

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 4—7, Januar 1969

Die Zinkausscheidung bei Diabetikern unter Penicillamin

Von B. HÖFFKEN und J.-G. RAUSCH-STROOMANN¹⁾

Aus der I. Medizinischen Universitäts-Klinik Hamburg-Eppendorf

(Direktor: Prof. Dr. H. Bartelheimer)

(Eingegangen am 10. Juni 1968)

Die Bedeutung des Zinks für den Diabetes mellitus wird besprochen. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob Diabetiker, die zinkhaltige Insulinpräparate spritzen, Zink in ihrem Körper speichern oder nicht. Zur Erfassung des Zinks wurde der harnfähige Chelatbildner Penicillamin verwandt. Die Zinkausscheidung von 12 Diabetikern und 11 Normalpersonen ohne und mit Penicillamin wurde nach der Methode von WOLFF und BUSSE mit Dithizon bestimmt und miteinander verglichen. Diabetiker scheiden unter Penicillamin im Verhältnis nicht mehr Zink aus als Normalpersonen. Dieses Ergebnis spricht gegen eine vermehrte Retention von Zink im Körper bei langdauernder Verabreichung von Zink-Depot-Insulin-Präparaten.

Excretion of zinc in diabetics receiving penicillamine

The significance of zinc in diabetes mellitus is discussed. The question arises as to whether diabetics receiving injections of zinc insulin store zinc in their bodies. Penicillamine was administered as a chelating agent to trap any stored zinc and transport it to the urine. The excretion of zinc was compared in 12 diabetics and 11 normal persons with and without the administration of penicillamine; zinc was determined by the method of WOLFF and BUSSE with dithizone. Diabetics receiving penicillamine excreted no more zinc than the corresponding normal persons. The results show that zinc is not retained in the body during the long term administration of zinc depot insulin preparations.

Die Bedeutung des zweiwertigen Schwermetalls Zink für das Insulin und den Diabetes mellitus ist noch nicht vollständig geklärt. Zink ist Bestandteil zahlreicher Fermente; die Zinkmenge der einzelnen Organe beträgt durchschnittlich 20—30 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht (1, 2), nur die Leber, die Retina, die Gonaden und die β -Zellen der LANGERHANSSchen Inseln des Pankreas sind besonders zinkreich (1—3). Normales Blutplasma enthält etwa 120 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ Zink (2—5).

Beim Diabetes mellitus weicht die Plasmazinkkonzentration nicht von der Norm ab. Auch der Zinkgehalt der β -Zellen ist im diabetischen Pankreas gegenüber dem normalen unverändert (2, 6). Steigt jedoch die Insulinsekretion nach Erhöhung der Blut-Glucose-Konzentration, so nimmt das chemisch nachweisbare Zink in den LANGERHANSSchen Inseln ab. Chelatbildner, die mit Zink feste Komplexverbindungen eingehen, verursachen einen experimentellen Diabetes mit Degeneration der β -Zellen (7).

Insulin ist in den β -Zellen an Zink-Eiweiß-Komplexe gebunden und wird durch Metabolite, die mit Zink stabilere Komplexe bilden als Insulin, freigesetzt (8). Der physiologische Zinkgehalt ist keine Voraussetzung für die biologische Wirksamkeit des Insulins, seine Kristallisation *in vitro* wird durch Zinkionen jedoch wesentlich erleichtert (Assoziation der Insulinmoleküle über Histidinreste) (9).

Verbindungen mit niedermolekularen basischen Eiweißkörpern aus der Gruppe der Protamine verlängern die Wirkung des Insulins auf den Blutzucker. Zusätze von

Zinksalzen stabilisieren zusätzlich die neutrale Protamin-Insulin-Suspension (Protamin-Zink-Insulin) (10). Allein durch Zusatz von Zink ohne Anwendung anderer Resorptionsverzögerer konnten 1952 HALLAS-MØLLER, PETERSEN und SCHLICHTKRULL (11) die Insulinwirkung beliebig modifizieren. Reinste Insulinkristalle können bis auf einen Zinkgehalt von 5% angereichert werden und sind in einem pH-Bereich zwischen 5 und 8 praktisch unlöslich. Die Präparate Semilente, Lente und Ultralente der Firma Novo enthalten zum Beispiel 2 mg Zinkchlorid auf 1000 E Insulin.

