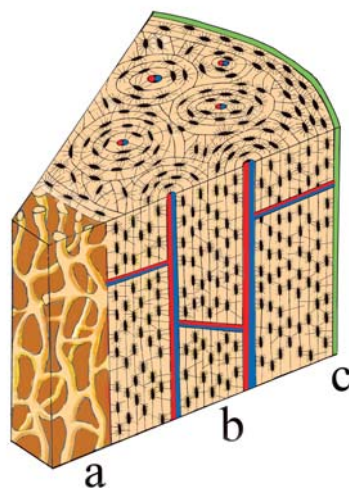


Eljárások a csont- és a porcszövet vizsgálatára

A kötő- és támasztószövetek közé tartozó csont-, illetve porcszövet a gerincesek (Vertebrata) törzsébe tartozó élőlények jellemző szövetféleségei. Emberben a magzati élet folyamán, a középső csíralemezből (mezoderma) származó embrionális kötőszövetből (mesenchyma) alakulnak ki, miközben annak sejtjei maguk körül szilárd közti állományt termelnek.

A legtöbb csont helyén előbb annak (hyalin-)porcos elő alakja képződik, majd ennek helyét foglalja el fokozatosan a csontszövet. A csontok fejlődése csak a pubertás után fejeződik be. A kemény és egyben rugalmas csontszövet nagyfokú regenerációra képes. Megváltozott terhelés hatására szerkezete átépülhet, de részletenkénti, lassú átépülése (remodeling) e nélkül is folyamatosan végbemegy. A tömör csont nyomószilárdsága 1,5–1,8 t/cm² [21]. Kémiai összetétele viszonylag tág határok között váltakozik. 15–45% víztartalma mellett szárazanyagtartalmának 1/3-át szerves, 2/3-át szervetlen anyagok alkotják. A szerves anyagok 90%-a I-es típusú kollagén, a többi egyéb fehérje, neutrális zsír és lipid. (Csont-specifikus fehérjék az osteocalcin, osteonectin és az osteopontin.) A szervetlen anyagok nagy része trikálcium-foszfát, illetve hidroxipatit [Ca₅(PO₄)₃OH], csekély részük kalcium-karbonát és egyéb sók.

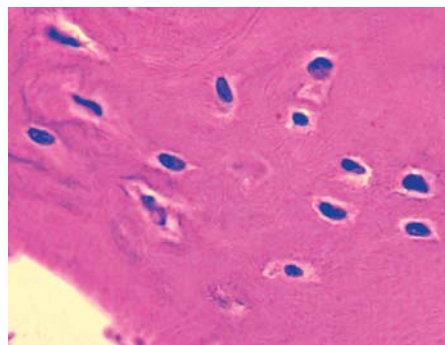
A csontok felszínét ereket tartalmazó, rostos kötőszövetes csontthártya borítja (1. ábra). Külső rétegük tömör, belsejük szivacsos, itt a csontgerendák közti teret sárga (zsíros) vagy vörös (vérképző) csontvelő tölti ki. Mikroszkóppal a csontszövet sejtekre és sejt közötti állományra különíthető. Az utóbbi rétegzett, lemezes szerkezetű, optikailag anizotróp. A kb. 10 µm vastag lemezek (*lamellák*, *laminák*) párhuzamosan rendezett kollagénrostokból, valamint szervetlen sókból állnak, és vékony, kollagénszegény ragasztóréteg köti őket össze. A tömör csontszövetben a lemezek 5–15 rétegben, koncentriku-



1. ábra.

A csontszövet vázlatos szerkezete

- a. Szivacsos csont
- b. Tömör csont
- c. Csontthártya



2. ábra.

