

Aus der Neurochirurgischen Abteilung (Vorstand: Prof. Dr. J. GERLACH) und dem  
Physiologischen Institut (Vorstand: Prof. Dr. E. BAUEREISEN)  
der Universität Würzburg

## **Ein neues Verfahren zur vollständigen Erfassung der im Liquor cerebrospinalis vorhandenen Zellen (Zellenfangverfahren)**

Ein Beitrag zur Liquorecytologie

Von

G. SIMON und H. SCHRÖER

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Oktober 1962)

### **I. Einleitung**

Bei der heutigen routinemäßig durchgeführten Liquordiagnostik ist die Dominanz der chemischen Untersuchungsverfahren gegenüber den cytologischen unverkennbar. Die ungleiche Entwicklung auf den verschiedenen Gebieten der Liquorforschung ist in erster Linie auf die zu Beginn unseres Jahrhunderts erzielten großen Fortschritte in der Eiweiß- und Kolloidforschung zurückzuführen. Die Liquorecytologie hatte demgegenüber wesentlich weniger eindrucksvolle Ergebnisse aufzuweisen, obgleich die diagnostische Bedeutung des qualitativen Liquorzellbildes schon früh hervorgehoben wurde (ALZHEIMER 1904; RAVAUT 1906; PLAUT, REHM u. SCHOTTMÜLLER 1913). Der mangelnde Einbau der gesamtcytologischen Untersuchung in die klinische Liquordiagnostik muß vor allem den unzureichenden Untersuchungsmethoden zur Last gelegt werden. Erbrachten manche der angegebenen Verfahren auch verwertbare Ergebnisse, so hafteten ihnen doch so viele Nachteile an, daß sie sich nicht als Routineverfahren durchzusetzen vermochten.

Man bediente sich bisher zur Erfassung der im Liquor vorhandenen zelligen Elemente zweier Methoden, die man nach der Art der Trennung der zelligen von den flüssigen Liquorbestandteilen als Sedimentations- und Filtrationsverfahren bezeichnen kann.

Das Verfahren der *Zellsedimentierung* durch Zentrifugieren — in der älteren Literatur (WIDAL, RAVAUT, SICARD) als „französische Methode“ bezeichnet — hat sich verhältnismäßig lange behauptet. Es wurde allerdings wiederholt modifiziert, indem entweder die Dauer des Zentrifugierens variiert (NISSL 1904; JUNKER 1950) oder der Liquor mit bestimmten Substanzen versetzt wurde (ALZHEIMER 1907; FORSTER 1930; KAFKA 1910; ROEDER u. REHM 1942; FISCHER 1956), um den zellschädigenden Einfluß des Schleuderns zu verringern. In der Form der Alzheimer'schen Methode, bei der das Zentrifugat wie ein zur histologischen Untersuchung bestimmtes Gewebe behandelt, also eingebettet und geschnitten wird, fand das Sedimentationsverfahren Eingang in viele Kliniken und wurde lange Zeit für die

Methode der Wahl gehalten. EINSTEIN (1931) und OSTERTAG (1932) versuchten das Absetzen der Liquorzellen durch Zugabe gesättigter Ammoniumsulfatlösung zum Liquor und Erzeugung eines kräftigen Eiweißniederschlags zu beschleunigen. Allen diesen Methoden haftete aber der Nachteil der zu großen Zellschädigung an.

Glaubte man anfänglich, den zellschädigenden Einfluß des Zentrifugierens durch spontanes Sedimentierenlassen der Zellen vermeiden zu können (RAYAULT), so zeigte sich bald, daß sich die Zellen in der für die Spontansedimentierung benötigten langen Zeit erheblich veränderten. Der von SCHÖNENBERG (1949) gemachte Vorschlag, die Liquorzellen einfach auf einen ins Reagensglas gestellten halbierten Objektträger absedimentieren zu lassen, bewährte sich hinsichtlich der guten Darstellbarkeit der Zellen; das Verfahren hatte allerdings den großen Nachteil, daß nur ein äußerst geringer Teil der zelligen Liquorbestandteile erfaßt werden konnte. Den größten Fortschritt brachte zweifellos das Sedimentierkammerv Verfahren von SAYK (1954), das den schädigenden Einfluß des Zentrifugierens durch einfaches Absinkenlassen der Zellen umgeht und die Dauer der Spontansedimentierung durch Absaugen der Flüssigkeit über Filtrierpapier verkürzt. Die Methode erbringt ein dem Blutbild vergleichbares Liquorzellbild, sie hat nur den Nachteil der unvollständigen Erfassung der im Liquor enthaltenen Zellen; denn ein beachtlicher Teil derselben (bis zu 40%) bleibt am Filtrierpapier haften und geht für die Untersuchung verloren.

Auf die *Filtrationsverfahren*, deren methodische Entwicklung noch nicht als abgeschlossen gelten kann, soll hier nicht näher eingegangen werden. Die bisher mit diesen Verfahren gewonnenen Ergebnisse sind ebenfalls — besonders bezüglich der Darstellung der Zellstruktur — noch unbefriedigend.

Die Nachteile der bisher verwendeten Methoden liegen somit einmal in der mit ihrer Durchführung verbundenen Gefahr der Zellschädigung und zum anderen in der unvollständigen zahlenmäßigen Erfassung der Liquorzellen.

