

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. K. ZEIGER).

**Die Markierung der A-Zellen des Inselsystems beim Menschen
durch Silberimprägnierung nach GROS-SCHULTZE.**
(Mit einem Beitrag von F. FEYRTER und A. TERBRÜGGEN.)

Von
H. FERNER.

(Eingegangen am 17. Mai 1954.)

Die Fortschritte auf dem Gebiete der inneren Sekretion des Inselorganes, welche im Laufe der letzten Jahre erzielt wurden, waren zu einem nicht unerheblichen Teile den verbesserten Färbemethoden zur Differenzierung der A- und B-Zellen zu danken. Insbesondere haben die Silbermethode nach GROS-SCHULTZE zur Markierung der A-Zellen beim Menschen (FERNER) und die Granulafärbemethoden (GOMORI) Anwendung gefunden. Es gelang unter anderem der Nachweis, daß ein zweites Inselhormon, das Glucagon, existiert, das den A-Zellen entstammt und einen hyperglykämisierenden Effekt entfaltet. Es bewirkt bei Carnivoren schon in einer Dosierung von 0,1 γ i.v. eine sofortige Blutzuckererhöhung. Von STAUB (1953) und Mitarbeitern ist das Glucagon inzwischen in reiner kristallisierter Form gewonnen worden.

Das Substrat für die Differenzierung der Inselzellen.

Die Markierung der beiden Zelltypen in den Inseln im mikroskopischen Präparat beruht darauf, daß es gelingt, die spezifische Granulierung der A- und B-Zellen in verschiedener Weise anzufärben¹. Im gelungenen Präparat nach Chromalaun-Hämatoxylin-Phloxin-Färbung (GOMORI) z. B. erscheinen die A-Zellen rot und die B-Zellen blau granuliert. *Das Vorhandensein und die Anfärbarkeit der spezifischen Körnelung ist also die Voraussetzung für die farberische Kennlichmachung der Zelltypen.* Auch die Granulationen der A-Zellen allein darzustellen ist bei frischem Material für eine Differenzierung ausreichend wie bei der Gomori-Azan-Färbung, oft ist dann aber die Unterscheidung nicht distinkt genug. Da es andere regelmäßige und sichere Kriterien für die Unterscheidung, z. B. charakteristische Unterschiede der Größe, Form oder Struktur der Zellkerne nicht gibt², können weitgehend oder völlig ent-

¹ Die C- und D-Zellen (BENSLEY, BLOOM) rechtfertigen nicht ihre Kennzeichnung als eigener Zelltyp (FERNER 1952). Die vereinzelt vorkommenden D-Zellen sind den A-Zellen zuzuordnen (GOMORI).

² Nur die Inselzelltypen beim Meerschweinchen machen hierbei eine Ausnahme, da die Kerne der A- und B-Zellen deutlich verschieden sind.

granulierte B-Zellen oft nicht mit Sicherheit als solche erkannt werden. Das Fehlen der Granulierung im gefärbten Präparat kann auch die Folge einer ungeeigneten oder fehlerhaften Fixierung sein, welche die Körnchen nicht zu erhalten vermochte oder ihre Anfärbung nicht erlaubt. Da die Inselzellen auch während der Teilung ihre Granulierung verlieren und ganz „hell“ erscheinen, ist es gewöhnlich unmöglich, Teilungsfiguren mit Sicherheit einem der beiden Zelltypen zuzuordnen. Es gelingt nur bei jenen Tierformen, bei denen die Zelltypen innerhalb der Inseln topisch geordnet liegen, wie bei den fetalnen Mantelinseln oder denen der Muridae. Hier kann aus der Lage der Teilungsfigur — ob im A-Zellenmantel oder im B-Zellenkomplex — meist auf ihre Zugehörigkeit geschlossen werden.

Die AB-Relation.

Die Erfahrung lehrt, daß man unter normalen Bedingungen bei Säugern, insbesondere bei den Laboratoriumstieren, mit den modernen Granulafärbemethoden (GOMORI 1941, FERNER 1952) und bei Verwendung dünner Schnitte bei der Inselzelldifferenzierung keine besonderen Schwierigkeiten hat, da alle Inselzellen gut granuliert sind. Es stimmen daher auch die von verschiedenen Untersuchern gefundenen Werte der normalen AB-Relation gut überein. Unter solchen experimentellen Bedingungen, welche zu starker Entgranulierung der B-Zellen Veranlassung geben, tritt diese Schwierigkeit ihrer Erkennung bereits auf. Die AB-Relation hat sich aber nicht nur für die experimentelle Morphologie, sondern auch für die menschliche Pathologie als bedeutungsvoll erwiesen, da Verschiebungen der Relation aufschlußreicher sind als Feststellungen über Änderungen des Inselgesamtvolumens ohne Zelldifferenzierung.

In einer einzelnen Insel oder genauer gesagt in einer aus einer Insel herausgeschnittenen Scheibe, wie wir sie im Präparat beurteilen, schwankt die prozentuale Beteiligung der A- und B-Zellen außerordentlich stark. In der Mehrzahl der Inseln überwiegen jedoch beim ausgewachsenen Tier und beim erwachsenen Menschen die B-Zellen beträchtlich. Um so bemerkenswerter ist die Feststellung, daß die Auszählung einer Anzahl von Inseln und die Errechnung des Durchschnittes eine konstante AB-Relation ergibt (FERNER 1942, HULTQUIST und Mitarbeiter 1948), ganz gleichgültig, welcher Teil des Pankreas für die Untersuchung verwendet wurde (HULTQUIST 1948). Das Inselorgan besteht aus rund 20% A-Zellen und 80% B-Zellen sowohl bei den ausgewachsenen Laboratoriumstieren als auch beim gesunden erwachsenen Menschen. Die Schwankungen betragen in der Regel nach oben und nach unten nicht mehr als 5%.

