

Zur Wirkung von Thyreocalcitonin auf die experimentelle Weichteilverkalkung*

E. ALTENÄHR, H.-J. SCHÄFER und C. A. WULFF

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

Eingegangen am 11. November 1969

Effect of Thyrocalcitonin on Experimental Soft Tissue Calcinosis

Summary. The influence of repeated injections of thyrocalcitonin on experimental calcinosis was investigated in 146 rats. Calcinosis was induced by dihydrotachysterol alone (1 mg/rat; stomach tube) or by dihydrotachysterol combined with injections of chrome-III-chloride (10 mg/rat; intravenously). In addition to that treatment other groups received 0.3 MRC units of thyrocalcitonin subcutaneously at intervals of 4 hours during the whole experiment. The animals were sacrificed on the 4th resp. on the 7th day of experiment.

Experimentally-induced soft tissue calcinosis was inhibited by thyrocalcitonin until the 4th day, but was not prevented completely. That inhibitory effect was not observed in animals sacrificed on the 7th day. Likewise thyrocalcitonin inhibited hypercalcemia induced by dihydrotachysterol only during the initial days of the experiment. Localization and distribution of calcinosis was not influenced by thyrocalcitonin. Electron microscopically, all groups showed interstitial calcinosis of the kidneys and calcareous deposits within renal tubular cells, the intracellular deposits lying in cytoplasmic vacuoles, in cytosomes, or free within the cytoplasm. Only during the initial days of the experiment was the ash calcium content of the kidneys lowered by thyrocalcitonin. The limited effect of thyrocalcitonin in inhibiting calcinosis and hypercalcemia is interpreted as an escape phenomenon. The findings suggest that this escape phenomenon becomes evident only in stimulated calcium metabolism.

Zusammenfassung. An 146 Ratten wurde die Wirkung wiederholter Thyreocalcitonin-Gaben auf experimentelle Weichteilcalcinosen untersucht.

Die Verkalkungen wurden durch Dihydrotachysterin (1 mg/Tier, Schlucksonde) allein oder durch Dihydrotachysterin und Applikation von Chrom-III-Chlorid (10 mg/Tier, i. v.) erzeugt. Weitere Versuchsgruppen erhielten zusätzlich zu dieser Behandlung während der gesamten Versuchszeit 4stündlich 0,3 MRC-Einheiten Thyreocalcitonin subcutan. Die Tiere wurden am 4. beziehungsweise am 7. Versuchstag getötet.

Die experimentell erzeugten Weichteilcalcinosen ließen sich bis zum 4. Versuchstag durch Thyreocalcitonin hemmen, jedoch nicht vollständig verhindern. Bei längerer Versuchsdauer war dagegen kein verkalkungshemmender Effekt des Thyreocalcitonin mehr feststellbar. Ebenso konnte die durch Dihydrotachysterin ausgelöste Hypercalciämie nur während der ersten Versuchstage durch Thyreocalcitonin gesenkt werden. Die Lokalisation und das Verteilungsmuster der Verkalkungen wurden durch Thyreocalcitonin nicht beeinflusst.

In der Niere wurden bei allen Versuchsgruppen neben interstitiellen Verkalkungen elektronenmikroskopisch auch intracelluläre Kalkablagerungen in den Tubulusepithelien nachgewiesen, und zwar in Cytoplasmavacuolen, in Cytosomen und frei im Cytoplasmaraum. Der Aschecaliumgehalt der Nieren war nur während der ersten Versuchstage durch Thyreocalcitonin erniedrigt. — Das Nachlassen der verkalkungshemmenden und hypocalciämischen Wirkung von Thyreocalcitonin wird als Escape-Phänomen aufgefaßt. Dieses Escape-Phänomen gegenüber Thyreocalcitonin wird offenbar nur bei stimuliertem Calciumstoffwechsel deutlich.

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Extraossäre Weichteilverkalkungen finden sich vor allem beim Hyperparathyreoidismus, bei den Hypercalciämie-Syndromen und bei der chronischen Dialysebehandlung (Lit.: Seifert, 1968; Altenähr u. Mitarb., 1969). Unter experimentellen Bedingungen lassen sich Weichteilcalcinosen bei der Calcergie oder Calciphylaxie nach Selye (1962) erzeugen. Eine Hemmung der experimentellen Calcinosen kann durch zahlreiche Faktoren herbeigeführt werden. Hierzu gehören Metalleionen (Thomas und Tomita, 1967; Drescher, 1969), Pyrophosphate (Fleisch u. Mitarb., 1965, 1966; Seifert und Dulawa, 1969), Polyphosphonate (Francis, 1969) und hormonale Einwirkungen (Glucocorticoide, Testosteron, Östradiol, Hypophysektomie; Selye, 1962).

Über eine verkalkungshemmende Wirkung des Thyreocalcitonin (TCT) liegen bisher nur vereinzelte Untersuchungen vor. Gabbiani u. Mitarb. (1968 a, b) berichteten über einen Hemmeffekt von Thyroxin und TCT auf experimentelle Calcinosen. Rasmussen und Tenenhouse (1967) beobachteten eine Verhinderung der durch Parathormon induzierten Nephrocalcinose bei gleichzeitiger TCT-Infusion.

In der vorliegenden Arbeit soll die Frage geprüft werden, welchen Einfluß eine protrahierte Applikation von TCT auf den Ablauf der experimentellen Weichteilcalcinose besitzt. Als calciummobilisierende Substanz wurde Dihydratathysterin (DHT) gewählt, als zusätzlicher Verkalkungstoff („Challenger“) Chrom-III-Chlorid. Die pathohistologischen Befunde wurden durch vergleichende Untersuchungen des Calciumgehaltes von Serum und Gewebe und durch elektronenmikroskopische Studien an der Niere der Versuchstiere ergänzt.

