Originalarbeit

ZENTRALBLATT für PATHOLOGIE

Fragen der Standardisierung und Qualitätssicherung in der DNA-Zytometrie

Problems concerning standardization and quality assurance in DNA cytometry

MICHAELA AUBELE, KARSTEN RODENACKER

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Institut für Pathologie, Oberschleißheim, Deutschland

Abstract

Rat liver imprints were treated with five different fixation techniques. Chicken erythrocytes stored over an extended period in the refrigerator were dropped on each slide before FEULGEN staining. By means of an image analysis system chicken erythrocytes, rat leukocytes and hepatocytes were measured and the integrated optical density (IOD) was calculated for each nucleus. The coefficient of variation (CV) of IOD was about 15 % for chicken erythrocytes. Leukocytes showed a CV of up to 10 %. The CV was lower for hepatocytes than for leukocytes, and lowest for air-dried hepatocytes. The standard error of the mean (SEM) did not show remarkable differences between the fixation groups. For hepatocytes it was in general less than 1 % of the respective mean value. The hepatocytes showed a linear staining except the wet formalin-fixed cells. This holds also for the wet formalin fixed leukocytes which showed only 85 % of the IOD of 2c hepatocytes. The ratios of erythrocytes to 2c hepatocytes varied between 0.33 and 0.35. The IOD ratios of standard cells to 2c hepatocytes from single specimens showed remarkable differences from the above mentioned ratios of the pooled slides of a fixation group. The use of external standard cells was proved to be problematic, especially because of their variation in staining intensity independent of the staining intensity of hepatocytes.

Zusammenfassung

Abklatschpräparate von einer Rattenleber wurden nach fünf verschiedenen Protokollen fixiert und anschließend nach FEULGEN gefärbt. Hepatozyten, Leukozyten und Hühner-Erythrozyten (externer Standard) wurden bildzytometrisch gemessen, und die integrierte optische Dichte (IOD) pro Zellkern berechnet. Pro Zellgruppe bzw. pro Fixiergruppe wurden Mittelwert, Variationskoeffizient (CV), Standard Fehler des Mittelwertes (SEM) und Verhältnisse der IOD Mittelwerte (Ratios) berechnet. Der CV der IOD betrug bis zu 15 % bei Hühner-Erythrozyten, bis zu 10 % bei Leukozyten. Er war allgemein für Hepatozyten niedriger als für Leukozyten, und für erst luftgetrocknete Hepatozyten niedriger als für feucht fixierte. Sowohl Hepatozyten als auch Leukozyten aus verschiedenen Fixiergruppen zeigten keine ausgeprägten Unterschiede im SEM. Er lag bei Hepatozyten allgemein unter 1 % des entsprechenden Mittelwertes. Die IOD-Ratios von Leukozyten zu diploiden Hepatozyten war ungefähr 1,0 für erst luftgetrocknete Präparate, jedoch nur 0,85 für formalinfixiertes Zellmaterial. Die Ratios von Hühner-Erythrozyten zu diploiden Hepatozyten lagen zwischen 0,33 und 0,35. Die Verhältnisse der IOD Mittelwerte, berechnet für einzelne Präparate, zeigten zum Teil erhebliche Abweichungen vom Verhältnis der fünf gepoolten Präparate einer Fixiergruppe. Externe Standardzellen erwiesen sich dabei als besonders problematisch, da sie färberische Schwankungen unabhängig von der Anfärbung der Hepatozyten zeigten.

Sachwörter: DNA-Histogramm, integrierte optische Dichte, Färbestandard, Qualitätskontrolle.

Einleitung

Ziel in der DNA-Zytometrie ist es, die integrierte optische Dichte (IOD) FEULGEN gefärbter Zellen so präzise wie möglich zu messen, um repräsentative und interpretierbare DNA-Histogramme zu erhalten. Dies setzt ein Arbeiten unter Standardbedingungen voraus, aber auch eine sorgfältige Wahl des Fixatives und das Messen geeigneter Standardzellen für die DNA Skalierung.

Die Einflüsse unterschiedlicher Fixantien auf FEULGEN-gefärbtes Zellmaterial wurden schon mehrmals untersucht [1, 3, 5, 9]. Lufttrocknung des Zellmaterials führt nicht nur zu einer anderen Hydrolyseempfindlichkeit der Zellen [9], sondern beeinflußt auch die Erhaltung und Darstellung des Chromatins [5]. Kompakteres Chromatin, wie es bei Lymphozyten beobachtet wird, kann ebenso zu einer nichtstöchiometrischen Anfärbung des Zellmaterials führen wie die Behandlung der Zellen mit entsprechenden Fixantien wie z. B. Formalin [2, 7, 10].

