

Morphologische Untersuchungen am Pankreas der Ratte im Kaliummangel unter besonderer Berücksichtigung der Langerhansschen Inseln

A. Burkhardt, H. Kaess und W. Ehlers

Pathologisches Institut der Universität Heidelberg (Direktor: Prof. W. Doerr)
und Medizinische Universitätsklinik Heidelberg (Direktor: Prof. G. Schettler)

Eingegangen am 26. Februar 1973

Morphological Studies of the Pancreas of Rats in Potassium Deficiency, with Special Reference to the Islets of Langerhans

Summary. The morphology of the pancreas of rats in severe potassium depletion was studied following 18 hours of fasting. While the exocrine pancreas showed no differences from control animals, the A-cells in the islets of Langerhans of the control animals were decreased in size and degranulated following the fast. In potassium depletion this did not happen; on the contrary the A-cells seemed enlarged. The implications for glucagon secretion and electrolyte metabolism are discussed, with special reference to whether the secretion of glucagon by the A-cells is impaired in potassium depletion.

Zusammenfassung. Bei Ratten im Kaliummangel wurde nach 18stündigem Fasten eine Vergrößerung der A-Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas gefunden, während Normaltiere danach eine Degranulierung und Verkleinerung der A-Zellen zeigten. Beziehungen im Hinblick auf den Glucagonstoffwechsel einerseits, den Elektrolytstoffwechsel andererseits werden diskutiert, insbesondere, ob ein durch Kaliummangel hervorgerufener Sekretionsstop für den histologischen Befund eine Rolle spielen könnte.

Im Kaliummangel sind Veränderungen des Kohlehydratstoffwechsels bekannt, welche durch erhöhte Blutzuckerwerte und eine verminderte Glucose-Toleranz charakterisiert sind (Sagild *et al.*, 1961; Conn, 1965; Barthelheimer *et al.*, 1967; Mondon *et al.*, 1968; Kaess *et al.*, 1971; Gorden *et al.*, 1972). Dies wird zum Teil auf eine verminderte oder qualitativ veränderte Insulinsekretion zurückgeführt. Gorden *et al.* (1972) sprechen vom Kaliummangel als von einem „insulinopenic state“. Die Abhängigkeit der Insulinsekretion von Veränderungen des Ionenmilieus und insbesondere vom Kaliumion ist *in vivo* und *in vitro* untersucht (Conn, 1965; Howell und Taylor, 1968; Hiatt *et al.*, 1972; Gorden *et al.*, 1972). Howell und Taylor (1968) diskutieren veränderte Enzymaktivitäten und eine Beeinflussung der Zellmembranpolarisation als mögliche Wirkungsmechanismen.

Ob sich parallel zu diesen Veränderungen des Glucosestoffwechsels im Kaliummangel auch morphologische Veränderungen am Inselzellapparat des Pankreas nachweisen lassen, ist bisher noch nicht untersucht.

Methode

Als Versuchstiere dienten männliche Wistar-Ratten (130—190 g). Die Versuchsdauer betrug 14 Tage. Es wurden 4 Gruppen untersucht:

Gruppe 1. 10 Normaltiere (übliche Laboratoriumskost, Leitungswasser ad libitum).

Gruppe 2. 8 Tiere im Kaliummangel (Diät von weniger als 0,01 % Kalium und 3 % Natrium (Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio), destilliertes Wasser; 2 Tiere starben während des Versuchs); und nach Auswertung dieser beiden Gruppen noch zwei weitere Kontrollgruppen.

Gruppe 3. 6 substituierte Kaliummangeldiättiere (kaliumarme Diät mit Kaliumsubstitution durch kaliumchloridhaltiges Trinkwasser — 3 %).

Gruppe 4. 6 Normaltiere (wie Gruppe 1).

Diese Kontrollgruppe 4 war nötig, weil ein direkter und unkontrollierter Vergleich von Gruppe 1 und 2 mit der Gruppe 3 wegen der zeitlichen Differenz der Versuche problematisch erschien.

Die Tötung erfolgte nach 18stündigem Hungern durch Ausbluten. Die Tötungszeit war einheitlich 14 Uhr.

Zur histologischen Untersuchung wurde das Pankreas sofort in Bouinscher Lösung fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten. Danach erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin, Chromhämatoxylin-Phloxin nach Gomori (Doerr, 1970; Berg, 1972), eine Versilberung nach Bodian, eine Versilberung nach Davenport (modifiziert nach Hellerström und Hellman, 1960) und eine Tryptophanfärbung nach der p-Dimethylaminobenzaldehydmethode (Adams, 1960).

Um neben dem qualitativen Befund auch ein in Zahlen faßbares Kriterium der Funktion der Inseln zu erhalten, wurde eine Auszählung der Inseln bei der Gruppe 1 und 2 (Kaliummangeltiere und Normaltiere) vorgenommen. Selbstverständlich ist der quantitative Befund nur in Verbindung mit den qualitativen Befunden aussagefähig (vgl. Kracht, 1958a).

An den Schnitten mit Granulafärbung wurden pro Tier an je einem in der Schnittführung rein zufälligen Schnitt die A- und die B-Zellen sämtlicher auf diesem Schnitt getroffener Inseln unter gleichen Bedingungen ausgezählt. Dabei wurden nur Zellen gezählt, welche genügend Cytoplasma zur Beurteilung der Granulafärbung — rote oder blaue Anfärbung — auf dem Schnitt zeigten. Die so ausgezählten A-Zellen enthielten sowohl A1-Zellen, bzw. D-Zellen, als auch A2-Zellen (Definition von Hellerström und Hellman, 1960; vgl. Dawson, 1970; Faller, 1969; Bargmann, 1971).

Eine Korrektur der ausgezählten Werte durch Caryometrie, Zellvolumenbestimmung oder Inselgrößenmessungen wurde nicht vorgenommen (zum Problem der Inselzellzählung vgl. Hultquist *et al.*, 1948; Ferner, 1952, 1955, 1958; Creutzfeld und Theodossiou, 1957; Gepts 1958; Wattenwyl, 1964; Marzotko *et al.*, 1971, insbesondere aber Hellman, 1959 a—f, 1962, 1964; Hellman und Hellerström, 1959).

Die direkt ausgezählten Werte werden bei gleicher Schnittdicke, Färbung etc. durch 3 Faktoren bestimmt:

1. von der Größe des Kerns und des Cytoplasmaleibes der Summe der Zellen der ausgezählten Art, denn ein größerer Körper, der in einem Medium vorkommt, hat bei zufälliger Schnittführung eine größere Chance getroffen zu werden, als ein kleinerer (vgl. hierzu Hellman, 1959a);

2. von dem Vorhandensein und der Erkennbarkeit des Identifizierungsmerkmals der Zellart bei den einzelnen Zellen und

3. von der tatsächlichen Zahl der Zellen dieser Art (die Zahl kann also, muß aber nicht erhöht sein).

Unter Berücksichtigung dieser Möglichkeiten kann eine solche „unkorrigierte“ Zählung bei einer der Methodik entsprechenden Kritik, bei Einhaltung gleicher Bedingungen bei allen Bestimmungen und unter Berücksichtigung der qualitativen Befunde, durchaus Differenzen im Funktionszustand von Zellgruppen in Zahlenwerten faßbar machen.

