

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Berlin
[Direktor: Prof. Dr. R. Rössle].)

Tupfpräparate und ihre Anwendung zur Diagnosenstellung der Blutkrankheiten im Sektionssaal.

Von

Dr. A. F. Zanaty (Kairo).

(Eingegangen am 18. Juli 1934.)

Krankheiten, die die blutbildenden Organe oder das Reticulo-Endothelialsystem befallen, bereiten uns häufig differentialdiagnostische Schwierigkeiten; nicht nur in der Klinik, häufig auch noch auf dem Sektionstisch fällt es uns schwer, zu einer eindeutigen Diagnose zu kommen. Um die Schwierigkeiten anzudeuten, erinnern wir nur daran, wie z. B. ein Lymphogranulom dasselbe Bild und dieselbe Lokalisation aufweisen kann, wie ein Lymphosarkom oder eine Lymphadenose. Letztere kann in seltenen Fällen makroskopisch schwer von einer Myelose zu unterscheiden sein, besonders in den Fällen von Myelose, bei denen das Befallensein von Lymphdrüsen oder eine fortgeschrittene diffuse Milzerkrankung im Vordergrund steht. Das graue, homogene, gleichmäßige Bild, das das Organ bietet, kann sowohl der Ausdruck einer myeloischen Umwandlung sein, wobei die *Malpighischen* Körperchen durch weitgehende myeloische Metaplasie der Pulpa und folgender Druckatrophie gänzlich verschwinden, als auch Ausdruck einer lymphatischen Umwandlung, wobei die *Malpighischen* Körperchen keine Grenze mehr erkennen lassen und mit der Pulpa zusammen eine ununterbrochene Lymphocytenmasse bilden. Wenn die makroskopische Diagnose der Milz und Leber, wo wir unverdeckbare Gewebsteile haben, schon derartige Schwierigkeiten bietet, begegnen wir solchen um so mehr bei den Lymphdrüsen, wo sie fehlen. Abgesehen von Blutstauungen und Hämorrhagien, die in ihnen bei Leukosen häufig, bei Lymphogranulom und Lymphosarkom kaum anzutreffen sind und uns Fingerzeige geben, ist es kaum möglich zu entscheiden, ob die geschwollenen Drüsen eine Myelose, Lymphadenose, Lymphosarkomatose oder auch Lymphogranulomatose bedecken. Ebenso irreführend können Befunde am Knochenmark sein, da eine geringe Stauung oder die fast immer begleitende Erythropoese es bei jeglichen Blutkrankheiten erschweren, ein klares Bild zu gewinnen. Das eitrige („pyoide“) Aussehen des Markes bei Myelose, das von alten Autoren seit *Neumann* her beschrieben wird, ist jetzt kaum noch zu sehen. Das heute gewöhnlich zu beobachtende Bild ist graurot, ja, sogar vorwiegend rot; vielleicht infolge einer gereizten Erythropoese,

die durch verschiedene Mittel hervorgerufen sein kann, gegeben zur Behebung der stets begleitenden Anämie. So brauchen sowohl der Kliniker als auch der pathologische Anatom Untersuchungsmethoden, die ihm mit einfacher Technik eine schnelle Diagnose gestatten. Es stehen uns heute eine größere Anzahl von Untersuchungsmethoden zur Verfügung. Wir wollen einzelne kurz, besonders im Hinblick auf die Untersuchung im Sektionssaal, erwähnen.

