

Die frühzeitige transorbitale Nadelautopsie

Eine brauchbare Methode zur Gewebsentnahme für ultrastrukturelle Untersuchungen am menschlichen Stirnhirn

H. Herrlinger, D. Kronski, A. P. Anzil und K. Blinzinger

Arbeitsgruppe für Elektronenmikroskopie, Max-Planck-Institut für Psychiatrie und
II. Medizinische Abteilung des Städtischen Krankenhauses München-Schwabing,
München

Eingegangen am 22. März 1974

Early Transorbital Needle Autopsy

A Practicable Brain Tissue Sampling Method for Ultrastructural Studies in Man

Summary. We describe a method of transorbital needle autopsy for sampling cerebral tissue about 15 min after death. The specimens of orbital gray and white matter examined under the electron microscope exhibited a tissue preservation ranging from satisfactory to excellent. The validity of the method received further confirmation by some interesting incidental findings observed in five cases known to have been free of neurologic and psychiatric disease. Attention is called to the usefulness of this approach for the ultrastructural study of the brain in various pathologic situations of neurologic and/or psychiatric interest. Furthermore, the importance of this method as a means to obtain an ultrastructural baseline of human central nervous tissue in different age groups is briefly mentioned.

Key words: Clinical Neuropathology — Postmortem Tissue Preservation — Electron Microscopy of Human Brain Tissue.

Zusammenfassung. Mit der transorbitalen Nadelautopsie wird eine Technik beschrieben, welche die Entnahme von menschlichem Hirngewebe etwa innerhalb einer Viertelstunde post mortem ermöglicht. Die Stanzzyylinder aus dem Orbitalbereich des Frontallappens weisen auf der submikroskopischen Ebene gewöhnlich eine befriedigende bis ausgezeichnete Strukturhaltung auf. Die Brauchbarkeit der Methode wird auch durch Beispiele interessanter akzidenteller Beobachtungen bei fünf Fällen erläutert, die klinisch weder neurologische noch psychiatrische Störungen gezeigt hatten. Mit Hilfe der frühzeitigen transorbitalen Nadelautopsie lassen sich vor allem elektronenmikroskopische Untersuchungen bei bisher ungeklärten zentralnervösen Krankheitsprozessen durchführen. Außerdem bietet diese Entnahmetechnik auch die Möglichkeit, umfassendere Kenntnisse über die Normvarianten der feineren Strukturverhältnisse im Gehirn von Menschen verschiedener Altersstufen zu gewinnen.

Schlüsselwörter: Klinische Neuropathologie — Postmortale Gewebserhaltung — Elektronenmikroskopische Untersuchung menschlichen Hirngewebes.

Bei zahlreichen neurologischen und psychiatrischen Krankheitsbildern, so etwa bei der multiplen Sklerose oder der Schizophrenie, konnten für die Erforschung pathogenetischer Zusammenhänge moder-

nere morphologische Methoden, wie die Elektronenmikroskopie, bisher kaum eingesetzt werden. Einerseits lassen sich bei der Mehrzahl solcher Prozesse wegen des Fehlens einer dringenden Indikation zur Hirnbiopsie histo- und cytopathologische Untersuchungen am Zentralorgan gewöhnlich erst nach dem Tode durchführen. Andererseits verstreicht bei einer auf konventionelle Weise vorgenommenen Autopsie bis zu Fixierung des Materials meist soviel Zeit, daß intravital entstandene Zell- und Texturveränderungen subtilerer Art infolge der autolytischen und anderer postmortaler Strukturumwandlungen nicht mehr eindeutig zu erfassen sind. Dieses den Fortschritt in bestimmten Gebieten der klinischen Neuropathologie erheblich behindernde Dilemma veranlaßte uns, die von Slack *et al.* (1973) beschriebene Technik der möglichst schnell nach dem Exitus letalis mittels einer Hohlnadel über die Augenhöhle erfolgenden Gewebsentnahme aus dem Stirnhirn auf ihre Anwendbarkeit für ultrastrukturelle Studien zu prüfen. In der vorliegenden Mitteilung wollen wir anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen zeigen, daß die durch eine frühzeitige transorbitale Nadelaautopsie aus dem Frontallappen gewonnenen Gewebeproben — insbesondere nach einer geringfügigen Modifizierung der Methode — weitgehend den Anforderungen entsprechen, die man bei Untersuchungen auf ultrastruktureller Ebene an die Objekterhaltung stellen muß. Zugleich sollen einige interessante Befunde demonstriert werden, die wir beiläufig an unserem bislang noch relativ geringen und nicht von neuropsychiatrischen Fällen herührenden Material erheben konnten.

