

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Münster i. Westf.  
(Direktor: Prof. Dr. W. GLESE)

## Histochemische Untersuchungen zur Calciphylaxie der Langerhansschen Inseln beim Alloxan-Diabetes

Von

GERHARD SEIFERT \*

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Dezember 1964)

Bei der Calciphylaxie nach SELYE treten selektive Gewebsverkalkungen auf, die auf der veränderten Reaktionsweise der Receptorgewebe nach Einwirkung zweier Substanzen („sensitizer“ und „challenger“) innerhalb einer kritischen Zeitperiode beruhen. Im Pankreas lassen sich experimentell zwei verschiedene Formen der Verkalkung hervorrufen: die calciphylaktische interstitielle Pankreatitis und die Inselcalciphylaxie. In einer früheren Untersuchung zur Pathologie der calciphylaktischen Pankreatitis (SEIFERT) wurde auf die Wechselwirkungen zwischen Calcium-Stoffwechsel und Pankreasfunktion sowie auf die Koinzidenz von Pankreatitis und Hyperparathyreoidismus mit Hypercalcämie eingegangen. In der vorliegenden Arbeit sollen histochemische Befunde zur Inselcalciphylaxie beim Alloxan-Diabetes mitgeteilt werden. Bei dieser Versuchsanordnung führt Alloxan als auslösende Substanz („challenger“) dann zu einer selektiven Verkalkung des Inselapparates, wenn die initiale B-Zellschädigung innerhalb einer bestimmten kritischen Zeitperiode nach vorheriger Sensibilisierung eintritt.

### Untersuchungsgut und Methodik

97 männliche Albino-Ratten einer gewöhnlichen Zucht mit einem Körpergewicht von 100—200 g erhielten eine an Vitaminen, Eiweiß und Mineralien reiche Standardkost. Das Körpergewicht wurde täglich während der Versuchsdauer bestimmt. Die Sektion der Tiere erfolgte nach Chloroformnarkose. Vom Pankreas wurden unfixierte Kryostatsehnitte (Kryostat Duspiva-Dittes) angefertigt und enzymhistochemisch untersucht. Folgende Fermentreaktionen wurden durchgeführt: saure Phosphatase (GOMORI; DEANE u. Mitarb.; Substrat 0,1 m Natrium- $\beta$ -Glycerophosphat), alkalische Phosphatase (PEARSE; Substrat 3%iges Natrium- $\beta$ -Glycerophosphat), Succinodehydrogenase (PEARSE; Substrat Natriumsuccinat), Cholinesterase (GEREBTZOFF; SNELL; Substrat Acetylthiocholinjodid) und Monoaminoxidase (GLENNER u. Mitarb.; Substrat Tryptaminhydrochlorid). Der Blutzucker wurde enzymatisch aus dem Herzblut nach der Methode von BARTHELMAI und CZOK bestimmt<sup>1</sup>. Außerdem wurden Gewebstücke nach Fixation in 10%igem neutralen Formalin oder Bouinscher Lösung untersucht. Weitere methodische Einzelheiten finden sich bei STRACK und SEIFERT.

Es wurden sechs Versuchsgruppen gebildet:

*Gruppe I.* Am 1. Versuchstag wurde bei 20 Ratten pro Tier 3 ml A.T. 10® (ölige Lösung von kristallisiertem Dihydrotachysterin mit 1 mg Dihydrotachysterin/ml ölige Lösung) mit

\* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

<sup>1</sup> Die Bestimmung der Blutzuckerwerte verdanke ich der freundlichen Mithilfe von Herrn Priv.-Doz. Dr. H. OTTO, Medizinische Univ.-Klinik Münster i. Westf.

der Schlucksonde verabfolgt<sup>1</sup> oder i.m. injiziert. Am 2. Versuchstag wurde jedem Tier 100—150 mg Alloxan/kg Körpergewicht als 5%ige wäßrige Lösung i.v. verabfolgt. Versuchsdauer 3—17 Tage.

