Proceedings: Deutsch-Sowjetisches Symposium über Gegenwartsfragen der Medizin Kiew 1982

STELLENWERT DER DURCHFLUSSCYTOMETRIE BEI DER FRÜHERKENNUNG MALIGNER ERKRANKUNGEN

G. Valet [1], A.Raffael [1], H.H.Warnecke [2], R.Wirsching [3]
1) Max-Planck-Institut für Biochemie, D-8033 Martinsried
2) I.Frauenklinik der Universität, D-8000 München
3) Chirurgische Klinik, Klinikum Großhadern der Universität D-8000 München

Die Durchflußcytometrie eröffnet neue Möglichkeiten der empfindlichen und schnellen (1000-2000 Zellen/sec) Identifizierung und Charakterisierung von Tumorzellen. Es können Bestandsparameter (z.B. DNS, RNS, Antigene, Lektinbindungsorte, Hormonrezeptoren, Oberflächenladungsdichte, Protein und Lipide) und bei lebenden Zellen auch Funktionsparameter (z.B. Transmembranpotential, intrazelluläres pH, lysosomale oder cytoplasmatische Enzymaktivitäten, Phagozytose und Zellvolumen) gemessen werden. Die Funktionsparameter sind vor allem von Bedeutung für die Aufklärung der Interaktion der Tumorzellen mit den normalen Zellen des Organismus. Ein großer Vorteil der Durchflußcytometrie besteht darin, daß mehrere Parameter jeder Zelle gleichzeitig gemessen werden können. So ist es z.B. bei der BNML Leukämie der Ratte nicht möglich mit einer Zellvolumen- oder DNS-Analyse allein die nur gering aneuploiden Leukämiezellen sicher zu erkennen. Bei simultaner Zellvolumen und DNS Messung sind solche Zellen dagegen gut darstellbar. Mehrparameter-Messungen sind ebenfalls bei der Identifizierung von Tumorzellen der menschlichen Cervix uteri von entscheidender Bedeutung für die empfindliche Erkennung von Tumorzellen. Die gleichzeitige Messung von zwei Zellparametern z.B. Zellvolumen gegen DNS, oder Zellvolumen gegen Carcino-Embryonisches Antigen (CEA) der Zellmembran ist hier für einen empfindlichen Tumorzellnachweis nicht ausreichend. Die simultane Dreiparameter-Messung (Zellvolumen, DNS, CEA) erhöht die Nachweisgrenze, die bei Zweiparameter-Messung etwa 5-10% Tumorzellen beträgt um eine Größenordnung auf gegenwärtig 0.5-1.0% Tumorzellen. Für lebende Zellen haben wir erstmals eine durchflußcytometrische Methode entwickelt, die es gestattet das intrazelluläre pH von Einzelzellen innerhalb von 3-5 min zu bestimmen. Der dazu verwendete Fluoreszenzfarbstoff 2,3-Dicyano-1,4-Hydrochinon färbt vitale Zellen, und zeigt neben dem pH auch die Aktivität der unspezifischen Esterasen an. Zellen des haematopoetischen Systems haben in der überwiegenden Mehrheit ein intrazelluläres pH um 7.2, während Epithelzellen von Magen, Rectum, Bronchien und Cervix uteri ein saures pH zwischen 6 und 7 aufweisen. Carcinomzellen unterscheiden sich an der Primärlokalisation in ihrem pH-Wert nicht nennenswert von normalen Epithelzellen. Metastatischen Zellen in Lymphknoten, Ascites oder Pleuraexsudaten sind dagegen häufig neutral oder nur schwach sauer. Durch Glucosezusatz können die Tumorzellen, nicht aber Lymphozyten oder Granulozyten acidifiziert werden. Da in Lymphknoten normalerweise keine sauren Zellen vorhanden sind, steht hier möglicherweise eine klinisch-diagnostisch interessante Möglichkeit zur Verfügung intraoperativ die Metastasierung der Krebszellen in die regionalen Lymphknoten schnell zu erfassen.

STELLENWERT DER DURCHFLUSSCYTOMETRIE BEI DER FRÜHERKENNUNG MALIGNER ERKRANKUNGEN

G.Valet [1], A.Raffael [1], H.H.Warnecke [2], R.Wirsching [3]

[1] Max-Planck-Institut für Biochemie, D-8033 Martinsried

[2] I.Frauenklinik der Universität, D-8000 München

[3] Chirurgische Klinik, Klinikum Großhadern der Universität D-8000 München

Die Durchflußcytometrie ist eine neue Möglichkeit Eigenschaften von Einzelzellen mit hoher Geschwindigkeit (typischerweise 1000-2000 Zellen/sec) zu messen. Einzelzellsuspensionen liegen im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten bereits vor, oder sind aus den meisten Organen durch mechanische oder enzymatische Aufarbeitung herstellbar. Von jeder Zelle können Eigenschaften wie Fluoreszenz (1), Fluoreszenzanisotropie (2), photometrische Absorption (3), Kleinwinkelstreuung, 90° Streuung (4) durch optische Messung, sowie das Zellvolumen auf elektrischem Wege (5,6) bestimmt werden. Fluoreszenz oder optische Absorption der Zellen werden durch spezifische Anfärbung erreicht, wobei zwei Arten von meßbaren Zelleigenschaften, nämlich Bestands- und Funktionseigenschaften unterschieden werden können. Bestandseigenschaften wie DNS, RNS, Antigene, Lektinbindungsorte, Hormonrezeptoren, Dichte der negativen Oberflächenladungen, Gesamtprotein und Gesamtlipide (7,8,9,10,11,12) werden durch Syntheseleistungen der Zellen erreicht. Sie können an lebenden oder fixierten Zellen gemessen werden. Funktionseigenschaften sind das Resultat vieler metabolischer Prozesse und nur an lebenden Zellen meßbar. Das Zellvolumen ist eine typische Funktionseigenschaft, weil es Resultante der osmotischen Verhältnisse, der Aktivität der Ionenpumpen, sowie der passiven Diffusion kleinmolekularer Substanzen durch die Zellmembran ist. Weitere durchflußcytometrisch erfaßbare Funktionseigenschaften sind das Tansmembranpotential, das intrazelluläre pH, lysosomale und cytoplasmatische Enzymaktivitäten, sowie die Phagocytose bei Makrophagen, Granulozyten oder manchen Gliazellen (13,14,15,16,17). Neben der analytischen Messung von Zelleigenschaften im Durchflußcytometer können Zellen mit bestimmten Eigenschaftskombinationen in einem Zellsorter auch präparativ angereichert werden. Dies ist dann wichtig, wenn Zellen weiterkultiviert werden sollen, oder wenn ihre morphologische Identität festgestellt werden soll. Ist die Lage von Krebszellen in experimentellen Verteilungskurven durch Identifizierungssorten einmal bekannt, so

ist es nicht mehr nötig die Zellen jedesmal zu sortieren. Man kann das Verteilungsmuster als ein Chromatogramm auffassen, wo jede Zellpopulation eine charakteristische Lage aufweist, ähnlich dem Rf-Wert bei Elektrophoresen oder Chromatogrammen in der Proteinchemie. Wird das Zellvolumen als eine der Eigenschaften gemessen, so kann bei Zellinhaltsstoffen eine mittlere Substanzkonzentration und bei Eigenschaften der Zelloberfläche eine mittlere Packungsdichte angegeben werden.

