

Elektronenmikroskopische Untersuchung krankhafter Verkalkungsherde in menschlichen Geweben*.

Von

F. Grasenick, A. Propst und M. Ratzenhofer.

Aus dem Physikalischen Institut der Technischen Hochschule und dem Pathologisch-Anatomischen Institut der Universität Graz.

Mit 6 Abbildungen.

(Eingelangt am 14. Mai 1952. Vorgelegt in der Sitzung am 5. Juni 1952.)

Eine sehr häufig sekundäre Veränderung der Gewebe bei Krankheiten aller Art ist die Verkalkung. Hierunter versteht man im medizinisch-morphologischen Sprachgebrauch das Auftreten von Calciumverbindungen in den geschädigten Geweben, ohne auf die chemische Zusammensetzung der jeweils vorliegenden Verbindungen näher eingehen zu wollen. Wenn wir im folgenden den Ausdruck „Verkalkung“ gebrauchen, so ist dies in diesem Sinne zu verstehen.

Morphologisch, im lichtmikroskopischen Präparat, äußert sich die „Verkalkung“ im Auftreten krümeliger bis feinkörniger, staubähnlicher Partikel, die durch Hämatoxylin blau gefärbt werden. Die histochemischen Methoden zur näheren Identifizierung der betreffenden Calciumverbindungen sind jedoch umstritten. „Die meisten Verfahren stellen keine eigentlichen Calciumnachweismethoden dar... einige sind eigentlich Phosphat- oder Sulfatreaktionen und geben positive Resultate nur an Orten, wo Calcium in Form von Calciumphosphat bzw. -sulfat vorliegt“¹. Bei vielen Methoden ist es außerdem schwierig oder unmöglich, das im Material nachgewiesene Calcium zu lokalisieren, das heißt seine Lage im Gewebe anzugeben. Das von *Scott* und *Packer* (1939) ausgearbeitete analytische Verfahren² gestattet zwar die Identifizierung und Lokalisie-

* Herrn Prof. Dr. G. Jantsch zum 70. Geburtstag gewidmet.

¹ *Fr. Roulet*, Methoden der pathologischen Histologie. Wien: Springer-Verlag. 1948.

² *D. Glick*, Techniques of Histo- and Cytochemistry. New York und London: Interscience Publ. 1949.

zung des Calciums im Gewebe, doch auch nur bei der für histologische Untersuchungen üblichen Vergrößerung und ohne über die Art der Calciumverbindungen Aufschluß geben zu können. Über die sublichtmikroskopische Feinstruktur der calciumhaltigen Stoffe und gleichzeitig über die Art der vorliegenden Calciumverbindungen bei der pathologischen Verkalkung herrscht bisher noch keine Klarheit.

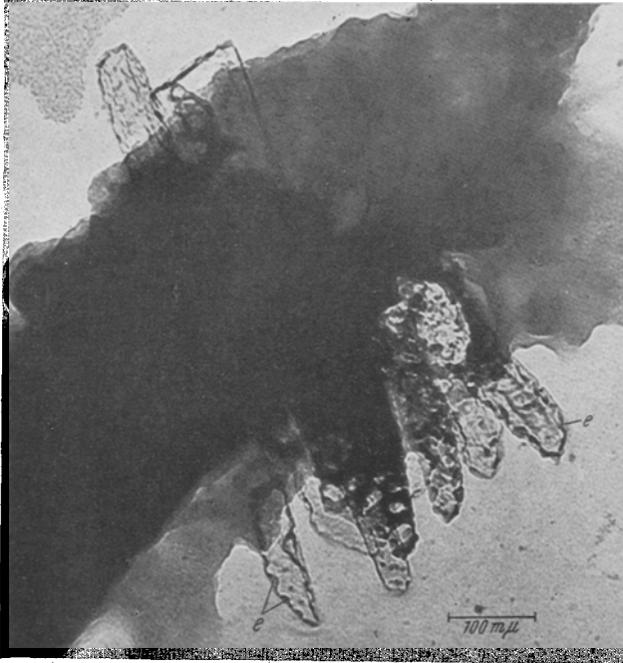


Abb. 1. Kalkherd der Lunge, Fall 1. Nativ. Büschelförmig angeordnete Kristallnadeln im nekrotischen Gewebe. e = Einbuchtungen an ihrer Oberfläche. za. 144 000fach ($\frac{4}{5}$).