Die so ermittelten Zahlen sind also keine Absolutwerte, sondern relative, nur innerhalb eines Versuchssystems vergleichbare Werte.

Vergleiche mit den Zahlen anderer Autoren können — wie auch bei den meisten bisher angewandten quantitativen Methoden — natürlich nur unter großem Vorbehalt vorgenom-

men werden. Aus demselben Grund wurden die Gruppen 3 und 4 nicht in diesen quantitativen Vergleich miteinbezogen (zeitliche Differenz s.o.).

Ausgezählt wurden insgesamt 47 345 Zellen. Die Zahl der ausgezählten Inseln richtete sich nach der Schnittgröße und war von Tier zu Tier unterschiedlich, sie lag in der Mehrzahl der Fälle über der geforderten Zahl von 40—50 Inseln (Ferner, 1952, 1958). Die Zahl der ausgezählten Zellen pro Tier schwankte ebenfalls, lag aber bei fast allen Tieren über den geforderten 2000 Zellen (Hultquist *et al.*, 1948; Hellman, 1959a; Ferner, 1952) und betrug bis zu 7000 Zellen pro Tier.

Die ausgezählten Werte wurden statistisch ausgewertet. Von jedem Tier wurde die durchschnittliche Anzahl der Zellen pro Insel, die durchschnittliche Anzahl der A- und der B-Zellen, der prozentuale Anteil dieser Zellen und die B/A -Ratio bestimmt.

Außerdem wurden diese Werte getrennt für die Gruppe der Kontrolltiere und die Gruppe der Kaliummangeltiere ermittelt.

Die Berechnung der Durchschnittswerte erfolgte nach der Formel

$$\overline{B/A} = \left(\sum_{i=1}^n (B_i/A_i) / \Delta (B_i/A_i) \right) / \sum_{i=1}^n (1/\Delta (B_i/A_i)).$$

Wobei B_i/A_i = die Ratio für das i 'te Tier,

$\Delta (B_i/A_i)$ = der statistische Fehler dieser Ratio und

n = die Anzahl der untersuchten Tiere ist.

Der Fehler wurde berechnet aus:

$$\Delta (\overline{B/A}) = \left(\sqrt{\sum_{i=1}^n ((\overline{B/A}) - (B_i/A_i))^2} \right) / n.$$

Zum Vergleich der beiden Gruppen wurde das verteilungsunabhängige Randomisierungsverfahren angewendet (Pfanzagl, 1966).

Ergebnisse

A. Allgemeines

Unter den Versuchsbedingungen nahmen die Normaltiere durchschnittlich 25 g zu, während die Kaliummangeltiere und die kaliumsubstituierten Kaliummangeldiättiere nur 9 g zunahmen. Die Blutkaliumwerte der Kaliummangeltiere betrugen durchschnittlich 2,4 mg-%, die der Normaltiere 5,4 mg-%, die Werte der kaliumsubstituierten Tiere lagen um ein geringes höher als bei den Normaltieren. Die Kaliummangeltiere zeigten erhöhte Blutzuckerwerte, durchschnittlich 104 mg-%, gegenüber den Vergleichstieren (83 mg-%) der Gruppe 1. Die Normaltiere der Gruppe 4 zeigten höhere Blutzuckerwerte als die Normaltiere der Gruppe 1 (im Durchschnitt 125 mg-%), die kaliumsubstituierten Tiere der Gruppe 3 waren gegenüber der Vergleichsgruppe 4 erniedrigt, im Durchschnitt 94 mg-%.

Die Calciumwerte aller Gruppen lagen zwischen 5,4 und 6,2 mg-%.

Der Insulinanstieg nach Glucosebelastung war bei den Kaliummangeltieren vermindert, der Insulingesamtgehalt des Pankreas war bei beiden Gruppen etwa gleich. Die intra- und extracellulären Kaliumkonzentrationen im Pankreas waren im Kaliummangel signifikant erniedrigt. Diese Werte und die Bestimmungsmethoden werden in einer Arbeit über die Elektrolytverteilung im Kaliummangel im einzelnen aufgeschlüsselt und besprochen (Kaess *et al.*, in Vorbereitung).

B. Histologische Ergebnisse

1. Exokrines Pankreas

Es finden sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen. Die Acinusstruktur ist klar und typisch. Es besteht kein interstitielles Ödem oder eine Fibrose. Granulocytäre oder rundzellige Infiltrate fehlen. Die

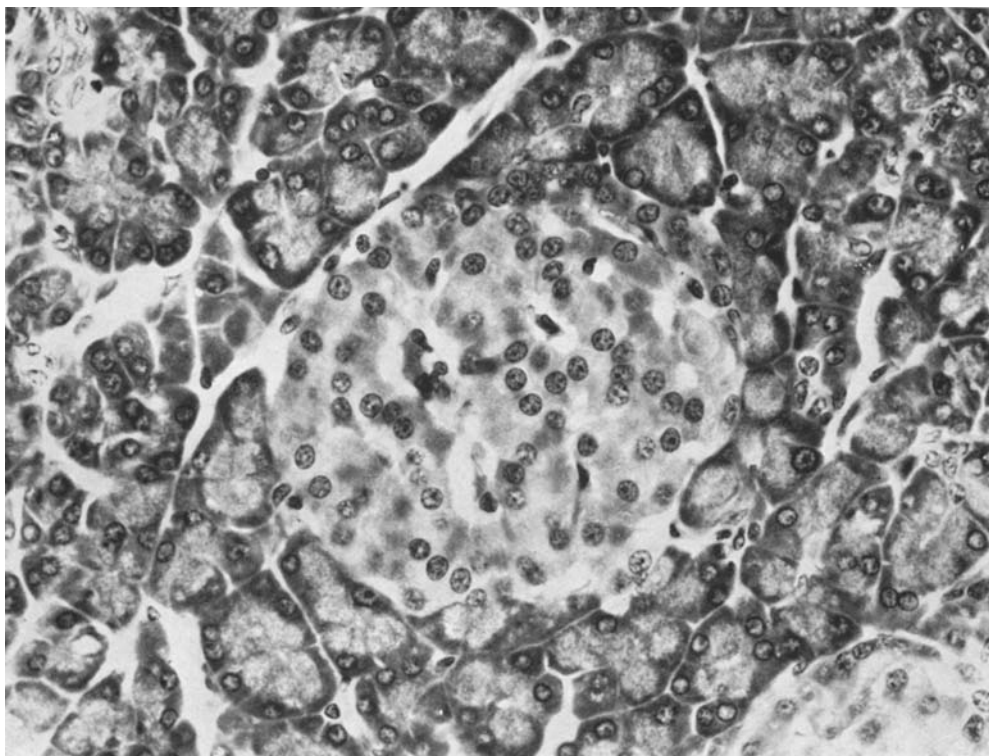


Abb. 1. Langerhanssche Insel mit nur wenigen A-Zellen. Nur an einer Stelle geschlossener Saum dicht stehender A-Zellkerne, spärliches, wenig granuliertes Cytoplasma. Bei den übrigen peripher gelegenen Kernen ist eine Abgrenzung gegenüber Capillarendothelien oder Bindegewebszellen schwierig. Normaltier Nr. 4+, Chromhämatoxylin-Phloxinfärbung. Vergr. 1:400

Acinuszellen zeigen basal ein dunkelgefärbtes Cytoplasma und apikal typische dicht an dicht liegende Cymogengranula, welche tryptophanpositiv sind, d.h. die Zellen befinden sich nach 18stündigem Hungern im „Stapelstadium“. Die Ausführungsgänge zeigen keinerlei Besonderheiten.

