

Aussagekraft oberflächenzytologischer Untersuchungen zur
Diagnostik von Hirnerkrankungen

von Sonja Christine Wünsche

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Aussagekraft oberflächenzytologischer Untersuchungen zur
Diagnostik von Hirnerkrankungen

von Sonja Christine Wünsche

aus München

München 2016

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Institut für Tierpathologie

Abteilung für klinische und vergleichende Neuropathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Stellenwert und Möglichkeiten zytologischer Untersuchungen (im Vergleich zur Histologie)	3
2.	Zytologische Grundtechniken	4
2.1.	Probengewinnung.....	4
2.2.	Anfertigung der Ausstriche	6
2.3.	Methoden der Fixierung	8
2.3.	Färbungen	9
3.	Indikationen für neurozytologische Untersuchungen.....	11
3.1.	Liquorzytologie	12
3.1.1.	Entnahmetechniken	12
3.1.2.	Untersuchungen des Liquors.....	13
3.1.3.	Die Anfertigung zytologischer Präparate	13
3.1.4.	Die zytologische Untersuchung des Liquors	14
3.2.	Zytologie aus Läsionen	14
3.3.	Stereotaktische Biopsien	15
3.4.	Anwendung der Zytologie für die postmortale Untersuchung.....	16
4.	Vorgehensweise zur Anfertigung und Auswertung von Abklatschzytologien des ZNS und von Hirnläsionen	17
5.	Zellen des ZNS.....	18
5.1.	Neurone.....	18
5.2.	Gliazellen	20
5.3.	Weitere Zellen des ZNS.....	21
5.4.	Zytologisches Erscheinungsbild der weißen Substanz	21
5.5.	Zytologisches Erscheinungsbild der grauen Substanz	22
III.	PUBLIKATION	23
IV.	DISKUSSION	52
1.	Zielsetzung der Studie.....	52

2.	Praktikabilität oberflächenzytologischer Untersuchungen am Gehirn.....	53
3.	Ergänzende Aspekte zu bisherigen Aussagen zur Normozytologie des ZNS.....	56
4.	Überprüfung der Ergebnisse mit Augenmerk auf dem Vergleich unterschiedlicher Erkrankungsgruppen.....	59
5.	Empfehlung für die zytologische Untersuchung postmortaler Proben der Hirnoberfläche.....	63
6.	Ausblick.....	67
V.	ZUSAMMENFASSUNG	69
VI.	SUMMARY.....	71
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	73
VIII.	ANHANG	81
1.	Methoden.....	81
1.1.	Herstellung der zytologischen Präparate.....	81
1.2.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE).....	81
1.3.	Modifizierte Färbung nach Wright.....	81
2.	Materialien.....	82
2.1.	Verwendete Chemikalien.....	82
2.2.	Verwendete Lösungen.....	83
2.3.	Verwendete Geräte.....	83
2.4.	Verwendete Software.....	84
IX.	DANKSAGUNG	85

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
µm	Mikrometer
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
G	Gauge
HE	Hämatoxylin/Eosin
kg	Kilogramm
Liquor	Liquor cerebrospinalis
min	Minuten
ml	Milliliter
modWS	modifizierte Färbung nach Wright
MRT	Magnetresonanztomographie
Mx	Meninx
NID	nicht infiltrative Erkrankungen
PCR	Polymerase Chain Reaction
sec	Sekunden
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

I. EINLEITUNG

Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) sind vielfältig und führen häufig zu Ausfällen, aus denen sich die Ursache oder Art der Erkrankung nicht ablesen lässt. So können unterschiedliche Ätiologien ein und dieselben neurologischen Symptome verursachen. Beispielsweise kann ohne weitere Diagnostik ein entzündlicher Prozess anhand der Semiologie nicht von einem tumorösen, vaskulären, oder degenerativen Geschehen unterschieden werden.

Die fortschrittliche bildgebende Diagnostik kann mit Sicherheit einen großen Beitrag leisten und die Unterscheidung struktureller Hirnläsionen erleichtern. Nach einer humanmedizinischen Studie von 2014 ist die Unterscheidung von Hirntumoren und nicht-neoplastischen Hirnerkrankungen mit Hilfe von Magnetresonanztomographie in 78,2 % der Fälle möglich (ALAM et al., 2014). Auch die Magnetresonanztomographie (MRT), zur Erkennung von Hirntumoren bei Hunden und sogar zur Tumortypisierung, stellt ein erfolgreiches Bildgebungsverfahren dar (RODENAS et al., 2011). Jedoch kann eine ätiologische Diagnose mittels bildgebender Verfahren nicht sicher gestellt werden.

Der morphologischen Untersuchung des Gewebes kommt hierbei eine wichtige Rolle zu. Für die Diagnostik von Erkrankungen des ZNS kommen die Histologie und die Zytologie zum Einsatz. Die Histologie wird für die Untersuchung von Biopsiematerial aus Operationen am ZNS angewendet, sowie standardmäßig zur postmortalen Diagnostik von ZNS-Gewebe. Für die histologische Untersuchung wird jedoch mehr Gewebe benötigt als für die Zytologie. Das weniger invasive Verfahren, die Zytologie, findet in der Neurologie hauptsächlich Anwendung zur intravitalem Diagnose entzündlicher oder neoplastischer Erkrankungen. Dabei stellt die Liquorzytologie das am meisten angewandte Verfahren dar (COWELL et al., 2008), gefolgt von Sofortdiagnostik von Tumoren während einer Operation oder Nadelbiopsie (DE LORENZI et al., 2006). Die meisten Studien befassen sich mit der Zytologie von Tumoren, doch darüber, inwieweit sich auch andere Pathologien in einer zytologischen Probe des ZNS erkennen lassen, gibt es bis dato nur wenige Informationen. Ebenso ist bisher wenig über den Informationsgehalt bekannt, der aus einem zytologischen Abklatsch der

Hirnoberfläche gewonnen werden kann und ob er möglicherweise für die postmortale Diagnostik oder sogar für die operationsbegleitende Diagnostik von Nutzen sein könnte.

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel den diagnostischen Wert von nicht-invasiven Abklatschzytologien der Hirnoberfläche neurologisch auffälliger Tiere mit unterschiedlichen Entitäten, zu untersuchen und mit der Histologie zu vergleichen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Stellenwert und Möglichkeiten zytologischer Untersuchungen (im Vergleich zur Histologie)

Routinemäßig wird die Histologie als Standarduntersuchungsmethode für die meisten Gewebearten, wie auch für Proben aus dem ZNS, für die morphologische Diagnostik genutzt. Die Bedeutung des Begriffs „Histologie“ lässt sich aus dem Griechischen ableiten, „histos“ („Gewebe“) und „logos“ („Lehre“), und stellt die Wissenschaft von biologischem Gewebe dar. Bis das histologische Präparat auf dem Objektträger fertiggestellt ist, sind jedoch einige Schritte notwendig, in denen das Gewebe vorbehandelt werden muss. Die Bearbeitung beansprucht einige Zeit, sodass sich die Diagnosestellung hinauszögert. Auf dem fertigen histologischen Präparat bleibt die Architektur des Gewebes erhalten, und Veränderungen können so im Kontext des Gewebes betrachtet und bewertet werden.

Die zytologische Untersuchung dagegen wird meist zur Schnelldiagnostik verwendet. Da für die Zytologie keine Vorbehandlung des Gewebes vor dem Färben erforderlich ist, steht der fertige Objektträger viel schneller zur Verfügung, und eine Untersuchung kann so frühzeitig wichtige Informationen liefern, wenn auch nicht immer eine definitive Diagnose. Außerdem hat sie den Vorteil, dass keine große technische Ausstattung erforderlich und sie einfach und kostengünstig durchführbar ist. Nur eine geringe Menge an Gewebe ist notwendig, um ein zytologisches Präparat anzufertigen, sodass das Gewebe für die histologische Untersuchung erhalten werden kann (PEIFFER et al., 2002). Auch wenn die Architektur des Gewebes nicht erhalten bleibt, wie bei der Histologie, ist doch in manchen Fällen eine Art strukturierte Verteilung der Zellen zu beobachten. Dies gilt allerdings nicht für zytologische Präparate, die aus flüssigen Proben, wie zum Beispiel dem Liquor cerebrospinalis (im Folgenden Liquor genannt), angefertigt wurden. Auch wenn die Dicke der zytologischen Präparate variiert und teilweise Überlagerungen von Zellen vorhanden sind, ist meist ein einschichtiger Zellrasen vorhanden. Dieser ermöglicht im Gegensatz zur Histologie eine bessere Beurteilung der einzelnen Zelle und liefert wertvolle nukleäre und zelluläre Details, die vor allem bei der Bewertung von Tumorzellen von großer Bedeutung sind (JÖRUNDSSON et al., 1999; SHARMA und DEB, 2011). Die klinischen

Daten und die genaue Lokalisation der Probennahme sind für die Beurteilung der zytologischen Proben wichtiger als bei Schnittpräparaten, um so vermeidbare Fehler auszuschließen. Beiden gemeinsam ist jedoch, dass sie auf die Anwesenheit veränderter Zellen in der Probe angewiesen sind. Die Histologie gilt zwar als Goldstandard für die morphologische Diagnose, doch liefert die Zytologie eine diagnostische Genauigkeit von bis zu 90% der Fälle (FIRLIK et al., 1999).

2. Zytologische Grundtechniken

2.1. Probengewinnung

Die Zytologie gewinnt im Rahmen minimal-invasiver Methoden immer stärker an Bedeutung. Besonders wichtig sind die Gewinnung zytologischer Proben und die Anfertigung zytologischer Präparate, da hier die Zellen nicht sichtbar sind und es schwierig zu kontrollieren ist, ob eine Probe adäquat ist oder nicht (MISCHKE, 2005). Hauptsächlich kann durch Erfahrung und ständige Verbesserung der Technik die Anzahl nichtdiagnostischer Proben minimiert und so die Ergebnisse verbessert werden (COWELL et al., 2008). Jedoch ist auch die Wahl der richtigen Probennahmetechnik je nach Gewebebeschaffenheit entscheidend (KRISHNANI et al., 2012).

Es gibt vier verschiedene Techniken der Probengewinnung für die zytologische Untersuchung: die Feinnadelpunktionstechnik, die Abklatschtechnik, die Schabetechnik und den Abstrich.

Die Feinnadelpunktionstechnik ist die am häufigsten angewandte Methode. Sie kann mit oder ohne Aspiration durchgeführt werden und eignet sich am besten für die Beprobung von Massen oder proliferativen Läsionen, besonders von Haut und Unterhaut, sowie zur Probengewinnung von glandulären Organen wie Lymphknoten. Um von inneren Organen minimal-invasive Proben zu gewinnen, ist die Feinnadelpunktion ebenfalls die Methode der Wahl. Dazu werden 22- bis 25-G Kanülen und 3- bis 20-ml Spritzen verwendet (COWELL et al., 2008).

Die Abklatschtechnik kann genutzt werden bei ulzerierten oder exsudativen, oberflächlichen Läsionen oder für Gewebe, das bei Operationen oder Sektionen gewonnen wird. Bei oberflächlichen Läsionen dient sie vor allem dazu, Neoplasien oder Infektionserreger nachzuweisen. Für die Anfertigung von

Abklatschpräparaten von chirurgisch entnommenem Probenmaterial ist es wichtig, dass das Gewebe angeschnitten wird, um eine frische Oberfläche für den Abklatsch zu erhalten. Danach sollte Blut und Gewebsflüssigkeit mit einem sauberen, absorbierenden Material abgetupft werden, da sonst die Gewebezellen schlechter auf dem Objektträger haften bleiben und sich nicht wie gewöhnlich bei zytologischen Präparaten in ihrer Größe und Form ausbreiten. Das vorbereitete Gewebe wird anschließend mit leichtem Druck mehrere Male hintereinander auf einen Objektträger aufgetupft. Wenn ausreichend Abklatschpräparate angefertigt wurden, sollte das verwendete Gewebe in Formalin verbracht werden, um anschließend für die histologische Untersuchung zur Verfügung zu stehen (COWELL et al., 2008).

Die Schabetechnik findet seltenere Anwendung als die zwei schon beschriebenen Techniken. Sie kann eingesetzt werden bei äußerlichen Läsionen oder auch bei Gewebe aus Operationen oder Sektionen. Üblicherweise weisen Schabepreparate höhere Zellgehalte auf als Abklatschpräparate, und sind deshalb bei derbem Gewebe zu favorisieren (MISCHKE, 2005). Bei trockenen und flachen Hautläsionen sind sie ebenfalls von Vorteil, da ansonsten die Zelldichte zu niedrig ist. Angefertigt werden die Schabepreparate indem eine Skalpellklinge mehrmals senkrecht zur Läsion in Richtung des Probenentnehmers, geschabt wird. Bei trockenen Hautläsionen muss drauf geachtet werden, dass tief genug geschabt wird, sodass Serum beziehungsweise Blut austritt. Diese Flüssigkeit wird dazu beitragen, dass die Zellen besser auf dem Objektträger haften bleiben und auch beim Färben nicht abgewaschen werden (COWELL et al., 2008). Soll die Technik für Gewebeproben aus Operationen genutzt werden, so muss das Gewebestück wie bei der Abklatschtechnik frisch angeschnitten und trocken getupft werden, bevor ein Geschabsel genommen wird. Das gewonnene Material wird auf die Mitte des Objektträgers aufgetragen und entweder mit der Skalpellklinge direkt verstrichen oder mit einer der später beschriebenen Techniken verteilt (COWELL et al., 2008).

Abstriche werden eigentlich nur angewendet, wenn keine der anderen Techniken in Frage kommt, wie zum Beispiel für Proben von Nase, Vagina oder Außenohr. Dazu werden sterile Tupfer oder Bürsten benutzt, die vorsichtig über die Läsion gerollt werden (MISCHKE, 2005). Ist die Läsion feucht, muss der Tupfer beziehungsweise die Bürste nicht angefeuchtet werden. Ist das nicht der Fall, so

sollte die Stelle mit einer sterilen NaCl-Lösung befeuchtet werden, um die Zerstörung der Zellen während der Probenahme und Präparateherstellung auf ein Minimum zu reduzieren. Wenn der Abstrich genommen ist, wird der Tupfer oder die Bürste ohne Druck auf die Oberfläche eines Objektträgers gerollt, um so die Zellen zu übertragen und möglichst wenig Zellzerstörung zu provozieren (COWELL et al., 2008).

2.2. Anfertigung der Ausstriche

Nach der Probengewinnung ist für die Anfertigung von zytologischen Präparaten die Wahl der optimalen Technik von Bedeutung, mit Ausnahme der oben beschriebenen Abklatschtechnik, welche die Gewinnung und Anfertigung in einem Schritt verbindet. Bei flüssigen Proben ist, je nach Zellgehalt, noch eine Vorbereitung der Probe notwendig. Ist der Zellgehalt niedrig, kann die Probe durch Sedimentation oder Zentrifugation konzentriert werden. Generell stehen vier Techniken zur Herstellung der Ausstriche zur Verfügung, die je nach Art und Konsistenz der Probe ausgewählt werden. Dies sind die Auseinanderziehtechnik, die Blutausstrichtechnik, die Linienausstrichtechnik und die Verteilung der Zellen mit einem spitzen Gegenstand (COWELL et al., 2008).

Die Auseinanderziehtechnik ist die beste Methode um Präparate anzufertigen, wenn die Probe mit der Feinnadelpunktion oder Schabetechnik gewonnen wurde. Ziel hierbei ist es eine dünne Schicht mit einem einschichtigen Zellrasen herzustellen, ohne dass dabei die Zellen aufgrund der Scherkräfte rupturieren. Die hierbei wirkenden Scherkräfte führen dazu, dass auch Zellverbände genügend weit ausgebreitet werden, um anschließend adäquat beurteilt werden zu können (MISCHKE, 2005). Das gesammelte Material wird nahe an einer Seite des Objektträgers aufgetragen. Ein zweiter Objektträger wird senkrecht zu dem ersten und auf diesem direkt über der Probe aufgelegt. Meist breitet sich die Probe allein durch das Gewicht des Objektträgers beziehungsweise durch die Adhäsionskraft bei Flüssigkeiten schon zwischen den zwei Objektträgern aus, sodass eine ausreichende Verteilung der Zellen gegeben ist. Ist die Probe dicker, kann leichter Druck mit dem zweiten Objektträger ausgeübt werden, der jedoch während des Ausstreichens wieder aufgehoben werden soll. Dann wird der zweite Objektträger leicht über die gesamte Länge des ersten gezogen, um so die Probe auszubreiten. Wichtig ist, dass währenddessen kein externer Druck ausgeübt wird und die Objektträger nicht gegeneinander verkippt werden, da sonst der Großteil der

Zellen rupturieren kann. Dies stellt besonders in den Händen unerfahrener Untersucher einen großen Nachteil der Auseinanderziehtechnik dar (COWELL et al., 2008).

Bei flüssigen Proben oder Proben die ausreichend Flüssigkeit oder Blut enthalten, kann die Blutausstrichtechnik angewendet werden. Das ist zum Beispiel oft bei Feinnadelaspiraten von Lymphknoten der Fall. Diese Technik hat den Vorteil, dass sie schonender für die Zellen ist, besonders bei empfindlichen Zellpopulationen, und im Allgemeinen einen dünnen Ausstrich mit intakten, gut ausgebreiteten Zellen produziert. Jedoch werden Verbände von Zellen schlechter ausgebreitet (MISCHKE, 2005). Es wird ein Tropfen der Probe, wie bei der Auseinanderziehtechnik, auf den Objektträger nahe eines Endes aufgetragen. Dann wird ein zweiter Objektträger im 45-Grad Winkel vor dem Probematerial auf den ersten aufgesetzt und zu etwa einem Drittel in die Probeflüssigkeit zurückgezogen, sodass die Flüssigkeit an der Objektträgerkante verläuft. Nun wird der zweite Objektträger schnell aber gleichmäßig vorwärts geschoben, wie bei einem Blutausstrich üblich. Der Ausstrich sollte in einer Fahne enden, die nicht ganz bis zum Ende des Objektträgers reichen darf, damit sie noch gut anfärbbar und beurteilbar bleibt. Aus diesem Grund muss darauf geachtet werden, dass nicht zu viel Probematerial aufgetragen wird (COWELL et al., 2008).

Wenn zur Konzentrierung einer zellarmen Probe keine Zentrifuge oder ähnliches zur Verfügung steht, kann die Linienausstrichtechnik der Aufkonzentrierung dienen. Allerdings ist hier die Ausbreitung der Zellen oft nicht ausreichend, um diese anschließend gut beurteilen zu können. Hierfür wird der Ausstrich wie oben beschrieben durchgeführt, nur dass er abrupt beendet wird, indem der obere Objektträger nach dreiviertel der Länge des Ausstrichs nach oben abgehoben wird und nicht in einer Fahne endet. So entsteht eine Linie mit erhöhter Zelldichte im Vergleich zum restlichen Ausstrich.

Eine andere Möglichkeit Ausstriche aus Aspiraten anzufertigen ist die Verteilung der Zellen mit einem spitzen Gegenstand. Dies ist besonders geeignet, wenn nur wenig Probematerial zur Verfügung steht. Hierbei wird das Probematerial mit der Spitze einer Kanüle in verschiedene Richtungen sternartig verteilt. Bei dieser Technik werden die Zellen meist gut erhalten, doch um die Zellen herum bleibt eine dicke Schicht Gewebsflüssigkeit vorhanden, die einer guten Ausbreitung der Zellen entgegenwirkt und die Beurteilung der Zelldetails erschwert (COWELL et

al., 2008).

2.3. Methoden der Fixierung

Eine Fixierung der Zellen ist nötig als Grundlage für eine Färbung und spätere Beurteilung der zytologischen Präparate. Die wichtigsten Faktoren einer Fixierung sind der Zellerhalt, die Zellstabilisierung, eine reaktionsfreudige Grundlage für die Färbung zu schaffen und die Permeabilität der Zellmembran für die Farbstoffe zu erhöhen (BOON und DRIJVER, 1986).

Die Lufttrocknung ist die am häufigsten genutzte Fixiermethode in der Tiermedizin. Sie bewirkt ein Abflachen der Zellen und damit einen vergrößerten Durchmesser der Zellen. Um ein optimales Ergebnis zu erhalten, sollten die Zellen rasch trocknen (JÖRUNDSSON et al., 1999). Eine Nachfixierung nach der Lufttrocknung zum Beispiel mit Methanol begünstigt eine Anfärbung des Chromatins (BOON und DRIJVER, 1986). Bei einer flüssigen Probe ist die Lufttrocknung allerdings problematisch, da die Proben nur langsam trocknen und die Flüssigkeit zunehmend hyperton wird, was zu vermehrter Zellerstörung und somit schlechtem Zellerhalt führen kann (STANLEY und LÖWHAGEN, 1993; NG et al., 1994).

Schon 1937 wurde die Nassfixierung für die Diagnostik von Hirntumoren eingesetzt (RUSSELL et al., 1937). Meist kommt für die Nassfixierung 95%iges Ethanol zum Einsatz. Es können auch Benetzungssprays verwendet werden, die gleichzeitig die Zellen fixieren und sie vor Schäden durch Austrocknung bewahren (JÖRUNDSSON et al., 1999). Ein gewisser Grad Lufttrocknung ist während der Anfertigung eines Ausstriches unvermeidbar und ist auch nötig, damit die Zellen auf dem Objektträger haften bleiben. Deshalb sollte zumindest der untere Teil der Zellen, die am Objektträger haften, getrocknet sein, bevor eine Nassfixierung erfolgt. Jede zusätzliche Lufttrocknung führt jedoch zu irreversiblen Zellschäden und zu Artefakten (SCHULTE, 1986).