Wir nahmen nun elektronenoptische Untersuchungen vor: 1. um die sublichtmikroskopische Form der in den „Verkalkungsherden“ vorliegenden calciumhaltigen Substanzen, 2. um gleichzeitig deren Lage im Gewebe kennenzulernen und schließlich, 3. um womöglich ihre chemische Zusammensetzung zu studieren.

Es standen uns zu diesem Zwecke 4 geeignete Fälle pathologischer Verkalkung zur Verfügung, und zwar Kalkherde aus Lungen und aus Lymphknoten. Das Material wurde bei der kurz nach dem Tode durchgeführten Obduktion gewonnen. Die orientierende histologische Voruntersuchung ergab in Gefrierschnittpräparaten jeweils eine fein-krümelige, bald gleichmäßige, bald ungleichmäßige Verkalkung nekrotischer Gewebsteile (Blaufärbung mit Hämatoxylin). Wir haben sodann einen

Teil der oben angegebenen speziellen histochemischen Kalkreaktionen ausgeführt. Ihr Ausfall war nach herrschender Auffassung so zu deuten, daß in den „Verkalkungsherden“ außer Calcium selbst, Calciumphosphat, Calciumcarbonat, Calciumsulfat sowie fettsaures Calcium enthalten sein könnten.

Methode: Von der Schnittfläche des *unfixierten* Anteiles der Herde, der also unmittelbar auf die histologisch überprüften Teile folgte, wurde

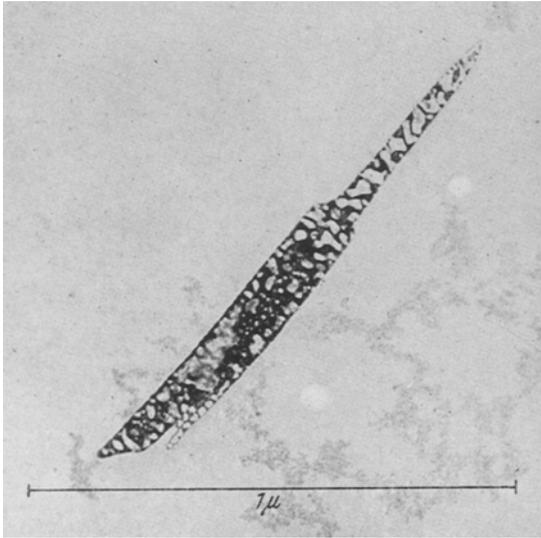


Abb. 2. Kalkherd der Lunge, Fall 1. Nativ. Freiliegende Kristallnadel mit deutlicher Innenstruktur. za. 72 000fach ($\frac{9}{10}$).

Material mit der ausgeglühten Platinöse abgestrichen, in destilliertem Wasser aufgeschwemmt, auf eine Blende gebracht und nativ, lediglich nach Auftrocknen untersucht.

Im *Lungenpräparat* (Fall 1, L. Oe. Nr. 1395/51, 34jähr. Frau) fanden sich, am besten bei 18000facher Vergrößerung, in den nekrotischen Gewebsformationen³ mehrfach einzelne bzw. in losen Büscheln liegende *Kristallspeieße* und *Nadeln* (Abb. 1). Diese Kristalle konnten außerdem auch völlig isoliert angetroffen werden (Abb. 2), so daß sie der Betrachtung leichter zugänglich waren. Am besten ließen sie sich im Dunkelfeld auffinden, in dem sie mehr oder weniger hell aufleuchteten. Ihre Oberfläche war teils glatt, teils mit seichten Einbuchtungen versehen (Abb. 1, e). Zum Teil waren die Kristalle völlig durchstrahlbar, zum Teil undurchstrahlbar, wobei sich ein eigenartiger, oft regelmäßiger Wechsel von hellen und dunklen Anteilen darbot. Zuweilen ergab sich eine Art Kammerung bzw. rundlich-

³ Systematische elektronenoptische Untersuchungen dieser Gewebsmassen führen wir seit längerer Zeit aus. Hierüber soll später berichtet werden.

