

A Kóssa-reakcióról

Krutsay Miklós dr.

Magyar Imre Kórház, Patológiai Osztály, Ajka

Összefoglalás: A klasszikus Kóssa-reakcióval *in vitro* a kalciumvegyületek (hidroxi-apatit, kalcium-hidrogén-foszfát, kalcium-karbonát, kalcium-oxalát, kalcium-pirofoszfát, kalcium szappanok) nem festődnek. A módszer nem a kémiai jól meghatározott, nagyrészt anorganikus kalciumvegyületeket mutatja ki a szövetekben, hanem a szövethez kötött kalciumot, illetve a kalciumionok megkötésére képes szöveti csoportokat tünteti fel.

ON THE KÓSSA REACTION

The calcium compounds (hydroxylapatite, calcium hydrogen phosphate, calcium carbonate, calcium oxalate, calcium pyrophosphate, calcium soaps) fail to be stained in vitro by the classical Kóssa reaction. The method does not detect the chemically good determined, mostly inorganic calcium compounds in the tissues, but demonstrates the tissue-bound calcium, i. e. the organic tissue groups which are able to bind calcium ions.

Kóssa Gyula, a budapesti Állatorvosi Főiskola Gyógyszertani Intézetének tanára a róla elnevezett, mindmáig használatos szövettani „mészreakció” több mint egy évszázada, 1901-ben írta le. Az eljárás azon alapul, hogy a metszetet ezüstnitrát-oldattal kezelve az oldhatatlan kalciumvegyületekben a fém helyére ezüst lép, a keletkezett, szintén oldhatatlan ezüstsó pedig fény hatására redukálódva, ezüstkiválás közben megfeketedik. A pozitív reakció feltétele egyrészt, hogy a cserebomlás bekövetkezzék, másrészt, hogy az ezüstvegyület fényvel redukálható legyen. (Nem mindegyik kalciumsó reagál ezüstionokkal, és nem mindegyik ezüstsó redukálható.)

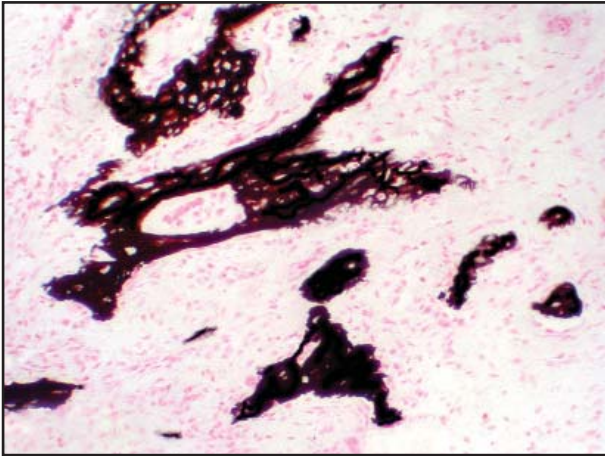
A módszer nem specifikus a kalciumra, hanem azokat a savmaradékokat (foszfát, hidrogénfoszfát, karbonát, oxalát, pirofoszfát, zsírsav) mutatja ki, amelyeknek ezüstsója oldhatatlanabb az eredeti kalciumsónál. Mint-hogy a szervezetben előforduló lerakódásokban ezek a savmaradékok nagyrészt kalciummal kapcsolatosak, az egyszerű eljárás kalcium-kimutatásként használható. Előnye, hogy az alapszövet szintelen marad.

Specifikussá tehetjük a módszert, ha a metszetet előzőleg oxálsavval kezeljük (Gallyas és Wolff, 1985). Ekkor ugyanis a sav az esetleges egyéb fémek sóit (például a ferri-foszfátot) kioldja, a kalciumsók viszont kalcium-oxaláttá alakulva visszamaradnak. Minthogy az ezüst-oxalát napfényen nem redukálódik, a módosított eljárásnál a szerzők azt hidrogén-peroxiddal barna ezüst-oxidá oxidálták, majd UV-fénnyel kezelték, a képződött ezüst-

gócokat pedig fizikai előhívással növelték meg. (Ezüst-oxid keletkezését az igazolja, hogy ammonia-oldattal könnyen kivonható a metszetből, míg a fém-ezüst ammóniákban oldhatatlan.) Mellőzhető a hidrogén-peroxid, az UV-fény és a fizikai előhívás, ha az ezüst-oxalátot kémiai redukáljuk (Krutsay 1963). Ezzel a módszerrel a legtöbb ezüstsó oxálsav-előkezelés nélkül is feltüntethető. A kalcium-pirofoszfát és a zsírsavas kalcium kimutatásához azonban oxálsav-előkezelés feltétlenül szükséges, mert az ezüst-nitrát nem reagál velük, csak akkor, ha már kalcium-oxaláttá alakítottuk őket.

Stoeltzner (1905) az ezüst-nitráton kívül vas-, kobalt- és ólomsó-oldatokat is használt reagensként, és a kalciumsók helyén keletkezett oldhatatlan fém-sókból ammónium-szulfiddal sötét színű szulfidokat (Ag_2S , Fe_2S_3 , CoS , PbS) képezett a metszetben. Ezen reakciók kimenetele csupán attól függ, hogy az illető kalciumvegyület és a másik fém-só között bekövetkezik-e cserebomlás, azaz az új fémvegyület oldhatatlanabb-e az eredeti kalciumvegyületnél. A kobaltszulfid-reakciót specifikusnak találtuk a trikálcium-foszfátra $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ illetve a $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$ összetételű vegyes sóként azt tartalmazó hidroxi-apatitra (Krutsay 1969).

