

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin und dem Pathologischen Institut
(Vorstand: Prof. C. G. AHLSTRÖM) der Universität Lund (Schweden)

**Untersuchungen mit der Sulfidsilbermethode an menschlichen
und tierischen Bauchspeicheldrüsen
(unter besonderer Berücksichtigung des Diabetes mellitus
und experimenteller Metallvergiftungen)**

Von

GERHARD E. VOIGT

Mit 7 Textabbildungen in 10 Einzeldarstellungen

(Eingegangen am 3. Januar 1959)

Mit der von TIMM (1) inaugurierten Sulfidsilbermethode lassen sich die mit Schwefelwasserstoff fällbaren Metalle histochemisch nachweisen. Es gelingt damit nicht nur die histologische Darstellung der künstlich dem Organismus zugeführten, sondern auch der normalerweise in manchen Geweben deponierten Metalle. Die vorliegenden Untersuchungen wurden durchgeführt, um einen Überblick über die Verteilung der Metalle im menschlichen und tierischen Pankreas unter normalen und krankhaften Bedingungen sowie nach einigen Metallvergiftungen zu gewinnen. Dabei wurde besonders auf das in den Langerhansschen Inseln vorkommende Zink und sein Verhalten beim diabetischen und nicht-diabetischen Menschen und Tier geachtet und versucht, dessen Aufgabe näher zu ergründen.

I. Die Sulfidsilbermethode

In Weiterführung Liesegangscher (1, 2, 3) Versuche konnte ROBERTS (1, 2, 3) zeigen, daß man Gold nach Injektion von Goldthiosulfat durch eine sog. physikalische Entwicklung im histologischen Schnitt sichtbar machen kann. Dies ist nach TIMM (1) auf das hierbei im Gewebe entstehende Goldsulfid zurückzuführen. Nicht nur Goldsulfid, sondern auch andere Metallsulfide einschließlich Arsensulfid sind mit der physikalischen Entwicklung histochemisch nachzuweisen [TIMM (2), VOIGT (1)]. Hierzu bedient man sich nach TIMM (2) des folgenden Verfahrens (Sulfidsilbermethode).

a) Die Fixierung. Das Gewebe wird in schwefelwasserstoffgesättigtem, 70%igem Alkohol fixiert. (Es dürfen grundsätzlich nur analysenreine Substanzen verwendet werden, und es ist peinlichste Sauberkeit bezüglich der Glasgeräte usw. einzuhalten.) Hierbei dringt der Schwefelwasserstoff (gelöst und in dissoziierter Form) sehr schnell in das Gewebe ein, und es kommt zu einer Sulfidfällung aller Metalle. Es ist anzunehmen, daß dieser Vorgang bereits abgeschlossen ist, bevor die bei der Fixierung auftretenden Diffusionsströme eingesetzt haben. Die Sulfidfällung bedingt eine mengenmäßige Vergrößerung der Metallpartikel, die offenbar an Ort und Stelle in den Gewebsmaschen verankert werden.

Die Organstücke dürfen nicht allzu groß sein, um ein gleichmäßiges Durchtränken mit dem Schwefelwasserstoff zu erzielen.

Mitunter beobachtet man an Schnitten von Präparaten, die länger als etwa 12 Std in dieser Lösung belassen worden waren, nach der physikalischen Entwicklung eine diffuse Schwärzung der Schnittränder. Dies ist vermutlich auf die Anwesenheit von elementarem Schwefel zurückzuführen, der sich manchmal — wahrscheinlich durch die Wirkung der im Gewebe noch wirksamen reduzierenden Fermente — in der Fixierungslösung bildet. Man

sicht in solchen Fällen nadelförmige Schwefelkristalle in der Alkohollösung, die sich auch an der Oberfläche der Gewebsstücke ablagern. Dies wird besonders auch durch die Einwirkung von Licht, besonders Sonnenlicht, begünstigt. Die Fixierung geschieht deshalb zweckmäßig im Dunkeln.

Das Material wird hiernach in der üblichen Weise in Paraffin eingebettet. In der Alkoholreihe darf Carbolxyol nicht verwendet werden.

b) Die physikalische Entwicklung. Die entparaffinierten Schnitte werden einer physikalischen Entwicklung unterzogen. Es handelt sich dabei um einen technischen Vorgang, der besonders in der photographischen Praxis seine Anwendung findet (Verstärkung von Platten). Hierzu übergießt man die in Schalen ausgebreiteten, auf Deckgläsern ohne Anwendung von Klebstoffen aufgezogenen histologischen Schnitte mit einer Entwicklerlösung, die aus Gummi arabicum (Schutzkolloid), Silbernitrat, Hydrochinon (Reduktionsmittel) und eventuell außerdem noch etwas Citronensäure oder Borsäure besteht. Man beobachtet nach einiger Zeit, d. h. bevor eine Allgemeinschwärzung der gesamten Entwicklerlösung eingesetzt hat, eine Anlagerung von schwarzem, elementarem Silber in der Umgebung der Metallsulfidpartikel im histologischen Schnitt.

Die Metallsulfide wirken in gleicher Weise wie die Belichtungskeime in photographischen Schichten, d. h., sie beschleunigen in ihrer Umgebung katalytisch den Reduktions-Oxydationsvorgang zwischen den Silberionen und dem Reduktionsmittel Hydrochinon. Dabei ist es für das Zustandekommen dieses Effektes erforderlich, daß die Reaktion künstlich verlangsamt wird. Das wird durch das Gummiarabicum und die Citronensäure oder Borsäure bewirkt. Man kann statt des Silbernitratis aber auch Silbersalzkomplexe (Natriumsulfit und Silbernitrat) anwenden, wie dies z. B. im Entwickler nach LÜPPO-CRAMER der Fall ist und von QUERIDO für histochemische Zwecke benutzt wurde.

Die Verlangsamung des Prozesses ist für die Züchtung großer Silberpartikel in der Umgebung der Metallsulfide von größter Bedeutung. Hier liegt aber auch die größte Variationsmöglichkeit und Schwierigkeit bei der technischen Handhabung des Verfahrens, weil die hierfür verwendeten Gummiarabicum-Sorten unterschiedliche Qualität aufweisen können. Als ungeeignet hat sich bisher in jedem Falle pulverisiertes Gummiarabicum erwiesen. Am besten löst man möglichst große Stücke. In früheren Veröffentlichungen wurde eine 20%ige Gummiarabicum-Lösung empfohlen, die auch von TIMM (2) beibehalten worden ist, der allerdings jetzt seinem Entwickler eine wesentlich größere Citronensäuremenge zugibt, als dies früher geschah. Der Entwickler nach TIMM (2) arbeitet verhältnismäßig rasch. Es wird aber auch sehr bald eine Bräunung bzw. Schwärzung der Lösung beobachtet, die eine mikroskopische Kontrolle des Entwicklungsvorganges im Schnitt erschwert. Außerdem ist es schwierig, diesen möglichst gleichzeitig für alle Schnitte abzubrechen.

Nach vielen Versuchen hat sich nun folgender Entwickler den bisher angegebenen überlegen erwiesen:

60 ml 40%ige wässrige Gummi arabicum-Lösung (gut gequollen, d. h. mindestens 14 Tage alt und während dieser Zeit häufig gerührt. Gegen Verpilzung werden einige Thymolkristalle zugegeben. Die Lösung wird bei Zimmertemperatur aufbewahrt).

Vor Gebrauch gibt man hierzu 0,6 ml 10%ige wässrige Silbernitratlösung und schüttelt gut durch. Dies wird mit 6 ml folgender, höchstens 24 Std alter Lösung versetzt: 0,4 g Hydrochinon + 0,9 g Citronensäure + 20 ml Aqua bidest.

Die Gesamtlösung wird mindestens 30 sec sehr gut geschüttelt und sofort über die in flachen Schalen befindlichen Schnitte gegossen.

Ein Standardrezept für die Zusammensetzung des Entwicklers läßt sich jedoch kaum angeben, sondern man muß je nach Gummiarabicum-Qualität variieren.

Die Schalen werden dann mit Glasplatten abgedeckt, um ein Trocknen der Lösung an der Oberfläche zu vermeiden. Während der Entwicklung wird ab und zu vorsichtig geschwenkt. Für die Zeitspanne der Versilberung hat das Licht eine erhebliche Bedeutung. Vor Sonnenlicht muß gewarnt werden. Es hat sich am zweckmäßigsten herausgestellt, die Entwicklung bei künstlichem Licht vorzunehmen und eine 60 Watt-Lampe etwa 40 cm über die Schalen zu plazieren. Zu starke Beleuchtung führt alsbald eine Schwärzung der Lösung herbei, ohne daß der erwünschte Versilberungseffekt an den histologischen Schnitten eingetreten ist. Die Entwicklung wird durch Abspülen der Schnitte in fließendem Wasser dann beendet, wenn eine Schwärzung der im Gewebe vorhandenen Metallsulfide (mikroskopische

Kontrolle) herbeigeführt worden ist. Um den Zeitpunkt besonders bei Vergleichsuntersuchungen richtig beurteilen zu können, hat es sich als zweckmäßig herausgestellt, stets einen *Kontrollschnitt* von *einem* bestimmten Organstück mitzuführen.

Läßt man den Entwickler zu lange einwirken, so zeigt sich mit dessen fortschreitender Schwärzung auch eine Anlagerung von Silberpartikeln an den Strukturen des Schnittes, ohne daß man eine Bevorzugung bestimmter Gewebsanteile beobachten kann.

c) **Identifizierung der Metallsulfide.** Durch die Fixierung in Schwefelwasserstoff-Alkohol kommt es zu einer Sulfidfällung sämtlicher Metalle. Die Differenzierung der einzelnen Metallsulfide trifft nun auf ganz erhebliche und mitunter unerklärliche Schwierigkeiten. So können konzentrierte Säuren und Laugen bei der Durchführung von Lösungsversuchen am Gewebe nicht angewandt werden, da es hierbei zu einer Zerstörung der histologischen Strukturen kommt. Außerdem erhält man vielfach keine vollständige Lösung der Metallsulfide, selbst wenn man die verschiedenen Reagentien in entsprechend verdünnter Form oft tagelang einwirken läßt. Dies ist oft unbegreiflich und beruht vielleicht auf dem Kolloidcharakter des histologischen Materials.

Es wurde hierzu früher vorgeschlagen [VOIGT (1), STEGNER und FISCHER], durch Zusatz von Reagentien zur Fixierungslösung die Bedingungen für die Fällung der einzelnen Metallsulfide zu verändern. STEGNER und FISCHER haben hierfür unlängst ein ausführliches Schema gegeben. Dieses Vorgehen birgt aber eine erhebliche Gefahr in sich: Es kann zu Umlagerungen der einzelnen Metalle im Gewebe kommen, wahrscheinlich bevor die Schwefelwasserstoff-Fällung eingesetzt hat. Dies läßt sich gut am Pankreas z. B. des Hamsters demonstrieren: Fixiert man das Gewebe in ameisensaurem schwefelwasserstoffgesättigtem Alkohol, so zeigt sich nach erfolgter Versilberung, wie die das Zink markierenden Silbergranula in Klumpen angeordnet sind. Dies entspricht durchaus nicht den wirklichen Verhältnissen: das Zink ist gleichmäßig über das Zellplasma verteilt. Ob dieser Effekt darauf zurückzuführen ist, daß durch die Säure eine Verlagerung des Zinks vor der Fällung mit Schwefelwasserstoff eintritt, oder ob durch die Säureeinwirkung Strukturveränderungen am Gewebe herbeigeführt werden, die eine Verlagerung der Zinksulfidpartikel zur Folge haben, mag dahingestellt bleiben.

Das Vorgehen STEGNERS und FISCHERS stellt zweifellos eine gute Hilfe bei der Differenzierung der Metallsulfide dar, wenn man nur die chemische Seite betrachtet. Es kann aber zu histologischen Fehldeutungen Anlaß geben, besonders wenn man berücksichtigt, daß es durch Verlagerungen der im Gewebe diffus verteilten, geringsten Metallmengen auch zu lokalen Konzentrierungen kommen kann, die nunmehr bei der nachfolgenden physikalischen Entwicklung sichtbar werden. Besser scheint dann doch zu sein, wenn man sich mehr auf Ergebnisse an solchem Material verläßt, das in gewöhnlichem, annähernd neutralem schwefelwasserstoffgesättigtem Alkohol fixiert wurde. Mit einiger Geduld kann man auch unter Verwendung der von STEGNER und FISCHER aufgeführten Reagentien manchmal zu einigermaßen brauchbaren Resultaten kommen, wenn man Lösungsversuche an dem gefällten Material durchführt.

Für die Identifizierung der verschiedenen Metallsulfide verwendet man die in der analytischen Chemie gebräuchlichen Reagentien: Salzsäure, Essigsäure, Ammoniaklösung sowie Ammonium und Cyanid.

Die Identifizierungsmöglichkeit der Metallsulfide im histologischen Material ist jedoch bislang begrenzt, so daß weitere Möglichkeiten gefunden werden müssen. Nach TIMM (3) kann man z. B. Eisensulfid mit Penanthrolin lösen.

Mit Dithizon wurde in eigenen Versuchen bislang keine vollständige Entfernung der Metallsulfide erzielt.

Fehlerquellen. Daß bei der Anwendung der Sulfidsilbermethode eventuell reduzierende Substanzen (z. B. durch Sprengung von Schwefel-Brücken) im histologischen Schnitt stören, kann schon deshalb ausgeschlossen werden, weil man durch Variation des pH die Fällung bestimmter Metallsulfide begünstigen oder verhindern kann, oder aber man kann, wie geschildert, vor der Versilberung einen Teil der bereits gefällten Metallsulfide zur Lösung bringen, wie dies etwa den Prinzipien der analytischen Chemie entspricht. Würden nur reduzierende Substanzen vorliegen, dürfte man kaum ein analoges Verhalten erwarten können. Wasser- und alkoholösliche reduzierende Substanzen (z. B. Vitamin C) werden schon bei den Manipulationen zur Herstellung der Schnitte entfernt.