Das Blutausstrichpräparat vermag uns gewiß mancherlei Auskunft zu geben, aber es ist wohl allgemein bekannt, welche starken Veränderungen die Blutzellen, besonders die weißen, selbst bei bester Technik, im Ausstrich häufig aufweisen; insbesondere die vorwiegend am Rande des Präparates befindlichen Granulocyten und Monocyten leiden unter dem doch für eine Zelle immer erheblichen, am Rande besonders hohen Druck. So sind gerade die für unsere Beurteilung so wichtigen Zellformen und noch mehr die etwa vorhandenen zirkulierenden großen Jugendformen an den Ausstrichrändern besonders mechanischen Wirkungen ausgesetzt. Weniger gefährdet sind die kleinen, reifen Lymphocyten, sie finden sich meist unversehrt in der Mitte des Ausstriches. Im Dickentropfen-Präparat¹ sind die Zellen sicher nicht so starken mechanischen Einwirkungen ausgesetzt. Wir haben viele Zellen auf engem Raum vereinigt, ein Vorteil, der uns zum Suchen von Parasiten, zum Studium der Polychromasie usw. wohl zustatten kommt. Die Schichtdicke des Präparates sowie die bewirkte Hämolsierung erlauben uns aber kein genaues Studium gerade der weißen Zellen. Manche Nachteile der zwei genannten Methoden sind, insbesondere was die letztere anbelangt, bei der supravitalen Färbung zu vermeiden. Sie hat nur den Nachteil, daß die in Flüssigkeit sich befindenden Zellen groß und voluminös bleiben und ihre feine Struktur häufig erst bei wechselnder Untersuchung in verschiedenen Ebenen darbieten. Aber die Präparate sind nicht aufzubewahren. Eine Methode, die die Vorteile der oben genannten in sich vereinigt und ihre Mängel weitgehend meidet, ist die Tupfpräparatmethode (Verdichtung der Zellen, gute Differenzierbarkeit). Für den Kliniker, d. h. für die Untersuchung am Kranken, ist ihre Anwendung natürlich beschränkt. Um so mehr gestattet sie uns, die weißen Blutzellen, ihre Vorstufen in den Blutbildungsorganen, die zellige Zusammensetzung verschiedenster Gewebe im Sektionssaal zu studieren. Wir haben die Methode an einem großen Material geprüft; wir untersuchten normale und besonders aber erkrankte Organe bei Blutkrankheiten, wie Leukosen, Reticulosen, Myelome, Lymphosarkome, Lymphogranulome, Anämien und besonders das Knochenmark bei den verschiedensten Erkrankungen. Wir sind überzeugt, daß die Methode für Organe, wie Leber, Knochenmark, Milz usw.

¹ v. Schilling: Anleitung zur Diagnose im dicken Bluttröpfchen, 3. Aufl. Jena 1924.

durchaus zuverlässige und klare Bilder gibt. Die schnelle Diagnose, die als solche häufig schon wünschenswert ist, liefert sie uns ebenso sicher wie der histologische Schnitt; zuverlässiger aber können wir die Art der Zellen sicherstellen, verglichen mit dem Schnittpräparat, in dem diese ja große Veränderungen der Form, Kontur und Färbbarkeit durch den Fixations- und Einbettungsprozeß erleiden. Ein Vergleich zwischen einem Tupfpräparat und einem Schnitt von demselben Organ überzeugt jeden von dieser Tatsache. Wenn sich das Tupfpräparat schon zur Feststellung geringgradiger Abweichungen der Zellzusammensetzung von Organen bewährt, so ist sie noch wertvoller für die Untersuchung dieser Organe bei Erkrankungen, wie Leukosen, bei denen es sich oft um junge, primitive, empfindliche Zellen handelt. Gerade diese Zellen, die leicht beträchtliche Veränderungen durch mechanische, chemische und physikalisch-chemische Einwirkungen erleiden, sind im Tupfpräparat wohl erhalten und gut gefärbt zu untersuchen.

Das Tupfpräparat leistet nicht nur gute Dienste für die Diagnostik an Organen, die schon makroskopisch eine fremde Zellbeimengung oder falsche Zellzusammensetzung erkennen lassen (Organinfiltrate, hyperplastisches Knochenmark), sondern sie ist noch nützlicher für Fälle, die wir wohl als Blutkrankheiten im Sektionssaal erkennen, von denen wir aber nicht sicher entscheiden können, welcher Art die Erkrankung ist (Leukosen). Sowohl die leicht und schnell anzustellende Oxydase-reaktion läßt schnell eine Entscheidung treffen, wie auch ergeben die *Giemsa*-Präparate derart klare Bilder, wie wir sie kaum jemals am Schnittpräparat erzielen können. Mit den Ausstrichpräparaten des Klinikers können sie unbedingt verglichen werden, denn wie diese sind sie ohne Vorbehandlung aus Frischmaterial angefertigt und können wie der Ausstrich nach *Giemsa* gefärbt werden.