Wir haben uns in den letzten Jahren hauptsächlich mit der schnellen Identifizierung von Krebszellen und mit der Messung von funktionallen Zelleigenschaften beschäftigt. Als erstes Beispiel möchte ich an Hand von Messungen des Zellvolumens und der DNS bei einer Rattenleukämie (BNML, Brown Norway Myeloblasten Leukämie (18)) aufzeigen, wie wichtig die simultane Messung mehrerer Eigenschaften für die Identifizierung von Krebszellen ist. Die DNS der in 70% Äthanol fixierten Zellen wurde in 0.15 M NaCl, 5 mM Tris/HCl pH 7.4 Puffer mit dem Fluoreszenzfarbstoff Mithramycin (100 µg/ml, 15 mM MgCl2) (12) durch 2h Inkubation bei 20°C angefärbt. Die Fluoreszenz und das Volumen jeder Zelle wurde dann in einem FLUVO-METRICELL Durchflußcytometer (19) mit einer zylindrischen, hydrodynamisch fokussierten Meßöffnung von 85 µm Durchmesser und 100 um Länge mit bei einem elektrischen Strom von 0.8mA gemessen. Die Meßdaten wurden auf Magnetband gespeichert und mit FORTRAN IV Computerprogrammen ausgewertet (11,20,21). Die DNS-Verteilungskurve von Zellen einer hochleukämischen Ratte am 25.Tag nach i.p. Inokulation von $1x10^7$ Milzzellen einer leukämischen Ratte zeigt keinen signifikanten Unterschied zur DNS-Verteilung eines normalen Knochenmarks (Abb.1). Die Volumenverteilungskurven (Abb.2) zeigen zwar Unterschiede zwischen normaler und leukämischer Ratte, es kann jedoch aus dieser Veränderung nicht auf das Vorhandensein maligner Zellen geschlossen werden. Die simultane Zellvolumen-DNS Messung (Abb.3) des leukämischen Tiers zeigt, daß die G0/G1 und die G2/M Zellen des $\beta + \gamma$ Zellzyklus der großen Zellen ca 8% mehr

DNS aufweisen als die entsprechenden Zellen des α-Zellzyklus. Dies ist durch Auszeichnen der DNS-Histogramme des bzw. des $\beta + \gamma$ Zellzyklus der BNML Knochenmarkszellen der Abb.3 im Vergleich zu den entsprechenden Histogrammen der Zellen eines Normaltieres gut ersichtlich (Abb.4). Die mangelnde Kongruenz der DNS-Verteilungskurven der leukämischen Ratte bedeutet, daß die großvolumigen Blasten des BNML Tieres hyperdiploid sind, was ein klares Indiz für leukämische Zellen ist. Die simultane Zweiparameter Messung (Abb.3) erlaubt demnach die Identifizierung der malignen Zellen, was auf Grund von zwei separaten Messungen je einer Eigenschaft (Abb.1,2) nicht möglich ist. Allerdings müssen ca 5-15% aneuploider Zellen in der Probe vorhanden sein, ums sie einwandfrei zu erkennen. Diese Empfindlichkeit ist für Krebsvorsorgeuntersuchungen oder Therapieüberwachung nicht ausreichend.

An Hand eines Beispiels aus der cervix uteri Cytologie möchte ich deshalb aufzeigen, wie die Empfindlichkeit der Zellvolumen und DNS Messung durch Hinzunahme der simultanen Immunfluoreszenz als dritter Eigenschaft deutlich steigerbar ist. Die Zellvolumen gegen DNS Zweiparameter Messung (9) erlaubt die Unterscheidung zwischen kleinen Entzündungszellen, wie Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen, und großen Zellen des Plattenepithels (Abb.5). Die quantitative Auswertung solcher Histogramme ergibt,daß die Anteile der in S und G2/M Phase befindlichen Zellen bei Schwangeren und im Tumorfall höher als bei Normalpersonen (Abb.6)ist. Eine empfindliche Methode zur Krebszellidentifizierung ist durch diese Messung jedoch nicht gegeben, weil sich die Anteile der proliferierenden Zellen der verschiedenen Patientengruppen deutlich überlappen. Deshalb wurde versucht die Empfindlichkeit durch Messung des Carcino-Embryonischen Antigens (CEA) der Zelloberfläche zu steigern. CEA war als tumorassoziiertes Antigen bei Cervixcarcinomen (Abb.7) deutlich positiv verglichen zur Zellprobe einer gesunden Frau (Abb.8). Ähnliches wurde auch bei Messung des Epithelialen-Membran-

antigens (EMA) (22) beobachtet. Das CEA-Antigen wurde in indirekter Fluoreszenz mit einem monospezifischen, affinitätsgereinigten Ziegen-Anti-CEA Serum als erstem und einer fluoresceinierten Kaninchen-Anti-Ziegen Immunglobulinfraktion als zweitem Antikörper nachgewiesen. Das erste Antiserum war frei von Antikörpern gegen kreuzreagierendes Antigen (NCA). Bei den positiven Tumorproben (Abb.7) ist nicht klar, welcher Teil der positiven Fluoreszenz durch morphologisch intakte Zellen, durch Zellaggregate oder Zelldetritus hervorgerufen wird. Eine simultane Messung von drei Zelleigenschaften (23) kann dies klären. Durch die Zellvolumen gegen DNS Messung können die morphologisch intakten Zellen (Zellvolumen+DNS) von entkernten Zellen (nur Volumen) und nackten Kernen (nur DNS) unterschieden werden. Der DNS-Wert der Zelle zeigt außerdem an, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zelle befindet. Bei Messung der Immunfluoreszenz als dritter Eigenschaft kann ohne weiteres unterschieden werden, ob fluoreszierende Antikörper an intakte Zellen oder an Zelldetritus gebunden sind (Abb.9). Der Vergleich von Zellen einer tumorzellhaltigen und einer tumorzellfreien Probe zeigt,daß im Tumorfall eine signifikante Zahl von Zellen mit mittlerem Volumen vorhanden ist, die CEA-positiv sind, während bei Zellproben gesunder Frauen nur ganz wenige morphologisch intakte Zellen positiv sind. Die quantitative Berechnung zeigt bei normalen Proben zwischen 0.5-1.0% CEA-positiver Zellen (Abb.10a). Messungen, bei denen das epitheliale Membranantigen (EMA) angefärbt wurde zeigten ähnlich Ergebnisse (Abb.10b). Werden bei derselben Probe einmal CEA und einmal EMA angefärbt, so ergibt sich, daß CEA und EMA auf den Zellen nicht gekoppelt ausgedrückt werden (Abb.10c,d). Das bedeutet eine Erhöhung der Unterscheidungsmöglichkeit zwischen normalen und maligen Zellen, wenn Antiseren verwendet werden, die aus einer Mischung beider Antikörper bestehen. Eine solche Mischung ist aus den Daten der Abb.10a und 10b ausgerechnet und in Abb.10e dargestellt. Die Hinzunahme der dritten Zelleigenschaft hat demnach die Empfindlichkeit der Auffindung abnormer Zellen etwa um den

Faktor 10 von 5-10% bei Ein- oder Zweiparameter Messungen auf 0.5-1.0% bei simultaner Messung von drei Zelleigenschaften erhöht.

Als letztes möchte ich auf eine von uns neu entwickelte Färbung eingehen, die es erlaubt den intrazellulären pH-Wert im Durchflußcytometer zu messen. Es wird hierzu die Substanz 2,3-Dicyano-1,4-Hydrochinon (DCH) verwendet (14). DCH ist ein fluoresizierender pH-Indikator, der die Farbe des emittierten Fluoreszenzlichts mit ansteigendem pH im Bereich pH 4-8 von blau nach gelb verändert. DCH dringt jedoch nicht in Zellen ein. Durch Veresterung wird die Substanz z.B. in Form ihres Acetatesters (ADB) membrangängig. Intrazelluläres ADB wird von unspezifischen Esterasen des Cytoplasmas bei Zimmertempertur innerhalb von 2 bis 3 min in DCH und Acetat gespalten. DCH reichert sich in vitalen Zellen an, weil es nicht durch die intakte Zellmembran nach außen abdiffundieren kann. Die Fluoreszenz von DCH wird im FLUVO-METRCELL zwischen 300-400 nm durch eine Quecksilber Hochdrucklampe angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wird durch zwei Photoröhren im Bereich 420-440 nm (F1) und 500-580 nm (F2) gesammelt. Das Verhältnis beider Fluoreszenzen ist ein Maß für das intrazelluläre pH. Die Färbung erlaubt es also das intrazelluläre pH vitaler Zellen zu messen und gleichzeitig noch eine Information über die Esteraseaktivität der Zellen zu erhalten. Neben den beiden Fluoreszenzen wird das Zellvolumen als dritte Zelleigenschaft simultan gemessen. So kann z.B.das intrazelluläre pH von Lymphozyten und Granulozyten des peripheren Blutes bereits wenige Minuten nach Abnahme von Kapillarblut,das zur Messung 1/500 mit physiologischer Kochsalzlösung pH 7.4 verdünnt wird, gemessen werden (Abb.10). Auf Grund der Esteraseaktivität und des Volumens können Lymphozyten und Granulozyten gut voneinander unterschieden werden (Abb.10). Die Aufzeichnung von Zellvolumen gegen pH zeigt,daß die Granulozyten ein pH um 7.2 aufweisen, während die Lymphozyten um etwa 0.1 pH Einheiten tiefer bei pH 7.1 liegen. Ein mittleres pH um pH 7.2