2. Endokrines Pankreas

Die Langerhansschen Inseln der Versuchstiergruppen zeigen typische Unterschiede ihrer A-Zellfunktionsbilder. Bei allen 3 Kontrolltiergruppen besitzen die Inseln nur einen dünnen A-Zellen-Mantel, welcher meist nicht geschlossen und kaum stärker als 1—2 Zellagen ist. Nur vereinzelt finden sich A-Zellpolster (bei „Kappenschnittführung“, Ferner, 1952; Ferner und Runge, 1955).

Die periphere Anordnung der A-Zellen ist für die Ratte typisch (vgl. Ferner, 1952; Korps und LeCompte, 1955; Doerr und Becker, 1958; Marzotko *et al.*, 1971).

Die A-Zellen sind von länglicher Form und kleiner als die B-Zellen, was charakteristisch sein soll (Ferner, 1952). Sie besitzen ein nur überaus spärliches Cyto-

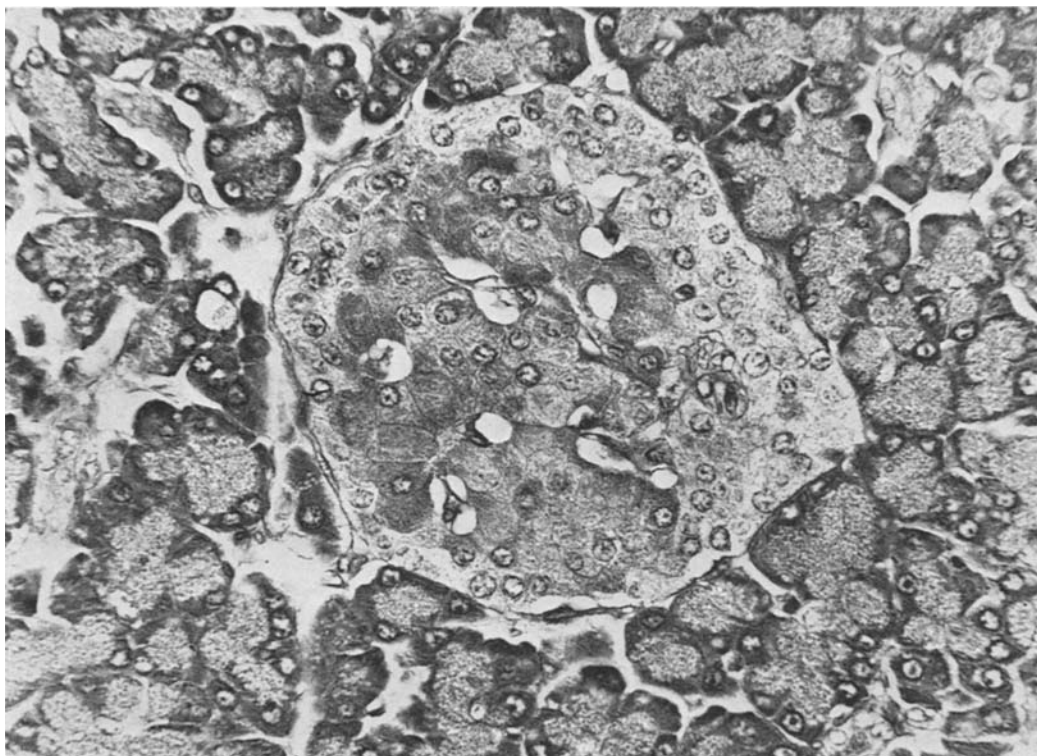


Abb. 2. Langerhanssche Insel mit breitem, fast geschlossenem A-Zellensaum. Große, gut granulierte Zelleiber z. T. mehrreihig liegend. Kaliummangeltier Nr. 2—, Chromhämatoxylin-Phloxin. Vergr. 1:400

plasma, welches nur wenige oder oft gar keine Granula enthält. Häufig ist zwischen den dicht liegenden Kernen überhaupt kein Cytoplasma erkennbar. Der A-Zellensaum ist bei den Normaltieren der Gruppe 1 besonders spärlich (vgl. Abb. 1), bei den Normaltieren der Gruppe 4 etwas stärker ausgeprägt und besser granuliert. Die kaliumsubstituierten Kaliummangeldiättiere der Gruppe 3 zeigen eine zwischen beiden liegende Entfaltung und Ausprägung des A-Zellenmantels.

Bei starker Vergrößerung findet sich im Cytoplasma der A-Zellen der meisten Inseln bei Silberimprägnation nach Bodian bei den Kontrolltieren eine feine staubartige argyrophile Granulierung (Abb. 3a und 3b, vgl. Ferner, 1952). Sie ist bei der Gruppe 1 besonders deutlich, bei den Tieren der Gruppen 3 und 4 schwächer und wechselnd ausgeprägt. Wenn diese argyrophile Granulierung bei einer Insel vorhanden ist, sind praktisch alle A-Zellen dieser Insel betroffen.

Hamperl (1952) fand bei den A-Zellen der Ratte nach seiner Methode keinerlei Argyrophilie. Auch unsere Befunde genügen nicht den von Hultquist *et al.* (1948) aufgestellten Kriterien einer echten Argyrophilie.

Bei den Kaliummangeltieren der Gruppe 2 fällt gegenüber den Kontrollgruppen eine Vergrößerung und Entfaltung des A-Zellenmantels der Inseln auf (Abb. 2).