*Gruppe II.* Am 1. Versuchstag wurde bei 21 Ratten pro Tier 1,5 ml A. T. 10® mit der Schlucksonde oder i.m. verabfolgt. Am 2. Versuchstag erhielten die Tiere vormittags eine weitere Dosis von 1,5 ml A. T. 10® mit der Schlucksonde. Alloxan wurde in der gleichen Dosierung wie in Gruppe I entweder am Nachmittag des 2. Versuchstages i.v. oder am Vormittag des 3. Versuchstages i.v. oder intraperitoneal appliziert. Versuchsdauer 4—11 Tage.

*Gruppe III.* Am 1. Versuchstag wurde bei 26 Ratten pro Tier vormittags 2 ml A. T. 10® und nachmittags je 2,5 ml der gleichen Substanz mit der Schlucksonde appliziert. Am 2. Versuchstag erhielten die Tiere Alloxan in der gleichen Dosierung wie Gruppe II i.v. injiziert. Zum Unterschied von Gruppe I und II hatten die Tiere 36 Std vor der Alloxangabe kein Futter mehr erhalten, sondern lediglich Trinkwasser. Nach der Alloxanverabfolgung wurde den Tieren 24 Std lang anstelle von Leitungswasser Zuckerwasser gegeben. Die Fütterung erfolgte wie in den anderen Gruppen nach Alloxan in üblicher Weise mit Preßlingen. Versuchsdauer 4—13 Tage.

*Gruppe IV.* Sechs Tiere erhielten Alloxan i.v. (100—150 mg/kg Körpergewicht) ohne vorherige A. T. 10®-Einwirkung. Versuchsdauer 2—17 Tage.

*Gruppe V.* Bei 14 Tieren wurde lediglich A. T. 10® in einer Dosierung von zweimal 1,5 ml mit der Schlucksonde oder i.m. verabfolgt. Versuchsdauer 3—10 Tage.

*Gruppe VI.* Zehn Tiere dienten als Kontrollgruppe und erhielten weder A. T. 10® noch Alloxan.

### Untersuchungsbefunde

In den Versuchsgruppen I—IV kam es nach Einwirkung von Alloxan zu einem typischen Alloxan-Diabetes. Die Blutzuckerwerte stiegen durchschnittlich auf

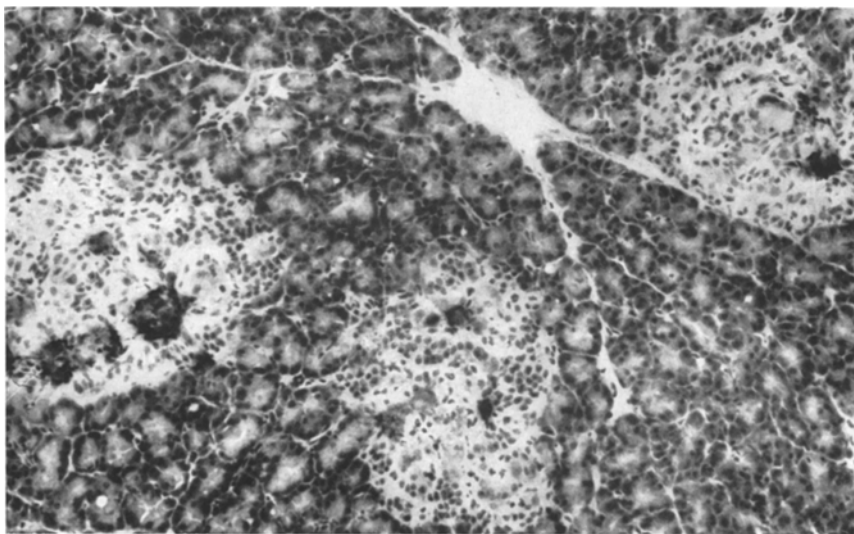


Abb. 1. Rattenpankreas (Gruppe III) mit scholligen Inselverkalkungen und intaktem exokrinen Parenchym. Pyrostat. H.-E. Vergr. 100fach

