

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur experimentellen Insulitis nach Injektion von Anti-Insulin-Serum*

G. KLÖPPEL, E. ALTENÄHR und G. FREYTAG

Pathologisches Institut der Universität Hamburg (Direktor: Prof. Dr. G. Seifert)

Eingegangen am 5. September 1971

Electronmicroscopic Findings in Experimental Insulitis after Injection of Anti-Insulin Serum

Summary. Electronmicroscopical studies were carried out on mice made hyperglycemic by means of anti-insulin serum. The sera were separated into pools with a high or a low titer of the antibodies. The following observations were made:

1. After a single injection of an antiserum abundant microvesicles are found in the Golgi region. Furthermore, numerous pregranules are noted during the course of regranulation. The possibility of an increased secretion of proinsulin is discussed.

2. After a single as well as repeated injections of strong antiserum highly degenerative changes are noted in some beta cells. It is suggested that a reversible hypersecretory degeneration is present, resulting in a nearly complete inhibition of the secretion.

3. The infiltrate of granular leukocytes observed after administering anti-insulin serum may be considered an immune reaction of the immediate type by the demonstration of precipitated material in the islet area. The occurrence of mononuclear cells in the long term study indicates that in addition a delayed hypersensitivity against the antigen-antibody complex may develop.

Zusammenfassung. Es wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen an Mäusen mit einem diabetischen Syndrom nach Injektion von Anti-Insulin-Serum durchgeführt. Die Seren wurden in Gruppen mit hohem und niedrigem Antikörpertiter aufgeteilt. Folgende Befunde wurden beobachtet:

1. Nach einmaliger Injektion eines Antiserum entwickeln sich während der Regranulierungsphase reichlich Mikrovesikel im Bereich des Golgi-Apparates. Ferner sind Prägranula zu beobachten. Die Möglichkeit einer verstärkten Proinsulinsekretion wird diskutiert.

2. Sowohl nach einmaliger als auch nach wiederholter Injektion starker Antiseren treten hochgradige degenerative Zellveränderungen in einzelnen B-Zellen auf. Es wird angenommen, daß es sich um eine reversible hypersekretorische Degeneration mit einer Sekretionsstarre der B-Zellen handelt.

3. Das granulocytäre Infiltrat nach einmaliger Injektion von Anti-Insulin-Serum kann durch den Nachweis von präzipitiertem Material im Inselbereich als eine Immunreaktion vom Soforttyp angesehen werden. Das Auftreten von mononucleären Zellen nach längerer Versuchsdauer weist darauf hin, daß eine Immunreaktion vom Spättyp gegen den Antigen-Antikörperkomplex hinzukommt.

Die entzündliche Infiltration der Pankreasinseln, die bei juvenilen Diabetikern mit akutem Krankheitsverlauf (Gepts, 1965) und bei Neugeborenen diabetischer Mütter beobachtet wurde (Silverman, 1963), konnte tierexperimentell auf verschiedene Weise reproduziert werden (Renold et al., 1964; Toreson et al., 1964; Münte-

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

fering et al., 1971). In der vorliegenden Arbeit wird die Injektion von Meerschweinchen-Anti-Insulin-Serum als experimentelles Modell zur Erzeugung einer Insulitis herangezogen (Lacy and Wright, 1965; Logothetopoulos and Bell, 1966; Freytag et al., 1969). Unsere Untersuchungen beabsichtigen, die Ultrastruktur der Entzündungsreaktion nach Injektion von Insulin-Antiserum näher zu charakterisieren. Gleichzeitig sollen die dabei auftretenden B-Zellveränderungen im Hinblick auf die Insulinsynthese und -sekretion im Versuchsablauf analysiert werden.

Material und Methode

Meerschweinchen wurden mit kristallinem Rinder-Insulin (Hoechst) und komplettem bzw. inkomplettem Freundschens Adjuvans in wöchentlichen Abständen 9–12 Wochen lang immunisiert. Zur Blutentnahme wurde eine mehrfache Herzpunktion durchgeführt, wobei jeweils bis zu 6 ml Blut entnommen wurden. Mit Hilfe einer Elektroprecipitationsmethode konnte der Titer an präzipitierenden Insulin-Antikörpern semiquantitativ bestimmt werden: Zur Präcipitationsreaktion wurde 1 % Agargel mit Michaelis-Puffer (1:1 verdünnt in Aq. dest.) pH 6,85 angesetzt. Die Lochmuster wurden mit der handelsüblichen Culliford-Stanze ausgestanzt (Lochdurchmesser 3 mm. Verimpfte Menge pro Stanzloch: 10 μ l). Bei anodischer Wanderungsrichtung des Insulins — gelöst in 0,6 M Phosphatpuffer pH 8,0 — und kathodischer des Antikörpers findet sich zwischen den Stanzlöchern eine scharfe Präcipitationslinie (Laufzeit 20–30 min bei 5 mA pro Objektträger). Zur Titerbestimmung wird 10 μ l Serum mit 10 μ l Insulinlösung in aufsteigender Konzentration versetzt (0,25 E/ml–16 E/ml). Inkubation des Serum-Insulingemisches 30 min bei 37° C, danach für 8 Std bei 4° C. Sedimentation der Präcipitate bei 16000 Upm. Der Überstand wird in die kathodische, ein starkes Anti-Insulin-Serum in die anodische Lochreihe verimpft. Der Übergang von positiver zu negativer Reaktion nach Diffusionswaschung (24 Std) und Anfärbung mit Amidoschwarz 10B gibt einen Anhalt für die Titerhöhe der präcipitierenden Insulin-Antikörper. Auf diese Weise wurde ein Serumpool mit niedrigem (5 E/ml) und hohem Titer (10 E/ml) zusammengestellt.

