbsinsulin als Antigene.

Vor I.-Injektion:

Rinderinsulin	Antigen 1:200	Serum 1: 5 +
Kalbsinsulin	1:200	1: 5 +

10 min. nach I.-Injektion:

Rinderinsulin	1:200	1: 2,5 ±
		1: 5 ±
		1:10 ±
	1:400	1: 2,5 +
	1:600	1:10 ±
Kalbsinsulin	1:200	1: 2,5 ±
		1: 5 ±
		1:10 ±
	1:400	1: 2,5 +
	1:600	1:10 +

Blutzucker 120 mg%, Urinzucker negativ, Aceton negativ.

Insulin: 40 E Depot- + 32 E Comb-Insulin.

15.4.58: Komplementbindungsreaktion, Rinder- und Kalbsinsulin als Antigene.

Vor I.-Injektion: Mit Rinder- u. Kalbsinsulin alle Antigen- und Serumverdünnungen negativ.

15 min. nach I.-Injektion: Mit Rinder- und Kalbsinsulin alle Antigen- und Serumverdünnungen negativ.

Boyden-Test, Rinder- und Kalbsinsulin als Antigene.

Vor I.-Injektion:

Rinderinsulin	Antigen 1:200	Serum 1:10 +
	1:400	1: 2,5 +
Kalbsinsulin	1:200	1:10 +
	1:400	1: 2,5 ±

15 min. nach I.-Injektion:

Rinderinsulin	1:200	1: 2,5 +
	1:400	1: 5 +
	1:600	1: 2,5 ±
Kalbsinsulin	1:200	1: 2,5 +
	1:400	1: 5 +
	1:600	1: 2,5 ±

3.5.58: Blutzucker 112 mg%, Urinzucker negativ. Aceton negativ.

Insulin: 40 E Depot- + 32 E Comb-Insulin.

Komplementbindungsreaktion, Kalbs- u. Schweineinsulin als Antigene.

Vor I.-Injektion: Mit beiden Insulinen alle Antigen- und Serumverdünnungen negativ.

20 min. nach I.-Injektion: Mit beiden Insulinen alle Antigen- und Serumverdünnungen negativ.

Zusammenfassung: Es liegt hier der *jugendliche Diabetes* eines 13jährigen Mädchens vor, der seit dem 5. Lebensjahr besteht und sofort insulinbedürftig war. Jetzt ist der Stoffwechsel auf insgesamt 72 E eingestellt, die Blutzuckerwerte schwankten im Januar/Februar 1958 um 200 mg% bei einer deutlichen Acidoseneigung. Ende Februar 1958 bis zu den Untersuchungstagen am 12.4., 15.4. und 3.5.58 war dann bei gleicher Insulintagesdosis von 72 E Depot- und Comb-Insulin ein Rückgang der Blutzuckerwerte eingetreten. Die Nüchternblutzuckerwerte lagen im Normbereich.

Vergleicht man den klinischen Ablauf des Diabetes mit den serologischen Titerergebnissen, so zeigt sich, dass

1. anfänglich beim *Boyden-Test* vor der provozierenden Insulin-Injektion *hämagglutinierende Antikörper gegen Rinder-, Kalbs- und Schweineinsulin* nachweisbar waren, allerdings nur sehr schwach und bei den stärkeren Serumkonzentrationen. Ausserdem waren *komplementbindende Antikörper gegen Rinder- und Kalbsinsulin* vorhanden. Nach der Injektion des Insulin-Handelspräparates traten deutliche Titererhöhungen nur bei rein-kristallisiertem Kalbs- und Rinderinsulin auf. Durch den Reiz des plötzlichen Antigenüberschusses vom Antigen-Antikörperkomplex abdissoziiert, waren diese Antikörper nachweisbar. Auf die theoretischen Ueberlegungen über

eine Antigen-Antikörperkinematik (*Berson & Yalow*) wurde bereits eingegangen; und dass

2. mit Besserung der Stoffwechselsituation, die ohne Änderungen im Kostregime oder in der Insulindosierung eintrat, auch ein Intensitätsrückgang der Agglutinationsphänomene zu beobachten war. Jedoch waren auch bei kurzfristigen Kontrollen keine komplementbindenden Antikörper zu erfassen.

