

Zur Pathogenese der calciphylaktischen Lungenfibrose*

H.-J. SCHÄFER

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

Eingegangen am 7. Dezember 1967

On the Pathogenesis of Calciphylactic Pulmonary Fibrosis

Summary. A comparative morphologic and biochemical study was made on the development of calciphylactic pulmonary fibrosis in female white rats. A first group of animals received 1 ml AT 10® p.o. (= 1 mg dihydrotachysterin in oily immersion) as a "sensitizer" on the first day and 10 mg CrCl₃ i.v. as a "challenger" on the second day. A second group received 1 ml AT 10® p.o. only. The duration of the experiment was 32 days. In the course of the calciphylactic reaction, three stages may be distinguished: an initial stage (swelling of cells and fibres in the alveolar membrane), the stage of mineralization (calcinosis of the basal membranes and elastic fibres, increased cellular activity, destruction of fibres) and the stage of fibrous induration resembling fibrocystic honeycomb lung (proliferation of interstitial cells, loss of alveolar tissue, calcium phagocytosis by foreign body giant cells, fibrous proliferation). The extent of pulmonary calcinosis is related to the elevation of the blood calcium level (peak values exceeding 15 mg-% on the 2nd to 4 thday), but not to the blood phosphate level. One of the factors in the pathogenesis of the calciphylactic reaction is increased permeability, which favours the lyotropic action of the challenger substance on the fibrous framework of the lung. The hypothesis is presented that CrCl₃ is first deposited in the fibrous tissue of the lung and then induces the formation of calcium apatite by exchange with endogenous calcium. Calciphylactic pulmonary fibrosis may serve as an experimental model for the study of the pathogenesis of etiologically different forms of pulmonary fibrosis in man.

Zusammenfassung. Der Ablauf der calciphylaktischen Lungenfibrose wurde vergleichend morphologisch und biochemisch bei weiblichen Albinoratten untersucht. Versuchsgruppe 1 erhielt 1 ml AT 10® (= 1 mg Dihydrotachysterin in öliger Lösung peroral) am 1. Versuchstag als „Sensitizer“ und 10 mg Chromchlorid intravenös am 2. Versuchstag als „Challenger“, Versuchsgruppe 2 1 ml AT 10® allein. Die Versuchsdauer betrug 32 Tage. Im Ablauf der calciphylaktischen Reaktion lassen sich 3 Phasen unterscheiden: Initialphase (Zell- und Faserschwellung der Alveolarmembranen), Mineralisationsphase (Calcinose der Basalmembranen und elastischen Fasern, Zellaktivierung, Faserdestruktionen) und fibrotische Umbauphase vom Typus der fibrocystischen Wabenlunge (interstitielle Zellproliferation, Parenchymrestriktion, Kalkphagocytose durch Fremdkörperriesenzellen, Faserneubildung). Es bestehen Korrelationen zwischen Stärkegrad der Lungencalcinose und Erhöhung des Calciumspiegels (Gipfpunkt von über 15 mg-% am 2.—4. Versuchstag), nicht dagegen zur Höhe des Phosphatspiegels. In der Pathogenese der calciphylaktischen Reaktion spielen Permeabilitätssteigerungen eine Rolle, die eine lytische Alteration des Lungengerüstes durch den Challenger begünstigen. Es wird die Hypothese vertreten, daß Chromchlorid zunächst in das Lungengerüst eingelagert wird und dann die Nucleation von Calciumapatit durch Austausch mit endogenem Calcium herbeiführt. Die calciphylaktische Lungenfibrose stellt ein geeignetes Modell zum Studium des Ablaufes menschlicher Lungenfibrosen unterschiedlicher Ätiologie dar.

Die Lungenfibrosen stellen eine Krankheitsgruppe mit heterogenen ätiologischen Faktoren dar (MEESEN, 1949; UEHLINGER und SCHOCH, 1957; GIESE,

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

1960, 1961, 1965; HARTUNG, 1964). Hierzu gehören Infektionen, chemische Noxen, allergische und immunpathologische Faktoren, Kreislaufstörungen und Stoffwechselkrankheiten. Die Lungencalcinose ist als eine Sonderform der „Lungenstarre“ anzusehen und führt bei diffuser Lungengerüstverkalkung zur sog. „Bimssteinlunge“ (LUBARSCH und PLENZE, 1931; MULLIGAN, 1947; GROSSE, 1960; GIESE, 1960; FRANKE, 1960; SELYE, 1962; WILKERSON, 1964). Ursächlich liegt meist eine allgemeine Mineralstoffwechselstörung vor, so bei primärem Hyperparathyreoidismus oder den Hypercalcämie-Syndromen bei Vitamin D-Intoxikation, destruierenden Knochenprozessen, Nephropathien, Sarkoidose und anderen Krankheiten (UEHLINGER, 1955, 1964 a, b; SEIFERT und JUNGE-HÜLSING, 1966; SCHÄFER, 1968). Auf herdförmige Lungenverkalkungen ohne allgemeine Elektrolytverschiebung und besondere Formen der Kalkablagerungen in den Lungen (Mikrolithiasis alveolaris pulmonum, Corpora amyacea u.a.) soll im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden (SCHÄFER, 1968).

Experimentelle Lungencalcinosen wurden bisher durch Injektion von Calcium- und Phosphationen (KLEINMANN, 1928), nach calcium- und phosphatreicher Diät (RABL, 1923; BUTLER, 1924; DREYFUSS, 1927; KLEINMANN, 1928), nach hochdosierter Verabfolgung von Vitamin-D-Derivaten (KREITMAIR und MOLL, 1928; BRAND und HOLTZ, 1929; DEMOLE und FROMHERZ, 1929; HERZENBERG, 1929; SMITH und ELVOVE, 1929 u. a.), nach Parathormongaben (HUEPER, 1927; LEARNER, 1929; JAFFE u. Mitarb., 1931), durch Magnesiummangel (UNGLAUB u. Mitarb., 1959) oder durch Inhalation von eisenhaltigem Staub (GROSS u. Mitarb., 1960) erzeugt.

Neue Möglichkeiten zum Studium der Pathogenese von Lungenfibrosen ergeben sich aus der Konzeption von SELYE (1962) über die Calciphylaxie und der Erzeugung einer speziellen calciphylaktischen Gewebsreaktion in der Lunge. Nachdem in früheren Untersuchungen (SEIFERT und DREESBACH, 1966; SEIFERT, 1968) bereits kurz auf die Lungencalciphylaxie hingewiesen worden ist, sollen in dieser Arbeit vergleichende morphologische und biochemische Untersuchungsergebnisse dargelegt und folgende Fragen näher erörtert werden:

1. Lassen sich im Ablauf der calciphylaktischen Reaktion bestimmte, konstant wiederkehrende Stadien unterscheiden?
2. Welche Korrelationen bestehen zwischen dem Grad der Kalkablagerung in den Lungen und der Höhe des Blutcalcium- und Blutphosphatspiegels?
3. Welche geweblichen Reaktionen finden sich sowohl bei der calciphylaktischen Lungenfibrose als auch bei menschlichen Lungenfibrosen?

Untersuchungsgut und Methodik

Die Versuche wurden an 57, ca. 10 Wochen alten weiblichen Albinoratten durchgeführt, die während der Zeit des Experiments normales Standardfutter und Leitungswasser ad libitum erhielten.

Nachdem in Vorversuchen (SCHÄFER, 1968) zahlreiche Substanzen und calciphylaktische Versuchsanordnungen hinsichtlich ihres Effektes auf die Entwicklung einer Lungencalcinose geprüft worden waren, wurden folgende 3 Versuchsgruppen gebildet (s. Tabelle 1):

Gruppe 1. 25 Ratten wurden am 1. Versuchstag je 1 ml AT 10® (= 1 mg Dihydrotachysterin in öliger Lösung) mit der Magensonde verabfolgt¹. 24 Std später wurde nach kurzer

¹ AT 10® wurde freundlicherweise von den Farbenfabriken Bayer AG, Leverkusen, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1. *Übersicht über die Versuchsanordnung*

Gruppe	Applizierte Substanzen		Versuchs-dauer (Tage)	Tier-zahl	Mittleres Körpergewicht (g) 1. Versuchstag
	„Sensitizer“ 1. Tag	„Challenger“ 2. Tag			
1	1 ml AT 10® peroral	1 ml CrCl ₃ i.v.	1—32	25	112
2	1 ml AT 10® peroral	—	1—24	24	112
3	—	—	4—32	8	109

Äthernarkose die linke V. jugularis externa freigelegt und 10 mg CrCl₃ (aufgelöst in 1 ml Aq. dest.) langsam intravenös injiziert. Die Tötung der Tiere erfolgte 12 Std, 1—6, 10, 16, 29 und 32 Tage nach Versuchsbeginn.

Gruppe 2. 24 Ratten erhielten lediglich 1 ml AT 10® per Magensonde. Die Tiere wurden 6—24 Std, 2—9, 16 und 24 Tage nach Versuchsbeginn getötet.

Gruppe 3. 8 Ratten blieben als Kontrolle unbehandelt und wurden nach 4, 16, 20 und 32 Tagen getötet.

Bei allen Tieren wurde für die Dauer des Experimentes täglich das Körpergewicht bestimmt. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die Ratten durch Äthernarkose getötet. Die Fixation der Lungen erfolgte nach vorheriger Aufspritzung des Bronchialbaumes in Formolalkohol (1 Teil 40%iges, mit Pyridin neutralisiertes Formalin / 2 Teile 80%iger Alkohol). An Paraffinschnitten wurden — z. T. nach Entkalkung mit 5%iger Trichloressigsäure — folgende Färbungen vorgenommen: Hämatoxylin-Eosin, v. Gieson, Elastica nach WEIGERT, Astrablau (PEARSE, 1961), PAS-Reaktion, v. Kossa-Reaktion und Calciumnachweis nach VOIGT (1957) mit Naphtalhydroxamsäure.