Als Alternative zur Nassfixierung kann die Rehydrierung von luftgetrockneten Präparaten verwendet werden. Diese bietet eine vergleichbare Qualität der Zellmorphologie wie die Nassfixierung und verhindert die durch Lufttrocknung bedingte Bildung von Artefakten (JÖRUNDSSON et al., 1999). Eine Studie von Chan und Kung hat gezeigt, dass sich physiologische Kochsalzlösung am besten für eine Rehydrierung eignet, und der Zellerhalt hierbei vergleichbar oder sogar

besser ist als bei nassfixierten Präparaten (CHAN und KUNG, 1988). Weitere Vorteile der Rehydrierung mittels Kochsalzlösung sind unter anderem ein besserer Erhalt der Zellen, Hämolyse von verdunkelnden Erythrozyten, wodurch andere Zellen besser beurteilt werden können, ein sauberer Hintergrund und eine leichte Abflachung und Vergrößerung der Zellen (NG et al., 1994; YANG und ALVAREZ, 1995; JONES, 1996).

2.4. Färbungen

Ob die zytologischen Präparate luftgetrocknet oder nassfixiert werden, hängt von der ausgewählten Färbung ab. Es werden verschiedene Typen von Färbungen für die zytologische Untersuchung genutzt (JÖRUNDSSON et al., 1999). Diese umfassen hämatologische Färbungen vom Romanowsky-Typ, Schnellfärbungen vom Romanowsky-Typ, Vitalfärbungen, wie New-Methylenblue, und Tri- und Polychromatische Färbungen. In der Veterinärmedizin kommen am häufigsten hämatologische Färbungen vom Romanowsky-Typ und deren Schnellfärbungen für die zytologische Diagnostik zum Einsatz (JÖRUNDSSON et al., 1999). Nicht nur die unterschiedlichen Färbereigenschaften sind von Bedeutung für die Wahl der Färbung, sondern auch inwieweit der Untersucher mit den Effekten der Färbung auf die Morphologie der Zellen vertraut ist (MISCHKE, 2005).

Hämatologische Färbungen vom Romanowsky-Typ umfassen Färbungen wie die modifizierte Wright-Färbung, Giemsa-Färbung, die May-Grünwald-Giemsa-(Pappenheim-) Färbung, und Schnellfärbungen wie zum Beispiel die Diff-Quik®-Färbung. Sie sind kostengünstig, leicht anzuwenden, sofort verfügbar, und werden deshalb häufig als Standardfärbung gewählt. Außerdem können die Objektträger ohne größere Einbußen in der Qualität mehrere Jahre aufbewahrt werden, da die Färbung permanent ist. Für die Färbungen vom Romanowsky-Typ werden luftgetrocknete Präparate verwendet. Da sie oft für das Anfärben von Blutausstrichen angewendet werden, ist der Untersucher meist mit den Färbereigenschaften gut vertraut. Im Allgemeinen werden das Zytoplasma und Organismen hervorragend angefärbt. Auch wenn die Darstellung nukleärer Details nicht an die der Färbungen vom Papanicolaou-Typ herankommt, ist sie dennoch zufriedenstellend, um Neoplasien von Entzündungen zu unterscheiden und neoplastische Zellen auf Malignitätskriterien zu untersuchen (COWELL et al., 2008). Allerdings kann eine verlässliche Evaluierung nur dann erzielt werden, wenn die Zellen als Monolayer vorliegen. Die meisten verfügbaren Färbungen

vom Romanowsky-Typ eignen sich für das Färben zytologischer Präparate, jedoch gibt es Unterschiede in den Färbereigenschaften. Mit der Diff-Quik®-Färbung zum Beispiel lassen sich nicht alle Mastzellgranula sicher anfärben, sodass es leicht zu Fehlinterpretationen und Verwechslungen kommen kann (COWELL et al., 2008). Färbungen vom Romanowsky-Typ liefern oft die zuverlässigsten Ergebnisse, wie in einer Studie von 2002 bewiesen (LONG et al., 2002).

Vitalfärbungen, wie die New-Methylenblue-Färbung, kommen meist als Ergänzung zu Färbungen des Romanowsky-Typ zum Einsatz. Sie findet Anwendung zur Untersuchung auf die Anwesenheit kernhaltiger Zellen, Pilze, Bakterien, Mastzellen sowie Fetttropfchen und Cholesterolkristalle. Auch hier werden luftgetrocknete Präparate verwendet. Die New-Methylenblue-Färbung stellt eine sehr schnelle Färbung dar, die jedoch nicht permanent ist und eine Aufbewahrung der Präparate somit nicht ermöglicht. Die Darstellung von Kern und Kernkörperchen ist sehr gut, jedoch lässt sich das Zytoplasma der Zellen kaum anfärben, was von Vorteil ist, wenn der Focus der Untersuchung auf den Kerndetails liegt. Gut anfärben lassen sich Pilzhyphen und viele andere infektiöse Erreger sowie Mastzellgranula. Eosine Granula werden allerdings nicht angefärbt. Normalerweise lassen sich Erythrozyten nicht anfärben und stellen sich als runde Bereiche dar, die auch bläulich erscheinen können. Kernhaltige Zellen können folglich auch bei einem größeren Erythrozytenaufkommen nicht von diesen verdeckt werden. Die Untersuchung der Objektträger sollte direkt nach der Färbung durchgeführt werden, da die Färbung schon nach Stunden nachlässt (MISCHKE, 2005).

Tri- und Polychromatische Färbungen erfordern eine Nassfixierung der zytologischen Probe. Die trichromatische Papanicolaou-Färbung benötigt viele einzelne Schritte, weshalb sie für eine routinemäßige Anwendung in der tierärztlichen Praxis selten in Frage kommt, mit Ausnahme auf dem Gebiet der Gynäkologie (MISCHKE, 2005). Mit der Papanicolaou-Färbung werden Kerndetails exzellent dargestellt und in der Humanmedizin wird sie routinemäßig in der Zytopathologie eingesetzt (JÖRUNDSSON et al., 1999). Besteht der Verdacht auf neoplastische Zellen, so ist die Färbung aufgrund der detaillierten Kerndarstellung von besonderer Bedeutung. Das Zytoplasma und viele Organismen werden jedoch nur undeutlich angefärbt. Dies ist von Vorteil wenn

sich Zellen überlappen oder dicht beisammen liegen, um trotzdem eine Untersuchung in verschiedenen Ebenen zu ermöglichen. Eine Keratinisierung von Oberflächenepithelien ist durch eine Rotfärbung einfach festzustellen (MISCHKE, 2005).

Die bichromatische Hämatoxylin/Eosin-Färbung (HE) findet breite Anwendung in der Histopathologie (JÖRUNDSSON et al., 1999). Hier wird sie routinemäßig zur Anfärbung der histologischen Schnitte eingesetzt. Kerndetails werden in der HE-Färbung ebenfalls hervorragend dargestellt und das Zytoplasma wird wie bei den histologischen Präparaten bekannt angefärbt (JÖRUNDSSON et al., 1999). Gerade für Gewebsfragmente ist die HE-Färbung oder die Papanicolaou-Färbung gut geeignet, da sie aufgrund der Nassfixierung oder Rehydrierung eine gewisse Transparenz des Zytoplasmas erlauben (YANG, 1995). Solche Gewebsfragmente lassen den Zytopathologen einzigartige, architektonische Informationen gewinnen, die bei der routinemäßig angewandten Romanowsky-Typ-Färbung verloren gehen würden. Dies gilt insbesondere für dickere zytologische Präparate (FROST, 1986).

Den Ergebnissen einer Studie von 1999 zu Folge wird prinzipiell für zytologische Präparate empfohlen, eine Lufttrocknung durchzuführen und einen oder mehrere Objektträger, jedoch nicht alle, nach dem Romanowsky-Typ anzufärben. Übrige zytologische Präparate sollten rehydriert und zusätzlich nach HE oder Papanicolaou angefärbt werden. Insbesondere dicke Präparate sollten rehydriert und nicht nach Romanowsky angefärbt werden, da sonst wichtige Informationen der Kerndetails und Gewebsfragmente verloren gehen könnten. Die Kombination der Färbung nach Romanowsky mit entweder der HE- oder Papanicolaou-Färbung schließt in gewisser Weise die Lücke zwischen zytologischen und histologischen Interpretationen (JÖRUNDSSON et al., 1999).

3. Indikationen für neurozytologische Untersuchungen

Die Neurozytologie wird derzeit, vor allem in der Tiermedizin, hauptsächlich zur intravitalen Diagnostik von entzündlichen oder neoplastischen Erkrankungen des ZNS angewendet. Als wichtiger Bestandteil der Aufarbeitung eines Patienten mit neurologischen Symptomen spielt die Liquorzytologie derzeit die größte Rolle (COWELL et al., 2008), gefolgt von der Zytologie aus Läsionen während einer Operation. Der Einsatz der Zytologie als Hilfsmittel in der postmortalen

Diagnostik neurologischer Erkrankungen ist jedoch nicht weitverbreitet (DADA und ANSARI, 1997).

3.1. Liquorzytologie

Die Untersuchung des Liquor cerebrospinalis stellt einen wichtigen Teil der diagnostischen Aufarbeitung von Patienten mit neurologischen Symptomen dar. Auch wenn es fast nicht möglich ist, eine definitive Diagnose nur durch die Untersuchung des Liquor cerebrospinalis zu stellen, ist sie dennoch hilfreich um das Vorliegen und die Art primärer Erkrankungen des ZNS festzustellen. Entzündliche, infektiöse, neoplastische, traumatische und einige degenerative Erkrankungen des ZNS führen zu veränderten Parametern des Liquors. (COWELL et al., 2008). Die zytologische Untersuchung des Liquors gilt derzeit als Goldstandard für den Nachweis leptomeningealer Metastasen (CHAMBERLAIN et al., 2009).

3.1.1. Entnahmetechniken

Erste Beschreibungen der Entnahme des Liquor cerebrospinalis gibt es aus dem Jahre 1890 von Quincke, der die Lumbalpunktion zur Entlastung von Patienten mit Hydrozephalus darstellt (FLEISCHMANN, 1897). Etwas später wurde von Dixon und Halliburton gezeigt, dass die Liquorpunktion beim Hund direkt durch das Ligamentum atlantooccipitale möglich ist (HALLIBURTON und DIXON, 1913). Heute werden beide Entnahmestellen genutzt. Für die Entnahme über die Cisterna cerebellomedullaris wird der Spalt zwischen Hinterhaupt und Atlas punktiert. Die Cisterna lumbalis erreicht man in dem Zwischenwirbelspalt zwischen 5. und 6. Lendenwirbel (COWELL et al., 2008). Die Punktion im Lumbalbereich ist technisch schwieriger durchzuführen als die Punktion der Cisterna cerebellomedullaris, und führt häufiger zu einer iatrogenen Blutkontamination (DI TERLIZZI und PLATT, 2009). Da der Liquor vorwiegend in rostro-kaudale Richtung fließt, ist es aussagekräftiger die Entnahmestelle kaudal der vermuteten Läsion zu wählen (THOMSON et al., 1990). Zur Punktion sollte der Patient in Narkose liegen und die ausgewählte Stelle aseptisch vorbereitet sein (DI TERLIZZI und PLATT, 2009). Es sollte maximal ein ml Liquor pro fünf kg Körpergewicht (bei Hunden, Katzen und Pferden) entnommen werden (CARMICHAEL, 1998). Für gewöhnlich ist ein „ploppendes“ Gefühl spürbar, wenn die Dura mater von der Nadel durchstoßen wird. Der erste

Tropfen Liquor sollte verworfen werden, um eine Kontamination der Probe zu minimieren (COWELL et al., 2008). Zum Auffangen des Liquors werden sterile Röhren verwendet. Für eine Polymerase Chain Reaction (PCR) Analyse des Liquors muss ein EDTA Röhren verwendet werden, das für die Routinediagnostik nicht empfohlen wird, da es den Proteingehalt fälschlicherweise erhöhen kann (RAND et al., 1994). Die meisten Labors können schon mit einer Probe von nur 0,5 ml Liquor den Proteingehalt, die Zellzahl und die Zytologie auswerten (DI TERLIZZI und PLATT, 2009).

3.1.2. Untersuchung des Liquors

Die Untersuchung des Liquors sollte mehrere Parameter einschließen: eine makroskopische Beurteilung von Farbe und Trübung, eine quantitative Analyse der Totalproteinkonzentration, der Zellzahl kernhaltiger Zellen und Erythrozyten, sowie die zytologische Untersuchung. Da die Zellen aufgrund des niedrigen Proteingehalts im Liquor sehr schnell degenerieren, muss eine Analyse so schnell wie möglich erfolgen. Idealerweise sollte die Bestimmung der Zellzahlen und die Anfertigung der Objektträger für die zytologische Auswertung innerhalb von 30 Minuten nach der Entnahme abgeschlossen sein. Kann die Probe nicht in der bestimmten Zeit bearbeitet werden, könnte sie mit 40 % Ethanol im Verhältnis 1:1 verdünnt werden, um so den Zellerhalt (allerdings auf Kosten der Detailmorphologie) zu verbessern (COWELL et al., 2008). Die Stabilität der Zellen des Liquors von Hunden und Katzen kann auch verbessert werden, indem 11% Serum hinzugefügt wird (BIENZLE et al., 2000) oder der Liquor vor der Zentrifugation mit Eiweiß (z.B. bovinem Serumalbumin) versetzt wird (DE GRAAF et al., 2011).

3.1.3. Die Anfertigung zytologischer Präparate

Weil die Zellzahl in normalem Liquor extrem gering ist, ist es notwendig die Konzentration an Zellen zu erhöhen, bevor ein Ausstrich angefertigt wird. Hierfür stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung: Die Zytozentrifugation, Sedimentation, und Membranfiltration. Die meisten Labore verwenden eine Zytozentrifuge, um die Zellen für die Auswertung vorzubereiten (GARMA-AVINA, 2004). Eine Zytozentrifuge nutzt eine Umdrehungszahl von 700/min für 10 Minuten, und konzentriert so die Zellen von ein bis zwei Tropfen Flüssigkeit zu einer kleinen, runden Fläche auf einem Objektträger (CHRISTOPHER et al.,

1988). In den meisten Fällen werden die Präparate luftgetrocknet und mit Färbungen nach dem Romanowski-Typ (Mai-Grünwald-Giemsä, Wright oder Diff-Quik®) angefärbt (DI TERLIZZI und PLATT, 2009). Die zytologische Untersuchung des Liquors ist auch unerlässlich falls die Zellzahl im Normalbereich liegt, da es trotzdem möglich ist, dass Abnormitäten in Zelltyp oder Zellstruktur vorliegen (EVANS, 1988).

3.1.4. Die zytologische Untersuchung des Liquors

Physiologisch kommen im Liquor nur geringe Mengen an Zellen vor. Mononukleäre Zellen dominieren das Zellbild gesunder Hunde und Katzen. Sie bestehen aus kleinen Lymphozyten, die denen im Blut sehr ähnlich sind, und größeren Zellen, welche insbesondere im englischen Sprachraum auch als monozytoide Zellen bezeichnet werden (COOK und DENICOLA, 1988; RAND et al., 1990; CHRISMAN, 1992; RAND et al., 1994). Gelegentlich werden auch intakte Neutrophile im Liquor gesunder Tiere gesehen, was wahrscheinlich auf eine Blutkontamination während der Entnahme zurückzuführen ist (DI TERLIZZI und PLATT, 2009). Erythrozyten sind normalerweise im Liquor nicht enthalten (COOK und DENICOLA, 1988; CHRISMAN, 1992). Das Vorhandensein von Erythrozyten ist meist iatrogenen Ursprungs, doch es kann auch auf eine echte Blutung hinweisen (DI TERLIZZI und PLATT, 2009). Diesbezüglich sind weitere Veränderungen, wie Fibrin-Niederschläge, Erythrophagozytose und Siderophagen interpretatorisch zu Hilfe zu nehmen. Vereinzelt können auch Ependymzellen, Choroid-Plexus-zellen, Meningealzellen oder Mitosefiguren in gesunden Proben vorkommen (COOK und DENICOLA, 1988; RAND et al., 1990; CHRISMAN, 1992; RAND et al., 1994). Andere seltene Befunde im Liquor sind Knorpelzellen und Epithelzellen, aus dem Stichkanal stammend, sowie neurale Elemente, wie Neurogliazellen (CHRISMAN, 1992; CHRISTOPHER, 1992). Sogar Nervengewebe wurde in wenigen Fällen im Liquor entdeckt, dies wurde jedoch als Kontamination infolge einer unbeabsichtigten Punktion des Rückenmarks interpretiert (FALLIN et al., 1996).

3.2. Zytologie aus Läsionen

Neben der Liquorzytologie kommt die Zytologie aus Läsionen des ZNS als Schnelldiagnostik heute häufig zum Einsatz. Schon seit 1937 werden in der Humanmedizin zytologische Präparate angefertigt, um intrakranielle Neoplasien

zu untersuchen (RUSSELL et al., 1937). Die Technik wurde für die Untersuchung von weichen und ödematösen neurochirurgischen Proben als geeignet erachtet. In der Neuropathologie dient die Zytologie heute als Methode, um während einer Operation eine schnelle und exakte Diagnose zu erlangen (TORRES und COLLACO, 1993), die es dem Chirurg ermöglicht weitere Entscheidungen auf der Basis der zytologischen Diagnose zu treffen. Von Vorteil ist auch, dass die zytologischen Präparate leicht anzufertigen, außerdem kostengünstig sind und eine hohe diagnostische Genauigkeit liefern (ROESSLER et al., 2002). Auch tiermedizinische Studien zeigen, dass die Zytologie aus Läsionen ein zuverlässiges und genaues Hilfsmittel zur Diagnostik von ZNS-Läsionen darstellt. Um falsche Ergebnisse zu vermeiden, sollten die Daten der zytologischen Untersuchungen stets mit den klinischen und radiologischen Befunden abgeglichen werden (DE LORENZI et al., 2006). Während einer Operation ist eine schnelle neuropathologische Untersuchung bedeutend, um das Vorhandensein eines Tumors bestätigen oder ausschließen zu können. Unterschieden werden kann zwischen nichtneoplastischen und neoplastischen Läsionen. Ersteres schließt Entzündungen, Zysten, Granulome und Narbengewebe mit ein, wohingegen letzteres Neoplasien neuroepithelialen Ursprungs (neurale, gliale, epenymale und choroidale Proliferationen) und nichtneuroepithelialen Ursprungs umfasst (RASKIN und MEYER, 2010).

3.3. Stereotaktische Biopsien

Neben der Nutzung der Zytologie zur Diagnostik von ZNS-Läsionen bei offenen neurochirurgischen Operationen, kommt sie auch bei der Beurteilung stereotaktischer Biopsien zum Einsatz. Die Bedeutung des Wortes „stereotaktisch“ lässt sich aus dem Griechischen ableiten, „stereos“ („räumlich“) und „tactus“ („berühren“), und steht für das Erreichen eines bestimmten Punktes in einem dreidimensionalen System. Da in vielen Fällen eine offene Operation nicht indiziert ist, wie beispielsweise bei Läsionen ohne Masseneffekt oder welche nicht resezierbar sind, entwickelte sich die Technik der stereotaktischen Biopsie (KRIEGER et al., 1998). Schon im Jahre 1908 wurde im Rahmen eines Tierversuches ein stereotaktischer Apparat von Horsley und Clarke entwickelt (HORSLEY und CLARKE, 1908). Erste Beschreibungen der stereotaktischen Technik für Biopsien aus intrakraniellen Läsionen beim Menschen gibt es aus dem Jahre 1947 (SPIEGEL et al., 1947). Jedoch fanden stereotaktische Biopsien

in der Humanmedizin erst ab dem Jahre 1973, nach einer Publikation von Conway, breitere Anerkennung (CONWAY, 1973). Ein bedeutender Fortschritt für die Biopsie von Läsionen von Hunden und Katzen war die Umgestaltung eines CT-gestützten stereotaktischen Hirnbiopsiesystems für die Nutzung bei Hund und Katze (KOBLIK et al., 1999a; KOBLIK et al., 1999b). Da die mit dieser Technik gewonnenen Gewebeproben relativ klein sind, ist es von großer Bedeutung mit dem Material sparsam umzugehen. Die Zytologie wird deshalb hier bevorzugt als Schnelldiagnostik eingesetzt, da im Gegensatz zu Gefrierschnitten weniger Material verbraucht wird, das später noch für die histologische Untersuchung benötigt wird. Ebenfalls von Vorteil sind die Schnelligkeit, der kleine technische Aufwand, die schnelle Erlernbarkeit und die hervorragende zytologische Qualität (PEIFFER et al., 2002).

3.4. Anwendung der Zytologie für die postmortale Untersuchung

Die zytologische Untersuchung findet derzeit in der postmortalen Diagnostik nur begrenzte Anwendung. Hier wird sich routinemäßig meist nur auf die Histologie an Paraffinschnitten oder Gefrierschnitten konzentriert. Unter den Schnelltechniken ist die Qualität von Gefrierschnitten aus Autopsiematerial jedoch oft schlecht und es besteht zusätzlich das Risiko einer Kontamination des Kryostaten mit evtl. humanpathogenen Infektionserregern (WALKER und GOING, 1994). Suvarna und Start haben in ihrer Studie gezeigt, dass die Zytologie für die postmortale Untersuchung fokaler Läsionen von hohem Wert ist. Sie kann zwar die Histologie und Mikrobiologie nicht ersetzen, jedoch eine schnelle und akkurate Diagnose zur Zeit der Autopsie erleichtern und sogar zusätzliche Informationen liefern. Mit einer Sensitivität von 96% und einer Gesamtgenauigkeit von 89% stellt die Zytologie von Läsionen ein vielversprechendes Verfahren dar (SUVARNA und START, 1995). Speziell für die Anwendung der ZNS-Zytologie als postmortales diagnostisches Hilfsmittel gibt es zwar keine aktuellen Studien, aber da die Breite der in oben genannter Studie verwendeten Gewebe groß ist, ist anzunehmen, dass die Ergebnisse wahrscheinlich auch auf ZNS-Gewebe übertragen werden können. Zudem gibt es Untersuchungen zur zytologischen Diagnostik intrakranieller Läsionen, wie oben schon beschrieben, die ebenfalls erstaunliche Ergebnisse erzielen. Ein Beispiel die Studie von Long, in der eine diagnostische Genauigkeit von 81% erreicht wurde (LONG et al., 2002). Bei Betrachtung der vielen positiven Ergebnisse sollte die

Verwendung der Zytologie als Hilfsmittel in der postmortalen Diagnostik von Erkrankungen des ZNS häufiger zum Einsatz kommen.

