

# Die Wirkung der experimentellen Hypercalcämie durch Dihydrotachysterin auf Drüsenfunktion und Verkalkungsmuster der Mamma

Licht-, elektronenmikroskopische und chemisch-analytische  
Untersuchungen

G. Brandt und R. Bässler

Pathologisches Institut der Universität Mainz (Direktor: Prof. Dr. H. Bredt)

Eingegangen am 21. März 1972

## Effect of Experimental Hypercalcaemia Induced by Dihydrotachysterol on the Secretory Activity and the Pattern of Calcification in the Mammary Gland

Light-, Electronmicroscopic and Chemical-Analytical Investigations

*Summary.* Disorders in the metabolism of calcium of the breast are manifested by calcifications of the acini, ducts, epithelial cells and by necrosis and in patients with advanced mammary cancer by hypercalcemia. To study the pathophysiology of these changes we carried out investigations of the mammary glands of female juvenile rats during experimentally induced hypercalcemia.

First group: control animals. Second group: rats treated with estrogen-progesterone (5 µg: 1 mg) for 10 days. Third group: the same premedication and 0.5 mg DHT/100 g weight at 10th day. Fourth group: the same hormones but with 0.25 mg DHT/100 g weight. Fifth group: only 0.5 mg DHT. Sixth group: only 0.25 mg DHT/100 g weight. The mammary glands were examined by histological, electron-microscopic and histochemical methods, and chemical-analytical studies of them were made to determine their calcium contents.

Results: DHT induces in juvenile female rats a proliferation of the mammary ducts. After pretreatment by estrogen and progesterone DHT induces a secretion in the acini of milk-like fluid with fat-globules and casein-granules, similar to that of the lactation period. The mobilization of calcium by DHT leads to sectorial calcifications in the acini of the mammary glands with a precipitation of calcium in the endoplasmatic reticulum and mitochondria. By describing a patient with galactorrhea hypercalcemica in the third stage of hyperparathyroidism we compare our experimental results with those found in the human.

*Zusammenfassung.* Störungen des Calciumstoffwechsels in der Mamma zeigen sich als lokalisierte Kalkablagerungen in Drüsenläppchen, Gängen, Epithelzellen und Nekrosen oder als Hypercalcämie bei metastasierenden Mammacarcinomen. Als Beitrag zur Pathophysiologie wird experimentell die Wirkung von Dihydrotachysterin (DHT) auf die weibliche Brustdrüse der Ratte untersucht.

Die Untersuchungen wurden an 60 weiblichen juvenilen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt:

1. Gruppe: Kontrolltiere.
2. Gruppe: Östrogen-Progesteron-Injektionen 1:200, 10 Tage.
3. Gruppe: Östrogen, Progesteron (10 Tage) und  $\frac{1}{2}$  mg DHT pro 100 g Körpergewicht am 10. Versuchstag.
4. Gruppe: gleiche Bedingungen, jedoch  $\frac{1}{4}$  mg DHT pro 100 g Körpergewicht.
5. Gruppe: keine Hormone, nur  $\frac{1}{2}$  mg DHT pro 100 g Körpergewicht.

6. Gruppe: gleiche Bedingungen, nur  $\frac{1}{4}$  mg DHT pro 100 g Körpergewicht. — Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen, histometrische Auswertung der Proliferationsgrade mit dem Punkt-Zähl-Verfahren und chemisch-analytische Untersuchungen des Calciumgehaltes der Brustdrüsen.

*Ergebnisse:* 1. DHT führt bei juvenilen, weiblichen Ratten zu einer Proliferation von Milchgängen und Gangsprossen. 2. Nach Vorbehandlung mit Östrogen-Progesteron hat Dihydrotachysterin einen sekretorisch stimulierenden Effekt mit Abgabe eines qualitativ der Lactation vergleichbaren Sekretes. 3. Als Ausdruck der Mobilisation des Calciumstoffwechsels tritt eine herdförmige Calcinose der Mamma und Kalkabscheidungen an Lipoproteidmembranen im endoplasmatischen Reticulum und an Mitochondrien auf. 4. Aus der Pathologie der Brustdrüse des Menschen wird ein Fall von Galactorrhoea hypercalcaemica bei tertiärem Hyperparathyreoidismus beschrieben.

Die Pathophysiologie des Calciumstoffwechsels in der weiblichen Brustdrüse hat seit Entwicklung der mammographischen Diagnostik und seit Anwendung der Geschlechtshormone zur Therapie des Mammacarcinoms zunehmend an Bedeutung gewonnen. Störungen in der Calciumhomöostase bei Brustdrüsenerkrankungen finden ihren Ausdruck als:

1. *Lokalisierte, feinhaerige Kalkablagerungen* in verschiedenen Formen der Mastopathie und in Geschwülsten.

Zur Frage der Pathomorphogenese derartiger Verkalkungen konnte in eigenen experimentellen Untersuchungen gezeigt werden, daß sich Kalksalze im retinierten Sekret der Zellen, der Lobuli und Milchgänge niederschlagen, oder daß die Verkalkungsmatrix metabolisch geschädigte Epithelzellen, Nekrosen und das angrenzende Stroma darstellt (Brandt und Bässler, 1969). Es war dadurch möglich, die in menschlichen Mammacarcinomen nachweisbare Topik von Calcifikationen experimentell nachzuahmen.

2. Als *Hypercalcämie* im Rahmen metabolischer Störungen unterschiedlicher Ätiologie bei metastasierenden Mammacarcinomen (Myers, 1960; Martz, 1968; Hayward, 1970).

Die Hypercalcämie tritt häufig im Beginn der Sexualhormontherapie auf und gilt als deren gefahrvollste Komplikation.

Therapieresistente Hypercalcämien wirken sich prognostisch ungünstig aus und stellen erfahrungsgemäß ein Symptom der Tumorprogression dar (Szymendera, 1970). Spontane Hypercalcämien werden in etwa 10% bei Mammacarcinom beobachtet (Jessiman, Emerson, Shah und Moore, 1963). Bei Brustdrüsencarcinomen mit Skeletmetastasen wird die Hypercalcämie als Ausdruck der Osteolyse und bei dem Fehlen von Knochenmetastasen als paraneoplastisches Syndrom gedeutet, das durch einen im Tumor gebildeten, parathormonähnlichen Wirkstoff ausgelöst wird (Gordan u. Mitarb., 1966).

Angesichts dieser Wirkungsmechanismen und der vielfältigen Angriffspunkte im Calciumstoffwechsel der Mamma sollen folgende Fragen experimentell geprüft werden:

1. Welche morphogenetische Wirkung hat Dihydrotachysterin auf die weibliche Brustdrüse der Ratte?

2. Hat der Effekt von Dihydrotachysterin Bedeutung für die Pathologie der Brustdrüse des Menschen?

## Material und Methoden

Die Versuche wurden an 60 weiblichen, juvenilen, nicht kastrierten 100 g schweren Sprague-Dawley-Ratten einer Mainzer Tierzuchtanstalt in 6 Gruppen zu je 10 Tieren durchgeführt. Fütterung durch Standardfutter (Altromin®). Trinkwasser ad libitum.

Die Proliferation des Brustdrüsengewebes wurde durch tägliche intramuskuläre Injektion eines Östrogen-Progesteron-Gemisches 1:200; 5 ng Östrogen (Progynon B oleosum Schering), 1 mg Progesteron (Proluton Schering) vom 1. bis 10. Versuchstag erreicht. Als Hypercalcämiefaktor erhielten die Tiere AT 10 (kristallisiertes Dihydrotachysterin (DHT) der Firmen Bayer, Merck) peroral durch Schlucksonde am 10. Versuchstag.

1. Gruppe: Kontrolltiere.
2. Gruppe: Östrogen-Progesteron-Behandlung.
3. Gruppe: wie 2. und  $\frac{1}{2}$  mg DHT pro 100 g Körpergewicht.
4. Gruppe: wie 2. und  $\frac{1}{4}$  mg DHT pro 100 g Körpergewicht.
5. Gruppe:  $\frac{1}{2}$  mg DHT pro 100 g Körpergewicht.
6. Gruppe:  $\frac{1}{4}$  mg DHT pro 100 g Körpergewicht.

Tötung durch Entbluten in Äthernarkose: 11. (2), 13. (3), 15. (3), 17. Versuchstag (2 Versuchstiere).

Für die *histologischen* Untersuchungen wurde in neutralisiertem Formol-Alkohol fixiert. Einbettung in Paraffin. Färbung mit Hämalaun-Eosin, PAS-Reaktion, Kossa-Reaktion. Calciumnachweis nach Voigt.

