

Aus dem Pathologischen Institut der Medizinischen Akademie Erfurt
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. H. GÜTHEERT)

Untersuchungen über das Pankreaszink des Meerschweinchens

Von

H.-E. STEGNER und D. MÜLLER

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. März 1958)

Die funktionswichtigen strukturellen und metabolischen Beziehungen zwischen Zink und Insulin sowie Glucagon haben die Ausarbeitung und laufende Verbesserung histochemischer Methoden zum topochemischen Zinknachweis veranlaßt. Dabei fanden fast ausschließlich Methoden Anwendung, die in ihren Prinzipien der von OKAMOTO (1), (2) entwickelten entsprechen, jedoch sowohl bezüglich ihrer Ortsrichtigkeit und Empfindlichkeit [MASKE (1)] als auch in ihrer Spezifität (MAGER, McNARY u. LIONETTI; McNARY) verbessert worden sind. Eine Vorstellung von Empfindlichkeit und Grenzen der histochemischen Dithizontechnik vermitteln folgende rechnerische Überlegungen.

Nimmt man als Bezugsmaß nicht Menge/Volumen, sondern Menge/Fläche, so wird der Zahlenwert unabhängig von der Dicke des histologischen Objektes. Damit kann als Grundlage der Berechnung die Extinktion und nicht das Verhältnis Extinktion/Schichtdicke dienen. Die Grenze der Nachweisbarkeit des Zinks ist nur von der Extinktion selbst abhängig. Wenn man erfahrungsgemäß als niedrigsten, deutlich erkennbaren Extinktionswert etwa 0,1 annehmen kann, so ergibt sich folgende Berechnung der Empfindlichkeit. 3,22 γ /5 ml Zn ergeben einen Extinktionsmodul von 1. Bei einem ml erhält man natürlich denselben Modul bei $\frac{1}{5}$ der Zinkmenge. Durch Zugrundelegen des Extinktionsmoduls 0,1 kommt man schließlich auf $\frac{1}{50}$ der oben angegebenen Zinkmenge, also rund 0,06 γ /ml. Da der Extinktionsmodul der Extinktion bei der Schichtdicke 1 cm entspricht, ergibt sich also bei der zugrundegelegten Menge von 1 ml eine Grundfläche von 1 cm², in der die berechnete Menge von 0,06 γ Zn gerade noch sicher erkennbar ist. Wenn wir anstelle dieser Fläche von 1 cm² eine solche von (10 μ)², die quadratische Grundfläche einer geometrisch vereinfachten fiktiven Zelle, betrachten, so wird sich die nachweisbare Zinkmenge im selben Maße verkleinern wie die betrachtete Fläche. Das Verhältnis 1 cm² : (10 μ)² ist 1:10⁶. Daraus ergibt sich als geringste in diesem Flächenstück nachweisbare Zinkmenge 0,06 γ /10⁶ = 0,06 γ /(10 μ)² *. Diese Menge ist unter der Bedingung der Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes unabhängig von der Schichtdicke, d. h. also von der Dicke des mikroskopischen Objektes. Zu annähernd dem gleichen Ergebnis über die Empfindlichkeit des histochemischen Zinknachweises kommt man auch unter Benutzung des für die qualitative Mikroanalyse angegebenen Wertes von 0,03 γ in einem Tropfen von 0,03 ml (D'ANS-LAX).

Die Ortsrichtigkeit des Nachweises wird durch die granulagebundene Form [MASKE (2), (3)] des Inselzinks begünstigt. Diffusionseffekte sind

* 1 γ = 1 Digamma = 10⁻⁶ γ .

jedoch nicht völlig zu vermeiden (McNARY; RUNGE, MÜLLER und FERNER). Die Dithizonmethoden erlauben keine exakten quantitativen Aussagen über die nachgewiesenen Zinkmengen und setzen außerdem das Vorliegen des Zinks in einer mit Dithizon reaktionsfähigen organischen Bindung voraus — was durchaus nicht für alle biogenen Zinkverbindungen zutrifft (WEITZEL; WEITZEL und BUDECKE) — sowie ein für die Dithizonatbildung obligates örtliches p_H -Milieu. Alle diese aufgeführten Faktoren sind bei einem negativen Ausfall der Dithizonreaktion zu diskutieren, bevor der Schluß auf ein völliges Fehlen von Zink berechtigt ist.

