

Kalcium- és vasvegyületek együttes lerakódása az agyban

Krutsay Miklós dr.

Magyar Imre Kórház, Patológiai Osztály. Ajka

Összefoglalás: A szerző a globus pallidusban lerakódott, erősen basophil anyagban a molibdenát-reakcióval ortofoszfátokat (ferri-foszfátot és kalcium-foszfátokat) mutatott ki.

COMMON DEPOSITION OF CALCIUM- AND IRON COMPOUNDS IN THE BRAIN

Orthophosphates (ferric phosphate and calcium phosphates) were detectable with the molybdate reaction. in the strongly basophilic material deposited in the globus pallidus.

Az agy szürke magvaiban észlelhető, vaslerakódással kísért, többnyire kétoldali, szimmetrikus mészlerekódás (basal ganglia calcification, BGC, cerebrovascularis ferrocalcinosis, calcinosiderosis) tüneteket általában nem okozó, viszonylag gyakori, időskori elváltozás. Forstl és mtsai (3) a koponya CT-vizsgálatra került betegek 1,2%-ában találták. Neuropsychiatriai tünetekkel járó formája lehet idiopathikus (Fahr-betegség) vagy anyagcserezavarokhoz, fertőző betegségekhez, toxikus ártalmakhoz, traumához társuló (12). Familiaris idiopathikus alakja (FIBGC) autosomális domináns öröklődésű. A tünetek (extrapyramidalis mozgásszavarok, feledékenység, személyiségváltozás, dementia) nem mutatnak összefüggést a meszesedés intenzitásával (3). A lerakódások leggyakrabban a globus pallidusban, ritkábban a nucleus dentatusban, a striatumban és a thalamusban fordulnak elő. Az érintett agyrészletekben makroszkópos elváltozás többnyire nem látható.

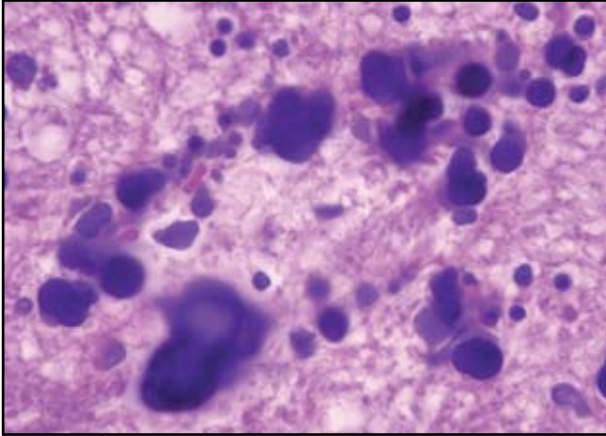
Az agyi vasfelhalmozódással járó neurodegenerációk (NDIA) csoportjába tartozó Hallervorden-Spatz-kórban (pantothenate kinase-associated neurodegeneration, PKAN) is található hasonló, vascularis lerakódások a globus pallidusokban és a substantia nigrában a makroszkóposan rozsdabarna elszíneződést okozó, intracelluláris hemosiderin- és lipopigment-accumuláció mellett (7).

Képkötő módszerekkel már in vivo is kimutathatók a lerakódások (1. kép). Szövettanilag – hematoxilin-eozinfestéssel – kékesfekete-lilásfekete színűkről könnyen felismerhetők (9). E helyeken az alumínium-hemato-



1. kép. Bazális ganglion meszesedés. CT-kép.

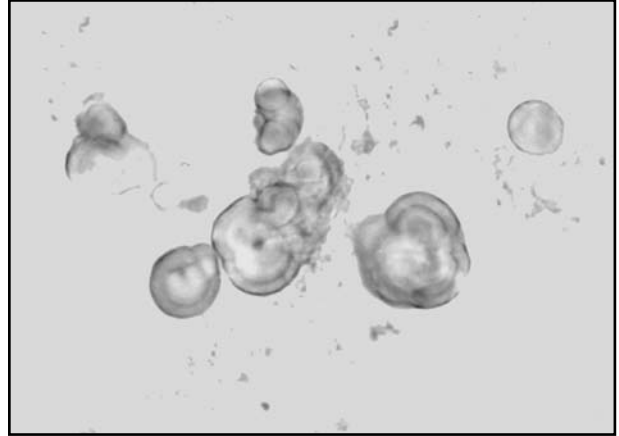
xilinből a vas(III)-ionok hatására vashematoxilin képződik, amely ezen depositumokat sötétebb színűre festi, mint az alumínium-hematoxilin az egyszerű mészlerekódásokat. Az erősen festődő anyag, amelyet a régebbi német irodalomban Pseudokalk-nak neveztek, a kis agyi



