

Aus der Universitäts-Nervenklinik Köln (Direktor: Prof. W. SCHEID)

Weitere Untersuchungen der Beeinflußbarkeit von Kupferchlorid-Kristallen durch Liquor cerebrospinalis

Von

FRITZ LEHMANN-GRUBE

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Juli 1955)

Kürzlich hatten wir in dieser Zeitschrift Gelegenheit, über die Ergebnisse einer neuen diagnostischen Methode zu berichten⁵, die von RIEBELING vorgeschlagen wurde⁷ und die wir dann mit seiner Hilfe für die Liquordiagnostik bearbeiten konnten⁴.

Es handelt sich, kurz gesagt, um folgendes: Körperflüssigkeiten oder Gewebeextrakte werden einer wäßrigen Lösung von Kupferchlorid zugesetzt, und dieses Gemisch wird dann zum Eintrocknen gebracht. Normale Liquores verändern das Kristallbild in charakteristischer Weise. Die sonst nadelförmigen, gitterartig angeordneten CuCl₂-Kristalle erscheinen deutlich in 2 Formengruppen, die Strukturen erster und zweiter Ordnung genannt wurden. Jene sind gröbere, unter dem Mikroskop dunkel erscheinende, verschieden lange Nadeln. Diese treten als lockere feine Gebilde auf, die einen größeren Formenreichtum zeigen und leicht von den Strukturen erster Ordnung abgegrenzt werden können. Die Strukturen zweiter Ordnung sind es, die bei Zusatz pathologisch veränderter Liquores in leicht erkennbarer Weise abgewandelt sind. Die dann zu beobachtenden Formen wurden „organische Wuchsformen“ genannt, um ihre Ähnlichkeit mit blühenden Gräsern oder Baumflechten hervorzuheben und um eine knappe Formulierung zu ermöglichen. Abbildungen solcher Wuchsformen finden sich in der vorhergegangenen Arbeit⁵. Es ergab sich danach die Notwendigkeit, noch folgende Fragen zu klären:

1. Kann die Kupferchlorid-Kristallisationsmethode als Routine-methode Eingang in die Klinik finden?

2. Ist die Methode differentialdiagnostisch verwertbar, mit anderen Worten: lassen sich für bestimmte Krankheiten bestimmte Kristallbilder nachweisen?

3. Welche Faktoren im Liquor bewirken die Veränderungen der CuCl₂-Kristalle in der oben beschriebenen Weise?

Zu 1.: (Anwendungsmöglichkeiten). Die Feststellung von K. F. und L. SCHEID: „Das methodische Rüstzeug der normalen und pathologischen

Liquorphysiologie ist bemerkenswert rückständig und starr geblieben“, hat auch Gültigkeit für die Liquordiagnostik. Der Versuch, neue Wege zu beschreiten, kann daher von wesentlicher Bedeutung sein.

