

SZÖVETVEGYTANI ÉS IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATOK MÚMIA SZÖVETEKEN ÉS ÁSATAG CSONTOKON

Józsa László

Csermely

Józsa, L.: *Histochemistry and immunohistochemistry: a new outlook in paleohistology.* In this review I summarize data concerning the respective preservation and deterioration of enzymatic and antigenic determinants of various proteins in paleontologic material at different ages. By early histochemical methods polysaccharides, proteoglycans, as well as lipids and anorganic components could be demonstrated in mummified tissues. By enzyme histochemical investigations it is possible to demonstrate various enzymes in mummy tissues, such as alkaline phosphatase of bone, metalloproteinases in connective tissue, neuropeptidase in peripheral nerve, peroxidase in red blood cells, etc. The application of immunohistochemical techniques is further development in the study of mummified tissues. Today with these methods collagens, non-collagenous matrix proteins, immunoglobulins, some hormones, and cell differentiation phenotype markers can be detected, which are useful in paleopathological studies and in the diagnosis of morphologically doubtful lesions.

Keywords: Mummified tissues; Enzym histochemistry; Immunohistochemistry.

Bevezetés

A múmia-szövetek mikroszkópos vizsgálatát a pesti Egyetem élettan tanára Czermák Nepomuk János vezette be 1852-ben. Nem csodálható, hogy a korabeli fejletlen technológia miatt, csak több, mint ötven évvel később akadt követője, aki szintén óegyiptomi múmia szívét, ereit vizsgálta (Shattok 1909). Az 1920–1930-as évekből néhány közleményt ismerünk, de rendszeres hisztológiai feldolgozásra csak a múlt század második felében került sor. Az „egyszerű” *szövetteni metódusokkal a különféle szöveteket* (hám, izom, kötőszövet, stb.) *és sejtmagokat lehet eltérő színekben feltüntetni.* A kórszövetteni megfigyelésekben alapvető a sejtmagok (alakjának, nagyságának, kromatin tartalmának, a magoszlások gyakoriságának, stb.) elemzése. A múmia szövetekben a sejtmagok többnyire nem tűntethetők fel, emiatt a kóros eltérések diagnosztizálása sok nehézséget okoz. A hisztológiai technika következő fejlődési stádiuma *a hisztokémia*, azaz *ismert kémiai reakciók segítségével ismert biológiai alkotórészek színreakciókkal történő detektálása.* A paleohisztológiában hamar tért hódítottak a szövetvegytani reakciók, a múlt század közepén már poliszaccharidák, lipidek (koleszterin), kalciumkarbonát és kalciumfoszfát, vas, egyéb fémek, stb. szöveti kimutatására is sor került (1. táblázat). A recens szövetteni vizsgálatok során ez időben már mind több enzimet, eltérő minőségű fehérjét, zsírokat, a szövetekben lerakódó (pl. húgysav), vagy felgyülemelő anyagot (ochronosis pigment) tudtak kimutatni (Stenn és mtsai 1977). Kezdetben úgy vélték, hogy az enzimek elvesztik aktivitásukat a mumifikáció (mumifikálás) során, ezért (hosszú ideig) meg sem kísérelték kimutatásukat. Később jöttek rá, hogy az enzimek évezredek át megtarthatják működőképességüket

(2. táblázat). Akkoriban az enzimeket működésük alapján, a képződött „végtermék” színreakciójával lehetett feltüntetni. Azóta az enzimek ellen termeltetett antitestekkel, az enzimfehérjéket tudjuk (immunológiai reakciók alapján) azonosítani, függetlenül attól, hogy maga a fermentum működőképes-e vagy sem (Etspüler és mtsai 1995). Az 1960-as években az **immunhisztokémiai módszerek** kidolgozásával új lehetőségek nyíltak mind a recens, mind az őskortani megfigyelések előtt. Ezzel az eljárással a szöveti antigénekhez kötődött specifikus antitestek (fluoreszcens vagy látható fényben feltűnő) színreakcióval történő megjelenítése mind több szöveti elemre (3. táblázat) és/vagy kórokozóra (4. táblázat) kiterjed.

A hisztokémiai és immunhisztokémiai vizsgálatok a paleohisztológiában

A szövetgytani és immunhisztokémiai vizsgálatok eredményességét nem a lelet fekvési kora, sokkal inkább a mumifikálódás/mumifikálás módja, a szöveteket korábban ért vegyi és fizikai behatások, valamint a kiszáradt szövetek rehidrálásának sikeressége határozzák meg. Hamvasztásos anyagban (ez ideig) mindössze a DNS, kalcium és vas detektálása sikerült. Eredményes hisztokémiai és immunhisztokémiai vizsgálatok történtek 20,000—25,000 éves leleteken, a porc alapállomány és kollagén hálózatát (Franc és mtsai 1995), sőt több millió éves dinoszaurusz csontokon a proteoglikánokat azonosították (Pawliczki 1978). A nagy diagnosztikus értékkel bíró és kimutatható kóros eltérések, [régebbi bevérzések, thrombosis (Moodie 1923), hegesezés, köszvényes húgysav-kicsapódás (Józsa 2005), érlemeszedés (Sandison 1955), specifikus gyulladások stb.] nem nélkülözhetik a hisztokémiai megerősítést.

