

Aus dem Psychiatrischen Landeskrankenhaus Weissenau
(Direktor: Prof. Dr. W. EDERLE)

Die spektralphotometrische Analyse des Liquor cerebrospinalis im UV-Licht

II. Mitteilung

Von
W. EDERLE

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Dezember 1959)

I

Die spektrophotometrisch bestimmte Absorptionskurve des nativen Liquors im ultravioletten Bereich gibt, wie in einer früheren Arbeit gezeigt werden konnte, einen charakteristischen Kurvenverlauf. Im äußersten kurzwelligen Teil ist eine fast vollständige Absorption zu beobachten, deren graduelle Schwankungen, Breite und Anstieg des Durchlässigkeitsgrades im Bereich bis etwa $240\text{ m}\mu$ neben anderen Faktoren vom Eiweißgehalt des Liquors abhängt. Im Bereich von $245\text{—}270\text{ m}\mu$ nimmt der Anstieg des Durchlässigkeitsgrades merklich ab oder wird negativ, so daß die kurvenmäßige Darstellung des Durchlässigkeitsgrades ein zweites Minimum ergibt. Kurve I und II Abb. 1 sollen diese Verhältnisse demonstrieren. Der Einfachheit halber soll die erste Absorptionsbande α -Absorption (αA), die zweite β -Absorption (βA) bezeichnet werden. Die βA ist sehr variabel und nicht vom Eiweißgehalt des Liquors abhängig, soweit es sich um normale oder nur um mittel-mäßig erhöhte Eiweißwerte handelt. Bei starker Eiweißvermehrung ist sie dagegen regelmäßig ausgeprägt. Das Maximum der βA liegt normalerweise bei $266\text{ m}\mu$; bei starker Eiweißvermehrung, selten bei nur mittlerer Eiweißvermehrung, kann sich das Maximum der βA in den Wellenbereich von $275\text{—}280\text{ m}\mu$ verschieben. Dies ist in jedem Falle als pathologisch zu beurteilen. Keine Beziehung ließ die Analyse von über 300 Liquores zur Ammonsulfatfraktion und zum Ausfall der Kolloidkurven erkennen.

In der vorausgegangenen Veröffentlichung wurde schon darauf hingewiesen, daß die βA regelmäßig nach Absorption des Liquors an Kohle aufgehoben und mehr oder weniger abgeschwächt oder ebenfalls aufgehoben wird nach Ausschütteln des Liquors mit Chloroform.

In einer neueren Versuchsreihe wurden die Absorptionskurven nativer Liquores mit denen nach Fällung des Liquoreiweißes durch Perchlorsäure (0,8 ml Liquor + 0,2 ml Perchlorsäure 10%) verglichen. Perchlorsäure wurde deshalb als Fällungsmittel verwandt, weil es selbst die Absorption in der ganzen Breite des ultravioletten Bereiches nur in geringem Maße beeinflusst. Bei einem auf diese Weise eiweißfrei gemachten Liquor fällt die βA völlig oder fast völlig weg. Aus den Untersuchungsergebnissen darf gefolgert werden, daß die βA im wesentlichen an das Liquoreiweiß gebunden, aber nicht von den quantitativen Eiweißverhältnissen abhängig ist. Sie ist, wie sich weiterhin leicht zeigen läßt, auch nicht von der Ammonsulfatfraktion des Liquoreiweißes abhängig. Bei allen normalen Liquores mit mehr oder weniger starker βA , auch bei einem Teil der pathologischen Liquores läßt sich die βA durch Chloroformausschüttung des Liquors