Die Granulafärbungen lassen uns leider *beim Menschen* für die Bestimmung der AB-Relation oft im Stich, insbesondere am pathologischen menschlichen Material. Hierfür sind mehrere Gründe maßgeblich. Einmal wird man nur selten wenige Stunden nach dem Tode fixierte Drüsen

zur Verfügung haben, zum anderen ist beim erwachsenen Menschen eine wechselnde Anzahl von B-Zellen völlig entgranuliert oder nur am Capillarpol granuliert, der im Schnitt nicht immer getroffen ist. In ganz besonderem Maße gilt letzteres für die Inseln von Zuckerkranken, von denen bekannt ist, daß oft ein großer Teil der B-Zellen extrem entgranuliert erscheint. Diese B-Zellen sind dann *chromophob* oder, wenn nach der Phloxinfärbung nicht ausreichend differenziert wurde, sogar in der Farbqualität der A-Zellen tingiert. So erklärt es sich, daß man z. B. mit der Gomori-Methode beim erwachsenen Menschen¹ meist unbefriedigende Ergebnisse erhält und viele Inselzellen eben nicht mit Sicherheit dem einen oder anderen Zelltyp zuordnen kann (HULTQUIST 1949, BURKL 1951, CREUTZFELDT 1953, eigene Erfahrungen). Auch Originalpräparate von Dr. GOMORI, welche er mir freundlichst überlassen hat, zeigen dieses Phänomen in ganz ausgesprochener Weise. Auf der anderen Seite werden bei schwacher Phloxinfärbung oft nicht alle A-Zellen genügend deutlich rot erscheinen. Man kann mit anderen Worten eine genaue Auszählung nicht vornehmen, da die Zuordnung eines größeren oder kleineren Teiles der Inselzellen beim Menschen zweifelhaft bleibt. Diese Unsicherheit äußert sich in einer viel größeren „Schwankungsbreite“ der AB-Relation, wenn die Auszählung an Gomori-präparaten erfolgt. GOMORI (1941) findet mit der Chromhämatoxylin-Phloxin-Methode eine Schwankung der A-Zellen-Frequenz schon beim gesunden erwachsenen Menschen zwischen 10% und 40%, davon allerdings in $\frac{2}{3}$ der Fälle eine Schwankung nur zwischen 11% und 25%. Die starke Verschiebung der A-Zellen-Frequenz besonders nach oben, welche in Widerspruch steht zu der bemerkenswerten Konstanz von rund 20% bei Laboratoriumstieren und den gleichen Werten, die beim gesunden erwachsenen Menschen mit der Silbermethode festgestellt wurden, sind durch die Schwierigkeiten der Differenzierung und Auszählung von menschlichen Granulapräparaten verursacht und erklärt. Besonders die hohen Werte der A-Zellen erwecken den Verdacht, daß hier entgranulierte B-Zellen durch das Phloxin rötlich angefärbt und als A-Zellen gezählt wurden.

Die Silberimprägnierung der A-Zellen nach GROS-SCHULTZE.

Zur Markierung der A-Zellen und für die Auszählung der AB-Relation eignet sich *beim Menschen*, insbesondere bei pathologischem Material, die Silberimprägnierung nach GROS-SCHULTZE besser als die Granulafärbemethoden. Bei ausreichender Erfahrung und Routine stellen sich die A-Zellen sehr prägnant schwarz granuliert dar, während die B-Zellen

¹ Die Inselzellen beim menschlichen Embryo sind dicht und gleichmäßig granuliert (FERNER und STOECKENIUS 1950).

hell bleiben oder diffus gebräunt erscheinen. Durch Vergolden verschwindet die Bräunung wieder. An gelungenen Silberpräparaten kann die AB-Relation ohne Schwierigkeiten ausgezählt werden. Die technische Durchführung der Silbermethode, die ja von der Neurohistologie herstammt, speziell zur Markierung der A-Zellen, sowie ihre Vor- und Nachteile habe ich in meiner Monographie 1952 ausführlich dargelegt und brauche sie daher hier nicht zu wiederholen. Die Differenzierung mit der Silbermethode ist vom Grad der Granulierung der B-Zellen unabhängig. Die A-Zellen sind immer regelmäßig und viel gleichmäßiger granuliert.

Beim gesunden erwachsenen Menschen haben meine eigenen Zählungen im Inselorgan, wie bereits erwähnt, eine A-Zellen-Frequenz von rund 20% ergeben (FERNER 1942), zu einem Zeitpunkt, zu dem über die gleichartige AB-Relation bei Säugern — später mit Granulafärbe-methoden ausgezählt — noch nichts bekannt war. Die weitgehende Übereinstimmung der AB-Relation beim gesunden erwachsenen Menschen und bei den Laboratoriumstieren kann geradezu als Beweis für ihre Richtigkeit gelten. Die Gros-Schultze-Methode für die Markierung der A-Zellen ist von einer Reihe von Untersuchern kritisch geprüft und ihre Eignung bestätigt worden, insbesondere auch durch Vergleich mit Granulafärbungen (TERBRÜGGEN 1947, 1948; HULTQUIST, DAHLÉN und HELANDER 1948).

Die Identität der Silberzellen mit den A-Zellen halten außerdem auf Grund *eigener* Untersuchungen für wahrscheinlich oder erwiesen:

CAMPENHOUT (1933) vermutete wohl erstmalig, daß die versilberbaren Zellen in den Inseln den A-Zellen entsprechen und KON (1933) beobachtete, daß die Silberreaktion beim Menschen nur in den A-Zellen der LANGERHANSSchen Inseln positiv ausfällt. Ich selbst habe diese Frage während der menschlichen Entwicklung und beim erwachsenen Menschen eingehend untersucht (FERNER 1938—1952). BARGMANN (1939) schließt sich in seinem Handbuchbeitrag der Anschauung an, daß die Silberzellen in den Inseln mit den A-Zellen identisch sind. TERBRÜGGEN (1947, 1948): „Ich selbst kann bestätigen, daß die nach GROS-SCHULTZE dargestellten Silberzellen nach Form und Lage den A-Zellen entsprechen“.

