

**Wilhelm Kosenow**

## Chromosomale Geschlechtsdiagnose mit Hilfe des Leukocytentests

Die chromosomale Geschlechtsdiagnose mit Hilfe des Leukocytentests beruht auf dem Nachweis von *Kernanhängen* bestimmter Form und Grösse an polymorphkernigen Neutrophilen. Angesichts der ausgiebig erforschten Blutkörperchenmorphologie nimmt es nicht wunder, dass derartige Anhangsgebilde auch früher schon gut bekannt waren. Sie finden sich in zahlreichen Atlanten abgebildet und werden dort gewöhnlich als Segmentierungsvarianten gedeutet. Davidson und Smith gebührt das grosse Verdienst, in ihnen geschlechtsspezifische Merkmale entdeckt zu haben. Doch nicht nur das: Sie erkannten auch bereits, dass es für die Diagnose nicht genügt, nur einzelne dieser Gebilde zu registrieren. Das gelegentliche Vorkommen ganz ähnlich aussehender Strukturen beim männlichen Geschlecht macht es vielmehr erforderlich, auch hier bestimmte Zahlenregeln aufzustellen. Auf Grund ihrer Erfahrungen anhand von mehreren Blutaussstrichen verschiedener Probanden gelangten die sodann zu der auch heute noch gültigen Feststellung, dass ein Vorkommen von mindestens 6 typischen « drumsticks » auf 500 ausgezählte Zellen eine hinreichende Begründung für die Diagnose « *chromosomal weiblich* » (besser: « *chromatin-positiv* » oder « *Barr-positiv* ») darstellt. Davidson und Smith beschrieben fernerhin noch andere Leukocytenkernanhänge nebst ihrer Bedeutung für die Geschlechtsbestimmung und erkannten, dass die Methode bei extremer Linksverschiebung der Leukocyten unter Umständen versagt, falls auch in diesem Falle die genannte Zahlenregel angewandt wird.

Die Befunde der englischen Hämatologen sind in der Folgezeit von zahlreichen Untersuchern nachgeprüft und voll bestätigt worden. Dabei wurde entweder die von Davidson und Smith geübte Untersuchungstechnik beibehalten oder in verschiedener Hinsicht abgewandelt.

Bei unseren eigenen Untersuchungen über die theoretische Bedeutung der hämatologischen Geschlechtsbestimmung und ihre Eignung für die klinische Praxis gingen wir von der Beobachtung aus, dass man die Leukocyten-Kernanhänge 3 *mehr oder weniger verschiedenen Typen* zuordnen kann (s. Abb. 1):

1. Typ A = « *drumstick* » oder *Trommelschlegel- bzw. hängende Tropfen-Form*, die durch eine fadenförmige Chromatinbrücke mit dem übrigen Kern verbunden ist und durch eine farbintensive, homogene Zeichnung auffällt. Der eigentliche Kernanhang dieses Typs (ohne Fadenbrücke) ist durchschnittlich etwa  $2 \mu$  lang und 1,5-1,6 breit. Er stellt zweifellos die in diesem Zusammenhang wichtigste und am meisten charakteristische Struktur dar (Abb. 1a).

2. Typ B = « *sessile nodule* » bzw. *ungestielte Knoten- oder Tropfenform* (Abb. 1b). Form, Grösse, Chromatindichte und Begrenzungsschärfe gleichen hier weitgehend dem « *drumstick* ». Es fehlt jedoch dessen fädige Kernverbindung, so dass die Anhängsel dieses Typs entweder breitbasig (« *ungestielte Knoten* ») oder mit einer Spitze (« *ungestielte Tropfen* ») unmittelbar einem Kernsegment aufsitzen. Sie sind leichter als der « *drumstick* » mit uncharakteristischen Kernausbuchtungen zu verwechseln. Trotzdem besteht kein Zweifel daran, dass beide Formen gleichen Ursprungs und im Hinblick auf die Geschlechtsdiagnose ebenbürtig zu bewerten sind.