*Histometrische Auswertung.* Punkt-Zähl-Verfahren nach Chalkley (1943) (Netzeinteilung nach Attardi, je 15 Netze zu 25 Zählpunkten pro Versuchstier) zur Bestimmung von Parenchym-, Fett- und Bindegewebsverteilung. Weite der Alveolen (bei Gruppe 2—4 gemessen) durch je 50 Einzelmessungen pro Tier mit dem Ocularmikrometer der Firma Zeiss; es wurden nur gut abgrenzbare, kreisrunde Alveolenanschnitte ausgemessen.

*Chemisch-analytische Untersuchungen*<sup>1</sup>. Gewichtskontrolle. Flammenphotometrische Serum-Calcium-Bestimmung. Feucht- und Trockengewichtsbestimmung der linken abdominalen Mamma (Parameter des Trockengewichts: Mamma nach Trocknen im Brutschrank bei 80° C bis zur Gewichtskonstanz). Flammenphotometrisch erfaßbarer Gesamt-Calciumgehalt der Mamma nach Säureveraschung.

*Elektronenmikroskopische Untersuchungen* wurden bei Tieren der Gruppen 1, 2 und 3 vorgenommen. Die Gewebstücke wurden der rechten abdominalen Mamma entnommen, auf 1 mm Kantenlänge zurechtgeschnitten, in 5% Glutaraldehyd vorfixiert, in 1%igem Osmiumtetroxyd nachfixiert. Einbettung in Durcupan. Herstellung von Ultradünnschnitten auf dem Reichert-Mikrotom, Schnittkontrastierung mit Bleicitrat und Uranylacetat. Untersuchung im Elmiskop I von Siemens.

## Ergebnisse

*1. Makroskopische Befunde.* Bei juvenilen Kontrolltieren ist bis auf die großen Milchgänge in der Umgebung der Mamille Drüsenparenchym makroskopisch nicht erkennbar. Unter der *Wirkung von Östrogen und Progesteron* (2. Gruppe) bildet sich nach wenigen Tagen ein insuläres, aus Läppchen bestehendes Parenchym aus, das mit zunehmender Proliferation zu flächenhaften Drüsengruppen konfluiert.

*Östrogen, Progesteron und DHT* (Gruppe 3 und 4) führen am 15. und 17. Versuchstag zu einer Verbreiterung des Parenchympolsters der Mamma, das eine sulzige Beschaffenheit zeigt und etwa 2 mm stärker ist als nach alleiniger Östrogen-Progesteron-Applikation (Gruppe 2).

Die mit DHT *ohne* Vorbehandlung mit Sexualhormonen stimulierten Brustdrüsen (Gruppe 5 und 6) weisen vom 15. Tag an eine breite, etwa 1,5 mm messende und aus Drüsen- sowie Fettgewebe bestehende Schicht in der Subcutis auf.

<sup>1</sup> Herrn Prof. Dr. Beiermann, Chem. Inst. der Univ. Mainz, sei für freundliche Hilfe bei der Durchführung dieser Untersuchungen vielmals gedankt.

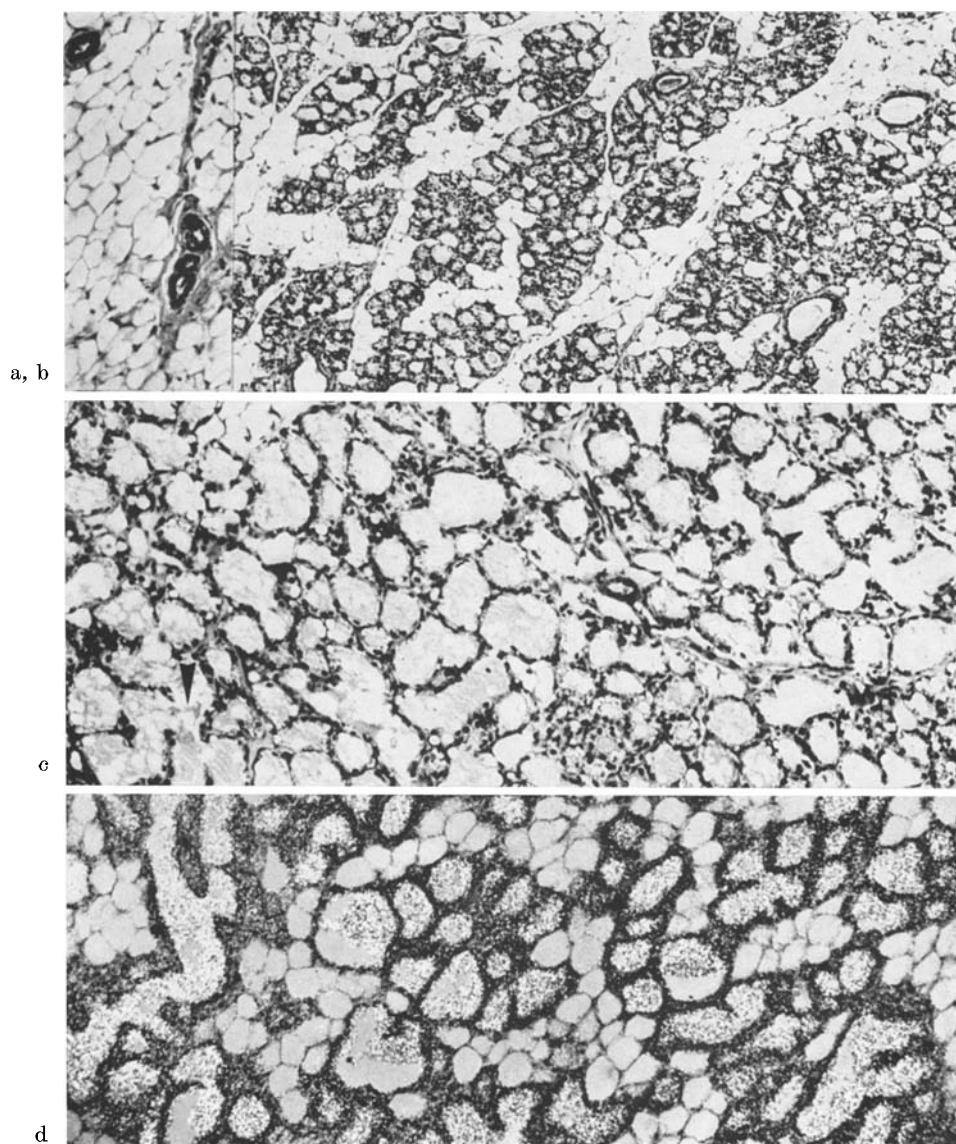


Abb. 1a—d. Wirkung von Östrogen, Progesteron und DHT auf die Mamma. a Normale Drüsengänge bei Kontrolltier. Vergr.  $230\times$ . b Lobulärer Proliferationszustand nach 10tägiger Östrogen-Progesteron-Behandlung. c Östrogen, Progesteron und DHT-Wirkung am 15. Tag. Vermehrte Sekretion, Ektasie der Alveolen, Absetzen des Milcheiweiß von dem leichteren Milchfett (Pfeil). d Darstellung des Calcium, Voigt-halbpolarisiert. Paraff. HE. Vergr.  $70\times$

2. *Histologische Untersuchungsbefunde.* Die *juvenilen Kontrolltiere* (Gruppe 1) zeigen ein tubuläres Drüsenmuster, wobei die Gänge von schmalen bindegewebigen Scheiden umgeben sind und keinerlei sekretorische Aktivität erkennen lassen (Abb. 1a).

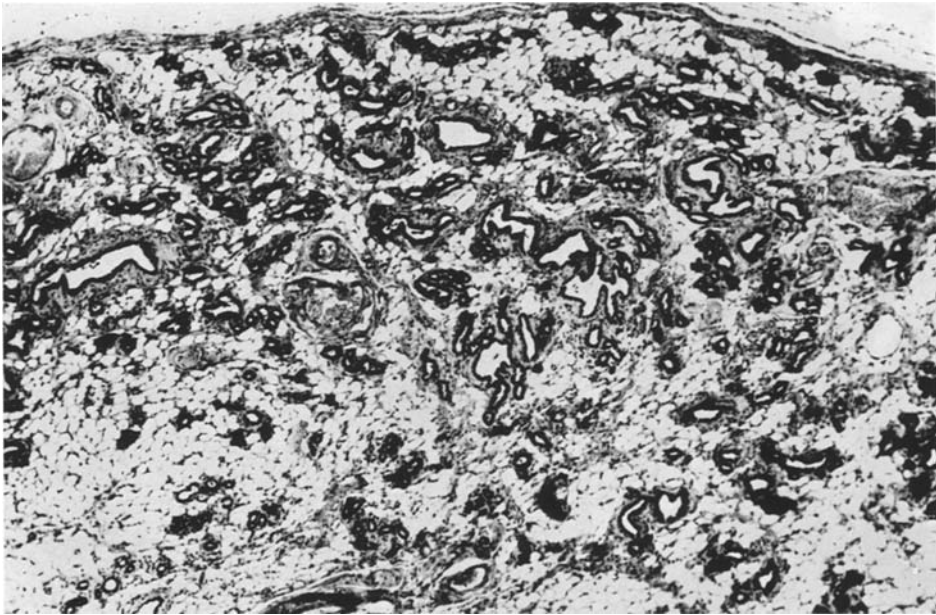


Abb. 2. Proliferationszustand der Mamma nach alleiniger DHT-Wirkung am 5. Tag nach Applikation. Form. Paraff. HE. Vergr. 70 ×

*Östrogen und Progesteron* (Gruppe 2) löst eine Proliferation zu Drüsenläppchen aus, die mit der Sekretion eines fett- und eiweißhaltigen Sekretes verbunden ist. Das zwischen den insulären Drüsengruppen lokalisierte Fett- und Bindegewebe schwindet mit Ausdehnung des Parenchyms (Abb. 1 b). Vom 11.—15. Versuchstag nimmt der Durchmesser der Alveolen um das 2—3fache zu. Die Drüsenepithelien enthalten große Fetttropfen, die in die Lumina abgegeben und von hier in die großen Milchgänge abtransportiert werden. Daher sind die Gänge ektatisch und zumeist sekretreich.