wurde auch bei menschlichem Knochenmarks- und Milzzellen beobachtet. Epitheliale Zellen der cervix uteri (Abb.12), des Magens, des Rectums, der Mamma und der Lunge waren dagegen deutlich sauer. Auf Grund der Esteraseaktivität und des Zellvolumens können die Granulozyten von den Epithelzellen abgegrenzt werden (Abb.12). Im Volumen gegen pH Histogramm (Abb.12) sind die Granulozyten neutral, während die Epithelzellen ein saures Innen-pH zwischen pH 6 und 7 aufweisen. Die kleinsten und wenig differenziertesten Zellen sind dabei die sauersten. Ein ähnlicher Säuregrad wie bei Normalzellen wird auch bei Primärtumorzellen der Cervix uteri, des Magens und des Rectums beobachtet. Die pH-Färbung kann demnach nicht empfindlich zwischen Normal- und Tumorzellen an der Primärlokalisation unterscheiden. Eine 30 min Inkubation bei 37°C von Normal- und Primärtumorzellen in Gegenwart von 40 mM Glucose ändert das intrazelluläre pH von Epithelialzellen, Carcinomzellen des Primärtumors und haematopoetischer Zellen nicht nennenswert. Von großem Interesse ist dagegen das Verhalten von Metastasenzellen. Bei Peritoneal- , Pleura- (Abb.13) und Lymphknotenmetastasen (Abb.14) weisen die Entzündungszellen ein neutrales pH auf, die Tumorzellen sind meist ebenfalls neutral oder manchmal auch sauer. Infolge der Neutralität der normalen Zellen können die sauren Tumorzellen können sehr empfindlich nachgewiesen werden. Neutrale Tumorzellen können durch 30 min 37oC Inkubation in Gegenwart von 40 mM Glucose angesäuert werden, während sich das pH in den Entzündungszellen nicht ändert. Die pH Färbung ist also bezüglich der Erkennung von Primärtumoren nicht sehr empfindlich. Sie ist jedoch bei der Suche nach wenigen Tumorzellen in Körperflüssigkeiten oder im lymphatischen System wahrscheinlich von diagnostischem Wert,wenn etwa während Operationen schnell die Ausdehnung des Krebsgewebes in den regionalen Lymphknoten bestimmt werden soll.

Zusammengefaßt zeigen die vorgetragenen Ergebnisse, daß die Durchflußcytometrie im Vergleich zu anderen Methoden

wesentliche neue Möglichkeiten zur Tumorzell-Identifizierung und Charakterisierung bietet. Besonders wichtig erscheint die Tatsache, daß die aus dem Organismus durch Abstrich oder Exzision entnommenen Zellen mit Hilfe der Durchflußcytometrie in vielen Fällen schon wenige Minuten nach Entnahme gemessen werden können. Es ist nicht notwendig Separations- oder Anreicherungsschritte vor der Messung durchzuführen, die meist längere Zeit dauern, und die Zelleigenschaften verändern können. Die Durchflußcytometrie sollte es deshalb ermöglichen vor allem die in vivo Beziehungen und Auseinandersetzungen verschiedener Zellsysteme in Tumoren in Zukunft besser zu verstehen.

Literaturverzeichnis:

1. Gill J.E.: Principles of Cytochemistry, in: Flow Cytometry and Sorting, ed.M.R.Melamed, P.F.Mullaney, M.L.Mendelsohn, John Wiley & Sons, New York 1979, S.233-242

2. Jovin Th.M: Fluorescence Polarization and Energy Transfer: Theory and Application, in: Flow Cytometry and Sorting, dto., S.137-166

3. Kaplow L.S., Dauber H., Lerner E.: Assessment of monocyte esterase activity by flow cytometry, J.Histochem. Cytochem. 24,363-372,(1976)

4. Salzman G.C.: Light-Scattering Approaches to Cell Characterization, in: Flow-Cytometry and Sorting, dto., S.105-124

5. Kachel V.: Electrical Resistance Pulse Sizing (Coulter Sizing), in: Flow-Cytometry and Sorting, dto., S.61-104

6. Kachel V.: Basic principles of electrical sizing of cells and particles and their realization in the new instrument METRICELL, J.Histochem.Cytochem. 24,211-230,(1976)

7. Crissman H.A, Tobey R.A.: Cell cycle analysis in 20 min, Science 184,1297,(1974)

8. Shapiro H.M.: Flow Cytometric of DNA and RNA content in intact cells stained with Hoechst 33342 and Pyronin Y, Cytometry 2,143-150,(1981)

9. Scheiffarth O.F., Valet G., Dvorak R., Baur S., Kachel V., Zander J.: Flow cytometric characterisation of tumor associated changes in gynecologic malignancies, in: Separation of cells and subcellular particles, ed. H.Peeters, Pergamon

Press, Oxford 1979, S.11-16

10.Siegert W., Mönche T., Valet G.: Epstein-Barr Virus -induced increase in the Concanavalin-A receptor density of established EBV-negative lymphoma lines in vitro, Exp.Hematol. 8,1173-1182,(1980)

11.Valet G., Bamberger S., Hofmann H., Schindler R., Ruhenstroth-Bauer, Flow cytometry as a new method for the measurement of electrophoretic mobility of erythrocytes using membrane charge staining by fluorescinated polycations, J.Histochem.Cytochem. 27,342-349,(1979)

12.Crissman H.A., Oka M.S., Steinkamp J.A.: Rapid staining methods for analysis of deoxyribonucleic acid and protein in mammalian cells, J.Histochem.Cytochem. 24,64-71,(1976)

13.Shapiro H.M., Natale P.J., Kamentsky L.A.: Estimation of the membrane potentials of individual lymphocytes by flow cytometry, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76,5728-5730,(1979)

14.Valet G., Jenssen H.L., Krefft M., Ruhenstroth-Bauer G.: Flow cytometric measurement of the transmembrane potential, the surface charge density and the phagocytic activity of guinea pig macrophages after incubation with lymphokines, Blut 42,379-382,(1981)

15.Valet G., Raffael A., Mororder L., Wünsch E., Ruhenstroth-Baueer G.: Fast intracellular pH determination in single cells by flow cytometry, Naturwiss. 68,265-266,(1981)

16.Tsou K.C., Yip K.F., Miller E.E.: Acridine phosphate as a substrate for enzyme activated DNA stain, J.Histochem. Cytochem. 28,1032-1038,(1980)

17.Malin-Berdel J., Valet G.: Flow cytometric determination

of esterase and phosphatase activities and kinetics in hematopoietic cells with fluorogenic substrates, Cytometry 1,222-228,(1980)

18.vanBekkum D.W., Hagenbeek E.: Relevance of the BN leukemia as a model for human acute myeloid leukemia, Blood Cells 3,565, (1977)

19.Kachel V., Glossner E., Kordwig e., Ruhenstroth-Bauer G.: FLUVO-METRICELL, a combined cell volume and cell fluorescence analyzer, J.Histochem.Cytochem. 25,804-812,(1977)

20.Valet G., Fischer B., Sundergeld A., Hanser G., Kachel V., Ruhenstroth-Bauer G.: Simultaneous flow cytometric DNA and volume measurements of bone marrow cells as sensitive indicator of abnormal proliferation patterns in rat leukemias, J.Histochem.Cytochem. 27,398-403,(1979)

21.Valet G.: Graphical representation of three parameter flow cytometer histograms by a newly developed FORTRAN IV computer program, in: Flow Cytometry IV, Universitetsforlaget Oslo 1980, S.125-129

22.Sloane J.P., Ormerod M.G.: Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplastic tissues and its value in diagnostic tumor pathology, Cancer 47,1786-1795, (1981)

23.Valet G., Ormerod M.G., Warnecke H.H., Benker G., Ruhenstroth-BauerG.: Sensitive three parameter flow cytometric detection of abnormal cells in human cervical cancers: a pilot study, J.Cancer Res.Clin.Onc. 102,177-184,(1981)

Legenden der Abbildungen

Abb.1: DNS-Verteilung der Knochenmarkszellen einer normalen (a) und einer hochleukämischen (b) Brown Norway Ratte 25 Tage nach i.p. Inokulation von $1x10^7$ leukämischer Milzzellen.

Abb.2: Volumenverteilungskurven der Knochenmarkszellen der Abb.1 von einer normalen (a) und einer leukämischen (b) Ratte.