Eine Trennung der Gruppen A und B ist daher nur aus formalen Gründen gerechtfertigt. Sie wurde von uns trotzdem beibehalten, einmal aus Rücksicht auf den eingebürgerten Zählwert des leichter erkennbaren « *drumstick* » und zum anderen in der Absicht, hierdurch einen Eindruck über die Häufigkeit des Vorkommens beider Typen zu gewinnen.

3. Typ C = *Zwischenformen sowie Stab-, Haken- und Fadenformen* (Abb. 1c und d). Während die letztgenannten Kernanhangsgebilde mit den Typen A und B keinerlei Ähnlichkeit aufweisen, ist die sog. Zwischenform von diesen lediglich durch ihre Grösse (bis maximal  $3/4$  eines echten « *drumsticks* ») und ihre oft geringere Farbdichte sowie eine weniger ausgeprägte Randschärfe abzugrenzen. Ein weiterer Unterschied gegenüber den vorgenannten Gruppen besteht darin, dass Typ C einzeln, zu mehreren Exemplaren und gleichzeitig neben einer A- bzw. B-Form in einer Zelle vorkommen kann, während « *drumsticks* » und ungestielte Knoten praktisch immer nur solitär angetroffen werden.

Die *Auswertung eines Blutausstrichs*, der wie gewöhnlich nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt wird, nimmt in der Regel längere Zeit in Anspruch, da grundsätzlich 500 segmentkernige Neutrophile mit der Ölimmersionsoptik durchgesehen werden sollen. Diese Forderung ist gelegentlich kaum zu erfüllen, beispielsweise dann, wenn das Präparat nur wenig polynucleäre Leukocyten enthält oder wenn diese eine stärkere Linksverschiebung aufweisen. Auch in derartigen Fällen kann aber eine vorherige Leukocytenanreicherung durch Sedimentation von Venenblut noch zum Erfolg führen. Diese Massnahme erweist sich auch dann als hilfreich, wenn selbst

500 ausgezählte Segmentkernige kein eindeutiges Resultat erbracht haben und aus diesen Gründen noch grössere Zellmengen erfasst werden sollen.

Dass angesichts der eindrucksvollen Struktur des « drumstick » überhaupt solche Zweifel auftauchen können, hat seinen Grund darin, dass dieser an sich ungemein charakteristische Kernanhang eben leider nicht absolut geschlechtsspezifisch ist,

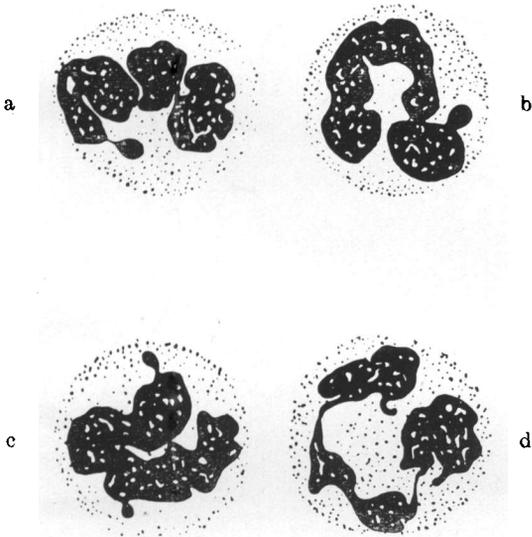


Abb. 1 a-d. Leukozyten-Kernanhänge vom Typ A, B und C (schematische Zeichnungen nach Mikrophotographien).

- a) « drumstick » bzw. Trommelschlegel- oder hängende Tropfenform (Typ A).
- b) « sessile nodule » bzw. ungestielte Knoten- oder Tropfenform (Typ B).
- c) sogen. Zwischenformen (Typ C).
- d) Haken- und Stabformen (Typ C).

