

(Aus der Königlichen Universitätsklinik für Nerven- und Geisteskrankheiten
Genua [Direktor: Prof. U. Cerletti].)

Bemerkungen über die Chloruro-Krystallisation des Liquors.

Von
Dr. Hermann Selzer.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. Juni 1937.)

Tomesco, Cosmulesco und *Serban* haben versucht, die Erfahrungen von *Bergauer*, *Boucek* und *Podroucek* über die verschiedenen Krystallisationsarten von Gemischen von physiologischer Kochsalzlösung mit Blutserum von Frauen in verschiedenen Abschnitten des Menstruationszyklus auf den Liquor bei verschiedenen neurologischen und psychiatrischen Krankheiten anzuwenden. Dabei haben sie feststellen können, daß sich bei der Verdampfung eines Tropfens einer in verschiedenen Graden hergestellten Verdünnung eines Gemisches von Liquor mit physiologischer Kochsalzlösung in einem Milieu von 75° eine besondere Anordnung der Salzkristalle im Verdampfungsrückstand ergibt, die verschiedenen Charakter aufwies je nachdem, ob der Liquor von normalen oder von an Nerven- und Geisteskrankheiten leidenden Individuen stammte. Die Verfasser nehmen an, daß dieser von ihnen als „Chloruro-Krystallisation“ bezeichneten Erscheinung eine besondere, für die feinere Differentialdiagnostik wichtige Bedeutung zukommt.

Die Versuchsanordnung für die Chloruro-Krystallisation (CK) ist sehr einfach: in 6 Wassermannröhrchen füllt man steigend 1—6 ccm physiologischer Kochsalzlösung und fügt jedem dieser Röhrchen einen Tropfen des zu untersuchenden Liquors bei; die Röhrchen werden darauf kräftig geschüttelt, wodurch Verdünnungen des Liquors von 1:20 bis zu 1:120 hergestellt werden. Sodann entnimmt man den einzelnen Gemischen einige Tropfen, läßt sie auf einen gründlich gereinigten und mit Äther entfetteten Objektträger fallen und die Tropfen sodann in einer Umgebung von 75° verdampfen. Für jedes Röhrchen muß eine gesonderte Pipette sowie ein besonderer Objektträger genommen werden.

Nach Verdampfung des Tropfens kann man nach Angaben der Verfasser auf Grund makro- und mikroskopischer Befunde auf einen normalen oder pathologischen Charakter der Cerebrospinalflüssigkeit schließen. Läßt man auf einen Objektträger einen Tropfen reiner physiologischer Kochsalzlösung verdampfen, so sieht man an Stelle des Tropfens an den Rändern des früher von diesem eingenommenen Raumes einen mehr oder weniger vollständigen, mehr oder weniger breiten, unregelmäßigen weißen Wall, der einen völlig freien Innenraum umschließt; mikroskopisch bestehen diese Salzmassen aus groben unregelmäßig angeordneten Krystallanhäufungen.

Ist jedoch die Kochsalzlösung mit Liquor versetzt worden (Abb. 1), so besteht der getrocknete Tropfen makroskopisch aus einer matt-

