

Adatok a kalciumlerakódások hisztokémiájához

Krutsay Miklós dr.

Magyar Imre Kórház, Patológiai Osztály, Ajka

Összefoglalás. A spektrometria (ICP-OES) útján meghatározott kalcium-foszfor arányból megállapítható, hogy a kalcium a Kóssa-pozitív, basophil, meszes szövetekben (csontszövetben, agyhomokban, elmeszesedett aortafalban) nagyrészt anorganikus foszfátok alakjában van jelen. A csontszövet hidroxí-apatitot és kalcium-karbonátot tartalmaz, míg az agyhomok trikálcium-foszfátból áll. A kobaltszulfid-reakció pozitivitása feltehetően oktalcium-foszfáttól származik.

ADDENDA TO THE HISTOCHEMISTRY OF CALCIUM DEPOSITS

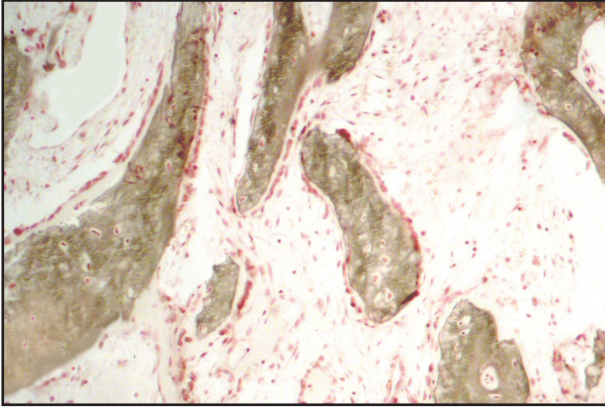
The calcium-phosphorus ratio determined by spectrometry (ICP-OES) suggests that in Kóssa-positive, basophilic, calcified tissues (e.g. bone, pineal sand, and calcified aortic wall), calcium is present in the form of inorganic phosphates, primarily. Bone contains hydroxyapatite and calcium carbonate, whereas pineal sand consists of tri-calcium phosphate. The positivity of the cobalt sulfide reaction is tentatively attributed to the presence of octa-calcium phosphate.

A Magyary-Kossa [1909-ig Kóssa] Gyula farmakológus és orvostörténész (1865-1944) által bevezetett, egyszerűen kivitelezhető Kóssa-reakciót [7] több mint száz éve világszerte használják a kalciumvegyületek szövettani metszetekben való feltüntetésére. Ezüst-nitráttal való kezelésre ugyanis a kalciumsók átalakulnak a megfelelő ezüstsókká, az utóbbiak pedig napfényen fekete fémzüstté redukálódnak. Előző közleményünkben [14] beszámoltunk arról, hogy a fehérje-glicerinnel szuszpendált és tüdőszövetbe fecskendezett, oldhatatlan kalciumsók közül csak a kristályos kalcium-hidrogénfoszfát adja metszetben a klasszikus Kóssa-reakciót. Napfény helyett alkalmazott vegyszeres redukálással [8] azonban már a legtöbb kalciumsó reagál, oxálsav-előkezelést követő vegyszeres redukálással [5, 10] pedig mindegyik vegyület megfeketedik. Tehát a reakció első része – a cserebomlás – általában végbemegy, de a pozitívítás a keletkezett ezüstsó redukálhatóságától függ.

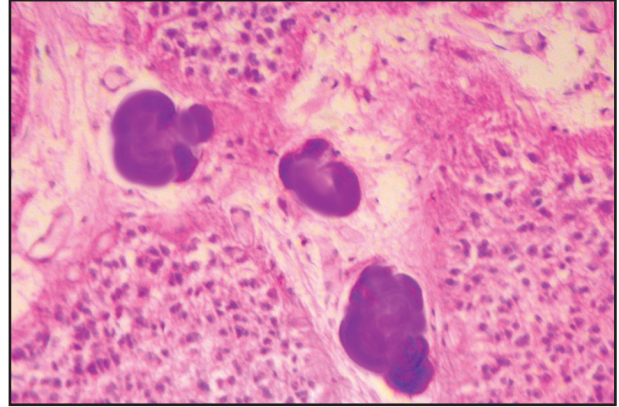
A csontalapállomány, valamint szövetekben előforduló, basophil, amorph mészlerakódások Kóssa-pozitívak, így felmerülhet a kérdés, hogy mi okozza a különbséget a vegytiszta kalciumsókkal szemben. Már Kóssa [7] em-