Csontszövet. Hematoxinilín-eozin festés

san elhelyezkedve 100–300 µm átmérőjű, hosszirányú, hengeres képleteket (*osteonokat*) alkotnak. Ezek – a bennük spirálisan futó kollagénrostok miatt – polarizált fényben különösen szembe tűnőek. (Tripszinmészttel izolálhatók is.) Az osteonok tengelyében, az ún. Havers-csatornában és az ezeket harántul összekötő Volkmann-csatornában található a csont erei. A laminák közötti üregecskében (*lacunákban*) foglalnak helyet a tojásdad maggal és keskeny citoplazmával rendelkező, 20–25 µm hosszú, barackmagalakú csontsejtek (*osteocyták*). A lacunából minden irányban csator-

nácskák (*canaliculusok*) indulnak ki. Ezekben húzódnak a csontsejtek finom citoplazmanyúlványai, amelyek révén a sejtek kapcsolatban állnak egymással és az őket tápláló érrendszerrel. A sejt-yúlványok átlag 100 nm átmérőjűek, a canaliculusok átmérője átlag 260 nm [25]. A canaliculusok fala és a nyúlványok között proteoglikánokat tartalmazó pericellularis tér van [20].

A csontszövet sejt közötti állománya gyenge basophiliát és PAS-reakciót mutat. Hematoxinilín-eozin festéssel egyneműnek tűnik, csupán az osteocyták magjai láthatók a lacunákban (2. ábra). A sejtek citoplazmája, a nyúlványokkal együtt festetlen marad. Van Gieson (pikroszírúsz vörös) festéssel a nem méasztelenített csont alapállománya vörösre, a méasztelenített csonté sárgára festődik (a canaliculusok vörösek, így kis nagyítással narancsszínű látnunk). Trikróm festéssel a méasztelenített csont alapállománya vörös, a nem méasztelenítetté, (illetve a metszetben méasztelenítetté) kék lesz. Csontszövet jelenlétének demonstrálására, valamint oktatási célból szükség lehet olyan eljárásra, amely elektíven feltűnteti a szövetre jellemző lacunákat és canaliculusokat.

A csontszövetet mikroszkóppal csiszolat vagy metszet formájában vizsgálhatjuk. A csiszolatot vékonyra kifűrésztelt csontlemezből készítjük, amelyet acetonnal történő zsírtalanítás után tárgylemezre ragasztva finomszemcsés csiszolópapír és fenőkő (szürke, ún. Arkansas kő) segítségével tovább vékonyítunk. Az áttűnővé vált lemezt kanadabalszammal lefedve a csont üregrendszere a benne maradt levegő és az alapállomány eltérő fénytörése folytán látható lesz. A preparátumot bázisos jellegű anilinszínezékek (fukszin, kristályibolya) alkoholos oldatával átitatva az üregrendszert a színezék rajzolja ki.

A hosszadalmas csiszolatkészítésnél sokkal egyszerűbb eljárás, ha a csontot formalinban való alapos fixálás

után mésztelenítjük (dekalcináljuk), paraffinba ágyazzuk és metszetet készítünk belőle. A dekalcinálás – azaz a csont keménységét okozó és a metszést akadályozó kalciumsók eltávolítása – olyan savakkal történhet, amelyek a vízben oldhatatlan trikálcium-foszfátból és kalcium-karbonátból jól oldódó kalciumsót képeznek. Erre a célra salétromsavat, sósavat, hangyasavat, triklór-ecetsavat ajánlottak. Richman és munkatársai^[18] sósav és hangyasav elegyét tartottak előnyösnek. (A Bio-Optica cég [Milánó] által forgalomba hozott Bio-Dec dekalcináló folyadék a biztonsági adatlap szerint szintén sósavat és hangyasavat tartalmaz.) A sósavhoz a gyengébb sav hozzáadása első megközelítésben indokolatlannak látszik, a gyakorlatban azonban célszerűnek bizonyult.