Argyrophile oder argentaffine Substanzen sind in dem Entwicklersystem nicht wirksam [VOIGT (5)].

Wie in früheren Mitteilungen beschrieben [VOIGT (1)], kann es im Gewebe zum Auftreten von chemisch bisher nicht näher identifizierten Substanzen kommen, die sich auch ohne eine Fixierung in Schwefelwasserstoff-Alkohol mit einer physikalischen Entwicklung nachweisen lassen. Diese Substanzen können also auch dann mit der Versilberung sichtbarmacht werden, wenn das Gewebe nur in Alkohol fixiert wurde. Sie fanden sich in den Nieren bei verschiedenen Nephroseformen in der Lunge, in abgestoßenen Alveolarepithelien, aber auch in tuberkulösen Herden. Das Auftreten solcher Stoffe ist selten, trotzdem erscheint es erforderlich, in jedem Falle bei Untersuchungen mit der Sulfidsilbermethode auch eine Kontrolluntersuchung an alkoholfixiertem Material vorzunehmen.

Weitere Methoden

Da man im Pankreas in erster Linie mit dem normalen Auftreten von histochemisch nachweisbarem Zink zu rechnen hat, wurde auch mit der Magnesiumdithizonatmethode [TM (2)] untersucht; dabei wird das Zink als ein roter Niederschlag dargestellt, der sich auf Grund des Farbtones z. B. von dem Kobalt (dunkelviolett) oder Blei (braun) unterscheiden läßt. Nickel ergibt mit dem Reagens einen braunvioletten Niederschlag.

Das Verfahren ist der Dithizonmethode nach McNARY nach eigenen Beobachtungen deshalb überlegen, weil es sich besonders gut am Paraffinschnitt anwenden läßt, auch wenn das Material in Schwefelwasserstoff-Alkohol fixiert wurde.

Für die Herstellung der Magnesiumdithizonatlösung hat sich folgendes Vorgehen bewährt:

In etwa 20 ml Aqua bidest. schwemmt man eine gute Messerspitze Magnesiumoxyd auf und gibt hierzu eine Messerspitze Dithizon (als Substanz). Die Lösung wird 2 Std bei Zimmertemperatur im Dunkeln und möglichst unter Luftabschluß stehengelassen, weder geschüttelt noch gerührt, um jede Oxydation zu vermeiden. Nach Filtrierung ist die Lösung gebrauchsfertig.

Entparaffinierte Schnitte, möglichst von Material, das in Schwefelwasserstoff-Alkohol oder aber in Alkohol fixiert wurde, legt man für 30 min in diese Lösung ein und montiert nach kurzem Abspülen in Aqua dest. in Gummiarabicum-Glycerinlösung. Die Präparate werden im Dunkeln aufbewahrt und sind einige Tage haltbar.

Dithizonmethoden sind nicht so empfindlich wie das Sulfidsilberverfahren und geben nicht so klare histologische Bilder. Das ist auch schon von SEIFERT anerkannt worden. Trotzdem sind die damit zu erzielenden Ergebnisse eine wertvolle Ergänzung zu den mit der Sulfidsilbermethode erhaltenen Resultaten.

II. Das Sulfidsilberbild des menschlichen Pankreas

1. Das Pankreas des Embryos

Zur Untersuchung gelangten Feten mit einer Scheitel-Sohlenlänge von 8, 12, 14,5, 15, 15,5, 19, 22, 25, 29, 29,5, 32, 39, 44 cm und von reifen gesunden Neugeborenen. Teilergebnisse dieser Untersuchungen sind bereits früher mitgeteilt worden [VOIGT (8)]. Diese wurden nunmehr durch das weitere Material ergänzt.

Bereits bei dem jüngsten der untersuchten Feten (8 cm) läßt sich im Cytoplasma der zwischen den Epithelien der primitiven Drüsenschläuche eingesprengten Inselzellen das Vorhandensein dichter schwarzer Granula nachweisen. Auch die ersten primitiven Inselzellkomplexe haben ein schwarz granulierte Plasma. Die Untersuchung mit der Magnesiumdithizonatmethode zeigt eine deutliche Rotfärbung. Lösungsversuche vor der physikalischen Entwicklung (S. 297) deuten darauf hin, daß die dem Versilberungseffekt zugrunde liegende Substanz Zink ist.

Die gleichen Verhältnisse liegen beim 12 cm langen Feten vor. Beim Embryo mit einer Länge von etwa 15 cm kommt es nun plötzlich zum Auftreten von 2 ver-

schiedenen Inselzelltypen: solchen, die bei schwacher Vergrößerung schwarz, und solchen, die braun aussehen. Bei starker Vergrößerung zeigt sich dann, daß in den sog. schwarzen Zellen, dicht gepackt, schwarze Granula vorhanden sind, während in den sog. braunen Zellen die Granula feiner verteilt sind. Die zwischen das Acinusepithel eingesprengten Inselzellen enthalten stets die dichten schwarzen Granula, während die schon als Langerhanssche Inseln ansprechbaren Zellgruppen aus sog. schwarzen und braunen Zellen bestehen. Die schwarzen Zellen befinden sich mehr an der Peripherie der Inseln, während die braunen Zellen im Zentrum der Inseln gelegen sind. Es treten auch kleine Gruppen von nur sog. braunen Inselzellen auf. Magnesiumdithizonat färbt die schwarzen Zellen rot, während die braunen Zellen nur eine bedeutend schwächere, eben erkennbar Rosafärbung erkennen lassen.

Diese beiden Zellarten, d. h. sog. braune und schwarze, lassen sich auch in der Folgezeit beim Embryo unterscheiden. Die sog. schwarzen Zellen liegen mehr an der Peripherie der Inseln, während die zentral gelegenen Inselzellen die feinere Granulierung aufweisen. Man sieht aber außerdem bei Feten zwischen 20 und 30 cm Körperlänge das Auftreten von Inseln, die aus 2 durch Bindegewebe und Blutgefäße voneinander getrennten Anteilen bestehen, wobei die eine Hälfte nur sog. braune und die andere Hälfte nur schwarze Inselzellen enthält. Es treten auch Inseln auf, die nur aus braunen Zellen bestehen. Eingesprengte schwarze Inselzellen zwischen den Epithelien der Drüsengangsstücke sind häufig, zwischen denen der Gänge relativ selten.

Mit zunehmendem Wachstum des Feten verschwindet dann der Unterschied zwischen den sog. braunen und schwarzen Zellen allmählich, d. h., die Granulierung in den braunen Zellen wird dichter, und beim reifen Neugeborenen ist es schon schwierig, einen sicheren Unterschied im Schwärzungsgrad der einzelnen Inselzellen festzustellen.

2. Das Pankreas des gesunden Erwachsenen

Kindliches Material steht bislang leider nicht in genügendem Umfang zur Verfügung, so daß hier nur die an Erwachsenendrüsen gefundenen Verhältnisse dargelegt werden können. Es handelt sich dabei um gerichtliches Obduktionsgut.

Inselzelle. (In Langerhansschen Inseln, eingesprengten Inselzellen in den Drüsengangsstücken und den Ausführungsgängen.)

Das Bild unterscheidet sich nicht wesentlich von dem, was beim reifen Neugeborenen geschildert wurde. Man sieht, daß sämtliche in den Langerhansschen Inseln vorkommenden Zellen schwarze Granula in ihrem Zellplasma aufweisen. Das Cytoplasma mancher Inselzellen ist so dicht von schwarzen Granula ausgefüllt, daß bei schwacher Vergrößerung der Eindruck einer vollständigen Schwärzung dieser Zellen hervorgerufen wird. Diese Zellen machen den größten Anteil der Inseln aus. Daneben gibt es aber dann noch Inselzellen, in deren Cytoplasma die Granula etwas weniger dicht nebeneinanderliegen. Das einzelne Granulum erscheint bei starker Vergrößerung vielleicht auch etwas kleiner als in den sog. schwarzen Zellen. Bei schwacher Vergrößerung gewinnt man den Eindruck, als ob solche Zellen braun tingiert wären. Es ist jedoch außerordentlich schwierig, diese beiden Zellarten voneinander zu unterscheiden oder gar das

Mengenverhältnis zu berechnen. Die „schwarzen“ Zellen haben ein kappenförmiges Plasma. Treibt man die physikalische Entwicklung zu weit, d. h., läßt man den Entwickler zu lange einwirken, verschwindet der Unterschied vollkommen. Alle Inselzellen sind dann vollständig schwarz. Es muß besonders betont werden, daß sämtliche Granula auf das Plasma der Inselzellen konzentriert sind, die Kerne sind frei.

Mit der Magnesiumdithizonatmethode läßt sich eine Rotfärbung der Langerhansschen Inseln herbeiführen.

Beim Vorgehen nach STEGNER und FISCHER (Zufügung der Chemikalien zum Fixierungsgemisch) zeigt sich ein dem Zink analoges chemisches Verhalten (SEIFFERT).

Hiernach kann also davon ausgegangen werden, daß man mit der Sulfid-silbermethode in den Langerhansschen Inseln das Zink erfaßt, wie dies auch von TIMM und NETH betont worden ist.

Auch wenn die Fäulnis bereits fortgeschritten ist, d. h. wenn also Kernfärbungen usw. nicht mehr möglich sind, lassen sich die Langerhansschen Inseln mit der Sulfidsilbermethode noch gut sichtbar machen. Bei mittlerem Fäulnisgrad sieht man manchmal eine Schwärzung der Inselkerne. Dies beruht vermutlich darauf, daß es vor der Fixierung mit Schwefelwasserstoff zu einem Umsatz der Nucleinsäure mit dem in der Umgebung vorhandenen Zink gekommen war. Dies hat damit zu einer postmortalen Anreicherung von Zink im Bereich der Zellkerne geführt.

Mit der Sulfidsilbermethode darstellbare, zwischen den Epithelien der Drüsendarstücke eingesprengte Inselzellen treten nicht oft auf, und Inselzellen im Epithel der normal aussehenden Ausführungsgänge sind selten. Die Entscheidung, ob es sich bei solchen isolierten Inselzellen um solche mit einer groben oder einer feineren schwarzen Granulierung handelt, ist nicht möglich.

Die normal gestalteten Inseln bestehen entweder nur aus sog. schwarzen Zellen, oder aber man kann das Vorhandensein beider Zellarten, d. h. größer (schwarzer) und feiner granulierter (brauner) erkennen, wobei die schwarzen Inselzellen meist an Capillaren angrenzen.

Drüsendarstücke und Ausführungsgänge. Mit der Sulfidsilbermethode läßt sich in den Acinuszellen und Epithelien der Ausführungsgänge normalerweise keine Schwärzung nachweisen.

Dies mag etwas merkwürdig erscheinen, da man ja das Vorhandensein von Zink [in der Carbanhydrase; KEILIN und MANN (1, 2)] auch in diesen Epithelien annehmen muß. Das Zink läßt sich jedoch dann erfassen, wenn man die Dithizonreaktion am Spodogramm durchführt. Dabei wird natürlich durch Zusammensintern der in diesen Zellen vorhandenen Zinkmengen eine gewisse Verlagerung herbeigeführt und das in der Zelle vermutlich diffus verteilte Zink konzentriert. Mit Hilfe dieser Untersuchung läßt sich keine Auskunft darüber geben, in welchem Zellanteil (Kern oder Plasma) sich das Zink in den Acinusepithelien findet.

Das Zink ist also offenbar in den Acinuszellen so fein verteilt, daß es sich dem histo-chemischen Nachweis mit der Sulfidsilbermethode entzieht.

Allerdings beobachtet man manchmal auch beim gesunden Menschen in den Lumina und den nach dem Lumen zu gelegenen Anteilen der Epithelien der Drüsendarstücke und in den Ausführungsgängen das Vorhandensein schwarzer Granula. In solchen Fällen sind nicht etwa alle Acini betroffen, sondern meistens nur kleinere Abschnitte.

Bindegewebe. Mit der Sulfidsilbermethode läßt sich im Bindegewebe niemals das Auftreten von Metallen feststellen.

Gefäßwandung. Die Gefäßwandung erweist sich beim gesunden Menschen frei von Substanzen, die sich mit der Sulfidsilbermethode nachweisen lassen.

Physikalische Entwicklung alkoholfixierten Gewebes. Alle vorliegenden Fälle, aber auch Operationsmaterial wurden in dieser Weise untersucht. Es zeigt sich dabei, daß man an ganz frischem Material keinen Versilberungseffekt erzielen kann. Sobald jedoch postmortale Veränderungen einsetzen, läßt sich eine granulierte Versilberung der Inselzellen herbeiführen. Diese ist jedoch meist nicht so stark ausgeprägt wie an solchem Material, das in Schwefelwasserstoffalkohol fixiert wurde.

Wenn also am alkoholfixierten Pankreas der oben beschriebene Versilberungseffekt eintritt, so ist hierfür möglicherweise eine postmortale Bildung von Zinksulfid verantwortlich. Diese kann auf der autochthonen Bildung von Schwefelwasserstoff aus schwefelhaltigen Eiweißverbindungen beruhen. Der Bildungsmechanismus ist von SPECHT eingehend geschildert worden.

3. Das Pankreas des nichtdiabetischen Kranken und des Diabetikers

Zur Untersuchung gelangte das Obduktionsmaterial von 73 Personen, die in der Klinik an Erkrankungen verstorben waren, bei denen also eine gründliche klinische Untersuchung vorausgegangen war. Es handelt sich um Bauchspeicheldrüsen von 36 Nichtdiabetikern und 37 Diabetikern. Wegen der lückenhaften oder überhaupt fehlenden anamnestischen Daten, besonders hinsichtlich einer eventuell bestehenden Zuckerkrankheit, konnte das gerichtliche Sektionsgut für diese Untersuchungen nicht herangezogen werden.

a) Die Langerhansschen Inseln. *Anzahl und Gestalt der Inseln.* Die Sulfidsilbermethode gestattet eine hervorragende färberische Heraushebung der Inselzellen gegenüber dem übrigen Gewebe der Bauchspeicheldrüse, das mit Kernechtrot oder Paracarmine angefärbt wurde. Damit ist es leicht, die Gestalt und die Menge der Inseln näher zu beurteilen.