## II. Methodische Voraussetzungen für ein neues Verfahren zur Darstellung von Liquorzellen

An ein im Rahmen klinischer Diagnostik zur Darstellung von Liquorzellen routinemäßig anwendbares Verfahren wird man folgende Anforderungen stellen müssen:

1. Das Liquorzellbild muß hinsichtlich der Zelldarstellung dem Blutausschrieb vergleichbar sein.
2. Die in der Liquorprobe enthaltenen zelligen Elemente müssen möglichst vollständig erfaßt werden können.
3. Das Verfahren muß ohne großen apparativen Aufwand rasch und einfach durchführbar sein.

Da es uns nicht aussichtsreich erschien, auf den bisher beschrittenen methodischen Wegen zu einem neuen Verfahren zu gelangen, das den gestellten Anforderungen gerecht würde, suchten wir ein ganz andersartiges methodisches Prinzip zu verwirklichen. Wir gingen dabei von der Vorstellung aus, daß es gelingen müsse, die geformten Bestandteile des Liquors mit einem feinen Netz zu umfassen und einzufangen, während die Flüssigkeit abfließt. Als Modell diente uns der sichtbare Vorgang der Blutgerinnung in vitro mit der nachfolgenden Retraktion des Blutkuchens. Gelänge es, die Liquorzellen auf ähnliche Weise mit einem „physiologischen“ Netz einzufangen, so wäre damit nicht nur die Gewähr für eine schädigungsfreie Anreicherung der Liquorzellen, sondern auch die Aussicht auf eine

vollständige Erfassung derselben gegeben. Die Anfärbung der Zellen könnte dann, nach Übertragung des Netzes auf einen Objektträger, leicht vorgenommen werden.

Die Herstellung eines Fibringerinnsels in einer Liquorprobe bietet grundsätzlich keine Schwierigkeiten: Versetzt man den Liquor mit gereinigter Fibrinogenlösung und gibt dann eine kleine Menge Thrombin zu, so tritt infolge Ausbildung eines Fibrinnetzwerkes Gerinnung ein. Eine andere Frage ist, ob das Gerinnsel die erforderliche Konsistenz besitzt, um als mikroskopisches Präparat zur Darstellung der in ihm enthaltenen Zellen verwendet werden zu können.

Die physikalischen Eigenschaften eines Gerinnsels sind von der Fibrinogenkonzentration, vom  $p_H$  und der Ionenstärke des Substrates, von der Thrombinkonzentration sowie von der Temperatur und der Geschwindigkeit der Gerinnung abhängig. Im Milieu des normalen Liquors ist ein Gerinnsel, das bei hoher Fibrinogenkonzentration zustande gekommen ist, derb-gallertig und kompakt, ein bei kleiner Fibrinogenkonzentration entstandenes dagegen zart und leicht zerreißbar. In beiden Fällen eignen sich die Gerinnsel nicht für den beabsichtigten Zweck: Das derb-gallertige, trübe, feinmaschige und wenig elastische Gerinnsel fängt zwar die Liquorzellen ein, hält aber auch die Flüssigkeit in den Intermizellarräumen so fest umschlossen, daß es nach Überführung auf einen Objektträger bei dem dann erforderlichen mechanischen Auspressen zerreißt bzw. nach Wegnahme des zweiten, komprimierenden Objektträgers zusammenklumpt. — Das zarte, durchscheinende, grobmaschige und elastische Gerinnsel dagegen sintert schon im Reagensglas bei kleinen Erschütterungen des Röhrchens zusammen, enthält nur einen Teil der in der Probe vorhandenen Zellen und zerreißt unvermeidlich bei dem Ausprevorgang auf dem Objektträger. — Bei mittleren Fibrinogenkonzentrationen wird der beabsichtigte Zweck ebenfalls nicht erreicht, weil sich in dem Bereich des Konzentrationsüberganges die beschriebenen Nachteile addieren. Als ideal wäre die Gerinnselkonsistenz erst dann anzusprechen, wenn sich die elastischen Eigenschaften des zarten Gerinnsels (niedrige Fibrinogenkonzentration) mit der feinmaschigen Netzstruktur des derb-gallertigen (hohe Fibrinogenkonzentration) vereinigen ließen.

Die Konsistenz eines Gerinnsels, das in einem gereinigten System zustande kommt, kann außer durch die genannten Faktoren noch durch Calciumionen beeinflusst werden (FERRY u. MORRISON 1947). Diese führen in ausreichender Konzentration zur Entstehung eines feinmaschigen und elastischen Gerinnsels mit vermindertem Retraktionsvermögen.

Bei geeigneter Wahl der Konzentrationen des Fibrinogens, der Calciumionen und des Thrombins läßt sich in einer Liquorprobe ein Fibringerinnsel erzeugen, das die für den „Zellenfang“ notwendigen physikalischen Eigenschaften aufweist: sein Faserwerk ist fein genug, um ein Abfangen sämtlicher Zellen der Liquorprobe zu gewährleisten und nach der Anfärbung auf dem Objektträger bei der mikroskopischen Durchsicht nicht störend in Erscheinung zu treten; seine Zerreißfestigkeit ist groß genug, um der mechanischen Beanspruchung gewachsen zu sein, die mit seiner Überführung auf einen Objektträger und dem nachfolgenden Auspressungsvorgang verbunden ist. Die zweckmäßigen Endkonzentrationen der dem Liquor zugesetzten Substanzen ermittelten wir für Fibrinogen zu ca. 160 mg-%, für Calciumionen zu ca. 2,2 mg-% und für Thrombin zu ca. 6 E/ml.

