

# Urát-lerakódások szövettani kimutatása

Krutsay Miklós dr.

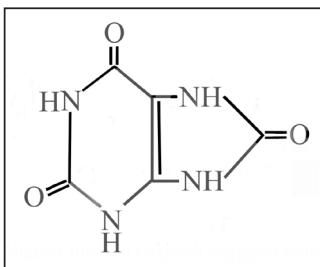
Magyar Imre Kórház, Patológiai Osztály, Ajka

**Összefoglalás:** a húgysav és az urátok anizotrópok, erősen argentaaffinok és adják a ferri-ferricianid-reakciót. Enyhén lúgos (boraxos) oldatban szobahőmérsékleten is redukálják az ezüst-nitrátot. Ha ezután a szövethez nem specifikusan kötődött ionos ezüstöt erősebben lúgos formaldehid-oldattal redukáljuk, sárga kontrasztfestést kapunk, külön színezék alkalmazása nélkül. Semleges ezüstnitrát-oldatban a nátrium-urátból ezüst-urát képződik, amelyet a formaldehid-oldat szintén fém ezüstté redukál.

## HISTOLOGICAL DETECTION OF URATE DEPOSITS

*Uric acid and urates are anisotropic and strongly argentaaffinic substances that give a positive reaction with ferric-ferricyanide. They reduce silver nitrate in the slightly alkaline solution of borax, even at room temperature. Reducing the ionic silver bound non-specifically to the tissues with an alkaline formaldehyde solution produces a yellow counterstain without the use of an appropriate dye. In a neutral silver nitrate solution, sodium urate is transformed into silver urate, which is reduced to metallic silver by the formaldehyde solution.*

**A**nukleinsavak purinbázisai (adenin, guanin) lebontásának végterméke az emberben a húgysav ( $C_5H_4N_4O_3$ ,  $M=168,11$ ). Ez a szerkezetből naponta kb. 700 mg mennyiségben távozik, kétharmad részben a vizelettel. A vegyület fehér, porszerű, kristályos anyag, amely – bár nincsenek karboxil-csoportjai – kétértékű, gyenge savként viselkedik ( $pK_{s1}=5,7$ ). Több tautomer alakja ismeretes, közülük leggyakoribb a laktám-forma (1. ábra). (A laktim-alakban a karbonilgyököket -COH-csoportok helyettesítik.) Lemezes kristályai romboid- vagy téglalap-alakúak, a rombos-rendszerbe tartoznak. A húgysav és sói alkoholban oldhatatlanok, vízben rosszul oldódnak. A sav oldhatósága erősen függ a vegyhatástól és a hőmérséklettől, semleges közegben, szobahőmérsékleten kb. 6 mg/dl (0,36 mmol/l), pH 5 körül már csak 1,5 mg/dl (0,09 mmol/l). Méréseink szerint pH 6-os desztillált vízben 336  $\mu$ mol/l töménységben oldódik. Alkálifém-hidroxidok, -karbonátok oldatában ill. piperazin-oldatban a húgysav sokkal könnyebben oldható, mint vízben. A



piperazint a gyógyászatban is megkísérelték felhasználni, húgysavkövek oldására [4]. A húgysav és az urátok redukáló sajátosságúak.

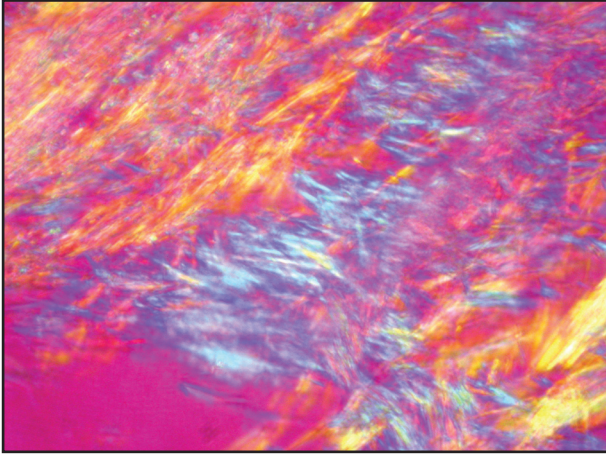
1. ábra. A húgysav trilaktám-alakjának szerkezeti képlete.

A mononátriumurát-monhidrát ( $C_5H_3N_4O_3Na \cdot H_2O$ ,  $M=208,10$ ) szobahőmérsékletű, telített vizes oldata kb. 70 mg/dl (3,4 mmol/l) töménységű, de 37 °C-on pH 7,4-es pufferoldatban a só 120 mg/dl koncentrációt érhet el [5]. Oldhatósága Wilcox és mtsai [11] szerint pH 7,7-nél, Kippen és mtsai [5] szerint pH 7 és 10 között minimumot mutat. Az oldékonyságot a hőmérséklet emelkedése növeli, nátrium-klorid jelenléte csökkenti [5].