Der histochemische Calciumnachweis nach Voigt bringt in Gruppe 1 und 2 vereinzelt diffus verteilte, polarisationsoptisch doppelbrechende Kristalle zur Darstellung. v.Kossa-Reaktion negativ.

3. *DHT nach Vorbehandlung mit Östrogen und Progesteron* (Gruppe 3 und 4) bewirkt eine evidente Steigerung der sekretorischen Aktivität, die sich darin äußert, daß schon 1 Tag nach DHT-Applikation das Fettgewebe durch ein proliferierendes und verstärkt sezernierendes Drüsenparenchym weitgehend verdrängt wird. Die Lumina der Alveolen sind mikroskopisch stark erweitert, sekretreich, wobei sich runde große Fettkugeln von einem homogenen grauen Sekret abheben (Abb. 1 c). Stärker als ohne DHT zeigt sich in Alveolen und Gängen eine sog. Spiegelbildung (nach Richardson, 1948). Die Drüsenepithelien enthalten zumeist runde Fetttropfen und sind infolge Dehnung der Alveolen abgeflacht. Diese Veränderungen sind in Gruppe 3 mit der höheren DHT-Dosis von  $\frac{1}{2}$  mg pro 100 g Körpergewicht stärker ausgeprägt als in Gruppe 4. Vom 15. Versuchstag an besteht das Drüsengewebe aus dichtstehenden und weitgehend gleichmäßig diffe-

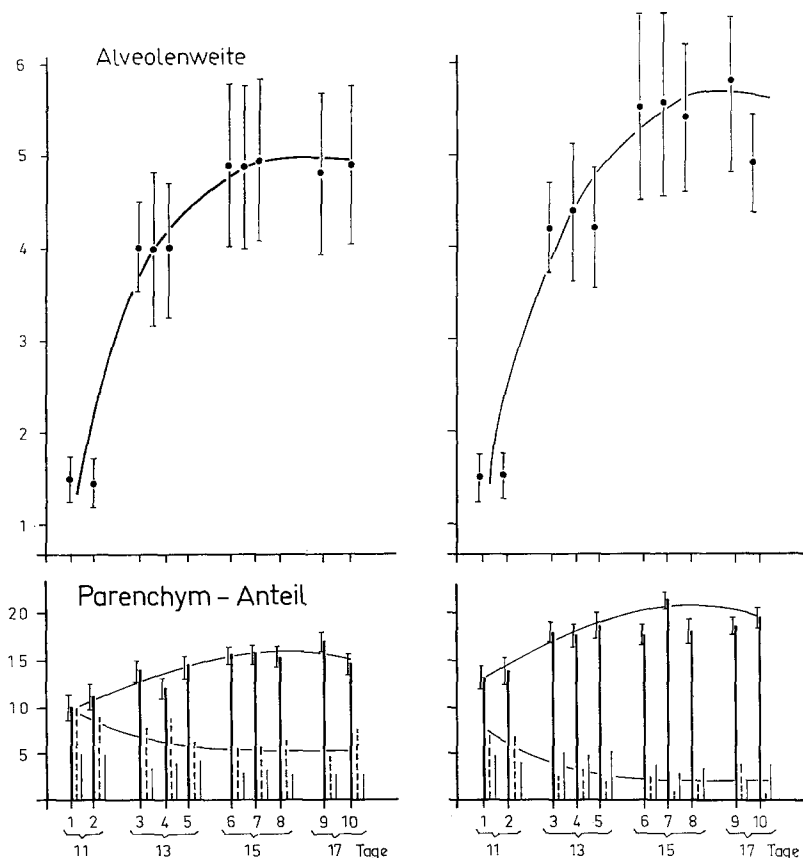


Abb. 3. Darstellung der Meßwerte von Alveolenweite und Parenchymanteil nach Östrogen-Progesteron-Behandlung (linke Seite) und unter zusätzlicher DHT-Wirkung (rechte Seite)

renzierten Alveolen, die einer laktierenden Mamma mit geringer Galaktostase entsprechen.

Der histochemische Calciumnachweis nach Voigt zeigt, daß das Sekret reichlich polarisationsoptisch doppelbrechende Kristalle enthält (Abb. 1 d). Stellenweise ergibt auch das Epithel und das Interstitium eine feinkörnige positive Reaktion. Schollige Kalkabscheidungen fehlen. Kossa-Reaktion negativ.

Die *DHT-Wirkung ohne* zusätzliche hormonale Stimulation (Gruppe 5 und 6) äußert sich in einer Proliferation und Ektasie des Gangsystems, in der Ausbildung von kleinen Drüsensprossen und in einer Vermehrung des circumductalen Bindegewebes (Abb. 2). Drüsenläppchen — wie in Gruppe 3 und 4 — bilden sich unter der alleinigen Wirkung von DHT bei unterschiedlicher Dosierung nicht aus. Die erweiterten Gangstrukturen enthalten mikroskopisch kein Sekret. Auch in den Epithelzellen ist eine Fettsynthese nicht nachweisbar. Bemerkenswert ist die Zunahme des Bindegewebes und der mesenchymalen Zellen in Stroma und Fettgewebe.

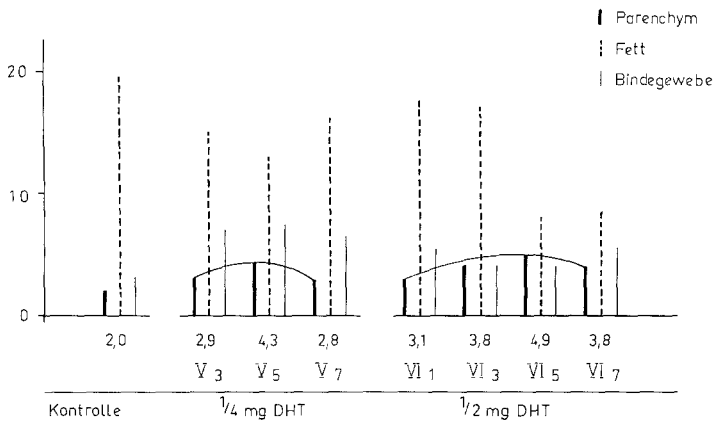


Abb. 4. Darstellung der Meßwerte von Parenchym, Binde- und Fettgewebe nach alleiniger DHT-Wirkung der angewendeten Dosierung im Vergleich zu den Kontrolltieren

Nach dem Voigtschen Nachweis ist freies Calcium in den proliferierten Parenchymschichten erfaßbar.

4. *Histometrische Untersuchungen.* Die mit Hilfe des Punkt-Zähl-Verfahrens ermittelten Treffer ergeben eine signifikante Vermehrung des Parenchymanteils unter dem Einfluß von DHT. Gleichzeitig ist eine Verminderung des Fett- und Bindegewebsanteils nachweisbar, die unter DHT wesentlich stärker ausgeprägt ist als nach alleiniger Östrogen-Progesteron-Behandlung. Die Meßwerte der Alveolenweite liegen im Vergleich zu Gruppe 2 nach DHT höher, sie erwiesen sich statistisch als nicht signifikant (Abb. 3). Gegenüber den Kontrolltieren lassen die Tiere nach alleiniger DHT-Applikation (Gruppe 5 und 6) einen dosisabhängigen Proliferationszustand des Parenchyms und des Bindegewebes erkennen, der am 5. Versuchstag am deutlichsten ist und am 7. Tag geringe Involutionerscheinungen zeigt (Abb. 4).