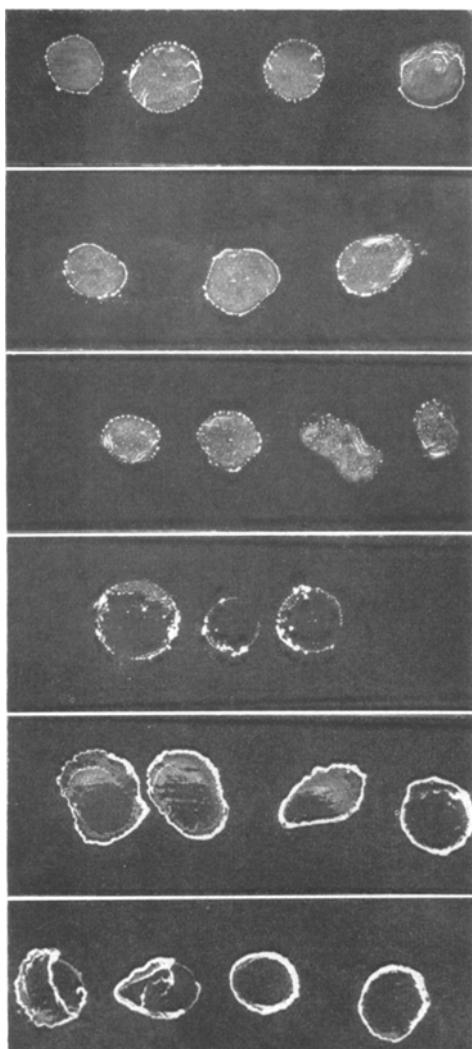


Abb. 1.

weißen, undurchsichtigen Salzmembran umgeben von einer, im Verhältnis zu der oben beschriebenen, dünneren und vollständigeren weißen Salzschicht. Mikroskopisch ist der Außenrand weniger unregelmäßig und besteht in der Verdünnung 1: 20 aus einer einzigen Krystallschicht; das zentrale Salzhäutchen besteht aus feinen und verschieden angeordneten Krystallen, die verschiedenartigste Formen annehmen können: Rosetten, bestehend aus einem zentralen Krystall und strahlenförmig um diese angeordnete vogelfeder- oder distelblattartige Kristallelemente; kleeblattähnliche, achteckige Krystalle; längliche, lanzen spitzenförmige, unregelmäßig verteilte oder einfach nadelförmige Formationen; linienförmig, wellen- oder zwiebelschalenaartig hintereinander gelagerte Krystallketten.

In der Verdünnung 1 : 40 findet man makroskopisch und mikroskopisch ungefähr das gleiche Bild, wobei bei bewaffnetem Auge allerdings die distelblätter- und zwiebelschalenaartigen Anordnungen überwiegen. In den folgenden Verdünnungen ändert sich das

makroskopische Bild: Der äußere Krystallrand wird dem Bild bei Verdampfung des reinen Kochsalztropfens ohne Liquorzusatz immer ähnlicher, das opake Häutchen weist Lacunen auf, besteht in einigen Tropfenrückständen oft nur noch in einem schmalen, halbkreisförmigen Saum oder fehlt gar ganz. Das mikroskopische Präparat erscheint mit

fortschreitender Verdünnung immer weniger geformt, die Elemente werden immer weniger organisiert, unordentlicher, die einzelnen Linien werden grober, wie mit einer breiten Feder gezogen; das Gesichtsfeld erscheint gelockerter.

Dies wären die Resultate, die sich mit Liquor anscheinend normaler Individuen ergeben, d. h. solcher, die keinerlei Erscheinungen seitens des Zentralnervensystems aufweisen. Fügt man jedoch den verschiedenen Lösungen Liquor von progressiven Paralytikern hinzu, so findet man Ergebnisse, die von den rumänischen Verfassern als pathologisch bezeichnet werden. Makroskopisch sieht man im Trockenpräparat das feine Krystallhäutchen bis in die höchsten Verdünnungen das Zentrum ausfüllen (Abb. 2); man muß oft 10fache Mengen physiologischer Lösung nehmen, um makroskopisch den den normalen Bildern ähnliche Darstellungen zu erhalten. Unter dem Mikroskop sieht man bei 1: 20 die Rosetten oft mit groben strahligen vogelfederähnlichen Ausläufern. Bei 1: 80 und 1: 100 werden diese Strahlen feiner und gleichmäßiger, man kann das Bild eines Leberschnitts erhalten, wobei die Zentralvene der Krystall wäre, die Leberbälkchen feine Krystalschnüre. An anderen Stellen sieht man gröbere Zeichnungen, distelblattartige Elemente zwischen den einzelnen Rosetten. Weitere pathologische Formationen sind parallele Linien aus größeren oder kleineren „Vogelfedern“ oder besser „Eichenblättchen“. Weiterhin bilden sich