Az immunhisztokémia szinte beláthatatlan távlatokat nyitott meg az őskortani diagnosztikában is. Napjainkban több ezerre tehető a recens patológiában alkalmazott immunhisztokémiai reakciók száma, s egyre több ilyen végeznek múmia és a földből előkerült vázrészeken is. Az immunhisztokémiai eljárások specificitása kb. 96–99%-os, szenezitivitása 90% körüli. Amint a paleohisztológiai technika kidolgozásában, éppen úgy az ásatag szövetek immunhisztokémiai vizsgálatában is vezető szerepet játszott magyar kutató, Lengyel Imre (1975), aki immunfluoreszcens technikával határozta meg a vércsoportokat a földből előkerült csontokból. Egyiptomi múmiák bőréből, izomzatából és csontjaiból az AB0 vércsoport-antigéneket Crainic és mtsai (1989) mutatta ki. A napjainkban végzett szöveti vércsoport-meghatározások nagy része, már immunhisztokémiai módszerekkel történik. A HLA antigéneket pre-Kolumbián múmiák szöveteiből sikerült detektálni (Stasny 1974). Ennek azért van különleges jelentősége, mert összefüggés mutatható ki bizonyos betegségek (spondylitis ankylopoetica, rheumatoid arthritis, lepra, tuberculosis, pestis, himlő, stb.) és a HLA antigének között (Józsa 2006). Napjainkban kb. négyszáz olyan kórképet ismerünk, amelyekben adott HLA-antigén státuszu egyének gyakrabban betegeknek meg (pl. a spondylitis ankylopoeticában szenvedők 94%-a HLA B27 antigén hordozó, másfelől, az ilyen antigén kombinációt mutató újszülöttekről 90%-os valószínűséggel megmondható, hogy életük folyamán Bechterew-kórossá válnak), s ha megbetegedtek, akkor halálozásuk is sokkal magasabb, mind a más HLA kombinációjuké.

Ezzel az eljárással a kórokozó ágensek, vírusok (*himlővírus*, *human papilloma vírus*, *cytomegalia vírus*), baktériumok (*Treponema pallidum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pasteurella pestis*, stb.), protozoonok (*Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica*) és magasabb rendű paraziták (*Schistosoma hematobium*, *Tripanosoma cruzi*, stb.), egyaránt azonosíthatók (4. táblázat).

1. táblázat. Egyes szöveti komponensek hisztokémiai kimutatása.
Table 1. Histochemical detection of some tissue components.

Hisztokémiai reakciók Histochemical stains	Kimutatható szöveti alkotók – Tissue elements	Vizsgálati anyagok Material	Irodalmi hivatkozás References
Lipidek: Lipids:	Neutrális zsírok Neutral lipids	Érfal Vascular wall	Sandison 1955 Józsa 1966
Niluskék szulfát Nil blue sulphat	Neutrális zsírok + zsírsavak Neutral lipids + fatty acids		Sandison 1959
Schultz-reakció Schultz-reaction	Koleszterin Cholesterine		Sandison 1955
Polisaccharidok: Polysaccharides PAS reakció PAS staining	Aldohexózok, bazálmembránok, glikogén, gombák, proteoglikánok Aldohexoses, fungi glycogen, base membranes, proteo- glycans	Érfal, mirigyek, daganatszövet máj, izom, csont Vascular wall, glands, tumor tissues, liver, muscle, bone	Sandison 1959, Farkas és mtsai 2007, Dore 2001, Born 1959
Kolloid-vas reakció Colloidal iron stain	Szulfatált polisaccharidok Sulphated polysaccharides	Érfal, porc Vascular wall, cartilage	Józsa 1966 Born 1959
Toluidinkék Toluidin blue staining	Szulfatált polisaccharidok Sulphated polysaccharides	Csont, porc Bone, cartilage	Anderson és Jorgensen 1960
DNS DNA	Sejtmag Nucleus	Bármely szövet All tissues	Hagelberg 1989 Guarino 2000
Melanin-kimutató Melanin detection	Pigment-anyag Pigments	Bőr Skin	Józsa és Pap 1998
Szervetlen anyagok Anorganic substances Van Kossa staining	Mézsók Calc	Érfal, elmeszesedett tumorok Vascular wall Calcified tumors	Moodie 1923 Williams 1927
Berlinikék reakció Prussian blue	Vas ++ Iron	Vérzések utáni állapot Posthemorrhagic state	Moodie 1923
Rubeánsav Rubeanic acid	Réz, ezüst Copper, silver	Csont Bone	Józsa és Fóthi 2010

2. táblázat. Enzimhisztokémiai reakciók.
Table 2. Enzyme histochemical stainings.

Vizsgált szövet – <i>Tissues</i>	Enzim – <i>Enzymes</i>	Irodalmi hivatkozás – <i>References</i>
Csont Bone	Alkalikus foszfatáz Alcaline phosphatase	Weser és mtsai 1995
Csont, kötőszövet Bone, connective tissues	Metallo-proteinázok Metalloproteinases	Kaup és mtsai 1994, 2000
Agy Brain	Szuper-diszoxidáz Super-dysoxydase	Weser és mtsai 1989
Vörösvértest Red blood cells	Peroxidáz Peroxydase	Józsa és Pap 1998
Perifériás idegek Peripheral nerves	Nitritoxid-szintetáz Neuropeptidáz Nitrit-synthetase Neuropeptidase	Hoyle és mtsai 1997
Kötőszövet Connective tissue	Metalloproteinázok Metalloprteinase enzymes	Wick és mtsai 2001

3. táblázat. Immunhisztokémiai kimutatások.
Table 3. Immunohistochemical stainings.

Kimutatott szöveti komponens <i>Tissue components</i>	Vizsgált szövet <i>Tissue</i>	Irodalmi hivatkozás <i>References</i>
Vércsoport anyagok Blood-group materials	Csont (i.sz. 5–10. sz.) Bone (5–10th century AD.)	Lengyel 1975
	Bőr, vázizom, csont Skin, muscle, bone	Cranic és mtsai 1989
HLA antigének HLA antigens	Bőr, izom, csont (egyiptomi múmiák) Skin, muscle, bone (Egyptian mummies)	Stastny 1974
Hemoglobin(ok) Hemoglobins	Csont (i.e.2 – i .sz. 5. sz.) Bone (2nd century BC to 5th c. AD)	Ascenzi és mtsai 1985
IgA immunglobulin IgA immunoglobuline	Vese glomerulus (19. sz.) Kidney glomerulum (19th century)	Józsa 2008
Fibrinoid Fibrinoid	Kötőszövet Connective tissue	Allison és mtsai 1977
I. típusú kollagén Collagen Typ I	Bőr (i.e. 1. sz.) Skin (1st century BC)	Józsa és Pap 1998
	Csont (i.sz. 5–10. sz.) Bone (5th–10th century AD)	Nerlich és mtsai 1993 Romakov és mtsai 2002
II. típusú kollagén Collagen Typ. II	Porc (i.sz. 5–10. sz.) Cartilage (5–10th century AD)	Nerlich és mtsai 1993
	Csonttumor (i.sz. 12–13. sz.) Bone tumor (12–13th century AD)	Franc és mtsai 1995 Józsa és Főthi 2003

3. táblázat folytatása
Table 3 contin'd.