Das wesentliche Problem in der DNA-Zytometrie ist jedoch die Skalierung der gemessenen IOD-Werte in DNA-(c)-Werte [3, 6]. Dies setzt das Messen von Standardzellen mit bekanntem DNA-(c)-Wert für die jeweiligen Präparations- und Färbebedingungen voraus. Es stellt aber auch hohe Anforderungen an die IOD-Mittelwerte, die mit möglichst geringen Fehlern behaftet sein sollten.

Zentralbl. Pathol. 1993; **139**: 437 - 441
Gustav Fischer Verlag Jena

Ziel dieser Untersuchung war es, sowohl die Streuung von IOD-Einzelwerten als auch die Reproduzierbarkeit der IOD-Mittelwerte nach verschiedenen Fixierungen zu untersuchen, und die Qualität und Verwendbarkeit unterschiedlicher Standardzellen zu bestimmen.

Material und Methode

Präparation und Fixierung

Von einer Rattenleber (Wistar, Stamm Neuherberg) wurden Imprints angefertigt und nach fünf verschiedenen Protokollen fixiert. Je fünf Präparate wurden mit folgenden Fixierungen behandelt: Feuchtfixierung in 4 % Formalin/PBS, pH 7.0 (Wet Formalin, WF), Feuchtfixierung in 70 % Äthanol (Wet Ethanol, WE), nach einer Nacht Lufttrocknung entweder Fixierung in Formalin (Air Formalin, AF) oder in 70 % Äthanol (Air Ethanol, AE). Eine fünfte Gruppe von Präparaten wurde nur luftgetrocknet ohne weitere Fixierung (Air, A). Hühner-Erythrozyten, gelagert über längere Zeit in 10 % Formalin im Kühlschrank, wurden auf jedes Präparat aufgetropft und getrocknet. Alle Präparate wurden gemeinsam nach unserer FEULGEN-Methode gefärbt (Hydrolyse: 5 N HCl, 22 °C, 30 Min.; SCHIFF-Reagenz 1 Stunde).

Messung

Von jedem Präparat wurden 15 Lymphozyten, 15 Granulozyten und 100 Hepatozyten innerhalb der Imprints gemessen und ca. 30 Hühner-Erythrozyten als externer DNA-Standard. Die Zellen wurden mit einem AXIOMAT Mikroskop (Zeiss, FRG) und einer TV-Kamera (Bosch, FRG) gemessen. Die Einzelzellmessungen erfolgten mit Objektiv 100 x und einem Grünfilter (540 nm Wellenlänge). Die digitale Auflösung betrug 0.25 Mikrometer, die Grauwerte-Auflösung bestand aus 256 Kanälen [4]. Nach bildpunktweiser Umrechnung der gemessenen Transmissionswerte in Extinktionswerte [8] wurde pro Zellkern die integrierte optische Dichte (IOD) nach folgender Formel berechnet:

$$IOD_{Zellkern} = (\overline{E}_{Zellkern} - \overline{E}_{Hintergrund}) * A ,$$

wobei $\overline{E}$ die mittlere Extinktion des Hintergrundes bzw. des Zellkerns, A die Fläche des Zellkerns darstellt.

Statistische Auswertung

Die gemessenen Zellen wurden in Leukozyten (LEU), Hühner-Erythrozyten (ERY), diploide, tetraploide und oktoploide Hepatozyten (H2c, H4c, H8c) gruppiert. Pro Zellgruppe und pro Präparat wurden der IOD-Mittelwert, der Variationskoeffizient (CV) und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet und unter den verschiedenen Fixiergruppen verglichen. Die Verhältnisse der IOD-Mittelwerte (Ratios) von Zellgruppen einzelner Präparate wurden verglichen mit den Ratios der gepoolten Präparate der jeweiligen Fixiergruppe.

Die Normierung von Färbevarianzen erfolgte pro Präparat anhand der jeweiligen Leukozyten:

$$IOD_{normiert} = \frac{IOD_{gemessen}}{\overline{IOD}_{Leukozythen}}$$

wobei $\overline{IOD}$ den Mittelwert von Leukozyten pro Präparat darstellt. Für die DNA-Skalierung der IOD-Werte dienten die gepoolten diploiden Hepatozyten der jeweiligen Fixiergruppe als 2c Referenz-Wert.