4. Vorgehensweise zur Anfertigung und Auswertung von Abklatschzytologien des ZNS und von Hirnläsionen

Das Gewebe des ZNS ist für die Herstellung von zytologischen Präparaten gut geeignet (RASKIN und MEYER, 2010). Abklatschpräparate weisen eine höhere diagnostische Genauigkeit auf als Quetschpräparate, die jedoch eine geringere Anzahl an nichtdiagnostischen Proben liefern (LONG et al., 2002). Zytologien des ZNS werden vielen Studien zu Folge mit der HE-Färbung angefärbt (MEYER et al., 2010; PANTH, 2011; KRISHNANI et al., 2012). Zarka und Moes beschreiben, dass sie für zytologische Präparate des ZNS die HE-Färbung verwenden und zusätzliche Objektträger mit einer Färbung nach Wright behandelt werden können (ZARKA und MOES, 2007). Da die zu vergleichenden histologischen Schnitte ebenfalls mit der HE-Färbung behandelt werden, fallen die Untersuchung und der Vergleich dem Untersucher vermutlich leichter. Außerdem werden Veränderungen des Zytoplasmas mit der HE-Färbung deutlicher dargestellt (KLEINSCHMIDT-DEMASTERS und PRAYSON, 2006). Laut einer Studie von 2002, in der vier Färbungen untersucht wurden, werden mit der modifizierten Wright-Färbung die besten Ergebnisse erzielt, allerdings wurde die HE-Färbung hier nicht in den Vergleich miteinbezogen (LONG et al., 2002).

Eine einheitliche Vorgehensweise zur Beurteilung der zytologischen Präparate ist von Vorteil. Als erstes sollte die Qualität der Probe beurteilt werden, die stark von der Probennahme aber auch von der Fixierung und Färbung beeinflusst wird. Fehler, wie eine mangelhafte Färbung oder rupturierte Zellen, können zu einer nicht beurteilbaren Probe führen (FOURNEL-FLEURY et al., 1994). Als nächstes sollte überprüft werden ob das Präparat repräsentativ ist oder gar die Läsion oder die gewünschte Lokalisation verfehlt wurde (FOURNEL-FLEURY et al., 1994). Die Interpretation der zytologischen Präparate des ZNS setzt eine gefestigte Erfahrung nicht nur der allgemeinen Zytologie, sondern speziell der normalen und abnormalen zytologischen Merkmale des Nervengewebes voraus (RASKIN und MEYER, 2010). Anfangs wird empfohlen die Präparate mit einer geringen Vergrößerung zu betrachten, um einen Eindruck der zytologischen Zusammensetzung und einen Überblick über die bauliche Struktur der Probe zu

erhalten. Die auffälligen Bereiche können dann später mit einer höheren Vergrößerung untersucht werden (ZARKA und MOES, 2007). Die Zellularität sollte bewertet werden, und man sollte sich die Frage stellen, ob das Gewebe normal oder verändert ist (FOURNEL-FLEURY et al., 1994). Zu unterscheiden gilt auch, ob auftretende Veränderungen reaktive oder neoplastische Züge haben, oder ob eventuell Zellansammlungen mit charakteristischen Formationen, wie zum Beispiel drüsenartigen Strukturen, auftreten (FOURNEL-FLEURY et al., 1994; ZARKA und MOES, 2007).

5. Zellen des ZNS

Um die zytologischen Präparate des ZNS überhaupt beurteilen zu können, muss man sich über die Zusammensetzung der physiologisch anzutreffenden Zellen bewusst sein. Anderenfalls können pathologische Veränderungen eventuell nicht erkannt werden oder sogar normale Befunde missinterpretiert und als pathologisch bewertet werden. Es gibt derzeit nur wenige Informationen zu der Zytologie von normalem Nervengewebe gesunder Tiere (RASKIN und MEYER, 2010). In einer Studie von 2004 wurden Proben aus verschiedenen Hirnregionen neurologisch unauffälliger Katzen und Hunde untersucht (DE LORENZI et al., 2004).

Das Nervengewebe setzt sich nach ihrer Funktion aus zwei unterschiedlichen Zelltypen zusammen. Zum einen aus den Nervenzellen, die für Erregungsbildung und –Weiterleitung verantwortlich sind, und zum anderen aus Neurogliazellen, welche hauptsächlich Stoffwechselfunktionen übernehmen (NICKEL et al., 2004).

5.1. Neurone

Neurone sind der wichtigste Bestandteil des ZNS (RASKIN und MEYER, 2010). Sie besitzen eine Vielfalt an Größe und Form, und können anhand der Fortsätze in multipolare, bipolare und pseudounipolare Nervenzellen unterteilt werden. Davon kommt die multipolare Nervenzelle am häufigsten vor (NICKEL et al., 2004). Die Zellkörper und deren Fortsätze befinden sich im ZNS in anatomisch getrennten Gebieten, der grauen und der weißen Substanz. In der grauen Substanz findet man die Nervenzellkörper und ihre Dendriten. Dagegen wird die weiße Substanz von den Axonen und ihren Hüllen gebildet (JUNQUEIRA et al., 2005). Keine andere Zelle variiert so in ihrer Größe, je nach Lokalisation, wie die Nervenzelle. Ihr

Durchmesser kann von 5 μm (Körnerzellen des Kleinhirns) bis zu 100 μm (Motorcortex) betragen. Alle Nervenzellen haben einen großen, zentral gelegenen, runden bis ovalen Nukleus und häufig einen einzigen Nukleolus. Ihr Zytoplasma ist aufgrund der typischen Nissl-Substanz auffällig körnig. In manchen Regionen des Hirns kann das Zytoplasma Melaninpigmente und Mikrovakuolen enthalten. Zytologische Proben des Kleinhirns weisen ein sehr charakteristisches Aussehen auf. Hier ist die Zellularität deutlich höher als in anderen Bereichen und zwischen den vielen, typischen, kleinen, hyperchromatischen Körnerzellen treten immer wieder die großen Purkinjezellen auf (RASKIN und MEYER, 2010). Makroskopisch kann das Gehirn in das Vorderhirn, bestehend aus Großhirn und Zwischenhirn, den Hirnstamm, bestehend aus Mesenzephalon, Pons und Medulla oblongata, und dem Kleinhirn untergliedert werden. Die Zellarchitektur variiert sehr stark in den unterschiedlichen Bereichen des Gehirns (WELSCH et al., 2014). Die Kleinhirnrinde zum Beispiel hat einen typischen dreischichtigen Aufbau. Sie setzt sich von außen nach innen aus der Molekularschicht, der Purkinje-Zell-Schicht und der Körnerzellschicht zusammen. In der Molekularschicht finden sich Interneurone, die Stern- und Korbzellen, sowie Dendriten der Purkinjezellen. Die Purkinje-Zell-Schicht, wie der Name schon verrät, beherbergt die typischen, großen Perikaryen der Purkinjezellen. In der anschließenden Körnerzellschicht befinden sich die kleinen, dicht gepackten Körnerzellen, sowie vereinzelt inhibitorische Golgizellen (JUNQUEIRA et al., 2005). Die Großhirnrinde dagegen hat einen charakteristischen sechsschichtigen Aufbau. Sie besteht aus der Molekularschicht, der äußeren Körnerzell- und Pyramidenzellschicht, sowie der inneren Körnerzell- und Pyramidenzellschicht und der Lamina multiformis (JUNQUEIRA et al., 2005). Der Großteil der Neurone der Großhirnrinde stellt Pyramidenzellen dar, nur 15% sind Nicht-Pyramidenzellen. Der Zellkörper der Pyramidenzellen hat die Form ähnlich einer Pyramide. Ihre Größe kann sehr unterschiedlich sein und bis zu 100 μm betragen. Die Pyramidenzellen besitzen einen runden, großen Kern und ihr Nukleolus ist deutlich erkennbar. Die Nicht-Pyramidenzellen sind zahlenmäßig deutlich weniger und stellen hauptsächlich Interneurone dar. Ihre Gestalt und Größe kann variieren. Es kommen zum Beispiel die typischen Sternzellen vor (WELSCH et al., 2014). Außerhalb der oben beschriebenen Gebiete gibt es noch viele andere Bereiche im Gehirn, die eine spezielle Zellarchitektur oder Zellzusammensetzung besitzen und bei der Beurteilung von zytologischen Proben berücksichtigt werden

müssen.

5.2. Gliazellen

Es können vier verschiedene Gliazellen unterschieden werden. Diese werden unterteilt in Neurogliazellen und Mikrogliazellen. Zu den Neurogliazellen gehören die Ependymzellen, Oligodendrozyten und Astrozyten. Ependymzellen bilden ein einschichtiges, kubisches bis hochprismatisches Epithel, das der Auskleidung aller inneren Hohlräume des ZNS dient (JUNQUEIRA et al., 2005). Die Zellen besitzen einen kleinen, runden, zentral gelegenen Nukleus (RASKIN und MEYER, 2010). Der Zilienbesatz der Ependymzellen ist im juvenilen Alter beträchtlich, nimmt aber mit zunehmendem Alter ab (ZARKA und MOES, 2007). Die Zellen des Plexus choroideus stellen eine modifizierte Form der Ependymzellen dar, die den Liquor cerebrospinalis produzieren. Sie sitzen einem fibrovaskulären Stroma auf, das in die Ventrikel hineinragt (ZARKA und MOES, 2007). Verglichen mit den Ependymzellen sind sie plumper, größer und besitzen eine kopfsteinpflasterähnliche Oberfläche. Beide zeigen jedoch ähnliche zytomorphologische Merkmale und treten meist in kleinen, lockeren Zellgruppen auf, wodurch die Unterscheidung schwer fällt (RASKIN und MEYER, 2010). In dem Stroma des Plexus choroideus finden sich häufig kleine Nester von Meningealzellen, sowie mit zunehmendem Alter kristalline Konkremente, sogenannte corpora arenacea (STERNBERG, 1996).

Astrozyten sind fortsatzreich und spielen eine große Rolle für den Stoffwechsel des Nervengewebes. Sie wirken als Vermittler zwischen den Nervenzellen, den Hirnhäuten und Blutgefäßen, und bilden mit den Blutgefäßen zusammen die Blut-Hirn-Schranke. Außerdem haben sie eine stabilisierende Funktion, indem sie die Nervenzellen mechanisch unterstützen (NICKEL et al., 2004; JUNQUEIRA et al., 2005). Das typische sternförmige Aussehen ist in der für zytologische Präparate typischen Romanowsky-Typ-Färbung nicht zu erkennen. Hier erscheinen die Zellen als kleine, nackte, ovale Nuklei, die von Neuropil umgeben sind (RASKIN und MEYER, 2010). Es gibt zwei unterschiedliche Typen von Astrozyten: den fibrillären und den protoplasmatischen Typ. Der fibrilläre Astrozyt ist typisch für die weiße Substanz und besitzt zahlreiche Zytoplasmafortsätze, während der protoplasmatische Astrozyt mit wenigen, dickeren Fortsätzen hauptsächlich in der grauen Substanz vorkommt (ZARKA und MOES, 2007).

Die Oligodendrozyten sind vor allem in der Substantia alba zu finden. Diese produzieren Myelin, das der Isolierung der Axone der Nervenzellen dient (JUNQUEIRA et al., 2005). Sie sind aber auch in der grauen Substanz anzutreffen, wo sie Nervenzellen umgeben, was als Satellitose bezeichnet wird. In zytologischen Präparaten scheinen ihre Zellkerne runder und kleiner als die der Astrozyten und ihr Zytoplasma ist, wie bei den Astrozyten, nicht gut zu erkennen. Aufgrund ihrer Größe und Form können Oligodendrozyten leicht mit Lymphozyten verwechselt werden (RASKIN und MEYER, 2010).

Die Mikrogliazellen sind aus dem Knochenmark stammende Monozyten, die über das Blut ins Gehirn gelangen und hier zu den Mikrogliazellen des ZNS transformieren (ZARKA und MOES, 2007). Sie und die Meningealzellen sind die einzigen Zellen des ZNS mesenchymalen Ursprungs. Sie besitzen einen kleinen, länglichen Zellkern, was sie von den anderen unterscheidet, und haben viele sich verzweigende Fortsätze. Sie haben die Eigenschaften zu phagozytieren und sind dem mononukleären Phagozytensystem zugehörig (NICKEL et al., 2004; JUNQUEIRA et al., 2005). In zytologischen Präparaten der Hirnrinde sind Mikrogliazellen oft perivasulär anzutreffen. Als reaktive Zellen zeigen sie Lipophagozytose, was zu einem schaumigen Aussehen führt (RASKIN und MEYER, 2010).

5.3. Weitere Zellen des ZNS

Neben den Zellen des Nervengewebes sind noch andere Zellen im ZNS anzutreffen, wie z.B. die Meningealzellen und Zellen der Blutgefäße und ihres Inhalts. Die Meningealzellen kommen typischerweise in netzähnlichen, zusammenhängenden Zellverbänden vor und die Form des Zellkerns variiert von rund über oval bis hinzu länglich. Im Gegensatz zu Zellen des Plexus choroideus sind die Zellgrenzen der Meningealzellen kaum zu erkennen. Vereinzelt organisieren sich die Meningealzellen zu pseudoazitären Strukturen. Dies ist typisch für Meningiome, kann aber auch in normalem Meningealgewebe vorkommen (RASKIN und MEYER, 2010; LACRUZ et al., 2014).

5.4. Zytologisches Erscheinungsbild der weißen Substanz

Der Hintergrund weißer Substanz stellt sich in einem zytologischen Präparat feingranuliert dar und präsentiert kleine Lipidvakuolen aus Myelin, den sogenannten Myelinfiguren. Die Zellularität in der weißen Substanz ist geringer

als in der GS und setzt sich hauptsächlich aus Oligodendrozyten und wenigen Astrozyten zusammen, die jedoch schwer voneinander zu unterscheiden sind. Je nach Region können auch lange, feine Fasern, die zu den Axonen gehören, beobachtet werden. Sie erstrecken sich oft über mehrere mikroskopische Gesichtsfelder. Die hier vorkommenden Gefäße bestehen größtenteils aus feinen Kapillaren, mit langgestreckten Endothelzellen, die parallel zu der Kapillarwand angeordnet sind. Auch Arteriolen mit einer dickeren Wand können in der weißen Substanz aufgefunden werden. Ventrikelnaher weiße Substanz kann außerdem Nester von Ependymzellen enthalten (LACRUZ et al., 2014).

5.5. Zytologisches Erscheinungsbild der graue Substanz

Zytologische Präparate des zerebralen Cortex, des Hypothalamus und der Basalkerne sind sich sehr ähnlich. Der Hintergrund erscheint, wie auch bei der weißen Substanz, eosinophil und feingranuliert. Die Zellularität dagegen ist höher als in der weißen Substanz. Sie kann aber je nach Lokalisation stark variieren, so wie auch die Form und Größe der Zellen sehr unterschiedlich sein kann. Neben den oben beschriebenen Gliazellen kommt in der grauen Substanz außerdem eine Vielzahl von Neuronen unterschiedlichen Aussehens vor, aber mit charakteristischen nukleären und zytoplasmatischen Merkmalen. Die Neurone erscheinen als große Zellen mit reichlich Zytoplasma und deutlichen Zellgrenzen, sowie einem prominenten, runden Zellkern und einem Nucleolus. Charakteristisch sind, wie bei der weißen Substanz, die Kapillaren, wobei auch Arteriolen und kleine Arterien vorkommen (LACRUZ et al., 2014).

Das Aussehen von zytologischen Präparaten der grauen Substanz des Kleinhirns unterscheidet sich klar von dem oben Beschriebenen, dies hauptsächlich durch den deutlich höheren Zellgehalt. Die vorherrschenden Zellen sind Neurone aus der Körnerzellschicht, die wie kleine, runde, hyperchromatische Zellen ohne sichtbares Zytoplasma aussehen. Neben der großen Zahl dieser kleinen Nervenzellen können vereinzelt voluminöse Purkinjezellen aufgefunden werden. Die Purkinjezellen besitzen ein ausladendes Zytoplasma mit eindeutig dendritischen Ausläufern und einem großen Nucleus mit deutlich sichtbarem Nucleolus. Der Rest der subcortikalen Strukturen des Kleinhirns hat ein Erscheinungsbild vergleichbar mit der schon beschriebenen grauen und weißen Substanz (LACRUZ et al., 2014).

III. PUBLIKATION

Diagnostic yield and accuracy of postmortem cytological sampling from the brain surface of animals with neurological abnormalities

S. Wünsche, M. Rosati, K. Matiasek*

Section of Clinical and Comparative Neuropathology, Institute of Veterinary Pathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig Maximilians University of Munich, Veterinaerstr. 13, D-80539 Munich, Germany

* Corresponding author. Tel.: +49 21803313.

E-mail address: kaspar.matiasek@neuropathologie.de (K. Matiasek).

Submitted to The Veterinary Journal

Received 4 May 2015, Accepted 27 February 2016

Published Online 4 March 2016

Doi:10.2016/j.tvjl.2016.02.013

Copyright © 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abstract

Clarification of central nervous system (CNS) disorders frequently requires pathological investigation via brain biopsy or postmortem examination. The use of cytology is usually restricted to diagnosis of mass lesions and septic meningitis. The value of brain cytology at postmortem examination has not been explored sufficiently. This study aimed to clarify the diagnostic value of meningeal imprint cytology at postmortem brain examination. Samples were taken from cerebrum and cerebellum and stained with the modified Wright stain and with haematoxylin-eosin. The slides were evaluated and findings were compared to brain histopathology with respect to resemblance, discrepancy and diagnostic validity. The study included 169 cases involving multiple animal species. Histopathology identified inflammatory disorders in 60/135 (44.4%) cases, neoplasia in 19/135 (14.1%) and non-infiltrative diseases in 56/135 (41.5%). Cytology revealed pathological changes in 79/135 (58.5%) of these cases. The histopathological diagnosis was reproduced in 57/135 (42.2%) cases, 43/57 (75.4%) of which were inflammatory. Non-diagnostic cases included 16/135 (11.9%) with sub-diagnostic cytological features and 3/135 (2.2%) with unclear phenomena. In 55/135 (40.7%) of brains with histological lesions, cytology proved inferior, providing negative results, including 40/55 (72.7%) cases with non-infiltrative diseases, 12/55 (21.8%) with inflammation and 3/55 (5.5%) with neoplasia. Conversely, 3/34 (8.8%) of controls showed cytological abnormalities. Cytological sampling from CNS adds to the sensitivity of neuropathological investigations, even if restricted to non-invasive surface imprints. The diagnostic accuracy exceeds 40%, with infiltrative diseases being five times more likely to be detected than non-infiltrative diseases.

Keywords: Veterinary clinical pathology; Central nervous system; Cytology;

Imprint; Meningeal; Neurocytology

Introduction

All too often, clarification of central nervous system (CNS) disorders requires morphological investigation carried out via brain biopsy or postmortem examination. Production of histological sections of brain requires a fully equipped histology laboratory and routine sections may not be available for evaluation earlier than 24 hours after sample arrival unless cryohistological sections are performed. Histological processing requires technical expertise and sparse biopsy material exposes the tissue to a significant risk of procedural artefacts that may mask or mimic pathological changes.

Imprint cytology of CNS lesions, as routinely performed in human medicine (Russell et al., 1937), could reduce the turnaround time of definite diagnoses (Long et al., 2002; De Lorenzi et al., 2006). Although providing a limited insight into the tissue context, brain cytology usually provides better opportunity for evaluation of cellular and subcellular details than cryosections. It is tissue sparing and hence comprises a non-interfering ancillary diagnostic tool that is quicker and easier to perform when compared to histopathology (Folkerth, 1994; Prayson and Napekoski, 2011).

Irrespective of these advantages, brain cytology has not been used widely in veterinary practice. Instead, it is restricted to diagnosis of mass lesions during brain surgery or biopsy and for diagnosis of suspected septic meningitis (De Lorenzi et al., 2006; Mishra et al., 2012). As to whether brain cytology may prove valuable in other disorders and how it performs in comparison to standard histopathology of brain lesions has not been systematically evaluated. This postmortem study aimed to investigate the diagnostic yield and accuracy of non-

invasive brain surface cytology in veterinary investigations.

Materials and methods

Cases

This study was conducted on randomly chosen postmortem brain samples from animals of multiple species with neurological signs subjected to routine autopsy for diagnostic purposes unrelated to this investigation over a period of 3 years. We included companion animals, horses, farm animals, zoo animals and wildlife. Samples of histopathologically confirmed normal brains taken at autopsy served as cytological controls.

Tissue sampling and slide processing

All animals underwent full postmortem examination. The brains were removed as described by Matiasek et al. (2015). Upon removal of the dura mater and excessive fluids from the brain surface, touch preparations were taken from (1) the dorsolateral aspects of the cerebral convexity and (2) the dorsolateral cerebellar surface using standard slides (Star Frost Adhesive, Engelbrecht Medizin- & Labortechnik) (Fig. 1A). Additional cytological specimens were taken from focal brain lesions if previously identified via diagnostic imaging or external macroscopic evaluation. All slides were air-dried and fixed in 75% ethanol for 30 min for disinfection. The slides were routinely stained with modified Wright stain (modWS) (Long et al., 2002) and with haematoxylin-eosin (HE) (Jorundsson et al., 1999) (Fig. 1B).