CREUTZFELDT (1949) beim Hund: „Die Lage der Silberzellen entspricht den mit gewöhnlichen Färbungen erhaltenen Bildern von A-Zellen“ und „Die Verschiebung im Zahlenverhältnis von α - zu β -Zellen im Verlaufe des (Alloxan)-Diabetes läßt sich nach Auszählung nach GROS-SCHULTZE versilberter Präparate genauer erfassen“. BARGMANN und CREUTZFELDT (1949): „Es ist nicht zweifelhaft, daß die nach GROS-SCHULTZE imprägnierbaren Inselzellen tatsächlich A-Zellen verkörpern.“ SENDRAIL, BAZEX und BOLTE (1949) haben die Identität beim Meerschweinchen einwandfrei erwiesen.

Im Gegensatz zu dieser bemerkenswerten Zahl von Autoren, welche in der Methodik und in der Materie über eine große Erfahrung verfügen, haben BURKL (1951, 1953) und neuerdings CREUTZFELDT (1953), dieser in Gegensatz zu seinen vorausgegangenen Untersuchungsergebnissen, die Ansicht vertreten, daß sich die Versilberung zur Markierung der A-Zellen nicht eigne, weil „bei Verwendung der GROS-SCHULTZESCHEN Versilberungsmethode entgegen den Angaben anderer Autoren nicht alle A-Zellen in den Inseln erfaßt werden“ (BURKL), bzw. daß „der Gros-Schultze-Methode der Wert einer elektiven Darstellungsmethode für die A-Zellen der Inseln abzusprechen sei“ (CREUTZFELDT).

Das Studium der ablehnenden Arbeiten macht es indessen dem Kenner der Methodik und der Materie nicht schwer, die Ursachen für den Mißerfolg aufzudecken. Auffallend ist zunächst die Kehrtwendung um 180° in der Beurteilung der Silbermethode für die A-Zellen-Markierung, welche CREUTZFELDT seit 1949 vollzogen hat. Es seien nur einige Beispiele aufgeführt:

CREUTZFELDT 1953, S. 165: „Die Zahl der mit der Gros-Schultze-Methode in den LANGERHANSSCHEN Inseln darstellbaren Silberzellen läßt sich bis zu einem gewissen Grade variieren.“ „Es liegt auf der Hand, daß dem Versilberer damit ein weiter Spielraum gelassen ist“ (S. 137). Ganz anders 1949: „Es muß weiterhin mit FERNER (1938) gegen HÄMPFERL (1932) ausdrücklich betont werden, daß die Zahl der Silberzellen im Pankreas bei längerer Einwirkung der ammoniakalischen Silberlösung nicht zunimmt, solange der Schnitt nicht gänzlich geschwärzt ist“ (S. 285). Oder: „Die Launenhaftigkeit der Gros-Schultze-Methode ist bekannt“ (1953, S. 152) und „Von Launenhaftigkeit der Gros-Schultze-Methode kann kaum die Rede sein“ (1949, S. 285).

Einer der Gründe für den Mißerfolg CREUTZFELDTS ist unmittelbar aus seiner Schilderung des Entwicklungsvorganges der Silberzellen in der ammoniakalischen Silbernitratlösung selbst zu entnehmen (1953, S. 155). Er führt aus: „Beobachtet man jedoch unter dem Mikroskop den Entwicklungsvorgang aufmerksam, so kann man in zahlreichen Fällen innerhalb der Inseln die Silberzellen nacheinander sehen. Und zwar schwärzen sich typischerweise zuerst einzelne Silberzellen, die in Zahl und Lage den echten A-Zellen entsprechen dürften, während sich etwas später erst die Masse der randständigen Silberzellen imprägniert“¹.

Da es sich aber doch methodisch-technisch nur darum handelt, die A-Zellen von den B-Zellen zu „differenzieren“ und nicht darum, unter allen Umständen „auszusilbern“, d. h. möglichst viele Inselzellen zu schwärzen, muß man sich fragen, warum CREUTZFELDT die Versilberung nicht zu einem Zeitpunkt beendet, zu dem er erkennt, daß die „echten“ A-Zellen schwarz imprägniert sind, die übrigen Inselzellen aber entweder noch gar nicht verändert oder nur gebräunt sind. Und was sollte es an dem Ergebnis ändern, wenn man nachher durch Vergoldung diese Bräunung in den B-Zellen wieder zum Verschwinden bringt? Selbstver-

¹ Vom Verfasser gesperrt.