Junge adulte Wistar-Inzucht-Mäuse wurden entweder einmalig (0,02 ml/g Körpergewicht) oder täglich (0,03 ml/g Körpergewicht) 3 oder 7 Tage lang mit niedrig- bzw. hochtitrigem Anti-Rinder-Insulin-Serum vom Meerschweinchen injiziert. Die Injektion erfolgte intravenös in die Schwanzvene. Einmalig injizierte Tiere wurden 1,5, 3 und 6 Std später getötet, während die anderen Tiergruppen jeweils 1,5 Std nach der letzten Injektion getötet wurden.

Blutzuckerbestimmung: Zur Kontrolle des diabetischen Syndroms wurde jeweils bei 6 nicht fastenden Tieren aus verschiedenen Versuchsreihen eine enzymatische Blutzuckerbestimmung (Boehringer, Mannheim) vor und 2 Std nach Injektion vorgenommen.

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurde das Pankreasgewebe sofort nach der Entnahme 2 Std in 3 % Glutaraldehyd mit 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,4) fixiert. Nach Waschen in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer über Nacht erfolgte eine Nachfixierung in 1 % Osmiumsäure mit Cacodylatpuffer für 90 min. Nach Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe wurde das Gewebe über Propylenoxyd in Epon 812 eingebettet. Die Semidünnschnitte und Feinschnitte wurden am Reichert-Ultramikrotom OM U2 angefertigt. Die Feinschnitte wurden dann mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert und am Philips-Elektronenmikroskop EM 300 bei 60 kV mikroskopiert.

Ergebnisse

Kontrolltiere

Die im einzelnen bekannte Ultrastruktur der B-Zelle der Maus soll im Hinblick auf die Inselveränderungen bei den Versuchstieren kurz charakterisiert werden. Die B-Zellen sind durch ihre Granula gekennzeichnet, die zwischen der umgebenden Membran und dem elektronendichten Inhalt einen weiten elektronenoptisch leeren Hof erkennen lassen. Die Granula sind relativ uniform im Cyto-

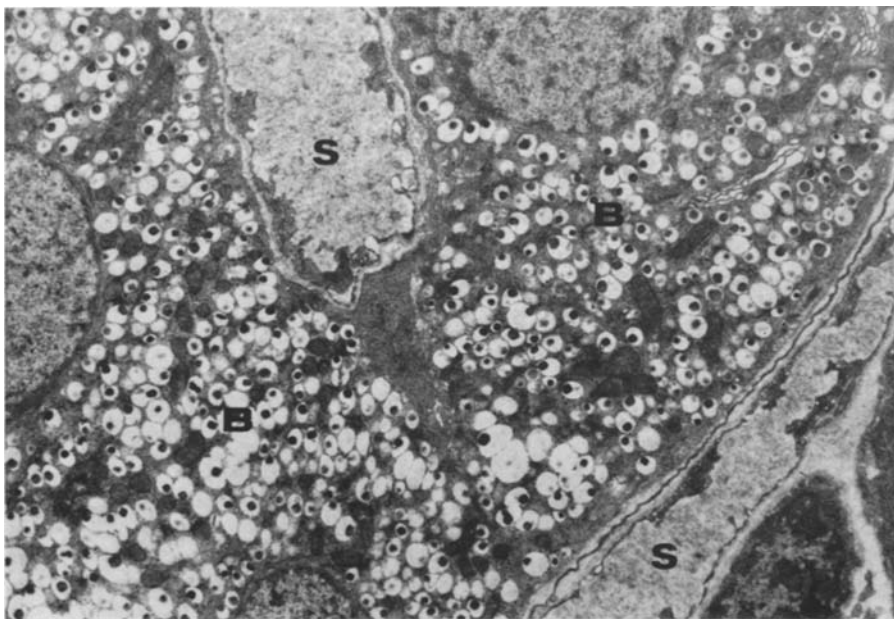


Abb. 1. Kontrolltier: B-Zellen am Rande einer Insel mit typischen Sekretgranula und schmalen Golgi-Komplexen. *S* Sinusoid in enger Nachbarschaft zu den B-Zellen (*B*). Vergr. $\times 5780$

plasma verteilt, wobei der Granulagehalt der einzelnen B-Zellen jedoch unterschiedlich sein kann (s. Abb. 1). Weitere membranbegrenzte Körper finden sich häufig in der Nähe der Golgi-Regionen. Es kann zwischen kleinen bläschenförmigen Mikrovesikeln und großen sog. Prägranula mit einem unterschiedlich elektronendichten Inhalt unterschieden werden. Außerdem lassen sich ovale Mitochondrien und ein gut entwickeltes rauhes endoplasmatisches Reticulum beobachten. Die B-Zellen liegen vielfach den Sinusoiden dicht an. Von den B-Zellen lassen sich A-(A₂-) und D-(A₁-) Zellen abgrenzen, ohne daß hier auf die ultrastrukturellen Charakteristika eingegangen werden soll, da sie im Laufe des Versuchs keine wesentlichen Veränderungen zeigen.

Versuchstiere

Die Injektion von Anti-Insulin-Serum rief regelmäßig eine polymorphzellige Insulitis hervor (s. Abb. 2). Die ultrastrukturellen Veränderungen der Inseln insgesamt und der B-Zellen im einzelnen lassen nach Injektion von hoch- und niedrigtitrigem Anti-Insulin-Serum keine prinzipiellen Unterschiede erkennen, sondern zeigen nur eine unterschiedlich starke Ausprägung in Abhängigkeit von der Titerhöhe. Es wird im folgenden nur dann auf einen Unterschied hingewiesen, wenn das Ausmaß der Veränderungen elektronenmikroskopisch deutlich verstärkt war.

