

Der Nachweis von Calcium-Phosphat in der Herzmuskulatur mittels Röntgenmikroanalyse

W. Mohr, J. Hersener und K. Lossnitzer

Abteilung Pathologie II des Zentrums für Biologie und Theoretische Medizin
der Universität Ulm,
AEG-Telefunken Forschungsinstitut in Ulm und Sektion für Cardiologie und Angiologie
des Zentrums für Innere Medizin und Kinderheilkunde der Universität Ulm

Eingegangen am 18. August 1972

The Detection of Calcium Phosphate in the Myocardium by X-Ray Microanalysis

Summary. The myocardia of myopathic hamsters were examined by means of energy-dispersive X-ray microanalysis. The integrated X-ray spectrum exhibits high peaks in the range of the K_{α} -lines for phosphate and for calcium. The localization of these elements in the tissue was subsequently established by line scan. A high counting rate for both elements was detected in the area of the mineral salt deposits visible by light microscopy. The studies establish the possibility of detecting deposits of foreign substances consisting of elements with a higher number than 11 in the table of elements quickly and accurately by energy-dispersive X-ray microanalysis.

Zusammenfassung. Die Herzmuskulatur von myopathischen Hamstern wurde mittels energiedispersiver Röntgenmikroanalyse untersucht. Das integrale Röntgenspektrum ergab hohe Peaks im Bereich der K_{α} -Linie des Phosphors und des Calciums. Für diese beiden Elemente wurde anschließend mit „line scan“ die Lokalisation im Gewebe ermittelt. Es wurde dabei für beide Elemente eine hohe Zählrate im Bereich von lichtmikroskopisch sichtbaren Mineralsalzablagerungen gemessen. Aus den Untersuchungen geht hervor, daß es mit der energiedispersiven Röntgenmikroanalyse in kurzer Zeit möglich ist, eindeutige Aufschlüsse über Ablagerungen von Elementen mit einer Ordnungszahl größer als 11 im Gewebe zu erhalten.

In der Herzmuskulatur des myopathischen syrischen Goldhamsters (BIO 8262) treten nach dem 30. Lebenstag herdförmig vorwiegend in Riesenzellen gelegene Mineralsalzablagerungen auf (Mohr u. Mitarb.). Die Ablagerungen ergeben einen positiven Reaktionsausfall bei der Färbung mit Silbernitrat nach Kossa. Dieser positive Reaktionsausfall spricht jedoch lediglich für die Gegenwart von Phosphorverbindungen, da mit der Kossaschen Reaktion nur das Phosphor erfaßt wird (Eger, 1963).

Neben den verschiedenen physikalischen Methoden, die heute zur Identifizierung von Mineralsalzen im Gewebe angewandt werden (s. Engström, 1963), bietet sich zur schnellen qualitativen Mineralsalzbestimmung und deren Lokalisation im Gewebe die Röntgenmikroanalyse an (Hall und Höhling, 1969; Cosslett und Hall, 1971). Herbst u. Mitarb. (1971) konnten auf diese Weise Calciumablagerungen in der menschlichen Placenta nachweisen. In den vorliegenden Unter-

suchungen versuchten wir, die Mineralsalzablagerungen in der Herzmuskelkultur näher zu charakterisieren.

Material und Methode

Von der in neutralem Formalin fixierten Herzmuskelkultur wurden nach Einbettung in Paraffin 10 µm dicke Schnitte hergestellt. Diese Schnitte wurden auf quadratische Glasobjektträger mit einer Kantenlänge von 1 cm aufgezogen. Nach Entparaffinierung und Lufttrocknung wurden die Schnitte mit einer etwa 30 nm dicken Kohlenstoffschicht versehen, um eine Aufladung der Probe während der elektronenmikroskopischen Untersuchungen zu vermeiden. Später wurden zur Verbesserung der Kontrastverhältnisse bei den raster-elektronenmikroskopischen Aufnahmen noch etwa 20 nm Aluminium aufgedampft. Die Untersuchungen wurden mit einem Stereoscan MK II der Firma Cambridge Instrument Co. vorgenommen, an den ein energiedispersives Röntgenspektrometer (EDAX, Modell 505) mit einem Halbleiterdetektor angeschlossen war, das in Verbindung mit einem Vielkanalanalysator die empfangene Röntgenstrahlung nach Energien der einzelnen Röntgenquanten aufteilt. Dieses Gerät besitzt eine Energieauflösung von 160 eV. Alle Untersuchungen wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 10 kV und mit einem Probenstrom von 4×10^{-12} bis 10^{-9} A durchgeführt.