Abb.3: Simultane Zellvolumen und DNS Messung der Zellen von Abb.1b. Die Amplitude der Verteilungskurve ist auf die mit 'M' bezeichneten Klasse als 100% Wert standardisiert. Dargestellt ist der Amplitudenbereich 0-10%, welcher in 10 gleiche Teile geteilt ist (Zahlen 1-9). Werte über 10% sind durch '*' markiert. Für das Histogramm wurden 54321 Zellen gemessen. Es kann der Zellzyklus α der kleinen Zellen von den Zellzyklen $\beta + \gamma$ der intermediären und großen Zellen mit jeweils einer Go/G1, S und G2/M Phase unterschieden werden. Die Go/G1 Zellen der Zellzyklen $\beta + \gamma$ sind aneuploid , weil sie ca 8% mehr DNS als die Zellen des Zyklus α enthalten.

Abb.4: DNS Verteilungen der α, bzw. $\beta + \gamma$ Zellzyklen des Knochenmarks einer normalen Ratte (a) und der leukämischen (b) Ratte der Abb.3. Die Aneuploidie des $\beta + \gamma$ Zellzyklus der leukämischen Ratte (b) tritt deutlich in Erscheinung.

Abb.5: Zellvolumen gegen DNS von Abtsrichen der menschlichen Cervix uteri.Im linken Bild die kleinvolumigen Entzündungszellen (Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen), im rechten Bild die Epithelzellen.

Abb.6: S+G2/M Anteile der kleinen und großen Zellen der Cervix uteri bei normalen (N), schwangeren (PR) und Tumor tragenden (TU) Frauen. Die Werte wurden aus Zweiparameter Verteilungskurven ähnlich wie in Abb.5 berechnet.

Abb.7: Zellvolumen gegen CEA Immunofluoreszenz einer tumorzellhaltigen Probe. Die Volumenskala ist logarithmisch und

umfaßt 2.5 logarithmisch Dekaden, die Fluoreszenzskala ist linear.

Abb.8: Zellvolumen gegen CEA Immunofluoreszenz bei einem Abstrich von einer gesunden Frau.

Abb.9: Simultane Messung von Zellvolumen, DNS und CEA Immunofluoreszenz einer normalen (a) und einer tumorzellhaltigen Probe (b). Die Zellen beider Proben waren 1.7% Formaldehyd fixiert worden. Vor den Färbungen wurde überschüssiger Formaldehyd durch Waschen der Zellen beseitigt. Im rechten Bild wurde die Antikörperinkubation in Gegenwart von 50 mg/ml Albumin durchgeführt, während sie im linken Bild in physiologischer Kochsalzlösung erfolgte. In der Kochsalzlösung sind die großvolumigen Superfizialzellen CEA positiv. Diese Fluoreszenz ist allerdings unspezifisch, da sie durch Albuminzusatz unterdrückt werden kann. Die CEA Fluoreszenz der mittelgroßen Zellen der rechten Abbildung ist durch Albuminzusatz dagegen nicht hemmbar. Sie zeigt das Vorhandensein abnormer Zellen in dieser Probe. Je Kurve wurden 60 000 Zellen gemessen. Dargestellt sind die 10% Konturlinien bezogen auf den maximalen Klasseninhalt jedes Histogramms.

Abb.10: Darstellung der CEA und EMA positiven Zellen bei normalen (N) und tumorzellhaltigen (TU) Abstrichen der cervix uteri.

Abb.11: Zellvolumen gegen Esteraseaktivität (ADB) (links) und Zellvolumen gegen intrazelluläres pH (rechts) bei menschlichen Blutleukozyten im peripheren Blut 5 min nach Entnahme. Das Blut wurde zur Messung 1/500 mit physiologischer Kochsalzlösung pH 7.4 verdünnt und für 3 min bei Zimmertemperatur mit 25 ug/ml ADB gefärbt. Die Zellvolumen und Fluoreszenzskala ist logarithmisch geteilt (2.5 Dekaden), das F1/F2 Verhältnis ist linear dargestellt.

Abb.12: Zellvolumen gegen Esteraseaktivität (links) und Zellvolumen gegen intrazelluläres pH (rechts) von Zellen der normalen Cervix uteri. Auf der pH Skala entspricht der Klasse 8 ein pH von 7.2, der Klasse 40 ein pH von 6.0. Die Granulozyten können auf Gund der hohen Esteraseaktivität leicht von den Epithelzellen abgegrenzt werden. Sie weisen ein pH von 7.2 auf, während die Epithelzellen sauer sind (pH 6-7).

Abb.13: Pleura Exsudat als Folge eine Cervix uteri Karzinoms. Die Entzündungs- und die Tumorzellen sind neutral (links). 30 min Inkubation der Zellen mit Glucose bei 37 °C säuert die großvolumigen Tumorzellen an, während die kleinen Entzündungszellen ihr pH nicht wesentlich verändern (rechts).

Abb.14: Mesenterialmetastase eines Rektumkarzinoms. Ohne Glucosezusatz (links) sind die Zellen im wesentlichen neutral, während nach Glucosezusatz wiederum die großvolumigen Tumorzellen angesäuert wurden (rechts).