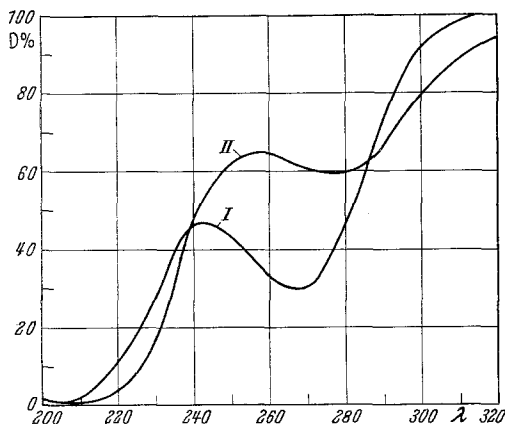


Abb. 1. Kurve I: normaler Liquor mit niedrigem Eiweißgehalt (20 mg-%) aber starker βA . Kurve II: Liquor mit leicht vermehrtem Eiweißgehalt (38 mg-%) mit sehr flacher βA

beseitigen. Dieses Verhalten der βA unter den verschiedenen, geschilderten Versuchsbedingungen legt die Vermutung nahe, daß normalerweise die βA durch Lipideiweißkörper bedingt ist. Diese Lipideiweißkörperfraktion scheint bei einem Teil der pathologischen Liquores absolut oder relativ vermindert zu sein. Auf feinere Einzelheiten der Kurventypen, die nach Enteiweißung und Ausschüttelung mit Chloroform zu beobachten sind, soll hier nicht näher eingegangen werden.

II

Dagegen sollen noch einige Ausführungen zur praktischen Liquordiagnostik angeschlossen werden. In der vorausgegangenen Arbeit wurde als empirische Berechnungsformel an Hand einer Eichkurve für den Eiweißgehalt die Formel $\frac{2 \cdot D_{225} + D_{230}}{3}$ angegeben. Diese Berechnung hat sich auch bei den weiteren Vergleichsbestimmungen an nun insgesamt über 300 normalen und pathologischen Liquors als zuverlässig erwiesen, soweit es sich um normale oder mäßig erhöhte Eiweißwerte bis 75–80 mg-% handelt. Bei starker Eiweißvermehrung ist eine direkte

Eiweißbestimmung (siehe unten) zweckmäßig. In seltenen Fällen kann es auch vorkommen, daß die enteweißte Restfraktion eine überdurchschnittliche Absorption bewirkt. Dabei ist beim Vergleich der verschiedenen colorimetrischen oder anderen gebräuchlichen Eiweißbestimmungsmethoden folgendes zu berücksichtigen: Die Eiweißfraktion des Liquors stellt ein Gemisch verschiedener Eiweißkörper dar. Als Bestimmungskriterium dient immer eine bestimmte Größe, z. B. der Stickstoffgehalt, oder die Intensität einer bestimmten Farbreaktion oder die Sedimentierung nach Fällung. Die der Messung dienende Größe ist aber für die verschiedenen Eiweißkörper des Gemisches verschieden oder fehlt bei einigen völlig. So erhält man die von uns früher angewandte Xanthoproteinreaktion nur von den cyclischen Eiweißverbindungen. Nur wenn diese immer im gleichen prozentualen Verhältnis vertreten wären, würden sich wirklich exakte Eiweißwerte ergeben. Für die klinische Diagnostik sind aber, wie die Erfahrung zeigt, die erreichbaren Annäherungswerte doch ausreichend. Was nun die spektralphotometrische Absorptionsmethode mit UV-Licht anlangt, so ist zu berücksichtigen, daß die einzelnen Eiweißkörper das UV-Licht verschieden stark absorbieren. Dies führt zu einer gewissen Streuung der Werte, namentlich bei höherem Eiweißgehalt im Vergleich zu einer bestimmten Eichmethode. Diese Streuung der Werte liegt aber nach unserer Erfahrung innerhalb von $\pm 6\%$. Von diesen durch die Art des Bestimmungsobjektes bedingten, unvermeidlichen Differenzen sind die der Untersuchungsmethode selbst anhaftenden Fehlermöglichkeiten zu unterscheiden. Unvermeidbar ist in dieser Hinsicht eine gewisse Ungenauigkeit des Spektralphotometers bei extrem hohen und bei extrem niedrigen Absorptionswerten. Sie fällt aber für die praktische Diagnostik nicht ins Gewicht. Im übrigen sind die vermeidbaren Fehlermöglichkeiten sehr gering. Erforderlich ist eigentlich lediglich, was selbstverständlich sein sollte, zuverlässige Reinhaltung der zur Verwendung kommenden Cuvetten, Pipetten und Gläser. Natürlich kann nur klarer Liquor zur Untersuchung verwandt werden.