Ancillary procedures

All cases were accompanied by full macroscopic and

neurohistopathological investigation. Brains were fixed in 10% neutral-buffered formalin and trimmed as described by De Risio et al. (2012). Fixed tissues were processed in an automatic tissue processor, then underwent an ascending ethanol series and xylene treatment, after which the slides were embedded in Paraplast (Leica Biosystems Richmond). Sections (6 μm thick) were prepared and stained with haematoxylin-eosin, as well as various special stains depending on the case specific diagnostic request.

Neurocytological examination

The results of the microscopic evaluation were analysed by considering quality, representativity and cytopathological features (see Appendix: Supplementary Table 1).

After establishment of readability, preparations were assessed for components of the meninges (Fig. 2A), inner brain surfaces (ependyma, choroid plexus) (Fig. 2B), blood vessels (Fig. 2C, D), grey matter components (neurons; Fig. 2E, F) and white matter components (myelin figures, fibre bundles and tracts; Fig. 2G, H). Conclusions on the origin of the cells were drawn from (1) nerve cell size, morphology (granular, pyramidal, piriform, multipolar), arrangement and relative number of cells, as well as (2) the relationship between grey and white matter components and (3) vascularity.

Cytopathological features were sorted into (1) presence of non-residential cells or endogenous material (e.g. red blood cells, leucocytes including macrophages, tumour cells, contaminating cells, blood clots), (2) cytomorphological and numerical abnormalities of residential cells (e.g. inclusions, vacuolation, chromatolysis, neuronal degeneration, demyelination,

astrogliosis, microglial activation), (3) tissue necrosis and (4) presence of microorganisms (e.g. bacteria, fungi, parasites) or foreign bodies. In cases of suspected haemorrhage, efforts were taken to identify (1) erythrophagocytosis and (2) siderophages (with or without Perl's stain). Evaluation for cellular atypia was performed using standard algorithms for oncocytology (Sharma and Deb, 2011). The presence of bacteria was categorised into (1) intracellular or extracellular organisms, (2) Gram positive or Gram negative organisms and (3) coccoid, rod-shaped, fusiform or mixed morphologies.

Examples for cytological abnormalities are provided in Fig. 3. The most important changes were check-listed in a purpose designed evaluation form (see Appendix: Supplementary Table 1).

All cases were investigated by two blinded investigators. Six diagnostic levels were distinguished: (1) not evaluable, (2) inconspicuous, (3) unclear phenomena, (4) distinct but sub-diagnostic cytopathological features, (5) phenomenological diagnosis possible and (6) aetiological diagnosis possible. The outcome of these examinations was compared to the 'gold standard' histology with regards to their resemblance or discrepancy and comparative diagnostic validity. Equal outcome was graded 0, lower diagnostic value was rated -1 and surplus information +1.

Distribution rating and data analysis

For the assessment of diagnostic value, four factors were considered: (1) localisation, (2) distribution and (3) degree of a lesion, as well as (4) degree of cellular exfoliation. Localisation considered the proximity of any lesion (1) to the leptomeninges (with or without direct meningeal involvement or involvement of

the ventricles) and (2) to the sampling site, namely the dorsolateral convexity. Lesions were separated in those affecting the meninges, parenchyma and/or ventricles. Positive cytology slides further were rated with regards to the histological lesion involving the same fossa as the imprinted brain site (Fig. 4). The degree of exfoliation comprised (1) highly infiltrative and exfoliative lesions (such as diffuse inflammation and round cell tumours), (2) less exfoliative lesions (such as solid granulomas and cohesive neoplasms) and (3) non-infiltrative disorders.

A correlation analysis using Spearman's rank sum test was performed to evaluate the effects of (1) evidence of pathological cytology, (2) diagnostic value and (3) diagnostic accuracy on the likelihood of detection by non-selective sampling. χ^2 and Fisher's exact tests were performed for comparison of groups. Statistical analyses were conducted using GraphPad PRISM® software (GraphPad Software Inc.). A P value ≤ 0.05 was considered to indicate a significant difference.

Results

Demographics

The study included 169 cases from 29 vertebrate species, including 168 eutherians and 1 marsupial (see Appendix: supplementary Table 2); 87 were companion animals, 11 were horses, 56 were farm animals, 13 were zoo animals and two were wildlife. Age and sex distribution are depicted in the Appendix (Supplementary Table 2). Neurolocalisation on the basis of clinical records is indicated in Table 1.

Brain histopathology and disease classification

Thirty-four cases (20.1%) were histopathologically normal, while 135 cases (89.9%) presented with histopathological abnormalities after consideration of species-specific features and the state of maturity. The distribution of affected regions is shown in Table 1. Brain lesions were classified on the basis of histopathology as infiltrative (79/135, 58.5%), inflammatory (60/135, 44.4%) and neoplastic (19/135, 14.1%). The remaining 56/135 (41.5%) of cases comprised non-infiltrative diseases (NID), including degenerative, metabolic, vascular and traumatic disorders (Table 2). Seventy-four lesions involved the meningeal (59) or ventricular (15) surfaces and 61 cases were localised to the parenchyma. Forebrain involvement alone was seen in 46 cases, whilst eight cases selectively affected the hindbrain and 81 cases involved the contents of both fossae, either multifocally or diffusely.

Cytology

The composition of tissue fragments in cytological specimens is given in Table 3. Evaluation of thick smears in general was easier in HE stained slides due to preservation of transparency. Surface cytology yielded pathological changes in 79/135 (58.5%) diseased brains; selected findings are depicted in Fig. 3. The diagnostic impact of cytomorphological results is summarised in Table 4. In 16/135 (11.9%) cases, distinct but sub-diagnostic features were seen, while unclear phenomena were observed in 3/135 (2.2%) cases and diagnostic findings were negative in 55/135 (40.7%) brains with histological lesions.

On superficial sampling from the convexities, meningeal changes were most often reproduced in the cytological specimens, leading to positive findings in

40/59 (67.8%) imprints from these cases. Involvement of the meninges was significantly more likely to be identified than ventricular ($P = 0.03$) or parenchymal ($P \leq 0.0001$) disorders. Without direct connection to the subarachnoid space, lesions confined to the brain parenchyma only were least likely to be diagnosed on imprint cytology; abnormalities were identified in cytological smears in only 14/61 (23.0%) cases of this type. Ventricular changes were detected in 5/15 (33.3%) cases. Diffuse and multifocal histological lesions were significantly more likely to be reflected in cytological samples than focal lesions outside the imprint zone ($P = 0.048$). The representativity of cytological findings with regards to histological forebrain, hindbrain and combined lesions is depicted in Fig. 4.

In terms of diagnostic accuracy, cytological diagnoses matched with histopathological findings in 34/59 (57.6%) meningeal, 3/15 (20.0%) ventricular and 9/61 (14.8%) parenchymal disorders; at these sites, cytology provided surplus information in 6/59 (10.2%), 2/15 (13.3%) and 3/61 (4.9%) cases, respectively. This surplus information clarified the type and total extent of inflammatory changes (6/135; 4.4%) or gave evidence of histologically unseen intrathecal haemorrhage (1/135; 0.7%), astrogliosis (1/135; 0.7%), neuronal necrosis (1/135; 0.7%), micrometastases (1/135; 0.7%) and bacterial infection (1/135; 0.7%). The accuracy of diagnosis was highest for meningeal disorders (meningeal vs. ventricular: $P = 0.05$; meningeal vs. parenchymal: $P < 0.0001$; ventricular vs. parenchymal: $P = 0.35$).

Amongst the different disease categories, inflammatory encephalopathies were accompanied by abnormal smears in 48/60 (80.0%) cases; they permitted a

cytological diagnosis in 44/60 (73.3%) cases and matched with histological findings in 43/60 (71.7%) cases. Cytological specimens added new information on brain pathology in 5/60 (8.3%) histologically confirmed cases with inflammatory disorders.

Tumours were the second most frequent disorders detected on imprint cytology. They were accompanied by abnormal smears in 16/19 (84.2%) cases either due to presence of tumour cells (7/19; 36.8%), secondary changes such as necrosis and inflammation (7/19; 36.8%) or both (2/19; 10.5%). Atypical cells were evident in 9/19 (42.1%) smears, while tumour classification proved possible in 3/19 (15.8%) cases. Cytological findings matched with histological tumour diagnosis in 8/19 (42.1%) cases, while additional features were detected in 3/19 (15.8%) cases. In one histologically negative case in the control group, tumour cell emboli of a bronchoalveolar carcinoma were detected on the smears, while metastases were not detected in serial sections of the brain from this case.

Cytology performed worst in detection of NID, with a failure of diagnosis in 50/56 (89.3%) cases. Cytomorphological abnormalities were detected in 15/56 (26.8%) cases and a cytological diagnosis was reached in 8/56 (14.3%) cases. The histological diagnosis was reproduced in 6/56 (10.7%) cases and additional information was obtained in 3/56 (5.4%) cases (Table 5).

Discussion

Imprint cytology is an inexpensive procedure that is easy to perform and allows for ad hoc diagnosis of many exfoliative disorders in veterinary practice (Bertazzolo et al., 2014; Johnson et al., 2014). In animals with neurological

disease, cytology is used predominantly to achieve an intravital diagnosis of inflammatory and neoplastic disorders. Cytological evaluation of cerebrospinal fluid (CSF) is the most widely performed procedure, followed by imprints or smears from lesions taken by needle core biopsy or during surgery (De Lorenzi et al., 2006; Di Terlizzi and Platt, 2009). A quick and definite diagnosis via postmortem brain cytology also may be of use in cases (1) of possible infectious diseases that pose a hazard to other animals or the owner, (2) the owners declining more expensive histopathological investigations for financial reasons, and (3) the clinician seeking immediate information before the return of the histopathological report. Conversely, manipulation of unfixed brain tissue, introduces the risk of artefacts interfering with identification of pathological changes. This study explored the possibility of gathering information on brain diseases via non-selective imprint cytology from the intact brain surface.

Superficial sampling throughout the full variety of brain lesions resulted in a match to the histological diagnosis in 57/135 (42.2%) of the clinical cases. The main determinants for identification on cytology were (1) the proximity of a lesion to the sampling site, (2) the degree of cellularity and (3) the degree of exfoliation. Hence, diffuse bacterial, viral or immune-mediated meningitis/meningoencephalitis (35/47; 74.5%) and neoplastic leptomeningeal involvement (6/10; 60%) were most likely to be detected on cytology. Notably, apparent restriction of an inflammatory process to the brain parenchyma or ventricles on histopathology did not lower the detection rate or accuracy of the cytological diagnosis significantly ($P = 0.73$). This held true even without evident laceration of the brain surface, which would otherwise imply an artificial translocation of cells from the parenchyma during craniectomy and durotomy.

The positive yield therefore may result from a spread of cells via the extracellular spaces and/or convection through the interstitial or cerebrospinal fluids (Mareel et al., 1998). These mechanisms also may explain the presentation of 14/46 (30.4%) histologically identified forebrain lesions on cerebellar imprints and of 5/8 (62.5%) caudotentorial changes on cerebral cytologies (Fig. 4).

The sampling mode via imprinting probably accumulates cells that are disseminated in a tangential plane over the subarachnoid space and that may be difficult to be seen on perpendicular microtome sections with low yields. Likewise, this may explain the enrichment of tumour cell emboli disseminated amongst leptomeningeal microvessels, which may not have resulted in solid brain metastases of sufficient number or size to be detected on histopathological examination. In the present study, one case of a metastasising lung carcinoma was detected by cytology that was not detected in the brain by on histopathological examination.

Localisation deeper in the brain, low cellularity and lack of exfoliative features renders NID least likely to project to the sampled brain surface. Moreover, in most metabolic/toxic and neurodegenerative disorders, diagnosis is based on the spatial distribution rather than purely the quality of changes. In the present study, a positive diagnosis was achieved in 8/56 (14.3%) cases of NID; in these diseases, the yield and accuracy may benefit from more invasive sampling methods. Cytology added new information in 3/56 (5.4%) histologically confirmed cases of NID cases; surplus details were obtained by surface cytology in 11/135 (8.1%) cases across all disease categories (Table 5).

Romanowsky type stains are superior to HE for detection of bacteria, nuclei and subnuclear characteristics, as well as chromatolysis. The diagnostic value of cytological staining is affected by the thickness of the smear, which varies for different brain lesions, in particular the degree of exfoliation associated with infiltrative disorders and malacia; with thick smears and high cellularity it is useful to perform HE staining. Another benefit of HE staining is the rapid identification of excitotoxicity, astrogliosis, Rosenthal fibres, microglial processes and proteinaceous material.

Conclusions

Non-invasive cytological examination of brains at postmortem examination is a promising tool for rapid in-house diagnosis of structural brain lesions. In this study, a definite diagnosis was attained on cytology in 57/135 (42.2%) cases of histologically confirmed brain diseases. While cytological examination cannot replace a histological examination, unexpected findings can be realised that may add to the diagnostic accuracy of investigation of brain diseases. Imprint cytology improves the detection rate and facilitates the morphological diagnosis of brain diseases even if taken non-selectively from the brain surface.

Conflict of interest statement

None of the authors has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

This study would not have been possible without the excellent technical support by Mrs Karin Stingl and the sampling assistance by Mrs Beate Schmidt, Institute of Veterinary Pathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig Maximilians University (LMU), Munich. We also are grateful to Prof. Dr Johannes Hirschberger, Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, LMU, Munich, for advice and training in cytology. Preliminary results of the study pilot were presented as a poster at the 27th Annual Symposium of the European Society for Veterinary Neurology/European College of Veterinary Neurology, Madrid, Spain, 18-20 September 2014.

Appendix: Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi: 10.1016/j.tvjl.2016.02.013.

References

- Bertazzolo, W., Didier, M., Gelain, M.E., Rossi, S., Crippa, L., Avallone, G., Roccabianca, P., Bonfanti, U., Giori, L., Fracassi, F., 2014. Accuracy of cytology in distinguishing adrenocortical tumors from pheochromocytoma in companion animals. *Veterinary Clinical Pathology* 43, 453-459.
- De Lorenzi, D., Mandara, M.T., Tranquillo, M., Baroni, M., Gasparinetti, N., Gandini, G., Masserdotti, C., Bonfanti, U., Bertolini, G., Vian, P., Bernardini, M., 2006. Squash-prep cytology in the diagnosis of canine and feline nervous system lesions: A study of 42 cases. *Veterinary Clinical Pathology* 35, 208-214.
- De Risio, L., Brown, R., Tennant, B., Sparkes, A., Matiasek, L., de Stefani, A., Weissenböck, H., Matiasek, K., 2012. Slowly progressive lymphohistiocytic meningoencephalomyelitis in 21 adult cats presenting with peculiar neurological signs. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 14, 250-256.
- Di Terlizzi, R., Platt, S.R., 2009. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part II - analysis. *The Veterinary journal* 180, 15-32.

- Folkerth, R.D., 1994. Smears and frozen sections in the intraoperative diagnosis of central nervous system lesions. *Neurosurgery Clinics of North America* 5, 1-18.
- Johnson, J.G., 3rd, Blair, R., Brandao, J., Tully, T.N., Jr., Gaunt, S.D., 2014. Atypical fibrosarcoma in the skin of a Roborovski hamster (*Phodopus roborovskii*). *Veterinary Clinical Pathology* 43, 281-284.
- Jorundsson, E., Lumsden, J.H., Jacobs, R.M., 1999. Rapid staining techniques in cytopathology: A review and comparison of modified protocols for hematoxylin and eosin, Papanicolaou and Romanowsky stains. *Veterinary Clinical Pathology* 28, 100-108.
- Long, S.N., Anderson, T.J., Long, F.H., Johnston, P.E.M., 2002. Evaluation of rapid staining techniques for cytologic diagnosis of intracranial lesions. *American Journal of Veterinary Research* 63, 381-386.
- Mareel, M., Leroy, A., Bracke, M., 1998. Cellular and molecular mechanisms of metastasis as applied to carcinomatous meningitis. *Journal of Neuro-Oncology* 38, 97-102.
- Matiasek, K., i Batlle, M.P., Rosati, M., Fernández-Flores, F., Fischer, A., Wagner, E., Berendt, M., Bhatti, S.F., De Risio, L., Farquhar, R.G., 2015. International veterinary epilepsy task force recommendations for systematic sampling and processing of brains from epileptic dogs and cats. *BMC Veterinary Research* 11, 216.
- Mishra, S., Kent, M., Haley, A., Platt, S., Sakamoto, K., 2012. Atypical meningeal granular cell tumor in a dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24, 192-197.
- Prayson, R.A., Napekoski, K.M., 2011. *Frozen Section Library: Central Nervous System*, 1st Edn. Springer, Berlin, Germany, pp. 4-5.
- Russell, D.S., Krayenbühl, H., Cairns, H., 1937. The wet film technique in the histological diagnosis of intracranial tumours: A rapid method. *Journal of Pathology and Bacteriology* 45, 501-505.
- Sharma, S., Deb, P., 2011. Intraoperative neurocytology of primary central nervous system neoplasia: A simplified and practical diagnostic approach. *Journal of Cytology* 28, 147-158.

Table 1
Clinical neurolocalisation and distribution of histopathological changes.

Cases (<i>n</i> = 135)	Localisation of clinical signs		Localisation based on histopathology	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Forebrain	39	28.9	30	22.2
Brain stem	7	5.2	3	2.2
Cerebellum	1	0.8	2	1.5
Spinal	6	4.4	3	1.8
Multifocal central nervous system	24	17.8	97	57.4
Unclear	58	43.0	-	-

Table 2

Diagnostic accuracy: cytologically positive versus negative cases amongst animals with histopathological brain lesions

Disorders	positiv		negative	
	n	%	n	%
Inflammation	44	32.6	16	11.9
Neoplasia	8	5.9	11	8.1
NID	8	5.9	48	35.6

Table 3
Cellular composition of the smears with regards to the imprint site

Composition	Cerebrum	Cerebellum
	<i>%</i>	<i>%</i>
Meningothelial cells	94.6	88.6
Grey matter	83.3	83.1
White matter	33.9	41.0
Choroid plexus/ependyma	32.1	41.6
Blood vessels	61.3	62.7

Table 4

Summary of diagnostic levels of obtained specimens

Diagnostic level	Cases with brain lesions (total <i>n</i> = 135)		Controls (total <i>n</i> = 34)	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Not evaluable	1	0.7	-	-
Inconspicuous	55	40.7	31	91.2
Unclear phenomena	3	2.2	-	-
Distinct but sub-diagnostic cytopathological features	16	11.9	1	2.9
Phenomenological diagnosis possible	53	39.3	2	5.9
Aetiological diagnosis possible	7	5.2	-	-

Table 5

Agreement in between histological and cytological outcome

Diagnosis	<i>n</i> (135)		Agreement		Surplus	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	% ^a	<i>n</i>	% ^a
Inflammatory: (<i>n</i> = 60; 44.4%)						
Encephalitis	17	28.3	9	52.9	1	5.9
Meningitis	10	16.7	5	50.0	1	10.0
Meningoencephalitis	33	55.0	24	72.7	3	9.1
Neoplastic (<i>n</i> = 19; 14.1%)						
Meningioma	2	10.5	1	50.0	0	0.0
Neuroglial	2	10.5	0	0.0	1	50.0
Plexus	1	5.3	0	0.0	0	0.0
Pituitary	2	10.5	0	0.0	0	0.0
Germinal	1	5.3	1	100	0	0.0
Hematopoietic	8	42.1	2	25.0	2	25.0
Carcinoma	2	10.5	1	50.0	0	0.0
Sarcoma	1	5.3	0	0.0	0	0.0
Non-infiltrative diseases (<i>n</i> = 56; 41.5%)						
Degenerative	6	10.7	0	0.0	0	0.0
Malformation	10	17.9	0	0.0	0	0.0
Metabolic	32	57.1	2	6.3	1	3.1
Vascular	8	14.3	1	12.5	2	25.0

Surplus comprises cases, in which cytology obtained more information than histology.

^a Percentages refer to the cases per individual entity.

Figure legends

Fig. 1. (A) Imprint from the dorsolateral cerebellar surface. (B) Slides stained with modified Wright's stain and haematoxylin and eosin.

Fig. 2. Examples of normal central nervous system (CNS) cytology. (A) Sheet of meningotheial cells (M). (B) Multiple cohesive cell rafts (CR) from inner brain surface, consistent with ependyma or choroid plexus epithelium. (C, D) Cerebral grey matter (GM) featuring arterioles (Art) in C and capillaries (Cap) in D. (E, F) Typical appearance of cerebral cortex with large pyramidal cells (PC), clusters of neuroglial nuclei (NG), granule cells (GC) and capillaries (Cap). (G, H) White matter smears showing transverse and longitudinal features of myelinated fibres (MF) and cytomorphology of oligodendrocytes (Olig).

Staining: A, B, E, G: Modified Wright's stain; C, D, F, H: Haematoxylin and eosin. Magnification: Scale bar = 150 μm for A, B, E, F; 82 μm for C; 73 μm for D; 75 μm for G; 126 μm for H.

Fig. 3. Selection of representative cytological findings. (A) Lymphoid aggregate in encephalitis in a cat. (B) Inflammatory cells surrounding a myelin sheath in canine distemper virus encephalitis in a dog. (C) Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) in the leptomeninges (Men) in *Streptococcus suis* meningitis in a pig. (D) Astrogliosis (AG), histiocytic cluster (Hist) and neutrophilic neuronophagia (NN) in *Streptococcus suis* infection in a pig. (E) Atypical endothelial cells (EC) in metastatic carcinoma in a dog. (F) Meningoethelial cell whorls (Men) in a meningoethelial meningioma in a cat. (G) Eosinophilic nerve cell necrosis (EosN) in a lion. (H) Astrocyte proliferation (AC) surrounded by mononuclear cells in a

case of immune-mediated leucoencephalitis in a dog. Staining: A, B, D, F, G: Haematoxylin and eosin; C, E, H: Modified Wright's stain; Magnification: scale bar = 37.5 μm for A, B, D; 42 μm for C; 22.5 μm for E; 55 μm for F; 75 μm for G, H.