Isolierte Inselzellen können normalerweise einzeln oder in kleinen Gruppen im Verband der Epithelien der Ausführungsgänge, auch zwischen den eventuell mehrschichtigen Epithelien besonders cystischer Bildungen der Gänge, aber auch zwischen den Epithelien der Drüsenendstücke auftreten. Außerdem findet man einzelnliegende Inselzellen in fibrösen Bezirken und im Bindegewebe zwischen den Acini. Sie entgehen leicht der Untersuchung, wenn man nicht Spezialfärbungen wie die Sulfidsilbermethode anwendet.

Recht häufig treten *kleinere Inselzellaufäden* auf, die aus wenigen Zellen bestehen und zwischen denen man nur selten einmal eine versorgende Capillare sehen kann. Sie finden sich manchmal in direktem Anschluß an isolierte Inselzellen im Epithel von Gängen, die oft cystisch erweitert sind und meist in sklerotischen Bezirken liegen. Zwischen den Gängen und jenen Zellaufäden vermißt man eine bindegewebige Zwischenschicht. Die Inselzellen umhüllen auch manchmal als ein dünner Mantel den gesamten Gang. Solche Inselzellaufäden beobachtet man aber außerdem sehr häufig in bindegewebigen (sklerotischen) Bezirken *ohne* Verbindung mit Gängen oder Drüsenendstücken.

Eine weitere Inselform sind *säulen- oder bandartige Inselzellkomplexe*, die meist aus einer Zellreihe, manchmal aber auch aus 2—3 bestehen. In ihnen erkennt man selten oder nur mit Mühe Capillaren. Diese Bildungen finden sich vorzugsweise in bindegewebigen (sklerotischen) Bezirken, aber auch manchmal zwischen den acinösen Pankreasanteilen und dann nur vor einer zarten bindegewebigen Hülle umgeben. Nicht in einem einzigen Falle konnte ein sicherer

direkter räumlicher Zusammenhang mit den Epithelien der Ausführungsgänge oder einzelnen Inselzellen im Verband der Epithelien der Drüsendarstellungen beobachtet werden.

Eine weitere Form einer gestaltlichen Abweichung von normalen Langerhansschen Inseln stellen *größere Inselzellkomplexe* dar, die nicht rundlich sind, sondern eine unregelmäßig gestaltete Umgrenzung haben. Es fehlt ihnen vielfach eine deutlich sichtbare Bindegewebsskapsel. Man hat manchmal den Eindruck, als ob diese Zellkomplexe direkt mit den Zellverbänden der Acini in Verbindung stehen. Auch vermißt man eine regelmäßige Lagerung um Capillaren herum. Solche Komplexe sind bedeutend größer als normal aussehende Inseln.

Die *Hyalin*massen bei Inselhyalinose zeigen im Sulfidsilberbild meist eine diffuse Gelbfärbung sowie mitunter locker eingestreute schwarze, manchmal etwas klumpige Granula. In fibrösen Inselbezirken kann nie ein positiver Ausfall der Reaktion festgestellt werden.

Besonderheiten nach Anwendung der Sulfidsilbermethode. Während bislang beim normalen, gesunden Erwachsenen und beim reifen Neugeborenen nur 2 schwer zu trennende Zellarten auf Grund ihrer Darstellung mit der Sulfidsilbermethode unterschieden werden konnten, ergaben sich bei der Untersuchung des in diesem Abschnitt besprochenen Materials 2 weitere Möglichkeiten:

1. Inselzellen, deren Plasmaleib nach Anwendung der Sulfidsilbermethode nur eine diffuse Gelbfärbung zeigt, ohne daß man Granula auch nach Anwendung der stärksten im Lichtmikroskop möglichen Vergrößerung erkennen kann.
2. Inselzellen, deren Plasma frei von jedem Versilberungseffekt bleibt.

Nach dem Ausfall der Versilberung können also die Langerhansschen Inseln aus 4 verschiedenen „Zellarten“ („schwarze“, „braune“, „gelbe“ und solche ohne Versilberungseffekt) bestehen. Folgende Kombinationen werden beobachtet:

1. Inseln, die nur aus schwarzen, dicht granulierten Zellen bestehen. Die Einzelgranula sind verhältnismäßig groß.
2. Inseln, die aus feiner granulierten braunen und aus schwarzen Zellen zusammengesetzt sind.
3. Eine weitere Inselart besteht nur aus Zellen, deren Plasma eine feinere, wenn auch dichte Granulierung aufweist (braune Zellen), schwarze Inselzellen werden vermißt. Eine solche Differenzierung kann man nur dann vornehmen, wenn man im Gesichtsfeld zum Vergleich andere sichere schwarze Inseln oder Inselzellen sieht.
4. Inseln, die aus einzelnen schwarzen Zellen und außerdem nur aus solchen bestehen, deren Plasmaleib eine zarte Gelbfärbung aufweist, ohne daß man Granula erkennen kann.
5. Manchmal treten Inseln auf, deren Zellen nur eine Gelbfärbung zeigen, schwarze Zellen werden vermißt.
6. Schließlich kommt es zum Auftreten von Inseln mit einigen (d. h. je Schnitt 2-3) schwarzen Inselzellen, während alle anderen Zellen weder Granula noch eine diffuse Gelbfärbung erkennen lassen.
7. Die letzte Möglichkeit ist schließlich das Auftreten von Inseln, deren Zellen völlig frei von Versilberungseffekten bleiben.

Nichtdiabetische Kranke. Beim Nichtdiabetiker konnte auch in dieser Untersuchungsreihe das Auftreten von sog. schwarzen Inseln beobachtet werden sowie solcher Inseln, die aus feiner granulierten sog. braunen Zellen und meist einer im Verhältnis zu den braunen Inselzellen geringeren Anzahl sog. schwarzer Inselzellen bestehen.

Von dieser Regel gibt es aber Ausnahmen. Es kann auch beim Nichtdiabetiker zum Auftreten von Inselzellen kommen, deren Cytoplasma keine oder nur eine

geringe Anzahl feiner Granula aufweist. Es handelt sich dabei um 5 Patienten, die an fieberrhaften, septischen Erkrankungen verstorben waren (3 Fälle mit Peritonitis, 2 Sepsisfälle mit unklarer Genese). Die histochemischen Veränderungen sind nicht bei den anderen untersuchten Sepsisfällen zu beobachten.

Diabetiker. Beim Diabetiker sind Veränderungen des Sulfidsilberbildes vom Normalen, d. h. Verminderung des Granulagehaltes in den Inselzellen, bedeutend häufiger festzustellen. Freilich sieht man bei keinem Falle das einheitliche Auftreten eines einzigen Inseltyps, wenn man die gegebene Typeneinteilung zugrunde legt, sondern stets beobachtet man im gleichen Pankreas verschiedene Inselbilder. Es ist auffallend, daß das Auftreten dieser einzelnen Typen nicht etwa bezirkweise geschieht, sondern stets verschiedene Inselformen nebeneinanderliegen.

Diese Feststellung mag insofern wichtig sein, als damit ausgeschlossen werden kann, daß etwa eine ungleichmäßige Durchdringung der Organstücke mit Schwefelwasserstoff oder eine ungleichmäßige physikalische Entwicklung diesem

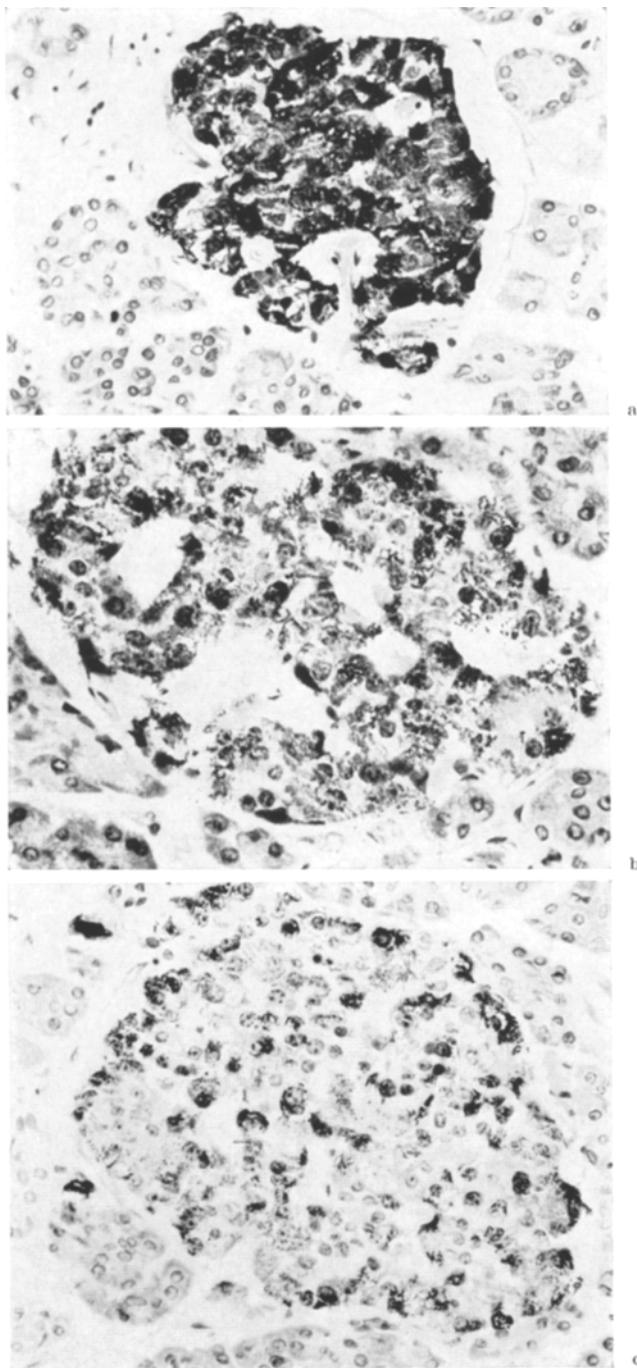


Abb. 1a—c. Langerhanssche Inseln. Sulfidsilbermethode, Kernechtrot. Die verschiedenen Inseln befinden sich in dem gleichen Diabetikerpankreas (64jähriger Mann, Diabetes seit 11 Jahren, keine Insulinbehandlung). a Normal („schwarze“ Zellen), b und c Inseln mit deutlich verminderter Metalgehalt (braune und schwarze bzw. gelbe und schwarze Zellen). 300 ×

eigentümlichen Effekt zugrunde liegt. Es wurde versucht, die geringgradigen Versilberungseffekte in manchen Inseln mit eventuellen, morphologischen Veränderungen an den Zellen zu vergleichen. Dies ist aber wegen des mit der Alkoholfixierung verbundenen Schrumpfungserscheinungen an den versilberten Präparaten kaum möglich.

Das Untersuchungsgut stammt vorzugsweise von Altersdiabetikern, die teilweise eine sehr kurze Diabetesanamnese haben. Freilich kann man sich natürlich auf solche Auskünfte nicht allzusehr verlassen, denn nicht gar so selten besteht eine Zuckerkrankheit längere Zeit, ohne daß der Patient sich dessen bewußt

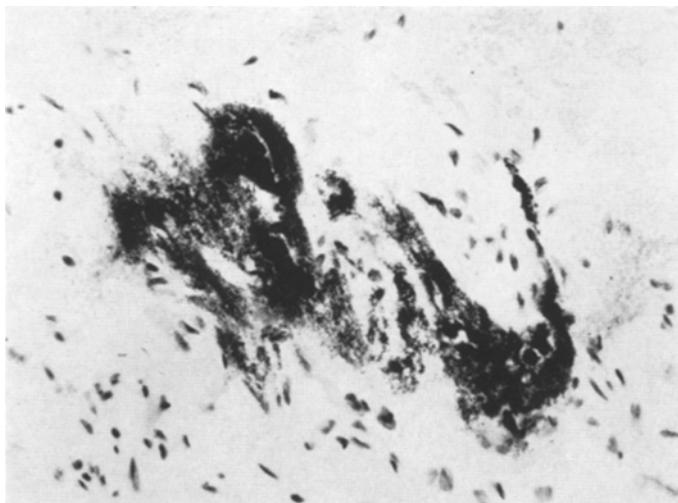


Abb. 2. Granulahaufen in einem größeren sklerotischen Bezirk eines Pankreas. Sulfidsilbermethode, Kernechtrot. 400 x

ist. Auch in dem vorliegenden Material ist ein Fall vorhanden, bei dem die sicher schon länger bestehende Erkrankung erst kurze Zeit vor dem Tode entdeckt wurde.

b) Bindegewebe. Wie bereits beschrieben, bleibt das Bindegewebe des menschlichen Pankreas nach Anwendung der Sulfidsilbermethode normalerweise frei von Versilberungseffekten. Es enthält also keine histochemisch nachweisbaren Metalle. So ist es besonders auffallend, daß sich bei einer Reihe von Fällen das Auftreten von schwarzen Granula im Bindegewebe in der unmittelbaren Umgebung von kleineren Inselzellkomplexen und isolierten Einzelzellen zeigt. Diese Granula befinden sich zunächst dicht nebeneinander, um mit zunehmender Entfernung von den Inselzellen allmählich zu verschwinden.

c) Gefäßwandung. Bei einem erheblichen Teil der Diabetiker wurde das Auftreten von schwarzen Granula in den Arterienwänden beobachtet. An den gleichen Stellen läßt sich mit der Magnesiumdithizonatmethode eine deutliche Rotfärbung erzielen.