Material und Methode

Als Versuchstiere dienten 146 intakte weibliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 100—120 g. Es wurden folgende Versuchsgruppen gebildet (Tabelle 1):

Tabelle 1. Übersicht über die Versuchsanordnung

	Gruppe	Anzahl der Versuchstiere	Medikation		Versuchsdauer
			1. Tag	2. Tag	
Vorversuche	I	10	TCT	—	9 Std
	II	10	TCT 4stündlich	—→	14 Tage
	III	6	DHT	TCT	2 Tage
Hauptversuch	IV	19	DHT	—	4 bzw. 7 Tage
	V	22	DHT		
			TCT 4stündlich	—→	4 bzw. 7 Tage
	VI	23	DHT	CrCl ₃	4 bzw. 7 Tage
	VII	23	DHT	CrCl ₃	
			TCT 4stündlich	—→	4 bzw. 7 Tage
	VIII	14	—	—	4 bzw. 7 Tage

Vorversuche (Gruppe I—III)

Um die Wirkungsdauer einer einmaligen TCT-Gabe¹ auf den Serumcalciumspiegel zu prüfen, erhielten 5 Tiere nach 12stündigem Hungern subcutan 0,3 MRC-Einheiten TCT in Aqua dest. gelöst und 5 Tiere 0,3 MRC-Einheiten TCT in Aqua dest. mit einem 5%igen Gelatinezusatz (*Gruppe I*). 5 Tiere blieben unbehandelt und dienten als Kontrolltiere. Das Blut wurde unmittelbar vor der TCT-Gabe, $\frac{1}{2}$ Std, 1 Std und dann stündlich bis 9 Std nach der TCT-Applikation aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen und der Calciumgehalt an je 20 μ l Serum mit dem Eppendorf-Flammenphotometer bestimmt.

Um das Verhalten des Serumcalciumspiegels bei längere Zeit andauernder protrahierter TCT-Applikation zu untersuchen, erhielten 10 Tiere 14 Tage lang 0,3 MRC-Einheiten TCT mit Gelatinezusatz in 4stündigen Abständen (*Gruppe II*). Serumcalciumbestimmungen wurden parallel zu den Analysen bei Kontrolltieren anfangs täglich, dann alle 2 Tage jeweils unmittelbar vor und eine Stunde nach einer TCT-Injektion durchgeführt.

In einem weiteren Versuch wurde die Wirkung einer einmaligen TCT-Gabe auf den Serumcalciumspiegel bei der durch DHT hervorgerufenen Hypercalciämie untersucht (*Gruppe III*). 6 Ratten erhielten peroral mittels Magensonde 1 mg DHT¹ in ölicher Lösung. 40 Std danach wurden je 3 Ratten 0,3 bzw. 0,5 MRC-Einheiten TCT subcutan injiziert. Die TCT-Lösung wurde in folgendem Verhältnis zubereitet: 8 MRC-Einheiten TCT wurden in 0,8 ml einer 0,1 molaren Ameisensäure gelöst und mit 0,1 molarem Acetatpuffer (pH 4,6) auf 8 ml aufgefüllt; dieser Lösung wurden 400 mg Gelatine zugegeben. Die Serumcalciumbestimmungen erfolgten vor der TCT-Gabe und dann stündlich bis 4 Std danach. — 2 Ratten erhielten ausschließlich DHT, 2 Ratten wurden als Kontrolltiere nicht behandelt.

Hauptversuch (Gruppe IV—VIII)

In *Gruppe IV* (19 Tiere) wurde am 1. Versuchstag einmalig 1 mg DHT gegeben, um eine Weichteilcalcinose zu erzeugen. Die 22 Tiere der *Gruppe V* erhielten zusätzlich während der gesamten Versuchsdauer alle 4 Std 0,3 MRC-Einheiten TCT. In *Gruppe VI* (23 Tiere) wurde den Tieren nach dem Prinzip der Calciphylaxie am 1. Tag 1 mg DHT (als „Sensitizer“ = sensibilisierende Substanz) mittels Magensonde und am 2. Tag 10 mg Chrom III-Chlorid in 1 ml Aqua dest. (als „Challenger“ = auslösende Substanz) intravenös appliziert. *Gruppe VII* (23 Tiere) erhielt zusätzlich zu der Calciphylaxie-Behandlung alle 4 Std 0,3 MRC-Einheiten TCT. TCT war in Ameisensäure und Acetatpuffer mit Gelatinezusatz gelöst wie oben angegeben. *Gruppe VIII* (14 Tiere) diente als Kontrollgruppe.

Es wurde täglich zweimal der Serumcalciumgehalt bestimmt, und zwar jeweils unmittelbar vor und 1 Std nach einer TCT-Gabe. Ein Teil der Tiere wurde am 4. Tag, der Rest am 7. Versuchstag in Äthernarkose getötet. Zur lichtmikroskopischen Untersuchung wurden Herz, Aorta, Lunge, Magen, Duodenum, Pankreas und Niere in 10%igem neutralem gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin sowie nach der PAS-Reaktion und der v. Kossa-Reaktion gefärbt.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurde am 4. Versuchstag Nierengewebe entnommen, in Osmiumsäurelösung nach Dalton fixiert und in Epon 812 eingebettet. Die Schnitte wurden teils ohne Nachkontrastierung, teils nach Schnittkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat am Philips EM 300 mikroskopiert.

Außerdem wurde bei einem Teil der Tiere je eine Niere auf ihren Calciumgehalt untersucht: Die Nieren wurden bei 107° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und bei 600° C im Muffelofen verascht. Die Asche wurde in 0,1 N HCl gelöst und der Calciumgehalt flammenphotometrisch bestimmt.

Befunde

I. Vorversuche (Gruppe I—III)

0,3 MRC-Einheiten TCT (*Gruppe I*) senkten bei intakten und sonst unbehandelten Tieren den Serumcalciumspiegel um etwa 1,5—2 mg-% sowohl mit als auch ohne Gelatine-Zusatz (Abb. 1). Mit Gelatine-Zusatz hielt diese Wirkung länger (bis 5 Std) an, als bei alleiniger Gabe von TCT.

¹ Thyreocalcitonin (Schweine-Thyreocalcitonin) wurde von der CIBA-AG, Basel, DHT (AT 10)[®] von den Farbenfabriken Bayer, Leverkusen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

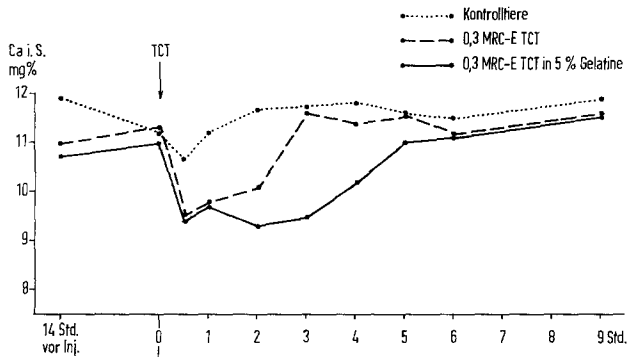


Abb. 1. Verhalten des Serumcalciumspiegels nach s.c. Injektion von 0,3 MRC-Einheiten TCT ohne Gelatine bzw. mit Gelatinezusatz (Gruppe I)

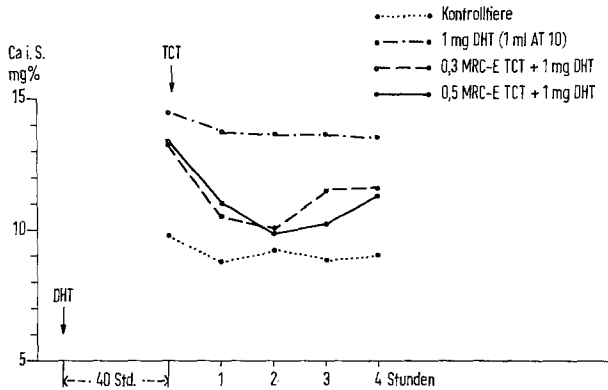


Abb. 2. Verhalten des Serumcalciumspiegels nach s.c. Injektion von 0,3 bzw. 0,5 MRC-Einheiten TCT bei der DHT-Hypercalciämie (Gruppe III)

Wurde dieselbe TCT-Dosis über 14 Tage lang 4stündlich verabfolgt (Gruppe II), so blieb bei den sonst unbehandelten Tieren die hypocalciämische TCT-Wirkung erhalten.