1,5 Std nach Injektion von Anti-Insulin-Serum findet sich eine perlschnurartige Anordnung vieler Granula entlang der Zellmembran. Von dort aus erfolgt

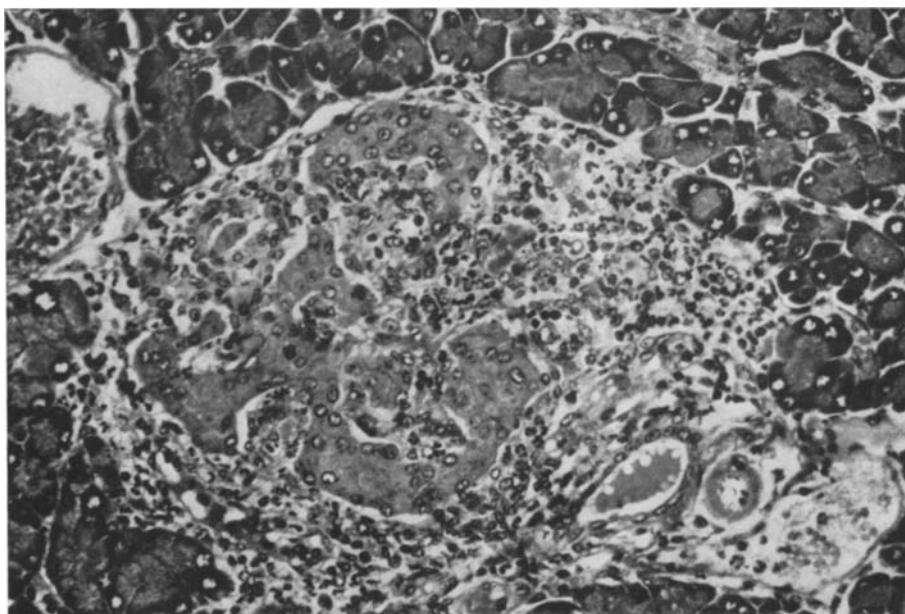


Abb. 2. Maus 3 Tage nach Injektion von hochtitrigem Anti-Insulin-Serum: Polymorphzellige entzündliche Infiltration einer Pankreasinsel (sog. Insulitis). PAS-Reaktion. Vergr. $\times 300$

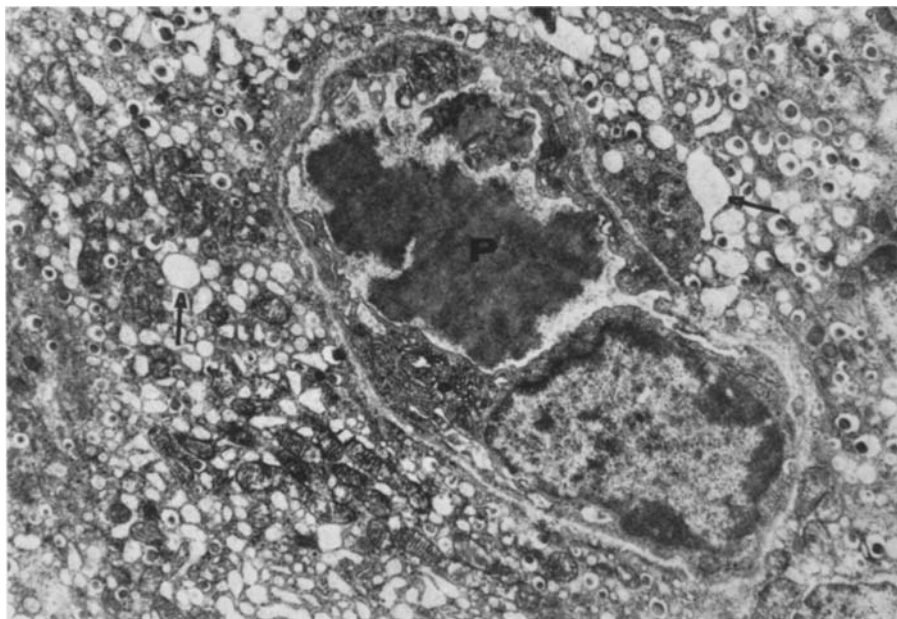


Abb. 3. Maus 1,5 Std nach Injektion von hochtitrigem Anti-Insulin-Serum: Elektronenoptisch dichtes Präzipitatmaterial (P) (Antigen-Antikörperkomplex ?) intrasinusoidal. Degranulierte B-Zellen mit beginnender cystischer Dilatation des rauhen endoplasmatischen Reticulum (↑). Vergr. $\times 7000$

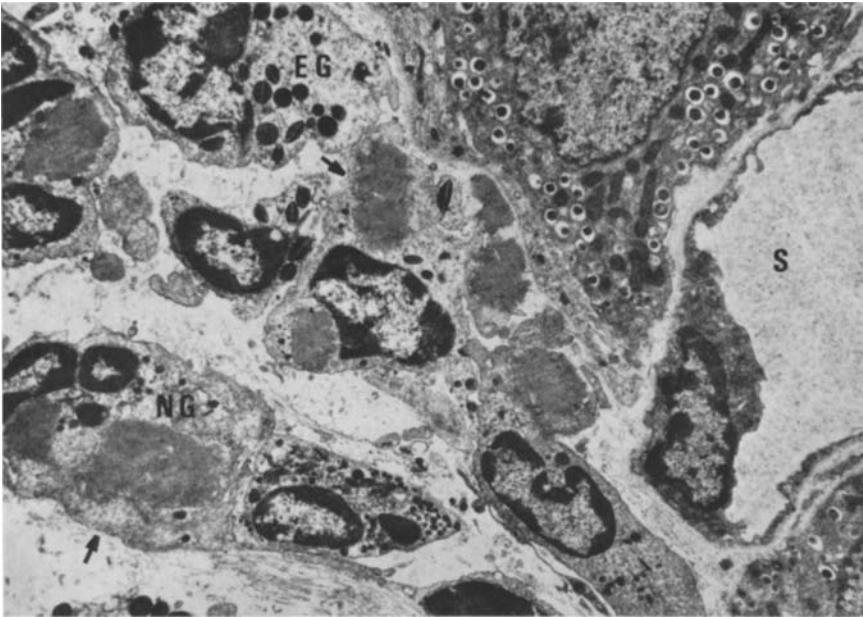


Abb. 4. Maus 3 Std nach Injektion von hochtitrigem Anti-Insulin-Serum: Entzündliches Infiltrat im Interstitium. Eosinophile Granulocyten (*EG*). Phagocytose (↑) des Präcipitatematerials durch neutrophile Granulocyten (*NG*). *S* Sinusoid. Vergr. $\times 9700$

