

EVIDENCE FOR SPECIFIC BINDING OF TOLBUTAMIDE
TO THE PLASMA MEMBRANE OF THE PANCREATIC B-CELLS

JANOVE SEHLIN

Sulfonylurea derivatives have long been known to stimulate the release of insulin^{1, 10}. The mechanism of this action is obscure. It has been shown that tolbutamide is distributed like an extracellular space marker in islets incubated with approximate physiological concentrations of albumin⁵. When experiments are performed without albumin in the medium, tolbutamide is taken up to a lesser extent than 3-0-methyl-D-glucose, which distributes in the total tissue water⁸. The islet uptake of tolbutamide is strongly stimulated by substances which enhance the membrane permeability to extracellular space markers⁸.

Taken together, these data prompted us to suggest that tolbutamide is normally restricted to the exterior of the B-cells and stimulates insulin release by binding to the plasma membrane. This view would be substantially corroborated if the islet uptake of tolbutamide were shown to be saturable and if competition between different sulfonylureas,

DIMOSTRAZIONE DELL'ESISTENZA DI LEGAMI SPECIFICI TRA TOLBUTAMIDE E MEMBRANA PLASMATICA DELLA CELLULA B DEL PANCREAS. È noto da tempo che i derivati sulfanilureici stimolano la liberazione di insulina^{1, 10}. Il meccanismo di questa azione non è chiaro. È stato dimostrato che, in isole incubate con concentrazioni approssimativamente fisiologiche di albumina⁵, la tolbutamide si distribuisce come un marcatore dello spazio extracellulare. Quando gli esperimenti vengono compiuti in assenza di albumina nel mezzo di incubazione, la tolbutamide viene captata in misura minore rispetto al 3-0-metil-D-glucosio, il quale si distribuisce nello spazio idrico totale del tessuto⁸. La captazione della tolbutamide da parte delle isole viene fortemente stimolata dalle sostanze che aumentano la permeabilità della membrana ai marcatori dello spazio extracellulare⁸.

Considerati nel loro complesso, questi dati ci hanno indotti ad ipotizzare che la tolbutamide sia normalmente confinata all'esterno delle cellule B e stimoli la liberazione insulinica legandosi con la membrana plasmatica. Questa opinione risulterebbe confermata in maniera decisiva, qualora venisse dimostrato che la captazione della tolbutamide

Key-words: B-cells; Glibenclamide; Insulin release; Obese-hyperglycemic mice; Pancreatic islets; Tolbutamide; Tolbutamide binding.

Data di arrivo in Redazione 12-9-1973.

Acta diabet. lat. 10, 1052, 1973.

with respect to the islet uptake, could be detected. These aspects have now been investigated by analyzing the uptake of tritiated tolbutamide of very high specific radioactivity by B-cell-rich pancreatic islets microdissected from obese-hyperglycemic mice.

MATERIALS AND METHODS

1-(*p*-toluenesulfonyl)-3-butylurea (tolbutamide) labelled with ^3H in the butyl part of the molecule as well as non-radioactive tolbutamide and non-radioactive 1-[*p*-2-(5-chloro-2-methoxybenzamido) ethyl-phenyl]-sulfonyl}-3-cyclohexylurea (glibenclamide) were donated by Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt/Main, GFR. $\text{U-}^{14}\text{C}$ -sucrose was from the Radiochemical Centre, Amersham, Bucks, U.K.; human serum albumin (grade A, less than 2% other proteins) was from Kabi AB, Stockholm, Sweden. All other compounds were commercially available reagents of analytical grade. Distilled and deionized water was used throughout.

The animals used were adult, male obese-hyperglycemic mice (gene symbol *ob/ob*) from the Umeå colony. After being starved overnight, the mice were killed and the islets isolated by free hand microdissection³ in Krebs-Ringer bicarbonate buffer equilibrated with O_2 and CO_2 (95:5). This buffer was used as the basal medium in all subsequent incubations.

