

Nowoczesne metody przygotowywania osadów pływu mózgowo-rdzeniowego

Modern methods of cerebrospinal fluid cytology sediments

ANDRZEJ POTEKOWSKI¹, REINHARD LEHMITZ²

- Z: 1. Kliniki Neurologii PAM w Szczecinie
2. Pracowni Pływu Mózgowo-Rdzeniowego Centrum Diagnostyki
i Leczenia Chorób Układu Nerwowego Uniwersytetu w Rostocku

STRESZCZENIE. *Praca zawiera krótki opis stosowanych obecnie metod zagęszczania komórek płynu mózgowo-rdzeniowego do badania cytologicznego. Autorzy oceniają każdą metodę i przedstawiają technikę najnowszą, wypracowaną w ostatnich latach w Rostocku i Szczecinie (red.).*

SUMMARY. *A brief description is presented of currently used methods of the cerebrospinal fluid cells densification for the purposes of cytological examination. Each of these methods is evaluated and the most recent technique developed in Rostock and Szczecin is presented (ed.).*

Słowa kluczowe: płyn mózgowo-rdzeniowy / diagnostyka / osad
Key words: cerebrospinal fluid / diagnostics / cytological sediments

Od 1891 roku, kiedy to Heirich Ireneus Quincke w 38 numerze *Berliner Klinische Wochenschrift* doniósł o pierwszym nakłuciu lędźwiowym, rozpoczęło się znużone opracowywanie metod badania poszczególnych składników płynu mózgowo-rdzeniowego oraz poznania ich zmian w zależności od procesów chorobowych. Mimo tego, że w ostatnich dwudziestu latach ilość wykonywanych punkcji w diagnostyce neurologicznej spadła o około 60%, to jednak w pozostałych przypadkach badanie płynu mózgowo-rdzeniowego ma nadal znaczenie decydujące. Dlatego też obserwujemy stały rozwój metod analizy biochemicznej oraz doskonalenie metodyki oceny cytologicznej.

Przygotowanie preparatów cytologicznych płynu mózgowo-rdzeniowego, potocznie określanymi mianem osadów, z początku oparte było na wirowaniu. Mimo różnorodnych prób, m.in. polegających na wirowaniu na niskich obrotach i w obniżonych

temperaturach, wartość morfologiczna tak powstałych preparatów była niska. Dlatego Bannwarth w 1933 r. i Demme w 1950 r. uznali, że jakościowe badanie komórek płynu mózgowo-rdzeniowego nie ma znaczenia w diagnostyce klinicznej. Analiza cytologiczna komórek została więc ograniczona do ich ilościowego określenia w komorze Fuchsa-Rosenthala.

Postęp w diagnostyce płynu mózgowo-rdzeniowego rozpoczął się właściwie z chwilą wprowadzenia do praktyki laboratoryjnej kamery opracowanej przez Sayka w 1954 r., w której uzyskiwano komórki o dobrze widocznej strukturze. Już pierwsze obserwacje Sayka wykazały, że liczba komórek uznana za prawidłową, nie wyklucza obecności wśród nich komórek patogennych, np. nowotworowych. Od tego czasu wzrosło znaczenie jakościowej oceny cytologicznej płynu mózgowo-rdzeniowego jako metody diagnostycznej i stosowanej do kontroli przebiegu choroby.

Celem wszystkich wprowadzonych metod i ich modyfikacji było:

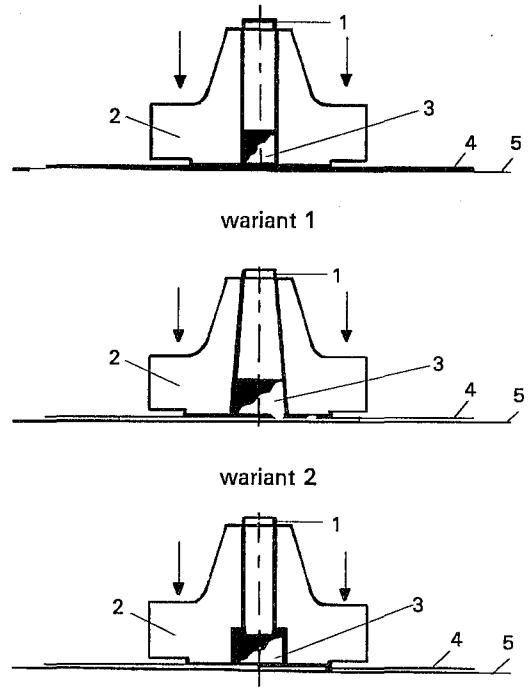
- uzyskanie w osadzie możliwie największej liczby komórek przy jak najmniejszej ilości płynu mózgowo-rdzeniowego potrzebnej do badania,
- zmniejszenie uszkodzenia komórek w trakcie przygotowywania osadu,
- uniknięcie selektywnych strat komórek i przez to uzyskanie osadu zbliżonego do warunków *in vivo* dla danego przypadku,
- opracowanie szybkiej i niepracochłonnej metodyki uzyskiwania osadu płynu mózgowo-rdzeniowego,
- wprowadzenie jak największej liczby barwień i metod cytochemicznych,
- wykorzystanie pozabawionego komórek płynu mózgowo-rdzeniowego do dalszych badań.

Najważniejsze metody uzyskiwania osadu płynu mózgowo-rdzeniowego w kolejności ich pojawiania się, były następujące.

Metoda sedymentacyjna (tzw. „przyspieszonej sedymentacji”) Sayka (1954)

W metodzie tej przyspieszenie sedymentacji uzyskiwano przez umieszczenie między tubusem i szkiełkiem podstawowym bibuły filtracyjnej z otworem o średnicy odpowiadającej przekrojowi tubusa. Komórki osadzały się bezpośrednio na szkiełku podstawowym. Szybkość odsączania płynu mózgowo-rdzeniowego do bibuły zależała od siły nacisku na tubus specjalnego ciężarka. Trwającej 20–30 minut sedymentacji poddawano 1 ml płynu mózgowo-rdzeniowego. Ta metoda przechodząc wiele modyfikacji, przez wiele lat stosowana była przez większość pracowni płynu mózgowo-rdzeniowego w byłej NRD (rys. 1).

Podstawową zaletą tej metody jest bardzo dobry obraz komórki. Wadą natomiast „selektywne gubienie” zwłaszcza małych limfocytów, zależne od konstrukcji kamery bądź dokładności złożenia jej poszczególnych części,

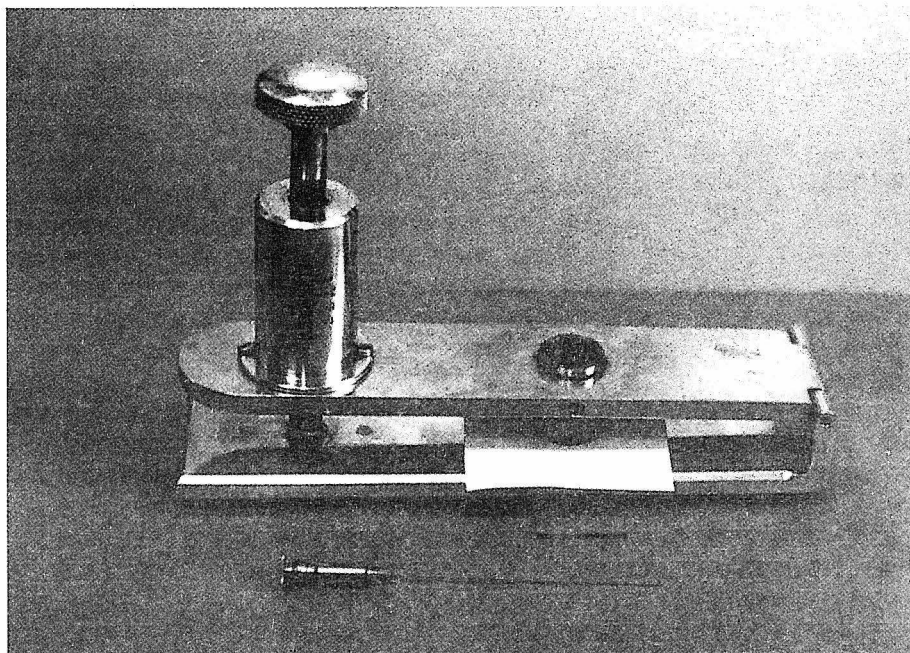


Rysunek 1. Warianty kamery Sayka.