Auch besonders schwer zugängliche Objekte, wie das Kinderknochenmark und das sklerotische Mark, sind an Tupfpräparaten wohl zu studieren. Untersuchen wir die Zellen an diesen Objekten im Schnitt nach Entkalkung, so sind ihre Strukturen durchweg weitgehend gestört und schlecht färbbar. Insbesondere läßt sich auch die Hämatopoese beim Embryo mit der Tupfpräparatmethode gut verfolgen. Zum Studium der feinen Histologie der jungen Zellen ist weder der dicke Tropfen, in dem die Erythrocyten und ihre gekernteten Mutterzellen hämolysiert werden, noch der Schnitt, in dem man oft die Mutterzellen der Erythrocyten und Granulocyten, sowie auch die Lymphocyten nicht unterscheiden kann, geeignet.

Außer durch die erwähnten Vorteile machte sich uns die Methode durch die ausgesprochen einfache Technik unentbehrlich. Wir möchten kurz berichten, wie wir unsere Präparate im Sektionssaal herstellen und weiter behandeln.

Das Organ wird mit einem unbedingt sauberen und sehr scharfen Messer ausgeschnitten. Von der Schnittfläche wird ein Würfel von etwa $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ cm Seitenlänge ausgeschnitten. Das Stück wird mit der chirurgischen Pinzette gefaßt, mit der glatten, breiteren Fläche nach unten. Die untere freie Fläche tupft man nun mehrere Male auf sauberem Porzellan oder Glas ab, bis die Fläche „trocken“ erscheint. Das Präparat wird, wenn nicht vorher leicht abgetupft wird, zu dick, stark blutig und färbt sich schlecht. Gleich danach tupft man auf einem sauberen, entfetteten Objektträger wiederholt nacheinander; dabei darf kein besonderer Druck angewendet werden, besonders nicht bei weichen blutreichen Organen (Milz, Knochenmark). Man betupft zweckmäßig verschiedene Objektträger zur Anfertigung verschiedener Färbungen. Zwecks Zeitersparnis können auch einmal verschiedene Organe markiert auf denselben Objektträger getupft werden. Man hat so neben der Zeitersparnis den Vorteil, daß der ganze Fall auf einem einzigen Objektträger gefärbt und untersucht werden kann und bequem aufzubewahren ist. Kinderknochenmark, sowie Röhrenmark des Erwachsenen, das von Knochenbälkchen unterteilt ist, wird zuerst mit dem Knochenmesser ausgeschnitten und, wie oben beschrieben, abgetupft. Ist das Mark stark verknöchert und sehr zellarm, so darf das Stück mit der Pinzette während des Tupfens leicht gepreßt werden, um den Inhalt der Markräume zu gewinnen. Fettiges Knochenmark bietet erhebliche Schwierigkeiten, da das Fett zwischen und über den Markzellen liegend, keine gute gleichmäßige Färbung zuläßt. Wir haben den Versuch gemacht, dieses Fett mit verschiedenen fettlösenden Mitteln zu beseitigen, konnten aber weder eine vollkommene Entfettung, noch einwandfreie Färbungen erzielen. Beim Versuch, durch längere Entfettung übersichtlichere Bilder zu erhalten, mußten wir feststellen, daß die Zellen und Zellkerne ihre ursprünglichen Konturen und gute Färbbarkeit weitgehend einbüßen. Die Entfettungsbehandlung beeinträchtigt auch stark den Ausfall der Oxydasereaktion. Am fettigen Mark ist die Zellform am besten am Schnittpräparat nach Einbettung zu studieren, die Oxydasereaktion ist am Gefrierschnitt anzustellen. Auch wird man versuchen, aus fettreichem Mark hämopoetische Inseln herauszuschälen und von ihnen Tupfpräparate anzufertigen. Die verschiedensten Färbungen liefern gute Bilder. Die Präparate können bald gefärbt werden. Im Gegensatz zum „dicken Tropfen“, der am besten 24 Stunden vor der Färbung trocknet, um ein Abschwimmen zu vermeiden, kann das Tupfpräparat bald weiter bearbeitet werden. Bei Blutkrankheiten genügt es gewöhnlich, die Präparate mit Methylenblau und Giemsa zu färben und die Oxydasereaktion anzustellen. Die kombinierte *May-Grünwald-Giemsa*-Färbung gibt bessere Granulafärbung und feine Differenzierungen. Methylenblau bringt die Nukleolen klarer heraus und erleichtert die Unterscheidung der Normoblasten und ihrer Vorstufen durch ihre