durch den Vorgang der Emiocytose (Lacy, 1967) die Sekretion der Granula in den Extracellulärraum. Fusionen der Granula mit der Zellmembran sind jedoch nur selten darzustellen. Über den Ablauf des Granulattransportes zur Zelloberfläche konnte keine Aussage gemacht werden. Im Bereich der Golgi-Felder sieht man vermehrt Mikrovesikel und Prägranula. Gleichzeitig werden in den Sinusoiden vereinzelt eosinophile und neutrophile Granulocyten sowie reichlich nicht membranbegrenztes wolkiges Material gefunden (s. Abb. 3). Hochtitriges Serum hat eine stärkere Granulocytenaggregation zur Folge.

3 Std nach Injektion von Anti-Insulin-Serum sind die B-Zellen unterschiedlich stark degranuliert, wobei weiterhin eine Margination der Granula und eine Zunahme der Granulavorstufen beobachtet wird. Zu diesem Zeitpunkt ist die Entzündungsreaktion voll ausgeprägt. Sowohl in den Sinusoiden als auch im Interstitium sind eosinophile und neutrophile Granulocyten sowie einzelne mononucleäre Zellen zu sehen (s. Abb. 4). Zum Teil haben die neutrophilen Granulocyten jenes elektronendichte Material phagozytiert, das reichlich in den Sinusoiden und im Interstitium nachzuweisen ist. Im Interstitium liegt dieses Material den B-Zellen oft so dicht an, daß es die kleinen Einbuchtungen an der Zelloberfläche ausfüllt.

6 Std nach Injektion von Anti-Insulin-Serum hat die Regranulierung voll eingesetzt. Die Golgikomplexe haben sich vergrößert und sind von zahlreichen Mikrovesikeln umgeben. In noch stärkerem Maße werden Prägranula beobachtet. Sie erreichen oft die Zelloberfläche, um sich dort ebenso anzuordnen wie vorher die

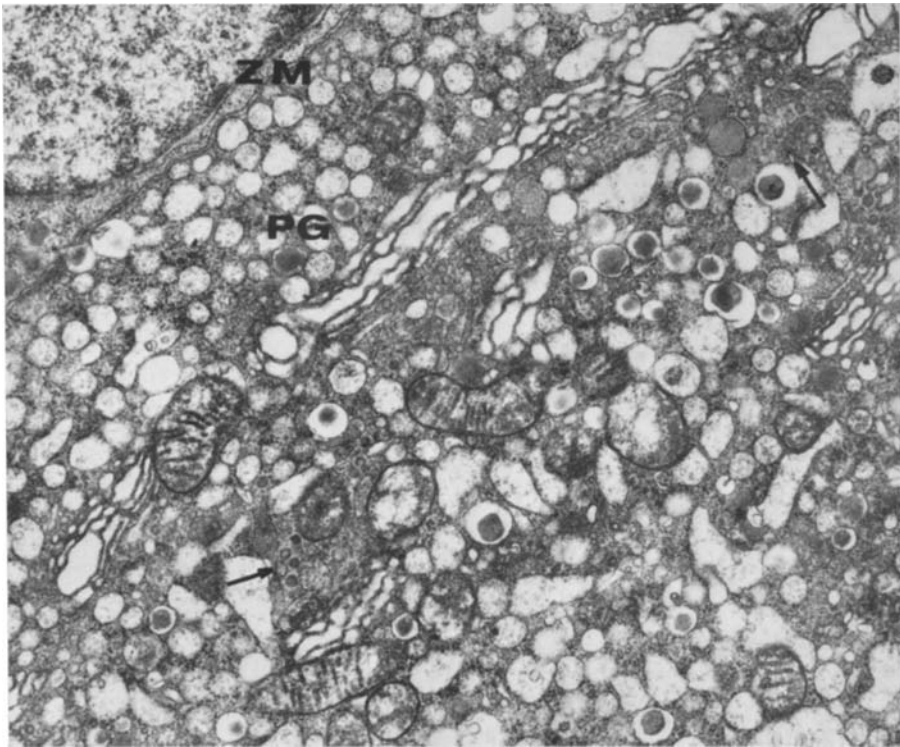


Abb. 5. Maus 6 Std nach Injektion von niedrigtitrigem Anti-Insulin-Serum: B-Zellen mit vielen Prägranula (PG) im Cytoplasma und an der Zellmembran (ZM); unterschiedlicher elektronendichter Inhalt der Prägranula. Erweiterte Golgi-Komplexe mit vielen Mikrovesikeln (↑) in der Nachbarschaft. Vergr. $\times 16200$

reifen Sekretgranula, welche jetzt nur noch vereinzelt vorhanden sind (s. Abb. 5). Nach Injektion von hochtitrigem Serum kommt es darüber hinaus zu einer cystischen Dilatation des endoplasmatischen Reticulum, welches nur spärlich Material mit geringer elektronenoptischer Dichte zum Inhalt hat. Weiterhin sind nur einzelne Prägranula zu sehen, während Mikrovesikel noch recht häufig im Bereich der verbreiterten Golgi-Komplexe vorkommen. Der Kern erscheint geschrumpft und ist von einem erweiterten perinucleären Raum umgeben (siehe Abb. 6). Trotz dieser degenerativen Veränderungen kommen B-Zellnekrosen nur sehr selten vor. Die Entzündungsreaktion, die lichtmikroskopisch eine deutliche Zunahme der Infiltration in Abhängigkeit vom Serumtiter erkennen läßt, zeigt gegenüber dem 3 Std-Befund keine wesentlichen Veränderungen.

