

A kalciumpirofoszfát-kristályok azonosításáról

Krutsay Miklós dr. és Ferencz Géza dr.

Magyar Imre Kórház, Patológiai Osztály, Ajka és Országos Rheumatológiai és Fizioterápiás Intézet, Kristálydiagnosztikai Laboratórium, Budapest

Összefoglalás: A szerzők az általuk *in vitro*, hevítéssel előállított kalcium-pirofoszfát-kristályokat hosszukra vonakoztatva negatív kettőtörésűeknek találták. Egyes preparátumokban, vizes közegben való állás közben, átkristályosodás folytán a kettőtörés pozitívrá változott. A transzmissziós elektromikroszkópos vizsgálat bizonyította, hogy az optikailag negatív tűs kristályok hossz tengelyükkel harántirányban egymás mellé rendeződött, apró, szintén tűszerű, elemi kristályokból állnak. Ezek méretük miatt polarizációs optikailag nem vizsgálhatók, azonban hosszukra pozitív optikai jellegűeknek kell lenniük, hogy együttesen az észlelt negatív ket-

tőtörést előidézhessék. A kicsapással készült kristályok részint pozitív, részint negatív kettőtörést mutattak.

Formalin-fixálás és szövettani beágyazás során a kristályok kioldódtak, alkohol-fixálás után a metszetben maradtak.

Minthogy az *in vitro* készült kalcium-pirofoszfát kristályok alakja, nagysága és kettőtörése a preparálás módjától függően változó, az összehasonlításra szolgáló kontrollt gondosan kell megválasztanunk. Elektron diffrakciós vizsgálattal a synoviális folyadék polarizációs mikroszkópos vizsgálatának biztonsága jelentősen fokozható.

IDENTIFICATION OF CALCIUM PYROPHOSPHATE CRYSTALS

Artificial calcium pyrophosphate crystals, produced by the authors by heating of calcium hydrogen phosphate, were found have a negative double refraction relative to their longitudinal direction. The double refraction changed to positive in some artificial crystal preparations during storage in water. Transmission electron microscopic evaluation indicated that the optical negative crystals were composed of needle-like, parallel elementary crystals oriented diagonally to the length of the needle-shaped main crystal structure observed by light microscope. Due to their size, the tiny elementary crystals could not be studied individually by polarization microscope, but the observed negative double refraction suggests a positive optical character relative to their length. The crystals produced with precipitation showed partly positive partly negative birefringence.

The calcium pyrophosphate crystals dissolved during formalin fixation and histological embedding while they remained intact in tissues fixed in alcohol.

*Care should be taken when applying any *in vitro* produced crystal as a control since the shape, size and double refraction of the crystals may be altered by the way of preparation. The reliability of the polarization microscopic examination of synovial fluids can be significantly improved by electron diffraction.*

A kalciumpirofoszfát-dihidrát ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CPPD) mézsköszvényben (álkőszvény, pyrophosphate arthropathia, chondrocalcinosis, calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease) az ízületi porcban, tokban és szalagokban rakódik le, és innen bejut a synoviális folyadékba is. Az ismeretlen eredetű be-

tegség idiopathikus, sporadikus formája főként idősebeknél fordul elő, autosomális domináns öröklődésű, familiáris alakja azonban fiatalabb korban kezdődik. Az elváltozás haemochromatosishoz, Wilson-kórhoz, diabeteshez, hyperparathyreoidismushoz, hypothyreosishoz társulhat. A haemochromatosisos betegek 30–50%-a

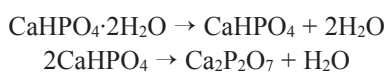
chondrocalcinosisban is szenved. A valódi köszvénytől való elkülönítésében a klinikai tüneteken kívül a röntgenkép, a serum húgysav-szint és az ízületi nedv vizsgálatának van fontos szerepe.

A monoklin illetve a triklin rendszerhez tartozó kalciumpirofoszfát kristályai 1–20 µm nagyságúak, alakjuk változatos: pálca, zömök rombold vagy téglalap. Az ugyanilyen nagyságú, ugyanezen kristályrendszerekbe sorolt mononátrium-urát (MNU) ezzel szemben hegyes végű, tűszerű kristályokat képez, amelyek a tophusok szövettani metszeteiben leggyezőszerű nyalábokban helyezkednek el, vagy sokszögletű, barnás lemezekké tömörülnek. Chivukula és mtsai [6] szerint a kalcium-pirofoszfát – a mononátrium-uráttal ellentétben – vízben nem oldódik, ezért formalinban fixált anyagok paraffin-metszeteiben is kimutatható. Simkin és mtsai [26] viszont a éppen a formalinnak tulajdonították a kristályok kioldódását.

