

(Aus der III. chirurgischen Klinik der Kgl. ung. Pázmány-Péter Universität in Budapest. [Vorstand: Prof. L. Ádám].)

Der mikrotechnische Nachweis unlöslicher Kalksalze in den Geweben¹.

Von
G. Gömöri.

Mit 6 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 13. Juni 1932.)

Mit den bisher bekannten mikrotechnischen Methoden können die unlöslichen Kalksalze der Gewebe nur in dem Falle nachgewiesen werden, wenn das zu untersuchende Objekt nicht unschneidbar hart ist, also nur wenig oder sehr fein verteilte Kalksalze enthält. In diesem Falle gibt die Durchtränkung nach *Kóssa* oder nach *Roehl* recht lehrreiche Bilder. Wenn jedoch das Untersuchungsmaterial so hart ist, daß es nur durch Entkalkung schriftfähig gemacht werden kann, können wir die Kalksalze — die ja gerade durch die Entkalkung entfernt worden sind — nicht mehr untersuchen. Es gibt zwar Färbungen, die die Stelle der ausgelösten Kalksalze mehr oder weniger genau angeben, wie z. B. die gewöhnliche Hämatoxylinfärbung, welche die Kalksalze enthaltenen Gewebe dunkelfahlblau färbt oder die *Antonowsche* Safranin-Lichtgrünfärbung und noch einige andere, die, obgleich sie eine ziemlich gute Orientierung ermöglichen, zu genauen vergleichenden Untersuchungen ganz ungeeignet sind. Es wurde auch vorgeschlagen, auch harte Blöcke ohne Entkalkung zu schneiden; man wird da fast immer einige brauchbare Stückchen erhalten, die man nach *Kóssa* nachweisen kann. Hierzu bemerkt *Antonow* sehr treffend, daß wir in solchen Fällen die Kalksalze vielmehr durch die Scharten des Mikrotommessers, als durch die Färbung nachweisen.

Mit Hilfe des hier mitzuteilenden Verfahrens gelingt der histologische Kalknachweis selbst in unschneidbar harten Blöcken, und zwar in einer außerordentlich klaren und elektiven Weise. Somit wird ein verhältnismäßig wenig bekanntes Gebiet der normalen und pathologischen Histologie für die wissenschaftliche Forschung eröffnet.

¹ Vorgetragen gelegentlich der 1. Großversammlung der Ungarischen Pathologischen Gesellschaft am 6. und 7. Juni 1932.

Ich möchte mein Verfahren etwas ausführlicher beschreiben, als es bei neuen mikrotechnischen Methoden üblich ist, denn es gehört in jene recht kleine Gruppe der Verfahren, die — wenigstens was die Grundsätze anbelangt — auf einer systematischen chemischen Grundlage beruhen.

Das Grundprinzip ist das folgende: Die unlöslichen Kalksalze müssen schon im rohen Gewebsblock gefärbt oder durchtränkt werden, wonach wir den Block ruhig entkalken und nach der üblichen Weise verarbeiten können, der an Stelle der Kalksalze eingelagerte Farbstoff ergibt — falls die Reaktion elektiv und genügend quantitativ war — ein äquivalentes Bild im Sinne *Nissls*.

Zur Erreichung dieses Ziels erschienen die Silbersalze überaus geeignet. Der Kalkgehalt der Knochen und anderer, größtenteils pathologischer Kalkablagerungen besteht nämlich aus Calciumphosphat und zu geringerem Teile aus Calciumcarbonat. Da nun Silberphosphat viel weniger löslich ist als Calciumphosphat und Silbercarbonat etwas weniger löslich als Calciumcarbonat, können wir mit Recht erwarten, daß, wenn wir die kalkhaltigen Blöcke in eine Silbersalzlösung einlegen, zwischen den Kalk- und Silbersalzen eine Reaktion eintreten wird, indem an Stelle der Kalksalze, wenigstens des Phosphats, sich die entsprechende Silberverbindung einlagern wird, und zwar in umgekehrtem Verhältnis zu der Löslichkeit der Kalk-, bzw. Silbersalze. Daß dies auch der Fall ist, hat Ing. chem. *P. Spanyár* durch seine Versuche bewiesen. Er übergoß genau abgewogene Mengen von Calcium phosphoricum dibasicum „Kahlbaum“ mit einer n/10 Ag NO₃-Lösung in Überschuß. Das weiße Pulver nahm augenblicklich eine zitronengelbe Farbe an. Die Silberlösung wurde nach 2 Tagen titriert, wobei es sich herausgestellt hat, daß etwa 96% des Ca durch Ag verdrängt worden war. Das eingelagerte Silbersalz wird nun zu metallischem Silber reduziert, darnach die Kalksalze, die an der Reaktion nicht teilgenommen haben, durch Entkalkung entfernt. Die entkalkten Blöcke können wie üblich eingebettet und geschnitten werden. An Stelle der Kalksalze muß man schwarzes, metallisches Silber sehen.