Ergebnisse

1. Das integrale Röntgenspektrum der untersuchten Proben

Abb. 1 zeigt das Röntgenspektrum zwischen 0 und 4 KeV des Glasobjektträgers. Im Nullkanal ist die Zähldauer mit 80 sec registriert. Die dargestellten Spektrallinien stehen für die Elemente Natrium (K_{α}) bei 1,04 KeV, Silicium (K_{α}) bei 1,74 KeV und Calcium (K_{α}) bei 3,69 KeV. Abb. 2 zeigt das Röntgenspektrum eines Herzmuskelpräparates mit Kalksalzablagerungen. In diesem Fall betrug die Zähldauer 300 sec (vgl. Nullkanal). Man erkennt hier einen verhältnismäßig kleinen Silicium-Peak bei 1,74 KeV. Deutlich hervor treten in diesem Falle Phosphor (K_{α}) bei 2,01 KeV und Calcium (K_{α}) bei 3,69 KeV. Angedeutet sieht man noch den K_{β} -Peak des Calciums bei 4,0 KeV.

Bei einer Zähldauer von 80 sec wurden im Glasobjektträger für das Silicium 880 Impulse registriert, für das Calcium dagegen nur 90 Impulse. In der Herzmuskelprobe betrug die Zähldauer 300 sec, es wurden dabei für das Silicium etwa 180 Impulse und für das Calcium dagegen 580 Impulse registriert. Es ist daraus abzuleiten, daß das nachgewiesene Calcium nicht dem Glasobjektträger entstammen kann. Zudem läßt sich im Gegensatz zu der Untersuchung an dem Glasobjektträger in dem Herzmuskelpräparat eine hohe Zählrate für Phosphor ermitteln, die geringe Zählrate für Silicium dagegen ist durch den Glasobjektträger erklärbar.

2. Lokalisation von Calcium und Phosphor in der Herzmuskelkultur

Abb. 3a und b stellen identische Herzmuskelbereiche im raster-elektronenmikroskopischen Bild dar. Auf Grund der unterschiedlichen Sekundärelektronenausbeute lassen sich optisch normale Herzmuskelbereiche von pathologisch veränderten Arealen abgrenzen. Während das normale Herzmuskelgewebe eine eher homogene Struktur aufweist, zeigen die pathologisch veränderten Bereiche einen granulären bis scholligen Aufbau. Die röntgenmikroanalytische Lokalisierung von Phosphor (K_{α} -Linie des Phosphors, Abb. 3a) durch „line-scan“ an der Stelle

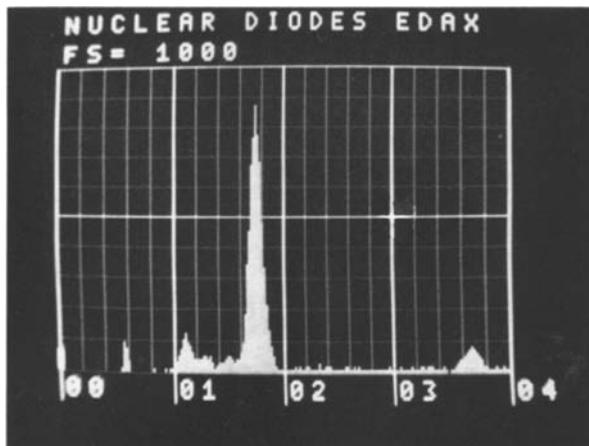


Abb. 1. Integrales Röntgenspektrum des Glasobjektträgers. Abszisse: Röntgenstrahlenenergie in KeV, Ordinate: Impulshöhe (maximal 1000), Nullkanal = Zähldauer in Sekunden

