

Algoritmusok egyes amorf és kristályos szöveti lerakódások azonosítására

Krutsay Mikós dr.

Magyar Imre Kórház, Ajka, Patológiai Osztály

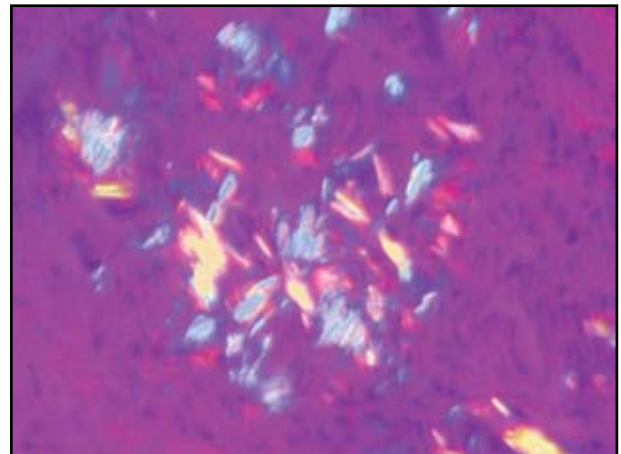
Összefoglalás: A szerző egyszerű algoritmusokat ajánl egyes oldhatatlan kalciumsók (ortofoszfátok, pirofoszfátok, oxalátok, stearátok) valamint a kvarc-, a talcum- és az urátkristályok szövettani elkülönítésére.

ALGORITHMS FOR THE IDENTIFICATION OF AMORPHOUS AND CRYSTALLINE TISSUE DEPOSITS

The author proposes simple algorithms for the histological differentiation of various types of insoluble calcium salts (orthophosphates, pyrophosphates, oxalates, stearates) as well as of quartz, talc, and urate crystals.

A szövetekben kóros körülmények között felhalmozódó szerves és szervetlen, színtelen anyagok közül a rutin kórszövettani vizsgálatoknál a leggyakrabban a trikálciumfoszfát-lerakódásokkal találkozunk. Ezek izotropok, Kóssa-pozitívak, hematoxilín-eozin-festéssel basophilén (liláskék) festődnek. A többi, vízben oldhatatlan, anizotrop kalciumsó (kálcium-hidrogénfoszfát, kalcium-pirofoszfát, kalcium-oxalát, kalcium-karbonát, és a zsírsavas kalcium) festetlen marad. Erősebb basophil (kékesfekete) festődést mutatnak egyes, natívan színtelen ferri-vegyületek, amelyek a Gandy-Gamna göcök kötőszöveti rostjait, a Schaumann-testeket és a kis agyi erek falát impregnálhatják. (A szintén ionizálható ferri-vasat tartalmazó haemosiderin azonban hematoxilín-festés után is megtartja barna színét.) A kétféle basophil eredete hisztokémiailag könnyen tisztázható a kalciumsókat elektíven festő alizarinvörösrel [2, 3, 5], illetve a ferrivegyületeket kimutató berliniké-reakcióval [1].

A „meszes” területek basophilája részben magától a trikálcium-foszfáttól, részben a lerakódás talaját képező, szerves alapállománytól ered, ezért, bár gyengébben, mézstelenítés után is észlelhető [11]. A trikálcium-foszfát [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], illetve a hozzá hasonló szerkezetű hidroxipapatit [bázisos kalcium-ortofoszfát $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$], amely a csontok fő alkotórészét képezi, a csontokon kívül fiziológiásan csupán a tobozmirigy és a plexus chorioideus mézsrégeiben (agyhomok, acervulus cerebri) fordul elő [8]. Kóros körülmények között érfalakban, elhalt szövetekben (daganatok, tbc), sarjszövetekben (például malakoplakia), a Schaumann-testekben, és a Gandy-Gamna-gócokban rakódik le, némelykor vasvegyületekkel együtt



1. ábra. Talcum-granuloma mellhártyában. Polarizált fény, Rot I. kompenzátor.