ständlich kann auf die Vergoldung auch verzichtet werden. Die Versilberung ist zu beenden, wenn der Untersucher erkennt, daß die A-Zellen in einem Schub imprägniert sind. Dieses Intervall zwischen der Imprägnierung der A-Zellen und der später etwa nachfolgenden Bräunung oder Schwärzung anderer Inselzellen recht groß zu gestalten oder letztere überhaupt zu vermeiden, ist die Kunst des Versilberers und seiner Methode. In der von mir angewandten Durchführung der GROS-Schultze-Versilberung erfolgt nach der schubartigen Imprägnierung der A-Zellen¹ keine Schwärzung der B-Zellen, auch wenn der Schnitt mehrere Minuten in der ammoniakalischen Lösung liegenbleibt. Wenn ich ohne Rücksicht auf die beabsichtigte Differenzierung darauf ausgehe, soviel als möglich zu schwärzen, dann gehe ich am Wesen der „Differenzierung“ vorbei und erhalte ein unbrauchbares Präparat. Wenn weiter CREUTZFELDT der Meinung ist, daß die Bodian-Methode² „deswegen von großem Wert sei, weil die Zahl der Silberzellen durch den Untersucher nicht zu beeinflussen sei“, so ist dazu zu sagen, daß ganz allgemein in der mikroskopischen Technik die Erfahrung und Übung eines Untersuchers doch die Grundlage für die Differenzierung eines Präparates sind, und daß auch eine gewöhnliche H.-E.-Färbung oder Azanfärbung „subjektiv“ unter dem Mikroskop differenziert werden muß. Bei den Granulafärbungen wird sogar zweimal unter Kontrolle des Auges differenziert, d. h. das Zuviel an Farbe aus den Elementen herausgewaschen, die in einem 2. Akt mit einer anderen Farbe tingiert werden sollen, worauf ein zweites Mal differenziert wird. Es ist in jedem Falle dem Untersucher überlassen, auf Grund seiner Erfahrung diesen Vorgang zu beenden, und dies um so mehr, je diffiziler die Differenzierung ist. Der Unterschied besteht nur darin, daß bei der GROS-Schultze-Methode *einmal* und zwar progressiv, bei den Granulafärbungen (z. B. der Azanfärbung), aber sogar *zweimal* regressiv differenziert wird. Es besteht kein Zweifel, daß man auch mit den verschiedenen Granulafärbungen am gleichen Material keine mathematische Konstanz auf 1% genau erhalten kann, wenn auch darüber noch keine Untersuchungen vorliegen. Insbesondere kann man, wenn man will, die entgranulierten B-Zellen in den Inseln je nach der Differenzierung und Färbung in dem Farbton der A-Zellen oder B-Zellen anfärben. Man braucht nur bei der Gomori-Hämatoxylin-Phloxin-Färbung das Phloxin intensiver zur Anwendung bringen und erhält die entgranulierten B-Zellen rot, also als „A-Zellen“ gefärbt. Man kann nicht mit Silbermethoden arbeiten und glauben, dabei auf die Propädeutik der histologischen Technik verzichten zu können.

¹ Die Geschwindigkeit des Erscheinens der Silberzellen ist von der Einstellung der ammoniakalischen Silbernitratlösung, d. h. von dem Ammoniakzusatz abhängig.

² Die Bodian-Methode arbeitet mit kolloidalem Silber und Kupfer als Katalysator, also mit ganz anderen Bedingungen.

Neuerdings hat FEYRTER durch einen interessanten Kunstgriff die Übereinstimmung der Ergebnisse der Silbermethode und der Granulafärbungen für die Markierung der A-Zellen beim Menschen in direktem Vergleich bewiesen (s. S. 31): Nach der Versilberung eines Pankreaschnittes mit der FEYRTERSchen „genormten“ Methode¹ wird eine der Inseln mit ihren Silberzellen bei starker Vergrößerung photographiert. Hierauf wird der Schnitt wieder entsilbert und eine Granulafärbung ausgeführt (Masson-Trichrom). Die gleiche Insel wird nun unter dem Mikroskop eingestellt und mit der Photographie verglichen. Es ergibt sich, daß die A-Zellen mit den Silberzellen der Photographie *Zelle für Zelle* übereinstimmen. Gelegentlich wird man auf einzelne A-Zellen und ihre spezifisch gefärbten Körnchen im Granulapräparat erst durch das Silberbild aufmerksam, da die A-Zellen im Silberbild markanter sind. Herr Prof. FEYRTER hat mir kürzlich Gelegenheit gegeben, mich von der Übereinstimmung A-Zellen—Silberzellen am gleichen Inselschnitt zu überzeugen. Der geschilderte Kunstgriff liefert einen nicht zu entkräftenden Beweis, daß in den Inseln durch die Gros-Schultze-Methode beim Menschen, bei richtiger Ausführung und hinreichender Erfahrung, die A-Zellen — und nur diese — in markanter Weise zur Darstellung gebracht werden, wie dies schon den Erfahrungen von CAMPENHOUT, KON, FERNER, HESS, TERBRÜGGEN und HULTQUIST, DAHLÉN und HELANDER entsprach.

Der zweite Einwand gegen die CREUTZFELDTSchen Ergebnisse bezieht sich auf das Untersuchungsgut: Mit seiner Methodik erhielt CREUTZFELDT bei 52 Gesunden, wie er seine nichtdiabetischen Fälle nennt, eine Silberzellfrequenz zwischen 9 % und 68 % und bei 24 Diabetikern eine solche zwischen 17 % und 82 %, also praktisch keine verwertbaren Unterschiede. Er zieht daraus weitgehende Folgerungen, auf welche hier nicht eingegangen zu werden braucht. Nun sehe man sich aber diese „Gesunden“ mit der extrem streuenden Silberzellenfrequenz näher an, die in einer Liste mit Hauptleiden und Todesursachen aufgeführt werden und als Vergleichsmaterial dienen. Es handelt sich in der *erdrückenden* Mehrzahl um Fälle, welche nach langwierigen Erkrankungen, insbesondere bösartigen Geschwüsten, verstorben sind, also ein rein pathologisches Material und nicht um „Gesunde“, wie sie irreführend bezeichnet werden. Es ist aber hinlänglich betont worden (FERNER 1942), daß nach langdauernden reduzierenden Erkrankungen, ebenso wie nach langdauernden Hungerzuständen, die AB-Relation auf die A-Zellen-Seite in ähnlicher Weise wie beim Diabetes verschoben gefunden wird, was wohl als eine Folge der besonderen Stoffwechselsituation zu werten ist. Auch aus der CREUTZFELDTSchen Tabelle geht dies einwandfrei hervor: Bei den ersten

¹ Es handelt sich um die GROS-SCHULTZE-Methode.