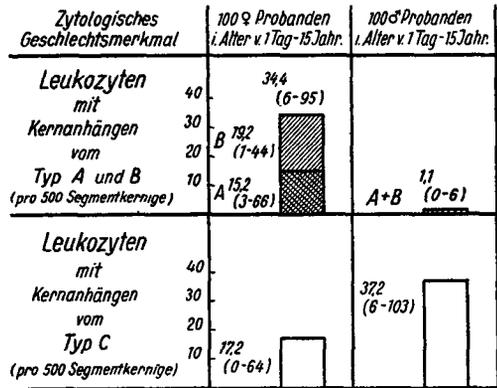


Abb. 2. Graphische Darstellung der durchschnittlichen Anzahl polynucleärer Leukozyten mit Kernanhängen der Typen A, B und C bei Auszählung von jeweils 500 segmentkernigen Neutrophilen (mit mindestens einer fädigen Kernbrücke) in Blutausstrichen von 100 Knaben und 100 Mädchen aller Altersstufen. (Mittelwerte, und - in Klammern - die höchsten und niedrigsten Einzelwerte).

N. B.: Gewertet wurde immer nur die Trägerzelle als solche! Bei den Typen A und B stimmt das Ergebnis dann mit der tatsächlichen Zahl der Kernanhänge überein, bei Form C jedoch nicht, da diese zu mehreren Exemplaren in einer Zelle vorkommen kann.

jedenfalls nicht in der Weise, dass die Registrierung eines einzelnen Exemplars im Blutausstrich bereits zu der Aussage « genetisch weiblich » berechtigt. Ebenso wie bei dem Geschlechtschromatin der Haut- und Mundepithelzellen gibt es nämlich auch hier bei männlichen Zellen vereinzelt Kernanhänge, die ganz ähnlich aussehen und unter den Bedingungen des Lichtmikroskops einfach nicht eindeutig von echten Formen abzutrennen sind. Man benötigt daher für die Diagnose *Mindestzahlen*, die erreicht werden müssen, wenn das Ergebnis der Untersuchung genügend zuverlässig sein soll.

Die erste *Zahlenregel* dieser Art gaben — wie erwähnt — bereits Davidson und Smith, als sie für das Urteil « chromosomal weiblich » die Beobachtung von mindestens 6 « drumsticks » in einem Präparat forderten. Auch die meisten anderen

Arbeitskreise schlossen sich dieser Begrenzung an, während wir selbst auf Grund einer Auswertung von je 100 Präparaten altersverschiedener Knaben und Mädchen (s. Abb. 2) zu der Feststellung kamen, dass bei Berücksichtigung von jeweils 500 Zellen mindestens 6 oder mehr Kernanhänge des Typs A und B zusammen für das weibliche Geschlecht charakteristisch sind.

Weiterhin stellte sich heraus, dass die übrigen Kernanhänge der Gruppe C zwar keineswegs geschlechtsspezifisch sind, dass sie aber bei männlichen Individuen im

Klinische Diagnose: Zur Beobachtung

Weißes Blutbild:

Leukozytenzahl: 8000

Baso. Eos. Myel. JgdI. Stab. Segmentk. Lymph. Monoc. Plasmaz.  
2 8 25 55 10

Bemerkungen:

Zahl der Leukozyten mit Kernanhängen

A	II III	7
B	III III III	15
C	III III III III II III III III III	47

Ergebnis:

A+B 22

A+B  
C 0,47

A		
Stabk.		
B	I	1
A	III	3
Eos.		
B		

Stabk. (A+B) 1

Eosin. (A+B) 3

Zahl der differenzierten neutroph. Segmentk.

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

Hämatologische  
Geschl. Diagnose:

♀

Abb. 3. Formblatt für die Durchführung des Leukozyten-Tests in der klinischen Praxis. In den unteren Kästchen werden die jeweils zu erfassenden 500 segmentkernigen Neutrophilen (mit mindestens einer fadenförmigen Kernbrücke) dekadenweise abgestrichen, in den oberen Reihen dagegen die Zellen mit Kernanhängen A, B und C einzeln vermerkt. (Beispiel der Auswertung bei einem Mädchen).