Diese mit der Sulfidsilbermethode und der Magnesiumdithizonatmethode in der Gefäßwandung nachweisbare Substanz (wahrscheinlich Zink) befindet sich recht oft in Gesellschaft mit Calcium, das mit der Naphthalhydroxamsäuremethode [VOIGT (4)] nachgewiesen wurde.

d) Der exokrine Pankreasanteil. Das Auftreten von Granula in den Lumina der Drüsenendstücke und der Ausführungsgänge sowie in dem dem Lumen zu gelegenen Plasmaanteil der Epithelien der Drüsenendstücke wurde bereits als ein normales Vorkommen geschildert. Auffallend ist hierbei das abschnittsweise Betroffensein der Drüse.

Darüber hinaus zeigte sich nun besonders bei Diabetikern das Auftreten von Granula im Epithelplasma, wobei sich nicht die lumennahe Lagerung erkennen läßt.

Auffallend ist, daß man manchmal kleine rundliche Abschnitte von Drüsenendstücken sehen kann, deren sämtliche Epithelien im Plasma kleine Granulahaufen erkennen lassen. Man gewinnt fast den Eindruck, als ob es sich hierbei um Inseln handeln könne. Die gleichen Bezirke verhalten sich auch in der Hämatoxylin-Eosinfärbung auffällig: Das Plasma ist bedeutend heller gefärbt, aufgelockert. Es handelt sich dabei um pseudoinsuläre Zellhaufen [FERNER (1)].

Lösungsversuche haben kein klares Bild über die chemische Natur dieser dem Versilberungseffekt zugrunde liegenden Substanzen geben können. Mit der Dithizonmethode konnte keine Färbung erzielt werden. Letzteres beweist allerdings nichts, da die in den Zellen vorhandenen Substanzmengen unter der Nachweisgrenze für Dithizon liegen können.

Zellen mit den hier beschriebenen Silbergranula nach Anwendung der Sulfidsilbermethode haben nichts mit eingesprengten isolierten Inselzellen zu tun, soweit sich dies nach der Lagerung der Silbergranula beurteilen läßt.

e) Besonderheiten am Pankreas. *Nekrose (Fettgewebsnekrose) des Pankreas.* Nekrotische Bezirke im Pankreas lassen sich außerordentlich gut mit der Alcianblaumethode sichtbar machen. Es müssen also hier ganz erhebliche Mengen an sauren Mucopolysacchariden vorliegen, was bisher offenbar nicht bekannt war. Außerdem kann man mit der Naphthalhydroxamatmethode erhebliche Mengen an Kalk nachweisen.

Mit der Sulfidsilbermethode beobachtet man manchmal in diesen nekrotischen Bezirken das Auftreten von schwarzen Granulahaufen, die in ihrer Lokalisation etwa der der Langerhansschen Inseln entsprechen könnten. Die Granula sind etwas grob, verklumpt, liegen dicht nebeneinander, und man kann um diesen Granulakomplex herum schemenhaft Bindegewebe vermuten.

Cystische Pankreasfibrose. Zur Beobachtung kam ein Fall von typischer, cystischer Pankreasfibrose bei einem 5 Monate alten Kind. Die Inselzellen sind

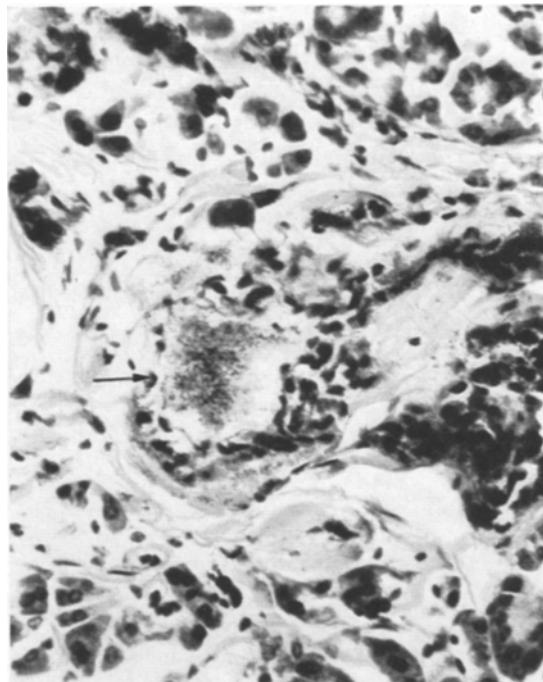


Abb. 3. Granulahäufen in einem hyalinen Bezirk einer Langerhansschen Insel. Sulfidsilbermethode, Kernechtrot. 400 x

teils grobgranuliert schwarz, teils feingranuliert, braun. Es treten auffallend viele isolierte oder in kleinen Gruppen liegende Inselzellen zwischen den Epithelien der cystischen Bildungen auf. Die Inselzellgruppen wölben sich z. T. in das Lumen hinein.

Primäres Pankreascarcinom. In den Carcinomzellen lassen sich histochemisch keine Metalle nachweisen. Zwischen den Tumormassen sieht man manchmal geschwärzte und verzerrte Langerhanssche Inseln. In der Umgebung kleiner Inselzellgruppen treten schwarze Granulaanhäufungen im Bindegewebe auf.

*Insulom*¹. Haselnußgroßes Insulom (Operationsmaterial) von einem 48jährigen Mann. Die hochgradige Hypoglykämie verschwand nach der Operation. Histologisch zeigte sich das typische Bild. Mit der Sulfidsilber- und Magnesium-dithizonatmethode ließen sich in den Geschwulstzellen keine Metalle nachweisen.

III. Das Sulfidsilberbild des tierischen Pankreas

1. Das normale Pankreas

Es wurde alles zugängliche Tiermaterial untersucht. Mit der Sulfidsilbermethode ließen sich schwarze Granula in den Inselzellen, den Acinusepithelien und den Ausführungsgängen erzeugen, wie sich aus Tabelle 1 ergibt.

Tabelle 1. *Befunde an tierischen Bauchspeicheldrüsen nach Anwendung der Sulfidsilbermethode*

	Langerhanssche Inseln	Drüseneindstücke	Ausführungsgänge
Fische	ein Teil der Inselzellen (in Gruppen und Strängen gelagert) +	—	Cytoplasma: +
Huhn	teils ++, teils (+)	—	—
Katze	+++	+(abschnittsweise)	Lumen: +
Bär	++	+	—
Rotfuchs	+++	+(abschnittsweise)	—
Hund	++	++ (abschnittsweise)	+
Pferd	Periphere Inselzellen: +++ (schwarz); Zentrale Inselzellen: ++ (braun)	—	—
Schwein	+++	—	—
Igel	++	+(überall)	+
Rind	—	+(abschnittsweise)	(+)
Wisent.	—	+	(+)
Elch	3 Tiere: — 1 Tier: (+)	+	(+)

¹ Herrn Prof. Dr. SANDBLOM sei für die Überlassung des Materials gedankt.

Tabelle 1 (Fortsetzung)

	Langerhanssche Inseln	Drüsenendstücke	Ausführungsgänge
Schaf	—	+	(+)
Reh	++	+	+
Rentier	++	+	Cytoplasma; +
Ziege	+	(+)	(+)
Maus	+++	—	—
Ratte	Periphere Inselzellen: +++ (schwarz); Zentrale Inselzellen: ++ (braun)	—	—
Goldhamster . . .	+++	—	—
Meerschwein . . .	— [manchmal (+)]	—	—
Kaninchen	+++	—	—

2. Das Pankreas des Hundes mit Spontandiabetes

Zur Untersuchung gelangten die Bauchspeicheldrüsen von 3 Hunden, bei denen klinisch ein Diabetes mellitus bestand. Übereinstimmend ließ sich folgendes feststellen:

Die Langerhansschen Inseln sind sehr klein, verzerrt und wegen ihrer geringen Zahl nur schwer zu finden. Die Einzelzellen sind verhältnismäßig groß, und ihr

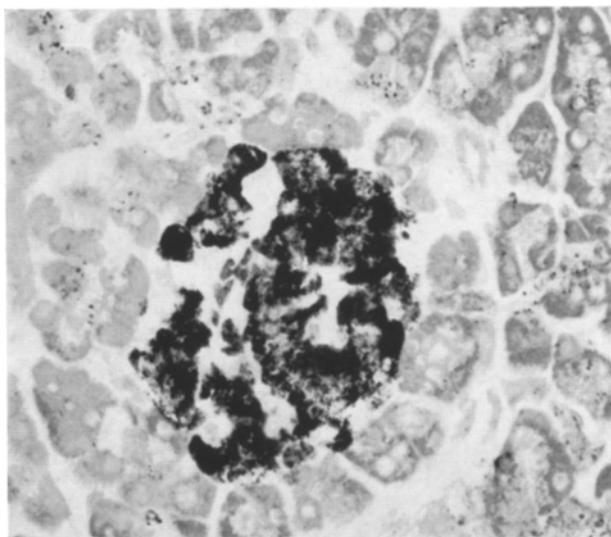


Abb. 4. Pankreas, Hund, normal. Man beachte auch die vereinzelten Granula im exokrinen Anteil

Cytoplasma ist von größeren und kleineren Vacuolen eingenommen. Die Ausführungsgänge zeigen vielfach cystische Erweiterungen mit reichlich Bindegewebe in der Umgebung. Ein Teil der Inselzellen enthält nach Anwendung der Sulfidsilbermethode keinerlei Granula, in anderen Zellen lassen sich einige wenige Silber-

körper entdecken. Einzelne Inselzellen haben einen normalen Granulagehalt des Cytoplasmas. Die Epithelien der Ausführungsgänge sind frei von Granula. Geschwärzte Einzelzellen lassen sich weder zwischen den Epithelien der Ausführungsgänge noch in den Drüsenendstücken beobachten. Die Gefäßwandungen sind frei von Silbergranula. Calcium konnte nirgends nachgewiesen werden.

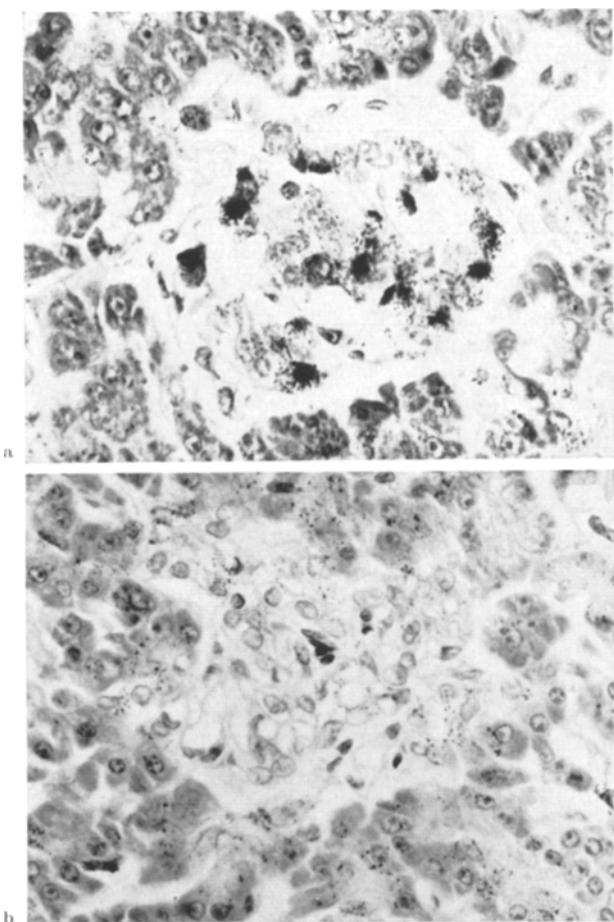


Abb. 5a u. b. Pankreas, Hund, Diabetes. a Nur ein Teil der Inselzellen enthält Metallanhäufungen. b Langerhanssche Insel. Die Zellen sind frei von Metallanhäufungen

zeigte sich folgendes: Fixiert man das Material mit Alkohol, so erhält man in den Inseln keine sichere Rotfärbung. Diese tritt jedoch auf, wenn man Material behandelt, das in Schwefelwasserstoffalkohol fixiert worden ist. Nach Veraschung der Schnitte und Behandlung mit Magnesiumdithizonat beobachtet man in der Gegend der Langerhansschen Inseln rote Konglomerate. Auch im Bereich der Acini sieht man eine zarte Rotfärbung.

Cortison. 7 Kaninchen: bis zu 60 Tagen Cortal (Gesamtmenge bis zu 2732 mg) und Testosteron (bis zu 366 mg). Blutzuckerwerte bis zu 0,37 g-%; 2 Kaninchen: 24 bzw. 30 Tage lang Cortisonacetat (800 bzw. 1450 mg) und Neohombrol (120 bzw. 150 mg). Blutzuckerwerte bis zu 0,19 g-% (Untersuchungen gemeinsam mit ISING).

BAL. 2 Hamster und 2 Kaninchen: bis zu 16 bzw. bis zu 15 Tagen bis zu 135 mg/100 g bzw. bis zu 565 mg/g BAL.

Glucosebelastung. Kaninchen: mit der Magensonde und intravenös innerhalb von 7 Std bis zu 61 g Glucose.

IV. Experimentelle Untersuchungen

1. Versuche zur Entfernung des Inselzinks

Alloxan. Das Verhalten des Zinks in den Langerhansschen Inseln nach Injektion von Alloxan hat bereits früher mehrfach das Interesse von Untersuchern gefunden. So konnten besonders MASKE, WOLFF, STAMPFL und BAUMGARTEN mit Hilfe der von OKAMOTO angegebenen Methode des histo-chemischen Zinknachweises durch Injektion von gepufferter Dithizonlösung ein Verschwinden dieses Metalls alsbald nach der Dithizoninjektion nachweisen. In einer früheren Mitteilung wurde gezeigt [VOIGT (2)], daß im Gegensatz zu den Befunden von MASKE et al. ein Verschwinden des Zinks beim alloxandiabetischen Tier nicht vorliegt. In Ergänzung zu den früheren Untersuchungen mit der Sulfidsilbermethode wurde nunmehr am Pankreas der Alloxantiere (Kaninchen) auch noch die Magnesiumdithizonatreaktion durchgeführt. Dabei

Hypophysektomie. 5 Ratten: Hypophysektomie 40 bzw. 110 Tage vor der Tötung¹.