Hier sei nur kurz auf die an sich selbstverständliche Tatsache hingewiesen, dass es sich beim Insulin vom Rind und vom Kalb um das Pankreashormon der gleichen Tierspecies „Rind“ handelt. Ist die Genauigkeit unserer Methodik bindend, dann muss der Grad der Hämolysehemmung bzw. der Hämagglutination oder der negative Ausfall beider Reaktionen unter Verwendung der beiden Insulinpräparationen parallel gehen. Aus diesen Gründen haben wir die Untersuchungen mit Kalbs- und Rinderinsulin sehr oft gleichzeitig ablaufen lassen.

Ueberblickt man das gesamte Krankengut, das wir serologisch untersuchen konnten, so teilt es sich bezüglich der *Ergebnisse* folgendermassen auf.

A. Gesamtzahl der untersuchten Diabetiker: 107, davon sind

I. Mit Insulin eingestellt

1. Altersdiabetes	48	
<i>positive</i> serologische Reaktionen		11
Männer		3
Frauen		8
<i>negative</i> serologische Reaktionen		37
Männer		9
Frauen		28
2. Jugendlicher Diabetes	15	
<i>positive</i> serologische Reaktionen		6
männliche Jugendliche		1
weibliche Jugendliche		5
<i>negative</i> serologische Reaktionen		9
männliche Jugendliche		2
weibliche Jugendliche		7
3. Diabetes, nicht zu 1. u. 2. gehörend	16	
positive oder fraglich positive Reaktionen		2
negative serologische Reaktionen		14

II. Ohne Insulin eingestellt		
4. Diabetes aller Altersklassen	21	
fraglich positive serologische Reaktionen		2
negative serologische Reaktionen		19
III. Mit peroralen Antidiabetica eingestellt	7	
fraglich positive serologische Reaktionen		1
negative serologische Reaktionen		6
B. Gesamtzahl der untersuchten gesunden Kontrollpersonen und diabetesfreien Leichtkranken		
	33	
fraglich positive serologische Reaktionen		2
negative serologische Reaktionen		31

Es wurde schon mehrfach betont, dass ein positiver Insulinantikörper-Nachweis nur im Rahmen des klinischen Erscheinungsbildes der vorliegenden diabetischen Stoffwechselstörung in seiner pathogenen Bedeutung zu beurteilen ist. In diesem Sinne ist auch die bereits mehrfach zitierte Arbeit von *Scheifarth, Frenger & Moeckel* zu werten.

Diese serologische Studie, durchgeführt bei 83 insulineingestellten Zuckerkranken ohne und 27 mit chronischen Begleitkrankheiten mit Eiweissverschiebung im Sinne einer chronischen Entzündung, hat ergeben, dass es mehrere Faktoren gibt, die zu einer Fehlbeurteilung der sehr empfindlichen Hämagglutination führen können. Es wird allerdings in der Arbeit nicht darauf hingewiesen, wann und in welchen Zeitabständen nach der Insulin-Injektion Blut für die serologischen Untersuchungen abgenommen wurde.

In unserem Untersuchungsgut ist das *Zahlenverhältnis insulinrefraktärer bzw. hochinsulinierter Diabetesfälle* zum positiven bzw. negativen Antikörpernachweis folgendes:

1. *Altersdiabetes*. Von den 11 Diabetikern mit vorübergehend oder länger positiven serologischen Reaktionen waren 5 Frauen und 1 Mann mit passagerem insulinresistenten Verhalten.

2. *Jugendlicher Diabetes*. Von den 6 Diabetikern mit positivem Nachweis hämagglutinierender und bzw. oder komplexbindender Antikörper (vorübergehend oder längere Zeit)

war ein Mädchen mit ausgeprägter passagerer Insulinresistenz.