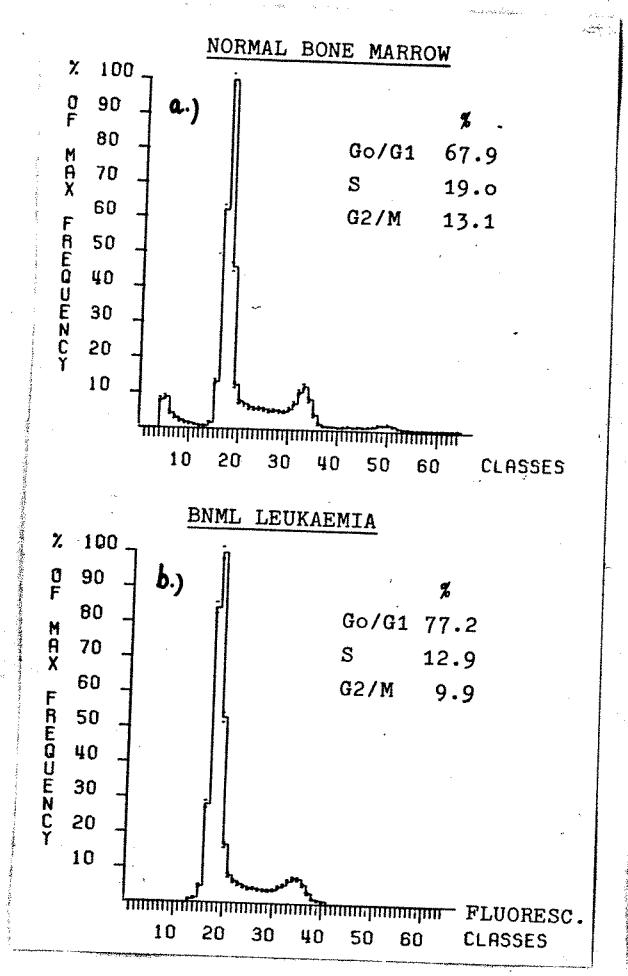


Abb. 1

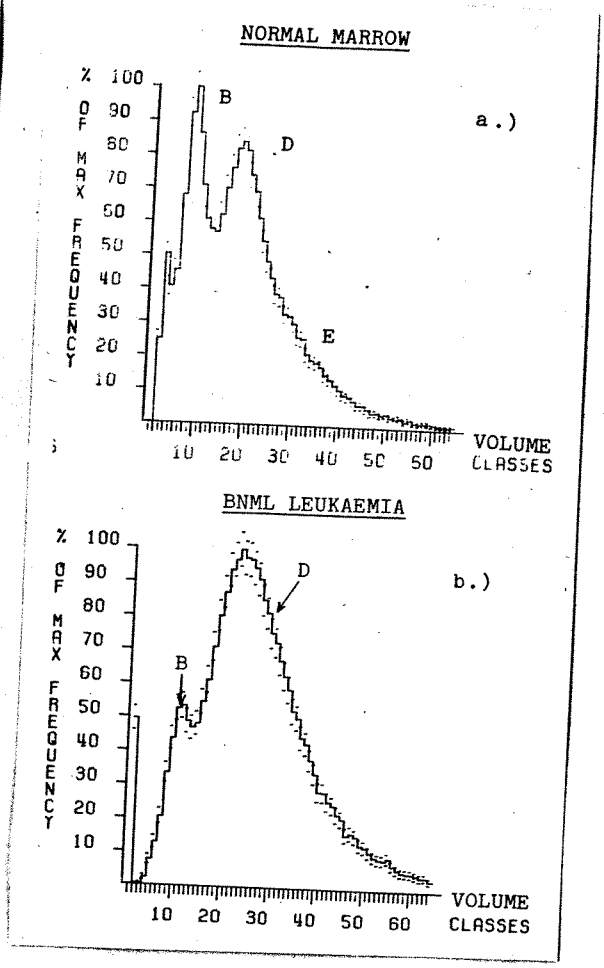


Abb. 2

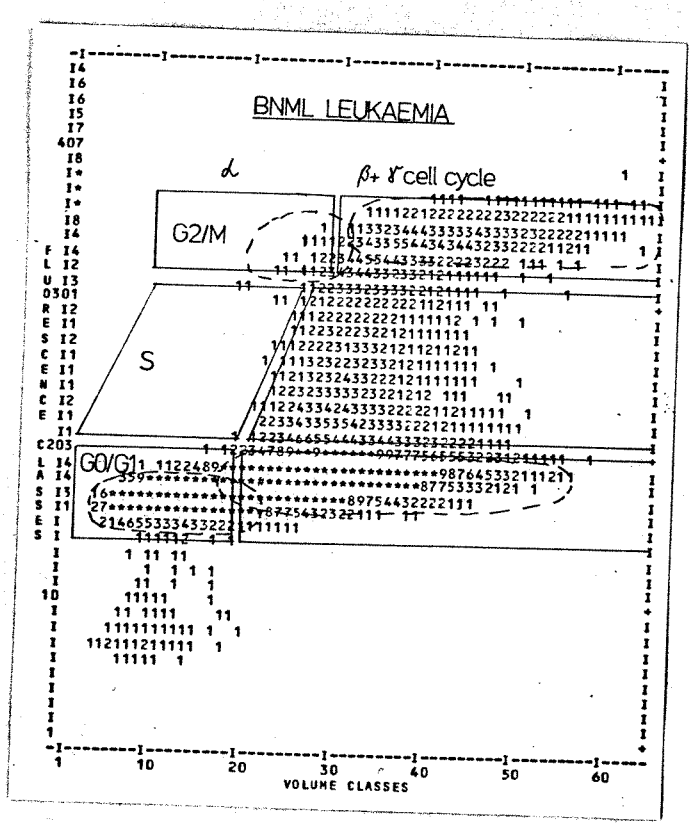


Abb. 3

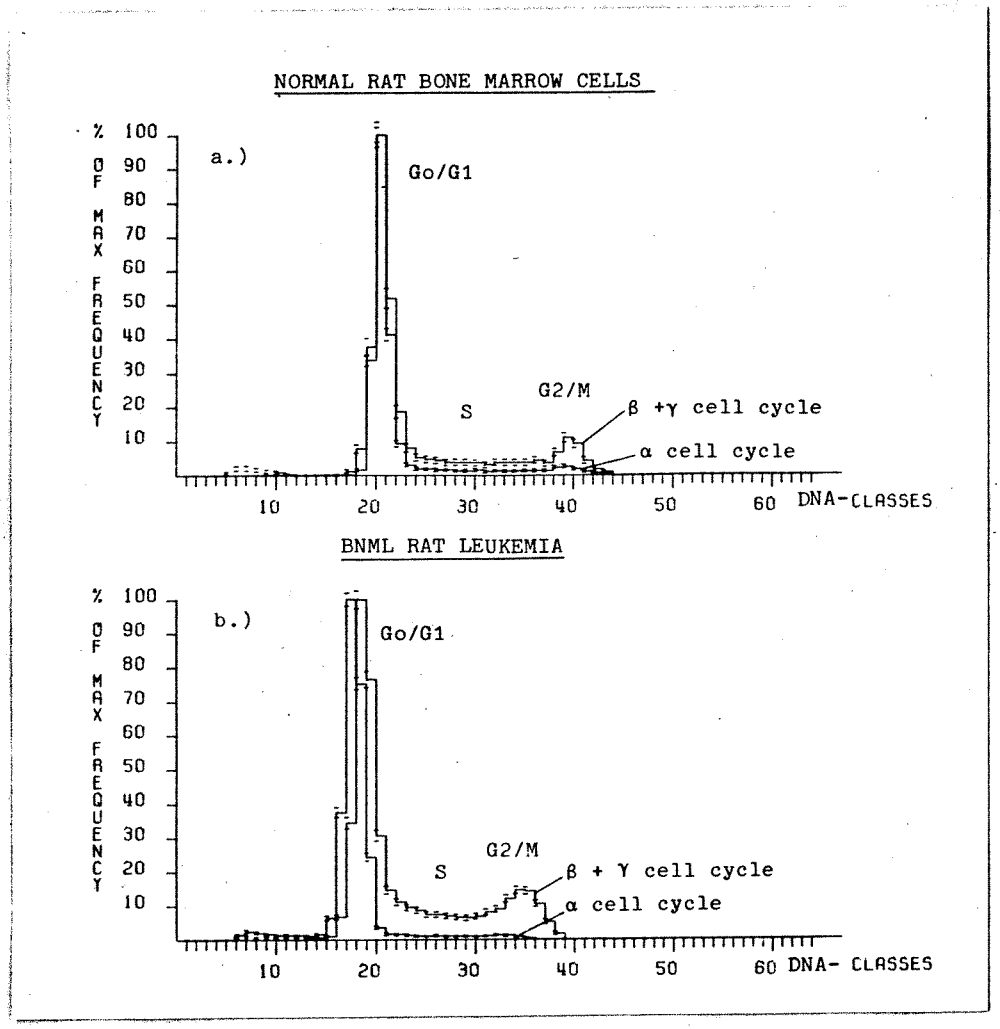

NORMAL RAT BONE MARROW CELLS
% OF MAX FREQUENCY
a.)
Go/G1
S
G2/M
β +γ cell cycle
α cell cycle
DNA-CLASSES
BNML RAT LEUKEMIA
b.)
Go/G1
S
G2/M
β + γ cell cycle
α cell cycle
DNA- CLASSES