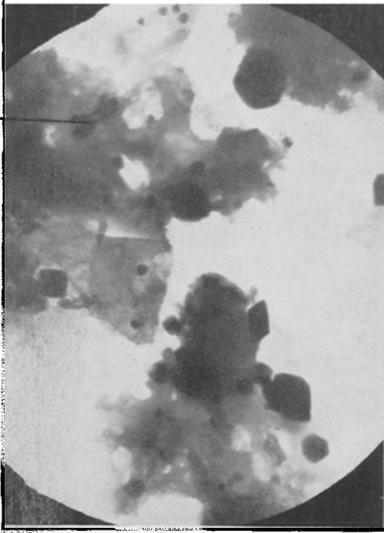


Abb. 3 a. Kalkherd der Lunge. Fall 2. Nativ. Zahllose, verschieden große kubische und nadelartige Kristalle im nekrotischen Gewebe. \times = Kristallaggregat. za. 4600fach ($9/10$).

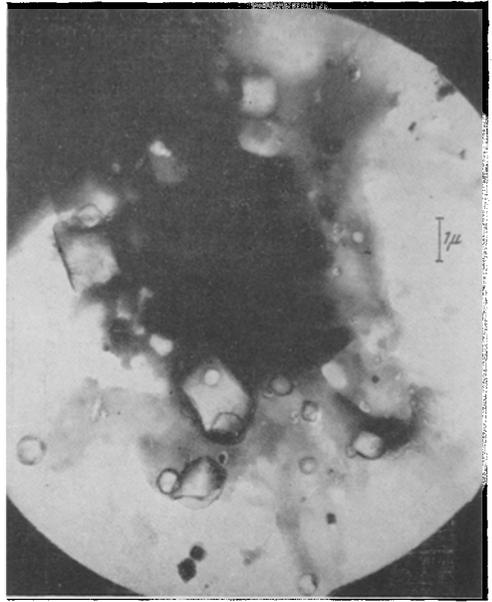


Abb. 3 b. Kalkherd der Lunge. Fall 2. So wie Abb. 5 a, nochmals mit Salzsäure 1 Std. behandelt. Zahllose, verschieden große kubische Kristalle im nekrotischen Gewebe (vgl. Abb. 3 a), völlig gelöst, teilweise gelöst, ungelöst. za. 6900fach ($4/5$).

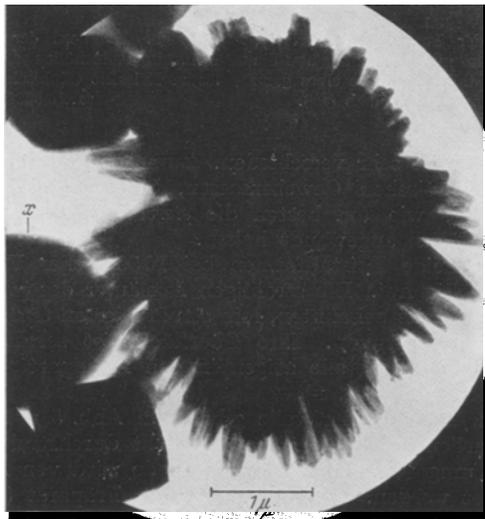


Abb. 4. Kalkherd der Lunge, Fall 2. Nativ. 4 würfelförmige Körper mit z. T. poröser Oberfläche, (x) und Aggregat aus Nadeln. za. 16 500fach ($4/5$).

poröse Struktur (Abb. 2). Ob es sich um eine Eigenstruktur oder um Veränderung durch Strahlung handelt, ist nicht entschieden. Doch vermuten wir ersteres, weil die Strahlungsdichte relativ sehr gering war.

Während uns im 1. Präparat nur Kristalle der beschriebenen Type begegneten, ergab ein anderes, gleichfalls nativ untersuchtes Lungenpräparat (Fall 2, L. Oe. Nr. 493/52, 80jähr. Mann) 2 verschiedene Kristallformen nebeneinander (Abb. 3 a): außer den schon bekannten Spießen und Nadeln, welche vielfach auch größere, ausgesprochen strahlig gebaute Aggregate (Abb. 3 a, x) bilden, überwiegend *kubische Körper* (Oktaeder und Würfel, siehe Abb. 3 bis 5), teils mit scharfen, teils mit abgerundeten Kanten und

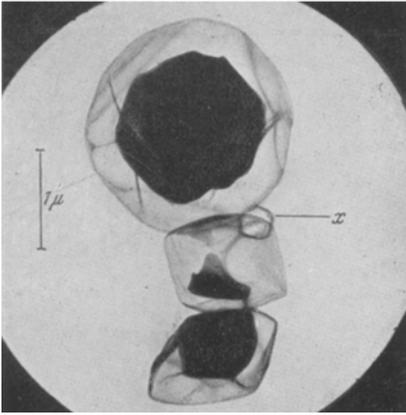


Abb. 5 a. Kalkherd der Lunge, Fall 2. Nativ, 10 Min. Salzsäureeinwirkung. Kohlehülle um die teilweise gelösten Kristalle. x = Hülle eines ganz gelösten Kristalls. za. 16 500fach ($\frac{4}{5}$).