Die Röhren eingesandter Liquores sind meist nur mit einem Korken verschlossen, der schon zuvor bei anderem Material (z. B. Blut) verwendet worden sein kann. Dadurch kann es zur Beimischung liquorfremder Stoffe kommen, die das Untersuchungsergebnis meist im längerwelligen UV-Spektrum fälschen. Die Korken sollten daher mit einem Mantel von Pergamentpapier geschützt werden. Zu vermeiden sind auch Veränderungen in der Zusammensetzung der Vergleichslösung. Bei längerem Gebrauch können diese namentlich durch Pilzwachstum entstehen. Man läßt die Vergleichslösung daher zweckmäßig steril, jeweils nicht in zu großer Menge herstellen und bewahrt sie im Kühlschrank auf.

Bei Ausschaltung dieser leicht vermeidbaren Fehler ergibt die Bestimmungsmethode außerordentlich exakt reproduzierbare Werte. Dies ist sehr wertvoll bei Verlaufskontrollen des Liquorbefundes. In dieser Beziehung dürfte die spektralphotometrische Untersuchung an Genauigkeit

von keiner der gebräuchlichen Untersuchungsmethoden erreicht oder gar übertroffen werden.

Unter dem untersuchten Liquormaterial sind 81 Liquores, die nach dem Ausfall der αA und βA als normal bewertet wurden, d. h. die nach der angegebenen Formel berechnete Eiweißmenge betrug weniger/ bis höchstens 30 mg-% und die βA ergab bei 266 $m\mu$ keinen Wert unter 30% für den Durchlaßgrad oder eine Verschiebung in der βA nach der langwelligen Seite. Keiner dieser Liquoren ergab nach den Vergleichsbestimmungen pathologische Eiweißwerte oder eine abnorme Eiweißrelation; in sämtlichen Fällen waren auch die SCR und die Mastixreaktion normal. In einem Fall fand sich jedoch als einzige abnorme Größe des Liquorstatus eine Zellvermehrung auf 21/3 Zellen (bei einer Epileptikerin mit frühkindlicher

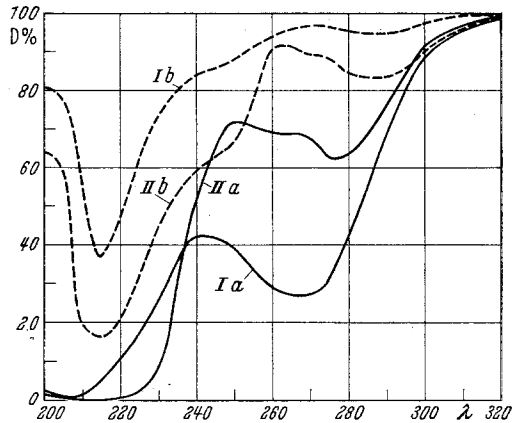


Abb. 2. Kurve Ia Absorptionskurve eines nativen Liquors mit normaler αA und abnorm starker βA ; Kurve Ib zugehörige Eiweißabsorptionskurve. Kurve IIa nativer Liquor mit pathologischer αA (Eiweißgehalt 65 mg-%) und flacher aber nach 275 $m\mu$ verschobener βA (Glioblastom); Kurve IIb zugehörige Eiweißabsorptionskurve

Hirnschädigung). Nach den vorliegenden Erfahrungen könnte man sich also bei normaler Absorptionskurve im UV-Licht außer der Zellzählung weitere Untersuchungen sparen.