Abb. 4

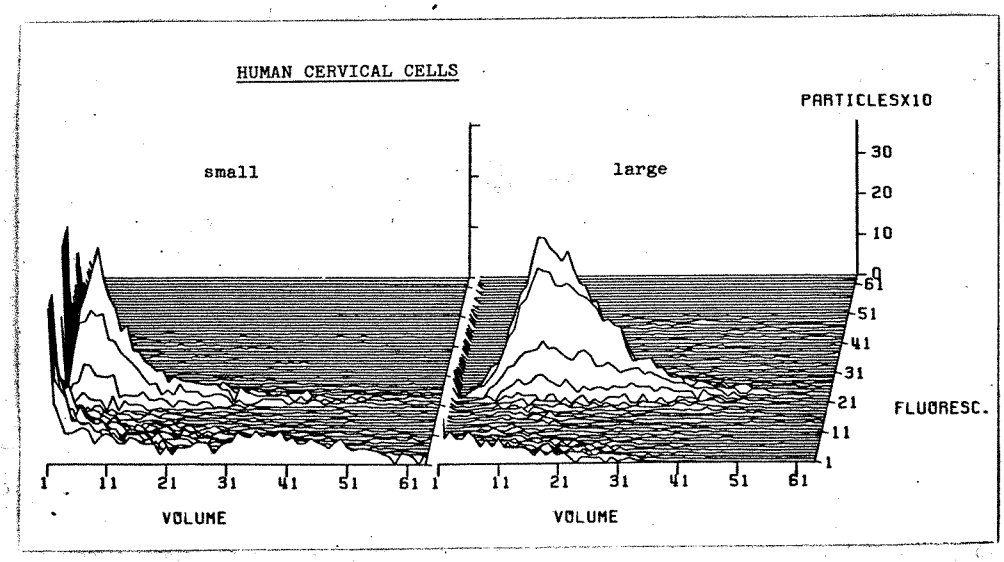

HUMAN CERVICAL CELLS
PARTICLESX10
small
large
FLUORESC.
VOLUME
VOLUME

Abb. 5

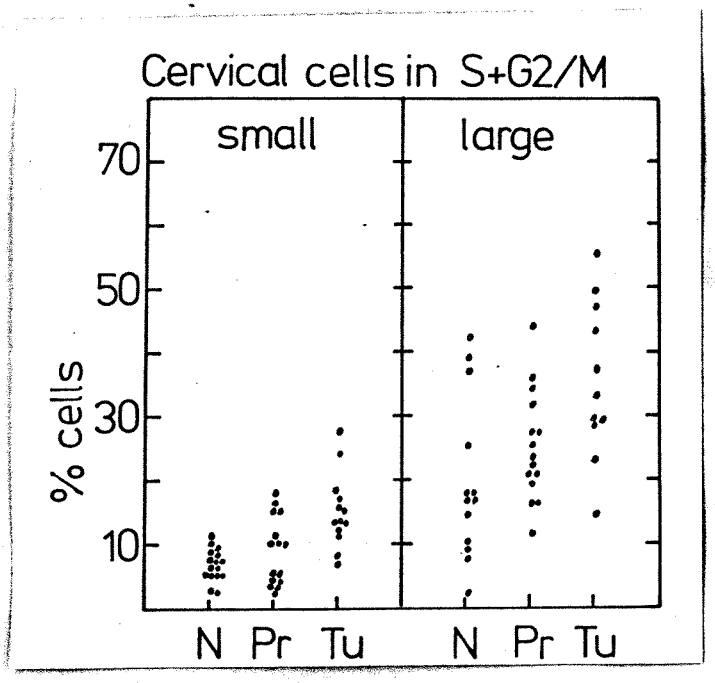


Abb. 6

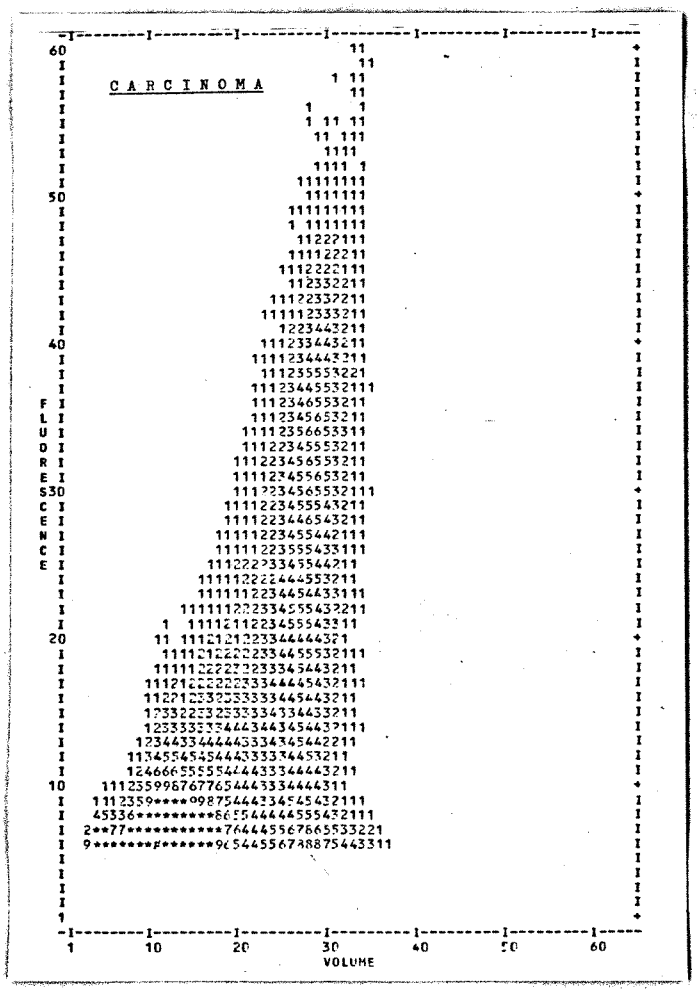


Abb. 7

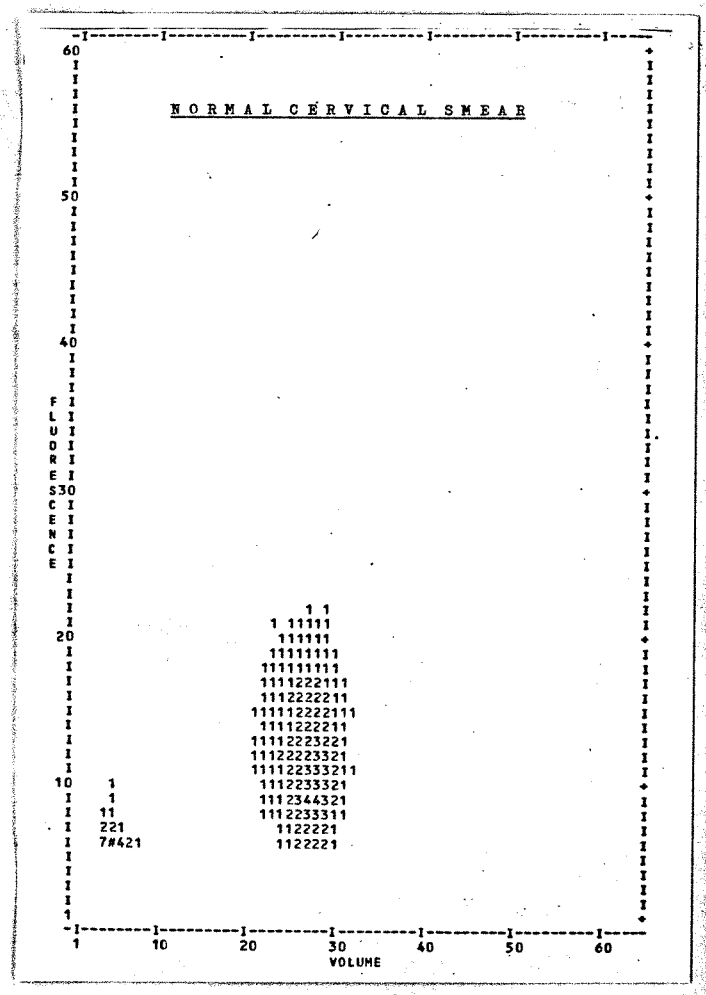


Abb. 8

NIV 10.00%.

NIV 10.00%.