5. *Chemisch-analytische Untersuchungen.* Der Serum-Calcium-Spiegel schwankt bei Kontrolltieren und hormonbehandelten Ratten um 5 mval/l. DHT erzeugt eine Hypercalcämie mit Maximum am 3. Tag nach Applikation (Abb. 5). Das Ausmaß der Hypercalcämie ist dosisabhängig: bei höherer DHT-Dosis werden höhere Serum-Calcium-Werte gefunden.

Der Calciumgehalt des gesamten Brustdrüsengewebes bezogen auf das Trockengewicht beträgt nach 10 Tage dauernder hormonaler Stimulation 0,05 mval Calcium pro g Gewebe. Mit zunehmender sekretorischer Umwandlung der Drüse sinkt der Calciumgehalt pro g Gewebe ab.

Nach Östrogen-Progesteron-Behandlung und zusätzlicher DHT-Gabe beträgt der Gesamt-Calcium-Gehalt des Brustdrüsengewebes das 1,5fache und sinkt mit fortschreitender sekretorischer Umwandlung in gleicher Weise ab wie bei reiner Hormonbehandlung (Abb. 5).

Bezogen auf das Trockengewicht ist der Calciumgehalt bei DHT-Behandlung relativ größer als in bezug auf frisches Gewebe. Dies liegt an einer verstärkten Wassereinlagerung in das Mammagewebe bei DHT-Applikation. Aus DHT-behandelten Mammæ konnte 10% mehr Wasser abgedampft werden als bei reiner Hormonproliferation (Abb. 5).

6. *Elektronenmikroskopische Beobachtungen.* Im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren tritt unter der Wirkung von Östrogen und Progesteron eine Wandlung der Zellstruktur ein, die durch Merkmale der Proliferation und Sekretion gekennzeichnet ist (Lit. Bässler, 1970). Dabei ist die Cytomorphologie des Drüsenepithels vom 11.—17. Tage der Versuchsanordnung nahezu gleich. Am 13. und 15. Tag der Östrogen-Progesteron-Applikation (Gruppe 2) hat das Epithel kubische Formen und wölbt sich mit halbrunden oder kugelförmigen Fortsätzen in das Drüsenlumen vor. Das Cytoplasma ist ausgefüllt mit runden und ovalen Fett-

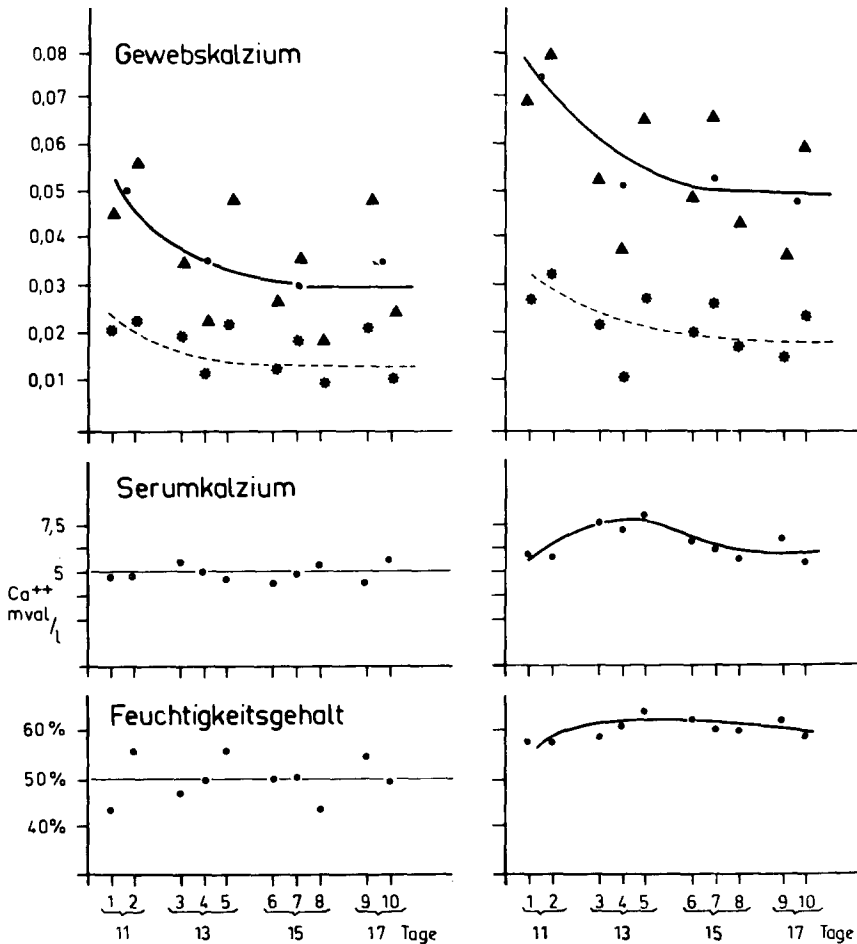


Abb. 5. Ergebnisse der chemischen Untersuchungen des Drüsengewebes nach Östrogen-Progesteron-Behandlung (linke Seite) und unter zusätzlicher DHT-Wirkung (rechte Seite)

tropfen, die als leere Aussparungen imponieren (Abb. 6). Deren Begrenzung ist scharf und wird nicht durch eine eigene Membran, sondern von Bestandteilen des Zellplasma gebildet. Hier befinden sich massenhaft freie und an das endoplasmatische Reticulum gebundene Ribosomen sowie Mitochondrien mit gleichmäßiger Cristastruktur und kontrastreicher Matrix.

In der Umgebung der Fetttropfen zeigen sich homogen-strukturierte und kontrastreiche Lysosomen. Daneben treten mit zunehmender Wirkungsdauer der Geschlechtshormone Cytosome unterschiedlicher Größe und Innenstruktur auf. Diese Einschlüsse sind solitär oder in kleinen Gruppen von 5—20 vorhanden und weisen wirbelförmig oder konzentrisch angeordnete Lipoidprotein-Lamellen auf, kleinere kontrastreiche Einheiten mit einer kontrastschwachen Matrix, wobei sich topische und pathogenetische Übergänge zu Fetttropfen ableiten lassen. Vereinzelt treten auch Cytosegrosomen hervor, die degenerierte Teile von Epithel-



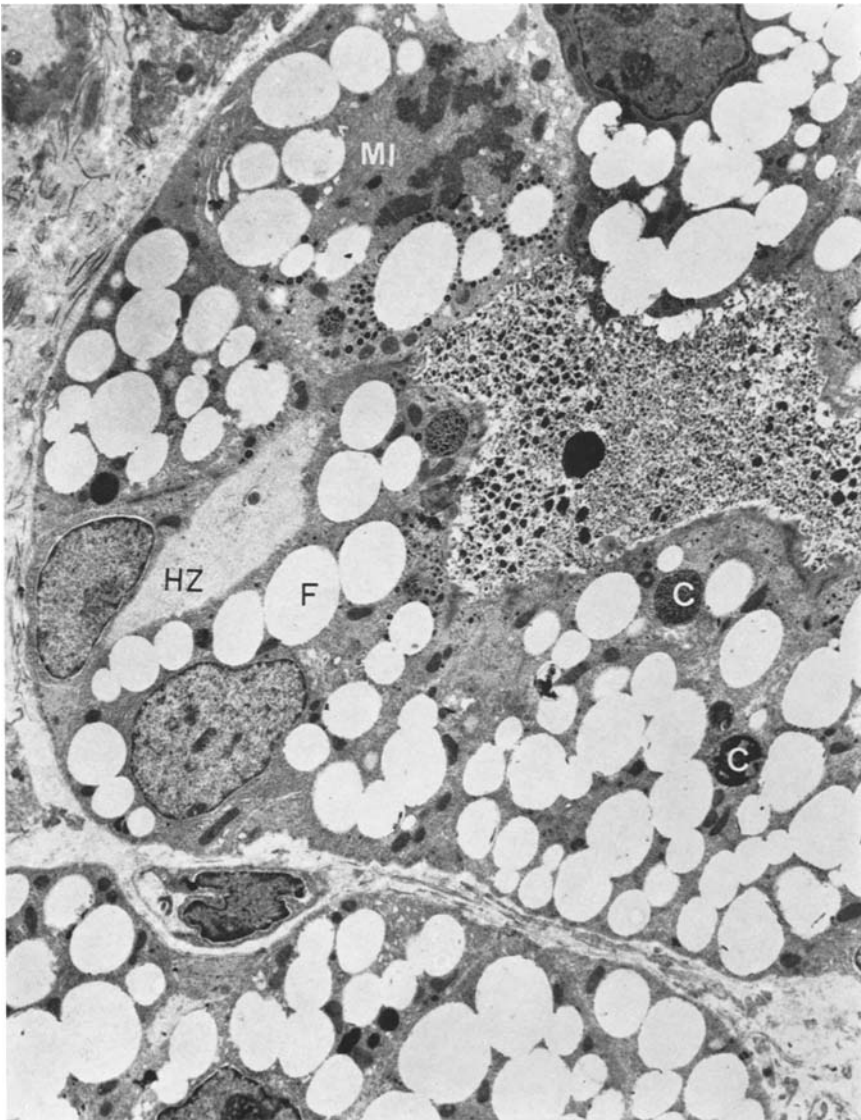


Abb. 6. Ausschnitt einer Drüsenalveole nach Östrogen-Progesteron-Behandlung am 15. Tag. Epithelzellen enthalten zahlreiche Fetttropfen (*F*), im apikalen Cytoplasma unterschiedlich gestaltete Cytosomen (*C*). Im Lumen ein kolostrales Sekret. Mitose am oberen Bildrand (*MI*), Anschnitt einer hellen Zelle (*HZ*). Archiv-Nr. 290/70; Vergr. el.-mikr. 2000, Abb. 4600

zellen mit Kernen und Ergastoplasma enthalten. — Die Golgi-Felder sind in der Regel klein, die Zisternen leer. Zeichen einer Synthese von partikulären Eiweißkörpern, die dem Casein entsprechen, wurden nicht nachgewiesen. — Das die Drüsenlumina ausfüllende, fein- und grobkörnige kontrastreiche Material weist weder die distinkten Formen des Caseins noch die ausgebildeter Milchfettkügelchen