lítette, hogy az ezüst-foszfát redukciója fény hatására csak szerves anyagok jelenlétében következik be. Nativ, nem mésztelenített csontszövet, amely az irodalmi adatok szerint trikálcium-foszfátot (hidroxí-apatitot) és kalciumkarbonátot tartalmaz, mind kémcsökísérletben mind metszetben erős Kóssa-reakciót ad, míg a szerves állományától kiégetés útján megfosztott csont – a savval demineralizált csonthoz hasonlóan – elveszti reakcióképességét. A csontokból illetve a kollagénből előállított és a fényképezetben használt zselatinról ismeretes, hogy az nem csak vivőanyaga a fotóemulzióknak, hanem azok érzékenyítésében is fontos szerepe van [17]. A trikálcium-foszfát és a kalcium-karbonát azonban in vitro, fehérjés vagy zselatinos közegben sem reagál. Ez arra utal, hogy a Kóssa-pozitív szövetekben a zselatinnál hatásosabb szerves katalizáló anyagok vannak. Berger és mtsai [1], valamint Bills és mtsai [2] kalcium-foszfát esetében hidroxí-karbonsavak, például citromsav jelenlétében tapasztaltak pozitív Kóssa-reakciót.

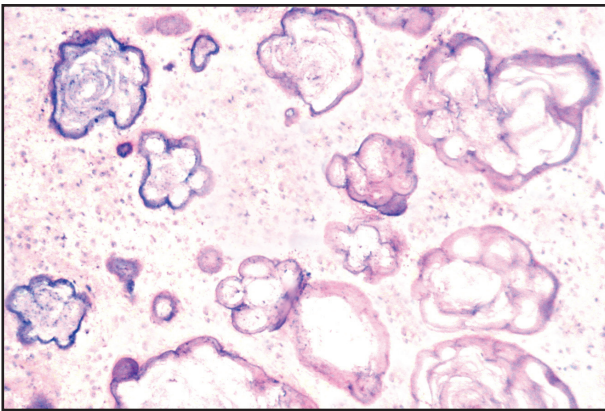
Annak is fennáll a lehetősége, hogy a csont és az egyéb mésztartalmú szövetek olyan, az általunk vizsgáltaktól eltérő kalciumvegyületeket is tartalmaznak,



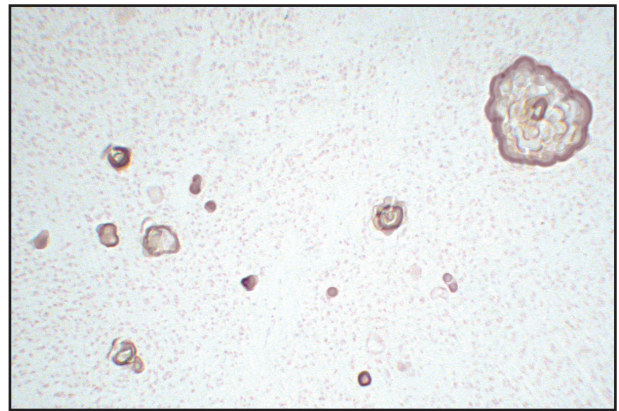
1. kép. Nem mésztelenített csontszövet metszete.
Kobaltszulfid-reakció.



2. kép. Agyhomokszemcsék nem mésztelenített tobozmirigyben. Hematoxin-eozin-festés.



3. kép. Metszet mésztelenített tobozmirigyből.
Hematoxin-eozin-festés.



4. kép. Mésztelenített tobozmirigy metszete.
Kobaltszulfid-reakció.