After isolation, the islets were subjected to preincubation for 30 min in basal medium. They were then incubated for different periods of time in 200 μl medium supplemented with both ^3H -labelled tolbutamide and ^{14}C -labelled sucrose. The details of the incubations are given in the legends to the table and figures. Sucrose has previously been shown to be restricted to the extracellular space of islets^{6,7}. The double-label procedure therefore made it possible to correct for tolbutamide in the extracellular space without washing the islets. After incubation, the islets were placed on aluminium foil and freed of as much contaminating fluid as possible by means of a micropipette. This procedure was standardized to take only a few seconds. The islets were then plunged into melting isopentane (-160°C). After freeze-drying (-40°C ; 0,001 mm Hg) overnight and weighing on a quartz-fibre balance, the islets were analyzed for ^3H and ^{14}C in a liquid scintillation spectrometer as previously described⁷. Tolbuta-

da parte delle isole può raggiungere un livello di saturazione e fosse possibile mettere in evidenza una competizione tra diverse sulfaniluree per quanto riguarda tale captazione. Questi aspetti sono stati presi in esame nel presente lavoro, in cui la captazione di tolbutamide tritiated dotata di elevatissima radioattività specifica è stata studiata in isole pancreatiche ricche di cellule B, ottenute mediante microdissezione da topi obesi-iperiperglicemici.

MATERIALI E METODI

La tolbutamide [1-(*p*-toluenesulfonyl)-3-butylurea] marcata con ^3H nella parte butilica della molecola, come pure la tolbutamide e la glibenclamide (1-[*p*-2-(5-cloro-2-metossiben-zamido)etil/-fenil]-sulfonyl}-3-cicloesilurea) non radioattive sono state donate dalla *Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt/Main*, Repubblica Federale di Germania. Il saccarosio- $\text{U-}^{14}\text{C}$ è stato fornito dal *Radiochemical Centre, Amersham, Bucks*, Gran Bretagna, e l'albumina sierica umana (grado A, contenente meno del 2% di altre proteine) dalla *Kabi AB, Stockholm*, Svezia. Tutte le altre sostanze erano reattivi puri per analisi disponibili in commercio. Per tutti i procedimenti è stata utilizzata acqua distillata e deionizzata.

Sono stati impiegati topi maschi adulti obesi-iperiperglicemici (simbolo genetico *ob/ob*) della colonia di Umeå. Dopo una notte di digiuno, gli animali venivano uccisi e le loro isole isolate mediante microdissezione a mano libera³ in tampone Krebs-Ringer bicarbonato equilibrato con O_2 e CO_2 (95:5). Questo tampone è stato utilizzato quale mezzo di base in tutte le successive incubazioni.

Una volta isolate, le isole venivano preincubate per 30 min nel mezzo di base e, quindi, incubate per differenti periodi di tempo in 200 μl del mezzo stesso, addizionato con ^3H -tolbutamide e ^{14}C -saccarosio. I dettagli relativi all'incubazione sono indicati nelle didascalie della tabella e delle figure. In precedenza, era stato dimostrato che la distribuzione del saccarosio è limitata allo spazio extracellulare delle isole^{6,7}. Il procedimento di doppia marcatura permette perciò di operare la correzione per la tolbutamide nello spazio extracellulare senza dover ricorrere al lavaggio delle isole. Dopo l'incubazione, le isole venivano poste su fogli di alluminio e liberate, mediante micropipetta, della maggiore quantità possibile di liquido contaminante. Questo procedimento era standardizzato in maniera da richiedere soltanto pochi secondi, dopodiché le isole venivano immerse in isopentano al punto di fusione (-160°C). Dopo congelamento-essiccamento (-40°C ; 0,001 mm Hg) della durata di una notte e

side uptake in excess of the sucrose space was calculated as: (mmoles tolbutamide in islet) — (concentration of tolbutamide in the medium) × (sucrose space). The term space was defined by the expression: (cpm in the tissue) / (cpm per unit volume of the medium).

pesatura su bilancia a fibra di quarzo, esse venivano sottoposte ad analisi, per quanto riguarda il loro contenuto in ^3H e ^{14}C , per mezzo di uno spettrometro a scintillazione liquida, come descritto in precedenza⁷. La quantità di tolbutamide captata in eccesso rispetto allo spazio del saccarosio veniva calcolata come segue: (mmoli di tolbutamide nell'isola) — (concentrazione di tolbutamide nel mezzo) × (spazio del saccarosio). Il termine spazio era definito dall'espressione: (cpm nel tessuto)/(cpm per unità di volume del mezzo).

RESULTS

Tolbutamide was taken up in excess of sucrose and equilibrated very rapidly in the islets (fig. 1). After 3 min of incubation with 20 μM tolbutamide the difference between the sucrose and tolbutamide spaces was 48.0 ± 4.6 $\mu\text{moles/kg}$ dry weight. After 45 min it had decreased to 36.2 ± 1.7 μmoles . The shape of the curves suggests that the decrease in difference was due to sucrose requiring a longer time for equilibration in the islets.