Kimutatott szöveti komponens Tissue components	Vizsgált szövet Tissue	Irodalmi hivatkozás References
III. típusú kollagén Collagen Typ. III	Bőr (i.e. 1. sz.) Skin (1st. century BC) Csont, porc (i.sz. 5–10. sz.) Bone, cartilage (5–10th century AD)	Józsa és Pap 1998 Nerlich és mtsai 1993
IV. típusú kollagén Collagen Typ. IV	Porc, bőr, placenta (i.e. 10–15. sz.) Cartilage, skin, placenta (10–15th c. BC)	Mekota és Vermehren 2005
Simaizom actin Smooth muscle actin	Bőr (i.e. 10–15. sz.) Skin (10–15th century BC)	Mekota és Vermehren 2005
Desmin	Bélfal, prosztata (19. sz.) Gut, prostate (19th century)	Józsa és Pap 1998
S-100 protein	Porc (i.e. 10–15. sz.) Cartilage (10–15th century BC)	Mekota és Vermehren 2005
Vimentin	Bőr, placenta e. (5–15. sz.) Skin, placenta (5–15th century BC)	Mekota és Vermehren 2005
Fibronectin	Bőr (i.e. 1. sz.) Skin (1st century BC)	Józsa és Pap 1998
Pancytokeratin	Bőr (i.e. 1. sz.) Skin (1st century BC)	Józsa és Pap 1998
Epithelialis membran antigén Epithelial membrane antigen	Bőr (i.e. 1. sz.) Skin (1st century BC)	Józsa és Pap 1998
Prosztata specifikus antigén Prostate specific antigen	Prosztata (14.sz.) Prostate (14th century AD) Prosztata tumor (i.e. 7. sz.) Prostate carcinoma (7th century BC)	Fornaciari és mtsai 2001 Schultz és mtsai 2007
Thyreoglobulin	Pajzsmirigy (18. sz.) Thyroid gland (18th century)	Ciranni és mtsai 1999
K-ras K-rash	Végbélrák (15. sz.) Rectal carcinoma (15th century)	Marchetti és mtsai 1996
Tejfehérje-globulin Human milk fat globuline	Emlőrák (i.e. 2000 körül) Breast carcinoma (cca 2000 BC)	Allison és Gerszten 1998
Glia-alkalikus protein Glial alkaline proteine	Agy (i.sz. 5–10 sz.) Brain (5–10th century AD)	Gerszten és Martinez 1995
Alkalikus foszfatáz Alcaline phosphatase	Csont (i.e. 3–4. sz.) Bone (3–4th century BC)	Etspüler és mtsai 1995
Szívizom myosin Myocardial myosin	Szív (i.sz. 4–6. sz.) Heart (4–6th century AD)	Miller és mtsai 2000
Béta-amyloid Beta-amyloid	Agy (20. század) Brain (20th century)	Omalu és mtsai 2005
Alfa synuclein Tau synuclein	Agy (20. század) Brain (20th century)	Omalu és mtsai 2005

4. táblázat. Kórokozók immunhisztokémiai kimutatása.
Table 4. Immunohistochemical detection of infectious agents.

Kórokozó Infectious agent	Szövetminta Tissue	Irodalmi hivatkozás References
Himlő-vírus Smallpox virus	Bőrelváltozás Skin eruption	Fornaciari és mtsai 1986
Human papilloma vírus HPV	Hüvelyfal, méh Vaginal wall, uterus	Fornaciari és mtsai 2003
Cytomegalia vírus Cytomegalovirus	Tüdő Lung	Meddens és Janssen 1999
Treponema pallidum	Bőr, nyirokcsomó Skin, lymph gland	Fornaciari és mtsai 1989
Mycobacterium tuberculosis	Tüdő – Lung	Fulcheri 1995
Pasteurella pestis	Lép, nyirokcsomó Spleen, lymph node	Fulcheri 1995
Plasmodium falciparum	Vér, lép Blood, splen	Fulcheri 1995
Tripanosoma crucei	Bőr Skin	Fornaciari és mtsai 1992 Guhl és mtsai 1999
Fasciola hepatica	Máj Liver	Dittmar és Teeegen 2003
Schistosoma haematobium	Húgyhólyag	Miller és mtsai 1992
Sch. Mansoni	Urinary bladder	
Sch. japonicum	Húgyhólyag, vese Urinary bladder, kidney	Rutherford 1999

Fiziológiás és kóros szöveti alkotórészek (fibrin, kollagén típusok [I., II., III., VI kollagén], nem-kollagén alapállomány-fehérjék [fibronectin, laminin, tenascin, vimentin, poliszaccharida-protein komplexek], egyaránt feltűntethetők. A legrégebbi autoagressziós kórt, a generalizált kötőszöveti betegséget, (régebbi nevén kollagén-betegséget) az elváltozás patokémiájából ismert *fibrinoid* immunhisztokémiai azonosításával sikerült megállapítani (Allison és mtsai 1977). Bár nem múmiából, „mindössze” egy húsz hónapja eltemetett személy agymaradványaiból az *alfa-synucleint*, *tau-synucleint* és a *beta-amyloidot* detektálták, ezzel elsőként bizonyították egy oszlásnak indult kadáveren az Alzheimer-kórt (Omalu és mtsai 2005). Ez a beszámoló reményt nyújt arra, hogy a múmiákban ritkán fennmaradó agymaradványokból a jövőben kórismézhetővé válik ez a kórkép is.