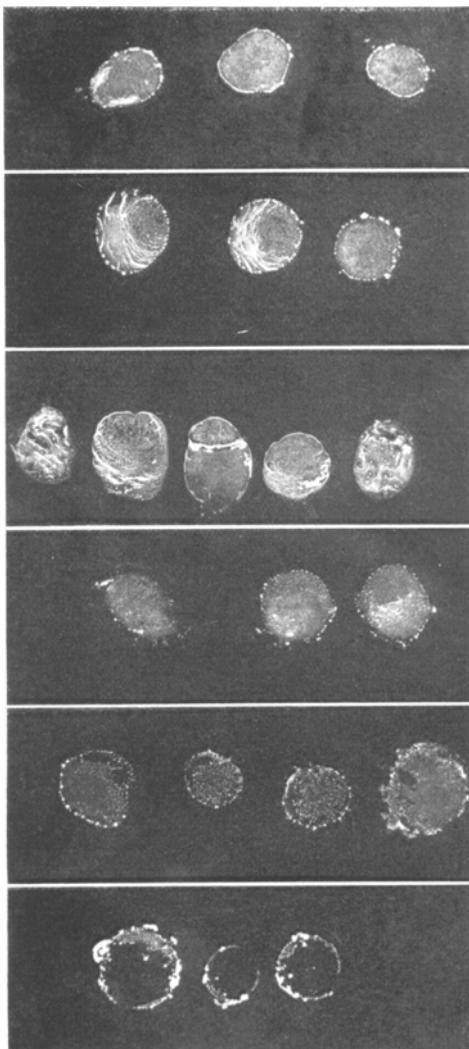


Abb. 2.

aus den Krystallen längere oder kürzere Wellen, die auch sphärische Anordnungen haben können. Als Besonderheiten einer pathologischen Reaktion der Chloruro-Krystallisation kann man also eine auch in geringeren Liquorkonzentrationen wirkende Organisation der auskrystallisierten Elemente bezeichnen; weiterhin ist charakteristisch, daß es sich um sehr feine Zeichnungen handelt, als wenn man zu deren Anfertigung eine feine, spitze Feder benutzt hätte.

Solche pathologischen Bilder ergeben sich nach den Angaben von *Tomesco*, *Cosmulesco* und *Serban* auch bei Kranken mit Verwirrtheitszuständen, Alkoholpsychose, manischdepressivem Irresein usw.

Auf den ersten Blick vermutet man, daß es sich bei dem geringeren oder stärkeren Erhaltenbleiben der Krystallorganisation um eine Wirkung des niedrigeren oder höheren Albumingehaltes der Mischung, der die Tropfen entnommen worden sind, handelt, wobei das in die physiologische Kochsalzlösung gebrachte Eiweiß durch eine Veränderung der Oberflächenspannung die Randspannung herabsetzt. Es gibt eine Grenze, bei der die Oberflächenspannung durch das Albumin nicht mehr gehalten werden kann, was bei normalem Liquor gewöhnlich bei der Verdünnung 1:60 der Fall zu sein scheint. Nimmt man das Gesamteiweiß normalerweise als mit 0,2 g im Liter Liquor an, setzt man ferner voraus, daß 1 Tropfen des Liquors in eine Verdünnung kommt, die 59 Tropfen physiologischer Kochsalzlösung enthält, so findet man, daß ein Tropfen des Liquor-Kochsalzlösungsgemisches mehr als 0,000 000 025 g Albumin enthalten muß, damit in seinem Trockenrückstand eine vollkommen opake Membran erhalten bleibe. Daher würde man es verstehen können, daß der pathologische Liquor, der albuminreicher ist, als der normale, auch in den Lösungen 1:80, 1:100 und mehr, noch keine Unterbrechungen der Salzschicht aufweist.

In ihren Arbeiten sprechen *Tomesco*, *Cosmulesco* und *Serban* die Vermutung aus, daß der verschiedene Albumingehalt bei der Reaktion der CK in normalem und pathologischem Sinne eine Rolle spiele, aber sie sehen hierin nicht die einzige und ausschließliche Erklärung dieser Erscheinung. Nach den Entdeckern der CK sollen noch andere Faktoren mitzuwirken: denn es fanden sich auch pathologische CK mit dem Liquor von solchen Kranken, die bei der Untersuchung mit den sonstigen klassischen Laboratoriumsmethoden normale Cerebrospinalflüssigkeit hatten. Es ergaben sich die sogenannten „Mischformen“, bei denen in einigen Bildern die pathologischen, in anderen die normalen Elemente überwogen. Die rumänischen Forscher denken dabei an das Mitwirken von qualitativen Unterschieden der Liquoralbumine, die in irgend-einem Zusammenhang mit dem klinischen Bilde stehen sollen und die bei den bisher bekannten und gebräuchlichen Liquorreaktionen nicht zum Ausdruck kommen. Mit einer ähnlichen Hypothese wäre auch die Bildung pathologischer Trockenpräparate bei Melancholikern, Alkohol-