Die tägliche Aufnahme von Zink durch die Nahrung beträgt 10—15 mg (1, 3, 12—15). Wie Versuche mit ⁶⁵Zn gezeigt haben, wird Zink nur zu einem sehr geringen Teil vom Darm resorbiert (16) und zu etwa 90% im Stuhl wieder ausgeschieden (1, 13, 14, 17). Das Ausscheidungsverhältnis von Zink in Stuhl und Harn ist etwa 10:1. Fast 25% des parenteral zugeführten ⁶⁵Zn wurde nach 15 Tagen im Kot, nur 1,2—4,7% im Harn nachgewiesen (10, 24).

Die tägliche Zinkausscheidung im Harn wird mit 300 bis 450 μg angegeben (6, 13, 14, 18, 19, 20). Beim Diabetes mellitus ist sie nach CONSTAM, LEEMAN, ALMASY (21), VALLE und KÄGI (2), MELZER, RUTHMAN und GEORGE (19) und KRAINIK und Mitarbeitern (12) signifikant höher als bei Gesunden. Sie ist unabhängig von Rasse, Klima, Tageszeit, von Alter, Größe, Gewicht und Geschlecht der Patienten und von der Dauer und Schwere ihrer Erkrankung; es besteht auch kein Zusammenhang zwischen Zinkausscheidung und Diurese, Glucosurie, Ketonurie oder Blutzuckerkonzentration. Je besser der Diabetes jedoch eingestellt ist,

¹⁾ *Jetzige Anschrift:* Endokrinologische Abteilung der Medizinischen Klinik, Klinikum Essen der Ruhruniversität.

desto niedriger ist die Zinkausscheidung. Die Proteinurie, die ein Viertel aller diabetischer Komplikationen ausmacht (23, 24), ist mit sechs- bis siebenfach gesteigerter Zinkausscheidung bei stark erniedrigter Serumkonzentration verbunden (3). So erhielt SEELIGER (5) signifikant erhöhte Zink-Clearance-Werte für Diabetiker, die durch eine renale Funktionsstörung bedingt sind.

Diabetiker führen sich bei ihren täglichen Injektionen etwa 2–100 µg Zink zu. Ein Diabetiker, der pro Tag beispielsweise 30 E Novo Lente spritzt, nimmt täglich 60 µg Zink (in einem Jahr 21,9 mg Zink) parenteral auf. Injiziertes Zink wird verhältnismäßig lange im Körper zurückgehalten und nur sehr langsam ausgeschieden; es besitzt eine lange biologische Halbwertszeit. McCANCE (13) und MONTGOMERY (25) hatten beobachtet, daß weniger Zink ausgeschieden wurde als durch Injektionen zugeführt worden war. PROUT, ASPER, LEE und RAY (26) sowie SHELIN und CHAIKOFF (22) folgerten daraus, daß das Zink im Körper gespeichert werden könnte.

Ausgehend von den Stoffwechselverhältnissen des Zinks und seiner Bedeutung für den Diabetes mellitus ergab sich unsere Fragestellung:

Kommt durch die jahrelange Anwendung von Depot-Insulinen bei Diabetikern eine vermehrte Zinkablagerung im Organismus zustande, und verfügen Diabetiker daher über mehr mobilisierbares Zink als nicht diabetische Vergleichspersonen?

Zur Erfassung des Zinks benutzten wir D-Penicillamin, das neben anderen Schwermetallen vor allem Zink bindet und ausschließlich durch die Nieren ausgeschieden wird (27). Der Zink-Penicillamin-Komplex besteht aus einem stabilen, fünfgliedrigen Chelatring, in dem das Zinkkation an die funktionellen Gruppen des Penicillamins koordinativ gebunden ist.

Versuchsordnung

Die Zinkausscheidung von Normalpersonen bzw. Diabetikern vor und nach Penicillamingabe wurde miteinander verglichen. Die Normalpersonen waren 11 gesunde Studenten, die 12 Diabetiker Patienten unserer Zuckercambulanz. Bis auf eine Ausnahme benötigten alle Diabetiker täglich 12–48 E Lente-Insuline und waren gut eingestellt. Die durchweg männlichen Versuchspersonen sammelten den Urin in Tagesportionen in gereinigten, zinkfreien Polyäthylflaschen, die wenige ml 0,1N HCl und Toluol enthielten, zunächst ohne Penicillamin. In der zweiten Versuchsperiode erhielten sie täglich 4mal 150 mg D-Penicillamin. Diese Dosierung erwies sich als ausreichend. Die Kapseln wurden morgens eingenommen, der angesäuerte Urin höchstens 4 Tage lang im Kühlschrank aufbewahrt und mit Toluol überschichtet. Die Zinkbestimmung wurde nach der Methode von WOLFF und BUSSE (28) durchgeführt, die sich durch ihre relative Einfachheit und geringe Fehlerbreite auszeichnet. Von jeder Versuchsperson wurden ein bis vier Tagesmengen Urin vor bzw. nach Penicillamingabe aufgearbeitet. Von jeder einzelnen Tagesmenge wurden vier Bestimmungen durchgeführt und das arithmetische Mittel sowie die mittlere Abweichung errechnet (Tab. 1).