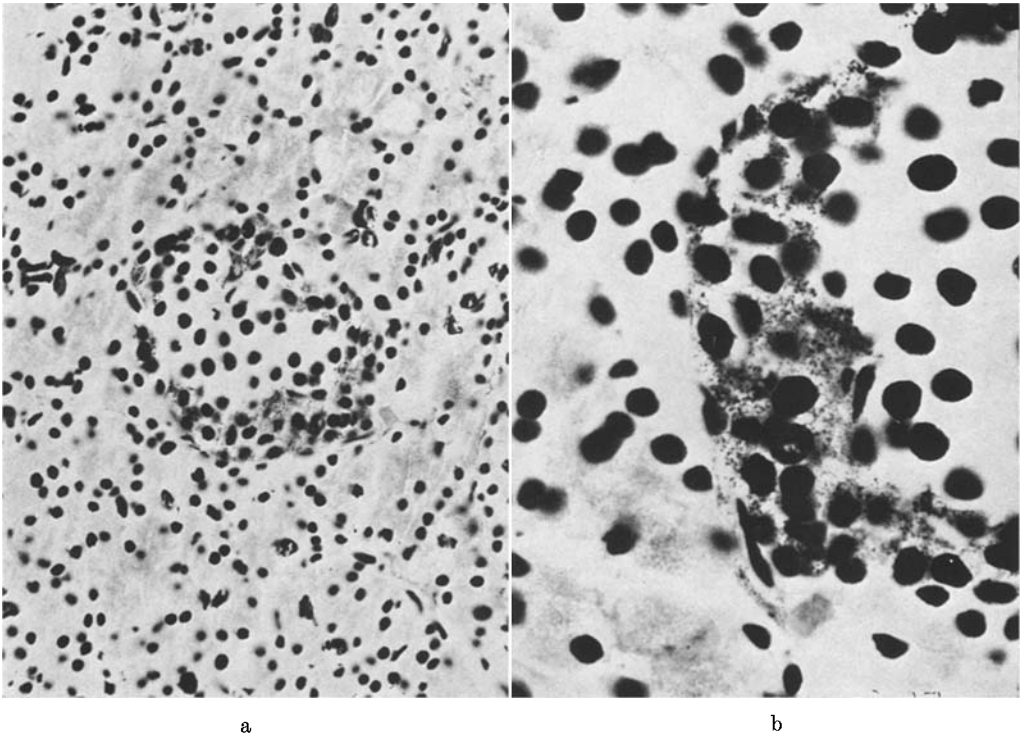


Abb. 3a u. b. Langerhanssche Insel eines Normaltieres bei Versilberung. Normaltier 8+. a Dicht gelagerte A-Zellkerne markieren deutlich die Insel. Versilberung nach Bodian. Vergr. 1:400. b Argyrophile Cytoplasmacinlagerungen in den A-Zellen bei starker Vergrößerung. Versilberung nach Bodian. Vergr. 1:1000 (Abb. 3a u. b verkleinert auf $\frac{2}{3}$)

Die Kerne erscheinen leicht vergrößert, das Cytoplasma ist entfaltet und immer dicht und reichlich granuliert, so daß die Zellen eine rundliche Form annehmen. Sie bilden oft einen mehrere Zelllagen breiten Saum. Häufig finden sich an einer oder mehreren Stellen breite polsterartige Verdickungen der A-Zellschichten, oft in Verbindung mit kleinen Ductuli. Fast jedem dargestellten Zellkern kann ein klar begrenztes Areal typisch gefärbten Cytoplasmas zugeordnet werden.

In der Versilberung nach Bodian erkennt man bei den Kaliummangeltieren die Inseln nur schwer, denn der dichtere A-Zellkernsaum fehlt, die Kerne der A-Zellen haben fast die Größe und den Abstand der umliegenden acinären Kerne einerseits und der B-Zellkerne andererseits. Außerdem fehlen — trotz gleicher histo-technischer Behandlung — hier bis auf wenige Ausnahmen die geschilderten silberpositiven Cytoplasmabestandteile (Abb. 4).

Anzeichen für Mitosen der A-Zellen fehlen bei allen Versuchstiergruppen.

Die Versilberung der gastrinproduzierenden (Dawson, 1970; Greider und McGuigan, 1971) A1-Zellen nach der Methode von Hellerström und Hellman (1960) ergab nur eine sehr schwache Imprägnation der Zellen. Der Grund ist wahrscheinlich die Fixierung des Gewebes unmittelbar nach Entnahme. Postmortale Veränderungen begünstigen bis zu einem gewissen Grade die Versilberung (Ferner, 1952;

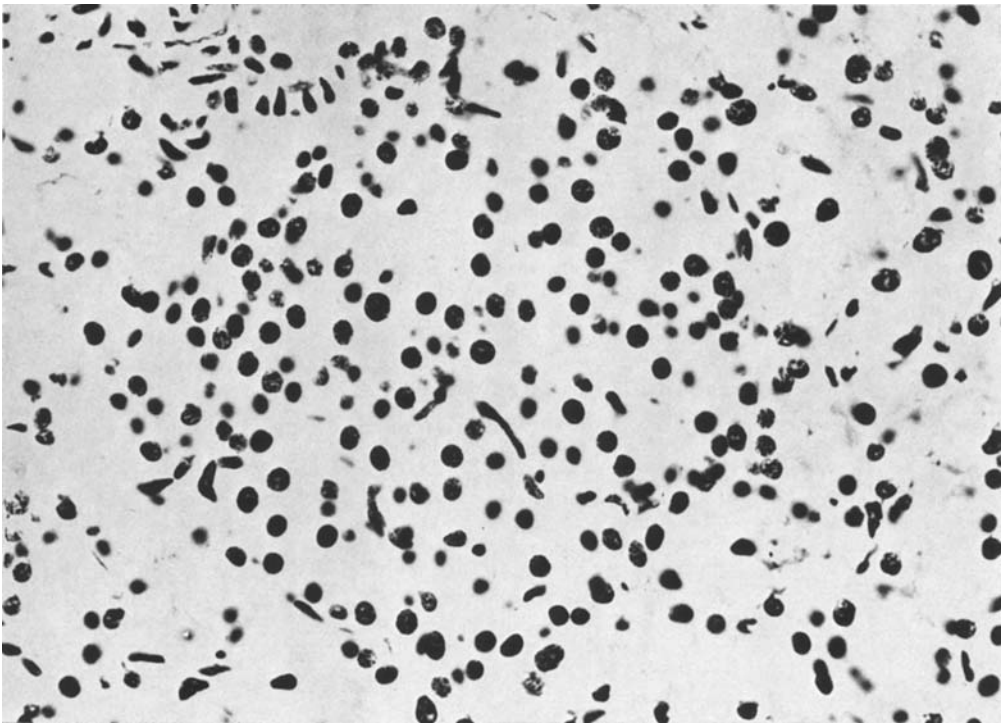


Abb. 4. Langerhanssche Insel eines Kaliummangeltieres bei Versilberung. Weit auseinanderstehende A-Zellkerne bei fehlenden argyrophilen Einlagerungen im Cytoplasma machen eine Abgrenzung der Insel schwierig. Kaliummangeltier 1—, Versilberung nach Bodian. Vergr. 1:400

Hellerström und Hellman, 1960). Bei allen Versuchstiergruppen stellen sich nur sehr wenige A1-Zellen dar, meist sind sie einzeln zwischen B- und A2-Zellen gelegen, wie dies für die Ratte typisch ist (Hellman, 1961; Alm und Hellman, 1964; Hellerström *et al.*, 1964).

Die vergrößerten und vermehrten A-Zellen der Inseln bei den Kaliummangel-tieren zeigen hierbei keinerlei Argyrophilie — es handelt sich somit um glucagon-produzierende A2-Zellen (Hellerström und Hellman, 1962; Hellerström *et al.*, 1964).

Die B-Zellen aller vier Versuchsgruppen zeigen keine erkennbaren Unterschiede. Sie erscheinen gleich groß, mit unauffälligen Kernen und normal granuliertem Cytoplasma typischer Anfärbbarkeit.

Das residuale Inselgewebe und der Faseranteil ist bei allen Gruppen — entsprechend der Jugendlichkeit der Ratten (Hellman, 1959d) — sehr spärlich und zeigt keine Differenzen.

Die ausgezählten Durchschnittswerte der A- und B-Zellen bei den einzelnen Tieren der Gruppen 1 und 2 sind in Tabelle 1 aufgestellt.

