

Autoradiographische Befunde an Liquorzellen

Hans Wolfgang Kölmel

Neurologische Abteilung (Leiter: Prof. Dr. D. Janz) im Klinikum Charlottenburg
der Freien Universität Berlin, Spandauer Damm 130, D-1000 Berlin 19

Autoradiographic Findings in Cerebrospinal Fluid Cells

Summary. The report concerns the results of autoradiographic studies of cerebrospinal fluid cells. We investigated pleocytosis in cases of inflammatory diseases of the central nervous system, hemorrhage in the cerebrospinal fluid space, brain tumor and hemoblastosis, as well as in cases of undefined neurologic disease. Cerebrospinal fluid was incubated with tritiated thymidine. The results show that tumor cells have the highest labeling index and monocytes the lowest. Cells from primary brain tumors incorporate tritiated thymidine more rarely and less intensely than cells from cerebral metastases. Lymphocytes from inflammatory disease in infants may demonstrate a high labeling index.

Key words: H3-thymidine autoradiography – CSF cytology – Tumor cells – Lymphocytes – Monocytes.

Zusammenfassung. Über die Ergebnisse autoradiographischer Untersuchungen an Zellen im Liquor cerebrospinalis mit H3-Thymidin wird berichtet. Untersucht wurden Pleocytosen bei entzündlichen Erkrankungen des Zentralnervensystems, nach Blutungen in den Liquorraum, bei Hirntumoren und Leukosen sowie bei unklaren neurologischen Erkrankungen. Die Ergebnisse zeigen, daß Tumorzellen den höchsten, Monocyten den niedrigsten Markierungsindex aufweisen. Zellen autochthoner Hirntumoren zeigen seltener und geringer den Einbau von markiertem Thymidin, Zellen von Hirnmetastasen häufiger und intensiver. Lymphocyten entzündlicher Pleocytosen bei Kleinkindern können einen hohen Markierungsindex aufweisen.

Schlüsselwörter: H3-Thymidin-Autoradiographie – Liquorcytologie – Tumorzellen – Lymphocyten – Monocyten.

Einleitung

Die Autoradiographie hat in der Punktionscytologie seit Jahren ihren festen Platz [1, 10]. Auf der Suche nach geeigneten cytodiagnostischen Differenzierungs-

methoden bietet sich dieses Verfahren auch für die Liquorcytologie an. Entsprechende Untersuchungen wurden allerdings erst in den letzten Jahren unternommen [5, 6].

Dies ist nicht verwunderlich, denn zu den technischen Anforderungen einer Autoradiographie kommen die erfahrungsgemäß empfindlichen Liquorzellen hinzu. Die bei der Autoradiographie notwendige Inkubation bei 37°C, die im Liquormilieu durchgeführt wird, bewirkt eine außerordentliche Beanspruchung der Zellen. Optimale Präpariermethoden, welche v. a. minimale mechanische Beanspruchung der Zellen bedeuten, sind deshalb Voraussetzung für das Gelingen autoradiographischer Präparate. Es bleibt auch zu überlegen, ob die Zugabe von Kulturmedium zum Liquor [3] oder die Inkubation bei Sauerstoff-Überdruck [4] die Vitalität der Zellen anregen bzw. verlängern oder eher In-vivo-Bedingungen herstellen und ob damit das Markierungsergebnis bzw. der Einblick in die tatsächliche Umsatzrate der Zellen verbessert werden.

Nach Darstellung der von uns verwendeten Methode soll ein Überblick über die ersten Ergebnisse gegeben werden.