dunkler gefärbten Kerne; auch die Lymphocyten sind bei Methylenblaufärbung gut erkennbar, was dem Ungeübten bei anderen Färbungen oft schwer fällt. Für die Oxydasereaktion verwendeten wir die *Graham-Methode* wie beim Ausstrich. Vorteilhaft färbt man ein etwas dickeres Präparat nur 5 Sekunden lang mit Methylenblau nach.

Es ist zu beachten, daß in Abteilungen, wo viel Formalin gebraucht wird, das Wasser Formoldämpfe löst und dadurch sauer wird, was der *Giemsa-Färbung* schadet. Es empfiehlt sich, solchem Aqua destillata pro Kubikzentimeter 2 Tropfen einer Kalium-Carbonatlösung 1 : 10000 zuzusetzen. Aber auch einfaches Leitungswasser gibt zuverlässige Färbungen.

Die makroskopische Betrachtung eines solchen Präparates zeigt uns, daß das Zentrum des Tupfpräparates immer am intensivsten gefärbt ist, da hier die Zellen in dickster Schicht liegen. Zur mikroskopischen Untersuchung sucht man mit starker Vergrößerung verschiedene gut gefärbte Tupfstellen aus und gewinnt meist dabei schon eine ungefähre Vorstellung von dem Zellbild. Man untersucht dann mit Ölimmersion am Rande, wo die Zellen gewöhnlich einzeln nebeneinanderliegen und oft noch in derselben Anordnung erscheinen, wie sie im Organ zusammenlagen. So finden wir die *Malphigischen* Körperchen der Milz häufig als wechselnd große, dichte Ansammlungen von Lymphocyten. Tupfpräparate der Leber lassen Infiltrate häufig als Zellinseln, allseits von Leberzellen — oft noch in typischer Bälkchenanordnung — umschlossen, erkennen. Organzellen sind immer, am besten die Leberzellen, von fremden Zellen zu unterscheiden. Ihr Kern bietet ein charakteristisches Bild; er liegt im granulierten, leicht gefärbten Protoplasma. Tupfpräparate embryonaler Lebern bieten ein besonderes Bild. Da die Blutzellen locker in ihnen liegen und leicht an dem Objektträger haften, so finden wir große hämopoetische Inseln mit wenigen dazwischenliegenden Leberzellen.

Abgesehen von den lymphatischen Zellhaufen, an denen wir manchmal die *Malphigischen* Körperchen wiedererkennen, bietet die Milz normalerweise ein buntes Bild von Zellen dar; Granulocyten verschiedenen Alters, lymphoide Zellen, Monocyten, Pulpazellen, Erythrocyten, mitunter auch einzelne Erythroblasten; also alle Zellen, die gewöhnlich in der Pulpa zu finden sind. Bei Leukosen ist dieses Bild mehr oder weniger homogen durch das Hervortreten der der Krankheit und ihrem Stadium eigentümlichen Zelle. Tupfpräparate von Lymphdrüsen (gerade diese bieten ja häufig der makroskopischen Diagnose größte Schwierigkeiten: Leukosen, Lymphosarkome, Lymphogranulome, Retikulosen, unspezifische entzündliche Schwellungen) können manchmal bei stärkerer bindegewebiger Durchwachsung recht zellarme Bilder geben. Die Untersuchung mehrerer läßt aber meist eine Diagnose zu.

