

Aus der Neurochirurgischen Universitätsklinik Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. T. RIECHERT)

Eine einfache Methode zur Untersuchung der zellulären Bestandteile der Cerebrospinalflüssigkeit

Von
EBERHARD METZEL

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. März 1963)

Die Forderung nach einer Liquorzelldiagnostik wurde schon seit der Jahrhundertwende gestellt. Die Ergebnisse sind in der klinischen Praxis bis heute jedoch wenig befriedigend. Verschiedene Methoden wurden ausgearbeitet und — entsprechend der allgemeinen technischen Entwicklung modifiziert und verbessert. Der Anreicherung der Zellen in zellarmen Liquores — dem Hauptproblem — stand die Anfälligkeit der normalen und pathologischen Zellelemente entgegen. Diese Schwierigkeiten zu meistern, ist Bestreben der einzelnen Darstellungsmethoden.

Als einfaches Verfahren der Zellanreicherung bot sich das Zentrifugieren des Liquors und Ausbreiten des Rückstandes auf dem Objektträger an. Diese Methode wurde von RAVAUT, WIDAL u. SICARD angegeben, von NISSL in Deutschland eingeführt und von zahlreichen Autoren modifiziert. Ihr praktischer Wert ist gering wegen der ungleichmäßigen Färbbarkeit und häufigen Zellschädigung (SAYK). Völlig unzureichende Ergebnisse brachte die Sedimentierung, wie sie RAVAUT durch einfaches Stehenlassen des Liquors versuchte. Die empfindlichsten Zellarten zerfallen hierbei. Eine logische Fortsetzung dieser Methoden ist die Sedimentkammermethode von SAYK, die gute Ergebnisse erbringt. Ebenfalls gute Ergebnisse mit der Liquorsedimentierung hatte in letzter Zeit BISCHOFF (1960). Das Verfahren von ALZHEIMER hat sich wegen seines Zeitaufwandes nicht recht einbürgern können. Es beruht auf einem Zellfang in einem Eiweißniederschlag und Sedimentieren. Das Sediment mit dem Eiweißniederschlag wird dann wie ein histologisches Präparat eingebettet und geschnitten. Auf einer Ammoniumsulfatfällung und Ausbreitung des Sedimentes auf einem Objektträger beruht die Methode von OSTERTAG (1932) und EINSTEIN. Sie führt erhebliche Veränderungen der Zellen herbei und birgt die Gefahr erheblicher Kunstprodukte in sich. Bei relativ zellreichen Liquores bringt die Objektträgermethode nach SCHÖNENBERG (1951) ausreichende Ergebnisse. Allerdings besteht durch mehrstündigem Stehenlassen des Objektträgers im Liquor die Gefahr der Zellauflösung. In letzter Zeit hat SIMON über ein neues Zellfangverfahren berichtet; mit Hilfe eines feinen Fibrinnetzes werden die Zellen gefangen und auf einem Objektträger ausgebreitet. Das Verfahren liefert ausgezeichnete Bilder.

Weitere neuere Verfahren der schonenden Zelldarstellung stammen von KALM, JUNKER (schonendes Zentrifugieren und phasenoptische Beobachtung); McCORMACK u. Mitarb. und DROPMANN (Supravitalfärbung) und von LARSON u. Mitarb. (Smearpräparate), McMENEMEY u. CUMINGS, SPRIGGS u. MARKS u. MARRACK.

Das Zelfangverfahren von SIMON und die Sedimentkammermethoden von SAYK und von BISCHOFF, die wohl die besten cytologischen Ergebnisse bringen, sind leider beide relativ zeitaufwendig. Wir wenden an unserer Klinik eine Methode an, die bei gleichguter Zelldarstellung den Vorteil der Schnelligkeit und der routinemäßigen Verwendbarkeit in sich birgt. Es handelt sich im Prinzip um eine schonende Filtration des Liquors und Auffangen der cellulären Bestandteile auf einem färbbaren Filter.