psychotikern und Oligophrenen zu erklären, während Psychastheniker, Maniker, Paranoiker und Epileptiker normale CK ergaben.

Wir haben es unternommen, eine Nachuntersuchung der Ergebnisse, die die Bukarester Schule veröffentlicht, anzustellen, um zu versuchen, uns ein Bild über die Art des Mechanismus der CK zu machen und um ihre Verwendbarkeit in der klinischen Diagnostik zu überprüfen.

Wir entnahmen den Liquor bei einer Reihe von Zugängen der neurologischen und psychiatrischen Abteilungen der Klinik ohne irgendeine Auswahl auf Grund der Diagnose zu treffen. Wir hielten uns natürlich genau an die angegebenen Vorschriften zur Herstellung der Tropfen und fanden, daß sich nach deren Verdampfung mehr oder weniger vollkommen Krystallringe und -membrane ergaben. Ebenfalls fanden wir in unseren Präparaten bei der mikroskopischen Untersuchungen all die verschiedensten Krystallformationen wieder, die bereits von *Tomesco*, *Cosmulesco* und *Serban* beschrieben worden sind. Wir sind aber zur Überzeugung gelangt, daß es sich dabei um eine ausschließlich physikalisch-chemische Erscheinung handelt. Der Grad der mit bloßem Auge zu unterscheidenden Verschiedenheiten hängt ausschließlich von dem Albumingehalt des Liquors ab. Das mattweiße Häutchen verliert seine Kontinuität, sobald die Verdünnung des Liquors ungefähr das Verhältnis

$$\frac{\text{g Albumine}}{\text{Tropfen physiologischer Lösung}} = \frac{0,035}{10}$$

erreicht hat.

Daher finden wir, daß ein normaler Liquor bei der Verdünnung 1:60 ungefähr die Lacunen in der Membran aufzuweisen beginnt, oder gar auf einen schmalen Saum innerhalb der weißen Salzkruste zusammen-schrumpft, während ein stark eiweißhaltiger Liquor bei Verdünnungen von 1:250 und mehr noch vollkommene Trockenrückstände ergeben kann.

Wir haben eine Serie von Liquores mit verschiedenem Albumingehalt in solchen Mengen in physiologische Kochsalzlösung gebracht, daß der Eiweißgehalt in den einzelnen Röhrchen der gleiche war. Zum Beispiel nahmen wir in 15 ccm Kochsalzlösung

3 Tropfen des Liquors Cam	mit 1,00 g Albumin
4 Tropfen des Liquors Mor	mit 0,75 g Albumin
6 Tropfen des Liquors Ter	mit 0,50 g Albumin
12 Tropfen des Liquors Can	mit 0,25 g Albumin
20 Tropfen des Liquors Val	mit 0,15 g Albumin

Wir stellten so mehrfache Versuchsreihen her und fanden, daß allgemein die makroskopischen Ergebnisse in allen Tropfen die gleichen waren. Allerdings gilt für diese Versuchsreihen, sowie für die CK im allgemeinen, eine Einschränkung, die vermutlich den Entdeckern dieser Methode nicht entgangen sein wird, die aber keinerlei Erwähnung gefunden hat: Wenn man von der gleichen Lösung nicht nur einen einzigen Objektträger mit den 3—5 Tropfen beschickt, sondern 10 und