Zur Untersuchung des Calcium- und Phosphatspiegels im Plasma benutzten wir Mikromethoden, die eine wiederholte Bestimmung bei ein und demselben Tier ermöglichen. Die erste Blutabnahme wurde unmittelbar vor der AT 10-Gabe vorgenommen. Weitere Entnahmen folgten 6, 12, 24 Std und 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 Tage später. Das Blut gewannen wir durch Punktions des retroorbitalen Venenplexus (NÖLLER, 1955) mit Hilfe zweier heparinisierter Glascapillarröhrchen, die zusammen ein Fassungsvermögen von ca. 120 µl besaßen. Anschließend wurde jeweils das eine Röhrchenende mit Kittsubstanz verschlossen und das Blut sofort zentrifugiert, nachdem es durch einen Eisenspan mit dem Heparin gut durchmischt worden war. Nach Durchsägung der Capillaren an der Zellplasmagrenze konnten die für die chemischen Ansätze notwendigen Plasmamengen aus dem einen Röhrchenteil unmittelbar abpipettiert werden. Die Calciumbestimmung wurde mit dem Flammenphotometer Eppendorf durchgeführt. Für den Ansatz benötigten wir 20 µl Plasma, das mit 1 ml Aq. bidest. verdünnt wurde. Als Bezugssubstanz dienten die ebenfalls im Verhältnis 1:50 verdünnten käuflichen Kompensations- und Standardlösungen. Für die Bestimmung des anorganischen Phosphats im Plasma benutzten wir die Mikromethode nach BÜTTNER (1966), an der wir nur geringfügige Änderungen in den Mengenverhältnissen vornahmen. Diese Methode beruht auf dem von FISKE und SUBBAROW (1925) erarbeiteten Prinzip. Als Ansatz waren auch hier 20 µl Plasma erforderlich.

Experimentelle Befunde

I. Gruppe 1 (AT 10 und CrCl₃)

1. Allgemeinreaktionen

Die Tiere zeigten starke Bewegungsarmut, struppiges Fell und schlaffen Muskeltonus, außerdem Freßunlust und zeitweilig starken Durchfall. Regelmäßig kam es zu einem starken Gewichtsverlust, der bereits 6 Std nach der AT 10-Gabe

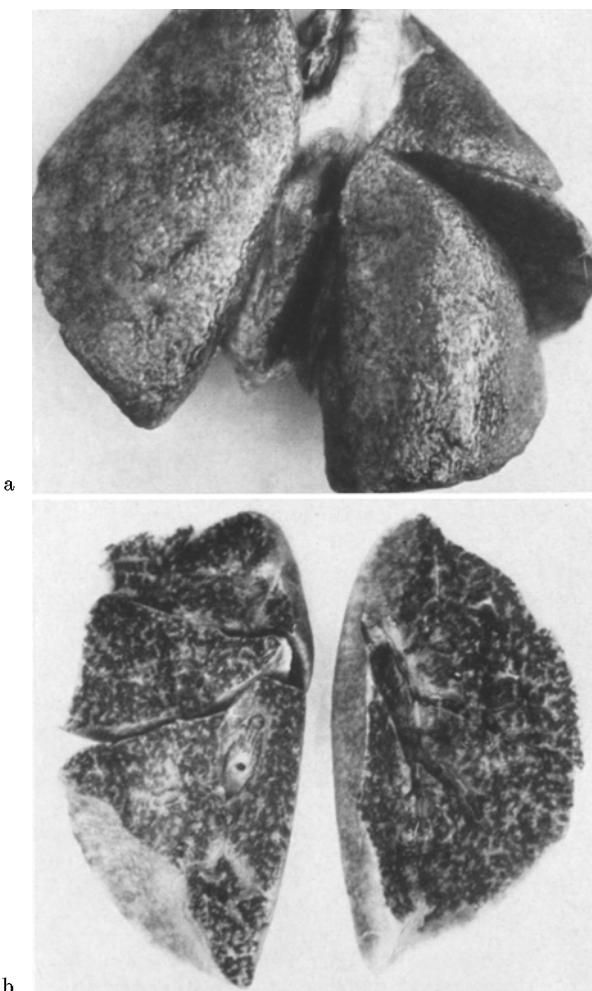


Abb. 1a u. b. Interstitielle Lungengerüstverkalkung (Versuchsgruppe I, 6. Versuchstag).
a Frischpräparat. Graue, netzartige Felderung der Oberfläche mit herdförmigen Verdichtungen.
b Schnittfläche derselben Lunge nach Inkubation in Silbernitrat. Schwarze Anfärbung der dicht nebeneinanderliegenden Kalkherde

einsetzte und nach 5—7 Tagen besonders deutlich im Vergleich zu den Kontrolltieren war. Bei einigen Tieren entwickelte sich eine Cyanose. 25% der Tiere verstarben spontan, wobei der Gipfelpunkt der Mortalität 5—8 Tage nach Versuchsbeginn lag.

2. Makroskopischer Lungenbefund

Makroskopische Veränderungen sind ab 5. Versuchstag deutlich zu beobachten. Nach Eröffnung des Thorax kollabieren die Lungen kaum, sondern besitzen eine auffallend derbe Konsistenz. An der Oberfläche finden sich graue netzartige Felderungen mit herdförmigen Verdichtungen (Abb. 1a). Auf der Schnittfläche bietet sich das Bild einer Bimssteinlunge mit feinstreifiger Gerüst-

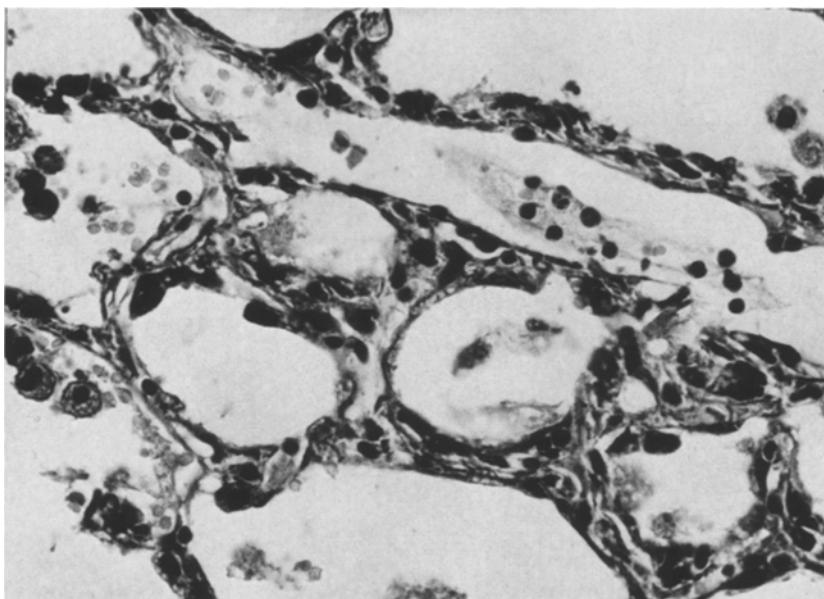


Abb. 2. Alveolargerüstveränderungen in der Mineralisationsphase (Versuchsgruppe 1, 10. Versuchstag). Schwellung der Alveolarepithelien, Aufquellung und Zellproliferation in den Alveolarwänden. H.-E., Vergr. 400fach

sklerose. Nach Inkubation in 5 %iger Silbernitratlösung heben sich die verkalkten Bezirke durch ihre schwarze Farbe deutlich von der Umgebung ab (Abb. 1 b). Die Verkalkung erstreckt sich über die gesamte Schnittfläche mit Bevorzugung der Obergeschosse.

3. Pathohistologische Veränderungen

Nach der Lokalisation der Kalkablagerungen lassen sich Veränderungen an den Alveolarwänden, den Bronchien und Lungenvenen unterscheiden. In den Lungenarterien treten dagegen keine Verkalkungen auf.

a) *Alveolargerüst*. Die diffus über die Lungenlappen verstreuten Verkalkungsherde sind besonders deutlich in den Obergeschossen ausgebildet und fehlen oft in den Alveolarwänden, die unmittelbar unter der Pleura oder dicht neben den Bronchien und Lungenvenen liegen. Im Ablauf der calciphylaktischen Reaktion lassen sich drei Phasen unterscheiden, nämlich eine Initialphase, eine Mineralisationsphase und eine fibrotische Umbauphase.

Die *Initialphase* umfaßt die ersten Stunden nach der Chromchloridinjektion. Die Kerne der Alveolarepithelien und Capillarendothelien sind vergrößert. Die alveolo-capillären Membranen sind geschwollen und zeigen bei dem Nachweis von Calcium nach VOIGT eine diffuse Imprägnation mit Calciumgranula. Gleichzeitig kommt es zu einer mäßigen Desquamation von Alveolarphagocyten in die Lüftung der Alveolen.