Eichkurve:

Für jede Dithizonlösung wurde eine Eichkurve aufgestellt, aus der der Zinkgehalt einer Probe direkt in µg/ml abgelesen werden kann. Die Extinktion steht bis zu einer Konzentration von 2 µg/ml

Tab. 1

Zinkausscheidung und Ausscheidungsquotienten bei Normalpersonen und bei Diabetikern vor und nach Penicillamin (Mittelwert und Streuung von jeweils 4 Analysen sowie arithmetisches Mittel der einzelnen Kollektive, des Ausscheidungsquotienten und deren Streuung)

Vpn. Nr.	Normalpersonen			Vpn. Nr.	Diabetiker		
	ohne Penicillamin µg/24 Stdn.	mit Penicillamin µg/24 Stdn.	Ausscheidungsquotient		ohne Penicillamin µg/24 Stdn.	mit Penicillamin µg/24 Stdn.	Ausscheidungsquotient
1	269,9 ± 9,6	710,5 ± 54,6	2,63	1	535,5 ± 12,0	870,0 ± 8,9	1,62
2	391,0 ± 16,6	576,0 ± 21,9	1,47	2	665,0 ± 47,3	1072,5 ± 65,2	1,61
3	508,8 ± 41,5	698,9 ± 51,4	1,37	3	624,0 ± 40,6	970,0 ± 36,6	1,55
	551,2 ± 50,2	654,5 ± 41,0	1,19	4	500,0 ± 2,7	730,8 ± 29,7	1,46
4	348,1 ± 7,0	590,6 ± 25,5	1,70	5	561,6 ± 19,0	855,4 ± 4,7	1,52
5	368,5 ± 11,1	502,2 ± 4,0	1,36	6	455,0 ± 9,4	660,0 ± 49,4	1,45
6	364,0 ± 10,4	565,0 ± 19,2	1,55	7	441,0 ± 12,2	571,5 ± 73,8	1,30
7	299,2 ± 3,4	554,7 ± 16,2	1,85		410,0 ± 21,4	1083,0 ± 68,1	2,64
8	383,1 ± 14,2	580,0 ± 22,8	1,51		490,5 ± 0	981,0 ± 39,7	2,00
9	262,5 ± 11,2	432,0 ± 15,3	1,65	8	600,0 ± 29,4	927,2 ± 24,5	1,55
10	280,0 ± 7,5	487,4 ± 0	1,74	9	534,1 ± 11,8	609,0 ± 63,5	1,14
	261,5 ± 11,3	579,5 ± 22,9	2,22	10	397,8 ± 24,6	603,0 ± 35,2	1,52
	234,6 ± 17,0	435,0 ± 12,5	1,85	11	585,0 ± 25,4	884,0 ± 12,8	1,51
	291,2 ± 16,2	431,6 ± 13,3	1,48	12	627,0 ± 36,6	921,0 ± 23,0	1,47
11	171,6 ± 3,5	247,5 ± 57,2	1,44				
	144,0 ± 36,9	232,5 ± 61,4	1,61				
	157,6 ± 35,7	259,0 ± 56,2	1,64				
	151,9 ± 43,5	207,4 ± 67,7	1,37				
\bar{x}	302,2 ± 27,1	485,8 ± 37,5	1,65 ± 0,08	\bar{x}	530,5 ± 22,6	838,5 ± 46,5	1,60 ± 0,09

in einem linearen Verhältnis zur Zinkmenge der Eichlösung. In unseren Versuchen wurde nur der Bereich von 0–1,0 µg/ml benötigt und der Anstieg der Eichgeraden aus dem tg α der Extinktionswerte im linearen Bereich der Eichkurve berechnet. — Die mittlere quadratische Abweichung der Eichwerte beträgt ± 2,62%.

Die Genauigkeit der Methode wurde mit der Errechnung der mittleren quadratischen Abweichung (Varianz) der Eichwerte in einer Reihe von Vorversuchen festgelegt.

Unter Benutzung der Formel:

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

ergab sich ein Wert von ± 2,6%.

Die Ergebnisse wurden auf folgende Beziehungen statistisch ausgewertet:

1. Ausscheidungsgröße von Normalpersonen und von Diabetikern ohne Penicillamin.
2. Relative Mehrausscheidung bei Normalpersonen und bei Diabetikern nach Penicillamin.