Material und Methode

Autoradiographische Untersuchungen wurden an 162 Liquorproben von 65 Patienten durchgeführt. Es handelte sich um entzündliche Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS), um Blutungen in den Subarachnoidalraum, um Hirntumoren, Haemoblastosen und um unklare neurologische Krankheitsbilder mit einer Liquorpleocytose. In jedem Fall wurden zunächst

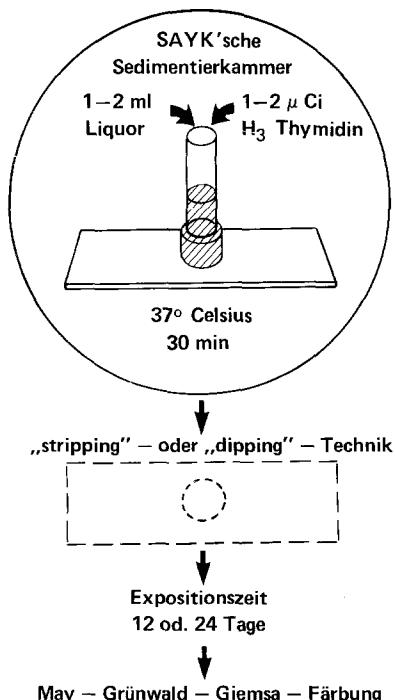


Abb. 1. Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte bei der Autoradiographie an Liquorzellen

einfache Zellsedimente mit der Cytozentrifuge oder mit der spontanen Sedimentation in der Saykschen Kammer [9] angefertigt, nach Pappenheim oder nach Papanicolaou gefärbt und üblicherweise ausgewertet. Weitere Liquorportionen wurden für die Autoradiographie verwendet. Als geeignete Markierungssubstanz kam Tritium-markiertes Thymidin in Frage. 1 bis 2 ml Liquor wurden mit 1 bis 2 μ Ci H3-Thymidin (spezifische Aktivität 5,6 Ci/mMol) in vitro inkubiert [1]. Die Inkubation erfolgte bei 37°C direkt in einer modifizierten Saykschen Sedimentationskammer. Spezielle Nährzusätze zum Zellsubstrat erfolgten nicht. Die Inkubationszeit wurde der Sedimentationszeit gleichgesetzt. Sie wurde auf ca. 30—40 min begrenzt. Nach Abschluß des Sedimentierungsvorganges wurden die Präparate luftgetrocknet und alsbald mit wasserfreiem Methanol fixiert. Die lichtempfindliche Schicht wurde im „Stripping“- oder „Dipping“-Verfahren aufgelegt. Die Expositionszeit betrug bei einem Teil der Präparate 12, bei einem anderen 24 Tage. Abbildung 1 zeigt schematisch die einzelnen Schritte.

Ergebnisse

Tritium-markiertes Thymidin wird als DNS-Baustein ausschließlich in proliferierende Zellen eingebaut. Es besteht Proportionalität zwischen Markierungsgröße und Zellumsatzrate. Damit ergibt sich der diagnostische Schwerpunkt in der Differenzierung rasch proliferierender Zellen im Liquor. Dies sind in erster Linie Tumorzellen. Es wurde deshalb zunächst geprüft, ob mit Hilfe der Autoradiographie Tumorzellen im Liquor besser identifiziert werden können und ob der Markierungsindex (MI) als Maßstab für die Malignität des Tumors angesehen werden kann. Es wurde vermutet, daß, je höher der MI ist, desto eher darauf zu schließen sei, daß es sich nicht nur um rasch proliferierende, sondern speziell um Tumorzellen handle.

Beispiel 1. Eine 65 Jahre alte Frau litt an einer chronischen Meningitis. Im Liquor fanden sich cytologisch Zellverbände, die nach ihrer Struktur am ehesten Plexuszellen zugerechnet werden konnten. Daneben fielen aber auch einige mononukleäre Riesenzellen auf, die einzelne Malignitätsmerkmale aufwiesen. Im autoradiographischen Präparat zeigten manche Zellen, die im Verband lagen, sowie einige Riesenzellen eine z. T. mäßige, z. T. auch kräftige Markierung. Der MI betrug 5,5%. Die Befunde bekräftigten den Verdacht, daß es sich um maligne Zellen handelt. Klinisch konnte intra vitam keine Ursache für die Erkrankung gefunden werden. Autoptisch stellte sich dann ein Carcinom des Plexus choroideus heraus.