Zink konnte bisher regelmäßig bei zahlreichen Tierspecies innerhalb der Inseln histochemisch mit Dithizonmethoden nachgewiesen werden. Eine Sonderstellung nehmen unter den gebräuchlichen Laboratoriumstieren die Meerschweinchen ein. Über konstant negativen Ausfall der Dithizonreaktionen in den Inseln des Meerschweinchenpankreas berichteten bereits OKAMOTO u. Mitarb. sowie McNARY. Ursächliche Zusammenhänge zwischen dem negativen Ausfall der Dithizonreaktionen und dem refraktären Verhalten gegenüber diabetogenen Alloxan- und Dithizon Dosen wurden von MASKE und WEINGES näher untersucht (MASKE und WEINGES; WEINGES und MASKE). Bis jetzt gibt es keine hinreichende Erklärung für die im Hinblick auf die Physiologie der inkretorischen Pankreasfunktion nicht unwesentliche Eigenheit in der Reaktionsweise des Meerschweinchenorganismus. Wir haben, da in zusammenfassenden Darstellungen über den Pankreaszinkgehalt verschiedener Tierspecies Angaben über das Meerschweinchenpankreas nicht zu finden waren (HOPPE-SEYLER/THIERFELDER), quantitative Untersuchungen an den Bauchspeicheldrüsen von Meerschweinchen durchgeführt. Zum histotopochemischen Zinknachweis wurde das von uns wiederholt angewandte Sulfidsilberverfahren [TIMM (1), (2)] herangezogen, das bezüglich seiner Erfassungsgrenze von großer Leistungsfähigkeit ist und sich in seiner Wirkungsweise grundsätzlich von den bisher angewandten Dithizonmethoden unterscheidet. Seine Vorteile liegen einmal in weitgehender Ortsrichtigkeit des Nachweises durch Umwandlung der Metalle in ihre schwerlösliche Sulfidform, zum anderen in der Möglichkeit, durch Apposition von elementarem Silber dem Auge normalerweise im Lichtmikroskop unsichtbare Teile in sichtbare Größenordnung umzuwandeln. Vor- und Nachteile dieser Methode sind besonders von VOIGT (1), (2), (3) verschiedentlich aufgeführt worden.

Material und Methodik

Zu den quantitativen und topochemischen Untersuchungen wurden männliche und weibliche erwachsene Meerschweinchen, deren Gewichte zwischen 495 und 880 g lagen, verwendet. Die Tiere erhielten Mischfutter.

1. Quantitative Zinkbestimmung: Die Bestimmung des Wassergehaltes der unter zinkfreien Kautelen entnommenen Organe erfolgte durch Trocknung bei 105 Grad. Die organischen Substanzen wurden durch Veraschung im elektrischen Ofen bei 600 Grad zerstört. Anschließend wurde in Modifikation der unten genannten, für das Serum ausgearbeiteten Methode die Asche in 5 cm³ 20%iger zinkfreier HCl unter Erwärmen gelöst und im allgemeinen auf genau 30 cm³ im Maßkolben aufgefüllt. (Bei sehr zinkreichem Material Auffüllung auf 100 cm³ im Maßkolben). Ein aliquoter Teil wurde davon entnommen und quantitativ analysiert nach der von WOLFF und RECHENBERGER angegebenen Methode*.

2. Topochemischer Zinknachweis: Zum Fixieren des Pankreasgewebes dienten a) H₂S-gesättigter 70%iger Alkohol; b) H₂S-gesättigter 0,1 n salzsaurer 70%iger Alkohol; c) H₂S-gesättigter 2 n essigsaurer 70%iger Alkohol; d) H₂S-gesättigter 1/2 n ammoniakalischer 70%iger Alkohol.

Eine ausführliche Darstellung der Weiterbehandlung und von uns angewandten Methode der physikalischen Entwicklung siehe bei STEGNER und FISCHER.