Die durchschnittlichen, gewichteten Werte der beiden Gruppen sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 1. Durchschnittswerte der einzelnen Versuchstiere. + = Normaltiere, — = Kaliummangeltiere

Versuchstier	Zellzahl pro Insel	A-Zellen		B-Zellen		B/A Ratio
		Zahl/Insel	prozentual	Zahl/Insel	prozentual	
+ 1	57	$13,8 \pm 0,6$	$24,1 \pm 1,1$	$43,4 \pm 1,1$	$75,9 \pm 1,9$	$3,15 \pm 0,16$
+ 2	48	$10,4 \pm 0,4$	$21,8 \pm 0,9$	$37,2 \pm 0,8$	$78,2 \pm 1,6$	$3,58 \pm 0,16$
+ 3	79	$19,7 \pm 0,5$	$25,0 \pm 0,6$	$58,9 \pm 0,9$	$75,0 \pm 1,1$	$2,99 \pm 0,09$
+ 4	31	$6,5 \pm 0,3$	$21,2 \pm 0,9$	$24,2 \pm 0,5$	$78,8 \pm 1,7$	$3,72 \pm 0,17$
+ 5	51	$11,6 \pm 0,5$	$22,6 \pm 0,9$	$39,8 \pm 0,8$	$77,4 \pm 1,6$	$3,42 \pm 0,15$
+ 6	32	$10,8 \pm 0,5$	$33,2 \pm 1,4$	$21,6 \pm 0,6$	$66,8 \pm 2,0$	$2,01 \pm 0,10$
+ 7	61	$15,6 \pm 0,6$	$25,7 \pm 1,0$	$45,1 \pm 1,0$	$74,3 \pm 1,6$	$2,88 \pm 0,13$
+ 8	32	$4,9 \pm 0,3$	$15,2 \pm 1,0$	$27,4 \pm 0,8$	$84,8 \pm 2,4$	$5,57 \pm 0,40$
+ 9	51	$13,2 \pm 0,3$	$25,9 \pm 0,7$	$37,8 \pm 0,6$	$74,1 \pm 1,1$	$2,86 \pm 0,08$
+ 10	45	$13,3 \pm 0,5$	$29,7 \pm 1,1$	$31,4 \pm 0,8$	$70,3 \pm 1,7$	$2,36 \pm 0,11$
— 1	55	$21,9 \pm 1,3$	$39,6 \pm 2,3$	$33,4 \pm 1,6$	$60,4 \pm 2,9$	$1,53 \pm 0,12$
— 2	70	$27,9 \pm 0,8$	$40,0 \pm 1,1$	$42,0 \pm 0,9$	$60,0 \pm 1,4$	$1,50 \pm 0,05$
— 3	62	$19,6 \pm 0,7$	$31,4 \pm 1,1$	$42,8 \pm 1,1$	$68,6 \pm 1,7$	$2,19 \pm 0,10$
— 4	107	$46,1 \pm 1,7$	$43,1 \pm 1,6$	$60,9 \pm 1,9$	$56,9 \pm 1,8$	$1,32 \pm 0,06$
— 5	59	$16,8 \pm 0,8$	$28,3 \pm 1,3$	$42,6 \pm 1,2$	$71,7 \pm 2,0$	$2,54 \pm 0,14$
— 6	75	$27,2 \pm 0,9$	$36,3 \pm 1,2$	$47,7 \pm 1,2$	$63,7 \pm 1,5$	$1,76 \pm 0,07$
— 7	41	$11,7 \pm 0,7$	$28,7 \pm 1,6$	$28,9 \pm 1,0$	$71,3 \pm 2,5$	$2,48 \pm 0,17$
— 8	57	$25,3 \pm 0,8$	$44,2 \pm 1,4$	$32,0 \pm 0,9$	$55,8 \pm 1,5$	$1,26 \pm 0,05$

Tabelle 2. Durchschnittswerte der beiden Versuchsgruppen

Versuchsgruppe	Zellzahl pro Insel	A-Zellen		B-Zellen		B/A Ratio
		Zahl/Insel	prozentual	Zahl/Insel	prozentual	
Kontrolle	49	$12,1 \pm 0,1$	$24,7 \pm 0,3$	$36,8 \pm 0,2$	$75,3 \pm 0,5$	$3,00 \pm 0,30$
K-Mangel	65	$23,9 \pm 0,3$	$37,0 \pm 0,5$	$40,7 \pm 0,4$	$63,0 \pm 0,6$	$1,67 \pm 0,18$

Es zeigt sich, daß die B-Zellen trotz erheblicher Schwankungen in den einzelnen Inseln, bei beiden Gruppen durchschnittlich fast in gleicher Anzahl pro Insel gefunden werden (40 bzw. 36 pro Insel). Dies bestätigt den oben erhobenen Befund.

Andererseits ist die Zahl der A-Zellen pro Insel bei den Kaliummangeltieren erhöht (24 gegenüber 12 Zellen pro Insel), wodurch bei gleicher B-Zellzahl eine niedrigere B/A Ratio resultiert. Beim Vergleich der B/A Ratio der beiden Gruppen ergibt sich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,001$, ein signifikanter Unterschied zwischen diesen Gruppen.

Korreliert man die B/A Ratio zu den übrigen Meßwerten der einzelnen Tiere (Calciumspiegel, Kaliumspiegel, Gewicht, Pankreasgewicht, Blutzuckerwerte), so lassen sich keine sicheren Beziehungen finden. Dies stimmt mit den Befunden von Hellman (1959e) überein.

Diskussion

Bei einer einfachen, unkorrigierten Auszählung (s. Methodik) der Inselzellen fanden wir bei unveränderten B-Zellzahlen eine statistisch signifikante Vermehrung der A-Zellen bei den Kaliummangeltieren. Wir glauben, daß alle drei Faktoren, welche das Zahlenergebnis beeinflussen, einen nach den qualitativen Befunden zu bewertenden Einfluß auf das Ergebnis haben:

1. Den entscheidenden Faktor stellt offenbar die Tatsache dar, daß die A-Zellen der Kaliummangeltiere größer sind. Dies führt zu einer Überrepräsentation dieser Zellen bei der Auszählung.

2. Einen sicher wichtigen Anteil bei der Vermehrung der A-Zellzahlen spielt der Faktor der Identifizierbarkeit. Bei den Kontrolltieren liegen die A-Zellkerne sehr dicht. Cytoplasma ist den Kernen oft nicht eindeutig zuzuordnen, auch ist die Granulierung oft spärlich oder fehlend. Dies führt zu niedrigeren Werten.

3. Fraglich ist, ob tatsächlich eine numerische Vermehrung der A-Zellen vorliegt. Auffällig ist die Entfaltung kleiner Ductuli meist an Stellen, an denen deutliche A-Zellpolster zu sehen sind. Man könnte annehmen, daß an diesen Stellen eine Transformation von A-Zellen aus Ductulusepithelien (A-Zellsproßbildung, Burkhardt, 1936; Ferner, 1952; Korps und LeCompte, 1955; Seifert, 1958) stattfindet. Wahrscheinlich aber treten die Ductuli erst durch Entfaltung der in ihrem Epithel gelegenen A-Zellen in Erscheinung, bei Kollaps der A-Zellen sind sie nur spaltförmig zwischen den umliegenden Zellen gelegen und nicht als solche erkennbar. Eine funktionelle Bedeutung dieser am Rand oder in den Inseln gelegenen Ductuli ist fraglich.