Ergebnisse

Streuung von Einzelwerten

Der Variationskoefizient (CV) der ERY betrug bis zu 15% (Tabelle 1). Erst luftgetrocknete Leukozyten zeigten CV's von ungefähr 6 % bis 8 %, feucht fixierte bis zu 10 %. Der CV von Hepatozyten lag zwischen 4 % und 8 % (Tabelle 2). Er war bei luftgetrockneten Hepatozyten niedriger als bei feucht fixierten. Generell zeigten sowohl Leukozyten als auch Hepatozyten aus luftgetrockneten Imprints geringere Streuung der Einzelwerte als diejenigen aus feucht fixiertem Material.

Fehler der Mittelwerte

Tabelle 1 und 2 zeigen die IOD-Mittelwerte und ihre berechneten Fehler (SEM) pro Fixiergruppe. Der SEM war generell sehr niedrig für alle gemessenen Zellgruppen. Erythrozyten zeigten SEM-Werte zwischen 1 % und 2 %. Luftgetrocknete Leukozyten und Hepatozyten hatten etwas geringere Fehler der Mittelwerte als feucht fixierte. Der SEM von Hepatozyten betrug generell weniger als 1 % des entsprechenden Mittelwertes. In Abbildung 1 sind die Mit-

Tabelle 1. Anzahl gemessener Kerne (n), IOD-Mittelwerte (a. u.), Variationskoeffizient (CV) und Fehler des Mittelwertes (SEM) für Standardzellen und 2c Hepatozyten (H2c), gepoolt pro Fixiergruppe.

	n	Mittelwert	CV [%]	SEM
ERY (alle in Formalin gelagert)				
WF	101	115.2	11.39	1.31
WE	80	117.7	7.71	1.01
A	107	118.1	12.94	1.48
AE	100	120.7	14.89	1.80
AF	100	117.4	12.93	1.52
LEU				
WF	150	296.0	9.79	2.37
WE	150	333.1	8.90	2.42
A	152	341.2	8.92	2.47
AE	135	344.7	6.63	1.97
AF	146	341.3	5.83	1.65
H2c				
WF	83	346.7	4.67	1.78
WE	75	341.1	7.72	3.04
A	108	344.4	8.67	2.87
AE	105	348.3	5.70	1.94
AF	100	353.1	4.33	1.53

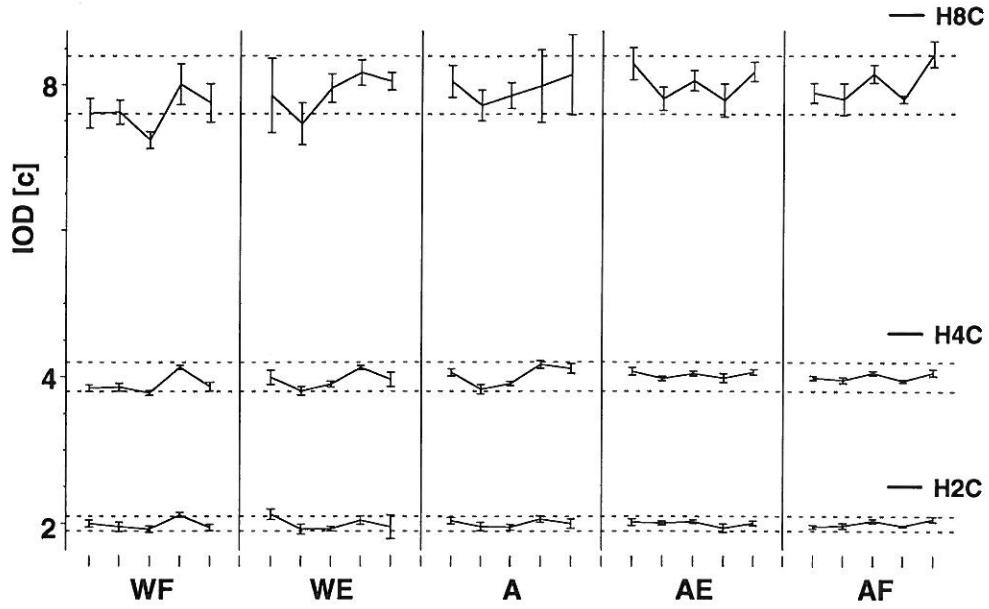

Abb. 1.
DNA-skalierte Mittelwerte (DNA (c) Werte) ±SEM-Balken für Hepatozyten einzelner Präparate. Die entsprechenden ±5 % Fehlergrenzen sind als unterbrochene Linie dargestellt. Obwohl viele der Mittelwerte innerhalb einer Ploidiegruppe in statistischem Sinne unterschiedlich sind, befindet sich die Mehrzahl von ihnen mit ihren SEM-Balken innerhalb dieser ±5 % Grenzen.