Das arithmetische Mittel der einzelnen Kollektive wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Für die Prüfung des Unterschiedes zwischen den Durchschnittswerten von zwei Kollektiven wurde die t-Verteilung benutzt:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \left[\sum_{i=1}^{n_1} (x'_i - \bar{x}')^2 + \sum_{i=1}^{n_2} (x''_i - \bar{x}'')^2 \right]}$$

$$t = \frac{\bar{x}' - \bar{x}''}{s} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

Ergebnisse

Die täglich ausgeschiedene Zinkmenge im Urin der einzelnen Versuchspersonen geht aus Tabelle 1 hervor.

Ohne Penicillamin ist die Zinkausscheidung von Diabetikern gegenüber der von Normalpersonen signifikant erhöht. Diabetiker scheiden 60,75% mehr Zink im Urin aus als Normalpersonen.

Die Ausscheidungsquotienten vor und nach Penicillamingabe betragen für Normalpersonen 1,65 und für Diabetiker 1,60. Sie liegen also in der gleichen Größenordnung. — Bei der Streuungserlegung ist $t = 0,41$. Für dieses t ist $p < 0,35$. Die gefundene Differenz der Ausscheidungsverhältnisse ist statistisch nicht signifikant.

Die relative Erhöhung der Zinkausscheidung durch Penicillamin ist bei Diabetikern nicht größer als bei Normalpersonen.

Die Versuchspersonen gaben während und nach der Einnahme von D-Penicillamin keine Unverträglichkeitserscheinungen an. Bei den Diabetikern ändert sich

wedern die Blutzuckerkonzentration noch der Bedarf an Insulin noch das subjektive Befinden.

Diskussion

Während die Harnzinkausscheidung bei Diabetikern gegenüber Normalpersonen auch in unseren Versuchen signifikant erhöht ist, ließ sich eine relative Mehrausscheidung bei Diabetikern unter Penicillamin statistisch nicht sichern. Eine erhöhte Absolutausscheidung war bei der vermehrten Grundausscheidung bei Diabetikern zu erwarten. Sie scheiden unter Penicillamin im Verhältnis aber nicht mehr Zink aus als Normalpersonen, da die Zinkmenge in den Insulinpräparaten wohl zu gering ist im Verhältnis zur Ausscheidung. Eine ungünstige Beeinflussung des diabetischen Stoffwechsels durch Zink ist somit unwahrscheinlich.

Das Nachweisverfahren nach WOLFF und BUSSE (28) ist hinreichend genau, da die Methode spezifisch auf Zink eingestellt ist und eine mittlere quadratische Abweichung der Einzelmessung von höchstens ± 4,6%, in unseren Versuchen von nur ± 2,62% aufweist. Die methodischen Fehler liegen in keinem Fall in der Größenordnung der Signifikanz der Ergebnisse.

Eine vermehrte Ausscheidung mit dem Stuhl wurde nicht ausgeschlossen. D-Penicillamin wird aber in einem ausreichend hohen Prozentsatz (30%) (24) der applizierten Menge renal ausgeschieden, so daß die Zink-Penicillamin-Ausscheidung nicht zufällig erhöht sein kann. Die Versuchspersonen bildeten ein einheitliches Untersuchungsgut. Bis auf eine Ausnahme wurden alle Diabetiker von der Blutzuckerambulanz überwacht, waren optimal eingestellt und ihrem Alter entsprechend voll leistungsfähig. Die Normalpersonen waren vollkommen gesund. Die kleine Anzahl erhöht die Wahrscheinlichkeit des Stichprobenzufalls, die hoch signifikante Vermehrung der Ausscheidung unter Penicillamin spricht aber auch für die Richtigkeit der Resultate. Auch die Schwankungsbreite der Werte ist wesentlich enger als bei VALLEE (2), und die Unterschiede zwischen den einzelnen Tagen betragen bei keiner Versuchsperson mehr als 17%. Im 24-Stdn.-Harn wurden die Tagesschwankungen mit erfaßt. Der abweichende Ausscheidungsmodus des Patienten Nr. 7 liegt wohl an einer Dekompensation seiner Stoffwechsellage, bei der CONSTAM (27) ebenfalls eine gesteigerte Zinkausscheidung beobachtet hat. Wir konnten dies bei den übrigen Diabetikern wegen der guten Einstellung nicht feststellen. Auch ergab sich kein Zusammenhang zwischen der Zinkausscheidung und der Dauer des Diabetes, dem Alter der Patienten, dem täglichen Harnvolumen und der Dosierung des Insulins.