Für die angegebene niedrige  $Ca^{++}$ -Konzentration ist Voraussetzung, daß die Calciumionen (in entsprechend höherer Konzentration) schon in der Lösung enthalten sind, mit der das Fibrinogen-Trockenpräparat gelöst wird. Bei pathologisch verändertem Liquor liegt das Optimum der Calciumkonzentration bei etwas tieferen oder höheren Werten. Mit der angegebenen Konzentration ist die Methode jedoch stets durchführbar.

### III. Beschreibung der Methode („Zellenfangverfahren“)

#### 1. Einfangen der Zellen

Zu 1,5 ml\* frisch entnommenem Liquor werden 0,6–0,8 ml einer 0,6%igen calciumhaltigen Fibrinogenlösung in ein mit Äther gut gesäubertes Reagensglas gegeben, das in einem Wasserbad von 37° C steht.

Zur Herstellung der Fibrinogenlösung werden 60 mg Rinderfibrinogen (Behring-Werke) in 10 ml einer 0,9%igen Kochsalzlösung, enthaltend 30 mg-%  $\text{CaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ , gelöst. Man überschichtet zunächst das Fibrinogen mit 5 ml der  $\text{NaCl-CaCl}_2$ -Lösung und läßt das Röhrchen — ohne zu schütteln — 5 min bei 37° C stehen. Dann gibt man weitere 5 ml des Lösungsmittels hinzu und entfernt nach etwa 10 min den Rest des nicht in Lösung gegangenen Fibrinogens mit einem Glasstab. Es ist sorgfältig darauf zu achten, daß die Fibrinogenlösung nicht mit Glasmaterial in Berührung gebracht wird, das mit Thrombin verunreinigt ist.

Durch Zugabe von 0,1 ml Thrombinlösung (Thrombinum purum Behring-Werke, 30 E, gelöst in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung) zu dem Liquor-Fibrinogen-Gemisch wird Gerinnung ausgelöst. Zur besseren Durchmischung wird das Reagensglas unmittelbar nach dem Zupipettieren der Thrombinlösung kurzzeitig (ca. 3 sec) aus dem Wasserbad herausgenommen und einige Male geschwenkt.

Schaumbildung ist dabei unbedingt zu vermeiden. Während der dann folgenden 15–30 sec soll das Röhrchen nicht bewegt werden, da andernfalls die Ausbildung des Fibrinnetzwerks gestört würde. 15–30 sec nach der Thrombinzugabe beginnt die sichtbare Entstehung eines sehr zarten Gerinnsels, das zunächst die ganze Liquorprobe ausfüllt und sich durch nun folgendes gleichmäßiges Drehen des Röhrchens in kurzer Zeit zu einem am Flüssigkeitsspiegel hängenden frei flottierenden, ballonähnlichen Fibrinnetz ausbildet (Abb. 1). Haftet das Netz an einer Stelle des Röhrchens an, so genügen einzelne etwas abruptere Drehbewegungen, um seine Ablösung von der Glaswand herbeizuführen.

Eine wesentliche methodische Erleichterung wäre von der Verwendung genormter, eigens für das Verfahren hergestellter Fibrinogen-, Thrombin- und Lösungs-

\* Es eignen sich Liquormengen von 1–3 ml. Fibrinogenlösung und Thrombinlösung sind stets in gleichbleibenden Mengenverhältnissen zuzusetzen.

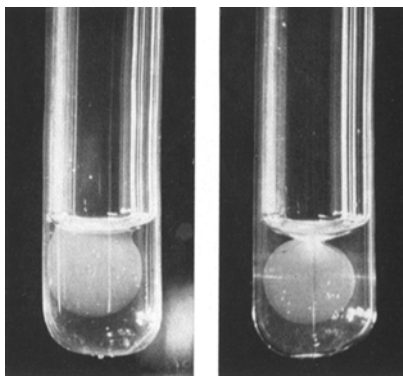


Abb. 1. Künstlich erzeugtes feinmaschiges Fibringerinnsel in einer Liquorprobe 1,5 min nach Zugabe der Thrombinlösung; a) nach langsamem, b) nach raschem Drehen des Röhrchens um seine Längsachse. (Die abgebildeten Gerinnsel wurden zwecks besserer bildlicher Wiedergabe in einem Liquor von mittlerem Eiweißgehalt erzeugt. Ein in normalem Liquor entstandenes Gerinnsel ist noch zarter und durchscheinender und neigt weniger zur Retraktion)

mittelmengen zu erwarten. Bis zu deren Bereitstellung wird man sich mit den zur Zeit im Handel befindlichen Substanzmengen behelfen müssen.