Die Vorzüge der Kupferchloridmethode liegen in der Leichtigkeit der Durchführung, sowie im geringen Liquorverbrauch (rund 1 cm³). Demgegenüber stehen folgende Nachteile: 1. Erfahrung in der Methode ist Voraussetzung, um Fehlbeurteilungen bei den weniger deutlichen Fällen zu vermeiden. 2. Schwankungen schwer kontrollierbarer Einflüsse sind schuld an der Tatsache, daß eine diffizilere quantitative Auswertung noch nicht möglich ist. Im Gegensatz zum reinen Kupferchlorid sind die aus dem Gemisch entstehenden Formen stark durch äußere Einwirkungen beeinflußbar. Folgende Einzelfaktoren wurden von uns systematisch untersucht: Luftfeuchtigkeit, Wärme, pH, CuCl₂-Konzentration und Zustand der Objektträgeroberfläche. Ohne auf Einzelheiten einzugehen, kann gesagt werden: Praktisch ohne Einfluß sind pH und CuCl₂-Konzentration (Schwankungen zwischen 20 und 30% der Salzlösung wurden geprüft). Sehr verändernd wirken Wärme und Luftfeuchtigkeit (Faktoren, die die Verdunstungszeit beeinflussen und damit die Kristallisationsdauer) sowie die Objektträgeroberfläche. Es ist nämlich ein wesentlicher Unterschied für das Ergebnis, ob diese absolut rein und entfettet ist und damit dem Tropfen ungehemmte Ausbreitung gestattet oder ob das Kristallisationsgemisch infolge hoher Oberflächenspannungen als dicker Tropfen dem Glas aufliegt. Während diese Fehlerquelle durch gründliche Reinigung der Gläser leicht beseitigt werden kann, stellen die ersten beiden Faktoren ein schwerwiegendes Problem dar. Es kann nach sorgfältiger Prüfung gesagt werden: Alle Ergebnisse, insbesondere bei Grenzfällen, hängen von der Kristallisationsdauer ab. Sie können bei schneller Kristallisation negativ, bei langsamer positiv sein. Entsprechend verschieben sich quantitativ die Ergebnisse. Optimale Bedingungen für die Kristallisation sind 20° C Temperatur bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 20%. Das konstante Einhalten dieser Werte ist für eine genaue Bewertung unerlässlich. Ist die Konstanz gewährleistet (mit Hilfe einer extra dafür eingerichteten Kammer, eventuell im Brutschrank), dann vermag die Methode zur ersten Erkennung pathologischer Liquores Gutes zu leisten.

Zu 2.: (Differentialdiagnostische Möglichkeiten). Von vornherein waren wir bestrebt, Kristallformen zu finden, die für bestimmte Krankheiten als typisch angesehen werden könnten. RIEBELING hatte mit Hirnextrakt und Serum⁷ ähnliche Ziele verfolgt. Der anfänglich gefundene Formenreichtum bei Liquorzusatz zur CuCl₂-Lösung war vorwiegend durch äußere Einwirkungen verursacht gewesen. Nachdem konstante Versuchsbedingungen weitgehend gesichert waren, erschienen die Kristallformen sehr viel eintöniger und ließen sich bei pathologischen

Verhältnissen ausnahmslos in die Kategorie der „Wuchsformen“ einreihen. Unterschiede konnten nur hier erwartet werden. Schon früher und dann besonders bei Betrachtung des photographischen Materials der Kristalle bei Meningitis tbc. war aufgefallen, daß die Strukturen zweiter Ordnung, in pathologischen Fällen also die Wuchsformen, bei klinisch und liquorologisch ähnlichen Fällen überaus verschieden sein konnten (vgl. Abb. 1—5 der früheren Arbeit) und es in der Regel auch waren, daß



Abb. 1. Bi.-Nr. 525. Serum. γ -Plasmocytom. Ges.-Eiw.: 7,2, Verd.-Gr.: 1:116. Vgl. mit Abb. 2. (Siehe auch Tab. 1, St23/24.) Vergr.: etwa 20fach

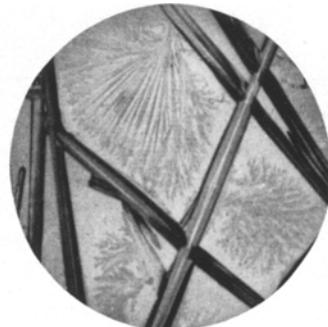


Abb. 2. Bi.-Nr. 523. Serum. Normaler Vergleichsfall zu Abb. 1. Ges.-Eiw.: 6,1. Verd.-Gr.: 1:100. Vergr.: etwa 20fach