2. kép. Mész- és vaslerakódások a globus pallidusban. Hematoxilin-eozin-festés.

arteriák mediájában és adventitiájában diffúz beivódást, a kapillárisok mentén pedig rögöket képez. Benne a kalcium és a vas jelenléte hisztokémiailag könnyen igazolható, azonban a velük kapcsolatos anionok kérdések. A kalciumtartalmú komponens az izotrópia és az erős Kóssa-reakció alapján trikálciumfoszfátnak tarthatjuk, mert szövetmetszetekben ily módon csupán ez az egy kalciumvegyület reagál (11). A vastartalmú összetevőről is feltételezhető, hogy foszfát-aniont tartalmaz (6, 7), de ennek kimutatására nem rendelkezünk megfelelő lokalizációt adó hisztokémiai eljárással (1, 5). Ilyenek birtokában is felmerülhetne a kérdés, hogy ugyanazon helyen a pozitív reakciót a kalcium-foszfát, a vas-foszfát vagy mindkettő adta-e. Ennek eldöntése lehetségesnek tűnik, ha nagyobb mennyiségű lerakódást tartalmazó anyag savas kivonatát az analitikai kémia módszereivel vizsgáljuk, és az anionok mennyiségét összevetjük a kationokéval. Figyelembe kell azonban vennünk, hogy a kalcium, a foszfor és a vas a lágyszövetekben nagyrészt szerves kötésben van jelen, a vas koncentrációja pedig a másik két elemének csupán mintegy századrészét képezi.

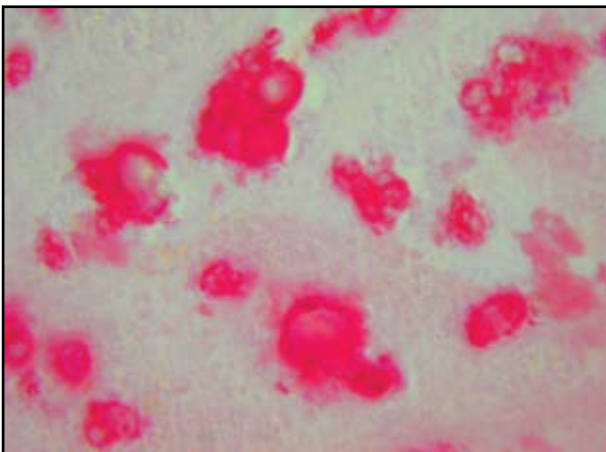
Egy súlyos fokú verőér elkeményedésben szenvedő, tüdőrákban meghalt, 57 éves férfibetegünk egyik oldali



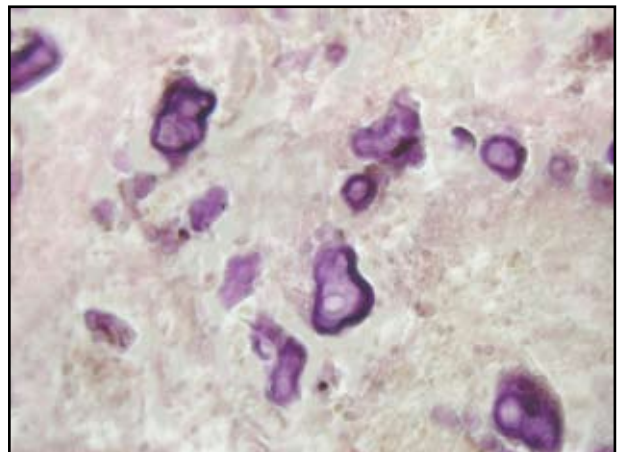
3. kép. A lerakódások festetlen készítményben.

globus pallidusában nátriumacetát-formalinban való fixálás után, paraffinmetszetekben, érfali mész- és vaslerakódások mellett tömegesen észleltünk natívan színtelen, hematoxilin-eozin-festéssel erősen basophil, izotrop, 7-27 μm átmérőjű, gömbölyded képleteket (2. és 3. kép), amelyeket sorozat-metszetekben különböző módszerekkel, hisztokémiailag vizsgáltunk. A depositumok körül, régebbi lágyulások jeleként, az agyszövet gócos felritkulása volt észlelhető. A másik oldali pallidumban csak a nagyobb erek falában találtunk kevés anorganikus lerakódást.

