

Aus der Urologischen Abteilung des Franziskus-Krankenhauses Berlin (Prof. Dr. HÜDEPOHL) und dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Münster (Dir.: Prof. Dr. PONSOLD)

## Histochemische Befunde an Rattenieren bei Überdosierung von Parathormon und AT 10 (Dihydrotachysterin)

Von

MARIANNE FRITSCH\* und HANS W. SACHS\*\*

(Eingegangen am 8. März 1961)

Mit 5 Textabbildungen

Bei Behandlung der latenten und manifesten Tetanie mit AT 10 (0,5%ige Lösung des hydrierten Tachysterins) bzw. bei besonders hoher Dosierung von AT 10 beobachtet man beim Menschen das Auftreten von Eiweiß und Erythrocyten im Harn sowie die Bildung von Kalkkristallen und Einlagerung von Konkrementen in den Nieren. Die Wirkung von AT 10 entspricht weitgehend der des Parathormons.

Wiederholte Gaben von *Parathormon* bewirken eine Änderung des Dispersitätsgrades der polymerisierten kohlenhydratproteininhaltigen Grundsubstanz des Knochens, führen zu einer Abnahme des Polymerisationsgrades durch mucolytische Enzyme und bilden ein lösliches Derivat in Form von Serum-Mucoproteinen (GERSH u. CATCHPOLE, CATCHPOLE).

Die polymerisierte Form ist in molaren NaCl-Lösung oder in Pufferlösungen mit einem pH zwischen 4,5 und 8,6 unlöslich. Dagegen löst sich das depolymerisierte Mucoid gut (BAKER, REAVEN u. SAWYER). In den Nieren unterscheiden wir bei wiederholten Parathormongaben ebenfalls glomerulär filtrierte Mucoproteine mit einem pH-Wert zwischen 4,5 und 8,6 sowie Uromucoide als Sekretionsprodukte der Tubulusepithelien, der Nierenkelche und des Nierenbeckens mit einem außerhalb der vorgenannten Werte liegenden pH-Bereich. Beide Kolloide sind Träger der Calcifizierung (BOYCE, GARVEY u. NORFLEET). In der normalen Niere sind die Mucopolysaccharide in allen Nierenabschnitten völlig gleichmäßig verteilt, auch Gaben von insgesamt 800 E Parathormon verursachten nach einer Woche keine Verkalkungen. Bei der Gabe von 1000 E Parathormon zeigt das histologische Bild eine netzförmige Vermehrung der Tubulusgrundsubstanz, während die Glomeruli unverändert bleiben (BAKER u. SISON, EBSTEIN). Wiederholte kleinere Parathormongaben verursachten ebenfalls die Ablagerung von Mucopolysacchariden als intracelluläre Granula und intratubuläre Zylinder (WERNLY). Gaben von über 1000 E Parathormon führten zunächst zu einer Anurie. Die Tubuli waren mit einer homogenen polysaccharidhaltigen Masse „verstopft“ oder enthielten Klumpen von dicht zusammengefügten Granula. In einigen Präparaten sah man in den Tubuluszellen, besonders denen der proximalen Sammelröhren, große Glykoproteingranula. In den Lumina der Tubuli und am Saum fanden sich Calcium- und Phosphorabscheidungen. Einige Abschnitte enthielten lediglich Polysaccharide, in den anderen wiederum waren die Polysaccharide mit Calcium und Phosphor imbibiert (ENGEL). Bei 1600—1700 E wurde Calcium auch in der tubulären Lichtung und bei noch höherer Dosierung in der Milzkapsel, der Basalmembran der großen und kleinen Arterien und Arteriolen, im Endokard und in der Magenfascie nachgewiesen (BAKER, REAVEN u. SAWYER).

Nach gleichen Gaben, aber Fixierung der Ratteniere in Osmiumsäure, Einbettung in Methacrylat wies GRIMES in etwa 0,5 my dicken Schnitten — also mit einer der Elektronen-

\* Die vorliegende Arbeit wurde während der Tätigkeit an der Medizinischen Klinik der Universität Münster (Dir.: Prof. Dr. W. H. HAUSS) im Jahre 1958 begonnen.

\*\* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

mikroskopie entlehnten Technik — besonders bei Phasenkontrast tropfenförmige Calcium-Mucoprotein-Komplexe neben verkalkten Basalmembranen im Cytoplasma der zugehörigen proximalen Tubulusepithelien nach. Auf das Mucoprotein schloß er aus der stark positiven PAS-Reaktion. Zylinder waren in diesem Tubulusabschnitt PAS-positiv, aber kalkfrei. Die intracytoplasmatischen Kalkgranula sollen unter der Mitwirkung der Mitochondrien aus rückresorbierten Mucoproteinen entstanden sein und nach dem Zerfall der Epithelien die Verkalkung der Zylinder in den distalen Abschnitten fördern. Dort lagen dann verkalkte Zylinder an kaum verkalkten Epithelien.

Die Verkalkung der Basalmembran erklärt GRIMES dagegen nicht durch Rückresorption, weil sie auch an Stellen vorkommt, die nicht rückresorbieren (etwa im Glomerulum) und weil sie bei Calciumgluconatgaben auch ohne intracytoplasmatische Verkalkung vorkommt. Der erhöhte Serumcalciumspiegel sei wahrscheinlich für die Verkalkung der Basalmembranen direkt verantwortlich.