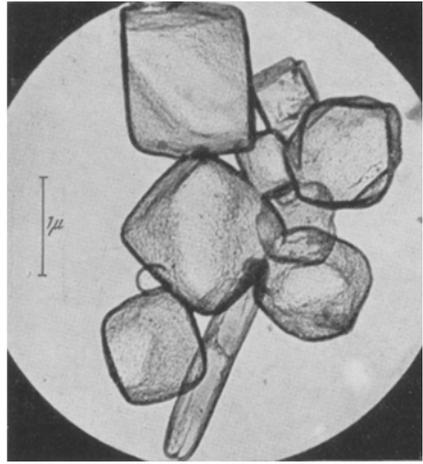


Abb. 5 b. Kalkherd der Lunge, Fall 2. So wie Abb. 3 b, Kohlehüllen an Stelle der völlig gelösten Kristalle (Kubische Formen, eine Nadel). za. 16 500fach ($\frac{4}{5}$).

Ecken. Ihre Größe ist sehr verschieden. Zumeist liegen sie in großer Zahl innerhalb der nekrotischen Gewebsmassen, in denen sie entstanden sind (Abb. 3 a und 3 b), wie am besten die *stereoskopische Betrachtung* zeigt, die wir in allen Fällen angewandt haben.

Abb. 4 bringt beide Kristallformen bei 16 500facher Vergrößerung; sie liegen hier fast völlig frei. Die strahligen Ausläufer des großen Aggregates lassen wieder die bereits bekannten, fein strukturierten und zum Teil durchstrahlbaren Nadeln erkennen. Ihre Oberfläche ist scharf begrenzt. Die anliegenden kubischen Kristalle zeigen in den Randpartien zum Teil eine fein-poröse Struktur (Abb. 4, x).

Über die *Oberfläche* der Kristalle gibt dann Abb. 5 näheren Aufschluß. Die Kristalle wurden zunächst mit einer leicht durchstrahlbaren strukturlosen *Kohlehülle* umgeben. Über diese Methode wird von F. Grasenick und R. Hefer berichtet werden. Hierauf wurde das Präparat (auf der gleichen Blende) mit 1 Tropfen 1%iger Salzsäure 10 Min. lang behandelt. Nach Waschen mit Aqua dest. zeigte die neuerliche Beobachtung, daß etwa die Hälfte der Kristalle unverändert war. Bei den übrigen hingegen war die

Kohlehülle, welche die ursprüngliche Form der Körper überzogen hatte und allen ihren Feinheiten folgte, deutlich zu sehen. Die äußeren Anteile waren durch die Salzsäure gelöst, die Zentren dagegen noch erhalten. Beim oberen großen Kristall ist zwischen seiner facettierten Kohlehülle und der Oberfläche des gelösten Restes ein breiter Zwischenraum entstanden, im kleinen Körper (Abb. 5 a, Mitte) war der ungelöste Rest nur gering. Von einem sehr kleinen Kristall war nur mehr seine Kohlehülle zu sehen, die Substanz ganz gelöst (Abb. 5 a, x). Um die Lösungsbedingungen der Kristalle weiter zu prüfen, wurden die gleichen Präparate nochmals der Säurebehandlung unterzogen, und zwar 1 Std. lang. Bei der folgenden Musterung im Elektronenmikroskop stellte sich heraus, daß einige Kristalle noch immer ungelöst waren, die übrigen waren teilweise gelöst, viele waren auch völlig

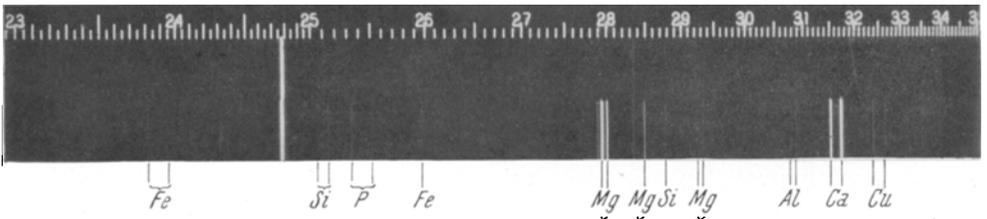


Abb. 6. Emissionsspektrogramm des Restmaterials von Fall 2.