Material und Methode

Unser Untersuchungsgut stammt von fünf nicht nach besonderen Gesichtspunkten ausgewählten Fällen. Es handelte sich um Patienten beiderlei Geschlechts, die im Alter von 65 bis 90 Jahren auf einer kardiologischen Intensivstation ad exitum gekommen waren. Keiner von ihnen hatte während des Klinikaufenthalts Zeichen einer Nerven- oder Geisteskrankheit gezeigt. Der Eintritt des Todes wurde von den behandelnden Ärzten nach den derzeit geltenden Richtlinien festgestellt. Die Gewebsentnahme erfolgte zwischen 10 und 20 min post mortem. Wie Slack *et al.* (1973) verwendeten wir anfangs eine Lumbalpunktionsnadel mit Trokar, um zwischen Oberlid und Augapfel hindurch das Dach der Orbita an seiner dünnsten Stelle zu durchbohren. Nachdem sich bei einigen Fällen mit stark verknöchelter Orbita Schwierigkeiten ergeben hatten, gingen wir dazu über, die Knochenperforation mit einer sehr dicken V2A-Nadel (Durchmesser 3,0 mm) vorzunehmen. Diese Modifikation hat den Vorteil, daß sich eine vorzeitige mechanische Schädigung des Hirngewebes leichter vermeiden läßt: erstens ist der für die Durchstoßung des Dachs der Augenhöhle erforderliche manuelle Kraftaufwand geringer und somit besser dosierbar; zweitens verbleiben anfallende lose Knochenstückchen meist in der Kanüle. Durch das Loch im Orbitaldach wurden anschließend mit der dünnwandigen, innenpolierten äußeren Kanüle einer Venoflex-Doppelkanüle (lichte Weite 1,5 mm; Länge 12 cm; Fa. G. A. Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen) mehrmals nacheinander Hirnstanzylinder von 1–3 cm Länge entnommen, die infolge der gleichzeitigen Durchstechung mehrerer Windungen abwechselnd aus grauer und weißer

Substanz bestanden. Bei der in einem unserer Fälle durchgeführten vollständigen Hirnsektion ergab die Sondierung der Stichkanäle, daß das mittels einer Nadelautopsie gewonnene Material ausschließlich dem orbitalen Anteil des Frontallappens entstammte. Zum Ausspülen der Stanzzyylinder aus der Kanüle wurde dieser eine Spritze aufgesetzt, welche bereits mit gekühlter 4%iger phosphatgepufferter Glutaraldehydlösung (pH 7,4) gefüllt war. Nach mindestens zweistündiger Aldehydfixierung bei +4°C zerlegten wir die Stanzzyylinder in dünne Scheibchen, von denen dann nach dem üblichen Vorgehen (Auswaschen in phosphatgepufferter 0,2 molarer Saccharoselösung, Nachfixierung mit 1%iger Osmiumtetroxydlösung, stufenweise Äthanoldehydrierung, Einbettung in Epon 812; Ultramikrotomie an Reichert- oder LKB-Geräten) möglichst großflächige Dünnschnitte angefertigt wurden. Diese wurden nach Doppelkontrastierung mit Uranylacetat und Bleizitrat in einem Zeiss-Elektronenmikroskop vom Typ EM 9A bei Vergrößerungsstufen zwischen 1900× und 41000× untersucht.

Ergebnisse

Das durch die frühzeitige transorbitale Nadelautopsie der elektronenmikroskopischen Untersuchung zugänglich gemachte cerebrale Gewebe