Az ízületi nedvben található kalcium-pirofoszfát kristályokat főként polarizációs optikai viselkedésük alapján tartják megkülönböztethetőnek a valódi köszvény esetén előforduló mononátrium-urát kristályoktól. Míg az előbbieket gyengén pozitív kettőtörésűeknek illetve izotropoknak írják le, addig az utóbbiak erősen negatív kettőtörésűek [4, 5, 7, 14, 15, 17, 24].

Az orvosi laboratóriumokban használatos, egyszerűbb polarizációs mikroszkópokkal a kettőtörésnek csupán a struktúrák jellegzetes irányaira vonatkoztatott (relatív) jellege határozható meg. Anizodiametrikus, hosszúkas tárgyak esetében a kettőtörés jellegét a hosszirányra vonatkoztatjuk. Ilyen értelemben mondjuk az in vivo keletkezett CPPD- kristályokat pozitív kettőtörésűeknek.

In vitro a kalcium-pirofoszfát képződhet oldható alkálifém-pirofoszfátokból kalciumsókkal való kicsapással, másrészt kalcium-hidrogénfoszfát hevítésekor. Az utóbbi esetben 195°-on vízmentes, amorf kalcium-hidrogénfoszfát, ebből 400° körül amorph kalcium-pirofoszfát, majd 500° felett a kristályos γ-módosulat, 750° körül a β-, végül, 1170°-on az α-módosulat keletkezik [2, 23].



Kicsapással két mól kristályvíz-tartalmú módosulathoz jutunk.



Bailar és mtsainak kézikönyve [2] szerint az α-módosulat két optikai tengelyű, a β-forma pedig egy optikai tengelyű kristályokat alkot. Az utóbbiak gyengén pozitív kettőtörésűek ($n_e - n_o = 0,009$). A γ-módosulatról nem tártunk adatokat.

Dieppe és Swan [8] leírja, hogy egyes kristályok nem kettősen törőek. Ivorra és mtsai [16] szerint az ízületi nedvben, közönséges fényben talált kristályoknak csupán

egy ötöde mutat anizotropiát. Ezért – míg a MNU-kristályok megtalálását a polarizált fény nagyban elősegíti – a CPP-kristályok keresését célszerűbb közönséges fényben végezni. A polarizált fénynek inkább a kristályok azonosításánál van szerepe [8, 16].

Minthogy az általunk kontroll-célokra in vitro előállított kalcium-pirofoszfát, az irodalmi adatokkal ellentétben, negatív kettőtörésűnek bizonyult, szükségesnek tartottuk, hogy vizsgálatokat végezzünk az eltérés okának kiderítésére.

ANYAGOK ÉS ELJÁRÁSOK

Nátrium-dihidrogénfoszfátból és kalcium-acetátból kicsapással kalcium-hidrogénfoszfátot készítettünk, majd ennek enyhe hevítésével kalcium-pirofoszfátot állítottunk elő. Ugyanezt a vegyületet nátrium-pirofoszfátból kalcium-acetáttal való kicsapás útján is elkészítettük. A sókból egy-egy mintát vízben rázogatva néhány napig állni hagyunk. A preparátumok azonosítására első lépésként infravörös színeképelemzést használtunk. Optikai tulajdonságaikat polarizációs mikroszkóppal, ortoszkópos sugármenettel vizsgáltuk.

A szövettani metszetekben való kimutathatóság megállapítására a kalcium-pirofoszfátot fehérje-glicerinnel keverve tüdőszövetbe fecskendeztük, azzal együtt formalinban, illetve etilalkoholban fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk. Az alapszövetet – Shidham és Shidham [25] javaslatára – eozinnal megfestve is vizsgáltuk.

