

# A kalciumvegyületek hisztokémiai elkülönítése

Krutsay Miklós dr.

Magyar Imre Kórház, Patológiai Osztály, Ajka

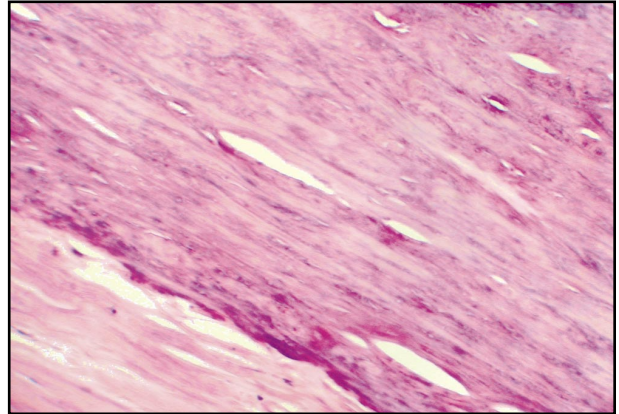
**Összefoglalás:** A timsós hematoxilin nem specifikus reagense a kalciumnak, sőt kioldja a trikálcium-foszfátot, a kalcium-karbonátot, a kalciumhidrogén-foszfátot és a kalcium-pirofoszfátot a metszetből, viszont megfesti a szerves alapállományt a trikálcium-foszfát és a kalcium karbonát lerakódások helyén. A kalcium-oxalát hematoxilin-festés után is a metszetben marad, és hisztokémiai módszerekkel vagy polarizációs mikroszkópiával kimutatható. A szerző két algoritmust közöl a kalciumvegyületek elkülönítésére.

## HISTOCHEMICAL DIFFERENTIATION OF CALCIUM COMPOUNDS

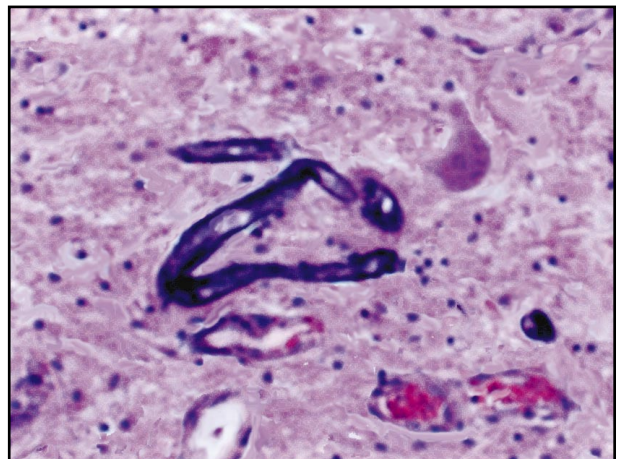
*Alum hematoxilin is not a specific reagent for calcium, moreover it dissolves the potassium tricalcium phosphate, calcium carbonate, potassium hydrogen phosphate, and calcium pyrophosphate from the sections. on the other hand it stains the organic ground substance at the place of tricalcium phosphate and calcium carbonate deposits. Calcium oxalate remains in the section after staining by hematoxilin and is demonstrated by histochemical methods or by polarizing microscope. The author publishes two algorithms for the differentiation of the calcium compounds.*

**A** kalciumvegyületek a szervezetben szilárd állapotban trikálcium-foszfát (pontosabban: ennek kalciumhidroxiddal alkotott vegyes sója: a hidroxipatit [ $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$ ]), kalcium-karbonát, kalciumhidrogén-foszfát, kalcium-pirofoszfát-dihidrát, kalcium-oxalát és zsírsavas kalcium alakjában fordulhatnak elő. Az egyes kalciumvegyületek hisztokémiai reakcióit az I. táblázatban foglaltuk össze.

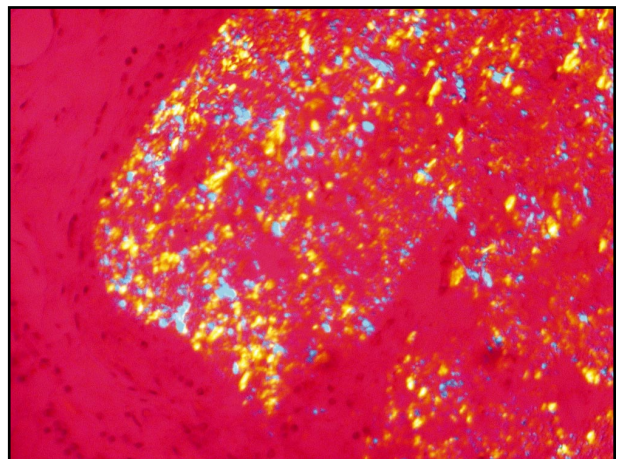
Tankönyvi adat, hogy a szövetekben leggyakrabban



1. ábra. Elmeszesedett epehólyagfal metszete. Mésztelenített anyag. Hematoxilin-eozin-festés.



