

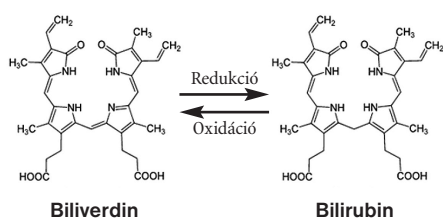


Krutsay Miklós

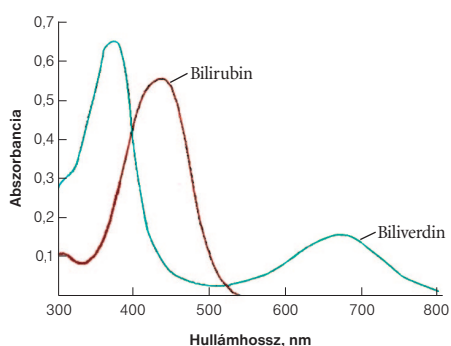
Magyar Imre Kórház, Patológiai Osztály, Ajka | miklos.krutsay@gmail.com

Adatok az epefestékek hisztokémiájához

Az emberi vörösvértestek élettartama átlag 120 nap, de a vörös csontvelőben folyamatosan újra termelődnek. A szerkezetben elszórtan – elsősorban a lépben, a májban és a vörös csontvelőben – jelen lévő, kötőszöveti eredetű falósejtekben (makrofágokban) az elpusztult vörösvértestek hemoglobinjából a kétértékű vas ledisszociál, a globin enzimhatásra lehasad. A visszamaradt protoporfirin IX ($C_{34}H_{34}N_4O_4$) tetrapirrol-gyűrűje felnyílik és belőle kékeszöld színű *biliverdin* ($C_{33}H_{34}N_4O_6$) keletkezik. Ezt a színezéket a biliverdin-reduktáz közvetlenül *bilirubinná* ($C_{33}H_{36}N_4O_6$) alakítja (1–2. ábra). A bilirubin vízben



1. ábra. A biliverdin átalakulása bilirubinná



2. ábra. Az epefestékek spektrális elnyelési görbéi

alig oldódik, egyes szerves oldószerek (pl. kloroform, benzol) azonban oldják, híg oldata sárga, töményebb oldata barna színű.

A bilirubin albuminokhoz kötötten, ún. *indirekt bilirubinként* jut a vérkeringésbe, koncentrációja a vérben $< 17 \mu\text{mol/l}$. Ezt a formáját a vese nem választja ki. A májba jutva elválik a fehérjétől, és a glukuronil-