13 Fällen, bei denen die Silberzellenfrequenz bis 25% gefunden wird (die also noch einer normalen entsprechen würde), ist nicht ein einziger maligner Tumor. Bei den übrigen Fällen von „Gesunden“ finden sich 17 maligne Tumoren und eine weitere große Anzahl von Fällen mit Tuberkulose, Marasmus und Kachexie. Die Bezeichnung Gesunder für die 52 Vergleichsfälle zum Diabetes ist irreführend und das Material selbst ist ungeeignet, um die A-Zellen-Frequenz gesunder Menschen zu bestimmen. CREUTZFELDT kommt selbst zu dem gleichen Ergebnis, wenn er feststellt: „*Auffallend sind lediglich die niedrigen Silberzellwerte bei den ohne schwere Krankheit plötzlich Gestorbenen (8 Fälle)*“.

Da die hier in Frage stehende Eignung oder Nichteignung der Silbermethode zur Markierung der A-Zellen des Inselorganes beim Menschen von entscheidender Bedeutung für die Gültigkeit bisher erhobener Befunde beim Menschen und für weitere Untersuchungen ist, habe ich zwei Spezialisten auf diesem Gebiet, Herrn Prof. FEYRTER, Göttingen, und Herrn Prof. TERBRÜGGEN, Bielefeld, gebeten, ebenfalls ihre Erfahrungen zur Verfügung zu stellen. Sie haben dies ohne Kenntnis meines Manuskriptes bereitwillig getan, wofür ich beiden Herren auch an dieser Stelle bestens danken möchte.

FEYRTER äußerte sich im März 1954 unter der Überschrift: „**Zur Frage der Argyrophilie des Inselgewebes**“ in folgender Weise:

„Bei Anwendung der Versilberung nach dem BIELSCHOWSKY-GROSSEN Verfahren, das ich seit Jahren in einer *genormten* Form verwende (1951), muß man vor allem zwischen der Darstellung der argyrophilen Körnelung von Zellen, die eine *besondere* Eigenschaft ihres Cytoplasma bedeutet, und der einfachen Schwärzung eines Cytoplasma, die insbesondere bei zeitlicher Ausdehnung der Versilberung als ein recht vulgäres Vorkommnis in Erscheinung tritt, unterscheiden.“

Ich zweifle nicht im geringsten daran, daß einschlägige Angaben im Schrifttum über das Inselgewebe von seiten der Kenner der Materie (FERNER, ERSPAMER, TERBRÜGGEN) sich stets auf argyrophil gekörnte und nicht auch auf einfach geschwärzte Inselzellen beziehen; das gilt in gleicher Weise von meinen eigenen Arbeiten. Wenn ich von den genannten Untersuchern absehe, so ist leicht möglich, daß ein weniger Geübter gegebenenfalls, ohne es zu beabsichtigen, den Gang der Versilberung vorzeitig, das heißt zu einer Zeit unterbricht, in der keineswegs alle im Schnitt vorhandenen Zellen mit potentieller argyrophiler Körnelung bereits mit schwarzem Silber beschlagen erscheinen. Die Versilberung der argyrophilen Körnelung eines Cytoplasma erfolgt nämlich in der Regel nicht im Augenblick, sondern allmählich, zunächst in Form einer Bräunung. Das kann gegebenenfalls dazu führen, daß ein weniger Geübter, der sich dieses Tatbestandes nicht bewußt ist, über einen

auffällig unterschiedlichen Gehalt des Inselgewebes an argyrophil gekörnten Zellen in verschiedenen Schnitten des gleichen Untersuchungsgutes in Verwunderung gerät.

Damit ist nicht gesagt, daß die Kenner der Materie, selbst bei Anwendung des genormten BIELSCHOWSKY-GROSSCHEN Verfahrens, vor Mißerfolgen gefeit sind. Aber es versteht sich, daß sie in der Regel die Mißerfolge als solche erkennen und bei der Verwertung ihrer Untersuchungsergebnisse ausschalten.

Die in Rede stehenden Mißerfolge sind, wie die Erfahrung lehrt, zweierlei: a) die Darstellung der argyrophil gekörnten Zellen bleibt aus, b) eine unverzüglich eintretende diffuse Schwärzung der Schnitte verdeckt die Besonderheit der argyrophil gekörnten Zellen. In beiden Fällen ist das Mißlingen nicht durch Launenhaftigkeit des Verfahrens verschuldet, sondern ein Zeichen dafür, daß es als empfindliche histochemische Reaktion nur bei peinlicher Erfüllung subtiler Voraussetzungen gelingt.

Die Darstellung der argyrophilen Körnelung ist, wie ich von Anfang an (1934) betonte, an Formolfixation des Untersuchungsgutes gebunden. Der Formaldehyd erzeugt erst die Argyrophilie, vielleicht durch Säuerung der Gewebe infolge Methylenierung. Wiederholt ist darauf aufmerksam gemacht worden, daß nach *sofortiger* Formolfixation *lebensfrisch* dem Körper entnommener tierischer Gewebsstücke die Argyrophilie der Inselzellen ausbleibt, bzw. ausbleiben *kann*. Das mutet an, als habe die in Rede stehende Formaldehydwirkung gewisse, wenigstens minimale Zersetzungsvorgänge im Cytoplasma, vielleicht in Form einer Auflockerung des chemischen Gefüges, zur Voraussetzung; damit stünde im Einklang, daß lange nach dem Tode gewonnenes menschliches Untersuchungsgut meist eine besonders rasch einsetzende, diffuse Schwärzung der Gewebe zeigt, offenbar, weil eine fortgeschrittene Autolyse an unterschiedlichsten Gewebsorten die Voraussetzungen der Argyrophilie nach Formolfixation in kräftiger Weise entstehen läßt; wohingegen in einem bald nach dem Tode gewonnenen Untersuchungsgut das durch den Formaldehyd erzeugte *besondere* Argyrophilievermögen der argyrophil gekörnten Inselzellen im Ablauf der Versilberung rasch und gesetzmäßig in Erscheinung tritt, lange vor der durch eine vulgäre Argyrophilie bedingten Schwärzung unterschiedlichster Gewebsorte.