Für die sonst noch diskutierten Arten der Inselzellvermehrung (Mitose, acino-insuläre Transformation, Transformation aus anderen Inselzellen; vgl. Lazarus und Volk, 1958; Seifert, 1958; Creutzfeldt, 1958; Hellman *et al.*, 1964; Faller, 1969; Mikami und Mutoh, 1971) finden wir bei unseren Versuchstieren keinen Anhalt. Auch erscheint es ausgeschlossen, daß entgranulierte B-Zellen als A-Zellen imponierten und dadurch eine A-Zellvermehrung vorgetäuscht wurde (Ferner, 1952), denn dies hätte auch „A-Zellen“ im Innern der Inseln entstehen lassen müssen.

Die Vergrößerung der A-Zellen und das Vorhandensein gut angefarbter Granula läßt auf eine veränderte Aktivität dieser Zellen bei den Kaliummangeltieren gegenüber den Normaltieren schließen. Daß die A-Zellen sich in einem unterschiedlichen Funktionsstadium befinden, wird durch den Befund der Versilberung nach Bodian deutlich. Warum bei den Kaliummangeltieren, die eindeutig mehr Granula enthalten, sich keine oder nur eine sehr geringe argyrophile Granulierung findet, läßt sich nicht sagen. Die Argyrophilie, wie auch die Färbbarkeit der Sekretgranula beruht allerdings nicht auf der Anwesenheit des Hormons, sondern auf Eigenschaften der Lipoproteinhülle (Greider *et al.*, 1969; Polak *et al.*, 1971) und gilt als chemisch unspezifisch (Dawson, 1970). Sie ist möglicherweise in verschiedenen Funktionsstadien inkonstant (Greider und McGuigan, 1971).

Entscheidend ist die Frage, ob die Veränderung des Funktionsstadiums der A-Zellen eine spezifische Folge des Kaliummangels ist oder ob andere Faktoren eine Rolle hierbei spielen.

Die Zusammenstellung der Tiergruppen war zufällig. Geringe Altersunterschiede haben auf die B/A Ratio außer bei sehr jungen Ratten keinen Einfluß (Hellman, 1959d, e). Eine

Führung der histologischen Schnitte durch verschiedene Pankreasteile — wie es bei einer zufälligen Schnittführung der Fall sein könnte, kann zwar eine unterschiedliche Inseldichte (Schwanz dichter als Kopf) zur Folge haben, die B/A Ratio ist aber in allen Teilen des Pankreas konstant (Hultquist *et al.*, 1948; Kracht, 1958; Hellman, 1959b).

Kaliummangel allein soll wachstumsbegrenzend sein (Follis *et al.*, 1942, bei Doppelfütterung; Smith *et al.*, 1950). Nach den Angaben beider Autoren beobachtet man dies jedoch erst nach einer längeren Versuchsdauer (bei Follis *et al.* von 87 Tagen).

Bei den hier geschilderten Versuchen (Versuchsdauer 14 Tage) dürfte die geringere Gewichtszunahme nicht auf dem Kaliummangel beruhen, sondern auf einer geringeren Nahrungsaufnahme sowohl bei den Kaliummangeltieren, als auch bei den kaliumsubstituierten Kaliummangeldiättieren. Eine wesentliche Unterernährung bestand aber bei beiden Gruppen nicht, eine — allerdings geringere — Gewichtszunahme bzw. ein Wachstum war unter der Diät möglich. Die Tatsache, daß die Tiere, welche bei Kaliummangeldiät mit kaliumchloridhaltigem Trinkwasser substituiert wurden und leicht erhöhte Kaliumwerte zeigten (Gruppe 3), im Verhältnis zu den Normaltieren der Gruppe 4 eher eine geringere Entfaltung der A-Zellen zeigen — also gerade im entgegengesetzten Sinne, wie die Kaliummangeltiere reagieren —, spricht dafür, daß es sich hierbei nicht um die Folge einer Unterernährung wegen biologischer oder kalorischer Minderwertigkeit der Diät handelt, sondern um eine spezifische Folge des Kaliummangels.

Aufgrund dieser Überlegungen und in Anbetracht der geringeren Entfaltung und Granulierung der A-Zellen bei allen drei Gruppen ohne Kaliummangel, erscheint es gerechtfertigt, die Vergrößerung der A-Zellen bei den Kaliummangeltieren als spezifische Folge des Kaliummangels anzusehen — sei es direkt oder über zwischengeschaltete Mechanismen des Stoffwechsels oder des Endocriniums.

Schwierig ist ein Deutungsversuch dieses Befundes. Der Schluß von einem morphologischen Befund auf funktionelle Vorgänge ist selbstverständlich problematisch und es können zwangsläufig nur einige Hinweise auf Erklärungsmöglichkeiten gegeben werden.

Der Befund einer A-Zellvergrößerung mit vermehrten Sekretgranula („A-Zellaktivierung“) erlaubt grundsätzlich zwei Deutungsmöglichkeiten (vgl. Kracht, 1958a, b; Seifert, 1958):

1. Gesteigerte Hormonsynthese bei gleichbleibender oder erhöhter Sekretion,
2. gleichbleibende (oder erhöhte) Synthese bei Sekretionsstop oder Sekretionsverminderung.

Wenn man die Vergrößerung der A-Zellen im Kaliummangel als Zeichen einer Sekretionssteigerung dieser Zellen auffaßt, müßte man einen erhöhten Glucagonspiegel im Kaliummangel erwarten. Für eine solche Annahme könnte sprechen, daß beim Diabetes mellitus, der ebenso wie der Kaliummangel einen Insulinmangelzustand darstellt (s.o.), von Unger *et al.* (1970) und von Müller *et al.* (1970) eine absolute oder relative Hyperglucagonämie festgestellt wurde. Während der Glucagonspiegel bei normalen Personen in der Hyperglykämie sinkt, steigt er bei Diabetikern an. Dieselbe Arbeitsgruppe fand auch im Experiment am Hund, daß die Senkung des Glucagonspiegels durch eine Hyperglykämie ausbleibt, wenn ein schwerer Alloxan-Insulinmangel erzeugt wird (Müller *et al.*, 1971). Ob allerdings

der Insulinmangel beim Diabetes mit dem des Kaliummangels vergleichbar ist, erscheint fraglich. Auch die genannte Arbeitsgruppe glaubt, aufgrund ihrer Befunde, daß noch andere Faktoren beim Diabetes die „Insulin-A-Zell-Interaction“ stören, sie nennen als Möglichkeiten eine primäre Insensitivität der A-Zellen, oder Diffusionsstörungen in den Inseln durch verdickte Basalmembranen.

Demgegenüber könnte die Annahme einer Sekretionsverminderung oder eines Sekretionsstops im Kaliummangel die Befunde sowohl an den A-Zellen als auch an den B-Zellen erklären.