Wenn so auch häufig das Tupfpräparat eines einzelnen Organes eine sichere oder weitgehende wahrscheinliche Diagnose erlaubt, so kann hier nicht genug betont werden, daß es nie ratsam ist, endgültige Schlüsse

nach Untersuchung eines einzigen Organs zu ziehen. Ist es doch bekannt, daß z. B. die Milz bei den verschiedenen Leukosen weitgehend gleichartige Bilder liefern kann. Wir haben nicht selten die Beobachtung gemacht, daß das Organ bei manchen chronischen Lymphadenosen im Tupfpräparat wie auch im Schnitt ein eher myeloisches als lymphatisches Bild darbietet. *Wir glauben, daß eine endgültige Diagnose immer erst nach Untersuchung aller Organe zu stellen ist.*

Auf einen besonderen, häufig besprochenen Befund in den Präparaten bei bestimmten Fällen möchten wir hinweisen, den man oft geneigt ist, schlechter Technik zuzuschreiben. Man findet manchmal zerflossene bzw. zerrissene Zellen und freie Kerne. Sie finden sich gewöhnlich in Tupfpräparaten bei Lymphadenosen, die mit starker Lymphoblastenbildung einhergehen. Wie schon erwähnt, sind die Meinungen der Untersucher über die Natur der Gebilde im Blutausschlag in der Klinik verschieden. Wenn manche diese Zellen als Reste (Schatten) degenerierter Lymphocyten, die infolge einer toxischen Wirkung im Blute auftreten, ansehen, so möchten wir sie als zirkulierende Lymphoblasten ansehen, die selbst bei der Anfertigung der Tupfpräparate leicht etwas deformiert werden. Der Lymphoblast ist eine sehr druckempfindliche Zelle, empfindlicher als der Myeloblast, der Megaloblast und der Makroblast. Wir betrachten diese „Schattenfiguren“ oder „Zellreste“ als charakteristischen Befund für leukämische, oft auch aleukämische Lymphadenosen.

Wie leicht und schnell die Methode erlaubt, eine Diagnose zu stellen oder einen unsicheren makroskopischen Befund zu bestätigen, möchten wir kurz an einzelnen Beispielen erläutern. Wir wollen an Fällen, bei denen uns meist auch der Kliniker keine richtungsweisenden Angaben machen kann, zeigen, wie sich auch die makroskopischen Organbilder weitgehend ähneln können.

Fälle.

817/33. 58jährige Frau. *Klinische Diagnose.* „Aleukämische Myelose.“ Blutbild: Leukocyten 6000, Basophile 2, Eosinophile 1, Myelocyten 1, Jugendformen 4, Stabkernige 4, Segmentkernige 53, Lymphocyten 33, Monocyten 2, Hämoglobin 45%, Erythrocyten 2,42 Millionen.

Sektion. Milz und Leber stark vergrößert. Innere Lymphdrüsen geschwollen, äußere nicht. Mäßige Schwellung der lymphatischen Apparate des unteren Dünndarms. Morphologisches Bild nicht ganz eindeutig, aber wahrscheinlich aleukämische Lymphadenose.

Tupfpräparate von Milz, Leber, Lymphdrüsen: *Giemsa*-Präparat zeigt große lymphoide Zellen mit meist einem oder zwei Nukleolen, keine Granula (Lymphoblasten). *Oxydase:* Nur vereinzelte oxydasepositive Zellen, besonders in der Milz. Sonst alles negativ.

Die Diagnose muß nach diesem Befund lauten: aleukämische Lymphadenose. Organschnittpräparate bestätigen diese Diagnose.

853/33. 19jähriger Mann. *Klinische Diagnose:* „Panmyelophthase.“ Anämie mit dem Blutbild: Hämoglobin 45%, Erythrocyten 2 Millionen, F.I. 1,1, Leukocyten 6000 fallend auf 3000, davon 85% Lymphocyten. Tod nach operativer Milzentfernung.

Sektion. Leber, Herz, Niere verfettet. Knochenmark besonders der Röhrenknochen stark zellig, zum großen Teil grau. Thymus groß, mit der Umgebung verwachsen. Zwei Halsdrüsen vergrößert.

Diagnose. Lymphosarkomatose?