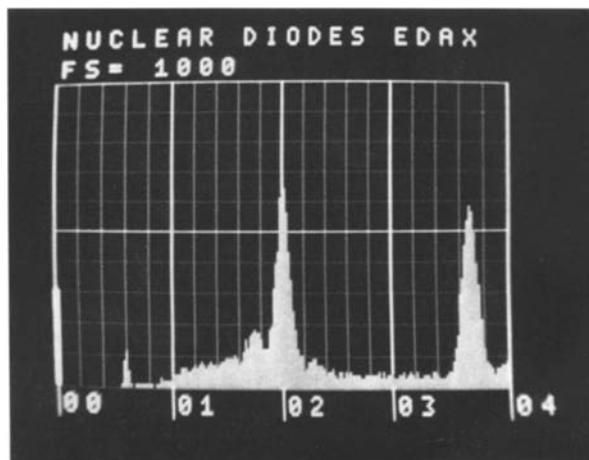
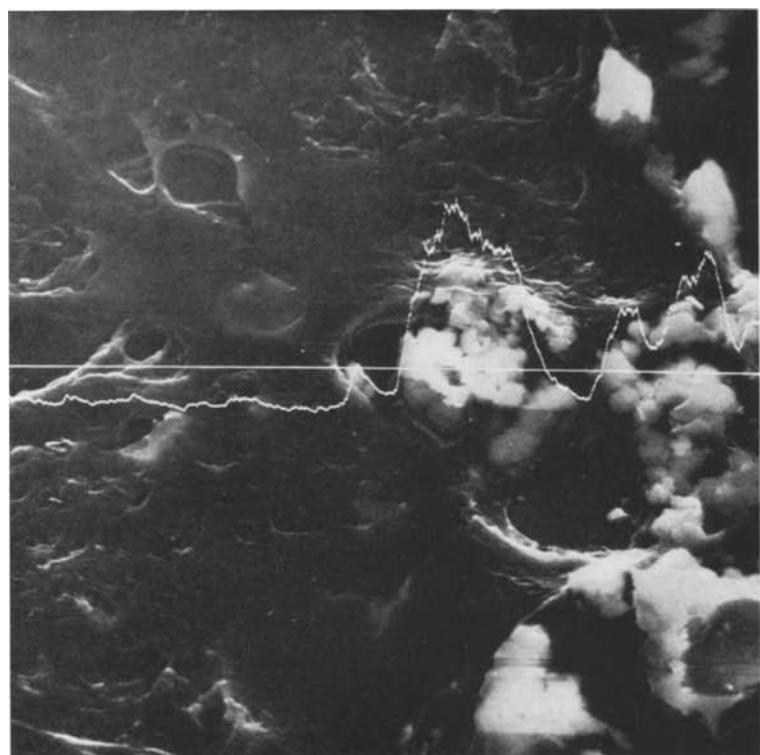
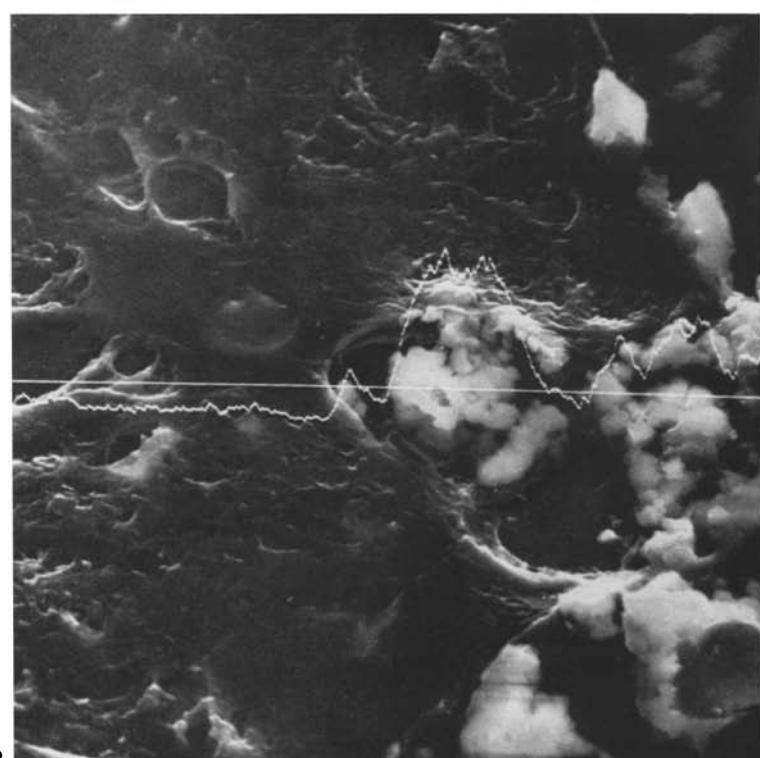