Methodik

Wir verwenden eine Bakterienfilterapparatur, wie sie von BOLL, SOOST u. MAD, WIMHÖFER, WAGNER u. SCHUNCK, METZEL u. a. für blutcytologische Untersuchungen benutzt wird. Die Anordnung ist auf

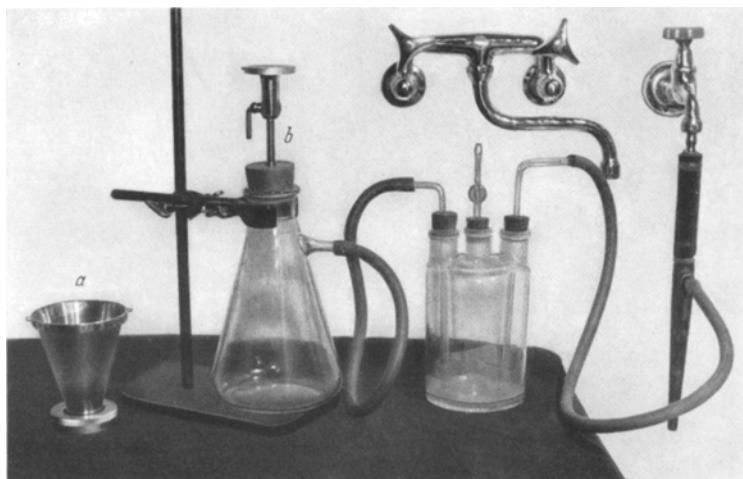


Abb. 1. Filterapparatur. *a* Trichterförmiger Aufsatz; *b* Filtertisch mit Remanitfritte für den Cellafilter mit Saugflasche

Abb. 1 ersichtlich. Für cytologische Zwecke eignen sich am besten Cellafilter der Durchlässigkeitssstufe grob. Die ungebrauchten Filter werden in 30—40%igem Alkohol aufbewahrt und dürfen nicht austrocknen. Der Filterdurchmesser beträgt normalerweise 50 mm. Für zellarme Liquores engen wir die wirksame Filterfläche erheblich ein; die genutzte Filterfläche hat dann einen \varnothing von 15—25 mm. Dies läßt sich durch eine einfache Konstruktionsänderung des Filtertrichters erreichen. Vor der Filtration wird der Filtertisch mit Fritte (eine poröse Metallunterlage für das Filterpapier) auf eine Saugflasche aufgesetzt, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist. Der Hahn des Gerätes wird geschlossen, die Fritte mit Periston getränkt, so daß eine Peristonschicht übersteht, darauf wird der Filter gelegt und der Trichter an dem Filtertisch angeschraubt.

Der frisch entnommene Liquor kann nun vorsichtig, möglichst ohne die Trichterwand zu berühren, auf das Filter aufgegossen werden. Danach wird der Hahn des Gerätes geöffnet und die Wasserstrahlpumpe in Tätigkeit gesetzt. Es ist wegen der Zellschonung wichtig, daß der Filtrationssog nur sehr gering bleibt. Kurz bevor die letzte Flüssigkeit abgesaugt ist, muß der Hahn geschlossen und die Filtration beendet werden. Bei eiweißreichen Liquores empfiehlt es sich, zunächst eine Vorfixierung mit etwa 5 ml Äther-Alkohol, 96%ig (1:1) vorzunehmen. Damit wird das Abschwimmen des Fibrinnetzes verhindert, das sich leicht



Abb. 2. Ventrikelliqor bei Glioblastoma multiforme. Tumorzellen durch Pfeil bezeichnet. Bei den großen Zellen handelt es sich um Makrophagen. May-Grünwald-Giemsa-Färbung. Vergrößerung ca. 1100fach

bildet und zahlreiche Zellen enthält. Nach 2—3 min wird der Trichter abgenommen und der Cellafilter mit zwei Pinzetten vorsichtig in Äther-Alkohol (1:1) eingebracht. Soll eine Papanicolaou-Färbung angeschlossen werden, muß mindestens 2 Std fixiert werden; für Routineuntersuchungen genügt in den meisten Fällen die May-Grünwald-Giemsa-(Pappenheim)-Färbung. Die Fixierung in Äther-Alkohol braucht dann nur 10—15 min zu betragen. Nach der Färbung müssen kurze Alkoholreihen und Xylopassagen angeschlossen werden. Danach erfolgt Halbierung der Filter und Einschluß mit Caedax oder ähnlichem. Das Deckglas sollte dann noch mit Colophonium am Objektträger befestigt werden. Das Präparat steht nach etwa 45—50 min (bei Pappenheim-Färbung)