When albumin (3 mg/ml) was added to the incubation medium the islet up-

RISULTATI

La tolbutamide veniva captata in eccesso rispetto al saccarosio e molto rapidamente equilibrata nelle isole (fig. 1). Dopo 3 min di incubazione con tolbutamide 20 μM , la differenza tra lo spazio del saccarosio e quello della tolbutamide era di $48,0 \pm 4,6$ $\mu\text{moli/kg}$ di peso secco. Dopo 45 min, tale valore appariva diminuito a $36,2 \pm 1,7$ μmoli . La forma della curva lascia ritenere che questa riduzione nella differenza sia dovuta al fatto che il saccarosio viene equilibrato più lentamente nelle isole.

Se al mezzo di incubazione veniva aggiunta albumina (3 mg/ml), la capta-

test substance	no. of experiments	islet content of tolbutamide ($\mu\text{moles/kg}$ dry weight of islets)			p-value for effect
		control	test	difference	
albumin (3 mg/ml)	8	51.9 ± 8.2	6.6 ± 3.4	-45.3 ± 6.1	< 0.001
glibenclamide 0.1 mM	14	51.1 ± 4.9	33.9 ± 2.7	-17.2 ± 3.9	< 0.001

Table 1 - Effects of albumin and glibenclamide on the islet uptake of tolbutamide. After preincubation for 30 min in basal medium with one of the listed test substances, islets were incubated for 60 min with radioactivity labelled tolbutamide as well as the test substances as indicated. Each experiment also included parallel control incubations without test substance. The incubation media contained 20 μM ^3H -labelled tolbutamide (313 mCi/mole) and 0.1 mM ^{14}C -sucrose (100 mCi/mole). Results are expressed as the islet content of tolbutamide in excess of the sucrose space. Mean values \pm SEM are given.

Effetti dell'albumina e della tolbutamide sulla captazione della tolbutamide da parte delle isole. Dopo preincubazione per 30 min nel mezzo di base con una delle sostanze di prova elencate, le isole sono state incubate per 60 min con tolbutamide marcata, nonché con la sostanza di prova indicata. Ciascun esperimento comprendeva anche incubazioni parallele di controllo in assenza della sostanza di prova. I mezzi di incubazione contenevano ^3H -tolbutamide 20 μM (313 mCi/mole) e ^{14}C -saccarosio 0,1 mM (100 mCi/mole). I risultati sono espressi come contenuto insulare di tolbutamide in eccesso rispetto allo spazio del saccarosio. Valori medi \pm SEM.