[12]. Az agyhomokszemcsék esetleges anizotropiája nem a kalciumfoszfát-tartalomnak, hanem a szerves alapállomány koncentrikus rendezettségének következménye [11]. A kalcium-ortofoszfátok némelyike a Kóssa-reakció mellett a kobaltszulfid-reakciót is adja [9].

A hematoxilinnal nem festődő kalciumsók anizotropok, és ennek révén polarizációs mikroszkóppal könnyen felismerhetők. Hematoxilín-eozinnal festett metszetben téves negatív eredményt kaphatunk, mert a kalcium-karbonátot és a kalcium-pirofoszfátot a timsós hematoxilín-oldatban lévő kevés sav, sőt még a savasan hidrolizáló timsó is oldja [4, 9, 12]. A kalcium-oxalát ellenállóbb, a zsírsavas kalcium pedig igen rezisztens. (A trikálcium-foszfát is oldható savakban, de felszínén az oldhatatlan

I. táblázat

Egyes kalciumvegyületek oldhatósága savakban

	TriCa-foszfát	CaH-foszfát	Ca-pirofoszfát	Ca-karbo-nát	Ca-cit-rát	Ca-oxa-lát	Zsír-sa-vas Ca
5 ml/dl ecet-sav	+	+	+	+	+	-	-
1,0 n só-sav	+	+	+	+	+	+	-

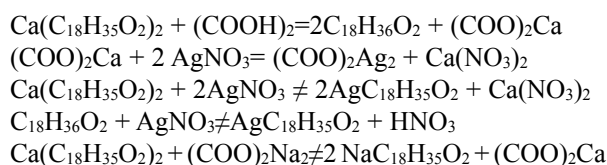
festécsapadék még a kioldódás előtt kialakul [11].) Célszerű ezért, ha a polarizációs optikai vizsgálatot festetlen, vagy csupán eozinnal megfestett metszeten végezzük. Shidham és mtsai [13] alkoholos eozin-oldatot ajánlottak a kioldódás biztosabb elkerülésére.

A különböző kémiai összetételű endogén kristályokat el kell különítenünk egymástól és az exogén anizotrop anyagoktól (növényi részek, sebészi varrófonál-törmelék, kvarc, talcum). A legtöbb esetben ez már a lokalizáció és a morfológia alapján megtörténhet. A hisztokémiai elkülönítést a savakban való oldhatóság (I. táblázat) és egyes reakciók alkalmazásával végezhetjük a II. és a III. táblázatban leírt, egyszerű algoritmusok szerint. A savak a kalciumsókat többnyire könnyen oldják, ezért vizsgálatukhoz savtartalmú fixálók (például Bouin, Zenker, Stieve, „Susa”, Cajal) nem alkalmasak. A rögzítésre használt egyszerű formalint is ajánlatos nátrium-acetáttal

semlegesítenünk, esetleges hangyasav-tartalmának hatás-talanítására.

Kalciumoxalát-kristályokat a Schaumann-testekben (BCG-lymphadenitis, sarcoidosis) etilén-glikol-mérge-zéskor pedig a vesecsatornákban találhatunk. (A gépkoc-sik hűtőjében használt „fagyálló folyadék” fő alkotó-részt képező etilén-glikol a szervezetben glikolsavvá, majd oxálsavvá oxidálódik.) A kristályok sósavban oldódnak, híg ecetsav azonban nem oldja őket.

A hosszúláncú zsírsavak kalciumsói (kalcium-sztearát, kalcium-palmitinát) pancreatitis esetén a környező zsír-szövetben képződnek a mirigynedv hatására felszabaduló zsírsavakból és a vér kalcium-ionjaiból. A szabad zsír-savakkal ellentétben, paraffinbeágyazás során nem oldó-dnak ki, és polarizált fényben jól felismerhető, optikailag negatív, apró, tűs kristályokat képeznek. Mészreakciót csak oxálsav-előkezelés után adnak. Az oxálsav ugyanis elbontja a zsírsavas sókat, a felszabaduló kalcium-ionok az oxalát-ionokkal azonnal kalcium-oxalátot képeznek, amely a második lépésben cserebomlással ezüst-oxalattá alakul. A szintén felszabaduló és hidrolizálva kevésbé disszociáló zsírsavak nem reagálnak az ezüst-nitráttal. (Az oxálsav nem helyettesíthető semleges alkálifém-oxalátokkal.)