Ergebnisse und Besprechung

Der Zinkgehalt eines Organes wird nach heutigen Kenntnissen im wesentlichen durch seinen Gehalt an zinkhaltigen Fermenten bestimmt

Tabelle 1

Meer- schweinchen Nr.	Meerschweinchen- pankreas: Zink- gehalt des Gesamt- pankreas in mg-%	
	berechnet auf Frisch- gewicht	berechnet auf Trocken- substanz
I weiblich	0,80	2,01
II weiblich	0,20	2,83
III weiblich	2,04	5,19
IV weiblich	1,09	2,84
V männlich	2,23	7,23
VI männlich	1,03	1,58
VII männlich	1,12	3,50
VIII männlich	0,76	7,21
IX männlich	2,73	9,83
X männlich	3,33	6,18
XI männlich	—	4,35
XII männlich	—	2,22
	$\bar{x} = 1,83$ $s = 1,04$	$\bar{x} = 4,58$ $s = 2,58$

(WEITZEL), unter denen im Warmblüterorganismus neben alkalischer Phosphatase, verschiedenen Dehydrogenasen und anderen Enzymen der Carboanhydratase große Bedeutung zukommt. Hochgradige Zinkanreicherungen in einem Gewebe beruhen nach den bisherigen Befunden auf Zinkkomplexen nicht-fermentativer Natur. Als Durchschnittswert findet sich in allen tierischen Geweben und fast allen Organen ein Zinkgehalt von 20—30 γ/g

Frischgewicht (HOPPE-SEYLER/THIERFELDER). Im Pankreas von Rind, Kalb, Pferd, Schaf, Hund, Katze, Schwein und Mensch fanden WEITZEL u. Mitarb. für das Trockengewebe Mittelwerte zwischen 109 und 185 γ Zink pro 1 g, also etwa 10—20 mg-%. Frühere Untersucher fanden mit 13,5 mg-% Zink im

menschlichen Pankreas (TOMPSETT), 7,5—8 mg-% Zink im Rinderpankreas (FISCHER und SCOTT) und 19,5 mg-% in der Bauchspeicheldrüse des Hundes (HORVAT) etwa entsprechende Werte. Die von uns

* Siehe auch Zusammenfassung in den Arbeitsvorschriften für das Pulfrich-photometer von Carl Zeiss, Jena 1946.

bei der Untersuchung des Meerschweinchenpankreas gewonnenen Ergebnisse (Tabelle 1) sind a) mit den Mittelwerten der aufgeführten anderen Tierarten zu vergleichen sowie b) mit dem Zinkgehalt anderer Organe der gleichen Tierart (Tabelle 2). Dabei finden wir im Mittel im Meerschweinchenpankreas einen deutlich geringeren Zinkgehalt als im Pankreas anderer vergleichbarer Tierarten. In Gegenüberstellung zum Zinkgehalt der Meerschweinchenspeicheldrüse (Unterkieferdrüse) und Oberschenkelmuskulatur liegen im Pankreas der gleichen Tierart die Zinkwerte durchschnittlich um die Hälfte niedriger.

Tabelle 2

Meer- schweinchen Nr.	Oberschenkel- muskulatur Zn-Gehalt in mg-%		Unterkieferdrüse Zn-Gehalt in mg-%	
	berechnet auf Frisch- gewicht	berechnet auf Trocken- substanz	berechnet auf Frisch- gewicht	berechnet auf Trocken- substanz
I weiblich	1,50	6,55	1,17	5,56
II weiblich	1,77	8,66	2,23	7,80
III weiblich	3,41	14,80	2,83	8,55
IV weiblich	1,66	7,07	2,47	10,80
V männlich	1,46	6,17	2,39	9,22
VI männlich	1,70	7,34	2,69	9,54
	$\bar{x} = 1,41$ $s = 0,92$	$\bar{x} = 8,93$ $s = 3,27$	$\bar{x} = 2,29$ $s = 0,18$	$\bar{x} = 8,57$ $s = 1,78$
Die Streuung wurde nach folgender Formel berechnet:				
$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$				

Der topochemische Nachweis von Zink in den Langerhansschen Inseln mit der Sulfidsilbermethode war in allen Fällen negativ. Auch bei Verlängerung der Entwicklung über die zur Darstellung des Inselzinks bei anderen Tierarten notwendige Zeit hinaus ließ sich im Inselgewebe kein Versilberungseffekt erzielen. In einzelnen Fällen waren im exokrinen Parenchym granuläre Versilberungen zu beobachten. Die Natur der diesem Effekt zugrunde liegenden „Entwicklungskeime“ ist uns noch unbekannt.