300—400 mg-% und maximal bis auf 840 mg-% an. Die diabetischen Tiere nahmen an Gewicht deutlich ab. Die Gewichtsverluste waren bei den Ratten mit hohen Blutzuckerwerten am stärksten und betrugen maximal ein Drittel des Ausgangsgewichtes. Histologisch fanden sich in den Gruppen I—IV die charak-

<sup>1</sup> A. T. 10® wurde freundlicherweise von den Farbenfabriken Bayer AG, Leverkusen, zur Verfügung gestellt.

teristischen Inselveränderungen. Diese bestanden anfangs in einer Degranulierung und Cytoplasmaverklumpung der B-Zellen, später in Kernpyknosen, Nekrosen und Schwund der B-Zellen, so daß vorwiegend nur noch kleine, aus A-Zellen bestehende Inselreste erkennbar waren. Nach alleiniger Einwirkung von Dihydrotachysterin (Gruppe V) zeigten die Inseln keine Veränderungen und waren durch deutlich granulierten B-Zellen im Inselzentrum sowie durch eine randliche A-Zellschale gekennzeichnet.

Eine Inselverkalkung trat nur bei den alloxandibetischen Ratten der Versuchsgruppe III auf, die 36 Std vor der Alloxangabe nicht mehr gefüttert worden waren und 24 Std lang nach der Alloxaneinwirkung Zuckerwasser zu trinken erhalten hatten. Das Pankreas zeigte bereits makroskopisch an der Oberfläche feine weißliche, punktförmige Verkalkungen. Histologisch waren die Kalkablagerungen auf das Inselgewebe begrenzt (Abb. 1) und bei der Kossa-Reaktion durch schwarze feingranuläre oder schollige Ablagerungen gekennzeichnet (Abb. 2c). Das exokrine Parenchym wies dagegen keinerlei Calcifikation auf.

Die Inselverkalkungen waren stellenweise so massiv, daß eine Abgrenzung der einzelnen Inselzellen inmitten der Kalkniederschläge nicht mehr möglich war. Es blieb jedoch auch bei massiver Kalkeinlagerung eine unterschiedlich breite