mehr Gläschen mit solchen Tropfen anfertigt, so ergibt sich keineswegs immer das gleiche makroskopische Resultat; manchmal fanden wir vollständige Membranen, andere Male wieder solche, die Lacunen aufwiesen, andere Male erinnerten die Trockenrückstände an solche reinen Salzwassers. Solche Unterschiede fanden wir nicht nur, wenn es sich um eine Grenzlösung von 0,035 g Albumin auf 10 Tropfen physiologischer Lösung handelte, obgleich bei dieser Verdünnung es am häufigsten beobachtet wurde, sondern auch, wenn der Albumingehalt höher lag. Es sprechen also Zufälligkeitsfaktoren mit, so daß ein vollständig gleiches Ergebnis im Eiweißgehalt der einzelnen Tropfen der Mischung von Liquor und physiologischer Lösung nicht zu erwarten ist. Sollte das die sogenannten Mischformen zu erklären imstande sein?

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten wir beim Studium der mikroskopischen Bilder der CK.

Wir fanden vollkommen gleiche Bilder, wie die rumänischen Verfasser, sehen aber keinen Grund dafür, die einzelnen Krystallformationen anders als mit den verschiedenen Albuminkonzentrationen der gebildeten Tropfen zu erklären.

Wir haben nur solche Kranke untersucht, die irgendwelche nervöse Symptome aufwiesen, sei es eine einfache Neurasthenie, einen Tumor cerebri, eine Encephalitis oder eine progressive Paralyse. Wir sahen ebenfalls bei hohen Liquorkonzentrationen (z. B. 1: 20 eines Liquors mit 0,65 g Albumin) die einen einzelnen Krystall umgebenden Krystallstrahlen aus vogelfederartigen Gebilden, deren vielfache Seitenstrahlen sich miteinander verflechten (Abb. 3). Nehmen wir aber 1 Tropfen eines Liquors, der 0,15 g Albumin im Liter enthält und verdünnen ihn mit 5 Tropfen physiologischer Kochsalzlösung, so gelingt es sehr oft, gleiche Anordnungen zu erhalten. Ebenso fanden wir die parallelen Linien mit Spitzen von Distelblättern (Abb. 4), sowie die konzentrischen Kreise (Abb. 5) abhängig von dem Grade der Verdünnung; dabei kann es vorkommen, daß ein albuminarmer Liquor, der bereits bei 1: 40 in der Mitte der Krystallmembran unorganisierte Strukturen aufweist, oder gar große, mit bloßem Auge zu erkennende Lacunen, in den Randzonen derartige, nach Angaben der Verfasser Tomesco, Cosmulesco und Serban für pathologischen Liquor in der Konzentration 1: 80 oder 1: 100 bezeichnende distelblattartige Rosetten, wie sie in Abb. 6 dargestellt sind. Es ist das unserer Meinung nach nicht anders zu erklären, als daß in den Randzonen eben eine den Tropfen 1: 100 entsprechende Oberflächenspannung herrscht, während diese bereits in der Mitte gleich Null ist, oder dem eines normalen Liquors entspricht im Gemisch von 1 Tropfen Liquor auf 3 ccm physiologischer Kochsalzlösung = 1: 60 (Abb. 7).

Die konzentrischen Ringe mit mehr oder weniger feinen Linien scheinen besonders in Grenzlösungen mit relativ wenig Albumin vorzukommen, wobei aber die Oberflächenspannung sich nur auf einen kleinen

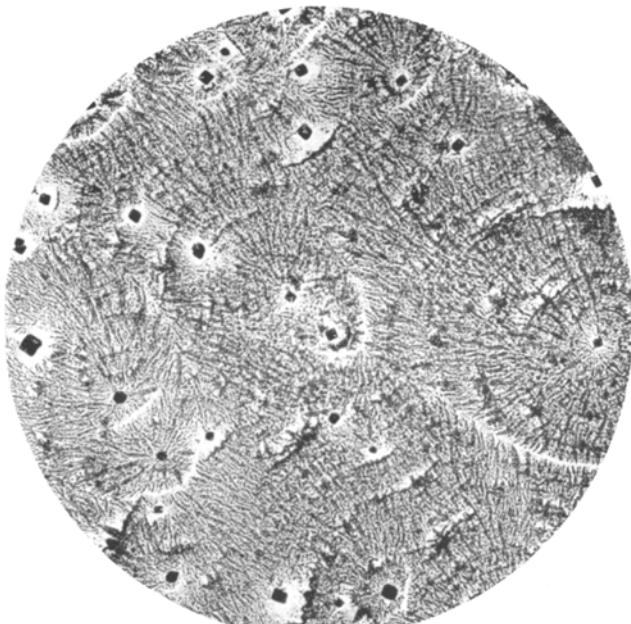


Abb. 3.