## 2. Fertigung des Präparates

1,5 min nach der Thrombinzugabe wird der Röhrcheninhalt auf einen horizontal liegenden Objektträger (Kontrolle mittels Wasserwaage) vorsichtig entleert, so daß das Gerinnsel auf die Mitte des Objektträgers zu liegen kommt (Abb. 2). Zur Vereinfachung dieser Manipulation bedienen wir uns einer selbst hergestellten, durch 3 Stellschrauben justierbaren Bank, die mit einem Plexiglasrähmchen ausgestattet ist, in das der

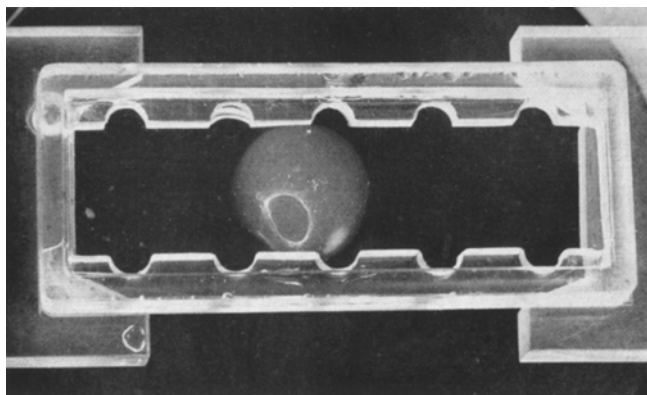


Abb. 2. Fibrinnetz auf dem justierten Objektträger. — (Die aus dem Gerinnsel ausgetretene Flüssigkeit ist zum größten Teil am Objektträgerrand abgelaufen)

Objektträger lose eingelegt wird (Abb. 3). Unmittelbar nach dem Aufbringen auf den Objektträger hat das Gerinnsel noch eine quallenähnliche Form. Während der folgenden 5 min tritt ein Teil der Flüssigkeit spontan aus dem Gerinnsel aus, wobei dieses sich abflacht und an seiner der Luft ausgesetzten Oberfläche klebriger wird. Dann wird ein zweiter, mit Siliconöl vorbehandelter (Beschreibung siehe unten) Objektträger mit seiner siliconierten Fläche schonend auf den ersten — bzw. auf das Gerinnsel — gelegt.

Zweckmäßigerweise legt man zuerst eine Schmalkante des Objektträgers auf und läßt die gegenüberliegende Kante auf ein seitlich untergeschobenes Stäbchen gleiten, das man nach der Seite wegzieht, wenn der Objektträger mit dem Gerinnsel in Berührung gekommen ist. Auf diese Weise wird jede störende Luftblasenbildung in der Nähe des Gerinnsels vermieden.

Der aufgelegte Objektträger drückt nun durch seine Eigenschwere weitere Flüssigkeit aus dem Gerinnsel aus. Der Siliconüberzug verhindert die Ausbildung einer wäßrigen Schicht zwischen Gerinnsel und Objektträger. Die klebrige Oberseite des Gerinnsels haftet daher der siliconierten Fläche des aufgelegten Objektträgers an. Wenn sich die auslaufende

Flüssigkeit in dem capillaren Spalt zwischen beiden Objektträgern gleichmäßig verteilt hat, werden die aufeinanderliegenden Objektträger aus dem Plexiglasrahmen herausgenommen und ohne Druck vorsichtig gegeneinander verschoben. Dabei bleibt das jetzt flächig ausgebreitete kreisrunde bis ovale Fibrinnetz in seiner ganzen Ausdehnung an dem silikonierten Objektträger haften. Das fertige Präparat läßt man ca. 10 min zum Austrocknen an der Luft auf einer Färbebank liegen.

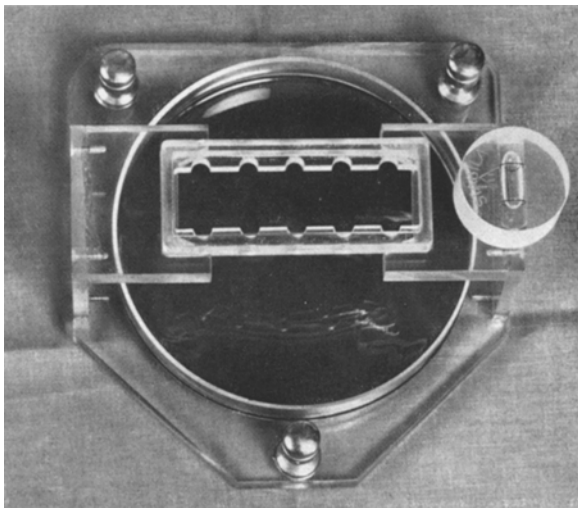


Abb. 3. Plexiglasbank mit auswechselbarem Rahmen zur Aufnahme des Objektträgers. — Der Rahmen wird unter Kontrolle der Wasserwaage mittels der 3 Stellschrauben an der Fußplatte der Bank genau horizontal einjustiert