Tabelle 2. Anzahl gemessener Zellkerne (n), DNA skalierte Mittelwerte (DNA (c) Werte), CV and SEM für gepoolte Hepatozyten pro Fixiergruppe (H2c als 2c Referenzwert benutzt).

	n	Mittelwerte	CV	SEM
H2C				
WF	83	2.00	5.85	0.013
WE	75	2.00	8.01	0.019
A	108	2.00	6.66	0.013
AE	105	2.00	4.70	0.009
AF	100	2.00	3.84	0.008
H4C				
WF	331	3.895	5.50	0.012
WE	347	3.959	7.91	0.017
A	319	4.004	5.96	0.013
AE	342	4.032	4.67	0.010
AF	326	4.006	3.69	0.008
H8C				
WF	48	7.618	5.31	0.058
WE	41	7.922	5.87	0.073
A	38	7.930	5.73	0.074
AE	37	8.004	4.21	0.055
AF	48	7.978	3.76	0.043

telwerte ±SEM-Balken der Hepatozyten pro Präparat nach DNA-Skalierung dargestellt. Auch hier wird ersichtlich, daß der SEM aller Hepatozyten-Mittelwerte sehr gering war, mit Ausnahme der H8c Zellen, was sicherlich auf die geringe Anzahl gemessener Zellen in dieser Ploidiegruppe zurückzuführen ist.

IOD-Ratios

Die IOD-Mittelwerte von 2c, 4c und 8c Hepatozyten, gepoolt pro Fixiergruppe, verhielten sich annähernd im Verhältnis 1 zu 2 zu 4, mit Ausnahme der WF-Gruppe (1 zu 1.95 zu 3.81) (Tabelle 3). Das IOD-Verhältnis von LEU/H2c war annähernd 1.0, wiederum mit Ausnahme von WF (0.85). Das Ratio ERY/H2c variierte zwischen 0.33 und 0.35 (Tabelle 3).

Die Verhältnisse der IOD-Mittelwerte von einzelnen Präparaten zeigten zum Teil erhebliche Abweichungen von den vorgenannten Ratios der gepoolten Präparate pro Fixier-

Tabelle 3. Ratios der IOD-Mittelwerte von Standardzellen und Hepatozyten, gepoolt pro Fixiergruppe.

	ERY/H2c	LEU/H2c	H4c/H2c	H8c/H2c
WF	0.332	0.854	1.948	3.809
WE	0.345	0.977	1.980	3.961
A	0.343	0.991	2.002	3.965
AE	0.347	0.990	2.012	4.002
AF	0.332	0.967	2.003	3.989

gruppe. Aus Abb. 1 geht ebenfalls hervor, daß die Mittelwerte innerhalb einer Fixiergruppe von Präparat zu Präparat zum Teil erheblich streuen. Innerhalb der Hepatozyten waren die größten Abweichungen vom Ratio des Pools bei WF fixiertem (±5 %) und bei WE fixiertem Zellmaterial (±7 %) zu finden. Luftgetrocknete Hepatozyten hatten Abweichungen von maximal ±3 % vom Ratio der Fixiergruppe. Viele der gezeigten IOD-Mittelwerte innerhalb einer Ploidie- und Fixiergruppe sind aufgrund der sehr kleinen Intra-Präparate Streuung in statistischem Sinne signifikant unterschiedlich voneinander ($p \leq 0.05$). Wie jedoch aus der Abbildung anhand der ±5 % Fehlergrenzen hervorgeht, liegen fast alle Mittelwerte und ihre ±SEM-Balken innerhalb dieses Bereiches.