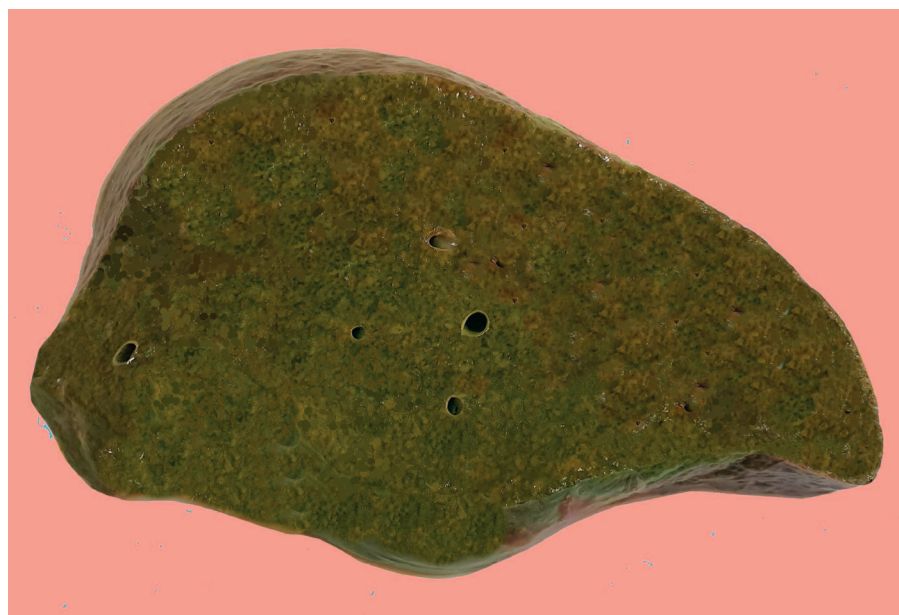
transzferáz enzim hatására, két molekula glukuronsavval észterezve konjugált, *direkt bilirubinná* alakul, amelynek szintje a vérben $< 5 \mu\text{mol/l}$. (A klinikai laboratóriumok a vér direkt és totális bilirubin-koncentrációját vizsgálják, a biliverdinnel nem foglalkoznak.) A direkt bilirubin epesavas alkálifémsókkal, koleszterinnel, foszfolipoidokkal és fehérjékkel együtt az epével ürül. Ennek színe a bilirubin–biliverdin aránytól függően a sárgásbarnától a kékeszöldig terjedhet. A bélben, baktériumok hatására, a glukuronsavak lehasadnak a bilirubintról, amely redukálódva szintelen *sterkobilinogénné* ($C_{33}H_{48}N_4O_6$), majd oxidálódva barna színű *sterkobilinné* ($C_{33}H_{46}N_4O_6$) alakul. (Ez adja a széklet színét.) A sterkobilinogén egy része *urobilinogénként* ($C_{33}H_{44}N_4O_6$) a bélből felszívódik, áthalad a vesén és kiválasztódik a vizelettel, amelyben Ehrlich-reagenssel (p-dimetil-amino-benzaldehid sósavas oldatával) detektálható (a vörös reakcióterméket kloroform oldja). Az urobilinogén hiánya vagy megszaporodása érzékenyen jelzi a bélbe jutott bilirubin meny-

nyiségét. *Urobilinné* ($C_{33}H_{42}N_4O_6$) oxidálódva a vizelet sárga színét adja.

A vér bilirubin-szintjének emelkedésekor a bőr a sárgától a sötét zöldesbarnáig terjedő színben elszíneződik (icterus). Ez legkorábban a szem kötőhártyáján ismerhető fel. A belső szerveken általában nem látható feltűnő színváltozás, tartós sárgaságnál azonban a vese és a máj zöldesbarna-barnászöld lesz (3. ábra). Fokozott vörösvértest-pusztuláskor vagy a glukuroniltranszferáz csökkent termelődésekor (pl. Gilbert-kórban, Crigler–Najjar-szindrómában) az indirekt bilirubin szintje emelkedik a vérben. Epeútelzáródáskor, májbetegségekben és a konjugált bilirubin kiválasztásának zavaránál (Dubin–Johnson-, ill. Rotor-szindrómában) főként a direkt bilirubin koncentrációja nő, és $35 \mu\text{mol/l}$ felett a festék megjelenik a vizeletben is.

A bilirubinnak a vérben és a vizeletben való kimutatására, meghatározására számos színreakciót ajánlottak. Ezek a bilirubinnak biliverdinné és további színes termékekké (bilicianin, biliprazin, koletelin)

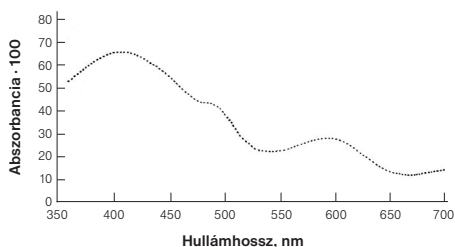
3. ábra. Icterosus máj metszészlapja





való oxidálásán alapulnak (salétromsavval, ferri-kloriddal, jóddal). A vérben való mennyiségi (fotometriás) meghatározására a van den Bergh-reakciót használják (diazotált szulfanilsavval a bilirubin vörös színezéket képez).