2. ábra. Ferri-foszfát kis agyi erek falában. Hematoxilin-eozin-festés



3. ábra. Zsírsavas kalcium kristályai pancreas-zsírnekrosisban. Festetlen paraffinmetszet. Polarizált fény. Rot I kompenzátor.

I. táblázat

## A szövetekben előforduló egyes kalcium- és vasvegyületek reakciói

	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	CaCO <sub>3</sub>	CaHPO <sub>3</sub>	Ca-oxalát	Zsírsavas Ca	Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	FePO <sub>4</sub>
Anizotropia	-	+	+	+	+	+	-
Hematoxin- festés után	kioldódott, alap lila	kioldódott, alap lila	kioldódott	kristályos maradt	kristályos maradt	kioldódott	kékes- szürke
5 ml/dl-es ecetsavban	oldódik	oldódik +CO <sub>2</sub>	oldódik	nem oldódik	nem oldódik	oldódik	nem oldódik
<i>n</i> sósavban	oldódik	oldódik	oldódik	oldódik	zsírsavvá alakul	oldódik	oldódik
Mészreakció	++	++	+	++	-	-	+
Oxálsav- mészreakció	++	++	+	++	++	++	-
Alizarinvörös- festés	+	+	+	+	+	+	+(lila)
Kobaltszulfid- reakció	+	-	-	-	-	-	+
Berlinikék- reakció	-	-	-	-	-	-	+

használt hematoxin-festés a kalciumvegyületeket (triviálisan: a „meszet”) kék színben tünteti fel, amely színt a szokásos eozin-kontrasztfestés liláskékre vagy lilára változtatja. A fenti megállapítással szemben a hisztokémiailag (oxálsav-mészreakcióval, alizarinvörös-festéssel [2, 6]) kalciumtartalmúnak talált területek a hematoxin-eozin-festéskor kétféleképpen viselkedhetnek (I. táblázat):

1. Mutathatják a fenti leírt, és más kationos színezékekkel is elérhető basophil festődést (pl. csontok, csonttartalmú daganatok, a tobozmirigy agyhomok-szemcséi, mészlerakódások elhalt, elsajtosodott szövetekben, atherosclerosis arteriákban, Schaumann-testek tuberculoid sarjszövetekben, Michaelis-Gutmann-testek malakoplakiában, pasammoma-testek meningeomákban, plexus chorioideus-papillomákban és papillaris carcinomákban). Ez a festődés a patológusok számára igen értékes, mert egy metszetben, külön mészreakciók végzése nélkül felhívja a figyelmet a kalciumsók jelenlétére (I. ábra).

Az említett lerakódások többsége izotrop és feltehetően csupán trikálcium-foszfátot (hidroxí-apatitot) tartalmaz. A basophil a szövet mésztelenítése vagy a met-

szetnek 0,02*n* sósavval történő kezelése után is változatlan marad, míg a mészreakciók negatívvá válnak. Ugyancsak negatívak lesznek a mészreakciók 0,02*n* sósavtartalmú timsós hematoxin-oldattal való festést követően is. Ez megerősíti Cameron [1] véleményét, miszerint a hematoxin nem a kalciumvegyületeket hanem a mészlerakódás talajául szolgáló basophil, szerves alapállományt festi, amelyhez trikálcium-foszfát – és esetenként kalcium-karbonát is – kötődik.

A szintén basophil festődésű csontszövet kollagénrostos alapállományának anizotropiája miatt a szeretlen állományt alkotó hidroxí-apatit és kalcium-karbonát jelenléte nem mésztelenített anyagban sem bizonyítható polarizációs optikailag. Elhalt szövetekben és atherosclerosis esetén azonban mutatkozhatnak anizotrop kalciumkarbonát-szemcsék a festetlen metszetek azon területein, amelyek a hematoxin-eozin megfestett készítményekben basophiloknak bizonyultak. Timsós hematoxin-festés után, a kalcium-karbonát anizotropiája nem vizsgálható, mert a vegyület már a festékoldatban lévő és savasan hidrolizáló timsó hatására is kioldódik (pH=2,9). Az oldathoz a szokásos előírások szerint hozzáadott sav (cit-

*II. táblázat*  
**A kalciumvegyületek, az urátok és a ferrifoszfát elkülönítése szövettani metszetekben**

hematoxilin-eozin-festés				
liláskék alap		anizotrop kristályok		kékesszürke
új metszet, polarizált fény		új metszet, ferri-ferricianid-reakció		berlinikék-reakció
izotrop	anizotrop	negatív	pozitív	pozitív
CoS-reakció	CoS-reakció	új metszet, mészreakció		urátok
pozitív	negatív	pozitív	negatív	FePO <sub>4</sub>
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	CaCO <sub>3</sub>	Ca-oxalát	új metszet, oxálsav-mészreakció	
			pozitív	
			zsírsavas Ca	