1. táblázat

A Kóssa- és a kobaltszulfid-reakció eredménye egyes anyagokban ill. vegyületekben

	Basophilia	Kóssa r. in vitro	Kóssa r. metszetben	Kóssa r. vegyszeres redukálással	Oxálsav Kóssa r. vegyszeres redukálással	Kobalt- szulfid r.
Csont	+	++	++	++	++	+
Mésztelenített csont	+	-	-	-	-	-
Agyhomok	++	0	++	++	++	-
Mésztelenített agyhomok	+	-	-	-	-	+
Trikálcium-foszfát	++	-	++	++	++	-
Oktakalcium-foszfát	++	-	++	++	++	++
Kalcium-hidrogén-foszfát	-	-	++	++	++	-
Kalcium-pirofoszfát	-	-	-	+	+	-
Kalciumkarbonát	-	-	-	++	++	-
Zsírsvavas kalcium	-	-	-	-	++	-

2. táblázat

A kalcium és a foszfor atomtömeg-aránya egyes anyagokban

Anyag	Ca:P atomtömeg-arány
Meszes aorta	1,59:1
Csontok	1,74–2,35:1
Ecetsavval kezelt csont	0,98:1
Kiizzított csontok	1,34–1,49:1
Ecetsavval kezelt, majd kiizzított csontok	1,49–1,96:1
Tobozmirigyek (átlag)	1,48:1
pH 3,5 között lecsapott Ca-foszfát	1,00:1
pH 9 oldatból lecsapott Ca-foszfát	1,34–1,23:1
pH 11 oldatból lecsapott Ca-foszfát	1,30:1
Na ₄ P ₂ O ₇ -oldatból pirofoszfát-felesleggel lecsapott Ca-foszfát	0,50:1
Na ₄ P ₂ O ₇ -oldatból kalcium-felesleggel lecsapott Ca-foszfát	1,00:1

amelyek natív állapotban reagálnak, de izzításkor elbomlanak. Így feltételeztük, hogy a fém az alizarinvörös-festéssel [11, 12, 13] illetve oxálsavas mészreakcióval igazolt, Kóssa-pozitív kalcium-lerakódásokban a szerves szöveti váz negatív töltésű csoportjaihoz kapcsolódik. Ezzel a hipotézissel szemben anorganikus kalciumsók jelenlétét és egyúttal a katalizátorok szerepét bizonyítaná, ha a kalcium mellett valamely savmaradék jellemző eleme – például a foszfor – is nagyobb mennyiségben kimutatható lenne. Ekkor a két elem atomtömeg-arányából meghatározott vegyületek jelenlétére is következtethetnénk. Minthogy a hisztokémia eszköztára az anionok analízise vonatkozásában szegényes, a kalcium és a foszfor mennyiségi meghatározására az induktív csatolású plazma-optikai emissziós spektrometria (ICP-OES) látszott alkalmasnak.

ANYAGOK ÉS ELJÁRÁSOK

Mésztelenítetlen és mésztelenített tobozmirigyek és csontok metszeteiben vizsgáltuk a hematoxin-festés, a Kóssa- és a kobaltszulfid-reakció [19] eredményét. Jelentősebb mennyiségű agyhomokot (acervulus cerebri) tar-

3. táblázat

A kalcium és a foszfor atomtömeg-aránya egyes kalciumsókban

Név, képlet, molekulatömeg	Ca:P atomtömeg-arány
Monokalcium-ortofoszfát CaH ₄ (PO ₄) ₂ =234,05	0,50:1
Kalcium-dinátrium-dihidrogén-ortofoszfát CaNa ₂ H ₂ (PO ₄) ₂ =278,0	0,50:1
Kalcium-dinátrium-pirofoszfát CaNa ₂ P ₂ O ₇ =260,0	0,50:1
Kalcium-metafoszfát Ca(PO ₃) ₂ =198,0	0,50:1
Kalcium-hidrogén-ortofoszfát (dikalcium-foszfát) CaHPO ₄ =136,1	1,00:1
Kalcium-pirofoszfát (kalcium-difoszfát) Ca ₂ P ₂ O ₇ =254,1	1,00:1
Oktakalcium-ortofoszfát Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆ =892,4	1,33:1
Trikalcium-ortofoszfát Ca ₃ (PO ₄) ₂ =328,4	1,50:1
Hidroxi-apatit Ca ₅ OH(PO ₄) ₃ =502,3	1,67:1
Tetrakalcium-ortofoszfát Ca ₄ O(PO ₄) ₂ =366,3	2,00:1