Abb. 4.

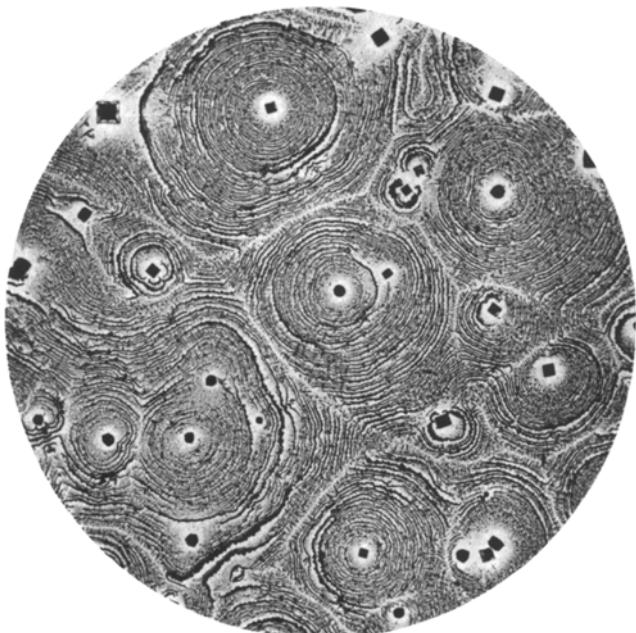


Abb. 5.

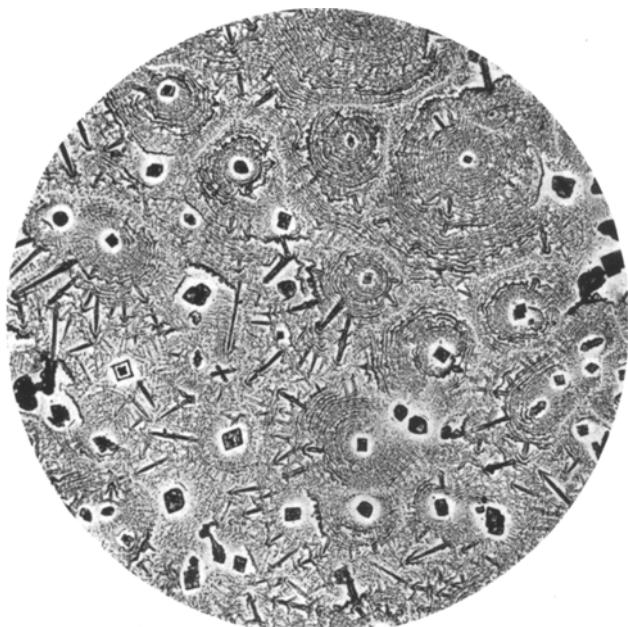
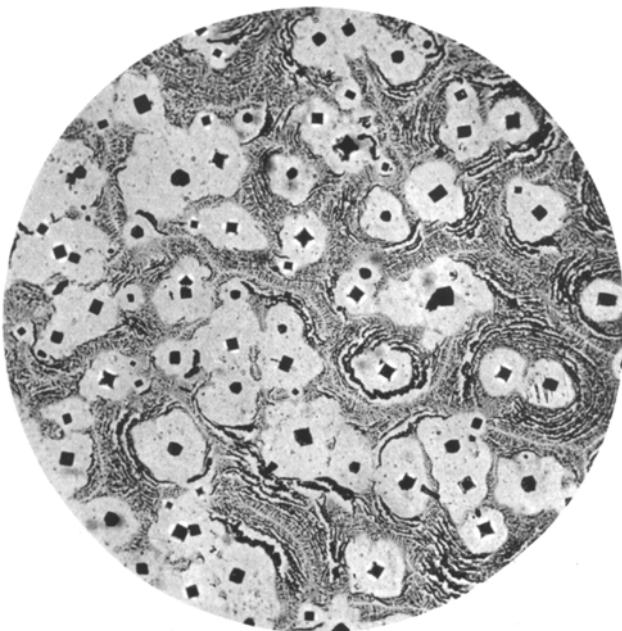


Abb. 6.