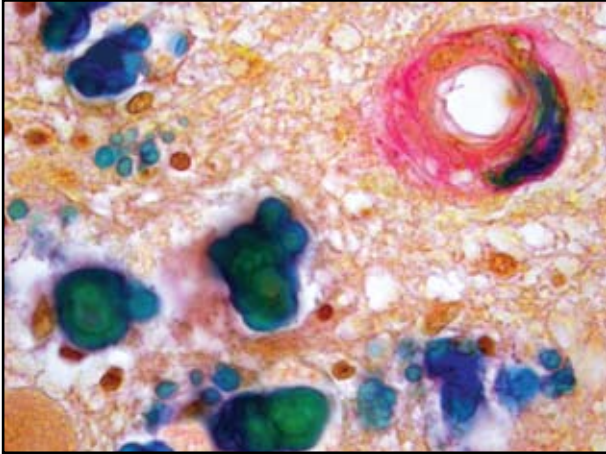
A képletek savakban való oldódása közben a gázfejlődés hiánya, valamint az izotropia karbonátok és oxalátok jelenléte ellen szólt. A Kóssa-reakció, valamint a redukálószer is alkalmazó, szélesebb spektrumú „mészreakció” pozitív eredményt adott. Az utóbbival az alapszövet sárgára festődött. Ecetsav-kezelés után a Kóssa-reakció negatív lett, a redukálószer is alkalmazó mészreakció barna színűre gyengült (a vasvegyület reagált). Az alizarinvörös-festés a gócot narancsvörösre festette (4. kép), ecetsav-kezelés után pedig ugyanott a vasra jellemző, szürkéslila színt mutatott (5. kép) (8). A ferri-vas jelenlétét bizonyító berlinikék-reakció ecetsav-kezelés után is pozitív maradt (6. kép), sósavban való rövid kezelés után



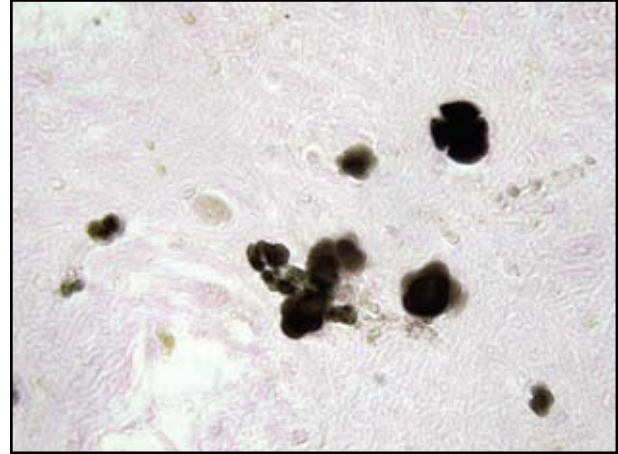
4. kép. Alizarinvörös-festés.



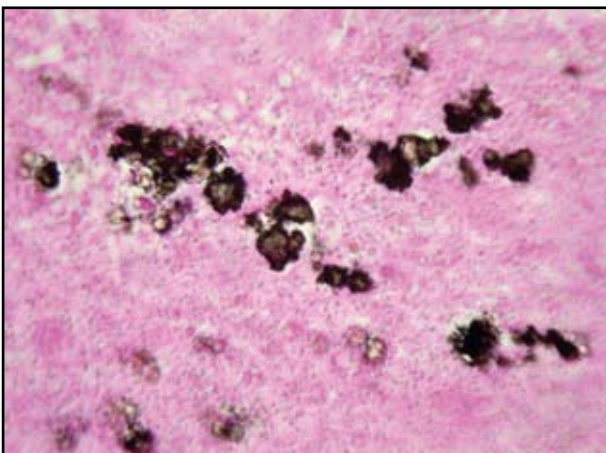
5. kép. Alizarinvörös-festés ecetsav-kezelés után.



6. kép. Berlinikék-reakció ecetsav-kezelés után.



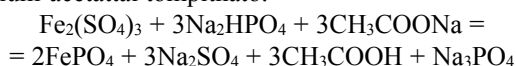
7. kép. Kobaltszulfid-reakció.