Die *Mineralisationsphase* (Abb. 2—4) umfaßt etwa die ersten 10 Versuchstage und ist durch eine Aktivierung der epithelialen sowie mesenchymalen Zellelemente in den Alveolarwänden, eine zunehmende Calcinose und Veränderungen des Faser-

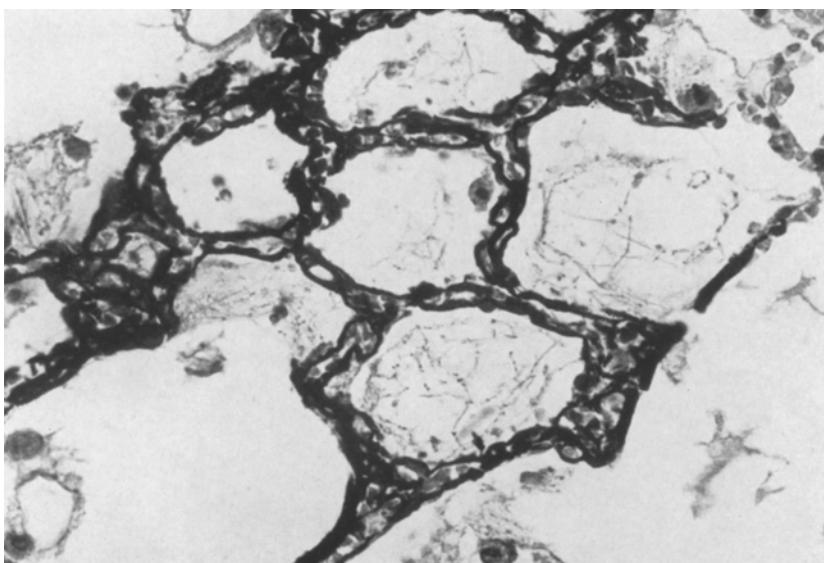


Abb. 3. Bandförmige Verkalkung der Alveolarmembranen (Versuchsgruppe 1, 9. Versuchstag). Kossa-Reaktion. Vergr. 380fach

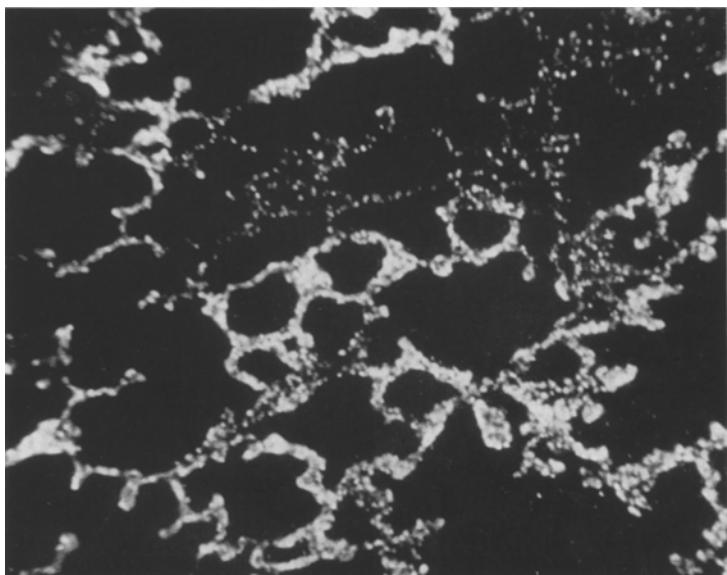


Abb. 4. Granuläre und bandförmige Lungengerüstverkalkung (Versuchsgruppe 1, 5. Versuchstag). Calciummethode nach VOIGT (polar.). Vergr. 100fach

gerüstes gekennzeichnet. Die Kerne der Alveolarepithelien, Fibroblasten und Alveolarmakrophagen schwellen weiter an (Abb. 2). Herdförmig finden sich auch Proliferationen von Fibroblasten und Histiozyten sowie vermehrte Ansammlungen von Mucopolysacchariden, so daß sich die Basalmembranen der Capillaren und die Umgebung elastischer Fasern bei der PAS-Reaktion verbreitert darstellen

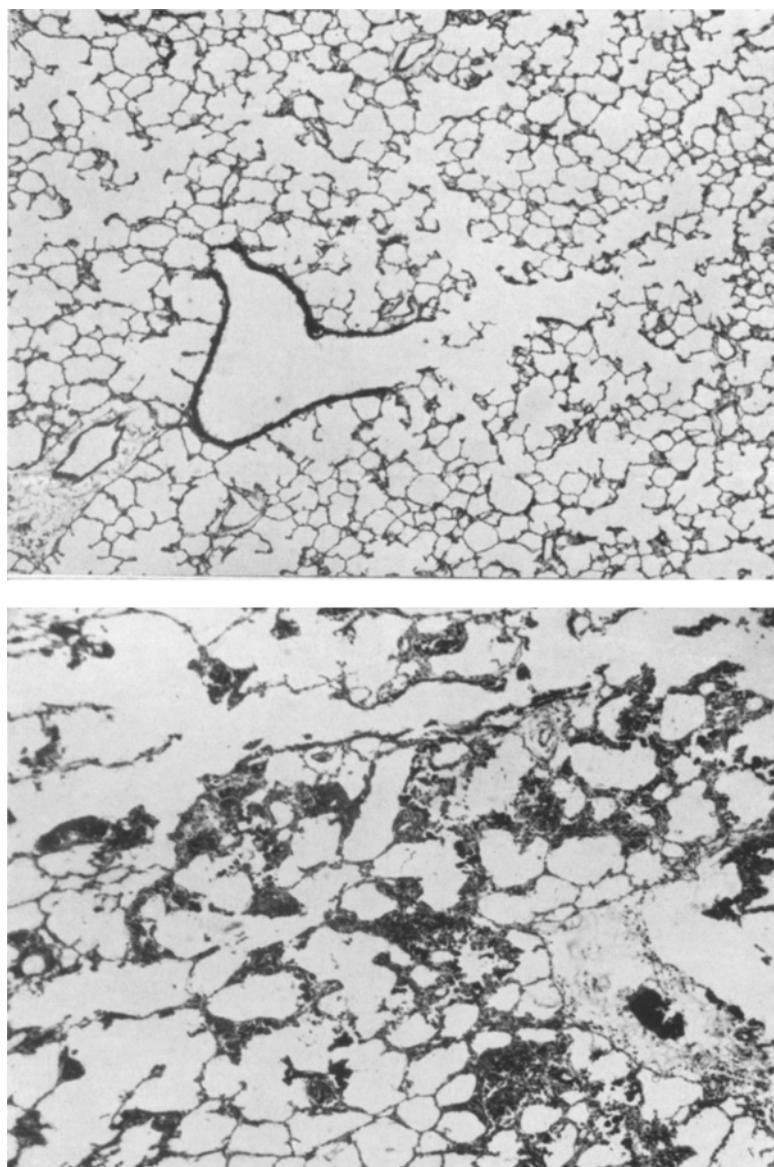


Abb. 5. Fibrocystischer Lungenumbau in der fibrotischen Umbauphase (Versuchsgruppe 1, 29. Versuchstag). Normale Lungenstruktur (Kontrolltier, obere Bildhälfte) und calciphylaktische Lungenfibrose (untere Bildhälfte). H.-E., Vergr. 40fach

lassen. Die elastischen Fasern zeigen eine beginnende Destruktion mit herdförmiger Fragmentation und Verklumpung. Die ersten Kalkablagerungen erfolgen in granulärer Form vorwiegend entlang den elastischen Fasern und den Basalmembranen der Capillaren (Abb. 3), daneben auch ungeordnet entlang den interstitiellen Septen und um proliferierende Fibroblasten. In den folgenden Tagen nimmt die Intensität der Verkalkung zu, wobei die disseminierten kleinen

Mineralisationsherde zu größeren Mineralisationszentren zusammengelagert werden. Es entstehen homogene Kalkbänder im Bereich inkrustierter elastischer Fasern und Basalmembranen (Abb. 4). Der Verkalkungsprozeß erreicht nach 6 Tagen ein Maximum. Parallel damit geht die Zunahme PAS-positiver Substanzen als Verkalkungsmatrix, während zu diesem Zeitpunkt saure Mucopolysaccharide mittels der Astrablaufärbung nicht vermehrt nachweisbar sind. Trotz der Mineralisation ist die Lungengerüststruktur insgesamt noch erhalten,

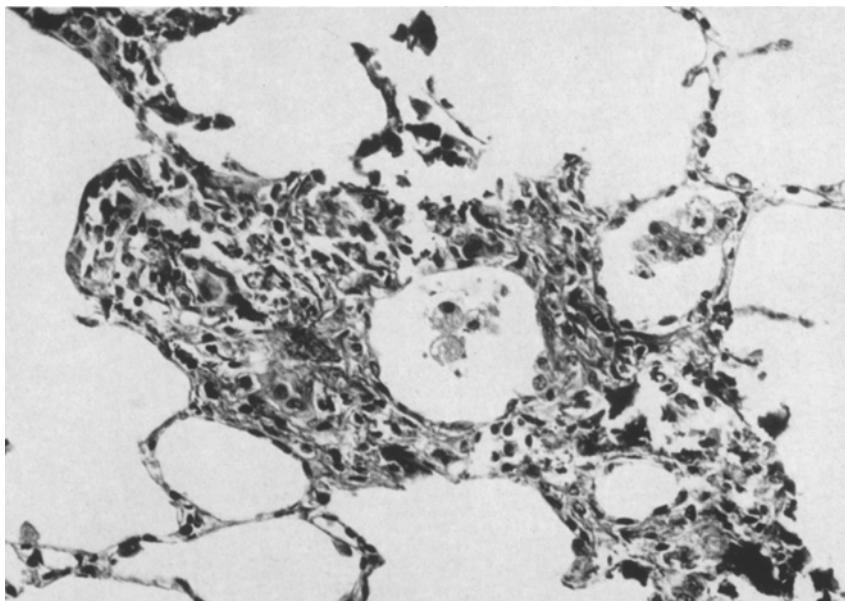


Abb. 6. Fibrotische Umbauphase (Versuchsgruppe 1, 16. Versuchstag). Verbreiterung des Lungeninterstitium durch Kalkablagerung und Zellproliferation. PAS-Reaktion.
Vergr. 250fach

wobei sich das Bild einer starren Lunge mit weiten, gleichsam in Inspirationsstellung verbliebenen Alveolen bietet.