Nach 3- bzw. 7tägiger Injektion von Anti-Insulin-Serum können hauptsächlich zwei B-Zellveränderungen beobachtet werden. Nach Behandlung mit niedrigtitrigem Serum findet sich generell eine Hyperplasie des rauen endoplasmatischen Reticulum, während reife und unreife Granula nur vereinzelt zu sehen sind (s. Abb. 7a). Die Injektion von hochtitrigem Serum ist darüber hinaus häufig von

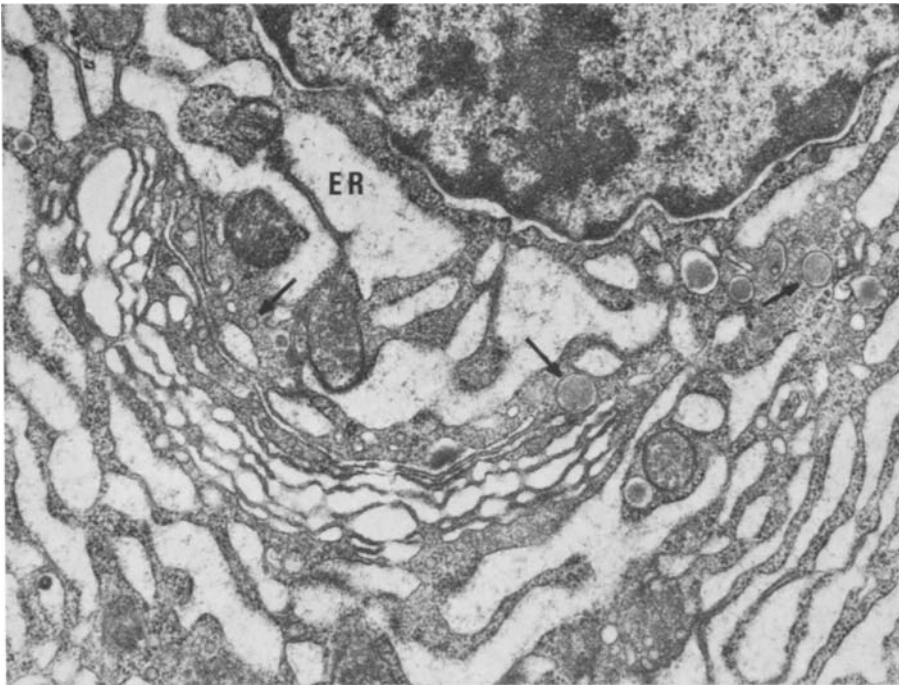


Abb. 6. Maus 6 Std nach Injektion von hochtitrigem Anti-Insulin-Serum: Hypersekretorische Degeneration einer B-Zelle mit cystischer Dilatation des rauhen endoplasmatischen Reticulum (*ER*), beginnende Kernpyknose, Erweiterung des perinucleären Raums und subtotaler Degranulierung. Einzelne Prägranula und mehrere Mikrovesikel (↑) in Nähe des Golgi-Komplexes. Vergr. $\times 22100$

einer cystischen Dilatation des rauhen endoplasmatischen Reticulum, einer ausgeprägten Expansion des Golgi-Apparates, einer Schrumpfung des Kerns und einer starken Verminderung der Granulazahl begleitet (s. Abb. 7b). Die Granula lassen zudem einen sehr unterschiedlich elektronendichten Inhalt erkennen. Auch jetzt werden B-Zellnekrosen sehr selten gefunden.

Eine entzündliche Infiltration ist deutlich ausgeprägt. Neben Granulocyten sind jedoch nach 3 und noch stärker nach 7 Tagen eine Zunahme immunocyitärer, mononucleärer Zellen zu beobachten, so daß der Anteil dieser Zellen am entzündlichen Infiltrat schließlich überwiegt (s. Abb. 8a). Die weitaus meisten mononucleären Zellen sind vom Typ der Immunocyten mit und ohne Makrophageneigenschaft. Sie besitzen einen großen Zellkern mit hohem Euchromatingehalt und ein organellreiches Cytoplasma mit zahlreichen Ribosomen. Neben den Immunocyten finden sich kleine Lymphocyten mit einem hohen Heterochromatingehalt des Kerns und einem organellenarmen Cytoplasma, das nur wenige Ribosomen enthält. Vereinzelt sind auch Plasmazellen mit einem deutlich ausgeprägten rauhen endoplasmatischen Reticulum zu beobachten. Die Immunocyten, die als Makrophagen agieren, haben intrasinusoidales und interstitiell gelegenes Präcipitatematerial phagozytiert (s. Abb. 8).