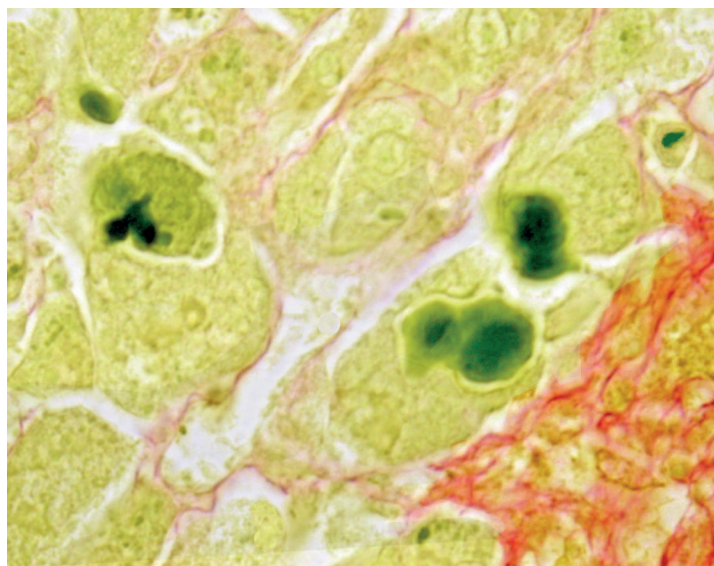
A patológusok előtt jól ismert, hogy a szövettani feldolgozást megelőző, formalinban (4 g/dl-es formaldehid-oldatban) történő „fixálás” során az epe és a sárgaságban szenvedettek májának barna színe néhány óra vagy néhány nap alatt – levegőtől elzárva is – zölddé válik, ellentétben a formalinmentes fixálóokban (pl. aceton) való viselkedéssel. Lillie és munkatársai [7] vizsgálatai szerint számos alifás és aromás aldehid képes a színváltozást előidézni. A zöld szín redukálószerrel (Na-ditionit, Naborohidrid, K-piroszulfít, Na-tioszulfát) hatására barna lesz, de oxidálószerrel visszaalakul. A formaldehid redukálószerként ismeretes, ezért kérdéses, hogy az általa létrehozott szín biliverdintől származik-e. Spektrofotométerrel vizsgálva [7], a formalinnal elegyített epe elnyelési görbéje eltér a biliverdin spektrumától (4. ábra).



4. ábra. Bilirubint és formaldehidet tartalmazó oldat elnyelési görbéje [7]

Mikroszkóppal az epefestékek csak ott és csak akkor mutathatók ki szemcsék-alvadékok alakjában, ahol nagyobb koncentrációt érnek el (pl. a máj epekapillárisaiban, a vesecsatornákban) és fehérjékhez kötődtek, így a fixáláskor azokkal együtt kicsapódtak. A szövettani feldolgozás során ugyanis a szervrészeket vízzel és szerves oldószerekkel (alkohollal, acetonnal, xilolal stb.) kerülnek érintkezésbe, amelyek a vegytiszta bilirubint, ill. biliverdint oldják.

A formalinban fixált, icterusos szervekből készült metszetekben az epefesték részben barna színű is maradhat. (A műtéileg eltávolított epehólyagok kötőszövetében esetenként tisztán bilirubinból álló, barna lerakódást találunk.) A barna szín megnehezíti vagy lehetetlenné teszi a bilirubin elkülönítését az esetlegesen ugyanott előforduló, egyéb barna pigmentektől (lipofuscin, hemosziderin, melanin).