Die *fibrotische Umbauphase* (Abb. 5—9) setzt in der 2. Versuchwoche ein und führt zu einem progressiven Gerüstumbau (Abb. 5), der mit exsudativen und proliferativen Vorgängen an den Alveolen verbunden ist. Nach einem flüchtigen exsudativen Stadium mit intraalveolärem und interstitiellem Ödem stehen Zell- und Faserproliferationen sowie Vermehrungen der Mucopolysaccharide im Vordergrund, so daß allmählich eine Lungengerüstveränderung nach Art einer fibrocytischen Wabenlunge resultiert. Ähnlich wie bei einer interstitiellen Pneumonie bzw. Alveolitis treten Infiltrate aus Lymphocyten, Plasmazellen, Fibroblasten und Histiocyten auf (Abb. 6). Sie umschließen die verkalkten Strukturen (Abb. 7) und engen die Alveolarlichtungen vom Rand her ein. Die Wände der Alveolargänge werden von verbreiterten und stark verkalkten Septen begrenzt, die nach der Lichtung zu von einer flachen bis kubischen Zellschicht überkleidet werden und im Inneren neugebildete Capillaren enthalten, während ehemalige Capillaren durch Verkalkung obliteriert sind. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich mittels der

Astrablaufärbung vermehrt saure Mucopolysaccharide nachweisen, die vor allem in der Nachbarschaft von aktivierten Fibroblasten angeordnet sind. Im weiteren Verlauf treten Riesenzellen (Abb. 8 und 9) auf, die in der 3. Versuchswoche besonders deutlich und reichlich zu beobachten sind. Sie liegen meist neben größeren Kalkpartikeln oder Bruchstücken elastischer Fasern, wobei sie das Fremdmaterial mit ihrem Cytoplasma umschließen, während die Zellkerne in der Regel hufeisenförmig gegenüber dem Resorptionspol der Zelle angeordnet sind.

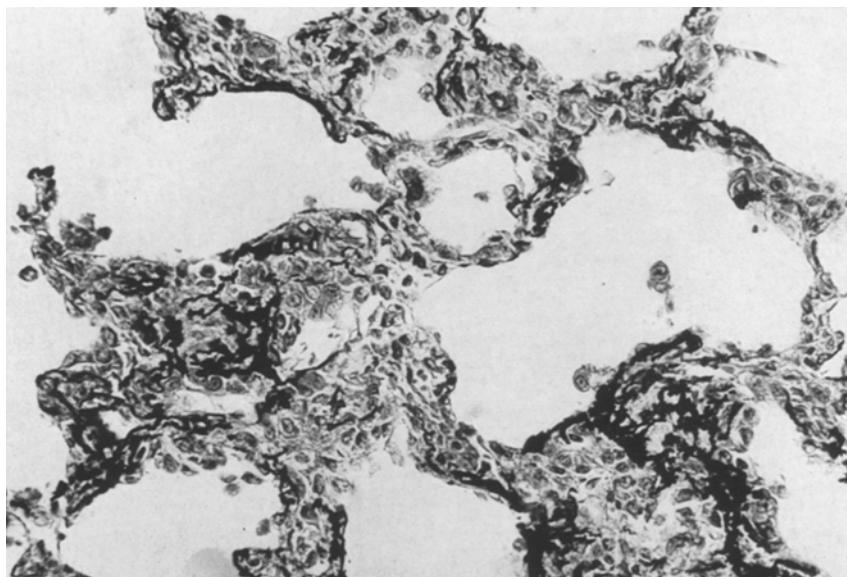


Abb. 7. Interstitielle Zellproliferation und Calcinose (Versuchsgruppe 1, 16. Versuchstag). Kossa-Reaktion. Vergr. 240fach

Neben den vielkernigen Riesenzellen finden sich 2—3kernige Makrophagen. Die bei der Astrablaufärbung tingierten sauren Mucopolysaccharide liegen meist in unmittelbarer Nachbarschaft der Riesenzellen und den Randsäumen der Verkalkungsmatrix, während mit der PAS-Reaktion die Kalkschollen diffus angefärbt werden. In der 5. Versuchswoche bietet sich das Bild einer interstitiellen Lungenfibrose mit kollagener Faserbildung in den verdickten Alveolarwänden und Septen, einer Rarefizierung des Lungengerüstes mit Schwund an Capillaren und elastischen Fasern und Ausbildung wabiger Hohlräume inmitten des erstarrten Lungengerüstes. Durch die Riesenzellen ist es zu diesem Zeitpunkt zu einer partiellen Auflösung der Kalkherde gekommen. Die Zellproliferation ist mit einer starken Faserneubildung verbunden.

b) Bronchialsystem. Die calciphylaktische Reaktion spielt sich besonders an den großen und mittleren Bronchien sowie an der Trachea ab. Hauptorte der Verkalkung sind nicht die bei der Ratte nur extrapulmonal vorhandenen Knorpelspannen, sondern die Fasern der Lamina propria und Lamina submucosa (Abb. 10). Bei starken Kalkablagerungen greift die Calcinose auch auf das elastische und kollagene Fasergewebe der Lamina fibrocartilaginea über. Die Verkalkung nimmt mit der Dicke der Lamina propria und Muskulatur nach den kleineren Bronchien

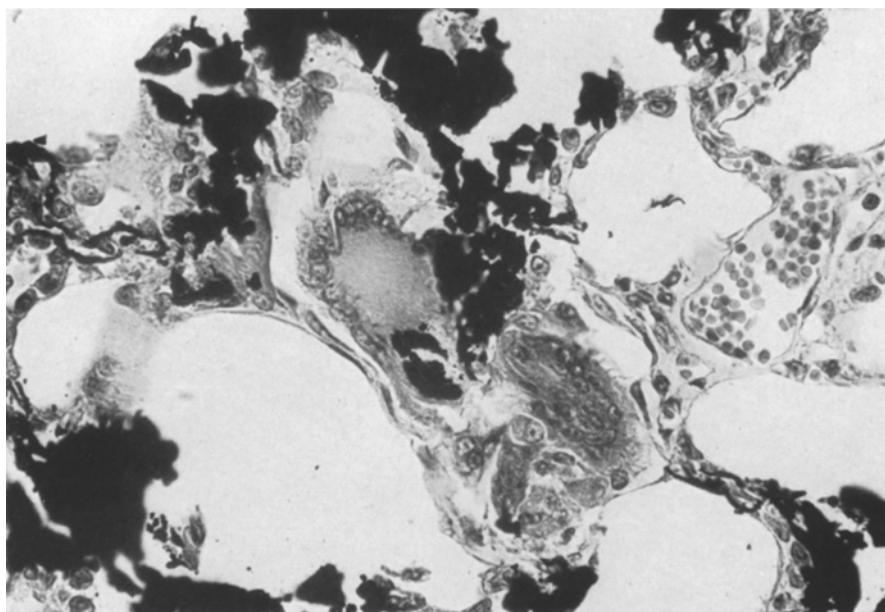


Abb. 8. Fremdkörperriesenzellen mit Resorption von Kalkschollen (Versuchsgruppe 1, 16. Versuchstag). Kossa-Reaktion. Vergr. 400fach

ab und fehlt in den terminalen Bronchioli. Die der Pulmonalarterie unmittelbar benachbarte Wandseite der Bronchien ist meist unverkalkt. Der phasenförmige Reaktionsablauf der Verkalkung entspricht den Stadien der Alveolargerüstcalcinose. In der Umgebung der verkalkten, plumpen und unscharf begrenzten Fasern lässt sich eine Vermehrung PAS-positiver Substanzen beobachten. Im Gegensatz zu den Alveolarveränderungen sind die verkalkten elastischen Fasern bei der Astrablaufärbung tingierbar. Durch die Kalkinkrustation der Lamina propria treten degenerative Veränderungen an den Schleimhautepithelien, jedoch keine Plattenepithelmetaplasien auf. Unter zunehmender Infiltration durch Fibroblasten, Histiocyten, Riesenzellen und Mastzellen kommt es zu einer Resorption der Kalkmassen und einer Vermehrung der sauren Mucopolysaccharide. In der 5. Versuchwoche ist zwischen Kalkmassen und Schleimhautepithel eine neue Bindegewebsschicht entwickelt.

c) Lungenvenen. Ebenso wie in den Bronchien nimmt der Kalkgehalt in den Lungenvenen mit dem Querschnitt ab, so daß die kleinen Venen völlig kalkfrei sind. Die Kalkablagerung (Abb. 10) erfolgt bevorzugt in den inneren Wandschichten der Venen, die auf diese Weise einen homogenen Kalkzyylinder um die Venenlichtung bilden können. Nur gelegentlich greift die Verkalkung auf die übrigen Wandschichten sowie auf kleinere angrenzende Gefäße über. Initial finden sich Schwellungen der Endothelzellen, Endotheldefekte und Intimaverquellungen. Parallel mit der Aktivierung der Fibroblasten geht eine Vermehrung von PAS-positivem Material. Die Mineralisation erfolgt vorwiegend entlang den elastischen Fasern der Intima. Bei Mitbeteiligung der Adventitia ist auch dort der Kalk an kollagenen und elastischen Fasern abgelagert. In der Media, die bei der Ratte