Das beschriebene Beispiel ist nach Auswertung der bisherigen Ergebnisse eher eine Ausnahme. In den 15 Fällen *autochthoner Hirntumoren* konnte die Autoradiographie nur 4mal den nach dem panoptischen Bild geäußerten Verdacht der Malignität bestärken (Tabelle 1). In allen anderen Fällen wurde entweder eine minimale oder gar keine Inkorporation des radioaktiven Materials in einzelne Zellen registriert.

Anders stellten sich die autoradiographischen Ergebnisse bei *Hirn- bzw. Meningealmetastasen* (einschließlich Leukämien und maligne Lymphome) dar. Durch die Tatsache der Metastasierung erweisen sich diese Tumore von vornherein als im besonderen Grade maligne.

1. Pineoblastom	7,0%
2. Plexuscarcinom	5,5%
3. Astrocytom (nach Operation)	4,5%
4. Ependymom (nach Operation)	2,0%

Tabelle 1. MI bei autochthonen Hirntumoren

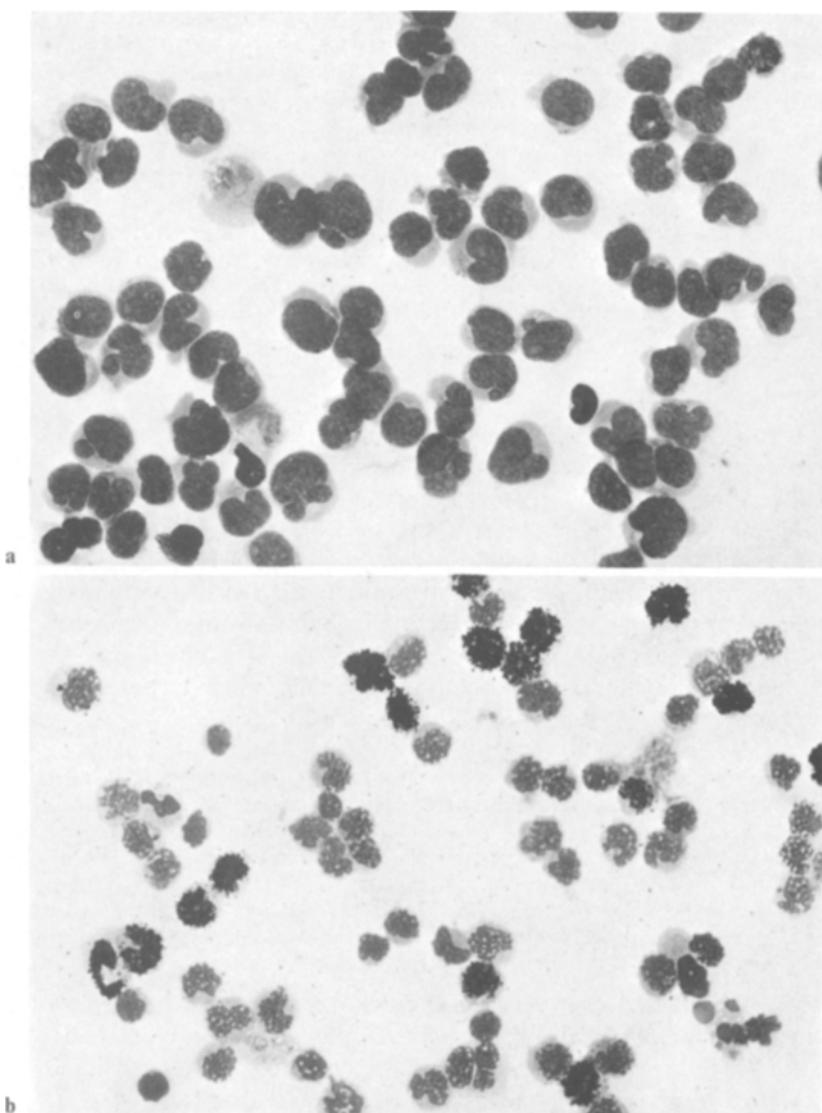
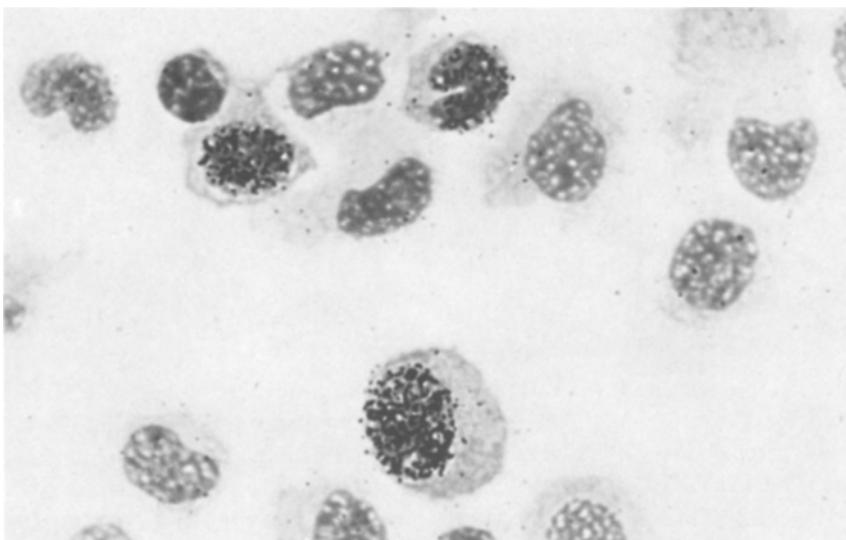