Die restlichen 5 Diabetiker benötigten zur Kompensation ihres Stoffwechsels wohl hohe Insulinmengen, letztere konnten jedoch über Monate hinaus konstant gehalten werden.

3. TIERVERSUCHE

Es wurden bisher zahlreiche *Versuche* bei der *Ratte*, beim *Meerschweinchen* und beim *Kaninchen* unternommen, auf dem Wege der *Sensibilisierung Insulinresistenz* zu erzeugen. Die Versuche, durch Verwendung von handelsüblichem oder rein-kristallisiertem Insulin eine Immunität beim Kleintier hervorzurufen, sind häufig an der zur Immunisierung relativ schwachen Antigenität des Insulins gescheitert. *Bernstein, Kirsner & Turner* konnten bei sensibilisierten Meerschweinchen lediglich anaphylaktische Reaktionen erzeugen. Nach einer 24tägigen Sensibilisierung mit einem Fremdinsulin liess sich ein echter anaphylaktischer Schock bei Reinjektion sowohl des gleichen Tierinsulins, das zur Sensibilisierung verwandt wurde, als auch eines anderen Insulinpräparates auslösen.

Durch Einführung der *Adjuvantien* in die Immunbiologie (*Freund*) war es möglich geworden, relativ schwache Antigene zur Antikörperproduktion anzuregen. Ueber den Mechanismus dieser Steigerung der antigenen Potenz besteht noch keine Klarheit. Nach *Freund* verzögert *Paraffinöl*, eine der Komponenten des Adjuvans, die Antigenresorption und wirkt positiv chemotaktisch auf mononukleäre Zellen, die die Antikörperbildung bekanntlich begünstigen. Die *Mycobakterien*, die zweite Komponente dieses Resorptionsverzögerers, erzeugen desgleichen eine zelluläre Reaktion; andere Autoren (*Raffel, Arnaud, Dukes & Huang*) sind der Ansicht, dass gewisse Lipide der Mykobakterien sich mit dem Antigen verbinden und Reaktionen vom „Tuberkulintyp“, eine „delayed reaction“, hervorrufen.

Die Adjuvans-Technik hat sich u. a. bei der Bildungsförderung von Diphtherie-Antitoxin im Meerschweinchen und Kaninchen (*Ramon, Lemetayer & Richou*) bewährt und wurde von *Lowell & Franklin* zur Erzeugung einer Insulinresistenz im Kaninchen verwandt. Auch mit

Pferdeserum als synergistisch wirkendem Antigen (*Swift & Schultz*) und mit dem parasymphathischen Pilokarpin (*Belák, Sáchy & Csere-sznes*) lässt sich die *antigene Fähigkeit des Insulins* heben.

Auch wir haben versucht, Insulin-Antikörper bei Meer-schweinchen und Kaninchen durch regelmässige subkutane und intraperitoneale Injektion von rekristallisiertem und glukagon-freiem Insulin zu erzeugen, um erstere mit der *Boyden-Technik* und mit der abgestuften Komplementbindungsreaktion nachzuweisen. Da jedoch auch der Konvulsionstest an der Maus ebenso wie die serologischen Untersuchungen negativ ausfielen, wurden diese Sensibilisierungsversuche mit reinem Insulin ohne Zusatz einer Verzögerungssubstanz nicht mehr weiterverfolgt.

Wir sind dann zur *Adjuvantentechnik* übergegangen. Wir stellten die gelblich-milchige Emulsion des Adjuvans aus Rinderinsulin mit 0,5 % Phenolzusatz, Emulgatoren und hitzeabgetöteten, getrockneten und zerriebenen Mycobakterien her; als *Emulgatoren* zur Herstellung einer Wasser- in Öl-Emulsion verwandten wir *Falba*¹ oder *Arlacel A*² eine Monooleat-Mannit-Verbindung; ausserdem wird *Paraffin-* oder *Erdnussöl* für die ölige Phase der Emulsion zugegeben. 5 mg abgetötete Mycobakterien werden zunächst in flüssiges Paraffin eingerührt. Dann werden 4,0 ml Rinderinsulinlösung tropfenweise in 2,0 ml Emulgator mit einem elektrischen Rührgerät oder durch mehrmaliges Aufziehen und Mischen in der Spritze eingebracht. Anschliessend werden 4,0 ml Paraffin mit den bereits vorher eingemischten Mycobakterien dazugegeben. Es entsteht eine weisse, dicke, ölige Flüssigkeit, die reaktionslos bei intramuskulärer Injektion mit dicker Kanüle vertragen wird.