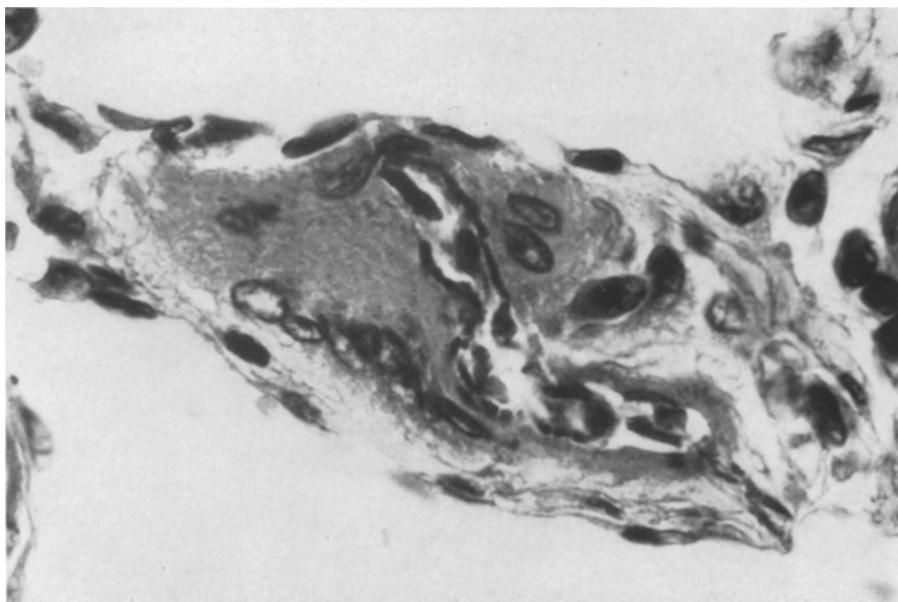


Abb. 9. Phagocytose von verkalkten Faserresten in Fremdkörperriesenzellen einer Alveolarwand (Versuchsgruppe 1, 29. Versuchstag). H.-E., Vergr. 1000fach

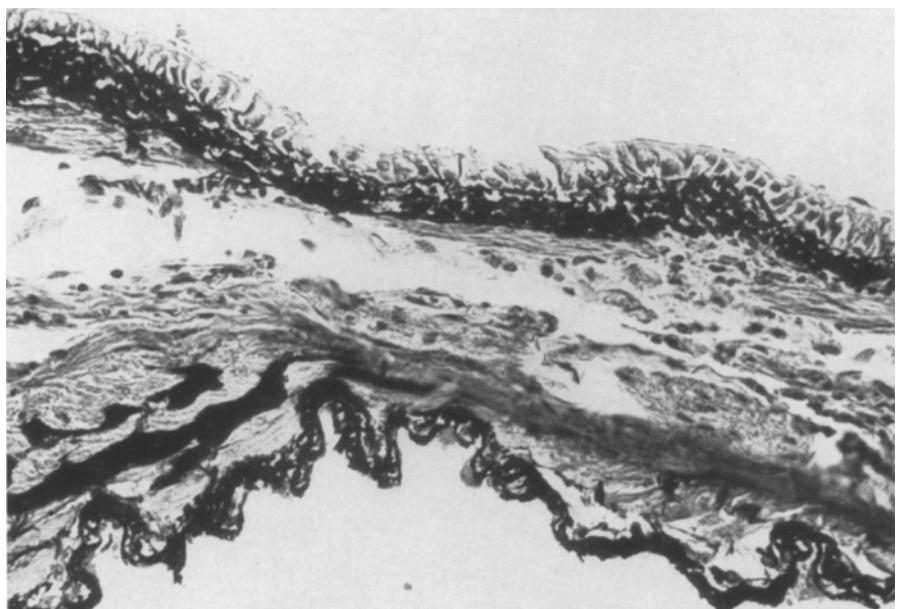


Abb. 10. Bandförmige Calcinose der Membrana propria eines Bronchus (oberer Bildteil) und der elastischen Fasern einer Lungenvene (unterer Bildteil; Versuchsgruppe 1, 6. Versuchstag). Kossa-Reaktion. Vergr. 250fach

von Herzmuskulatur gebildet wird (POLICARD u. Mitarb., 1959), lagern sich die Kalksalze entlang den Bindegewebsscheiden der Muskelzellen ab. Vereinzelt lassen

sich auch intracelluläre Kalkablagerungen nachweisen. Im weiteren Ablauf der calciphylaktischen Reaktion wird durch eine subendotheliale Bindegewebswucherung die innere Venenwand stark zerklüftet. Diese Veränderungen und auch die Intensität der Kalkablagerung bleiben bis zur 5. Versuchwoche bestehen. Riesenzellbildungen treten in der Venenwand nicht auf.

4. Blutchemische Befunde

a) *Plasmacalciumspiegel*. Die aus allen gleichzeitigen Einzelmessungen errechneten Mittelwerte (s. Abb. 11 und Tabelle 2) zeigen, daß bereits nach 12 Std

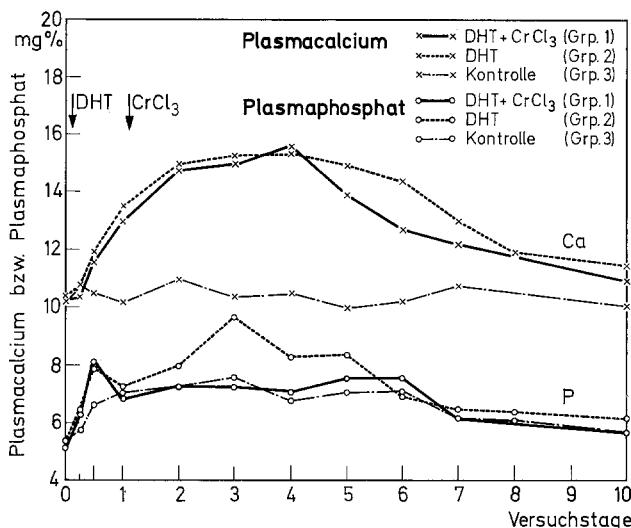


Abb. 11. Verlauf der Calcium- und Phosphatwerte im Plasma bei Versuchsgruppe 1, 2 und 3.
Standardabweichungen s. Tabelle 2.

Tabelle 2. Vergleichende Zusammenstellung der Calcium- und Phosphatwerte im Plasma (Mittelwerte und Standardabweichungen) bei Versuchsgruppe 1, 2 und 3

Tage nach Versuchs- beginn	Gruppe 1 <i>DHT + CrCl₃</i>)		Gruppe 2 (DHT)		Gruppe 3 (Kontrolltiere)	
	Calcium	Phosphat	Calcium	Phosphat	Calcium	Phosphat
0	10,2 ± 0,4	5,1 ± 0,4	10,3 ± 0,5	5,1 ± 0,4	10,1 ± 0,8	5,3 ± 0,5
1/4	10,3 ± 0,5	6,3 ± 0,4	10,7 ± 0,7	6,4 ± 0,4	10,7 ± 0,7	5,7 ± 0,4
1/2	11,5 ± 0,6	8,0 ± 0,4	11,8 ± 0,6	7,9 ± 0,7	10,4 ± 0,7	6,6 ± 0,5
1	12,9 ± 1,0	6,8 ± 0,5	13,4 ± 0,7	7,2 ± 0,3	10,1 ± 0,5	7,0 ± 0,6
2	14,8 ± 1,3	7,2 ± 1,0	14,8 ± 1,2	7,9 ± 0,9	10,9 ± 0,2	7,2 ± 0,3
3	14,9 ± 1,1	7,2 ± 1,0	15,2 ± 1,2	9,6 ± 1,7	10,3 ± 0,5	7,5 ± 0,4
4	15,4 ± 1,6	7,0 ± 1,1	15,3 ± 0,9	8,2 ± 1,3	10,4 ± 0,6	6,7 ± 0,7
5	13,8 ± 1,6	7,5 ± 0,5	14,8 ± 1,7	8,3 ± 1,9	9,9 ± 0,4	7,0 ± 0,8
6	12,6 ± 1,3	7,5 ± 0,7	14,3 ± 1,5	6,9 ± 1,1	10,1 ± 0,5	7,0 ± 0,7
7	12,1 ± 1,9	6,1 ± 0,7	12,9 ± 1,4	6,4 ± 1,1	10,7 ± 0,7	6,1 ± 0,6
8	—	—	11,8 ± 0,5	6,3 ± 0,2	—	6,0 ± 0,6
10	10,8 ± 1,3	5,6 ± 1,0	11,3 ± 1,3	6,1 ± 0,6	9,9 ± 0,6	5,6 ± 0,5

die Calciumwerte von denen der Kontrolltiere abweichen. Nach 24 Std und unmittelbar vor der Challengergabe ist schon eine ausgeprägte Hypercalcämie zu verzeichnen, die nach 2—4 Tagen einen Gipfel von über 15 mg-% Calcium erreicht. Nach 10 Versuchstagen befindet sich der Calciumspiegel mit 11 mg-% noch immer im hochnormalen Bereich.

b) *Plasmaphosphatspiegel*. Die Veränderungen des anorganischen Phosphatspiegels sind weniger deutlich. 12 Std nach Versuchsbeginn ist der Phosphatspiegel gegenüber Kontrolltieren signifikant erhöht (s. Abb. 11 und Tabelle 2). Nach 24 Std und unmittelbar zum Zeitpunkt der Challengergabe sind die Phosphatwerte zum Normbereich abgesunken und verbleiben dort.

c) *Relation zwischen Calcinoesgrad und Calciumphosphatindex*. Im Hinblick auf die Frage einer Korrelation zwischen Stärkegrad der Verkalkung und Abweichungen im Mineralstoffwechsel wurde die Intensität der Lungencalcinose jedes Tieres mit den Maximalwerten des Calcium- und Phosphatspiegels und dem größten Calciumphosphatprodukt verglichen. Danach bestehen Korrelationen nur zwischen Calcinoesgrad und Calciumspiegelerhöhung, nicht dagegen zur Höhe des Phosphatspiegels oder zum Calciumphosphatprodukt.