A továbbiakban a hevítéssel előállított kristályok szuszpenzióját hártázott rácsokra cseppentve, száradás után JEOL JEM 100C elektronmikroszkóppal, elektron-diffrakció alkalmazásával [3] is azonosítottuk. A fotonegativon mért diffrakciós mintázat adatait, a korrekciós faktorok figyelembe vételével az A.S.T.M.-katalógusban [1] közölt adatokkal és saját korábbi méréseink értékeivel hasonlítottuk össze. A kristályok morfológiáját transzmissziós üzemmód alkalmazásával is megvizsgáltuk.

EREDMÉNYEK

A kalcium-hidrogénfoszfátból enyhe hevítéssel nyert fehér por 10–80 µm vastag, 100–1200 µm hosszú, pálcika- illetve tüalaku kristályokból állott (γ-módosulat), amelyek hosszirányukra vonatkoztatva negatív kettőtörésűeknek bizonyultak (1. és 2. ábra). Nagy fénymikroszkópos nagyításnál egyes kristályok szélén helyenként fésűszerű rajzolat volt megfigyelhető (3. ábra). A transzmissziós-elektronmikroszkópos vizsgálat szerint ezen kristályok hossztengegyükkel párhuzamosan egymás mellé rendeződött, apró, szintén tűszerű, elemi kristályokból tevődnek össze (4. ábra). A vízben hosszabb ideig rázogatott anyagban az urát-kristályokhoz hasonló, nyalábokban elhelyezkedő, pozitív kettőtörésű, finom kristálytűk

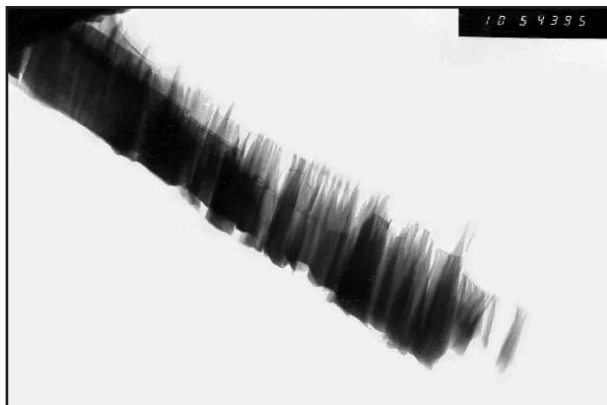


1. ábra. A szintetizált (hevítéssel készült) kalciumpirofoszfát-kristályok igen hasonlóak a nátriumurát-kristályokhoz

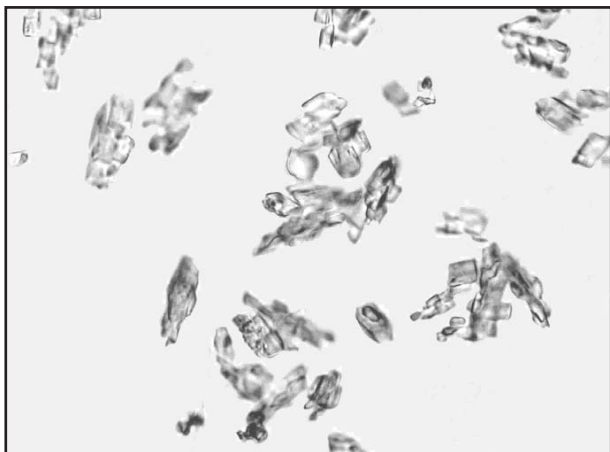


2. ábra. A tűszerű kristályok polarizált fényben, Rot I. kompenzátorral

3. ábra. Nagyobb nagyítással felfedezhető egyes kristályok élének fésűszerű szerkezete

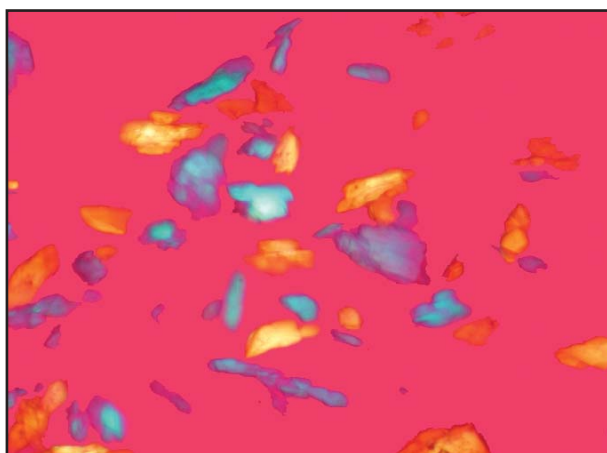


4. ábra. A tűszerű kristályok a hossztengetyre merőlegesen elhelyezkedő elemi kristályokból állnak. Transzmissziós EM felvétel