Auf dieser Grundlage habe ich meine Versuche begonnen und nach Verarbeitung mehrerer hundert kalkhaltiger Blöcke (Knochen, sklerotische Gefäße, verkalkte Geschwülste, tuberkulöse Herde, usw.) ist es mir gelungen, das Verfahren auch in der Praxis zu verwirklichen. Den experimentellen Teil möchte ich übersichtshalber in der Reihenfolge der histologischen Arbeitsmethode behandeln.

1. Ausschneiden der Blöcke. Möglichst dünne (höchstens 1—2 mm dicke) Blöcke. Je dünner die Blöcke, umso schöner gelingt die Imprägnation. Das Innere dicker Blöcke bleibt ungefärbt.

2. Fixieren. Formalin von vornherein unzweckmäßig, weil es schon an und für sich die Silbersalze reduziert, und durch seinen stets vorhandenen Ameisensäuregehalt Kalksalze löst. Wegen der Säurelöslichkeit des Calciumphosphats natürlich

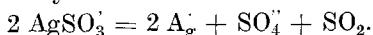
auch keine andere saure Fixierflüssigkeit möglich. Die Salze der Schwermetalle ebenfalls unbrauchbar, da auch ihre Phosphate unlöslich. Auch müssen sämtliche Chloride und Bichromate mit Rücksicht auf die spätere Versilberung vermieden werden. Somit bleibt nur der Alkohol (bzw. Aceton) und die Kochmethode. Beide Fixierverfahren gut brauchbar, ich ziehe aber den Alkohol vor. Eine Fixierung 2—3 Tage lang in 80—96%igem Alkohol hatte sehr gute Ergebnisse. Aceton wegen seiner stark schrumpfenden und härtenden Wirkung weniger zu empfehlen. Zum Aufkochen eine 2%ige Kaliumnitrat- oder 5%ige Alaunlösung in 20%igem Alkohol geeignet. Lösungen in destilliertem Wasser weniger gut, da diese Calciumphosphat merklich lösen (11 mg-%), während in 20%igem Alkohol die Löslichkeit (unter 1 mg-%, *Spanyár*) vernachlässigt werden kann. Das Aufkochen geschieht auf eine Weise, daß die Stücke in die siedende Flüssigkeit geworfen und 4—5 Min. lang darin gelassen werden.

Nach Fixierung Waschung der Blöcke in mehrmals gewechseltem destilliertem Wasser einige Stunden.

3. *Versilberung*. In 1,5%iger Silbernitratlösung unter Lichtabschluß 6—10 Tage bei Zimmerwärme. Konzentriertere Lösungen wirken schneller, bräunen jedoch die Blöcke. Höhere Temperatur von gleicher Wirkung. Man legt die Blöcke am zweckmäßigsten auf einen Wattebausch, um das gleichmäßige Eindringen der Silberlösung zu ermöglichen. Die Silberlösung soll mehrere Male durch frische Lösung ersetzt werden. Je reicher kalkhaltig, je härter die Blöcke, umso länger muß die Versilberung dauern. Die kalkhaltigen Teile der Blöcke nehmen in der Silberlösung innerhalb einiger Minuten eine lebhafte zitronengelbe Farbe an (Silberphosphat), welche nach einigen Tagen in helles Bräunlichgelb umschlägt. Das Untersuchungsmaterial darf jedoch, selbst in den kalkhaltigen Teilen, keine dunklere Farbe annehmen. Wenn es trotzdem zu dunkeln beginnt, was jedoch kaum vor 14 Tagen zu beobachten ist, muß die Versilberung beendet werden. Hiernach kommt die