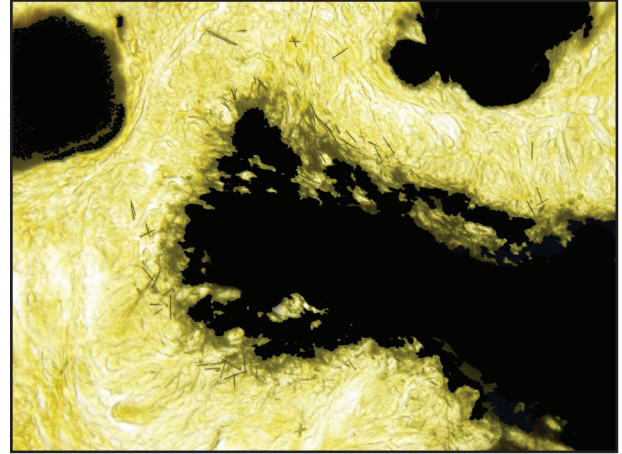
A testfolyadékokban a húgysav pH 7,4 körül urát-anion (nátrium-urát) alakjában van oldva. Koncentrációja a szérumban 3-7 mg/dl  $\approx$  180-420  $\mu$ mol/l (nőknél kb. 15%-kal alacsonyabb érték). A nátrium-urát in vitro vérplasmában 10,6 mg/dl, vizeletben 21,4 mg/dl töménységben oldódik [5]. Savas vegyhatású (pH<5,5) vizeletben húgysavvá alakul, amely – ha számára az oldat túltejtett – kicsapódik, és belőle bizonyos körülmények között kő is képződhet.

A vér húgysavszintjének a kiválasztás zavarából vagy túltermelődésből eredő emelkedése esetén köszvény (arthropathia urica) alakulhat ki. Ekkor mononátriumurát kristályok rakódnak le *tophus uraticus*oknak (köszvényes csomóknak) nevezett göcökben, az ízületekben, később a bőr alatti kötőszövetben, esetleg a vesékben is.

A rutin patológiában az urátokat tartalmazó szövetek közül legtöbbször a bőr köszvényes csomói, ritkán a köszvényes ízületek elemei (porc, tok, bursa) kerülnek szövettani vizsgálatra. Az irodalom szerint az anyagokat alkoholban kell fixálnunk, mert a vizes közegben történő



2. ábra. Urátkristályok tophusban, polarizált fényben, Rot I. kompenzátorral.



3. ábra. Urátkristályok tophusban. Argentaffin-reakció.

formalin-fixálás, és az utána alkalmazott folyó csapvizet mosás során az urátok kioldódhatnak. Simkin és mtsai [10] szerint a formalin az urátokat nem csupán fizikálisan, hanem kémiai reakció útján, addíciós vegyület képezve is oldja, ezért a metszetben már csak kis hányadukat találjuk meg. Shidham és mtsai [9], valamint Bély [2] azonban azt tapasztalták, hogy pufferezett (pH=7,4) formalinban történő, nem túl hosszú rögzítés és rövid (30 perces) mosás az urátok mennyiségét a nagyobb anyagokban lényegesen nem csökkenti. Magunk, pufferezetlen formalin után is ezt észleltük. Mindazonáltal a legnagyobb biztonságot az alkoholfixálás nyújtja, vízben való kimosás nélkül.

A gyakorlatban a nátrium-urát kimutatásának van jelentősége. A vizsgálat a legegyszerűbben polarizált fényben történhet. A mononátrium-urát kristályai tű alakúak, erősen negatív kettőtörésűek, optikailag kéttengelyűek, a monoklin és a triklin rendszerbe tartoznak (2. ábra). Barnás színű halmazokat képeznek, amelyeket szalmakazalhoz hasonlítanak. Metszetben való lokalizálásukhoz az alapszövet enyhe megfestése is szükséges (pl. a HE-festés eozin-oldatával). Shidham és mtsai [8] a festéshez – a kioldódás elkerülésére – alkoholos eozin Y-oldatot javasoltak (0,5 g/dl, 20 sec.). Ezen szerzők [9] és Bély [2] megfigyelték, hogy hematoxilin-eozin-festés után az előzőleg jelen volt urátok már nem mutathatók ki. Feltehetően a hematoxilin-oldat savtartalmának hatására húgysavvá alakulnak át, amelynek durvább kristályai már nem kötődnek a szövethez. Hasonlóképpen nem ajánlott a hematoxilin-festés a savakban könnyen oldódó kristályos kalciumsók, pl. a kalcium-pirofoszfát vizsgálatánál sem [6].