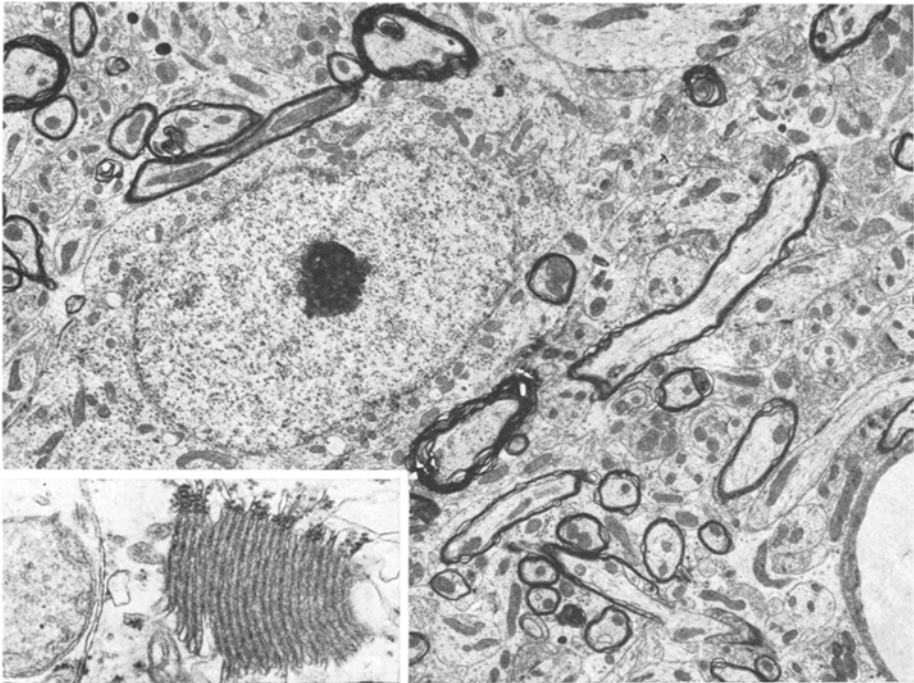


Abb. 1. Übersichtsaufnahme des corticalen Gewebes: Sämtliche Texturkomponenten zeigen eine ausgezeichnete Strukturhaltung. Erweiterung des Extracellulär-raums sind nicht zu sehen. Vergr. $\times 13800$. Inset: Übereinandergestapelte enggestellte Zisternen des rauen endoplasmatischen Reticulum in einer Nervenzelle. Vergr. $\times 23400$

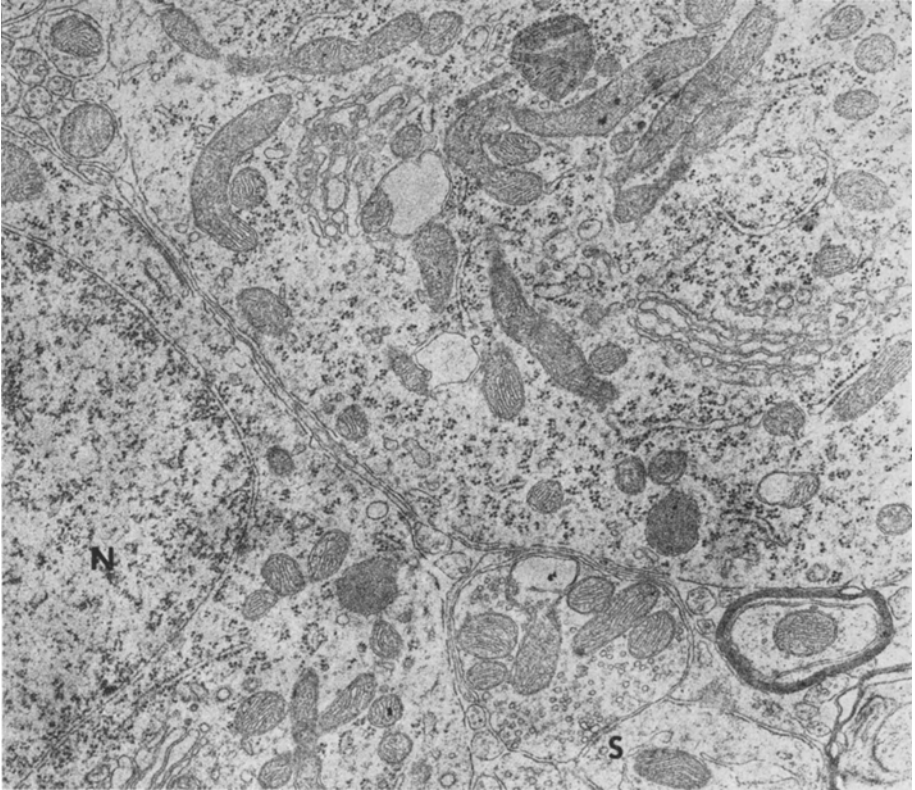


Abb.2. Ein Ausschnitt zweier nahe beieinanderliegender Nervenzellperikarya gibt die gute Erhaltung von Zellkern und Cytoplasmaelementen wieder. *N* Zellkern. *S* Axodendritische Synapse. Vergr. $\times 18000$

zeigte eine von Fall zu Fall zwar variierende, im allgemeinen aber durchweg befriedigende Strukturhaltung. Bei einem Fall waren sämtliche Zell- und Texturkomponenten des Rindengraus strukturell sogar noch so weitgehend intakt, wie man es sonst eigentlich nur in einem unter optimalen Bedingungen fixierten tierischen oder bioptischen Material zu sehen gewohnt ist (Abb.1 und 2). Selbst die bekanntlich gegen Sauerstoff- und Substratmangel, Änderungen der H-Ionenkonzentration, mechanische Druckbelastung u. dgl. besonders empfindlichen Nervenzellen ließen häufig keine wesentlichen postmortalen bzw. artefiziellen Alterationen erkennen. An ihren Kernen konnten wir meist eine gleichmäßige Chromatinverteilung ohne gröbere randständige Verklumpungen sowie einen regelrecht strukturierten Nucleolus beobachten (Abb.1).