andererseits klinisch ganz verschiedene Fälle bei ähnlichem oder differierendem Liquorsyndrom weitgehend identische Bilder ergaben. Ebenso wenig ließ sich eine Grundform z. B. für Lues cerebri oder Encephalomyelitis disseminata nachweisen. Wir versuchten, auf dem Wege über das Blutserum weiterzukommen. Mit einer großen Anzahl von Seren bei Krankheiten mit und ohne deutliche Veränderungen der Bluteiweißkörper wurden Kristallversuche angestellt. Eindeutig normale Sera wurden zum Vergleich herangezogen. Wir gingen (im Gegensatz zur später beschriebenen Versuchsanordnung) so vor, daß das Gesamteiweiß von vornherein bei den Verdünnungsgraden berücksichtigt wurde und daß immer ein Vergleichspaar — normales und pathologisches Serum — auf einem Objektträger untergebracht wurde, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. Ziel war es, für einige Erkrankungen oder doch wenigstens für bestimmte Typen der Pherogramme einheitliche Kristallformen zu ermitteln. Verwertbare Ergebnisse konnten nicht erzielt werden. Wohl waren in einigen Versuchen Unterschiede deutlich (s. Abb. 1 u. 2). In den meisten Fällen jedoch konnten im Kristallbild des Normal- und des Patientenserums keine Unterschiede ermittelt werden. Selbst das Homoserum (Retroplazentarserum) zeigte keinen Unterschied gegenüber dem zum Vergleich herangezogenen Normalserum. (Die geprüften Verdünnungsgrade waren 1:50, 1:100, 1:150, 1:200.) Einige typische Versuche

sind in Tab. 1 dargestellt. Wir folgern daraus und aus den oben erwähnten Beobachtungen, daß diese Methode noch nicht geeignet ist, differential-diagnostisch weiterzuhelpfen. Immerhin ist nicht zu übersehen, daß die „Wuchsformen“ des Liquors nicht völlig gleich denen des entsprechend verdünnten Serums sind.

Zu 3.: (Formative Kräfte). Schon früher konnten wir das Eiweiß als den ursächlichen Faktor der Kristallbeeinflussung wahrscheinlich machen. Durch Ultrafiltration — Membranfiltermethode³ — eingeengter

Tabelle 1

Lfd. Nr.	Protokoll Nr.	Diagnose	<i>Pherogramm</i> Ab. α_1 β γ + α_2	Beurteilung beim Vergleich mit einem Normalserum
1	Kl 10/11	Lebercirrhose, La- paroskopisch ge- sichert. Diabetes	47 11 11 31	Keine Unterschiede der Strukturen zwischen pa- thologischem Serum und normalem Vergleichs- serum.
2	He 12/13	Beginnende Leber- cirrhose. Ulcus duodeni	44 11 5 40	Kein deutlicher Unter- schied der Strukturen
3	Ri 12/14	Kavernöse Lung.-Tb. Amyloidose	28 33 29	Die Kristallformen des Amyloidose-Serums etwas zarter. Sonst kein Unterschied.
4	Ho 15/16	„Homoseran“ (Asid -- Serum-Institut) Re- troplazentarserum	3 Fraktionen	Keine Unterschiede
5	Ha 17/18	Amyloid-Nephrose, autoptisch gesich.	22 35 20 23	Keine Unterschiede
6	Mü 19/20	Carcinoma ventriculi, ante exitum	40 25 12 23	Keine Unterschiede
7	Str 21/22	Schwere kavernöse Lungen-Tb. Rezidiv. Blutungen	48 21 14 12	Keine Unterschiede
8	Wu 23/26	Lebercirrhose, laparoskopisch gesichert.	31 11 13 45	Keine Unterschiede
9	St 23/24	γ -Plasmocytom. Histolog. gesichert	25 7 4 64	Deutlicher Unterschied zum Normalserum. Körnige Ausfüllung der Zwischenräume. Grobe Kristallformen.
10	Ru 27/28	Lebercirrhose	36 14 10 40	Keine Unterschiede
11	Ri 30/31	wie Ri 12/14	28 33 29	Keine Unterschiede
12	Ru 30/32	wie Ru 27/28	36 14 10 40	Keine Unterschiede