*Siliconieren der Objektträger.* — Auf der gereinigten Fläche eines neuen Objektträgers werden einige Tropfen eines Siliconöles (wir verwendeten General Electric Dri Film SC 87; Bezugsfirma E. Scheller & Cie., Zürich) kräftig verrieben und die Fläche mit einem weichen Lappen nachpoliert. Die so behandelten Objektträger werden dann 1 Std. in einem Trockenschrank (100—200°C) gelagert, anschließend für 5 min in eine Schale mit 1:5 verdünntem Ammoniak gebracht, mit Aqua. dest. abgespült und 10—15 min in Aqua. dest. gewässert. Zum rascheren Trocknen bringt man die siliconierten Objektträger zweckmäßigerweise wieder für kurze Zeit in einen Trockenschrank. Die nicht behandelte Objektträgerfläche wird mit einem Fettstift kenntlich gemacht. Zur Vermeidung von Verunreinigungen des Siliconüberszuges müssen die Objektträger staubfrei aufbewahrt werden. Einmal siliconierte Objektträger dürfen für die hier beschriebene Methode nicht mehr als Normalobjektträger verwendet werden. Es empfiehlt sich daher, sie entweder zu verwerfen, oder sie nach der Säuberung gesondert aufzuheben.

### 3. Fixieren und Färben des Präparates

Um eine Schädigung der Zellen durch Austrocknen zu vermeiden, sollen Fixierung und Färbung schon nach den ersten Anzeichen des

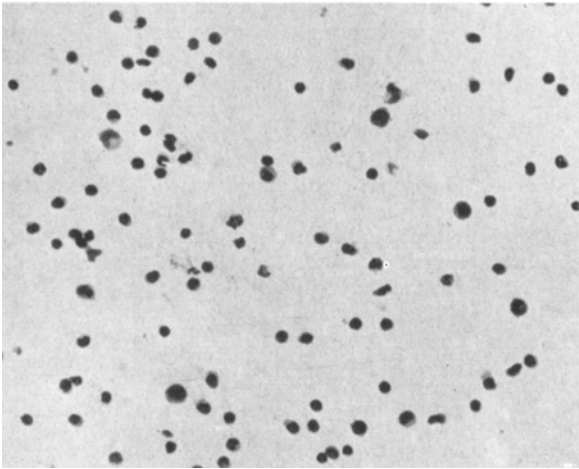


Abb. 4

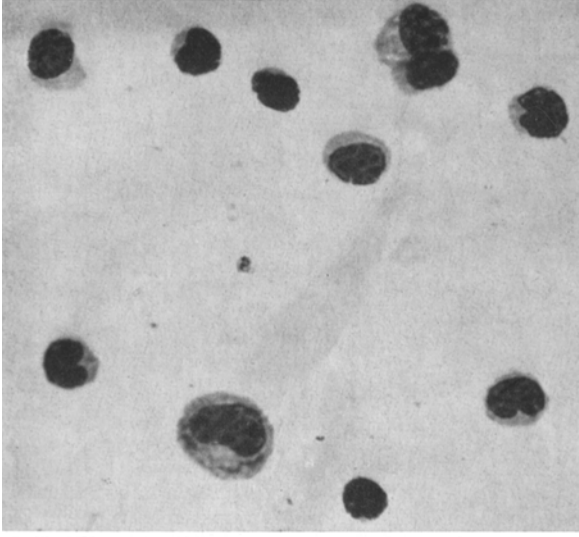


Abb. 5

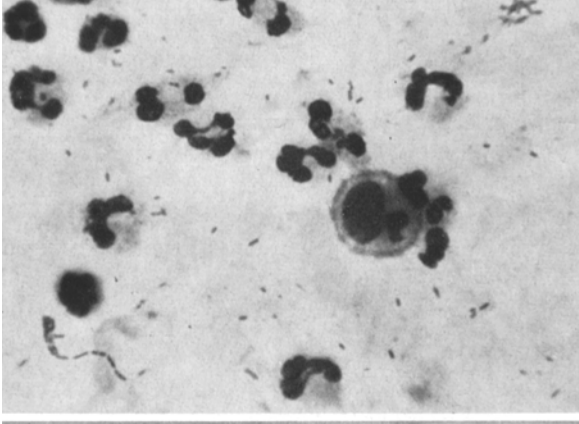


Abb. 6

Abb. 4. Zellbild bei einer abakteriellen (Virus-?) Meningitis. (216/3. Zellen). (Der Netzhintergrund ist im Übersichtsbild kaum sichtbar)

Abb. 5. Zellbild bei einer abakteriellen (Virus-?) Meningitis. (216/3. Zellen). Ausschnitt aus dem Präparat der Abb. 4. MG. G.-Färbung

Abb. 6. Zellbild bei einer Pneumokokkenmeningitis (618/3. Zellen). Phagocytäre Reaktion. MG. G.-Färbung

Antrocknens, d.i. ca. 10 min nach Fertigung des Präparates, vorgenommen werden. Es kommen alle üblichen Färbemethoden in Betracht. Wir bedienten uns, um einen Vergleich mit Blutausstrich-Präparaten anstellen zu können, vor allem der Färbung nach GIEMSA-MAY-GRÜNWALD in folgender Modifikation:

Fixierung mit alkoholischer May-Grünwald-Lösung: 3 min. Nach Zusatz der gleichen Menge Aqua. bidest. noch 1 min färben. Abgießen. Nachfärben mit 1:10 verdünnter Giemsa-Lösung: 12 min. — Zur Erzielung einer einwandfreien Zelldarstellung müssen Fixierung und Färbung sehr sorgfältig durchgeführt werden. So soll das Aufbringen der Lösungen auf den Objektträger vom Rande her und tropfenweise erfolgen, um ein Abhebern des Fibrinnetzes von der Unterlage zu verhüten. Die Farblösungen, vor allem die alkoholische May-Grünwald-Lösung, sollen durch Filtrierpapier aufgegossen werden. Für das Abspülen empfiehlt sich die Verwendung von einwandfreiem Aqua. bidest.