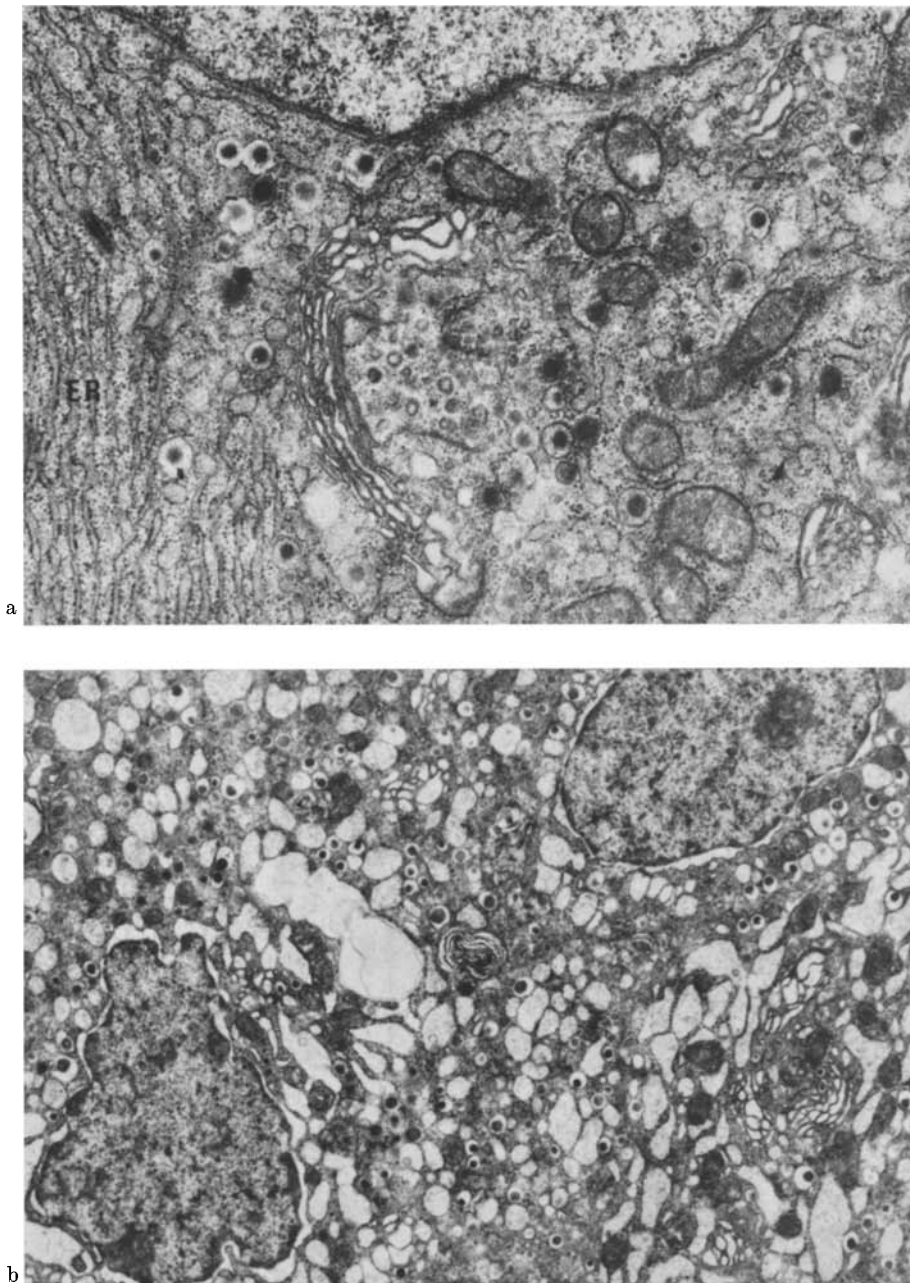


Abb. 7. a Maus 7 Tage nach Injektion von niedrigtitrigem Anti-Insulin-Serum: B-Zellen mit Hyperplasie des rauen endoplasmatischen Reticulum (*ER*) in häufig lamellärer Anordnung. Expansion des Golgi-Komplexes. Deutliche Degranulierung. Wenige Granula in allen Stadien der Reifung. Vergr. $\times 20400$. b Maus 7 Tage nach Injektionen von hochtitrigem Anti-Insulin-Serum: Hypersekretorische Degeneration von B-Zellen. Cystische Dilatation des rauen endoplasmatischen Reticulum. Schrumpfung des Kerns mit erweitertem perinucleären Raum. Deutliche Degranulierung mit wenigen Prägranula und reifen Sekretgranula. Vergr. $\times 8000$