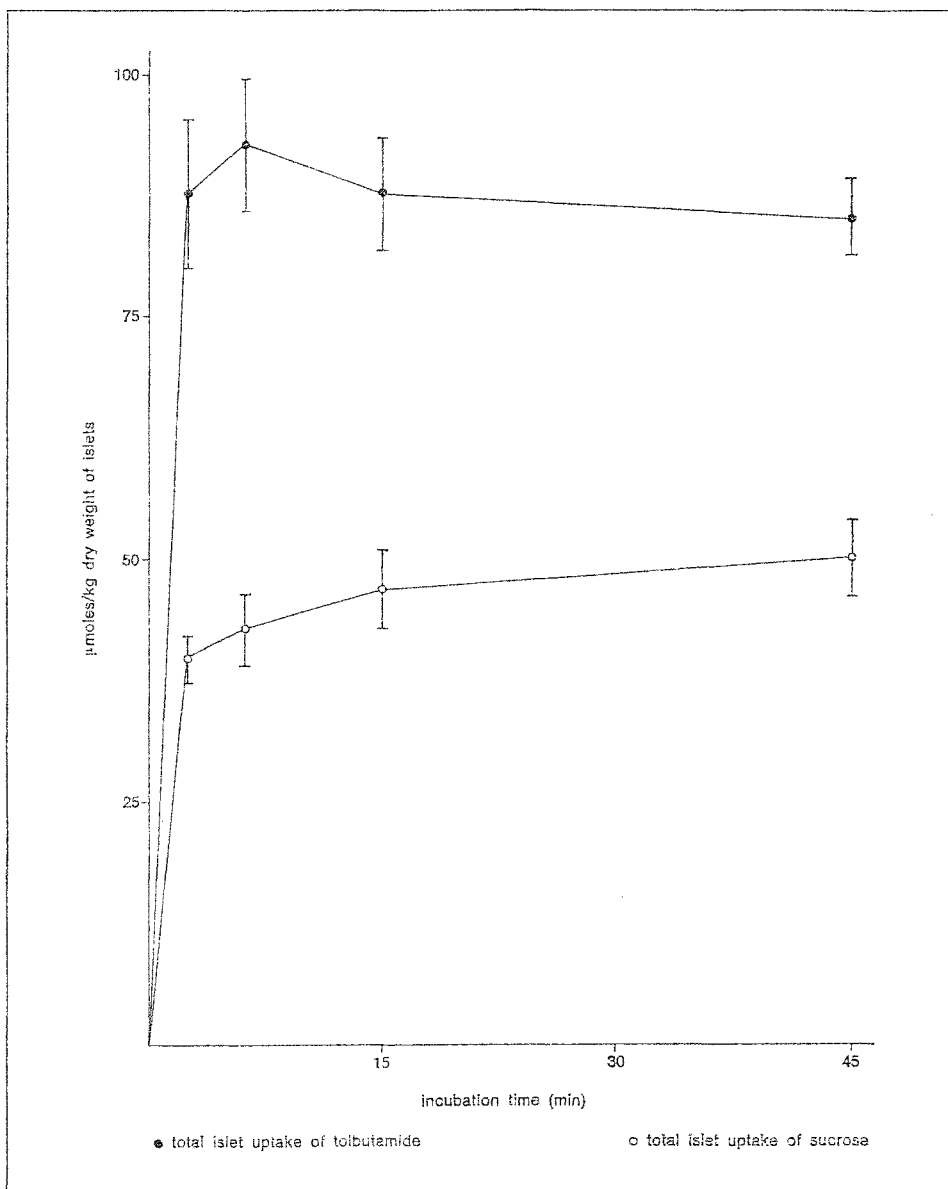


Fig. 1 - Time-course of tolbutamide uptake. After preincubation for 30 min in basal medium, islets were incubated for different periods of time in media containing $20 \mu\text{M}$ ^3H -labelled tolbutamide (313 mCi/mmole) and 0.1 mM ^{14}C -labelled sucrose (100 mCi/mmole). The points show total islet uptake ($\mu\text{moles/kg}$ dry weight of islets) of tolbutamide (\bullet) and of sucrose (\circ). To make possible a direct comparison between the tolbutamide and sucrose spaces, the latter values are calculated for a sucrose concentration of $20 \mu\text{M}$. Bars denote SEM for 6 experiments.

Andamento nel tempo della captazione della tolbutamide. Dopo 30 min di preincubazione nel mezzo di base, le isole sono state incubate per differenti periodi di tempo in mezzi contenenti ^3H -tolbutamide $20 \mu\text{M}$ (313 mCi/mmole) e ^{14}C -saccarosio $0,1 \text{ mM}$ (100 mCi/mmole). I punti indicano la captazione insulare totale ($\mu\text{moli/kg}$ di peso secco di isole) della tolbutamide (\bullet) e del saccarosio (\circ). Per rendere possibile un confronto diretto tra lo spazio della tolbutamide e quello del saccarosio, questi ultimi valori sono calcolati per una concentrazione di saccarosio $20 \mu\text{M}$. Le sbarre indicano i SEM per 6 esperimenti.

take of tolbutamide was strongly depressed (tab. 1). In fact, the uptake did not significantly differ from zero after correction for tolbutamide in the sucrose space. Addition of 0.1 mM glibenclamide resulted in an inhibited uptake of tolbutamide (tab. 1). To investigate the concentration dependence of the tolbutamide uptake, islets were incubated with different concentrations ranging from 0.01 to 1.0 mM. Higher concentrations could not be used because of the limited solubility of tolbutamide. Fig. 2 shows that the steady-state uptake of tolbutamide by the islets is saturable with a maximum uptake of about 3 mmol/kg dry weight and a half-maximum at a 2 mM concentration in the medium.

