

Aus der
Abteilung Klinische Biochemie und Pathobiochemie
des Deutschen Diabetes Forschungsinstituts
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. D. Müller-Wieland

**β -Zellproliferation und β -Zelldegeneration
bei Hyperinsulinämie und Typ 2 Diabetes mellitus**
(Eine morphologische Studie am Modell der NZO Maus)

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
vorgelegt von
Carsten Lange

2003

**Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referentin: PD Dr. Junger
Korreferent: Prof. Dr. Schwenen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	S.1
2. Material und Methoden	S.5
2.1. Material	S.5
2.1.1. Puffer	S.5
2.1.2. Fixierungslösungen	S.5
2.1.3. Antikörper	S.5
2.1.4. Chromogen-Systeme	S.6
2.1.5. Weitere Chemikalien	S.6
2.1.6. Geräte und technische Hilfsmittel	S.6
2.2. Methoden	S.7
2.2.1. Tiere	S.7
2.2.2. Gewebeverarbeitung	S.7
2.2.3. Immunhistochemie	S.8
2.2.3.1. Immunenzymatische Doppelfärbung zur Identifizierung proliferierender β -Zellen	S.8
2.2.3.2. Doppelfärbung zur Identifizierung apoptotischer β - Zellen	S.13
2.2.4. Morphometrische Messungen	S.16
2.2.5. Statistische Methoden	S.19
3. Ergebnisse	S.20
3.1. Etablierung der Methode	S.20
3.1.1. Immunhistochemische Doppelfärbung zur Identifizierung proliferierender β -Zellen	S.20
3.1.2. Doppelfärbung zur Identifizierung apoptotischer β -Zellen	S.25

3.2. Entwicklung des Pankreas bei diabetischen und insulin-resistenten männlichen NZO Mäusen	S.26
3.2.1. Physiologische Charakteristika der Tiere	S.26
3.2.1.1. Körpergewicht (KG)	S.26
3.2.1.2. Blutglukose (BG) und immunreaktiver Insulinspiegel (IRI)	S.28
3.2.2. Morphologie des Pankreas	S.32
3.2.2.1. Volumenfraktion der Inseln ($V_{V_{Ins}}$), Inseldichte ($N_{A_{Ins}}$) und Hyperplasie der Inseln	S.32
3.2.2.2. Relation der Non- β - und β -Zell-Anteile sowie β -Zelldichte und β -Zellgröße	S.34
3.2.2.3. Morphologische Integrität der Langerhans'schen Inseln	S.39
3.2.3. Proliferation der β -Zellen	S.42
3.2.4. Apoptosen im exokrinen und endokrinen Pankreas	S.46
3.2.5. Korrelationen und Unterschiede	S.48
4. Diskussion	S.49
4.1. Diskussion der Methoden und der experimentellen Parameter	S.49
4.1.1. Tiermodell und Auswahl der Versuchstiere	S.49
4.1.2. Gewebeverarbeitung	S.50
4.1.3. Immunhistologie	S.51
4.1.3.1. Proliferation	S.51
4.1.3.2. Apoptose	S.55
4.2. Diskussion der Ergebnisse	S.58
5. Zusammenfassung	S.65
6. Literaturverzeichnis	S.66
7. Lebenslauf	S.74
8. Danksagung	S.75

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
BB	BioBreeding
BG	Blutglukose
BrdU	5-Bromo-2-Desoxyuridin
DAB	Diaminobenzidin
DDKT	Dampfdruckkochtopf
F(ab)	Antibody-binding Fragment
GK	Goto-Kakizaki
HRP	Horseradish (Meerrettich) Peroxidase
II-Ductuli	Intrainsuläre Ductuli
IRI	Immunreaktives Insulin
KG	Körpergewicht
LSAB	Labelled Streptavidin-Biotin Methode
NOD	Non Obese Diabetic
NZO/Hi	New Zealand Obese (Herberg, L.)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Propidium Jodid
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP [deoxy-uridine triphosphate] Nick-end Labeling
ZDF	Zucker Diabetic Fatty
ZF	Zucker Fatty
ZK	Zellkern
ZLC	Zucker Lean Control

Für verwendete technisch-mathematische Abkürzungen siehe S. 16 im Teil Material und Methode.

1. Einleitung

Das Krankheitsbild des Diabetes mellitus wurde erstmals vor ca. 3500 Jahren in Ägypten beschrieben. Trotz dieser frühen Erstbeschreibung wurde erst 1889 durch Mering und Minowski (1889) entdeckt, dass es sich bei dieser Krankheit um eine Erkrankung der Bauchspeicheldrüse handelt. Weitere 32 Jahre später entdeckten Banting und Best (1921) das für die Blutzucker-Regulation hauptverantwortliche Hormon Insulin, das von den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln produziert und entsprechend dem Bedarf sezerniert wird. Bis heute werden die Wirkungswege und -kaskaden des Insulins sowie die dabei auftretenden Störungen untersucht, um ein tieferes Verständnis für die Ursachen dieser weltweit häufigsten Stoffwechselerkrankung zu erlangen (historische Übersicht übernommen aus Canstam et al., 1974).

Es werden im wesentlichen zwei Typen der Erkrankung unterschieden. Der Diabetes mellitus Typ 1 ist Folge einer Autoimmunreaktion gegen die Insulin-produzierenden β -Zellen und das Hormon selbst (Tisch und McDevitt, 1996). Dabei kommt es durch die Zerstörung der β -Zellen zu einem absoluten Mangel an Insulin, erhöhten Blutzuckerwerten und zu schweren Folgeerkrankungen, insbesondere bei suboptimaler Therapie. Diese Form der Zuckerkrankheit tritt meist bei normalgewichtigen Kindern oder Jugendlichen erstmals in Erscheinung. Etwa 5-10% der Diabetiker leiden am Typ 1 Diabetes.

Ungefähr 90% der Zuckerkranken dagegen leiden derzeit am Diabetes mellitus Typ 2. Mehr als 80% der Typ 2 Diabetiker sind übergewichtig. Bei dem Typ 2 Diabetes mellitus handelt es sich primär um einen relativen Insulinmangel. Dieser entsteht insbesondere durch eine zunehmende Resistenz der Leber und der peripheren Gewebe gegenüber Insulin, was eine Steigerung des Insulinbedarfs zur Folge hat (Kahn, 1998). Zum Ausbruch des Diabetes kommt es, wenn die Gesamtmenge der β -Zellen diesen Bedarf nicht mehr decken kann. Auch hier führt eine inkonsequente Behandlung zu teilweise schwerwiegenden Spätschäden. Besonders betroffen sind dabei die Nieren, die Netzhäute der Augen, periphere Nerven, sowie die periphere Mikrozirkulation.

Neben diesen beiden Formen gibt es auch seltenere spezifische Typen, wie den maturity onset diabetes of the young (MODY), eine autosomal vererbte Form der Erkrankung, die typischerweise vor dem 25. Lebensjahr auftritt und einen milden

Verlauf nimmt. Der Gestationsdiabetes ist wiederum eine eigene und meist temporäre Erscheinungsform des Diabetes mellitus. Des Weiteren kann ein Diabetes durch Drogen, Chemikalien, Infektionen und Autoimmunreaktionen induziert werden. Weltweit sind ca. 150 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt. Allein in Deutschland sind ungefähr 5% der Bevölkerung betroffen, was in etwa 4,5 Millionen Menschen entspricht. Es wird geschätzt, dass allein die Behandlung dieser Krankheit und ihrer Folgen 5-10% des Gesundheitsbudgets der Industrieländer in Anspruch nimmt. Diabetes mellitus und seine Spätschäden stehen in diesen Ländern an vierter Stelle der Haupttodesursachen (Hauner et al., 1998).

Allein diese wenigen epidemiologischen Zahlen machen deutlich, dass es sich bei dieser Erkrankung um ein großes medizinisches, gesellschaftliches und nicht zuletzt ökonomisches Problem handelt. Es sind noch erhebliche wissenschaftliche Anstrengungen nötig, um die Ursachen und Folgen der Erkrankung vollständig zu verstehen oder gar kurative Therapieansätze aufzustellen.

Autopsiestudien am menschlichen Pankreasgewebe (Klöppel et al., 1985; Pick et al., 1998) weisen darauf hin, dass der β -Zell-Pool bei Typ 2 Diabetikern reduziert ist. Es ist nicht geklärt (Finegood et al., 2001), ob die reduzierte β -Zellmenge die Ursache oder die Konsequenz des Typ 2 Diabetes ist und ob sie aus einem erhöhten β -Zelluntergang oder aus einer Abnahme der β -Zellproliferation resultiert.

Studien an menschlichen β -Zellen in situ sind aus vielen Gründen problematisch. Zum einen lässt sich das menschliche Pankreas natürlich erst nach dem Tod des Patienten morphologisch untersuchen, wobei der Patient sich zu diesem Zeitpunkt meist in einem sehr weit fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung befand. Zum anderen werden alle diagnostizierten Diabetiker medikamentös möglichst optimal eingestellt, so dass die entsprechende Pankreasmorphologie durch therapeutische Maßnahmen eventuell deutlich beeinflusst wird. Insbesondere wenn man Zusammenhänge zwischen den Stoffwechsellparametern (Seruminsulin und Blutglukose) und morphologischen Charakteristika untersuchen möchte, ist ein natürlicher und unbeeinflusster Krankheitsverlauf notwendig, um möglichst unverfälschte Werte zu erhalten. Dies lässt sich auf Grund ethischer und moralischer Grundsätze am Menschen selbstverständlich nicht realisieren und macht die Untersuchung an Tiermodellen notwendig.

Neben Tiermodellen, bei denen der Untergang von β -Zellen durch chemische Agentien bewirkt wird (Swenne und Andersson, 1984; Wang et al., 1994) und

transgenen Modellen, bei denen ein oder mehrere Gene für Schlüsselproteine der Signaltransduktion ausgeschaltet wurden, gibt es eine Vielzahl an spontan diabetischen Tiermodellen (Leiter und Herberg, 1997). Letztere zeigen Charakteristika, die den Syndromen der verschiedenen Typen des menschlichen Diabetes mellitus sehr nahe kommen. Für den Typ 1 Diabetes dienen beispielsweise die NOD Maus (Atkinson und Leiter, 1999) und die BB Ratte (Klötting und Stark, 1987) als Modell. Als Modelle für den Typ 2 Diabetes wurden in den letzten Jahren eine Reihe von Nagerstämmen entdeckt. Insbesondere gelang es durch Auslese Mäusestämme zu züchten, die eine polygenetisch bedingte Fettsucht und gestörte Glukose-Toleranz aufweisen und im Laufe ihres Lebens eine diabetische Stoffwechsellage entwickeln können (Leiter und Herberg, 1997).

Die New Zealand Obese (NZO) Maus wurde ursprünglich aufgrund einer polygenetischen Fettleibigkeit selektiert (Proietto et al., 1993).

NZO/Hi Mäuse weisen bereits ein hohes Geburtsgewicht auf, sind hyperphag und entwickeln eine ausgeprägte juvenile Fettsucht, auch dann, wenn sie eine Diät mit relativ niedrigem Fettgehalt erhalten. Während sowohl weibliche als auch männliche Tiere eine gestörte Glukosetoleranz zeigen, entwickeln bei normaler Diät nur die männlichen Tiere eine Hyperinsulinämie. Etwa 50% der männlichen NZO/Hi Mäuse werden diabetisch (Leiter et al., 1998; Junger et al., 2002). Weibliche Tiere können dagegen eine normale Blutglukosekonzentration bei niedrigem Insulinniveau aufrechterhalten. Somit ist die NZO Maus als Tiermodell besonders interessant, da innerhalb dieser Inzuchtlinie mit genetisch einheitlichem Hintergrund (Leiter et al., 1998) deutliche Gruppierungen von Stoffwechsel-Phänotypen unterscheidbar sind und somit bei Untersuchungen zur β -Zellentwicklung in Korrelation zu den Stoffwechsellagen der Einfluss unterschiedlicher genetischer Faktoren ausgeschlossen werden kann. Ausgehend von den, von Leiter et al. (1998) beschriebenen Subphänotypen wurden in der vorliegenden Arbeit männliche Tiere in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe beinhaltet diabetische Tiere, die andere Gruppe enthält Tiere, die sich durch Hyperinsulinämie und Insulinresistenz unterschiedlicher Schweregrade auszeichnen, aber zum Zeitpunkt der Tötung eine kompensierte Blutglukose aufweisen. In diesen beiden Gruppen sollen Zusammenhänge und Abhängigkeiten zwischen individuellen β -Zellmassen, β -Zellproliferation und β -Zelldegeneration untersucht werden, um die Frage zu klären, ob – was wir annehmen dürfen (Junger et al. 2002) – und in welchem Ausmaß bei

den diabetischen im Vergleich zu den hyperinsulinämischen Tieren die β -Zellmasse reduziert ist und ob dies eine Konsequenz einer verminderten β -Zellproliferation oder einer gesteigerten β -Zelldegeneration ist. Weiterhin sollte geklärt werden, ob bei den insulinresistenten Tieren ein Zusammenhang zwischen Insulinbedarf und β -Zellproliferation einerseits und morphologischen Charakteristika der β -Zellen andererseits besteht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Puffer

Doppelt konzentrierter PBS-Puffer (Stammlösung), pH 7,4; 560 mosmol/kg
(NaCl 16,008 g/l; KCl 0,402 g/l; Na₂HPO₄ x 2H₂O 2,848 g/l; H₂PO₄ 0,408 g/l)

Tris-Puffer, pH 7,6; 275 mosmol/kg
(Tris 6,057 g/l; NaCl 5,844 g/l)

Citratpuffer, pH 6; 10 mM

9 ml Stammlösung A + 41 ml Stammlösung B + 450 ml Aqua dest.

(Lsg. A: 21,01 g C₆H₈O₇xH₂O in 1000 ml Aqua dest.; Lsg. B: 29,41 g C₆H₅O₇Na₃x2H₂O in 1000 ml Aqua dest.)

2.1.2 Fixierungslösung

Paraformaldehyd 4%ig in PBS-Puffer, pH 7,4; 1280 mosmol/kg

(8% Paraformaldehyd wird in Aqua dest. suspendiert, bei 60°C mit einigen Tropfen 1 N NaOH depolymerisiert; die Aldehydlösung wird auf pH 7,4 eingestellt, filtriert und 1:2 mit doppelt konzentriertem PBS-Puffer verdünnt)

2.1.3 Antikörper

Guinea Pig Anti-Porcine Insulin AK der Firma DAKO®

Rabbit Anti-Porcine Glucagon AK der Firma DAKO®

Rabbit Polyclonal Anti-Human Somatostatin AK der Firma DAKO®

Rabbit Anti-Human PP AK der Firma DAKO®

Rabbit Anti-Mouse Ki-67 AK der Firma DIANOVA®

Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti Rabbit IgG (DIANOVA®)

Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG (DIANOVA®)

Biotin-conjugated F(ab')₂-Fragments of Swine Anti-Rabbit Ig (DAKO®)

Streptavidin-conjugated Alkaline Phosphatase (DAKO®)

Streptavidin-conjugated Peroxidase (DAKO®)

2.1.4 Chromogen-Systeme

3,3'-Diaminobenzidin (DAB) der Firma DAKO®

Fast Red-Substrat System (Nr. K0597) der Firma DAKO®

2.1.5 Weitere Chemikalien

Antibody Diluent (Background Reducing) der Firma DAKO®

Bovine Serum Albumin (BSA) der Firma SERVA®

Fluorescent Mounting Medium der Firma DAKO®

HICO-MIC Eindeckmittel der Firma HIRTZ & CO®

Kaiser's Glycerol Gelantine

Levamisol der Firma SIGMA®

Histowax der Firma LEICA®, Fp 57-58°C

Propidium Iodide der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH

RNase A (bovine pancreas) der Firma Boehringer Mannheim GmbH

Alle übrigen Chemikalien wiesen einen analytischen Reinheitsgrad auf (MERCK®)

2.1.6 Geräte und technische Hilfsmittel

Mikrotom der Firma MICROM® mit Schnitt-Transfer-System

CryoCut CM 3000 der Firma LEICA®

HistoBond®-Adhäsionsobjektträger

Dampfdruckkochtopf der Firma FISSLER®

Lichtmikroskope Orthoplan der Firma LEITZ® und DMRBE der Firma LEICA®

Bildanalyse-System SIS mit Digitalkamera HV-C20 der Firma HITACHI® und

Software: analySIS Pro V3.00 der SOFT IMAGING SYSTEM GmbH

2.2 Methoden

2.2.1 Tiere

Als Tiermodell für Fettleibigkeit, Hyperinsulinämie und Typ 2 Diabetes mellitus wurden uns 36 und 52 Wochen alte männliche New Zealand Obese (NZO/HI) Mäuse von Fr. Prof. Dr. Dr. Herberg zur Verfügung gestellt. Sie wurden in einem spezifisch pathogen-freien (SPF) Bereich der Tierlaboratorien des Deutschen Diabetes Forschungsinstitutes gezüchtet, hatten freien Zugang zu autoklaviertem Trinkwasser und bekamen eine Diät, die 4,5% Fett, 51,5% Kohlenhydrat und 21% Protein enthielt (SSNIFF, Soest, Germany). Bei allen Tieren wurden in der 16., 24., 36. und 52. Lebenswoche zwischen 8.00 und 9.00 Uhr morgens sowohl das Körpergewicht, die Blutglukose (automatische Glukose Oxidase Methode, Care Diagnostica, Voerde, Germany) als auch der immunreaktive Insulinspiegel im Serum (Pharmacia Insulin Ria 100; Pharmacia AB, Uppsala, Sweden) bestimmt. Vor den Blutentnahmen zur Bestimmung der Stoffwechselfparameter wurde den Tieren die Nahrung nicht entzogen.

2.2.2 Gewebeverarbeitung

Die Tiere wurden getötet, das Pankreas entnommen und senkrecht zum Ductus pancreaticus major halbiert. Es wurde entweder der Kopfteil oder der Schwanzteil des Pankreas zehn Stunden in 4% gepuffertem Formaldehyd fixiert. Die jeweils korrespondierende Hälfte wurde kryofixiert. Die formaldehyd-fixierten Gewebestücke wurden nach einem Routineprotokoll dehydriert und in Paraffin eingebettet. Je nachdem, welcher Teil des halbierten Pankreas in Paraffin eingebettet wurde, befindet sich zur Orientierung entweder ein Teil der Milz oder ein Stück des Darms mit im Block.

Mit dem Mikrotom wurden Gewebeschnitt-Serien (Schnittdicke 5 μm) angefertigt. Eine Serie umfasst 15 Schnitte. Zwischen den Serien wurden je 200-250 μm Gewebe verworfen. Die einzelnen Schnitte wurden auf Adhäsions-Objektträger aufgenommen.

2.2.3 Immunhistochemie

2.2.3.1 Immunenzymatische Doppelfärbung zur Identifizierung proliferierender β -Zellen

Versuchskonzept

Angestrebt wurde eine gut erkennbare Darstellung der proliferierenden Kerne insulinproduzierender β -Zellen. Da immunhistochemisch positiv gefärbte Kerne in einem schwach gefärbten Zytoplasma (Hämalaun-Färbung) am besten zu erkennen sind, wurde auf eine spezifische Insulinfärbung verzichtet. Zur Differenzierung der β -Zellen wurden daher α -, δ - und PP-Zellen, die im Folgenden als Non- β -Zellen bezeichnet werden immunhistochemisch dargestellt. Um das zu erreichen, wurden die Non- β -Zellen mit Antikörpern gegen Glukagon, Somatostatin und pankreatisches Polypeptid markiert (Scaglia et al., 1997; Pick et al., 1998), wogegen die Proliferation über einen Antikörper gegen pKi-67, ein Protein, das in den Kernen proliferierender Zellen exprimiert ist, angezeigt wurde.

Als Resultat sollten das Zytoplasma der Non- β -Zellen zur semiautomatischen Detektion braun, das der β -Zellen hellblau und die proliferierenden Kerne rot gefärbt werden.

Experimentelles Vorgehen

Entparaffinierung/Rehydrierung und Blockierung der endogenen Peroxidase

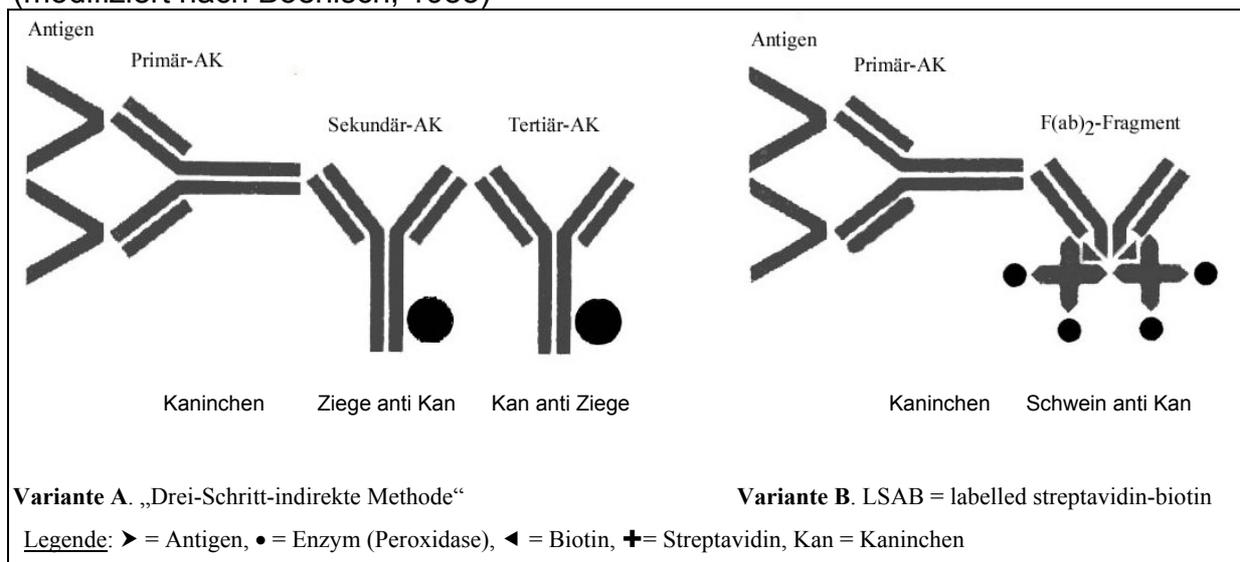
Zunächst wurden die Gewebeschnitte in einer Xylol-/Aceton-Reihe entparaffiniert und rehydriert. In einem zweiten Schritt wurde die endogene Peroxidase durch H_2O_2 (3%) geblockt.

Darstellung der endokrinen Non- β -Zellen (α -/ δ -/PP-Zellen)

Für die Darstellung der in zytoplasmatischen Vesikeln gespeicherten Hormone der Non- β -Zellen entschieden wir uns für eine indirekte Färbemethode. Die Primär-Antikörper wurden als Cocktail, bestehend aus Antikörpern gegen die Pankreashormone Glukagon, Somatostatin und PP eingesetzt. Sämtliche Antikörper zeigen laut Hersteller eine ausgeprägte (Kreuz-)Reaktivität gegen die

entsprechenden Hormone der Maus. Dabei sind die primären, an das Antigen bindenden Antikörper unmarkiert. Um den Antigen-Antikörper-Komplex zu lokalisieren, werden weitere markierte Antikörper benötigt. Dazu wurden zwei Varianten getestet (s. Abb. 1 und Tab. 1).

Abb. 1: Graphische Darstellung der beiden durchgeführten Varianten (modifiziert nach Boenisch, 1983)



Bei Variante A wurden zur Lokalisation der Antigen-Primärantikörper-Komplexe Sekundär- und Tertiär-Antikörper eingesetzt, die jeweils mit Peroxidase markiert waren (s. Abb. 1 und Tab. 1). Zur Stabilisierung der Antikörper-Lösungen und Verminderung der unspezifischen Hintergrundfärbung wurde Rinder Serum Albumin verwendet (Craig et al., 1993).

Bei Variante B wurden biotinylierte $F(ab)_2$ -Fragmente und mit Peroxidase konjugiertes Streptavidin zur Lokalisation der Antigen-Primärantikörper-Komplexe eingesetzt (s. Abb. 1 und Tab. 1). Diese Variante ist als LSAB (= labelled streptavidin-biotin) Methode bekannt. Aufgrund der großen Affinität zwischen Biotin und Streptavidin entsteht ein stabiler Streptavidin-Biotin-Komplex.

Als Substrat für die Peroxidase wurden 0,0006% H_2O_2 (0,02% einer 3%igen H_2O_2 -Verdünnung) hinzugefügt. Das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) wurde in einer Konzentration von 1 mg DAB in 1 ml Tris-Puffer und einer Inkubationsdauer von 10 Minuten bei Raumtemperatur eingesetzt.

Darstellung der proliferierenden Zellen

Die Markierung des nukleär exprimierten Proteins Ki-67 macht einen Aufschluss der Zellkerne nötig. Dieser wurde durch Kochen der Schnitte in Citrat-Puffer (10 mM, pH 6.0) in einem Dampfdruckkochtopf (DDKT) erreicht (Shi et al., 1997). Fraglich waren sowohl der Zeitpunkt (s. Tab. 1), als auch die Dauer des Aufschlusses. Deshalb wurden die Präparate einmal bis zum Erreichen der Dampfdruckstufe II (7 Minuten) und einmal nach Erreichen der Druckstufe II für weitere 10 Minuten im DDKT belassen (insges. 17 Minuten).

Zur Markierung des nukleär exprimierten Ki-67 Proteins wurden entsprechende Primär-Antikörper verwendet. Die Lokalisation des entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgte mittels der LSAB-Methode (labelled streptavidin-biotin-method) mit biotinylierten F(ab)₂-Fragmenten als Brücke für Streptavidin (Donath et al., 1999), das mit alkalischer Phosphatase konjugiert war. Der Enzymnachweis wurde mit einem Fast-Red/Naphtolphosphat-System geführt. Levamisol wurde zur Hemmung der gewebeeigenen (= endogenen) alkalischen Phosphatase eingesetzt (s. Tab. 1).

Darstellung von β -Zellen und proliferierenden Zellen

Zu Kontrollzwecken wurden von jedem Tier auch Doppelfärbungen von insulinproduzierenden β -Zellen und Ki-67 angefertigt. Die hierfür nötige Prozedur unterscheidet sich in der Wahl und den Inkubationsbedingungen des Insulin-Antikörpers sowie den Konzentrationen der Sekundär- und Tertiär-Antikörper von der oben dargestellten Non- β -Färbung.

Für die Darstellung der insulinproduzierenden Zellen wurde ein Antikörper gegen Meerschweinchen-Insulin, der laut Hersteller eine (Kreuz-)Reaktivität gegen Mäuse-Insulin aufweist, in zwei verschiedenen Konzentrationen (1:50 und 1:150) verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht. Getestet wurde auch eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, die aber zu weniger guten Ergebnissen führte. Wie bei der Färbung der Non- β -Zellen wurden auch hier die peroxidase-gekoppelten Sekundär- und Tertiär-Antikörper verwendet, jedoch jeweils in einer Konzentration von 1:300. Die hier beschriebenen Varianten sind in Tabelle 1 in Form von Flussdiagrammen zusammengefasst.