Abb. 2. Integrales Röntgenspektrum der Herzmuskulatur mit Mineralsalzablagerungen. Abszisse: Röntgenstrahlenenergie in KeV, Ordinate: Impulshöhe (maximal 1000), Nullkanal = Zähldauer in Sekunden

der durchgehenden Linie zeigt in der normalen Herzmuskulatur kein über das Rauschen hinausgehendes Signal, im Bereich der pathologisch veränderten Bezirke dagegen kommt ein deutlicher Anstieg der Zählrate zur Darstellung. Abb. 3b zeigt an der entsprechenden Stelle den Zählratenverlauf für das Calcium (K_{α} -Linie des Calciums). Es ergibt sich ein der Phosphorlinie entsprechender Kurvenverlauf mit etwas geringerer Zählrate, was auf ein Ca-Phosphat schließen lässt.



a



b

Abb. 3a u. b

Diskussion

Bei der Röntgenspektralanalyse werden durch den Primär-Elektronenstrahl die Elemente in der Probe zur Emission charakteristischer Röntgenstrahlen angeregt. Diese Röntgenstrahlen erzeugen im Halbleiterkristall eines energiedispersiven Analysators Spannungsimpulse, die der Energie der Röntgenquanten proportional sind. Die Spannungsimpulse werden über einen Vielkanalanalysator zur Anzeige gebracht.

Der Vorteil eines solchen energiedispersiven Systems im Vergleich zu den halb- oder vollfokussierenden Kirsstallspektrometern liegt vor allem in der schnellen Übersicht bei qualitativen Analysen und in der Unempfindlichkeit gegenüber Geometrieffekten, wie Kegel u. Mitarb. (1971) zeigten. Darüber hinaus kommt die energiedispersive Analyse mit wesentlich kleineren Strahlströmen aus, was besonders für empfindliche Proben vorteilhaft ist. Mit modernen Detektoren wird die Röntgenstrahlung bis herab zu etwa 1 KeV, was der K_{α} -Linie des Natriums entspricht, sicher analysiert. Somit kann man auch mit kleinen Beschleunigungsspannungen zwischen 5 und 10 kV arbeiten, wie sie bei der Weichstrahlmethode (Höhling u. Mitarb., 1971) angewandt werden. Für Untersuchungen an biologischem Material bedeutet dies, daß für eine schnelle qualitative Analyse auch elektronenoptisch nicht transparente Paraffinschnitte (Höhling u. Mitarb., 1971) geeignet sind. Bei der für unsere Untersuchungen angewandten Beschleunigungsspannung entstammt die Röntgenstrahlung nach Andersen (1967) einer Tiefe von weniger als 7 μm .