Hypophysenvorderlappenhormon: 2 Kaninchen: 150 bzw. 240 Tage lang insgesamt 1685 bzw. 4615 RE/kg.

13 Ratten, 40—150 Tage lang insgesamt 520—2775 RE.

Nach BAL-Behandlung, Glucosebelastung, Hypophysektomie und Hypophysenvorderlappenhormon-Behandlung konnte keine Veränderung des Blutzuckergehaltes festgestellt werden. Das Sulfidsilberbild zeigte bei keinem der Versuchstiere, also auch nicht nach Cortisonbehandlung, eine wesentliche Veränderung des Sulfidsilberbildes.

2. Metallvergiftungen

Wie voranstehend geschildert, zeigten sich nach Anwendung der Sulfidsilbermethode in menschlichen und tierischen Bauchspeicheldrüsen recht häufig in den Lumina der Drüsenendstücke und der Ausführungsgänge, aber auch in den Acinus-epithelien in der Nähe der Lumina schwarze Granula. Dies wurde als das Bild eines Ausscheidungsprozesses gedeutet. Um diese Annahme zu erhärten, sind die Bauchspeicheldrüsen von Ratten untersucht worden, die folgende Metallsalzlösungen intramuskulär erhalten hatten und danach in Abständen von 15 min bis 5 Std getötet wurden (Tabelle 2).

Tabelle 2. Das Verhalten der Drüsenendstücke des Pankreas der Ratte nach Anwendung der Sulfidsilbermethode bei Metallvergiftungen

Tötung nach min	Sublimat 2 mg	Kupfersulfat 6 mg	Arsenik 0,5 ml wäßrig-gesättigter Lösung	Urannitrat 4 mg
15	großer Teil der Epithelien	einzelne Epithelien	+++	++ (bezirksweise)
30	großer Teil der Epithelien	+	+++	++ (bezirksweise)
60	++	+(bezirksweise)	+++	++ (bezirksweise)
90	++	+(bezirksweise)	+++	++ (bezirksweise)
120	++	+(bezirksweise)	+++	+++ (bezirksweise)
180	+++	+(bezirksweise)	+++	++ (bezirksweise)
240	+++	++(bezirksweise)	+++	++ (bezirksweise)
300	+++	++(bezirksweise)	+++	+(bezirksweise)
Tötung nach min	Zinksulfat 100 mg	Thalliumacetat 0,5 mg	Cadmiumacetat 2,5 mg	Bleiacetat 20 mg
15	+++	+	+(bezirksweise)	+(bezirksweise)
30	+++	+	++	+
60	+++	+	+++	+++
90	+++	+	+++	+++
120	+++	+	+++	+++
180	+++	+	+++	+++
240	+++	++	+++	+++
300	+++	++	+++	+++

¹ Herrn Dozent Dr. C. RERUP sei für die Überlassung der hypophysektomierten Tiere gedankt.

Bei sämtlichen vergifteten Tiere ließen sich mit der Sulfidsilbermethode in den Lumina der Drüsenendstücke und den den Lumina angrenzenden Plasmaanteilen der Acinusepithelien dichte schwarze Granula erzeugen. Dabei ist die Granulierung, wie in der Übersicht markiert, bei den einzelnen Vergiftungen unterschiedlich dicht. Auch sind nicht stets sämtliche Drüsenendstücke gleichmäßig betroffen, sondern es läßt sich bei Vergiftungen mit Quecksilber-, Kupfer-, Uran- und Thalliumsalzen eine mehr bezirksweise Beteiligung beobachten. Bei den anderen Intoxikationen sind die Granula gleichmäßig auf alle Drüsenendstücke verteilt. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Metallsalzen können darauf

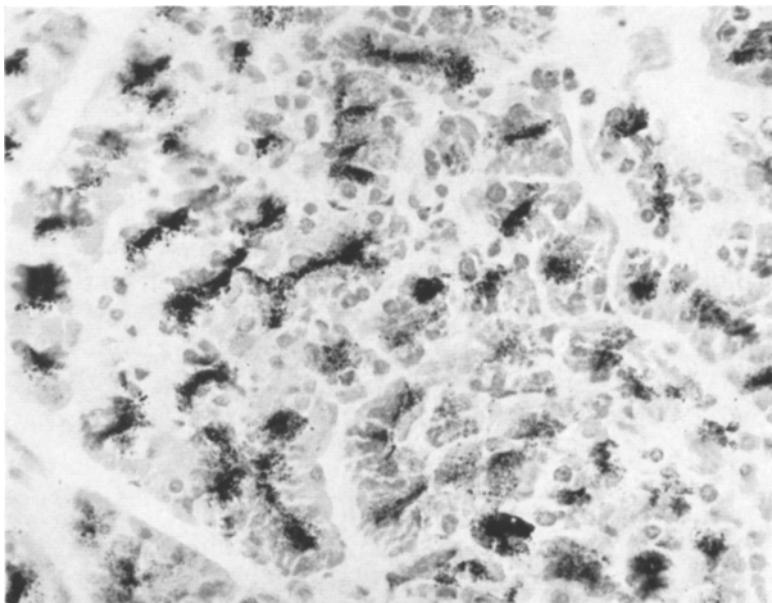


Abb. 6. Pankreas, Ratte. Cadmiumvergiftung (3 Std), Sulfidsilbermethode, Hämatoxylin. 400 ×

zurückzuführen sein, daß jeweils die größte, nach früheren Erfahrungen bei Ratten nicht sofort tödlich wirkende Giftmenge gespritzt wurde, was erhebliche mengenmäßige Unterschiede der verwendeten Substanzen bedingte. Es scheint also bei kleinerem Metallangebot nur ein Teil der Drüsenendstücke Metalle aufzunehmen.

In den Lumina der größeren Ausführungsgänge ließen sich besonders bei einigen Tieren nach Zink-, Quecksilber- und Kupfersalzvergiftungen meist erhebliche Mengen an schwarzen Granula beobachten, während sich bei den anderen Tieren entweder nur wandständige Granulaanhäufungen zeigten oder aber die großen Lichtungen völlig frei von irgendwelchem Inhalt waren. Es muß daran gedacht werden, daß der Inhalt der Ausführungsgänge bei den Manipulationen zur Herstellung der Präparate entfernt worden ist.

Kontrolltiere, die in der letzten Zeit die gleiche Nahrung wie die für die Experimente verwendeten Tiere erhalten hatten, zeigten in dem exokrinen Anteil der Bauchspeicheldrüse keine mit der Sulfidsilbermethode darstellbaren Substanzen.

Akute und chronische Vergiftungen mit verschiedenen Schwermetallsalzen wurden auch an *Hamstern* vorgenommen, wobei sich die gleichen Resultate wie bei Ratten erzielen ließen.

Es wurden außerdem *Meerschweinchen* mit Kobaltsulfat vergiftet. Die Tiere erhielten 3 Tage lang täglich 5 bzw. 10 mg Kobaltsulfat und wurden 2 bzw. 3 Tage nach der letzten Injektion getötet. Am exokrinen Drüsenanteil wird der gleiche histochemische Befund erhoben, wie er schon in früheren Versuchen bei

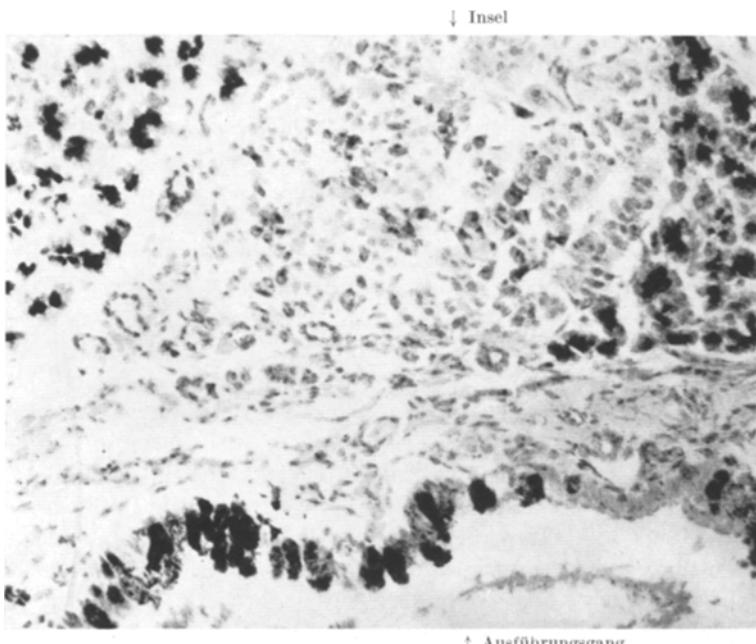


Abb. 7. Pankreas, Meerschweinchen, Kobaltsulfatvergiftung. Sulfidsilbermethode. 200 ×

Ratten erzielt werden konnte, d. h. Granula in den Lumina der Drüsenendstücke und Ausführungsgänge (VOIGT, BOG und WOLFF). In den Langerhansschen Inseln, in denen sich beim Meerschweinchen normalerweise nur einige wenige Körnchen erzeugen lassen, erzielt man mit der Sulfidsilbermethode eine feine, dichte, schwarze Granulierung eines Teiles der Inselzellen. Es handelt sich dabei vorwiegend um solche Zellen, die Capillaren anliegen. Außerdem sieht man, wie ein großer Teil der Epithelien der Ausführungsgänge mit schwarzen Granula vollgepfropft ist.

V. Diskussion

1. Welche funktionelle Aufgabe hat das Inselzink?

Das Fehlen des histochemisch nachweisbaren Zinks bei einigen Wiederkäuern ist bereits in früheren Veröffentlichungen hervorgehoben worden [TIMM und NETH, VOIGT (2, 10)]. Es war vermutet worden [VOIGT (2)], daß die Wiederkäuer vielleicht auf Grund einer anderen Stoffwechselregulierung das möglicherweise für eine *Insulinstapelung* erforderliche Zink nicht benötigen. Dies ist nach diesen neuen Untersuchungsbefunden aber unsicher geworden, da ja bei einigen Wiederkäuern

ein positiver Befund erhoben und sogar bei einem der 4 untersuchten Eichen etwas Metall in den Inselzellen nachgewiesen werden konnte.

Eine Anhäufung von Zink in den Langerhansschen Inseln ist für die *Insulinproduktion* offenbar nicht erforderlich. Dies läßt sich aus dem Ergebnis der Untersuchungen bei den angeführten Tieren zwanglos ableiten.

Damit ist allerdings noch nicht gesagt, ob dies auch beim Menschen der Fall ist. Für die Beantwortung dieser Frage scheint das hier zur Untersuchung gekommene Insulom eine besondere Bedeutung zu haben, in dessen Zellen sich bei der histochemischen Untersuchung keine Metalle nachweisen ließen. Diese Geschwulst spielt eine bedeutende Rolle bei der Insulinproduktion, wie sich aus dem klinischen Bild bei dem Patienten ergibt. Geht man davon aus, daß das Insulom selbst insulinproduzierend ist — sein hoher Insulingehalt spricht dafür (ESKELUND, SEIFERT) —, bedarf es also für die Insulinproduktion auch beim Menschen keiner Anhäufungen von Zink in den Inselzellen.

2. Können zinkarme Inselzellen Metalle aufnehmen?

Interessant war nun die Prüfung des Verhaltens der zinkarmen bzw. zinkfreien Langerhansschen Inseln z. B. beim Meerschweinchen nach Zufuhr von Zink bzw. anderen Metallen (Vergiftungen), wobei hier zunächst nur Kobalt geprüft wurde. Es zeigte sich [VOIGT (9)], daß das Zink in den Langerhansschen Inseln des Meerschweinchens gestapelt werden kann. Aber auch das Kobalt wandert in einen Teil der Inselzellen hinein. Dieser Befund verdient insofern eine besondere Beachtung, da VAN CAMPENHOUT und CORNELIS durch Kobaltchloridinjektionen eine Schädigung der A-Zellen der Langerhansschen Inseln herbeiführen konnten, die auch keine Hyperglykämie zur Folge hatte. (Die A-Zellen werden als nicht insulinproduzierend angesehen.) Leider läßt sich keine sichere Auskunft darüber geben, ob das Kobalt beim Meerschweinchen in den A-Zellen abgelagert wird, da eine sichere Differenzierungsfärbung für die A- und B-Zellen an den mit der Sulfidsilbermethode behandelten Präparaten bislang nicht möglich ist.

Verwiesen sei in diesem Zusammenhang auf früher erhobene Befunde bei experimentellen Kobaltvergiftungen an der Ratte (VOIGT, BOG und WOLFF), wobei sich die Anwesenheit von Kobalt in den besonders lokalisierten A-Zellen auf Grund der vorgenommenen Lösungsversuche vermuten ließ.

Nach dem Ergebnis dieser Experimente muß es also in den Langerhansschen Inseln des Meerschweinchens eine Substanz geben, die Zink und Kobalt binden kann.

Auffallenderweise werden unter physiologischen Bedingungen, d. h. ohne forcierte Metallzufuhr (Vergiftungen), nur ganz geringe Metallmengen deponiert. Ob das Meerschweinchen eventuell über einen besonderen Mechanismus für die rasche Ausscheidung der mit der Nahrung normal zugeführten Metalle (speziell Zink) verfügt oder ob andere Faktoren hierfür verantwortlich sind, bedarf weiterer Untersuchungen. Auch ist bislang nicht geprüft worden, ob nach der Zinkvergiftung eine Veränderung des Blutzuckergehaltes eintritt.

3. Regressive Veränderungen des Inselgewebes

Das Auftreten von säulen- oder bandförmigen Formationen, von kleineren Inselzellanhäufungen und von Einzelzellen außerhalb der zum insulären oder

extrainsulären Apparat gehörigen Inselzellen ist nicht pathognomonisch für den Diabetes mellitus. Derartige Bildungen lassen sich sehr häufig isoliert liegend in bindegewebigen, sklerotischen Bezirken beobachten, mitunter sind sie auch von reichlich Fettgewebe umgeben, und manchmal sieht man auch kleine Inselzellkomplexe in Verbindung mit Ausführungsgängen. Solche Inselzellanhäufungen werden vorwiegend als regenerative Veränderung aufgefaßt [WEICHSELBAUM, KRAUS, SSOBOLEW, CECIL (1, 2), SEIFERT u. a.]. Nach Untersuchungen FERNERS (1) sollen sie aus A-Zellen bestehen, die von ihm als nicht insulinproduzierend angesehen werden.