Fig.4. Representativity of surface imprints with regards to meningeal, parenchymal and ventricular lesions (A) and rostromentorial, caudotentorial and compound lesions (B). A: 40 out of 59 meningeal lesions, 14/61 parenchymal lesions and 5/15 ventricular lesions were identified on the imprint smears. Figure B shows how many of forebrain lesions (green), cerebellar lesions (blue) and bicompartimental pathologies (grey) were identified on cerebral versus cerebellar imprints.

Figure 1

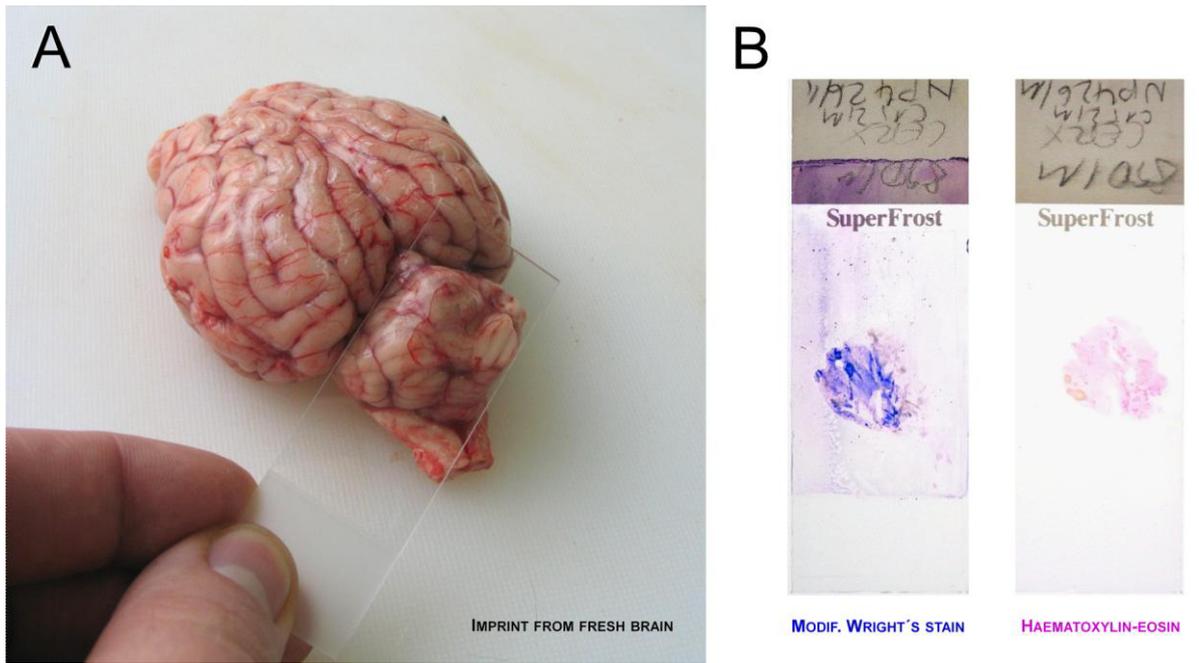


Figure 2

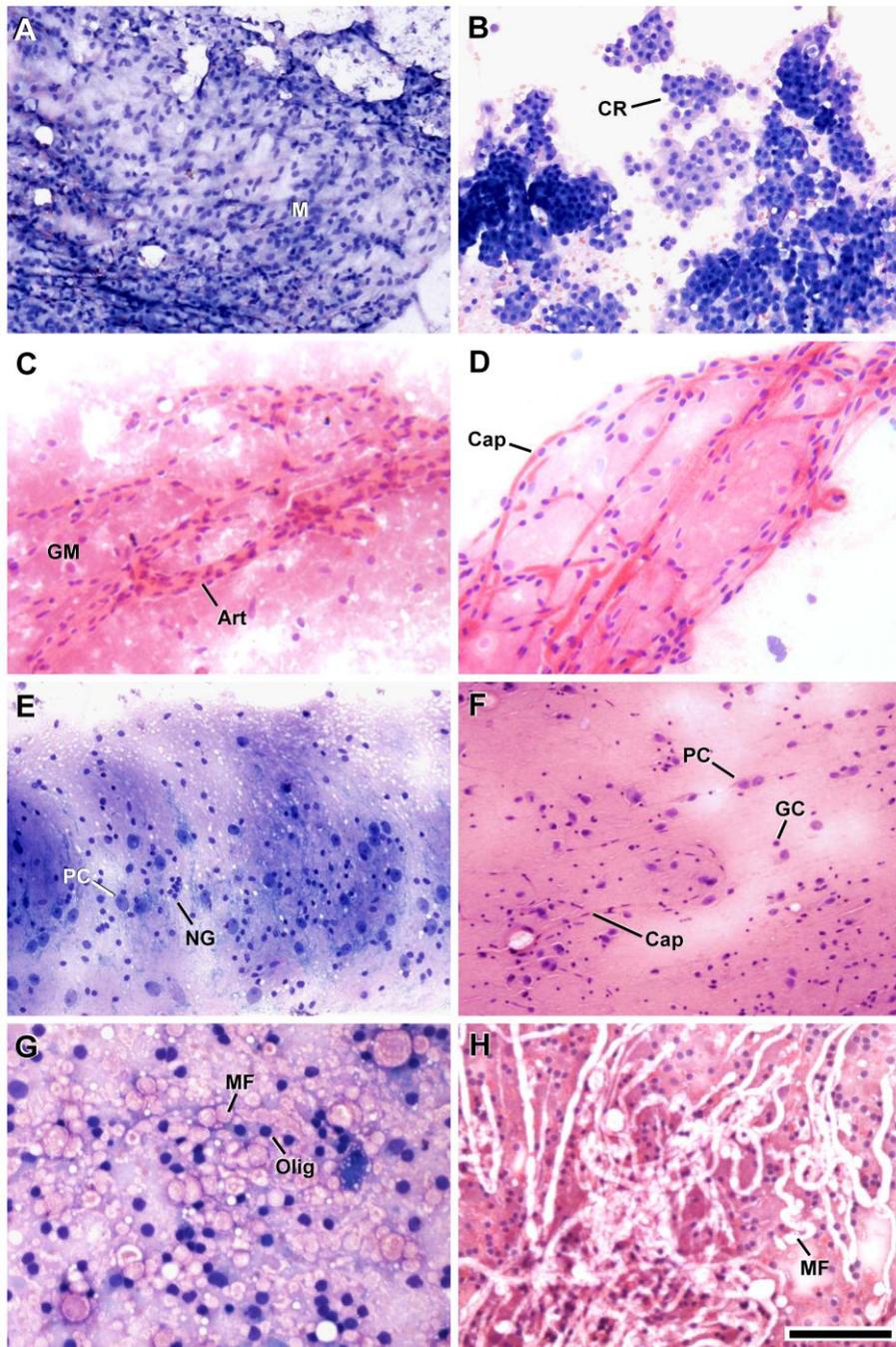


Figure 3

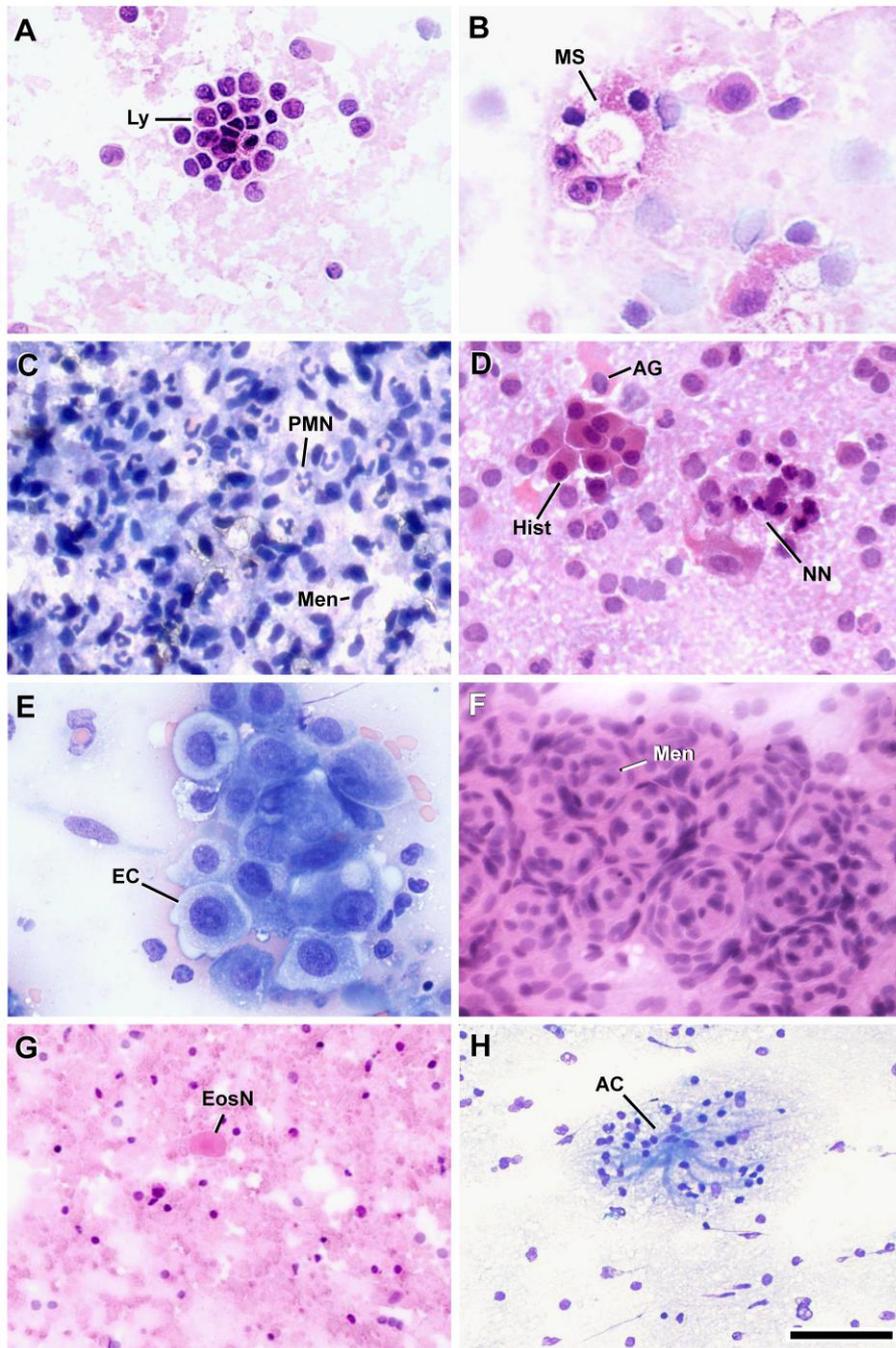
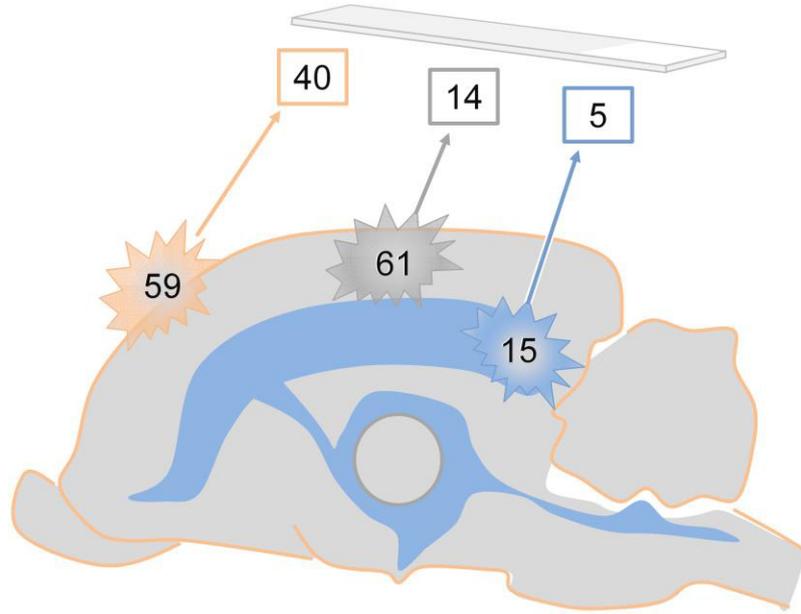
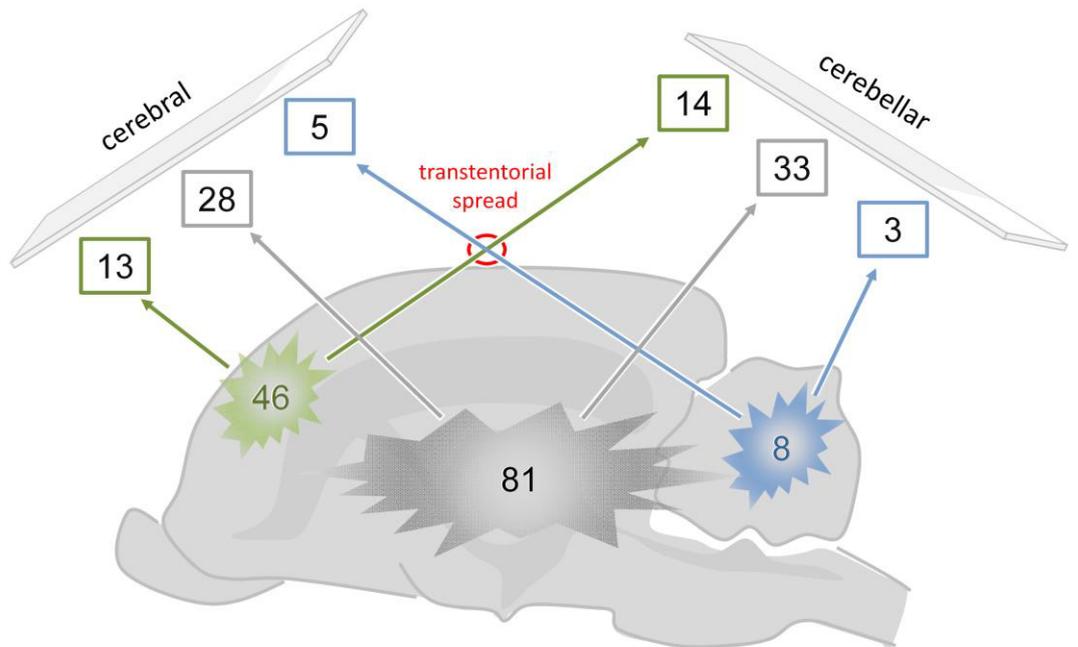


Figure 4

A



B



Supplementary Table 1

Selection of checklisted cytological parameters

Category	Parameter
Quality	Overall yield of material Overall thickness of the smear Cell staining quality Precipitates Cell preservation Autolysis Bacterial contamination
Representativity	Extracellular background Free red blood cells Nucleated cell density Meningeal cell content Grey matter content / type White matter content Ependyma / Plexus epithelium Blood vessels content / type
Pathology	
a. Degenerative features	Perikaryon/ dendrites Nerve fibre Astroglial Oligodendroglial / myelinergic Ependyma / Plexus epithelium Vessel wall
b. Reactive features (intrinsic)	Chromatolysis Astrogliosis / astrocytosis Microglial proliferation / neuroinflammation Vascular prominence
c. Necrosis	Type / stage
d. Extrinsic cellular reactions	Haemorrhage / erythrophagocytosis Pigment-laden macrophages Resorptive - macrophages Other leukocytic infiltrates
e. Atypical, abnormal and misplaced cells/ tissue	Neoplastic Dysplastic Metaplastic Dystopic Other
f. Further changes	Concrements Other

Supplementary Table 2

Signalement of included cases

Species	n (169)		Age	Sex ^a							
	n	%		♂ in years ^b	m		f		mn		fs
	n	%	♂ in years ^b	n	%	n	%	n	%	n	%
Cat	48	28.4	6.4 ±5.0	10	20.8	5	10.4	19	39.6	14	29.2
Dog	32	18.9	5.1 ±4.7	10	31.3	6	18.8	8	25.0	8	25.0
Cattle	18	10.7	0.9 ±2.9	8	44.4	10	55.6	-	-	-	-
Pig	15	8.9	1.1 ±1.2	3	20.0	9	60.0	3	20.0	-	-
Horse	11	6.5	10.6 ±7.9	3	27.3	3	27.3	5	45.5	-	-
Sheep	8	4.7	1.6 ±1.6	5	62.5	2	25.0	1	12.5	-	-
Goat	7	4.1	2.3 ±1.6	2	28.6	5	71.4	-	-	-	-
Alpaca	6	3.6	3.6 ±5.4	3	50.0	2	33.3	1	16.7	-	-
Donkey	1	0.6	10.0	-	-	1	100	-	-	-	-
Rabbit	2	1.2	7.5	-	-	1	50.0	-	-	1	50.0
Rat	1	0.6	2.5	1	100	-	-	-	-	-	-
Ferret	1	0.6	0.3	-	-	1	100	-	-	-	-
Degu	2	1.2	1.1	-	-	1	50.0	1	50.0	-	-
Yak	2	1.2	3 days	1	50.0	1	50.0	-	-	-	-
Guinea pig	1	0.6	14 days	1	100	-	-	-	-	-	-
Llama	1	0.6	6.0	-	-	1	100	-	-	-	-
Vicuna	1	0.6	11.0	1	100	-	-	-	-	-	-
Camel	1	0.6	0.4	1	100	-	-	-	-	-	-
Mustelidae	1	0.6	adult	-	-	1	100	-	-	-	-
Sciurus	1	0.6	adult	1	100	-	-	-	-	-	-
Lion	1	0.6	0.3	-	-	1	100	-	-	-	-
Tiger	1	0.6	18.0	-	-	1	100	-	-	-	-
Zebra	1	0.6	1.5	-	-	1	100	-	-	-	-
Rhinoceros	1	0.6	3 days	1	100	-	-	-	-	-	-
Kangaroo	1	0.6	adult	-	-	1	100	-	-	-	-
Deer	1	0.6	6.0	-	-	1	100	-	-	-	-
Hamadryas baboon	1	0.6	18.0	1	100	-	-	-	-	-	-
Chimpanzee	1	0.6	19.0	-	-	1	100	-	-	-	-
Vermilingua	1	0.6	6.0	1	100	-	-	-	-	-	-

^a Percentages refer to the population of the investigated species. ^b ...unless specified otherwise.

Abbreviations: m, male; f, female; mn, male-neutered; fs, female spayed

IV. DISKUSSION

1. Zielsetzung der Studie

Wie oben unter Punkt 3 der Literaturübersicht erwähnt, beschränkt sich der Einsatz der Zytologie im Bereich neurologischer Erkrankungen hauptsächlich auf die Liquorzytologie (COWELL et al., 2008) und die Diagnostik fokaler Hirn- bzw. Rückenmarksläsionen (DE LORENZI et al., 2006). Die diagnostische Genauigkeit bei der zytologischen Untersuchung intrakranieller Läsionen wurde beim Tier auf über 80% geschätzt, sofern das Präparat wirklich Zellen der Läsion beinhaltet (LONG et al., 2002). Diese hohe Detektionsrate ist durch das intraläsionale Sampling allerdings auch die Überrepräsentation infiltrativer (hauptsächlich neoplastischer) Krankheiten in dieser Studie bedingt.

Inwieweit der Informationsgehalt auch aus nicht-invasiven zytologischen Präparaten der Hirnoberfläche solch gute Ergebnisse liefern kann oder überhaupt von Nutzen ist, wurde im Vorfeld der hier vorgestellten Arbeit nicht weitergehend untersucht. Diese Studie stellt daher die erste Untersuchung zum nichtinvasiven Sampling der Hirnoberfläche von Tieren mit neurologischer Erkrankung dar. Es wurde dabei insbesondere der Hypothese nachgegangen, dass derartige zytologische Abklatschpräparate von diagnostischem Wert sind und sich deren Einsatz als schnelle und Zusatzinformationen liefernde Untersuchung neben der histologischen Aufarbeitung als sinnvoll erweist.

Übereinstimmend mit dieser Hypothese zeigen die Ergebnisse deutlich, dass sich wertvolle Informationen ablesen lassen. In 42,2% der Fälle konnte sogar eine definitive Diagnose aus dem zytologischen Befund abgeleitet werden, die mit dem Wert der histologischen Untersuchung vergleichbar war. Fokussiert man sich bei der Auswertung auf einzelne Krankheitsgruppen und Lokalisationen, so kann die Zytologie sogar noch wesentlich bessere Ergebnisse erzielen. Hervorzuheben sind hierbei insbesondere entzündliche Erkrankungen, bei denen in 71,7% der Fälle eine definitive Diagnose gestellt werden konnten. Betrafen die veränderten Läsionen die Meninx, so deckten sich die Ergebnisse von Zytologie und Histologie sogar in 57,6% der Fälle. Diese Übereinstimmung war bei den ventrikulären (20,0%) und parenchymatöse Veränderungen (14,8%) deutlich geringer. Noch dazu konnte die Zytologie in 8,1% der Fälle zusätzliche

Informationen liefern, die in der histologischen Untersuchung nicht zu erkennen waren. Daraus wird deutlich, dass durch die nicht-invasive Zytologie der Hirnoberfläche die Diagnostik von Erkrankungen des Hirns verschärft werden kann.