Gegenüber Kontrolltieren mit Werten um 10 mg-% war 40 Std nach Gabe von 1 mg DHT (Gruppe III) der Serumcalciumspiegel auf 13—15 mg-% angestiegen. Eine einmalige Gabe von 0,3 oder 0,5 MRC-Einheiten TCT senkte diese Hypercalciämie deutlich bis nahezu auf Normalwerte (Abb. 2). Die Wirkung hielt über mehr als 4 Std an. Eine Dosiserhöhung von 0,3 auf 0,5 MRC-Einheiten TCT verstärkte die Wirkung nicht wesentlich.

II. Hauptversuch (Gruppe IV—VIII)

Die durch eine einmalige Gabe von DHT allein (Gruppe IV) oder in Verbindung mit Chrom-Chlorid (Gruppe VI) erzeugte Hypercalciämie erreichte am 3. und 4. Versuchstag mit Werten um 14—15 mg-% ihren Höhepunkt. Danach fiel der Calciumspiegel langsam ab und erreichte am 7. Tag etwa wieder Normalwerte. In den ersten Tagen war diese Hypercalciämie durch TCT noch gut zu senken. Vom 4. Tag an war jedoch ein Nachlassen der TCT-Wirkung festzustellen, so daß

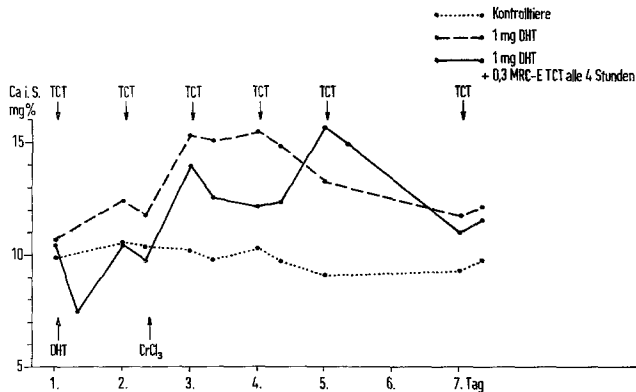


Abb. 3. Verhalten des Serumcalciumspiegels während des DHT-Versuchs und bei gleichzeitiger protrahierter TCT-Applikation (Gruppe IV, V und VIII)

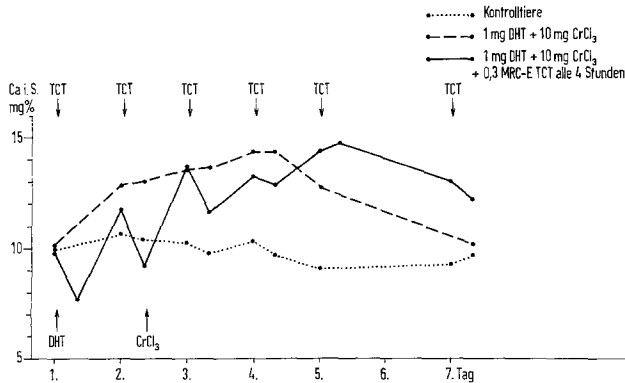


Abb. 4. Verhalten des Serumcalciumspiegels während des Calciphylaxie-Versuchs und bei gleichzeitiger protrahierter TCT-Applikation (Gruppe VI, VII und VIII)

der Serumcalciumspiegel der zusätzlich mit TCT behandelten Tiere am 5. Tag und danach sogar die Werte der nicht mit TCT behandelten Tiere überstieg (Abb. 3, 4).

Im Zusammenhang mit den Mineralverschiebungen in den verschiedenen Gruppen entwickelten sich Weichteilverkalkungen unterschiedlichen Grades in zahlreichen Organen. In der Niere kam es zu einer Nephrocalcinose mit intratubulären Kalkzylindern, Tubuluszellverkalkungen und Kalksalzablagerungen im Interstitium (Abb. 5). Diese Veränderungen waren anfangs hauptsächlich an der Markrindengrenze entwickelt, später reichten sie bis in die äußere Rindenzone und umgaben teilweise auch die Bowmansche Kapsel der Glomerula. Die Lungenverkalkungen, welche besonders bei der Calciphylaxie-Gruppe entstanden, imprägnierten das Alveolargerüst (Abb. 6), daneben auch die Lamina propria der Bronchien und teilweise die Wand größerer Gefäße. Im Herzen fanden sich Verkalkungen subendocardial, interstitiell, in der Wand der Coronargefäße und als Muskelzellverkalkungen. Die Verkalkungen des Magens und des Duodenums bildeten sich vor allem interstitiell in der Lamina propria der Magenschleimhaut

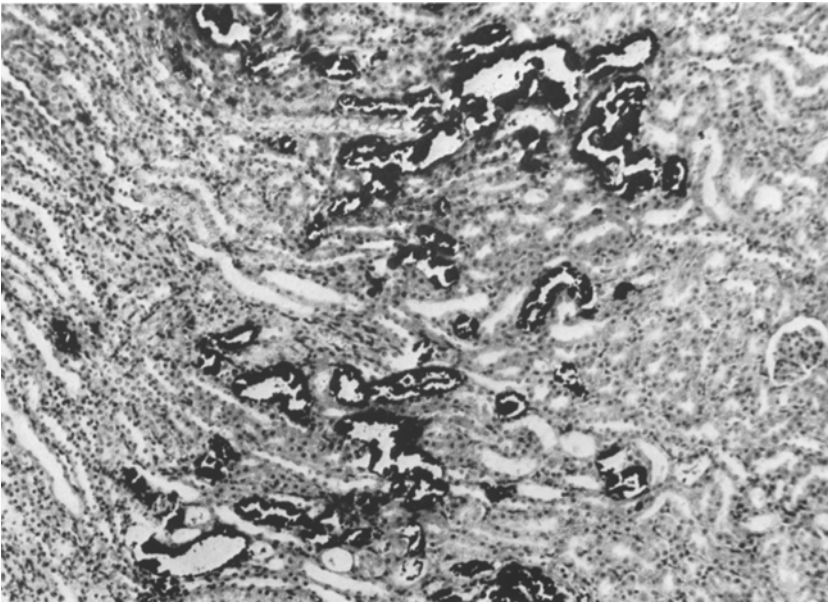


Abb. 5. Niere (Gruppe VI: DHT + CrCl_3 ; 4. Tag): Nephrocalcinose an der Markrindengrenze. Kossa-Reaktion, Vergr. 150fach