Die perinucleäre Zisterne der Neurone war selten deutlich dilatiert. Das granuläre endoplasmatische Reticulum wies jedoch, ähnlich wie einzelne Anteile des Golgi-Apparates, des öfteren einmal geringfügige umschriebene Erweiterungen auf. Der Ribosomenbesatz seiner Membranen und der Bestand an freien Polysomen erschienen dagegen fast nie auffallend reduziert. Vereinzelt trafen wir in neuronalen Perikaryen auf dichte Stapel von abgeflachten Zisternen (Abb. 1, Inset), welche an die in verschiedenen Nervenzelltypen der Katze entdeckten (Adinolfi, 1969) und in Striatumneuronen einer Ratte als „dark cisternal fields“ eingehender beschriebenen Formationen (Anzil *et al.*, 1971) erinnerten. Der Erhaltungszustand der Mitochondrienpopulation in den Nerven- und Gliazellen erwies sich als unterschiedlich; manchmal fanden sich aber erstaunlich wenige Exemplare dieser Organellen, die stärker geschwollen waren (Abb. 1 und 2). Im Neuropil des orbitalen Cortex konnten mit Ausnahme eines einzigen Falls in der Regel weder ungewöhnliche Verbreiterungen der Intercellularfugen noch stärkere Auftreibungen von astrocytären oder neuronalen Zellfortsätzen festgestellt werden. Auch geschrumpfte und verdichtete Dendriten bekamen wir, entsprechend dem nahezu völligen Fehlen von sog. „dark neurons“, nur höchst selten zu Gesicht. An den synaptischen Kontaktstellen ließen sich immer die charakteristischen Membranspezialisierungen und Vesikelansammlungen zur Darstellung bringen. Die Markmäntel der myelinisierten Axone wiesen häufig die hinlänglich bekannten Aufsplitterungen, sonst aber keine Veränderungen ihrer periodischen Lamellenstruktur auf (Abb. 1 und 2). Die corticalen Blutgefäße zeigten stets ein ultrastrukturelles Bild, das durch die verzögerte Fixierung offenbar nicht oder nur wenig beeinträchtigt war. Die an den Basalmembranen der Capillaren und Venolen inserierenden Astrocytenfortsätze waren gewöhnlich kaum geschwollen und enthielten, wie auch manche anderen astrocytären Cytoplasmabereiche, öfters noch Anhäufungen von partikulärem Glykogen.

Bei sämtlichen Fällen, in denen wir bisher mit Hilfe der transorbitalen Nadelaautopsie Hirngewebsproben untersuchen konnten, stießen wir mehr oder weniger oft auf interessante, sicher intravital entstandene Alterationen. Diese darf man, obgleich sich ihnen noch keineswegs die Bedeutung von krankhaften Organbefunden im üblichen Sinn beimessen läßt, bei einer nur auf die einzelnen betroffenen Zellen oder Texturkomponenten bezogenen Betrachtungsweise wohl schon als pathologisch werten.

In zwei Fällen fanden sich im Rindengrau vereinzelt aufgetriebene Neuriten, die neben locker verteilten tubulo-vesiculären Elementen meist auch stärker veränderte Mitochondrien enthielten (Abb. 3). Es könnte sich hierbei um kleinere Exemplare oder Entwicklungsformen der sog. Sphäroide handeln, welche, wenn sie gehäuft und ubiquitär auf-