Auf Grund der Ergebnisse darf angenommen werden, daß keine Zinkspeicherung bei langdauernder Zufuhr von Zink-Depot-Insulinpräparaten zu erwarten ist.

Wir danken der Firma Heyl & Co., Berlin für die großzügige Bereitstellung von D-Penicillamin (Metalcaptase).

Literatur

1. VALLEE, B. L., *Physiol. Rev. Baltimore* 39, 443 (1959). — 2. VALLEE, B. L. und J. H. R. KÄGI, *Schweiz. med. Wschr.* 88, 132, (1958). — 3. RECHENBERGER, J. und W. WEGNER, *Dtsch. Gesd. Wes.* 16, 1810 (1961). — 4. CONSTAM, G. R., W. LEEMAN, F. ALMASY und A. G. CONSTAM, *Schweiz. med. Wschr.* 32, 1104 (1964). — 5. SEELIGER, K., *Die Nierenschwelle für Zink bei Diabetes mellitus* Diss. Hamburg 1964. — 6. VALLEE, B. L. und M. D. BOSTON, *J. Amer. Med. Ass.* 162, 1053 (1959). — 7. WOLFF, H. und H. KÖSTLER, *Klin. Wschr.* 29, 93 (1951). — 8. RECHENBERGER, J., *Zbl. Stoffwechs.-Verdgs.krkh.* 178 (1958). — 9. KARLSSON, P., *Kurzes Lehrbuch der Biochemie* G. Thieme, Stuttgart (1966). — 10. SCOTT, D. A. und A. M. FISCHER, *J. Pharmacol. Exper. Ther. Baltimore* 58, 93 (1936). — 11. HALLAS-MÖLLER, K., K. PETERSEN und J. SCHLICHTKRULL, *Science, Washington* 116, 394 (1952). — 12. KRAJNIK, A. G., B. MÜLLER-HILL, F. E. STRUWE, H. SUND und K. WALLENFELS, *Klin. Wschr.* 39, 1132 (1961). — 13. McCANCE, R. A. und E. W. WIDDOWSON, *Biochem. J.* 36, 692 (1942). — 14. VALLEE, B. L., W. E. C. WACKER, A. F. BARTHOLOMAY, E. B. ROBIN und E. C. WARREN, *N. England J. Med.* 255, 403 (1956). — 15. VALLEE, B. L., W. E. C. WACKER und J. H. R. KÄGI, *J. Clin. Invest.* 36, 933 (1957). — 16. RUBINI, M. E., G. MONTALVO, C. P. LOCKHART und C. R. JOHNSON, *Amer. J. Physiol.* 200, 1345 (1961). — 17. DRINKER, K. R., P. K. THOMPSON und M. MARSH, *Amer. J. Physiol.* 30, 31, (1927). — 18. SHELINE, G. E., J. L. CHAIKOGG, H. D. JONES und M. L. MONTGOMERY, *J. biol. Chemistry* 147, 409 (1943). — 19. MELTZER, L. E., J. RUTHMAN, P. GEORGE, R. RUTHMAN und J. KITCHELL, *Amer. J. med. Sci.* 244, 283 (1962). — 20. VALLEE, B. L., W. E. C. WACKER, A. F. BARTHOLOMAY und F. L. HOCH, *N. Engl. J. Med.* 257, 1055 (1957). — 21. CONSTAM, G. R., W. LEEMAN und F. ALMASY, *Schweiz. med. Wschr.* 88, 1103 (1958). — 22. SHELINE, G. E., J. L. CHAIKOFF, H. D. JONES und M. L. MONTGOMERY, *J. biol. Chemistry* 149, 139 (1943). — 23. AARSETH, S., *Cardiovascular-renal Disease in Diabetes mellitus Acta med. Scand. Suppl.* 281, 221 (1953). — 24. ENGLESON, G., *Studies in Diabetes mellitus. Acta paediatr Stockholm Suppl.* 97 (zu) 144, (1954). — 25. MONTGOMERY, M. L., G. E. SHELINE und J. L. CHAIKOFF, *J. Exper. Med.* 78, 151 (1943). — 26. PROUT, T. E., S. P. ASPER, jr., T. LEE und B. L. RAY, *Metabolism* 9, 109 (1960). — 27. CRAWHALL, J. C. und C. J. THOMPSON, *Science, Washington* 147, 1459 (1965). — 28. WOLFF, H. und C. BUSSE, *Biochem. Z.* 322, 154 (1951).

Prof. Dr. J.-G. Rausch-Stroomann
43 Essen 1
Hufelandstr. 55