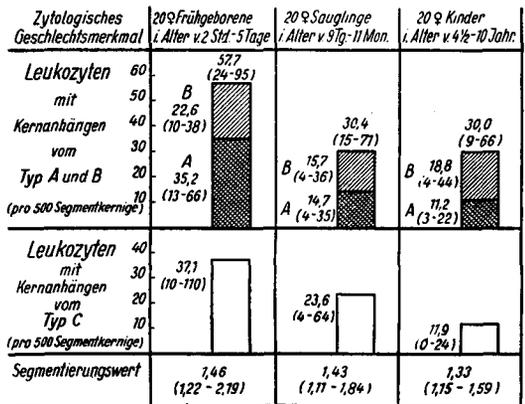


Abb. 4. Durchschnittliche Häufigkeit von Leukozyten mit Kernanhängen der Typen A, B und C bei 60 weiblichen Kindern verschiedener Alters- und Reifegrade (Mittelwerte und - in Klammern - die niedrigsten bzw. höchsten Einzelwerte bei Auszählung von jeweils 500 segmentkernigen Neutrophilen. Die untere Spalte enthält - in Ziffern - die entsprechenden Segmentierungswerte, welche nach der Methode von H. Harm berechnet wurden). Beachte das relativ häufigere Vorkommen von geschlechtsspezifischen (hauptsächlich Typ A!) und unspezifischen Kernanhängen bei der Gruppe der Frühgeborenen, das mit einer etwas stärkeren Segmentierung der Leukozyten einhergeht! Vergl. Abb. 5 und insbesondere Abb. 6, die zeigt, dass auch reife Säuglinge der ersten Lebenswoche sich ganz ähnlich verhalten wie gleichaltrige Frühgeborene!

Verhältnis häufiger vorkommen und daher auf diese Weise evtl. für die Diagnose eine Rolle spielen können (s. Abb. 2). So ist es z.B. in unserem Laboratorium üblich, auch diese Kernanhangsformen bei der Routinebeurteilung eines Blutausrichs grundsätzlich mit zu erfassen. Der abschliessend ermittelte Hilfwert A + B: C (über 0,3-0,4 = chromatin-positiv) kann gelegentlich zur richtigen Geschlechtsdia-

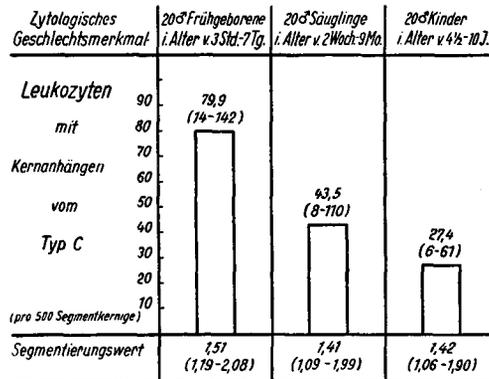


Abb. 5. Durchschnittliche Häufigkeit von Leukozyten mit Kernanhängen des Typ C bei 60 männlichen Kindern verschiedener Alters- und Reifegrade. (Mittelwerte und — in Klammern — die niedrigsten bzw. höchsten Einzelwerte bei Auszählung von jeweils 500 segmentkernigen Neutrophilen. Die untere Spalte enthält — in Ziffern — die entsprechenden Segmentierungswerte). Beachte das relativ häufigere Vorkommen der genannten Kernanhänge bei der Gruppe der Frühgeborenen, das mit einer deutlich stärkeren Segmentierung der Leukozyten einhergeht! Vgl. Abb. 4 und Abb. 6!

gnose beitragen, die allerdings in jedem Falle durch das Ergebnis « A + B » entschieden werden muss. Zur Erleichterung der Zählarbeit verwenden wir ein Formblatt, das auf Abb. 3 wiedergegeben ist.

Auch wir können bestätigen, dass die für das weibliche Geschlecht spezifischen Kernanhänge bei Frühgeborenen (Abb. 4 und 6) und reifen Neugeborenen (Abb. 6) häufiger als im späteren Alter vorkommen. Interessanterweise trifft dies in besonderem Masse für die « drumsticks » (Typ A), weniger ausgeprägt dagegen für die Anhängsel des Typ B zu. Da in gleicher Weise auch die unspezifischen C-Formen reagieren (Abb. 5 und 6), kann dieser Altersunterschied bei Berücksichtigung des oben genannten Hilfwerts « A + B: C » unerkentt bleiben. Dieses bemerkenswerte Phänomen, das nach unseren Erfahrungen nur die Kernmerkmale der Leukozyten betrifft und beispielsweise beim Geschlechtschromatin der Mundepithelzellen nicht vorkommt (Abb. 6), wird möglicherweise durch besondere blutmorphologische Gegebenheiten der ersten Lebensstage ausgelöst. Als einer der ursächlichen Faktoren kommt nach unserer Vermutung die stärkere Segmentierung der Neutrophilen in Betracht (s. Abb. 4 und 5). Diese Zusammenhänge sind jedoch noch nicht genügend geklärt und müssen weiterhin geprüft werden.