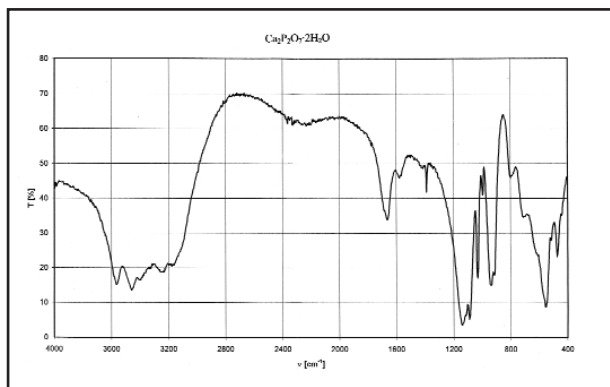
5. ábra. A kicsapással készült CPPD zömök kristálya

alakultak ki. Más mintában, átkristályosodás folytán olyan, vastagabb formák is létrejöttek, amelyek jobban hasonlítottak a betegek synoviális folyadékában talált CPPD-kristályokhoz. Az erősebb hevítéskor (700° felett) kapott β - illetve α -módosulatú sók gyengén kettőtörőek illetve izotropok voltak. Apró szemcsészetük és törmelékeny állaguk miatt az anizotrop formák kristályalakja és kettőtörésük jellege nem volt megállapítható. A kicsapással készült kalcium-pirofoszfát zömökebb, 40–100 μm vastag, 100–400 μm hosszú, hasábalakú kristályokat al-

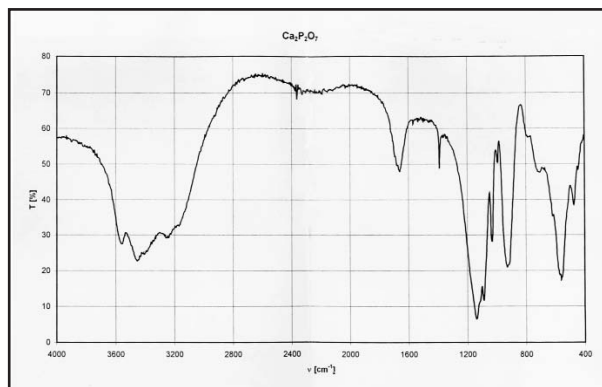


6. ábra. A kicsapással készült CPPD-kristályok. Egyes hosszúságú példányok – azonos orientációjuk ellenére – eltérő interferenciaszínt mutatnak. Polarizált fény. Rot I. kompenzátor.

kotott, így jobban megközelítette az in vivo előforduló kristályok alakját (5. ábra). A kristályok egy része pozitív, más részük negatív negatív kettőtörésűnek bizonyult



7. ábra. A kristályviz-tartalmú kalcium-pirofoszfát IR spektrofotometriás görbéje.



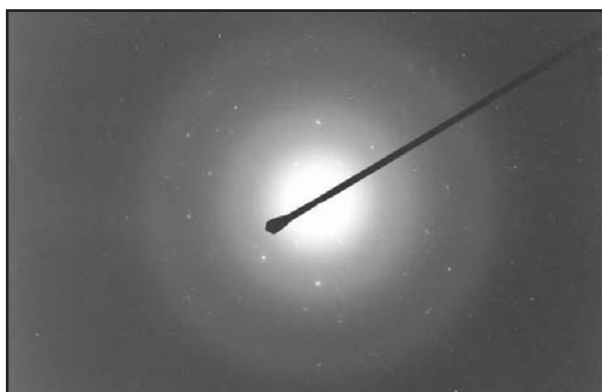
8. ábra. A vízmentes kalcium-pirofoszfát IR-spektroszkópos elnyelési görbéje.

(6. ábra). A vegyszerként beszerzett kalcium-pirofoszfát (Aldrich) különböző alakú, apró kristálytörmelékeket tartalmazott, amelyek közül a hasábalakúak pozitív kettőtörésűek voltak. A két utóbbi preparátum kristályai vízben állva nem változtak. Az IR spektrofotometria mindegyik anyagnál a kalcium-pirofoszfátra jellemző színekpet [21] mutatott (7. és 8. ábra). Az elektrondiffrakciós mérések is igazolták, hogy mind a túszerű, mind a vizes közegben átalakult, az in vivo észleltekhöz hasonlóbb kristályok kalcium-pirofoszfátnak felelnek meg (9. ábra).