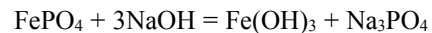
8. Kóssa-reakció oxálsav-kezelés után.

viszont negatívvá vált. A kobaltszulfid-reakció az erekben és a rögök egy részében pozitív volt, a rögök nagyobb hányada festetlen maradt (7. kép). Ecetsav-kezelés után a reagálás teljesen megszűnt. Oxálsav-kezelésre a lerakódások anizotrópok lettek, jelülül annak, hogy felszínükön kalciumoxalát-réteg képződött. A kezelés után a mészreakció pozitív maradt, a berlinikék-reakció viszont negatív lett. A kalcium-foszfátot kimutató Kóssa-reakciót az oxálsav-kezelés gyengítette. A rögök egyenletlenül, szemcsésen feketedtek meg (8. kép), felszínük szintelenül maradt része anizotropiát mutatott.

Mint hogy a lerakódások elkülönítésében a savakban való oldhatóságot lényegesnek találtunk, viszont az eredetileg rendelkezésünkre álló ferrifoszfát-preparátum tisztasága kétségessé vált, házilag készítettünk újabb preparátumokat kálium-dihidrogénfoszfátból, dinátrium-hidrogénfoszfátból ill. trinátrium-foszfátból az oldhatóság vizsgálatára. A savanyú foszfátokat nem kíséreltük meg előzőleg semleges foszfáttá alakítani, nehogy az esetleges lúgfelesleg hatására a ferrifoszfát ferrihidroxiddal alakuljon. A felszabaduló foszforsav aciditása nátrium-acetáttal tompítható.



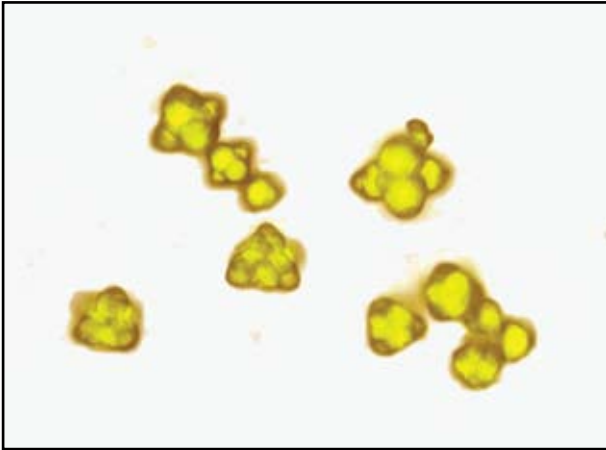
A kicsapással készült vas(III)-foszfát (FePO_4) sárgás-fehér, izotrop por. Erős ásványi savakban és oxálsavban könnyen oldódik, ecetsav nem oldja. Erős lúgok hatására belőle vörösesbarna ferri-hidroxid képződik, mert a lúg a gyenge bázist felszabadítja. Takacs és mtsai (16) szerint a ferrifoszfát pH 3,5 felett fokozatosan átmeneti termékekké (ferri-hidroxi-foszfát), majd (pH 4,5-nél lúgosabb közegben ferri-hidroxiddá változik. A ferri-hidroxid ecetsavban is oldható.



Ferri-foszfátból álló anizotrop ásvány a *strengit* ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), amelynek optikailag kéttengelyű kristályai a rombos rendszerbe tartoznak.

Az ortofoszfátnak tartott kalcium-komponenssel kapcsolatban megemlíjtük, hogy a trinátrium-foszfátból általunk előállított izotrop trikalcium-foszfát in vitro kobaltszulfid-pozitívnek bizonyult, de nem adott Kóssa-reakciót. Ismeretes, hogy az ezüst-nitráttal ioncserével reagáló kalciumvegyületek in vitro Kóssa-negatívak, mert a képződött ezüstsók nem fényérzékenyek. Metszetekben közülük csak az ortofoszfátok reagálnak, feltehetően azért, mert lerakódásaik valamely fényérzékenyítő anyagot is tartalmaznak (11). A Kóssa-reakciónál tanúsított viselkedéssel ellentétben a legtöbb kalciumsó in vitro kobaltszulfid-pozitív, de metszetekben csupán az ortofoszfátok egy része mutat pozitívást. Ezek általában vasvegyületekhez társulnak. (A csontban és az agyhomokban fiziológiásan előforduló kalcium-foszfátok nem vagy csupán igen gyengén reagálnak.) Ebben a viselkedésben szerepe lehet, hogy a képződött, vékony kobaltvegyület-réteg leválik az eredeti anyag felületéről (10).