DISCUSSION

There is indirect evidence that sulfanylureas, like tolbutamide and glibenclamide, do not readily penetrate into the pancreatic B-cells^{5,8}. When incubations were performed in the absence of albumin, glibenclamide was taken up in amounts exceeding the total islet water space. This has been interpreted as being due to binding of glibenclamide to the plasma membranes of the islet cells. In contrast to glibenclamide, tolbutamide was distributed in a space smaller than that of the total islet water⁸. The low specific radioactivity of the labelled tolbutamide used in these experiments made it difficult to demonstrate a tolbutamide uptake in excess of the extracellular space. The present work performed with ³H-labelled tolbutamide of very high specific radioactivity shows that tolbutamide is, in fact, distributed in a volume larger than that of the islet extracellular space. This would be expected if tolbutamide binds to the B-cell membranes, as has previously been proposed⁵. The present observations are probably representative for the B-cells, since islets from

zione della tolbutamide risultava fortemente depressa (tab. 1). Infatti, essa non si discostava significativamente da zero, dopo correzione per la tolbutamide presente nello spazio del saccarosio. L'aggiunta di glibenclamide 0,1 mM dava luogo ad inibizione della captazione di tolbutamide (tab. 1). Per valutare la dipendenza della captazione della tolbutamide dalla concentrazione, le isole sono state incubate con differenti concentrazioni della sostanza (0,01-1,0 mM). Non è stato possibile impiegare concentrazioni più elevate, a causa della limitata solubilità della tolbutamide. La fig. 2 dimostra che la captazione della tolbutamide da parte delle isole è, in condizioni di equilibrio dinamico, saturabile, con massimo di circa 3 mmoli/kg di peso secco e valore semimassimo ad una concentrazione 2 mM nel mezzo.

DISCUSSIONE

Esistono prove indirette secondo cui le sulfaniluree, quali la tolbutamide e la glibenclamide, non penetrano facilmente nelle cellule B del pancreas^{5,8}. Operando l'incubazione in assenza di albumina, la glibenclamide viene captata in quantità superiore allo spazio idrico totale delle isole. Ciò è stato interpretato quale conseguenza della formazione di legami tra glibenclamide e membrane plasmatiche delle cellule insulari. A differenza della glibenclamide, la tolbutamide si distribuisce in uno spazio inferiore a quello idrico totale delle isole⁸. Data la scarsa radioattività specifica della tolbutamide marcata usata in tali esperimenti, la dimostrazione di una captazione in eccesso di questa sostanza rispetto allo spazio extracellulare risultava difficile. Le presenti ricerche, condotte con ³H-tolbutamide dotata di radioattività specifica molto elevata, dimostrano che effettivamente il farmaco si distribuisce in un volume superiore a quello dello spazio extracellulare delle isole. È quanto ci si dovrebbe attendere se la tolbutamide si legasse alle membrane delle cellule B, come ipotizzato in