4. *Wässerung*. Waschung 3—4 Tage lang, in täglich 4—5mal gewechseltem, reichlichem destilliertem Wasser unter Lichtabschluß, bis das zuletzt abgegossene Waschwasser mit Salzsäure überhaupt keine, oder nur eine gegen dunklen Hintergrund eben noch wahrnehmende geringste Opalescenz zeigt. Ungenügende Wässerung bewirkt schmutzige, körnige Bilder.

5. *Reduktion*. Folgende Stoffe versucht: photographische Entwickler (Metol, Hydrochinon, Pyrogallol, Amidol), Rongalit, Salvarsan, Dextrose, Formalin, Natriumnitrit, Natriumsulfit und Natriumhypophosphit. Von diesen wirken die photographischen Entwickler, Rongalit und Salvarsan zu heftig, sie reduzieren nicht nur die anorganischen Silbersalze, sondern auch die Albuminate, schwärzen den ganzen Block und arbeiten sehr schmutzig, fleckig. Dextrose selbst in alkalischem Medium ohne genügende Reduzierkraft. Im Formalin vereinen sich die Fehler der photographischen Entwickler und der Dextrose; es reduziert zu schwach und ist dabei nicht elektiv. Natriumnitrit reduziert überhaupt nicht. Natriumsulfit gibt tiefschwarze, recht elektive Bilder, es bildet sich jedoch sehr oft ein störender, schwarzer Niederschlag. Diese Erscheinung läßt sich damit erklären, daß ein Überschuß der Sulfitlösung das Silberphosphat unter Bildung des komplexen Anions AgSO_3^- löst. Dieses Anion ist zersetzblich, es schlägt daraus bald elementares Silber nieder, wobei sich Schwefeldioxyd bildet:



Die Reduktion des Silberkomplexes vollzieht sich natürlich auch in der Lösung und vom herausfallenden Silber werden die Blöcke verunreinigt. Das idealste Reduktionsmittel ist Natriumhypophosphit. Dieses reduziert mit vollkommen Elektivität nur das anorganische Phosphat und Carbonat, während die Albuminate gar nicht angegriffen werden. Dies umso bemerkenswerter, da Silberphosphat im Proberröhrchen, bei Anwendung reiner Chemikalien, auf diese Weise nur sehr schwer reduzierbar. Wenn wir auf chemisch reines Calciumphosphat niedergeschlagenes Silberphosphat im Röhrchen mit einer Hypophosphatlösung übergießen, werden wir tagelang nichts beobachten können, nur später beginnt die Schwärzung und schreitet sehr langsam fort. Es ist auch schon *Kóssa* aufgefallen, daß das aus reinem Calciumphosphat hergestellte Silberphosphat sich anders benimmt als das aus dem Calciumphosphat der Gewebe hergestellte, indem dieses unvergleichlich lichtempfindlicher ist, als jenes. Er hält es für möglich, daß die von ihm beschriebene Reaktion vielleicht gar nicht von den Phosphaten, sondern von den verunreinigenden Albuminaten herrührt. Die Frage läßt sich nicht leicht entscheiden, jedenfalls ist es eine Tatsache, daß man die eben beschriebene Reaktion in Versuchsröhrchen durch Zusatz von Serum nicht wesentlich beschleunigen kann (eigener Versuch). Am wahrscheinlichsten noch, daß es sich hier um Unterschiede der Dispersität handelt. Es ist z. B. zur Genüge bekannt, daß die Lichtempfindlichkeit von Bromsilberemulsionen stark von ihrem Dispersitätsgrad abhängt.