Vergleicht man das tierische mit dem menschlichen Pankreas, so fällt grundsätzlich auf, daß beim Tier offenbar keine sklerotischen oder nekrotischen Veränderungen wie beim Menschen vorkommen; sie werden jedenfalls in dem vorliegenden normalen Tiermaterial niemals beobachtet. Auch morphologisch abnorme Inselzellanhäufungen können bei Tieren nicht gesehen werden.

Dies spricht dafür, daß das Auftreten jener besonderen Inselzellkonglomerate beim Menschen mit sklerotischen Veränderungen parallel geht oder sogar von diesen bedingt ist. Jene abnormen Inselzellanhäufungen finden sich aber auch bereits bei jüngeren Menschen. Zu den erwähnten Inselzellkonglomeraten gehören aber auch die band- oder säulenförmigen Inseln, die SEIFERT besonders als Regenerate vom Gangapparat her anspricht. In dem hier zur Untersuchung gekommenen Material konnte niemals ein sicherer direkter Zusammenhang dieser Bildungen mit den Zellen der Ausführungsgänge beobachtet werden, auch nicht in Serienschnitten. Achtet man weiterhin auf die in der Nähe befindlichen Gänge, so fällt immer wieder ihre cystische Erweiterung, teilweise vielleicht sogar mit intracanaliculären Einstülpungen, auf. Das Epithel ist teils flach, atrophisch, teils kubisch, teils aber auch zylindrisch, und mitunter sieht man auch ein mehrschichtiges Epithel.

Vergleicht man diese Bilder mit den Befunden EEDERS nach Verschluß des Pankreasgangs durch Pankreaskopfcarcinom, so ist die Gleichartigkeit der Morphologie überraschend. Auch hier sind bandartige Inseln sowie kleinere Inselzellkomplexe in bindegewebigen Bezirken zu beobachten, die nach EDER auf Verformung bereits vorhandener Inseln durch Druck- und Zugwirkung durch das Bindegewebe zurückzuführen sind. Durch Fibrose kann es zu einer Zerlegung von Inseln durch bandartige Septen kommen, wobei dann auch ein weiterer Inselzellschwund einsetzen kann. Schließlich hebt auch EDER in den Beschreibungen seiner Präparate das Vorliegen von cystischen Erweiterungen der Ausführungsgänge hervor. Bei einem Verschluß des Pankreasgangs durch einen Tumor kommt es natürlich zum Auftreten der beschriebenen morphologischen Veränderungen in weiten Teilen der Drüse, während in den zur Untersuchung vorliegenden Präparaten stets nur kleine, umschriebene derartige Bezirke beobachtet werden.

Bei Veränderungen als Folge eines groben sichtbaren Verschlusses des Pankreasgangs sowie in kleineren sklerotischen Bezirken findet man im Bindegewebe außer vielleicht einigen Lymphocyten, Plasmazellen und versorgenden Blutgefäßen stets nur Gänge und Inselgewebe, nicht aber Acinusgewebe. Dies läßt darauf schließen, daß die Gänge und Inselzellen außerordentlich widerstandsfähig sind.

Damit ist aber bereits zum Ausdruck gebracht, daß man bei einer kritischen Durchsicht der Präparate nicht recht daran glauben kann, daß die Inselzellkonglomerate in sklerotischen Bezirken überwiegend Regenerate darstellen. Dies ergibt sich besonders, wenn man die mit der Sulfidsilbermethode behandelten Präparate betrachtet. Man sieht sehr oft in der unmittelbaren Umgebung von

kleineren Inselzellhaufen in dem umgebenden Bindegewebe das Auftreten von Silbergranula, die die Anwesenheit von Zink markieren. Diese Granula verlieren sich allmählich mit zunehmender Entfernung von den verbliebenen Inselzellen. Wie schon früher betont, wurden nicht ein einziges Mal in dem umgebenden Bindegewebe normalgestalteter Langerhansscher Inseln Granula beobachtet.

Das Vorhandensein von Zink in der unmittelbaren Umgebung von solchen kleinen Inselzellverbänden deutet recht sicher darauf hin, daß es sich hierbei um das „chemische Überbleibsel“ zugrunde gegangener Inselzellen handelt. Damit wären also die beschriebenen Inselzellverbände in bindegewebigen Bezirken in erster Linie als Reste zugrunde gehender Inseln anzusehen.

Das Auftreten von solchen Granulaanhäufungen konnte auch *in nekrotischen Bezirken* festgestellt werden und kann ebenfalls als ein chemischer Rest von zugrunde gegangenen Inseln gedeutet werden.

Das Sulfidsilberbild zeigt in den *hyalinen Bezirken* meist eine schwache, diffuse Gelbfärbung und manchmal das Auftreten von Granula. Dies ist bei der Fibrose der Inseln nicht der Fall, d. h., die Bindegewebfasern zeigen keinen Versilberungseffekt. Das Metall im Hyalin dürfte aus Inselzellen stammen. Geht man davon aus, so spricht dies für einen Ersatz untergegangenen Inselgewebes durch Hyalin. Das Zink kann hier also ebenfalls als ein chemisches Überbleibsel von Inselzellen angesehen werden, in ähnlicher Weise wie in der Umgebung von Inselfragmenten der sklerotischen Bezirke. Die Hyalinbildung geht hiernach mit einer Inselzellerstörung einher und dürfte somit eine schwerere Form der Inselschädigung sein als die Inselfibrose. Auch MOSCHCOWITZ glaubt bei der Hyalinose an eine Zerstörung der Inselzellen, die von den Capillarwänden ausgeht (vgl. auch WARREN und LE COMpte). Vielfach ist die Inselfibrose ein Vorläufer der Hyalinose (WEICHSELBAUM und MOSCHCOWITZ).

4. Progressive Veränderungen des Inselgewebes

Insuläres Gangorgan. Für die Inselregeneration wird dem insulären Gangorgan (Inselzellen in Gängen und Acini) [FEYRTER (1, 2)] eine besondere Bedeutung beigemessen. Die Befunde an den mit der Sulfidsilbermethode behandelten Präparaten tierischer Bauchspeicheldrüsen zeigen bei den verschiedenen Species eine recht unterschiedliche Ausbildung des extrainsulären Anteils des Inselorgans. Bei den bereits genannten Tieren ohne histochemisch nachweisbares Zink kann man die extrainsulär gelegenen Inselzellen natürlich mit der Sulfidsilbermethode nicht darstellen.

Auffallend viele derartige Zellen haben Katze und Pferd, während z. B. Hund, Schwein, Igel und Rentier einen nur wenig ausgebildeten extrainsulären Inselapparat aufweisen [VOIGT (10)]. Katze und Pferd sind in dem untersuchten Material auch die einzigen Tiere, bei denen in der unmittelbaren Umgebung der Ausführungsgänge kleine Inselzellhaufen gefunden werden. Bei Fischen gibt es keinen extrainsulären Inselapparat.

Als beweisend für das Vorliegen von Regenerationsprozessen im menschlichen Pankreas werden besonders kleine Inselzellkomplexe an der Außenseite von Gängen angesehen, die von eingesprengten Inselzellen im Gangepithel (insuläres Gangorgan) ihren Ausgang nehmen sollen. Diese Inselzellkonglomerate sind meist klein, umhüllen manchmal als ein dünner Mantel den gesamten Gang, oder sie

liegen nur an einer Seite. Mitunter sieht man sie auch zwischen mehrschichtigen Epithelien cystisch erweiterter Gänge.

Es ist in solchen Fällen natürlich stets schwierig, eine sichere Entscheidung darüber zu treffen, ob es sich um Neubildungen oder den Rest zugrunde gegangener Inseln handelt. Und wenn man das Bild einer cystischen Pankreasfibrose sieht, wird man skeptisch, ob es überhaupt eine solche Regeneration gibt: Bei dieser Erkrankung beherrschen Inselzellkomplexe das Bild, die man auf Grund ihrer Lagerung sicher als Regenerate deuten würde. Sollte es bei einem solchen destruierenden Vorgang, wie bei der cystischen Pankreasfibrose, wirklich zu einer Neubildung von Inselgewebe in größerem Umfang kommen?

Acino-insuläre Transformation. Das Auftreten von acino-insulären Transformationen ist von SEIFERT kürzlich wieder bejaht, von FERNER (2) dagegen abgelehnt worden. Sichere Anhaltspunkte für das Existieren solcher Umbildungen haben auch in den vorliegenden Präparaten nicht gewonnen werden können. Wohl aber sieht man manchmal bei großen Inselzellkomplexen ein direktes Angrenzen von Inselgewebe an Acinusepithel. Ob es sich dabei um eine echte Transformation handelt, eine Absprößung von in das Acinusepithel eingesprengten Inselzellen oder eine bereits primär in dieser Weise vorliegende Lagerung der verschiedenen Zellanteile, kann nicht entschieden werden. Auffallend ist jedenfalls, daß eine trennende Bindegewebsslage fehlt; doch hat gerade dies öfter im Blickpunkt der Erörterungen gestanden (WARREN und LE COMPTÉ).

Eine besondere Erwähnung müssen in diesem Zusammenhang auch die „pseudoinsulären Zellhaufen“ finden. Diese werden von FERNER (1) als Gruppen von Drüsengeweben angesehen, wobei die Inselform allein nicht ausreichend sei, den endokrinen Charakter dieser Bildungen anzunehmen.

Mit der Sulfidsilbermethode lassen sich in diesen Zellen im Gegensatz zu den Epithelien der Drüsengeweben schwarze Granula in einer besonderen Lagerung darstellen. Doch kann man auch daraus keinen Schluß ziehen, welchem Pankreasanteil diese Bildungen zuzuordnen sind.

5. Das Sulfidsilberbild der Langerhansschen Inseln beim Diabetes mellitus

Jugendlicher Diabetes. Wie im pathologisch-anatomischen Sektionsgut üblich, kamen vorwiegend Fälle von Altersdiabetes zur Untersuchung und nur 7 Fälle können zum jugendlichen Diabetes gerechnet werden (Altersgrenze: 30 Jahre). Darunter befindet sich 1 Fall, bei dem die Krankheit erst im 31. Lebensjahr entdeckt wurde, jedoch vermutlich schon längere Zeit bestanden hatte.

Unter diesen Fällen fanden sich 2 bei denen kein histochemischer Unterschied im Zinkgehalt der Inseln beobachtet werden konnte. Beide Fälle wurden klinisch eigentümlicherweise als mit Insulin schwer einstellbar bezeichnet, was bei den anderen 5 Fällen nach klinischen Angaben nicht vorlag. Bei letzteren sind die histochemischen Unterschiede gegenüber der Norm deutlich.

Altersdiabetes. Zum Altersdiabetes können 30 Fälle gerechnet werden. Darunter zeigten sich 3 ohne eine Verminderung des Zinkgehaltes der Inselzellen. Bei 18 Fällen war die histochemisch nachgewiesene Veränderung deutlich. Bei weiteren 9 Fällen sind sie gering, so daß man vielleicht daran zweifeln kann, ob wirklich eine Verminderung des Zinkgehaltes vorliegt.

Letzteres ergibt sich aus folgendem: Die mikroskopisch sichere Differenzierung der eingangs dargestellten (S. 297) verschiedenen Inselformen ist mitunter schwieriger, als dies den Anschein haben mag. Dies gilt besonders für solche Inseln, die aus „braunen mit einigen schwarzen“ und „gelben mit einigen schwarzen“ Zellen bestehend registriert wurden. Es wurde vielfach kontrolliert, ob auch wirklich keine Granula in den gelben Inselzellen zu sehen sind, d. h. ob die dem Farbeffekt sicherlich zugrunde liegenden feinsten Einzelkörner sich in ihrer Größe unterhalb des optischen Auflösungsvermögens des Mikroskops befinden. Diese Schwierigkeit muß man bei der endgültigen Beurteilung mit berücksichtigen.

Dauer der Zuckerkrankheit und Verminderung des Inselzinks. Ein Zusammenhang zwischen der Dauer der Erkrankung und der Zinkverminderung läßt sich nicht nachweisen: Auf der einen Seite brauchen langjährige Patienten (z. B. 78jähriger Mann mit Diabetes seit 28 Jahren) keine Verminderung des Inselzinks zu haben, wenngleich dies auch möglich sein kann (59jähriger Mann mit Diabetes seit 15 Jahren). Auf der anderen Seite können auch nur kurze Zeit kranke Diabetiker einen normalen Zinkgehalt des Inselapparates zeigen (81jähriger Mann, Diabetes seit 1 Jahr), oder das Zink kann vermindert sein (33jähriger, Diabetes angeblich nur seit $1\frac{1}{2}$ Jahren). Es ist jedoch schwierig, sichere anamnestische Angaben über die Dauer der Erkrankung zu erhalten.

Nicht insulinbehandelter Diabetes. Im handelsüblichen Insulin befindet sich stets Zink, das zur Kristallisation des Insulins benutzt wird. Wie bereits geschildert, wandert das Zink nach dem Ergebnis der Versuche am Meerschweinchen in die Langerhansschen Inseln, in denen normalerweise bei diesem Tier nur geringste Metallmengen enthalten sind.

Danach kann es möglich sein, daß auch das mit dem Insulin beim Menschen injizierte Zink eventuell in den Inselzellen wiedergefunden wird und damit das histochemische Bild verändert.

In der Untersuchungsreihe stehen 9 Diabetesfälle zur Verfügung, bei denen keine Insulinbehandlung vorgenommen worden ist. Bei 5 dieser Fälle waren die histochemischen Veränderungen sehr gering, bei 4 Fällen stark ausgeprägt.