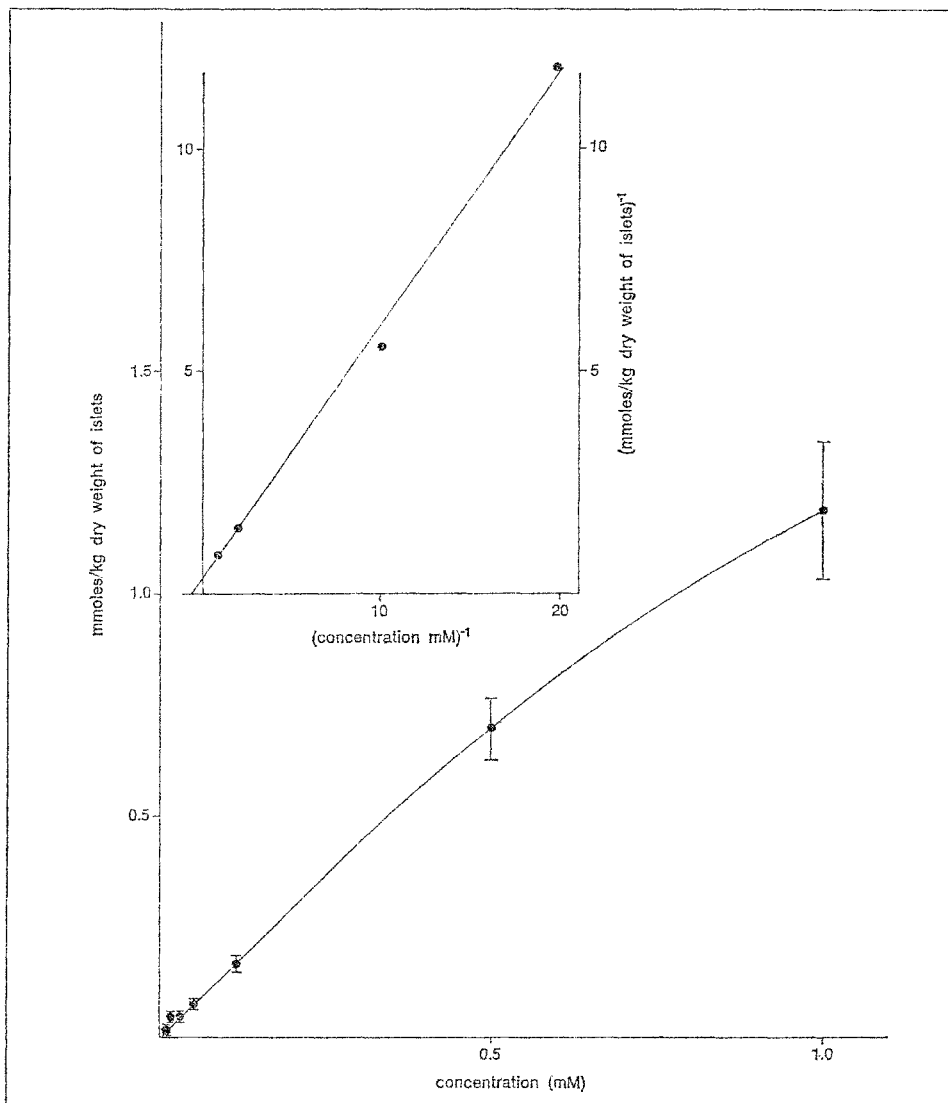


Fig. 2 - Concentration dependence of tolbutamide uptake. After preincubation for 30 min in basal medium, islets were incubated for 60 min with different concentrations of ^3H -labelled tolbutamide (0.01-1.0 mM; 313 mCi/mmmole) and ^{14}C -labelled sucrose (0.1 mM (100 mCi/mmmole). The points in the lower curve show islet uptake of tolbutamide (nmoles/kg dry weight of islets) corrected for label in the sucrose space. Bars denote SEM for 6, 11, 5, 12, 6, 6 and 4 experiments respectively. The upper curve is a double-reciprocal plot of tolbutamide uptake in relation to the tolbutamide concentration of the medium. The four highest tolbutamide concentrations from the lower curve are used.

Dipendenza della captazione di tolbutamide dalla concentrazione. Dopo 30 min di preincubazione nel mezzo di base, le isole sono state incubate per 60 min con differenti concentrazioni di ^3H -tolbutamide (0,01-1,0 mM; 313 mCi/mmmole) e ^{14}C -saccarosio 0,1 mM (100 mCi/mmmole). I punti nella curva inferiore indicano la captazione insulare della tolbutamide (nmoli/kg di peso secco di isole), corretta per la sostanza radioattiva presente nello spazio del saccarosio. Le sbarre indicano i SEM per 6, 11, 5, 12, 6, 6 e 4 esperimenti rispettivamente. La curva in alto è il diagramma della captazione della tolbutamide in rapporto alla concentrazione della sostanza nel mezzo, in cui entrambe le variabili sono trasformate nel loro reciproco. Sono state usate le 4 concentrazioni più alte della curva inferiore.

*ob/ob mice consist to more than 90% of these cells*⁴.

The binding of tolbutamide was much more less than that reported for glibenclamide⁸ and glibornuride¹³. This is of interest, since the latter sulfonylurea compounds are more potent insulin secretagogues than tolbutamide^{2, 11, 12}. The finding that the islet uptake of tolbutamide was saturable at rather low medium concentrations supports the idea of a specific binding to the B-cell membrane. The idea that this binding is related to the secretagogic action of tolbutamide is supported by the observation that glibenclamide displaces tolbutamide from the islets.

*The uptake of tolbutamide by the islets was strongly dependent on the presence of albumin in the medium. It was evident that albumin at a concentration of 3 mg/ml lowered the binding of 0.02 mM tolbutamide so that the residual binding did not significantly differ from zero. This is in accordance with a previous study in which it was shown that at this albumin concentration the islets did not bind significant amounts when exposed to 0.3 mM of tolbutamide⁵. These observations are not surprising, since it is known that albumin has a high capacity for binding tolbutamide as well as other sulfonylureas⁹. It should be noted that albumin always is present during *in vivo* stimulation with sulfonylureas. The fact that tolbutamide also stimulates insulin release under *in vitro* conditions when albumin is present for methodological reasons indicates that small amounts of bound tolbutamide suffice to elicit insulin release.*

precedenza⁵. Queste osservazioni sono probabilmente rappresentative delle cellule B, dato che queste costituiscono⁴, per oltre il 90%, le isole dei topi *ob/ob*.