A Gomori-féle alkalikus foszfatáz-reakciónál (4, 5, 13) a nátrium-glicerofoszfátból kobaltszulfid- ill. Kóssa-reakcióval kimutatható kalcium-foszfát keletkezik. Ennél az átalakulásnál – a szervezetben keletkezett lerakódásoktól eltérően – kémiailag tiszta anyag csapódik ki, tehát a belőle képződött ezüst-foszfát fényérzékenységét (Kóssa-pozitivitását) nem magyarázhatjuk a hozzá elegyedett szerves vegyületekkel. Gomori megemlíti, hogy ezen kalcium-foszfát anizotrop (5), tehát kémiai összeté-

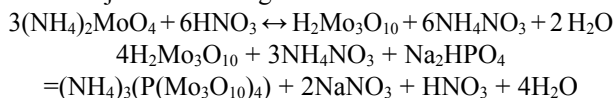


9. kép. A molibdenát-reagenssel képezett reakciótermék.

telében vagy legalább is molekulaszervezetében eltér az általunk előállított ill. a szövetekben lerakódott kalcium-foszfáttól.

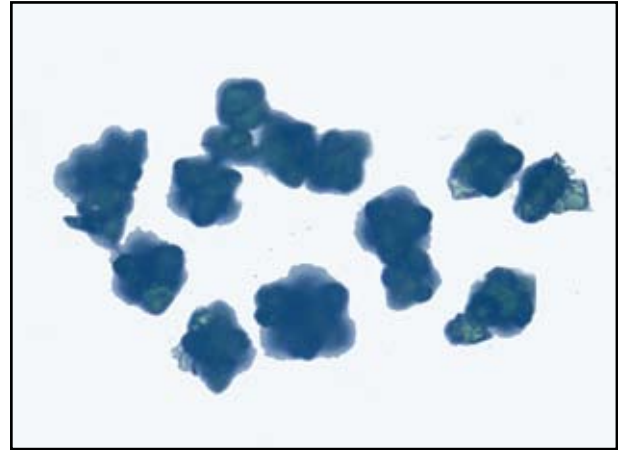
A kalcium-komponens ecetsavban való oldhatósága és a vas-komponens oldhatatlansága lehetővé tette az utóbbinak elkülönítését, és benne a feltételezett ortofoszfát-anion kimutatását. Erre a célra a molibdenát-reakciót alkalmaztuk (1, 14, 15, 17).

Az ammónium-molibdenát vízben oldódó, alkoholban oldhatatlan, fehér kristályos por. Összetétele $pH=6$ felett $(NH_4)_2MoO_4$, (ortomolibdenát), $pH=6$ alatt $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (hepta(para)molibdenát). Erős ásványi savak – különösen salétromsav – hatására izopolisavakká polimerizálódik. Ezek ortofoszfát-ionokkal heteropolisav (foszformolibdenát)-ionokat $(P(Mo^{VI}_3O_{10})_4^{3-})$ képeznek, amelyek a jelen lévő ammónium-ionokkal $(NH_4)_3(P(Mo^{VI}_3O_{10})_4)$ összetételű ammónium-foszformolibdenáttá egyesülnek. Ez utóbbi savakban oldhatatlan, lúgokban oldódó, citromsárga, kristályos vegyület, amelynek kialakulását melegítés és ammóniumsók jelenléte elősegíti.



A molibdenát-reakció határkoncentrációja 1 mg/ml (pD : 3,0), kimutatási határa: 5 μg PO_4^{3-} .

Az analitikai reakciók kifejező egyik mutató a *határkoncentráció* (D , $HK_{g/ml}$) azt fejezi ki, hogy 1 ml-ben hány g iont tartalmaz a leghígabb oldat, amelyben a kérdéses ion az adott reakcióval még kimutatható ($HK = KH/10^6HT = 1/HH$). A határkoncentráció negatív logaritmusát pD -vel jelöljük. Reciproka a *határhígítás* ($HH_{ml/g}$) megmutatja, hogy 1 g iont tartalmazó oldatot legfeljebb hány ml-re hígíthatunk fel, hogy benne az ion még kimutatható legyen ($HH = 10^6HT/KH = 1/HK$). A *határtérfogat* (HT_{ml}) a határkoncentrációnak megfelelő töménységű oldatnak az a legkisebb térfogata, amellyel még pozitív reakciót kapunk ($HT = KH \cdot HH/10^6 = KH/10^6HK$). A *kimutatási határ* ($KH_{\mu g}$), az ionnak az adott reakcióval kimutatható, mikrogrammokban ($1\mu g=1\gamma=10^{-6}g$) kifejezett legkisebb