*III. táblázat*  
**A kalciumvegyületek elkülönítése szövettani metszetekben**

oxálsav-mészreakció				
pozitív				
új metszet, polarizált fényben				
izotrop	anizotrop			
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	mészreakció (oxálsav nélkül)			
	pozitív		negatív	
	új metszet, 5 ml/dl-es ecetsavban		új metszet, <i>n</i> sósavban	
	oldódik		nem oldódik (anizotrop marad)	oldódik
	+CO <sub>2</sub>	-CO <sub>2</sub>	kalcium-oxalát	kalcium-pirofoszfát
	kalcium-karbonát	kalcium-hidrogén-foszfát		zsírsavas kalcium

romsav, sósav vagy ecetsav) a pH-t tovább csökkenti, és a kioldódást meggyorsítja.

A kis agyi erek fala ill. a kollagénrostos kötőszövet hematoxilin-eozin festéskor némely esetben feltűnő, sötét kékesszürke-lilásfekete színben mutatkozik (2. ábra). Ez

a színeződés nem kalciumvegyületektől, hanem ferri-foszfáttól ered. Ugyanitt alizarinvörössel szürkéslila, egyszerű mészreakciónál pedig barna szín lép fel. Ezen „Pseudokalk” mutatható ki pl. Hallerworden-Spatz-betegségben is, az agyban [5]. Az így festődő területek a

berlinikék-reakciót is adják, kobaltszulfid-reakciónál pedig a kénhidrogén határára barnásfekete vas-szulfid képződik bennük. A festődést ill. a reakciókat 0,02n sósavas előkezelés nem befolyásolja (mint ahogyan a 0,02n sósav-tartalmú hematoxilin-oldat sem vonja ki a ferri-foszfátot), azonban 10 g/dl-es, acetonos oxálsav-kezelés [2] vagy 5 g/dl-es oxálsav-kezelés megakadályozza. A fentiek arra utalnak, hogy vas(III)-foszfát esetében hematoxilinnal valóban a fémvegyület, és nem az alapszövet festődik. A ferri-foszfát-lerakódás, az érfalnak kissejtes carcinómában észlelhető, basophil DNS-beivódása és arteriák atherosclerosis elmeszesedése hisztokémiailag berlinikék-, Feulgen- ill. mészreakcióval különíthető el.

2. Más elváltozásokban a hisztokémiailag kalciumtartalmúnak bizonyult területek nem basophilek, hematoxilinnal nem festődnek, de színtelen, anizotrop kristályok találhatóak bennük. A kalciumoxalát Schaumann-testek kíséretében, tuberculoid sarjszövetek óriássejtjeiben [7], etilén-glikol-mérgezés esetében a vesecsatornákban, a zsírsavas kalcium pancreas zsírnecrosisban) (3. ábra) észlelhető. A kalciumpirofoszfát-dihidrát, amely mészköszvényben, az ízületek környékén rakódik le, vizsgálataink szerint formalin-fixálás esetén – az urátokhoz hasonlóan – kioldódik, alkohol-rögzítés esetén azonban megtartott marad. Ezen vegyületet, valamint a kalcium-hidrogénfoszfátot a timsós hematoxilin feloldja, tehát

csak akkor mutathatók ki, ha vizsgálatot nem hematoxilin-eozin-festéssel, hanem mészreakcióval vagy polarizációs mikroszkópiával kezdjük.

A fentiek alapján, a hematoxilin-eozin-festés ill. az oxálsav-mészreakció eredményéből kiindulva, két algoritmust állítottunk össze a kalciumvegyületek, a ferri-foszfát, és az urátok elkülönítésére (II. és III. táblázat).

## IRODALOM

1. Cameron, G. R.: The staining of calcium. J. Path. Bact. 1930. 33. 929-955.
2. 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.
3. Kóssa, J.: Über die im Organismus künstlich erzeugbaren Verkalkungen. Beitr. Path. Anat. 1901. 29. 163-202.
4. Krutsay M.: Methode zur Darstellung einzelner Kalziumverbindungen in histologischen Schnitten. Acta histochem. 1963. 15. 189-191.
5. Krutsay M., Garzuly F.: Anorganikus és pigment-lerakódások az agyban Hallervorden-Spatz-betegségben. Idegyógy. Szemle. 1993. 46. 124-127.
6. Krutsay M.: A kalcium hisztokémiai kimutatása alizarin-vörös S-sel. Osteolog. Közl. 2000. 8. 216-217.
7. Reid, J. D., Andersen, M. E.: Calcium oxalate in sarcoid granulomas. Amer. J. clin. Path. 1988. 90. 545-558.