Abb. 2a und b. Malignes Lymphom vom Burkitt-Typ. Meningosis sarkomatosa. Patient: männlich, 18 Jahre alt. Liquor: 210 Zellen/mm³, 130 mg% Eiweiß, 16 mg% Glukose. a) Pappenheim-Färbung. Uniformes Zellbild. Auffällige, z.T. bohnen- bis hufeisenförmige, z.T. vielfach gelappte, chromatinreiche Kerne. Basophilie des Cytoplasmas. 1:480. b) Autoradiographie nach Inkubation mit H3-Thymidin (1 ml Liquor + 1 µCi H3-Thymidin). Expositionzeit 12 Tage. Hoher Markierungsindex (16%). Lebhafte Inkorporation des radioaktiven Materials in die einzelnen Zellkerne. 1:400

Beispiel 2. Ein 18 Jahre alter Mann litt an einem malignen Lymphom vom Burkitt-Typ. Sechs Wochen nach Beginn der Erkrankung machten sich Zeichen einer Meningitis bemerkbar. Liquorcytologisch konnte nach dem panoptischen Bild (Abb. 2a) eine Meningosis sarkomatosa nachgewiesen werden. Autoradiographisch ergab sich der extrem hohe MI von 16% (Abb. 2a). Dieser erhöhte sich noch gering unter der intrathekalen Therapie mit Cytostatika, auch als die

Tabelle 2. MI bei Hirnmetastasen bzw. Meningosis carcinomatosa (leucaemica)

1. Malignes Lymphom	17,8%	10. Akute Leukämie	4,5%
2. Melanom	14,8%	11. Magencarcinom	4,3%
3. Malignes Lymphom	10,0%	12. Mammacarcinom	4,3%
4. Magencarcinom	9,6%	13. Bronchialcarcinom	4,2%
5. Monocytenleukämie	8,0%	14. Mammacarcinom	3,8%
6. Primärtumor unbekannt	6,8%	15. Myeloblastenleukämie	2,4%
7. Akute Leukämie	6,8%	16. Lymphoblastenleukämie	2,4%
8. Bronchialcarcinom	6,0%	17. Lymphoblastenleukämie	2,2%
9. Bronchialcarcinom	5,4%		