Die vorausgegangene detaillierte Beschreibung könnte die Einfachheit des Verfahrens verdecken, weshalb das Vorgehen noch einmal kurz *zusammengefaßt* sei:

Die zu untersuchende Liquorprobe wird im Verhältnis 3,6:1 mit 0,6%iger Fibrinogenlösung versetzt, welche Kochsalz in isotonischer Konzentration sowie 0,03% Calciumchlorid enthält. Durch Zugabe von Thrombinlösung wird bei 37°C die Ausbildung eines zarten Gerinnsels bewirkt, das 1,5 min nach der Thrombinzugabe auf die Mitte eines horizontal liegenden Objektträgers gegossen wird. Nach weiteren 5 min legt man einen zweiten, mit einem Siliconüberzug versehenen Objektträger auf, der im Verlauf von ca. 1 min das Gerinnsel zu einem Film zusammendrückt. Die beiden Objektträger werden durch seitliches Verschieben voneinander abgelöst, wobei das Fibrinnetz an dem siliconierten Objektträger haften bleibt. Die Färbung des Präparates erfolgt nach kurzem Antrocknen auf übliche Weise.

Die Abb. 4—8 mikroskopischer Präparate sollen die Leistungsfähigkeit der Methode hinsichtlich der einwandfreien Zelldarstellung demonstrieren.

#### IV. Kritische Besprechung des Zellenfangverfahrens

Erfüllt das beschriebene Verfahren tatsächlich die eingangs genannten Forderungen bezüglich der Zelldarstellung, der vollständigen Erfassung der Liquorzellen und der Verwendbarkeit als Routinemethode?

a) Die *Zelldarstellung* in unseren Präparaten ist einwandfrei und qualitativ mit derjenigen in Blutausstrich-Präparaten durchaus vergleichbar. Die Zellen kommen in allen Einzelheiten gut zur Darstellung: Kern und Cytoplasma sind voneinander abgegrenzt, man erkennt die Chromatinstruktur des Kernes und die Granula im Cytoplasma. Bei Verwendung von Liquor ein und desselben Patienten zur Herstellung mehrerer Präparate zeigt sich die einwandfreie Reproduzierbarkeit der



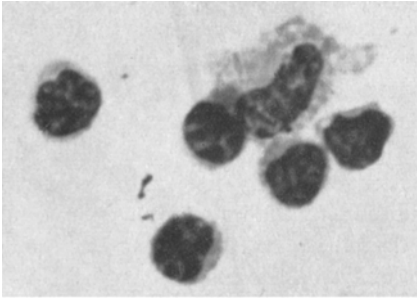
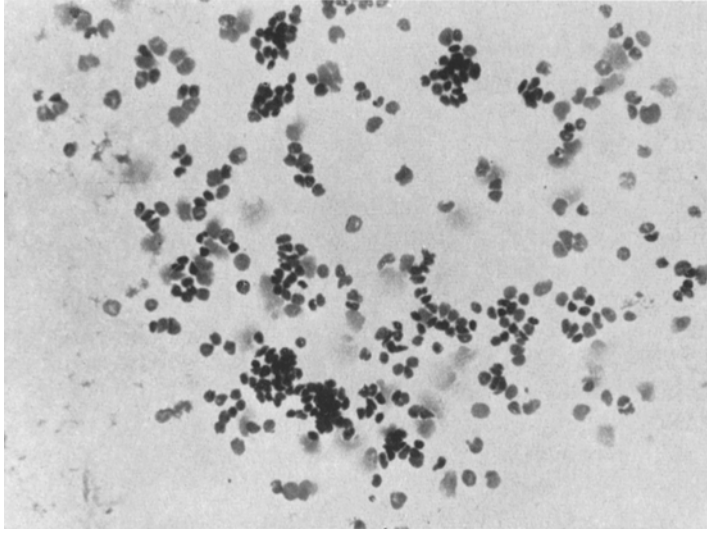


Abb. 7

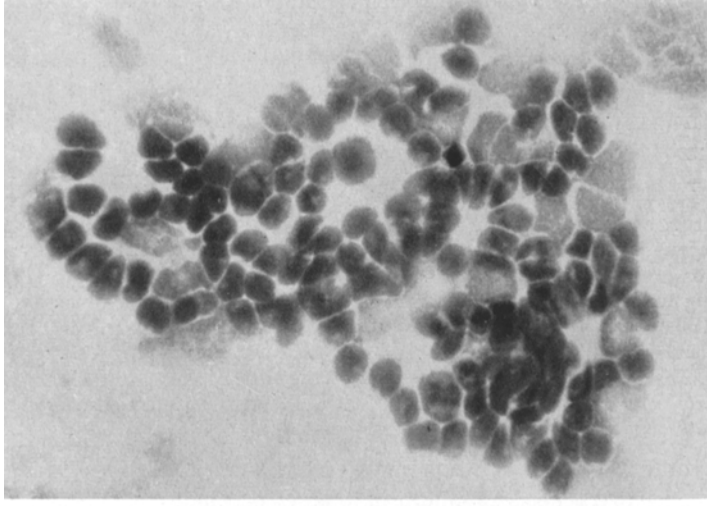
Abb. 7. Tumorploicytose. (Gliom re. parietal - 32/3. Zellen)