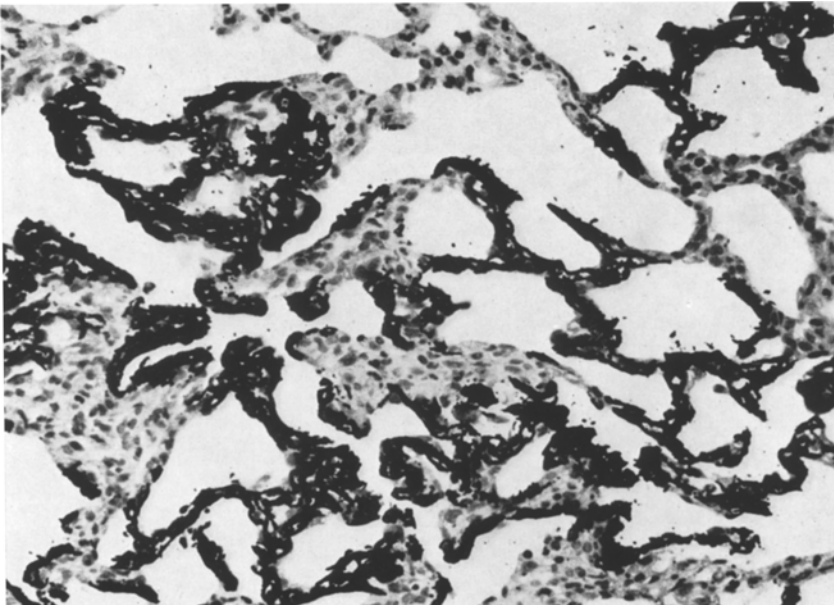


Abb. 6. Lunge (Gruppe VII: DHT + CrCl_3 + TCT vierstündlich; 7. Tag): Ausgeprägte Verkalkung der Alveolarmembranen. Kossa-Reaktion, Vergr. 400fach

zwischen den Magendröusen (Abb. 7) und in der Submucosa des Duodenum zwischen den Brunnerschen Dröusen aus. Ebenso zeigten Aorta und Pankreas in einigen Föllen Verkalkungen.

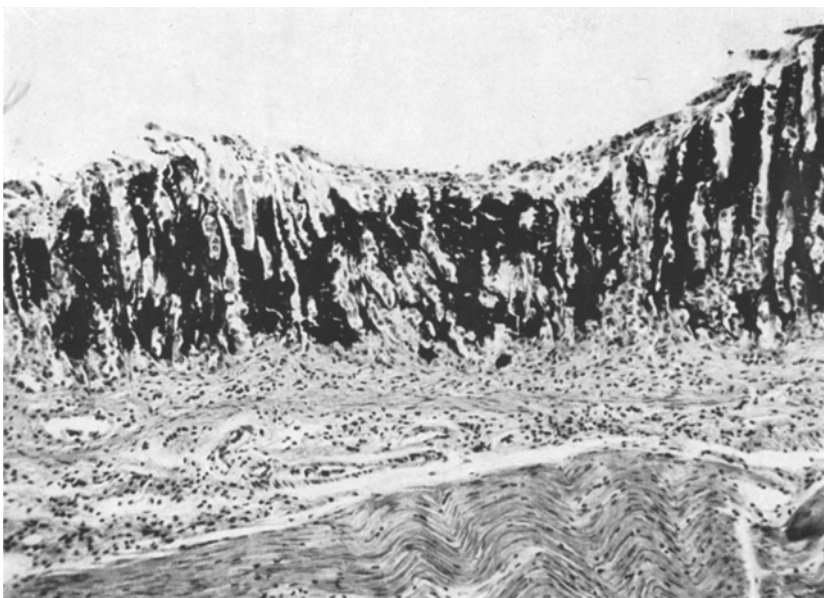


Abb. 7. Magen (Gruppe VI: DHT + CrCl₃; 4. Tag): Calcinose der Magenschleimhaut. Kossa-Reaktion, Vergr. 150fach

Tabelle 2. *Durchschnittlicher Verkalkungsgrad der Organe (Skala 0—3; s. Text) bei Einwirkung von TCT auf Calcinose und Calciphylaxie*

Gruppe	Medikation	Ver- suchs- tag	Verkalkungsgrad				
			Niere	Lunge	Magen	Herz	Gesamt- index ^a
IV	DHT	4. Tag	1,2	0,1	2,3	0,5	0,66
		7. Tag	1,8	0,6	2,4	0,6	0,96
V	DHT + TCT	4. Tag	0,5	0,0	1,3	0,3	0,37
		7. Tag	1,5	0,6	1,9	0,7	0,76
VI	DHT + CrCl ₃	4. Tag	0,5	1,5	2,5	1,2	1,05
		7. Tag	1,9	1,7	2,0	1,1	1,38
VII	DHT + CrCl ₃ + TCT	4. Tag	0,2	0,4	2,0	1,1	0,59
		7. Tag	1,2	2,2	2,2	1,9	1,66

^a Gesamtindex = durchschnittlicher Verkalkungsgrad von Niere, Lunge, Magen, Darm, Pankreas, Herz und Aorta zusammengefaßt.