Elvileg minden sav használható ami a trikálcium-foszfátot oldja, de gyenge vagy híg savakkal hosszú ideig tart a dekalcinálás. Vékonyabb szövetminta, erősebb sav, nagyobb savkoncentráció, hosszabb idő, magasabb hőmérséklet és az oldat keverése elősegíti a méasztelenítést^[24]. Lillie és munkatársai^[15] kimutatták, hogy a többek által javasolt, ún. „elektromos dekalcinálás” nem elektrolízisen, hanem az oldatnak az áram hatására történő felmelegedésén alapul. A savak hátránya, hogy idővel – különösen magasabb hőmérsékleten – a nukleinsavakat hidrolizálva kioldják a nukleoproteinekból, ezáltal gyengítik a sejtmagok festődését. A bázikus anilinszínezékekkel való a festhetőség már rövid ideig tartó dekalcinálás után megszűnik. Hematoxilin–eozin festéssel a magfestődés ekkor még megmarad, de a magok egyre halványabbak és vörösebb árnyalatúak lesznek. A hematoxilin ugyanis nem csak a nukleinsavakhoz, hanem a sejtmag bázikus proteinjeihez, az argininben dús hisztonokhoz is kötődik, amelyeket semleges vagy gyengén savanyú közegben az eozin is megfest. (A nukleinsavak lehasadása után a hisztonok savanyú színezékekkel még gyengén lúgos közegben is festődnek^[11].) A gyorsabb méasztelenítés érdekében csak addig emelhetjük a sav koncentrációját, míg a festődés nem károsodik. Nagyobb anyagnál megtörténhet, hogy amikor az teljes egészében metszhető állapotba kerül, széli részein már nem kapunk megfestődést. Normál sósavval (a ke-

reskedelemben kapható tömény sósav kb. 12-szeres hígításával) szobahőmérsékleten, négy napig történő méasztelenítés után, timsós hematoxilinnal a magfestődés még elfogadható marad, ennyi idő viszont bőven elegendő a szokványos méretű, 1–2 g-os anyagok dekalcinálásához. A folyadékot feleslegben alkalmazzuk. A csontban 50% trikálciumfoszfát-tartalmat feltételezve, 1 g csontszövethez legalább 10 ml *n* normál sósav szükséges. A méasztelenítés előrehaladását célszerű naponta ellenőriznünk tüvel vagy bemetszéssel. (A röntgenvizsgálat, a súlymérés vagy a méasztelenítőoldat kalciumtartalmának ammónium-oxaláttal történő detektálása inkább csak elméleti lehetőségként merül fel.) A méasztelenített anyagokat legalább egy órán keresztül áramló csapvízben mossuk.

Erősíthetjük a sejtmagok festődését, ha timsós hematoxilin helyett vas-hematoxilint használunk. Hasonló hatást érhetünk el, ha a méasztelenítő savhoz ferrisót adunk, és a metszetet timsós hematoxilinnal festjük^[8,9,16]. (A szövethez kötődött ferrisók a timsós hematoxilint vas-hematoxilinná alakítják.)

A kéméletesen méasztelenítő, enyhén lúgos pH-jú etilén-diamin-tetraecetsavas dinátrium (EDTA-Na₂) oldat lassú hatása miatt rutin patológiai célra nem alkalmas^[16], de ahol az időfaktor nem számít (normál szövettani preparátumokhoz, enzimizstokémiai vizsgálatokhoz, sziklacsontokhoz) ajánlható méasztelenítésre. A vegyszer lúgos közegben a kalcium-ionokkal rosszul disszociáló, de vízben jól oldódó komplexet képez (1 M=372,24 g EDTA-Na₂ 103 g trikálcium-foszfátot old). 1 g csont dekalcinálására legalább 20 ml 10 g/dl-es oldatot számítsunk. Az oldat készítésekor 10 g

vegyszert vízzel 100 ml-re feltöltünk, majd kevergetés közben addig adunk hozzá szemcsés nátrium-hidroxidot, míg a folyadék fel nem tisztul (pH≈8). (Az EDTA-Na₂ savanyú só, vízben nehezen oldódik. Lúggal semlegesítve EDTA-Na₄ képletű, jól oldható sóvá alakul.)