M.G.G.-Färbung

Abb. 8. Medulloblastom. a Übersichtsbild; b Tumorzellverband. M.G.G.-Färbung



a



b

Abb. 8

Ergebnisse. Eine mechanische oder chemische Schädigung der sehr empfindlichen Liquorzellen, wie sie bei Anwendung früherer Verfahren der Liquorzellgewinnung (Zentrifugieren, Förderung der Sedimentation durch Eiweißausfällung) in Kauf genommen werden mußte, wird durch die hier beschriebene Methode vermieden. Auch der durch längeres Stehen des Liquors bedingte zellschädigende Einfluß, der selbst bei den neueren Sedimentationsverfahren noch eine ziemlich große Rolle spielt, fällt weg. Für das Einfangen der Zellen und für die Fertigung des Präparates werden bei unserem Verfahren insgesamt etwa 10 Minuten benötigt. Die „Einbettung“ der Liquorzellen in ein elastisches Netzwerk aus biologischem Material bedeutet keine Schädigung; sie gewährleistet im Gegenteil die größtmögliche Schonung der Zellen.

b) Die *vollständige Erfassung* aller in der Liquorprobe enthaltenen Zellen wird mit der „Zellenfangmethode“ tatsächlich erreicht. Das feinmaschige Fibrinnetz gibt die eingeschlossenen Zellen auch während des Flüssigkeitsaustritts aus dem Gerinnsel nicht mehr ab. Der Vergleich zwischen der auf übliche Weise ermittelten Zellzahl mit der Zahl der im Präparat nachweisbaren Liquorzellen zeigt eine weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse. Die bei den Liquorproben mit „niedrigen Zellzahlen“ gefundenen Unterschiede scheinen durch die relativ große Fehlerbreite unserer üblichen Zählverfahren bedingt zu sein. Die exakte Auszählung der Zellen in einer größeren Liquormenge, wie sie bei unserem Verfahren verwendet wird, dürfte — u. U. methodisch ausnutzbar — genauere Werte ergeben. In dem Flüssigkeitsrest einer Liquorprobe, der nach Herausnahme des Fibringerinnsels noch übrig bleibt, ließen sich bei wiederholter Untersuchung keine Zellen nachweisen. Nach dem Ausdrücken des zellenhaltigen Gerinnsels zwischen zwei Objektträgern, dem schonenden Antrocknenlassen der Objektträgerflächen sowie anschließender Fixierung und Anfärbung derselben fanden wir Zellen nur im Fibrinnetz, nicht in seiner Umgebung oder am gegenüberliegenden Objektträger.

c) Die *Handhabung der Methode* ist einfach. Das Zupipettieren von Fibrinogen- bzw. Thrombinlösung zum Liquor, das Drehen des Reagensglases bei Beobachtung der Gerinnselbildung, das Justieren des Objektträgers erfordern keine besondere manuelle Geschicklichkeit. Das richtige Ausgießen des Röhrcheninhalts und das Auflegen eines siliconierten Objektträgers sowie die vorbereitende Siliconierung derselben dürften nach kurzem Einüben ebenfalls leicht gelingen. Das Abziehen der beiden Objektträger voneinander mag eine gewisse Fingerfertigkeit voraussetzen, doch überschreitet diese kaum den Geschicklichkeitsgrad, den man z. B. für das Andrücken eines Glasplättchens an eine Zählkammer benötigt. Ein kurzzeitiges Einüben in die Methode sei trotzdem empfohlen. Hierzu kann an Stelle von Liquor Michaelis-Puffer oder physiologische Kochsalzlösung verwendet werden.

Der mögliche *Einwand*, die Struktur des Fibrinnetzes könne bei der mikroskopischen Betrachtung stören, trifft nicht zu. Das leicht angefärbte Netz ist im mikroskopischen Übersichtsbild wohl erkennbar, wirkt aber nicht störend; es wird überdies bei Verwendung der für die Differenzierung der Zellen erforderlichen Vergrößerung überstrahlt und ist dann kaum oder gar nicht mehr sichtbar.

Durch den Zusatz von Fibrinogen und Thrombin wird keine Schädigung der Zellen verursacht. Das Fibrinnetz schützt diese vielmehr vor zu rascher Austrocknung.

### Zusammenfassung

Es wird über ein Verfahren zur vollständigen Erfassung der im Liquor cerebrospinalis enthaltenen zelligen Bestandteile berichtet, bei dem die Zellen mit Hilfe eines in der zu untersuchenden Liquorprobe erzeugten Fibrinnetzes eingefangen werden („Zellenfangverfahren“).

Die Methode unterscheidet sich prinzipiell von den bisher verwendeten Sedimentations- und Filtrationsverfahren. Man erzielt mit ihr auf einfachstem Wege eine optimale, qualitativ dem Blutausschlag vergleichbare Darstellung der Liquorzellen sowie deren vollständige Erfassung.