Insgesamt waren die Verkalkungen bei der Calciphylaxie (Gruppe VI) stärker ausgeprägt als bei der DHT-Calcinose (Gruppe IV). Eine vollständige Verhinderung der Verkalkungen durch Calcitonin wurde weder bei der DHT-Calcinose noch bei der Calciphylaxie erzielt. Der Verkalkungsgrad der einzelnen Organe wurde bei jedem Tier nach einer Skala von 0 (nicht verkalkt) bis 3 (sehr stark verkalkt) festgelegt und daraus ein Durchschnittswert für die Einzelorgane einer Gruppe

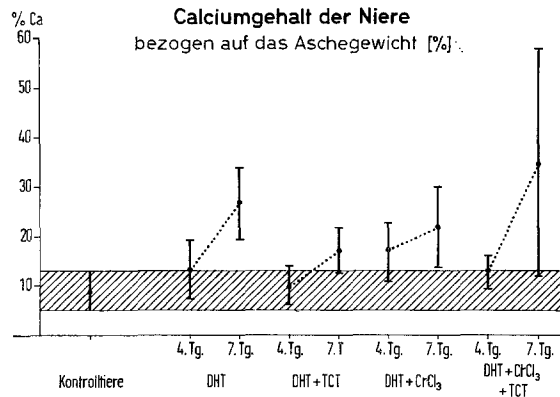


Abb. 8. Calciumgehalt in Prozent des Aschegewichtes der Niere am 4. und 7. Versuchstag bei Gruppe IV—VIII

Tabelle 3. Prozentuale Anzahl der Organe mit Verkalkungen bei Einwirkung von TCT auf Calcinose und Calciphylaxie. Berücksichtigt wurden: Niere, Lunge, Magen, Darm, Pankreas, Herz und Aorta

Gruppe	Medikation	Versuchstag	
		4. Tag	7. Tag
IV	DHT	45 %	48 %
V	DHT + TCT	29 %	41 %
VI	DHT + CrCl ₃	54 %	63 %
VII	DHT + CrCl ₃ + TCT	38 %	73 %

und ein Gesamtindex für alle Organe der jeweiligen Gruppe ermittelt (Tabelle 2). Dabei kommt die stärkere Verkalkung der Calciphylaxiegruppe gegenüber der DHT-Gruppe sowohl am 4. als auch am 7. Versuchstag zum Ausdruck. Der Gesamtindex zeigt ferner, daß bis zum 4. Versuchstag durch TCT eine relative Hemmung des Verkalkungsgrades sowohl bei der DHT-Calcinose als auch bei der Calciphylaxie erreicht werden konnte. Diese Hemmung bis zum 4. Tag betraf bei der DHT-Calcinose insbesondere die Niere, bei der Calciphylaxie vor allem die Lungen.

Am 7. Versuchstag war eine verkalkungshemmende Wirkung von TCT nicht mehr festzustellen. Der Gesamtindex des Verkalkungsgrades war bei der DHT-Calcinose nach TCT nur wenig und nicht signifikant niedriger als ohne TCT, bei der Calciphylaxiegruppe mit TCT sogar noch erhöht. Ein gleichartiges Verhalten zeigte die prozentuale Anzahl der Organe mit Verkalkungen ohne Berücksichtigung des Verkalkungsgrades (Tabelle 3).

Um diese semiquantitativ erhobenen histologischen Befunde bezüglich des Verkalkungsgrades zu stützen, wurde bei einem Teil der Tiere der Calciumgehalt einer Niere nach Veraschung bestimmt und auf das Aschegewicht bezogen (Abb. 8). Auch hierbei zeigte sich eine mäßige Verminderung des Calciumgehaltes durch TCT am 4. Versuchstag, während diese Wirkung am 7. Versuchstag weniger

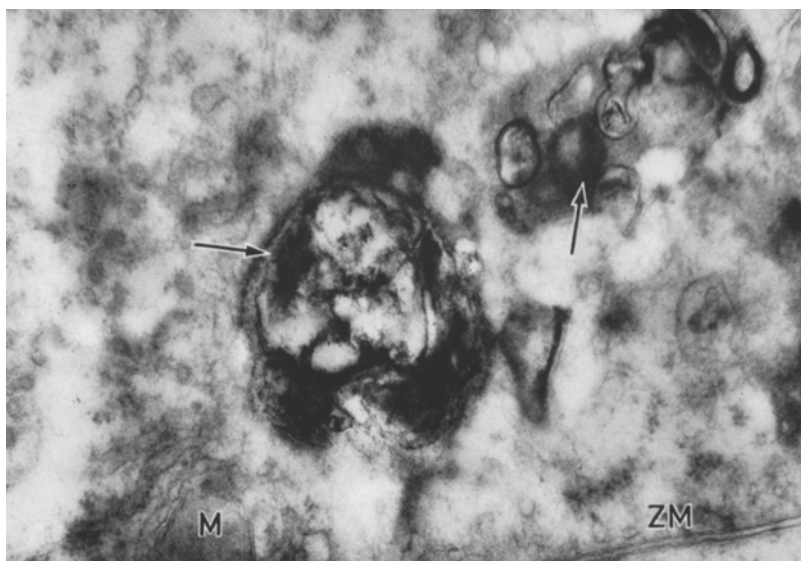


Abb. 9. Niere (Gruppe IV: DHT; 4. Tag): Elektronenmikroskopischer Ausschnitt einer Tubuluszelle: Einlagerung von amorphem elektronendichtem Material (\nearrow) in der Wand von Cytoplasmavacuolen. *M* Mitochondrium, *ZM* Zellmembran. Dalton-Fixierung, keine Schnittkontrastierung, Vergr. 37000fach

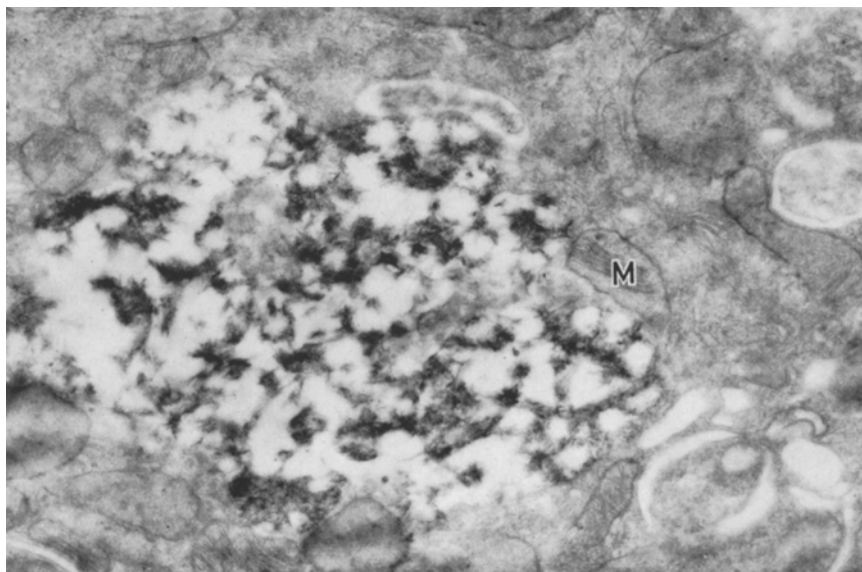


Abb. 10. Niere (Gruppe V: DHT + TCT; 4. Tag): elektronenmikroskopischer Ausschnitt einer Tubuluszelle; beetförmige Einlagerung kristalliner Kalksalze innerhalb des Cytoplasmas. *M* Mitochondrium. Dalton-Fixierung, keine Schnittkontrastierung, Vergr. 21000fach

deutlich war. Bei der Calciphylaxie mit TCT war der Calciumgehalt der Nieren unter breiter Streuung eher noch höher als ohne TCT. Allerdings überlagern sich die Standardabweichungen.