II. Gruppe 2 (AT 10)

Die *Allgemeinreaktionen* entsprechen denen der Gruppe 1, allerdings in deutlich abgeschwächter Intensität und mit geringerer Konstanz. Desgleichen kommt es zu einer *Lungencalcinose*, deren Stärkegrad bei den einzelnen Tieren sehr unterschiedlich ausfällt. Die Kalkherde sind kleiner, liegen weiter auseinander und kommen weniger konstant vor. Die Lokalisation der Verkalkung entspricht in den Grundzügen der Gruppe 1, wobei die Alveolarwände und die Lamina propria sowie Lamina submucosa der großen Bronchien stärker mineralisiert sind als das subendotheliale Fasergewebe der großen Venen. Ein Unterschied besteht jedoch darin, daß mitunter auch die elastischen Fasern der Lungenarterien verkalkt sind und in der Media dieser Arterien vermehrt Mucopolysaccharide nachweisbar werden. Die Phasen der Mineralisation entsprechen denen der Gruppe 1. Allerdings erfolgt der Mineralisationsprozeß nicht so rasch, so daß die einzelnen Stadien nicht so scharf voneinander abgrenzbar sind. Die Kalkimprägnation der Fasern ist abgeschwächt, die Riesenzellbildung geringer und der fibrotische Lungenumbau weniger deutlich.

Der Verlauf der *Plasmacalciumkurve* nach alleiniger Einwirkung von AT 10 mit einem Hypercalcämiegipfel nach 2—4 Tagen ist mit den Meßwerten der 1. Gruppe weitgehend identisch. Die Untersuchung des *Phosphatspiegels* ergibt insofern ein unterschiedliches Bild, als zwar nach dem initialen Anstieg die Werte nach 24 Std zur Norm zurückkehren, dann jedoch nach 2—4 Tagen ein zweiter hyperphosphatämischer Gipfel auftritt, dessen Höhe sogar über den Werten des 1. Versuchstages liegt (s. Abb. 11 und Tabelle 2). Außerdem ergibt die Korrelationsuntersuchung zwischen Calcinoesgrad und Calciumphosphatindex eine positive Korrelation aller Meßwerte. Die Tiere mit den stärksten Lungenverkalkungen haben zugleich die höchsten Calcium- und Phosphatwerte und das größte Calciumphosphatprodukt.

III. Gruppe 3

Die Tiere der Kontrollgruppe nehmen während des Versuches trotz der zahlreichen Blutentnahmen an Länge und Gewicht deutlich zu. Spontane Verkalkungen treten nicht auf, abgesehen von einzelnen kleinen Kalkeinlagerungen in die Tracheal- und Bronchialknorpel. Bei einzelnen Kontrolltieren, die mit AT 10-Tieren in einen Versuchskäfig gebracht worden waren, kam es zu passageren Hypercalciämien und Hyperphosphatämien. Dieses Verhalten ist auf die Koprophagie und die Aufnahme von nicht resorbiertem AT 10 zurückzuführen, da bei Tieren, die in Stoffwechselkäfigen gehalten worden waren, keine derartigen Mineralstoffwechselveränderungen zu beobachten waren.

Diskussion

Die calciphylaktische Lungenfibrose zeigt einen dreiphasigen Ablauf. Die zeitlich aufeinander folgenden Stadien lassen sich als Initial-, Mineralisations- und Umbauphase definieren und sind durch eine Reihe geweblicher Merkmale gekennzeichnet.

In der *Initial- und Mineralisationsphase* stehen Permeabilitätssteigerung, Zellaktivierung sowie Faser- und Grundsubstanzveränderungen des Lungengerüstes im Vordergrund. Die durch Dihydrotachysterin ausgelöste Permeabilitätssteigerung (GERLACH und THEMANN, 1965a) geht mit einer Schwellung und Proliferation der Endothelzellen sowie einer Aufquellung des perivasalen Gewebes einher. An den Lungenvenen finden sich außerdem — ähnlich wie bei der calciphylaktischen Arteriopathie (SEIFERT und DREESBACH, 1966) — Endotheldefekte. Durch die Permeabilitätssteigerung wird der Durchtritt des Chromchlorids als Challenger in den extravasalen Raum begünstigt. Die gesteigerte Stoffwechselaktivität in den späteren Verkalkungszonen geht aus der Kernschwellung der Fibroblasten, Endothelzellen und Alveolarepithelien hervor und findet eine Parallele in dem Nachweis eines erhöhten S³⁵-Einbaues (SEIFERT und JUNGE-HÜLSING, 1966) sowie einer vermehrten Inkorporation von radioaktivem Hydroxyprolin und Leucin (GERLACH und THEMANN, 1965b) in verkalkenden Gewebsbezirken. Die Stoffwechselacceleration, die auch mit einer gesteigerten Bildung von Protofibrillen und Mucopolysacchariden einhergeht, entspricht einer unspezifischen Mesenchymreaktion (HAUSS und JUNGE-HÜLSING, 1961). Darüber hinaus sind im Zusammenhang mit der calciphylaktischen Mesenchymaktivierung eine DHT-bedingte aktive celluläre Ionenverschiebung (GERLACH und THEMANN, 1965a) und eine örtliche aktive Zerstörung von Verkalkungsinhibitoren zu diskutieren. Als solche Inhibitoren kommen z.B. Polyphosphate (FLEISCH und BISAZ, 1962) und die kürzlich von HOWARD u. Mitarb. (1967) entdeckten und isolierten Hexapeptide in Betracht.

Die *Mineralisation* erfolgt sowohl entlang den Fasern als auch ungerichtet in der Grundsubstanz des Lungengerüstes. SCHONER (1964) mißt den Mucopolysaccharidveränderungen eine entscheidende Bedeutung für die Lungenverkalkung bei. SELYE u. Mitarb. (1964) schlossen aus histochemischen Reaktionen im Ablauf der Calciphylaxie, daß die mit dem Challenger beladene Grundsubstanz zuerst Phosphat anziehe und sekundär Calcium anlagere. SPEER und URIST (1965) nahmen dagegen an, daß verschiedene polyvalente Metallionen eine lyotrope Alteration des Bindegewebes herbeiführen. Im Laufe dieses Prozesses werden

nach dieser Auffassung die Metallionen jeweils zwischen mehrere der an den Faserproteinen freigewordenen Carboxylgruppen gebunden und später, durch die gesteigerte Durchflutbarkeit des Gewebes und die Hypercalcämie begünstigt, gegen endogene Calciumionen ausgetauscht. In der Folge kann die Verkalkung nach Art einer Kettenreaktion mit Phosphatanlagerung und Apatitausfall weiterlaufen (URIST und ADAMS, 1966). In Vorversuchen konnten wir — ähnlich wie GABBIANI und TUCHWEBER (1963) — nachweisen, daß bei Verwendung von Eisen als Challenger eine deutliche räumliche Parallelität zwischen Eisen- und Kalkablagerung besteht. Die Hypothese, daß Chromchlorid als Challenger das Lungengerüst für die Nucleation von Apatitkristallen aktiviert und durch seine lytropen Eigenschaften die initiale Calcium-Boosterung anbahnt, findet eine weitere Ummauerung in den Veränderungen der Fasern und Grundsubstanz im Lungeninterstitium bei der calciphylaktischen Lungenfibrose. Die kollagenen und elastischen Fasern zeigen eine Aufquellung, Aufsplitterung und Verklumpung. Die veränderte Färbarkeit der Grundsubstanz bei der PAS-Reaktion und Astrablaufärbung spricht für eine Entmischung, Depolymerisierung und auch Neubildung von Mucopolysacchariden. Bis zum 6. Versuchstag nimmt der Verkalkungsgrad kontinuierlich zu, wobei die Kalkgranula zu homogenen Kalkspangen konfluieren. Die Bildung größerer Kalkschollen kann sowohl durch ein spontanes Wachstum nucleationsfähiger Apatitkristalle nach physikalischen Gesetzen als auch durch einen fortschreitenden lytropen Prozeß erfolgen, bei dem Challengersubstanz nach dem Austausch mit Calcium für angrenzende Gewebsbezirke zur Verfügung steht. Für ein spontanes Kristallwachstum jedoch wäre wiederum eine fortlaufende Inhibitorzerstörung Voraussetzung (FLEISCH u. Mitarb., 1966).

Die *calciphylaktische Umbauphase* ist durch Kalkresorption und interstitielle Fibrosierung gekennzeichnet. Das Granulationsgewebe enthält zahlreiche Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen vom Fremdkörperotyp, die sowohl Kalkpartikel als auch Reste aufgelöster elastischer Fasern phagozytiert haben. Der Vorgang der Elasticodiarose ist von zahlreichen anderen Krankheiten bekannt, die mit einer Destruktion von elastischem Fasergewebe verbunden sind (BECKER, 1954). An den Kalkschollen, die von Riesenzellen abgebaut werden, sind die sauren Mucopolysaccharide vermehrt nachweisbar. Außerdem kommt es zu einer starken Neubildung kollagener Fasern innerhalb der Alveolarwände und Lungensepten, so daß das Bild einer interstitiellen Lungenfibrose resultiert. Der Umbauprozeß führt zu einer Erstarrung der Lungengerüststruktur mit erschwerter Ventilation, Diffusion und Perfusion. Im Endstadium finden sich Veränderungen, die auf Grund des Wechsels von emphysematösen Alveolarerweiterungen und fibrosierten Septen einer fibrocystischen Wabenlunge weitgehend entsprechen.