Bei den Tieren mit nicht erniedrigten Kaliumwerten (Normaltiere und kaliumsubstituierte Tiere, Gruppe 1, 3 und 4) sind die A-Zellen nach 18stündigem Hungern klein, kollabiert und degranuliert. Hokfelt und Hultquist (1958) beschreiben beim Kaninchen nach 15stündigem Hungern mit Hypoglykämie der Tiere ebenfalls eine Reduktion der Färbbarkeit, bzw. eine Degranulierung der A-Zellen. Sie deuteten dies als „state of hyperactivity“. Man darf also annehmen, daß es durch die Hypoglykämie oder andere Veränderungen im Hungerzustand zu einer Ausschleusung des in den Granula enthaltenen Hormons — Glucagon — gekommen ist, wie dies auch von Hokfelt und Hultquist vermutet wurde.

Die Abgabe des Hormons und damit die Degranulierung der A-Zellen bleibt nach unseren Befunden bei den Tieren im Kaliummangel offenbar aus. Die A-Zellen bleiben groß und entfaltet, mit reichlich Granula im Cytoplasma.

Dies könnte einmal als Folge des im Kaliummangel erhöhten Blutglucosespiegels erklärt werden und wäre damit eine Folge des erniedrigten Insulinspiegels. Allerdings zeigten die Normaltiere der Gruppe 4, bei denen von allen Tieren die höchsten Blutzuckerwerte gemessen wurden (es wurde jeweils nur eine Bestimmung zum Zeitpunkt des Todes gemacht, keine Verlaufskontrollen), ebenfalls eine weitgehende Verkleinerung und Degranulierung der A-Zellen — wenn auch in geringerem Maße als die Normaltiere der Gruppe 1 mit sehr niedrigen Blutzuckerwerten.

Andererseits ist es durchaus denkbar, daß der Kaliummangel über denselben Mechanismus, durch den er eine Ausschleusung des Insulins aus den B-Zellen behindert (s. o.), auch eine Ausschleusung des Glucagons aus den A-Zellen beeinträchtigt.

Unterschiedliche Eigenschaften der Granulamembranen (unterschiedliche Argyrophilie) im Kaliummangelzustand und bei Normaltieren könnten auf eine solche Wirkung hindeuten.

Anders verhalten sich die B-Zellen: Bei den 18 Std hungernden Kontrolltieren bestand kein Grund zur Insulinabgabe, ebensowenig wie bei den hungernden Kaliummangeltieren, bei denen außerdem eine Beeinträchtigung der Insulinsekretionsfähigkeit durch den Kaliummangel bestand. Entsprechend finden sich bei *allen* Tiergruppen gut granulierte und entfaltete B-Zellen, die Auszählung ergab im Durchschnitt gleiche Zellzahlen pro Insel. Dazu paßt auch, daß der Gesamtinsulingehalt des Pankreas bei Normaltieren und Kaliummangeltieren unverändert war (s. Kaess *et al.*, in Vorb.).

Weitere Untersuchungen werden klären müssen, ob der morphologische Befund einer A-Zellvergrößerung funktionell eine Parallele in einem erniedrigten — oder möglicherweise auch erhöhten — Glucagonspiegel findet und ob ein Teil der Symptome des Kaliummangels auf einem durch Sekretionshemmung hervorgerufenen Hypoglucagonismus beruht.

Die vorliegenden Befunde werfen die Frage auf, ob eine Veränderung des Glucagonspiegels mit den übrigen bekannten Befunden im Kaliummangel zu vereinbaren ist, und inwieweit die Befunde des Kaliummangelsyndroms sich auch durch einen hierdurch veränderten Glucagonspiegel erklären lassen.

Literatur

- Adams, C. W. M.: A histochemical method for tryptophan applicable to formalin fixed tissues. *J. Path. Bact.* **80**, 442—445 (1960).
- Alm, G., Hellman, B.: Distribution of the two types of a cells in the pancreatic islets of some mammalian species. *Acta endocr. (Kbh.)* **46**, 307—316 (1964).
- Bargmann, W.: Funktionelle Morphologie des inkretorischen Regulationssystems, V, 8. Der Inselapparat der Bauchspeicheldrüse. In: *Handbuch der Allgemeinen Pathologie*, Bd. VIII, Teil 1, S. 61—72. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1971.
- Bartelheimer, H. K., Losert, W., Senft, G., Sitt, R.: Störungen des Kohlehydratstoffwechsels im Kaliummangel. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.* **258**, 391—408 (1967).
- Berg, G.: *Histologische Labortechnik*. München: J. F. Lehmanns 1972.
- Burkhardt, L.: Inselneubildung im Pankreas bei Stenose des Ausführungsganges durch Pankreaskopfcarcinom. *Virchows Arch. path. Anat.* **296**, 655—665 (1936).
- Conn, J. W.: Hypertension, the potassium ion and impaired carbohydrate tolerance. *New Engl. J. Med.* **273**, 1135—1143 (1965).
- Creutzfeldt, W.: Die pathologische Morphologie der Langerhans'schen Inseln im Experiment, besonders beim experimentellen Diabetes. *Verh. dtsh. path. Ges.* **42**, 85—106 (1958).
- Creutzfeldt, W., Theodossiou, A.: Die Relation der A- und B-Zellen in den Pankreasinseln bei Nichtdiabetikern und Diabetikern. *Beitr. path. Anat.* **117**, 235—252 (1957).
- Dawson, J.: The endocrine cells of the gastrointestinal tract. *Histochem. J.* **2**, 527—549 (1970).
- Doerr, W.: *Spezielle pathologische Anatomie II*, S. 329—339. Heidelberg-New York: Springer 1970.
- Doerr, W., Becker, V.: Die Bauchspeicheldrüse. In: *Pathologie der Laboratoriumstiere* (eds. P. Cohrs, R. Jaffé, H. Meessen), Bd. I. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.
- Faller, A.: Elektronenmikroskopische Differenzierung verschiedener Inselzelltypen im Pankreas normaler Albinoratten. *Z. Zellforsch.* **97**, 226—248 (1969).
- Ferner, H.: *Das Inselnystem des Pankreas*. Stuttgart: G. Thieme 1952.
- Ferner, H.: Die orthologische Histologie und Cytologie der Langerhans'schen Inseln. *Verh. dtsh. path. Ges.* **42**, 25—41 (1958).
- Ferner, H., Runge, W.: Die Wirkung des Synthalin A auf das A-Zellsystem des Inselorgans bei der Ratte in den ersten Lebenstagen. *Z. Zellforsch.* **43**, 1—7 (1955).
- Follis, R. H., Orent-Keiles, E., McCollum, E. V.: The production of cardiac and renal lesions in rats by a diet extremely low in potassium. *Amer. J. Path.* **18**, 29—40 (1942).
- Gepts, W.: Die histopathologischen Veränderungen der Langerhans'schen Inseln und ihre Bedeutung in der Frage der Pathogenese des menschlichen Diabetes. *Endokrinologie* **36**, 185—211 (1958).
- Gorden, Ph., Sherman, B. M., Sinopoulos, A. P.: Glucose intolerance with hypokalemia: An increased proportion of circulating proinsulin-like components. *J. clin. Endocr.* **34**, 235—240 (1972).
- Greider, M. H., Howell, S. L., Lacy, P. E.: Isolation and properties of secretory granules from rat islets of Langerhans. *J. Cell. Biol.* **41**, 162—166 (1969).
- Greider, M. H., McGuigan, J. E.: Cellular localisation of gastrin in the human pancreas. *Diabetes* **20**, 389—396 (1971).
- Hamperl, H.: Über argyrophile Zellen. *Virchows Arch. path. Anat.* **321**, 482—507 (1952).
- Hellerström, C., Hellman, B.: Some aspects of silver impregnation of the islets of Langerhans in the rat. *Acta endocrin. (Kbh.)* **35**, 518—532 (1960).
- Hellerström, C., Hellman, B.: Reactions of the two types of A cells in the islets of Langerhans after administration of glucagon. *Acta endocrin. (Kbh.)* **41**, 116—122 (1962).