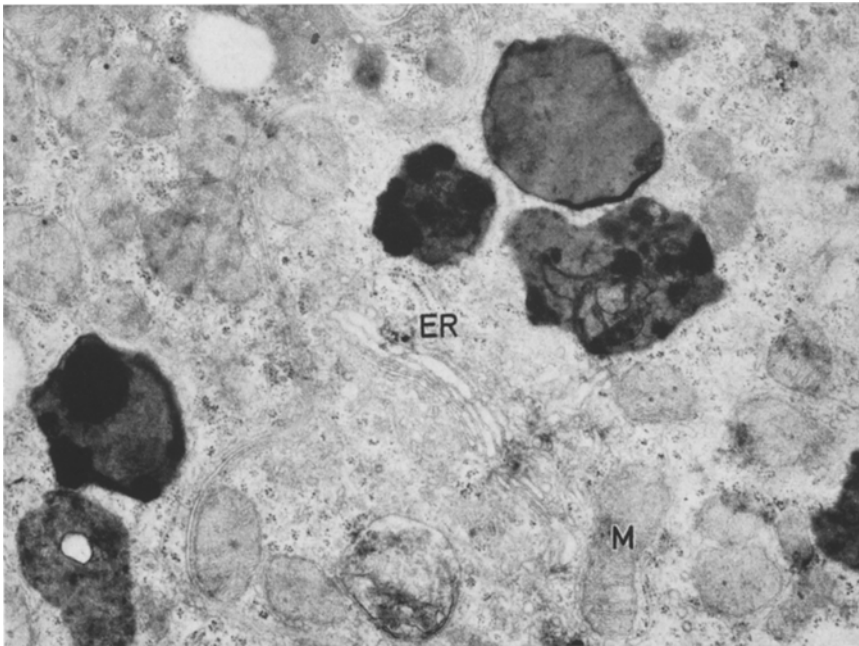


Abb. 11. Niere (Gruppe IV: DHT; 4. Tag): elektronenmikroskopischer Ausschnitt einer Tubuluszelle; Einlagerung von scholligem netzartig konfluierendem elektronendichtem Material innerhalb von Cytosomen. *ER* endoplasmatisches Reticulum. Dalton-Fixierung, keine Schnittkontrastierung, Vergr. 17500fach

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Nieren am 4. Versuchstag zeigte intracelluläre Verkalkungen in den Tubulusepithelien des proximalen Tubulus contortus. Diese Verkalkungen erschienen amorph in Cytoplasmavacuolen (Abb. 9), wie sie auch von anderen Autoren beschrieben wurden (Giacomelli u. Mitarb., 1964; Gerlach und Themann, 1965; Lunglmayr und Schwarzmeier, 1968). Außerdem fanden sich intracytoplasmatische kristalline Kalkbeete, welche die nadelförmige büschelartige Apatitstruktur erkennen lassen (Abb. 10). Ferner waren Cytosomen mit scholligen und verzweigten elektronendichten Einlagerungen zu beobachten (Abb. 11), die wir ebenfalls als Verkalkungen deuten (vgl. Totovic, 1965; Gerlach und Themann, 1965). Diese beschriebenen intracellulären Verkalkungen wurden durch TCT nicht verändert.

Schließlich kommen als Ort einer Calciumablagerung die sog. Matrixaggregate in Mitochondrien (Abb. 12) in Betracht (Peachey, 1964; Thomas und Greenawalt, 1968), welche bei intracellulären Verkalkungen teilweise vergrößert gefunden werden. Durch TCT ließen sich jedoch weder Zahl noch Größe dieser Matrixaggregate beeinflussen.

Diskussion

Nach den bisherigen Kenntnissen über die Wirkungsweise des Calcitonin liegt der Hauptangriffspunkt des Hormons am Knochen. Weitere Partialwirkungen auf andere Organe, z. B. die Niere (Hirsch und Munson, 1969; Clark und Kenny,



Abb. 12. Niere (Gruppe IV: DHT; 4. Tag): elektronenmikroskopischer Ausschnitt einer Tubuluszelle; calciumhaltige, stark elektronendichte Matrixaggregate (\nearrow) in Mitochondrien. ZM Zellmembran. Dalton-Fixierung, keine Schnittkontrastierung, Vergr. 55000fach

1969) scheinen für den allgemeinen Calciumstoffwechsel von untergeordneter Bedeutung zu sein. Der hypocalciämische Effekt des TCT, den Ziegler u. Mitarb. (1968) bei der Ratte unter verschiedenen Versuchsbedingungen beschreiben, legte die Vermutung nahe, daß TCT einen hemmenden Einfluß auf Weichteilcalcinosen bei Hypercalciämie-Syndromen ausüben könne. Rasmussen und Tenenhouse (1967) konnten eine durch Parathormon-Infusion hervorgerufene Nephrocalcinose durch gleichzeitige TCT-Infusion verhindern. In ähnlicher Weise fanden Gabbiani u. Mitarb. (1968a, b) durch TCT-Gabe eine Verhinderung der durch Nephrektomie hervorgerufenen Weichteilcalcinose und eine Abschwächung der durch Parathormon-Überdosierung, Calcergie und Calciphylaxie hervorgerufenen Weichteilverkalkungen.

Wir untersuchten den Einfluß von TCT sowohl auf die durch DHT ausgelöste Calcinose als auch auf die Calciphylaxie bei gleichzeitiger Gabe von Chromchlorid. Die von uns verwandte Calciphylaxieform führt zu einer besonders starken Verkalkung von Lunge (Schäfer, 1968), Niere, Herz und Magen.

Die von Gabbiani u. Mitarb. (1968a, b) bei ähnlicher Versuchsanordnung an thyreoparathyreoidectomierten Ratten gefundene Verkalkungshemmung durch TCT ließ sich in unseren Versuchen nur zum Teil bestätigen. Bis zum 4. Versuchstag, einem Zeitraum, den auch Gabbiani u. Mitarb. untersuchten, fanden wir übereinstimmend eine Verminderung des Verkalkungsgrades. Diese anfängliche Ver-

kalkungshemmung war sowohl lichtmikroskopisch als auch am Asche calciumgehalt (Niere) feststellbar. Bei längerer Versuchsdauer läßt sich ein derartiger Effekt nicht mehr nachweisen. Sowohl bei der Calciphylaxie als auch bei der DHT-Calcinose ergab sich hinsichtlich des TCT-Effekts, daß beide Verkalkungsformen nur anfänglich, jedoch nicht auf die Dauer durch TCT zu beeinflussen waren.