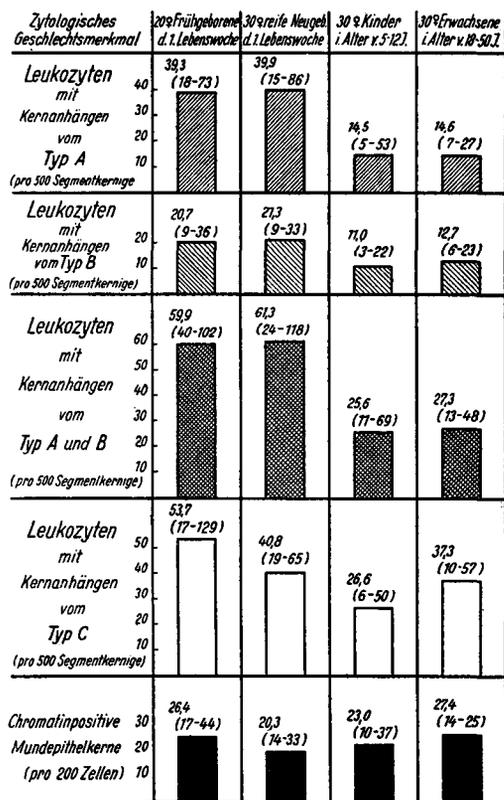


Abb. 6. Graphische Darstellung der durchschnittlichen Anzahl polynucleärer Leukozyten mit Kernanhängen der Typen A, B und C (auf je 500 ausgezählte Segmentkernige) sowie der durchschnittlichen Menge chromatin-positiver Mundepithelkerne (auf je 200 ausgewertete Zellen) bei 110 weiblichen Probanden, aufgliedert nach verschiedenen Altersgruppen. (Mittelwerte und - in Klammern - die jeweils höchsten und niedrigsten Einzelwerte). Beachte das relativ zahlreiche Vorkommen der Leukozytenmerkmale bei Neugeborenen der ersten Lebenswoche (und zwar auch bei reifen N.) sowie das Fehlen eines Altersunterschiedes beim Mundschleimhautabstrich (vgl. Abb. 4 und 5).