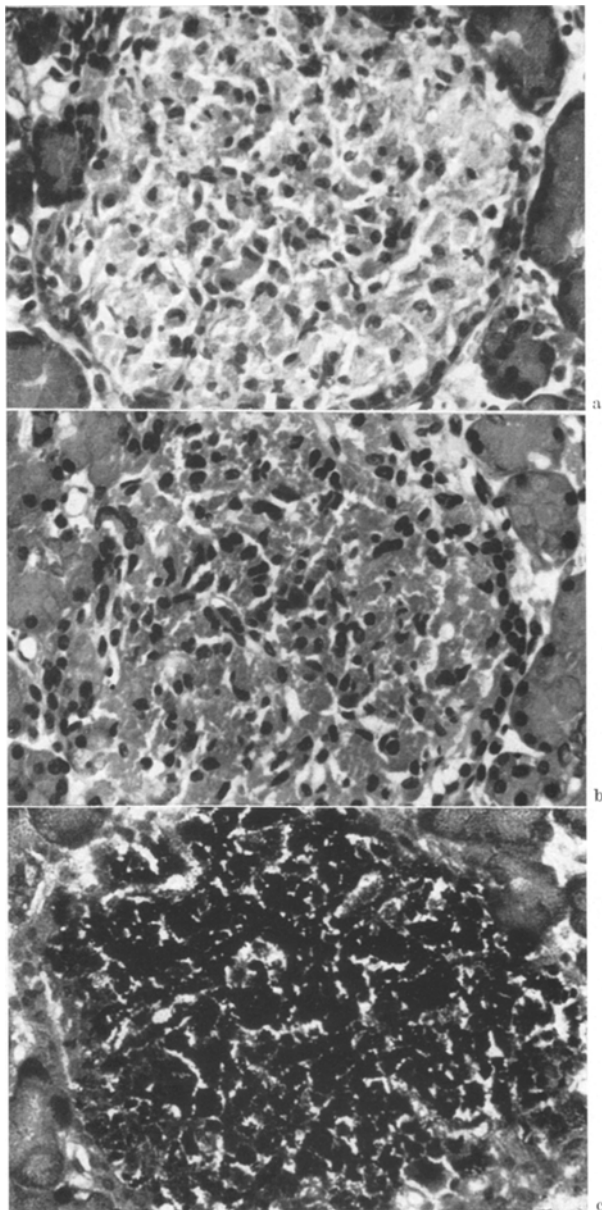


Abb. 2a—c. Rattenpankreas (Gruppe III): a Mucoide Inselzellauflösungen (H.-E.), b Ablagerung saurer Mucopolysaccharide im gleichen Bereich (Astrablau-Färbung), c Granulär-schollige Verkalkung im Bereich der Mucopolysaccharidlokalisation (Kossa-Reaktion). Paraffin. Vergr. 238

randliche Inselzone unverkalkt, die der Lokalisation der A-Zellen entsprach. Die geschädigten B-Zellen zeigten in Paraffinschnitten ein leicht basophiles mucoides Cytoplasma, welches bei der Astrablau-Färbung feingranulär-flockige Anreicherungen von sauren Mucopolysacchariden aufwies (Abb. 2). Die Lokalisation der Kalkniederschläge in den B-Zellen entsprach den Cytoplasmaregionen,

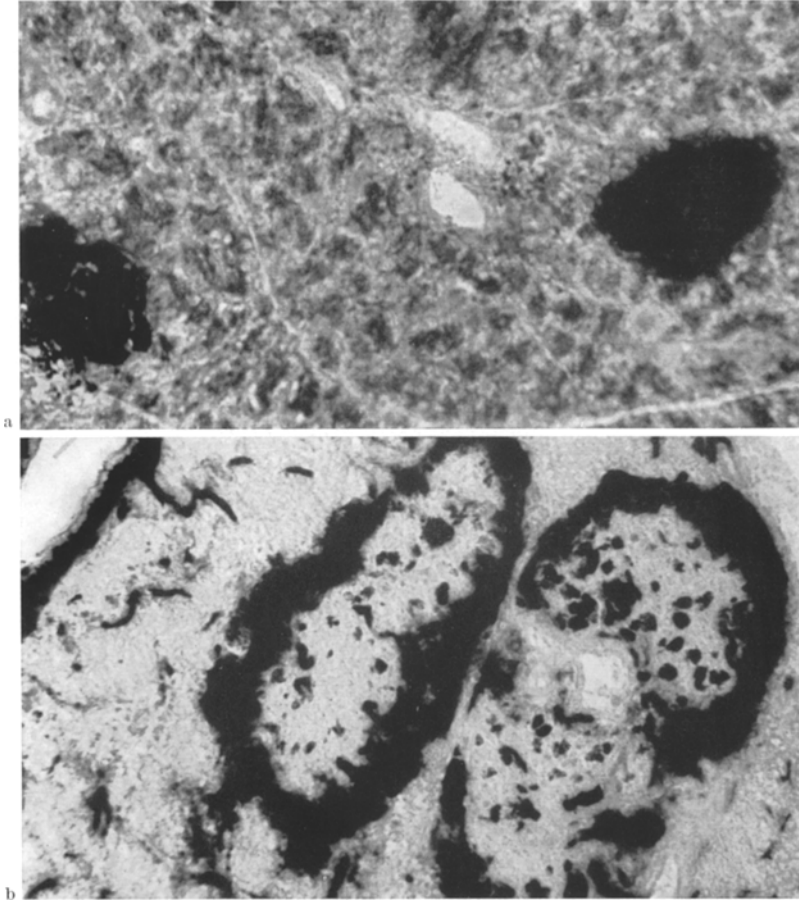


Abb. 3a u. b. Rattenpankreas (Gruppe III): a Starke Aktivität der sauren Phosphatase im Zentrum zweier Pankreasinseln. b Deutliche Markierung der alkalischen Phosphatase in den Inselcapillaren und der randlichen A-Zellenschale. Kryostat. Vergr. 100fach

die bei der Astrablau-Färbung kräftig tingiert waren (Abb. 2). Demgegenüber ließen sich weder in den anderen Versuchsgruppen mit Alloxan-Diabetes (Gruppe I, II, IV) noch nach alleiniger Einwirkung von Dihydratachysterin (Gruppe V) oder bei Kontrolltieren saure Mucopolysaccharide in den Inseln mittels der Astrablau-Färbung darstellen.