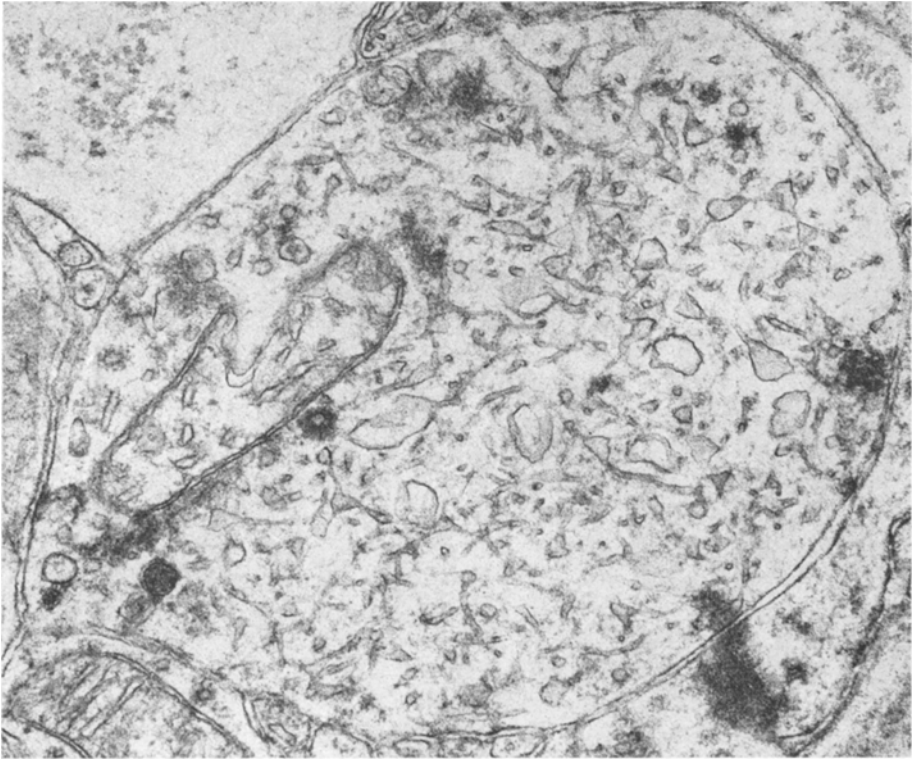


Abb.3. Neuritenaufreibung mit tubulo-vesiculären Binnenstrukturen. Vergr. $\times 13500$

treten, das morphologische Substrat des als „neuroaxonale Dystrophie“ bezeichneten Gewebssyndroms darstellen (Jellinger, 1973). In Betracht zu ziehen sind hier natürlich auch die als „axonal remodeling“ im tierischen ZNS beschriebenen Phänomene (Sotelo und Palay, 1971). Bei drei Fällen kamen im corticalen Neuropil rundliche, bis zu $10\ \mu$ messende Gebilde zur Beobachtung, die aus einem dichten Filz von wirr durcheinanderliegenden, teilweise sich verzweigenden, etwa $60\ \text{\AA}$ dicken Filamenten bestanden und stets eine limitierende Membran vermissen ließen (Abb.4). Der Umstand, daß sie nicht ausschließlich in astrocytären, sondern wiederholt auch in neuronalen Cytoplasmaausläufern anzutreffen waren, steht u. E. ihrer Identifizierung als Corpora amylacea (Ramsey, 1965) nur scheinbar entgegen. Das Problem ihrer Abgrenzbarkeit von den gleichartig strukturierten Lafora-Körperchen läßt sich hier allerdings nur andeuten und soll einmal in einer gesonderten Publikation eingehender erörtert werden. In einem unserer Fälle be-

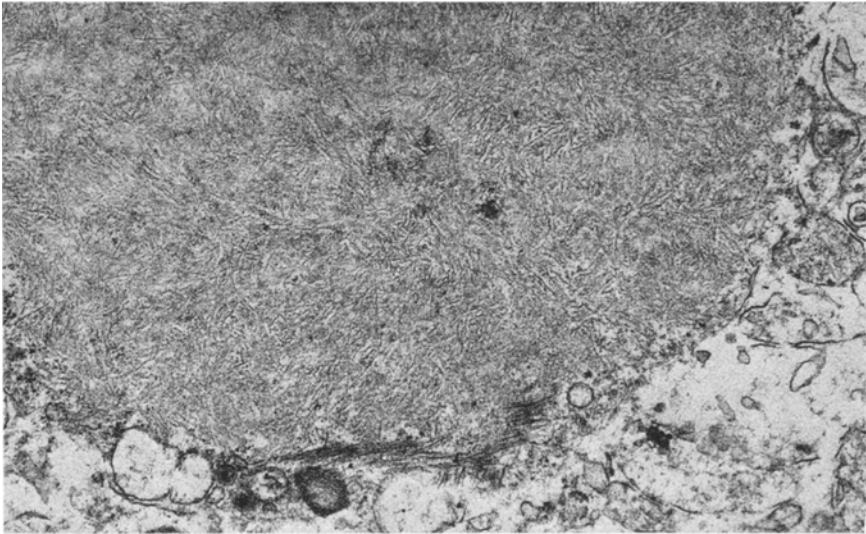


Abb.4. Corpus amylaceum, wahrscheinlich in einem Astrocytenfortsatz liegend.
Vergr. $\times 24000$