Kézenfekvőnek látszott, hogy a Kóssa-reakció pozitívítását a fent említett kalciumvegyületek valamelyikének a szövetekben való jelenléte okozza. Amikor azonban a kalciumvegyületekkel azonos savmaradékokat tartalmazó, *in vitro* előállított, oldhatatlan ezüstvegyületeket



Csontgerendák nem mésztelenített szövet metszetében. Kóssa-reakció, Kernechtrot-magfestés

(ezüst-foszfátot, ezüst-karbonátot stb.) napfény hatásának tettük ki, azt tapasztaltuk, hogy azok nem redukálódnak (lásd táblázat). Ha a kalciumvegyületeket a metszetek felragasztására használt tojásfehérje-glicerinnel keverve tüdőszövetbe fecskendeztük, és paraffinbeágyazás után abból metszeteket készítettünk, a Kóssa-reakciónál csupán a kalcium-hidrogénfoszfátból képződött ezüstsó feketedett meg. Ezen vegyület redukciója in vitro is bekövetkezett, ha a sötét tojásfehérje- vagy zselatinoldatban szuszpendáltuk. (Már Kóssa is megemlítette, hogy az ezüst-foszfát csak szerves anyagok jelenlétében redukálódik.) A hidroxipapatitból előállított ezüstsó fény hatására metszetben sem változott, és az ezüst csupán kémiai redukálószer hatására vált ki belőle.

Ez arra utal, hogy kalcium-hidrogénfoszfátból és hidroxipapatitból ezüst-ionok hatására keletkező foszforsavas ezüstsó eltérő összetételű és fényérzékenységű.

Tankönyvi adat, hogy a csontszövet szeretlen állományát kb. 8:1 arányban hidroxipapatit és kalcium-karbonát alkotja. A szerves alapállomány (a kollagénrostok) anizotropiája miatt a polarizációs-mikroszkópos vizsgálat nem használható fel az anizotrop kalcium-karbonát lokalizálására és az izotrop hidroxipapatitól való elkülönítésére. Ezen két vegyülettel végzett, negatív eredményű in vitro-kísérletekkel szemben csontszövet-metszetekben a Kóssa-reakció pozitívnak bizonyult (lásd ábra), ami a szerves alapállomány szerepét igazolja a kalciumsókból képződött ezüstsók fényérzékenységének fokozásában.

A kobaltszulfid-reakciónál a csontszövet éppen ellenkezőleg viselkedik, mint a Kóssa-reakciónál, ugyanis a benne lévő hidroxipapatit in vitro adja a kobaltszulfid-reakciót, míg metszetben nem reagál. Feltehetően a csontszövetben a kalcium nem csupán a foszfát-csoportokhoz, hanem a szerves alapvázhhoz is kötődik, és ezt a kötést a kobalt-ionok nem képesek megbontani. Észleltük, hogy a szövettani vizsgálat céljából mésztelenített csontszövet kemény csapvízben történő mosáskor kissé „visszakeményedik”. (Ennek elkerülésére ajánlottak empirikusan a régi hisztotechnikai kézikönyvek tömény nátriumszulfát-oldatban történő mosást.) Ha mésztelenített csontszövetet kalciumsó- (például kalciumacetát-) oldattal kezelünk, desztillált vízben való alapos kimosás után, alizarinvörös-festéssel vagy rtg-vizsgálattal kimutatható, hogy a szövet újból kalciumot vett fel. Minthogy a sával történő mésztelenítéskor a kalciummal együtt a hidroxipapatit

A kalciumvegyületek hisztokémiai reakciói

	Szövethez kötött kalcium	Csontszövet	Kalcium-hidrogén-foszfát	Trikalcium-foszfát. Hidroxipapatit	Kalcium-karbonát	Kalcium-pirofoszfát. Zsírsavas kalcium
Kóssa-reakció in vitro	0	+	-	-	-	-
Kóssa-reakció metszetben	+	+	+	-	-	-
Kóssa-reakció kémiai redukálással	+	+	+	+	+	-
Oxálsav-Kóssa-reakció, kémiai redukálással	+	+	+	+	+	+
Kobaltszulfid-reakció	-	-	-	+(Csontszövetben negatív)	-	-
Alizarinvörös-reakció	+	+	+	+	+	+
Fénytörés	izotrop	anizotrop	anizotrop	izotrop	anizotrop	anizotrop

apatit foszfát-csoportjai is kivonódnak, ez a jelenség csak a szerves alapállomány fémionok iránti affinitásával magyarázható.

Megfigyeléseink azt bizonyítják, hogy a klasszikus Kóssa-reakció pozitivitása nem a szövetektől izoláltan is létező, kémiaiailag jól meghatározott kalciumvegyületeken, hanem a szerves szöveti váz negatív töltésű csoportjaihoz kapcsolódó kalcium-ionokon alapul. Ilyen, szövetekhez kötött kalcium fordul elő a csontszövetben, az agyhomokban, a psammoma-testekben, elhalt, elmeszesedett szövetekben és az agyi mészlerakódásokban.

IRODALOM

1. 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.
2. Kóssa, J.: Ueber die im Organismus künstlich erzeugbaren Verkalkungen. *Beitr. path. Anat. allg. Path.* 1901, 29, 163-202.
3. Krutsay, M.: Methode zur Darstellung einzelner Kalziumverbindungen in histologischen Schnitten. *Acta histochem.* 1963, 15, 189-191.
4. Krutsay, M.: Beitrag zur Histochemie der Schaumann-Körper. *Acta histochem.* 1969, 32, 249-252.
5. Stoeltzner, W.: Über Metallfärbungen verkalkter Gewebeteile. *Virch. Arch.* 1905, 180, 362-365.