Kalciumpirofoszfát-dihidrát-kristályok ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) álköszvény (chondrocalcinosis, CPPD) esetén fordulhat-nak elő az ízületi folyadékban, és itt el kell különíteni

II. táblázat

Kalcium- és vasvegyületek, urátok elkülönítése alkohol-fixálás után, paraffinmetszetekben

Hematoxilin-eozin festéssel				
Liláskék	Kékes-fekete	Színtelen		
Trikalcium-foszfát	Ferri-vegyületek	Új, festetlen metszet. Polarizált fényben anizotrop lerakódás		
		Ferri-ferricianid reakció		
		Pozitív	Negatív	
		Urátok	Új metszet, 5 ml/dl ecetsavban	
		Oldódik	Nem oldódik	
			1,0 n sósavban	
		Kalcium-piro-foszfát	Oldódik	Nem oldódik
			Kalcium-oxalát	Alizarinvörös-festés
			Vörös	Színtelen
	Zsírsavas kalcium	Exogén anyag		

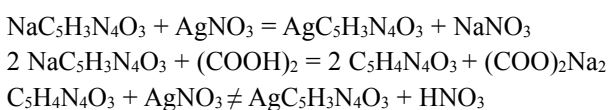
III. táblázat

Kalciumvegyületek szövettani elkülönítése

Alizarinvörös-festés			
Pozitív			
Polarizált fény			
Izotrop	Anizotrop		
Trikalcium-foszfát	5 ml/dl-es ecetsavban		
	Oldódik	Nem oldódik	
	Kalcium-pirofoszfát	1,0 n sósavban	
		Oldódik	Nem oldódik
		Kalcium-oxalát	Zsírsvavas kalcium

őket az urátkristályoktól. A pirofoszfát-kristályok zömök alkatúak és gyengén pozitív kettőtörésűek vagy izotropok [6, 7]. (A mikrokristályok harántul aggregálódva a kettőtörés jellegét invertálhatják [6]). Kontroll-preparátum készítésekor tévedést okozhat, hogy kalcium- és pirofoszfát-ionokat tartalmazó oldatokból a pirofoszfát-ionok feleslege esetén – kalcium-pirofoszfát helyett – a kalcium-dinátrium-dihidrogén-ortofoszfát optikailag negatív tús kristályai válnak ki [7].

Urátkristályokkal a patológiai anyagban főként a bőrtophusainak vizsgálatakor találkozunk, ha az anyag fixálása alkoholban történt. Régebben gyakran észleltük őket újszülöttek vesecsatornáiban is (urát-infarctus). Formalinban az urátok kioldódnak. Simkin és mtsai [13] kimutatták, hogy az oldódást nem a fixáló víztartalma, hanem a húgysavnak ($C_5H_4N_4O_3$) a formaldehiddel való kémiai reakciója okozza. A „valódi” köszvényre (arthritis urica) jellemző nátrium-hidrogénurát (mononátrium-urát-monohidrát) erősen negatív kettőtörésű, hosszú kristálytűket alkot. Savak hatására az urátok átkristályosodnak húgysavvá, amely szintén nehezen oldható vízben. (Polarizációs mikroszkóppal jól követhető a túalakú kristályok átalakulása hasábokká.) Az urátok redukáló voltak miatt adják a ferri-ferricianid-reakciót [1]. Az „egyszerű” mézreakciónál is reagálnak, oxálsav-kezelést követő mézreakciónál viszont nem festődnek [1]. (A oxálsav hatására felszabaduló, nehezen oldható húgysav nem képez sót az ezüst-ionokkal.)