Raum, sei es einen kleinen Tropfen, sei es die Randzone auszuwirken hat. Zweifellos sahen wir Zeichnungen mit grober Feder, die ganze Tropfen ausmachten, und die nur in den normalen Liquorkrystallisationen vorkommen sollen, auch bei der CK von Enzephalitikern oder Paralytikern.

Wenn man eine genügend große Anzahl von Tropfen verdampfen läßt, so kann man Übergänge von rein pathologischen Bildern zu vorwiegend pathologischen und zu gemischten mit vorwiegend normalem Befund antreffen, wo bis auf einige kleine schwach gezeichnete Reste,



die man als feingezeichnet beschreiben kann, Krystallinien „mit grober Feder gezogen“ überwiegen.

Es könnte gegen uns angeführt werden, daß es mit der Logik unvereinbar erscheint, wenn wir „gemischte, vorwiegend normale Formen“ im Liquor von Paralytikern mit 0,60—0,80 g Albumin finden und trotzdem die CK als rein physikalisch-chemische Erscheinung der Oberflächenspannung bezeichnen wollen, während *Tomesco*, *Cosmulesco* und *Serban* die bequemere Lösung einer qualitativen Beeinflussung des Liquoralbumins vorschlagen. Aber was wissen wir denn über die Krystallisierungsvorgänge, die beim Verdampfen eines unter verschiedener Oberflächenspannung stehenden kolloidalen Gemisches sich abspielen? Es erscheint unwahrscheinlich, daß in jedem von 20 Tropfen eines gleichen Liquor-Kochsalzlösung-Gemisches die gleiche Oberflächenspannung besteht.

Dann muß unbedingt angenommen werden, daß die ohne besondere feinere Krystallisation erfolgenden groben Niederschläge, die wir sehr oft haben beobachten können, die Salzgehalte der Lösungen derart verdünnt werden kann, daß die Krystallbilder eine ganz andere Anordnung erfahren müssen. Ist denn der Albumingehalt des kolloidalen Systems Liquor-Kochsalzlösung nach dem Durchlaufen durch die Pipette oder im allgemeinen in den einzelnen Röhrchen trotz eifriger Schüttelns und Vermischens und sodann auch in den Tropfen gleich? Anscheinend nicht, denn sonst müßten alle Tropfpräparate einer gleichen Lösung gleiche Resultate, wenigstens makroskopischer Art, zeigen.

Daß es sich sich um solche Vorgänge handelt, scheint unzweifelhaft:

Wenn wir nämlich den Liquor enteiweißen, so bietet er keinerlei CK mehr da. Wird das ausgefällt und durch Zentrifugieren zusammengeballte Albumin in destilliertem Wasser aufgelöst und wieder als Liquor behandelt bei der Herstellung der Verdünnung mit der physiologischen Kochsalzlösung, so hat man in vielen Tropfen die gleichen Ergebnisse wie mit dem Liquor. (Man beachte nämlich, daß auch hier eine Reihe von Faktoren mitspielen, die eine gleiche Konzentration des Albumins im destillierten Wasser wie vorhergehend im Liquor unmöglich machen.) Allerdings muß man schon eine genügende Anzahl von Tropfen verdampfen lassen von all den hergestellten Verdünnungen, um von den Zufällen unabhängig zu sein, die einen einzelnen Tropfen beeinflussen.