Richman és munkatársai^[18] vizsgálataiból és a Bio-Dec oldattal elért kedvező eredményekből kiindulva 1,0 *n* normál sósavhoz a szövettani laboratóriumban kéznél lévő ecetsavat, illetve pikrinsavat adunk, és formalinban fixált májszövetet, illetve vörös csontvelőt ebben az oldatban 1–6 napig inkubálva, majd paraffinba ágyazva a metszetekben megfigyeltük a sejtmagok festődését. 10 térf% ecetsav hatására a magfestődés javult, de a vörösvértestek részben hemolizálódtak. Jobb eredményt értünk el pikrinsavval telített 1,0 normál sósavval vagy az alábbi oldattal:

Tömény (36–38 tömeg %-os)
sósav 8 ml
Telített pikrinsav oldattal
(kb. 1,3 g/dl) 100 ml-re feltöltve

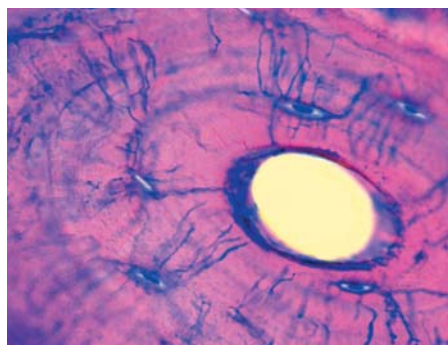
A magfestődést értékelve a következő sorrendet kaptuk: kontroll (sav nélkül)>pikrinsavas sósav>Bio-Dec>normál sósav. Arra vonatkozóan nem találtunk magyarázatot, hogy az önmagukban rosszul méasztelenítő, gyenge szerves savak hogyan gátolják a nukleoproteinek erős szerves savak hatására történő hidrolízisét. Az ecetsav és a pikrinsav egyébként számos, bevált fixáló keveréknek (*Bouin*, *Carnoy stb.*) is alkotórésze. A pikrinsav sárga színe ellenőrizhetővé teszi az anyag kimosását, és általa az oldatot könnyen megkülönböztethetjük a szintelen formalintól.

I. táblázat

Csont- és porcfestési eljárások egyes lépései

		1.	2.	3.	4.	5.	6.
Csont	Schmorl I.	Müller-f. v. formalin	Méasztelenítés	Celloidin	Tionin	Pikrinsav	Alkohol
Csont	Schmorl II.	Müller-f.	Méasztelenítés	Celloidin	Tionin	PW-sav	NH ₄ OH
Csont	Krutsay	Formalin	Méasztelenítés	Paraffin	Metilénkék	Alkohol	PW-sav
Porc	Romeis	Formalin	Méasztelenítés	Paraffin	Metilénkék	NH ₄ -molibdenát	Alkohol
Porc	Krutsay	Formalin	Méasztelenítés	Paraffin	Metilénkék	PW-sav	Alkohol

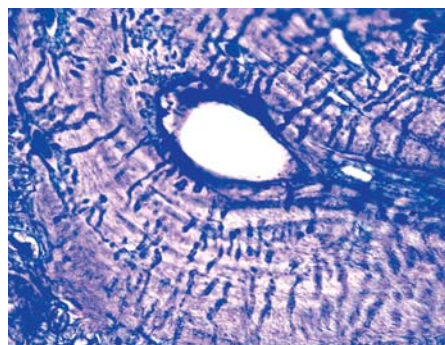
A zsírtartalmú csontok átívódásának elősegítésére a mésztelenítő folyadékhoz N-cetilpiridinium-kloridot (kationos detergens), illetve nátrium-lauril-szulfátot (anionos detergens) adtunk. 0,1 g/dl koncentráció esetén ezek felületaktív hatását a savas közeg megszüntette (az oldat felrázva nem habzott). 1 g/dl koncentrációban a tenzidok – különösen a Na-lauril-szulfát – már hatásosnak bizonyultak. Ez utóbbi a festődést nem rontotta.