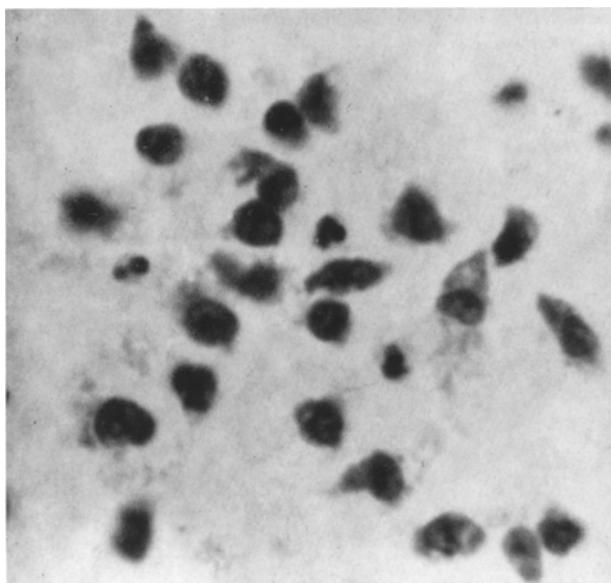


Abb.3. Ventrikelliquor bei histologisch gesichertem Ependymom. Zahlreiche Tumorzellen. May-Grünwald-Giemsa-Färbung. Vergrößerung ca. 700fach

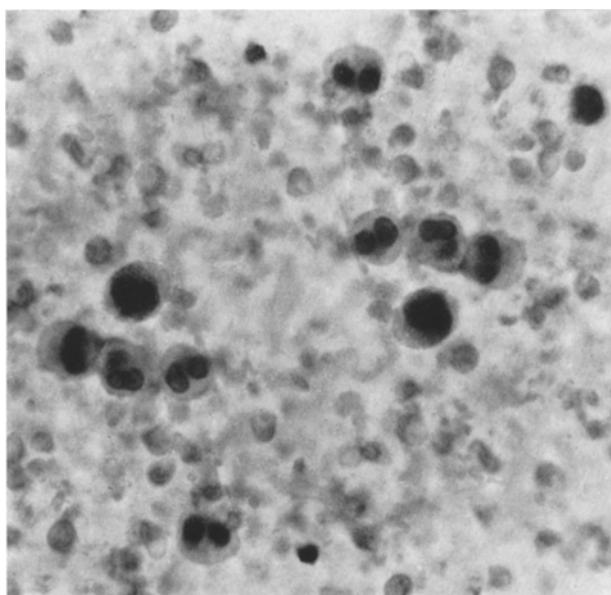


Abb.4. Ventrikelliquor nach lange liegender Drainage. Zahlreiche Leukocyten und vereinzelte Lymphocyten. Papanicolaou-Färbung. Vergrößerung ca. 800fach

dem Untersucher zur Verfügung. Die auf diese Weise gewonnenen Präparate halten sich auf Jahre hinaus und eignen sich gleich gut für die Tumorzellsuche wie auch für die Zelldifferenzierung aus sonstigen diagnostischen Erwägungen heraus. Die Abb. 2, 3 und 4 zeigen einige Beispiele aus eigenen Präparaten.

Die Methode eignet sich ebenfalls für andere zellarme Körperflüssigkeiten zu morphologischen diagnostischen Zwecken.