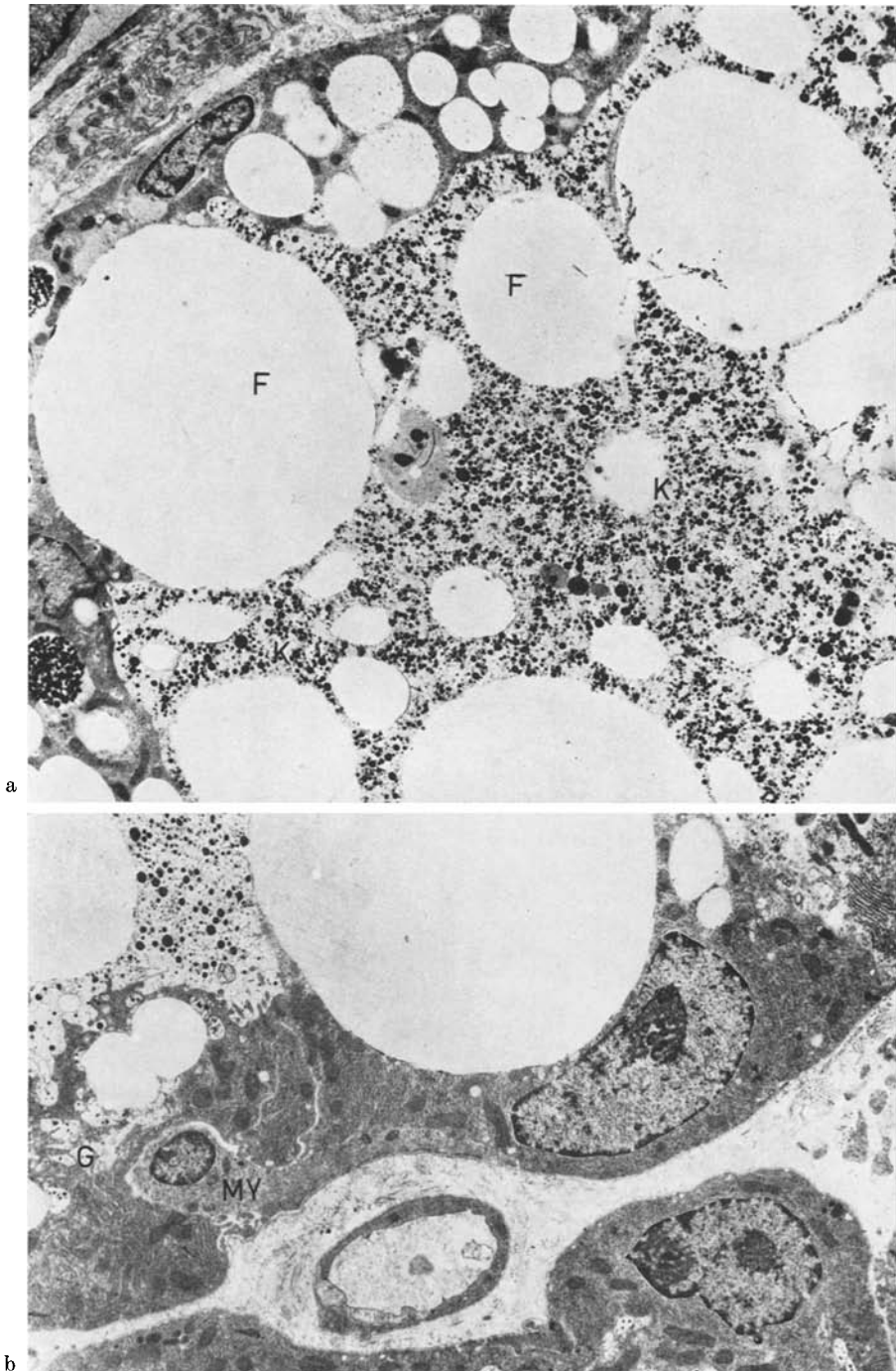


Abb. 7. a Drüsenalveole nach Östrogen-Progesteron-Vorbehandlung und 5tägiger Wirkung von DHT (15. Tag). Erweiterung des Drüsenlumens mit Ablagerung großer Fetttropfen (*F*) und Caseingranula (*K*). Das Epithel ist abgeflacht und zeigt reichlich kleinere Fetttropfen sowie Cytosome. Arch.-Nr. 332/70. Vergr. el.-mikr. 2100, Abb. 4830. b Drüsenepithelsaum mit starker Ausbildung des Ergastoplasmas und von Golgfeldern (*G*), die reichlich Caseingranula enthalten. Myoepithelzelle (*MY*). Arch.-Nr. 426/70, Vergr. el.-mikr. 2800, Abb. 6440

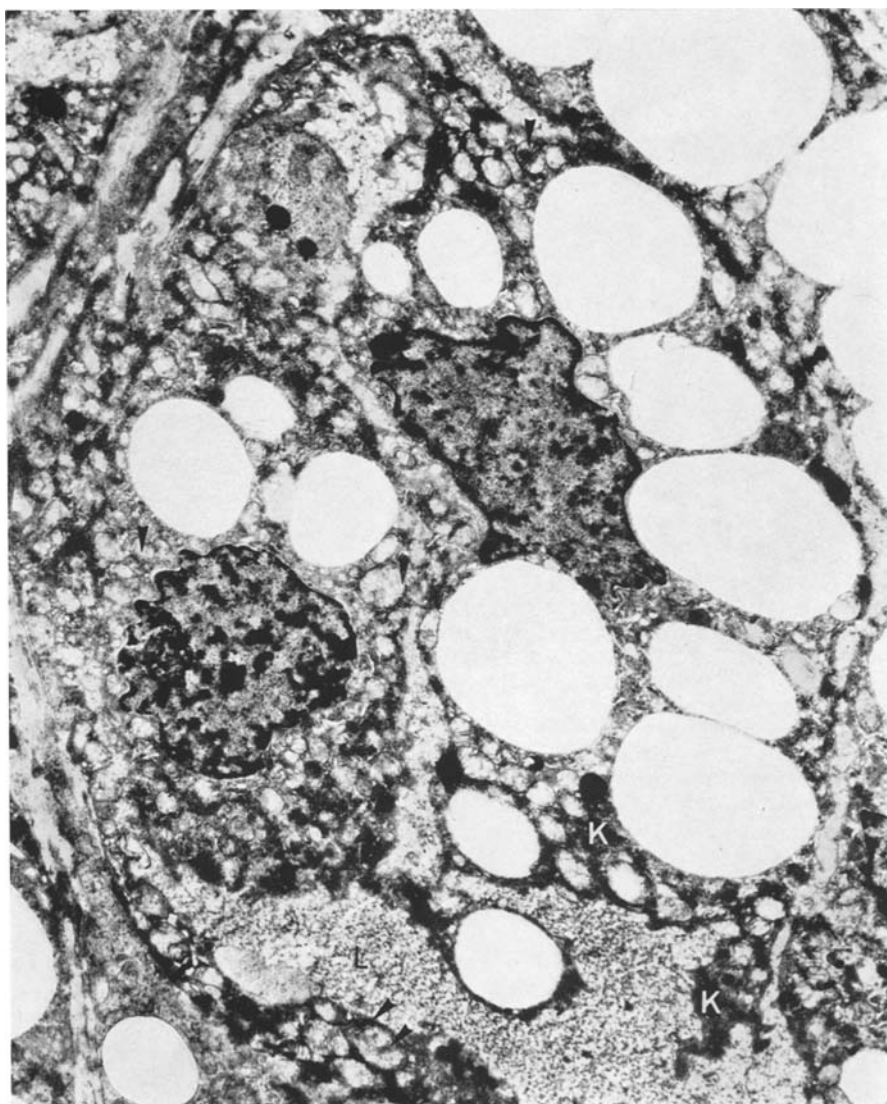


Abb. 8. Drüsenalveole mit diffuser Kalkabscheidung in Form eines kontrastreichen Materials (K). Daneben vermehrt Mitochondrien, vereinzelt in Teilung begriffen und von unterschiedlicher Größe und auffällig heller Matrix. Stellenweise intramitochondriale Ablagerungen (Pfeile). Im Drüsenlumen (L) kontrastreiches feinkörniges Sekret. Arch.-Nr. 427/70, Vergr. el.-mikr. 3200, Abb. 7360

auf. Morphologisch entspricht dieses Sekret einer dem Colostrum vergleichbaren wäßrig-flüssigen und einer durch osmiophile Partikel charakterisierten fettreichen Phase. — Die Zellkerne sind rund oder oval und werden durch die große Zahl der gebildeten Fetttropfen in der Zelle häufig deformiert. Die noch fortwährende Vermehrung des Epithels äußert sich in dem Auftreten von Mitosen (Abb. 6).