Das Hypophosphit (Natrium hypophosphorosum cryst.) wird in einer möglichst frisch zu bereitenden 5%igen Lösung angewendet. Vor Gebrauch setzen wir 100 ccm der Lösung 4—5 Tropfen n/10-Natronlauge zu, um die schwach saure Wirkung des Hypophosphits zu unterbinden (Silberphosphat wird schon von schwachen Säuren merklich gelöst!). Die elektive Schwärzung der kalkhaltigen Teile der Blöcke wird nach etwa $\frac{1}{2}$ Stunde merkbar, und die Reaktion ist, je nach der Dicke der Blöcke, in 4—6 Tagen beendet. Natürlich muß die Flasche vor Licht geschützt bleiben. Zuweilen bräunt sich die Hypophosphatlösung und ist in diesem Falle durch frische Lösung zu ersetzen. Trüben darf sie sich jedoch keinesfalls, selbst nicht im geringsten Grade. Wenn sie sich trotzdem trüben würde, so ist dies ein Zeichen dafür, daß die Blöcke nach der Versilberung nicht tüchtig genug ausgewaschen wurden. In solchen Fällen bekommen wir schmutzige Bilder. Die Blöcke ändern übrigens ihre Farbe während der Reduktion nicht, abgesehen von den kalkhaltigen Teilen, die sich schwärzen. Nach der Reduktion folgt wieder

6. *Wässerung* in fließendem Wasser, 3—4 Stunden lang, nachts oder in der dunklen Kammer.

7. *Fixieren* 2 Tage lang in mehrfach gewechselter 3—5%iger Natriumthiosulfatlösung, unter Lichtabschluß. Damit sind die nicht reduzierten Silbersalze entfernt worden, die Blöcke lichtunempfindlich gemacht und können hinfest bei Tageslicht weiterbehandelt werden.

8. *Auswaschen* in fließendem Wasser wenigstens 24 Stunden lang.

9. *Entkalkung*. Zu diesem Zwecke natürlich Säuren, die das Silber angreifen (Salpetersäure, in geringerem Grade auch Salzsäure), nicht anwendbar. Sehr geeignet eine 6—8%ige Lösung von Sulfosalicylsäure, welche auf meinen Vorschlag in dem I. Universitätsinstitut für pathologische Anatomic in Budapest seit Jahren

mit sehr befriedigendem Erfolg angewendet wird. Diese greift das Silber nicht an und hat dabei den Vorzug, daß sie die Kernfärbung kaum beeinträchtigt. Die

Entkalkung dauert 1 bis 3 Tage, je nach der Dicke und Härte der Blöcke. Es ist zweckmäßig die Säurelösung 1—2 mal durch frische Lösung zu ersetzen. Nach der Entkalkung werden die Blöcke noch einmal in fließendem Wasser gründlich ausgewaschen.

Dies war das eigentliche Verfahren. Hiernach sind die Blöcke auf die übliche Weise einzubetten und zu schneiden. Die Schnitte lassen sich mit den meisten gebräuchlichen Färbungen tadellos färben.

In den fertigen Schnitten erscheint der Kalk tiefschwarz, mit fast bei spielloser Schärfe auf ganz ungefärbtem Grunde. Manchmal sehen wir die bizarren Zeichnungen: Auf die Bindegewebszüge meistens senkrecht eingestellte, miteinander parallel liegende, plumpe Scheiben, die durch haarfeine, rankenähnliche oder astartig verzweigende Fortsätze verbunden sind; anderes mal spinnen- oder tau sendfüßerartige Figuren; oft nur amorphe Körner (Abb. 1—6). Hier möchte ich erwähnen, daß nach *Schmorl* das Verfahren von *Kóssa* zum feineren

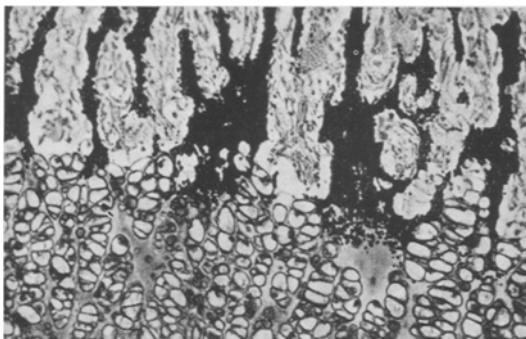


Abb. 1. Untere Femurepiphyse eines Neugeborenen.
50 mal.



Abb. 2. Sklerotischer Herd in der Art. femoralis. 120 mal.



Abb. 3. Ein Teil der vorigen Abbildung. 350 mal.