Liquor ergab „Wuchsformen“ (s. Abb. 3), wohingegen das Ultrafiltrat kaum eine Beeinflussung der CuCl₂-Kristalle erkennen ließ. Die Tatsache, daß auch bei sanierten Liquores von tuberkulöser Meningitis für pathologischen Prozeß sprechende Kristallformen auftreten, macht wahrscheinlich, daß dafür nicht nur die Quantität der Eiweiße allein verantwortlich zu machen ist. Diese Vermutung wurde gestützt durch die Beobachtung, daß auch bei elektrophoretischer Kontrolle von Meningitis tbc.-Liquores in weitgehend sanierten Stadien (unserer 2. Gruppe entsprechend⁵⁾) signifikante Veränderungen der Eiweißkörper im Sinne einer Vermehrung der Albumine und einer Verminderung der β -Globulin- und der τ -Fraktion gefunden wurden⁶. Andere Modellversuche mit Blutseren führten in dieser Frage weiter.

Das Vorgehen war wie folgt: Patientenserum mit stark veränderten Bluteiweißwerten (papierelektrophoretisch nach GRASSMANN u. Mitarb.² erwiesen)*, wurden in arithmetischer Verdünnung (von 1:100, 1:120, 1:140—1:500) nach früher^{4, 5} beschriebener Methode zum Kristallisieren gebracht. (Ein Unterschied bestand nur insofern, als in diesen Fällen die CuCl₂-Lösung nicht angesäuert wurde.) Um unkontrollierbare äußere Einflüsse weitgehend auszuschließen, erfolgte die Kristallisation zusammen mit einer entsprechenden Reihe eines Serums einer klinisch gesunden Vergleichsperson. Auch diese Vergleichssera wurden in jedem Falle elektrophoretisch geprüft. (Die Mittelwerte sowie die Abweichungen betrugen für die einzelnen Fraktionen: Alb.: $64 \pm 11,1$; $\alpha_1 + \alpha_2$ -Globulin: $12,4 \pm 1,56$; β -Globulin: $9,7 \pm 2,26$ und γ -Globulin: 15 ± 15 bei 7 Normalfällen.) Auf diese Weise war ein Maßstab von Fall zu Fall geschaffen, denn es war zu erwarten, daß äußere Faktoren beide Reihen gleichmäßig beeinflussen würden. Die Gesamteiweißwerte wurden mit Doppelbestimmungen nach der BIURET-Methode¹ festgestellt. Gesucht wurden die Verdünnungsgrade, bei denen die als organische Wuchsformen beschriebenen Kristalle gerade noch auftraten. (Diese Werte sind keineswegs identisch mit der Grenze der Beeinflussung überhaupt. Eine Näherung an das Bild der reinen CuCl₂-Kristalle erfolgt erst bei viel höheren Verdünnungen.) (Siehe unten.)



Abb. 3. Bi.-Nr. 304. Liquor von 10 cm³ auf 5 cm³ durch Ultrafiltration eingeeignet. Cerebraler Gefäßprozeß. Keine Liquorveränderungen. Der unfiltrierte Liquor zeigte keine Wuchsformen

* Auch an dieser Stelle möchte ich Herrn Dr. med. H.-J. TEPE, Leiter des Chemischen Labors des A.-K.-Heidberg in Hamburg, sowie Frau WÖLFING für die Durchführung der Elektrophoresen und der Gesamteiweißbestimmungen herzlich danken.

Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Nach Umrechnung aller Eiweißwerte auf 5% sind zwischen beiden Reihen deutliche Unterschiede der Verdünnungsgrade, die als Grenzwerte ermittelt wurden, augenscheinlich. Äußere Faktoren machen sich stark bemerkbar, insbesondere hier, wo die Beurteilung der Kristallbilder eine sehr schematische sein mußte und selbst geringgradigste und undeutlichste „Wuchsformen“ noch bewertet wurden. Zur Übersichtlichkeit fügen wir