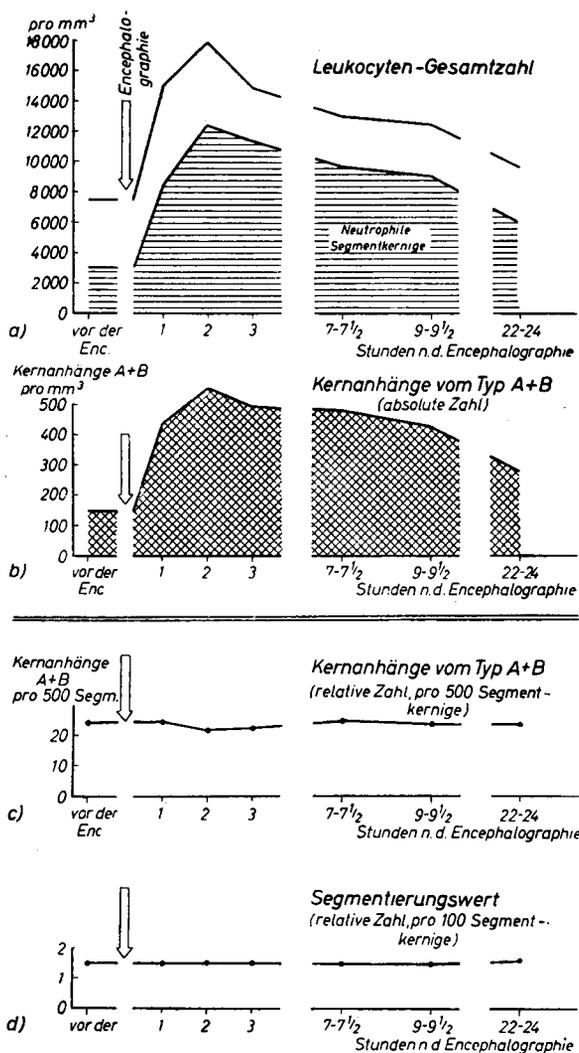


Abb. 7 a-d. Graphische Darstellung des durchschnittlichen Verlaufs der Leukozytenmenge (a), der Zahl segmentkerniger Neutrophiler (a) sowie derjenigen der Kernanhänge vom Typ A und B (b = absolut, c = relativ) und des Segmentierungswertes (d) bei 10 weiblichen Probanden vor und innerhalb von 24 Stunden nach einer lumbalen Luftencephalographie. Der relative Anteil an Kernanhängen (c) bleibt auch hier, trotz erheblichen Anstiegs der Leukozytenzahlen, völlig konstant. Beachte das gleichsinnigé Verhalten des Segmentierungswertes (d)!

Im Rahmen derartiger experimenteller Untersuchungen haben wir selbst uns u. a. die Frage vorgelegt, ob und wie weit sich die Kernanhangszahl desselben Probanden verändert, wenn dieser starken Verschiebungen der peripheren Leukocytenmenge ausgesetzt ist. Als Beispiel wählten wir hierfür die *Pneumoencephalographie*, deren bekannte Auswirkungen auf die periphere Leukocytenformel auch von uns schon in früheren Untersuchungen eingehend geprüft wurden.

Bei 10 weiblichen Probanden haben wir zu diesem Zweck unmittelbar vor und mehrere Stunden nach dem Liquor-Luft-Austausch (bei gleicher Narkose) die Gesamtmenge der Leukocyten, ferner die Zahl der segmentkernigen Neutrophilen und diejenige der Kernanhänge von Typ A und B sowie den Segmentierungswert bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass bei gleichbleibenden Segmentierungswerten (innerhalb der neutrophilen Segmentkernigen, also unter Ausschluss der Stabkernigen) auch die relative Menge der Kernanhänge keine Veränderung erfährt. Die Kurve der absoluten Kernanhangszahlen verläuft daher im Diagramm der Abbildung 7 (b) praktisch parallel mit der Mengenkurve der neutrophilen Segmentkernigen.

Für die *Praxis des Leukocytentests zur chromosomalen Geschlechtsdiagnose* lässt sich hieraus folgern, dass es für deren Ergebnisse gleichgültig bleibt, ob die Untersuchung während der Phase einer Leukocytose oder bei normalen Leukocytenzahlen durchgeführt wird. Die relative Menge der Kernanhänge (pro 500 segmentkernige Neutrophile) bleibt in beiden Fällen gleich. Lediglich die Auswertungszeit ist bei höherem Zellvorkommen geringer, da die zur Diagnose erforderliche Zahl von 500 Segmentkernigen unter diesen Umständen schneller erreicht werden kann.

So interessant und wichtig die hier aufgezeigten cytomorphologischen Zusammenhänge des Leukocytentests auch sein mögen, seine eigentliche Bedeutung für die Klinik liegt natürlich auf dem Gebiet der praktischen Diagnostik. Ich möchte hierauf nicht näher eingehen und nehme an, dass dies im Rahmen anderer Vorträge geschehen wird. Die Durchsicht von 500 Segmentkernigen einschliesslich der Kernanhangsdifferenzierung erfordert zwar nicht nur eine Menge Zeit, sondern auch viel Übung und Erfahrung. Sind aber diese Voraussetzungen erfüllt, dann ist die Methode allein wegen der einfachen Herstellungsweise panoptisch gefärbter Blutausstriche unübertrefflich einfach und in ihren Ergebnissen auch sehr zuverlässig. Es gibt allerdings Ausnahmen (z. B. beim Klinefelter-Syndrom), in denen die Beurteilung auf Grund der genannten Regeln auf Schwierigkeiten stösst. In unserem Laboratorium ist es daher üblich, in entscheidenden Situationen grundsätzlich zwei Verfahren, nämlich den *Leukocyten-* und den *Mundepithel-Test*, gleichzeitig durchzuführen. Hiermit gelingt es praktisch in allen Fällen, zu einem klaren Urteil zu gelangen.