Koma. Bei 3 Patienten erfolgte der Tod im diabetischen bzw. Insulin-Koma. Besonderheiten des Sulfidsilberbildes gegenüber dem bei anderen Diabetesfällen ließen sich nicht feststellen.

Spontandiabetes beim Hund. Vergleicht man die Ergebnisse beim Menschen mit denen am Pankreas des spontandiabetischen Hundes, so zeigt sich eine auffallende Übereinstimmung. Ja, beim Tier sieht man sogar noch deutlicher eine Verminderung des histochemisch nachweisbaren Zinks. Außer einer geringeren Anzahl zinkhaltiger ist der größte Teil der Inselzellen frei von histochemisch faßbaren Metallen. Dies geht mit ausgeprägten morphologischen Veränderungen parallel. Die Langerhansschen Inseln sind klein, atrophisch und verzerrt. Die Inselzellen zeigen das klassische Bild einer hydropischen Degeneration (WEICHSELBAUM), was schon von HJÄRRE hervorgehoben worden ist. Diese Form der morphologischen Inselzellveränderung wird nach TORESON und THEODOSSIÖU durch eine Glykogenspeicherung in den B-Zellen bewirkt.

Das Fehlen des Zinks läßt sich jedoch nicht nur in hydropischen Inselzellen beobachten, sondern auch in gestaltlich normalen Zellen.

Auffallend ist auch beim diabetischen Hund wie bei allen untersuchten Tieren das Fehlen von sklerotischen Veränderungen an den Arterien. Inselzellhaufen besonders in der Umgebung von Gängen (insuläres Gangorgan) vermißt man

beim normalen und diabetischen Hund. Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß der Hund sehr wenige dem extrainsulären Apparat zuzurechnende Inselzellen in den Ausführungsgängen und den Acini besitzt.

Beim spontandiabetischen Hund fallen die fast cystischen Erweiterungen an den Gängen auf. LAZARUS und BENCOSME konnten ähnliches am Pankreas des cortisondiabetischen Kaninchens beobachten und vermuten, daß die Veränderung in diesem Falle entweder durch eine Obstruktion des Gangapparates oder durch eine direkte Einwirkung des Cortisons auf das Gangepithel hervorgerufen werde.

Sulfidsilberbild der Inseln und Diabetesdiagnostik. Überblickt man die Untersuchungsergebnisse am Pankreas des diabetischen Menschen und beim Hund in ihrer Gesamtheit, so ist die Veränderung des histochemischen Bildes gegenüber dem normalen deutlich. Das Ergebnis erweitert die bereits früher an einem kleineren Material erhobenen Befunde [VOIGT (3)], die SEIFERT durch Untersuchungen mit der Dithizonmethode nach McNARY bestätigen konnte.

Die Verminderung des histochemisch nachweisbaren Inselzinks ist, statistisch gesehen, als Veränderung beim Diabetes mellitus auffallend — damit ist aber bei der Untersuchung des Einzelfalles nicht gedient, da es sich nicht um ein konstantes Phänomen der Zuckerkrankheit handelt.

Sonach kann man die Sulfidsilbermethode zur Reihe der Verfahren rechnen, von denen man sich leider vergeblich eine sichere Hilfe bei der Diagnostik des Diabetes mellitus erhofft hatte, wie z. B. die Methoden zur Differenzierung der A- und B-Zellen (CREUTZFELD und THEODOSSIÖU).

Beurteilt man den Wert eines Untersuchungsverfahrens nach diesem Gesichtspunkt, so sinkt er für die Sulfidsilbermethode noch mehr ab, nachdem jetzt der Nachweis gebracht werden konnte, daß auch beim nichtdiabetischen Kranken ein Schwund des Inselzinks vorliegen kann, in dem untersuchten Material bei 5 Sepsisfällen.

Verminderung des Inselzinks — Diabetesursache? Der Spontandiabetes und der experimentelle Diabetes des Tieres unterscheiden sich insofern voneinander, als das Zink bei letzterem nicht aus den Inselzellen verschwindet, wie dies ursprünglich auf Grund von Untersuchungsergebnissen mit der Dithizoninjektionsmethode beim Alloxandiabetes angenommen worden war (WOLFF, MASKE u. a.). Auch beim Cortisondiabetes konnte keine Veränderung des Zinkgehaltes der Inseln festgestellt werden. Das gleiche gilt nach Glucosebelastung (vgl. WOLFF, RINGLEB und AMANN), BAL-Behandlung, Hypophysektomie und Behandlung mit Hypophysenvorderlappenhormon, bei denen sämtlich kein Diabetes folgte.

Nimmt man an, daß dem Diabetes eine mangelnde Insulinproduktion zugrunde liegt, so kann beim tierischen Alloxan- und Cortisondiabetes kein Zinkmangel für die Auslösung der Erkrankung — d. h. für die Insulinunterproduktion — verantwortlich sein. Auch beim menschlichen Spontandiabetes ist das unwahrscheinlich, da ja die Insulinproduktion auch ohne Anwesenheit von Zink vonstatten gehen kann, wie sich aus der Untersuchung des Insuloms ergab (sofern dieser Tumor selbst insulinproduzierend ist und nicht etwa nur die Insulinproduktion stimuliert). Dies alles spricht dafür, daß der nachgewiesene Zinkmangel in den Inselzellen des Diabetikers lediglich sekundär im Rahmen einer chemischen Veränderung auftritt, die vielleicht (auch) an der für die Inselfunktion wichtigeren Bindesubstanz für das Zink ansetzt.

Erkennt man einen Zinkmangel als den Ausdruck einer Funktionsänderung der Inselzellen an, so konnte also der Nachweis erbracht werden, daß dies auch bei septischen Erkrankungen auftreten kann.

Das Sulfidsilberbild der Arterienwandung. Bei der Untersuchung der Arterien im Pankreas zeigte sich bei dem menschlichen, nicht dagegen bei dem tierischen Material nach Anwendung der Sulfidsilbermethode das Auftreten von schwarzen Granula, die in der Media gelegen sind. Lösungsversuche (s. S. 297) und die Ergebnisse mit der Magnesiumdithizonatmethode (Rottfärbung) deuten darauf hin, daß es sich um Zink handelt. Diese Einlagerungen fanden sich ausschließlich im Diabetikerpankreas bei 12 von 37 Fällen. Derartige Einlagerungen wurden schon früher in Nierenarterien beim Diabetiker beschrieben [VOIGT (7)], sie konnten aber auch beim Vorliegen einer Retinopathia diabetica in den Ciliararterien beobachtet werden (VOIGT, unveröff.). In dem vorliegenden Material waren die jüngsten Patienten 28 und 29 Jahre (Fall 1 und 2) alt.

Diesen Veränderungen wird man einen erheblichen Beweiswert für die Diabetesdiagnostik zuschreiben können. Sie stehen nicht in Zusammenhang mit der Insulinmedikation, nachdem auch nicht mit Insulin Behandelte betroffen waren.

Gleichzeitig mit diesen Metalleinlagerungen (8 Fälle), aber auch unabhängig davon (11 Fälle), kann eine Mediaverkalkung vorhanden sein, wie dies schon früher an den Nierenarterien bei Diabetikern beobachtet wurde [VOIGT (4, 6)]. Insgesamt fanden sich also bei 19 von 37 Diabetesfällen derartige Verkalkungen. Diese sind offenbar nicht altersbedingt. Mediaverkalkungen in den Arterien im Pankreas sind allerdings nicht für den Diabetes mellitus spezifisch, sondern sie wurden auch bei einem Nichtdiabetiker gefunden.

Diese Befunde sind auffallend, zumal GRUBER in seinem Material niemals Verkalkungen der Arterien des Pankreas beobachten konnte. Diese beschriebenen vermutlichen Zink- und die Kalkeinlagerungen deuten darauf hin, daß es sich hier um eine besondere Art von Arteriosklerose handelt, da sich bei einer „gewöhnlichen“ Arteriosklerose Blei und nicht Zink in den verkalkten Partien nachweisen läßt (KRATZSCH) und weiterhin dabei nicht die feinen Organarterien wie in Niere und Pankreas betroffen sind. Dies zeigt sich auch bei der Durchsicht des vorliegenden Untersuchungsmaterials von Nichtdiabetikern.

Die Metall- und Kalkeinlagerungen sind auch schon in den Arterienwänden bei Fällen von jugendlichem Diabetes zu sehen, bei denen MOSCHCOWITZ keine morphologischen Gefäßveränderungen feststellen konnte.

Vergleicht man das Auftreten von Inselveränderungen (Fibrose, Hyalinose) mit dem von Zink- und Calciumeinlagerungen in der Arterienmedia, so ergibt sich folgendes Bild:

Sieben von 12 Fällen mit Inselhyalinose zeigen Metalleinlagerungen in der Arterienmedia, und nur bei einem einzigen Hyalinosefall fehlten Calciumeinlagerungen in der Media. Bei 3 weiteren Fällen von Inselfibrose konnte eine Mediaverkalkung festgestellt werden. Bei 6 Nichtdiabetikern mit Inselfibrose bestand keine Mediaverkalkung.

Auf einen Zusammenhang zwischen den genannten Insel- und Gefäßveränderungen (Sklerose) hat bereits früher MOSCHCOWITZ hingewiesen, allerdings konnte er das ausschließlich bloß beim Altersdiabetes konstatieren. Unter 52 Fällen fand er nur einen Ausnahmefall mit Hyalinose ohne Arteriosklerose.

Über die Ursache der Verkalkung und Metalleinlagerung in der Arterienmedia im Pankreas läßt sich nichts aussagen. Eine einfache Einwanderung des Zinks vom Blut her dürfte kaum in Betracht kommen, da der Serum-Zinkgehalt beim Diabetiker nicht verändert ist.

6. Das Sulfidsilberbild des exokrinen Pankreasanteiles

Im Pankreas des gesunden und kranken Menschen konnten manchmal in den Lumina der Gänge und Drüseneindstücke, aber auch in dem nach dem Lumen zu gelegenen Plasmaanteil der Drüseneindstück-Epithelien schwarze Granula beobachtet werden. Auf Grund der Lagerung dieser Substanzen ist es naheliegend, an das Bild eines Ausscheidungsprozesses zu denken. Auffallenderweise sind stets nur umschriebene Bezirke betroffen und nicht das gesamte Pankreas.

Bei Tieren konnten recht oft ähnliche Bilder gesehen werden. Beim Igel fanden sich solche Körnchen in sämtlichen Acini. Außerdem lassen sich manchmal in den Epithelien der Ausführungsgänge feine schwarze Granula bei Anwendung der Sulfidsilbermethode erzeugen, die im Plasma in einer Zone zwischen dem Kern und der nach dem Lumen zu gerichteten Zellgrenze gelegen sind. Sie finden sich z. B. bei Fischen oder bei Hunden. Die diesem Effekt zugrunde liegende Substanz ist unbekannt, ebenfalls die funktionelle Aufgabe.

7. Die Lagerung der Metalle bei experimentellen Metallvergiftungen

Frühere experimentelle Untersuchungen unter Zuhilfenahme der Sulfidsilbermethode haben bereits gezeigt, daß das Pankreas wahrscheinlich eine Bedeutung für die Ausscheidung von metallischen Giften hat. Dies ist besonders für Zink [VOIGT (8)], Arsen, Kobalt und Nickel (VOIGT, BOG und WOLF) auf Grund der mit der Sulfidsilbermethode und der Magnesiumdithizonatmethode getroffenen Feststellungen vermutet worden.

Um einen Überblick darüber zu bekommen, ob auch andere Metallgifte als die bereits genannten im Pankreas erscheinen und eventuell ausgeschieden werden, wurden Ratten, aber auch Hamster mit verschiedenen Metallsalzen vergiftet und das Pankreas unter Anwendung der Sulfidsilbermethode untersucht. Bei der Ratte lassen sich normalerweise im exokrinen Pankreasanteil histochemisch keine Metallanhäufungen nachweisen. Nach Vergiftungen mit Quecksilber-, Kupfer-, Arsen-, Uran-, Zink-, Thallium-, Cadmium- und Bleisalzen fanden sich konstant in den Lumina der Drüseneindstücke und im Plasma der Acinusepithelien in Lumennähe schwarze Granula, die nur bei der Kupfer- und Thalliumsalzvergiftung etwas spärlicher vorhanden waren. Aus der Lagerung der Granula, besonders in den Lumina der Ausführungsgänge, kann man wohl schließen, daß hier das Augenblicksbild eines Ausscheidungsprozesses in Richtung Darm erfaßt wird.

Unter Verwendung radioaktiver Isotope ist man bereits früher zu dem gleichen Resultat bezüglich Zink und Kobalt gekommen (MONTGOMERY, SHELINE und CHAIKOFF; COMAR und DAVIS; COMAR, DAVIS und TAYLOR).

Zusammenfassung

1. Mit der Sulfidsilbermethode lassen sich beim Menschen die Zellen der Langerhansschen Inseln und des extrainsulären Inselorganes auf Grund ihres hohen Zinkgehaltes selektiv darstellen. Bei menschlichen *Feten* tritt bereits bei

dem kleinsten der untersuchten Exemplare (8 cm) das Zink in den Inselzellen in Erscheinung. Bei einer Körperlänge von etwas 15 cm beobachtet man 2 verschiedene Inselzelltypen: solche mit einem größeren und solche mit einem geringeren Metallgehalt. Der Unterschied verschwindet mit zunehmender Entwicklung und ist beim reifen, gesunden Neugeborenen nur noch schwer festzustellen.

2. Bei gesunden Erwachsenen sieht man in allen Inselzellen als Zeichen eines erheblichen Metallgehaltes nach Anwendung der Sulfidsilbermethode eine dichte schwarze Granulierung.

3. Beim Diabetiker, aber auch bei einigen *Sepsisfällen* (Nichtdiabetiker) wurde histochemisch eine Verminderung des Inselzinks nachgewiesen, die jedoch nicht konstant bei jedem Falle auftritt und in ihrem Schweregrad nicht in Abhängigkeit zum klinischen Erscheinungsbild der Zuckerkrankheit steht.