		Glukagon, Somatostatin, PP & Ki-67			Insulin & Ki-67	
		I.	II.	III.	IV.	V.
		DDKT vor DAB Variante A	DDKT nach DAB Variante A	DDKT vor DAB Variante B	DDKT nach DAB Variante B	DDKT nach DAB Variante A
Entparaff./ Rehydr.				Xylol 5' Xylol 5' Aceton 100% 10' Aceton 70% 10' Aceton 40% 10'		
3% H ₂ O ₂				5'		
Puffer				Tris/NaCl pH 7,6, RT, 5'		
1. AK	Glukagon	(1:300)	Glukagon (1:300)	Glukagon (1:300)	Glukagon (1:300)	Insulin (1:50)
	Somatostatin	(1:1050)	Somatostatin (1:1050)	Somatostatin (1:1050)	Somatostatin (1:1050)	
Medium	PP	(1:225)	PP (1:225)	PP (1:225)	PP (1:225)	DAKO-Verdünnungsmedium 4°C, Nacht
		DAKO-Verdünnungsmedium RT, 30'	DAKO-Verdünnungsmedium RT, 30'	DAKO-Verdünnungsmedium RT, 30'	DAKO-Verdünnungsmedium RT, 30'	
Puffer	Tris/NaCl	pH 7,6, RT, 5'	Tris/NaCl pH 7,6, RT, 5'	Tris/NaCl pH 7,6, RT, 5'	Tris/NaCl pH 7,6, RT, 5'	
2. AK	Ziege-anti-Kaninchen (HRP)	Ziege-anti-Kaninchen (HRP)	Ziege-anti-Kaninchen (HRP)	Biotin. F(ab) ₂	Biotin. F(ab) ₂	Ziege-anti-Kaninchen (HRP)
		(1:600)	(1:600)	(1:300)	(1:300)	
Medium	Tris/NaCl + 5% BSA		Tris/NaCl + 5% BSA	DAKO-Verdünnungsmedium RT, 30'	DAKO-Verdünnungsmedium RT, 30'	Tris/NaCl + 5% BSA RT, 30'
		RT, 30'	RT, 30'			
Puffer	Tris/NaCl	pH 7,6, RT, 5'	Tris/NaCl pH 7,6, RT, 5'	Tris/NaCl pH 7,6, RT, 5'	Tris/NaCl pH 7,6, RT, 5'	
3. AK	Kaninchen-anti-Ziege (HRP)	Kaninchen-anti-Ziege (HRP)	Kaninchen-anti-Ziege (HRP)	Streptavidin-HRP	Streptavidin-HRP	Kaninchen-anti-Ziege (HRP)
		(1:600)	(1:600)	(1:300)	(1:300)	
Medium	Tris/NaCl + 5% BSA		Tris/NaCl + 5% BSA	DAKO-Verdünnungsmedium RT, 30'	DAKO-Verdünnungsmedium RT, 30'	Tris/NaCl + 5% BSA RT, 30'
		RT, 30'	RT, 30'			
Puffer	Tris/NaCl	pH 7,6, RT, 5'	Tris/NaCl pH 7,6, RT, 5'	Tris/NaCl pH 7,6, RT, 5'	Tris/NaCl pH 7,6, RT, 5'	
Aufschluß	DDKT Stufe II 17' (Citrat)		DDKT Stufe II 17' (Citrat)			
Puffer	Tris/NaCl	pH 7,6, RT, 5'	Tris/NaCl pH 7,6, RT, 5'	Tris/NaCl pH 7,6, RT, 5'	Tris/NaCl pH 7,6, RT, 5'	
Chromogen	DAB (1 mg/ml)		DAB (1 mg/ml)	DAB (1 mg/ml)	DAB (1 mg/ml)	DAB (1 mg/ml)
	mit 0,02% H ₂ O ₂ (3%ig)		mit 0,02% H ₂ O ₂ (3%ig)	mit 0,02% H ₂ O ₂ (3%ig)	mit 0,02% H ₂ O ₂ (3%ig)	
T, t		RT, 10'	RT, 10'	RT, 10'	RT, 10'	
Puffer	Tris/NaCl	pH 7,6, RT, 5'	Tris/NaCl pH 7,6, RT, 5'	Tris/NaCl pH 7,6, RT, 5'	Tris/NaCl pH 7,6, RT, 5'	
Aufschluß	DDKT Stufe II 17' (Citrat)		DDKT Stufe II 17' (Citrat)		DDKT Stufe II 17' (Citrat)	
Puffer	Tris/NaCl	pH 7,6, RT, 5'	Tris/NaCl pH 7,6, RT, 5'	Tris/NaCl pH 7,6, RT, 5'	Tris/NaCl pH 7,6, RT, 5'	

Tabelle 1: Arbeitsschritte zur Optimierung der Doppelfärbung

Glukagon, Somatostatin, PP & Ki-67				Insulin & Ki-67
I.	II.	III.	IV.	V.
DDKT vor DAB Variante A	DDKT nach DAB Variante A	DDKT vor DAB Variante B	DDKT nach DAB Variante B	DDKT nach DAB Variante A
1. AK Medium T, t	Ki-67 (1:50) DAKO-Verdünnungsmedium RT, 30'			
Puffer	Tris/NaCl pH 7,6 , RT, 5'			
2. AK Medium T, t	Biotin. F (ab)2 (1:300) DAKO-Verdünnungsmedium RT, 30'			
Puffer	Tris/NaCl pH 7,6 , RT, 5'			
Enzym Medium T, t	Streptavidin-AP (1:100) DAKO-Verdünnungsmedium RT, 30'			
Puffer	Tris/NaCl pH 7,6 , RT, 5'			
Chromogen	FAST RED 1 Tablette auf 3 ml FastRed-Lösung + 50 µl Levamisol RT, 10'			
T, t				
Puffer	Tris/NaCl pH 7,6 , RT, 5'			
Waschen	Aqua dest. 2 mal je 5'			
Gegenfärb.	Hämalaun			
T, t	RT, 2'			
Waschen	Leitungswasser bei RT, 10' Aqua dest.			
Tabelle 1: Arbeitsschritte zur Optimierung der Doppelfärbung				
<p>Von den durchgeführten Experimenten zur Optimierung der Doppelfärbung sind die wesentlichen Versionen in der Tabelle dargestellt. Entscheidend ist der Zeitpunkt des DDKT-Einsatzes. Variante A: Verwendung der "Drei-Schritt-Indirekten Methode" zur Markierung der Non-β-Zellen. Variante B: Einsatz der LSAB-Methode zur Markierung der Non-β-Zellen. (s. Abb. 1). Die beiden grün unterlegten Spalten zeigen die optimierten Protokolle (Nr. II und V).</p>				

2.2.3.2 Doppelfärbung zur Identifizierung apoptotischer β -Zellen

Versuchskonzept

Für die Darstellung der Apoptose führten wir ebenfalls eine Doppelfärbung durch. Zuerst erfolgte die Färbung aller nicht insulinproduzierenden endokrinen Zellen. Zur Lokalisation apoptotischer Zellen wurde der Fluoreszenzfarbstoff Propidium Jodid eingesetzt. Dieser bindet an Nukleinsäuren und färbt daher alle Zellkerne. Die Zellkerne apoptotischer Zellen mit fragmentiertem und kondensiertem Chromatin stechen durch besonders hohe Fluoreszenzintensität deutlich hervor. Die freien Ribonukleinsäuren wurden zuvor mittels RNase A zerstört. Diese Färbung wurde nach dem Beispiel von Scaglia et al. (1997) durchgeführt.

Experimentelles Vorgehen

Nach Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte folgte die immunhistochemische Färbung der Non- β -Zellen wie unter 2.2.3.1 beschrieben. Danach wurden die Objektträger drei mal je fünf Minuten in PBS-Puffer gewaschen. Es folgte eine 10 minütige Inkubation der Schnitte mit RNase A (100 μ g RNase/ml in PBS-Puffer) bei 37°C. Getestet wurden zusätzlich die gleichzeitige Verwendung von RNase und Propidium Jodid, was zu einer nur sehr schwachen Färbung führte, sowie eine 20 minütige RNase-Behandlung, wobei hier kein Unterschied zur 10 minütigen Variante erkennbar war.

Nach dieser Behandlung pipettierten wir die Inkubationslösung ab. Anschließend wurden die Schnitte mit einer Lösung von Propidium Jodid (5 μ g/ml in PBS-Puffer) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Getestet wurden hier zusätzlich der Einsatz einer 30-minütigen Inkubation bei gleicher Konzentration, sowie eine 10-minütige Inkubation bei einer Konzentration von 10 μ g/ml. Dies führte jedoch zu keiner wesentlichen Veränderung der Darstellung.

Eine Gegenfärbung mit Hämalaun ist nicht möglich, da das Fluoreszenzsignal des Propidium Jodids dadurch unterdrückt wird.

Als apoptotisch wurden analog zu Allen et al. (1997), Hiramine (1997), Igney und Krammer (1999), Majno und Joris (1995), Li et al. (1998), Pick et al. (1998) und Scaglia et al. (1997) alle Zellen gewertet, die entweder einen deutlich verdichteten Kern, eine halbmondförmige Chromatinverdichtung im Kern oder aber apoptotische

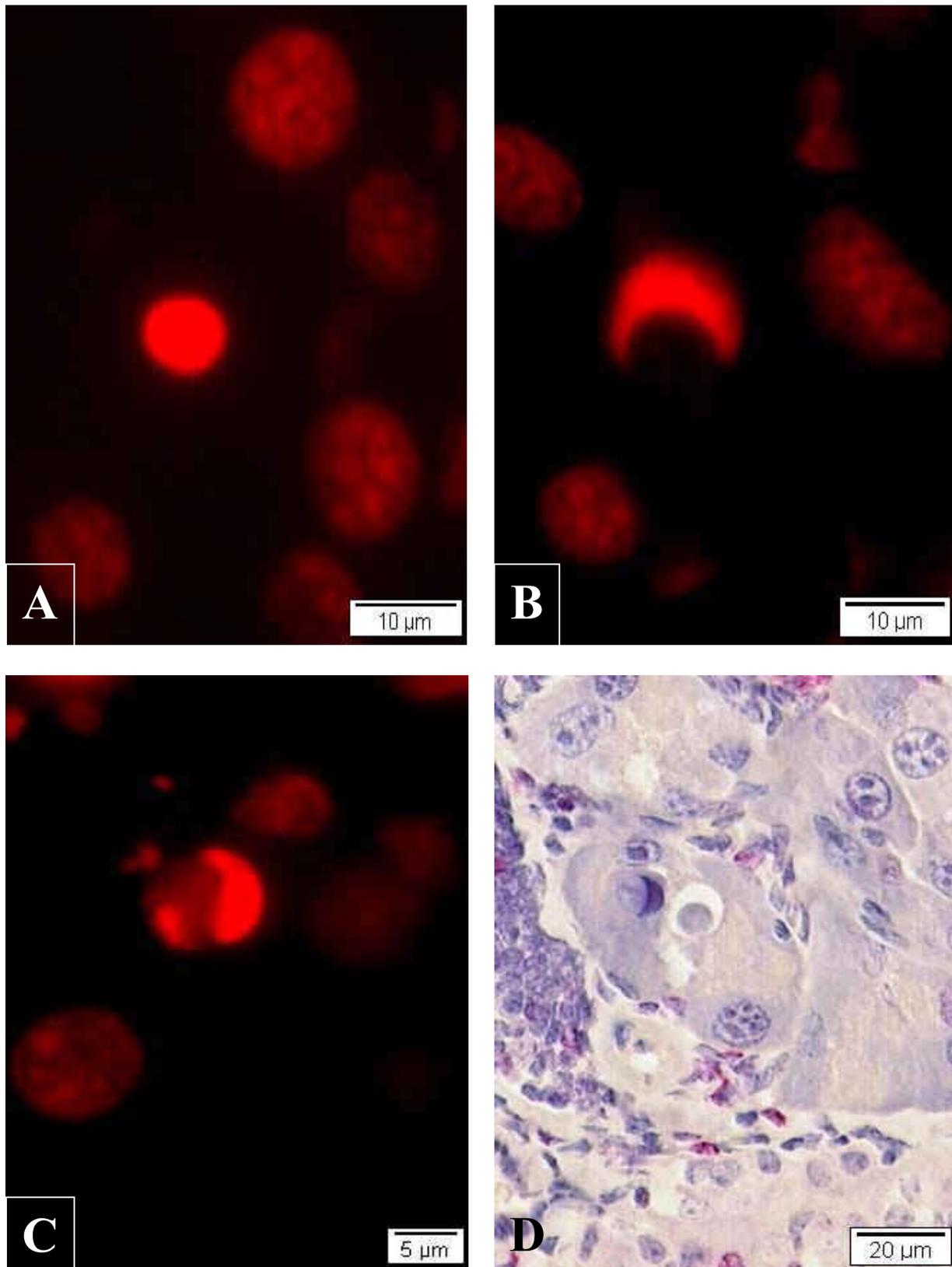


Abb. 2: Darstellung von Zellkernen apoptotischer Zellen

Abb. 2 A: deutlich verdichteter Zellkern einer apoptotischen Zelle im Vergl. zu den Kernen vitaler Zellen in der Umgebung (Non-β-/Propidium Jodid-Färbung), **Abb. 2 B:** halbmondförmige Chromatinverdichtung im Zellkern einer apoptotischen Zelle (Non-β-/Propidium Jodid-Färbung), **Abb. 2 C:** Auflösung verdichteten Kernchromatins in apoptotische Körperchen (Non-β-/Propidium Jodid-Färbung), **Abb. 2 D:** halbmondförmige Chromatinverdichtung einer apoptotischen Zelle (Hämalaun-gegentefärbte Non-β-/Ki-67-Färbung)

Körperchen aufwiesen. Zur Veranschaulichung zeigen Abb. 2 A-D einige Beispiele apoptotischer Zellen.

2.2.4 Morphometrische Messungen

Tabelle 2: Übersicht über die direkt bestimmten und berechneten Parameter mit Erläuterung und Art der Messung bzw. Berechnung

Direkt ausgemessene /-gezählte Parameter			
Parameter	Einheit	Erläuterung	Messung
A_{Pankreas}	mm ²	Fläche des gesamten Pankreasgewebeprofils*	Punktzählverfahren
A_{Ins}	mm ²	Fläche der Inselprofile	Planimetrie (Umfahren)
$A_{\text{non-}\beta}$	μm ²	Non-β-Zellfläche	Planimetrie (Farbschwellenwertmessung)
N_{Ins}	n	Anzahl der Inselprofile	Auszählung der Inselprofile
N_{β}	n	Anzahl der β-Zellen	Auszählung der nicht "non-β gefärbten" endokr. Zellen
$N_{\beta, \text{Ki67}}$	n	Anzahl der proliferierenden β-Zellen	Auszählung der Ki-67 positiven ZK nicht "non-β gefärbter" endokriner Zellen
N_{Apop}	n	Anzahl der apoptotischen Zellen	Auszählung der apoptotischen ZK
$N_{\beta, \text{Apop}}$	n	Anzahl der apoptotischen β-Zellen**	Auszählung der apoptotischen ZK nicht "non-β gefärbter" endokriner Zellen
$N_{\text{non-}\beta, \text{Apop}}$	n	Anzahl der apoptotischen Non-β-Zellen**	Auszählung der apoptotischen ZK "non-β gefärbter" Zellen
$N_{\text{Exo, Apop}}$	n	Anzahl der apoptotischen exokr. Zellen**	Auszählung der apoptotischen ZK im exokrinen Pankreasgewebe

Berechnete Parameter			
Parameter	Einheit	Erläuterung	Berechnung
A_{β}	μm ²	β-Zellfläche	$A_{\text{Ins}} - A_{\text{non-}\beta}$
$V_{V\text{Ins}}$	%	Relativer Anteil der Inselfläche an der Fläche des Pankreasgewebeprofils	$A_{\text{Ins}} / A_{\text{Pankreas}} \times 100$
$V_{V\text{non-}\beta (\text{Ins})}$	%	Relativer Anteil der Non-β-Fläche an der Fläche des Inselprofils	$A_{\text{non-}\beta} / A_{\text{Ins}} \times 100$
$V_{V\beta (\text{Ins})}$	%	Relativer Anteil der nicht "non-β gefärbten" Inselfläche an der Fläche des Inselprofils	$A_{\beta} / A_{\text{Ins}} \times 100$
$V_{V\text{non-}\beta (\text{Pankreas})}$	%	Relativer Anteil der Non-β-Fläche an der Fläche des Pankreasgewebeprofils	$A_{\text{non-}\beta} / A_{\text{Pankreas}} \times 100$
$V_{V\beta (\text{Pankreas})}$	%	Relativer Anteil der nicht "non-β gefärbten" Inselfläche an der Fläche des Pankreasgewebeprofils	$A_{\beta} / A_{\text{Pankreas}} \times 100$
$N_{A\text{Ins}}$	n/mm ²	Inseldichte	$N_{\text{Ins}} / A_{\text{Pankreas}}$
$N_{A\beta}$	n/10 ³ μm ²	β-Zelldichte	N_{β} / A_{β}
I_{Ki67}	%	Markierungsindex = Anteil prolif. β-Zellen an allen β-Zellen	$N_{\beta, \text{Ki67}} / N_{\beta} \times 100$

* Ohne Fettgewebe, Lymphknoten und Milz- bzw. Darmanschnitt

** Kriterien zur Erkennung apoptotischer Zellkerne: deutliche Chromatinkondensation, dichter halbmondförmiger Nukleus oder apoptotische Körperchen (s. 2.2.3.2 & Abb. 2)

Die stereologischen Techniken wurden entsprechend den Empfehlungen von E.R. Weibel (1973) und M.A. Williams (1977) angewandt. Der notwendige Umfang an Messungen zur Schätzung eines Parameters wurde jeweils durch die Bildung progressiver Mittelwerte festgelegt (Williams, S.37), wobei Abweichungen von $\pm 10\%$ zugelassen wurden.

Die Fläche der Pankreas-Schnitte ($A_{Pankreas}$) wurde mittels einer Punktzählmethode (Punktraster $d = 2,85 \text{ cm}$) bei einer Vergrößerung von 28,5x bestimmt. Fettgewebe, Lymphknoten sowie Lumina großer Gänge und Gefäße wurden nicht in die Wertung einbezogen.

Von jedem ausgewerteten Schnitt wurden alle Langerhans'schen Inseln (N_{Ins}) über ein Lichtmikroskop mittels einer Digitalkamera aufgenommen, in einen Computer eingelesen und mit Indices versehen. Die digitalisierten Bilder dienten zur Bestimmung sämtlicher Inselparameter (s. Tab. 2), wobei die Software AnalySIS Pro zur Anwendung kam.

Die Flächen aller Inselprofile (A_{Ins}) wurden planimetrisch bestimmt. Die Flächen der braun gefärbten Non- β -Zellen ($A_{non-\beta}$) wurden über eine farbschwellenwertabhängige Autodetektion ermittelt. Die Fläche der β -Zellen (A_{β}) wurde als Differenz von $A_{Ins} - A_{non-\beta}$ rechnerisch extrapoliert, wobei der Gefäß- und Bindegewebsanteil vernachlässigt wurde.

In Inselprofilen $< 40.000 \mu\text{m}^2$ ($\approx \varnothing 200 \mu\text{m}$) wurden alle β -Zellen (N_{β}) gezählt. Entsprechend dem progressiven Mittel blieben die β -Zell-Zahlen pro Flächeneinheit ($N_{A\beta}$) nach der Auswertung von ca. 25 Inseln innerhalb einer Schwankungsbreite von $\pm 5\%$ (s. Diagramm 1) konstant.

Über Inselprofile $> 40.000 \mu\text{m}^2$ wurde ein quadratisches Raster gelegt (1 Rasterquadrat = $900 \mu\text{m}^2$). In Abhängigkeit der Inselgrößen wurde in jedem 2. bis 5. Rasterquadrat die β -Zell-Zahl (N_{β}) bestimmt. Entsprechend dem progressiven Mittel wurden mindestens 15 Quadrate/Insel (s. Diagramm 2) ausgezählt (im Mittel 24 ± 6 Rasterquadrate) und alle Inseln ausgewertet. Ausgehend von diesen Werten wurde die mittlere β -Zell-Zahl pro Flächeneinheit ($N_{A\beta}$) abgeschätzt.

Diagramm 1: Beispielhafte Darstellung des progressiven Mittelwertes der β -Zelldichte (= $N_{A\beta}$) bei Inseln mit Profilflächen $< 40.000 \mu\text{m}^2$

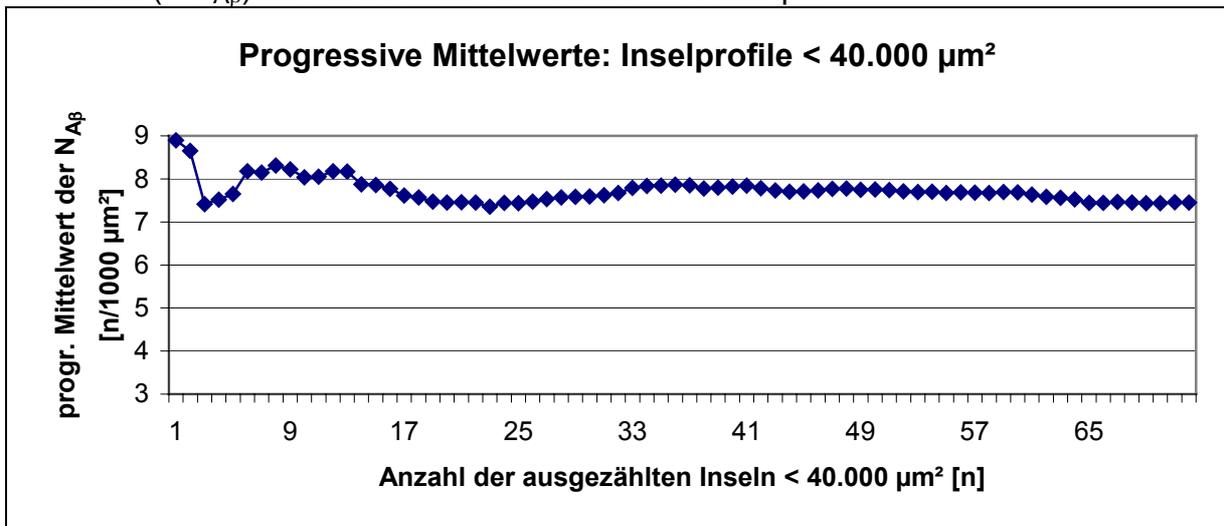
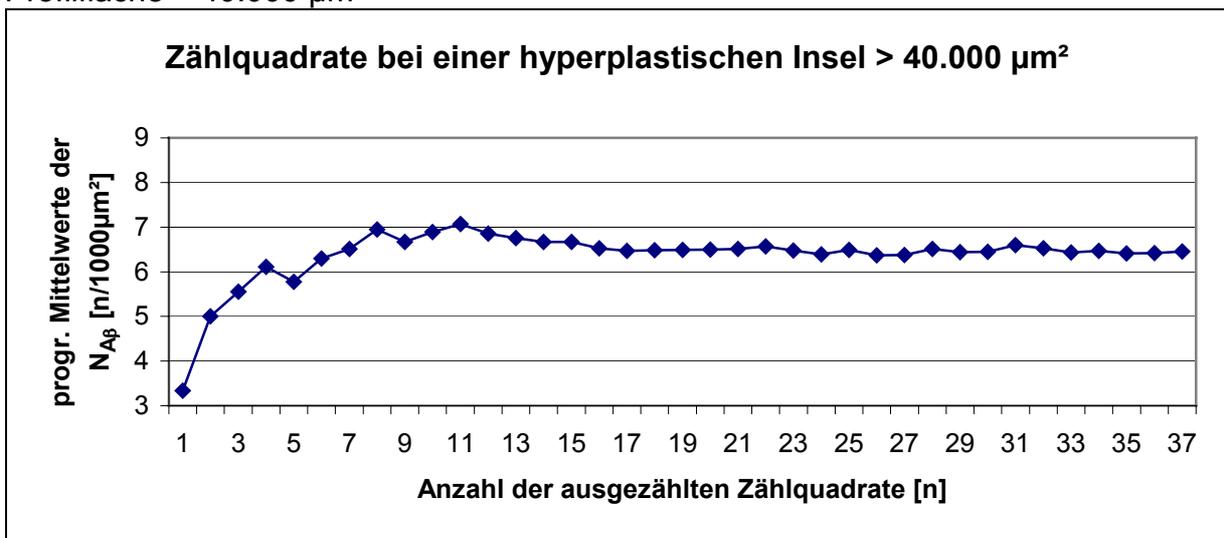


Diagramm 2: Beispielhafte Darstellung des progressiven Mittelwertes der auf $1000 \mu\text{m}^2$ hochgerechneten β -Zell-Anzahl (= N_{β}) pro Rasterquadrat bei einer Insel mit einer Profilfläche $> 40.000 \mu\text{m}^2$



Ki-67 positive β -Zellen ($N_{\beta, Ki67}$) wurden in allen Inselprofilen gezählt und zu den aus $N_{A\beta}$ und den Inselflächen geschätzten β -Zell-Zahlen ins Verhältnis gesetzt (I_{Ki67}).

Im Gegensatz zur Bestimmung der Proliferation zählten wir in den Propidium Jodid-gefärbten Gewebeschnitten sämtliche positive (=apoptotische) Zellen, also im Endo- wie im Exokrinen. Es erfolgte jedoch eine Aufschlüsselung der apoptotischen Zellen nach ihrer Lokalisation ($N_{\beta, Apop}$, $N_{non-\beta, Apop}$, $N_{Exo, Apop}$).

Für die Bestimmung des relativen Inselvolumens (V_{VIns}), sowie der Anzahl der Inselprofile/Fläche (N_{AIns}) wurden je Tier sowohl Schnitte des darm- wie des

milzseitigen Pankreas ausgewertet, also wurden zusätzlich zu den Paraffinschnitten auch Schnitte der kryofixierten Pankreashälfte (s.o.) verwendet. Damit wird einem eventuellen Unterschied der Verteilung der Inseln innerhalb des Organs Rechnung getragen (Saito et al., 1978). Da eine immunhistochemische Doppelfärbung an kryofixierten Schnitten nicht möglich war, wurden die übrigen Parameter ($A_{non-\beta}$, A_{β} , N_{β} , I_{Ki67} und N_{Apop}) ausschließlich an den in Paraffin eingebetteten Schnitten bestimmt.

Beurteilung der morphologischen Integrität der Langerhans'schen Inseln

Als morphologische Merkmale für pathologische Veränderungen der Inseln wurden

- die Exokrinisierung der Inseln,
- peri- und intrainsuläre Leukozyteninfiltrate,
- Bildung von Ductuli innerhalb der Inseln,
- sowie stark degenerative Veränderungen der Inseln (Relikte)

herangezogen. Zur Quantifizierung dieser Merkmale wurden die Objektträger systematisch im Lichtmikroskop durchmustert und veränderte Inseln in die entsprechenden Kategorien (s.o.) eingeteilt. Die so ermittelten Werte werden in Prozent der Gesamtzahl aller ausgewerteten Inseln angegeben. Hierfür wurden im Mittel 64 ± 17 Inseln je Tier untersucht.

2.2.5 Statistische Methoden

Bei allen Experimenten wurden die Ergebnisse als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Signifikanzberechnung erfolgte (in Abhängigkeit von der Versuchsanordnung) mit dem ungepaarten oder gepaarten Student t-Test. Der ungepaarte Student t-Test wurde unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen der Stichproben durchgeführt. Ein Unterschied konnte als signifikant (hochsignifikant) betrachtet werden, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ ($p < 0,01$) erfüllt war.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung der Methode

3.1.1 Immunhistochemische Doppelfärbung zur Identifizierung proliferierender β -Zellen

Ziel dieser Färbung war es, eine möglichst gut erkennbare Darstellungsform proliferierender β -Zellen zu etablieren. Mehrere Versuche zeigten, dass sich rot gefärbte Kerne gegen ein helles, schwach hämalaun-gefärbtes Zytoplasma sicherer erkennen lassen als gegen ein immunhistochemisch braun gefärbtes (als Chromogensysteme standen DAB und Fast Red zur Verfügung). Des Weiteren lassen sich die β -Zellen bei einer Insulin-Färbung nur noch schwer quantifizieren, da ihre Kerne teilweise nicht mehr sicher erkennbar sind. Dies führte zu der Entscheidung, die endokrinen Non- β -Zellen (α -, δ - und PP-Zellen) und nicht die insulinproduzierenden β -Zellen selbst zu markieren (Abb. 3 A + B).

Darstellung der endokrinen Non- β -Zellen (α -/ δ -/PP-Zellen) und der proliferierenden Zellen

Es wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um die optimalen Inkubationsbedingungen und Konzentrationen zu ermitteln.

Die Inkubationstemperatur und –zeit für die Antikörperreaktion mit den Hormonen Glukagon, Somatostatin und PP wurden variiert. Während die Inkubation bei 4°C über Nacht eine starke unspezifische Hintergrundfärbung hervorrief (Abb. 3 C), zeigte die Inkubation bei Raumtemperatur (ca. 21°C) über 30 Minuten eine deutlich spezifischere Färbung der hormonproduzierenden Zellen, weitestgehend ohne einen störenden Hintergrund zu verursachen (Abb. 3 A).