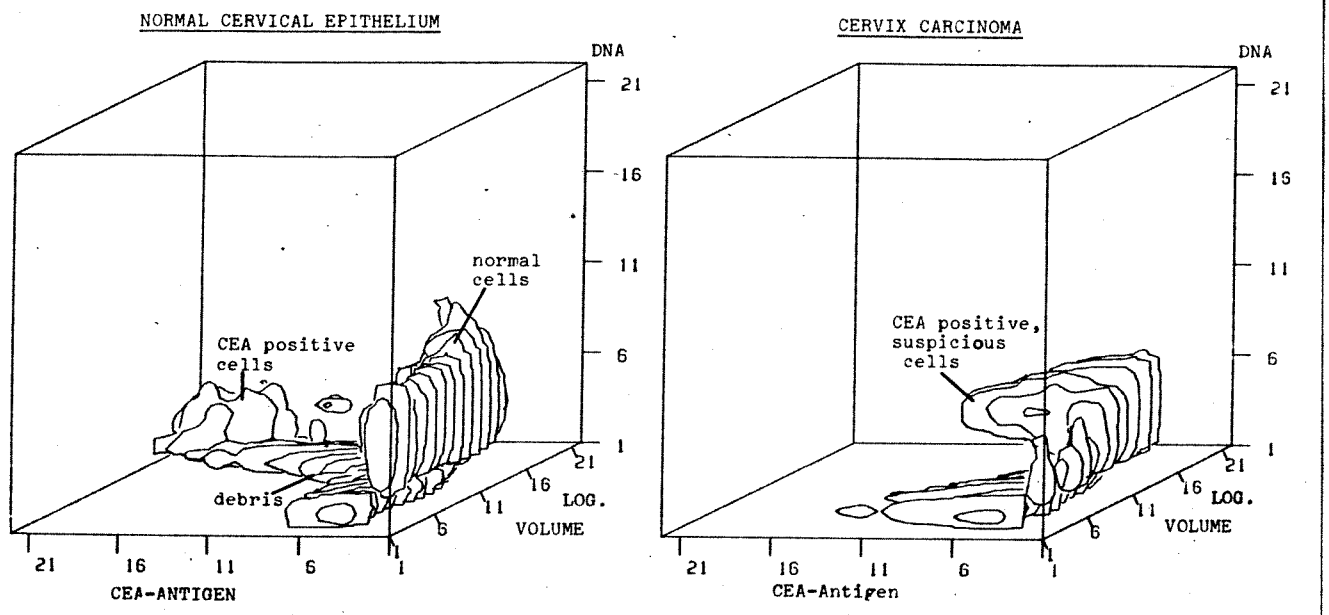
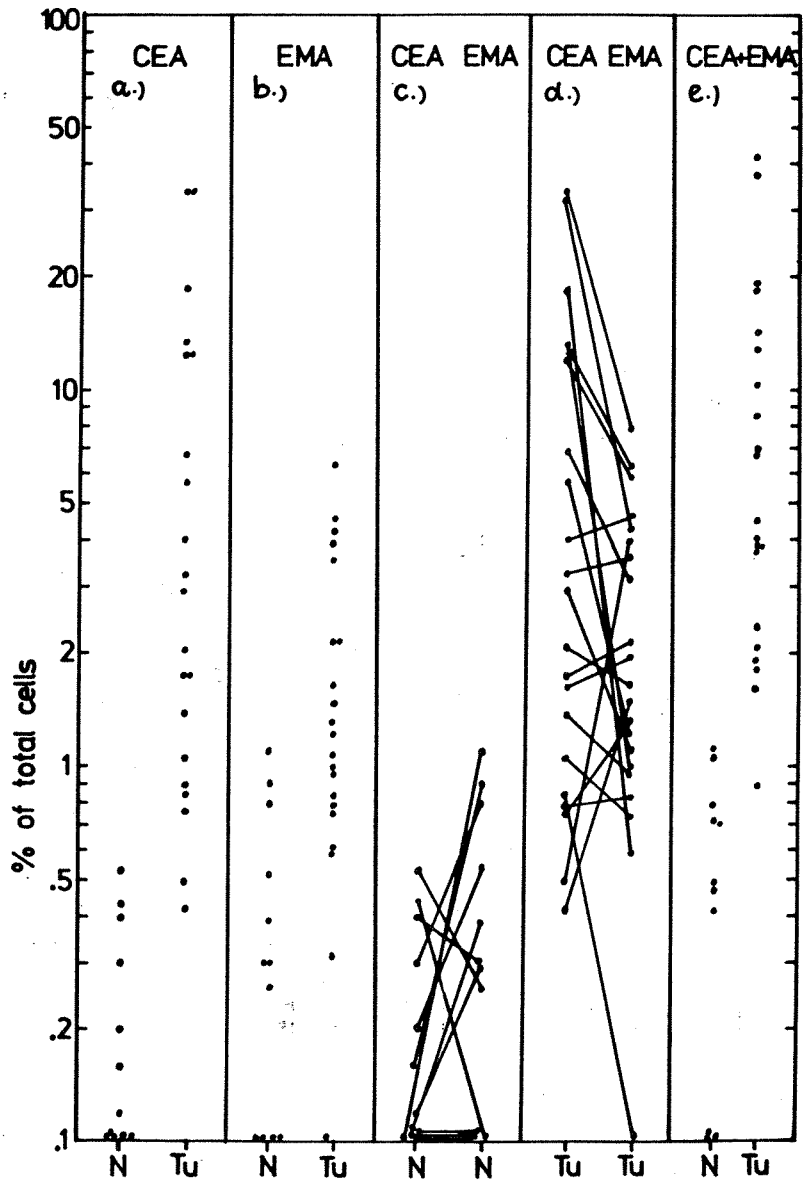


Abb. 9

Abb. 10



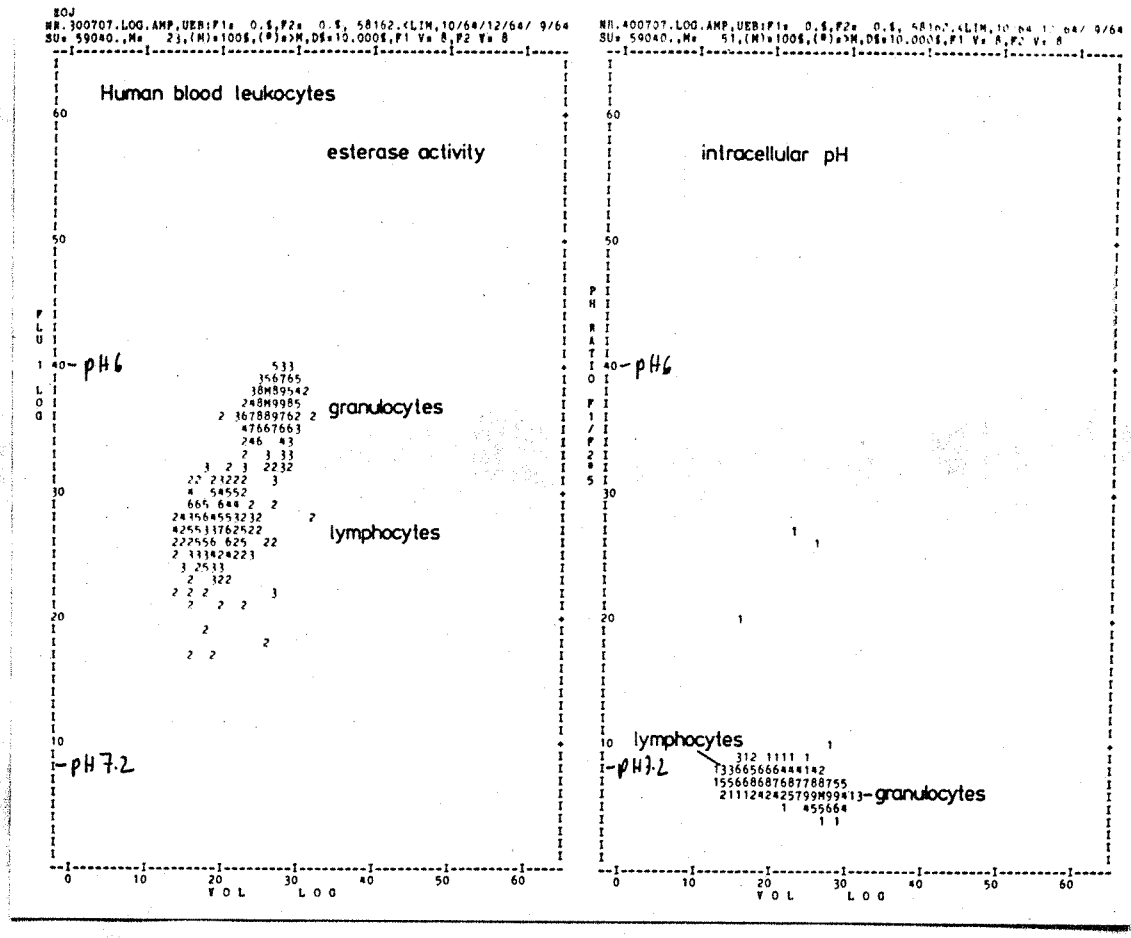

Human blood leukocytes
esterase activity
granulocytes
lymphocytes
pH6
pH7.2
intracellular pH
lymphocytes
granulocytes
VOL
LOG