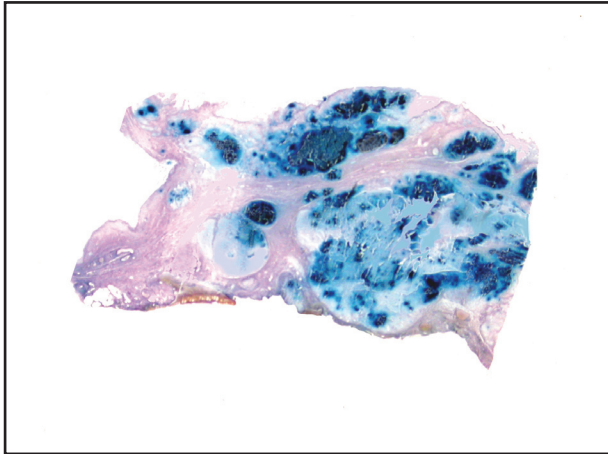
Az urátok argentaaffinok, argyrophilok és adják a ferri-ferricianid-reakciót is. Feltüntetésükre a hexametilén-tetramin-ezüst oldattal végzett, Gomori-féle argyrophil-reakciót [3] javasolják. (A hexametilén-tetramin formaldehid és ammónia vegyülete.) Ennél azonban egyszerűbb és specifikusabb az argentaaffin-reakció [7] (3. ábra), amelynél az ezüstoldat nem tartalmaz redukálószerrel és

komplekxképző anyagot. (Az argyrophil-reakció ugyanis olyan, gyengén redukáló szövetelemeket is feltüntet, amelyek önmagukban nem képesek mikroszkóppal látható mennyiségű ezüstöt kiválasztani.)

Az argentaaffin-reakciónál az urátok az ezüst-nitrátot fém-ezüstté redukálják. A melléktermékként képződő sav megkötésére, a reagensnek lúgos vegyhatásának kell lennie. Ezüst-só-oldatok meglúgosítására csak kevés vegyület (pl. piperazin, ammónium-hidroxid, bórax) alkalmas, minthogy az ezüst-ionok többnyire csapadékot alkotnak a lúgokkal és a lúgosan hidrolizáló sókkal (pl. alkálifém-hidroxidokkal, -karbonátokkal, -foszfátokkal).

A piperazin, bár nem csapja ki az ezüst-nitrátot, és ajánlottak is argentaaffin-reakcióhoz [1], feloldja a húgysavat és kisebb mértékben az urátokat is, ezért a reagensben nem használható. Ezüstnitrát-oldathoz adott ammónia-oldat kezdetben ezüst-oxidból álló barna csapadékot okoz, amely a továbbiakban komplex vegyület alakjában, szintelenül oldódik. Az ezüst-ionok disszociációját gátló ammóniafelesleg elkerülésére azonban a sztöchiometrikus arányt titrálásszerűen be kell állítanunk, ami a reagens elkészítését nehézkessé teszi. Mindezt figyelembe véve reagensünkben bóraxot használtunk. Bóraxszal meglúgosított ezüstnitrát-oldatból – in vitro – a húgysav már szobahőmérsékleten is, rövid idő alatt fekete ezüst-csapadékot választ ki. Meleg oldattal azonnal sötétbarna színt kapunk. Nátrium-urát esetében, metszetben a redukció lassabban következik be. 60 °C-on – előmelegítés nélkül – kb. fél óra szükséges a megfelelő fedettséget adó ezüstlerakódás kialakulásához. Túl hosszú inkubálás az urátok festődését már nem erősíti, csak az alapszövet festődését fokozza, ezáltal a kontraszt csökken. Szobahőmérsékletű oldattal még két óra után is kissé gyengébb lesz az ezüstöződés, de az alapszövet szintelen marad.

Semleges oldatban az urátok melegen is csak lassan redukálják az ezüst-nitrátot, de felszínükön, rövid idő alatt, ioncserével – a hőmérséklettől függetlenül – szintelen ezüst-urát képződik, amelyet a formaldehid-oldat barna színnel szintén ezüstté redukál. Ez az eljárás meg-



4. ábra. Tophus bőrben. Ferri-ferricianid-reakció. Lupe-nagyítás.

felel a kalciumvegyületek kimutatására szolgáló „mész-reakciónak” [7]. Oxálsav-előkezelés esetén az urátok reakciója elmarad, míg a kalciumvegyületek megfeketednek.

A ferri-ferricianid-reakciónál [7] az urát-lerakódások diffúzan festődnek (4. ábra). A reagensben lévő ferrisót az urátok ferro-sóvá redukálják, amely kálium-ferricianiddal oldhatatlan ferro-ferricianidot (Turnbull-kéket) képez.