Die Primär-Antikörper wurden in Form eines Cocktails in zwei verschiedenen Zusammensetzungen getestet. Dabei ergab sich, dass die Konzentrationen von 1:600 für Glukagon, 1:2100 für Somatostatin und 1:450 für PP zu niedrig für eine gut erkennbare Anfärbung der entsprechenden Zellen war (Abb. 3 D). Mit den doppelten Konzentrationen (1:300 Glukagon, 1:1050 Somatostatin, 1:225 PP) konnten die Non- β -Zellen mit ausreichender Intensität gefärbt werden, um ihre Fläche mittels einer

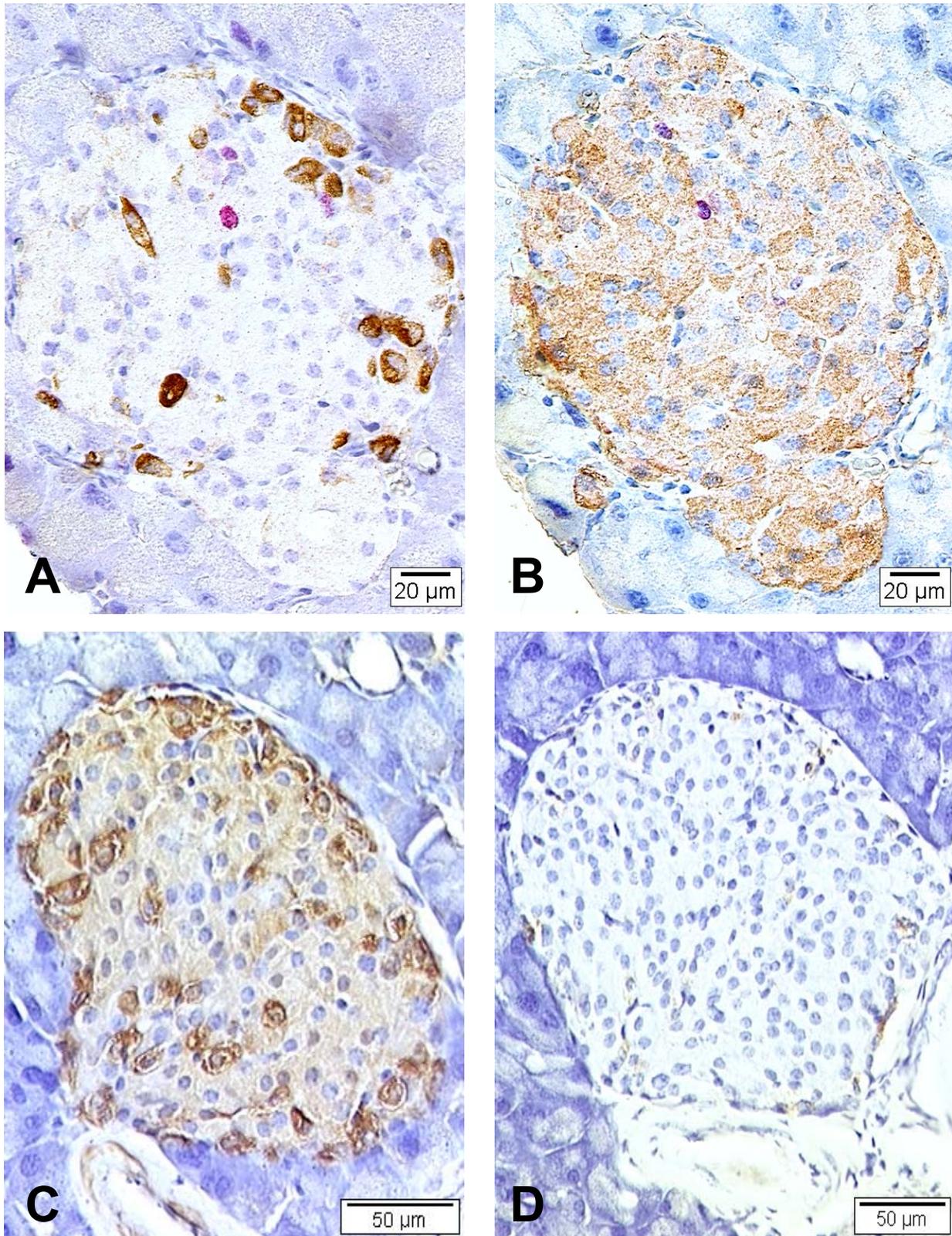


Abb. 3: Unterschiedliche Darstellung der hormonbildenden Inselzellen

Abb. 3 A: von uns standardisierte Doppelfärbung von Non- β -Zellen und Ki-67 zur Quantifizierung proliferierender β -Zellen (Tab.1, Spalte II), **Abb. 3 B:** zu Kontrollzwecken durchgeführte Doppelfärbung von Insulin und Ki-67 (Tab.1, Spalte V), **Abb. 3 C:** Darstellung der Non- β -Zellen bei Inkubation der Primär-AK über Nacht bei 4°C mit Konzentrationen der Primär-AK von 1:300 für Glukagon, 1:1050 für Somatostatin, 1:225 für PP (ausgeprägter unspezif. HG), **Abb. 3 D:** Darstellung der Non- β -Zellen bei Inkubation über 30 Min. bei Raumtemperatur mit der halben Konzentration des Non- β -Cocktails (1:600 Glukagon, 1:2100 Somatostatin, 1:450 PP) (nahezu keine spezif. Markierung)

farbschwellenwertabhängigen Autodetektion zu vermessen und trotzdem proliferierende Non- β -Zellen noch erkennen zu können (Abb. 3 A).

Für die Lokalisation der Primär-Antikörper wurden zwei unterschiedliche Methoden verglichen, die beide Peroxidase als Enzym für die DAB-Farbreaktion benötigten (s. Abb. 1).

Variante A („Drei-Schritt-Indirekte Methode“) nutzt die Kombination von an Peroxidase gekoppelten Sekundär- und Tertiär-Antikörpern (Tab. 1: Spalte I, II).

Variante B basiert dagegen auf der LSAB-Methode (Labelled Streptavidin-Biotin). Bei dieser Methode binden biotinylierte F(ab)₂-Fragmente an die Primär-Antikörper und werden mit HRP-markiertem Streptavidin und DAB nachgewiesen. Für die Detektion des Ki-67-Antigens wurde die gleiche Methode verwendet, jedoch mit AP-markiertem Streptavidin. Dieses reagiert offensichtlich auch nach dem Aufschluss noch mit dem Reaktionsprodukt über den Non- β -Zellen und verursacht so eine rotbraune Zytoplasma-Färbung

Damit sind die roten, Ki-67-positiven Kerne farblich nur noch schwer von dem rotbraunen Zytoplasma der Non- β -Zellen zu differenzieren (Abb. 4 B). Dagegen kommt es mit Variante A nach einer entsprechenden Aufschlusszeit zu keiner Interferenz mit dem zweiten Färbeschritt. (Abb. 4 A).

Zur Bestimmung des besten Zeitpunktes des Kernaufschlusses wurden einige Objektträger vor der Farbreaktion mit dem DAB, andere nach Abschluss der Hormonfärbung der DDKT-Behandlung ausgesetzt. Während eine bereits stattgefundenene DAB-Farbreaktion durch den Aufenthalt im DDKT unbeeinträchtigt bleibt (Abb. 5 A-C), zeigt sich, dass bei Aufschluss vor der Chromogenreaktion mit DAB keine Hormonfärbung mehr möglich ist (Abb. 5 D).

Zur Bestimmung der Aufschlusszeit im Dampfdruckkochtopf wurden einige Objektträger bis zum Erreichen der zweiten Dampfdruckstufe, ca. 7 Minuten, andere bis 10 Minuten nach Erreichen der zweiten Dampfdruckstufe, also insgesamt 17 Minuten im Topf belassen. Dabei stellte sich heraus, dass die 7-minütige Variante nicht ausreicht, um die Kerne aufzuschließen. Es kommt zu keiner Kernfärbung, dafür aber zu einer Rot-Braun-Färbung des Zytoplasmas der Non- β -Zellen. Die 17-minütige Variante erbringt dagegen ein zufriedenstellendes Ergebnis in Bezug auf den Kernaufschluss (Abb. 5 C) und verhindert ein Interferieren des zweiten Färbeschritts mit dem Antikörperkomplex aus dem ersten.

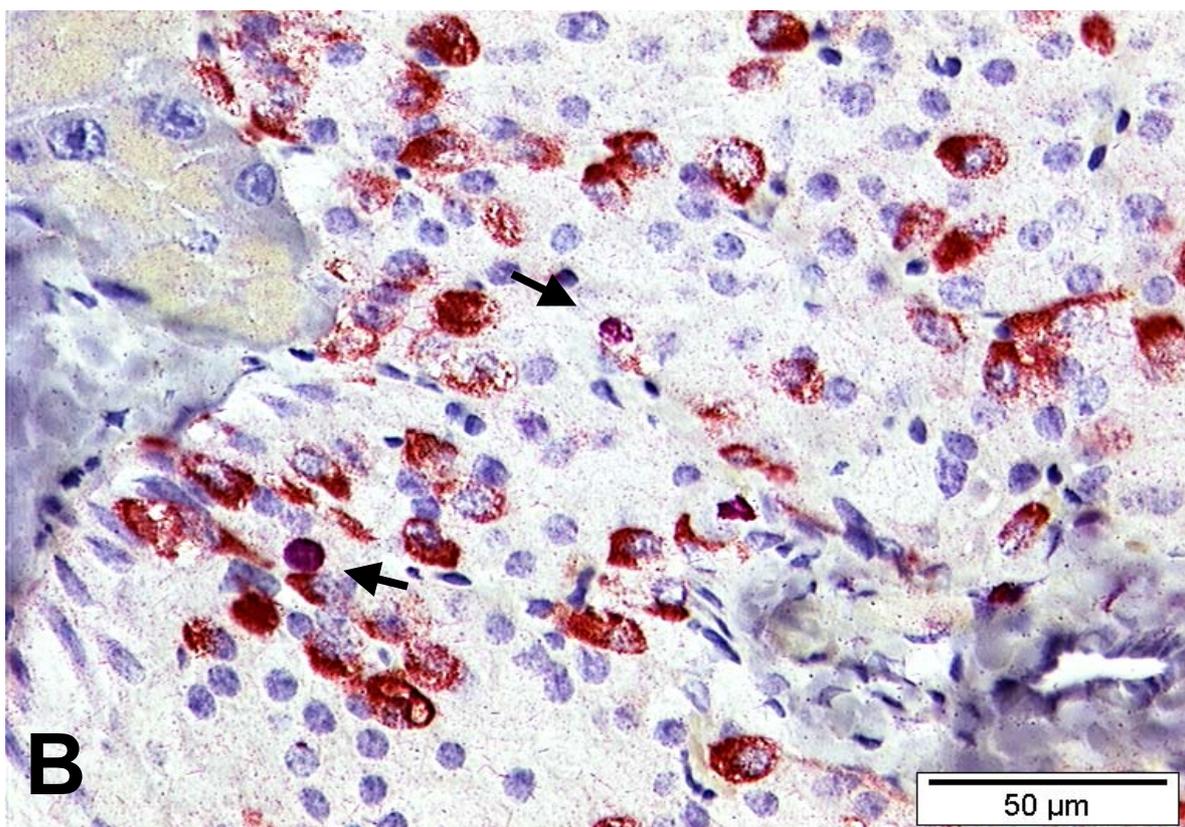
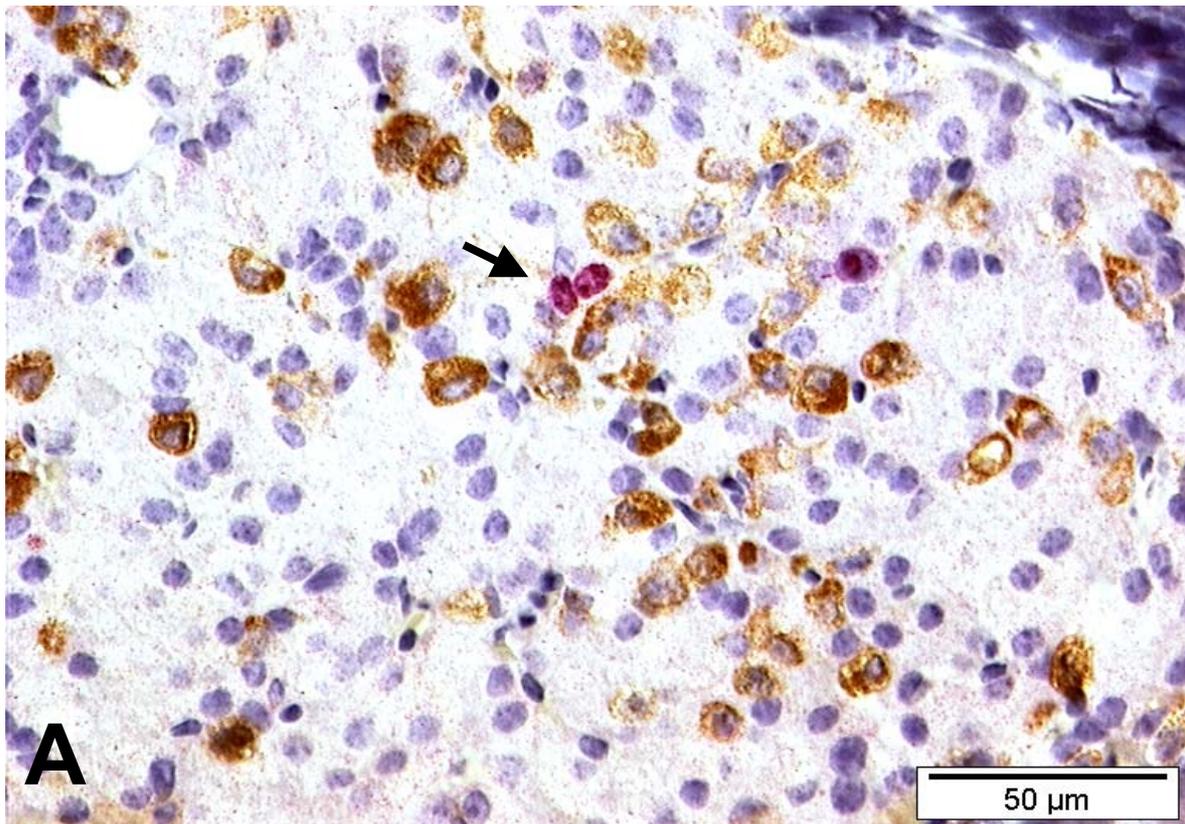


Abb. 4: Vergleich der Varianten A und B

Abb. 4 A: Nachweis der primären Non- β -Antikörper mit HRP-markierten Sekundär- und Tertiär-Antikörpern, Nachweis der Ki-67-Antikörper mittels LSAB-Methode (Tab. 1, Spalte II).

Abb. 4 B: Nachweis der primären Non- β -Antikörper über Streptavidin-HRP und der Ki-67-Antikörper mittels Streptavidin-AP, jeweils nach Einsatz biotinylierter F(ab)₂-Fragmente (Tab. 1, Spalte IV).

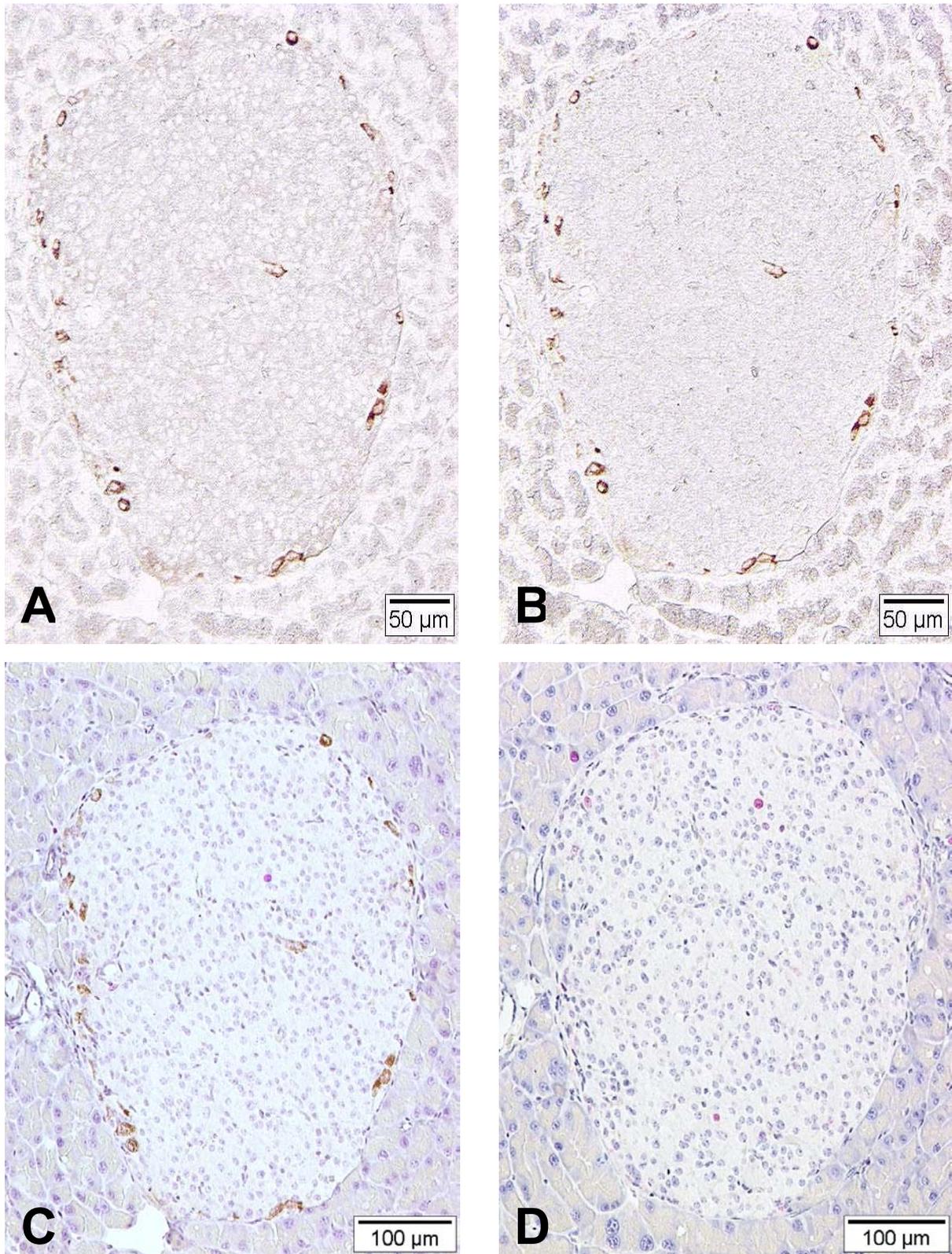


Abb. 5: Zeitpunkt des DDKT-Einsatzes

Abb. 5 A-C: Bilder derselben Langerhans'schen Insel zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf einer Non- β -/Ki-67-Doppelfärbung; **Abb. 5 A** zeigt die Insel nach Abschluss der kompletten Non- β -Färbung, jedoch vor Einsatz des DDKT, während **Abb. 5 B** dieselbe Insel nach dem Kernaufschluss im DDKT darstellt; **Abb. 5 C** zeigt die Insel nach Abschluss der gesamten Doppelfärbung (non- β + Ki-67) und Gegenfärbung mit Hämalaun (Tab. 1, Spalte II), **Abb. 5 D:** Endergebnis der „Doppelfärbung“ bei DDKT-Einsatz direkt vor der Inkubation mit DAB (Tab. 1, Spalte I)

Darstellung von β -Zellen und proliferierenden Zellen

Die beiden Unterschiede dieser Färbung zu der oben beschriebenen Methode sind der Einsatz eines anderen Primär-Antikörpers für die Hormonfärbung sowie höherer Konzentrationen der Sekundär- und Tertiär-Antikörper.

Auch hier wurden Versuche zur Bestimmung von Antikörper-Konzentration, Inkubationszeit und -temperatur durchgeführt.

Während bei einer Konzentration des Insulin-Antikörpers von 1:150 je nach Inkubationszeit und -temperatur (30 Minuten bei Raumtemperatur / über Nacht bei 4°) entweder keine oder nur eine sehr schwache Färbung auftritt, wird beim Einsatz einer Konzentration von 1:50 und einer Inkubationstemperatur von 4°C über Nacht eine deutliche Markierung der β -Zellen erreicht. Eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur (21°C) und gleicher Konzentration erbringt keine guten Ergebnisse. Um eine kräftigere Färbung der insulinproduzierenden Zellen zu erreichen, muss die Konzentration der Sekundär-Antikörper von 1:600 auf 1:300 erhöht werden (Abb. 3 B).

3.1.2 Doppelfärbung zur Identifizierung apoptotischer β -Zellen

Sowohl zur Bestimmung des Zeitpunkts als auch der Dauer des obligatorischen Einsatzes der RNase wurden Versuche durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass bei Anwendung der RNase vor dem Propidium Jodid eine deutlich geringere Hintergrundfärbung (= Färbung von mRNA) auftritt, als bei gleichzeitigem Einsatz. Kein Unterschied ergibt sich zwischen 10- und 20-minütiger Inkubation vor der Fluoreszenzfärbung.

Auch für die Fluoreszenzfärbung wurden verschiedene Konzentrationen sowie Inkubationszeiten geprüft.

Während die Inkubationen von 10 $\mu\text{g/ml}$ in PBS über 10 Minuten, wie auch von 5 $\mu\text{g/ml}$ in PBS über 30 Minuten eine Hintergrundfärbung hervorrufen, liefert die Verwendung von 5 $\mu\text{g/ml}$ in PBS über 20 Minuten befriedigende Ergebnisse. Sämtliche Versuche wurden bei 37°C durchgeführt.

Da eine Gegenfärbung mit Hämalaun die Fluoreszenz unterdrückt, mussten wir auf sie verzichten.

3.2 Entwicklung des Pankreas bei diabetischen und insulinresistenten männlichen NZO Mäusen

3.2.1 Physiologische Charakteristika der Tiere

Die physiologischen Daten (Körpergewicht, Blutglukose und Insulinspiegel) der in dieser Studie verwendeten Tiere wurden von Frau Prof. Dr. Dr. Herberg am Deutschen Diabetes Forschungsinstitut in Düsseldorf erhoben und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Aufgrund dieser Stoffwechselwerte, insbesondere der Blutglukose und der Insulinspiegel, werden die verwendeten Tiere von uns in zwei Gruppen eingeteilt, die wir als diabetische Tiere und hyperinsulinämische, insulinresistente Tiere klassifiziert haben. Blutzucker und Insulinwerte dienen auch als Korrelationsparameter mit den morphometrischen Daten.

3.2.1.1 Körpergewicht (KG)

Die Entwicklung der Körpergewichte ist den Diagrammen 3 bzw. 4 zu entnehmen.

Die diabetischen Tiere (Diagramm 3) erreichen bis zur 16. Woche mit $52,3 \pm 1,6$ g ein etwas höheres KG als die insulinresistenten Tiere mit $49,6 \pm 3,2$ g, ohne dass dies jedoch statistisch signifikant ist. Ab der 24. Lebenswoche sind die insulinresistenten Tiere im Mittel schwerer als die diabetischen Tiere. Im weiteren Verlauf kommt es bei drei diabetischen Tieren zu einer deutlichen Gewichtsabnahme. Diese Gewichtsabnahme geht zeitlich mit einem starken Anstieg der Blutglukose einher (s. Diagramme 5-7).

Die insulinresistenten Tiere (Diagramm 4) zeigen bis zur 36. Woche einen kontinuierlichen Anstieg des KG. Nach der 36. Woche halten sie ihr KG bis zu ihrer Tötung (52. Woche) annähernd auf dem erreichten Niveau.

Diagramm 3: Entwicklung des Körpergewichts der diabetischen Tiere über 36 bzw. 52 Wochen

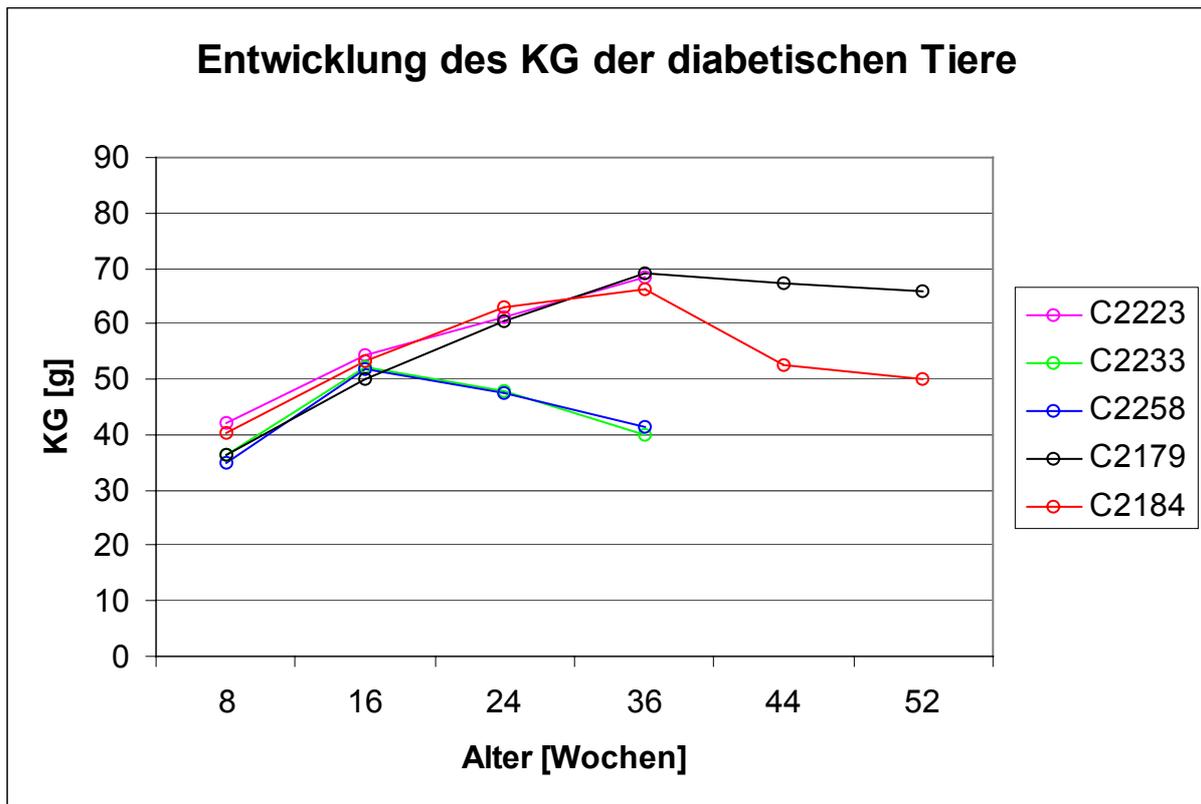
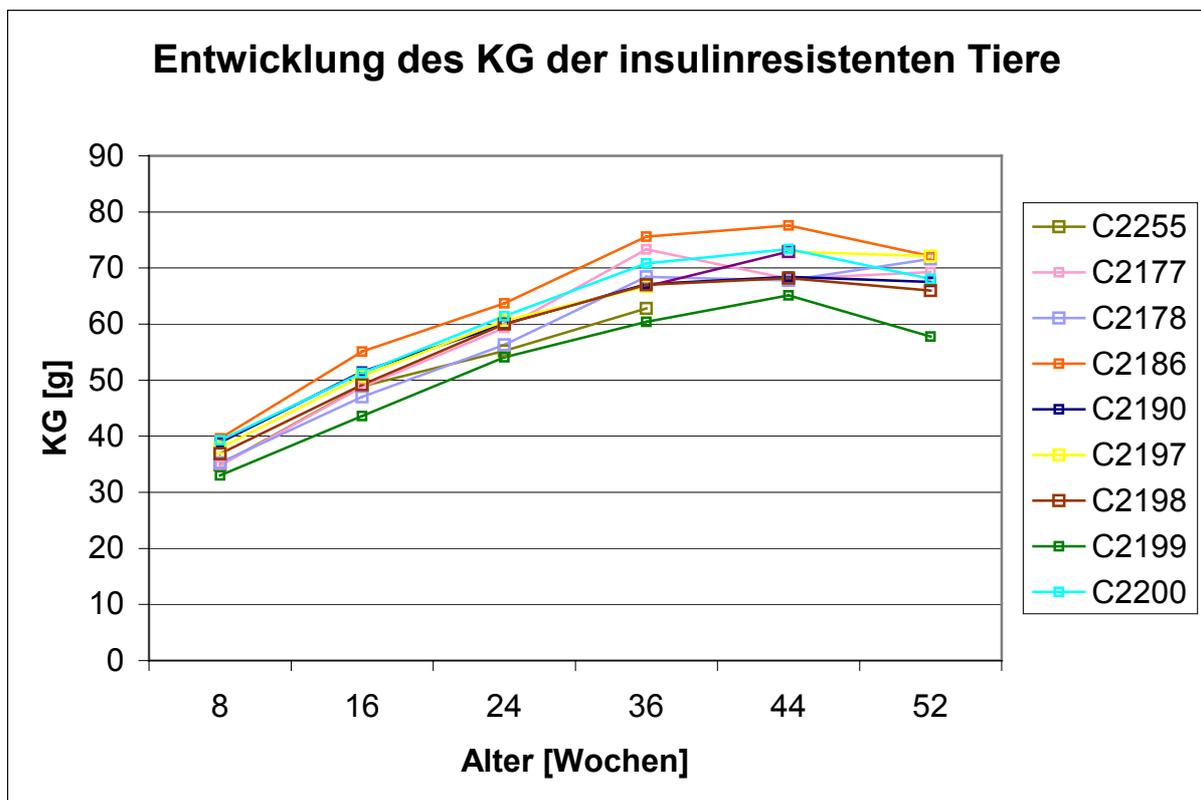


Diagramm 4: Entwicklung des Körpergewichts der insulinresistenten Tiere über 36 bzw. 52 Wochen



3.2.1.2 Blutglukose (BG) und immunreaktiver Insulinspiegel (IRI)

BG und IRI sind zwar aus experimentellen Gründen in großen Zeitabständen kontrolliert worden, lassen aber das Stoffwechselverhalten über den gesamten Versuchszeitraum abschätzen. Bei der Beurteilung der Werte ist zu berücksichtigen, dass den Tieren vor der Blutentnahme die Nahrung nicht entzogen wurde.