3. ábra. Csontszövet. Metilénkék-eozin festés

barna, pelyhes csapadékot ad a tioninnal, a foszfor-volfrámsavra keletkező fekete csapadék csupán mikroszkóppal látható.) Egyes színezékek megbízhatatlansága miatt Allison^[2] csak tanúsítvánnyal azonosítható tionin készítmények használatát ajánlotta.

Vizsgálataink szerint a módszerhez paraffinmetszetek is alkalmasak, a Müller-oldattal való kezelés mellőzhető^[10]. A tionint előnyösen helyettesíthetjük egyéb, bázisos tiazin színezé-

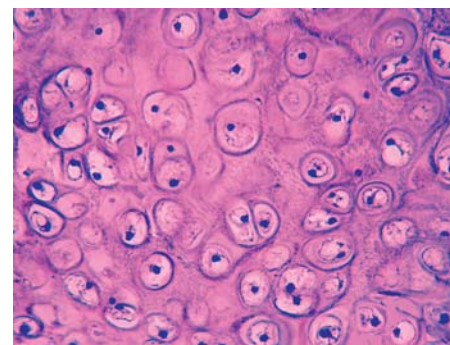


4. ábra. Csontszövet. Kristályibolya festés

foszfor-volfrámsav a színezéket fixálja, azaz ellenállóbbá teszi a kontrasztfesték, illetve a víztelenítő alkohol hatásával szemben.

A csontszövet festésére az alábbi eljárást ajánljuk:

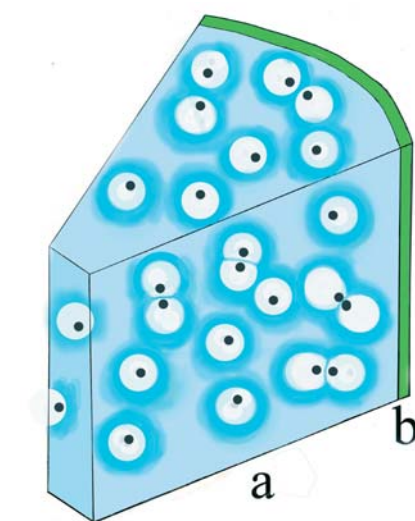
1. A formalinban rögzített, mésztelenített és paraffinba ágyazott metszetet glicerinnel készült, 1 g/dl-es metilénkék törzsoldat és desztillált víz 1:9 arányú elegyével festjük 1–2



6. ábra. Hyalinporc. Hematoxilin-eozin festés

Csontmetszetek festésére Schmorl^[21] több mint 100 éve közölt két eljárást, melyek mindmáig szerepelnek a hisztotechnikai kézikönyvekben (I. táblázat). A csontokat fixálás után hetekig Müller-féle folyadékban (kálium-pirokromát oldatban) tartotta, majd savban mésztelenítve celloidinba ágyazta. A metszeteket tionin oldattal festette, pikrinsavval, illetve foszfor-volfrámsavval kezelte és alkohollal differenciálta. Leírta, hogy az eljárások nem az osteocytákat és nyúlványaikat, hanem az őket befogadó üregrendszert festik meg. (Az 0,1 µm átlagos átmérőjű sejtnyúlványok a fénymikroszkóp feloldóképességének határa alatt maradnak.) A paraffin beágyazást és a toluidinkéket nem találta alkalmasnak a festésekhez, Drury és Wallington^[5] viszont az azúr A-t használhatónak tartották.