**Abb. 3.** Mumps-Meningoencephalitis. Patient: weiblich, 5 Jahre alt. Liquor: 340 Zellen/mm³. 47 mg% Eiweiß, 48 mg% Glukose. Autoradiographie nach Inkubation mit H3-Thymidin (1 ml Liquor + 1 µCi H3-Thymidin). Expositionzeit 12 Tage. Markierung von 3 lymphocytären Zellen, darunter eine Lymphoidzelle. 1:1000

absolute Tumorzellzahl sank. Die Meningosis zeigte sich bald gegen jede Therapie resistent. Nach weiteren sechs Wochen verstarb der Patient.

In diesem Beispiel bestärkte das Ergebnis der Autoradiographie die nach dem panoptischen Präparat geäußerte Diagnose [2, 5, 7]. In 22 Fällen metastatischer Hirn- bzw. Meningealerkrankungen konnte durch den hohen MI (zwischen 2 und 17,8%) 17mal entweder der klinische Tumorverdacht oder die nach dem panoptischen Zellbild als gesichert erscheinende Diagnose bestärkt werden (Tabelle 2). In den restlichen 5 Fällen, alle mit sehr niedriger Zellzahl, war das radioaktive Material minimal oder nicht in die Zellkerne eingebaut worden. Die Fälle, die einen hohen MI aufwiesen, fielen durch die Schnelligkeit des Krankheitsverlaufes auf.

Auch Lymphocyten und Monocyten sind im Liquor proliferationsfähig. Da sie ebenfalls in vitro H3-Thymidin zu inkorporieren vermögen [8, 11], wurden

Liquorpleocytosen bei *nicht malignen Erkrankungen* des ZNS autoradiographisch untersucht (28 Patienten).

Es ergab sich, daß besonders jene *Monocyten*, die am Ende der exsudativen Phase einer bakteriellen Meningitis auftreten, radioaktiv markiert werden (maximaler MI 4,5%). Auch die zu Makrophagen umgewandelten Monocyten nach Blutung in den Subarachnoidalraum zeigten einen Einbau von H3-Thymidin in ihren Zellkern (maximaler MI 4%). — Bei den *Lymphocyten* war der Einbau des radioaktiven Materials noch etwas deutlicher als bei den Monocyten. Auffällig waren v.a. die hohen Markierungsindices bei Virusmeningitis. Bevorzugt markiert wurden besonders die als Lymphoidzellen bezeichneten Transformationsformen der Lymphocyten. Der höchste Markierungsindex ergab sich bei einem fünfjährigen Kind mit Mumps-Meningoencephalitis mit 5% (Abb. 3). Der Markierungsindex von Lymphocyten und Monocyten war um so höher, je jünger der Patient war, er war am höchsten bei Säuglingen (5,3%).

Da bei 12tägiger Expositionszeit der Präparate die Markierungsgröße gelegentlich so gering war, daß man sie aufgrund der Hintergrundsstrahlung kaum wahrnehmen konnte, wurde auch eine 24tägige Expositionszeit gewählt. Die autoradiographischen Befunde wurden so besser erkennbar; da die Zahl der Silberkörner aber mit steigender Expositionszeit bekanntlich linear steigt, war eine Mehrinformation dadurch nicht zu erwarten.