Deshalb rechnen wir Tiere, die zum Zeitpunkt der Tötung BG-Werte über 250 mg/dl und relativ niedrige IRI-Werte aufwiesen, zur Gruppe der diabetischen NZO Mäuse (Diagramme 5-9) (Junger et al., 2002; Kurrer et al., 1997). In dieser Gruppe laufen die Kurven für BG und IRI generell scherenförmig auseinander. Der Blutzucker steigt dramatisch, während der Insulinspiegel abfällt und sich dann auf einem relativ niedrigen Niveau hält.

Das Stoffwechselverhalten der Tiere, deren BG zum Zeitpunkt der Tötung unter 250 mg/dl liegt, ist wesentlich heterogener (Diagramme 10-18). Der Verlauf der BG- und IRI-Spiegel über 36-52 Wochen lassen bei all diesen Tieren auf das Bestehen einer Insulinresistenz schließen. Die Tiere konnten den Anstieg der BG aber durch eine Anpassung der Insulinproduktion und –sekretion über die gesamte Lebenszeit relativ gut kompensieren. Sechs Tiere zeigen zum Zeitpunkt der Tötung eine zum Teil sehr ausgeprägte Hyperinsulinämie (IRI > 50 μ U/ml).

Im Mittel liegen die Insulinspiegel der insulinresistenten Tiere kurz vor ihrer Tötung mit $85,56 \pm 49,40$ μ U/ml signifikant höher als die der diabetischen Tiere mit $30,56 \pm 20,99$ μ U/ml. Ihre BG-Werte sind mit $176,22 \pm 41,75$ mg/dl deutlich niedriger als die der diabetischen Tiere mit $513,20 \pm 131,54$ mg/dl.

Obwohl für die morphologischen Untersuchungen nur eine begrenzte Anzahl von Tieren eingesetzt wurde, weist das Spektrum der Stoffwechselsituationen dieser Tiere eine genügend große Breite auf, um eine mögliche Rückkopplung zwischen Insulinbedarf, Insulinverfügbarkeit und β -Zellproliferation experimentell aufzudecken.

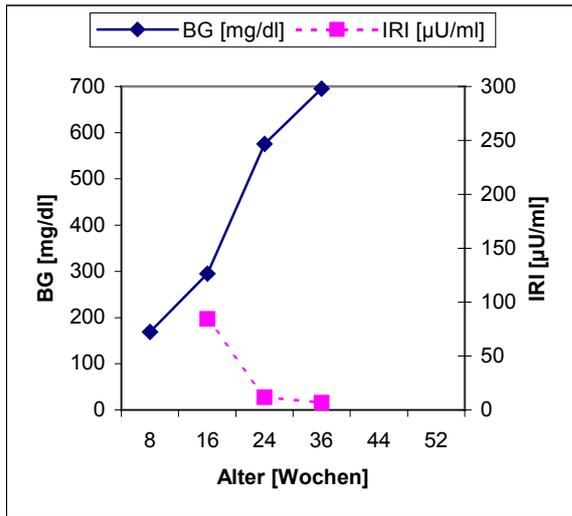


Diagramm 5: C2233

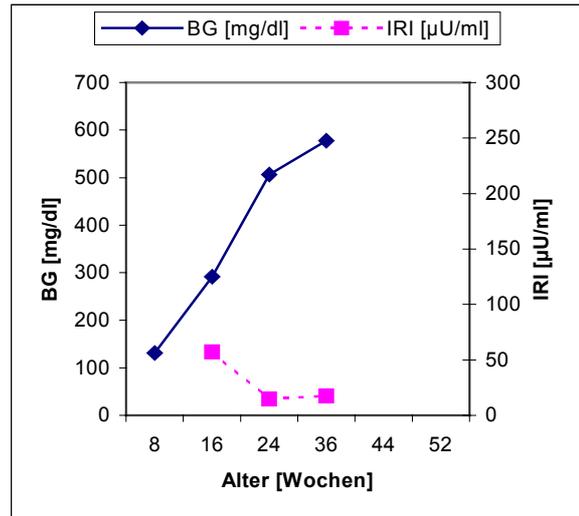


Diagramm 6: C2258

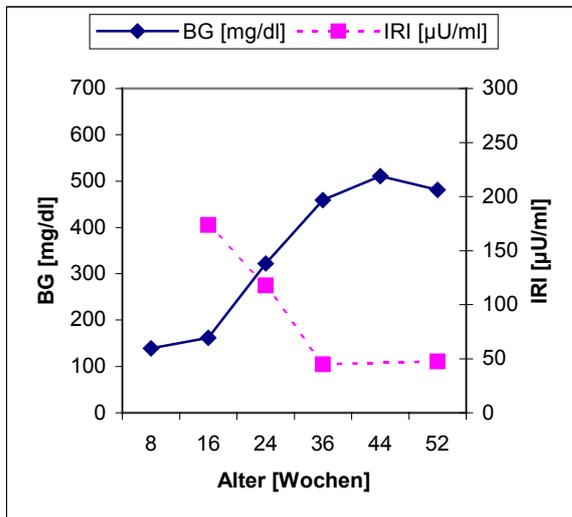


Diagramm 7: C2184

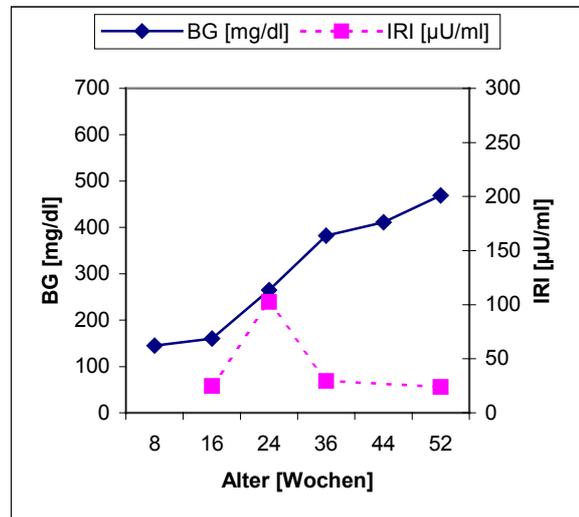


Diagramm 8: C2179

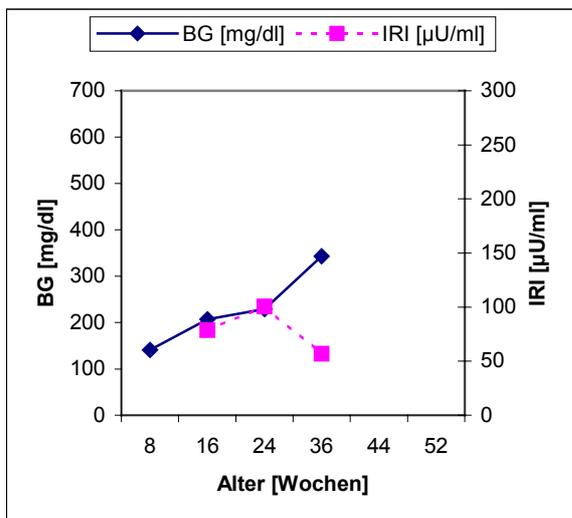


Diagramm 9: C2223

Stoffwechselverläufe (BG und IRI) der diabetischen Tiere über 36 bzw. 52 Wochen

Darstellung des für die diabetischen Tiere typischen Stoffwechselhaltens. Die Kurven für BG und IRI laufen scherenförmig auseinander. Die Blutglukose steigt auf Werte weit über 250 mg/dl, während der Insulinspiegel auf ein relativ niedriges Niveau abfällt und sich dort einpendelt.

Insulinresistente Tiere mit tendenziell
zunehmendem Insulinbedarf

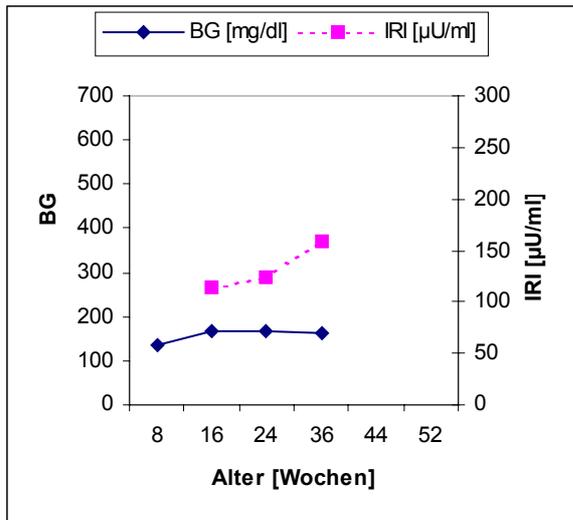


Diagramm 10: C2255

Insulinresistente Tiere mit tendenziell
abnehmendem Insulinbedarf

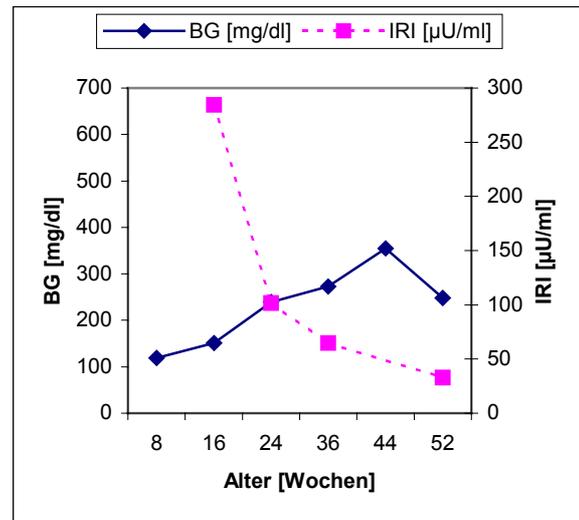


Diagramm 13: C2200

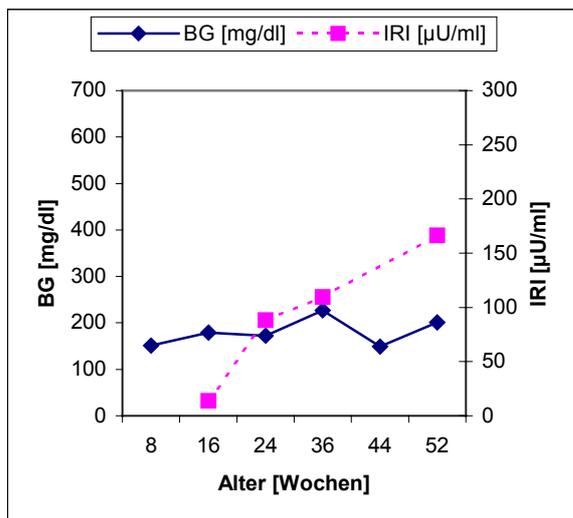


Diagramm 11: C2178

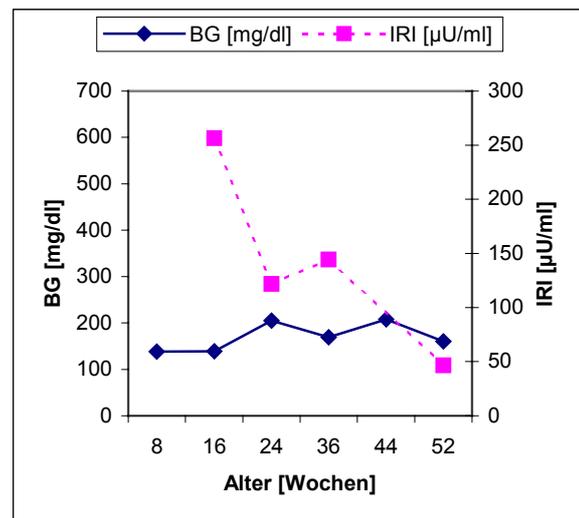


Diagramm 14: C2198

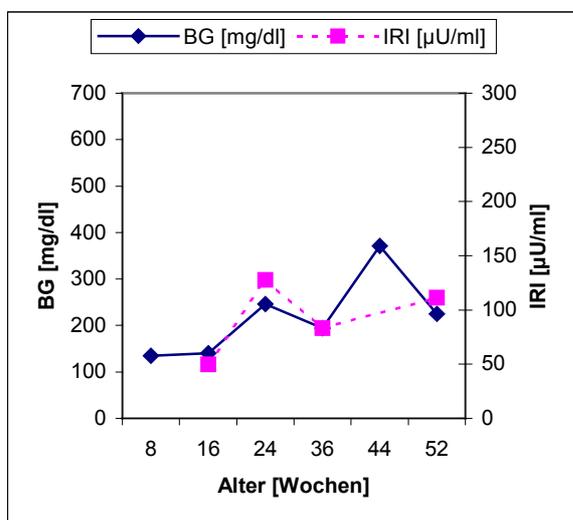


Diagramm 12: C2197

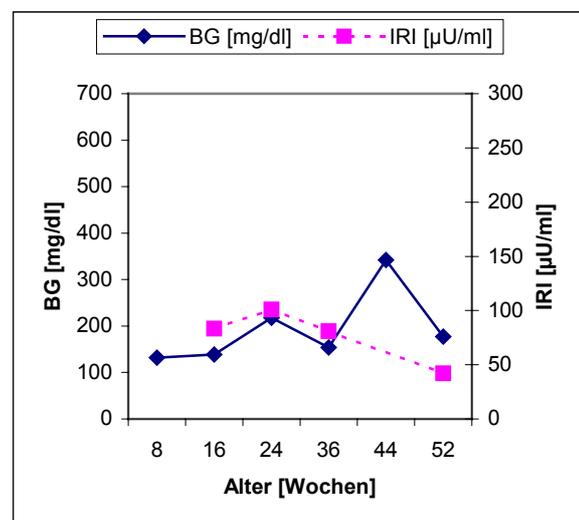


Diagramm 15: C2199

Insulinresistente Tiere mit wechselndem Insulinbedarf

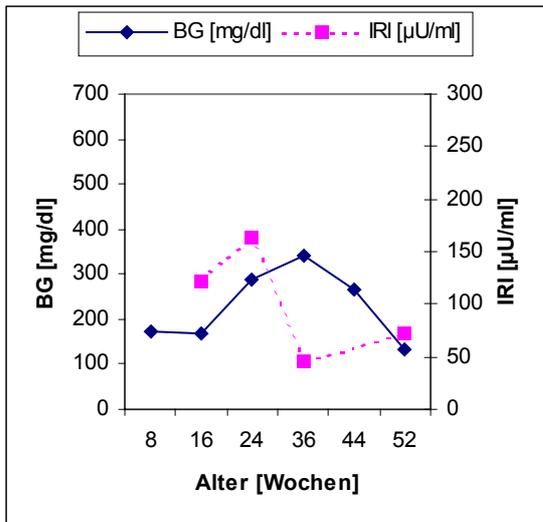


Diagramm 16: C2190

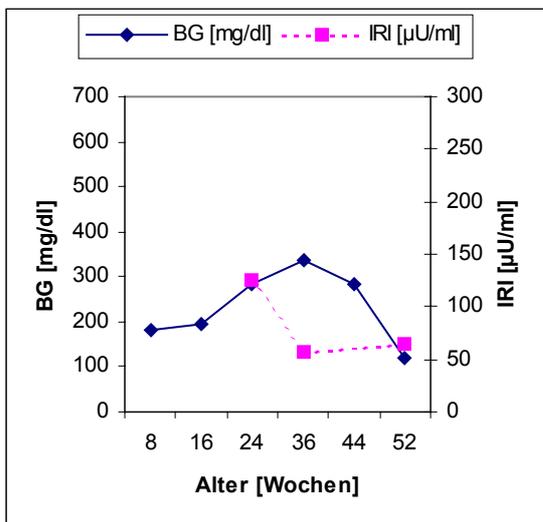


Diagramm 17: C2186

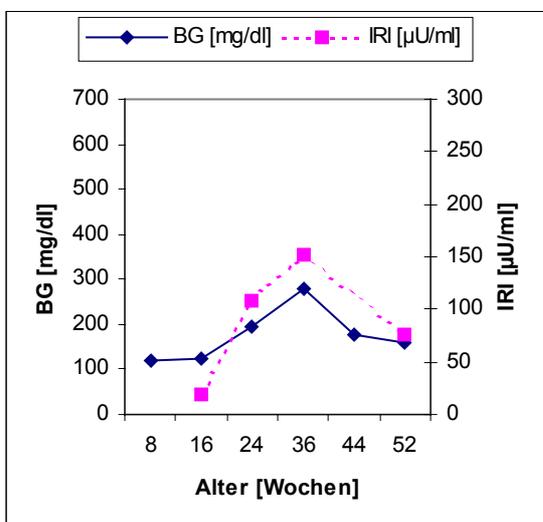


Diagramm 18: C2177

3.2.2 Morphologie des Pankreas

Es ist anzunehmen, dass sich die unterschiedlichen Stoffwechselsituationen in der Pankreasmorphologie widerspiegeln. Um morphologische Äquivalente der Stoffwechselentgleisungen herauszuarbeiten, wurden die Parameter bestimmt, die den individuellen β -Zellpool quantitativ beschreiben: die Volumenfraktion der Inseln (V_{VIns}), die Inseldichte (N_{AIns}), die β -Zellgröße sowie das Verhältnis von β - und Non- β -Zellen innerhalb der Inseln. Außerdem wurden die morphologischen Charakteristika des Pankreas, die Hinweise auf β -Zellläsionen geben können, erfasst.

Da ein Teil der morphometrischen Parameter Bezugsgrößen sind, stellen wir das Kapitel Morphologie den Kapiteln Proliferation und Apoptose voran.

3.2.2.1 Volumenfraktion der Inseln (V_{VIns}), Inseldichte (N_{AIns}) und Hyperplasie der Inseln

Die Langerhans'schen Inseln sind im exokrinen Pankreasgewebe nicht homogen verteilt. Entlang der großen Gänge finden sich höhere Inseldichten und häufig auch größere Inseln als im restlichen Pankreas. Aufgrund dieser inhomogenen Verteilung war es für die Bestimmung der Volumenfraktion der Inseln und der Inseldichten, wie bereits im Methodenteil beschrieben, erforderlich, beide Pankreashälften (Darm- und Milzseite) heranzuziehen und eine größere Zahl von Schnittebenen zu vermessen als für die übrigen morphometrischen Parameter.

Tabelle 3: Berechnung der Volumenfraktion der Inseln und der Inseldichte

Tier	$N_{\text{Schnittebenen}}$	A_{Pankreas}	N_{Ins}	A_{Ins}	V_{VIns}	N_{AIns}
	[n]	[mm ²]	[n]	[mm ²]	[%]	[n/mm ²]
Diabetische Tiere						
C2223	7	274	138	2,54	0,91	0,50
C2233	8	295	121	1,19	0,39	0,41
C2258	10	334	96	0,72	0,21	0,29
C2179	10	331	133	2,54	0,77	0,40
C2184	11	358	99	0,95	0,24	0,28
Insulinresistente Tiere						
C2255	13	262	207	7,03	2,68	0,79
C2177	7	251	232	17,05	6,79	0,92
C2178	13	304	227	17,93	5,90	0,75
C2186	8	345	271	4,94	1,43	0,79
C2190	9	250	172	5,66	2,24	0,69
C2197	11	287	257	10,32	3,60	0,90
C2198	10	234	170	7,17	3,06	0,73
C2199	8	189	194	9,19	4,86	1,03
C2200	10	243	156	4,74	1,95	0,64

Die zur Bestimmung der Volumenfraktion der Inseln (V_{VIns}) und der Inseldichte (N_{AIns}) ausgewertete Anzahl der Schnittebenen ($N_{\text{Schnittebenen}}$) und die erforderlichen Parameter: Flächen der Gewebeprofile (A_{Pankreas}), Anzahl der vorhandenen Inseln (N_{Ins}), sowie die Flächen der Inselprofile (A_{Ins}) in den ausgewerteten Schnitten

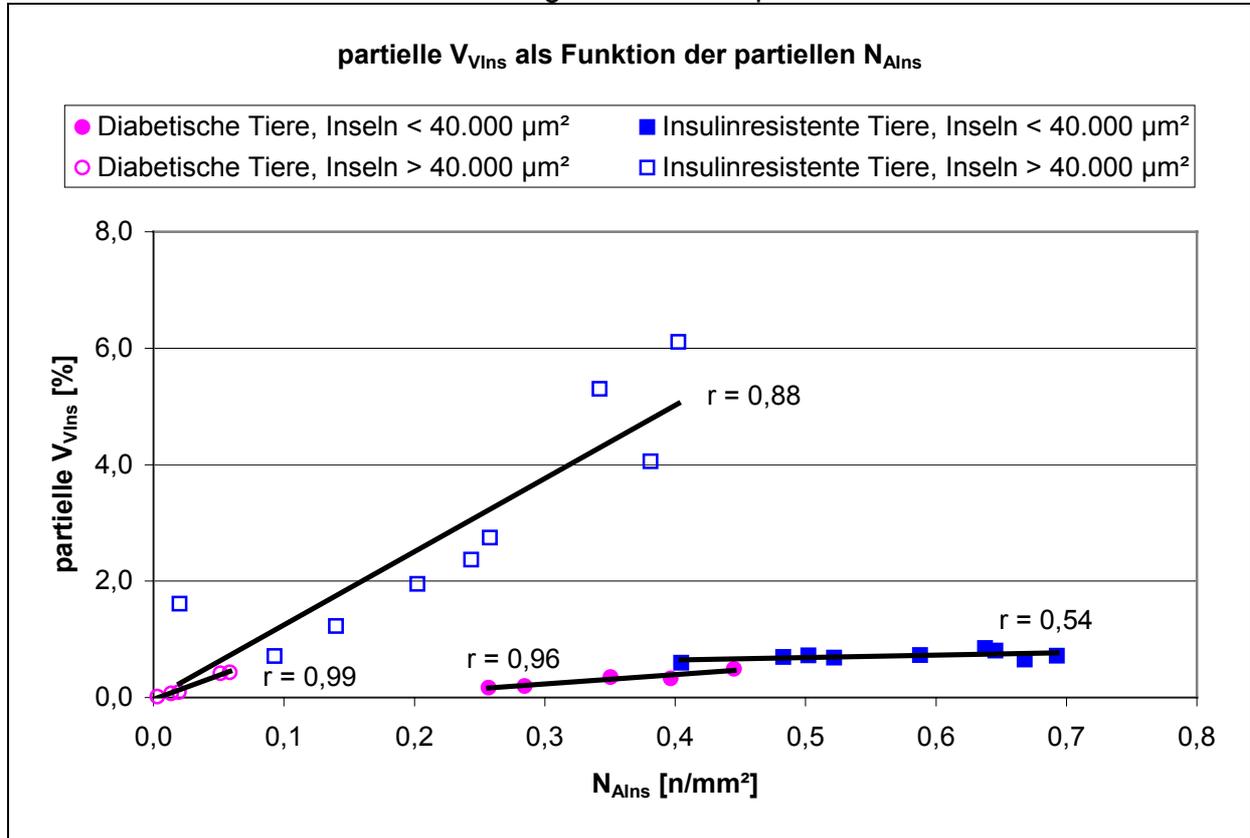
Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, dass sich die Gruppe der insulinresistenten Tiere von der Gruppe der diabetischen Tiere im Bezug auf die Volumenfraktion der Inseln und die Inseldichte deutlich unterscheidet.

Die Volumenfraktionen der Inseln sind bei den insulinresistenten Tieren im Mittel um den Faktor sieben ($3,61 \pm 0,12\%$ gegen $0,51 \pm 0,31\%$), die Inseldichten dagegen nur um den Faktor zwei ($0,81 \pm 0,12$ Inseln/mm² gegen $0,38 \pm 0,09$ Inseln/mm²) höher als bei den diabetischen Tieren. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich bei den insulinresistenten Tieren hypertrophe Inseln bilden. Um diese Hypertrophie zu charakterisieren, wurden die Anschnittflächen der Inseln in zwei unterschiedliche Größenklassen eingeteilt, in Inselprofile kleiner bzw. größer als 40.000 μm^2 , was einem Durchmesser von ca. 225 μm entspricht.

Bildet man von den beiden Größenklassen die partiellen Volumenfraktionen und trägt diese als Funktion ihrer zugehörigen Inseldichten (N_{AIns}) auf, so wird aus der Steigung der Geraden deutlich, dass eine nennenswerte Vergrößerung der Inselzellmasse (ausgedrückt durch V_{VIns}) vorwiegend durch Hyperplasie eines Teils der Inseln und nicht durch Hypertrophie der endokrinen Zellen (s.u.) bewirkt wird (Diagramm 19). Bei den diabetischen Tieren sind 90-100 % aller Inselprofile kleiner

als $40.000 \mu\text{m}^2$. Bei den insulinresistenten Tieren dagegen liegen zwischen 10 und 45 % der Inselprofile über $40.000 \mu\text{m}^2$. Im Einzelfall weisen die Schnittprofile Flächen von über $1.000.000 \mu\text{m}^2$ auf.

Diagramm 19: Abhängigkeit der partiellen Volumenfraktion der Inseln von der Inseldichte und dem Anteil der Inseln größer $40.000 \mu\text{m}^2$



3.2.2.2 Relation der Non- β - und β -Zell-Anteile sowie β -Zelldichte und β -Zellgröße

Die spezifische Färbung der Non- β -Zellen ermöglicht eine Differenzierung der Flächenanteile von Non- β - und β -Zellen in den Inselfschnitten. Die Hämalaun-Kernfärbung erlaubt des Weiteren eine Identifizierung und Zählung der β -Zellen (Diagramme 20 und 21, sowie Tabellen 4 und 5). Diese Daten bilden die Bezugsbasis zur Berechnung der Ki-67-Markierungsindices. Darüber hinaus liefern sie Hinweise für eine unterschiedliche Dynamik des β -Zellwachstums und der Degeneration der β - und Non- β -Zellen.

Die Zahl der auszuwertenden Inseln wurde über die Bildung der progressiven Mittelwerte ermittelt (Williams, 1977, S.37), die in den Diagrammen 20 und 21 dargestellt ist. Als zugelassene Abweichung wurden $\pm 10\%$ festgelegt.