talmazó tobozmirigyeket, atherosclerotikus aortarészleteket, natív és kiizzított csont részleteket salétromsavval extrahálva, spektrometriával meghatároztuk az oldat kalcium- és foszfortartalmát. Ugyanezt a meghatározást elvégeztük ecetsavval kezelt és kiizzított csontokon is. Nátrium-foszfátból és kalcium-kloridból különböző pH-k mellett csapadékokat képeztünk, amelyeknek megvizsgáltuk morfológiáját, polarizációs-optikai viselkedését, Kóssa- és kobaltszulfid-reakcióját, kalcium-foszfor arányát. (A csontok szeretlen állományának vizsgálatában a kollagénrostos alapállomány anizotropiája miatt a polarizációs mikroszkópia nem nyújt segítséget.)

EREDMÉNYEK

Különböző anyagokban illetve egyes kalciumvegyületekben a hisztokémiai reakciók eredményét az I. táblázat, a spektrometriával nyert eredményeket a II. táblázat mu-

tatja. A III. táblázatban az egyes kalciumfoszfátok Ca:P arányát foglaltuk össze.

A nem méasztelenített csontszövet metszetében erős Kóssa-reakció, enyhe basophilia és gyenge kobaltszulfid-reakció mutatkozott (1. kép). A basophiliát – a Kóssa- és a kobaltszulfid-reaktivitással együtt – a méasztelenítés megszüntette. A Kóssa-pozitív, kobaltszulfid-negatív, izotrop agyhomokban viszont a csontnál kifejezettebb eredeti basophilia (2. kép) csekély mértékben a méasztelenítés után is megmaradt (3. kép), és az ekkor Kóssa-negatívvá lett szemcsék enyhén kobaltszulfid-pozitívvá váltak (4. kép). A lúgos közegben előállított, amorf kalcium-foszfát in vitro is erős kobaltszulfid-reakciót [16] adott, míg a többi kalciumvegyület szövetmetszetben sem reagált [9]. Ha méasztelenített csont- vagy tobozmirigy-metszetet kalciumsó-oldatban pácoltunk, kimosás után nem kaptunk újra pozitív Kóssa-reakciót.

Oldható foszfátokat és kalciumsókat tartalmazó oldatokból pH 3-tól pH 6,5-ig rombooid-alakú, lecsorbult hegyű, lemezes, anizotrop, Kóssa-pozitív és kobaltszulfid-negatív kristályok alakjában kalcium-hidrogénfoszfát ülepedett le. Ezt a spektrometria is igazolta, mert a csapadék savas oldatában 1:1 Ca:P atomtömegarányt mutatott ki. PH 9 felett halvány barnás lemezekké összeállt, porszerű, izotrop, in vitro Kóssa-negatív és kobaltszulfid-pozitív kalcium-foszfátot kaptunk, amely az 1,3:1 Ca:P arány alapján oktakalcium-foszfát volt tartható. Az rgt-diffrakciós kép amorph állapotot jelzett. Köztes pH esetében a csapadék durvább rögös, gyengén Kóssa-pozitív, kobaltszulfid-negatív és részben anizotrop lett. A Ca:P arány 1,23:1 és 1,34:1 között váltakozott.

A tobozmirigyek nedves tömegére vonatkoztatva a kalciumtartalom átlag 2%-nak, a foszfortartalom pedig 1%-nak adódott. Atherosclerosisos aortákból a kalciumsóknak salétromsavval történő kioldásakor karbonátokra utaló csekély gázfejlődést (széndioxid) tapasztaltunk, az oldat pedig salétromsavas ammonium-molibdáttal a foszfátokra jellemző, bőséges, sárga csapadékot adott.

MEGBESZÉLÉS

Csontszövetben az alapállomány szerves részét az irodalmi adatok szerint főként kristályos hidroxipapatit, kevés kalcium-karbonát és amorf trikalcium-foszfát alkotja, egyesek viszont hidroxipapatit és karbonátapatit kristályos elegynek, ásványtanilag dahllitnak

$[(NaCa)_5(PO_4,CO_3)_3(OH)]$ tartják. Fiatal csontokban kalcium-hidrogén-ortofoszfátot (brushitot) és oktakalcium-foszfátot is találtak [6]. Feltételezik, hogy a hidroxipapatit oldható monokalcium-foszfátból, dikalcium-foszfáton és oktakalcium-foszfáton át történő átalakulással képződik [18].