Die in Rede stehenden Phänomene lassen sich überaus deutlich und sozusagen bequem gerade bei Anwendung der von mir empfohlenen Normung des BIELSCHOWSKY-GROSSCHEN Verfahrens verfolgen.

Ein anderes Moment, das die Darstellung der argyrophilen Körnelung mißlingen läßt, ist die Temperatur und das Licht. Wir arbeiten ständig bei einer Temperatur des Arbeitsraumes von 20—22° C. Bei Kälte bleibt die Darstellung der argyrophil gekörnten Zellen aus; an heißen, sonnigen

Tagen führt eine rasch eintretende diffuse Schwärzung oftmals zum Mißlingen.

Von Einfluß auf den Erfolg ist ferner die verschieden lange Verweildauer weniger der Stücke, als vielmehr der *Schnitte* (Gefrierschnitte, Paraffinschnitte) in der Formaldehydlösung. Wir belassen die Schnitte in der Regel für 2 Wochen in einer 40%igen Formaldehydlösung (Formalin). Die besondere Wirkung dieser Vorbehandlung auf die argyrophil gekörnten Zellen bekundet sich darin, daß diese nunmehr mit eindrucks voller Schärfe auf einem weitgehend farblosen Untergrund sich versilbern, vielleicht infolge Verstärkung der durch den Formaldehyd herbeigeführten chemischen Abänderung gerade an *ihren* Körnchen.

Dem Anfänger schließlich mißlingt das Verfahren durch grobe Niederschlagsbildung schon bei der Herstellung des Formaldehyd-Silbernitrat-Gemisches (ge normtes Verfahren) häufig deshalb, weil er die peinliche Reinigung der Glasgeräte und die peinliche Verwendung chemisch reiner Reagentien (Firma Merk) verabsäumt.

Aber alle diese Formen des Mißlingens der Versilberung sind für die Beurteilung der Ergebnisse, die von seiten der Kenner des Verfahrens (FERNER, ERSPAMER, TERBRÜGGEN) und durch mich mitgeteilt wurden, belanglos. Denn zweifellos hat niemand der Genannten die Mitteilung seiner Ergebnisse auf mißlungenen Schnitten aufgebaut.

Eine *andere Frage* ist die nach der *Spezifität der argyrophilen Körnelung*. Sie spitzt sich für die LANGERHANSSchen Inseln zur Frage zu: Ist sie identisch mit den Körnchen der A-Zellen? Es wird gut sein, wenn ich bei der Beantwortung der Frage mich im wesentlichen auf die LANGERHANSSchen Inseln des Menschen beschränke.

Ich habe zwar 1950 auf der Kieler Tagung der Deutschen Pathologischen Gesellschaft, wie gelegentlich schon früher (1934), nachdrücklich betont, daß sich die Ergebnisse differentieller Körnchenfärbungen, darunter auch jene der Versilberung, an den unterschiedlichen Zellarten innerhalb der verschiedensten Organe nicht decken, sondern einander überschneiden. Doch lag mir nur die Mahnung, die Ergebnisse subtiler zu verwerten, am Herzen, und gewiß nicht das Bestreben, sie zu entwerten.

An den LANGERHANSSchen Inseln des Menschen habe ich die Frage mittels jenes Kunstgriffes untersucht, den ich 1953 in meiner Monographie „Über die peripheren endokrinen (parakrinen) Drüsen des Menschen“ (S. 202) ganz allgemein zur Lösung solcher Probleme empfohlen habe: 1. Versilberung. 2. Fotografie der Inseln. 3. Entsilberung mittels einer Cyankalilösung, MASSONSche Dreifarbenfärbung (Trichromique). 4. Histologische Musterung der fotografierten Inseln im Trichromeschnitt unter ständigem Vergleich mit den Fotokopien der versilberten Inseln, wobei diese Fotokopien (wegen der Umkehr des Bildes beim Fotografieren) vorteilhafterweise mittels einer simplen Aufstellung neben dem Mikroskop in einem gewöhnlichen kleinen Planspiegel beobachtet werden. Das Ergebnis ist *beim Menschen* das folgende.

Die Cytoplasmen mit argyrophiler Körnelung erscheinen weit überwiegend im Trichromeschnitt rot (orange) gekörnt oder getönt, gehören also A-Zellen mit α-Körnchen an. Ein kleinerer Teil entspricht jenen

schmalen, fadenförmigen und verästelten Elementen, deren Anwesenheit als dritte Zellart in den LANGERHANSSchen Inseln ich auch für den Menschen betont habe.

Sie sind vermutlich den D-Zellen des Schrifttums an die Seite zu rücken.

In Zellen mit bläulichgrauer Körnelung oder Tönung des Cytoplasma, also in *B-Zellen mit β-Körnelung* (Trichromeschnitte) habe ich keine argyrophile Körnelung angetroffen; sie sind *argyrophob*.

Die Untersuchung der Frage in Reihenschnitten, von denen abwechselnd ein Schnitt der Trichromefärbung, ein Schnitt der Versilberung unterzogen wurde, führt zu keiner befriedigenden Klärung. Die Inselzellen sind weder genügend dick, noch von genügend ebenmäßigem Umriß, um sich in zwei benachbarten Schnitten hinlänglich deutlich dem Vergleiche darzubieten.