Wägt man Vor- und Nachteile der in der Liquorzell Diagnostik gebräuchlichen Methoden gegeneinander ab, so dürfte das neue Verfahren gegenüber den bisher verwendeten größere Vorteile bieten und für die routinemäßige Untersuchung des Liquorzellbildes besonders geeignet sein.

### Literatur

- ALZHEIMER, A.: Zbl. Nervenheilk. **30**, 449 (1907); zit. nach SAYK.  
 EINSTEIN, E.: Über eine Methode zur Zellgewinnung. Z. Zellforsch. **13**, 540 (1931).  
 FERRY, J. D., and P. H. MORRISON: Preparation and properties of serum and plasma proteins. VII. The conversion of human fibrinogen to fibrin under various conditions. J. Amer. chem. Soc. **69**, 388 (1947).  
 FISCHER, O.: Klinische und anatomische Beiträge zur Frage nach den Ursachen der Bedeutung der cerebrospinalen Pleozytose. Jb. Psychiat. Neurol. **27**, 313 (1956).  
 FORSTER, E.: Die Bedeutung des Liquorzellbildes für die Diagnostik der Tumoren des zentralen Nervensystems und die vom Plexus und Meningen ausgehenden Tumoren. Z. ges. Neurol. Psychiat. **126**, 683 (1930).  
 HASCHE, E.: Der Nachweis von Tumorzellen im Liquor cerebro-spinalis als diagnostisches Hilfsmittel im Rahmen der Tumordiagnostik. Psychiat. Neurol. med. Psychol. (Lpz.) **2**, 9 (1950).  
 JESSEN, H.: Zahl und Zählung der zelligen Elemente in der Spinalflüssigkeit. Z. ges. Neurol. Psychiat. **159**, 82 (1937).  
 JUNKER, F.: Die Zellen des Liquor cerebrospinalis im Phasenkontrastmikroskop. Dtsch. Z. Nervenheilk. **166**, 237 (1951).  
 KAFKA, V.: Mschr. Psychiat. Neurol. **27**, 414 (1910); zit. nach SAYK.

- NEUBERGER, F.: Über die Anfertigung und Verwertbarkeit von Liquor-Trocken-Präparaten. *Mshr. Ohrenheilk.* **83**, 97 (1949).
- NISSL, F.: *Zbl. Nervenheilk.* **15**, 255 (1904); zit. nach SAYK.
- OSTERTAG, B.: Die diagnostische Auswertung des Liquorzellbildes und dessen Gewinnung mittels neuer Methoden. *Klin. Wschr.* **1932**, 862.
- PLATT, W. R.: Diagnose von Veränderungen des zentralen Nervensystems aus abschilfernden Zellen. *Arch. Neurol. Psychiat. (Chic.)* **66**, 119 (1951).
- PLAUT, REHM u. SCHOTTMÜLLER: 1913; zit. nach SAYK.
- RAVAUT, G.: (1906); zit. nach SAYK.
- , J. WIDAL et L. SICARD: Zur Cytodiagnostik der Tabes. *Rev. neurol.* **6**, 289 (1903).
- REHM, O.: *Atlas der Cerebrospinalflüssigkeit*. Jena: Fischer 1932.
- Die epidemische Kinderlähmung. (Beitrag aus d. Pathologie d. Liquors) *Klin. Wschr.* **1934**, 13.
- RÖDER, F., u. O. REHM: *Die Cerebrospinalflüssigkeit*. Berlin: Springer 1942.
- SAYK, J.: Ergebnisse neuer liquorecytologischer Untersuchungen mit dem Sedimentkammerverfahren. *Ärztl. Wschr.* **1954**, 1042.
- Fortschritte der Liquorecytologie bei der Diagnostik bösartiger Hirngeschwülste. *Psychiat. Neurol. med. Psychol. (Lpz.)* **10**, 100 (1958).
- *Cytologie der Cerebrospinalflüssigkeit*. Jena: VEB. Gustav Fischer 1960.
- SCHALTENBRAND, G., u. H. WOLFF: *Die Produktion und Zirkulation des Liquors und ihre Störungen*. Hdb. d. Neurochirurgie Bd. I./I., S. 91. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1959.
- SCHELLER, H.: Liquorbefunde bei Hirntumoren. *Mshr. Psychiat. Neurol.* **95**, 257 (1937).
- Neuere Ergebnisse der Liquorforschung. *Nervenarzt* **10**, 132 (1937).
- SCHÖNENBERG, H.: *Dtsch. med. Wschr.* **1949**, 881.
- Über das Liquorzellbild bei der idiopathischen monocytären Meningitis. *Z. Kinderheilk.* **69**, 274 (1951).
- SIMON, G., u. R. STEGER: Die Bedeutung der Tumorzell Diagnostik für die Neurochirurgie. *Jahresversammlung der deutsch. Neurochirurg. Gesellschaft* 1960.

Priv. Doz. Dr. G. SIMON,  
Neurochirurg. Abt. d. Universität, Luitpoldkrankenhaus

Priv. Doz. Dr. H. SCHRÖER,  
Physiolog. Institut der Universität, Röntgenring 9  
87 Würzburg