4. Bei einem Teil der Diabetiker wurde in der Media der *Pankreasarterien* eine Metallanhäufung (wahrscheinlich Zink) beobachtet. Außerdem konnte sehr häufig gleichzeitig oder für sich allein eine Mediaverkalkung nachgewiesen werden, die außer bei Diabetikern auch bei einem Nichtdiabetiker beobachtet werden konnte. Es besteht höchstwahrscheinlich eine Beziehung zwischen diesen Gefäßveränderungen und der Inselhyalinose.

5. In der Umgebung von Inselfragmenten in *bindegewebigen Bezirken* lassen sich häufig mit der Sulfidsilbermethode Granula nachweisen, die als chemischer Rest von zugrunde gegangenem Inselgewebe gedeutet werden.

6. In einem *Insulom* (Patient mit Hypoglykämie) konnte histochemisch kein Zink nachgewiesen werden.

7. Es wird das Sulfidsilberbild bei einer Reihe von *Tieren* beschrieben. Bei Fischen treten 2 verschiedene Inselzellarten auf: Solche mit und solche ohne Metallanreicherungen. Bei Rind, Wisent, Elch (mit einer Ausnahme unter 4 Exemplaren) und dem Schaf sowie beim Meerschweinchen konnte keine Zinkanhäufung in den Inselzellen festgestellt werden. Bei Reh, Rentier und Ziege konnten dagegen Metallanhäufungen in den Inselzellen histochemisch dargestellt werden.

8. Beim *spontandiabetischen Hund* ist in den morphologisch hochgradig veränderten Inseln nur in geringsten Mengen Zink vorhanden. Die meisten Inselzellen sind jedoch frei von Metallen.

9. Mit *Alloxan*, *Cortison*, *BAL*, nach *Glucosebelastung*, *Hypophysektomie* und *Behandlung mit Hypophysenvorderlappenhormon* konnte in Tierversuchen keine Veränderung des Sulfidsilberbildes gegenüber der Norm erzeugt werden.

10. Die Aufgabe des Inselzinks ist ungeklärt. Es dürfte keine Bedeutung für die Insulinproduktion haben.

11. Ratten, Hamster und Meerschweinchen wurden mit einer Reihe von Schwermetallsalzen *vergiftet*. Die Untersuchungen zeigten, daß die Bauchspeicheldrüse wahrscheinlich eine erhebliche Funktion für die Ausscheidung metallischer Gifte hat, die durch den Pankreasgang in den Darm hineingelangen. Ein Teil der sonst von Metallanhäufungen freien Inselzellen des Meerschweinchenpankreas nahm bei Vergiftungen mit Zink- und Kobaltsalzen Metalle auf.

Summary

1. The cells of the human islets of Langerhans and the "extra insulin" islet tissues are selectively demonstrable with the sulfide silver method because of their high zinc content. Even in the smallest human fetuses studied here (8 cm), zinc was found in the islet cells. In fetuses of about 15 cm length, one encounters two different islet cell types: those with a greater and those with a lesser zinc content. This difference disappears with increasing development, and in mature healthy newborns it is difficult to make out.
2. Using this sulfide silver method, one sees as evidence of the considerable metal content a compact black granulation of all of the islet cells in healthy adults.
3. Both in diabetic and non-diabetic patients (cases of sepsis) a decrease in the islet cell zinc content was shown histochemically. However, this reduction was not constant in every case, and its degree of severity was not related to the clinical manifestations of the diabetes mellitus.
4. In a number of the diabetics a deposition of metal (probably zinc) was observed in the media of the pancreatic artery. Existing either simultaneously or alone, a medial calcification could also be demonstrated very frequently, not only in diabetics, but also in one non-diabetic. Undoubtedly there is a relationship between these vessel changes and the hyalinization of the pancreatic islets.
5. With the sulfide silver method granules could be demonstrated in the connective tissue surrounding the remnants of islets. These granules are interpreted as the chemical remains of destroyed islet tissue.
6. No zinc could be detected histochemically in an islet-cell adenoma (patient with hypoglycemia).
7. The findings in several different animals using the silver sulfide technic are described. In fishes two types of islet cells are seen: those with and those without metal deposits. In cows, bison, and elk (except in one of four), as well as in sheep and guinea pigs accumulations of zinc could not be demonstrated in the islet cells. Contrarily, in deer, reindeer, and in goats metallic deposits could be shown histochemically in the islet cells.
8. In spontaneously developing diabetes in the dog zinc is present only in the smallest amounts in the morphologically severely altered islets. However, most of the islet cells are free from metals.
9. In animal experiments with alloxan, cortisone, BAL, and after glucose loading, after hypophysectomy, and after treatment with anterior pituitary hormone no changes could be produced in the silver sulfide picture—the normal being used for comparison.
10. The purpose of the islet zinc remains unclarified. It most likely is not important in the production of insulin.
11. Rats, hamsters, and guinea pigs were poisoned with various heavy metal salts. The studies revealed that the pancreas most probably plays an important rôle in the elimination of metallic poisons, these being excreted into the intestine by way of the pancreatic duct. Some of the otherwise zinc-free islet cells in the guinea pig took up metals both in zinc and cobalt salt poisoning.

Literatur

- CAMPENHOUT, E. VAN, et G. CORNELIS: Destruction expérimentale des cellules alpha des îlots endocrines du pancréas chez le cobaye. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **145**, 933 (1951). — CECIL, R. L.: (1) A study of the pathol. anat. of the pancreas in 90 cases of Diabetes mellitus. *J. exp. Med.* **11**, 266 (1909). — (2) Hyalin degeneration of the islands of Langerhans in non-diab. condition. *Amer. J. med. Sci.* **147**, 726 (1914). — COMAR, C. L., and G. K. DAVIS: Cobalt metabolism studies. IV. Tissue distribution of radioactive Cobalt administered to rabbits, swine, and young calves. *J. biol. Chem.* **170**, 379 (1947). — COMAR, C. L., K. G. DAVIS and R. F. TAYLOR: Cobalt metabolism studies: Radioactive Cobalt procedures with rats and cattle. *Arch. Biochem.* **9**, 149 (1946). — CREUTZFIELDT, W., u. A. THEODOSSIU: Die Relation der A- und B-Zellen in den Pankreas-Inseln bei Nichtdiabetikern und Diabetikern. *Beitr. path. Anat.* **117**, 235 (1957). — EDER, M.: Regressive und progressive Veränderungen der Langerhansschen Inseln. *Beitr. path. Anat.* **115**, 157 (1955). — FERNER, H.: (1) Das Inselsystem des Pankreas. Stuttgart: Georg Thieme 1952. — (2) Diskussionsbemerkung. *Verh. dtsch. Ges. für Pathol.*, Wien, 1958. — FEYTER, F.: (1) Über das Inselorgan. *Anat. Anz.* **88**, Erg.-H., 97 (1939). — (2) Über das Inselorgan des Menschen. *Ergebn. allg. Path. path. Anat.* **36**, 3 (1943). — GRUBER, G. B.: Pathologie der Bauchspeicheldrüse. In HENKE-LUBARSCH, Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie, Bd. 5/II, S. 211. Berlin: Springer 1929. — HJÄRRE, A.: Sektionsbefund beim Diabetes mellitus des Hundes und der Hatze. *Arch. wiss. prakt. Tierheilk.* **57**, 1 (1928). — KEILIN, D., and T. MANN: (1) Carbonic Anhydrase. *Nature (Lond.)* **144**, 442 (1934). — (2) Carbonic anhydrase, purification and nature of the enzyme. *Biochem. J.* **34**, 1163 (1940). — KRATZSCH, H.: Der histochemische Nachweis des „normalen“ Bleies in verkalkten menschlichen Arterien. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **28**, 455 (1937). — KRAUS, E. J., u. A. WEICHSELBAUM: Die pathologisch-anatomischen Veränderungen des Pankreas beim Diabetes mellitus. In HENKE-LUBARSCH, Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie, Bd. 5/II, S. 522. Berlin: Springer 1929. — LAZARUS, S. S., and S. A. BENCOSME: Development and regression of cortisoninduced lesions in rabbit pancreas. *Amer. J. Clin. Path.* **26**, 1146 (1956). — LIESEGANG, R. E.: (1) Die Kolloidchemie der histologischen Silberfärbung. *Kolloidchem. Beih.* **3**, 3 (1911). — (2) Histologische Versilberungen. *Z. wiss. Mikr.* **45**, 273 (1928). — LIESEGANG, R. E., u. W. RIEDER: (3) Versuche mit einer Keimmethode zum Nachweis von Silber in Gewebsschnitten. *Z. wiss. Mikr.* **38**, 334 (1921). — LÜPPO-CRAMER: In J. M. EEDERS Handbuch der Photographie, 3. Aufl., Bd. 2, S. 1. Halle 1927. — MASKE, H., H. WOLFF, B. STAMPFL u. F. BAUMGARTEN: Beobachtungen über den Zinkstoffwechsel bei Alloxandiabetes. *Klin. Wschr.* **29**, 671 (1951). — McNARY, W. F.: Zinc-dithizone reaction of pancreatic islets. *J. Histochem. Cytochem.* **2**, 185 (1954). — MONTGOMERY, M. L., G. E. SHEPLINE and J. L. CHAIKOFF: The elimination of administered zinc in pancreatic juice, duodenal juice, and bile of the dog as measured by its radioactive isotope (Zn 65). *J. exp. Med.* **78**, 151 (1943). — MOSCHCOWITZ, E.: The pathogenesis of the hyalinisation of the Islands of Langerhans. *A.M.A. Arch. Path.* **61**, 136 (1956). — ROBERTS, W. J.: (1) A new procedure for the detection of gold in animal tissues: Physical development. *Proc. kon. ned. Akad. Wet.* **38**, 540 (1935). — (2) Recherche de l'or dans les tissus animaux par la méthode du développement physique (Keimmethode de LIESEGANG). *Bull. Histol. Techn. micr.* **9**, 344 (1935). — (3) Bijdrage tot de kennis omtrent localisatie van het goud na sanocrysin-injectie. *Diss. Utrecht* 1937. — SEIFERT, G.: Die pathologische Morphologie der Langerhansschen Inseln, besonders beim Diabetes mellitus des Menschen. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **42**, 50 (1959). — SPECHT, W.: Chemische Abbaureaktionen bei der Leichenzerersetzung. *Ergebn. allg. Path. path. Anat.* **33**, 138 (1937). — SSOBOLEW, L. W.: Zur normalen und pathologischen Morphologie der inneren Sekretion der Bauchspeicheldrüse. *Virchows Arch.* **168**, 91, 1902. — STEGNER, H. E., u. W. FISCHER: Das Sulfidsilberverfahren zum topochemischen Metallnachweis. *Virchows Arch. path. Anat.* **330**, 608 (1957). — THEODOSSIU, A.: Die „hydropische Veränderung“ der Langerhansschen Inseln und ihre Vorstufe nach chemischer Glucosebelastung der Katze. *Beitr. path. Path.* **116**, 369 (1956). — TIMM, F.: (1) Zell-mikrochemie der Schwermetallgifte. *Habil.-Schr. Leipzig* 1932. — (2) Zur Histochemie der Schwermetalle. Das Sulfidsilberverfahren. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **46**, 706 (1958). — (3) Zur Histochemie des Zinks. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **47**, 428 (1958). — TIMM, F., u. R. NETH: Zur Histochemie der Langerhansschen Inseln. *Z. Naturforsch.* **13b**, 538

(1958). — TORESON, W.: Glycogen infiltration in the pancreas. Amer. J. Path. **27**, 327 (1951). — VOIGT, G. E.: (1) Histologische Versilberungen. Habil.-Schr. Jena 1951. — (2) Histochemische Untersuchungen über das Zink in den Langerhansschen Inseln beim Alloxandiabetes. Acta. path. microbiol. scand. **41**, 81 (1957). — (3) Histochemische Untersuchungen über das Zink im menschlichen Pankreas beim Diabetes mellitus. Acta. path. microbiol. scand. **41**, 381 (1957). — (4) Ein neuer histotopochemischer Nachweis des Calciums (mit Naphthalhydroxamsäure). Acta histochem. (Jena) **4**, 122 (1957). — (5) Untersuchungen zur Keimbildung bei histologischen Versilberungen. Z. wiss. Mikr. **63**, 345 (1957). — (6) Über das Auftreten von Verkalkungen in der Niere beim Diabetes mellitus. Acta. path. microbiol. scand. **41**, 479 (1957). — (7) Über das Vorkommen von Metallen in Nierenverkalkungen beim Diabetes mellitus. Acta. path. microbiol. scand. **42**, 104 (1958). — (8) Investigation of the human embryonic pancreas for metals (zinc) by the sulphide-silver method. Acta. path. microbiol. scand. **44**, 120 (1958). — (9) Histochemical Investigation of the distribution of zinc in the pancreas in experimental zinc poisoning. Acta. path. microbiol. scand. **44**, 146 (1958). — (10) Das histologische Bild des Pankreas einiger Tiere nach Anwendung der Sulfid-silbermethode. Acta histochem. (Jena) (im Druck). — VOIGT, G. E., H. BOG u. I. WOLF: Untersuchungen zum histotopochemischen Nickel- und Kobaltnachweis. Zbl. allg. Path. path. Anat. **92**, 1 (1954). — WARREN, S., and P. M. LE COMPTE: The pathology of Diabetes mellitus. Philadelphia 1952. — WEICHSELBAUM, A.: Über die Regeneration der Langerhansschen Inseln im menschlichen Pankreas. S.-B. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl. **117** (1908). — WOLFF, H., H. MASKE, B. STAMPFL u. F. BAUMGARTEN: Untersuchungen über Dithizondiabetes. Klin. Wschr. **29**, 670 (1951). — WOLFF, H. P., D. RINGEB u. R. AMANN: Histochemische Untersuchungen über das Inselzink. Z. ges. exp. Med. **126**, 390 (1955).

Prof. Dr. GERHARD E. VOIGT
Rätsmedicinska Institutionen, Lund/Schweden