Die letzte, *augenblicklich bewegende* Frage ist schließlich die nach der *Hyperplasie der A-Zellen*, bzw. der *argyrophil gekörnten Zellen in den LANGERHANSSchen Inseln beim Diabetes mellitus des Menschen* (FERNER). Ich habe zwar meistens betont (1953, l. c.), daß dieser Befund nicht für den Diabetes mellitus allein kennzeichnend (spezifisch) sei, sondern gegebenenfalls z. B. auch bei der Urämie begegne. Doch habe ich die Angabe FERNERS an sich, zwar nicht im Rahmen einer planmäßigen Überprüfung, wohl aber genügend oft und so eindrucksvoll bestätigt gefunden, daß ich sie als eine auf dem Gebiet der Pathohistologie der Inseln des Menschen sehr bedeutsame und fruchtbringende Aufdeckung werte.

Ich würde an dieser Wertung auch dann nicht irre, wenn sich der Befund bei einer Mammutüberprüfung eines unterschiedslos zusammengetragenen Untersuchungsgutes von Diabetesfällen nur in 40% bewahrheiten sollte; denn dieser Hundertsatz bliebe für den, der sich der erstaunlichen *Seltenheit* der *steten* Wiederkehr bestimmter Befunde bei bestimmten Erkrankungen ganz allgemein bewußt geworden ist, noch immer ungewöhnlich hoch. Im übrigen ist auch auf dem Gebiete echter, forschreitender Forschung das Phänomen alltäglich, daß selbst bedeutsame neue und fruchtbringende Aufdeckungen Abänderungen am Rande erfahren müssen, ohne jedoch hierdurch in ihrem eigentlichen Kern gefährdet zu werden.

Ein Moment allerdings wird meines Erachtens bei der Erforschung des in Rede stehenden Gegenstandes in Hinkunft mehr als bisher Berücksichtigung finden müssen: der Umstand nämlich, daß der gestaltliche Betrachter der Inseln in Fällen von klinisch festgestelltem Diabetes mellitus keineswegs ohne weiteres mit einem stets gleichen klinischen Krankheitsbild rechnen darf. Es kommt sehr auf das Alter des Kranken, auf die Dauer der Erkrankung, auf die im Augenblick des Todes vorgelebte Phase, auf die Sterbeart, und nicht zuletzt auf die stattgehabte Behandlung, sicherlich auch darauf, ob im gegebenen Fall die Zuckerkrankheit vielleicht nur einen Nebenbefund darstellte, und auf vieles andere mehr an.

Von der neuerdings geübten Art der Erforschung des in Rede stehenden Gegenstandes an einem, aus unterschiedlichen Quellen gesammelten, unterschiedslos zusammengetragenen Untersuchungsgut, ohne Berücksichtigung der oben angeführten klinischen Momente, mit einer in ihren Grenzen vagen Schwärzung (Aussilberung) des Inselgewebes und nicht mit sauberer Darstellung der argyrophilen Körnelung der argyrophilen Inselzellen, ohne Sorge vor der verwirrenden Änderung der Sachlage durch verschieden weit fortgeschrittene Zersetzungsvorgänge nach dem Tode, vermag ich keine befriedigende Klärung zu erhoffen, sondern eher eine störende Vernebelung gewichtiger Tatbestände zu befürchten.

Es liegt meines Erachtens nicht der geringste Grund dazu vor, emphatisch vor der Versilberung zu warnen, wie dies kürzlich geschehen ist. Die Versilberung, insbesondere mittels des genormten BIELSCHOWSKY-GROSSCHEN Verfahrens, stellt vielmehr in den Händen eines Kenners der Materie ein überaus wertvolles histochemisches (und histophysikalisches) Rüstzeug dar, sowohl zur Erforschung des biologisch bedeutsamen argyrophilen Zellsystems, wie der selbst allerfeinsten neurofibrillären Formationen des Nervengewebes, vor allem der Lebensnerven.

Es erscheint mir in diesem Zusammenhange *mutatis mutandis* von einem Interesse, daß man auch auf dem Gebiet der Neurohistologie und Neurohistopathologie die besondere Versilberbarkeit feinster und allerfeinster Ausläufer von Ganglienzellen, deren Selektivität gleichfalls bei Anwendung des BIELSCHOWSKY-GROSSCHEN Verfahrens in spezieller Modifikation vor allem STÖHR und seine Schule gezeigt haben, entwerten wollte mit dem Hinweis darauf, daß sich auch andere Zellen und Formationen, insbesondere faserige Strukturen der Stützgewebe mit dem Silber schwärzen könnten.

Mit dem Silber schwärzen kann man in Schnitten formolfixierten Gewebes schließlich und endlich alles nur mögliche, sozusagen fast alles. Aber diese vulgäre Schwärzung ist zu trennen von jenen *besonderen Argyrophilien*, deren eigene Art sich mit einwandfreier Technik im Bereich des Epithels als argyophile Körnelung ganz bestimmter Zellarten und im Bereich des Nervengewebes als neurofibrilläre Struktur immer wieder eindrucksvoll erweisen läßt“.

Soweit die Stellungnahme von FEYRTER zur Frage der A-Zellen-Markierung durch Silberimprägnierung.

TERBRÜGGEN berichtete über seine Erfahrungen *zusammenfassend* am 12. 4. 1954 folgendes:

„Die GROS-SCHULTZESCHE Methode der Versilberung der LANGERHANSCHEN Inseln des Pankreas hat auch bei späteren Untersuchungen, die zum Teil unter ganz anderen Bedingungen in meinem Bielefelder Institut durchgeführt wurden, sehr befriedigende Ergebnisse gezeigt. Ich kann bestätigen, daß die Versilberung an ein und demselben Organ immer wieder eine gleiche Zahl von Inselzellen darstellt. Dabei ist zu

beachten, daß nur die Zellen mit geschwärzten Granula und nicht die diffus geschwärzten Zellen als Silberzellen angesprochen werden können.