Nehmen wir reines Hühnereiweiß und stellen starke, fallende Verdünnungen her, so gelingt es uns in manchen Tropfen, eine regelrechte CK zu erzielen. Um uns Klarheit zu verschaffen über einen etwaigen Einfluß der Oberflächenspannung auf die Krystallisationsvorgänge im ausgetrockneten Liquortropfen, haben wir auf Vorschlag von Herrn Professor *Amanteas* vom hiesigen Institut für physiologische Chemie den Liquor-Kochsalzgemischen einen oder mehrere Tropfen der für die Kolloidreaktionen des Liquors allgemein gebrauchten Mastixlösung hinzugefügt und haben feststellen können, daß der aus der solcherart veränderten Lösung entnommene Tropfen nach seiner Austrocknung ein einer höheren Verdünnung entsprechenden makro- und mikroskopisches Niederschlagsbild ergibt; gleiche Ergebnisse hatten wir mit Hinzugabe von Seifenlösungen. Wir können also daraus schließen, daß die mehr oder weniger starke Organisation der Salzkristalle der Ausdruck der durch den Liquortropfen in der Kochsalzlösung geschaffenen Oberflächenspannung ist, daß mit der Verminderung besagter chemisch-physikalischer Erscheinung sich auch die Krystallformationen ändern. Als Beweis mag weiterhin auch gelten, daß ein Mastix-Kochsalzgemisch ohne Liquorzusatz eine gewisse CK ergeben kann.

Weiterhin haben wir eine große Serie von CK mit fein ausgezogenen ungefähr gleichen Pipetten hergestellt und feststellen müssen, daß innerhalb einer größeren Anzahl von Tropfen aus der gleichen Pipette

sich nicht unbedeutende Unterschiede ergaben. Zu dem gleichen Schluß einer technisch einwandfreien Undurchführbarkeit der CK kamen wir, nachdem wir Objektträger mit Tropfen der gleichen Kochsalz-Liquorlösung aus der gleichen Pipette beschickt, in verschiedener Umgebung unter verschiedener Temperatur trocknen ließen: es ergab sich, daß eine in Zimmertemperatur hergestellte CK weit pathologischere Formen aufwies als eine solche in Brutöfen von 56° oder 75°. Ebenfalls ergaben sich große Unterschiede, wenn zwar in Zimmertemperatur von 17—18°, aber in Umgebung mit verschiedenem Feuchtigkeitsgehalt sich der Trockengehalt abspielte.

Wir hatten den Versuch unternommen, eine Nachuntersuchung der von *Tomescu*, *Cosmulescu* und *Serban* mit Chloruro-Krystallisation bezeichneten Liquoruntersuchungsmethode anzustellen, und nach Feststellung einer Reihe von Mängeln unter Anwendung der notwendigen Kritik Vorschläge zur Verbesserung und Vervollkommnung der Technik zu bringen, aber nach unseren Erfahrungen müssen wir zu dem Schluß kommen:

Die Erscheinungen der Chloruro-Krystallisation scheinen Folgeerscheinungen einer höheren oder niedrigeren Oberflächenspannung zu sein, die in einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung nach Hinzufügung eines mehr oder weniger albuminhaltigen Liquors herrscht.

Durch zufällige Bedingungen, durch den Grad der Vermischung von Liquor mit physiologischer Kochsalzlösung, durch die Tropfenbildung aus der Pipette, das ist durch Beeinflussung der Oberflächenspannung durch äußere mechanische Momente, wird ein verschiedener Ausfall der CK hervorgerufen.

So wird es unmöglich sein, dieser Methode irgendwelchen besonderen diagnostischen Wert beizumessen, da die einzelnen Krystallformen keinerlei einwandfreie Rückschlüsse auf qualitative Veränderungen der Liquorbestandteile zulassen.

Es ist vielleicht möglich, durch die Chloruro-Krystallisation einen gewissen Anhaltspunkt für den Gehalt eines Liquors an Albumin zu erhalten, aber es ist wohl nicht so, daß von nun an eine Untersuchung der Cerebrospinalflüssigkeit als unvollkommen zu gelten hat, wenn nicht die CK gemacht worden ist, so wie *Tomescu*, *Cosmulescu* und *Serban* glauben.

Bibliographie.

Bergauer, Boucek, Podroucek: C. r. Soc. Biol. Paris **117**, 174 (1934). — *Tomescu, Cosmulescu, Serban*: Bull. Acad. Med. Romanie **1**, 1. — Bull. Soc. Psychiatr. Bucarest **1**, 1.