A kristályok a savas reagensben nagyrészt kioldódnak a reakciótermék mellől, és maradékukat polarizált fényben – csak a sötétkékre színeződött, nagyobb göcök közepén találjuk meg.

Az urát-kristályokat el kell különíteni az alköszvényben (chondrocalcinosis, CPPD) előforduló kalciumpirofoszfát-dihidrát-kristályoktól [6]. Az utóbbiak zömökebbek, többnyire gyengén pozitív kettőstörésűek. Ugyanazon kristályrendszerekbe tartoznak, mint a nátrium-urát, de redukáló tulajdonságuk nincs.

## AZ AJÁNLOTT ELJÁRÁS ISMERTETÉSE

1. Az etilalkoholban vagy formalinban fixált anyag paraffin-metszetét a paraffin kioldása után 60 °C-os termosztátban, lefedett Petri-csészében 30 percig kezeljük bóraxos ezüstnitrát-oldattal (az oldatot nem melegítjük elő). Eközben a nagyobb urát-lerakódások szabad szemmel láthatóan megfeketednek, az alapszövet pedig halvány barnásárga lesz. Az oldat készítésekor az A-oldathoz azonos térfogatú B-oldatot adunk.

A-oldat: 0,1 g/dl-es ezüstnitrát-oldat.

B-oldat: 0,4 g/dl-es bórax- ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) oldat.

2. Öblítés kétszer váltott desztillált vízben.

3. Kezelés 25 ml tömény formalint, 75 ml desztillált vizet és 5 g vízmentes nátrium-karbonátot tartalmazó oldatban 2 percig.

5. Öblítés vízben.

4. Víztelenítés, derítés, lefedés.

*Eredmény:* az urát-lerakódások feketék, a sejtmagok halványbarnák, az alapszövet sárga.

*Megjegyzés:* több metszeten kívüttában való kezelése esetén, a nagyobb oldatmennyiség lassúbb felmelegedése miatt, szükséges lehet az ezüstözési idő meghosszabbítása, deszt. vízben való leöblítést követő mikroszkópos kontroll alapján. Az argentaaffin-sejtek szemcséi és argentaaffin pigmentek (melanin, hematoidin, lipofuscin, melanosis coli pigment) is ezüstöződhetnek, de morfológiájuk és lokalizációjuk alapján könnyen elkülöníthetők. Egyes kalciumsó-lerakódások szintén megfeketednek, azonban ezek ferri-ferricianid-negatívak, a leggyakrabban előforduló trikálcium-foszfát (hidroxi-apatit) pedig izotróp.

Levelezési cím: Dr. Krutsay Miklós. 8401 Ajka, Korányi Ferenc utca 1. Tel.: 88-521-800/170.

E-mail: krutsaym@korhazajka.hu

## IRODALOM

1. *Arzac, J. P.*: Acidos cromico y peryodico en la histoquímica argentica del glucogeno. Rev. Mexicana Lab. Clin. 1949. 2, 107-113.
2. *Bély M.*: Személyes közlés.
3. *Gomori, G.*: A new histochemical test for glycogen and mucin. Amer. J. clin. Path. 1946. 16, 177-179.
4. *Gordon, J.*: A contribution to the study of piperazine. Brit. Med. J. 1894. Vol. 1. No. 1746. 1291-1294.
5. *Kippen, I., Klinenberg, J. R., Weinberger, A.*: Factors affecting urate solubility in vitro. Ann. Rheumat. Dis. 1974. 33, 313-317.
6. *Krutsay M., Ferencz G.*: A kalciumpirofoszfát-kristályok azonosításáról. Osteol. Közl. 2004. 12, 25-29.
7. *Krutsay M.*: Patológiai technika. Medicina Kiadó. Budapest, 1999. pp. 161-162, 165-166, 244-248.
8. *Shidham, V., Shidham, G.*: Staining method to demonstrate urate crystals in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Arch. Path. Lab. Med. 2000. 124, 774-776.
9. *Shidham, V., Chivukula, M., Basir, Z., Shidham, G.*: Evaluation of crystals in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections for the differential diagnosis of pseudogout, gout and tumoral calcinosis. Mod. Pathol. 2001. 14, 806-810.
10. *Simkin, P. A., Bassett J. E., Lee, Q. P.*: Not water, but formalin, dissolves urate crystals in tophaceous tissue samples. J. Rheumatol. 1994. 21, 2320-2321.
11. *Wilcox, R. W., Khalaf, A., Weinberger, A. et al.*: Solubility of uric acid and monosodium urate. Med. & Biol. Eng. Comp. 1972. 10, 522-531.