10. kép. A ferroammónium-szulfáttal kezelt reakciótermék.

mennyisége ($KH = 10^6HT/HH = 10^6HT \cdot HK$). A határtérfogat ezt a mennyiséget tartalmazza.

A reagens készítésekor 5 g/dl ammónium-heptamolibdenátot és 10 g/dl ammónium-nitrátot tartalmazó oldathoz 10:3 arányban tömény (kb. 95 g/dl) salétromsavat adunk. (Alacsony hőmérsékleten a sav hatására az oldatból fehér, porszerű molibdéntrioxid válhat ki, amely enyhe melegítésre feloldódik (2).) Szöveteken végzett reakciónál figyelembe kell vennünk, hogy tömény salétromsav az aromás aminosavakat tartalmazó fehérjéket a xanthoprotein-reakció útján már önmagában is sárgára színezi.

Az ammónium-foszformolibdenátból redukálószer (pl. ascorbinsav, stannó-klorid, ferro-szulfát) hatására intenzív zöldeskék színű heteropolimolibdénkék $((NH_4)_7P(Mo^V_4Mo^{VI}_8O_{40}))$ keletkezik. Ennek koloidális oldata felhasználható a foszfor fotometriás meghatározására. A fenilhidrazin, savas közegben magát az ammónium-molibdenátot is redukálja, kék színt előidézve (1).

A reagenst a metszetre csepegtetve azon – ecetsav-előkezelés után is – sárga csapadék képződött (9. kép), amely híg vas(II)-szulfát (Mohr-só)-oldat hatására intenzíven megkékült (10. kép), igazolva ortofoszfát-ionok ill. ferri-foszfát jelenlétét. A reagens savtartalma az eredeti szöveti lerakódásokat pillanatszerűen feloldotta, ezért az oldatból ezt követően kivált csapadék a szöveten diffúzan oszlott el, és lokalizálása nem volt lehetséges. Ez utóbbi miatt *Bensley* (1) és *Gomori* (5) nem tartotta a reakciót sejt-szintű hisztokémiai célokra alkalmasnak. Ép nucleus lentiformis metszetén a reakciót elvégezve csupán halványkék elszíneződés mutatkozott, csapadék nem keletkezett.

A kóros agyrészlet lemetszett paraffin-blokkjából a paraffint xilollal és acetonnal kivonva, majd a szövet maradékát normál sósavval extrahálva, a kivonat klinikai-kémiai vizsgálatával a következő értékeket kaptuk Ca: 5,6 mmol, PO_4^{3-} : 2,5 mmol, Fe: 22 $\mu mol/100g$ nedvesanyag. Több ép (lerakódásoktól mentes) nucleus lentiformisra vonatkozóan ugyanezen meghatározások eredményei: Ca: 0,1-0,6 mmol, PO_4^{3-} : 1,6-2,1 mmol, Fe:

20-46 μmol között váltakoztak, 100 g nedvesanyagban. (Összehasonlításul a serum átlagértékei: Ca: 2,4 mmol/l, PO_4^{3-} : 1 mmol/l, Fe: 17 $\mu\text{mol/l}$)

Vizsgálataink szerint az agyi vascularis ásványianyag-lerakódásokban ferri-ortofoszfát mellett legalább két, izotrop, Kóssa-pozitív kalciumortofoszfát-féleség van jelen, ezeknek egyike kobaltszulfid-pozitív, a másik ezt a reakciót nem adja. A hisztokémiai reakciók alapján a vasfoszfát mennyisége jelentősnek tűnt, de ez a berlinikék-reakció érzékenységének volt betudható (kimutatási határ: 0,5 μg , pD : 7), mert a mennyiségi kémiai elemzés – a kalcium- és a foszfáttartalomtól eltérően – nem mutatta a vastartalom számottevő megszaporódását.