Tabelle 2

Lfd. Nr.	Protokoll Nr.	Ges.-Eiweiß		Pherogramm patholog.			Verd.-Grad		Verd.-Grad auf 5% G. E.		Verd. Quot.		
		normal	pathol.	Alb.	α_1	β	γ	norm.	path.	norm.	path.		
1	Wi 6/7	6,6 6,4	6,3 5,9	5,9 5,9	74	9	6	11	330	360	260	300	0,9
2	Ri 8/9	6,1 5,8	5,9 4,3	4,5 4,4	28	33	—	29	300	190	250	220	1,1
3	Kl 10/11	6,3 6,1	6,2 7,1	7,1 7,1	47	11	11	31	480	360	390	250	1,6
4	He 12/13	6,1 6,3	6,2 7,4	7,4 7,4	44	11	5	40	480	480	390	330	1,2
5	Ha 17/18	5,8 5,6	5,7 4,4	4,5 4,3	22	35	20	23	360	140	320	160	2
6	Mü 19/20	6,1 6,1	6,1 5,4	5,3 5,3	40	25	12	23	360	180	300	170	1,8
7	Str 21/22	6,1 6,1	6,1 7,1	6,9 7,0	48	21	14	12	400	240	330	170	1,9
8	St 23/24	6,1 6,1	6,1 7,3	7,1 7,2	25	7	4	64	360	320	300	220	1,4
9	Wu 25/26	6,1 6,1	6,1 6,9	6,9 6,9	31	11	13	45	360	280	295	200	1,5
10	Ru 27/28	6,6 6,6	6,6 7,6	7,8 7,7	36	14	10	40	400	360	300	235	1,3

einen Verdünnungsquotienten bei, der mit einem Blick die Feststellung ermöglicht, ob die Grenze der gesuchten Formen bei veränderten Sera niedriger (Quotient über 1) oder höher (Quotient unter 1) als bei den normalen Sera gefunden wurde. Die normalen Sera enthalten relativ mehr Albumin und relativ weniger Globulin als die pathologisch veränderten. Demnach verhalten sich die Eiweißwerte der Normalsera zu denen der Patientenserien wie die Eiweiße der Liquores „sanierter“ tuberkulöser Meningitiden zu Normalliquores (siehe S. 13). Auch im Kristallbild konnte entsprechendes Verhalten nachgewiesen werden: Während in Mischungen von Normalliquores mit CuCl₂ keine „Wuchsformen“

auftraten, wurden solche in Liquores „saniert“ tuberkulöser Meningitiden noch gefunden. Dementsprechend erschienen bei verdünnten normalen Sera noch „Wuchsformen“, während bei entsprechend verdünnten Patientenserum keine mehr auftraten. [Nur in einem von 10 Fällen, Versuch Wi. 6/7, ist der Quotient unter 1. Es handelt sich um den Fall einer Lebercirrhose, bei dem — im Gegensatz zu allen übrigen Fällen — eine Erhöhung der Albumine vorgelegen hatte (siehe Tab. 2). Dieser abweichende Quotient war also zu erwarten.] Wir zweifeln nach diesen Ergebnissen nicht daran, daß das Auftreten von „Wuchsformen“ in „sanierten“ Liquores der Meningitis tbc. in Verschiebungen der Eiweißkörper seine Ursache hat, wie sie auch anderweitig nachgewiesen worden waren.

Bei Vergleichsreihen mit reinem Kupferchlorid konnten noch bei Verdünnungen von 1:1200 deutliche Beeinflussungen des CuCl₂-Kristallbildes beobachtet werden. Da dieses Gemisch durch die Salzlösung noch um das Doppelte verdünnt wurde, andererseits die Gesamteiweißwerte im Serum nicht hoch sind, wird deutlich, wie empfindlich die kristallformenden Kräfte des Kupfersalzes auf Veränderungen ihres Milieus reagieren.

Eine theoretisch bedeutsame Frage ist damit aber noch nicht beantwortet. Nämlich: Wie kann man sich das Zustandekommen der Veränderungen im Kristallbild des Kupferchlorids nach Zusatz von Körperflüssigkeiten bzw. Gewebsextrakten erklären? Daß das Eiweiß den ursächlichen Faktor darstellt, darf als bewiesen gelten. Über den Modus ist damit jedoch nichts ausgesagt.