Diagramm 20: Verläufe der progressiven Mittelwerte der Non- β -Fläche je Insel in Prozent ($V_{V_{\text{non-}\beta}(\text{Ins})}$) bei den diabetischen Tieren

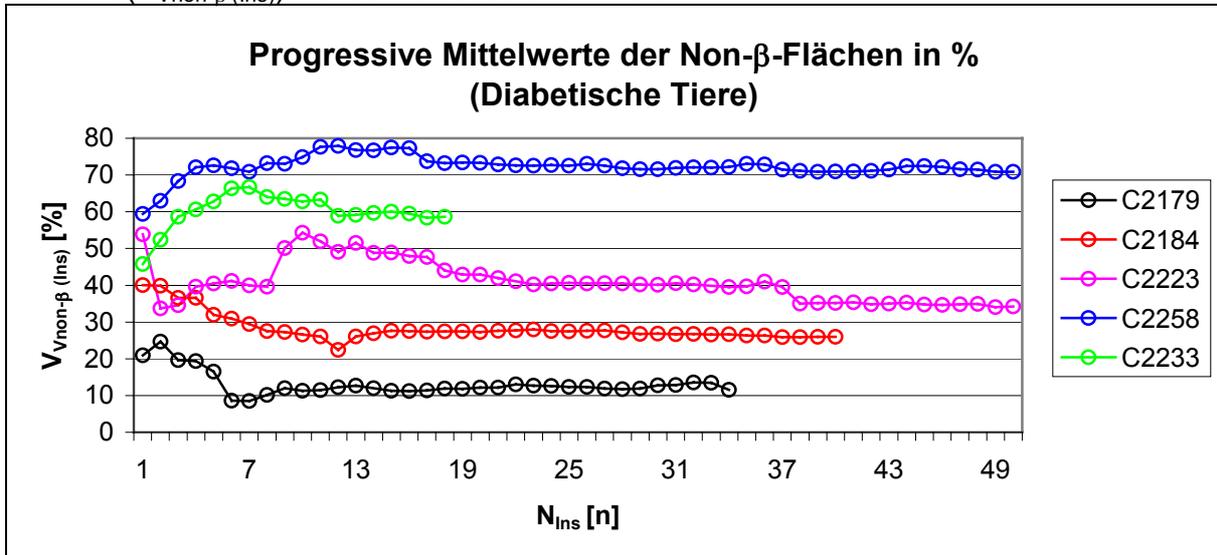
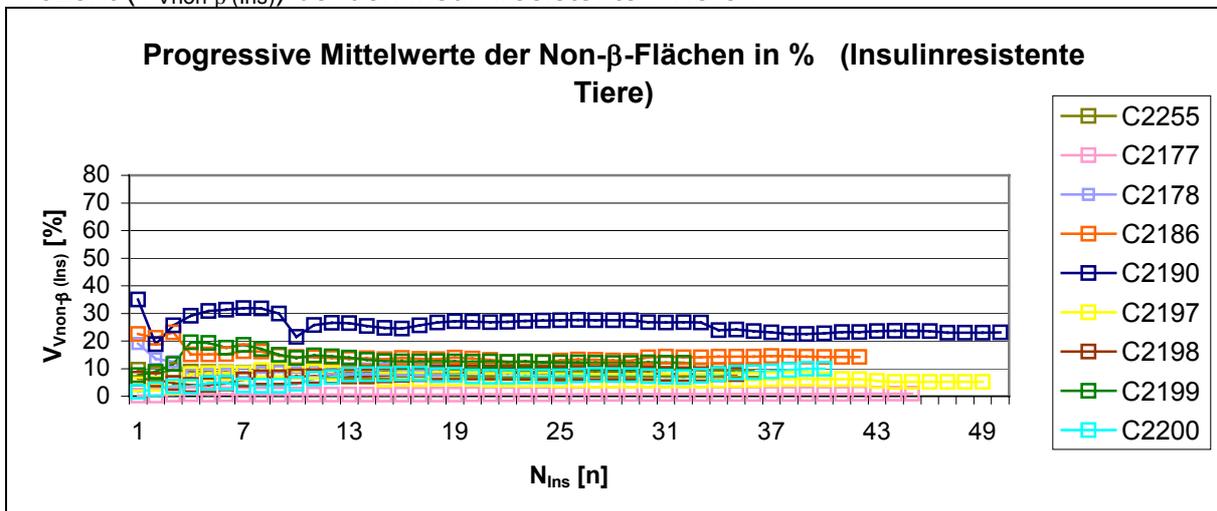


Diagramm 21: Verläufe der progressiven Mittelwerte der Non- β -Fläche je Insel in Prozent ($V_{V_{\text{non-}\beta}(\text{Ins})}$) bei den insulinresistenten Tieren



Das Verhältnis von β - zu Non- β -Zellflächen variiert innerhalb der Gruppe der diabetischen Tiere sehr stark. Bei den am schwersten diabetischen Tieren (C2233, C2258) beträgt der Non- β -Anteil 60-70 %. Bei den übrigen drei diabetischen Tieren liegt der Non- β -Anteil zwischen 10 und gut 30 %. Bei den insulinresistenten Tieren

liegt der Non- β -Anteil dagegen grostenteils unter 25% (Diagramm 20 und 21, sowie Tab. 4). Durchschnittlich liegt er bei den diabetischen Tieren mit 40 % signifikant hohrer als der der insulinresistenten Tiere mit ca. 10 %.

Neben den Volumenfraktionen der β - bzw. Non- β -Anteile am Inselgewebe ist die β -Zelldichte ($N_{A\beta}$) in Tabelle 4 dargestellt, aus der sich eine Abschätzung der β -Zellgröße vornehmen lässt.

Tabelle 4: Morphometrische Analyse der Inselprofile

Tier	N_{Ins} [n]	A_{Ins} [$10^3 \mu m^2$]	$A_{Non-\beta}$ [$10^3 \mu m^2$]	$V_{Vnon-\beta (Ins)}$ [%]	A_{β} [$10^3 \mu m^2$]	$V_{V\beta (Ins)}$ [%]	N_{β} [n]	$N_{A\beta}$ [n/ $10^3 \mu m^2$]
Diabetische Tiere								
C2223	87	825,7	269,3	32,6	556,4	67,4	2869	5,2
C2233	18	73,3	43,0	58,7	30,3	41,3	154	5,1
C2258	105	540,7	385,9	71,4	154,8	28,6	777	5,0
C2179	67	1445,2	201,5	13,9	1243,7	86,1	8224	6,6
C2184	45	285,0	72,5	25,4	212,5	74,6	1211	5,7
Insulinresistente Tiere								
C2255	36	1096,1	102,6	9,4	993,5	90,6	5704	5,7
C2177	45	3993,0	35,9	0,9	3957,1	99,1	25839	6,5
C2178	18	1927,6	181,6	9,4	1746,0	90,6	9207	5,3
C2186	42	800,2	113,5	14,2	686,7	85,8	5569	8,1
C2190	50	1037,1	240,0	23,1	797,1	76,9	5111	6,4
C2197	49	1700,8	89,3	5,2	1611,6	94,8	10634	6,6
C2198	35	867,6	69,6	8,0	797,9	92,0	5593	7,0
C2199	32	1317,0	160,5	12,2	1156,5	87,8	8802	7,6
C2200	40	700,6	69,3	9,9	631,3	90,1	5094	8,1

Bestimmung der Non- β -Fläche ($A_{non-\beta}$) und der β -Zellzahl (N_{β}), Berechnung der β -Fläche (A_{β}), der Volumenfraktionen von Non- β - ($V_{Vnon-\beta (Ins)}$) und β -Fläche ($V_{V\beta (Ins)}$) am Inselprofil, sowie der β -Zelldichte ($N_{A\beta}$)

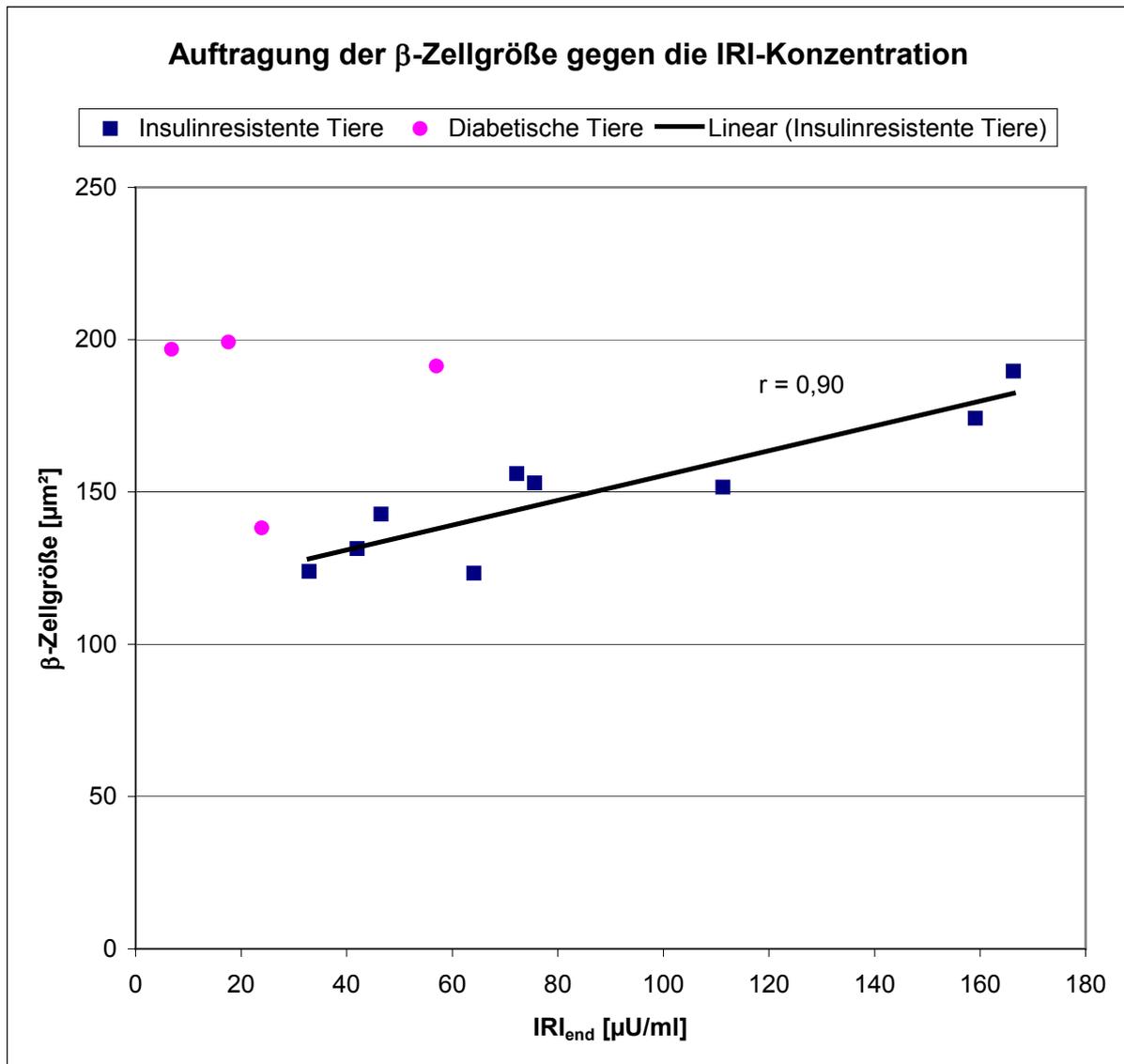
Die immunenzymatisch gefärbten Non- β -Zellen sind gut abgrenzbar. Die Restfläche der Inseln beinhaltet überwiegend β -Zellen und zu geringem Anteil Gefaanschnitte und das zugehörige Bindegewebe (Tab. 2). Die Zellkerne dieser Gewebekomponenten sind aufgrund ihrer Form von den β -Zellkernen in der Regel gut zu unterscheiden. Die Zählung der β -Zellkerne pro Flächeneinheit ergibt daher verlässliche Werte für β -Zelldichten und als Kehrwert eine gute Abschätzung der β -Zellgröße.

Im Mittel liegt die β -Zelldichte bei den insulinresistenten Tieren bei $6,8 \pm 0,98$ pro $10^3 \mu m^2$ β -Zellfläche und die daraus geschätzte β -Zellgröße bei $149,5 \pm 22,3 \mu m^2$. Die

diabetischen Tieren unterscheiden sich davon signifikant mit einer durchschnittlichen β -Zelldichte von $5,5 \pm 0,66$ pro $10^3 \mu\text{m}^2$ β -Zellfläche und einer β -Zellgröße von $179,7 \pm 25,4 \mu\text{m}^2$. Es zeigt sich also, dass die β -Zellen der diabetischen Tiere durchschnittlich größer sind als die der insulinresistenten Tiere.

Interessanterweise ergibt sich für die Gruppe der insulinresistenten Tiere, nicht jedoch für die diabetischen Tiere, eine positive Korrelation zwischen individuellen β -Zellgrößen und den zum Zeitpunkt der Tötung bestimmten IRI-Konzentrationen (Diagramm 22). Dies kann als Hinweis dafür gewertet werden, dass β -Zellen bei hohen Sekretionsleistungen hypertrophieren.

Diagramm 22: Zusammenhang zwischen β -Zellgröße und der IRI-Konzentration zum Zeitpunkt der Tötung der Tiere



Aus den Flächenrelationen, Non- β - zu β -Flächen, lassen sich für das gesamte Pankreas die Volumenfraktionen $V_{V_{\text{non-}\beta}} \text{ (Pankreas)}$ und $V_{V_{\beta}} \text{ (Pankreas)}$ (Testvolumen Pankreas) abschätzen (Tab. 5).

Tabelle 5: Differenzierung der Volumenfraktion der Inseln ($V_{V_{\text{Ins}}}$) in die Volumenfraktion des Non- β - ($V_{V_{\text{non-}\beta}} \text{ (Pankreas)}$) und β -Anteils ($V_{V_{\beta}} \text{ (Pankreas)}$) bezogen auf das Pankreasgewebe

Tier	$V_{V_{\text{Ins}}}$ [%]	$V_{V_{\text{non-}\beta}} \text{ (Pankreas)}$ [%]	$V_{V_{\beta}} \text{ (Pankreas)}$ [%]
Diabetische Tiere			
C2223	0,91	0,30	0,60
C2233	0,39	0,23	0,16
C2258	0,21	0,14	0,06
C2179	0,77	0,09	0,68
C2184	0,24	0,06	0,18
Insulinresistente Tiere			
C2255	2,68	0,25	2,43
C2177	6,79	0,06	6,73
C2178	5,90	0,56	5,34
C2186	1,43	0,20	1,23
C2190	2,24	0,52	1,72
C2197	3,60	0,19	3,41
C2198	3,06	0,25	2,82
C2199	4,17	0,59	4,27
C2200	1,95	0,19	1,76

Zur notwendigen Bestimmung der Non- β - bzw. β -Zellfläche siehe Tab. 4.

Während die Volumenfraktionen der Inseln ($V_{V_{\text{Ins}}}$) bei den insulinresistenten Tieren durchschnittlich sieben mal höher liegen als bei den diabetischen Tieren, liegt die Volumenfraktion der β -Zellen ($V_{V_{\beta}} \text{ (Pankreas)}$) sogar um den Faktor zehn höher ($3,30 \pm 1,84 \%$ gegen $0,34 \pm 0,28 \%$).

Dagegen liegen die Volumenfraktionen der Non- β -Zellen ($V_{V_{\text{non-}\beta}} \text{ (Pankreas)}$) bei den insulinresistenten Tieren mit $0,31 \pm 0,19 \%$ nur geringfügig über denen der diabetischen Tiere mit $0,17 \pm 0,10 \%$, dieser Unterschied ist nicht signifikant.

Dieser Befund weist auf eine spezifische Reduktion der β -Zellen bei den diabetischen Tieren hin.

3.2.2.3 Morphologische Integrität der Langerhans'schen Inseln

Zusätzlich zu den unterschiedlichen Volumenfraktionen der Inseln der beiden Tiergruppen und den unterschiedlichen Anteilen von Non- β - und β -Zellen innerhalb der Inseln fallen histologisch Besonderheiten in der Umgebung und in den Inseln selbst auf. Dazu zählen das Vordringen exokriner Zellen in das Inselgewebe, welches als Exokrinisierung bezeichnet wird (Abb. 6 D), das Auftreten von peri- und intrainsulären Leukozyteninfiltraten (Abb. 6 B + C), die von den Pankreasgängen her die Inseln erreichen, und die Bildung intrainsulärer Ductuli (Abb. 6 C). Inseln, deren β -Zellanteil nahezu vollständig zerstört ist, klassifizieren wir als Relikte (Abb. 6 E).

Um einen Zusammenhang dieser morphologischen Charakteristika mit der Stoffwechselsituation der Tiere zu untersuchen, haben wir diese Veränderungen quantifiziert (Tab. 6).

Jede Insel wurde ausschließlich einer Gruppe zugeordnet. So wurden beispielsweise Inseln mit Infiltraten und zusätzlicher Exokrinisierung in die Gruppe „Infiltr. (z.T. mit Exokr.)“ sortiert. Nur das Vorhandensein von intrainsulären Ductuli wurde als Zusatzcharakteristikum gewertet, d.h., dass beispielsweise eine exokrinisierte Insel mit intrainsulären Ductuli in beiden Gruppen aufgeführt wird.

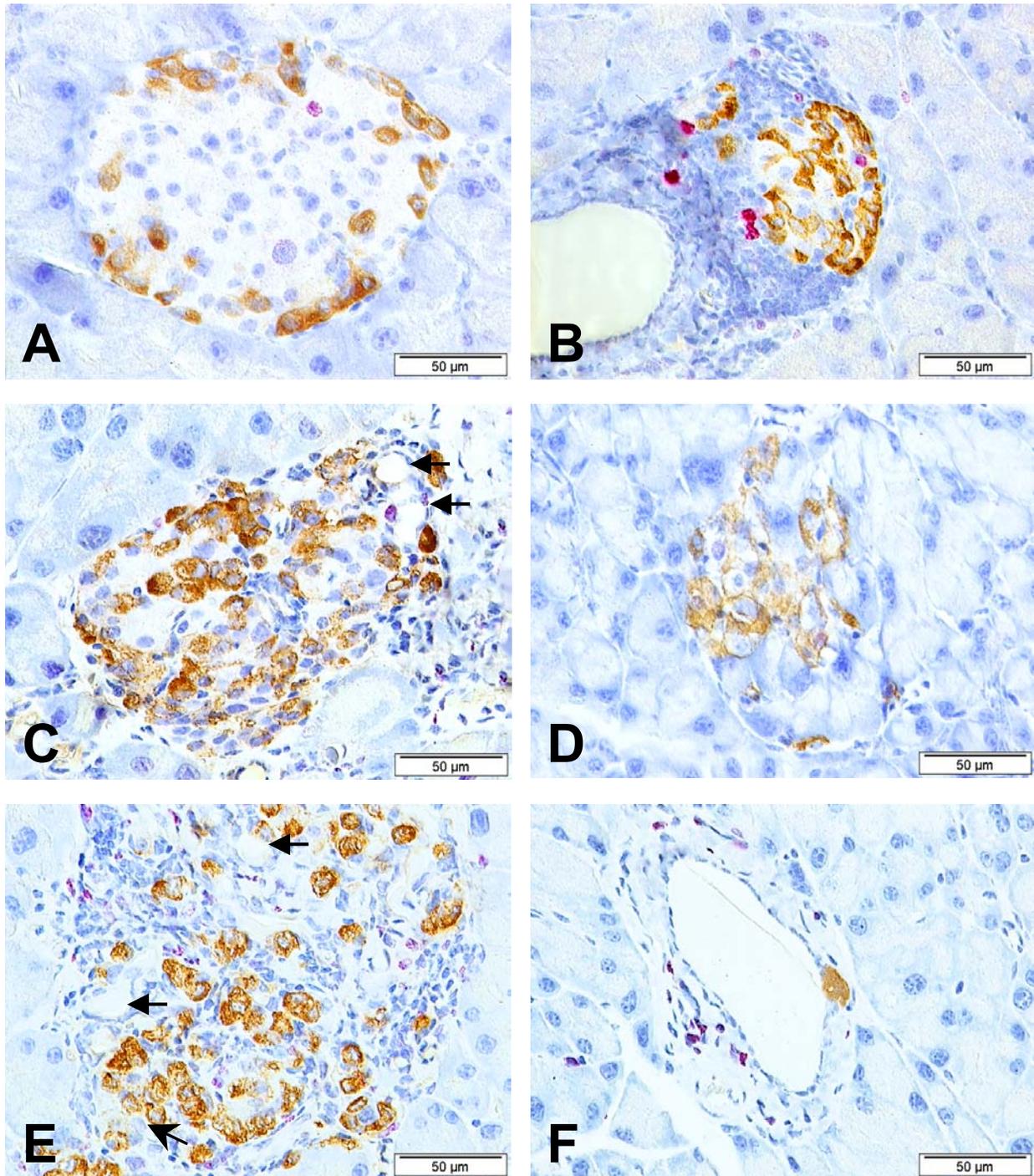


Abb. 6: Darstellung unterschiedlicher Inselmorphologien

Abb. 6 A: Darstellung einer intakten Langerhans'schen Insel mit einer proliferierenden β -Zelle (Non- β -/Ki-67-Doppelfärbung)

Abb. 6 B: Darstellung einer Insel mit periduktal-periinsulärem Infiltrat und proliferierender β -Zelle (Non- β -/Ki-67-Doppelfärbung)

Abb. 6 C: Darstellung einer Insel mit intra-/periinsulärem Infiltrat sowie intrainsulären Ductuli (◀) (Non- β -/Ki-67-Doppelfärbung)

Abb. 6 D: Darstellung einer exokrinierten Langerhans'schen Insel (Non- β -/Ki-67-Doppelfärbung)

Abb. 6 E: Darstellung eines Inselrelikts mit deutlichen intra-/periinsulären Infiltraten, Bildung von Ductuli und nur noch wenigen erkennbaren β -Zellen (◀) (Non- β -/Ki-67-Doppelfärbung)

Abb. 6 F: Darstellung einer aus dem Gangepithel entstehenden β -Zelle (Insulin-/Ki-67-Doppelfärbung)

Tabelle 6: Prozentualer Anteil der unterschiedlichen Insel-Integritäten an der Gesamtheit der ausgewerteten Langerhans'schen Inseln

Tier	N _{ins}	Intakt	nur Exokr.	Infiltr. (z.T. mit Exokr.)	Relikte	II-Ductuli
	[n]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Diabetische Tiere						
C2223	64	20,31	18,75	26,56	34,38	3,13
C2233	55	0,00	0,00	27,27	72,73	7,27
C2258	58	6,90	1,72	18,97	72,41	3,45
C2179	59	23,73	3,39	35,59	37,29	5,08
C2184	34	17,65	0,00	38,24	44,12	2,94
Insulinresistente Tiere						
C2255	63	79,37	7,94	11,11	3,17	3,17
C2177	102	92,16	0,98	5,88	0,98	1,96
C2178	44	86,36	9,09	4,55	0,00	2,27
C2186	61	55,74	19,67	18,03	6,56	0,00
C2190	91	63,74	18,68	13,19	4,40	0,00
C2197	56	58,82	11,76	16,18	10,29	1,47
C2198	71	84,51	8,45	7,04	0,00	0,00
C2199	70	60,00	11,43	21,43	4,29	1,43
C2200	62	66,13	20,97	12,90	0,00	1,61

Die Gruppe der diabetischen Tiere unterscheidet sich auch in der Morphologie der Langerhans'schen Inseln deutlich von der der insulinresistenten Tiere.

Während bei den diabetischen Tieren nur $13,72 \pm 9,92$ % der Inseln gemäß unserer Kriterien intakt sind, sind es bei den insulinresistenten Tieren mit $71,87 \pm 13,73$ % gut fünfmal soviel.

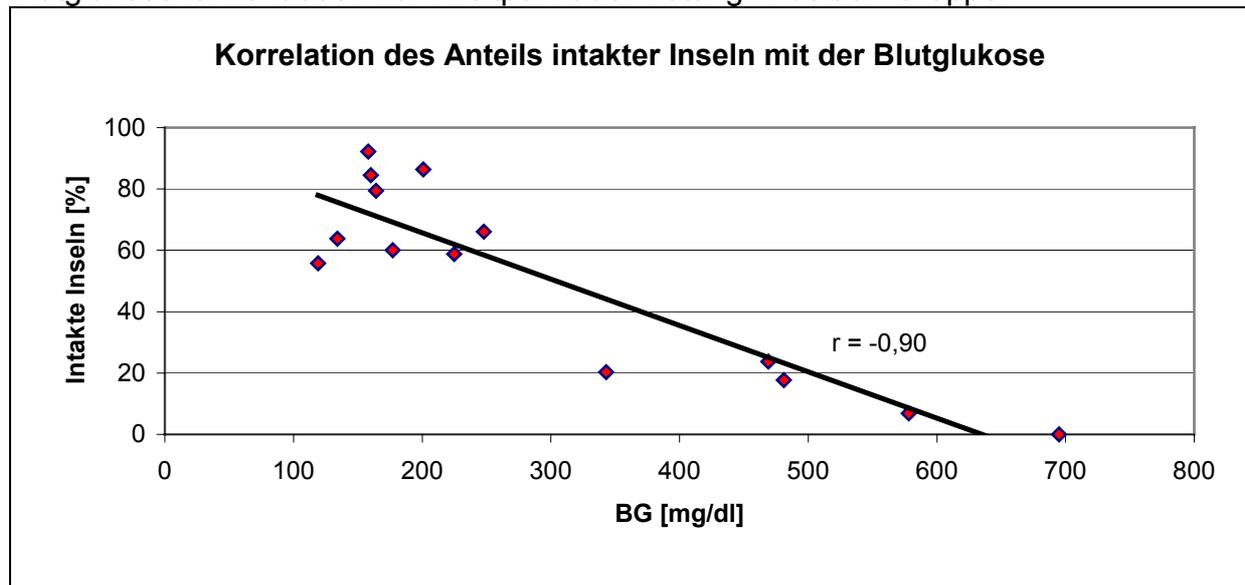
Umgekehrt verhält es sich mit den nahezu vollständig zerstörten Inselrelikten. Hier liegt der prozentuale Anteil bei den diabetischen Tieren mit $51,92 \pm 18,60$ % um den Faktor 15 höher als bei den insulinresistenten Tieren mit $3,30 \pm 3,53$ %.

Insgesamt beobachten wir zwei Qualitäten morphologischer Läsionen der Inseln, zum einen das Vordringen exokriner Zellen in das Inselgewebe, zum anderen leukozytäre Infiltrationen der Inseln. Während bei den diabetischen Tieren die Leukozyteninfiltrate im Vordergrund stehen, ist es bei den insulinresistenten Tieren eher die Exokrinisierung.

Deutlich ist der Unterschied der beiden Gruppen betreffend des Anteils an Inseln mit intransulären Ductuli. Er liegt bei den diabetischen Tieren mit $4,35 \pm 1,78$ % gut dreimal so hoch wie der der insulinresistenten Tiere mit $1,32 \pm 1,12$ %.

Beide Tiergruppen zusammenfassend ergibt sich eine signifikante neg. Korrelation zwischen der Blutglukose und dem Anteil der intakten Inseln (Diagramm 23).

Diagramm 23: Zusammenhang des Anteils intakter Inseln mit der Blutglukosekonzentration zum Zeitpunkt der Tötung in beiden Gruppen



3.2.3 Proliferation der β -Zellen

Der polyklonale Ki-67 Antikörper erkennt das Ki-67 Protein, das nur in proliferierenden Zellen während aller aktiven Phasen des Zellzyklus (Gerdes et al., 1984; Schrape et al., 1987; Braun et al., 1988; Tazzari et al., 1990; Bruno und Darzynkiewicz, 1992) exprimiert wird. Wie sich bei einem ersten Screening der Pankreasschnitte ergab, musste generell von niedrigen Markierungsindices, schätzungsweise weniger als 5 %, ausgegangen werden. Mit einer Ausnahme wurden zur Verbesserung der Zählstatistik pro Tier mehr als 50 Inseln ausgewertet. Während bei den insulinresistenten Tieren mit ihren hyperplastischen Inseln deutlich mehr als 10.000 β -Zellen ausgewertet wurden, liegt die Zahl der ausgewerteten β -Zellen bei den diabetischen Tieren mit den kleinen Inseln und hohem Non- β -Zellanteil deutlich unter 10.000 β -Zellen. Die Datenerhebung ist in Tabelle 7 zusammengefasst.