Auch weitere Vergleiche frischen Leichenmaterials mit der Azanfärbung und der von mir modifizierten Säurefuchsin-Methylgrünfärbung zeigen, daß die nach GROS-SCHULTZE versilberbaren Zellen dieselbe topographische Lage innerhalb der Inseln einnehmen wie die mit anderen Methoden dargestellten A-Zellen.

Die Methode ist also zweifellos sehr gut brauchbar. Eine Vermehrung der A-Zellen beim Diabetes mellitus ist fast regelmäßig nachweisbar. Allerdings halte ich diese Vermehrung für relativ und durch eine Verminderung der B-Zellen bedingt. Das kann man ganz besonders gut an sklerotischen und teilweise hyalinisierten Inseln beobachten. Ob die durch GROS-SCHULTZE darstellbaren Zellen im Magen usw. den A-Zellen ohne weiteres gleichgestellt werden können, scheint mir noch nicht bewiesen; auch quantitative Untersuchungen am Magen haben mir nicht eindeutig einen Zusammenhang mit dem Diabetes gezeigt.“

Ergebnisse.

Für die Differenzierung der A- und B-Zellen des *menschlichen* Inselorganes und die Auszählung der AB-Relation insbesondere am *menschlichen* Sektionsmaterial eignen sich in vielen Fällen die heute geübten Granulafärbungen schlecht, wofür die Gründe auseinandergesetzt werden. Hingegen ist die Silbermethode nach GROS-SCHULTZE sehr gut verwendbar insbesondere für die Bestimmung der AB-Relation, vorausgesetzt, daß eine ausreichende Erfahrung und Übung erworben wurde. Die Identität der Silberzellen des Inselorganes mit den A-Zellen ist durch erfahrene Untersucher mit besonderer Sorgfalt geprüft und gesichert worden. In einem wörtlich wiedergegebenen Beitrag nehmen zu dieser Frage auch FEYRTER und TERBRÜGGEN Stellung. Durch einen interessanten färbungstechnischen Kunstgriff von FEYRTER konnte die Identität beim Menschen direkt bewiesen werden. Die von FEYRTER nachgewiesene Argyrophilie der D-Zellen bestärkt die Anschauung, daß sie den A-Zellen zuzurechnen sind (GOMORI, FERNER).

Die Behauptung von BURKL (1951) und CREUTZFELDT (1953), daß der Silbermethode nach GROS-SCHULTZE der Wert einer elektiven Darstellungsmethode der A-Zellen beim Menschen abzusprechen sei, ist nicht zutreffend. Sie kann nur in methodischer Insuffizienz eine Erklärung finden. Im Falle CREUTZFELDTS kann überdies mit Sicherheit ausgesagt werden, daß das Vergleichsmaterial ungeeignet war, da es sich bei den „Gesunden“ CREUTZFELDTS in Wirklichkeit um pathologische Fälle handelte, welche an malignen Tumoren und anderen langdauernden zehrenden Krankheiten verstorben waren. Solche Fälle weisen aber ähnlich wie Diabetiker eine vom Gesunden stark abweichende AB-Relation im Sinne einer Erhöhung der A-Zellenfrequenz auf.

Literatur.

BARGMANN, W.: Inkretorische Drüsen. In v. MÖLLENDORFFS Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. VI/2. — BARGMANN, W., u. W. CREUTZFELDT: Klin. Wschr. **1949**, 268. — BLOOM, W.: Anat. Rec. **49**, 363 (1931). — BURKL, W.: Acta anat. (Basel) **12**, 358 (1951). — Anat. Anz. **99**, 345 (1953). — CAMPENHOUT, E. VAN: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **30** (1933). — CREUTZFELDT, W.: Z. Zellforsch. **34**, 280 (1949). — Beitr. path. Anat. **113**, 133 (1953). — ERSPAMER, V.: Z. Anat. **107**, 574 (1937). — FERNER, H.: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **44**, 451 (1938). — Virchows Arch. **309**, 87 (1942); **319**, 390 (1951). — Das Inselsystem des Pankreas. Stuttgart: Georg Thieme 1952. — FEYRTER, F.: Über die peripheren endokrinen (parakrinen) Drüsen des Menschen. Wien: Wilhelm Maudrich 1952. — GOMORI, G.: Anat. Rec., Suppl. **74**, 439 (1939). — Amer. J. Path. **17**, 359 (1941). — HAMPERL, H.: Virchows Arch. **321**, 482 (1952). — HESS, W.: Schweiz. Z. Path. u. Bakter. **9**, 46 (1946). — HULTQUIST, G. T., M. DAHLÉN u. C. G. HELLANDER: Schweiz. Z. Path. u. Bakter. **11**, 570 (1948). — HULTQUIST, G. T., u. B. TEGNER: Schweiz. Z. Path. u. Bakter. **12**, 717 (1949). — KON, Y.: Über die Silberreaktion der Zellen. Jena 1933. — SENDRAIL, M., A. BAZEX et N. BOLTE: Ann. d'Endocrin. **10**, 374 (1949). — STAUB, A., L. SINN and O. K. BEHRENS: Science (Lancaster, Pa.) **117**, 628 (1953). — TERBRÜGGEN, A.: Klin. Wschr. **1947**, 434. — Virchows Arch. **315**, 407 (1948). — WARREN, SH. L., and PH. M. LE COMPTE: The Pathology of Diabetes mellitus, 3. Aufl. Philadelphia: Lea a. Febiger 1952. — ZEIGER, K.: Physikochemische Grundlagen der histologischen Technik. Dresden u. Leipzig 1938.

Prof. Dr. HELMUT FERNER, Hamburg 20, Schottmüllerstr. 1.