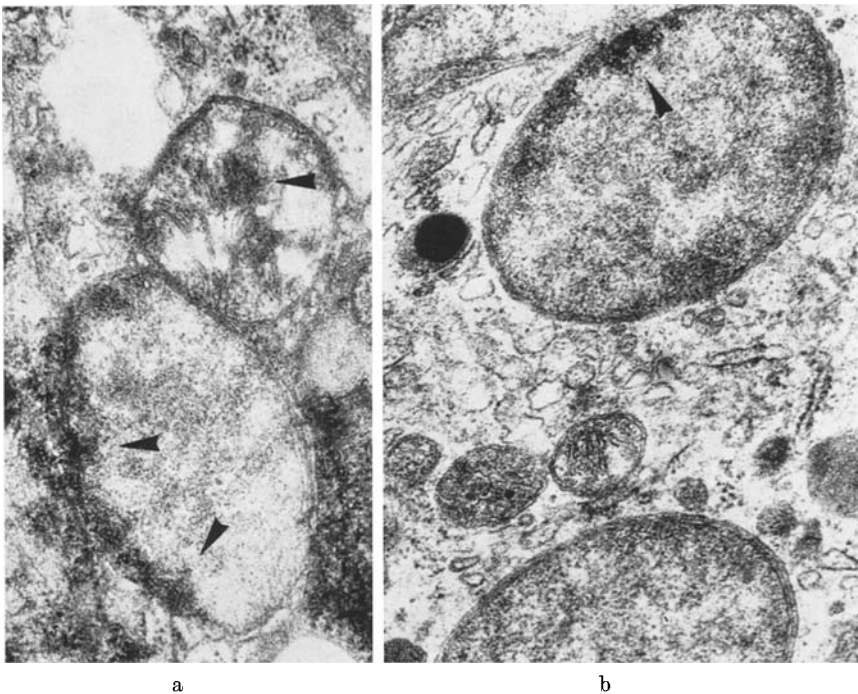


Abb. 9. Mitochondrien unterschiedlicher Größe aus Drüsen mit Kalkablagerungen nach Östrogen, Progesteron, DHT-Behandlung. a Kleines Mitochondrium mit erhaltener Cristastruktur und amorphen kontrastreichen Ablagerungen. Größeres Mitochondrion mit fehlender Cristastruktur und granulären Kalkablagerungen an und in der Außenmembran. Arch. Nr. 351/70; el.-mikr. Vergr. 12000, Abb. 27600. b Stark vergrößerte Mitochondrien mit Verlust der Cristastruktur und herdförmiger kontrastreicher Einlagerung an der Innenseite und Außenmembran. Arch.-Nr. 342/70, Vergr. el.-mikr. 15000, Abb. 27600

7. Die Wirkung von DHT nach Vorbehandlung mit Östrogen und Progesteron (Gruppe 3) äußert sich in einer quantitativen und qualitativen Veränderung der Sekretion mit Ausbildung großer Fetttropfen von 2—10  $\mu$  im Durchmesser, die, den Verhältnissen der Lactation entsprechend, von einem Plasmalemm umgeben und in das erweiterte Drüsenlumen abgegeben werden (Abb. 7). Die Ausfüllung des Lumens mit Sekret bewirkt eine Abflachung und Kompression des Epithels. Herdförmig sind die Zeichen einer akuten Sekretstauung und Auflösung von Epithelzellen feststellbar. — Anstelle des ungleichmäßig partikulierten Sekretes nach alleiniger Östrogen-Progesteron-Wirkung enthält nun das Sekret außer großen Fetttropfen zahlreiche 100—200  $\mu$  messende, weitgehend gleichmäßig beschaffene, kugelförmige Partikel, die dem Casein entsprechen (Abb. 7a). Dafür spricht die Erweiterung der Golgifelder, in denen diese Eiweiße synthetisiert werden, ferner eine herdförmige Vermehrung des Ergastoplasmas in den Zellen, in denen kleinere Fetttropfen zugunsten der Bildung großer Fetttropfen freigesetzt worden sind (Abb. 7b). In einem Teil der untersuchten Drüsenalveolen weisen die Epithelzellen ungewöhnliche, kontraststarke, feingranuläre Einlagerun-

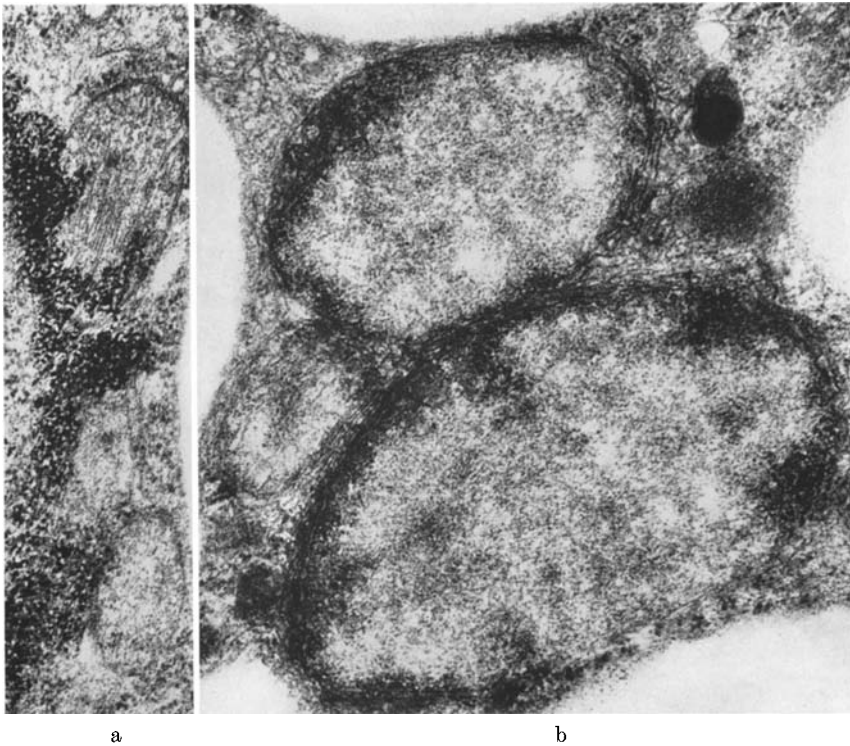


Abb. 10a u. b. Cytoplasmaausschnitte aus stark calcifizierten Arealen. a Granuläre-poly-cyclische Kalkabscheidung im Cytoplasma, örtlich auf das Randgebiet eines Mitochondriums mit erhaltener Cristastruktur übergreifend. Arch. Nr. 487/70. Vergr. el.-mikr. 15000, Abb. 34500. b Vergrößerte Mitochondrien mit aufgehobener Cristastruktur und starker Kalkablagerung an aufgesplitterten Außenmembranen und herdförmig in der marginalen Mitochondrien-Matrix. Arch.-Nr. 342/70; Vergr. el.-mikr. 15000, Abb. 34000

gen auf, die jeweils die Zellen der gesamten Alveolencircumferenz ausfüllen (Abb. 8). In diesen Zellen tritt ein unregelmäßiges und von den sekretorisch-aktiven Zellen unterscheidbares Kernmuster mit groben Chromatinschollen hervor. Auffällig ist vor allem eine Vermehrung von Mitochondrien unterschiedlicher Größe (500—3500  $\mu$ ), heller Matrix und reduzierter oder fehlender Cristastruktur. Gelegentlich finden sich Teilungsvorgänge der Mitochondrien (Abb. 8). Das Ergastoplasma dieser Zellen ist stark zurückgedrängt oder überlagert durch die Akkumulation eines kontrastreichen Materials. Bei starker Vergrößerung erweist sich dieses als fein- und grobgranulär, örtlich als nadelförmig-kristallin, das an cytoplasmatischen Membranstrukturen eines alterierten, zumeist glatten endoplasmatischen Reticulum und bevorzugt an den Innenflächen der Außenmembranen der Mitochondrien angelagert ist (Abb. 9, 10). Diese Außenmembranen sind in den größeren Mitochondrien bei gänzlicher Aufhebung der Cristastruktur vervielfacht (Abb. 10b). Von diesen Außenschichten greifen diese Abscheidungen herdförmig auf die Matrix über. Teilweise treten kontrastreiche Verdichtungen auch an den

erhaltenen Cristae auf (Abb. 9a, b). Die im Zellplasma befindlichen Fetttropfen erscheinen morphologisch nicht verändert. Das Drüsenlumen enthält feingranuläre, kontrastreiche Sekretionsprodukte, die sich von den oben beschriebenen Fettkugeln und Caseingranula unterscheiden (Abb. 8a).