A Schmorl-féle csontfestésnél a hosszú előkezelésen és a ma már kevésbé használatos celloidin beágyazáson kívül gondot okoz, hogy a tionin igen hajlamos a csapadékképzésre, amelyet már Schmorl is említett. Alkoholos, vagy megszárt vízes oldatában is találunk apró, sötétlila-fekete kristályokat, amelyek a metszetre rakódhatnak. A festés során alkoholban oldhatatlan, fekete csapadék is kiválhat a metszeten. (Kémcsőben a pikrinsav



5. ábra. A hyalinporc vázlatos szerkezete.
a. Porc
b. Porchártya

kekkel (toluidinkékekkel, metilénkékkel), valamint a trifetil-metán színezékekhez tartozó kristályibolyával és bázikus fukszinnal is. Ezek használatakor a metszet nem lesz csapadék. (Kémcsőben azonban a foszfor-volfrámsav a színezékeket mikroszkópos méretű pelyhek alakjában kicsapja.) Az eljárás feltehetően a pericelluláris proteoglikán réteg basophiláján alapul. A

- percig. (A törzsoldat eltartható.)
2. Öblítés vízben.
3. Differenciálás 70%-os etil- vagy izopropil-alkohollal, míg festék vonódik ki a metszetről (1–2 percig). (Töményebb alkohol nehezebben differenciál.)
4. Öblítés vízben.
5. Fixálás 5 g/dl-es foszfor-volfrámsav oldattal 1/2–1 percig.
6. Öblítés vízben.
7. Kontrasztfestés mikroszkópos kontroll mellett 0,1 g/dl-es eozin B-oldattal, míg a csontalapállomány rózsaszínű nem lesz (kb. 5 percig). (A foszfor-volfrámsavval kezelt metszet nehezebben veszi fel az eozint.)
8. Öblítés vízben.
9. Víztelenítés alkoholban, derítés, lefedés.

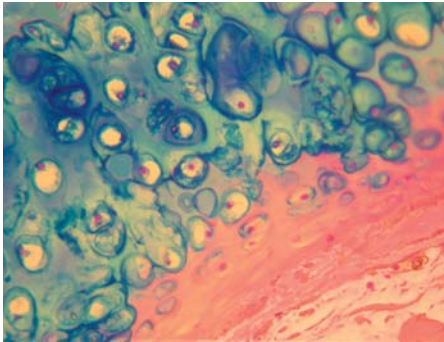
Eredmény: a lacunák szélei, a canaliculusok, a porcalapállomány és a hízósejtek szemcséi sötétkékek, a csontalapállomány és az egyéb szövetek rózsaszínűek (3. ábra).

Megjegyzés: a metilénkék kristályibolyával vagy bázikus fukszinnal helyettesíthető, ekkor a kontrasztfestést elhagyjuk. Kristályibolya festéssel a canaliculusok nagyobb átmérőjűnek tűnnek mint metilénkékkel (4. ábra).

Bár a hisztotechnikai kézikönyvek a

csontsejtek feltüntetésére a Schmorl-módszert ajánlják, többen is próbálkoztak a csontmetszetek ezüst impregnációjával [4, 6, 12, 14, 23].

A porcszövet a csontoknál rugalmasabb, de kisebb nyomószilárdságú (kb. 1,5 t/cm²) [21]. Mikroszkópos szerkezete szerint üvegporcot (hyalinporcot), rostos porcot és rugalmas porcot különböztetünk meg. Mindegyik sejtekből, rostokból és rostközötti állományból épül fel, és ereket tartalmazó, rostos

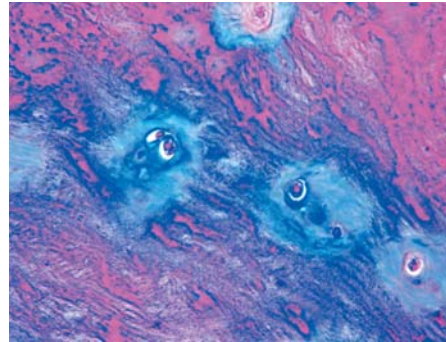


7. ábra.
Hyalinporc. Metilénkék-eozin festés

fixálásra más, nagy aniontömegű anyag pl. foszfor-volfrámsav is használható [11]. Az eljárással a porc rostközötti állományának proteoglikánjai és savanyú glikoproteinjei festődnek. A savas közeg megakadályozza az egyéb szövetelemek festődését.