Diskussion

Die autoradiographische Präparation erfordert im Liquorbereich besondere Voraussetzungen. Die durch den niedrigen Eiweißgehalt des Liquors mit Lebensminimum strapazierten Zellen werden durch die notwendige Inkubation bei 37°C zusätzlich beansprucht. Eine anschließende mechanische Strapazierung etwa durch Zentrifugation führt zu fast vollkommener Unkenntlichkeit der Zellmorphologie und macht damit die aufwendige Methode nutzlos. Nach unseren Erfahrungen ist ein befriedigendes cytologisches Resultat dann zu erwarten, wenn man die Sedimentiermethode nach dem Saykschen Modell verwendet. In diesem Fall wird die Inkubation mit der Sedimentation (Zellkonzentration) kombiniert, d.h. es wird die Zeit der Sedimentation gleich jener der Inkubation gesetzt. Die Sedimentierzeit wird auf ca. 30—40 min begrenzt, schwankt allerdings aus apparativen Gründen von Präparat zu Präparat um etwa 10—15 min. Ein quantitativer Vergleich der Ergebnisse ist schon aus diesen Gründen nicht möglich. In späteren Untersuchungen soll durch Zugabe von nicht markiertem Thymidin nach 30 min der Inkubation der Einbau von markiertem Thymidin kompetitiv gestoppt und somit die Vergleichbarkeit der Resultate verbessert werden.

Auf dem Weg zur Quantifizierung fordern andere Untersucher [3] parallel zur Inkubation eine Vitalitätsbestimmung der Zellen mit Trypanblau sowie den Zusatz von Kulturmedium zum Liquor, um die Lebensbedingungen der Zellen zu verbessern. Es scheint aber bei solch vorbehandeltem Liquor möglich, daß ein Teil üblicherweise *in vivo* ruhender oder kaum proliferierender Zellen übermäßig aktiviert wird; ein Umstand, der den MI hochtreibt, aber das wahre zellkinetische Spektrum *in vivo* verschleiert. — Um näher an *In-vivo*-Bedingungen heran-

Autochthone Hirntumoren	7,0%
Metastasen	17,8%
Lymphocyten	5,0%
Monocyten/Makrophagen	4,5%

Tabelle 3. Maximaler MI bei Liquorzellen

zukommen, wird auch die Inkubation der Zellen über eine Stunde bei Sauerstoffüberdruck empfohlen [4]. Eine Beurteilung der einzelnen methodischen Vorschläge ist heute noch kaum möglich.

Nach unseren Ergebnissen zeigten Zellen autochthoner und metastatischer Hirntumoren, Lymphocyten und Monocyten bzw. Makrophagen eine Markierung mit H3-Thymidin (Tabelle 3). Unter 15 autochthonen Hirntumoren konnte nur in 4 Fällen eine Markierung festgestellt werden, die über 1% lag. Im höchsten Falle lag der MI bei 7% (Pineoblastom). Einschränkend muß gesagt werden, daß es den Zellen autochthoner Hirntumoren in ihrer Mehrzahl an Malignitätsmerkmalen mangelt und sie nach dem morphologischen Bild durchaus mit aktivierten Monocyten oder transformierten Lymphocyten verwechselt werden können. Das gleiche gilt umgekehrt, so daß möglich ist, daß in dem genannten MI auch manche Lymphocyten und Monocyten aufgegangen sind. Schon diese kaum umgehbar Fehlerquelle macht die Autoradiographie nicht zur Methode, um Liquorzellen autochthoner Hirntumoren zu identifizieren. — Der hohe MI bei Liquorzellen, die von Metastasen stammen, korreliert mit den Erfahrungen anderer Autoren [2—5]. Den höchsten Markierungsindex weisen Zellen von undifferenzierten Tumoren auf, an erster Stelle lagen die malignen Lymphome [5]. Es ergab sich, daß je höher der MI, desto maligner der Krankheitsverlauf war, desto besser aber auch eine intrathekale Therapie mit Cytostatika ansprach. Ob die Autoradiographie sich klinisch als Effektivitätskontrolle einer cytostatischen Therapie anbietet, wie Dommash und Mitarb. [2] annehmen, halten wir jedoch für fraglich, zumal die Auswertung der Autoradiogramme kaum früher als 14 Tage nach der Liquorentnahme erfolgen kann. Für die Therapiekontrolle genügt in der Regel die Auswertung des panoptisch gefärbten Zellpräparates. — Daß Lymphocyten und Monocyten als proliferationsfähige Zellen im Liquor das radioaktive Material in vitro aufnehmen, war anzunehmen und ist auch durch Untersuchungen von Malashakhia und Mitarb. [8] sowie Yamakawa und Mitarb. [11] nachgewiesen worden. Der MI der entzündlichen Pleocytosen lag meist unter 1%, erreichte jedoch in Einzelfällen bis 5% und leicht darüber. Diese außergewöhnlich hohen Markierungsindizes waren durchweg bei Säuglingen und Kleinkindern festzustellen. Wurden die MI von Lymphocyten und Monocyten/Makrophagen getrennt bestimmt, so fielen sie bei Lymphocyten leicht höher aus.