Enzymhistochemisch ergab sich in Gruppe III mit Alloxan-Diabetes und Inselverkalkung eine Verschiebung der Fermentaktivität gegenüber der Kontrollgruppe. In den Inseln mit Inselverkalkung fiel die Aktivität der sauren Phosphatase stark positiv aus (Abb. 3), wobei die Fermentreaktion im Bereich der B-Zellen — d.h. im Inselzentrum — lokalisiert war. Die Aktivität der alkalischen

Phosphatase war ebenfalls stark ausgeprägt und im Gegensatz zur sauren Phosphatase vor allem in den randlich gelegenen Capillarknäuel und A-Zellen markiert (Abb. 3). Das Verteilungsmuster der alkalischen Phosphatase im exokrinen Gewebe um die Pankreasgänge und interacinär entsprach dem der Kontrollgruppe. Bei Darstellung der Succinodehydrogenase fand sich in den verkalkten Inseln praktisch keine Fermentaktivität, während das exokrine Drüsenparenchym durch eine deutliche Fermentreaktion im Cytoplasma der Drüsenacini gekennzeichnet war. Die Aktivität der Succinodehydrogenase fiel vielfach im exokrinen Gewebe stärker aus als bei Kontrolltieren. Mittels der Cholinesterase-

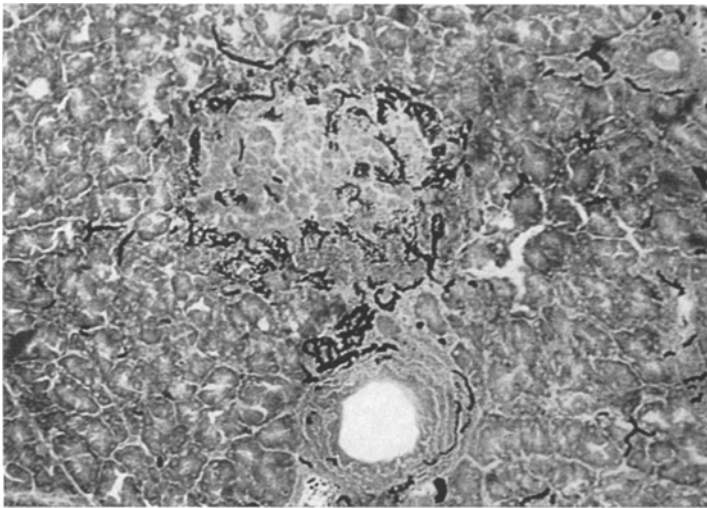


Abb. 4. Rattenpankreas (Gruppe III) mit Lokalisation der Cholinesterase-Aktivität in den insulären und interstitiellen Nervenfasern. Kryostat. Vergr. 100fach

Aktivität ließen sich auch in verkalkten Inseln noch feine vegetative Nervenfasern nachweisen (Abb. 4). Die Fermentlokalisation der Cholinesterase im übrigen exokrinen Gewebe entlang den Nervenfaserausläufern entsprach dem der Kontrolltiere. Die Monoaminoxydase-Aktivität fiel in den Inseln der alloxan-diabetischen Tiere negativ aus und zeigte somit keine Abweichung von dem Befund in normalen Pankreasinseln.

Innerhalb der Gruppe III waren die Inselverkalkungen nicht bei allen Tieren gleich stark ausgeprägt. Auch bei schwerer Inselverkalkung waren im gleichen Pankreas Inseln mit leichterer Verkalkung oder auch unverkalkte Inseln vorhanden.