Bei den Ratios der IOD-Mittelwerte einzelner Präparate und ihren Abweichungen vom Ratio des Pools wurde besonderes Augenmerk auf die zwei Standardzelltypen gerichtet. In Abb. 2 sind die Ratios von ERY und LEU zu diploiden Hepatozyten pro Präparat abgebildet. Die gezeigte Nullinie demonstriert jeweils das errechnete Ratio pro Fixiergruppe.

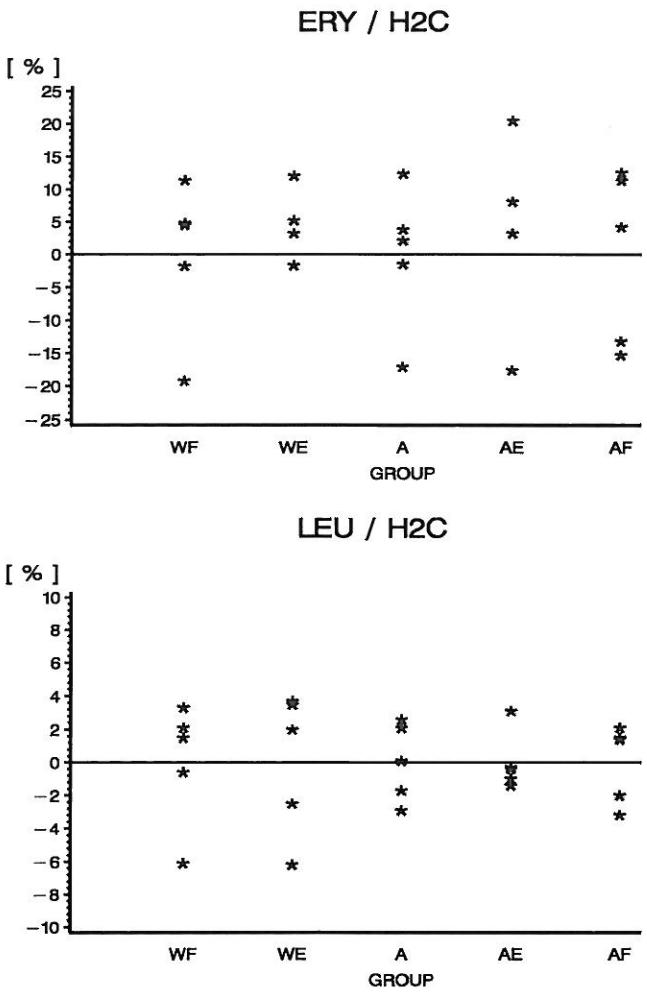

Abb. 2. Ratios der IOD Mittelwerte von Standardzellen zu diploiden Hepatozyten einzelner Präparate, geplotted als Sternchen. Die durchgezogene Nullinie demonstriert das Ratio pro Fixiergruppe. Die Abweichungen der IOD Ratios einzelner Präparate vom Ratio der gepoolten Präparate ist in Prozent angegeben.

Bei Leukozyten war die stärkste Abweichung ±3 % bei luftgetrocknetem Material und ±6 % bei feucht fixiertem Material. Gravierend, und für die DNA-Skalierung daher unbrauchbar, waren die Präparate-Abweichungen bei ERY/H2c von bis zu ±20 %.

Diskussion

Als wesentliche Problemquellen in der DNA-Zytometrie wurden hier die Streuung von IOD-Einzelwerten biologisch identischer Zellen und die Unsicherheit im DNA-Skalieren betrachtet. Letztere ist wesentlich verursacht durch den Fehler der gemessenen IOD-Mittelwerte und den Schwankungen der IOD-Ratios zwischen gleichbehandelten Präparaten. Die Einflüsse der untersuchten Fixantien auf die oben erwähnten Kriterien können wie folgt gewertet werden: CV und SEM waren generell bei luftgetrocknetem Material etwas geringer als bei feucht fixiertem. Ein klarer Nachteil von WF-Fixierung ist zusätzlich zum höheren CV eine nicht stöchiometrische Anfärbung des Zellmaterials.