Ergebnisse

Um die Leistungsfähigkeit nachzuprüfen, haben wir Modellversuche mit Ascitestumoraufschwemmungen durchgeführt. Von einer Ausgangslösung wurden Verdünnungsreihen in Zehnerpotenzen angesetzt. Nach Bestimmung der Zellzahl erfolgte Beschickung eines Filters mit jeweils 2 ml der Flüssigkeit. Dabei zeigte sich, daß die vorher in der Zählkammer ermittelten Zellzahlen quantitativ auf dem Filter wiedergefunden werden. Selbst bei niedrigen Zellzahlen und kleinen Flüssigkeitsmengen lassen sich noch ausreichend Zellen auffinden, wie sie zur Diagnostik erforderlich sind.

In unserer Klinik wurden außer der experimentellen Prüfung der Leistungsfähigkeit mit dieser Methodik 21 Fälle von Hirntumoren untersucht. Hierzu einige Beispiele: Bei dem in Abb. 2 gezeigten Befund handelt es sich um ein Punktat bei einer Patientin, die wegen Tumordurchdrang trepaniert worden war. Bei der Biopsie konnte ein Tumor nicht nachgewiesen werden. Die einige Monate später vorgenommene liquorzytologische Untersuchung ergab einen sicheren Tumorzellnachweis. Die Reoperation bestätigte den cytologischen Befund; es fand sich ein Glioblastoma multiforme. Abb. 3 zeigt den Liquorbefund bei einer Patientin, bei der klinisch der Verdacht auf einen raumverdrängenden Prozeß bestand. Im Liquorpräparat fanden sich zahlreiche tumorverdächtige Zellen. Bei der Operation wurde ein typisches Ependymom entfernt, das in der Gegend des Foramen Monroi saß und Beziehung zum Seitenventrikel hatte. Über einen Fall mit einem Astrocytom bei zwei Brüdern wird demnächst ausführlich berichtet werden.

Auf Grund der geringen Fallzahl können statistische Aussagen über die Häufigkeit des Tumorzellnachweises mit dieser Methode noch nicht gemacht werden. Wir haben jedoch den Eindruck, daß die Häufigkeit des Tumorzellnachweises mit den Ergebnissen von SAYK (1960), BISCHOFF (1961) u. a. übereinstimmt.

Ein negativer cytologischer Liquorbefund schließt einen Tumor nicht sicher aus. In die klinische und operative Diagnostik eingebaut, erweist sich die cytologische Liquoruntersuchung jedoch als wertvoller Baustein.

Zusammenfassung

Es wird über eine neue Methode der Liquorzellanreicherung berichtet. Die Zellen werden auf einem Bakterienfilter aufgefangen und mit dem Filter gefärbt und eingebettet. Beschreibung der Apparatur und Demonstration einiger Bildbeispiele.