Neben der Pathogenese der calciphylaktischen Reaktion interessiert besonders die Frage, welche *Korrelationen* zwischen *Verkalkungsgrad* und *Blutcalcium-* sowie *Blutphosphatspiegel* bestehen. Die bisherigen Mitteilungen über Mineralverschiebungen nach Einwirkung von Dihydrotachysterin beruhen auf z.T. zeitlich gestaffelten Einzelmessungen (JEAN und MENDELL, 1962; MOSS und URIST, 1964; REMAGEN und OEFF, 1965; IRVING u. Mitarb., 1966). Mit der von uns verwandten Mikromethode war es dagegen möglich, fortlaufende Messungen des Calcium- und Phosphatspiegels am gleichen Tier vorzunehmen und die Meßwerte sowohl bei alleiniger Applikation von Dihydrotachysterin als auch bei zusätzlicher Ein-

wirkung von Chromchlorid zu vergleichen. Die in beiden Gruppen feststellbare deutliche *Hypercalciämie* beruht nach Bilanzuntersuchungen, die von REMAGEN und OEFF (1965) mit radioaktivem Calcium vorgenommen worden sind, nicht auf einer enteralen Resorptionssteigerung, sondern einem vermehrten Knochenabbau mit Vergrößerung des mobilen Calciumpools. Das Dihydrotachysterin scheint eine gewisse Depotwirkung zu besitzen, da sich der Calciumspiegel bei unseren Tieren 10 Tage nach der Applikation immer noch in hochnormalem Bereich befand. Im Gegensatz zu der hochgradigen und zeitlich klar umreißbaren Hypercalciämie sind die Veränderungen des *Phosphatspiegels* weniger deutlich. Die Phosphatwerte sind bereits normalerweise weniger konstant. Dies kommt auch darin zum Ausdruck, daß die Angaben der Literatur über Phosphatwerte bei Vitamin D-Intoxikation zwischen „erniedrigt“ und „erhöht“ schwanken (HÖVELS, 1965). MOSS und URIST (1964) konnten kein einheitliches Verhalten des Phosphatspiegels feststellen, JEAN und MENDELL (1962) fanden nach Dihydrotachysteringabe eine Hypophosphatämie bei anfänglicher kurzer Hyperphosphatämie. Wir beobachteten bei fortlaufenden Messungen am gleichen Tier nach Einwirkung von Dihydrotachysterin eine zweigipflige Hyperphosphatämiekurve. Der erste und besonders der länger andauernde und zugleich auch höhere zweite Gipfel der Phosphatwerte lagen signifikant oberhalb der Normwerte. Bei der calciphylaktischen Reaktion (Dihydrotachysterin und Chromchlorid) kam es jedoch nur zu einem einmaligen Anstieg der Phosphatwerte, an den sich eine Normalisierung des Phosphatspiegels ohne zweiten Gipelpunkt anschloß.

Für den unterschiedlichen Kurvenverlauf des Phosphatspiegels in der 1. und 2. Versuchsgruppe kann vorerst nur eine hypothetische Deutung versucht werden. Durch die langsam zunehmende Dihydrotachysterinwirkung werden in steigendem Maße Calcium und Phosphat aus dem Knochen gelöst und ins Blut abgegeben. Die langsame Steigerung des Plasmacalciumspiegels wird zunächst noch durch eine Hemmung der Epithelkörperchen aufgefangen: der Ausfall des Parathormons senkt die Phosphatausscheidung, und der Phosphatspiegel im Blut steigt das erste Mal an. Durch den zunehmenden Anstieg des Plasmacalciumspiegels bei funktioneller Ruhigstellung der Epithelkörperchen wird nun möglicherweise eine gesteigerte Sekretion von Thyreocalcitonin ausgelöst. Da das Thyreocalcitonin wie das Parathormon einen phosphaturischen Effekt hat (ZIEGLER und PFEIFFER, 1967), sinkt der Phosphatspiegel wieder in den Normbereich ab. Diese Normalisierung des Phosphatspiegels gelingt aber nur vorübergehend, da der phosphaturische Effekt des Thyreocalcitonins — verglichen mit dem des Parathormons — relativ schwach ist (ZIEGLER u. Mitarb., 1967). So ist die Thyreocalcitoninproduktion bei zunehmender Phosphatfreisetzung aus dem Knochen bald überfordert, und es kommt zu einem neuen zweiten Hyperphosphatämiegipfel. Bei den calciphylaktisch behandelten Tieren wird die Wirkung des Thyreocalcitonins in dieser Phase durch die starken Kalkausfällungen und die damit verbundene erhebliche Phosphatabwanderung ins Gewebe unterstützt. Beide Faktoren zusammen könnten die dihydrotachysterinbedingte erhöhte Phosphatfreisetzung aus dem Knochen auffangen und den Blutspiegel im Normbereich halten. Wenn diese Überlegungen stimmen, würde einer leichten Dihydrotachysterinintoxikation ein leicht erhöhter, einer mittelschweren ein normaler bis erniedrigter, einer schweren Intoxikation wiederum ein erhöhter Phosphatspiegel entsprechen.

Eine Korrelation zwischen *Calcinosegrad* und Erhöhung des *Calcium-* und *Phosphatspiegels* bestand nur nach alleiniger Einwirkung von Dihydrotachysterin, nicht dagegen in der Calciphylaxiegruppe, wo trotz verstärkter Lungencalcinose keine zusätzliche Erhöhung der Calciumwerte und sogar ein geringerer Anstieg des Phosphatspiegels im Vergleich zur Dihydrotachysteringruppe vorlag. Eine direkte Abhängigkeit zwischen Calcinosegrad und Mineralspiegel scheint somit nicht vorzuliegen. Es muß vielmehr angenommen werden, daß lokale Gewebsveränderungen für die Auslösung des Verkalkungsprozesses von entscheidender Bedeutung sind. Für diese Annahme sprechen eine Reihe anderer Beobachtungen. So fanden MATHIEU u. Mitarb. (1964) nach Vitamin D-Einwirkung bei Ratten gleich starke heterotope Kalkablagerungen sowohl bei Entfernung der Epithelkörperchen und normalem Calciumspiegel als auch bei intakten Epithelkörperchen und Hypercalcämie. Umgekehrt konnten JEAN und MENDELL (1962) bei Dihydrotachysteringaben durch gleichzeitigen Stress zwar die Calcinose, nicht jedoch die starken Mineralveränderungen im Serum verhindern. Ebenso kann durch Polyphosphat nur die Vitamin D-bedingte Aortenverkalkung blockiert, dagegen nicht der allgemeine Mineralstoffwechsel beeinflußt werden (IRVING u. Mitarb., 1966). Bei der Calcergie (SELYE, 1962) treten auch ohne allgemeine Veränderungen des Calcium- und Phosphatspiegels lokale Calcinosen auf. Verwiesen sei auf das Beispiel der Hautcalcinose nach Einwirkung von Kaliumpermanganat (SEIFERT und v. HENTIG, 1967). Offensichtlich sind komplexe anabole (aktive Inhibitorzerstörung, Matrixsynthese, aktiver Ionentransport) und katabole (Lyotropie) Prozesse am Ort der Gewebsverkalkung die Voraussetzungen für den Ablauf einer Kettenreaktion, wobei allerdings den allgemeinen Mineralstoffwechselverschiebungen im Plasma eine wesentliche unterstützende und fördernde Rolle zukommt.

Die *calciphylaktische Lungenfibrose* stellt ein geeignetes Modell zum Studium von Lungengerüstveränderungen dar, wie sie bei menschlichen Lungenfibrosen in ähnlicher Weise beobachtet werden können. Auf Fremdkörperriesenbildungen in der Lunge bei idiopathischer Hypercalcämie wurde 1955 von UEHLINGER hingewiesen. Die Lungenfibrosen bilden keine nosologische Einheit, sondern sind Folgezustände ätiologisch unterschiedlicher Lungenkrankheiten (MEESSEN, 1949; UEHLINGER und SCHOCH, 1957; GIESE, 1960; HARTUNG, 1964; SEIFERT, 1968). Das Lungengerüst kann auf Grund seiner Struktur nur bestimmte Reaktionsmuster aufweisen, die matrizenartig durchlaufen werden und zu bestimmten Fibrosierungstypen führen. Hierzu gehören exsudative Prozesse an der alveolo-capillären Membran (Alveolitis, Faserverquellungen, Endothelzellenschwellungen u.a.) und proliferative Vorgänge (Vermehrung von Mesenchymzellen, Fasern und Grundsubstanzen), die zu einer Verbreiterung der Alveolarwände, zur Lungenrestriktion mit Capillarschwund und zur Erstarrung des Lungengerüstes führen. Solche exsudativen und proliferativen Stadien finden sich sowohl bei den verschiedenen Formen menschlicher Lungenfibrosen (Strahlenfibrose, Hamman-Rich-Syndrom, Sklerodermie u.a.) als auch im Ablauf der calciphylaktischen Lungenfibrose.

Literatur

- BECKER, V.: Die Elasticodialese in Fremdkörperriesenzellen. Virchows Arch. path. Anat. **325**, 397 (1954).
- BRAND, T., u. F. HOLTZ: Beitrag zum Verlauf und zur Prognose der durch Überdosierung von Vitamin D-Lösungen erzeugten Krankheit. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **185**, 217 (1929).