Durchführung der Sensibilisierung. Viermal 0,5 ml = 8 E Insulin im Abstand von einer Woche, in der 5. Woche 1,0 ml = 16 E. Vor, während und am Ende der Sensibilisierungsperiode wurde der Insulintoleranztest mit 0,1 E/kg Körpergewicht durchgeführt. Die Injektion der dem Gewicht des Versuchstiers entsprechenden Insulinmenge erfolgte in die Ohrtrandvene. Alle Kaninchen wurden im gleichen Modus

¹ *Pfaltz & Bauer, Inc., New York, N. Y.*

² *O. Nordwald, Laboratorium für Fermente und Organsubstanzen, Hamburg-Altona.*

sensibilisiert, der Blutzucker wurde 15, 30, 45, 60 und 120 min. nach der Insulin-Injektion bestimmt. *Lowell & Franklin* erzeugten mit dieser Insulin-Adjuvansmischung eine Resistenz beim Kaninchen gegenüber der hypoglykämischen Insulin-Injektion.

Es wurden 24 Kaninchen und 30 Meerschweinchen mit mehrfach rekristallisiertem Rinderinsulin nach der *Freund'schen* Adjuvantentechnik sensibilisiert und am Ende der Sensibilisierungsperiode wurde der Antikörpertiter bestimmt. Das Blut wurde durch Punktion entweder der gestauten Ohr- oder aus der Carotisvene entnommen. Vor, während und nach der Sensibilisierung wurde der Insulintoleranztest durchgeführt.

Auszug aus einem Versuchsprotokoll: Kaninchen 24 (männlich, Gewicht 3010 g) und 25 (männlich, Gewicht 3250 g) wurden viermal in 8tägigen Abständen mit einer Rinderinsulin-Adjuvansmischung (Arlacel A) gespritzt; Einzeldosis 8 E. Die 5. Injektion erfolgte in doppelter Dosis am Ende der 5. Woche. Die auf Tabelle 1 angegebenen Blutzuckerwerte nach Insulin zeigen bei beiden Tieren ein Absinken derselben, und zwar unabhängig von der Sensibilisierungsphase. Im Gegensatz zu *Lowell & Franklin*, die höhere Einzeldosen bei grösseren Abständen zwischen den Injektionen verabreichten, konnten wir bei diesen Tieren 24 und 25 keine Resistenz gegenüber der hypoglykämisierenden Wirkung des injizierten Insulins erzeugen. Dagegen war ein *positiver Nachweis hämagglutinierender Antikörper* gegen *Rinderinsulin* (das sensibilisierende Antigen), *Schweine- und Kalbs-Insulin* vier Tage nach der letzten sensibilisierenden Injektion möglich. Die Titerergebnisse bei Versuchsansatz mit Kalbsinsulin entsprechen den Befunden mit dem Rinder-Pankreashormon.

TABELLE 1
Insulintoleranztest beim Kaninchen im Verlauf der Sensibilisierungsperiode.