Die Abb. 1 und 2 zeigen positiven Zinknachweis mit dem Sulfidsilberverfahren in den Langerhansschen Inseln der Ratte und der Ente. Entsprechend den Untersuchungen von WOLFF und RINGLEB am Rattenpankreas erkennt man auch bei Anwendung des Sulfidsilberverfahrens in der Mehrzahl der Fälle innerhalb der A-Zellen höhere Zinkkonzentrationen als in den zentral gelegenen B-Zellenhaufen. Die A-Zellen des

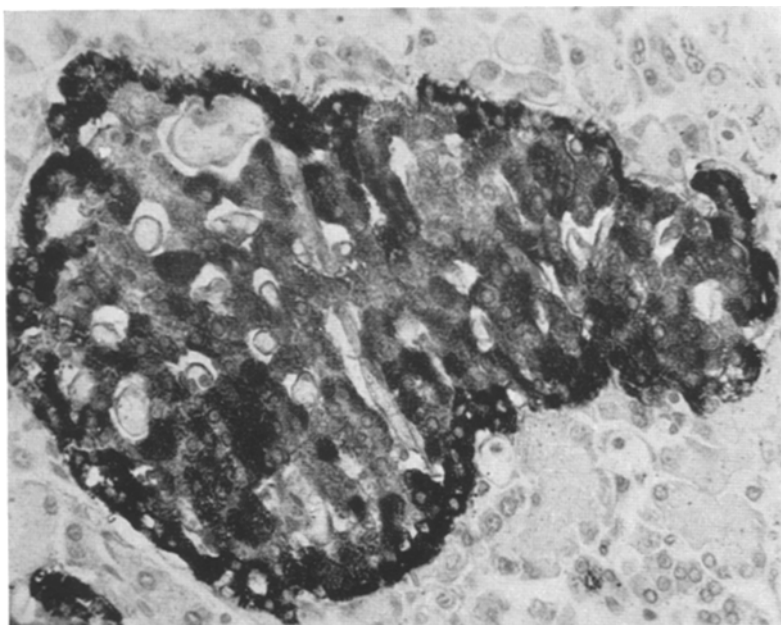


Abb. 1

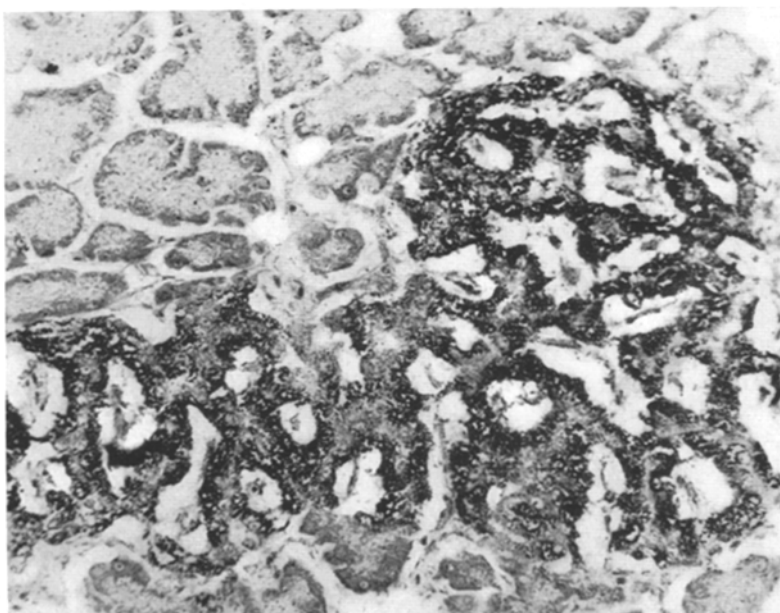


Abb. 2

Abb. 1. Rattenpankreas. Positiver Zinknachweis mit dem Sulfidsilberverfahren. Stärkere Reaktion im Bereich der in den Randabschnitten gelegenen A-Zellen. Vergr. 360:1