- (1) szklana rurka sedymentacyjna, (2) gumowy tubus, (3) płyn mózgowo-rdzeniowy, (4) bibuła filtracyjna, (5) szkiełko podstawowe.

co powoduje, że stosunek limfocytów i monocytów w cytogramie wynosi 50.5% i 47.7%, co daleko odbiega od warunków *in vivo* (odpowiednio 85% i 15%). Nie może zadowalać również niski wskaźnik wykrycia komórek, tj. stosunek liczby komórek widzianych w kamerze Fuchsa-Rosenthala i osadzie płynu mózgowo-rdzeniowego, który nie przekracza 10%. Wprowadzenie, po latach stosowania metody, zasady wykonywania kilku osadów z jednego płynu mózgowo-rdzeniowego nie zmniejszyło ryzyka utraty istotnych w diagnostyce komórek.

Opartą na zasadzie przyspieszonej sedymentacji kamerą osadową konstrukcji Kulczyckiego stosuje się w pracowni mózgowo-rdzeniowej w Szczecinie. Kamera ta jest mniejsza, lżejsza od kamery Sayka, umożliwia pobieranie płynu mózgowo-rdzeniowego bezpośrednio z igły punkcyjnej [2]. Nacisk tubusa na bibułę filtracyjną reguluje się specjalnie kalibrowaną śrubą (fot. 1).



Fotografia 1. Kamera sedymentacyjna prof. J. Kulczyckiego

Metoda filtracji błonowej (1956)

Wprowadzona przez Seala metoda filtracji płynu mózgowo-rdzeniowego przez mikroporowate błony ulegała najróżniejszym modyfikacjom technicznym i materiałowym. Preparat powstawał na zasadzie osadzania się komórek na filtrze o różnej szerokości porów. Większość materiałów filtracyjnych z racji swego składu chemicznego nie ograniczała możliwości zastosowania różnych barwień. W bogatokomórkowych i wysokobiałkowych płynach mózgowo-rdzeniowych dochodziło jednak do szybkiego zablokowania porów, co utrudniało uzyskanie miarodajnych wyników. Kistler zwiększył skuteczność metody poprzez wprowadzenie w swoim aparacie możliwości wyboru szerokości porów oraz zmiany ciśnienia. Kolmel wykorzystał podciśnienie powstałe w wyniku ssania wytwarzanego przez bibułę filtracyjną. Wadą metody filtracji błonowej i jej modyfikacji było, że stosowane podciśnienie, jak i nadciśnienie,

powodowały zmiany struktury komórek. Zaletą tej metody jest wyższy niż w metodzie Sayka wskaźnik uzyskania komórek, jednakże ich około trzykrotnie mniejsza wielkość, większy polimorfizm i kulisty kształt stanowią istotne utrudnienia w ocenie cytologicznej.

Metoda Simona i Schroera (1963)

W metodzie tej doprowadzano do powstawania skrzepu w płynie mózgowo-rdzeniowym przez dodawanie do niego roztworu fibrynogenu. Powstały skrzep tworzył sieć o wąskich, gęstych oczkach, w których teoretycznie powinny zatrzymywać się wszystkie komórki. Następnie skrzep poddawany został ścisnieniu pomiędzy dwoma szkiełkami podstawowymi. W ten sposób płyn mózgowo-rdzeniowy, pozbawiony komórek, zostawał wyciśnięty ze skrzepu. Jedno ze szkiełek suszono, a następnie preparat barwiono. Widoczna siatka fibrynogenu nie utrudniała oceny mikroskopowej.