Die Inseln des Tiers C2233 sind soweit zerstört und durch stark proliferierende Leukozyten infiltriert, dass eine eindeutige Identifizierung Ki-67 positiver β -Zellen nicht mehr möglich ist und wir auf die Bestimmung des Ki-67-Markierungsindex dieses Tieres verzichten mussten. Bei zwei weiteren Tieren wurden zwar 9 bzw. 10

Schnittebenen ausgewertet und insgesamt pro Tier ca. 100 Inseln erfasst, diese enthielten jedoch nur ca. 800 bzw. 2000 β -Zellen.

Tabelle 7: Bestimmung der Anzahl proliferierender β -Zellen und Berechnung des Ki-67-Markierungsindex (I_{Ki67})

Tier	$N_{\text{Schnittebenen}}$ [n]	A_{Pankreas} [mm ²]	A_{Ins} [mm ²]	N_{Ins} [n]	$N_{\beta, Ki67}$ [n]	N_{β} [n]	I_{Ki67} [%]
Diabetische Tiere							
C2223	4	203	1,10	118	118	3856	3,06
C2233	für dieses Tier war die Auswertung des Ki-67-Markierungsindex nicht möglich (s. o.)						
C2258	9	378	0,54	105	8	777	1,03
C2179	5	161	1,45	67	90	8224	1,10
C2184	10	403	0,57	92	16	2020	0,79
Insulinresistente Tiere							
C2255	4	113	2,01	72	90	10129	0,89
C2177	3	143	11,00	126	370	71471	0,52
C2178	3	52	5,48	41	411	27306	1,51
C2186	5	202	2,19	136	82	14440	0,57
C2190	4	177	3,16	106	83	15895	0,52
C2197	3	90	2,61	77	120	16578	0,72
C2198	4	107	3,34	82	33	20714	0,16
C2199	3	79	3,18	81	38	22035	0,17
C2200	6	152	2,37	122	24	17192	0,14

Zur Bestimmung des Ki-67-Markierungsindex (I_{Ki67}) ausgewertete Anzahl der Schnittebenen ($N_{\text{Schnittebenen}}$). Hierin wurden die Gewebeprofil-Flächen (A_{Pankreas}), die Flächen (A_{Ins}) und die Anzahl (N_{Ins}) der Inselprofile, die Anzahl aller β -Zellen (N_{β}), sowie die Anzahl der Ki-67-positiven β -Zellen ($N_{\beta, Ki67}$) bestimmt.

Bei den diabetischen Tieren ergibt sich ein Ki-67 Markierungsindex um oder größer 1%. Bei den insulinresistenten Tieren fällt die sehr breite Spannweite von über einer Zehnerpotenz – von 0,14 bis 1,51% - auf, was auf den Einfluss eines regulativen Parameters hinweist. Tatsächlich ergibt sich eine sehr starke, lineare, positive Korrelation mit den IRI-Konzentrationen, die kurz vor der Entnahme des Pankreas gemessen wurde (Diagramm 24). Ebenso ergibt sich eine positive Korrelation mit der β -Zellgröße, die über die β -Zelldichte geschätzt wurde (Diagramm 25). Dies bedeutet, dass die β -Zellen bei Tieren mit vermehrter Proliferation im Mittel größer sind. Dieser Befund war in Analogie zum beschriebenen Zusammenhang zwischen β -Zellgröße und IRI-Konzentration (Diagramm 22) bzw. zwischen Ki-67-Markierungsindex und IRI-Level zu erwarten. Dagegen findet sich keine Abhängigkeit von den BG-Werten (Diagramm 26). Es zeigen sich keine Korrelationen des Ki-67-Markierungsindex mit den Volumenfraktionen des Inselgewebes ($V_{V_{\text{Ins}}}$) bzw. den Volumenfraktionen des β -Zell-Gewebes ($V_{V_{\beta} (\text{Pankreas})}$).

Diagramm 24: Auftragung des Ki-67-Markierungsindex gegen den zum Zeitpunkt der Tötung gemessenen Insulin-Wert. Bei den insulinresistenten Tieren besteht eine hoch signifikante Korrelation beider Parameter.

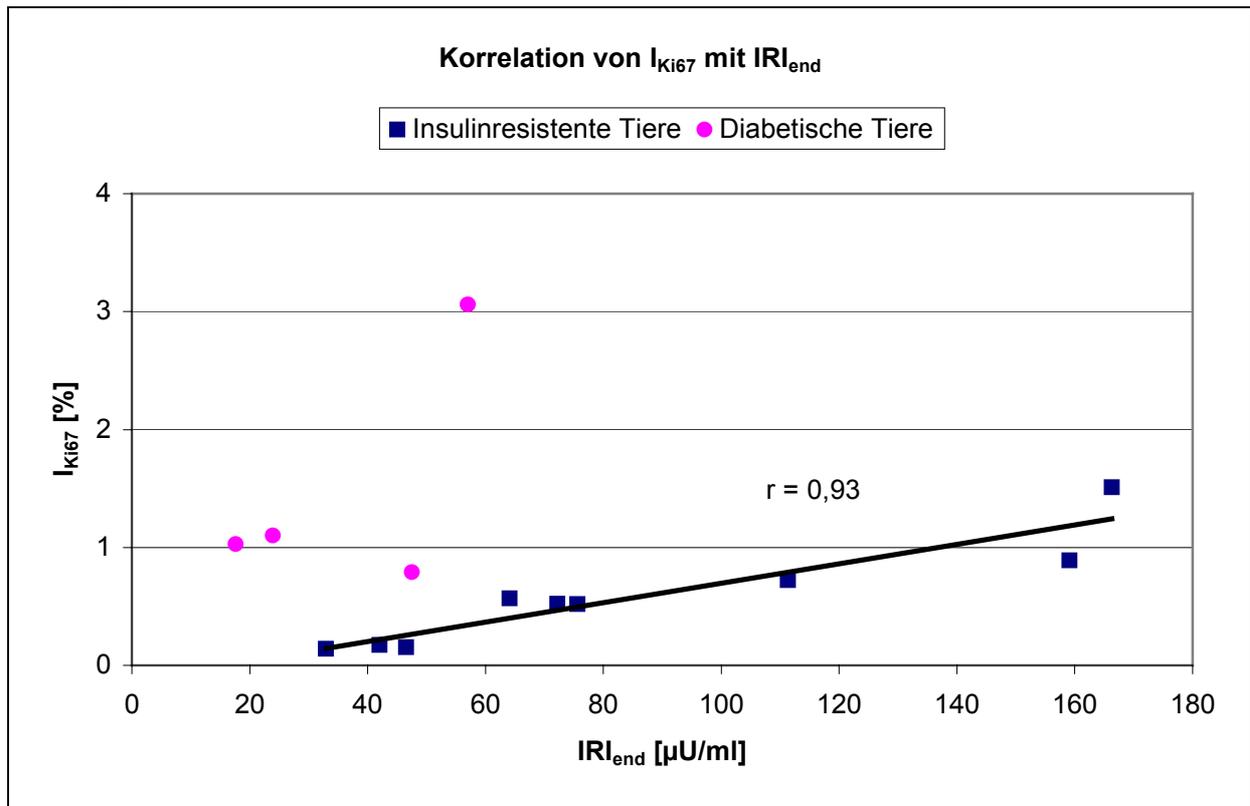


Diagramm 25: Auftragung des Ki-67-Markierungsindex gegen die β -Zellgröße. Bei den insulinresistenten Tieren besteht eine signifikante Korrelation beider Parameter.

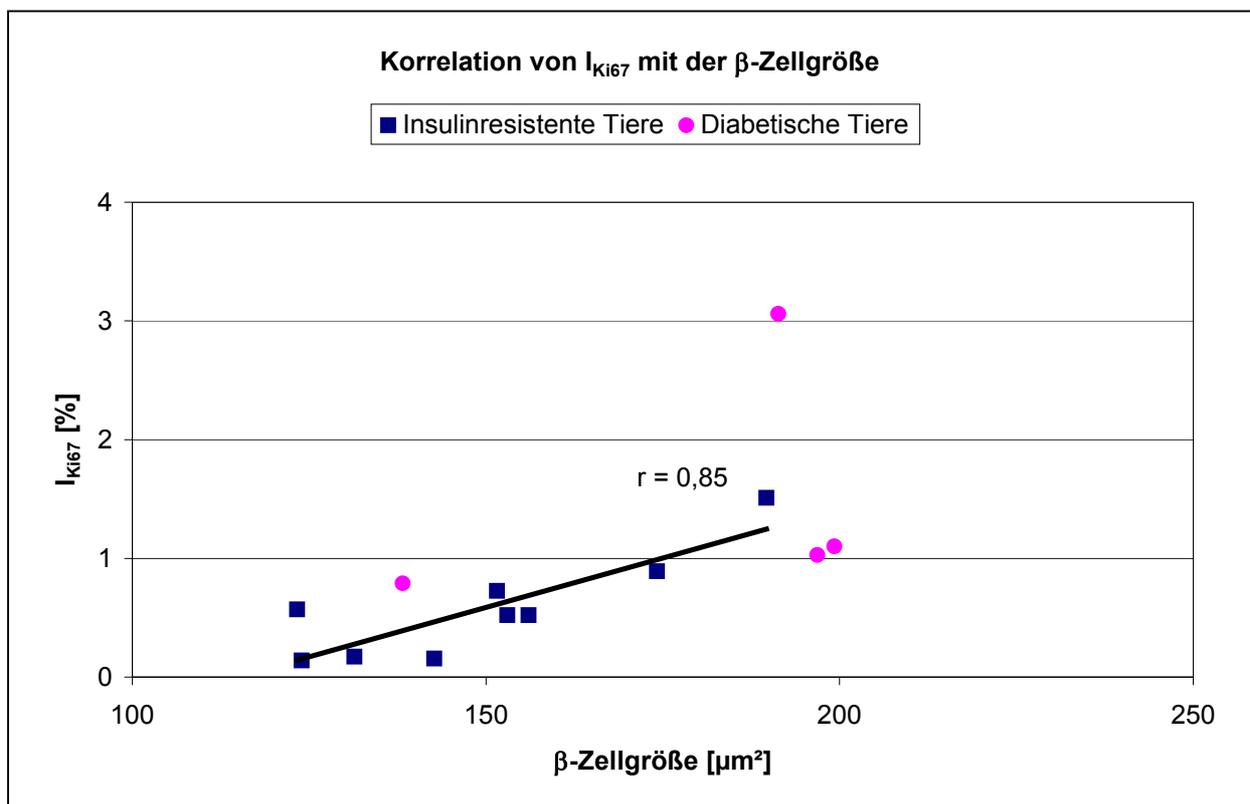
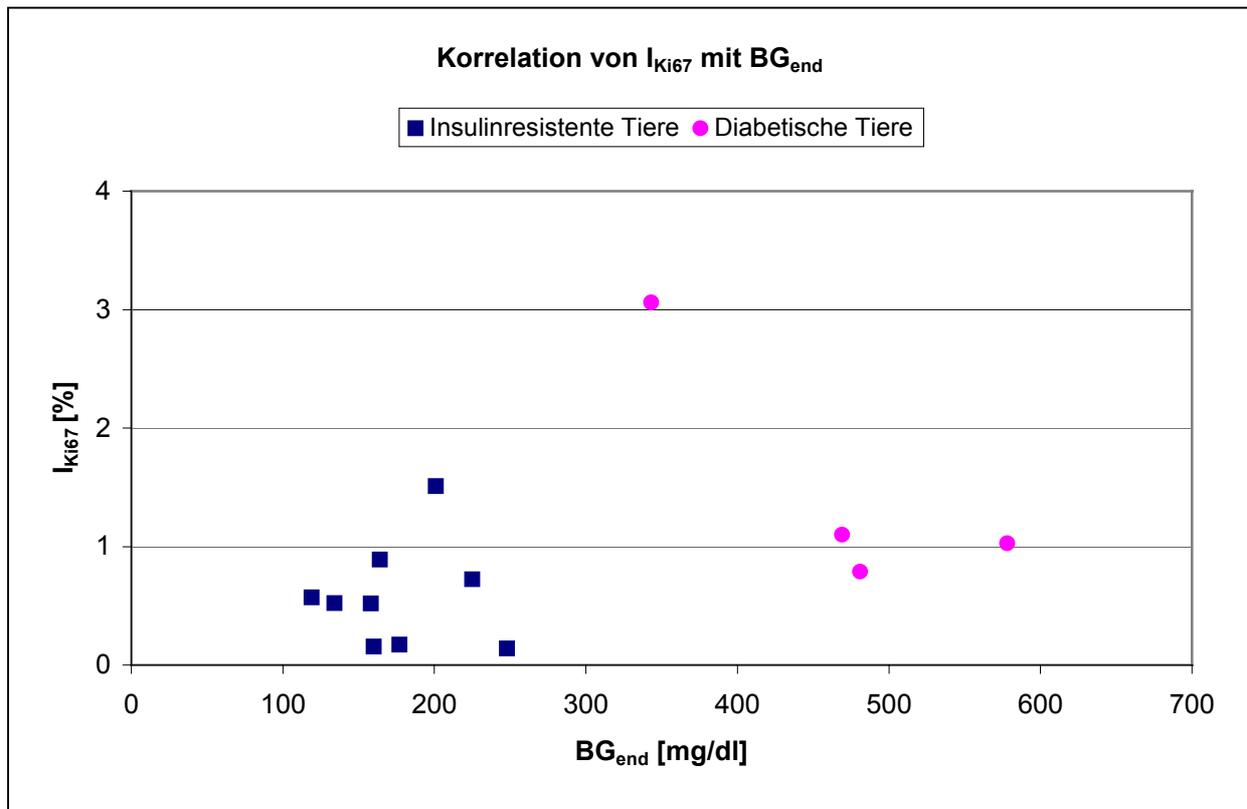


Diagramm 26: Auftragung des Ki-67-Markierungsindex gegen den zum Zeitpunkt der Tötung gemessenen Blutglukose-Wert. Es besteht keine Korrelation der beiden Parameter.



3.2.4 Apoptosen im exokrinen und endokrinen Pankreas

Es wurden alle mit Propidium Jodid gefärbten, apoptotisch veränderten Kerne (s. Abb. 2) sowohl im exokrinen wie im endokrinen Pankreasgewebe gezählt. Die ermittelte Anzahl der Apoptosen wurde dann zur Pankreasfläche (A_{Pankreas}) ins Verhältnis gesetzt.

Wie erwähnt (s. 2.2.3.2), war eine Gegenfärbung der Präparate mit Hämalaun nicht möglich, da dadurch die Fluoreszenz völlig unterdrückt wird. Auf Grund dieser Tatsache war eine Bestimmung der β -Zellzahl in den ausgewerteten Schnittebenen als Bezugssystem für die apoptotischen β -Zellen nicht möglich, wohl aber eine Zuordnung zum β -Zellanteil der Inselgewebe.

Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung apoptotischer Zellen.

Tabelle 8: Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen im gesamten Pankreasgewebe (N_{Apop}) sowie apoptotischer β -Zellen ($N_{\beta, \text{Apop}}$) in den ausgewerteten Inseln (N_{Ins}). Berechnung der apoptotischen Pankreaszellen pro mm^2 Pankreasgewebe.

Tier	$N_{\text{Schnittebenen}}$ [n]	N_{Ins} [n]	A_{Pankreas} [mm^2]	N_{Apop} [n]	$N_{\text{Apop}}/A_{\text{Pankreas}}$ [n/ mm^2]	$N_{\beta, \text{Apop}}$ [n]
Diabetische Tiere						
C2223	3	79	142	38	0,27	1
C2233	5	66	139	30	0,22	1
C2258	4	90	188	62	0,33	0
C2179	5	78	157	42	0,27	2
C2184	3	33	109	25	0,23	0
Insulinresistente Tiere						
C2255	3	51	91	19	0,21	0
C2177	3	131	142	35	0,25	1
C2178	3	42	50	7	0,14	1
C2186	5	133	219	51	0,23	1
C2190	6	172	266	59	0,22	0
C2197	3	85	90	36	0,40	1
C2198	4	90	104	12	0,12	2
C2199	3	76	84	34	0,40	1
C2200	5	94	133	19	0,14	1

Die äußerst geringe Häufigkeit von apoptotischen Kernen im Bereich der Langerhans'schen Inseln, lässt keine Aussage über den Beitrag der Apoptose zum β -Zelluntergang zu.

Um dem Einwand zu entgehen, dass eine Propidium Jodid-Färbung abweichende Ergebnisse im Vergleich zu einer TUNEL-Färbung ergeben könnte, wurden zur Kontrolle dieser extrem niedrigen Apoptoserate einige Präparate freundlicherweise von Frau Dr. Augstein (Inst Diabet Gerhardt Katsch Karlsburg eV, Karlsruhe, Deutschland) mit der TUNEL-Technik gefärbt, was jedoch zu vergleichbaren Resultaten führte.

Im Bezug auf die mittlere Dichte apoptotischer Zellen im gesamten Pankreasgewebe ($N_{\text{Apop}}/A_{\text{Pankreas}}$) unterscheidet sich die Gruppe der diabetischen Tiere mit $0,26 \pm 0,04$ Apoptosen/mm² Pankreasfläche nicht von der der insulinresistenten Tiere mit $0,23 \pm 0,11$ Apoptosen/mm² Pankreasfläche.

3.2.5 Korrelationen und Unterschiede

Tabelle 9: Signifikante Korrelationen verschiedener Parameter und Unterschiede zw. den Gruppen der diabetischen und insulinresistenten Tiere

Signifikante Korrelationen			
Parameter	Bemerkung	Korrelationskoeffizient (r =)	Signifikanz (p)
partielle V_{VIns} vs. N_{AIns}	Diabet. Tiere, Inseln < 40.000 μm^2	0,96	< 0,001
partielle V_{VIns} vs. N_{AIns}	Diabet. Tiere, Inseln > 40.000 μm^2	0,99	< 0,001
partielle V_{VIns} vs. N_{AIns}	Insulinresist. Tiere, Inseln > 40.000 μm^2	0,88	< 0,001
β -Zellgröße vs. IRI_{end}	nur bei den insulinresistenten Tieren	0,90	< 0,010
BG vs. intakte Inseln	bei allen Tieren	-0,87	< 0,001
I_{Ki-67} vs. IRI_{end}	nur bei den insulinresistenten Tieren	0,93	< 0,001
I_{Ki-67} vs. $N_{A\beta}$	nur bei den insulinresistenten Tieren	-0,85	< 0,010
Signifikante Unterschiede zw. diabetischen und insulinresistenten Tieren			
Parameter	Diabetische Tiere	Insulinresistente Tiere	Faktor
IRI [$\mu\text{U/ml}$]	30,56 \pm 20,99	85,56 \pm 49,40	2,8
BG [mg/dl]	513,20 \pm 131,54	176,22 \pm 41,75	2,9
V_{VIns} [%]	0,51 \pm 0,31	3,61 \pm 0,12	7,2
N_{AIns} [n/mm ²]	0,38 \pm 0,09	0,81 \pm 0,12	2,1
$V_{Vnon-\beta}$ (Ins) [%]	40,39 \pm 23,87	10,26 \pm 6,16	3,9
$V_{V\beta}$ (Ins) [%]	59,61 \pm 23,87	89,74 \pm 6,16	1,5
$N_{A\beta}$ [n/10 ³ μm^2]	5,52 \pm 0,66	6,82 \pm 0,98	1,2
$V_{V\beta}$ (Pankreas) [%]	0,34 \pm 0,28	3,30 \pm 1,84	9,7
Intakte Inseln [%]	13,72 \pm 9,92	71,87 \pm 13,73	5,2
Inselrelikte [%]	51,92 \pm 18,60	3,30 \pm 3,53	15,7
Infiltrierte Inseln [%]	29,23 \pm 7,25	12,26 \pm 5,73	2,4
Intrainsul. Ductuli [%]	4,35 \pm 1,78	1,32 \pm 1,12	3,3

Alle in der Tabelle genannten Unterschiede zwischen den diabetischen und den insulinresistenten Tieren sind statistisch signifikant ($p < 0,05$, Student-T-Test). Da die Fallzahlen beider Gruppen niedrig sind, wurden in der Tabelle nur die Größenordnungen der Unterschiede angegeben.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden und der experimentellen Parameter

Für das Verständnis der Ätiologie des Typ-2-Diabetes sind Kenntnisse über diejenigen Mechanismen wesentlich, die auf der Ebene der β -Zellen eine Kompensation von Insulinresistenz und Hyperinsulinämie bewirken können. In diesem Zusammenhang widmet sich ein Forschungszweig dem Studium der „Dynamik der β -Zellmasse“. Es werden β -Zellwachstum und β -Zelluntergang bei unterschiedlichen, aber definierten Stoffwechselsituationen untersucht. Diese Studien sind vom Ansatz her auf definierte Typ-2-Diabetes Modelle und auf den Einsatz morphologischer Methoden angewiesen. Auch für die Planung der vorliegenden Untersuchungen waren vor allem die Wahl des Tiermodells, die Auswahl der Tiere auf Grund ihrer individuellen Stoffwechselcharakteristika und die Wahl geeigneter, quantifizierbarer, immunohistochemischer Verfahren wichtig und werden im Folgenden diskutiert.

4.1.1 Tiermodell und Auswahl der Versuchstiere

Für die Untersuchung stand Archivmaterial an Pankreasgewebe von NZO/HI-Mäusen, deren Stoffwechselentwicklung (KG, BG, IRI) über die gesamte Lebenszeit dokumentiert worden ist, zur Verfügung. Diese Dokumentation der Stoffwechsellparameter hat die Zusammenstellung der beiden Tiergruppen, der Gruppe der diabetischen Tiere und der Gruppe der insulinresistenten Tiere, erleichtert. Von den 14 verwendeten männlichen NZO Mäusen wurden vier in der 36. Lebenswoche, die übrigen zehn in der 52. Lebenswoche getötet. Für die früheren Tötungszeitpunkte war der klinische Zustand der Tiere verantwortlich. Drei der frühzeitig getöteten Tiere gehörten der Gruppe der diabetischen Tiere an. Finegood et al. (1995) beschrieben am Modell der Sprague-Dawley Ratte die Altersabhängigkeit der β -Zell-Replikationsrate. Dabei zeigte sich, dass diese nach dem 50. Lebenstag, also ungefähr nach der siebten Lebenswoche altersunabhängig konstant blieb, so dass wir davon ausgehen, dass zwischen der 36. und 52. Lebenswoche keine altersbedingten Unterschiede bei unseren Tieren auftreten.

4.1.2 Gewebeverarbeitung

Die den Mäusen entnommenen Pankreata wurden sofort nach ihrer Entnahme senkrecht zum Ductus pancreaticus in zwei Hälften (Kopf/Körper und Körper/Schwanz) geteilt. Je eine Hälfte wurde formalinfixiert und in Paraffin eingebettet, während die andere kryofixiert wurde. Auf diese Weise erhält man sich die Möglichkeit, am Pankreasgewebe eines Tieres verschiedene histochemische Verfahren, die unterschiedliche Fixierungsarten erfordern, durchzuführen. Ebenso verfahren Donath et al. (1999) und Leibowitz et al. (2001). Für unsere immunhistochemischen Mehrfachfärbungen verwendeten wir ausschließlich die formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Schnitte. Da Saito et al. (1978) einen Unterschied der Verteilung großer und kleiner Inseln zwischen Pankreaskopf (eher kleinere Inseln, damit weniger Inselvolumen) und –schwanz (eher größere Inseln, damit mehr Inselvolumen) an sieben menschlichen Pankreata beschrieben haben, werteten wir zur planimetrischen Bestimmung der relativen Volumenfraktion der Inseln ($V_{V_{Ins}}$), mit der wir gleichzeitig eine Größenverteilung der Inselprofile erhielten, auch die jeweilig korrespondierende kryofixierte Ebene aus. Die von Saito et al. (1978) beschriebenen Verteilungsunterschiede können wir am Modell der NZO Maus jedoch nicht bestätigen. Dagegen fanden wir die meisten großen Inseln in unmittelbarer Nähe des Pankreashauptganges, der sich durch das gesamte Organ zieht, während sich die kleineren Inseln eher in der Organperipherie zeigten. Unsere Beobachtungen stimmen mit Garofano et al. (1998) überein, die keine signifikanten Unterschiede der β -Zellmasse und des β -Zell-Proliferationsindex zwischen Pankreaskopf und –schwanz am Modell der Wistar-Ratte beobachteten. Ebenso wenig zeigten sich bei uns signifikante Unterschiede der Proliferationsindices von β -Zellen großer und kleiner Inseln, so dass wir uns für die Auswertung der Proliferation auf die formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Pankreashälfte beschränken konnten.

4.1.3 Immunhistologie

4.1.3.1 Proliferation

Zum Nachweis der Proliferation wurde von uns der polyklonale anti-Maus Ki-67 Antikörper (Dianova) verwendet. Dieser Antikörper ist gegen das murine Ki-67 Protein (360.000 Mr) gerichtet, das der größten der 4 Splice-Varianten des humanen pKi-67 entspricht (Starborg et al., 1996; Scholzen und Gerdes, 2000). Das pKi-67 ist ein nukleäres Protein, welches in allen aktiven Zyklusphasen einer Zelle (G_1 , S, G_2 , M) exprimiert wird, nicht jedoch in der Ruhephase G_0 (Gerdes et al., 1984; Schrape et al., 1987; Braun et al., 1988; Tazzari et al., 1990; Bruno und Darzynkiewicz, 1992) oder bei Zellreparaturen (Hall et al., 1993). Das Protein kolokalisiert in der G_1 -Phase mit dem Heterochromatin des Kerns, findet sich dann vorwiegend im Nukleolus und wird von Beginn der Mitose an an der Oberfläche der Chromosomen beobachtet (Traut et al., 2002). Nach der Mitose wird es sehr schnell abgebaut. Bruno und Darzynkiewicz (1992) schätzen eine Halbwertszeit von < 1 Stunde, Heidebrecht et al. (1996) von ca. 90 Minuten. Es sind daher keine nennenswerten falsch zu hohen Werte bei der Bestimmung von Proliferationsindices zu erwarten, wenn man dazu die Zyklusdauer von 14,9 Stunden für β -Zellen (Swenne, 1992) in Betracht zieht.

Mit dieser Charakteristik ist das pKi-67-System deutlich im Vorteil gegenüber dem häufig verwendeten Antikörper gegen das sogenannte „Proliferation Cell Nuclear Antigen“ (PCNA), das eine lange Halbwertszeit aufweist und somit auch in postmitotischen G_0 -Zellen deutlich nachweisbar ist (McCormic und Hall, 1992). Zudem ist PCNA auch bei Reparaturmechanismen während der DNA-Replikation involviert (Schlüter et al., 1993), was zu falsch positiven Werten führen kann.

Vielfach wird zur Darstellung proliferierender Zellen auch 5'-bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Thymidin-Analogon, welches von proliferierenden Zellen während der S-Phase in die DNA eingebaut wird und später in Paraffinpräparaten mit geeigneten Antikörpern nachgewiesen werden kann (Rose et al., 1994). Diese Substanz muss den Tieren vor der Tötung injiziert werden. Zeitpunkt und Häufigkeit der Injektionen, die in den unterschiedlichen Studien variieren (Swenne, 1982 und 1983; Bouwens et al., 1994; Finegood et al., 1995; Garofano et al., 1998; Koyama et al., 1998; Edvell und Lindström, 1999) sind bei dieser Methode kritische Parameter, die einen direkten Vergleich dieser Studien

untereinander nicht zulassen. Eine Verwendung bei Archivmaterial ist ausgeschlossen. BrdU wird außerdem auch bei DNA-Reparaturvorgängen in die DNA integriert, womit auch solche Zellen als proliferierend detektiert werden.

Der Vergleich der Charakteristika dieser drei am häufigsten verwendeten Nachweissysteme soll verdeutlichen, dass ein zahlenmäßiger Vergleich von Proliferationsindices nur sehr eingeschränkt möglich ist. Dazu kommen noch individuelle, experimentelle Parameter, wie Gewebefixierung, Aufschlussbedingungen, Antikörper-Klone, Farbsysteme, etc., die wie bei unseren Methodenvarianten beschrieben, das Endergebnis beeinflussen können. Daher haben wir Wert darauf gelegt, die experimentellen Parameter für unsere Zielsetzung, die Doppelfärbung von Non- β -Zellen und proliferierenden Zellkernen, zu optimieren und strikt zu standardisieren, so dass wir innerhalb unserer Tierreihen reproduzierbare Proliferationsindices als Korrelationsparameter zum Vergleich mit den Stoffwechselfdaten erwarten können.