Die DNA-Skalierung der gemessenen IOD hängt ganz entscheidend von der Qualität der Standardzellen und der Stabilität der IOD-Ratios von Standard zu dem zu untersuchenden Material ab. Diploide Zellen gleicher Art und gleichen Ursprungs wie das zu untersuchende Material wären sicherlich der exakteste und problemloseste Standard. Jedoch sind sie in der Regel in Feinnadelpunktaten oder Abklatschpräparaten eines Tumors nicht vorhanden oder schwierig zu identifizieren. Interne Standardzellen wie z. B. Leukozyten sind in klinischem Material häufiger vorhanden. Sie zeigen jedoch je nach Fixierung geringere IOD-Werte als diploide Epithelzellen. Dies bedeutet, daß ihr IOD-Ratio sorgfältig untersucht werden muß, und daß die DNA-Skalierung mit einem zusätzlichen Fehler, nämlich der Streuung dieser Ratios von Präparat zu Präparat behaftet ist. In unserem Experiment waren die Abweichung der Ratios LEU/H2c der Einzelpräparate im Vergleich zu dem Ratio pro Fixiergruppe bei luftgetrocknetem Zellmaterial besser (±3 %) als bei feucht fixiertem (±6 %). Beide bewegen sich jedoch in einem Bereich, der in der Bild-Zytometrie als akzeptabel erscheint. Die Mittelwerte unserer externen Standardzellen, aufgetropft auf dieselben Präparate, zeigten nicht-akzeptable Abweichungen von bis zu ±20 %, was sicherlich auf die Lagerung der Zellen in Fixierlösung zurückzuführen ist. Aufgrund dieser großen Streuung der Ratios von Präparat zu Präparat ist das Messen von externen Standardzellen auf separatem Präparat nicht zu empfehlen. Dies könnte zu noch größeren Fehlern der IOD Ratios führen als es bei unseren ERY der Fall war.

Die Präparate in unserem Experiment wurden unter kontrollierten Bedingungen angefertigt und befanden sich alle in einem Färbegang. Dies ist in laufenden oder bei retrospektiven klinischen Untersuchungen sicherlich nicht gewährleistet. Dort können die Streuungen der Mittelwerte von Präparat zu Präparat wesentlich höher sein. Wir betrachten deshalb die Fehler der IOD-Verhältnisse LEU/H2c von ±3 % bei luftgetrocknetem Zellmaterial bzw. die Streuung der Hepatozyten-Mittelwerte innerhalb der ±5 % Fehlerbereiche (Abb. 1) als Grenze der Sensitivität in der Bild-DNA-Zytometrie.

Literatur

1. Baak JPA, Noteboom E, Koevoets JJM: The influence of fixatives and other variations in tissue processing on nuclear morphometric features. Anal Quant Cytol Histol 1989; **11**: 219-224.
2. Becker RL, Mikel UV: Interrelation of formalin fixation, chromatin compactness and DNA values as measured by flow and image cytometry. Anal Quant Cytol Histol 1990; **12**: 333-341.
3. Coen H, Pauwels M, Roels F: The rat liver cell nuclear imprint as a standard for DNA measurements. Anal Cell Pathol 1992; **4**: 273-285.
4. Gais P, Burger G: Geräte zur quantitativen Mikroskopie. In: Morphometrie in der Zyto- und Histopathologie, Burger G, Oberholzer M, Gössner W (Hrsg.). Berlin: Springer, 1988, S. 282-294.
5. Giroud F, Montmasson MP: Reevaluation of optimal Feulgen reaction for automated cytology: Influences of fixatives. Anal Quant Cytol Histol 1989; **11**: 87-95.
6. Munck-Wikland E, Rubio CA, Auer GU, et al: Control cells for image cytometric DNA analysis of esophageal tissue and the influence of preoperative treatment. Anal Quant Cytol Histol 1990; **12**: 267-274.
7. Prooijen-Knegt AC van, Redi CA, van der Ploeg M: Quantitative aspects of the cytochemical Feulgen-DNA procedure studied on model systems and cell nuclei. Histochemistry 1980; **69**: 1-17.
8. Rodenacker K: Featuring of cellular objects. In: Clinical cytometry and histometry. Burger G, Ploem JS, Görttler K (eds). London: Academic Press, 1987, pp. 91-96.
9. Schulte E: Air drying as a preparatory factor in cytology: Investigation of its influence on dye uptake and dye binding. Diagnost Cytopathol 1986; **2**: 160-167.
10. Schulte EKW, Wittekind DH: Standardization of the Feulgen reaction: the influence of chromatin condensation on the kinetics of acid hydrolysis. Anal Cell Pathol 1990; **2**: 149-157.

Korrespondenzadresse: M. Aubele, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Institut für Pathologie, Ingolstädter Landstraße 1, D-85764 Oberschleißheim, Deutschland; FAX 89-3187 3349.