Metoda sedymentacyjna Sörnasa (1967)

Gładko oszlifowany koniec szklanej rurki o przekroju wewnętrznym 10 mm zanurzano w płynnej wazelinie i ustawiano na szkiełku podstawowym. W tak powstałej komorze po stężeniu wazeliny umieszczano około 0,7 mm płynu mózgowo-rdzeniowego. Po godzinnej sedymentacji większą część płynu usuwano pipetą, a resztę odsączano, używając bibuły filtracyjnej. Wazelinę suszono, następnie usuwano, a preparat barwiono.

Zarówno metoda Simona i Schroera jak i Sörnasa stosowane były krótko w niewielu laboratoriach.

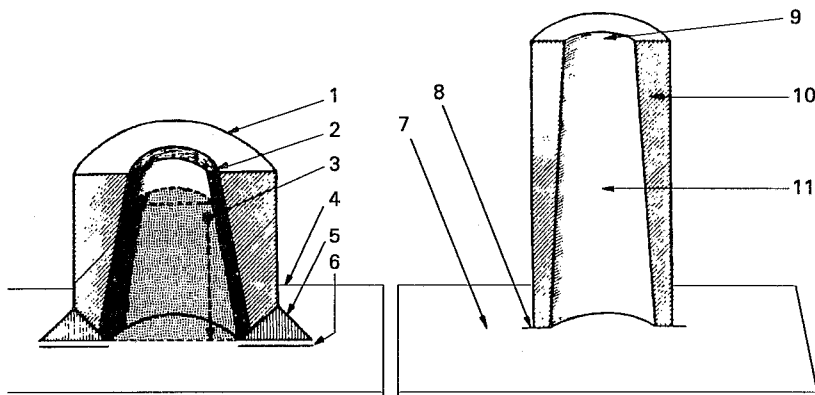
Kamera sorpcyjno-sedymentacyjna Sayka i Lehmitza (1979)

W metodzie tej (rys. 2), stosowanej szeroko w latach osiemdziesiątych, korzystano z jednorazowego tubusa, wykonanego z ceramicznego tworzywa (Kawenit IN KER 63), który mocowano środkiem klejącym bezpośrednio na szkiełku podstawowym. Po wstępnym nasączeniu wewnętrznej ściany tubusa 0.9% roztworem NaCl, 1 ml płynu mózgowo-rdzeniowego poddawano sedymentacji przez około 60 minut [7]. W czasie, kiedy płyn wnikał do ścianek tubusa, komórki osadzały się na szkiełku podstawowym. Autorzy tej metody opracowali również modyfikację

umożliwiającą odzyskiwanie płynu mózgowo-rdzeniowego do innych badań [4].