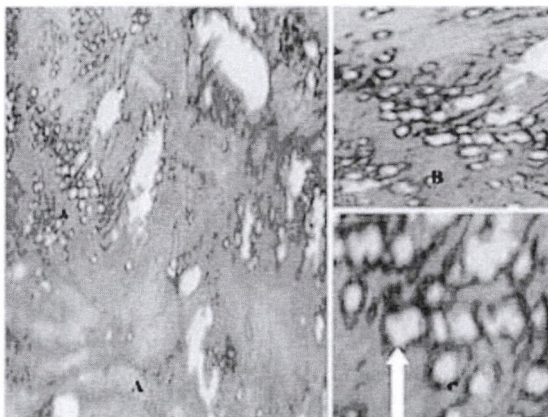
A szövetekben jelenlévő és kizárólag az adott szövetre jellegzetes fehérjék a markerek, amelyeknek számos csoportját ismerjük. A simaizom jelzőanyaga a desmin, amit prostatából tudunk kimutatni (Józsa és Pap 1998). A szívizomban különleges antigen-természetű actin és myosin található. Ha infarktus során a pusztuló szívizom-sejtekből kiszabadul és a véráram útján más szervekben (leggyakrabban a vesékben) felhalmozódik, akkor immunhisztokémiai reakciókkal nemcsak a szívve specifikus kontraktilis fehérjét lehet azonosítani, hanem az is biztonsággal kimondható, hogy a múmiának szívizom-elhalása volt. A kórisme megállja a helyét, függetlenül attól, hogy makroszkópos, vagy szövettani vizsgálattal a szívben kimutatható-e az infarktus, vagy netalán a szívet a mumifikálás során eltávolították (Miller és mtsai 2000). A szervezetben

többféle eredetű és funkciójú hámszövet fordul elő. A hámnak van általános markere, (amely valamennyi hám-féleségre jellemző), de vannak olyan jelzőanyagok is, amelyek csak egyetlen hámra jellegzetesek. A fedőhámokban több, mint harmincféle citokeratint mutattak ki, ezek detektálásával megmondható, hogy hámképlet (jóindulatú vagy rosszindulatú tumor) milyen fedőhámából indult ki. A különféle mirigyhámok eltérő markereket tartalmaznak. Az emlőre jellegzetes (mammary fat globulin nevű) marker kimutatásával, az ismeretlen helyről származó daganat kiindulási pontja biztonsággal meghatározható (Allison és Gerszten 1998). A prosztata mirigyek termeltek prosztata-specifikus antigént, nemcsak az ép dűlmirigy szövetben van jelen, hanem tartalmazza azt a prosztatarák is. Ennek kimutatásával sikerült bizonyítani a szkíta vezér csontjaiban talált áttét eredetét (Schultz és mtsai 2007). Néhány alkalommal a kóros géneket is sikerült azonosítani, mint pl. egy végbélrák esetében a K-ras mutációját (Marchetti és mtsai 1996). Nemcsak múmiák szövetekben, hanem skeleton részekben fellelt daganatos áttétekből is meghatározható a primer tumor helye. A porcából kiinduló sarcomát vázrészekben nem lehet elkülöníteni az osteosarcomától sem radiológiai, sem „egyszerű” mikroszkópos festésekkel, viszont immunhisztokémiai módszerekkel annak alapján, hogy a tumor milyen kollagént tartalmaz (a porc-sarcomákban II. típusú, az osteosarcomákban I. típusú kollagén képződik), differenciálhatók. Hosszasan lehetne sorolni a hisztokémiai és immunhisztokémiai vizsgálatok előnyeit, egyre több (napjainkban is ismert) kórkép pontos diagnosztizálása vált lehetővé mind múmiákon, mind vázleteken (3. táblázat).

A fehérje természetű hormonok (thyreoglobulin) ellen termelt antitestekkel nemcsak (a múmiákban ritkán fellelhető) pajzsmirigy, hanem a golyvát is diagnosztizálni lehet (Ciranni és mtsai 1999).

Saját vizsgálatok

Egyszerű hisztokémiai eljárásokkal (perjódsvavas Schiff reakcióval, PAS) ki lehet mutatni az alapi-hártyákat (1. ábra), s ezek feltüntetésével igazolni lehetett, hogy a (talált) csontáttét, mirigyes rákból (csaknem bizonyosan prosztata tumorból) származik (Farkas és mtsai 2007).



1. ábra: Osteoplasticus csontáttét (os ilei) metszetéből PAS reakcióval jól kimutatható a daganatos mirigyek alapi hártýája (nyíl). A kép100x, B kép 200x C kép 400x nagyítás.

Figure 1: Os ilei. In the metastasis, the base membrane of acinar structure (probably adenocarcinoma) can be seen. PAS staining. A = 100x, B= 200x, C= 400x magnification.