In der Herzmuskulatur des myopathischen Hamsterstammes BIO 8262 konnte mit dieser Methode an Paraffinschnitten eindeutig nachgewiesen werden, daß die pathologischen Ablagerungen Calcium und Phosphor enthalten. Neben dieser Übersichtsanalyse aller erfaßbaren Elemente ist es zudem möglich, ein Energiefenster für ein bestimmtes Element zu öffnen. Es kann dann die Verteilung dieses Elementes in einem Gewebe ermittelt werden und z.B. die Zählrate über einer Linie in das rasterelektronenmikroskopische Bild eingeblendet werden. Dadurch können die Elemente, deren Gegenwart mit dem integralen Röntgenspektrum ermittelt wurde, auch im Gewebe selbst lokalisiert werden. Bedingt durch die große Eindringtiefe des Elektronenstrahls und die Röntgenanregung durch rückgestreute Elektronen ist das laterale Auflösungsvermögen bei der Elementverteilung mit etwa 2 μm wesentlich schlechter als das des Sekundärelektronenbildes. Deshalb erreicht die Zählrate nicht in allen Bereichen der Ablagerungen das Grundniveau wieder, wie es topographisch aus dem Probenbereich zu erwarten wäre. Auffallend an den für beide Elemente dargestellten Verteilungslinien ist, daß im Bereich der maximalen Zählrate starke Schwankungen auftreten, die wahrscheinlich durch Dichte- oder Dicke Schwankungen im pathologisch veränderten Gewebe bedingt sind.

Abb. 3a u. b. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Herzmuskulatur: a mit Darstellung der lokalen Veränderung der Zählrate für Phosphor (P , K_{α}), b mit Darstellung der lokalen Veränderung der Zählrate für Calcium (Ca , K_{α}). Im Bereich der heller erscheinenden Mineralsalzablagerungen findet sich ein Anstieg der Zählraten für beide Elemente.

Vergr. 1850 \times , Kippwinkel: 40°, Bedampfung: Kohle und Aluminium

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß es mit der Röntgenmikroanalyse möglich ist, in biologischem Material Ablagerungen von Fremdstoffen mit Elementen, die eine Ordnungszahl größer als 11 aufweisen und die in einer Größenordnung von etwa $1 \mu\text{m}^3$ vorhanden sind, nachzuweisen. Dieses schnell arbeitende Analyseverfahren dürfte möglicherweise für die Differentialdiagnose von Gicht und Pseudogicht von Interesse sein, darüber hinaus scheint es auch möglich, mit dieser Methode die Diagnose einer Silikose zu sichern.

Literatur

- Andersen, C. A.: In: Methods of biochemical analysis (ed. D. Glick), vol. 15, p. 147—270. New York: Interscience Public. 1967.
- Cosslett, V. E., Hall, T. A.: Electron microprobe analysis in biology and medicine. *Exp. Techn. Phys.* **19**, 473—477 (1971).
- Eger, W.: Kalziumnachweis und Mineralisation des Knochengewebes. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **47**, 54—69 ((1963).
- Engström, A.: Physikalische Methoden zur Untersuchung des Knochengewebes. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **47**, 16—31 (1963).
- Hall, T., Höhling, H. J.: The application of microprobe analysis to biology. In: Proc. 5th Int. Congress on X-ray optics and microanalysis (eds. G. Möllenstedt and K. H. Gaukler), p. 582—591. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1969.
- Herbst, R., Multier-Lajous, A. M., Krönicher, W.: Elementanalyse unklarer Inklusionen in der menschlichen Placenta, untersucht an Ultradünnsschnitten. *Beitr. elektronenmikroskop. Direktabb. Oberfl.* **4/2**, 541—547 (1971).
- Höhling, H. J., Hall, R. A., Rosenstiel, A. P. von: Zur Elektronenstrahlmikroanalyse dünner Filme und biologischen Weichgewebes. *Beitr. elektronenmikroskop. Direktabb. Oberfl.* **4/2**, 125—156 (1971).
- Kegel, B., Wehner, K., Strauss, H.: Röntgenmikroanalyse mit dem Rasterelektronenmikroskop. *Beitr. elektronenmikroskop. Direktabb. Oberfl.* **4/2**, 23—32 (1971).
- Mohr, W., Lossnitzer, K., Beneke, G., Hersener, J.: Morphologie der Myopathie des syrischen Goldhamsters (BIO 8262) (in Vorbereitung).

Priv.-Doz. Dr. W. Mohr
Abteilung Pathologie II
der Universität
D-7900 Ulm, Oberer Eselsberg
Bundesrepublik Deutschland