Da die elektrisch getrennten Eiweißfraktionen mit bestimmten Molekülgrößen- bzw. Gewichten weitgehend korrelieren^{8,9} und die Verschiebungen im Verhältnis Albumin zu Globulin die Viscosität des Serums verändern⁹, ist eine Erklärungsmöglichkeit im physikalischen Zustand des Eiweißes, d. h. in der Veränderung der Viscosität des Lösungsmittels gegeben. Wenn man sich vorstellt, daß die Formierung der Kupferchloridkristalle einen Wachstumsvorgang darstellt, dann wäre es denkbar, daß dieser durch das Milieu beeinflußt wird. Diese Erklärung ist jedoch nur schwer aufrecht zu erhalten, wenn man bedenkt, daß noch im Verhältnis 1:1200 verdünntes Serum einen erkennbaren Einfluß auf das Kristallbild ausübt.

Es ist auch in Erwägung zu ziehen, ob die veränderten Kristallformen vielleicht den Niederschlag chemischer Verbindungen zwischen Kupferchlorid und Eiweiß darstellen. Damit wäre besser erklärt, daß so geringe Mengen eines Zusatzes noch Veränderungen bedingen können.

Eine Entscheidung ist noch nicht möglich und muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Zusammenfassung

Anknüpfend an eine frühere Veröffentlichung in dieser Zeitschrift werden weitere Versuche zum Ausbau der kyprographischen Methode mitgeteilt. Die Fehlerquellen werden systematisch untersucht. Äußere Faktoren, insbesondere Wärme und Luftfeuchtigkeit, können auf die Ergebnisse störend Einfluß nehmen. Die Resultate bei konstanten Bedingungen sind jedoch befriedigend und rechtfertigen eine Anwendung der Methode in der Klinik.

Die differentialdiagnostischen Möglichkeiten hingegen werden als gering erachtet.

Das Eiweiß wird als der ursächliche Faktor der Formveränderungen erkannt. Ob es sich dabei um physikalische Änderungen des Lösungsmittels handelt oder um eine chemische Verbindung zwischen Eiweiß und Kupferchlorid kann nicht entschieden werden.

Literatur

- ¹ FRANK, H., u. P.-H. KOECHER: Der Serum eiweißspiegel beim Menschen nach Untersuchungen mit der Biuretmethode. Dtsch. Arch. klin. Med. **197**, 181 (1950). —
² GRASSMANN, W., K. HANNIG u. M. KNEDEL: Über ein Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung der Serumproteine auf Filtrierpapier. Dtsch. med. Wschr. **1951**, 333. —
³ LASS, A., u. H.-J. TEPE, Beitrag zur Methodik der Papierelektrophorese von Liquor cerebrospinalis. Ärztl. Forsch. **1953**, 74. —
⁴ LEHMANN-GRUBE, F.: Über die Beeinflussung der Kupferchlorid-Kristallisation durch Liquor cerebrospinalis. Dissertation Hamburg 1953. —
⁵ LEHMANN-GRUBE, F.: Über die Beeinflußbarkeit der Kupferchlorid-Kristallisation durch Liquor cerebrospinalis bei Meningitis tuberculosa. Arch. f. Psychiatr. **192**, 207 (1954). —
⁶ v. OLDERSHAUSEN, H. F., F. W. ALY u. G. GRIES: Über die Veränderungen der Liquor- und Serumproteine bei der tuberkulösen Meningitis. Klin. Wschr. **1953**, 649. —
⁷ RIEBELING, C.: Zur Frage der Hirnschwellung. Dtsch. Z. Nervenheilk. **170**, 209 (1953). —
⁸ SCHEID, K. F., u. L. SCHEID: Studien zur pathologischen Physiologie des Liquor cerebrospinalis. Arch. f. Psychiatr. **117**, 219 (1944). —
⁹ WUHRMANN, F., u. CH. WUNDERLY: Die Bluteiweißkörper des Menschen. Basel: Benno Schwabe & Co. 1947.

Dr. F. LEHMANN-GRUBE, Köln-Lindenthal, Univ. Nervenklinik