2. Praktikabilität oberflächenzytologischer Untersuchungen am Gehirn

Die Anfertigung zytologischer Präparate ist kostengünstig und schnell und bietet somit einen erheblichen Vorteil gegenüber anderen Verfahren (FOLKERTH, 1994). Die in dieser Studie untersuchten zytologischen Präparate wurden sektionsbegleitend hergestellt. Daher wurden die Abklatschproben der Hirnoberfläche von den jeweils diensthabenden Personen mit variierender diagnostischer Erfahrung und zum Teil unter Zeitdruck genommen. Aus diesem Grund wurde eine simple und leicht nachvollziehbare Probennahmetechnik gewählt. Trotz der Probennahme durch unterschiedliche Personen konnte ein insgesamt gutes Resultat erzielt werden. Obwohl zu erwarten wäre, dass durch die unterschiedlichen Probennehmer größere Schwankungen in der Anfertigungsqualität des Abklatsches vorhanden sind, als bei einem einzigen Probennehmer, überzeugen die Ergebnisse der Studie, bei der in immerhin 58,6% der Fälle pathologischen Veränderungen festgestellt werden konnten und nur ein Fall aus technischen Gründen ausgeschlossen werden musste. Dies spricht dafür, dass man auswertbare zytologische Proben durchaus einfach und unter Praxisbedingungen gewinnen kann.

Die Qualität der zytologischen Präparate war insgesamt gut, was eine zuverlässige Beurteilung der abgebildeten Gewebsfragmente zuließ. Lediglich ein einziger Fall konnte aufgrund von schlechtem Zellerhalt nicht ausgewertet werden. Eine Beeinträchtigung der Auswertbarkeit kann von mehreren Schritten beeinflusst werden. Schlüsselstellen sind hierbei vor allem die Probennahme, Fixierung und Färbung.

Trotz der hohen Auswertbarkeit könnte die Abklatschtechnik natürlich optimiert werden, was jedoch primär durch Erfahrung und stetige Verbesserung der Technik erreicht werden kann und getan werden sollte, um die Anzahl nicht diagnostischer Proben möglichst gering zu halten (COWELL et al., 2008). Dies setzt allerdings ein gesteigertes Interesse des Probennehmers voraus. Bei der

Beprobung des ZNS müssen außerdem die hohe Vulnerabilität der Strukturen und Zellen sowie der geringe Gewebezusammenhalt bedacht werden, der unter Autopsiebedingungen durch Autolyse zusätzlich vermindert ist. Der Objektträger sollte kurz, ohne Druck und laterale Gleitbewegungen auf die Hirnoberfläche aufgelegt werden, um die Zellen möglichst gut zu erhalten und unbeschädigt auf den Objektträger zu übertragen.

Um das Fortschreiten autolytischer Prozesse sowie die bakterielle Probenkontamination und die Infektionsgefahr so gering wie möglich zu halten, sollte das Gewebe so schnell wie möglich und je nach Untersuchungsvorhaben durch Lufttrocknung oder Nassfixierung behandelt werden (RUSSELL et al., 1937; JÖRUNDSSON et al., 1999). In dieser Studie konnte mit sofortiger Lufttrocknung, trotz hohem Fettgehalt der Proben, ein exzellenter Zellerhalt und eine ausgezeichnete Detailerkennbarkeit erzielt werden. Eine nachfolgende Alkoholbehandlung erfolgte in unserer Studie nur zur Dekontamination im Hinblick auf potenziell humanpathogene Keime (SCHMID et al., 2007).

Die aufgrund der gelartigen Konsistenz des Hirngewebes oft dicken Zellfilme erschweren durch die Überlagerung gefärbter Strukturen die Auswertung. Um auch dickere Proben gut beurteilen zu können und bei der Untersuchung keine wichtigen Information der Kerndetails und Gewebsfragmente zu verlieren, wird, wie hier in der Studie durchgeführt, empfohlen, zusätzlich zu den Standardfärbungen nach Romanowsky eine transparente HE- oder Papanicolaou-Färbung anzuwenden (JÖRUNDSSON et al., 1999). Als bewährte histologische Färbung relativiert HE in gewisser Weise die Dicke der Probe, da sie in der mikroskopischen Untersuchung ein Durchscrollen durch die Probe in der Z-Achse und damit eine annähernd dreidimensionale Darstellung möglich macht. Das Durchdringen der Probe in der Z-Achse kommt der Untersuchung der fortsatzreichen ZNS-Zellen, wie Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen, aber auch den polyaxonalen Oligodendrozyten und deren komplexer Organisation sehr entgegen und erlaubt auch topografische Aussagen zur Herkunft der Probe. So können auch dickere Gewebsfragmente oder Zellansammlungen adäquat untersucht werden. Bezüglich zytomorphologischer Besonderheiten stellen sich in der HE-Färbung zytoplasmatische Charakteristika, wie Rosenthal-Fasern und andere Einschlüsse, sogar wesentlich besser dar als bei den Romanowsky-Techniken (LACRUZ et al., 2014).

Mit der Papanicolaou-Färbung können Kerndetails gut dargestellt werden (JÖRUNDSSON et al., 1999). Dagegen werden das Zytoplasma und viele Organismen nur undeutlich angefärbt (MISCHKE, 2005). Sie könnte somit von Vorteil gegenüber der HE-Färbung sein, wenn das Hauptaugenmerk auf der Beurteilung der Kerndetails dickerer Zellfilme liegt, denn Sie erlaubt ebenfalls eine Untersuchung in verschiedenen Ebenen (MISCHKE, 2005).

Die Abklatschproben in dieser Studie wurden jeweils an zwei verschiedenen Lokalisationen des Hirns genommen. Zum einen dorsolateral an der zerebralen Konvexität, und zum anderen dorsolateral an der paravermalen zerebellären Oberfläche. Somit gestaltet sich die Probennahme einfach und kann von jedermann durchgeführt werden. Es ist kein spezialisiertes Personal erforderlich, sondern die Proben können nach einer kurzen Einführung von jedem anfertigt werden. Da die zytologischen Proben nur von der Oberfläche des Hirnes genommen werden, ist kein vorausgehendes Bearbeiten, wie zum Beispiel Schneiden des unfixierten Hirnes, erforderlich, das der histologischen Qualität abträglich wäre (KATELARIS et al., 1994). Die Probenahme erfolgt somit nicht invasiv, sondern gewebeschonend und -sparend. Folglich steht das Gewebe trotz der Beprobung weiteren Untersuchungen ohne größere Beeinflussung zur Verfügung.

Wie in den Ergebnissen gezeigt, lassen sich die meningealen Erkrankungen am besten in den zytologischen Abklatschpräparaten reproduzieren. Jedoch wird in der Studie deutlich, dass auch anatomisch tiefer liegende Pathologien, wie parenchymatöse (14,8%) oder ventrikuläre (20,0%) Läsionen, erkannt werden können, wenn auch nicht mit so hoher Trefferquote im Vergleich zu meningealen Läsionen (57,6%). Außerdem konnten sowohl Läsionen des Großhirns auf Abklatschpräparaten des Kleinhirns, als auch umgekehrt festgestellt werden. Wie die Zellen aus der Tiefe an die Oberfläche kommen und warum sich Pathologien des Vorderhirns auf zytologischen Proben des Kleinhirns oder umgekehrt präsentieren, ist nicht eindeutig geklärt. Wahrscheinlich werden während der Kraniektomie und Durotomie, selbst wenn keine offensichtlichen Läsionen zu sehen sind, Mikroläsionen provoziert, die zu einem artifiziellen Transport von Zellen aus tieferen Strukturen an die Oberfläche führen. Eine andere Erklärung wäre die Konvektion von Zellen durch interstitielle Flüssigkeit und den Liquor, wie es intravital auch für Metastasierungen beschrieben ist (MAREEL et al.,

1998). Die Fehlerrate von insgesamt 41,5% könnte jenseits des Routinebetriebs durch Beprobung der Läsion, symptomatogenen Hirnregion oder auch der im MRT abnormen Lokalisation verbessert werden. Außerdem wäre aufgrund des Liquorstroms ein weiterer Abklatsch von der Unterseite des Hirnes, der sogenannten „Schlammfängerregion“ mit ihren basalen Zisternensystemen, interessant, um zu sehen inwieweit auch hier Zellen aus tiefer liegenden Strukturen detektierbar sind.

Bei dieser Pilotstudie hat man sich doch zunächst auf einen Mittelweg zwischen Repräsentativität und Vermeidung artifizieller Veränderungen, die mit der histologischen Diagnostik kollidieren könnten, beschränkt.

3. Ergänzende Aspekte zu bisherigen Aussagen zur Normozytologie des ZNS

Voraussetzung um krankhafte Veränderungen in der Zytologie des ZNS erkennen und beurteilen zu können, ist die normale Zellzusammensetzung und das normale zytologische Erscheinungsbild verinnerlicht zu haben. Sogar in den oberflächlichen Präparaten des Hirnes konnten Zellen aus tieferen Strukturen detektiert werden. Neben dem in der Literatur beschriebenen Erscheinungsbild von grauer und weißer Substanz des Hirns (LACRUZ et al., 2014), konnten in dieser Studie noch einige Aspekte präzisiert werden.

Der Hintergrund weißer Substanz wird als feingranuliert mit kleinen Lipidvakuolen, den Myelinfiguren, beschrieben (LACRUZ et al., 2014). Hier ist zu bemerken, dass die vermeintlichen Vakuolen nicht leer sind und somit als Lipidschollen bezeichnet werden sollten. Die Darstellung der Myelinfiguren war vielfach nahezu querschnittsähnlich rund, woraus sich Informationen zum Myelinisierungsgrad und zur Myelinscheidenkompaktierung ableiten lassen. Neben den Oligodendrozyten und wenigen Astrozyten (LACRUZ et al., 2014) kommt auch in der weißen Substanz Mikroglia vor. Im Normalzustand erscheinen die (inaktiven) Mikrogliazellen als kleine Zellen mit einem länglichen, oft kommaförmigen Zellkern mit kurzen oder unsichtbaren Zellausläufern. Sind sie aktiviert, so akkumulieren sie Zytoplasma, runden den Zelleib ab und zeigen eventuell Phagozytosezeichen bis hin zu dem für Gitterzellen typischen schaumigen Aussehen (RASKIN und MEYER, 2010).

Hinsichtlich der Nervenfasern finden sich meist myelinisierte, aber auch kleine unmyelinisierte Axone. Die myelinisierten Nervenfasern können isoliert vorliegen oder aber zu Bündeln, den Tractus und Funiculi zusammengefasst sein. Auf den Objektträgern ist es ferner möglich, große und kleine myelinisierte Fasern zu unterscheiden. Außerdem erlaubt die Abwesenheit von Schmidt-Lanterman-Kerben und von schwanzzellulären Mittelsegmenten eine Zuordnung der Nervenfasern zum ZNS. Denn im normalen Zustand liegen die Kerne und Perikaryen der Oligodendrozyten von den Fasern getrennt. Das heißt, sobald mononukleäre Zellen einer Faser aufsitzen ist das als pathologisch zu werten. Ferner kann die ventrikelnahе weiße Substanz Nester oder Verbände von Ependymzellen enthalten (LACRUZ et al., 2014). Sollten diese mit grauer Substanz verhaftet sein, stammen diese höchstwahrscheinlich aus den basolateralen Wandungen der Lateralventrikel, aus der Tiefe des dritten Ventrikels oder vom Boden des vierten Ventrikels.

Für die graue Substanz wurde großzügig postuliert, dass sich zytologische Präparate des zerebralen Cortex, des Hypothalamus und der Basalkerne nahezu identisch sind (LACRUZ et al., 2014). Im Großen und Ganzen ist eine ähnliche Zellkomposition gegeben, jedoch unterscheiden sich diese Regionen in einigen Punkten deutlich. Im Unterschied zum Menschen zeigt der Cortex des Tieres eine weniger deutliche Laminierung, dafür persistieren bei unseren Haustieren, und hier besonders bei der Katze, microcolumnäre Neuronenreihen (JONES, 2000), die sich in ihrer Anordnung auch im Zytopräparat wiederfinden. Diese sind typisch für den zerebralen Cortex und in den anderen Regionen nicht gleichartig zu finden. Ein weiteres Erkennungsmerkmal des Cortex sind die in dieselbe Richtung zeigenden Spitzen der Pyramidenzellen. In den Hirnkernen sind die großen Neurone überwiegend multipolar (nicht pyramidal) und haben eine variierende Ausrichtung.

Es wird ferner berichtet, dass das Vorkommen von Kapillaren, aber auch Arteriolen und kleinen Arterien, für die graue wie weiße Substanz ähnlich sei (LACRUZ et al., 2014). In der hier durchgeführten Studie waren nur die Kapillaren der grauen Substanz des Cortex auffallend trauerweidenartig aufzweigend und unterschieden sich deutlich von den wenig verzweigten Kapillaren der weißen Substanz. Diese Formationen fanden sich sowohl in den zerebro- als auch zerebellokortikalen Abklatschpräparaten. Arteriolen waren

gelegentlich und Arterien generell kaum anzutreffen. Damit dürfte die zytologische Erfassung vaskulärer Veränderungen auf Mikroangiopathien und assoziierte Phänomene beschränkt bleiben.

Die Basalkerne des Striatums sind von Projektionsfasern der Capsula interna (große myelinisierte Fasern) und den striatopallidalen Fasern nach Wilson (Assoziationsfasern) unterbrochen (DE LAHUNTER et al., 2015). Dadurch ergibt sich für diese ein typisches geripptes Pattern mit Inseln von grauer Substanz und Streifen mit Myelinfiguren und Nervenfasern. Dieses Muster reproduziert sich im zytologischen Präparat ausgezeichnet.

Innerhalb der *Formatio reticularis* findet sich dagegen eine wildes Hin und Her von grauer und weißer Substanz mit großkalibriger Faserdominanz und teils riesigen Neuronen (NICKEL et al., 2004). Eingebettet in lediglich graue Substanz würden Neuronen dieser Größe für die Betzschen Riesenzellen des Motorkortex sprechen (STERNBERG, 1996).

Der Hintergrund der reinen grauen Substanz, z. B. des Cortex, ist wesentlich feindisperser als beschrieben (LACRUZ et al., 2014) und mit Anteilen weißer Substanz nicht zu verwechseln.

In der Kleinhirnrinde sind neben den Körnerzellen und Purkinjezellen (LACRUZ et al., 2014) noch weitere mittelgroße bis große Neuronen, zum Beispiel Golgizellen zu finden. Diese sind allerdings multipolar und nicht piriform wie die Purkinjezellen. Am leichtesten ist die Kleinhirnrinde durch die zusammenhängenden Bänder der Granularzellschicht, ihren paucinukleären Glomerula und den einseitig gereihten Purkinjezellen zu erkennen. In den zytologischen Präparaten ist es aber definitiv nicht möglich, das Kleinhirndach von der *Formatio reticularis* zu unterscheiden.

Auch in selektiven Abklatschpräparaten im Vorfeld der eigentlichen Studie konnten die Zellen des Ependyms und der Plexusepithelien zytomorphologisch nicht differenziert werden, was bei einer Diagnosefindung zu berücksichtigen ist.

Die Meningealzellen hingegen zeigen sich in netzähnlichen Verbänden. Einzelzellen sind bei gutem Erhaltungszustand selten anzutreffen. Auch Pseudorosettenbildung der Meningealzellen können gehäuft aufgefunden und dann zur histogenetischen Zuordnung verwendet werden (RASKIN und MEYER,

2010).

In einigen Proben wurde eine Kontamination mit Schwann-Zellen vermutet. Diese stellten sich als langgestreckte spindelartige Zellen mit einem länglichen, großen Zellkern und ohne sichtbare Zytoplasmagrenzen dar. Außerdem konnten nur Zellverbänden und keine Einzelzellen beobachtet werden. Das geschilderte zytomorphologische Bild dieser Zellen deckt sich mit der zytologischen Beschreibung von Schwann-Zellen aus Tumoruntersuchungen (LACRUZ et al., 2014). Um zu beweisen, ob die vorliegenden Zellen tatsächlich Schwann-Zellen sind, wäre der zusätzliche Einsatz einer immunzytologischen Untersuchung sinnvoll.

Im Endeffekt können Fragmente aus den oben erwähnten Hirnregionen daher durchaus grob zugeordnet werden. Eine Verwechslung der Abklatschregionen konnte daher nach geringer Einarbeitung durchweg klar ausgeschlossen werden.

Dafür wurde die zytologische Beurteilung durchaus durch bereits einsetzende Autolyse erschwert. Betroffene Präparate machten einen „schmierigen“ nahezu amorphen Gesamteindruck. Bakterielle Kontamination konnte auf vielen der zytologischen Präparate ohne Maskierung der Primärpathologien beobachtet werden. Hauptsächlich wurden hier fusiforme Bakterien identifiziert, vereinzelt aber auch stäbchenförmige Bakterien, Mischkulturen und Simonsiella (COWELL et al., 2008).

4. Überprüfung der Ergebnisse mit Augenmerk auf dem Vergleich unterschiedlicher Erkrankungsgruppen

Die in dieser Studie gesammelten Fälle wurden anhand ihrer histologischen Diagnose in drei verschiedene Krankheitsgruppen unterteilt, um die Unterschiede der in der oberflächenzytologischen Untersuchung erhaltenen Ergebnisse nicht zu vernachlässigen. Diese drei Kategorien wurden, wie schon unter Punkt III. der Publikation beschrieben, als entzündliche, neoplastische und nicht-infiltrative Erkrankungen (NID) des Hirns definiert. Zu den NID wurden unter anderem degenerative, metabolische, vaskuläre Erkrankungen sowie Traumata zusammengefasst.

Eindeutig die besten Ergebnisse konnten bei den entzündlichen Veränderungen erzielt werden. In 71,7% der Fälle stimmte die zytologische Diagnose mit der

histologischen überein, und in 80,0% waren die zytologischen Präparate zumindest auffällig. Hierbei ist bemerkenswert, dass die Begrenzung eines Prozesses auf das Hirnparenchym oder die Ventrikel, die in der histologischen Untersuchung bestimmt wurde, keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Genauigkeit der zytologischen Diagnosestellung bedeutet. Auch bei diesen Fällen konnte die zytologische Untersuchung unerwartet gute Resultate erzielen. Folglich spielt bei den entzündlichen Veränderungen die Lokalisation der Läsion für die Schnelldiagnostik scheinbar eine untergeordnete Rolle. Hieraus kann geschlossen werden, dass die erhöhte Anzahl an Entzündungszellen, die auch aus tieferen Strukturen an die Oberfläche zu gelangen vermögen, von wohl größerer Bedeutung sein könnte. Außerdem konnte die Zytologie in 8,3% der entzündlichen Fälle Zusatzinformationen hervorbringen, die in der Histologie nicht zu sehen waren.

Ähnlich der histologischen Diagnostik war die ätiologische Zuordnung der Entzündungszytologie auf bakterielle Meningitiden, Enzephalitiden und Meningoenzephalitiden beschränkt. Ein bakterieller Befund wurde hier nur als kausal interpretiert, sofern sich die Bakterien intrazellulär befanden. Eine oft aufgefundene extrazelluläre Mischflora erscheint eher unwahrscheinlich, um als pathogene Krankheitsursache in Frage zu kommen (COWELL et al., 2008). Sie wird als Kontamination interpretiert, jedoch sind nur wenige Erreger durch ihre Morphologie schon eindeutig als Kontaminanten zu erkennen. Zu diesen gehören zum Beispiel fusiforme Bakterien und *Simonsiella* (COWELL et al., 2008). Da im Gegensatz zu der Liquordiagnostik auch Parenchymzellen in dem zytologischen Abklatsch vorhanden sind, dürfen im Einzelfall auch intrazelluläre Erreger mit Nerven-, Glia- oder Endothelzelltropismus erkennbar werden, auch wenn diese im eigenen Material nicht vorhanden waren. Betrachtet man die Kontrollgruppe, so konnten in fast 6% der histologisch als unauffällig bestätigten Kontrollen entzündliche Veränderungen festgestellt werden. Hier muss sich nun gefragt werden, ob diese entzündlichen Veränderungen als relevant zu werten sind, oder ob diese, wenn sie in der Histologie unentdeckt bleiben, auch tatsächlich keine Relevanz haben. Denkbar wäre, dass sich Entzündungszellen, die sich auf der Oberfläche des Hirns befinden bei einem Abklatsch durch Adhäsionskräfte auf dem Objektträger kumulieren, jedoch in einem histologischen Querschnitt aufgrund geringer Anzahl untergehen.

Schon allein aus diesem Grund sollten zytologische Abklatschpräparate des Hirns immer in der kompletten Aufarbeitung eines postmortalen Falles Anwendung finden, um zusätzlich zur Histologie Informationen bereitzustellen.

Die ebenfalls infiltrative Kategorie der Neoplasien erreichte die zweitbesten Ergebnisse in der zytologischen Auswertung. Mit 42,1%iger Übereinstimmung der zytologischen und histologischen Diagnose, und insgesamt 84,2% abnormalen zytologischen Präparaten unter den histologisch bestätigten Tumorfällen, kann die Zytologie überzeugen. Zusätzliche Information zur Histologie konnten in 15,8% der Fälle erhalten werden, und in einem einzigen Fall aus der Kontrollgruppe wurden Tumorzellemboli eines bronchioalveolären Karzinoms in dem zytologischen Präparat entdeckt, die aber in der Histologie nicht zu erkennen waren. Auch wenn die Histologie bei der Diagnosestellung eines Tumors einen deutlichen Vorsprung hat, ist es erstaunlich und wissenswert, dass die zytologische Untersuchung in Einzelfällen der Histologie sogar überlegen war. Sicherlich kann die Zytologie nicht alleine herangezogen werden um solche Fälle aufzuklären, jedoch kann sie wichtige zusätzliche Informationen liefern. Außerdem lassen sich die Einzelzellen in dem zytologischen Präparat besser auf eventuelle Malignitätskriterien untersuchen als in einem histologischen Schnitt, da die zellulären Details meist besser dargestellt werden (JÖRUNDSSON et al., 1999).