Die Nieren der Versuchsgruppen I—III (Dihydrotachysterin und Alloxan) und V (Dihydrotachysterin) zeigten das typische Bild einer Nephrocalcinose mit Tubulusnekrosen und Kalkzylindern, die Nieren der Versuchsgruppe IV (Alloxan) eine nekrotisierende Tubulonephrose ohne Verkalkung.

### Besprechung der Befunde

Im Gegensatz zur exokrinen Pankreasverkalkung sind Inselcalcinosen im menschlichen Pankreas extrem selten und bisher nur vereinzelt beim Diabetes

mellitus beschrieben (MALLORY; FISCHER; v. MEYENBURG). Eine der experimentellen Inselcalciophylaxie vergleichbare Beobachtung stammt von FISCHER, der im Pankreas eines 18 Jahre alten, an Coma diabeticum verstorbenen Mannes zahlreiche punktförmige isolierte Inselverkalkung fand.

Beim experimentellen Alloxan-Diabetes (Lit.: FERNER; CREUTZFELDT; LAZARUS und VOLK) kommt es nur dann zur Inselverkalkung, wenn die Alloxanschädigung der B-Zellen innerhalb einer bestimmten kritischen Zeitperiode nach Sensibilisierung der Tiere durch Dihydrotachysterin erfolgt. Die alleinige Alloxaneinwirkung führt dagegen nicht zur Inselverkalkung, sondern nur zu den typischen B-Zellveränderungen (Granulaverlust, Cytoplasmaverklumpungen, Kernpyknosen, B-Zellnekrosen).

Bei der Inselverkalkung alloxandiabetischer Ratten ist Alloxan als lokalisierender, auslösender Faktor („challenger“) für die Inselcalcinose anzusehen. Die Sensibilisierung zur Verkalkung durch Dihydrotachysterin in drei verschiedenen Versuchsgruppen führte jedoch nur in einer Versuchsgruppe (Gruppe III) zur Inselverkalkung, obwohl eine B-Zellschädigung durch das Alloxan in allen drei Gruppen bestanden hat. Diese Beobachtung berechtigt zu der Annahme, daß im Ablauf der calciophylaktischen Inselreaktion zwei Faktoren eine Rolle spielen: der Funktionszustand der Inselzelle zum Zeitpunkt der toxischen Einwirkung und die kritische Zeitperiode zwischen Sensibilisierung und Intoxikation. Die Tiere der Gruppe III mit Inselcalcinose waren 36 Std vor der Alloxangabe nicht mehr gefüttert worden, so daß auf Grund dieses kurzdauernden Hungerzustandes eine stärkere Anreicherung von Hormongranula zum Zeitpunkt der Alloxanapplikation angenommen werden kann. Die daraus resultierende besondere funktionelle Aktivität dieser insulinproduzierenden B-Zellen in einer bestimmten kritischen Zeitperiode nach erfolgter Sensibilisierung ist wahrscheinlich ein pathogenetischer Faktor für die Auslösung der calciophylaktischen Reaktion. Die Tatsache, daß bei den Tieren mit Inselverkalkung auch kalkfreie Inselkomplexe im gleichen Pankreas zu beobachten waren, wurde von KOĐOUSKOVÁ u. Mitarb. ebenfalls kurz erwähnt und spricht dafür, daß in sekretorisch tätigen Geweben ein Arbeitsrhythmus herrscht und sich nicht alle Zellen gleichzeitig im Zustand einer gesteigerten funktionellen Aktivität befinden.