Literatur

- ALZHEIMER, A.: Einige Methoden zur Fixierung der zellulären Elemente der Cerebrospinalflüssigkeit. *Zbl. Nervenheilk.* **30**, 449—451 (1907).
- BISCHOFF, A.: Der derzeitige Stand der Liquor-Cytodiagnostik. *Schweiz. med. Wschr.* **1960**, 479—489.
- Erfahrungen mit der Tumorzelldiagnostik im Liquor cerebrospinalis. *Acta neurochir. (Wien)* **9**, 510—524 (1961).
- BOLL, J.: Tumorzellnachweis im Blut und Knochenmark. *Fortschr. Med.* **80**, 383—384 (1962).
- DROPMANN, K.: Beitrag zur Liquorzelldiagnostik. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* **178**, 131—140 (1958).
- EINSTEIN, E.: Über eine Methode zur Zellgewinnung aus zellarmen Flüssigkeiten zur histologischen Untersuchung. *Z. Zellforsch.* **13**, 540—544 (1931).
- KALM, H.: Phasenkontrastbeobachtungen an Hirngeschwülsten. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* **179**, 267—284 (1959).
- LARSON, C. P., J. T. ROBSON and C. C. REBERGER: Cytologic diagnosis of tumor cells in cerebrospinal fluid. *J. Neurosurg.* **10**, 337—341 (1953).
- MARKS, V., and D. MARRAK: Tumor cells in the cerebrospinal fluid. *J. Neurol. Psychiat.* **23**, 194—201 (1960).
- MCCORMACK, L. J., J. B. HAZARD, D. BELOVICH and W. J. GARDNER: Identification of neoplastic cells in cerebrospinal fluid by a wet-film method. *Cancer* **10**, 1293—1299 (1957).
- MCMENEMEY, W. H., and J. N. CUMINGS: The value of the examination of the cerebrospinal fluid in the diagnosis of intracranial tumors. *J. clin. Path.* **12**, 400—411 (1959).
- METZEL, E.: Familiäre Gliome (im Druck).
- , u. W. UMBACH: Der Nachweis von Hirntumorzellen im Blut. (unveröffentlicht).
- NISSL, F.: Die Bedeutung der Lumbalpunktion für die Psychiatrie. *Zbl. Nervenheilk.* **15**, 255—284 (1904).
- OSTERTAG, B.: Die diagnostische Auswertung des Liquorzellbildes und dessen Gewinnung mittels neuer Methoden. *Klin. Wschr.* **1932**, 862—864.
- Die Auswertung des Hirnpunkts und Liquorsediments bei den raumbeengenden Prozessen. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* **130**, 141—144 (1933).
- SAYK, J.: Ergebnisse neuer liquorcytologischer Untersuchungen mit dem Sedimentierkammerverfahren. *Ärzt. Wschr.* **1954**, 1042—1046.
- Cytologie der Cerebrospinalflüssigkeit. Ergebnisse vergleichender Untersuchungen. Jena 1960.
- , u. R. LEMKE: Fortschritte der Liquorcytologie bei der Diagnostik bösartiger Hirngeschwülste. *Psychiatrie* **10**, 100—105 (1955).
- SCHMIDT, R. M.: Zur derzeitigen Kenntnis über Liquorcytologie. *Ther. d. Monats* **4**, 119—124 (1962).
- SCHÖNENBERG, H.: Über das Liquorzellbild bei der idiopathischen mononukleären Meningitis. *Z. Kinderheilk.* **69**, 274—284 (1951).

- SÖNEBERG, H.: Untersuchungen über Vitalspeicherung sowie phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen über den Zerfall der Liquorzellen. *Z. Kinderheilk.* **72**, 157—180 (1952).
- Das Liquorzellbild bei den entzündlichen Erkrankungen der Meningen im Kindesalter. *Ann. paediat. (Basel)* **181**, 65—98 (1953).
- SIMON, G.: Das Zellenfangverfahren — eine neue Methode zur vollständigen Erfassung der Liquorzellen. Vortrag: Neurochirurgen-Kongreß 2.—5. 9. 1962, Bad Ischl.
- , u. H. SCHRÖER: Ein neues Verfahren zur vollständigen Erfassung der im Liquor cerebrospinalis vorhandenen Zellen (Zellenfangverfahren). Ein Beitrag zur Liquorcytologie. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* **204**, 74—85 (1963).
- SOOST, H.-J.: Über das Vorkommen von Tumorzellen im zirkulierenden Blut. *Dtsch. med. Wschr.* **1960**, 893—899.
- Über die klinische Bedeutung des Tumorzellnachweises im Blut beim Genital-Carcinom der Frau. Vortrag: III. Weltkongreß f. Gyn. u. Geburtsh. 3.—9. 9. 1961, Wien.
- , u. H. MAD: Methoden zur Isolierung von Geschwulstzellen aus dem strömenden Blut. *Krebsarzt* **15**, 273—283 (1960).
- SPRIGGS, A. J.: Malignant cells in the cerebrospinal fluid. *J. clin. Path.* **7**, 122—130 (1945).
- WIDAL, J. A., L. SICARD et P. RAVAUT: A propos du cytodiagnostic du tabes. *Rev. neurol.* **11**, 289—292, 334—336 (1903).
- WAGNER, D.: mündliche Mitteilung.
- WIMHÖFER, H., D. WAGNER u. R. SCHUNCK: Der Tumorzellnachweis im strömenden Blut während therapeutischer Maßnahmen beim Genitalkarzinom der Frau. *Zbl. Gynäk.* **85**, 10—21 (1963).

Dr. EBERHARD METZEL,
Neurochirurgische Klinik der Universität, 78 Freiburg, Hugstetter Str. 55