### Diskussion

Die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen besagen, daß DHT auf das Drüsenparenchym stimulierend wirkt, indem es bei juvenilen, nicht kastrierten Tieren die Proliferation der Milchgänge und Sprossen anregt und nach Vorbehandlung mit Geschlechtshormonen einen evidenten sekretionsfördernden Impuls zeigt.

1. Der *proliferative Effekt* wird bei unbehandelten Tieren deutlich und ist histologisch einer mehrtägigen Östrogenapplikation vergleichbar. Dafür spricht die Proliferation und Ektasie der Gänge, die Vermehrung der Gangsprossen und die Ausbildung bindegewebiger Scheiden (Abb. 2). Zeichen einer Sekretion konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. Bei beiden Dosierungen von DHT reagieren die Drüsen ähnlich. Sie erreichen am 5. Tag das Maximum ihrer Ausbildung und bilden sich am 7. Tag allmählich zurück (Abb. 4).

2. Die *sekretionsfördernde Wirkung* des DHT ist eine synergistische, die erst nach Vorbehandlung mit Östrogen-Progesteron eintritt und histologisch wie histometrisch mit einer Vermehrung der Parenchymflächen, mit Ektasie der Drüsenalveolen und gesteigerter Sekretion verbunden ist (Abb. 1, 3). Die physiologische Bedeutung eines konstanten Parathormonspiegels für die Lactation geht aus Untersuchungen von Cowie und Folley (1961) hervor, wonach die Milchmenge nach Parathyreoidektomie abnimmt. DHT bewirkt nach Djojoseobagio und Turner (1964) eine verstärkte Lactation mit Mobilisation von Serumcalcium und in Kombination mit Geschlechtshormonen eine Stimulierung der Drüsenproliferation mit Erhöhung von DNS (v. Berswordt-Wallrabe und Turner, 1960). Ein sog. Absatzeffekt nach vorangehender Hormonbehandlung ist für die Wirkung des DHT auf die Drüsenzelle der Mamma deshalb unwahrscheinlich, weil sich Zellbild und Sekret unter dem Einfluß dieses Hormons quantitativ und qualitativ ändern: Die polytope intracelluläre Fettsynthese mit Abscheidung eines kolostralen Sekretes im Drüsenlumen nach Applikation von Geschlechtshormonen gewinnt unter DHT-Wirkung Aspekte einer Lactation mit Ausbildung großer Fettkugeln, Hervortreten eines rauen Ergastoplasmas und Golgifeldes, in dem Caseingranula ausgebildet werden. Demgemäß wandelt sich das Drüsensekret und enthält die in Abb. 7 dargestellten Bestandteile der Milch, die aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen über die Feinstruktur der Mamma lactans bekannt sind (Bargmann und Knoop, 1959; Bässler, 1961; Helminen und Ericsson, 1968).

Stimulierende Wirkungen einer akuten Hypercalcämie auf exokrine Drüsen sind aus pathophysiologischen Untersuchungen bekannt geworden: Die Syntropie *Hyperparathyreoidismus* und *Ulcera peptica ventriculi et duodeni* (in etwa 10%) konnte dadurch geklärt werden, daß die Hypercalcämie die Sekretion von Säure und Pepsinogen des Magens steigert (Ottenjann, Widmaier u. Demling, 1963; Ward, Adesola und Welbourn, 1964; Barreras und Donaldson, 1967).

Am Pankreas wiesen Goebell, Steffen, Baltzer, Schlott u. Bode (1972) bei Menschen mit normaler Enzymsekretion unter einer akuten Hypercalcämie eine Steigerung der Sekretion aller Enzyme um etwa 100% nach. Chronische Hypercalcämie bei Hyperparathyreoidismus kann dagegen zu Schädigungen der Enzymsekretion des Pankreas führen (Goebell, Horn, Bode u. Grossmann, 1970) und Voraussetzung für eine Pankreatitis werden (Seifert, 1965).

Für die Sekretion der *Speicheldrüsen* nach Acetylcholin-Reizung heben Douglas und Poisner (1962) die Bedeutung des Calciums als Stimulus hervor.

Aus der Pathologie der Brustdrüse des Menschen liegen im Schrifttum (Lit. Bässler, 1970) keine Mitteilungen über atypische Sekretionsvorgänge bei akuter oder chronischer Hypercalcämie vor.

Eine *Galaktorrhoea hypercalcaemica* bei einer 47 Jahre alt gewordenen Frau mit beidseitigen Cystennieren und tertiärem Hyperparathyreoidismus, chronischer Hypercalcämie und hochgradiger metastatischer Calcinose wurde im Path. Inst. Mainz (Sekt.-Nr. 494/71) beobachtet und wird ausführlich an anderer Stelle mitgeteilt: Die *Brustdrüsen* zeigten eine lobuläre Hyperplasie, Merkmale einer Sekretion, ektatische Gänge, die von Sekret ausgefüllt waren. Dieses gelbgraue Sekret floß beim Einschnneiden in die Brustdrüse reichlich ab und besteht aus einem fett- und eiweißhaltigen, histologisch eindeutig unterscheidbaren Anteil.

Die einer Induktion oder Stimulation der Drüsensekretion in der Mamma durch DHT zugrunde liegenden Mechanismen konnten durch die beschriebenen Versuche zwar nicht geklärt werden, zeigen aber zwei Angriffspunkte an: 1. Nach Gerlach und Themann (1965) löst DHT eine Steigerung der Capillarpermeabilität aus und erklärt die vermehrte Wassereinlagerung in das Drüsengewebe. Daß ein calciumreicher Saftstrom in die Drüsenzelle allein für die proliferative und sekretionsfördernde Wirkung verantwortlich zu machen ist, erscheint nach experimentellen Erfahrungen jedoch unwahrscheinlich. 2. Der mammotrope, östrogenähnliche Effekt auf die juvenile Mamma und Einfluß auf die Qualität der Sekretion nach hormonaler Vorbehandlung durch DHT weisen auf einen gemeinsamen Receptor in der Drüsenzelle hin. Dieser Sachverhalt kann durch die sterische Ähnlichkeit der Moleküle zwischen DHT und Sexualsteroiden erklärt werden.

In dieser Sicht könnte die infauste Prognose bei Mammacarcinomen mit therapieresistenter Hypercalcämie dahingehend gedeutet werden, daß die aus Mammacarcinomen von Gordan u. Mitarb. (1966) isolierten, osteolytisch wirkenden Sterole dem DHT verwandt und in der Lage sind, östrogenabhängige Carcinome in ihrer Progression zu forcieren.

3. Die experimentelle Hypercalcämie hat *herdförmige Calcifikationen in Alveolengruppen der sezernierenden Brustdrüsen* hervorgerufen, die den histochemisch nach Voigt (1957) erfaßbaren Ablagerungen von doppelbrechenden Kristalliten entsprechen. Elektronenmikroskopisch sind die kontrastreichen, feingranulären und angedeutet nadelförmigen Abscheidungen in den Epithelzellen der Drüsinalveolen nahezu gleichmäßig ausgeprägt und im Cytoplasma extramitochondrial in topischer Beziehung zu glatten Lipoproteidmembranen lokalisiert, die sie häufig überdecken. Sodann treten gleichartige Ablagerungen in stark vergrößerten Mitochondrien, und zwar entlang der gedoppelten oder vervielfachten Außenmembranen auf (Abb. 10b). Wenn auch nur selten die Cristae mitochondriales von Präcipitaten betroffen sind, so wird in diesen Untersuchungen als bevorzugter An-

griffs- und Deponierungsort der DHT-Wirkung die *Membranstruktur der Mitochondrien* (Außenmembran) und des *endoplasmatischen Reticulum* deutlich.