kamen wir an zwei kleineren intracerebralen Arterien Wandveränderungen zu Gesicht, die möglicherweise einem Frühstadium der kongo-philen Angiopathie (Pantelakis, 1954) entsprechen (Abb.5). Die Mehrzahl der glatten Muskelzellen in der Tunica media von solchen alterierten Gefäßen wies ein auffallend kontrastarmes Grundcytoplasma auf, in dem fast keine Myofilamente mehr zu finden waren. Auch schienen die Reihen von vesiculären Invaginationen an den Oberflächenmembranen dieser hellen Myocyten etwas gelichtet zu sein. Einzelne, vornehmlich an den perivaskulären Raum angrenzende Mediaelemente boten jedoch ein völlig anderes Bild, das von dem normaler glatter Muskelzellen ganz erheblich abwich. Ihr Plasmaleib war größtenteils von einer Masse dicht gelagerter, ungeordnet verlaufender, zarter Filamente ausgefüllt, die nur vereinzelt Einstreuungen von kärglichen Organellenresten zeigte und stellenweise bis an das äußere Blatt der Kernmembran heranreichte. Lediglich an der Peripherie dieser Zellen waren hin und wieder einige Ergastoplasmaformationen zu erkennen, die sich durch einen besonders dichten Ribosomenbesatz ihrer Membranen auszeichneten. Extracellulär liegende, senkrecht und/oder parallel zur Gefäßachse ausgerichtete Filamente, wie sie für eine fortgeschrittene Amyloidose bzw. „drusige Entartung“ der Hirngefäße kennzeichnend sein sollen (Schlote, 1965), konnten wir nicht sicher nachweisen.

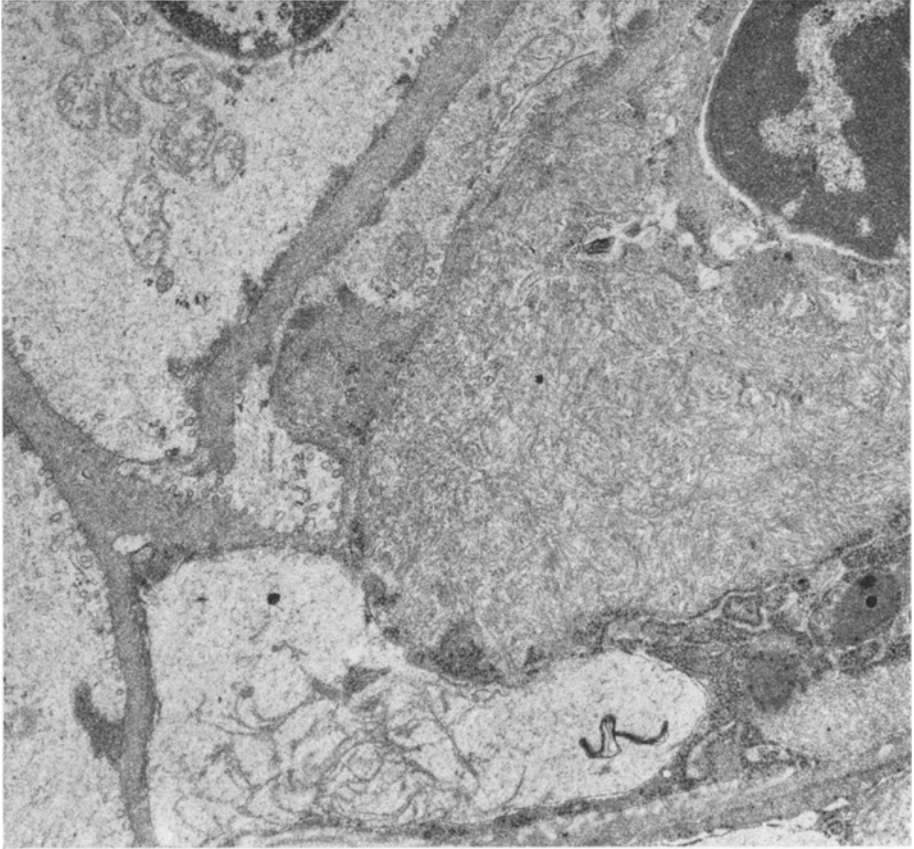


Abb.5. Wandabschnitt einer kleinen Arterie mit Frühstadium der kongophilen Angiopathie. Das Cytoplasma der in der Tunica media liegenden Zelle rechts ist von einer Ansammlung unorientierter feiner Fibrillen ausgefüllt; das Cytoplasma der links im Bild befindlichen Muskelzellen ist auffallend substanz- und kontrastarm.