Die vielschichtige Pathogenese der Inselcalciophylaxie ergibt sich aus zwei weiteren Beobachtungen, die den Ausfall der enzymatischen Reaktionen und die Anreicherung von sauren Mucopolysacchariden in den verkalkten Inseln betreffen. Bekanntlich wirken die Mucopolysaccharide und die Phosphatasen als Ionenaustauscher sowohl bei der physiologischen Calcium-Mineralisation als auch bei pathologischen Verkalkungen mit. Aus der Eigenschaft der Mucopolysaccharide als Kalkfänger resultiert die Bildung von Mucopolysaccharid-Calcium-Komplexen. In den verkalkten Inseln der alloxandiabetischen Ratten war nicht nur eine übereinstimmende Lokalisation von Mucopolysaccharidanreicherungen und Calciumausfällungen nachweisbar, sondern auch eine verstärkte Aktivität der sauren Phosphatase in den Verkalkungszonen und eine besonders deutliche Markierung der alkalischen Phosphatase-Aktivität in den randlichen Inselcapillaren und A-Zellen. Demgegenüber fand sich ein völliger Aktivitätsverlust der Succinodehydrogenase in den verkalkten Inseln, während das Cytoplasma der angrenzenden exokrinen Drüsenacini eher eine gesteigerte Fermentaktivität

erkennen ließ. Die Aktivität der Cholinesterase blieb im Inselbereich erhalten. Der Ausfall der Ferment-Aktivitäten und die vermehrte Ansammlung von Mucopolysacchariden in den verkalkten Inselzonen sprechen für die Annahme, daß bei der Calciphylaxie eine Kettenreaktion (SELYE u. Mitarb.; SEIFERT) abläuft und die Calciumimprägnation besonders im Bereich von veränderten Mucopolysacchariden als Kalkfänger lokalisiert ist. Die Inselcalciphylaxie geht mit einer veränderten enzymatischen Reaktion des Inselgewebes einher, besonders mit einer gesteigerten Phosphatase-Aktivität. Da es gleichzeitig zu einem Aktivitätsverlust der Succinodehydrogenase in den Inselzellen und zu einer verstärkten Aktivität des gleichen Fermentes im exokrinen Pankreasgewebe kommt, beruht der veränderte Ausfall der Fermentreaktionen möglicherweise auf einem enzymatischen Regulationsmechanismus, wie er beispielsweise in der Leber beim Alloxan-Diabetes in ähnlicher Weise diskutiert wurde (RUDOLPH).

### Zusammenfassung

Ratten erhielten am ersten Versuchstag als sensibilisierende Substanz („sensitizer“) 3—5 mg Dihydratachysterin in öligem Lösung (A.T. 10®) mit der Schlucksonde, am zweiten Versuchstag Alloxan als 5%ige wäßrige Lösung intraperitoneal. In allen Versuchsgruppen mit Einwirkung von Dihydratachysterin und Alloxan kam es zur Ausbildung eines typischen Alloxan-Diabetes. Eine Inselverkalkung trat jedoch nur dann auf, wenn die Tiere nach der Sensibilisierung in der kritischen Zeitperiode bis zur Alloxaneinwirkung gehungert hatten. Histochemisch ging die Inselverkalkung mit einer Anreicherung saurer Mucopolysaccharide, einer verstärkten Aktivität der sauren und alkalischen Phosphatase sowie einem Aktivitätsverlust der Succinodehydrogenase in den Inseln einher. Für die Auslösung einer Inselcalciphylaxie spielt der Funktionszustand der Inselzelle und die Zeitperiode zwischen Sensibilisierung und Intoxikation eine Rolle. Die Mucopolysaccharid-Calcium-Komplexe entstehen durch eine Kettenreaktion unter Mitwirkung enzymatischer Faktoren, besonders der Phosphatasen.

### Histochemical Studies of Calciphylaxis of the Islets of Langerhans in Alloxan Diabetes

#### Summary

On the first experimental day albino rats received by gavage, as sensitizer, 3—5 mg of dihydrotachysterol in an oily solution (A.T. 10®). On the second day of the experiment a 5% aqueous solution of alloxan was injected intraperitoneally. In the experimental groups receiving dihydrotachysterol and alloxan, the animals developed a typical alloxan diabetes. Calcification of the islets occurred, however, only if the animals had fasted during the critical period; that is, after the sensitization and up to the onset of action of alloxan. Histochemically, this calcification was associated with an accumulation of acid mucopolysaccharides, with an intensified activity of the acid and alkaline phosphatases, and with a loss of activity of the succinic dehydrogenase in the islets. The functional state of the islet cells and the time interval between sensitization and intoxication were instrumental in inducing an islet calciphylaxis. The mucopolysaccharide-calcium complexes developed by means of a chain reaction in which enzymatic factors, especially the phosphatases, contributed.