Tupfpräparate zeigen Leber ohne Infiltrationen. Knochenmark: starke Wucherung von runden, oxydasnegativen Zellen (Lymphocyten), einige haben Nukleolen und ähneln den Lymphoblasten mit allen Übergängen zum kleinen Lymphocyten. *Oxydase*. Außer sehr wenigen alle oxydasnegativ.

Diagnose: höchstwahrscheinlich medulläre Lymphadenose. Schnitte bestätigen diese Diagnose (beschrieben in einer besonderen Arbeit)¹.

1233/33. Mann in mittleren Jahren. *Klinische Diagnose und Sektionsdiagnose*: Lymphogranulom. Hochgradige sehr weiche Schwellung der retroperitonealen, iliacalen und inguinalen Lymphknötchen, starke der thorakalen, etwas geringere der Hals- und Achsellymphknoten. Durchsetzung der vergrößerten Milz mit „Knötchen“, ebenso die Leber. Rote Hyperplasie des Knochenmarks.

Tupfpräparate von Lymphdrüsen, Milz und Leber. Homogene Infiltration mit runden, nichtgranulierten, mittelgroßen Zellen.

Kein buntes Bild, wie man es gewöhnlich bei Lymphogranulom sieht. Die gleichen Zellen sind auch im Knochenmark zu finden.

Diagnose: höchstwahrscheinlich Lymphosarkomatose.

Schnitte ergeben teilweise Lymphombildung, teilweise das Bild der Metastasenbildung in Knochenmark, Nebenniere und Leber, aber gerade hier ist die Lymphombildung nicht in der *Glissonschen Kapsel*, sondern in der Mitte der Läppchen zu finden. Also das Bild eines atypischen Lymphosarkoms.

1347/33. 71jähriger Pensionär. *Klinische Diagnose*: Lymphogranuloma.

Sektionsdiagnose: Aleukämische generalisierte Lymphadenose. Beteiligung der abdominalen, thorakalen und Halslymphknoten und des lymphatischen Apparates des ganzen Dünndarms. Starke Infiltrate der Leber, der Milz und Nieren.

Tupfpräparate: Typisches Bild der Lymphadenose mit vielen Lymphoblasten in Wirbelsäule, Oberschenkelmark, wie auch in Lymphdrüsen, Milz und Leber.

Ausstriche wurden auch gemacht, die die großen Vorzüge des Tupfpräparates gegenüber solchen erkennen ließen.

175/34. 29jähriger Mann. *Klinische Diagnose*: Aplastische Anämie, Magenleiden. Nach klinischer Angabe Leukocyten 1200, 100% Lymphocyten, Hämoglobin 34%, E. 1,859.

Sektionsdiagnose: Aleukämische Lymphadenose. Vergrößerung der cervicalen, paratrachealen, paraaortalen, portalen, inguinalen und axillaren Drüsen. Lymphatische Hyperplasie der Milz. Infiltrate der Leber und Nieren.

Tupfpräparate zeigen sehr große Zellen, den Monocyten ähnlicher als Lymphocyten, oxydasnegativ.

Diagnose. Höchstwahrscheinlich Retikuloze. Schnittpräparate bestätigen diese Diagnose.

Zum Schluß möchten wir ausdrücklich betonen, daß wir nicht behaupten möchten, daß die Tupfpräparatmethode jede andere Untersuchungsmethode ersetzen kann und soll. Sie ist eine wertvolle, unseres Erachtens aber vernachlässigte Bereicherung unserer diagnostischen Möglichkeiten. Sie ist einfach und zuverlässig. Sie unterrichtet uns über Art, Form und feinste Struktur der am Aufbau bestimmter Organe beteiligten Zellelemente. Sie sagt uns aber nichts oder kaum etwas darüber aus, wie diese Elemente in dem Organ zueinander geordnet sind, oder an welchen Stellen und in welchem Maße sich fremde und krankhafte Zellbeimengungen finden. Um diese wichtige, ja vielleicht oft wichtigste Frage zu klären, ist und bleibt das Schnittpräparat unentbehrlich.

¹ Virchows Arch. **292**, H. 3.