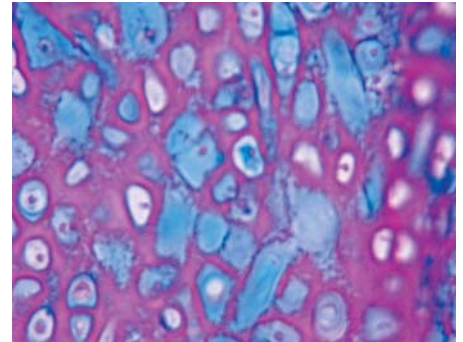
A porcszövet festésére javasolt eljárás

1. A formalinban fixált, paraffinba ágyazott anyag metszetét 30 percig



8. ábra.
Rostos porc. Metilénkék-eozin festés

A. B., Wallington, E. A.: Carleton's histological technique. 5th ed. Oxford University Press. London, 1980. pp. 199–220. 6. Gaudin-Audrain, C., Gallois, Y., Pascaretti-Grison, F., et al.: Osteopontin is histochemically detected by the AgNOR acid silver technic. *Histol. Histopathol.* 23 (2008), 469–476. 7. Ghazali bin M., Isa, M., Pek Chin Hoo: A technique for the simultaneous staining of osteocytes and osteons in frozen sections of decalcified bone. *Biotechn. Histochem.* 55 (1980), 47–48. 8. Krutsay M.: A szövettani vizsgálati anyagok mésztelenítéséről. *Morph. Ig. Orv. Szemle.* 10 (1970), 231–232. 9. Krutsay M.: Über die Entkalkung histologischer Untersuchungsobjekte. *Zbl. allg. Path.* 114 (1971), 75–76. 10. Krutsay M. és Szita I.: A csont-lacunák és canaliculusok feltüntetéséről. *Morph. Ig. Orv. Szemle.* 16 (1976), 65–66. 11.



9. ábra.
Rugalmas porc. Metilénkék-eozin festés

kötőszövetes porchártya határolja (5. ábra). A porcsejtek (*chondrocyták*) 20–25 µm átmérőjűek, kerekdedek. Gyakran több, zsemlyealakú sejt csoportot alkot. Kis, kerek sejtmagjuk van, bő citoplazmájuk igen halvány, benne sok glikogén mutatható ki. A sejtközötti állomány kb. 70% vizet, a hyalinporcban és a rostos porcban kollagénrostokat, a rugalmas porcban rugalmas rostokat, valamint proteoglikánokat, semleges és savanyú glikoproteineket tartalmaz, erek nincsenek benne. A hyalinporc rostközötti állománya a rostokat elfedi, ezért sejtközötti állománya egyneműnek tűnik (6. ábra). Ez az alapállomány – különösen a sejtek körül – erősen basophil festődésű, PAS-pozitív. Van Gieson-festéssel halványvörös, trikróm festéssel és alciankékkel kék, alcianzölddel zöld színű lesz. Az alcianszínezékekkel való festődés eredményét a pH és az oldószer lényegesen befolyásolja [13]. A PAS-festés és az alcianszínezékek a nyákot is feltüntetik.

A porcszövet elektív festésére a múlt század elején Romeis [19] közölt egy eljárást, amely igen hasonló a Schmorl-festéshez (I. táblázat). A szerző savas metilénkék oldattal festett, és a színt ammónium-molibdenát páco-lással fixálta. Később kiderült, hogy a

festjük az alábbi oldattal: Glicerinnel készült, 1 g/dl-es metilénkék törzsoldat 1 ml
1,0 n normál sósav 1 ml
Desztillált vízzel 100 ml-re feltöltve (A törzsoldat eltartható.)