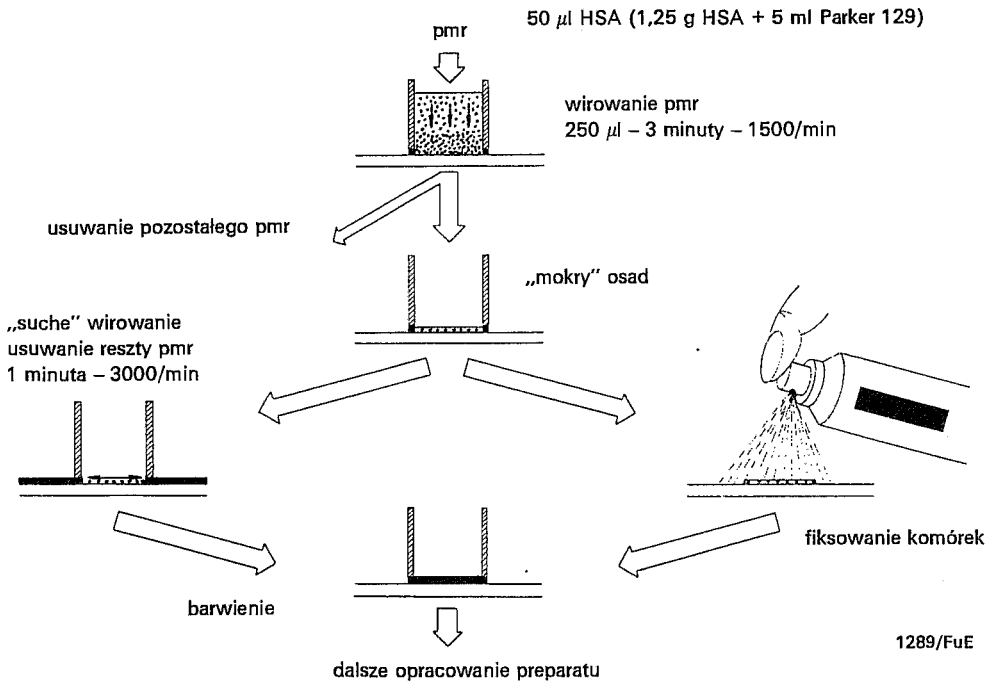
Wirowanie

Wzrost znaczenia technik wirowania datuje się od 1984 roku, kiedy to pojawiły się wirówki przystosowane do analiz cytologicznych firmy Schandon i Hettich. Są one obecnie najczęściej stosowane w praktyce. W przeciwieństwie do starszych metod, obecne wykorzystują już podczas wirowania bezpośrednie osadzanie komórek na szkiełku podstawowym lub nakrywkowym, które po zakończeniu barwienia zakładane jest na szkiełku podstawowym. W wirówce Schandon Cytospin 2 i w powszechnie stosowanej w Niemczech wirówce Hetticha reguluje się wszystkie parametry wirowania. Większość metod opiera się na dwuetapowym wirowaniu. W pierwszej fazie odbywa się wirowanie płynu mózgowo-rdzeniowego, a w drugiej, po wprowadzeniu uzyskanych komórek do wzbogaconego białkowo roztworu płynu mózgowo-rdzeniowego, następuje ponowne wirowanie. Wolny od komórek płyn z pierwszego wirowania można wykorzystać do innych analiz. W pracowniach płynu mózgowo-rdzeniowego, w których pracują autorzy, korzysta się z wirówki Hettich Universal 1200, przeprowadzając wirowanie dwuetapowo (rys. 3).



Rysunek 2. Warianty kamery sorpcyjno-sedymentacyjnej.

(1) i (9) – kamery różnych wymiarów, (2) i (10) – różne grubości ścianek kamery, (3) i (11) – różnej wysokości słup płynu mózgowo-rdzeniowego, (4) i (7) – szkiełka podstawowe, (5) powierzchnia stykająca kamery i szkiełka podstawowego, (6) i (8) – środek klejący.

Rysunek 3. Poszczególne etapy przygotowywania osadu w metodzie wirowania (*Hettich Universal*)

W pierwszej fazie w specjalnej kamerze osadzonej na szkiełku podstawowym wiruje się przez 3 minuty z prędkością 1 500 obr./min. 200 μ l płynu mózgowo-rdzeniowego z dodatkiem 50 μ l roztworu albuminy ludzkiej. Pamiętać należy, że wielkość powierzchni przekroju kamery uzależniona jest od wstępnej oceny liczby komórek w kamerze Fuchsa-Rosenthala: do 20 000 komórek/l – 30 mm², powyżej 20 000 komórek/l – 60 mm². Po wirowaniu nadmiar płynu w ilości 200 μ l usuwa się z kamery pipetą Hamiltona. Tak powstały „mokry osad” poddawany jest wirowaniu w drugiej kamerze z bibułą filtracyjną przez jedną minutę z prędkością 3 000 obr./min., a uzyskany osad jest barwiony. Do przygotowania osadów używa się szkiełek podstawowych, pokrytych polikationem (PDDA). Z wcześniejszych obserwacji wiadomo, że przygotowane szkiełka poprzez wysoką adhezję lepiej „wychwytywać” komórki. W innych ośrodkach do nawarstwiania szkiełek stosuje się poli-1-lizynę [6].