Quantitativ: Calcium	100		
Phosphor	12—15	Kupfer	0,5
Aluminium	2	Eisen	0,5
Magnesium	1	Silizium	0,5

gelöst (Abb. 3 b). Bei weiterer mehrstündiger Salzsäurebehandlung lösten sich alle Kristalle. In beiden letzteren Fällen zeigte die unverändert erhaltene Kohlehülle den Umriß der Kristalle im nativen Zustand an (Abb. 5 b). Sie sind meist facettiert, ihre Oberfläche ist, der fein-porösen Struktur (Abb. 4) entsprechend, rau, wie chagriniert.

Um die Identifizierung der vorgefundenen Kristalle zu erleichtern, wurde vom Restmaterial des Falles 2 eine *spektralanalytische Untersuchung* vorgenommen. Ihr Ergebnis wird in Abb. 6 wiedergegeben.

Die histochemische und spektralanalytische Gesamtanalyse ergab überwiegend Calcium. Dieser Umstand und der Reichtum an Kristallen im elektronenoptischen Bild lassen schließen, daß die Kristalle Calciumverbindungen sind. Die ergänzende *kristallographische Untersuchung* konnte hierzu noch folgendes beitragen: die Nadeln und ihre Aggregate können sowohl Calciumcarbonat als auch Calciumphosphat entsprechen. Bei den kubischen Formen ist eine organische Calciumverbindung wahrscheinlich; unter anderem ist an organische Calciumverbindungen zu denken.

Kalkherde wurden nicht nur in Lungen, sondern auch in 2 *Lymphknotenpräparaten* nach histologischer Voruntersuchung elektronenoptisch betrachtet (Fall 3 und 4). In einem Lymphknoten der Luftröhrengabelung (Fall 3, L. Oe. Nr. 498/52, 75jähr. Frau) fanden sich gleichartige Kristalle wie im

Lungenpräparat Fall 2. In einem Halslymphknotenpräparat (Fall 4, L. Oe. Nr. 469/52, 61jähr. Frau) waren nur Nadeln der beschriebenen Art vorhanden.

Die genaue Zuordnung der einzelnen Kristallformen zu den histochemisch und spektralanalytisch nachgewiesenen Elementen ist durch elektronenmikroskopische Untersuchung in Verbindung mit der angeführten Umhüllungsmethode mit Kohlenstoff ohne weiteres möglich: sie gibt die Form und Oberflächenbeschaffenheit der Kristalle wieder, sie ermöglicht, besonders bei Betrachtung stereoskopischer Aufnahmen, die Lokalisation im Gewebe und sie gestattet überdies durch Anwendung spezifischer Lösungsmittel die chemische Identifizierung der Kristalle. Diese abschließenden Untersuchungen erfolgen später.

Zusammenfassung.

Über die bisherigen lichtmikroskopischen, histochemischen und die verschiedenen analytischen Untersuchungsmethoden hinausgehend, läßt die Elektronenmikroskopie weitere Aussagen über den pathologischen Verkalkungsvorgang zu. Es lassen sich nämlich mit dieser Methode in den pathologischen Verkalkungsherden sublichtmikroskopische Kristalle nachweisen. Hierbei sind nach dem kristallographischen Verhalten zwei verschiedene Typen von Kristallen zu unterscheiden. Ihre Löslichkeit mit Salzsäure konnte im Elektronenmikroskop unmittelbar verfolgt werden. Es wird eine Methode angegeben, nach der die Zuordnung der vorgefundenen Kristalle zu den in Frage kommenden chemischen Verbindungen möglich ist.

Wir danken Herrn Prof. Dr. *H. Lieb* (Vorstand des Medizinisch-Chemischen Institutes der Universität Graz) und Herrn Dr. *E. Neuwirth* (Mineralogisches Institut der Technischen Hochschule Graz) für ihre freundliche Unterstützung bei der Beurteilung der Kristallformen und Herrn Dr. *F. Pohl* (Institut für Biochemie und Mikrobiologie der Technischen Hochschule Graz) für die liebenswürdige Ausführung der Spektralanalyse.