2. Öblítés vízben.
3. Fixálás 5 g/dl-es foszfor-volfrámsav oldattal 1/2–1 percig.
4. Öblítés vízben.
5. Festés 0,1 g/dl-es eozin B-oldattal, míg a kötőszövet rózsaszínű nem lesz (kb. 5 percig).
6. Öblítés vízben.
7. Víztelenítés alkoholban, derítés, lefedés.

Eredmény: a hyalinporc alapállománya, a rostos és a rugalmas porc rostközötti állománya kék, az egyéb szövetelemek rózsaszínűek (7., 8. és 9. ábra).

Irodalom

1. Alfert, M., Geschwind, I. I.: A selective staining method for proteins of all nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 39 (1953), 991–999. 2. Allison, R. T.: Picro-thionin (Schmorl) staining of bone and other hard tissues. *Brit. J. Biomedical Sci.* 52 (1995), 162–164. 3. Bélanger cit. in Lillie, R. D., Fullmer, H. M.: *Histopathologic technic and practical histochemistry.* 4th ed. McGraw-Hill Co. New York, 1976. p. 797. 4. Christie, K. N.: The demonstration of canaliculi in sections of decalcified bone by a silver impregnation method. *Stain Techn.* 52 (1977), 301–302. 5. Drury, R.

Krutsay, M.: Modifikation der Romeisschen Knorpelfärbung. *Zbl. allg. Path.* 121 (1977), 515–516. 12. Krutsay, M.: Silberimpregnation des Knochengewebes. *Anat. Anz.* 160 (1985), 369–371. 13. Krutsay M.: A hyalinporc festődési sajátosságai. *Ostol. Közl.* 16 (2008), 163. 14. Kusuzaki, K., Kageyama, N., Shinjo, H. et al.: A staining method for bone canaliculi. *Acta Orthop. Scand.* 66 (1995), 166–168. 15. Lillie, R. D., Laskey, A., Greco, J., Burtner, H. J., Jones, P.: Decalcification of bone in relation to staining and phosphatase technics. *Amer. J. Clin. Path.* 21 (1951), 711–722. 16. Petrás S. és Krutsay M.: A szövettani vizsgálati anyagok mésztelenítéséről. *Morph. Ig. Orv. Szemle.* 21 (1981), 303–306. 17. Ploton, D., Menager, M., Jeannesson, P. et al.: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizing region at the optical level. *Histochem. J.* 18 (1986), 5–14. 18. Richman, I. M., Gelfand, M., Hill, J. M.: Method for decalcifying bone for histologic section. *Arch. Path.* 44 (1947), 92–95. 19. Romeis, B.: Die Architektur des Knorpels vor der Osteogenese und in der ersten Zeit derselben. *Arch. f. Entwicklungsmech. d. Organismen.* 31 (1911), 387–422. 20. Sauren, Y. M., Mieremet, R. M., Groot, C. G. et al.: An electron microscopy study on the presence of proteoglycans in the mineralized matrix of rat and human compact lamellar bone. *Anat. Rec.* 232 (1992), 36–44. 21. Schaffer, J.: *Lehrbuch der Histologie und Histogenese.* 2. Aufl. W. Engelmann. Leipzig, 1922. pp. 137, 152. 22. Schmorl, G.: Darstellung feinerer Knochenstrukturen. *Cbl. allg. Path.* 10 (1899), 745–749. 23. Schoen, F. A.: A method to stain decalcified bone without loss of structural detail. *Biotechn. Histochem.* 66 (1991), 216–219. 24. Verdenius, H. H. W., Alma, L.: A quantitative study of decalcification methods in histology. *J. clin. Path.* 11 (1958), 229–236. 25. Yon, L. D., Weinbaum, S., Cowin, S. C. et al.: Ultrastructure of the osteocyte process and its pericellular matrix. *Anat. Rec.* 278 A (2004), 505–513.

Dr. Krutsay Miklós
Magyar Imre Kórház, Ajka