I legami della tolbutamide erano molto minori di quelli segnalati per la glibenclamide⁸ e la glibornuride¹³; è questo un dato interessante, in quanto queste ultime sulfaniluree stimolano la secrezione insulinica in misura maggiore che non la tolbutamide^{2, 11, 12}. Il rilievo che la captazione insulare della tolbutamide è saturabile a concentrazioni piuttosto basse della sostanza nel mezzo di incubazione conferma l'idea di un legame specifico con la membrana B-cellulare. L'ipotesi che questo legame sia in rapporto con l'azione secretagogica del farmaco trova appoggio nell'osservazione che la glibenclamide sposta la tolbutamide dalle isole.

La captazione della tolbutamide da parte delle isole dipende strettamente dalla presenza di albumina nel mezzo. Ad una concentrazione di 3 mg/ml, questa è apparsa ridurre sensibilmente i legami della tolbutamide 0,02 mM, tanto che quelli residui non si discostavano significativamente da zero. Ciò concorda con i risultati di un precedente studio, nel quale è stato dimostrato che a questa concentrazione di albumina le isole non legano quantità significative di tolbutamide, quando esposte a concentrazioni 0,3 mM della sostanza⁵. Ciò non sorprende, noto essendo che l'albumina possiede una elevata capacità di legare la tolbutamide ed altre sulfaniluree⁹. Deve essere rilevato che durante la stimolazione *in vivo* con sulfaniluree è sempre presente albumina. Il fatto che la tolbutamide stimoli anche la liberazione insulinica *in vitro*, allorché l'albumina è presente per ragioni metodologiche, indica che per provocare la liberazione dell'ormone sono sufficienti piccole quantità di tolbutamide legata.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Swedish Medical Research Council (grant 12X-562). The author wishes to thank Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt/Main, GFR, for a gift of ³H-labelled tolbutamide as well as unlabelled tolbutamide and glibenclamide.

RIASSUNTO

In isole pancreatiche ottenute da topi obesi-iperlipidemici è stata studiata la captazione di ^3H -tolbutamide. Il farmaco viene captato in eccesso rispetto allo spazio extracellulare delle isole. La captazione è saturabile, con massimo di circa 3 mmoli/kg di peso secco e valore semimassimo ad una concentrazione 2 mM nel mezzo. Albumina e glibenclamide deprimono la captazione della tolbutamide da parte delle isole. Questi dati confermano l'opinione secondo la quale la tolbutamide stimolerebbe la liberazione insulinica mediante formazione di legami specifici con la membrana plasmatica delle cellule B.

RÉSUMÉ

On a étudié l'absorption de ^3H -tolbutamide par les îlots pancréatiques de souris obèses hyperlipémiqes. Le médicament est absorbé en excès relativement à l'espace extracellulaire des îlots. L'absorption est saturable, avec un maximum d'environ 3 mmoles/kg de poids sec, et avec une valeur semi-maximum à la concentration 2 mM dans le milieu. Albumine et glibenclamide dépriment l'absorption de tolbutamide de la part des îlots. Ces données confirment l'opinion selon laquelle le tolbutamide stimulerait la libération insulinique au moyen de la formation de liaisons spécifiques avec la membrane plasmatique des cellules B.

RESUMEN

Se ha estudiado la captación de ^3H -tolbutamida en islas pancreáticas procedentes de ratones obeso-hiperglicémicos. Respecto al espacio extracelular de las islas, el fármaco resulta captado en exceso. La captación se puede saturar con un máximo de unos 3 mmoli/kg de peso seco y valor semimáximo a la concentración 2 mM en el medio. La albumina y la glibenclamida deprimen la captación de la tolbutamida por parte de las islas. Estos datos corroboran la opinión según la cual la tolbutamida estimula la liberación de insulina por medio de la formación de vínculos específicos con la membrana plasmática de las células B.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Aufnahme von ^3H -markiertem Tolbutamid seitens der Pankreasinseln von adipös-hyperglykämischen Mäusen wurde untersucht. Die Substanz wird in einem Raum aufgenommen, der grösser ist als der extrazelluläre Raum der Inseln. Die Aufnahme hat einen Sättigungspunkt und erreicht ihr Maximum bei 3 mMol/kg Trockengewicht und ihren Halbwert bei einer Konzentration von 2 mM im Medium. Albumin und Glibenclamid deschränken die Tolbutamidaufnahme. Diese Befunde bestätigen die Ansicht, dass Tolbutamid die Insulinfreisetzung mittels Bildung spezifischer Bindungen an der Plasmamembran der B-Zelle fördert.