A csontszövetben észlelt, 1,67:1-nél nagyobb Ca:P atomtömegarányt azzal magyarázhatjuk, hogy a csont a foszfátokon kívül kalcium-karbonátot is tartalmaz. Az aortafalban talált 1,50:1 és 1,67:1 közötti atomtömeg-

arány viszont arra enged következtetni, hogy a kalcium itt részben trikalcium-foszfát, részben kalcium-karbonát formájában van jelen. Amennyiben a kalcium közvetlenül kötődne a szövetekhez, vagy a meszes szövet túlnyomóan kalcium-karbonátból állna, a kalcium-foszfór aránynak meg kellene haladnia a szerves foszfátok jelenlétével még magyarázható értéket. Minthogy azonban az agyhomokban és az aortafalban kapott Ca:P arányok ezt a szintet nem érik el, a szövetekhez kötött kalcium-ionok mennyiségét – előző feltételezésünkkel szemben – elhanyagolhatónak tarthatjuk.

A kalcium a foszforsavval számos só képezhet, amelyek közül csak a monokalcium-ortofoszfát oldható. Minél nagyobb a Ca:P arány, általában annál kisebb a só oldhatósága. A kémiai irodalom szerint alkálifém-foszfátokból és oldható kalciumsókból semleges közegben az elméletileg várható trikalcium-foszfát helyett mindenkor hidroxipapatit képződik [16]. (Egyes vegyszergyártók a trikalcium-foszfátot hidroxipapatit néven hozzák forgalomba.)

A tobozmirigyekben a spektrometria a trikalcium-foszfátnak megfelelő Ca:P arányt mutatott, azonban metszetben az agyhomok kobaltszulfid-negatívnek bizonyult. Ugyancsak negatív eredményt adott a vegyszerként beszerzett trikalcium-foszfát is. Ezt azzal magyarázhatjuk, hogy az általunk lúgos közegben előállított kobaltszulfid-pozitív, izotrop kalciumsó, amelyet trikalcium-foszfátnak tartottunk, a spektrometria szerint valójában oktakalcium-foszfát [4]. Ezt a vegyületet a tobozmirigy nem tartalmazza, azonban egyes méasztlerakódásokban (pl. Schaumann-testek, vese kötőszöve, agyi erek, Gandy-Gamna-gócok) kimutatható [9].

Kísérleteinkből és az irodalomból úgy tűnik, hogy a kalcium-foszfátok összetétele, megjelenési formája és optikai jellege nagymértékben függ az előállítás körülményeitől (a hőmérséklet, pH, a komponensek koncentrációja, elegyítési aránya, az elegyítés sorrendje, a csapadék állási ideje a folyadékban) [15].

Cameron [3] szerint a meszes területeknek hematoxin-festéssel kimutatott basophiliája a szerves alapállománytól ered. Nem méasztelenített csontszövetnél azonban a basophiliát – a Kóssa- és a kobaltszulfid-reaktivitással együtt – szerves kalciumsóknak kell betudnunk, mert a méasztelenítés mindezeket megszünteti. Méasztelenített agyhomokban a megmaradt enyhe basophilia és a megjelenő gyenge kobaltszulfid-reaktivitás arra utal, hogy az elmeszesedés talaját képező szerves alapvázban vannak még illetve szabaddá váltak negatív gyökök, amelyekhez bizonyos fémionok (pl. a kobalt és a hematoxinban lévő alumínium) kapcsolódhatnak. Kóssa-reakcióval e területeken az ezüst fokozott kötődése nem mutatható ki, vegyszeres redukálás is alkalmazva pedig a metszet a megszokott módon diffúzan sárgára színeződik.