Beobachtungen über eine Eisenreaktion oder die Zunahme der Phosphataseaktivität des Gewebes waren nicht verzeichnet, obwohl gerade das Verhalten der Phosphatasen bei der Reabsorption des Phosphors in den Nierentubuli interessant wäre.

Wir haben nun versucht, die Wirkungen von AT 10 mit der des Parathormons im Rattenversuch zu vergleichen; dabei wurden die sauren getrennt von den übrigen Mucopolysacchariden und zwei verschiedenen Verkalkungsformen dargestellt.

### Material und Methoden

Männliche weiße Ratten aus verschiedenen Zuchttümmlen wurden behandelt, wie in den folgenden Tabellen ersichtlich ist.

Tabelle 1. *Parathormon*<sup>1</sup>

Nr.	Gewicht g	Tage × Einheiten	Einzel-dosis je 100 g	Gesamt-dosis je 100 g	Pause Tage	Versuchs-dauer Tage
156	200	5 × 40	20	100	2	7
157	200	5 × 40	20	100	2	7
169	180	10 × 40	22,2	222	2	12
176	200	10 × 40	20	200	2	12
180	160	1 × 200	125	125	—	1/8
181	160	5 × 200	125	625	2	7
185	160	7 × 200	125	875	—	7
186	200	7 × 200 1 × 100	100	750	2	10

Tabelle 2. *AT 10*<sup>1</sup>

Nr.	Gewicht g	Tage × mg	Einzel-dosis je 100 g	Gesamt-dosis je 100 g	Pause Tage	Versuchs-dauer Tage
158	210	5 × 2	0,95	4,75	2	7
159	200	5 × 2	1,00	5,00	2	7
170	180	10 × 2	1,11	11,10	2	12
175	190	10 × 2	1,05	10,50	2	12

Die intraperitoneal applizierte Parathormondosis wurde gestaffelt, um den Beginn der Veränderungen im Vergleich zu den Literaturangaben erfassen zu können. AT 10 gaben wir den Ratten oral, die Dosis empfahlen uns die Pharmakologen (KEMPER, mündliche Mitteilung) als wahrscheinlich wirksam, aber nicht letal. Im Schrifttum fanden wir keine Angaben über die Höhe der toxischen Dosis bei Ratten.

<sup>1</sup> Parathormon stellte in dankenswerter Weise die Firma Hormonchemie München zur Verfügung, AT 10 die Firma E. Merck in Darmstadt.

Die Ratten wurden nach den angegebenen Ruhepausen geköpft und Teile der Nieren sogleich gefriergetrocknet, in Formol oder Alkohol fixiert oder unfixiert mit dem Gefriermikrotom geschnitten. Die alkalische und die saure Phosphatase wurden nach GOMORI, die Lipasen nach GOMORI in der Modifikation von RICHTERICH, die Perjodsäure-positiven Substanzen nach HOTCHKISS, die Kalksubstanzen nach KOSSA und mit Kobaltnitrat, das ist mit dem zweiten Teil des Untersuchungsganges des oben zitierten Verfahrens nach GOMORI (s. auch SACHS), angefärbt. Eisen wurde nach TIRMAN u. SCHMELZER, die sauren Mucopolysaccharide mit Astrablau (PIOCH), das Glykogen mit der Bestschen Carminfärbung dargestellt und mit Trichrom-(GOLDNER) oder Hämatoxylin-Eosin-Färbungen verglichen.

### Ergebnisse

**Parathormon.** Häufig wurden vereinzelte Zylinder gefunden, die Perjodsäure-positive Substanzen und z. T. auch Kalk enthielten. Solche vereinzelten Zylinder sind wahrscheinlich Spuren früherer oder interkurrent durchgemachter Erkrankungen, da sie mit steigender Dosierung und steigender Überlebenszeit nicht zunahmen und andere, stärker behandelte Tiere keine solchen Zylinder erkennen ließen.

Perjodsäure-positive Zylinder scheinen erst bei stärkerer Dosierung, etwa 700 E/100 g Ratte eine Folge der Parathormongaben zu sein. Sie sind dann auch mit einer geringen tropfigen Entmischung des Tubulusprotoplasmas vergesellschaftet.

Ähnliches gilt auch für Veränderungen der *sauren Mucopolysaccharide*. In einem der am stärksten behandelten und am längsten beobachteten Tiere (750 E P.H./100 g Ratte über 10 Tage) trat mit Astrablau eine positive Reaktion in den Glomerula und im Interstitium der Papille auf, die bei schwächer behandelten und kürzer beobachteten Tieren (wie in den Normalkontrollen) nicht zu finden war: die Grundsubstanz der Glomerula stellte sich in Form eines feinen Netzwerkes blau dar, ohne verquollen zu sein. Die Basalmembranen der Tubuli waren in diesem Schnitt (noch) unauffällig. Daß diese Veränderungen wirklich durch Parathormon hervorgerufen wurde, ist unter Berücksichtigung der Literatur und der nachfolgenden AT 10-Befunde kaum zu bezweifeln.