Abb. 2. A-Zelleninsel des Entenpankreas. Positiver Zinknachweis mit dem Sulfidsilberverfahren. Stärkere Reaktion im Bereich der capillarnahen Zone der Zellen. Vergr. 400:1

Entenpankreas lassen die an den Stellen der Zinkablagerungen auftretenden granulären Versilberungen vor allem im Bereich der capillarnahen Zone der Zellen erkennen. Diese Befunde entsprechen den Ergebnissen der von MASKE (1) angewandten intravitalen Dithizonreaktion. Diffusionseffekte scheiden jedoch beim Sulfidsilberverfahren durch die außerordentlich rasche Umwandlung der Metalle in ihre schwerlösliche Sulfidform weitgehend aus.

Analog zu den mit Dithizonmethoden erhobenen Befunden machen die negativen Ergebnisse bei Anwendung des Sulfidsilberverfahrens nennenswerte Anreicherungen von Zink in den Langerhansschen Inseln des Meerschweinchenpankreas in hohem Maße unwahrscheinlich, wenn auch ein schlüssiger Beweis nicht mit histochemischen Methoden, sondern nur durch quantitative Analyse des isolierten Inselgewebes erbracht werden kann. Es hat den Anschein, daß nicht nur im Aufbau des Insulins, sondern auch bezüglich der Insulinbindung und -abgabe beim Meerschweinchen gegenüber anderen Säugetieren grundsätzliche Unterschiede bestehen. Insofern sind weitere eingehende Untersuchungen der Ursachen dieses abweichenden Verhaltens in physiologischer und pathophysiologischer Hinsicht von Interesse.

Zusammenfassung

Quantitative Zinkanalysen des Meerschweinchenpankreas liefern im Vergleich zu anderen Säugetieren mit durchschnittlich 4,5 mg-% Zink in der Trockensubstanz deutlich niedrigere Werte. Insuläre Zinkanreicherungen lassen sich analog den mit histochemischen Dithizonmethoden erhobenen Befunden auch bei Anwendung des Sulfidsilberverfahrens nicht nachweisen. Das Sulfidsilberverfahren bildet durch seinen, von den histochemischen Dithizonmethoden grundsätzlich abweichenden Wirkungsmechanismus eine wertvolle Ergänzung beim topochemischen Zinknachweis. Empfindlichkeit und Grenzen beider Methoden werden diskutiert.

Literatur

D'ANS-LAX: Taschenbuch für Chemiker und Physiker, 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1949. — FISCHER, A. M., u. D. A. SCOTT: Zit. nach HOPPE-SEYLER/THIERFELDER Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 10. Aufl., Bd. V. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1953. — HELCK, J.: Über das Verhalten von Bleinatriumthiosulfat im Organismus. Inaug.-Diss. Jena 1944. — HORVAT, L.: Zit. nach HOPPE-SEYLER/THIERFELDER 1941. — HOPPE-SEYLER/THIERFELDER: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 10. Aufl., Bd. V. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1953. — MAGER, M., W. F. McNARY and F. LIONETTI: Histochemical detection of zinc. J. Histochem. Cytochem. 1, 493 (1953). — MASKE, H.: (1) Das Zink in den Langerhansschen Inseln des Pankreas, sein physiologisches Verhalten und seine Bedeutung bei der Entstehung verschiedener experimenteller