Ugyancsak csontokon történt az a vizsgálat, amellyel az osteosarcomat azon az alapon különítettük el az ugyancsak gyakorta csonttermelő chondrosarcomától, hogy az előbbiben az I. típusú, míg a porc-tumorban a II. típusú kollagén termelődik (Józsa és Fóthi 2003). Egy ritka, fogeredetű daganatban, a 6–7. századi cementomában mind I., mind III. típusú kollagént találtunk, ezzel kimutatva, hogy a tumor a fogszövetből veszi eredetét (Józsa és Pap, közöletlen vizsgálatok). Habsburg József nádor (igen jó megtartású) veséjében subacut glomerulonephritist mutatott a mikroszkópos megfigyelés. Ennek a kórképnek több, (kórereditét tekintve) eltérő változata ismert. A pontos diagnózishoz meg kell határozni milyen immunglobulin csapódott ki a glomeruláris érfalakban. Immunhisztokémiai eljárással bizonyítottam, hogy IgA lerakódás volt, más immunglobulint (IgG, IgM, IgE) kimutatni nem lehetett (Józsa 2008). Ezzel a vizsgálattal egy újabb kórképet sikerült azonosítani az őskórtani anyagon, s egyben az IgA nephritisnek (más nevén Berg-típusú subacut glomerulonephritis) a legkorábbi esetét ismerttettem (Glassock 2009). A Berg-nephritis a szervezetben fennálló gennyes folyamatokhoz csatlakozik, s akár hetek múltán kialakulhat. József nádor kórelőzményében alhasi gyulladás szerepelt, szerveinek szövettani elemzésekor gennyes prosztatagyulladást tudtam kórismézni. A két folyamat (t. i. a gennyes prostatitis és a subacut IgA nephritis) közötti oki összefüggés megállapítható volt. Pap Ildikóval közösen végeztük azokat az immunhisztokémiai vizsgálatokat amelyekben egyiptomi múmia (i.e. 1. század) bőréből I. és III. típusú kollagént (2–3. ábra), fibronektint, valamint faggyúmirigyeiben cytokeratint, verejtékmirigyeiben epithelialis membrán antigént (EMA) mutattunk ki (4–5 ábra).

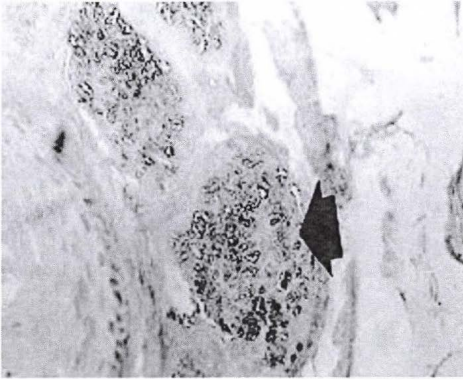
Az elvégzett hisztokémiai vizsgálatok pontos technikai kivitelezését a hivatkozott közleményeinkben írtuk le. Ennek a vizsgálatorozatnak „mellékterméke” a vörösvértestek peroxidáz enzimjének kimutatása volt (Józsa és Pap 1998).



2. ábra: I. típusú kollagén (csillag) óegyiptomi múmia bőrében. 300x nagyítás.
 Figure 2: The star sign of type I collagen fiber in the skin of Egyptian mummy. Magnification 300x.

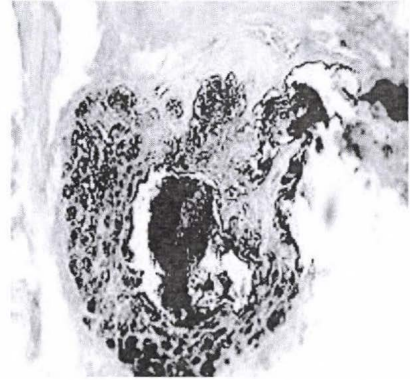


3. ábra: III. típusú kollagén (sötétre festődő vékony rostok) óegyiptomi múmia bőrében. A csillaggal jelölt, halvány rost I típusú kollagén. 300x nagyítás.
 Figure 3: Type III collagen (dark fibers) in the skin of Egyptian mummy. The star signs type I collagen fiber. Magnification 300x.



4. ábra: Epithelialis membrán antigén (EMA) óegyiptomi múmia bőrének verejtékmirigyében. 300x nagyítás.

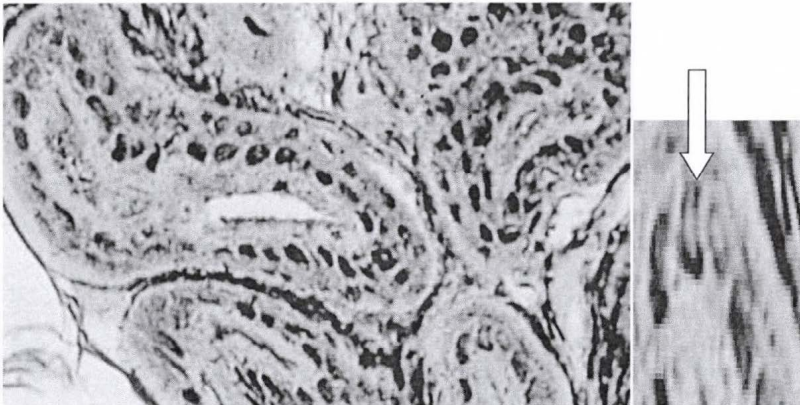
Figure 4: Epithelial membrane antigen (EMA) immunohistochemical reaction in the skin of Egyptian mummy. Magnification 300x.



5. ábra: Cytokeratin (CK) feltüntetése óegyiptomi múmia bőrének faggyúmirigyében. 300x nagyítás.

Figure 5: Cytokeratin(CK) PAP reaction in the skin of Egyptian mummy. Magnification 300x.

Korábban említettem, hogy a múmia szövetekben a sejtmagok nem tüntethetők fel a szokványos eljárásokkal, ami igen megnehezíti, gyakorta lehetetlenné teszi a pontos diagnózist, különösen daganatok esetében. Különleges technikákkal (szerencsés esetekben) mégis feltüntethetők a sejtmagok. Guarino és mtsai (2000) acridinorange-fluoreszcens festéssel többnyire ki tudták mutatni a múmia szövetek és ásatag csontokban a sejtmagokat. Saját folyamatban lévő vizsgálatainkban speciális ezüstözési technikával „előhívtuk” a sejtmagokat (6. ábra).



6. ábra: Különleges ezüstözési eljárással a sejtmagok „előhívhatók”. I. e. 1. századból származó egyiptomi múmia arcibőrének verejtékmirigyei. (300x. nagyítás). A kinagyított felvételen (600x nagyítás), a nyíllal jelzett képlet a nucleolaris organizációs régió (NOR).