Erwartungsgemäß schnitt die Zytologie bei der Gruppe der NID am schlechtesten ab. Eine Übereinstimmung mit der histologischen Diagnose konnte nur in 10,7% erreicht werden, und nur 26,8% der Fälle zeigten zytologische Abnormalitäten. Hierbei konnte allerdings keine ätiologische Zuordnung erzielt werden. Doch konnte die Zytologie in drei Fällen Zusatzinformationen liefern. Bei den zu den NID zählenden Krankheiten ist eine Hyperzellularität, eine hohe Exfoliation oder eine Änderung der Zellkomposition des Hirnes weniger oft zu erwarten. Eine Exfoliation tritt in dieser Gruppe nur blutungsbedingt, bei Nekrose oder im Zuge resorptiver Prozesse auf. Ansonsten können bei den NID aber histoarchitektonische und/oder zytomorphologische Veränderungen vermutet werden. Erstere sind wahrscheinlich nur sehr begrenzt in den zytologischen Präparaten zu erkennen. Letztere könnten möglicherweise sichtbar sein, allerdings nur wenn entsprechende Zellen aus den betroffenen Regionen auf dem Objektträger anzutreffen sind. Eine Diagnosestellung ist auf die Anwesenheit

veränderter Zellen angewiesen. Diese ist nur möglich, wenn tiefe Parenchymzellen mit cytomorphologischen Veränderungen zufallsbedingt durch Translokation an die Oberfläche gelangen. So könnten zum Beispiel astrozytäre Erkrankungen, wie die Alexander-Krankheit, neuronale Erkrankungen, wie lysosomale Speicherkrankheiten, spongiforme Krankheiten oder exzitotoxische eosine Nervenzellnekrosen, sowie andere abnorme Einschlüsse erkannt werden. Diese Veränderungen sind in der Regel sehr regionenspezifisch, was zur Folge hat, dass Zellen exakt aus der Prädilektionsstelle auf dem zytologischen Präparat vorhanden sein müssen, um eine Diagnose zu ermöglichen. Damit ist die Wahrscheinlichkeit einer zytologischen Diagnose bei den NID insgesamt eher gering.

Die Fragestellung, wie also die veränderten Zellen aus der Tiefe an die Oberfläche des Hirnes transportiert werden, lässt sich nicht vollständig beantworten. In Betracht gezogen werden muss, dass artifiziell im Rahmen der Präparation und Probennahme Mikroläsionen am Hirn verursacht werden könnten, wodurch Zellen aus tieferen Strukturen an die Oberfläche gebracht werden, auch wenn keine deutlichen Hinweise aus der Zellzusammensetzung (siehe oben) vorlagen.

Nicht artifiziell, also vorbestehend, könnten Zellen passiv durch Konvektion oder aktiv durch Zellmigration an die Oberfläche gelangen. Führt der Krankheitsprozess zu einer Auflösung des Gewebekontextes so wäre es denkbar, dass Zellen mit der Extrazellularflüssigkeit transportiert werden oder durch die Schwerkraft ihre Lokalisation verändern. Bei Erhalt des Gewebekontextes könnten Zellen mit der interstitiellen Flüssigkeit oder dem Liquor ausgebreitet werden, wie bei Tumorzellemboli bereits bekannt (MAREEL et al., 1998).

Außerdem wäre es denkbar, dass sich die Zellen an der Oberfläche des Hirnes durch Adhäsionskräfte während des Abklatsches vermehrt an dem Objektträger anlagern und folglich in höherer Anzahl auf der zytologischen Probe vorhanden sind, wobei eventuell in der histologischen Untersuchung nur ganz vereinzelt veränderte Zellen zu erkennen sind.

Die bessere Detektion einer Tumorzellembolie in der Zytologie könnte durch eine Tumorzellverschleppung entlang der Mikrogefäße der Leptomeninx, und deren Austreten aus dem Blutgefäß, beziehungsweise deren Ausbreitung über den Liquor erklärt werden. Eine andere Überlegung wäre, dass Unterschiede in Kraft

und Feuchtigkeit während des Abklatsches zu einem Platzen der Blutgefäße in den Meningen führen könnten und somit Zellen aus den Blutgefäßen gut sichtbar auf dem abgeklatschten Objektträger anzutreffen sind.

Den Erwartungen entsprechend liefern die infiltrativen Erkrankungen bessere Ergebnisse in der zytologischen Untersuchung. Zweifelsohne sollte man im Hinterkopf haben, dass wir in den zytologischen Proben auf das Vorhandensein veränderter Zellen angewiesen sind um eine Diagnose zu stellen. Denn ein unauffälliges zytologisches Präparat kann eine Erkrankung nie vollständig ausschließen.

5. Empfehlung für die zytologische Untersuchung postmortaler Proben der Hirnoberfläche

Auch wenn man weiß von welcher Lokalisation das Präparat stammt, sollte man ohne Befangenheit die vorliegenden Zellen beurteilen. Bei der Hirnzytologie ist es im Gegensatz zur Liquorbefundung essentiell die Normozytologie des ZNS verinnerlicht zu haben. Zur Untersuchung der oberflächenzytologischen Proben könnte nach dem abgebildeten Schema vorgegangen werden (Abbildung 1).

Nach der Überprüfung der Beschaffenheit des Hintergrundes, der Anzahl freier Erythrozyten, sowie der Verteilungsdichte kernhaltiger Zellen, sollte zu Beginn folgende Frage beantwortet werden: „Ist hirneigenes Gewebe auf der zytologischen Probe vorhanden?“.

Falls die Frage mit einem Nein beantwortet wird, sind entweder keine Zellen auf dem Objektträger anzutreffen und er ist somit nicht aussagekräftig, oder diese wurden durch andere Zellen oder extrazelluläre Bestandteile verdrängt oder maskiert. Sollte Ersteres der Fall sein, so sollte geprüft werden ob diese trotzdem an einem Krankheitsprozess beteiligt sein könnten. Hierfür kämen zum Beispiel Entzündungszellen oder metastasierende Tumorzellen in Betracht. Ebenso können Bakterien oder Pilze auf dem Objektträger auftreten. Ob dadurch ein Krankheitsbezug herzustellen ist, oder ob diese nur ein Zufallsbefund und Kontaminanten darstellen, muss im Folgenden geklärt werden.

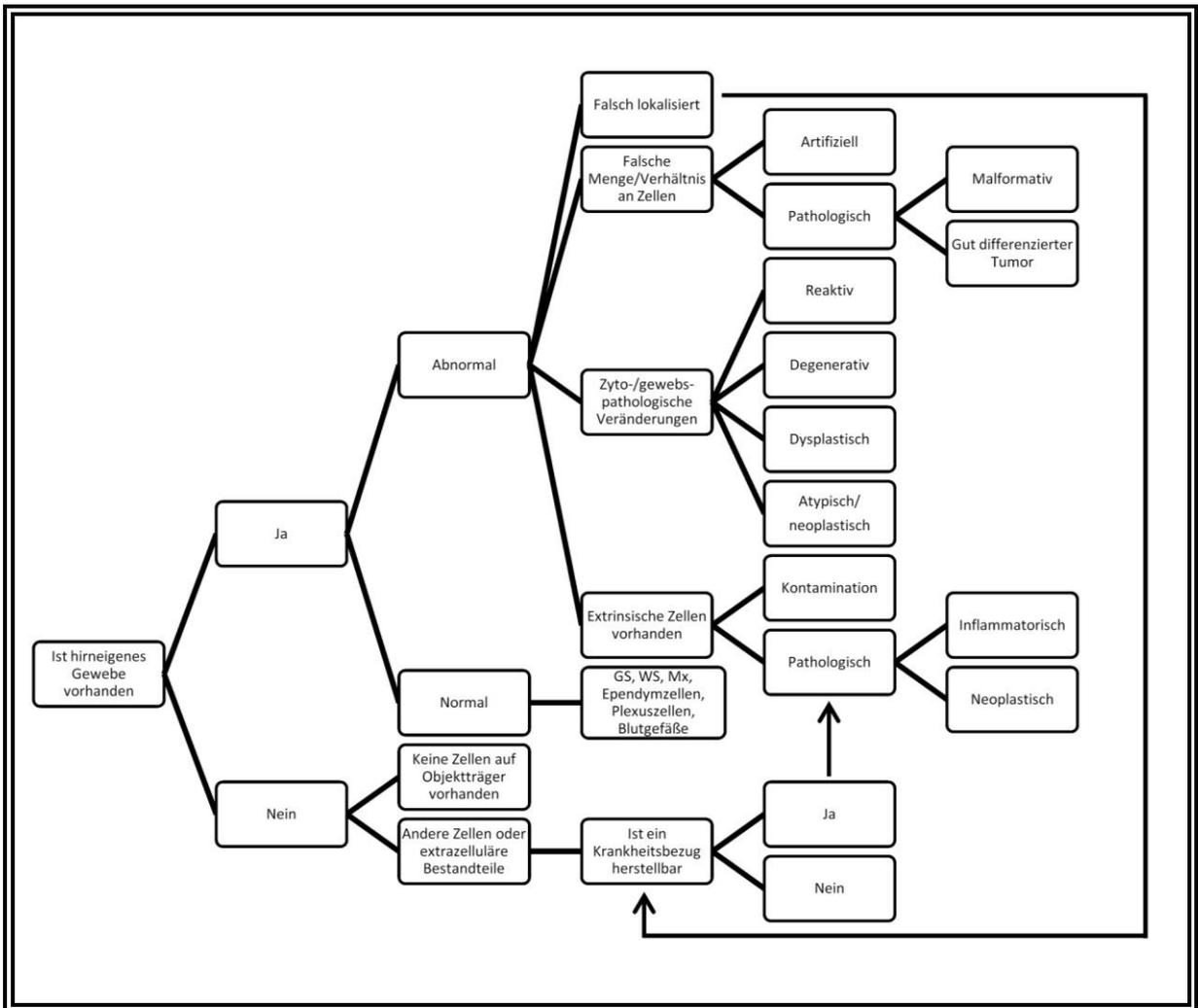


Abbildung 1: Vorgeschlagener Ablaufplan für die zytologische Untersuchung postmortaler Proben der Hirnoberfläche

Befindet sich jedoch hirneigenes Gewebe auf dem Objektträger, muss unterschieden werden, ob dieses in qualitativer sowie quantitativer Hinsicht normal bzw. erwartungsgemäß oder abnormal bzw. verändert ist.

In oberflächenzytologischen Hirnproben können wie oben beschrieben abgeschilferte Meningealzellen, zirkulierende Blutzellen und auch ohne strukturelle Hirnerkrankung Anteile von grauer oder weißer Substanz, wie Neuronen oder Myelinfiguren, vorhanden sein. Ihrer Herkunft entsprechend können zum Beispiel die Granularzellschicht oder die Purkinjezellen des Kleinhirnes, die Großhirnrinde oder die Basalganglien unterschieden werden. Außerdem können meningeale und parenchymatöse Blutgefäße angetroffen werden. Epenymzellen und Plexuszellen, welche im zytologischen Präparat nicht zu unterscheiden sind, können ebenfalls in Proben hirngesunder Tiere

vorkommen.

Wird das Gewebe dagegen als „abnormal“ eingestuft, so sollten unterschiedliche Punkte abgeklärt werden.

1: „Ist das Gewebe eventuell falsch lokalisiert?“

Das heißt, dass eindeutig feststeht, welche Lokalisation beprobt wurde, man aber trotzdem Zellen oder Zellzusammensetzungen typisch für andere Lokalisationen vorfindet. Denn nicht nur die einzelne Zelle ist von Bedeutung, auch die Zusammensetzung der Zellen im Präparat muss beachtet werden, denn je nach Region treten verschiedene Zellzusammensetzungen auf. Diese regionalen Besonderheiten, wie zum Beispiel die zellreiche Granularzellschicht des Kleinhirns, müssen berücksichtigt werden, da sie sonst fälschlicherweise als pathologisch bewertet werden könnten. Sind tatsächlich Zellen fehlerhaft lokalisiert, so könnte dies beispielsweise ein Hinweis auf eine bestehende Fehlanlage oder auf eine artifizielle Verschleppung darstellen.

2: „Besteht eine untypische Menge an Zellen oder ein falsches Verhältnis zwischen Zellen beziehungsweise Gewebskomponenten?“

Auch hier muss einem das regionenspezifische Zellbild vor Augen sein, um eine angemessene Beurteilung durchführen zu können. Ist zum Beispiel das Verhältnis von grauer zu weißer Substanz verschoben, ungewöhnlich zellreich oder kommen ungewöhnlich viele Blutgefäße in dem Präparat vor, so könnte dies auf Entartungen wie eine Neoplasie hindeuten.

3: „Liegen zyto- oder gewebspathologische Veränderungen vor?“

Das Aussehen der Einzelzellen sollte mit dem normozytologischen Bild abgeglichen werden, um eine adäquate Aussage machen zu können. Es sollte untersucht werden, ob reaktive, degenerative, dysplastische oder neoplastische Veränderungen auftreten. Zu den reaktiven Veränderungen zählen unter anderem die Astrozytose, Astrogliose, Mikrogliaaktivierung, sowie eine vaskuläre Prominenz (KLEINSCHMIDT-DEMASTERS und PRAYSON, 2006; PRAYSON und KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, 2006; ZARKA und MOES, 2007; LACRUZ et al., 2014). Zu den degenerativen Veränderungen zählen zum Beispiel eosinophile Nervenzellnekrosen (STERNBERG, 1996; ZARKA und MOES, 2007), aber auch alle anderen Zellkomponenten können degenerative

Veränderungen aufweisen, wie Astrozyten vom Alzheimer Typ II (STERNBERG, 1996). Zu der Beurteilung von dysplastischen beziehungsweise neoplastischen Zellen können die Kriterien der allgemeinen Zytologie herangezogen werden (RASKIN und MEYER, 2010). Wird eine monomorphe Zellpopulation ohne signifikante entzündliche Veränderungen aufgefunden, so wird eine Neoplasie vermutet. Diese kann aufgrund zytomorphologischer Charakteristika in benigne und maligne Neoplasien eingeteilt werden. Maligne Zellen zeigen meist drei oder mehrere typische zytomorphologische Veränderungen. Diese reichen von Anisozytose, Anisokaryose, Pleomorphismus, gestörtem Kern-zu-Zytoplasma-Verhältnis, vergrößerten oder in vermehrter Anzahl vorliegenden Nukleoli, bis hin zu abnormalen Mitosefiguren (RASKIN und MEYER, 2010).

4: „Sind neben den hirneigenen auch extrinsische (extraneurale) Zellen vorhanden und eventuell verändert?“

Darunter zählen unter anderem Zellen sekundärer Neoplasien sowie Entzündungszellen. Entzündungszellen dominieren häufig das zytologische Zellbild bei entzündlichen Läsionen. Je nach Ursache einer Meningoenzephalitis können sowohl neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, aber auch eosinophile oder basophile Granulozyten auftreten. Außerdem sind in unterschiedlicher Bedeutung Makrophagen zu finden. Bei diesen kann phagozytiertes Material genauer betrachtet werden und eventuell Aufschluss über pathologische Vorgänge, wie Erythrophagozytose, Zellphagozytose kernhaltiger Zellen oder auch Myelinophagie liefern. Weiter muss der Frage nachgegangen werden, wo genau diese Entzündungszellen zu finden sind, sofern die Präparatherstellung dies zulässt. Ist nur die Meninx, die weiße oder graue Substanz betroffen, oder gar mehrere Bezirke? Die Entzündungszellen in einem zytologischen Abklatschpräparat der Hirnoberfläche geben nur Aufschluss über einen vorliegenden Entzündungsprozess, wenn sie in direkter Nachbarschaft zu Zellen des ZNS liegen und ein Bezug zu diesen herstellbar ist. Darüber hinaus können Entzündungszellen oft auch in gefäßnaher Umgebung oder sogar in den Gefäßen selbst auftreten. Sind neben den Entzündungszellen Bakterien in dem zytologischen Präparat zu finden, sollte auf intrazelluläre Bakterien geachtet werden, da nur diese für eine Diagnose aussagekräftig sind. Frei vorkommende Bakterien müssen als Kontamination betrachtet werden (COWELL et al., 2008). Wichtig ist ferner die Assoziation der Entzündung mit möglichen zytopathogenen

Effekten von Gefäßzellen, Glia und Neuronen (KLEINSCHMIDT-DEMASTERS und PRAYSON, 2006), die auf bestimmte, auch virale Erreger hindeuten könnten (GUARNER et al., 2004).

6. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Zytologie von der Oberfläche des Hirns eine aussagekräftige Ergänzung zu der histologischen Aufarbeitung von Fällen mit neurologischen Erkrankungen für die postmortale Untersuchung ist. Wie zu erwarten, konnten die Fälle mit entzündlichen Läsionen in der Zytologie am besten nachgewiesen werden. Doch auch andere Erkrankungen, wie neoplastische oder degenerative Veränderungen konnten in der Zytologie, wenn auch in geringerer Anzahl, aufgedeckt werden. Außerdem lieferte die zytologische Untersuchung zusätzliche Informationen, die in der histologischen Untersuchung nicht zu erkennen waren.

Die Zytologie bietet auch bei der Beurteilung der Einzelzellen einen Vorteil, da diese meist im Monolayer vorliegen und somit wertvolle, zelluläre und nukleäre Details erlangt werden können. Dies ist besonders für die Beurteilung von Tumorzellen von Bedeutung (JÖRUNDSSON et al., 1999; SHARMA und DEB, 2011). Im Hinblick auf die Durchführung weiterführender Untersuchungen könnte die Zytologie gegenüber der Histologie von Vorteil sein. Wären zum Beispiel weitere Untersuchungen erwünscht, wie der Einsatz von Immunmarkern, so könnten die angefärbten, zytologischen Schnitte mit adäquatem Zellmaterial wieder entfärbt werden und anschließend einer immunzytologischen Untersuchung zur Verfügung stehen. Des Weiteren wurde für bestimmte Marker beschrieben, dass diese auf zytologischen Proben sensitiver zu wirken scheinen als auf histologischen Schnitten, da immunzytologische Proben positiv waren, wohingegen einige immunhistologischen Proben negativ ausfielen. Außerdem konnte in Fällen wo beide, die immunzytologische und die immunhistologische Untersuchung, positiv waren, festgestellt werden, dass die Intensität des histologischen Schnittmaterials deutlich schwächer war (CORKILL und KATZ, 1994). Die Zytologie kann folglich auch für antikörperbasierte Gewebsdiagnostik von Vorteil sein.

Die Anfertigung und Auswertung von postmortalen zytologischen Proben am Hirn könnte außerdem zu Trainingszwecken genutzt werden. Beispielsweise wäre

dies für die Ausbildung von Zytologen aus dem klinischen Umfeld, Labordiagnostiker und Pathologen mit zytologischem Schwerpunkt vorstellbar. Damit könnten diese intensiv auf intraoperative Schnelldiagnostik hin trainiert werden, sowie auf die vorläufige Abklärung von Infektionserkrankungen und –quellen für andere Tiere, Besitzer und Tierärzte.

Schlussendlich sollten bei der zytologischen Untersuchung von Oberflächenabklatschpräparaten des Hirns noch weitere Nachforschungen angestellt werden. So könnten immunzytologische Untersuchungen die diagnostische Aussagekraft bestärken oder auch krankheitsbezogene Studien folgen. Diese Studie stellt einen guten ersten Eindruck über die Vielfalt der anzutreffenden Erkrankungen und die diagnostische Genauigkeit der zytologischen Proben dar.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Studie wurden nicht-invasive, oberflächliche Abklatschzytologien der Hirnoberfläche angefertigt und hinsichtlich ihres diagnostischen Wertes als Routinemethode für die postmortale Untersuchung des Hirns analysiert. Die Ergebnisse wurden mit denen der histologischen Untersuchung verglichen.

Insgesamt wurden 135 zytologische Abklatschpräparate des Hirns von verschiedenen Säugetierspezies mit klinisch festgestellter oder vermuteter neurologischer Erkrankung evaluiert und einer detaillierten zytologischen Untersuchung unterzogen. Als Kontrollen dienten die zytologischen Präparate von 34 histopathologisch unauffälligen Hirnen.

Nach dem Entfernen der Dura mater und überschüssiger Flüssigkeit von der Gehirnoberfläche wurden von diesen Tieren sektionsbegleitend Abklatschpräparate von der dorsolateralen, zerebralen Konvexität und der dorsolateralen Oberfläche des Zerebellums angefertigt. Alle zytologischen Proben wurden luftgetrocknet und routinemäßig mit der modifizierten Färbung nach Wright (modWS) und der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) angefärbt. Die Objektträger wurden mikroskopisch evaluiert und die Ergebnisse mit der Histologie, im Hinblick auf ihre Ähnlichkeit, Diskrepanz und diagnostische Wertigkeit, verglichen.