SUMMARY

The uptake of ^3H -labelled tolbutamide by microdissected pancreatic islets from obese-hyperglycemic mice has been studied. Tolbutamide is taken up in excess of the extracellular space of the islets. The uptake is saturable with a maximum uptake of about 3 mmoles/kg dry weight and a half-maximum at a 2 mM concentration in the medium. Albumin and glibenclamide depress the islet uptake of tolbutamide. The data support the view that tolbutamide stimulates insulin release by specific binding to the plasma membrane of the B-cells.

REFERENCES

- 1) GRODSKY G. M.: Insulin and the Pancreas - Vitam. and Horm. 28, 37, 1970.
- 2) GRODSKY G. M., LEE J., FANSEKA R., SMITH D.: Insulin Secretion from the in Vitro Perfused Pancreas of the Rat: Effect of Ro 6-4563 and other Sulfonylureas - In: DUBACH U. C., BÜCHERT A. (Eds): Recent Hypoglycemic Sulfonylureas. Hans Huber, Bern, 1971; p. 83.
- 3) HELLERSTRÖM C.: A Method for the Microdissection of Intact Pancreatic Islets of Mammals - Acta endocr. (Kbh.) 45, 122, 1964.
- 4) HELLMAN B.: Studies in Obese-Hyperglycemic Mice - Ann. N. Y. Acad. Sci. 131, 541, 1965.
- 5) HELLMAN B., SEHLIN J., TÄLJEDAL L.-B.: The Pancreatic β -Cell Recognition of Insulin Secretagogues. II. Site of Action of Tolbutamide - Biochem. biophys. Res. Commun. 45, 1384, 1971.

- 6) HELLMAN B., SEHLIN J., TÄLJEDAL I.-B.: Transport of α -Aminoisobutyric Acid in Mammalian Pancreatic β -Cells - *Diabetologia* 7, 256, 1971.
- 7) HELLMAN B., SEHLIN J., TÄLJEDAL I.-B.: Evidence for Mediated Transport of Glucose in Mammalian Pancreatic β -Cells - *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 241, 147, 1971.
- 8) HELLMAN B., SEHLIN J., TÄLJEDAL I.-B.: The Pancreatic β -Cell Recognition of Insulin Secretagogues. IV. Islet Uptake of Sulfonylureas - *Diabetologia* 9, 210, 1973.
- 9) JUDIS J.: Binding of Sulfonylureas to Serum Proteins - *Pharm. Sci.* 61, 89, 1972.
- 10) LOUBATIÈRES A.: Stimulators and Inhibitors of Insulin Secretion. Physiological and Pharmacological Interferences. Synergisms and Antagonisms - In: LEVINE R., PFEIFFER E. F. (Eds): Mechanism and Regulation of Insulin Secretion. Casa Ed. « Il Ponte », Milano, 1968; *Acta diabet. lat.* 5 (Suppl. 1), 220, 1968.
- 11) PFEIFFER E. F., FUSSGÄNCER R., HINTZ M., KATSILAMBROS N., LAUBE N.: Dynamics of Insulin and Glucagon Secretion of the Isolated Perfused Rat Pancreas and Islets Following and in Presence of Newer Sulfonylureas - In: DUBACH U. C., BÜCHERT A. (Eds): Recent Hypoglycemic Sulfonylureas. Hans Huber, Bern, 1971; p. 97.
- 12) RENOLD A. E., LAMBERT A. E., BURR I. M., STAUFFACHER W.: Effects in Vitro of Sulfonylurea Derivatives on Fetal and Adult Rat Pancreas - In: DUBACH U. C., BÜCHERT A. (Eds): Recent Hypoglycemic Sulfonylureas. Hans Huber, Bern, 1971; p. 70.
- 13) TÄLJEDAL I.-B.: Uptake of Glibornuride by Microdissected Pancreatic Islets - (In manuscript, 1973).

Requests for reprints should be addressed to:

JANOVE SEHLIN
Istologiska Institutionen
Umeå Universitet
S-901 87 Umeå - Sweden

Traduzione a cura di G.U.