Figure 6: With a new silver-reaction the cell nuclei is demonstrable in the facial skin in a Egyptian mummy (1st century BC). Magnification 300x. In the detail in one nucleus the nucleolar organizing region (NOR) is visible. Magnification 600x.

Ezzel az eljárással nemcsak a nucleus határhártyáját és a nucleoplasmát lehet vizsgálni, hanem olyan – a paleohisztológiában korábban nem vizsgálható – képleteket, mint pl. a nucleolar organizing region (NOR). A NOR szabályozza a sejt fehérje-szintézisét, s minden olyan állapotban és kórfolyamatban (atrophia, hypertrophia, daganat), amikor a sejt fehérje-szintézise megváltozik, nemcsak alaki, hanem számbeli eltérések is beállnak (Józsa és mtsai 2003). Ma még nem lehet megmondani, hogy a NOR vizsgálata mennyire viszi előre az őskórtani diagnosztikát, ill. a patogenezis felderítését.

Miért nem történik több hisztokémiai vizsgálat?

Az „egyszerű” hisztokémiai reakciók a recens patológiában rutin eljárások, az enzimhisztokémiai vizsgálatokat egy-egy speciális esetben (enzimhiányos állapotok, izomrostok differenciálása, stb.) végzik. Az immunhisztokémiai módszerek az utóbbi évtizedekben váltak mindennapossá, valamennyi egyetemi és kórházi patológiai osztály gyakorta végzi ezeket. Nem tagadható, hogy a patológusok (hazánkban) kevesen vannak, túlterheltek, nem szívesen vállalnak olyan feladatokat, amelyek nem tartoznak szorosan a munkakörükhöz. A recens szöveteken viszonylag egyszerűen kivitelezhetők a szövettani, hisztokémiai eljárások. Más a helyzet az őskórtani vizsgálati anyagok esetében. A reakciókhoz elő kell készíteni a mumifikálódott (és/vagy az ásatag) szöveteket. A vizsgálati anyag rögzítése és rehidrációja az első, lényegében a legfontosabb lépés a feldolgozás során. Ezeknek a rendkívül időigényes folyamatoknak az optimális, vagy elégtelen volta határozza meg az őskórtani anyagokon elvégezhető hisztokémiai és immunhisztokémiai reakciókat (Dore és mtsai 2001, Józsa és Pap 1998, Mekota és Vermehren 2005). Ám nemcsak technikai nehézségekkel kell számolnunk a múmia (ásatag csontok) hisztokémiai vizsgálatakor. Sokan azért ellenzik ezeket, mert invazív módszereknek tartják, s inkább feláldozzák a diagnózis korrektségét, csakhogy ne kelljen megbontani a gyűjtemény értékes darabjait. A szövettani (és elektronmikroszkópos) technikáknak általában nagyon kicsi a minta igényük. Egy négyzetcentiméternyi (múmia) bőrdarabból akár húsz-harminc féle festés, ill. hisztokémiai reakció is elvégezhető (Józsa és Pap 1998). Gyufafejnyi (pár köbmilliméteres) mintából nemcsak a recens patológiában lehet helytálló kórismét mondani (pl. vese, máj, sőt szívizom biopsziából), hanem ugyanezek a szervek és szövetek a múmiákból is vizsgálhatók volnának. Átmeneti megoldásként az endoszkópos vizsgálat és a belszervekből endoszkóppal végzett szövetminta vétel jöhet szóba (Kim és mtsai 2005).

Nem elhanyagolható, hogy a mumifikálódott szövetek feldolgozása sokkal idő- és pénzigényesebb, mint a recens szöveteké. A különböző immunhisztokémiai reakciók, egyenként (a reagensek árától függően, 2010. évi árakon számolva) szövetmintánként 6 000–30 000 Ft-ba kerülnek. Ezt az összeget az anyagilag rosszul álló kórházi (egyetemi) patológiai laboratóriumok (nagy nehézségek árán) legfeljebb egy-egy esetben tudják „kigazdálkodni”. Nem csak Magyarországon, hanem szerte a világban, (kevés kivételtől eltekintve) igyekeznek a múmia-szöveteken történő hisztokémiai vizsgálatok számát minimalizálni. Mindezen nehézségek és akadályok ellenére az a véleményem, hogy törekedni kell minél gyakrabban mikroszkópos feldolgozásra.

Összefoglalva: *A makroszkópos kórismézés ideje a paleopatológiában is lejárt. Felelőtlenség (az esetek nagy részében) a csontok (múmiák) szabad szemmel történő megfigyelésével kórismét kimondani. Az egyszerű röntgenfelvétel 50%-kal megnöveli és pontosítja a (csak makroszkóposan vélelmezett) kórismék számát. Vannak azonban olyan*

kórképek is, amelyek azonosításához nem elegendő a makroszkópos és röntgenvizsgálat (Schultz 2001), hanem szövettani, és/vagy hisztokémiai-immunhisztokémiai elemzés is szükséges. Saját tapasztalatom szerint a mikroszkópos megfigyelés legalább 30%-kal több kórismét tesz lehetővé, mint a makroszkópos + röntgenvizsgálat (Józsa 2006). Az immunhisztokémiai módszerek alkalmazása tovább növelheti és pontosíthatja a kórismét. (Pl. makroszkópos vizsgálattal az idézett múmia vese „épnék” látszott. Szövettani és „egyszerű” hisztokémiai eljárásokkal megállapítható volt a glomerulonephritis, de csak immunhisztokémiai eljárásokkal volt azonosítható a folyamat természete [Berg-típusú IgA glomerulonephritis], s pontosan tisztázható, hogy a vesegyulladás tucatnyi formája közül melyikről van szó). Ezért lenne kívánatos – minden anyagi, tárgyi és személyi nehézség ellenére –, hogy mind több esetben történjék ne csak szövettani, hanem hisztokémiai és immunhisztokémiai feldolgozás is.