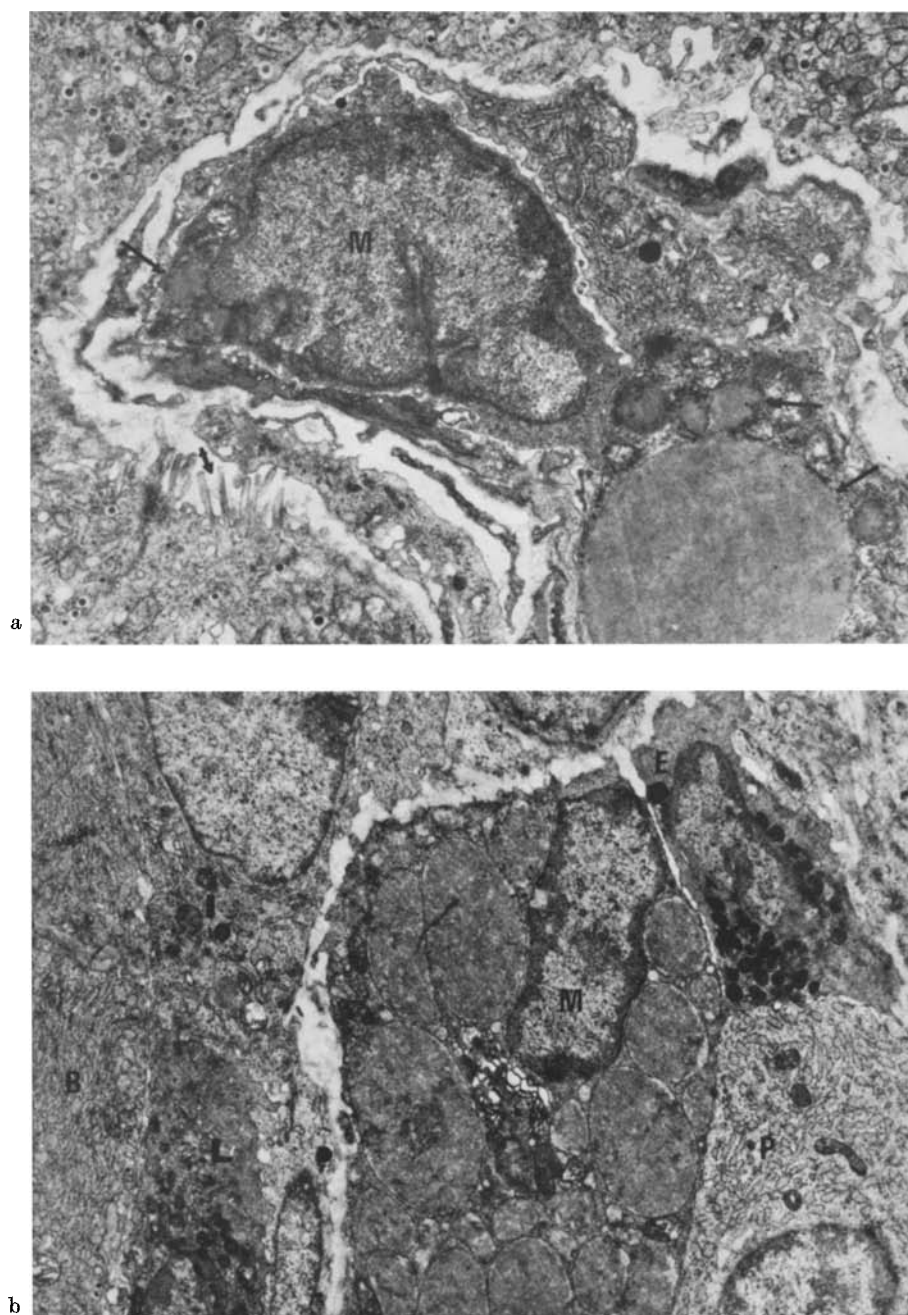


Abb. 8. a Maus 3 Tage nach Injektionen von niedrigtitrigem Anti-Insulin-Serum: Sinusoid mit Immunocyt vom Makrophagentyp (*M*). Phagocytose von Präcipitatmaterial (\uparrow). In der Umgebung degranulierte B-Zellen mit Cytoplasmaausstülpungen nach Emiocytose (\downarrow). Vergr. $\times 7800$. b Maus 7 Tage nach Injektionen von hochtitrigem Anti-Insulin-Serum: Makrophag (*M*) mit phagozytiertem, bereits membranös abgegrenztem Präcipitatmaterial. *L* Lymphocyt (intermediäre Form). *I* Immunocyt. *E* eosinophiler Granulocyt. *P* Plasmazelle. *B* B-Zelle. Vergr. $\times 5400$

Diskussion

Die Injektion von Meerschweinchen-Anti-Insulin-Serum bei Mäusen führt zu einem diabetischen Syndrom (Moloney and Coval, 1955), wie aus den Blutzuckerwerten hervorgeht, die 2 Std nach der Injektion bis auf Werte von 600 mg-% erhöht waren. Als Folge der Hyperglykämie findet sich eine ausgeprägte Stimulierung der Insulinsynthese und -sekretion in den B-Zellen (Logothetopoulos and Bell, 1966). Gleichzeitig kommt es zu einer periinsulären und intrainsulären Entzündungsreaktion (Freytag et al., 1969). Diese Insulitis zeigt in ihrem Ausmaß ebenso wie der Blutzuckerspiegel eine Abhängigkeit vom Insulin-Antikörpertiter (Klöppel et al., 1970). Beide Veränderungen stehen damit in engem Zusammenhang mit der Antigen-Antikörperreaktion.

Durch die maximale biologische Inaktivierung des zirkulierenden Insulins nach Injektion des Antiserum wird eine starke B-Zellstimulierung eingeleitet. Dieser Vorgang beginnt mit einer ausgeprägten B-Zelldegranulierung. Es wird dabei die vorhandene Reserve der reifen Granula emiozytiert und gleichzeitig eine Neubildung des Insulins eingeleitet, wie es die Expansion des Golgi-Apparates und das vermehrte Auftreten von Prägranula zeigt, die für Vorstufen der reifen Granula gehalten werden (Logothetopoulos, 1968). 6 Std nach der Injektion ist mit sinkendem Blutzuckerspiegel die Regranulation der B-Zellen weiter fortgeschritten. Auffällig ist, daß jetzt das Cytoplasma bis hin zur Zellmembran dicht mit unreifen Prägranula durchsetzt ist. Diese Beobachtung, die auf eine frühzeitige Sekretion von Insulin oder Insulin-Vorstufen hinweist, spricht dafür, daß die B-Zelle bei starker Stimulierung in der Lage ist, unter Umgehung des normalen Ablaufs bereits unreife Granula und Granulavorstufen zu sezernieren (Renold, 1970). Da Proinsulin sowohl in der Mikrosomenfraktion als auch in der Granulafraktion nachgewiesen wurde (Howell and Lacy, 1970; Sørensen et al., 1970), wird diskutiert, ob die Umwandlung von Proinsulin zu Insulin schon im Golgi-Komplex oder erst in den Prägranula erfolgt. Falls die zweite Annahme zutrifft, würde es möglicherweise unter der starken B-Zellstimulierung nach Injektion von Anti-Insulin-Serum zu einer vermehrten Proinsulinabgabe kommen. In vitro konnte nach Glucosestimulierung bereits eine erhöhte Proinsulinsekretionsrate nachgewiesen werden (Clark und Steiner, 1969).

Nach Stimulierung mit hochtitrigen Seren zeigen einzelne B-Zellen charakteristische Veränderungen, die wir als hypersekretorische Degeneration bezeichnen möchten. Die Veränderung geht über die cystische Dilatation des endoplasmatischen Reticulum hinaus, wie sie von Logothetopoulos (1968) beschrieben wurde, da sowohl pyknotische Kernalterationen als auch ein nahezu vollkommener Verlust an Granula festzustellen sind. Nach unseren Beobachtungen entspricht der Befund einer Sekretionsstarre der B-Zelle, welche durch eine Überbeanspruchung verursacht wird. Offensichtlich ist dieser Zustand aber unter den vorliegenden Versuchsbedingungen reversibel, da B-Zellnekrosen nur selten beobachtet wurden.