Richtige Verkalkungen der Basalmembranen oder Kalkabscheidungen in die Lichtung der Tubuli haben wir mit dem hier verwendeten Parathormon in Dosen bis etwa 800 E/100 g Ratte und innerhalb von 10 Tagen nicht gefunden. Erste Anfänge in dieser Richtung liegen bei einem unserer Parathormontiere nach 12 Tagen und 220 E/100 g Ratte nicht in der Basalmembran, sondern es finden sich feine, mit Kobaltnitrat und Kossa nachweisbare *Kalkniederschläge* im Tubulusepithel und Interstitium.

Anscheinend an gleicher Stelle geben die Tubulusepithelien auch eine schwach positive *Eisenreaktion*, möglicherweise bei geringer tropfiger Entmischung. Die Basalmembranen sind bei der Eisenreaktion im ganzen Querschnitt diffus angefärbt. Ob es sich bei diesem Phänomen mehr um eine Diffusion als um eine Speicherung handelt, läßt sich aus den Bildern nicht ablesen. Es bleibt offen, inwieweit diese Befunde wirklich Folge des Parathormons sind oder eine interkurrente Veränderung darstellen. Für einen Zusammenhang mit Parathormon sprechen die klinischen Erfahrungen, daß Anämien bei Nephrosen häufig sind und daß Eisen auch in den Versuchen mit AT 10 beobachtet wurde.

AT 10 verursacht schon mit der kleineren Dosis nach 7 Tagen Beobachtung teils starke, teils schwächere Kalknephrosen. Bei Trichromfärbung bunte und mit Perjodsäure positive Zylinder waren in allen Fällen nachzuweisen. Tropfige Ent-

mischung war an weniger veränderten Tubulusabschnitten noch deutlich, große andere Tubulusabschnitte waren bereits schwerer bis zur verkalkten Nekrose verändert.

Die *sauren Mucopolysaccharide* konnten beim stärker und länger behandelten Tier in den Glomerula und an der Basalmembran geringer nachgewiesen werden als bei dem schwächer und kürzer behandelten Tier (annähernd 5 mg auf 100 g Ratte nach 7 Tagen). Dagegen enthielten die Zylinder bei längerer Versuchsdauer und stärkerer Dosierung mindestens gleich viel, wenn nicht mehr saure Mucopolysaccharide. Zylinder bestanden oft aus einem Gemisch unregelmäßiger Teile mit und ohne saure Mucopolysaccharide.

Nach KOSSA und mit Kobaltreaktion nachweisbarer „Kalk“ war in Zylindern, Basalmembranen und nekrotischen Epithelien in allen Versuchen ziemlich gleichmäßig nachweisbar. Die Verkalkung der Basalmembran (ohne Verkalkung des anliegenden Tubulusteiles) wurde am häufigsten in der Nierenrinde gefunden.

Bei der Kobaltreaktion traten zwei (schon bei der Sublimatnephrose von SACHS beschriebene) verschiedene Substanzen auf: a) eine stark lichtbrechende, weniger geschwärzte, inkrustierende und b) eine amorphe schwarze.

Nur die Verteilung dieser beiden Substanzen im Nephron unterschied sich von der in der Sublimatniere: Nach AT 10-Gaben lagen beide in buntem Wechsel in der Außenzone des Nierenmarkes — nach Sublimatgaben fanden sie sich in verschiedenen Zonen: a) in der Rinde und b) in der Außenzone des Markes. Die stark lichtbrechende Inkrustation schien besonders oft das Epithel dilatierter Tubuli befallen zu haben.

Silber-(KOSSA) und Bleinitrat erlaubten keine Differenzierungen von zwei Verkalkungsformen. Erst die Reaktion mit Kobaltnitrat macht den Unterschied im gewöhnlichen und polarisierten Licht deutlich.

Eigenartigerweise traten auch mit der *Bestschen Carminfärbung* zweierlei Reaktionen auf:

1. Viele Zylinder waren teilweise oder ganz positiv, die gefärbte Substanz war nicht alkohollöslich und oft lichtbrechend; die Zylinder enthielten aber kein Glykogen, da die Reaktion gegen Wasser und Ptyalin unempfindlich war.

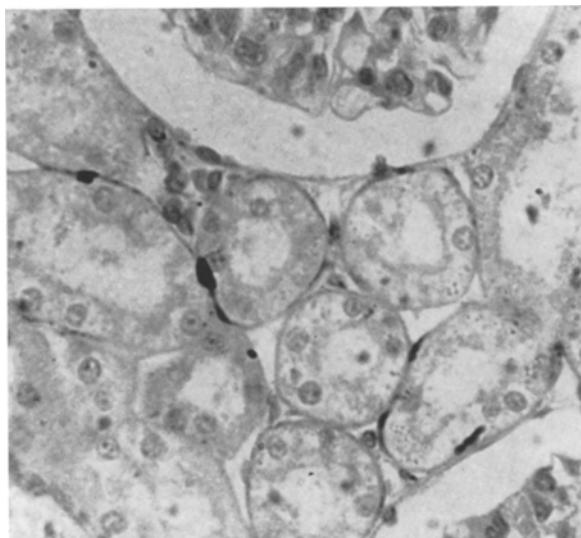


Abb. 1. Spindelförmige Verkalkung in den Basalmembranen der Nierenrinde nach 10,5 mg AT 10/ 100 g Gewicht (Nr. 175); Kalkreaktion mit Kobaltnitrat