Studium der Kalkstrukturen ungeeignet ist, weil das Silberphosphat krystallinisch niederschlägt. Diese Behauptung scheint jedoch nicht

stichhaltig zu sein, denn schon die erwähnten sehr feinen Ranken sprechen gegen den Aufbau aus größeren Krystallen. Übrigens haben wir ja auch die *Golgische Imprägnation*, welche auf Bildung eines Silberbichromatniederschlages beruht. Wenn man unter dem Mikroskop auf dem Objektträger je einen Tropfen Silbernitrat- und Kaliumbichromatlösung zusammenfließen läßt, kann man leicht beobachten, wie grobkristallinisch der Niederschlag ausfällt. Trotzdem würde es niemandem einfallen, das *Golgische Verfahren*, dem die Neurohistologie ihre glänzendsten Errungenschaften zu verdanken hat, nur deshalb für feinere Untersuchungen als ungeeignet zu bezeichnen.

Ich erwähne auch einen Fehler des Verfahrens und dieser ist das geringe Eindringungsvermögen der Versilberung. Es kommt selbst bei 14tägiger Versilberung häufig vor, daß von größeren kalkhaltigen Balken nur ein mehr oder weniger breiter Randstreifen durchtränkt ist, während die Mitte ungefärbt bleibt. Die Ursache davon ist wahrscheinlich darin zu suchen, daß die auf der Oberfläche der kalkhaltigen Teile sich bildende Silberphosphatmembran das weitere Eindringen der Silberlösung verhindert. Eine ähnliche Erscheinung läßt sich auch bei kurz in Alkohol



Abb. 4. Verkalkendes Fibrochondrosarkom des Oberschenkelcondylus. 50 mal.

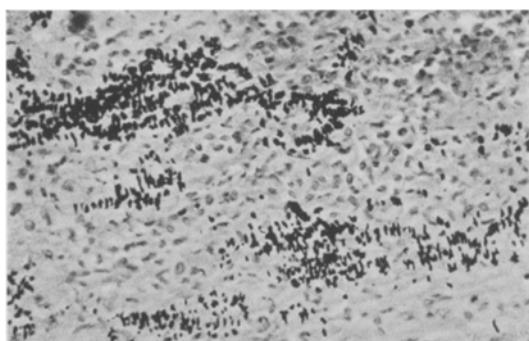


Abb. 5. Ein Teil der vorigen Geschwulst. 100 mal.

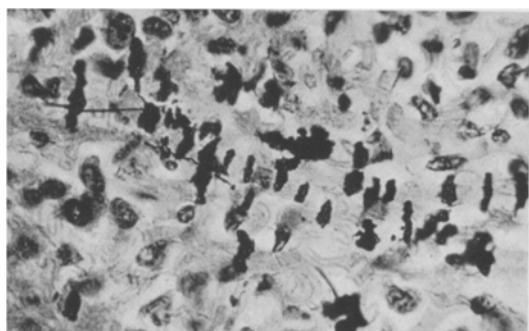


Abb. 6. Ein anderer Teil derselben Geschwulst. 300 mal.

fixierten Knochen bei Hämatoxylinfärbung wahrnehmen, es zeigt nämlich nur eine schmale Randschicht die kennzeichnende dunkelfahlblaue Färbung. *Schmorl* führt dies auf eine chemische Ursache zurück, er gibt jedoch zu, daß diese Erklärung nicht vollkommen zufriedenstellend ist. Daß bei meinem Verfahren in der Tat bloß ein ungenügendes Eindringungsvermögen der Silberlösung vorliegt, wird von den folgenden Tatsachen bewiesen: 1. Je länger man durchtränkt, umso breiter wird die geschwärzte Schicht. 2. Daß es sich nicht um das ungenügende Eindringen des Reduzenten handelt (was infolge der sich bildenden, wahrscheinlich äußerst wenig durchgängigen Silbermembran sehr wohl möglich wäre), habe ich dadurch bewiesen, daß ich zahlreiche Blöcke 3—14 Tage lang der Versilberung unterzog. Die eine Hälfte derselben habe ich nach der beschriebenen Weise im Block reduziert, die andere Hälfte nach entsprechendem Auswaschen mit Salzsäure entkalkt. Dadurch wurde das Silberphosphat in Silberchlorid überführt. Die eingebetteten Blöcke habe ich geschnitten, das Silberchlorid im Schnitt mit Hydrochinon zu metallischem Silber reduziert. Es zeigte sich zwischen den nach meinem Verfahren verarbeiteten und den mit Salzsäure entkalkten Präparaten kein anderer Unterschied, als daß die letztgenannten recht schmutzig, körnig waren; in der Breite der durchtränkten Zone jedoch konnte ich keine Unterschiede feststellen. Daß das Eindringen der Salzsäure ein vollkommenes war, bewies die tadellos gelungene Entkalkung.