<i>Tier Nr. 24</i>				<i>Tier Nr. 25</i>			
	5.12.57	21.12.57	5.1.58		5.12.57	21.12.57	5.1.58
	vor	während	nach		vor	während	nach
	Sensibilisierung				Sensibilisierung		
NW	194	96	113		98	118	115
	Insulin 0,3 E i.v.				Insulin 0,32 E i.v.		
15 min.	100	93	99		93	92	88
30 „	80	66	75		76	88	72
45 „	80	76	53		71	77	61
60 „	72	63	65		63	59	59
120 „	102	89	95		89	102	109

Bei den Tieren 24 und 25 wurde in der Adjuvansmischung *Arlacel A* verwandt, während *Falba* den Adjuvansmischungen für die Sensibilisierung der Tiere 3 und 4 zugegeben wurde; Tier 5 war das unbehandelte Kontrolltier. Es hat eine „gekreuzte Sensibilisierung“ stattgefunden, d.h. der positive Nachweis hämagglutinierender Antikörper konnte nicht nur mit dem sensibilisierenden Antigen, hier Rinderinsulin, sondern auch mit einem chemisch verwandten Antigen (in diesem Falle Schweine-Insulin) geführt werden. An sich ist die Tatsache einer *gekreuzten Sensibilisierung gegenüber verschiedenen Tierinsulinen* bereits bekannt. *Lewis* konnte anhand des anaphylaktischen *Schultz-Dale*-Versuches am jungfräulichen Uterus des mit Schweine- bzw. Rinderinsulin sensibilisierten Tieres ebenfalls gekreuzte Reaktionen zwischen diesen beiden Insulinen beobachten. Nach *Westphal*, der in seinem Vortrag „Die Struktur der Antigene und das Wesen der immunologischen Spezifität“ anlässlich der 100. Versammlung der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Aerzte (Wiesbaden 1958) auch auf die serologischen Kreuzreaktionen einging, verbinden sich Antikörper mit allen denjenigen künstlichen Antigenen, die die gleiche *determinante Gruppe* besitzen. Nach den Versuchen von *Lowell* und unseren tierexperimentellen Ergebnissen wären demnach hier diese determinanten Gruppen nicht innerhalb der Disulfidbrücken gelegen.

Wir haben, analog zu den serologischen Untersuchungen bei den Diabetikern, 9 Tage nach der letzten Adjuvans-Insulin-Mischinjektion, d.h. 5 Tage nach Blutabnahme für die ersten serologischen Reaktionen 0,2 E intravenös gegeben. Nach *Wasserman, Broh-Kahn & Mirsky* ist die Zeitspanne des 9.–12. Tages nach der letzten Injektion die optimale Zeit für den Nachweis von Insulin-Antikörpern. 10, 15 und 20 min. nach der „provozierenden“ Insulin-Injektion wurden nochmals *Boyden*-Tests mit Rinder- und Schweine-Insulin durchgeführt. Die *Titererhöhungen* von Rinderinsulin-Antikörpern sprechen dafür, dass die absolute Menge von Antikörpern gegenüber Rinderinsulin grösser ist als gegenüber Schweineinsulin.

Vergleicht man die serologischen Untersuchungsergebnisse mit den Blutzuckerwerten beim Insulintoleranztest, wie er für die Tiere 24 a und 25 a in *Tabelle 2* dargestellt ist, dann hat man den Eindruck, dass sich hier eine *Resistenz* gegenüber dem *Rinderinsulin* als *Antigen* entwickelt hat.

TABELLE 2

Beeinflussung des Insulintoleranztestes durch die Sensibilisierung.

	<i>Tier Nr. 24 a</i>		<i>Tier Nr. 25 a</i>	
	vor	nach	vor	nach
	Sensibilisierung		Sensibilisierung	
NW	167	103	174	112
	0,3 E Rinderinsulin i.v.		0,2 E Rinderinsulin i.v.	
15 min.	150	100	—	—
30 „	146	96	150	106
60 „	119	102	128	105
120 „	103	131	116	119
180 „	96	134	112	96

Die Sensibilisierungsversuche mit dem Adjuvans-Insulingemisch waren bei Verwendung von Meerschweinchen als Versuchstiere nicht in gleichem Masse erfolgreich. Es liessen sich wohl gelegentlich Hämagglutinationsphänomene mit dem Insulinantikörper-haltigen Serum und dem Insulinantigen erzeugen, die Befunde waren jedoch nicht konstant und nicht immer reproduzierbar.

This document is a scanned copy of a printed document. No warranty is given about the accuracy of the copy. Users should refer to the original published version of the material.