Vergr. $\times 18000$

Abschließend soll noch ein Befund erwähnt werden, den wir in sämtlichen bisher ausgewerteten Präparatblöcken von postmortal entnommenen Hirnstanzzyllindern erheben konnten. Teils in Gefäßnähe, teils mitten im Neuropil traten häufig Anschnitte von Zellen in Erscheinung, bei denen es sich offensichtlich um mobile phagocytierende Elemente handelte, deren feinere cyto- und karyoplasmatische Strukturmerkmale aber eine sichere Aussage über ihre Herkunft bzw. histogenetische Abstammung nicht ermöglichten. Nahezu alle dieser nicht näher identifizierbaren „M-Zellen“ (Matthews u. Kruger, 1973) enthielten

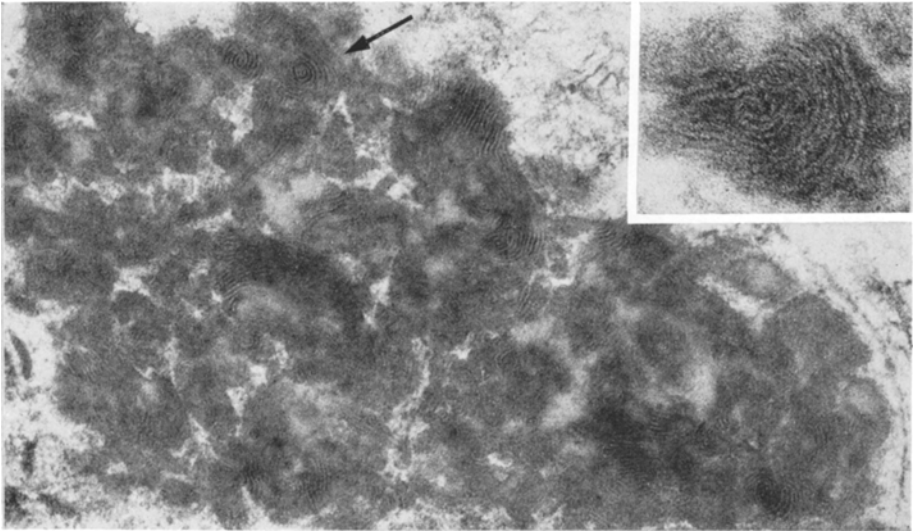


Abb. 6. Partuell membranbegrenzte Lipidablagerungen mit Fingerabdruckmustern (Pfeil) in einer „M-Zelle“. Vergr. $\times 54000$. Inset: Bei höherer Auflösung tritt die periodische Lamellierung noch klarer hervor. Vergr. $\times 123000$

ziemlich umfangreiche, unregelmäßig konfigurierte Cytoplasmaeinschlüsse, die aus ballenförmigen, vielfach konfluierenden Ansammlungen eines stark osmiophilen Materials bestanden und teilweise eine Begrenzung durch eine Einheitsmembran erkennen ließen (Abb. 6). Bei höherer Auflösung zeigten diese vermutlich aus lipidhaltigen Substanzen zusammengesetzten, pigmentartigen Konglomerate an vielen Stellen einen multilamellären Bau, der, unbeschadet seiner Periodizität von ca. 110 \AA , eine gewisse Ähnlichkeit mit den bei manchen intracellulären Ablagerungen beobachteten Fingerabdruckmustern aufwies (Abb. 6, Inset).

Diskussion

Ohne die mögliche Bedeutung der frühzeitigen transorbitalen Nadelautopsie für eine Erweiterung und Vertiefung unserer Kenntnisse in der klinischen Neuropathologie überbewerten zu wollen, glauben wir doch gezeigt zu haben, daß man mit Hilfe dieser relativ einfach zu handhabenden Methode aus dem menschlichen Frontalhirn Gewebeproben gewinnen kann, deren Strukturhaltung eine sichere Beurteilung krankhafter Zell- und Texturveränderungen im submikroskopischen Bereich vielfach noch zuläßt. Bei der Auswertung der Befunde wird man sich allerdings stets vor Augen halten müssen, daß sich außer der Zeitspanne vom Eintritt des irreversiblen Kreislauf- und Atemstillstandes bis zur Entnahme