Den beschriebenen Schönheitsfehler kann man jedoch nicht für einen schwerwiegenden Mangel halten. Einerseits beschäftigen den Pathologen vielmehr die Randteile der Herde, wo die Verkalkung bzw. die Aufsaugung im Gange sind und nicht die mittleren Teile, wo man häufig nur tote Substanz findet; anderenteils ist das Silberbild schon an der Grenze der nicht durchtränkten Mitte so dicht und undurchsichtig schwarz, daß man da selbst bei vollständig gelungener Färbung gar keinen Bau wahrnehmen könnte.

Zum Schluß wollte ich noch bemerken, daß das beschriebene Verfahren sehr geeignet ist, Kalksalze in makroskopischen pathologisch-anatomischen Präparaten zu zeigen (osteoplastische Geschwülste usw.). Ausgeschnittene, bzw. ausgesägte Scheiben werden in Alkohol fixiert, für einige Stunden in die Silberlösung gelegt, bis die starke zitronengelbe Färbung eingetreten ist, da nach in destilliertem Wasser gründlich ausgewaschen und in der Hypophosphitlösung 24 Stunden lang reduziert. Nach Fixierung in Thiosulfatlösung können die Scheiben in jeder gebräuchlichen Lösung aufbewahrt werden. Die kalkhaltigen Teile treten auf naturfarbigem Grunde durch ihre Schwärze sehr scharf hervor.

Zusammenfassung des Verfahrens.

1. Ausschneiden sehr dünner (1—2 mm dicker) Blöcke.
2. Fixieren in 80—96%igem Alkohol (eventuell Kochen in den erwähnten Lösungen), darnach wässern in destilliertem Wasser 3—4 Stunden lang.
3. Versilbern in 1,5%iger Silbernitratlösung 6—10 Tage lang. Die Lösung soll einige Male erneuert werden.
4. Auswaschen 3—4 Tage hindurch in täglich 4—5 mal gewechseltem destilliertem Wasser, bis das zuletzt abgegossene Waschwasser mit Salzsäure keine Trübung gibt.
5. Reduktion in einer 5%igen Natriumhypophosphatlösung. Vor Gebrauch setzt man 100 ccm der Lösung 4—5 Tropfen n/10-Lauge zu. Dauer der Reduktion 4—6 Tage.
6. Auswaschen in fließendem Wasser, 3—4 Stunden.
7. Fixieren in mehrmals gewechselter 3—5%iger Natriumthiosulfatlösung, 2 Tage.
8. Auswaschen in fließendem Wasser wenigstens 24 Stunden lang.
9. Entkalkung in 6—8%iger Sulfosalicylsäure, 1—3 Tage. Wässerung, Einbettung usw.
- 3.—7. sollen unter Lichtabschluß geschehen.

Endlich will ich noch erwähnen, daß die nach meinem Verfahren hergestellten sowohl mikro- als auch makroskopischen Präparate außerordentlich haltbar sind, sie vertragen selbst unmittelbaren Sonnenschein während langer Zeit ohne Schaden.

Schrifttum.

- Antonow:* Eine einfache Methode für histologischen Kalknachweis. Z. Mikrosk. **43**, 243. — *Kóssa:* Nachweis von Kalk. Beitr. path. Anat. **29**, 163. — *Schmorl:* Die pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden. 1928. — *Schuszik:* Über die Methoden zum mikroskopischen Nachweis von Kalk. Z. Mikrosk. **37**, H. 3. — *Stöltzner:* Über Metallfärbung verkalkter Gewebe. Virchows Arch. **180**.
-