Die Histologie ermittelte entzündliche Erkrankungen in 44,4%, Neoplasien in 14,1% und nicht-infiltrative Erkrankungen (NID: degenerativ, metabolisch, traumatisch und vaskulär) in 41,5% der Fälle. Die Oberflächenzytologie erkannte pathologische Veränderungen in 58,5% der erkrankten Hirne. In 11,9% der Fälle wurden eindeutige aber subdiagnostische Merkmale festgestellt. Unklare Phänomene wurden in 2,2% der Fälle beobachtet. In 40,7% der histologisch betroffenen Gehirne lieferte die Zytologie negative Ergebnisse. Andererseits konnten 42,2% der histologischen Diagnosen reproduziert werden und 8,1% der Fälle konnten sogar Zusatzinformationen liefern, die nicht in der Histologie erkannt wurden. Mit 71,7% übereinstimmenden Ergebnissen zeigte die Gruppe der Entzündungen die höchste diagnostische Genauigkeit. Die zytologischen Proben konnten die histologische Tumordiagnose in 42,1% der Fälle wiedergeben. Mit einer Fehlerrate von 89,3%, lieferte die zytologische

Untersuchung bei den NID nicht zuverlässig reproduzierbare Ergebnisse. Bei den 34 histopathologisch normalen Fällen zeigte sich die Zytologie weitestgehend unauffällig (91,2%). Jedoch zeigten 8,8% der histopathologisch unauffälligen Gehirne zytologische Abnormitäten, wovon zwei Fälle eine spezifische Diagnose erlaubten.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die zytologische Untersuchung von Hirnen eine vielversprechende Zusatzmethode für die Diagnostik struktureller Hirnläsionen darstellt, dies sogar dann, wenn die Proben nicht-selektiv von der Hirnoberfläche gewonnen werden. Natürlich kann sie die ordnungsgemäße histologische Untersuchung nicht ersetzen, sie jedoch durch unerwartete Zusatzbefunde sinnvoll ergänzen.

VI. SUMMARY

This study was launched to analyse the diagnostic value of non-invasive brain surface cytology as routine procedure in postmortem brain examination. The findings were compared to full brain histology.

Cytological touch preparations of the brains from a total of 135 animals of different vertebrate species with clinically documented or suspected neurological disease were evaluated and underwent a detailed cytological assessment. Samples of 34 histopathological normal brains served as cytological controls.

After removal of the dura mater and excessive fluids from the brain surface, touch preparations were taken at autopsy from the dorsolateral aspects of the cerebral convexity and the dorsolateral cerebellar surface. All slides were air-dried and routinely stained with modified Wright stain (modWS) and Haematoxylin-eosin stain (HE). The slides were evaluated microscopically and findings were compared to brain histology with regards to their resemblance, discrepancy and diagnostic validity.

Histology identified inflammatory disorders in 44.4% of cases, neoplasia in 14.1% and non-infiltrative diseases (NID: degenerative, metabolic, vascular disorders and trauma) in 41.5%. Surface cytology attained pathological changes in 58.5% of affected brains. In 11.9% of cases sub-diagnostic features were observed. Unclear phenomena were seen in 2.2% of cases. In 40.7% of histologically affected brains cytology provided negative results. Apart from that cytology reproduced the histological diagnosis in 42.2% of clinical cases, and in 8.1% cytology added surplus details, which could not be detected in histological examination. The category of inflammatory diseases showed the highest diagnostic accuracy with 71.7% matching results. Cytological results accorded with the histological tumour diagnosis in 42.1% of cases. With a failure rate of 89.3% cytology provided non-reliable and non-reproducible results in the group of NID. Amongst the 34 cases of histopathologically confirmed normal brains cytology appeared to be inconspicuous (91.2%). But 8.8% of histopathologically normal brains showed cytological abnormalities, whereof two cases allowed for a specific diagnosis.

In summary it can be said, that cytological investigation from the brain surface

seems to be a promising ancillary tool in the diagnosis of structural brain lesions, even if samples are not selectively won from the brain surface. Certainly cytology cannot replace an adequate histological investigation, but is able to complement additional findings to it.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Alam MS, Ahsan H, Sajjad Z, Beg M, Bhatti U, Enam A, Wasay M. Magnetic resonance spectroscopy of enhancing cerebral lesions: analysis of 78 histopathology proven cases. *J Pak Med Assoc* 2014; 64: 1141-5.

Bienzle D, McDonnell JJ, Stanton JB. Analysis of cerebrospinal fluid from dogs and cats after 24 and 48 hours of storage. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 216: 1761-4.

Boon ME, Drijver JS (1986) Routine cytological staining techniques: theoretical background and practice. Elsevier Science Limited: 59-9.

Carmichael N, (1998) Nervous system. In: Davidson M, Else R, Lumsden J (Eds.), *Manual of Small Animal Clinical Pathology*. British Small Animal Veterinary Association: 240-235.

Chamberlain MC, Glantz M, Groves MD, Wilson WH. Diagnostic tools for neoplastic meningitis: detecting disease, identifying patient risk, and determining benefit of treatment. *Semin Oncol* 2009; 36: 45-35.

Chan JK, Kung IT. Rehydration of air-dried smears with normal saline. Application in fine-needle aspiration cytologic examination. *Am J Clin Pathol* 1988; 89: 30-4.

Chrisman CL. Cerebrospinal fluid analysis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1992; 22: 810-781.

Christopher MM, Perman V, Hardy RM. Reassessment of cytologic values in canine cerebrospinal fluid by use of cytocentrifugation. *J Am Vet Med Assoc* 1988; 192: 1726-9.

Christopher MM. Bone marrow contamination of canine cerebrospinal fluid. *Vet Clin Pathol* 1992; 21: 95-8.

Conway LW. Stereotaxic diagnosis and treatment of intracranial tumors including an initial experience with cryosurgery for pinealomas. *J Neurosurg* 1973; 38: 453-60.

Cook JR, Jr., DeNicola DB. Cerebrospinal fluid. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1988; 18: 475-99.

Corkill ME, Katz R. Immunocytochemical staining of c-erb B-2 oncogene in fine-needle aspirates of breast carcinoma: a comparison with tissue sections and other breast cancer prognostic factors. *Diagn Cytopathol* 1994; 11: 250-4.

Cowell R, Tyler R, Meinkoth J, DeNicola D (2008) *Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat*, 3 edn. Mosby, St. Louis, MO: 232-1.

Dada M, Ansari N. Post-mortem cytology: a reappraisal of a little used technique. *Cytopathology* 1997; 8: 417-20.

de Graaf MT, van den Broek PD, Kraan J, Luitwieler RL, van den Bent MJ, Boonstra JG, Schmitz PI, Gratama JW, Sillevius Smitt PA. Addition of serum-containing medium to cerebrospinal fluid prevents cellular loss over time. *J Neurol* 2011; 258: 1507-12.

De Lahunter A, Glass E, Kent M (2015) *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology* 4. edn. Elsevier Saunders, St. Louis: 23-10.

De Lorenzi D, Bernardini M, Mandara MT (2004) Nuove applicazioni in citologia diagnostica veterinaria: il sistema nervoso centrale. 48th SCIVAC National Congress. Rimini, Italy. 136-8.

De Lorenzi D, Mandara MT, Tranquillo M, Baroni M, Gasparinetti N, Gandini G, Masserdotti C, Bonfanti U, Bertolini G, Vian P, Bernardini M. Squash-prep cytology in the diagnosis of canine and feline nervous system lesions: a study of 42 cases. *Vet Clin Pathol* 2006; 35: 208-14.

Di Terlizzi R, Platt SR. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: part II - analysis. *Vet J* 2009; 180: 32-15.

Evans RJ, 1988. Acillary diagnostic aids. In: Wheeler SJ (ED.), *Manual of Small Animal Neurology*, British Small Animal Veterinary Association: 62-47.

Fallin CW, Raskin RE, Harvey JW. Cytologic identification of neural tissue in the cerebrospinal fluid of two dogs. *Vet Clin Pathol* 1996; 25: 127-9.

Firlik KS, Martinez AJ, Lunsford LD. Use of cytological preparations for the intraoperative diagnosis of stereotactically obtained brain biopsies: a 19-year experience and survey of neuropathologists. *J Neurosurg* 1999; 91: 454-8.

Fleischmann S. Die Ergebnisse der Lumbalpunktion. *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde* 1897; 10: 337-67.

Folkerth RD. Smears and frozen sections in the intraoperative diagnosis of central nervous system lesions. *Neurosurg Clin N Am* 1994; 5: 18-1.

Fournel-Fleury C, Magnol J-P, Guelfi J-F (1994) *Atlas en couleur de cytologie du cancer chez le chien et le chat*. 35-27.

Frost JK. *The cell in health and disease. An evaluation of cellular morphologic expression of biologic behavior*. 2nd, revised edition. *Monogr Clin Cytol* 1986; 2: 304-1.

Garma-Avina A. An inexpensive sedimentation chamber for the preparation of cytologic specimens of cerebrospinal fluid. *J Vet Diagn Invest* 2004; 16: 585-7.

Guarner J, Shieh WJ, Hunter S, Paddock CD, Morken T, Campbell GL, Marfin AA, Zaki SR. Clinicopathologic study and laboratory diagnosis of 23 cases with West Nile virus encephalomyelitis. *Hum Pathol* 2004; 35: 983-90.

Halliburton W, Dixon W. Secretion of the Cerebrospinal Fluid. *J. Physiol.* 1913; 47: 215.

Horsley V, Clarke RH. The structure and functions of the cerebellum examined by a new method. *Brain* 1908; 31: 124-45.

Jones CA. Papanicolaou staining of air-dried smears: value in rapid diagnosis. *Cytopathology* 1996; 7: 333-9.

Jones EG. Microcolumns in the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000; 97: 5019-21.

Jörundsson E, Lumsden JH, Jacobs RM. Rapid staining techniques in cytopathology: a review and comparison of modified protocols for hematoxylin and eosin, Papanicolaou and Romanowsky stains. *Vet Clin Pathol* 1999; 28: 100-8.

Junqueira LCU, Carneiro J, Gratzl M (2005) *Histologie*, 6 edn. Springer, Heidelberg: 135-109.

Katellaris A, Kencian J, Duflou J, Hilton JM. Brains at necropsy: to fix or not to fix? *J Clin Pathol* 1994; 47: 718-20.

Kleinschmidt-DeMasters BK, Prayson RA. An algorithmic approach to the brain biopsy--part I. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 1630-8.

Koblik PD, LeCouteur RA, Higgins RJ, Bollen AW, Vernau KM, Kortz GD, Ilkiw JE. CT-guided brain biopsy using a modified Pelorus Mark III stereotactic system: experience with 50 dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 1999a; 40: 434-40.

Koblik PD, LeCouteur RA, Higgins RJ, Fick J, Kortz GD, Sturges BK, Pascoe PJ. Modification and application of a Pelorus Mark III stereotactic system for CT-guided brain biopsy in 50 dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 1999b; 40: 424-33.

Krieger MD, Chandrasoma PT, Zee CS, Apuzzo ML. Role of stereotactic biopsy in the diagnosis and management of brain tumors. *Semin Surg Oncol* 1998; 14: 25-13.

Krishnani N, Kumari N, Behari S, Rana C, Gupta P. Intraoperative squash cytology: accuracy and impact on immediate surgical management of central nervous system tumours. *Cytopathology* 2012; 23: 308-14.

Lacruz CR, De Santamaría JS, Bardales RH (2014) Central nervous system intraoperative cytopathology. Springer: 194-19.

Long SN, Anderson TJ, Long FH, Johnston PE. Evaluation of rapid staining techniques for cytologic diagnosis of intracranial lesions. *Am J Vet Res* 2002; 63: 381-6.

Mareel M, Leroy A, Bracke M. Cellular and molecular mechanisms of metastasis as applied to carcinomatous meningitis. *J Neurooncol* 1998; 38: 102-97.

Meyer M, Keith-Rokosh J, Reddy H, Megyesi J, Hammond RR. Sources of error in neuropathology intraoperative diagnosis. *Can J Neurol Sci* 2010; 37: 620-4.

Mischke R (2005) *Zytologisches Praktikum für die Veterinärmedizin*. Schlütersche Verlagsgesellschaft, Hannover: 48-11.

Ng WF, Choi FB, Cheung LL, Wu C, Leung CF, Ng CS. Rehydration of air-dried smears with normal saline. Application in fluid cytology. *Acta Cytol* 1994; 38: 64-56.

Nickel R, Schummer A, Seiferle E (2004) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, 4 edn. Parey, Stuttgart: 636-203.

Panth R. A systematic approach to cytological evaluation of central nervous system tumours. *Journal of Pathology of Nepal* 2011; 1: 136-41.

Peiffer J, Schröder JM, W. P (2002) *Neuropathologie*, 3. edn. Springer, Berlin/Heidelberg: 344-183.

Prayson RA, Kleinschmidt-DeMasters BK. An algorithmic approach to the brain biopsy--part II. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 1639-48.

Rand JS, Parent J, Jacobs R, Percy D. Reference intervals for feline cerebrospinal fluid: cell counts and cytologic features. *Am J Vet Res* 1990; 51: 1044-8.

Rand JS, Parent J, Percy D, Jacobs R. Clinical, cerebrospinal fluid, and histological data from thirty-four cats with primary noninflammatory disease of the central nervous system. *Can Vet J* 1994; 35: 174-81.

Raskin R, Meyer D (2010) *Canine and feline cytology: a color atlas and interpretation guide*. Saunders, 2 edn. Elsevier Inc: 365-20.

Rodenas S, Pumarola M, Gaitero L, Zamora A, Anor S. Magnetic resonance imaging findings in 40 dogs with histologically confirmed intracranial tumours. *Vet J* 2011; 187: 91-85.

Roessler K, Dietrich W, Kitz K. High Diagnostic Accuracy of Cytologic Smears of Central Nervous System Tumors. *Acta Cytol* 2002; 46: 667-74.

Russell DS, Krayenbühl H, Cairns H. The wet film technique in the histological diagnosis of intracranial tumours: A rapid method. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 1937; 45: 501-5.

Schmid I, Lambert C, Ambrozak D, Marti GE, Moss DM, Perfetto SP. International Society for Analytical Cytology Biosafety Standard for Sorting of Unfixed Cells. *Cytometry Part A* 2007; 71A: 414-37.

Schulte E. Air drying as a preparatory factor in cytology: investigation of its influence on dye uptake and dye binding. *Diagn Cytopathol* 1986; 2: 160-7.

Sharma S, Deb P. Intraoperative neurocytology of primary central nervous system neoplasia: A simplified and practical diagnostic approach. *J Cytol* 2011; 28: 147-58.

Spiegel EA, Wycis HT, Marks M, Lee A. Stereotaxic apparatus for operations on the human brain. *Science* 1947; 106: 349-50.

Stanley MW, Löwhagen T (1993) Fine needle aspiration of palpable masses. Butterworth-Heinemann: 57-1.

Sternberg SS (1996) Histology for pathologists. Lippincott-Raven, Philadelphia: 167-150.

Suvarna S, Start R. Cyodiagnosis and the necropsy. *Journal of clinical pathology* 1995; 48: 443-6.

Thomson CE, Kornegay JN, Stevens JB. Analysis of cerebrospinal fluid from the cerebellomedullary and lumbar cisterns of dogs with focal neurologic disease: 145 cases (1985-1987). *J Am Vet Med Assoc* 1990; 196: 1841-4.

Torres LF, Collaco LM. Smear technique for the intraoperative examination of nervous system lesions. *Acta Cytol* 1993; 37: 34-9.

Walker E, Going J. Cytopathology in the post mortem room. *Journal of clinical pathology* 1994; 47: 714-7.

Welsch U, Kummer W, Deller T (2014) Lehrbuch Histologie, 4 edn. Elsevier, München: 636-203.

Yang GC, Alvarez, II. Ultrafast Papanicolaou stain. An alternative preparation for fine needle aspiration cytology. *Acta Cytol* 1995; 39: 60-55.

Yang GC. Ultrafast Papanicolaou stain: A superior stain for fine needle aspiration

cytology applied in conjunction with the rehydration of air-dried smear with normal saline solution technique. *Adv Anat Pathol* 1995; 2: 208-11.

Zarka M, Moes G (2007) Intraoperative cytology of central nervous system lesions. *Acta Cytol*; 51 (supp 1) 257.

VIII. ANHANG

1. Methoden

1.1. Herstellung der zytologischen Präparate

Die zytologischen Proben wurden sektionsbegleitend angefertigt. Hierzu wurden nach Entfernung der Dura mater und überschüssiger Flüssigkeit Abklatschproben jeweils von der dorsolateralen, zerebralen und zerebellären Konvexität gewonnen. Dabei wurden beschichtete Objektträger benutzt. Die angefertigten Proben wurden luftgetrocknet und anschließend zu Desinfektionszwecken für 30 min in 75%igem Ethanol belassen. Daraufhin wurden die Objektträger wiederholt luftgetrocknet.

1.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

- (1) Färbung der Kerne in Mayers Hämalaun für 10 min
- (2) Unter fließendem, kalten Wasser für 30 min bläuen
- (3) Gegenfärben mit Eosin für 3 min
- (4) Zweimaliges Spülen in Aqua dest.
- (5) Entwässern mittels aufsteigender Alkoholreihe
 - 20 sec in 30%igen Ethanol
 - 20 sec in 50%igen Ethanol
 - 20 sec in 70%igen Ethanol
 - 20 sec in 96%igen Ethanol
 - 2 x 20 sec in 100%igen Ethanol
- (6) Immersion in Xylol für 3 x 5min
- (7) Eindecken mit Histofluid Eindeckmittel

1.3. Modifizierte Färbung nach Wright

Die modifizierte Färbung nach Wright wurde in einem automatischen Färbeautomat, dem Hematek® Slide Stainer (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Hier wurde der Objektträger eingesetzt und automatisch mit den entsprechenden Lösungen (STN, RNS, BUF) behandelt und anschließend luftgetrocknet. Im Anschluss wurden die Proben für 5 min in Xylol verbracht und zum Schluss mit Histofluid Eindeckmittel eingedeckt.

2. Materialien

2.1. Verwendete Chemikalien

Eosin G	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 100%	VWR Prolabo, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 96%	CLN GmbH, Niederhummel, Deutschland
Histofluid Eindeckmedium	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland
Kalium-Phosphat, wasserfrei, monobasisch	Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Tarrytown, New York, USA
Mayer's Hämalan	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methanol 8%, >99%	Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Tarrytown, New York, USA
Methylenblau-Eosin-Färbung, polychromatisch, 0,3%	Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Tarrytown, New York, USA
Phosphat Puffer	Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Tarrytown, New York, USA
Tensid	Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Tarrytown, New York, USA
Xylol technisch	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich

2.2. Verwendete Lösungen

- Eosin Stammlösung
10 g Eosin G (gelblich)
1000 ml Aqua dest.
- Eosin Gebrauchslösung:
100 ml Eosin Stammlösung
200 ml Aqua dest.
1 ml 100%ige Essigsäure
- Ethanol 75%
750ml 96%iger Ethanol
250ml Aqua dest.
- STN:
Methanol, >99%
Polychromatische Methylenblau-Eosin-Färbung, 0,3%
- RNS:
Methanol, 8%
Tensid
- BUF:
Kalium-Phosphat, monobasisch, wasserfrei, 0,07%
Phosphat Puffer
Tensid

2.3. Verwendete Geräte

Hematek® Slide Stainer	Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Tarrytown, New York, USA
Mikroskop Zeiss Axiophot 2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
Mikroskopkamera Leica DFC 295	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland
Objektträger Star Frost adhesive	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, Edermünde, Deutschland

2.4. Verwendete Software

Text und Tabellen

Microsoft Office 2010

Statistik

GraphPad PRISM (GraphPad Software
INC.)

IX. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Kaspar Matiasek, für die Überlassung dieses Themas, seine gute Betreuung, die ausgiebige Einarbeitung in die zytopathologische Untersuchung sowie dem überaus netten und kollegialen Umgang. Ganz besonders bedanken möchte ich mich für die vielen fachlichen wie auch privaten Gespräche und sein Engagement, mit dem er mich während meiner Arbeit unterstützt hat.

Herzlichen Dank auch an Herrn Dr. Marco Rosati. Danke, dass du mir mit Rat und Tat zur Seite standest und ich dich jederzeit alles fragen konnte. Vielen Dank für deine Ruhe und positive Ausstrahlung die mich immer wieder ermutigt hat.

Ich möchte mich insgesamt beim ganzen Team der Pathologie und Neuropathologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und dem freundlichen und kollegialen Umgang bedanken. Ein besonderes Dankeschön an Frau Karin Stingl für die Einarbeitung und Unterstützung im Labor, sowie der Beantwortung all meiner Fragen im labortechnischen Bereich.

Danke auch an Frau Milanca Pelic für die Unterstützung bei der Suche nach Archivmaterial.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Johannes Hirschberger für die überaus nette Einarbeitung in die allgemeine Zytologie. Danke, dass ich an den „Cyto-rounds“ teilnehmen durfte und dadurch viele hilfreiche Eindrücke sammeln konnte.

An meine lieben Mitdoktoranden ein herzliches Dankeschön. Liebe Eva, Judith, Ulli, Simi und lieber Simon: wir waren ein super Team, haben viel Spaß gehabt und uns gegenseitig unterstützt wo es nur ging. Ich hoffe wir haben auch außerhalb des Instituts noch viele lustige Abende. Besonders bedanken möchte ich mich bei dir Simi für deine Freundschaft. Danke, dass du immer für mich da warst und wir uns gegenseitig immer wieder motiviert haben! Es war eine tolle Zeit am Institut.

Meinem Schatz Basti möchte ich von Herzen danken für die liebevolle und unaufhörliche Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit. Danke, dass du all meine Launen ertragen und mich immer wieder aufgebaut hast wenn ich mit den Nerven mal wieder am Ende war. Vor allem aber danke ich dir für

deine unendlich große Liebe.

Mein größter und grenzenloser Dank gilt meiner Familie für die großartige und bedingungslose Unterstützung bei all meinen Vorhaben. Liebe Mama, lieber Papa ich danke euch von Herzen, dass ihr mich bei der Erfüllung meiner Wünsche und Ziele immer von Herzen unterstützt und jederzeit für mich da seid. Danke für die viele positive Energie! Auch bei meinen Schwestern Sassi und Sveni möchte ich mich von Herzen bedanken. Danke, dass ihr immer ein Ohr für eure kleine Schwester habt und egal wann und wo immer für mich da seid. Seid fest gedrückt. Meiner Oma Lucie danke ich für ihre Liebe!