Diabetesformen. *Acta neuroveget.* (Wien) 8, 51 (1955). — (2) Beobachtungen über das Zink in den Langerhansschen Inseln des Pankreas und seine Beziehungen zur Inseln-funktion. *Z. Naturforsch.* 8b, 96 (1953). — (3) Über die Beziehungen zwischen Insulin und Zink in den Langerhansschen Inseln des Pankreas. *Experientia* (Basel) 11, 122 (1955). — MASKE, H., u. K. WEINGES: Untersuchungen über das Verhalten der Meerschweinchen gegenüber verschiedenen diabetogenen Noxen. Alloxan und Dithizon. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.* 230, 406 (1957). — McNARY, E. F.: Zinc-dithizone reaction of pancreatic islets. *J. Histochem. Cytochem.* 2, 185 (1954). — NETTE, H.: Histochemische Untersuchungen über die Lokalisation von Eisen in Leber und Niere. Inaug.-Diss. Jena 1944. — NIETZSCHE, S.: Untersuchungen über den histochemischen Nachweis von Gold im Gewebe. Inaug.-Diss. Jena 1942. — OKAMOTO, K.: (1) IV. Mitt. Histochemischer Nachweis einiger Metalle in den Geweben, besonders in den Nieren und deren Veränderungen. *Trans. jap. path. Soc.* 32, 99 (1942). — (2) VII. Mitt. Über das Gewebseisen der Malaria-leber und Milz, die Zinkverteilung im Tierreich und den Zinkstoffwechsel. *Trans. jap. path. Soc.* 33, 247 (1943). — OKAMOTO, K., Z. AOYAMA, I. IBARAKI, H. NARUMI, M. SHIBATA, Y. KAWASAKI, D. SHIBATA and K. KOMATSU: Production of experimental Diabetes mellitus and zinc-reaction of islets of Langerhans. *Hyogo J. med. Sci.* 1, 77 (1951). — RECHENBERGER, J.: Zur Bestimmung des Serum-Zinks. *Z. Inn. Med.* 10, 645 (1955). — RENNERT, H.: Das zellmikrochemische Verhalten von Kupfer in Leber und Niere nach Zufuhr von Natriumcuprothiosulfat. Inaug.-Diss. Jena 1944. — RUNGE, W., J. MÜLLER u. H. FERNER: Der Zinknachweis in den A-Zellen und B-Zellen des Inselorgans bei der Ente. *Z. Zellforsch.* 44, 208 (1956). — STEGNER, H.-E., u. W. FISCHER: Das Sulfidsilberverfahren zum topochemischen Schwermetallnachweis. *Virchows Arch. path. Anat.* 330, 608 (1957). — TIMM, F.: (1) Zur Histochemie der Schwermetalle. Das Sulfidsilberverfahren. Vortr. auf dem Kongr. der Ges. für gerichtl. u. soziale Med., Marburg 1956. — (2) Zit. nach HELCK, NETTE, NIETZSCHE, RENNERT, ZAPPE. — TOMPSETT, S. L.: Zit. nach HOPPE-SEYLER/THIERFELDER. — VOIGT, G. E.: (1) Histologische Versilberungen. *Habil.-Schr. Jena* 1951. — (2) Gewebseigene Keime (Primärkeime) bei histologischen Versilberungen. *Z. wiss. Mikr.* 61, 1 (1952). — (3) Kolloid und histologische Versilberungen. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* 89, 457 (1952). — WEINGES, K., u. H. MASKE: Pankreatektomie und Cortisonwirkung bei Meerschweinchen. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.* 231, 440 (1957). — WEITZEL, G.: Chemie und Physiologie biogener Zinkverbindungen. *Angew. Chem.* 68, 566 (1956). — WEITZEL, G., E. BUDDECKE u. D. KRAFT: Zink und Glukagon im Pankreas der Ente. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 305, 132 (1956). — WOLFF, H.: Die quantitative Bestimmung des Serumzinks mittels Dithizon. *Biochem. Z.* 320, 291 (1956). — WOLFF, H., u. D. RINGLEB: Histochemische Untersuchungen über das Inselzink. *Z. exp. Med.* 124, 236 (1954). — ZAPPE, G.: Ein Beitrag zum histochemischen Nachweis von Gold im Gewebe. Inaug.-Diss. Jena 1944.

Dr. H. E. STEGNER, Pathologisches Institut der Medizinischen Akademie,
Erfurt, Nordhäuser Str. 74