Zusammenfassung: — Die Autoradiographie erlaubt Einblick in die Kinetik von Liquorzellen in vitro.

- Radioaktiv markiert wurden Tumorzellen, Lymphocyten und Monocyten; nicht markiert Granulocyten, Zellen des Plexus sowie des Ependyms.
- Der MI war bei Tumorzellen von Metastasen am höchsten, bei Monocyten am niedrigsten.

- Zellen von autochthonen Hirntumoren wiesen nur selten eine Markierung auf. Ihr MI lag im besten Falle wenig höher als bei Lymphocyten und Monocyten.
- Die Autoradiographie allein erwies sich nicht als Methode zur Identifizierung von Tumorzellen. War der MI auffallend hoch, dann war in der Regel die cytologische Diagnose schon durch das panoptische Bild gesichert gewesen.
- Der MI von Lymphocyten und Monocyten zeigte bei Säuglingen und Kleinkindern höhere Werte als bei Erwachsenen.

Literatur

1. Choné, B.: Bedeutung der Punktionszytologie in der Radiologie. In: Einführung in die klinisch-experimentelle Radiologie, pp. 116—189. München, Berlin: Urban und Schwarzenberg 1964
2. Dommasch, D., Przuntek, H., Grüniger, W., Mertens, G.: Intrathecal cytostatic chemotherapy of meningitis carcinomatosa. Eur. Neurol. **14**, 178—191 (1976)
3. Dommasch, D., Grüniger, W., Schultze, B.: Autoradiographic demonstration of proliferating cells in cerebrospinal fluid. J. Neurol. **214**, 97—112 (1977)
4. Engelhardt, P.: Intrathecal cytostatic therapy of meningeal carcinomatosis — Autoradiographic investigations of the CSF cells. J. Neurol. **213**, 309—315 (1976)
5. Fukui, M., Yamakawa, Y., Yamasaki, T., Kitamura, K., Tabira, T., Sadoshima, S.: H3-thymidine autoradiography of CSF cells in primary reticulum cell sarcoma of the brain. J. Neurol. **210**, 143—150 (1975)
6. Kölmel, H. W., Choné, B.: Tumorzellen im Liquor. Ein Beitrag zur differenzierten Zydiagnostik. Nervenarzt **43**, 644—645 (1972)
7. Kölmel, H. W., Choné, B. K. F.: Combined application of cytodiagnostic technics to the cerebrospinal fluid. J. Neurol. **216**, 1—8 (1977)
8. Malashakha, Yu. A., Geladze, M. G.: Autoradiographic studies of cultures of cerebrospinal fluid lymphocytes in nonsuppurative meningitis. Neurology (Minneap.) **26**, 1081—1099 (1976)
9. Sayk, J.: Cytologie der Cerebrospinal-Flüssigkeit. Jena: Fischer 1962
10. Schultze, B.: Die Orthologie und Pathologie des Nucleinsäure- und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm. In: Handbuch der allgemeinen Pathologie, zweiter Band, fünfter Teil. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1968
11. Yamakawa, Y., Fukui, M., Ohta, H., Kitamura, K.: H3-thymidine autoradiography of the CSF cells in cases of non-neoplastic disease. J. Neurol. **211**, 195—202 (1976)

Eingegangen am 21. Februar 1978