*

Ajánlás: Dr. Pap Ildikó születésnapjának tiszteletére.

Irodalom

- Allison, M.J., Gerszten, E., Martinez, A.S., Klurfeld, D.M. (1977): Generalized connective tissue disease in a mummy from the Huari culture (Peru). *Bull. New York Acad. Med.*, 53, 292–301.
- Allison, M.J., Gerszten, E. (1998): Human milk fat globule protein in a 3000 years mummy. *Paleopathology Newsletter*, 73, 2–3.
- Andersen, H., Jorgensen I.H. (1960): Decalcification and staining of archeological bones with histochemical interpretation of metachromasia. *Stain. Technol.*, 35, 291–294.
- Ascensi, A., Brunori, M., Citro, G., Zitro, R. (1985): Immunological detection of hemoglobin in bones of ancient Roman times and from an eneolithic ages. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 7170–7172.
- Ciranni, R., Casiagna, M., Fornaciari, G. (1999): Goiter in an eighteenth century Sicilian mummy. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 108, 427–432.
- Cranic, K., Durison, M., Onol, R. (1989): AB0 tissue antigens of Egyptian mummies. *Forensic Sci.*, 43, 113–124.
- Czermak, Nj. (1852): Beschreibung und mikroskopische Untersuchung zweier Ägyptischen Mumien. *S. R. Acad. Wissensch. Abt. Mathematik – Naturwissenschaft (Wien)*, 9, 427–485.
- Dittmar, K., Teegen, W. R. (2003): The presence of *Fasciola hepatica* (liver fluke) in humans and cattle from a 4,500 year old archaeological site in the Saale–Unstrut Valley, Germany. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, (Suppl. 1), 141–143.
- Dore, R., Pavan, E., Masali, M. (2001): Histological techniques and microscopic analysis of biological agents for preservation of human bone remains. *Biotechnic & Histochemistry*, 76, 89–95.
- Etspüler, H., Kaup, Y., Bailyes, En., Luzio, J.F., Weser, U. (1995): Monoclonal antibodies recognize 2300 years aged alkaline phosphatase. *Immunol. Lett.*, 48, 187–191.
- Farkas, Gy.L., Józsa, L., Paja, L., Molnár, J. (2007): Bone forming tumors on skeletons a Medieval Hungarian cemetery (Bátmonostor). *Paleopathology Newsletter*, 140, 14–21.
- Fornaciari, G., Castagna, M., Tognetti, A., Tornaboni, D. (1989): Syphilis in a renaissance Italian mummy. *Lancet*, 354, 614–615.
- Fornaciari, G., Castagna, M., Viacava, R., Tognetti, A., Bevilacqua, G. (1992): Chagas disease in Peruvian Inca mummy. *Lancet*, 339, 128–129.
- Fornaciari, G., Marchetti, J. (1986): Intact smallpox virus in an Italian mummy of the XVI century. An immunoelectron microscopic study. *Paleopathology Newsletter*, 56, 7–12.
- Fornaciari, G., Ciranni, R., Ventura, L. (2001): Paleoandrology and prostatic hyperplasia in Italian mummies (XV–XIX century). *Med. Secoli.*, 13, 269–284.

- Fornaciari, G., Zawaglia, K., Giusti, L., Vultaggio, C., Ciranni R. (2003): Human papilloma virus in a 16th century mummy. *Lancet*, 362, 1160.
- Franc, S., Marzin, E., Boutillon, M.M., Lafont, R., Lechéne de la Porte, P., Herbage, D. (1995): Immunohistochemical and biochemical analyses of 20,000–25,000-year-old fossil cartilage. *Eur. J. Biochem.*, 234, 125–31.
- Fulcheri, E. (1995): Immunohistochemistry: a new outlook in histopaleopathology. *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 71, 105–110.
- Gerszten, P.C., Martinez, J.M. (1995): The neuropathology of South-American mummies. *Neurosurgery*, 36, 756–765.
- Glasscock, R.J. (2009): Analyzing antibody activity in IgA nephropathy. *J. Clin. Invest.*, 119, 1450–1452.
- Guarino, F.M., Angelini, E., Odicra, G., Bianco, M.R. (2000): Detection of DNA in ancient bones using histochemical methods. *Biotechnic & Histochemistry*, 75, 110–117.
- Guhl, F., Jaramillo, C., Vallejo, G.A., Yockteng, R., C'ardenas-Arroyo, F., Fornaciari, G., Arriaza, B., Aufderheide, A.C. (1999): Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from Northern Chile. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 108, 401–407.
- Hagelberg, E., Sykes, R., Hodges, R. (1989): Ancient bone DNA amplified. *Nature*, 342, 485.
- Hoyle, C.K., Thomas, P.K., Burnstock, G., Appenzeller, O. (1997): Immunohistochemical localisation of neuropeptidase and nitric oxide synthetase in sural nerves from Egyptian mummies. *J. Auton. Nerv. System.*, 67, 105–108.
- Józsa, L.G. (1966): Paleopathology of arteriosclerosis. *Cor & Vasa*, 8, 231–236.
- Józsa, L.G., Kannus, P., Järvinen, M., Isola, J., Kvist, M., Lehto, M. (1993): Atrophy and regeneration of rat calf muscles cause reversible changes in the number of Nuclear Organizer Regions. *Laboratory Investigation*, 69, 231–237.
- Józsa, L.G., Pap, I. (1998): Immunohistochemical analysis of mummy skin. *J. Paleopathol.*, 10, 133–139.
- Józsa, L.G. (2005): Illnesses of Palatinus Joseph Habsburg and his first wife. *J. Paleopathol.*, 17, 145–152.
- Józsa, L. (2006): *Paleopathologia. Elődeink betegségei*. Semmelweis Kiadó, Budapest.
- Józsa, L.G., Fóthi E. (2003): Juxtacortical osteosarcoma on tibia and fibula from a medieval cemetery of Budapest. *J. Paleopathol.*, 15, 23–31.
- Józsa, L.G. (2008): Histologic diagnoses of tissues from two nineteenth century Habsburgs. *Paleopathology Newsletter*, 141, 12–18.
- Józsa, L.G., Fóthi, E. (2010): Repairing or protection of holes in the head: cranioplasty in 7th–10th centuries in Hungary. *Paleopathology Newsletter*, 151, 8–11.
- Kaup, Y., Baumer, U., Koller, J., Hedges, R.E., Werner, H., Hartmann, H.J., Etspüler, H., Weser, U. (1994): Zn2Mg alkaline phosphatase in an early Ptolemeic mummy. *Z. Naturforsch.*, 49, 489–500.
- Kaup, Y., Weser, U. (2000): Ancient metalloenzymes as possible markers in molecular archeology. *J. Inorg. Biochem.*, 79, 3–6.
- Kim, S.B., Shin, J.E., Park, S.S., Bok, G.D., Chang, Y.P., Kim, J., Chung, J.H., Yi, Y.S., Shin, M.H., Chang, B.S., Shin, D.H., Kim, M.J. (2006): Endoscopic investigations of the internal organs of a 15th century child mummy from Yanghju, Korea. *J. Anat.*, 209, 681–689.
- Lengyel, I.A. (1975): *Paleoserology. Blood typing with the fluorescent antibody method*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Marchetti, A., Pellegrini, S., Bevilacqua, G., Fornaciari, G. (1996) K-ras mutation in the tumor of Ferrante I. of Aragon, King of Naples (1431–1494). *Lancet*, 347, 1272–1273.
- Meddens, M.J.M., Janssen, H.P. (1999): Detection of cytomegalovirus infection by immunological staining and in situ DNA hybridization techniques. In: Bullock, G.R., Leatham, A.G., Velzen, D. (Eds): *Techniques in diagnostic pathology*. I. kötet. Academic Press, London, San Diego, New York. 41–66.