A kalcium-pirofoszfát sósavban és ecetsavban oldódott, sőt már a timsós hematoxilin timsóttartalmának megfelelő, 5 g/dl-es káliumaluminiumsulfát-oldat ($\text{pH} \approx 3,0$) is feloldotta. Ezért a kristályok hematoxilin-eozinnal festett metszetben nem vizsgálhatók. (Shidham és Shidham [24] szerint a pirofoszfát kettőtörése azért tűnik el, mert azt a hematoxilin „maszkírozza”). A preparált vegyületek alizarinvörsszel [20] festődtek, oxálsav-kezelés után erős mészreakciót [19]. adtak. A kobaltszulfid-reakció, valamint az oxálsav nélküli mészreakció negatívnak bizonyult. A formalinban rögzített anyagból a kristályok kioldódtak, alkohol-fixálás után azonban megtalálhatók voltak a metszetben.

MEGBESZÉLÉS

Az in vitro előállított kalcium-pirofoszfát morfológiája változatos. A kristályok formája és kettőtörése részben eltér a betegek synoviális váladékában található kalcium-pirofoszfátétól, és egyazon preparátumban pozitív és negatív kettőtörésű alakok is előfordulhatnak. Zömök kristályokból, haránttöréssel kialakulhatnak olyan hasábos formák, amelyeknek a hosszirányra vonatkoztatott kettőtörése invertálódott. A transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálat kimutatta, hogy az in vitro nyert, optikailag negatív tús kristályok hasonló alakú, elemi kristályokból épülnek fel. Minthogy ezek hossztengeleyükkel a fénymikroszkóppal látható kristályok hosszára merőlegesen helyezkednek el, pozitív kettőtörésűeknek



9. ábra. A szintetizált, túszerű kristályok elektrondiffrakciós képe.

kell lenniük, hogy a fénymikroszkóposan tapasztalt optikai negativitást előidézhessék.

Az oldhatósági viszonyokból következik, hogy a CPP kimutatását célzó szövettani vizsgálatkor a biopsziás vagy sectiós anyagot – az urátokra irányuló vizsgálatokhoz hasonlóan – alkoholban kell fixálnunk.

A legtöbb kórház gyakorló patológusainak csupán fény- illetve polarizációs mikroszkóp áll rendelkezésre a synoviális folyadék üledékének vizsgálatára. A munkát megkönnyíti, ha a talált kristályokat kontroll vegyületekkel hasonlítjuk össze. Nem mindegy azonban, hogy az összehasonlító preparátum hogyan van megválasztva és előkészítve. A kalcium-pirofoszfát példája azt mutatja, hogy különösen fontos az azonos kémiai összetételű vegyületek különböző kristályformáinak, módosulatainak ismerete.

Az ORFI-ban, ahol a Kristálydiagnosztikai Laboratórium elektronmikroszkópos mérési lehetőséggel is rendelkezik, a kristálytartalmú synovialis minták 30–40%-ában kell elektronoptikai vizsgálatot is végezni a határozott diagnózis érdekében, mert a kristályok igen kicsinyek, atipusos megjelenésűek, vagy esetleg valamely lokálisan alkalmazott gyógyszer maradványai [12]. Az elektrondiffrakció olcsó módszer, amellyel a polarizációs optikai vizsgálat biztonsága jelentősen fokozható [9, 10, 11, 12, 13, 18].

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetüket fejezik ki Mayer Jánosnak az elektronoptikai mérések kivitelezéséért, Dr. Welther Károlynénak a vizsgálatokban nyújtott segítségével, valamint Dr. Neumark Tamásnak, aki az ORFI-ban évtizedekkel ezelőtt megalapozta egyes mozgásszervi betegségek anyagszerkezeti vizsgálatokkal történő diagnosztikáját és kutatását.