- BÜTTNER, H.: Mikroliteranalysen. In: Handbuch der Kinderheilkunde, hrsg. von H. OPITZ und F. SCHMID, Bd. II/1, S. 860ff. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966.
- BUTLER, M.: Experimental calcification in mice. Proc. N. Y. path. Soc. **24**, 79 (1924).
- DEMOLE, V., u. K. FROMHERZ: Serumcalcium und Organverkalkungen unter der Wirkung von bestrahltem Ergosterin. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. **146**, 347 (1929).
- DREYFUSS, W.: Über den Kalkstoffwechsel im Tierversuch. Beitr. path. Anat. **76**, 254 (1927).
- FISKE, C. H., and Y. SUBBAROW: The colorimetric determination of phosphorus. J. biol. Chem. **66**, 375 (1925).
- FLEISCH, H., and S. BISAZ: Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. Amer. J. Physiol. **203**, 671 (1962).
- R. G. G. RUSSELL, and F. STRAUMANN: Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in Calcium homeostase. Nature (Lond.) **212**, 901 (1966).
- FRANKE, K.: Über Kalkmetastasen unter Berücksichtigung eines Falles mit excessiver Lungenverkalkung. Zbl. allg. Path. path. Anat. **100**, 472 (1960).
- GABBIANI, G., and B. TUCHWEBER: The role of iron in the mechanism of experimental calcification. J. Histochem. Cytochem. **11**, 799 (1963).
- GERLACH, U., u. H. THEMANN: (a) Elektronenmikroskopische Untersuchungen der metastatischen Calcifizierung. Klin. Wschr. **43**, 1262 (1965).
— — (b) Experimentelle und klinische Untersuchungen über die Calcifizierung von Geweben. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **71**, 520 (1965).
- GIESE, W.: Die Atemorgane. In: Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie, hrsg. von E. KAUFMANN und M. STAEMMLER, Bd. II/3, S. 1674ff. Berlin: W. de Gruyter & Co. 1960.
- Die allgemeine Pathologie der äußeren Atmung. In: Handbuch der allgemeinen Pathologie, hrsg. von F. BÜCHNER, E. LETTERER und F. ROULET, Bd. V/1, S. 402ff. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1961.
- Chronische Pneumonien. Beitr. Klin. Tuberk. **132**, 178 (1965).
- GROSS, P., M. L. WESTRICK, and J. M. MCNERNEY: A connective tissue disease with pulmonary fibrosis in guinea pigs. Arch. Path. **69**, 130 (1960).
- GROSSE, H.: Über zwei Fälle von Kalkmetastase bei Leukämie. Zbl. allg. Path. path. Anat. **100**, 187 (1960).
- HARTUNG, W.: Pathologie der Lungenfibrosen. Hippokrates (Stuttg.) **35**, 617 (1964).
- HAUSS, W. H., u. G. JUNGE-HÜLSING: Über die universelle unspezifische Mesenchymreaktion. Dtsch. med. Wschr. **86**, 763 (1961).
- HERZENBERG, H.: Studien über die Wirkungsweise des bestrahlten Ergosterins (Vigantol) und die Beziehungen der von ihm gesetzten Veränderungen zur Arteriosklerose. Beitr. path. Anat. **82**, 27 (1929).
- HÖVELS, O., u. D. REISS: Die Vitamin D-Intoxikation. In: Handbuch der Kinderheilkunde, Bd. IV, S. 427ff., hrsg. von H. OPITZ und F. SCHMID. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1965.
- HOWARD, J. E., W. C. THOMAS, L. M. BARKER, L. H. SMITH, and C. L. WADKINS: The recognition and isolation from urine and serum of a peptide inhibitor to calcification. Johns Hopk. med. J. **120**, 119 (1967).
- HUEPER, W. C.: Metastatic calcifications in organs of dog after injections of parathyroid extract. Arch. Path. Lab. Med. **3**, 14 (1927).
- IRVING, J. T., D. SCHIBLER, and H. FLEISCH: Effect of condensed phosphates on vitamin D-induced aortic calcification in rats. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **122**, 852 (1966).
- JAFFE, H. L., A. BODANSKY, and J. E. BLAIR: Fibrous osteodystrophy (osteitis fibrosa) in experimental hyperparathyroidism of guinea-pigs. Arch. Path. **11**, 207 (1931).
- JEAN, P., et P. MENDELL: Calcium et phosphore sériques au cours de la production d'une calcinose cutanée par un dérivé de la vitamine D. Rev. canad. Biol. **21**, 17 (1962).
- KLEINMANN, H.: Untersuchungen über die Bedingungen der Kalkablagerung in tierischen Geweben. Virchows Arch. path. Anat. **268**, 686 (1928).
- KREITMAIR, H., u. T. MOLL: Hypervitaminose durch große Dosen Vitamin D. Münch. med. Wschr. **75**, 637 (1928).
- LEARNER, A.: Calcium deposition in tissues of dogs and mice by aid of parathormone. J. Lab. clin. Med. **14**, 921 (1929).

- LUBARSCH, O., u. K. PLENZE: Kalkablagerungen. In: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie, Bd. III/3, S. 607ff., hrsg. von F. HENKE und O. LUBARSCH. Berlin: Springer 1931.
- MATHIEU, H., P. CUISINIER-GLEIZES, R. HABIB, H. DULAC, M. LACOSTE, E. GYRARD et P. ROYER: Action toxique de la vitamine D sans hypercalcémie chez le rat parathyroidectomisé. (Etude des lésions anatomiques.) *Path. et Biol.* **12**, 674 (1964).
- MEESSEN, H.: Über Lungencirrhose. *Beitr. path. Anat.* **110**, 1 (1949).
- MOSS, J., and M. R. URIST: Experimental cutaneous calcinosis. *Arch. Path.* **78**, 127 (1964).
- MULLIGAN, R. M.: Metastatic calcification. *Arch. Path.* **43**, 177 (1947).
- NÖLLER, H. G.: Die Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus. *Klin. Wschr.* **33**, 770 (1955).
- PEARSE, A. G. E.: Histochemistry. Theoretical and applied. London: Churchill 1961.
- POLICARD, A., A. COLLET et S. PREGERMAIN: La gaine myocardique des veines intrapulmonaires étudiée chez le rat au microscope électronique. *Bull. Micr. appl.*, Sér. **2**, 9, 5 (1959).
- RABL, C. R. H.: Zum Problem der Verkalkung. *Virchows Arch. path. Anat.* **245**, 542 (1923).
- REMAGEN, W., u. K. OEFF: Biochemisches und morphologisches Verhalten der Ratte bei Dihydrotachysterinbehandlung. *Z. ges. exp. Med.* **139**, 574 (1965).
- SCHÄFER, H.-J.: Zur Pathogenese der calciphylaktischen Lungenfibrose. Diss. Hamburg 1968.
- SCHONER, W.: Über die Bedeutung der Mukopolysaccharide für die Verkalkung der Lungenstruktur. *Ärztl. Forsch.* **18**, 1 (1964).
- SEIFERT, G.: Einteilung und Pathologie der Lungenfibrosen. 10. Tagung norddeutsche Tuberkulose-Gesellschaft (Hamburg 1967). Lübeck: Hansisches Verlagskontor (im Druck).
- , u. H. A. DREESBACH: Die calciphylaktische Arteriopathie. *Frankf. Z. Path.* **75**, 342 (1966).
- , u. O. v. HENTIG: Histochemische und elektronenoptische Befunde zur Pathogenese der experimentellen Hautcalcinose. *Beitr. path. Anat.* **135**, 75 (1967).
- , u. G. JUNGE-HÜLSING: Morphologische Aspekte bei extraossären Verkalkungsvorgängen. In: *Rheumatismus und Bindegewebe*, hrsg. von W. H. HAUSS und U. GERLACH (Der Rheumatismus, Bd. 38), S. 33ff. Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopff 1966.
- SELYE, H.: Calciphylaxis. Chicago: Chicago University Press 1962.
- P. L. CARUSO u. B. TUCHWEBER: Histochemische Studien über die Beteiligung der Mastzellen bei der Calciphylaxie. *Virchows Arch. path. Anat.* **337**, 538 (1964).
- SMITH, M. I., and E. ELVOVE: Action of irradiated ergosterol in rabbit. *Publ. Hlth Rep. (Wash.)* **44**, 1245 (1929).
- SPEER, D. P., and M. R. URIST: Experimental intracellular calcification of muscle. *Clin. Orthop.* **39**, 213 (1965).
- UEHLINGER, E.: Die pathologische Anatomie des Morbus Boeck. *Beitr. klin. Tbk.* **114**, 17 (1955).
- (a) Die Regulation des Kalziumstoffwechsels und primärer Hyperparathyreoidismus. *Münch. med. Wschr.* **106**, 685 (1964).
- (b) Hyperkalämie-Syndrom. *Münch. med. Wschr.* **106**, 692 (1964).
- , u. G. SCHOCK: Zur Diagnose und Differentialdiagnose der Lungenerüsterkrankungen: Entzündungen und Dystrophien. In: *Röntgendiagnostik. Ergebnisse 1952—1956*, hrsg. von H. R. SCHINZ, R. GLANNER und E. UEHLINGER. Stuttgart: Georg Thieme 1957.
- UNGLAUB, I., I. SYLLM-RAPOPORT u. I. STRASSBURGER: Pathologisch-anatomische Befunde bei experimentellem Magnesium-Mangel des Hundes. *Virchows Arch. path. Anat.* **332**, 122 (1959).
- URIST, M. R., and J. M. ADAMS: Effect of various blocking reagents upon local mechanism of calcification. *Arch. Path.* **81**, 325 (1966).
- VOIGT, G. E.: Ein neuer histotopochemischer Nachweis des Calciums (mit Naphthalhydroxamsäure). *Acta histochem. (Jena)* **4**, 122 (1957).
- WILKERSON, J. A.: Idiopathic infantile hypercalcemia, with subcutaneous fat necrosis. *Amer. J. clin. Path.* **41**, 390 (1964).
- ZIEGLER, R., B. LEMMER u. E. F. PFEIFFER: Über die Einwirkung von Thyreocalcitonin auf die Phosphaturie. *Klin. Wschr.* **45**, 34 (1967).
- , u. E. F. PFEIFFER: Thyreocalcitonin. *Dtsch. med. Wschr.* **92**, 613 (1967).

H.-J. SCHÄFER
Pathologisches Institut der Universität
2000 Hamburg 20, Martinistr. 52