Extraossäre Verkalkungen beruhen auf einem aktiven Stoffwechselprozeß, an dem sowohl die Zellen am Verkalkungsort als auch Faserbestandteile und Grundsubstanz des Bindegewebes beteiligt sind. Die lokalen, der Verkalkung vorausgehenden und für die Verkalkung entscheidenden Gewebsveränderungen werden bei der Calcinose und Calciphylaxie teils durch das sensibilisierende DHT, teils durch den zusätzlichen Provokatorstoff, in unserem Fall CrCl_3 , bewirkt. Sie bestehen in einer vermehrten Permeabilität der Gefäßwände, einer Bindegewebsaktivierung mit Zellproliferation, vermehrtem Einbau von Aminosäuren, vermehrter Bildung von Mucopolysacchariden, Depolymerisierung der Grundsubstanz und lyotropem Umbau der Faserstrukturen (Urist und Adams, 1966), wobei auch cellulär gebildete Enzyme freigesetzt werden. Schließlich erfolgt durch Ionenaustausch eine Einlagerung von Calcium- und Phosphationen und die Bildung von Calciumphosphat (Seifert und Junge-Hülsing, 1966; Seifert, 1965; Gerlach und Themann, 1965; Seifert und v. Hentig, 1967; Altenähr, 1967; Schäfer, 1968). Auf cellulärer Ebene wird die Calciumpermeabilität der Cytoplasma- und Mitochondrienmembranen durch Parathormon, Vitamin D und ebenso DHT erhöht. Hierbei handelt es sich um Vorgänge, welche für den Ablauf der Verkalkung von entscheidender Bedeutung sind (Shapiro und Greenspan, 1969; Gerlach und Themann, 1965). Zu diesen Gewebsfaktoren treten bei der DHT-Calcinose und bei der Calciphylaxie die blut-chemischen Veränderungen mit Mineralverschiebungen im Serum.

Ebenso wie bei dem Verkalkungsvorgang lokale Gewebsfaktoren und Plasmaminerale zusammenwirken, so sind auch für die Verkalkungshemmung beide Faktoren zu berücksichtigen.

Die von uns in den ersten Tagen beobachtete Hemmung der Verkalkung durch TCT ging in deutlicher Weise mit einer relativen Senkung der Hypercalciämie parallel. Ebenso bestand eine Parallele zwischen Nachlassen der TCT-Wirkung auf den Serumcalciumspiegel und auf den Verkalkungsgrad nach dem 4. Tag. Licht- und elektronenmikroskopisch konnten wir mit unseren Methoden durch TCT keine qualitativen Unterschiede im Ablauf der Verkalkung, auch nicht bezüglich Verteilungsmuster und Lokalisation der Verkalkungen feststellen. Es muß vorerst offengelassen werden, ob die anfängliche Verkalkungshemmung durch TCT allein auf seiner hypocalciämischen Wirkung beruht oder ob die relative Senkung des Calciumspiegels und die Verkalkungshemmung in unseren Versuchen parallele Erscheinungsformen einer allgemeinen Wirkung von TCT auf die Zelle und ihren Stoffwechsel darstellen.

Ein Nachlassen der hypocalciämischen und verkalkungshemmenden TCT-Wirkung beobachteten wir vom 4. Tag an. Wegen der kurzen Zeitdauer kommt eine Antikörperbildung gegen das applizierte Schweinecalcitonin für dieses Phänomen nicht in Betracht. Es ist möglich, daß hierbei ein hitzelabiler inaktivierender Faktor im Serum eine Rolle spielt, der eine physiologische Bedeutung bei der TCT-Inaktivierung besitzen soll (Tashjian und Voelkel, 1968). Am besten decken

sich unsere diesbezüglichen Befunde mit Beobachtungen, welche Friedman u. Mitarb. (1968), Raisz u. Mitarb. (1968) sowie Trummel u. Mitarb. (1969) am Knochen machten. Hierbei untersuchten die Autoren *in vitro* an Hand der Freisetzung von zuvor inkorporiertem ^{45}Ca die Wirkung von TCT auf die durch Parathormon bzw. 25-Hydroxycholecalciferol stimulierte Knochenresorption. 25-Hydroxycholecalciferol ist das pharmakologisch wirksame Stoffwechselprodukt von Vitamin D und möglicherweise auch als Metabolit von DHT für dessen Wirkung verantwortlich. Vom 3. Tag der TCT-Zugabe an stellten sie ein Nachlassen der Hemmwirkung von TCT auf die Knochenresorption und vom 4. Tag an sogar eine vermehrte Freisetzung von ^{45}Ca gegenüber den nur mit Parathormon behandelten Vergleichskulturen fest. Ebenso fanden sie *in vivo* nach dieser Zeit bei mit Parathormon und TCT behandelten Ratten sogar einen stärkeren Calciumanstieg im Serum als nach alleiniger Parathormongabe. Diese Befunde werden von den Autoren als Escape-Phänomen gedeutet, d. h. als ein Nachlassen der Empfindlichkeit des Zielorgans Knochen gegenüber dem TCT. Entsprechende Befunde wurden auch am Menschen von Dambacher und Haas (1969) erhoben: Bei Patienten mit hohem Knochenumbau beobachteten sie anhand des Calcium-Phosphat-Produktes im Serum bei mehrtägiger Gabe von Schweinecalcitonin eine deutliche Abnahme der Hormonwirkung.

Andererseits haben Orimo (1969) bei 3wöchiger Gabe und wir bei 2wöchiger Gabe von TCT an sonst unbehandelten Tieren kein Nachlassen der hypocalcämischen Wirkung von TCT festgestellt. Unsere Ergebnisse deuten daher in Zusammenhang mit den Befunden der genannten Autoren darauf hin, daß das beschriebene Escape-Phänomen gegenüber TCT offenbar nur bei einer gleichzeitigen Stimulierung des Knochen- und Calciumstoffwechsels durch Parathormon bzw. DHT auftritt.