## Bibliographie

1. BARR, M. L.: Progress in Gynecology 3, 131 (1957); Science, 126, 1187 (1957).
2. BORCHERS, H.: Med. Klinik, 51, 1198 (1956).
3. BRIGGS, D. K. and KUPPERMANN, H. S.: J. Clin. Endocrinol. a. Metabol., 16, 1117 (1956).
4. DAVIDSON, W. M., and D. R. SMITH, Brit. Med. J. 1954, 6.
5. HARM, H.: Zschr. menschl. Vererb.- u. Konstitutionslehre, 30, 501 (1952).
6. HARNACK, G. H. v., u. H. N. STRIETZEL: Klin. Wschr., 34, 401 (1956).
7. HIENZ, H. A.: Dtsch. med. Wschr., 82, 1986 (1957).
8. KOLLER, S.: Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen, 3. Aufl., Steinkopff. Darmstadt, 1953.
9. KOSENOW, W.: Mschr. Kinderhk., 104, 177 (1956); Arztl. Wschr., 11, 320 (1956); Triangel, 2, Nr. 8 (1956); Sem. hôp. Paris, 33 (1957), P. et B. 2347-B. 887; Dtsch. med. Wschr., 83, 971 (1958).
10. KOSENOW, W. und R. SCUPIN, Klin. Wschr. 34, 51 (1956); Acta Haematol. (Basel) 15, 349 (1956).
11. LENZ, W.: Annales Paediatrici (Basel) 188, 65 (1957).
12. LUERS, Th.: Mikrokosmos, 45, 217 (1956); Blut, 2, 81 (1956); Zschr. Naturforschg., 10b, 166 (1955); Umschau 785, 1955; Berl. Med. 7, 120 (1956).
13. MUDRA, A.: Anleitung zur Durchführung und Auswertung von Feldversuchen nach neueren Methoden, S. Hirzel. Leipzig, 1949.
14. NEMANN N., PIERSON, M., PIERSON, B. et de de WYN, J.: Sem. hop., Paris, 37, 20/3 (1956).
15. Neuweiler, W. u. E. BERGEMANN, Gynaecologia (Basel) 142, 281 (1956).
16. PEIPER, U. und J. OEHME: Klin. Wschr., 34, 1067 (1956).
17. PUSCHEL, E.: Tgg. Rhein. Westf. Kinderärzte in Bielefeld, 5. 10. 1955.
18. ROMATOWSKI, H., M. Tolksdorf u. H. R. WIEDEMANN: Klin. Wschr., 33, 911 (1955).
19. ROMINGER, E.: Arch. Kinderhk., 154, 107 (1956).
20. SCHAUMKELL, K. W., STANGE, H.-H. u. K. RUMPHORST: Klin. Wschr., 35, 1029 (1957).
21. TENCZAR, V. I. and D. E. STREITMATTER: Amer. J. Clin. Pathol., 26, 384 (1956).
22. TOLKSDORF, M., H. ROMATOWSKI, M. SAILE u. H. R. WIEDEMANN: Arztl. Wschr., 10, 1029 (1955).
23. WIEDEMANN, H. R., H. ROMATOWSKI u. M. TOLKSDORF: Medizinische, 1734, (1955); Münch. med. Wschr., 98, 1090, 1108 (1956).

## Zusammenfassung

Die chromosomale Geschlechtsdiagnose mit Hilfe des Leukocytentests beruht auf dem Nachweis von Kernanhängen bestimmter Form und Grösse an polymorphkernigen Neutrophilen. Morphologische Grundlagen und methodische Einzelheiten dieses in der klinischen Praxis vielfach bewährten Verfahrens werden an Hand von eigenen Untersuchungen kurz geschildert.