Die Insulitis ist eine weitere Folge der Injektion von präcipitierenden Insulin-Antikörpern. Der Nachweis eines elektronendichten wolkigen Materials in den Inseln sinusoiden kurz nach der Injektion spricht sehr dafür, daß es in diesem Bereich zu einer Präcipitationsreaktion des Insulins mit seinem Antikörper kommt. Entsprechende Präcipitate konnten in keinem anderen Organ nachgewiesen werden.

Wie vom Arthus-Phänomen bekannt ist, wird über die Komplementaktivierung bei der Bildung eines großen präzipitierenden Antigen-Antikörperkomplexes ein leukotaktischer Prozeß eingeleitet (Cochrane und Dixon, 1968). Die aggregierten Granulocyten wiederum setzen Mediatoren frei (Cochrane und Dixon, 1968), die zu Hyperämie und Ödem des Gewebes führen. Entsprechend sehen wir im elektronenmikroskopischen Bild eine Infiltration aus eosinophilen und neutrophilen Granulocyten, die ihr Maximum nach 3 Std erreicht und eine deutliche Abhängigkeit vom Antikörpertiter erkennen läßt. Eine immunologische Ursache der Entzündungsreaktion gewinnt damit sehr an Wahrscheinlichkeit, obwohl der Nachweis der Identität des Antigen-Antikörperkomplexes mit dem elektronendichten Material bislang fehlt.

Im Laufe des Versuchs nimmt der Anteil der Granulocyten am Infiltrat ab, und es treten immer mehr mononucleäre Zellen in Erscheinung, die als Immunocyten mit Makrophageneigenschaften und Lymphocyten einzuordnen sind. Da diese Zelltypen vornehmlich bei der Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp gefunden werden, ist zu diskutieren, ob nach mehrmaliger Injektion von Anti-Insulin-Serum die Sofortreaktion von einer verzögerten Immunreaktion überlagert wird, die sich gegen den Insulin-Antikörper vom Meerschweinchen im Antigen-Antikörperkomplex richtet. Die Annahme, daß sich nach wiederholten Injektionen von Anti-Insulin-Serum zusätzlich zu der Sofortreaktion eine Überempfindlichkeit vom Spättyp entwickeln kann, wird durch zwei Beobachtungen gestützt: die ausgeprägte Phagocytose des elektronendichten Materials durch Makrophagen und die Auslösung einer verzögerten Immunreaktion durch Antigen-Antikörperkomplexe, die im Antikörperüberschußbereich hergestellt werden (Uhr et al., 1957).

Literatur

- Clark, J. L., Steiner, D. F.: Insulin biosynthesis in the rat: demonstration of two proinsulins. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **62**, 278 (1969).
- Cochrane, C. G., Dixon, F. J.: Cell and tissue damage through antigen-antibody complexes. In: *Textbook of immunopathology*, ed. by P. A. Miescher and H. J. Muller-Eberhard. Vol. I, p. 94—110. New York and London: Grune & Stratton 1968.
- Freytag, G., Klöppel, G., Howe, I.: Zur Pathogenese der experimentellen Insulitis. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **53**, 423 (1969).
- Gepts, W.: Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes. *Diabetes* **14**, 619 (1965).
- Howell, S. L., Lacy, P. E.: Biochemical and ultrastructural studies of insulin storage granules and their secretion. In: *Beta cell secretion — from the standpoint of a pathobiologist*. *Diabetes* **19**, 895 (1970).
- Klöppel, G., Freytag, G., Gutschmidt, G.: Die histologischen Veränderungen des Inselorgans der Maus nach Anti-Schweine-Insulin- und Anti-Rinder-Insulin-Serum-Injektionen in Abhängigkeit von Versuchsdauer und Titerhöhe. *Acta endocr. (Kbh.)*, Suppl. **152**, 50 (1971).
- Lacy, P. E.: The pancreatic beta cell: structure and function. *New Engl. J. Med.* **276**, 187 (1967).
- Wright, P. H.: Allergic interstitial pancreatitis in rats injected with guinea pig anti-insulin serum. *Diabetes* **14**, 634 (1965).
- Logothetopoulos, J.: Electron microscopy of the pancreatic islets stimulated by insulin antibody. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.* **46**, 407 (1968).
- Bell, E. G.: Histological and autoradiographic studies of the islets of mice injected with insulin antibody. *Diabetes* **15**, 205 (1966).

- Moloney, P. J., Coval, M.: Antigenicity of insulin. Diabetes induced by specific antibodies. *Biochem. J.* **59**, 179 (1955).
- Müntefering, H., Schmidt, W. A. K., Körber, W.: Zur Virusgenese des Diabetes mellitus bei der weißen Maus. *Dtsch. med. Wschr.* **96**, 693 (1971).
- Renold, A. E.: Insulin biosynthesis and secretion — a still unsettled topic. *New Engl. J. Med.* **282**, 173 (1970).
- Soeldner, J. S., Steinke, J.: Immunological studies with homologous and heterologous pancreatic insulin in the cow. *Ciba Foundation Colloquia Endocrinol.* **15**, 122 (1964).
- Silverman, J. L.: Eosinophile infiltration in the pancreas of infants of diabetic mothers. *Diabetes* **12**, 528 (1963).
- Sørensen, R. L., Steffes, M. W., Lindall, A. W.: Subcellular localization to insulin conversion in isolated rat islets. *Endocrinology* **86**, 88 (1970).
- Toreson, W. E., Lee, J. C., Grodsky, G. M.: The histopathology of immune diabetes in the rabbit. *Amer. J. Path.* **52**, 1099 (1968).
- Uhr, J. W., Salvin, S. B., Pappenheimer, A. M., Jr.: Induction of delayed hypersensitivity in guinea pigs by means of antigen-antibody complexes. *J. exp. Med.* **105**, 11 (1957).

Dr. G. Klöppel
Priv.-Doz. Dr. E. Altenähr
Priv.-Doz. Dr. G. Freytag
Pathologisches Institut der Universität
D-2000 Hamburg 20, Martinstraße 52
Deutschland