Die in zahlreichen Untersuchungen über die experimentelle Nephrocalcinose dargestellten, bis 2000 Å langen Apatitkristallnadeln (Caulfield und Schrag, 1964; Giacomelli, Spiro und Wiener, 1964; Gerlach und Themann, 1965) liegen in dieser Form in der Mamma weder extra- noch intramitochondrial vor. Überwiegend werden granulär-polycyclische Einlagerungen festgestellt, die nur in den Randzonen der Mitochondrien kurz-nadelige Formen erkennen lassen und hier an Apatit erinnern (Abb. 10a, b). Die von Caulfield und Schrag (1964), Duffy, Suzuki und Churg (1971) nach Calciumgluconat, von Giacomelli u. Mitarb. (1964) nach Vitamin D-Applikation beschriebenen amorphen und granulären Verkalkungen entsprechen den eigenen Befunden und zeigen somit Calciumphosphate und -carbonate an.

Die *Calcifikation in der Mamma* ist mit einer *Vermehrung, Schwellung und Crista-Atrophie der Mitochondrien* verbunden, die teilweise so zahlreich sind, daß sie das gesamte Cytoplasma ausfüllen (Abb. 8).

Gleichartige Reaktionen der Mitochondrien, und zwar bevor eine Calcifikation nach Calciumgluconat sichtbar wird, beschreiben Duffy u. Mitarb. (1971) im Tubulusepithel bei der akuten Calciumnephropathie. Dieses Verhalten der Mitochondrien ist auf eine Wasseraufnahme zurückzuführen, die mit einer Calciumfluxe gekoppelt ist, dem eine Präcipitation des Calciums an den inneren Membranen folgt (Greenawald, Rossi und Lehninger, 1964). Eine dadurch initiierte Hemmung der oxydativen Phosphorylierung führt nach Duffy u. Mitarb. (1971) zu Störungen in der Energieproduktion und damit zu Voraussetzungen tubulärer Zellnekrosen.

Die experimentellen Untersuchungen zur Pathogenese intramammärer Verkalkungen fügen sich in den Rahmen bisheriger Studien ein, die bevorzugt am Tubulusepithel der Niere vorgenommen worden sind. Die metabolische Ausgangslage eines Organs zum Zeitpunkt der DHT-Wirkung macht Besonderheiten in der Pathomorphologie der Calcifikation verständlich, die für die Mamma auf den gleichzeitigen Einfluß mammotroper Steroide zurückzuführen sind.

Die Interpretation der Versuchsergebnisse und des Schrifttums läßt die einleitend gestellten Fragen beantworten:

1. Die Wirkung von DHT auf die weibliche Mamma von Ratten zeigt sich bei juvenilen, nicht kastrierten Tieren in einer Proliferation von Milchgängen und Gangsprossen. Nach Östrogen-Progesteron-Behandlung hat DHT einen sekretionsfördernden Effekt mit Abgabe eines qualitativ der Lactation vergleichbaren Sekretes. Als Ausdruck der Mobilisation des Calciumstoffwechsels tritt eine herdförmige Calcinose der Mamma mit Calciumabscheidungen an Lipoproteidmembranen hinzu.

2. Hyperparathyreoidismus mit chronischer Hypercalcämie kann bei Menschen eine Galaktorrhoe auslösen. Mammacarcinome mit therapieresistenten Hypercalcämien haben eine besonders ungünstige Prognose und werden auf parathormon-ähnliche, osteolytisch wirkende Sterole als tumoreigene Wirkstoffe zurückgeführt.



## Literatur

- Bargmann, W., Knoop, A.: Über die Morphologie der Milchsekretion. I. Licht- und elektronenmikroskopische Studien an der Milchdrüse der Ratte. *Z. Zellforsch.* **49**, 344—388 (1959).
- Barreras, R. F., Donaldson, R. M., Jr.: Effects of induced hypercalcemia on human gastric secretion. *Gastroenterology* **52**, 670—677 (1967).
- Bässler, R.: Elektronenmikroskopische Beobachtungen bei experimenteller Milchstauung. Frankfurt. *Z. Path.* **71**, 398—422 (1961).
- Bässler, R.: Morphology of the hormone-induced structural changes in the mammary gland. *Curr. Top. Path.* **53**, 1—89 (1970).
- Berswordt-Wallrabe, R. v., Turner, W. C.: Dihydrotachysterol (AT 10) and mammaryogenesis in ovary-thyroid-parathyroidectomized rats. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **104**, 599—602 (1960).
- Brandt, G., Bässler, R.: Pathomorphogenese experimenteller Verkalkungen in der weiblichen Brustdrüse. *Virchows Arch. Abt. A* **348**, 139—154 (1969).
- Caulfield, J. B., Schrag, P. E.: Electron microscopic study of renal calcification. *Amer. J. Path.* **44**, 365—374 (1964).
- Chalkley, H. W.: Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. *J. nat. Cancer Inst. Bethesda* **4**, 47—53 (1943/44).
- Cowie, A. T., Folley, S. J.: The mammary gland and lactation in sex and internal secretions, vol. II, ed. by W. C. Young and G. W. Corner, p. 590—642. Baltimore: The Williams and Wilkins Co. 1961.
- Djojoseobagio, S., Turner, W. C.: Effects of parathyroid extract, dihydrotachysterol (Hytakerol) and calciferol on milk secretion in rats. *Endocrinology* **74**, 554—558 (1964).
- Douglas, W. W., Poisner, A. M.: Importance of calcium for acetylcholine-evoked salivary secretion. *Nature (Lond.)* **196**, 379—380 (1962).
- Duffy, J. L., Suzuki, Y., Churg, G.: Acute calcium nephropathy. Early proximal tubular changes in the rat kidney. *Arch. Path.* **91**, 340—350 (1971).
- Gerlach, M., Themann, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchung der metastatischen Calcifizierung. *Klin. Wschr.* **43**, 1262—1268 (1965).
- Giacomelli, F., Spiro, D., Wiener, J.: A study of metastatic renal calcification at the cellular level. *J. Cell Biol.* **22**, 189—206 (1964).
- Goebell, H., Horn, H. D., Bode, Chr., Grossmann, H. H.: Primärer Hyperparathyreoidismus und exokrine Pankreasfunktion der Enzym- und Elektrolytsekretion im Duodenalsaft. *Klin. Wschr.* **48**, 810—819 (1970).
- Goebell, H., Steffen, A., Baltzer, G., Schlott, K. A., Bode, Chr.: Stimulierung der Enzymsekretion im Pankreas durch akute Hyperkalzämie. *Dtsch. med. Wschr.* **97**, 300—201 (1972).
- Gordon, G. S., Cantino, T. J., Erhardt, L., Jansen, J., Lubich, W.: Osteolytic sterol in human breast cancer. *Science* **151**, 1226—1228 (1966).
- Greenawald, J. W., Rossi, C. S., Lehninger, A. L.: Effect of active accumulation of calcium and phosphat on the structure of rat liver mitochondria. *J. Cell Biol.* **23**, 21—38 (1964).
- Hayward, J.: Hormones and human breast cancer. *Rec. Res. Canc. Res.* **24**, 69—92 (1970).
- Helminen, H. J., Ericson, J. L.: Studies on mammary gland involution. 1. On the lactating mammary gland. *J. Ultrastruct. Res.* **23**, 193—213 (1968).
- Jessiman, A. G., Emerson, K., Shah, R. C., Moore, F. D.: Hypercalcaemia in carcinoma of the breast. *Ann. Surg.* **157**, 377—393 (1963).
- Martz, G.: Die hormonelle Therapie maligner Tumoren. Band 41, Heidelberger Taschenbücher. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1968.
- Myers, W. P. L.: Hypercalcemia in neoplastic disease. *Arch. Surg.* **80**, 308—318 (1960).
- Ottenjann, R., Widmaier, F., Demling, L.: Magensekretion bei akuter Hyperkalzämie und Hypermagnesämie. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **69**, 160—163 (1963).

172 G. Brandt und R. Bässler: Wirkung der experimentellen Hypercalcämie auf die Mamma

Richardson, K. C.: Some structural features of the mammary tissues. Brit. med. Bull. **6**, 123—129 (1948).

Seifert, G.: Die kalziphylaktische Pankreatitits. Virchows Arch. path. Anat. **338**, 319—331 (1965).

Voigt, G. E.: Ein neuer histotopochemischer Nachweis des Calciums (mit Naphthalhydroxamsäure). Acta histochem. (Jena) **4**, 122—131 (1957).

Ward, J. T., Adesola, A. O., Welbourn, R. B.: The parathyroids, calcium and gastric secretion in man and the dog. Gut **5**, 173—185 (1964).

Prof. Dr. R. Bässler  
Pathologisches Institut der Universität Mainz  
D-6500 Mainz, Langenbeckstraße 1  
Deutschland