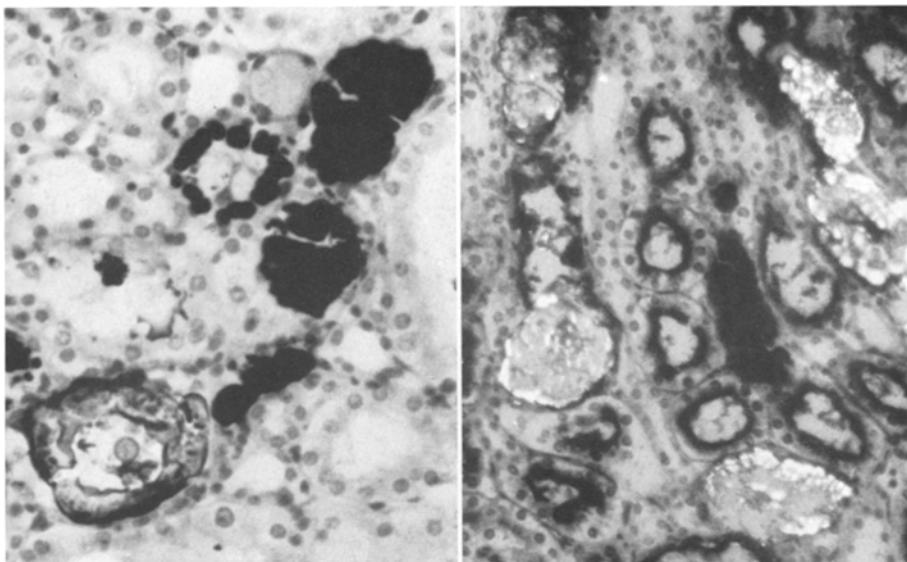


Abb. 2

Abb. 3

Abb. 2. Hellere Inkrustation, stark lichtbrechend (und in Abb. 3 doppelt brechend) und amorphe, schwarze (nicht lichtbrechende) Verkalkungen. Kobaltnitratreaktion mit Kerngegenfärbung in der gleichen Niere wie Abb. 1

Abb. 3. 1. Reaktion auf alkalische Phosphatase: schwarzer apikaler Saum der Tubulusepithelien. 2. Kobaltnitratreaktion: doppeltbrechende Inkrustation (im halbpolarisierten Licht) und schwarzer amorpher Zylinder (Bildmitte) in der gleichen Niere wie Abb. 1 und 2

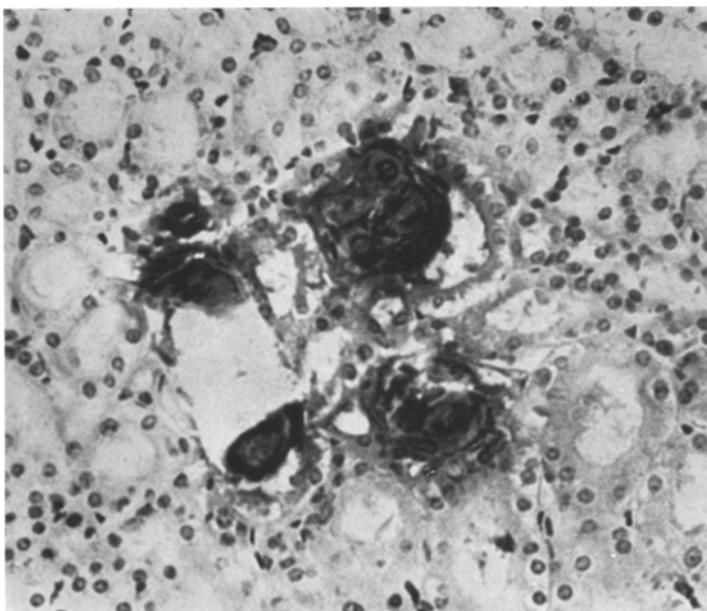


Abb. 4. Verschieden starke Bestsche Carminreaktion von teilweise verkalkten Zylindern mit Andeutung konzentrischer Ringe nach 11,1 mg AT 10/100 g Gewicht (Nr. 170)

2. In den Versuchen mit schwächerer Dosierung traten außerdem feine, intensiv rote Tröpfchen im Protoplasma schmaler Tubulusquerschnitte auf, ohne den Zelleib auszufüllen. Sie waren mit Wasser und Speichel löslich, enthielten also wahrscheinlich Glykogen.

Ziemlich gleichmäßig waren in der Niere Gefäßwandzellen verteilt, deren Protoplasma eine positive *Eisenreaktion* gab. Im Gegensatz zu den Parathormontieren war die Eisenreaktion auf die Zellen beschränkt, es bestand kein Hinweis für eine Diffusion.