IRODALOM

1. A.S.T.M. Index to powder diffraction file. Amer Soc for Testing Mater.U.S.A.
2. Bailar, J. C., Emeléus, H. J., Nyholm, R., Trotman-Dickenson, A. F.: Comprehensive inorganic chemistry. Pergamon Press. Oxford, 1973.
3. Beeston, B. E. P, Horn, R. W., Marham, R.: Electron diffraction and optical diffraction techniques. In: Practical methods in electron microscopy. Elsevier. New York 1973.
4. Berkow, R. (szerk.): Orvosi kézikönyv. Melania. Budapest, 1994. p. 1350
5. Bély M.: Kristálydiagnosztika szövetekben és testüregi folyadékokban. Orsz. metodikai diagnosztikai továbbképzés. Székesfehérvár, 1997.
6. Chivukula, M., Shidham, G., Shidham, V.: Evaluation of crystals in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Amer. J. clin. Path. 2000, 114, 629-659.
7. Collier, J. A. B.: Klinikai szakok Oxford zsebkönyve. Medicina. Budapest, 1992. p. 344.
8. Dieppe, P., Swan, A.: Identification of crystals in synovial fluid. Ann. Rheum. Dis. 1999, 58, 261-263.
9. Ferencz G.: Az elektrondiffrakció mint a kristályok azonosításának biztos módja. Orsz. metodikai diagnosztikai továbbképzés. Székesfehérvár, Patho System, 1997.
10. Ferencz G., Török I., Gyeney L., Virányi, M., Mayer J., Bély M.: Kristálydiagnosztika szemészeti esetekben. Patológus Találkozó, Sopron. Összefoglalók. (P38). 1999, p. 54. .
11. Ferencz G., Mayer J., Bély M.: Az elektrondiffrakciós kristályanalízis jelentősége a reumatológiai diagnosztikában. Magyar. Reumat. 1999, 40, 186
12. Ferencz G. Mayer J.: Lokálisan alkalmazott gyógyszerek maradványainak elektronoptikai vizsgálata. Magyar Reumat. 2000, 41, 180
13. Ferencz, G., Mayer, J.: The importance of electron diffraction crystal-analysis in rheumatology and pathology. Proceedings of 5th MCEM. Ed. Dini Catalano Rinton Press Inc. USA. 2001.
14. Harrison: A belgyógyászat alapjai. Springer Verl. Budapest, 1994. pp. 500-501.
15. Hollander, J. A., McCarty Jr., D. J.: Arthritis and allied conditions. 8th ed. Lea & Febiger. Philadelphia 1974. pp.114-1160.
16. Ivorra, J., Rosas, J., Pascual, E.: Most calcium pyrophosphate crystals appear as non-birefringent. Ann. Rheum. Dis. 1999, 58, 582-584.
17. Judkins, S. W., Cornbleet, P. J.: Synovial fluid crystal analysis. Lab. Med. 1997, 28, 774-779.
18. Kohn, N. N., Hughes, R. E., McCarty, D. J., Faires, J. S.: The significance of calcium phosphate crystals in the synovial fluid of arthritic patients. Ann. Int. Med. 1962. 56. 738-745.
19. Krutsay M.: Patológiai technika. Medicina. Budapest, 1999. pp. 245-249.
20. Krutsay M.: A kalcium hisztokémiai kimutatása alizarin-vörös S-sel. Osteolog. Közl. 2002, 10, 154-155..
21. Nyquist, R. A., Kagel, R. O.: Infrared spectra of inorganic compounds. Academic Press. New York-London, 1971.
22. Phelps, P., Steele, D., McCarty, D. J.: Compensated polarized light microscopy. JAMA.1968. 203. 508-512.
23. Rabatin, J. G., Gale, R. H., Newkirk, A. E.: The mechanism and kinetics of the dehydration of calcium hydrogen phosphate dihydrate. J. Phys. Chem.1960. 64. 491-493.
24. Schumacher Jr., H. R., Reginato, A. J.: Atlas of synovial fluid analysis and crystal identification.. Lea & Febiger. Philadelphia-London, 1991. pp. 89-132.
25. Shidham, V., Shidham, G.: Evaluation of crystals of gout, pseudogout, and tumoral calcinosis: a novel staining method. Lab. Medica International. 2001/8-9, pp. 14, 23-24.
26. Simkin, P. A., Bassett, J. E., Lee, Q. P.: Not water, but formalin, dissolves urate crystals in tophaceous tissue samples. J. Rheumatol. 1994, 21, 2320-2321.