Präparationsschritte, die sich bei der Standardisierung als kritisch herausgestellt haben, sollen im Folgenden diskutiert werden.

Die Kombination einer immunhistochemischen Färbung der endokrinen Non- β -Zellen mit einem Cocktail aus Antikörpern gegen Glukagon, Somatostatin und PP und einer weiteren immunhistochemischen Darstellung des kernständigen pKi-67 proliferierender Zellen führt zu einer optimalen Differenzierbarkeit der proliferierenden β -Zellen (Abb. 3 A).

Ähnliche Doppelfärbungen wurden von Scaglia et al. (1997), Garofano et al. (1998), Pick et al. (1998) und Sreenan et al. (1999) durchgeführt. Dabei verwendeten sie zur Markierung der proliferierenden Kerne statt des Ki-67 Antikörpers jedoch 5-bromo-2-desoxyuridin (BrdU).

Gegen eine indirekte Darstellung der β -Zellen als ungefärbte endokrine Zellen könnten jedoch folgende Einwände vorgebracht werden.

Zum einen ist bekannt, dass es innerhalb der Langerhans'schen Inseln vereinzelt endokrine Zellen gibt, die mehr als ein Hormon exprimieren, so dass endokrine Zellen, die außer Insulin ein weiteres Inselhormon produzieren, von uns zu den Non- β -Zellen gerechnet würden. Polak et al. (2000) beschreiben, dass während der embryonalen bzw. fetalen Entwicklung des menschlichen Pankreas noch über 90% der endokrinen Zellen eine Hormonkoexpression (Insulin, Glukagon und Somatostatin) aufweisen, diese Zahl in den Wochen post partem jedoch drastisch

abfällt. Im Pankreas adulter Tiere tritt eine Hormonkoexpression dann nur noch extrem selten auf, so dass wir diese in unserer Untersuchung unberücksichtigt lassen können.

Der zweite Nachteil der indirekten β -Zell-Darstellung besteht darin, dass ungefärbte mononukleäre Entzündungszellen für β -Zellen gehalten werden könnten. Unserer Erfahrung nach lassen sich endokrine Zellen auf Grund ihrer Morphologie, vor allem auf Grund der Kern-Plasmarelation, jedoch gut von diesen differenzieren.

Ein anderer kritischer Punkt resultiert daraus, dass die Primär-Antikörper sowohl des Non- β -Cocktails wie auch die des Ki-67 vom Kaninchen stammen und die gegen Kaninchen-IgG gerichteten Detektionssysteme interferieren können, was zu einer Überlagerung der Farbreaktionen führen kann. Wie eine Reihe von Testfärbungen ergeben hat, kann diese Interferenz verhindert werden, indem für die Hormonfärbung die „Drei-Schritt-indirekte Methode“ (Variante A, Abb. 1, Tab. 1 [I, II + V]) verwendet und der hierbei gebildete Immunkomplex nach Abschluss der Färbung denaturiert wird. Dies erfolgt bei uns durch den, für die Kernfärbung ohnehin erforderlichen Kernaufschluss.

Dazu bedienten wir uns eines haushaltsüblichen Dampfdruckkochtopfes und eines Citratpuffers (pH 6). Diese Art des Antigenaufschlusses wurde von Tsuji et al. (1997) für formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe empfohlen. Des Weiteren erkannten die Autoren, dass die Anwendung höherer Temperaturen zu einem vermehrten Aufschluss führt. Sie nutzten im weiteren Verlauf ebenfalls einen Antikörper gegen das Ki-67 Antigen zur Darstellung proliferierender Kerne, jedoch ohne eine immunhistochemische Doppelfärbung durchzuführen. Norton et al. (1994) und Traut et al. (2002) verwendeten ebenfalls einen haushaltsüblichen Dampfdruckkochtopf mit Citratpuffer (pH 6,0) und erreichten bei niedrigen Kosten und guter Reproduzierbarkeit Ergebnisse, die einer Mikrowellenbehandlung gleich kamen.

Der günstigste Zeitpunkt des Kernaufschlusses wurde ausgetestet. Die lichtmikroskopische Dokumentation einer Insel während der wichtigsten Färbeschritte (Abb. 5) zeigt eindeutig, dass der Aufschluss mittels DDKT erst nach vollendeter immunhistochemischer Färbung der Peptidhormone erfolgen darf, dann jedoch zu keiner Beeinträchtigung derselben führt.

Anhand dieser Dokumentation ist erkennbar, dass es bei einem Antigenaufschluss vor Abschluss der Non- β -Färbung zu keiner Zytoplasmafärbung mehr kam (Abb. 5

D). Wir führen dies auf eine Denaturierung des Immunkomplexes und dem damit verbundenen Verlust der Peroxidaseaktivität zurück.

Somit ist anzunehmen, dass das DAB nach der Peroxidase-Reaktion einen unter Aufschlussbedingungen unlöslichen Farbkomplex bildet, den die DDKT Behandlung nicht beeinflusst.

Unklar war auch die nötige Aufschlusszeit. Nach 7-minütiger Behandlung, was der Dauer bis zum Erreichen der Dampfdruckstufe II entspricht, zeigte sich keinerlei Kernfärbung, dafür jedoch eine Rotbraunfärbung des Zytoplasmas. Somit reicht diese 7-minütige Aufschlusszeit nicht aus, um die darzustellenden Antigene freizulegen. Dafür interferiert das LSAB-System, das im zweiten Färbeschritt verwendet wird mit der Non- β -Färbung, indem die biotinylierten F(ab)-Fragmente der Kernfärbung (anti-Rabbit) entweder an die intakten Tertiärantikörper (Rabbit) oder aber an die nicht vollständig abgesättigten, intakten Primär-Antikörper des Cocktails (Rabbit) der Zytoplasmafärbung binden, was dann in der Folge zu der rotbraunen Zytoplasmafärbung führt. Durch den 17-minütigen Einsatz des DDKT, welcher sich aus 7 Minuten bis zum Erreichen der Dampfdruckstufe II und weiteren 10 Minuten während dieser Druckstufe zusammen setzt, kommt es einerseits zu einem guten Aufschluss des Ki-67-Antigens, andererseits wird offenbar auch der Antikörperkomplex der Zytoplasmafärbung zerstört, so dass es zu keiner Überlagerung der Färbeschritte kommt.

Der Einsatz des DDKT für 17 Minuten zwischen den beiden Färbegängen ist also außer für den Kernaufschluss auch nötig, um die beiden Färbeschritte sicher voneinander zu trennen - eine reine Braunfärbung der Non- β -Hormone und eine reine Rotfärbung der Kerne zu erreichen.

Als Variante B für die Zytoplasmafärbung der Non- β -Zellen testeten wir die Labelled Streptavidin Biotin-Methode (LSAB) mit Peroxidase (HRP) - markiertem Streptavidin (Abb. 1, Tab. 1 [III + IV]), allerdings in einer Verdünnung von 1:300 zur Vermeidung einer Hintergrundfärbung. Die LSAB-Methode mit AP-markiertem Streptavidin nutzten wir später auch bei beiden Varianten zur Darstellung proliferierender Zellkerne, hier jedoch mit an alkalische Phosphatase gekoppeltem Streptavidin in einer Konzentration von 1:100. Bei Variante B kommt es jedoch unabhängig vom Einsatz des DDKTs zu einer rotbräunlichen Färbung des Zytoplasmas der Non- β -Zellen, so dass die roten Kerne nur schwierig gegen dieses abzugrenzen sind (Abb. 4 B).

Ursächlich hierfür könnte eine unvollständige Absättigung der noch reaktionsfähigen biotinylierten F(ab)₂-Fragmente aus der Zytoplasmafärbung mit an HRP gekoppeltem Streptavidin sein. Damit wäre es dem an alkalische Phosphatase gekoppeltem Streptavidin aus der Kernfärbung möglich, sich an diese freien F(ab)₂-Fragmente zu binden und so zu einer zweiten, jetzt roten Farbreaktion im Bereich des Zytoplasmas zu führen. Da Variante A zu guten Ergebnissen führte, setzten wir die Versuchsreihe der Variante B jedoch nicht fort.

4.1.3.2 Apoptose

Die Apoptose und die anschließende Phagozytose der untergehenden Zelle durch Nachbarzellen wurde 1914 erstmals von Ludwig Gräper als „physiologische Zellelimination“ beschrieben. 1971 beschrieb JFR Kerr eine besondere Form des Zelltods nach ihrem morphologischen Erscheinungsbild als „shrinking necrosis“. Ein Jahr später verwendete er erstmals den Begriff „Apoptosis“.

In den letzten Jahren zeigte sich jedoch die große Schwierigkeit, apoptotische Zellen in vivo darzustellen, da der Zeitraum von der morphologischen Erkennbarkeit der Apoptose bis zur Phagozytose der apoptotischen Zelle nur sehr kurz ist. Die Dauer der gesamten Apoptose kann sehr unterschiedlich sein. Collins et al. (1997) sprachen von 12 bis 24 Stunden, Willingham (1999) von Stunden bis Tagen. Auch über das Zeitfenster der Nachweisbarkeit morphologischer Veränderungen einer apoptotischen Zelle finden sich unterschiedliche Angaben. So findet sich bei Manjo und Joris (1995) die Angabe von 34 Minuten, während Kurrer et al. (1997) rechnerisch einen Wert von 1,7 Minuten und Augstein et al. (1998 a/b) von weniger als 6 Minuten für die lichtmikroskopische Nachweisbarkeit einer β -Zellapoptose ermittelten. Das Problem des sehr kurzen Zeitfensters für den Apoptosenachweis und die damit verbundene Gefahr der Unterschätzung von Apoptoseraten wird von vielen Autoren beschrieben (Manjo und Joris, 1995; Kurrer et al., 1997; Allen et al., 1997; Augstein et al., 1998 a/b; Donath et al., 1999; Willingham, 1999; Weir et al., 2001). Um erhöhte Apoptoseraten nachweisen zu können beschleunigten Augstein et al. 1998 die β -Zelldestruktion in NOD Mäusen durch Cyclophosphamid. Kurrer et al. führten 1996 ihre Untersuchungen an einer transgenen Maus (BDC2.5/NOD.scid) durch. Als Besonderheit zeigten die β -Zellen dieser Mäuse einen T-Zell-Rezeptor, so

dass es über einen vermehrten Angriff von CD4⁺ T-Zellen gegen β -Zellen zu erhöhten Apoptoseraten kam. Diese künstlich erhöhten Apoptoseraten spiegeln jedoch nicht die normale Größenordnung der β -Zellapoptose wider.

Ursprünglich war die Apoptose durch lichtmikroskopisch nachweisbare Veränderungen der Zellmorphologie definiert. Dazu gehören die Chromatinkondensation mit Dichtezunahme des Zellkerns, die halbmondförmige Anlagerung des kondensierten Chromatins an den Rand der Kernmembran, die Zellschrumpfung, die Kernsegmentation mit Zerfall in die apoptotischen Körperchen (Patel et al., 1996; Allen et al., 1997; Collins et al., 1997; Hiramane, 1997). Diese morphologischen Veränderungen laufen in immer gleicher Reihenfolge, aber mit unterschiedlichen zeitlichen Verzögerungen ab (Hockenberry, 1995; Willingham, 1999). Sie gehören zu den spezifischsten Veränderungen der Apoptose (Collins et al., 1997; Willingham, 1999).

Neben den lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen, lassen sich im Elektronenmikroskop zusätzliche Veränderungen feststellen. Zu diesen gehören Ausbuchtungen von Kern- und Plasmamembranen, die Ausbildung von Mikrospikes der Membranen, sowie das sogenannte Budding. Hierbei handelt es sich um die Bildung von Ausstülpungen der Plasmamembran, welche Zellorganellen enthalten, im Gegensatz zur Bildung von Bläschen bei nekrotischen Zellen, die nur Flüssigkeit beinhalten. Im Endstadium kommt es zur Lyse der Plasmamembran (Manjo und Joris, 1995; Willingham, 1999). Im Verlauf der Apoptoseforschung wurden auch Nachweise mehr oder weniger spezifischer Enzyme entwickelt. Hierzu gehören besonders Endonukleasen und Proteasen. Diese lassen sich jedoch an Gewebeschnitten nur extrem schwierig oder gar nicht nachweisen (Patel et al., 1996; Allen et al., 1997; Augstein et al., 1998 a/b).

Eine häufiger angewendete Detektionsmöglichkeit für Apoptosen stützt sich auf die, zu einem späteren Zeitpunkt (Collins et al., 1997) einsetzende DNA-Fragmentierung. Wyllie et al. (1980) beschrieb die Fragmentierung der DNA in Bruchstücke, die Vielfachen von 185 bp entsprechen. Diese DNA-Strang-Brüche lassen sich zum einen in einer Gelelektrophorese nachweisen, in der sie ein sogenanntes „ladder pattern“ Muster zeigen. Zum anderen lassen sich die Strang-Brüche über die TUNEL-Färbung (nick-end-labelling der freien 3'-OH Enden der DNA-Strang-Brüche) auch in Gewebeschnitten darstellen. In mehreren Studien wurde eine Doppelfärbung von Insulin und TUNEL durchgeführt (Kurrer et al., 1996; Augstein et al., 1998 a/b;

Bar-On et al., 1999), um apoptotische β -Zellen darzustellen. Um Unter- bzw. Überschätzungen der Apoptoseindices bedingt durch Gewebefixation, den unumgänglichen Einsatz von Proteinase und/oder anderen Vorbehandlungen zu vermeiden, sehen viele Autoren die Notwendigkeit, die TUNEL positiven Zellen zusätzlich noch auf die oben beschriebenen morphologischen Veränderungen hin zu kontrollieren (Collins et al., 1997; Willingham, 1999; Bonner-Weir, 2001). Aus diesem Grund führten O'Brian et al. (1997) parallel zur TUNEL-Färbung eine Detektion der Apoptose an hämalaun-gefärbten Schnitten nach morphologischen Gesichtspunkten durch. Collins et al. (1997) fanden in einer Studie deutlich weniger TUNEL positive Zellen, als morphologisch nachgewiesene Apoptosen. Donath et al. (1999) stellten in einer Studie fest, dass durch die TUNEL-Färbung sowohl apoptotische als auch nicht-apoptotische Zellen markiert wurden. Dies führten sie auf den nötigen Einsatz der Proteinase K zurück und kontrollierten ihre Ergebnisse an Propidium Jodid gefärbten Schnitten.

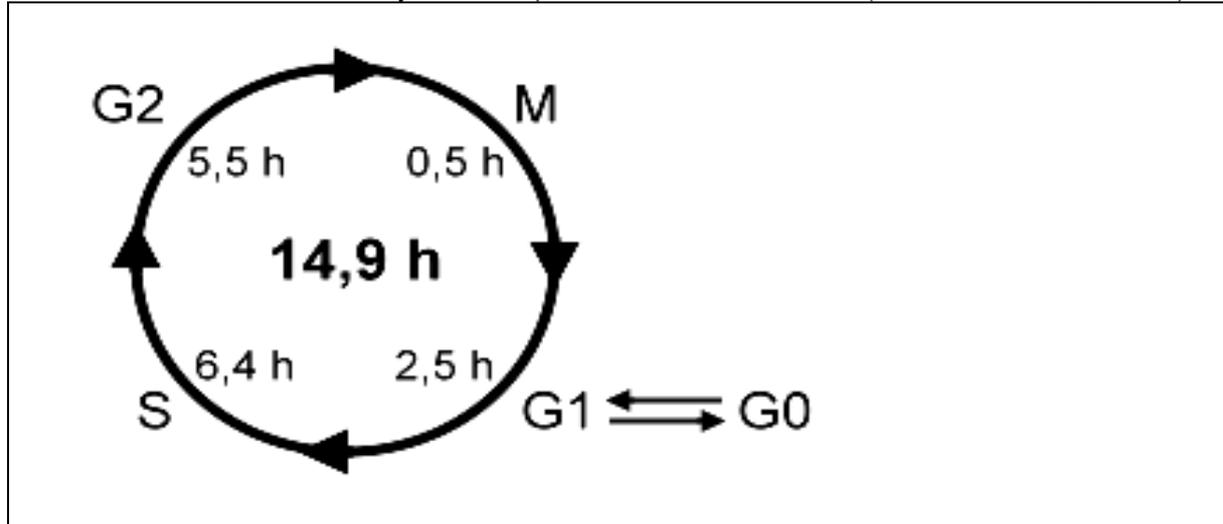
Propidium Jodid ist ein an Nukleinsäuren bindender Fluoreszenzfarbstoff, mit dessen Hilfe es möglich ist, Chromatinkondensationen, Chromatinmargination, Kernsegmentationen und apoptotische Körperchen im Fluoreszenzmikroskop deutlich darzustellen. Während Donath et al. (1999) noch die Ergebnisse ihrer TUNEL-Färbung mit dieser Methode überprüften, existieren mehrere Studien, die sich bei der Untersuchung der Apoptose allein auf die morphologische Darstellung der apoptotischen Kernveränderungen über Propidium Jodid konzentrieren (Scaglia et al., 1997; Li et al., 1998; Pick et al., 1998). Als apoptotisch wurden hier Kerne gewertet, die sich streng lokalisiert, dicht kondensiert, klein und kräftig gefärbt darstellten, sowie apoptotische Körperchen. Wir orientierten uns bei unserer Arbeit an der Studie von Scaglia et al. (1997), in der eine Doppelfärbung von Non- β -Zellen und Propidium Jodid durchgeführt wurde. Auch Bonner-Weir (2001) empfahl die Darstellung der Kernveränderungen über Propidium Jodid als „klassische morphologische Methode“.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Dynamik der β -Zellmasse (Finegood et al., 1995) ist ein wesentlicher Parameter, um den durch exogene (z.B. Nahrungszufuhr) und endogene Faktoren (z.B. Insulinresistenz) bestimmten Insulinbedarf verfügbar zu machen, der für die Aufrechterhaltung einer normoglykämischen Stoffwechsellage erforderlich ist. Zu den zellulären Parametern, die zu einer Vergrößerung oder Verminderung der β -Zellmasse führen, zählen die β -Zellneogenese, die Proliferation (Hyperplasie) sowie die Volumenvergrößerung (Hypertrophie) der β -Zellen einerseits und der β -Zelluntergang durch Apoptose und Nekrose andererseits (Bonner-Weir, 2001). Die Veränderung eines dieser Parameter kann bei Insulinresistenz entscheidend sein, ob sich eine diabetische Stoffwechsellage entwickelt oder nicht.

Die Neogenese von β -Zellen geht von Gangepithelzellen aus. Wie Bouwens et al. (1994) und Wang et al. (1995) nachgewiesen haben, bleibt die Fähigkeit zur Neubildung von β -Zellen über die fetale Entwicklungsphase hinaus erhalten. Sie ist offenbar im menschlichen Pankreas häufiger zu beobachten (Bouwens und Pipeleer, 1998; Butler et al., 2003) als im Pankreas von Nagetierstämmen. Wir haben bei der Durchsicht der Pankreasschnitte von insulinresistenten wie auch von diabetischen Tieren einzelne insulinpositive Zellen im exokrinen Pankreas und in Verbindung mit Gangepithelien beobachtet und bewerten diese als neugebildete Zellen. Eine ständige Neubildung von β -Zellen - wenn auch in geringer Zahl - könnte dafür verantwortlich sein, dass auch schwer diabetische NZO/Hi Mäuse mit stark veränderten Inseln (siehe Abb. 6) ohne Insulingaben überleben. Der Anteil der neugebildeten Zellen zur β -Zellmasse ist jedoch unserer Schätzung nach bei beiden Tiergruppen gering. Dagegen ist der Beitrag durch Proliferation, wie die Ergebnisse gezeigt haben, wesentlich.

Unsere Grundkenntnisse über den Zellzyklus der β -Zellen gehen auf die Untersuchungen von Swenne (1982) zurück. Swenne hat erstens an fetalen Langerhans'schen Inseln der Ratte die Dauer des gesamten Zellzyklus mit 14,9 h bestimmt und die Dauer der einzelnen Zyklusphasen abgeschätzt (Abb. 7).

Abb. 7: Phasen eines Zellzyklus der β -Zelle und ihre Dauer (nach Swenne I, 1982)

Swenne hat an isolierten Inseln außerdem nachgewiesen (Swenne, 1983 und 1992), dass die Zyklusdauer durch eine Erhöhung der Glukosekonzentration nicht verändert wird, dass jedoch mit steigender Glukosekonzentration ein größerer Prozentsatz an β -Zellen altersabhängig in das proliferative Kompartiment rekrutiert wird. Er hat damit nachgewiesen, dass die β -Zellproliferation ein regulativer Parameter sein kann. Dieser Prozentsatz vermindert sich mit dem Alter der Tiere. Bei einer Glukosekonzentration von 100 mg/dl beträgt er pro Tag ca. 6,5% bei fetalen Ratten, ca. 2,5% bei 3 Wochen alten Tieren und 1,7% bei adulten Tieren, und liegt bei einer Glukosekonzentration von 300 mg/dl bei 11%, 4,25% und 2,8% entsprechend dem jeweiligen Alter (Swenne, 1983 und 1992).

Unsere Vorstellungen über die Größenordnung und den Zeitraum, in dem dieser Parameter in vivo wirksam werden kann, gehen auf die Untersuchungen von Leahy et al. (1987 und 1988) und Bonner-Weir et al. (1989) zurück. Die Autoren haben eine 50%-ige Glukoselösung über 96 Stunden in normale Ratten mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/h infundiert und die Reaktion der peripheren Gewebe und des Pankreas untersucht. Es zeigt sich, dass Blutglukose- und Insulinkonzentration innerhalb von vier Stunden auf ein Maximum (BG 400 mg/dl) ansteigen und nach 24 Stunden kontinuierlich abnehmen, bis nach 96 Stunden die Blutglukosekonzentrationen wieder in den Normalbereich zurückkehrt, allerdings bei 3- bis 4-fach höheren Insulinkonzentrationen. Verglichen mit dem Beginn der Infusion, scheint zu diesem Zeitpunkt die Insulinsensitivität der peripheren Gewebe

zugenommen zu haben. In der β -Zellpopulation sind deutliche Veränderungen morphologisch nachweisbar. Die mittlere Querschnittsfläche der β -Zellen ist um das 1,4-fache auf ca. $150 \mu\text{m}^2$ angewachsen. Das entspricht etwa einer 1,6-fachen Vergrößerung des Zellvolumens und lässt, entsprechend den Befunden von Kiekens et al. (1992) und Giordano et al. (1993) auf eine Erhöhung der Biosyntheseaktivität der β -Zellen schließen. Nach 96 Stunden ist auch der Mitoseindex der β -Zellen 5-fach höher als der der Kontrolltiere. Nach Absetzen der Glukoseinfusion dauert es ca. 24 Stunden bis sich die Insulinsekretion normalisiert. Nach 7 Tagen liegen die Mitoseindices rund 50% unter denen der Kontrolltiere, was auf einen negativen gegenregulatorischen Effekt schließen lässt. Eine leichte Hypertrophie der β -Zellen ist weiterhin zu beobachten. Erst nach 30 Tagen sind alle Zellparameter wieder im Bereich der Kontrolltiere.

Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Kopplung zwischen Glukosestimulus und Insulinsekretion kurzfristig erfolgt. Die Adaptation des β -Zellpools an eine permanent höhere Leistungsanforderung erfolgt offenbar in längeren Zeiträumen. Zellvolumen und β -Zellproliferation ändern sich mittelfristig, im Bereich von Stunden bis Tagen. Die Daten weisen darauf hin, dass die Erhöhung der β -Zellmasse nach 96 Stunden weitgehend auf die Hypertrophie der β -Zellen zurückzuführen ist. Eine den Mitoseindices entsprechende stetige Zunahme der β -Zellzahl dürfte erst nach einigen Tagen eine Größenordnung erreicht haben, die morphometrisch eindeutig nachgewiesen werden kann.

Vergleicht man die Stoffwechselwerte unserer Tiergruppen mit den morphologischen Charakteristika des Pankreasgewebes, so fallen durchaus vergleichbare Merkmale auf. Die insulinresistenten NZO/HI Männchen können die Blutglukose kompensieren ($\text{BG} < 250 \text{ mg/dl}$), benötigen dazu aber individuell sehr unterschiedliche Insulinkonzentrationen ($33 - 166 \mu\text{U/ml}$), die annähernd als ein Maß für den individuellen Insulinbedarf gelten können. Bei den von uns quantifizierten morphologischen Parametern zeigen die Proliferationsindices eine sehr starke positive Korrelation mit den Insulinkonzentrationen (Diagramm 24). Eine nahezu ebenso starke Korrelation zeigen die mittleren Querschnittsflächen und damit die Volumina der β -Zellen mit den Insulinkonzentrationen bzw. dem individuellen Insulinbedarf (Diagramm 22). Keine Korrelation ergibt sich dagegen zwischen Blutglukosekonzentrationen und Proliferationsindices.

Die Gruppe der diabetischen Tiere zeichnet sich durch hohe bis extrem hohe Blutglukosewerte (340-700 mg/dl) und relativ niedrige Insulinkonzentrationen (7 - 57 μ U/ml) aus. Letztere decken den Insulinbedarf nicht, entsprechen aber vermutlich der maximal möglichen Sekretionskapazität des noch vorhandenen β -Zellpools. Im Vergleich zu den resistenten Tieren finden sich bei den β -Zellen der diabetischen Tiere höhere Proliferationsindices und im Mittel größere Querschnittsflächen bzw. größere Zellvolumina, ein Hinweis, dass trotz der Dekompensation des Glukosestoffwechsels die β -Zellen noch eine Adaptation an die hohen Leistungsanforderungen versuchen. Insgesamt weisen die Daten von beiden Tiergruppen auf einen Zusammenhang zwischen Insulinbedarf, Biosyntheseaktivität, Sekretionsleistung und Proliferationsaktivität hin.

Da bei der Organentnahme kein Pankreasgewicht registriert worden war, dient uns die Volumenfraktion der β -Zellen ($V_{V\beta}$) als Äquivalent für die β -Zellmasse, mit dem Vorbehalt, dass die Pankreasgewichte der schwer diabetischen Tieren im Vergleich zu denen der insulinresistenten Tiere niedriger liegen könnten und somit der β -Zellpool überschätzt würde. Betrachtet man die $V_{V\beta}$ -Werte der insulinresistenten und diabetischen Tiere, so werden zwei Punkte deutlich. Erstens decken die insulinresistenten Tiere ihren Insulinbedarf mit $V_{V\beta}$ -Größen zwischen 1,2 und 6,7%, während den diabetischen Tieren nur etwa ein Zehntel zur Verfügung steht. Zweitens ist zwischen den Volumenfraktionen der β -Zellen und den Proliferationsindices kein (deutlicher) Zusammenhang erkennbar ($r_{\text{insulinresistent}} = 0,32$; $r_{\text{diabetisch}} = 0,54$; $r_{\text{alle}} = 0,25$). Als Erklärung lassen sich im wesentlichen zwei Ursachen heranziehen, die jedoch für jede der beiden Tiergruppen unterschiedliches Gewicht haben.

Erstens kann der individuelle Insulinbedarf über die Lebenszeit schwanken. Wie Bonner-Weir et al. (1989) gezeigt haben, wird sich jeweils die β -Zellmasse durch Zu- oder Abnahme in einem längerfristigen Prozess entsprechend anpassen. Bei den insulinresistenten Tieren, die über eine Lebenszeit von 52 Wochen immerhin eine relativ befriedigende Kompensation ihres Glukosestoffwechsels aufrecht erhalten haben, lassen sich Veränderungen des Insulinbedarfs und regulative Prozesse auf der β -Zellebene nachvollziehen.

Da das Tierschutzgesetz die Zahl der Blutentnahmen beschränkt, liegen Messungen der individuellen Blutglukose- und Insulinkonzentrationen nur in relativ großen Zeitabständen vor. Trotzdem lassen sich bei einem Teil der Tiere Trendänderungen im Insulinbedarf während der Lebenszeit erkennen. Bei den insulinresistenten Tieren

C2198, C2199 und C2200 zeigt sich in den letzten Lebenswochen ein deutlich abnehmender Trend des Insulinbedarfs, erkennbar an den zu niedrigeren Niveaus hin absinkenden Insulinkonzentrationen bei im Normbereich liegenden Blutglukosekonzentrationen. Unsere Untersuchungen erlauben leider keine Angaben über die Kinetik der Veränderungen auf β -Zellebene, aber die niedrigen Proliferationsindices (ca. 0,15%) bei vergleichsweise hohen $V_{V\beta}$ -Werten (3 - 4%) passen durchaus in das Bild des von Bonner-Weir (1989 und 2001) beschriebenen negativen Feedback-Prozesses der Proliferationsraten und einer langsamen Abnahme der β -Zellmasse. Entgegengesetzt dazu zeigen die Tiere C2197, C2255 und C2178 einen steigenden Trend im Insulinbedarf, erkennbar an zunehmend höheren Insulinniveaus. Parallel dazu werden Proliferationsindices von 0,7 - 1,5% beobachtet bei $V_{V\beta}$ -Werten von 2,4 - 5,3%, für die bei anhaltendem Trend prospektiv noch eine weitere Zunahme zu erwarten gewesen wäre.