Literatur

- Altenähr, E.: Zur Pathogenese der Thymuscalciophylaxie. *Beitr. path. Anat.* **135**, 133—152 (1967).
- Seemann, N., Seifert, G.: Pathologische Anatomie der Epithelkörperchen. In: Der autonome und regulative Hyperparathyreoidismus, hrsg. v. V. Bay, S. 1—61. Stuttgart: Ferdinand Enke 1969.
- Clark, J. D., Kenny, A. D.: Hog thyrocalcitonin in the dog: urinary calcium, phosphorus, magnesium, and sodium responses. *Endocrinology* **84**, 1199—1205 (1969).
- Dambacher, M. A., Haas, H. G.: Calcitonin. *Neue Forschungsergebnisse. Med. Klin.* **64**, 496—499 (1969).
- Drescher, S.: Zur Hemmwirkung von Metallsalzen auf die experimentelle Gefäßcalcinose. *Beitr. path. Anat.* **139**, 74—92 (1969).
- Fleisch, H., Rüssel, R. G. G., Straumann, F.: Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature (Lond.)* **212**, 901—903 (1966).
- Schibler, D., Maerki, J., Rossard, J. F.: Inhibition of aortic calcification by means of pyrophosphate and polyphosphates. *Nature (Lond.)* **207**, 1300—1301 (1965).
- Francis, M. D.: The inhibition of calcium hydroxyapatite crystal growth by polyphosphonates and polyphosphates. *Calc. Tiss. Res.* **3**, 151—162 (1969).
- Friedman, J., Au, W. Y. W., Raisz, L. G.: Responses of fetal rat bone to thyrocalcitonin in tissue culture. *Endocrinology* **82**, 149—156 (1968).
- Gabbiani, G., Tuchweber, B., Côté, G., Lefort, P.: Action of thyroxine and calcitonin on experimental soft-tissue calcification. *Calc. Tiss. Res.* **2**, 30—37 (1968).
- — — Pakh, U. S., Selye, H.: Influence of thyroparathyroid apparatus on experimental soft tissue calcification. In: Parathyroid hormone and thyrocalcitonin (Calcitonin), ed. by R. V. Talmage and L. F. Belanger, p. 485—498. Amsterdam: Excerpta Med. Found. 1968.

- Gerlach, U., Themann, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchung der metastatischen Calcifizierung. *Klin. Wschr.* **43**, 1262—1268 (1965).
- — Experimentelle und klinische Untersuchungen über die Calcifizierung von Geweben. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* **71**, 520—522 (1965).
- Giacomelli, F., Spiro, D., Wiener, J.: A study of metastatic renal calcification at the cellular level. *J. Cell Biol.* **22**, 189—206 (1964).
- Hirsch, P. F., Munson, P. L.: Thyreocalcitonin. *Physiol. Rev.* **49**, 548—622 (1969).
- Irving, J. T., Schibler, D., Fleisch, H.: Effect of condensed phosphates on vitamin D-induced aortic calcification in rats. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **122**, 852—856 (1966).
- Lunglmayr, G., Schwarzmeier, J.: Morphologie und Adenosinphosphate bei experimenteller Nierenverkalkung. *Z. ges. exp. Med.* **148**, 204—209 (1968).
- Orimo (nicht publiziert): Zit. nach Hirsch und Munson (1969), p. 570.
- Peachey, L. D.: Electron microscopic observations on the accumulation of divalent cations in intra-mitochondrial granules. *J. Cell Biol.* **20**, 95—109 (1964).
- Raisz, L. G., Brand, J. S., Au, W. Y. W., Niemann, J.: Interactions of parathyroid hormone and thyreocalcitonin on bone resorption in tissue culture. In: *Parathyroid hormone and thyreocalcitonin (Calcitonin)*, ed. by R. V. Talmage and L. F. Belanger, p. 370—380. Amsterdam: Excerpta Med. Found. 1968.
- Rasmussen, H., Tenenhouse, A.: Thyreocalcitonin, osteoporosis and osteolysis. *Ann. J. Med.* **43**, 711—726 (1967).
- Schäfer, H.-J.: Zur Pathogenese der calciphylaktischen Lungenfibrose. *Virchows Arch. Abt. A Path. Anat.* **344**, 21—39 (1968).
- Seifert, G.: Die Calciphylaxie als pathogenetischer Faktor. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* **71**, 511—520 (1965).
- Pathologie der extraossären Gewebsverkalkungen. *Ärztl. Prax.* **20**, 539, 555—559 (1968).
- Dulawa, A. G.: Zur Hemmwirkung von Phosphatverbindungen auf die experimentelle Gefäßcalciose. *Beitr. path. Anat.* **139**, 59—73 (1969).
- Hentig, O., v.: Histochemische und elektronenoptische Befunde zur Pathogenese der experimentellen Hautcalciose. *Beitr. path. Anat.* **135**, 75—91 (1967).
- Junge-Hülsing, G.: Morphologische Aspekte bei extraossären Verkalkungsvorgängen. In: *Rheumatismus und Bindegewebe*, hrsg. von W. H. Hauss und U. Gerlach, S. 33—49. Darmstadt: Steinkopff 1966.
- Selye, H.: *Calciphylaxis*. Chicago: Chicago University Press 1962.
- Shapiro, J. M., Greenspan, J. S.: Are mitochondria directly involved in biological mineralization. *Calc. Tiss. Res.* **3**, 100—102 (1969).
- Tashjian, A. H., Jr., Voelkel, E. F.: Studies of the inactivation of thyreocalcitonin by serum. In: *Parathyroid hormone and thyreocalcitonin (Calcitonin)*, ed. by R. V. Talmage and L. F. Belanger, p. 108—118. Amsterdam: Excerpta Med. Found. 1968.
- Thomas, R. S., Greenawalt, J. W.: Microincineration, electron microscopy and electron diffraction of calcium phosphate-loaded mitochondria. *J. Cell Biol.* **39**, 55—76 (1968).
- Thomas, W. C., Tomita, A.: Mineralization of human and bovine tissue in vitro. *Amer. J. Path.* **51**, 621—628 (1967).
- Totovic, V.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an dem Tubulusapparat der Niere bei experimenteller chronischer Bleivergiftung der Ratte. *Virchows Arch. path. Anat.* **339**, 151—167 (1965).
- Trummel, C. L., Raisz, L. G., Blunt, J. W., De Luca, H. F.: 25-Hydroxycholecalciferol: Stimulation of bone resorption in tissue culture. *Science* **163**, 1450—1451 (1969).
- Urist, M. R., Adams, J. M.: Effect of various blocking reagents upon local mechanism of calcification. *Arch. Path. (Chic.)* **81**, 325 (1966).
- Ziegler, R., Riechmann, K., Grebenstein, R., Pfeiffer, E. F.: Über die hypocalciämische Wirkung von endogenem und exogenem Thyreocalcitonin bei der Ratte. *Klin. Wschr.* **46**, 587—593 (1968).

Dr. E. Altenähr
Pathologisches Institut der Universität
2 Hamburg 20, Martinistr. 52