und Fixierung der Hirnstanzzyylinder auch noch eine Reihe von anderen Faktoren auf die Objektbeschaffenheit auswirken kann. Zu nennen sind hier die Art der Grundkrankheit und eventueller konkomitierender Störungen, die unmittelbare Todesursache und insbesondere die Dauer der Agonie. So ist es bekannt, daß autolytische und andere postmortale Zerfallsprozesse in der Regel wesentlich schneller in Gang kommen, wenn bereits präterminal länger anhaltende hypoxische Mangelzustände oder gar eine stärkere Gewebsacidose bestanden haben. Eine häufigere und gezielte Anwendung der frühzeitigen transorbitalen Nadelaautopsie, der bei einer vorher eingeholten Einwilligung der Angehörigen des Verstorbenen keinerlei rechtliche Bedenken entgegenstehen, könnte zur Erhellung wenigstens einiger jener ätiopathogenetisch bislang unklaren zentralnervösen Krankheiten des Menschen beitragen, welche bioptisch schwer zugänglich und auch im Tierexperiment nicht wirklich reproduzierbar sind. Darüber hinaus könnten Untersuchungen der beschriebenen Art, wenn sie an einer ausreichend großen Zahl von Fällen durchgeführt werden, bei denen zu Lebzeiten keine neurologischen oder psychischen Auffälligkeiten bestanden, uns auch einen besseren Überblick über die noch innerhalb der Grenzen der Orthologie liegenden Variationsmöglichkeiten in der Ultrastruktur des menschlichen Gehirns und deren Häufigkeitsbeziehung zu verschiedenen Altersstufen verschaffen. Die über die Augenhöhle erfolgende Entnahme des Materials muß auch nicht unbedingt auf den orbitalen Cortex beschränkt bleiben. Wir halten es für möglich, auf dem gleichen Weg mittels längerer und während des Einstichs in die Tiefe mit einem Trokar versehener Kanülen brauchbare Gewebeproben auch aus subcorticalen Regionen, wie den Stammganglien, zu gewinnen. Abschließend möchten wir noch auf einen Punkt hinweisen, dessen Wichtigkeit uns durch eigenes Versäumnis in vier von fünf Fällen nachträglich bald klar geworden ist: Der frühzeitigen transorbitalen Nadelaautopsie sollte stets eine konventionelle Autopsie mit kompletter Hirnsektion folgen; es lassen sich nämlich die z. T. recht sporadischen und lückenhaften elektronenmikroskopischen Befunde oft schwer deuten, wenn sie nicht vor dem breiteren Hintergrund makroskopischer und histologischer Untersuchungsergebnisse gesehen werden.

Wir danken Frau Anke Mauß und Frau Pari Becker für die Anfertigung der Schnitte, Frau Veronika Heinzinger für die fotografischen Arbeiten und Frau Ursula Qreini für das Schreiben des Manuskripts.

Literatur

- Adinolfi, A. M.: The fine structure of neurons and synapses in the entopeduncular nucleus of the cat. *J. comp. Neurol.* **135**, 225—248 (1969)
- Anzil, A. P., Blinzinger, K., Matsushima, A.: Dark cisternal fields: specialized formations of the endoplasmic reticulum in striatal neurons of a rat. *Z. Zellforsch.* **113**, 553—557 (1971)

- Jellinger, K.: Neuroaxonal dystrophy: its natural history and related disorders. In: Progress in Neuropathology, Vol. II, pp. 129—180, H. M. Zimmerman, Ed. New York: Grune and Stratton 1973
- Matthews, M. A., Kruger, L.: Electron microscopy of non-neuronal cellular changes accompanying neural degeneration in the thalamic nuclei of the rabbit. II. Reactive elements within the neuropil. *J. comp. Neurol.* **148**, 313—345 (1973)
- Pantelakis, S.: Un type particulier d'angiopathie sénile du système nerveux central: l'angiopathie congophile. *M Schr. Psychiat. Neurol.* **128**, 219—256 (1954)
- Ramsey, H. J.: Ultrastructure of corpora amylacea. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **24**, 29—39 (1965)
- Schlote, W.: Die Amyloidnatur der kongophilen, drusigen Entartung der Hirnarterien (Scholz) im Senium. *Acta neuropath. (Berl.)* **4**, 449—468 (1965)
- Slack, P. M., Pryor, D. S., Dayan, A. D.: Rapid needle sampling of the brain after death for pathology and virology. *Lancet* **1973** **I**, 521
- Sotelo, C., Palay, S. L.: Altered axons and axon terminals in the lateral vestibular nucleus of the rat. *Lab. Invest.* **25**, 653—671 (1971)

Dr. H. Herrlinger
Max-Planck-Institut für Psychiatrie
D-8000 München 40
Kraepelinstr. 2
Bundesrepublik Deutschland