Lipasen und Plasmalreaktion wurden durchweg abgeschwächt. Bei der alkalischen Phosphatase geht der Abschwächung wahrscheinlich eine mäßige Steigerung voraus. Relativ beständig war die saure Phosphatase.

### Besprechung

#### I.

In der gewählten Dosierung waren die Nierenveränderungen nach AT 10-Gaben wesentlich stärker als nach Parathormon. Es entstand eine akute toxische verkalkende Nephrose. Diese wurde nach  $5 \times 2$  mg (nach 2 mg täglich über 5 Tage) und einer Beobachtungspause von zwei weiteren Tagen bereits deutlich. Sie unterschied sich ohne histochemische Untersuchungsmethoden nicht von der akuten toxischen Nephrose, die aus vielerlei Ursachen unter den verschiedensten Bezeichnungen vorkommt (SACHS) und nach AT 10-Gaben auch schon von GERLACH u. SCHÜRMAYER beobachtet wurde. Letztere untersuchten hauptsächlich biochemisch die Stoffwechselveränderungen und beschrieben histologisch in Hämatoxylin-Eosin-Schnitten eine Schädigung des Tubulusepithels bis zur Nephrose ohne Verkalkungen nach je 0,5 mg in 5 Tagen und Tötung am 6. Tage nach der ersten oralen AT 10-Gabe. Das entspricht etwa einem Viertel unserer Dosierung bei kürzerer Beobachtungszeit.

Durch längere Beobachtung der Tiere und mit Spezialfärbungen sind, soweit wir die Literatur überblicken, nunmehr neu festgestellt worden:

a) *Glykogen* oder eine histochemisch gleich reagierende Substanz in geringen Mengen nach AT 10. Die Glykogengranula dürften den von ENGEL nach Parathormon beschriebenen Glykoproteingranula entsprechen oder mit ihnen parallel gehen.

b) *Saure Mucopolysaccharide*, reichlich nach Parathormon und AT 10. Nach chemischen Befunden früherer Untersucher war die Ausscheidung von Mucopolysacchariden zu erwarten. Die hier bei AT 10 gefundenen Besonderheiten der sauren Mucopolysaccharide sind nach Intensität und Lage innerhalb des Nierengewebes nicht völlig mit den in der Literatur nach Parathormongaben beschriebenen Mucopolysacchariden identisch. Dies ist in erster Linie auf die Verschiedenheit der angewandten histochemischen Reaktionen zurückzuführen. Hier wurden die *sauren* Mucopolysaccharide dargestellt, während frühere Autoren mit der Perjodsäurereaktion nach HODGKISS teils ganz allgemein Polysaccharide oder mit weiteren physikalisch-chemischen Verfahren allgemein Mucopolysaccharide darstellten, ohne daraus die sauren hervorzuheben. Dies erklärt vor allem, daß Perjodsäure-positive Substanzen in den Tubulusepithelien gefunden, als Mucopolysaccharide gedeutet und als Grundlage für die Verkalkung angesehen wurden (BAKER u. a.) — während wir saure Mucopolysaccharide an diesen Stellen nicht

finden konnten. Wir hatten technisch nicht die Möglichkeit, die Perjodsäure-positiven Substanzen mit den gleichen Methoden so zu differenzieren wie die amerikanischen Autoren. Die Vermehrung Perjodsäure-positiver Substanzen in den Tubulusepithelien sahen wir aber auch in anderen Untersuchungsreihen bei nicht verkalkenden Nephrosen im Zuge der tropfigen Entmischung in Bildern, wie sie die amerikanischen Autoren abbilden. Deswegen sind wir nicht überzeugt, daß die Vermehrung der Mucopolysaccharide in den Tubulusepithelien eine Besonderheit der verkalkenden Nephrosen sei — wohl aber ihre Vermehrung in Basal-

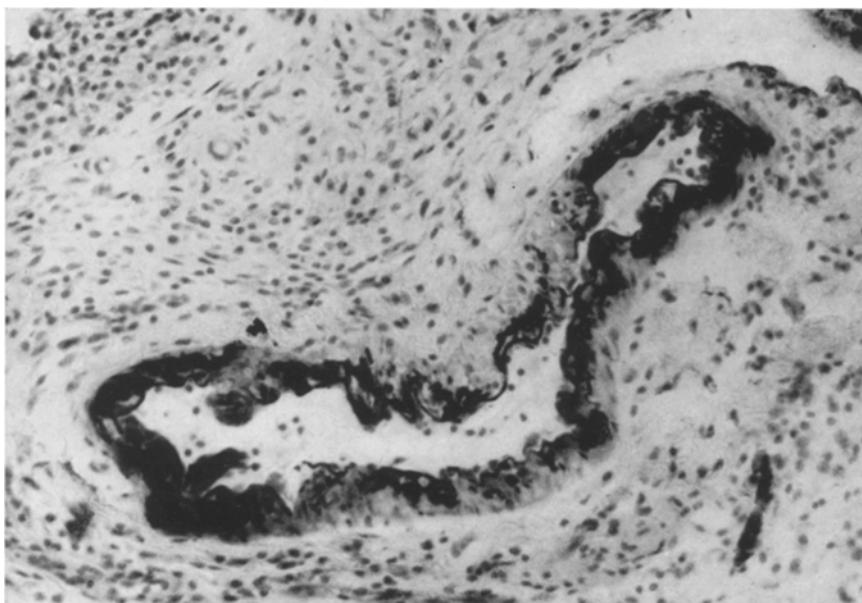


Abb. 5. Nierenarterie mit Verkalkung in Elastica und Muscularis. Kobaltnitratreaktion mit Kerngegenfärbung in der gleichen Niere wie Abb. 1—3 (Nr. 175)

membranen und Zylindern eine Besonderheit der Nephrocalcinose des Hyperparathyreoidismus.