### Literatur

- BARTHELMAI, W., u. R. CZOK: Enzymatische Bestimmung der Glukose im Blut, Liquor und Harn. *Klin. Wschr.* **40**, 585 (1962).
- CREUTZFELDT, W.: Die pathologische Morphologie der Langerhansschen Inseln im Experiment, besonders beim experimentellen Diabetes. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **42**, 85 (1959).
- DEANE, H. W., R. J. BARNETT u. A. M. SELIGMAN: Histochemische Methoden zum Nachweis der Enzymaktivität. In: *Handbuch der Histochemie* von W. GRAUMANN und K.-H. NEUMANN, Bd. VII/1. Stuttgart: Gustav Fischer 1960.
- FERNER, H.: Das Inselsystem des Pankreas. Stuttgart: Georg Thieme 1952.
- FISCHER, B.: Pankreas und Diabetes. *Frankfurt. Z. Path.* **17**, 218 (1915).
- GEREBTZOFF, M. A.: Recherches histochimiques sur les acétylcholine et choline estérases. *Acta anat. (Basel)* **19**, 366 (1953).
- GLENNER, G. G., H. J. BURTNER, and G. W. BROWN: The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by tetrazolium salts. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 591 (1957).
- GOMORI, G.: An improved histochemical technic for acid phosphatase. *Stain Technol.* **25**, 81 (1950).
- KOĐOUSKOVÁ, V., R. KOĐOUŠEK, and J. DUŠEK: Calcification of the Islets of Langerhans and renal cortical tubular epithelium in alloxan treated calciphylactic rats. *Experientia (Basel)* **19**, 314 (1963).
- LAZARUS, S. S., H. BARDEN, and M. BRADSHAW: Pancreatic beta cells and alloxan toxicity. Enzymatic histochemistry and toxic mechanism. *Arch. Path.* **73**, 210 (1962).
- , and B. W. VOLK: The pancreas in human and experimental diabetes. New York and London: Grune & Stratton 1962.
- MALLORY, F. B.: The principles of pathologic histology. Philadelphia: W. B. Saunders Co. 1914.
- MEYENBURG, H. v.: Über „Insulitis“ bei Diabetes. *Schweiz. med. Wschr.* **21**, 554 (1940).
- PEARSE, A. G. E.: Histochemistry. Theoretical and applied. London: Churchill 1961.
- RUDOLPH, G.: Fermenthistochemische Untersuchungen beim experimentellen Alloxan-Diabetes. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **42**, 130 (1959).
- SEIFERT, G.: Zur Enzymhistochemie der Speicheldrüsen bei der experimentellen Sialadenose und nach Sympathicusblockade. *Beitr. path. Anat.* **130**, 295 (1964).
- Die calciphylaktische Pankreatitis. *Virchows Arch. path. Anat.* **338**, 319 (1965).
- SELYE, H.: Calciphylaxis. Chicago: Chicago University Press 1962.
- P. L. CARUSO u. B. TUCHWEBER: Histochemische Studien über die Beteiligung der Mastzellen bei der Calciphylaxie. *Virchows Arch. path. Anat.* **337**, 538 (1964).
- SNELL, R.: The histochemical appearance of cholinesterase in the parotid gland of the rat. *Z. Zellforsch.* **49**, 330 (1959).
- STRACK, R.: Experimentelle Verkalkungen des Inselsystems und des exokrinen Pankreas. Diss. Münster 1965.

Prof. Dr. G. SEIFERT  
Pathologisches Institut der Universität  
44 Münster i. Westf., Westring 17