- Hellerström, C., Hellman, B., Petersson, B., Alm, G.: The two types of pancreatic A-cells and their relation to the glucagon secretion. In: S. E. Brolin, B. Hellman, H. Knutson (eds.). The structure and metabolism of the pancreatic islets, S. 117—130. Oxford: Pergamon Press 1964.
- Hellman, B.: Methodical aspects on the differential cell count of the islet tissue in the rat. *Acta path. microbiol. scand.* **45**, 336—346 (1959a).
- Hellman, B.: The volumetric distribution of the pancreatic islet tissue in young and old rats. *Acta endocrin. (Kbh.)* **31**, 91—106 (1959b).
- Hellman, B.: The effect of ageing on the number of the islets of Langerhans in the rat. *Acta endocrin. (Kbh.)* **32**, 78—91 (1959c).
- Hellman, B.: The effect of ageing on the total volumes of the A and B cells in the islets of Langerhans of the rat. *Acta endocrin. (Kbh.)* **32**, 92—112 (1959d).
- Hellman, B.: The relation between age and the B/A cell ratio in the islet tissue of the rat. *Acta endocrin. (Kbh.)* **31**, 80—90 (1959e).
- Hellman, B.: The numerical distribution of the islets of Langerhans at different ages of the rat. *Acta endocrin. (Kbh.)* **32**, 63—77 (1959f).
- Hellman, B.: Nuclear differences between the argyrophil (= A₁) and non argyrophil (= A₂) pancreatic A cells in the duck. *Acta endocrin. (Kbh.)* **36**, 603—608 (1961).
- Hellman, B., Hellerström, C.: Diurnal changes in the function of the pancreatic islets of rats as indicated by nuclear size in the islet cells. *Acta endocrin. (Kbh.)* **31**, 267—281 (1959).
- Hellman, B., Petersson, B., Hellerström, C.: The growth pattern of the endocrine pancreas in mammals. In: S. E. Brolin, B. Hellman, H. Knutson (eds.). The structure and metabolism of the pancreatic islets, S. 45—60. Oxford: Pergamon Press 1964.
- Hiatt, N., Davidson, M. B., Bonorris, G.: The effect of potassium chloride infusion on insulin secretion in vivo. *Hormone and metabolic Res.* **4**, 64—68 (1972).
- Hokfelt, B., Hultquist, G.: The influence of hypoglycemia on the histologic structure of the alpha cells in the pancreas. *Acta physiol. scand* **43**, 8—14 (1958).
- Howell, S. L., Taylor, K. W.: Potassium ions and the secretion of insulin by islets of Langerhans incubated *in vitro*. *Biochem. J.* **108**, 17—24 (1968).
- Hultquist, G. T., Dahlen, M., Helander, C. G.: Über die Technik bei Darstellung und Zählung der sog. Silberzellen in den Langerhans'schen Inseln. *Schweiz. Z. Path.* **11**, 570—589 (1948).
- Kaess, H., Ehlers, W., Burkhardt, A.: Distribution and insulin content in the pancreas of potassium deficient rats. (In Vorbereitung).
- Kaess, H., Schlierf, G., Ehlers, W., von Mikulicz-Radecki, J. G., Hassenstein, P., Walter, K., Breh, W., Hengstman, J.: The carbohydrate metabolism of normal subjects during potassium depletion. *Diabetologia* **7**, 82—86 (1971).
- Korps, W., LeCompte, Ph. M.: The nature and function of the alpha cells of the pancreas. *Diabetes* **4**, 347—366 (1955).
- Kracht, J.: Funktionszustände des Inselsystems. *Verh. dtsch. path. Ges.* **42**, 116—121 (1958a).
- Kracht, J.: Morphologische Kriterien zur Beurteilung der Inselaktivität. *Endokrinologie* **36**, 146—158 (1958b).
- Lazarus, S. S., Volk, B. W.: The effect of protracted glucagon administration on blood glucose and on pancreatic morphology. *Endocrinology* **63**, 359—371 (1958).
- Marzotko, D., Scharf, J.-H., Farr, I., Opitz, Chr., Schmidt, R., Liedel, H., Wetzig, H.: Quantitativ- und quantitativ-histologische Befunde am Inselorgan adulter Albinoratten nach Alteration endokriner Regelkreise. *Gegenbaurs morph. Jb.* **116**, 186—207 (1971).
- Mikami, S., Mutoh, K.: Light and electron-microscopic studies of the pancreatic islet cells in the chicken under normal and experimental conditions. *Z. Zellforsch.* **116**, 205—227 (1971).
- Mondon, C. E., Burton, S. A., Grodsky, G. M., Ishida, T.: Glucose tolerance and insulin response of potassium deficient rat and isolated liver. *Amer. J. Physiol.* **215**, 779—787 (1968).
- Müller, W. A., Faloona, G. R., Aguilar-Parada, E., Unger, R. H.: Abnormal alpha-cell function in diabetes. *New Engl. J. Med.* **283**, 109—115 (1970).
- Müller, W. A., Faloona, G. R., Unger, R. H.: The effect of experimental insulindeficiency on glucagon secretion. *J. clin. Invest.* **50**, 1992—1999 (1971).
- Pfanzagl, J.: Allgemeine Methodenlehre der Statistik, Bd. II. Berlin: De Gruyter 1966.

- Polak, J. M., Bloom, S., Conling, J., Pearse, A. G. E.: Immunfluorescent localization of secretin in the canine duodenum. *Gut* **12**, 605—610 (1971).
- Sagild, U., Andersen, V., Andreassen, P. B.: Glucose tolerance and insulin responsiveness in experimental potassium depletion. *Acta med. scand.* **169**, 243—251 (1961).
- Seifert, G.: Die pathologische Morphologie der Langerhans'schen Inseln, besonders beim Diabetes mellitus des Menschen. *Verh. dtsh. path. Ges.* **42**, 50—84 (1958).
- Smith, S. G., Black-Schaffer, B., Lasater, Th. E.: Potassium deficiency syndrome in the rat and the dog. *Arch. Path.* **49**, 185—199 (1950).
- Unger, R. H., Aguilar-Parada, E., Müller, W. A., Eisentraut, A. M.: Studies of pancreatic alpha cell function in normal and diabetic subjects. *J. clin. Invest.* **49**, 837—848 (1970).
- Wattenwyl, N. von: Neuere Differenzierungsmethoden der Langerhans'schen Inseln. *Path. et Microbiol. (Basel)* **27**, 144—156 (1964).

Dr. A. Burkhardt
Pathologisches Institut
der Universität
D-2000 Hamburg 20, Martinstr. 52
Bundesrepublik Deutschland