Abb. 11

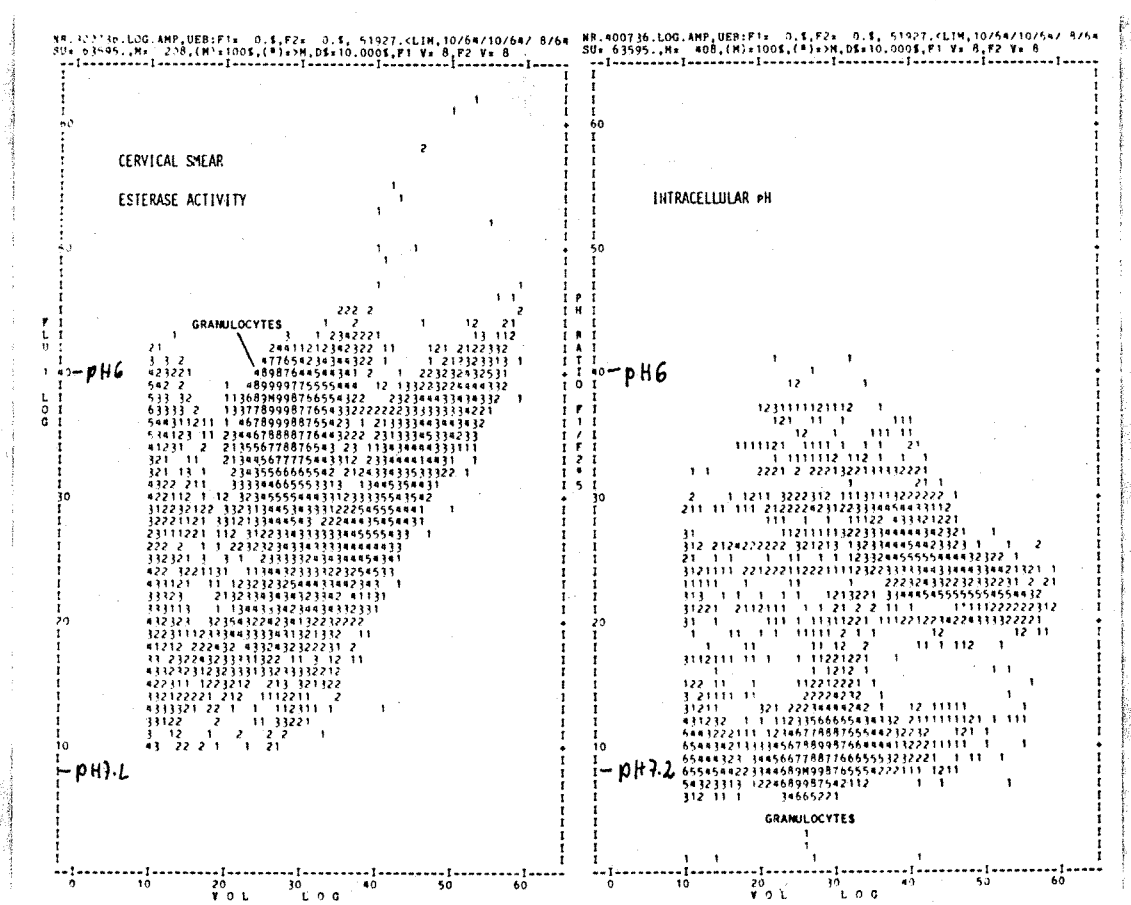

CERVICAL SMEAR
ESTERASE ACTIVITY
GRANULOCYTES
pH6
pH7.2
INTRACELLULAR pH
GRANULOCYTES
VOL
LOG

Abb. 12

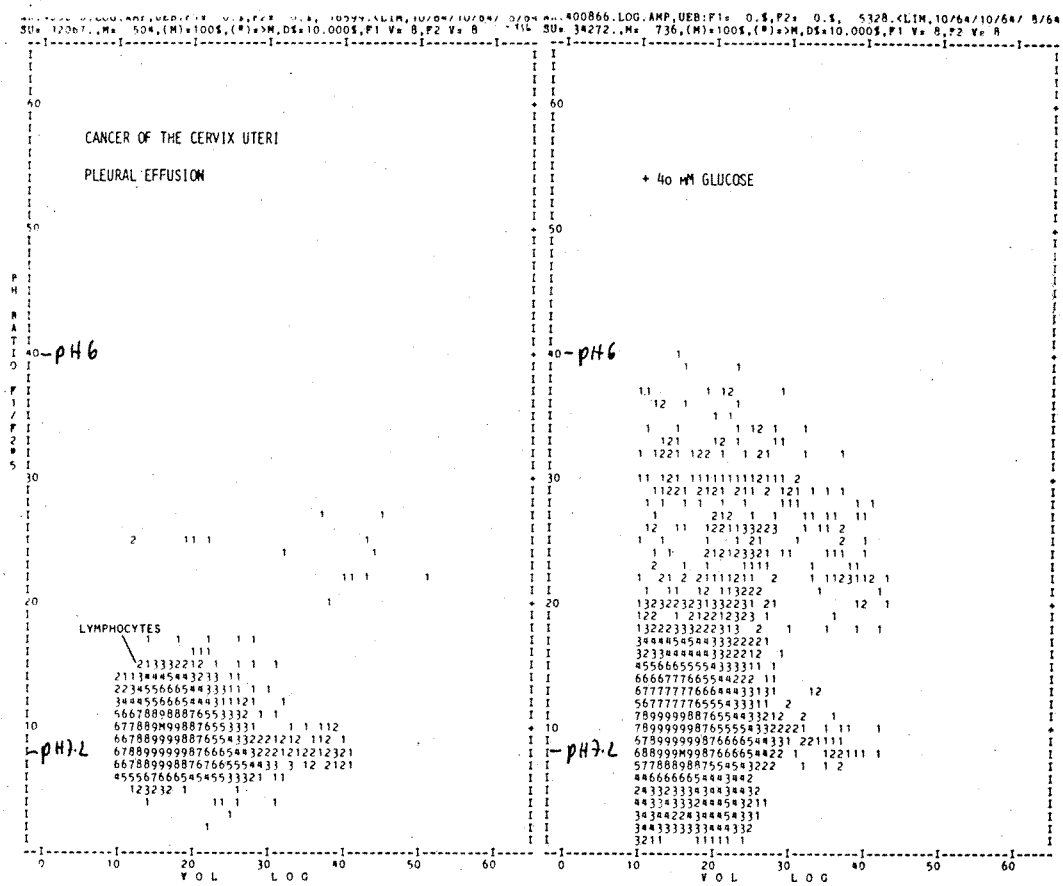

CANCER OF THE CERVIX UTERI
PLEURAL EFFUSION
+ 4o mM GLUCOSE
pH6
pH7.2
LYMPHOCYTES
PH
VOL
LOG

Abb. 13

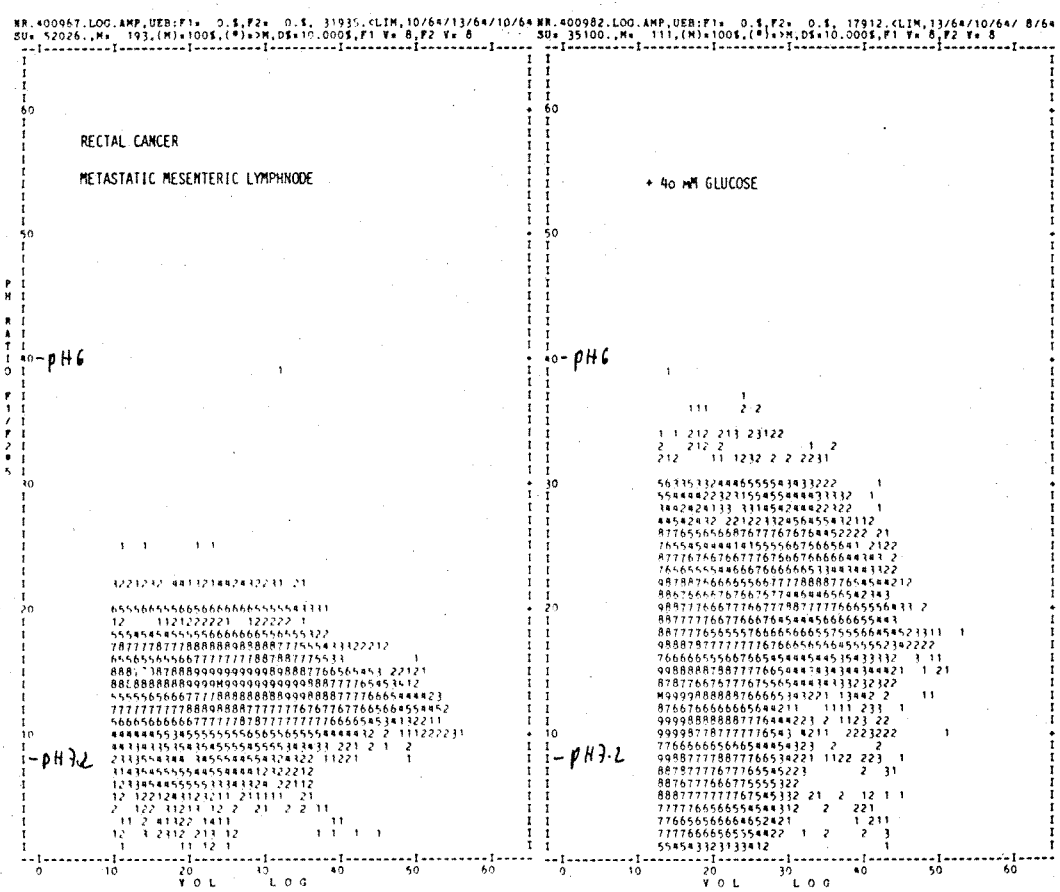

RECTAL CANCER
METASTATIC MESENTERIC LYMPHNODE
+ 4o mM GLUCOSE
pH6
pH7.2
PH
VOL
LOG

Abb. 14