A kalciumra hisztokémiailag specifikus eljárásnak az alizarinvörös-festés és az oxálsav-mészreakció tekinthet-

tő. Az előbbi módszer érzékeny a festékoldat pH-jára, ezért azt be kell állítanunk [2, 3].

A Kóssa-reakcióval a gyakorlatban előforduló kalciumsók közül az ortofoszfátok mellett csak a pirofoszfát ad, gyengébb, pozitív eredményt. A többi sav ezüstsója szerves (fehérjés) közegben sem fényérzékeny. A vegyszeres redukálást alkalmazó mézreakciónál – a zsírsvavas kalcium kivételével – valamennyi kalciumsó megfeketedik, de az urátok is reagálnak. Oxálsav-mészreakcióval a zsírsvavas kalcium is kimutatható, míg az urátok nem festődnek. Az alizarinvörös-festés és a ferri-ferricianid-reakció mellett, ez az eljárás is alkalmas az urát- és a zsírsvavas kalciumsó-kristályok megkülönböztetésére. (Mindkettő negatív kettőtörésű.)

A kvarc és a talcum kristályai anizotropok, erős savakban is oldhatatlanok. Az előbbinek szemcséi a tüdősilicosisos csomóiban fordulhatnak elő. Gyenge kettőtörésű és a kanadabalzsaméval csaknem azonos törésmutatójuk miatt ajánlatos a metszetet glicerinnel lefedve vizsgálni. A talcum optikailag erősen pozitív, hasáb-alakú kristályai pleurodesis után a megvastagodott mellhártyában mutatkozhatnak (1. ábra). A cellulóztartalmú növényi részek többnyire jellegzetes szerkezetűek, azonosításukhoz a PAS-reakció nyújt segítséget.

IRODALOM

1. Krutsay M.: Patológiai technika. Medicina Kiadó. Budapest, 1999. pp. 244-245, 246-248.
2. Krutsay M.: A kalcium hisztokémiai kimutatása alizarinvörös S-sel. Osteol. Közl. 2000, 8, 216-217.
3. Krutsay M.: A kalcium hisztokémiai kimutatása alizarinvörös S-sel. II. Osteol. Közl. 2002, 10, 154-155.
4. Krutsay M.: A kalciumvegyületek hisztokémiai elkülönítése. Osteol. Közl. 2002, 10, 214-217.
5. Krutsay M.: A kalcium hisztokémiai kimutatása alizarinvörös S-sel. III. Osteol. Közl. 2003, 11, 224-225.
6. Krutsay M. és Ferencz G.: A kalciumpirofoszfát-kristályok azonosításáról. Osteol. Közl. 2004, 12, 25-29.
7. Krutsay M. és Ferencz G.: A kalciumpirofoszfát-kristályok azonosításáról. II. Osteol. Közl. 2005, 13, 209-211.
8. Krutsay M.: Adatok a kalciumlerakódások hisztokémiájához. Osteol. Közl. 2008, 16, 82-86.
9. Krutsay M.: Kalciumsók a szövetekben. Osteol. Közl. 2008, 16, 191-194.
10. Krutsay M.: Kalcium- és vasvegyületek együttes lerakódása a szövetekben. Osteol. Közl. 2009, 17, 134-137.
11. Krutsay M.: A mézlerakódások basophilijája. Osteol. Közl. 2009, 17, 30-32.
12. 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.
13. Simkin, P. A., Bassett, J. E., Lee, Q. P.: Not water, but formalin, dissolves urate crystals in tophaceous tissue samples. J. Rheumatol. 1995, 21, 2320-2321.

Levelezési cím: Dr. Krutsay Miklós, 8401 Ajka, Korányi F. u. 1. Magyar Imre Kórház. Tel.: 88-521-800/170, E-mail: krutsaym@korhazajka.hu.