Saure Mucopolysaccharide mit der Astrablauauffärbung ließen sich nachweisen: 1. in den Glomerula, 2. in der Basalmembran der Tubuli, 3. in Zylindern innerhalb der Nierenkanälchen und im Nierenbecken, 4. im Interstitium, vorwiegend der Papille.

c) Die *Carminfärbung der Zylinder* geht nach den bisherigen Versuchen parallel zur Intensität der mit Astrablau nachweisbaren sauren Mucopolysaccharide (nur in den Zylindern!) und scheint wie diese ein Vorläufer der Verkalkung zu sein: In den Inkrustationen kamen alle Übergänge vor zwischen stark carminroten, schwach polarisierenden und schwach roten, aber stark polarisierenden Stellen. Nieren, die am stärksten verändert waren, zeigten die stärkste Inkrustation — schwächer veränderte Nieren eine schwächere Inkrustation und carminrote Zylinder ohne Polarisation.

d) „*Kalk*“ in zwei verschiedenen Formen nach AT 10. Die Kalkablagerungen beschränkten sich nicht nur auf die Basalmembranen, sondern befielen, wie

SYLVEN für das Parathormon beschrieb, auch die Bowmanschen Kapseln, fernernekrotische Tubulusepithelien und Zylinder. SYLVESEN Beschreibung von Kalkablagerungen in Milzkapsel, Endokard, Magenfascie und Basalmembran der Arterien kann noch um einen weiteren Fundort erweitert werden, nämlich Elastica und Muscularis der Nierenarterien.

In den nekrotischen Tubulusepithelien und Zylindern deckte der Kalknachweis mit Kobaltnitrat zwei verschiedene Kalksubstanzen auf, die in gleicher Form, aber anderer Verteilung auf Rinde und Mark auch schon bei anderen Vergiftungen in der Niere beobachtet wurden (SACHS): Hier lagen sie unregelmäßig durchmischt vorwiegend in der äußeren Markzone; aus Erfahrungen mit anderen Giften ist aber nicht zu erwarten, daß diese Beschränkung auf die äußere Markzone eine Besonderheit der AT 10-Nephrocalcinose wäre.

### II.

In unseren Untersuchungen konnten somit nach AT 10-Gaben an Ratten Veränderungen gefunden werden, die den nach Parathormon beschriebenen weitgehend gleichen. Bei Parathormongaben an unsere Ratten waren allerdings die Veränderungen gering. Es entsteht die Frage, wie weit die Mengen des Parathormons, dessen Standardisierung und Reinheitsgrad der Wirkstoffkomponenten oft umstritten ist, mit denen des AT 10 verglichen werden können. Wären die Dosen insofern vergleichbar, daß sie die erwünschten Effekte in etwa gleichem Maße erreichen, dann wären unerwünschte Effekte in Form von Nierenschäden bei AT 10-Gaben in ungleich höherem Maße zu erwarten als bei Parathormongaben. Dies gilt für Ratten. Für die Übertragung dieser Schlüsse auf den Menschen wird Vorsicht notwendig sein; immerhin fordern die Rattenversuche auf, beim Menschen nach entsprechenden Nierenveränderungen zu fahnden. Da hier Zylinder mit sauren Mucopolysacchariden im Nierenbecken gefunden wurden, liegt es nahe, unter anderem auch das menschliche *Harnsediment* nach Antröcknung und Fixierung in Formalindämpfen mit Astrablau zu untersuchen. Natürlich müßte klinisch in einer Reihenuntersuchung kontrolliert werden, wie weit auch in Zylindern anderer Genese saure Mucopolysaccharide nachweisbar sind.

### III.

Wenn man die nach verschiedenen Dosierungen und verschiedener Überlebenszeit gefundenen Bilder aneinanderreihet, kann man auf den *zeitlichen* Ablauf der Veränderungen schließen: Im Laufe der Vergiftung treten offenbar saure Mucopolysaccharide in Glomerula und Basalmembranen frühzeitig auf und sind dort später schwächer nachweisbar — zu späteren Zeitpunkten sind sie dann in den Zylindern stark. Die sauren Mucopolysaccharide treten offenbar vor der Verkalkung auf, in den Glomerula noch früher als in der Basalmembran der Tubuli und der Bowmanschen Kapsel. In den Glomerula scheint (zumindest nach den bisherigen Beobachtungen) die Verkalkung den sauren Mucopolysacchariden nicht zu folgen; diese gehen wahrscheinlich in den Harn über und wirken dort z. T. in den Zylindern weiter. Anders in den Basalmembranen, wo die Verkalkung dem Auftreten der sauren Mucopolysaccharide folgt und sie ablöst. An dieser Stelle haben schon BAKER u. Mitarb. eine solche Aufeinanderfolge angenommen, ohne daß sie die sauren von den übrigen Mucopolysacchariden getrennt hätten.