5. ábra. Epefestékrögök icterusos májban. Lugol-reakció

A kórszövetben szokásos, rutin hematoxilín-eozin festés során a bilirubin megtartja barna színét, a biliverdin viszont az eozintól zöldesbarna lesz, ezért natív színüket biztonsággal csak festetlen metszetben állapíthatjuk meg. Míg ilyenkor a biliverdin zöld színéről jól felismerhető, a bilirubin azonosítására hisztokémiai reakciókat kell alkalmaznunk. Itt csak olyan reagensek jöhetnek számításba, amelyek rövid reakcióidő alatt a barnától eltérő, élénk színt adnak, nem roncsolják a szöveteket és végtermékük vízben oldható. Stein [8] jódtinktúra (etil-alkoholos jódo-oldat) és Lugol-oldat (KI-os jódo-oldat) 1:2 elegyével a bilirubint biliverdinné oxidálta. Jobba [4] a Stein-féle reagenst 5–18 óra kezelési idővel a légutakba jutott epe, keményítő és cellulóz kimutatására ajánlotta, mert mindegyik ad színreakciót a jóddal. Kutlík [6] oxidálószerként vastimsó-, ill. lúgos kálium-ferricianid-oldatot javasolt. A bilirubin az előbbivel zöldre, az utóbbival bíborvörösre színeződött. Walker és munkatársai [9] az oxidálásra kálium-pirokromát-, ferri-ammónium-szulfát-, ill. jódo-oldatot használtak. Fouchet [1, 2] 1917-ben közölte, hogy ferri-klorid triklór-ecetsavas oldata a bilirubinnal kékeszöld színreakciót ad. Ezt Hall [3] 1960-ban vezette be a kórszöveti technikába, és a kézikönyvek azóta is ezt ajánlják [5]. A triklór-ecetsav hatása specifikus, mert más, hasonló erősségű savval nem helyettesíthető. Hátránya, hogy erősen higroszkópos, elfolyósodik, mérése kényelmetlen. Hígított (sárga) epében a triklór-ecetsav sárgás, a ferri-klorid és a ferri-ammónium-szulfát-oldat szürkészöld, a Fouchet-reagens sötét zöldeskék csapadékot képez. Lugol-oldat hatására az oldat színe zöldes lesz.

A szövettani metszetekben Fouchet-re-

agens, ill. Lugol-oldat alkalmazása után (5 perc kezelési idő) az epefestékek zöld színben mutatkoznak. (1 g/dl-es, kálium-jodidos jódo-oldat elemi jód nélkül is készíthető 0,3 g kálium-jodát, 2 g kálium-jodid, 8 ml 1,0 *n* sósav és 92 ml deszt. víz elegyítésével.) Lugol-oldat esetében a metszet diffúzan megbarnul a jódtól, ezért azt el kell belőle távolítanunk. Ez a „színtelenítés” történhet 5 g/dl-es kálium-jodid-oldattal, de automatikusan is végbemegy, amikor a metszetet, fedőlemezrel történő elzárása előtt, a szokványos módon alkoholon és xilolon visszük át. (Az elemi jódot szintén oldó nátrium-tioszulfát a képződött biliverdint visszaredukálhatja bilirubinná [7].) A zöld szín hosszabb, vizes mosásra zöldesbarna, lúgos hatására sötétbarna lesz (ez savakra nem változik, de a reagensekkel ismét zölddé tehető). Ezért a metszetet csak röviden öblítsük desztillált vízben (vagy inkább 2%-os ecetsavban). A könnyebb tájékozódás érdekében célszerű az eljárás végén az alapszövetet van Gieson szerint, pikrinsav-savanyúfukszin- vagy pikrinsav-szíriuszvörös-oldattal megfesteni (5. ábra) [5]. ●●●

Köszönetnyilvánítás. A szerző köszönetet mond Treiber Lászlóné kórszöveti asszisztensnek készséges technikai segítségéért.

IRODALOM

- [1] Fouchet, A.: Compt. rend. Soc. Biol. (Paris) (1917) 80, 826–828.
- [2] Fouchet, A.: J. Pharm. Chim. 7. ser. (1918) 18, 19–20.
- [3] Hall, J. M.: Amer. J. Clin. Pathol. (1960) 34, 313–316.
- [4] Jobba, G.: Zschr. f. Rechtsmedizin. (1971), 68, 204–206.
- [5] Krutsay M.: Patológiai technika. Budapest, Medicina, 1980. 243–244.
- [6] Kutlík, I. E.: Acta histochem. (1957) 4, 141–157.
- [7] Lillie, R. D., Pizzolato, P.: Virchows Arch. A. (1970) 350, 52–60.
- [8] Stein J.: Compt. rend. Soc. Biol. (Paris) (1935) 120, 1136–1138.
- [9] Walker, D., Pizzolato, P., Lillie, R. D.: J. Histochem. Cytochem. (1970) 18, 367–368.