Zweitens ist in eine Bilanz der β -Zellmasse auch der β -Zelluntergang mit einzubeziehen. Dieser Prozess wird vorwiegend bei den diabetischen Tieren deutlich.

Obwohl wir bei insulinresistenten NZO/Hi Männchen untergehende β -Zellen morphologisch erkennen können, überwiegt in der Bilanz das β -Zellwachstum. Dafür sprechen einmal die in allen Tieren vorkommenden hyperplastischen Inseln (Schnittfläche der Inselprofile $> 40.000\mu\text{m}^2$). Zum anderen sind die $V_{V\beta}$ -Werte durchschnittlich höher als die von weiblichen NZO/Hi Mäusen, die eine ausgeglichene Glukosehomöostase bei niedrigen Insulinkonzentrationen zeigen (Junger et al., 2002). Bei den diabetischen Tieren lässt sich dagegen aus der Inseldichte und den Volumenfraktionen der Inseln, der β -Zellen und der Non- β -Zellen auf eine negative Bilanz schließen, die auf einen Untergang endokriner Zellen allgemein, vorwiegend aber von β -Zellen zurückzuführen ist.

Bei der histologischen Beurteilung der Inseln und ihrer Umgebung fallen Läsionen auf, die für das NZO-Modell spezifisch sind (Junger et al., 2002). Ausgehend von Gangepithelien erreichen Lymphozyteninfiltrate und relativ wenige Makrophagen die Inseln und bleiben dort vorwiegend in periinsulären Bereichen (Abb. 6 B). Seltener sind intransuläre Infiltrate und die Bildung von intransulären Ductuli zu beobachten (Abb. 6 C). Außerdem dringt exokrines Gewebe in die Inseln vor (Abb. 6 D).

Die Läsionen sind sowohl bei den insulinresistenten als auch bei den diabetischen Tieren zu beobachten, bei letzteren jedoch wesentlich häufiger. Während bei den insulinresistenten Tieren 55-90% aller Inselanschnitte als intakt zu klassifizieren sind, sind es bei den diabetischen Tieren weniger als 25%. Zwischen dem Prozentsatz intakter Inseln und der Blutglukosekonzentration existiert eine negative Korrelation ($r = -0,9$) und zwischen dem Prozentsatz intakter Inseln und der Volumenfraktion der β -Zellen ($V_{V\beta}$) eine positive Korrelation ($r = 0,8$).

Im Zusammenhang mit der periduktalen-periinsulären Lokalisation der Infiltrate sind Beobachtungen und Überlegungen von Pipeleers et al. (2001) überdenkenswert. Die Experimente von Pipeleers und Mitarbeitern zielen darauf ab, den Einfluss der Nachbarschaft auf das Überleben der β -Zellen zu prüfen. In Zellkulturen haben die Autoren beobachtet, dass Zytokine in menschlichen Gangepithelzellen, nicht jedoch in β -Zellen, die Expression von iNOS und die Sekretion von NO anregen (Pavlovic et al., 1999). Die Autoren stellen die Hypothese auf, dass sich in vivo NO im Interstitium in Konzentrationen ansammeln könnte, die eine Nekrose von Zellen benachbarter Inseln bewirken könnten. In Anbetracht der von uns beobachteten periduktalen, periinsulären Lokalisation der Infiltrate wäre es sinnvoll in zukünftigen Experimente diese Hypothese zu überprüfen.

Wir können zur Zeit nicht unterscheiden, ob die Inselzellen, insbesondere die β -Zellen vorwiegend durch Nekrose, durch Apoptose oder durch die Kombination beider Modi untergehen. Wir können mit unseren hier angewandten, lichtmikroskopischen Methoden einen β -Zelluntergang durch Nekrose nicht ausschließen. Apoptotische β -Zellen lassen sich nachweisen (Abb. 2), wenn auch in sehr geringer Zahl. Bei den insulinresistenten Tieren haben wir rund 870 Inselquerschnitte überprüft und insgesamt nur 8 apoptotische β -Zellen beobachtet, dies entspricht etwa 0,4 Apoptosen pro 10.000 β -Zellen. Bei den diabetischen Tieren haben wir etwa 350 Inseln überprüft und 4 β -Zellapoptosen registriert. Da die Inseln wesentlich kleiner sind entspricht das etwa 3,1 Apoptosen pro 10.000 β -Zellen. Aufgrund der geringen „Trefferanzahl“ sind die Indices unsicher. Hier werden die Limits von in vivo Beobachtungen deutlich. Erstens werden im histologischen Präparat Apoptoseindices bestimmt und keine Raten. Das gilt ebenso für die Proliferation. Zweitens sind für eine Interpretation der Indices die Zeitfenster zu

berücksichtigen, innerhalb derer ein Ereignis erkennbar ist. R. Ritzel und P.C. Butler (erwähnt in Butler et al., 2003) haben in vitro in einer β -Zelllinie mittels Videomikroskopie eine Zeitdauer von ca. 120 Minuten für eine komplette Apoptose, vom Beginn bis zum Endstadium geschätzt. In vivo werden die Relikte der Endstadien durch Phagozytose schnell eliminiert. Augstein et al. (1998 a/b) schätzen für die Dauer der lichtmikroskopischen Nachweisbarkeit einer apoptotischen β -Zelle eine Zeitspanne von weniger als 6 Minuten, Kurrer et al. (1997) von weniger als 2 Minuten.

Bei in vivo Beobachtungen werden in der Regel, so auch von uns, die späten Apoptosestadien detektiert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass eine Apoptose in einem Zeitfenster von nur wenigen Minuten erkennbar ist. Im Vergleich dazu beträgt die Dauer eines β -Zellzyklus knapp 15 Stunden. Das Ki-67 Protein, das wir als Marker für die Proliferation gewählt haben, ist während der gesamten Zyklusdauer exprimiert, so dass das Zeitfenster in dem eine proliferierende Zelle erkannt werden kann mehr als 100 mal größer ist. Demzufolge müssten annähernd gleiche Apoptose- und Proliferationsraten vorliegen, wenn pro 10.000 β -Zellen 1 apoptotische und 100 proliferierende Zellen registriert würden. Mit diesen Überlegungen kann aufgezeigt werden, dass die von uns registrierten Apoptoseindices durchaus im Erwartungsbereich liegen. Für eine Aussage über ihre Bedeutung sind die Zählungen, wie oben erwähnt, jedoch zu unsicher.

Obwohl wir keine Entscheidung über den Modus des β -Zelluntergangs treffen können, lassen die Daten den Schluss zu, dass bei den diabetischen Tieren die Raten des β -Zelluntergangs die des Wachstums übersteigen. Da bei den NZO/HI Mäusen ein hoher Inzuchtstatus bestätigt wurde (Leiter et al., 1998), liegt die Frage nahe, ob und wann die Fluktuation exogener Faktoren (z.B. Nahrungsaufnahme) bei einzelnen Tieren ein Ausmaß erreichen kann, das die Entwicklung zum Diabetes forciert, indem die Anpassungsfähigkeit des β -Zellpools überfordert wird. Experimente, die die Anpassungsgrenzen des β -Zellpools insulinresistenter Tiere durch gezielte Glukose- oder Lipiddauerbelastung ausloten, könnten einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung des zeitlichen Ablaufs sowie vermutlich auch der Art der β -Zelldegeneration liefern.

5. Zusammenfassung

β -Zellproliferation und β -Zelldegeneration bei Hyperinsulinämie und Typ 2 Diabetes Mellitus (Eine morphologische Studie am Modell der NZO Maus)

Zielsetzung: Morphologische Studien haben gezeigt, dass die Masse der β -Zellen im Typ 2 Diabetes reduziert ist. Bei NZO/HI Mäusen, einem Tiermodell für Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes, können die β -Zellen über längere Perioden einen erhöhten Insulinbedarf kompensieren, ehe sich bei einem Teil der Tiere ein Diabetes entwickelt, der mit einer relativ verminderten β -Zellmasse einhergeht. Bisher ungeklärt ist die Frage, ob sich die verringerte β -Zellmasse auf eine verminderte Proliferation oder ein erhöhte Degeneration zurückführen lässt. Zur Beantwortung dieser Frage untersuchten wir an zwei ausgewählten Tiergruppen Zusammenhänge zwischen morphologischen Veränderungen des Inselapparates, der β -Zellproliferation, der β -Zelldegeneration und den Glukose- und Insulinkonzentrationen im Serum.

Methoden: An Gewebeschnitten von formaldehyd-fixiert und in Paraffin eingebetteten Pankreata männlicher NZO/HI Mäuse wurde eine immunhistochemische Doppelfärbung zur Darstellung proliferierender β -Zellen etabliert und optimiert. In einem ersten Schritt wurden Non- β -Zellen mittels Antikörpern gegen die Hormone Somatostatin, Glukagon und PP mit der „Drei-Schritt-Indirekten Methode“ zur Unterscheidung von den β -Zellen markiert. Nach einem Kernaufschluss wurden in einem zweiten Schritt die proliferierenden Kerne mittels eines polyklonalen Antikörpers gegen das während der aktiven Zyklusphasen exprimierte pKi-67 mit der Labelled Streptavidin-Biotin (LSAB) Methode dargestellt.

Apoptotische Kerne wurden in einer analog durchgeführten Doppelfärbung mit Propidium Jodid markiert.

Morphometrische Messungen und Zählungen bildeten die Basis für eine quantitative Beschreibung des Inselapparates und für die Berechnung der Proliferations- und Apoptoseindices von β -Zellen.

Ergebnisse: Insulinresistente NZO/HI Männchen können die Blutglukose kompensieren benötigen dazu aber sehr unterschiedliche Insulinkonzentration. Diabetische NZO/HI Männchen zeichnen sich durch hohe bis sehr hohe Blutglukosewerte und niedrige Insulinspiegel aus. Bei der Gruppe der insulinresistenten Tiere fanden sich im Vergleich zur Gruppe der diabetischen Tiere eine signifikant höhere Zahl an Inselanschnitten pro Schnittfläche (N_{Ains}) und aufgrund der Hyperplasie und Hypertrophie der β -Zellen signifikant höhere Volumenfraktionen der Inseln (V_{Vins}). Dabei war die Volumenfraktion der β -Zellen um den Faktor 10 höher als bei den diabetischen Tieren, während die Volumenfraktion der Non- β -Zellen sich nicht signifikant unterschied. Die Gruppe der insulinresistenten Tiere wies einen deutlich höheren Anteil intakter Inseln auf. Bei den diabetischen Tieren nahm der Prozentsatz an Inseln mit Läsionen mit steigender Blutglukose zu. Bei den insulinresistenten Tieren zeigten die Proliferationsindices der β -Zellen und die β -Zellgröße, ein Indiz für eine erhöhte Bioaktivität, eine starke positive Korrelation untereinander und mit den individuellen Insulinkonzentrationen, nicht aber mit den Blutglukosewerten. Bei den diabetischen Tieren waren die Proliferationsindices der β -Zellen und auch die β -Zellgrößen durchschnittlich höher. Eine Korrelation mit den Stoffwechselfparametern ergab sich jedoch nicht. Apoptotische Kerne waren im Bereich der Inseln äußerst selten nachzuweisen.

Schlussfolgerungen: Die Befunde weisen auf einen engen Zusammenhang zwischen Leistungsanforderung, d.h. dem Insulinbedarf, und dem β -Zellwachstum hin. Die diabetischen Tiere müssten ihren Insulinbedarf mit einer vergleichsweise geringen β -Zellmasse decken. Sie reagieren auf die hohe Leistungsanforderung mit einer Hypertrophie der β -Zellen und einer erhöhten Proliferation. Da die β -Zellmasse bei den diabetischen Tieren trotzdem deutlich unter der der insulinresistenten Tiere liegt, ist auf einen vermehrten Untergang von β -Zellen zu schließen, der mit immunologischen Prozessen in Zusammenhang stehen könnte.

6. Literaturverzeichnis

Allen RT, Hunter WJ, Agrawal (1997)

Morphological and Biochemical Characterization and Analysis of Apoptosis
J Pharmacological and Toxicological Methods 37:215-228

Atkinson MA, Leiter EH (1999)

The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets?
Nat Med 5:601-604

Augstein P, Elefanty AG, Allison J, Harrison LC (1998 a)

Apoptosis and beta-cell destruction in pancreatic islets of NOD mice with spontaneous and cyclophosphamide-accelerated diabetes
Diabetologia 41:1381-1388

Augstein P, Stephens LA, Allison J, Elefanty AG, Ekberg M, Kay TWH, Harrison LC (1998 b)

β -cell apoptosis in an accelerated model of autoimmune diabetes
Molecular Medicine 4 (8):495-501

Bar-On H, Ben-Sasson R, Ziv E, Arar N, Shafrir E (1999)

Irreversibility of Nutritionally Induced NIDDM in *Psammomys obesus* Is Related to β -Cell Apoptosis
Pancreas 18:259-265

Boenisch T (1983)

Handbuch immunhistochemischer Färbemethoden II
DAKO® Handbuch II S.22-27

Bonner-Weir S, Deery D, Leahy JL, Weir GC (1989)

Compensatory growth of pancreatic β -cells in adult rats after short-term glucose infusion
Diabetes 38:49-53

Bonner-Weir S (2001)

β -Cell turnover: its assessment and implications
Diabetes 50:S20-24

Bouwens L, Pipeleers DG (1998)

Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas
Diabetologia 41:629-633

Bouwens L, Wang RN, De Blay E, Pipeleers DG, Klöppel G (1994)

Cytokeratins as Markers of Ductal Cell Differentiation and Islet Neogenesis in the Neonatal Rat Pancreas
Diabetes 43:1279-1283

- Braun N, Papadopoulos T, Müller-Hermelink HK (1988)
Cell cycle dependent distribution of the proliferation associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells
Virchows Arch. B. 56:25-33
- Bruno S, Darzynkiewicz Z (1992)
Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells
Cell Proliferation 25:31-40
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC (2003)
 β -Cell Deficit and Increased β -Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes
Diabetes 52:102-110
- Collins JA, Schandl CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC (1997)
Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis
J Histochem Cytochem 45:923-934
- Canstam GR, Froesch ER, Hedinger C, Kistler G, Rossie PH, Steiner H, Töndury G (1974)
The Pancreas
In: Clinical Endocrinology (Theory and Practice) ed. By Lubhart A
Springer Verlag Berlin 1974
- Craig WY, Poulin SE, Collins MF, Ledue TB, Ritchie (1993)
Background staining in immunblot assays
J Immunological Methods 158:67-76
- Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N (1999)
Hyperglycemia-Induced β -Cell Apoptosis in Pancreatic Islets of *Psammomys obesus* During Development of Diabetes
Diabetes 48:738-744
- Edvell A, Lindström P (1999)
Initiation of Increased Pancreatic Islet Growth in Young Normoglycemic Mice
Endocrinology 140:778-783
- Finegood DT, McArthur MD, Kojwang D, Thomas MJ, Topp BG, Leonard T (2001)
Beta-cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats. Rosiglitazone prevents the rise in net cell death
Diabetes 50:1021-1029
- Finegood DT, Scaglia L, Bonner-Weir S (1995)
Dynamics of β -Cell Mass in the Growing Rat Pancreas
Diabetes 44:249-256
- Garofano A, Czernichow P, Bréant B (1998)
Beta-cell mass and proliferation following late fetal and early postnatal malnutrition in the rat
Diabetologia 41:1114-1120

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984)
Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined
by the monoclonal antibody Ki-67
J Immunol. 133:1710-1715

Giordano E, Cirulli V, Bosco D, Rouiller D, Halban P, Meda Paolo (1993)
B-cell size influences glucose-stimulated insulin secretion
Am J Physiol 265:358-364

Hall PA, McKee PH, Menage HP, Dover R, Lane DP (1993)
High levels of p53 protein in UV irradiated normal human skin
Oncogene 8:203-207

Hauner H, Stapperfend M, Scherbaum W (1998)
Verbreitung des Diabetes mellitus weltweit
Deutsche Medizinische Wochenschrift 123:777-782

Heidebrecht HJ, Buck F, Haas K, Wacker HH, Parwaresch R (1996)
Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the „Ki-67“ proteins
Cell Prolif 29:413-425

Hiramine C (1997)
Definition and morphological features of apoptosis
Rinsho-Byori 45:459-469

Hockenbery D (1995)
Defining Apoptosis
Am J Pathol 146:16-19

Igney FH, Krammer PH (1999)
Apoptosis – Signals and Diseases
Biochemica 3:24-27

Junger E, Herberg L, Jeruschke K, Leiter EH (2002)
The Diabetes-Prone NZO/HI Strain. II. Pancreatic Immunopathology
Laboratory Investigation 82:843-853

Kahn BB (1998)
Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance
Cell 92:593-596

Kerr JFR (1971)
Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death
J Pathol. 105:13-20

Kiekens R, Veld PI, Mahler T, Schuit F, Van De Winkel M, Pipeleers D (1992)
Differences In Glucose Recognition by Individual Rat Pancreatic B Cells Are
Associated with Intercellular Differences in Glucose-induced Biosynthetic Activity
J Clin Invest 89:117-125

- Klöppel G, Löhr M, Habich K, Oberholzer M, Heitz PU (1985)
Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes revisited.
Survey and Synthesis of Pathology
Research 4:110-125
- Klötting I, Stark O (1987)
Genetic studies of IDDM in BB rats: The incidence of diabetes in F2 and first
backcross hybrids allows rejection of recessive hypothesis
Exp Clin Endocrinol 98: 312-318.
- Koyama M, Wada RI, Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi S (1998)
Accelerated Loss of Islet β Cells in Sucrose-Fed Goto-Kakizaki Rats, a Genetic
Model of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus
Am J Pathol 153:537-545
- Kurrer MO, Pakala SV, Hanson HL, Katz JD (1997)
 β cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes
Proc Natl Acad Sci 94:213-218
- Leahy JL, Weir GC (1988)
Evolution of Abnormal Insulin Secretory Responses During 48-h In Vivo
Hyperglycemia
Diabetes 37:217-222
- Leahy JL, Cooper HE, Weir GC (1987)
Impaired Insulin Secretion Associated With Near Normoglycemia
Diabetes 36:459-464
- Leibowitz G, Yuli M, Donath MY, Nesher R, Melloul D, Cerasi E, Gross DJ, Kaiser N
(2001)
 β -Cell glucotoxicity in the Psammomys obesus model of type 2 diabetes
Diabetes 50:S113-117
- Leiter EH, Herberg L (1997)
The polygenetics of diabetes in mice
Diabetes Reviews 5:131-148
- Leiter EH, Reifsnyder PC, Flurkey K, Partke HJ, Junger E, Herberg L (1998)
NIDDM genes in mice – Deleterious synergism by both parental genomes contributes
to diabetogenic thresholds
Diabetes 47:1287-1295
- Li G, Segu VBG, Rabaglia ME, Luo RH, Kowluru A, Metz SA (1998)
Prolonged Depletion of Guanosine Triphosphate Induces Death of Insulin-Secreting
Cells by Apoptosis
Endocrinology 139:33752-3762
- Majno G, Joris I (1995)
Apoptosis, Oncosis and Necrosis
Am J Pathology 146:3-15

- McCormick D, Hall PA (1992)
The Complexities of proliferating cell nuclear antigen
Histopathology 21:591-594
- Norton AJ, Jordan S, Yeomans P (1994)
Brief, High-Temperature Heat Denaturation (Pressure Cooking) – A Simple And Effective Method Of Antigen Retrieval For Routinely Processed Tissues
J Pathology 173:371-379
- O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, Allan DJ (1997)
Apoptosis Is the Mode of β -Cell Death Responsible for the Development of IDDM in the Nonobese Diabetic (NOD) Mouse
Diabetes 46:750-757
- Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH (1996)
The role of proteases during apoptosis
FASEB 10:587-597
- Pavlovic D, Chen MC, Bouwens L, Eizirik DL, Pipeleers D (1999)
Contribution of Ductal Cells to Cytokine Responses by Human Pancreatic Islets
Diabetes 48:29-33
- Pick A, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W, Bonner-Weir S, Polonsky K (1998)
Role of Apoptosis in Failure of β -Cell Mass Compensation for Insulin Resistance and β -Cell Defects in the Male Zucker Diabetic Fatty Rat
Diabetes 47:358-364
- Pipeleers D, Hoorens A, Marichal-Pipeleers M, Van de Casteele M, Bouwens L, Ling Z (2001)
Role of Pancreatic β -Cells in the Process of β -Cell Death
Diabetes 50:52-57
- Polak M, Bouchareb-Banaei L, Scharfmann R, Czernichow P (2000)
Early Pattern of Differentiation in the Human Pancreas
Diabetes 49:225-232
- Porte D, Kahn SE (2001)
 β -Cell dysfunction and failure in type 2 diabetes : potential mechanisms
Diabetes 50:S160-163
- Proietto J, Thorburn AW, Fabris S, Harrison LC (1993)
Effects of dexfenfluramine on glucose turnover in non-insulin-depedndent diabetes mellitus
Diabetes Research and Clinical Practice 23: 127-134
- Querzoli P, Albonico G, Ferretti S, Rinaldi R, Magri E, Indelli M, Nenci I (1996)
MIB-1 proliferative activity in invasive breast cancer measured by image analysis
J Clin Pathol 49:926-930

Rane SG, Reddy EP (2001)

Cell Cycle Control Of Pancreatic Beta Cell Proliferation
Frontiers In Bioscience 5, d1-19

Rose DSC, Maddox PH, Brown DC (1994)

Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparison of five antibodies
J Clin Pathol 47:1010-1014

Saito K, Iwama N, Takahashi T (1978)

Morphometrical analysis on topographical difference in size distribution, number and volume of islets in the human pancreas
Tohoku Journal of Experimental Medicine 124(2):177-186

Scaglia L, Cahill CJ, Finegood DT, Bonner-Weir S (1997)

Apoptosis Participates in the Remodeling of the Endocrine Pancreas in the Neonatal Rat
Endocrinology 138:1736-1741

Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MHG, Key G, Flad HD, Gerdes J (1993)

The Cell Proliferation-associated Antigen of Antibody Ki-67: A Very Large, Ubiquitous Nuclear Protein with Numerous Repeated Elements, Representing a New Kind of Cell Cycle-maintaining Proteins
J Cell Biology 123:513-522

Scholzen T, Gerdes J (2000)

The Ki-67 protein: from the known and the unknown
J Cell Physiol 182:311-322

Schrape S, Jones DB, Wright DH (1987)

A comparison of three methods for the determination of the growth fraction in NHL
British J Cancer 55:283-286

Shi SR, Cote RJ, Taylor CR (1997)

Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present and Future
J Histochem Cytochem 45:327-343

Sreenan S, Pick AJ, Levisetti M, Baldwin AC, Pugh W, Polonsky KS (1999)

Increased B-Cell Proliferation and Reduced Mass Before Diabetes Onset in the Nonobese Diabetic Mouse
Diabetes 48:989-996

Starborg M, Gell K, Brundell E, Höög C (1996)

The murine Ki-67 proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression
J Cell Sci 109:143-153

Swenne I (1982)
The Role of Glucose in the In Vitro Regulation of Cell Cycle Kinetics and Proliferation of Fetal Pancreatic B-Cells
Diabetes 31:754-760

Swenne I (1983)
Effects of Aging on the Regenerative Capacity of the Pancreatic B-Cell of the Rat
Diabetes 32:14-19

Swenne I (1992)
Pancreatic Beta-cell growth and diabetes mellitus
Diabetologia 33:193-201

Swenne I, Andersson A (1984)
Effect of genetic background on the capacity for islet cell replication in mice
Diabetologia 27:464-467

Tazzari PL, Bontadini A, Gobbi M, Tassi C, Dinota A, Visani G, Michieli MG, Pileri S, Baccarani M, Tura S (1990)
Comparison of the DNA content, bromodesoxyuridine incorporation and Ki-67 antigen expression in human acute myeloid leukemia
Leuk. & Lymphoma 3:45-51

Tisch R, McDevitt H (1996)
Insulin-dependent diabetes mellitus
Cell 85 :291-297

Traut W, Endl E, Scholzen T, Gerdes J, Winking H (2002)
The temporal and spatial distribution of the proliferation associated Ki-67 protein during female and male meiosis
Chromosoma 111:156-164

Tsuji Y, Kusuzaki K, Hirasawa Y, Serra M, Baldini N (1997)
Ki-67 Antigen Retrieval in Formalin- or Ethanol-fixed, Paraffin-embedded Tissues: An Enhancement Method for Immunohistochemical Staining with Autoclave Treatment
Acta Histochem Cytochem 30:251-255

Wang RN, Bouwens L, Klöppel G (1995)
Beta-cell proliferation in normal and streptozotocin-treated newborn rats: site, dynamics and capacity
Diabetologia 37:1088-1096

Weibel ER, Bolender RP (1973)
Stereological Techniques for Electron Microscopic Morphometry
In: *Principles and Techniques of Electron Microscopy* ed. By Hayat MA

Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A. (2001)
 β -Cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes
Diabetes 50:S154-159

Williams MA (1977)
Quantitative Methods in Biology
In: *Practical Methods in Electron Microscopy ed. By Glauert AM*

Willingham MC (1999)
Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis
J Histochem Cytochem 47:1101-1109

Wyllie AH, Kerr, JF, Currie Ar (1980)
Cell death: the significance of apoptosis
Int Rev Cytol 68: 251-306

7. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Carsten Lange	Geburtsdatum:	09. Juli.1974
Anschrift:	Werstener Dorfstraße 211 40591 Düsseldorf	Geburtsort:	Wesel
Tel.:	0211 – 768495	Familienstand:	ledig
E-mail:	lange.carsten@web.de	Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung:

1981 – 1985 Theodor-Heuss-Grundschule, Flüren
1985 – 1994 Konrad-Duden-Gymnasium, Wesel (Abschluss: Abitur)

Zivildienst:

1994 – 1995 Diakonisches Werk der Evangelischen Kirche Rheinland

Hochschulstudium:

1995 – 2002 Studium der Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
1997 Ärztliche Vorprüfung
1998 Erstes Staatsexamen
2001 Zweites Staatsexamen
2002 Drittes Staatsexamen

Berufserfahrung:

2001 - 2002 Praktisches Jahr

Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf
Innere Medizin, Radiologie

Kantonsspital Winterthur, Schweiz
Chirurgie

2002 – 2003 Arzt im Praktikum

Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf
Radiologie

8. Danksagung

Frau PD Dr. Erika Junger danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, eine umfassende Betreuung sowie für viele interessante Anregungen und Diskussionen. Mein besonderer Dank gilt ihrer ständigen Bereitschaft, Hilfestellungen zu geben und mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Herrn Kai Jeruschke gilt mein Dank für seine häufig von mir in Anspruch genommene Hilfe im technischen Bereich.

Sowohl Frau PD Dr. Erika Junger als auch Herrn Kai Jeruschke danke ich für die Fixierung und Einbettung der verwendeten Pankreata.

Frau Prof. Dr. Dr. Herberg danke ich besonders für die Züchtung der Mäuse sowie für die Messung und Dokumentation des Körpergewichts, der Blutglukosewerte und der Insulinspiegel über die gesamte Lebenszeit der verwendeten Mäuse, ohne die die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Frau Dr. Augstein danke ich für die Durchführung einer TUNEL-Färbung an einigen unserer Präparate, die wir als Kontrolle zur Einschätzung unserer eigenen Ergebnisse nutzten.

Meiner Mutter danke ich ganz herzlich für die Durchsicht der Arbeit und die Korrektur im Rahmen der neuen Rechtschreibung. Ganz besonders danke ich meinen Eltern für die ermunternde und aufbauende Unterstützung, sowohl in Bezug auf diese Arbeit als auch mein Studium betreffend.