In den Tubulusepithelien wurden allerdings saure Mucopolysaccharide als Vorläufer der Verkalkung nicht gefunden. Dies kann verschiedene Gründe haben:

a) Es kommt vielleicht nicht darauf an, daß die Mucopolysaccharide sauer sind; denn BAKER u. GRIMES nehmen eine solche Aufeinanderfolge auch hier an, ohne die Mucopolysaccharide weiter differenziert zu haben. Unsere stark lichtbrechende Kalkinkrustierung ist allerdings bisher nur in Epithelien beobachtet worden, die keine wesentliche PAS-Reaktion mehr geben. Auch die Form unserer Inkrustierung erinnert nicht an Tropfen. Sie ahmt vielmehr in verzerrten Rechtecken und Bändern Teile des Epithelquerschnittes nach (Abb. 2a). — In Form rundlicher Gebilde ähnlich GRIMES Bildern liegen dagegen manchmal die nicht lichtbrechenden Kalkmassen (Abb. 2b). Aber auch diese Stellen geben keine besondere PAS-Reaktion und auch keine solche mit Astrablau. — Wenn PAS-positive Substanzen auch in den Tubulusepithelien Vorläufer der Verkalkung sind, dann sah GRIMES vielleicht frühere Stadien dieser Entwicklung oder es bleiben bei seiner Technik Substanzen erhalten, die bei der unseren verloren gingen. Genaueres könnte man erst aussagen, wenn Schnitte nach beiden verschiedenen Methoden angefertigt und dann verglichen würden.

b) Oder die Verkalkung der Tubulusepithelien nimmt zumindest z.T. einen anderen Weg: gerade im nekrotischen Gewebe ist eine Verkalkungstendenz auch im übrigen Körper allgemein bekannt. Die Verkalkung könnte hier durch Hypercalcämie beschleunigt sein. Der Nachweis von zwei verschiedenen Endprodukten der Verkalkung läßt wahrscheinlich werden, daß diese auf verschiedenen Wegen entstanden sind und daß die Verkalkung der Tubulusepithelien gegenüber der Verkalkung der Basalmembranen ihre Besonderheiten wahrt.

Durch Parathormon oder AT 10 werden somit die sauren Mucopolysaccharide offenbar beim Knochenabbau frei und erscheinen dann in der Niere. Drei Komponenten wirken dort:

1. Die Vermehrung der sauren Mucopolysaccharide, eventuell überhaupt der Mucopolysaccharide und aus dem Lumen in die Tubulusepithelien rückresorbierte intracellulär veränderte Mucoproteine (GRIMES).

2. Die Nekrose der Tubulusepithelien. Sie ist ihrerseits entweder Folge der Störung an der Basalmembran oder (und ?) nach GRIMES der Einlagerung veränderter Mucoproteine in das Cytoplasma der Epithelzelle.

3. Die Hypercalcämie, um das Nephron an bestimmten Stellen verkalken zu lassen.

Hypercalcämie allein führt im Experiment nicht zur Nierenverkalkung. Die sauren Mucopolysaccharide allein führen nicht an jeder Stelle zur Verkalkung: Sie werden im Glomerulum anscheinend ausgeschieden, ohne dort schon zur Verkalkung Anlaß zu geben. Schließlich braucht die Nekrose der Tubulusepithelien anderer Genese nicht zu verkalken. Erst das Zusammenwirken zweier oder mehrerer der oben genannten Komponenten (oder auch noch anderer Einflüsse) führt dann zu schneller und ausgedehnter Verkalkung. In den Tubulusepithelien könnte anstelle der sauren Mucopolysaccharide auch ein anderer Faktor Wegbereiter der Verkalkung sein und dann zu einer der beiden verschiedenen Verkalkungsformen führen. Wie weit die sauren Mucopolysaccharide bei Kalknephrosen und Nephrocalcinosen anderer Genese eine Rolle spielen, wird noch zu

prüfen sein. Bei unseren experimentellen Sublimatvergiftungen haben wir bisher in den Rattennieren saure Mucopolysaccharide in vergleichbaren Bildern nicht gefunden, obwohl wir sowohl voll ausgeprägte Kalknephrosen als auch ihre Vorstadien untersuchten.

#### IV.

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase ist nach vorübergehender Verstärkung abgeschwächt. In den dilatierten Tubuli wird der sonst breite apikale Saum der Aktivität schmal, sobald die Tubuli dilatiert sind — schon vor Nekrose und Verkalkung. Abgeschwächt sind ferner die saure Phosphatase und die Lipase. Wenn man histochemische Besonderheiten infolge des naheliegenden Zusammenhangs zwischen Phosphatase und Verkalkung erwartet, so hatte das Suchen nach solchen Besonderheiten — zumindest bisher — keinen Erfolg; denn alle diese Fermentveränderungen kommen auch bei nicht verkalkenden Nephrosen vor.