Megvizsgáltuk, hogyan változik csontban a Ca:P atomtömegarány ecetsavval történő kezelés illetve kiizítás után. Csontminta egyik részletében a spektrometria-

val mért Ca:P arány (~2,4:1) ugyanazon csont egy másik, ecetsavval kezelt részletében lényegesen kisebb lett (~1:1), feltehetően azért, mert a kalcium-karbonát a foszfátok mellől kioldódott. (Az arány kalcium-hidrogén-foszfátnak vagy kalcium-pirofoszfátnak felelt meg.) Csökkent az arány a csont kiizzítása után is (~1,3:1), holt mind a kalcium-karbonátból keletkezett kalcium-oxid, mind a trikalcium-foszfát hőstabilnak ismert vegyület, tehát a natív csontéval azonos érték volt várható. (Ilyen a Ca és P arány az oktalcium-foszfátban.) Ecetsavval kezelt, majd kiizzított csontban viszont jóval magasabb Ca : P arányt (~2:1) kaptunk, mint pusztá izzítás után, úgy, mintha a foszfortartalom csökkent volna. (Az arány megfelelt a tetrakalcium-foszfátnak.) Az észlelés ellenőrzéséhez és magyarázatához további vizsgálatok szükségesek.

IRODALOM

- Berger és mtsai: Johns Hopkins Med. J. 1970. 127. 2. Cit. Lillie R. D., Fullmer, H. M.: Histopathological Technic and Practical Histochemistry. 4th ed. McGraw Hill Co. New York, 1976. p. 540.
- Bills és mtsai: Johns Hopkins Med. J. 1971. 128. 194. Cit. Lillie R. D., Fullmer, H. M.: Histopathological Technic and Practical Histochemistry. 4th ed. McGraw-Hill Co. New York, 1976. p. 540.
- Cameron, G. R.: The staining of calcium. J. Path. Bact. 1930. 33. 929-955.
- Chow, L. C., Eanes, E. D.: Octalcium phosphate. Karger. Basel, 2001.
- Gallyas, F., Wolff, J. R.: Oxalate pretreatment and use of a physical developer render the Kossa method selective and sensitive for calcium. Histochemistry. 1985. 83. 423-430.
- Greenwood, N. N., Earnshaw, A.: Az elemek kémiája. Tankönyvkiadó, Budapest 1999. pp. 650-651, 712-717.
- Kóssa, J.: Ueber die im Organismus künstlich erzeugbaren Verkalkungen. Beitr. path. Anat. allg. Path. 1901. 29. 163-202.
- Krutsay, M.: Methode zur Darstellung einzelner Kalziumverbindungen in histologischen Schnitten. Acta histochem. 1963. 15. 189-191.
- Krutsay, M.: Beitrag zur Histochemie der Schaumann-Körper. Acta histochem. 1969. 32. 249-252.
- Krutsay M.: Patológiai technika. Medicina Kiadó. Budapest 1999. pp. 246-249.
- Krutsay M.: A kalcium hisztokémiai kimutatása alizarinvörös S-sel. Osteolog. Közl. 2000. 8. 216-217.
- Krutsay M.: A kalcium hisztokémiai kimutatása alizarinvörös S-sel. II. Osteolog. Közl. 2002. 10. 154-155.
- Krutsay M.: A kalcium hisztokémiai kimutatása alizarinvörös S-sel. III. Osteolog. Közl. 2003. 11. 224-225.
- Krutsay M.: A Kóssa-reakcióról. Osteolog. Közl. 2004. 12. 215-217.
- Krutsay M., Ferencz, G.: A kalciumpirofoszfát-kristályok azonosításáról. II. Osteolog. Közl. 2005. 13. 209-211.
- Náray-Szabó I.: Szervetlen kémia. II. köt. Akadémiai Kiadó. Budapest, 1957. pp. 275-278.
- Neumüller, O. A.: Römp vegyészeti lexikon. II. köt. Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1982. p. 89.
- Spencer, M.: An octalcium phosphate. Biochem. Biophys. Acta. 1980. 628. 244-238.
- Stoeltzner, W.: Über Metallfärbungen verkalkter Gewebeteile. Virch. Arch. 1905. 180. 362-365.

Köszönetnyilvánítás. A szerző köszönetet mond dr. Halmos Pál kandidátus, tud. főmunkatársnak (MTA Veszprémi Analitikai Kémiai Tanszéki Kutatócsoport) a spektrometriai mérések elvégzéséért.