- Mekota, A.M., Vermehren, M. (2005): Determination of optimal rehydration, fixation and staining methods for histological and immunohistochemical analysis of mummified soft tissues. *Biotechnic & Histochem*, 80, 7–13.
- Miller, R., Callas, D.D., Ricchiutti, V. (2000): Evidence of myocardial infarction in mummified human tissue. *JAMA*, 284, 830–831.
- Miller, R.L., Armelagos, G.J., Ikram, S., De Jonge, N., Krijer, F.W., Deelder, A.M. (1992): Palaeoepidemiology of *Schistosoma* infection in mummies. *Brit. Med. J.*, 304, 555–556.
- Moodie, L.R. (1923): *Paleopathology*, Univ. Illinois Press, Urbana.
- Nerlich, Ag., Parsche, F., Kirsch, T., West I., Von Der Mark, K. (1993): Immunohistochemical detection of interstitial collagens in bone and cartilage tissue remains in an infant Peruvian mummy. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 91, 279–285.
- Omalu, Bi., Mancuso, Ja., Cho, P. (2005) Diagnosis of Alzheimer's disease in an exhumed decomposed brain after twenty months of burial in deep grave. *J. Forensic Sci.*, 50, 1483–1458.
- Pawliczki, K. (1978): Methods of preparation of fossil bone for light- and transmission electronmicroscopy. *Stain Technol.*, 53, 95–102.
- Romakov, Iu.A., Bykov, V.A., Rebrova, G.A., Vasilevskij, V.K., Ho, S.S., Rebrov, L.B. (2002): Evaluation of preservation and the collagen structure state in the mummy tissues. *Vopr. Med. Khim.*, 48, 357–60 (Oroszul, angol összefoglalóval).
- Rutherford, P. (1999): Immunocytochemistry and the diagnosis of schistosomiasis; ancient and modern. *Parasitology Today*, 15, 390–391.
- Sandison, AT. (1955): The histological examination of mummified material. *Stain Technol.*, 30, 277–280.
- Sandison, AT. (1959): Resistance of sudanophilic lipids in sections of mummified tissues. *Nature* (London), 183, 196–197.
- Schultz, M. (2001): Paleohistopathology of bone: A new approach to the study of ancient diseases. *Yearbook of Physical Anthropology*, 44, 106–147.
- Schultz, M., Parzinger, H., Posdajakov, D.V., Chikisheva, T.A., Schmidt-Schultz, T.H. (2007): Oldest known case of metastasing prostate carcinoma diagnosed in the skeleton of a 2,700-year-old Scythian King from Arzham (Siberia, Russia). *Int. J. Cancer*, 121, 2591–2595.
- Shattok, B.D. (1909): Microscopic sections of the aorta of King Menephtak. *Lancet*, I, 319–322.
- Stastny, P. (1974): HLA antigens in mummified pre-Columbian tissues. *Science*, 183, 864–868.
- Stenn, F.F., Milgram, J.W., Lee, S.L., Weingard, R.J., Veis, A. (1977): Biochemical identification of homogentisic acid pigment in an ochronotic Egyptian mummy. *Science*, 197, 566–568.
- Weser, U., Etspüler, H., Kaup, Y. (1995): Enzymatic and immunohistochemical activity of 4000 years aged bone alkaline phosphatase. *FEBS Lett.*, 375, 280–282.
- Weser, U., Miesel, R., Hartmann, H.J. (1989): Mummified enzymes. *Nature* (London), 341, 996.
- Wick, G., Kalischnig, G., Maurer, H., Mayerl, C., Müller, P.U. (2001): Really old-palaeoimmunology: immunohistochemical analysis of extracellular matrix proteins in historic and pre-historic material. *Exp. Gerontol.*, 36, 1565–1579.
- Williams, H.U. (1927) Gross and microscopic anatomy of two Peruvian mummies. *Arch. Path.*, 4, 26–33.

Levelezési cím: Józsa László
 Mailing address: 3648 Csernely
 Táncsics út 9.
 Hungary
 jozsalg@gmail.com