#### Zusammenfassung

In Rattenversuchen wurden die Folgen der intraperitonealen Injektion von 100—875 E Parathormon/100 g Körpergewicht und 4—11 mg AT 10/100 g Körpergewicht auf die Nieren mit histochemischen Methoden untersucht. Nach Parathormon waren die Veränderungen gering, nach AT 10-Gaben stark. Die Veränderungen nach AT 10 gleichen den in der Literatur nach Parathormongaben beschriebenen.

Darüber hinaus wurden gefunden: geringe Ablagerungen in den Tubulusepithelien, die wie Glykogen reagierten; saure Mucopolysaccharide vermehrt in den Glomerula, Basalmembranen der Tubuli, in den Bowmanschen Kapseln, in Nierenzylinern und im Interstitium der Papille; eine mit Bestschem Carmin stark anfärbbare Substanz in den Zylindern (kein Glykogen); zwei verschiedene Formen der Kalkablagerung in den Tubuli.

In Basalmembranen und Zylindern sind die sauren Mucopolysaccharide offensbar Vorläufer der Verkalkung, nicht dagegen in den Glomerula.

Die Tierversuche lassen erwarten, daß man auch beim Menschen im Urinsediment Zylinder mit sauren Mucopolysacchariden finden und diagnostisch verwerten könnte.

#### Summary

In rat experiments the effects on the kidney of the intraperitoneal injection of 100—875 units of parathormone/100 gm. body weight and 4—11 mgm. AT 10/100 gm. body weight were studied histochemically. The changes after parathormone were slight but were severe after AT 10. The changes after AT 10 were the same as those described in the literature following parathormone administration. In addition, the scanty deposits found in the tubular epithelial cells reacted like glycogen. Acid mucopolysaccharides increased in the glomeruli, in the basement membrane of the tubuli, in the Bowmans capsule, in the tubular casts, and in the interstitium of the papillae. One substance in the tubular casts stained strongly with Best's carmine (no glycogen); two different types of calcium deposits were found in the tubuli. The acid mucopolysaccharides in the basement membrane and in the tubular casts were apparently precursors of the calcification; in contrast, not of those in the glomeruli.

The animal experiments indicated that one might expect to find casts with acid mucopolysaccharides in the urinary sediments of humans and these might be of diagnostic significance.

#### Literatur

- BAKER, R., G. REAVEN and J. SAWYER: Ground substance and calcification: The influence of dye binding on experimental nephrocalcinosis. *J. Urol. (Baltimore)* **71**, 511 (1954).  
—, and F. SISON: Demonstration of altered tissue mucopolysaccharides in renal calculus disease by selective staining techniques. *J. Urol. (Baltimore)* **72**, 1032 (1954).
- BOYCE, W. H., F. K. GARVEY and C. M. NORFLEET: Ion-binding properties of electrophoretically homogeneous mucoproteins of urine in normal subjects and in patients with renal calculus disease. *J. Urol. (Baltimore)* **72**, 1019 (1954).
- CATCHPOLE, H. R.: Serum and tissue glycoproteins in mice bearing transplantable tumors. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **75**, 221 (1950).
- EBSTEIN, W.: Über die experimentelle Erzeugung von Harnsteinen. Wiesbaden: J. F. Bergmann 1891.
- ENGEL, M. B.: Mobilization of mucoprotein by parathyroid extract. *Arch. Path. (Chicago)* **53**, 339 (1952).
- GERLACH, U., u. E. SCHÜRMAYER: Stoffwechseluntersuchungen bei experimenteller Nieren-schädigung durch Dihydrotachysterin (AT 10). *Z. ges. exp. Med.* **132**, 295 (1959).
- GERSH, I., and A. R. CATCHPOLE: The organization of ground substance and basement membrane and its significance in tissue injuries, disease and growth. *Amer. J. Anat.* **85**, 457 (1950).
- GOMORI, G.: Microscopic Histochemistry. Chicago, Ill. (U.S.A.): University of Chicago Press 1952.
- GRIMES, W. A.: A phase contrast study of the mechanisms of renal calcification. *J. Urol. (Baltimore)* **78**, 553 (1957).
- LIPP, W.: Histochemische Methoden, XVII, S. 11 ff. München: Oldenbourg 1954 ff.
- PIOCH, W.: Über die Darstellung saurer Mucopolysaccharide mit dem Kupferphthalocyaninfarbstoff Astrablau. *Virchows Arch. path. Anat.* **330**, 337 (1957).
- RICHTERICH, R.: Über die Lokalisation einiger Esterasen in verschiedenen Organen der Albinomaus. *Acta anat. (Basel)* **14**, 342 (1952).
- ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. München: Leibnitz 1948.
- SACHS, H. W.: Nephrosen bei Transfusionsschäden und exogenen Vergiftungen. *Dtsch. Z. gerichtl. Med.* **46**, 362 (1957).
- WERNLY, M.: Parathyreoida. In A. LABHARD, Klinik der inneren Sekretion, S. 824. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957.

Dr. MARIANNE FRITSCH, Berlin-Friedenau, Odenwaldstraße 9

Professor Dr. H. W. SACHS, Münster/Westf., v. Bodelschwingh-Str. 10