Metodyka ta jest obecnie wprowadzona do szeregu krajowych laboratoriów płynowych, przede wszystkim ze względu na wysoki wskaźnik uzyskania komórek, wynoszący dla granulocytów 48.1%, dla komórek plazmatycznych i mitoz blisko 100%, a dla erytrocytów i hemosyderynofagów około 65% (tabl. 1, 2). Kolejnymi zaletami są wysokiej jakości komórki oraz zbliżony do warunków *in vivo* stosunek limfocytów i monocytów wynoszący 84.4% i 14.8% (tabl. 3). Wszystkie te cechy są szczególnie istotne w przypadku płynów mózgowo-rdzeniowych ubogokomórkowych, a wysoki wskaźnik wykrycia komórek plazmatycznych wyróżnia wirowanie jako metodę opracowania osadów w diagnostyce przewlekłych chorób zapalnych o.u.n. [3, 5].

Tablica 1. Wskaźnik wykrycia komórek liczony dla leukocytów

	Wirówka	Kamera
Lekocyty (N=30)	48.1%	9.4%

Tablica 2. Wskaźniki wykrycia komórek

	Wirówka	Kamera
Komórki plazmatyczne	100%	30%
Erytro- i hemocydynofagi	65%	100%
Mitozy	100%	18%

Tablica 3. Stosunek limfocytów do monocytów w wirówce i kamerze Sayka

	Limfocyty	Monocyty
Wirówka	84.4	14.8
Kamera	50.5	47.7

Na podkreślenie zasługuje dostępność wirówki polskiej konstrukcji, warszawskiej firmy MPW. Zestaw do przygotowania osadów (Cytoset) jest, ze względu na swoją innowacyjną konstrukcję pozwalającą równocześnie opracowywać osad i odzyskiwać pozbawiony komórek płyn, szczególnie interesującym rozwiązaniem technicznym. Badanie przeprowadzone w Pracowni Płynu Mózgowo-Rdzeniowego Kliniki Neurologii w Szczecinie wykazały, że wskaźniki uzyskania komórek są wysokie i zbliżone do uzyskiwanych na sprzęcie produkcji zachodniej.

Brak w dalszym ciągu metody spełniającej wszystkie określone na wstępie cechy, a zwłaszcza zatrzymanie w osadzie wszystkich komórek, inspirowane do dalszych poszukiwań. Swoją prostotą i oryginalnością zwraca uwagę konstrukcja Hastki – „Liquorette”, wykorzystująca pole magnetyczne [1]. Dalej nie

ustaje w poszukiwaniach profesor Johannes Sayk, który w ostatnich latach, już po przejściu na emeryturę, opracował i opatentował kilka kolejnych rozwiązań [8]. Nie jest wykluczone, że po ponad 30 latach od opracowania swojej słynnej kamery, to właśnie jego rozwiązanie stanie się w najbliższej przyszłości techniką przygotowania osadów płynu mózgowo-rdzeniowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Hastka J.: Einrichtung und Verfahren zur einfachen Herstellung von Liquor preparaten. Lab. Med. 1991, 15, 404.
2. Kulczycki J.: Atlas cytologiczny płynu mózgowo-rdzeniowego. PZWL, Warszawa 1988.
3. Lehmitz R., Kleine T.O.: Liquorzitologie: Ausbeute, Verteilung und Darstellung von Leukozyten bei drei Sedimentationsverfahren im Vergleich zu drei Zytocentrifugen – Modifikationen. Lab. Med. 1994, 18, 1.
4. Lehmitz R.: Vorrichtung zur spontanen Sedimentation von Zellen des Liquor – cerebrospinalis auf Objektträgern. Medizintechnik 1988, 28, 86.
5. Lehmitz R.: Liquorzellanreicherung mit der Sedimentkammern – Vergleichende methodische Untersuchungen. Psychiat. Neurol. Med. Psychol. 1988, 40, 228.
6. Lehmitz R.: Verwendung von polykationen – beschichteten Objektträgern für Zellanreicherungverfahren. Z. Med. Lab. Diag. 1987, 28, 222.
7. Sayk J., Lehmitz R.: Die Sorptionskammer. Dt. Gesundh.-Wesen. 1979, 34, 256.
8. Sayk J.: The sorption ring chamber for spontaneous cell sedimentation and cytocentrifugation. VCH Verlag, Weinheim 1993.

Adres: Dr Andrzej Potemkowski, Klinika Neurologii PAM,
ul. Unii Lubelskiej 1, 71-344 Szczecin