IRODALOM

1. *Bensley, R. R.*: An examination of the methods for the microchemical detection of phosphorous compounds. *Biol. Bull.* 1906. 10. 49-65.
2. *Cannon, P.*: The solubility of molybdenum trioxide in various mineral acids. *J. inorg. nuclear Chem.* 1959. 11. 124-127.
3. *Forstl, H., Krumm, B., Eden, S., Kohlmeyer, K.*: Neurological disorders in 166 patients with basal ganglia calcification. *J. Neurol.* 1992. 239. 36-38.
4. *Gomori, G.*: Microtechnical demonstration of of phosphatase in tissue sections. *Proc. Soc. Exper. Biol.* 1939. 42. 23-26.
5. *Gomori, G.*: Microscopic Histochemistry Principles and Practice. Univ. Chicago Press. 1952. pp. 47. 182.
6. *Környei I.*: Neuropathologia. Akadémiai Kiadó. Budapest, 1987. pp. 259-260.
7. *Krutsay M., Garzuly F.*: Anorganikus és pigment-lerakódások az agyban Hallervorden-Spatz-betegségben. *Ideggyógy. Szemle.* 1993. 46. 124-127.
8. *Krutsay M.*: A kalcium kimutatása alizarinvörös S-sel. II. *Osteol. Közl.* 2002. 10. 154-155.
9. *Krutsay M.*: Kalcium- és vasvegyületek együttes lerakódása a szövetekben. *Osteolog. Közl.* 2009. 17. 134-137.
10. *Krutsay M.*: A kobaltszulfid-reakcióról. *Osteol. Közl.* 2011. 19. 196-197.
11. *Krutsay M.*: A Kóssa-reakcióról. II. *Osteol. Közl.* 2012. 20. 32-35.
12. *Lauterbach, E.* (ed.) : Psychiatric management of neurological diseases. Amer. Psychiatr. Press. Washington, 2000. pp. 137-178.
13. *Lillie, R. D., Fullmer, H. M.*: Histopathologic technic and practical histochemistry. 4th ed. McGraw-Hill Co. New York, 1976. p. 365.
14. *Macallum, A. B.*: On the detection and localisation of phosphorous in animal and vegetative tissues. *Proc. Roy. Soc. B.* 1898. 63. 467-479.
15. *Mann, G.*: Physiological Histology. Clarenton Press. Oxford, 1902. p. 295.
16. *Takacs, I., Murthy, S., Smith, S.* et al.: Chemical phosphorus removal. *Water Sci. Techn.* 2005. 52. 549-555.
17. *Thistlethwaite, W. P.*: The determination of the composition and constitution of ammonium phosphomolybdate and the conditions affecting its precipitation. *Analyst.* 1947. 72. 531-540.

Köszönetnyilvánítás: A szerző köszönetet mond Rádonyi Gyula főmérnöknek a klinikai-kémiai vizsgálatok elvégzéséért és Szállásy Anita kórszövettani asszisztensnek a kísérletekben való közreműködésért.

Date:
The Course will be held
Monday 3rd February 2014 until Friday 7th, 2014

Course Venue:
AOK-Vienna
(Algemeines Krankenhaus)
Hoersaalzentrum, Level 7
Währinger Gürtel 18-20
A-1090 Vienna

Registration fee:
Registration is accepted after full payment of the fee!
Certified radiologists: 700 €
Residents (with certification) 500 €

Deadline for registration: January 8th 2014

Bank account:
Bank Austria Unicredit
Account number: 504-671819/00
Name: Holzschneidwieseln
Address: Alandstr. 4, 1090 Vienna
Payment for: EMRI Erasmus Course 2014
IBAN: AT 261200050457181900
SWIFT/BIC: BKAUAT33
Bank Code: 12000

Limited participation!
Fee include syllabus, coffee-breaks, lunches, reception and social dinner

Local organization: F. Kemberger, K. Friedrich, H. Imhof

Course Registration and Information:
H. Fischer, E. Fischer, Chr. Arnecker
E-Mail: erasmus-course-vienna@redunivie.ac.at
Fax: ++43 1 4060 4899
Web-Site: www.erasmus.ac.at
Sponsored by:



EMRI Erasmus Course
MRI of the joints
Vienna, 3. – 7. February 2014

Module Coordinators:
Maryam Shahabpour (Brussels)
Hans Biam (Leiden)
Horng Imhof (Vienna)
Mark Davies (Birmingham)

Sponsored by:
Bayer HealthCare
Bayer Schering Pharma