Es erhebt sich nun die Frage, ob stärkeren Abweichungen der βA von der Norm eine diagnostische Bedeutung zukommt. Dies gilt vor allem für die Liquores mit normalen Eiweißwerten aber einer βA bei 266 $m\mu$ mit einem Durchlaßgrad von weniger als 30%. Dies ist in unserem Material bei etwa 10% der Fall, unter den pathologischen Liquores bei etwa 25%. Die normalen Liquores mit abnorm starker βA stammen mit einer Ausnahme durchweg von Patienten mit nachgewiesenen cerebralen Störungen. Es ist daher wahrscheinlich, daß einer abnormen starken βA bei im übrigen normalen Liquorwerten eine pathologische Bedeutung zukommt. In allen diesen Fällen war in der mit Chloroform ausgeschüttelten Liquorfraktion die βA auf- oder nahezu aufgehoben. Es handelt sich also um Liquores mit einem, unverbindlich ausgedrückt, hohen Chloroformwert bei 266 $m\mu$. Bei der eben erwähnten Ausnahme bestand eine typische progressive Muskeldystrophie ohne Anhaltspunkt für zentralnervöse Veränderungen.

Es wurde schon erwähnt, daß sich Perchlorsäure wegen seiner geringen und über die ganze Breite des UV-Bandes ziemlich gleichbleibenden Eigenabsorption besonders für die Eiweißfällung bei Absorptionsstudien eignet. Das Eiweißzentrifugat kann in der alkalisch gemachten Vergleichslösung (0,5% NaOH) gelöst werden. Die Absorptionskurve (gegen die entsprechende Vergleichslösung) ergibt ein scharf begrenztes Absorptionsmaximum bei 215 $m\mu$. Abb. 2 zeigt 2 Absorptionskurven verschiedenen Eiweißgehaltes. Abgesehen von dem Absorptionsmaximum bei 215 $m\mu$ findet sich konstant eine flache Absorptionsbande von 275 $m\mu$ bis 285 $m\mu$, also mit einer Verschiebung nach der langwelligen Seite gegenüber dem natürlichen Liquor. Bei höherem Eiweißgehalt verwenden wir den Grad der Absorption bei 215 $m\mu$ mittels einer Eichkurve zur quantitativen Eiweißbestimmung.

Besteht Veranlassung die Ammonsulfatfraktion quantitativ zu bestimmen, so muß das Zentrifugat zunächst nochmals in der Vergleichslösung zur Lösung gebracht und mit Perchlorsäure das Eiweiß erneut gefällt werden, ehe in der alkalischen Lösung die Absorptionswerte bestimmt werden.

Zusammenfassung

Die spektralphotometrische Bestimmung der Absorptionskurve des natürlichen Liquors im UV-Licht gestattet in exakt reproduzierbarer Weise normale und pathologische Liquores zu unterscheiden. Dies ist namentlich bei Verlaufskontrollen von Bedeutung. Ein konstantes Absorptionsmaximum (αA) findet sich im kurzwelligen Bereich bis 240 $m\mu$ und ist zur quantitativen Eiweißbestimmung mit einer für die klinischen Bedürfnisse hinreichenden Genauigkeit geeignet. Eine von den quantitativen Eiweißwerten unabhängige Absorptionsbande (βA) hat ihr Maximum bei allen normalen und den meisten pathologischen Liquors bei 266 $m\mu$. Eine Verschiebung nach 275 $m\mu$ kommt vereinzelt bei pathologischen Liquores vor.

Eine starke βA mit einem Durchlaßgrad von weniger als 30% spricht auch bei im übrigen normalen Liquorwerten für pathologische Veränderungen.

Das mittels Perchlorsäure gefällte Liquoreiweiß zeigt in alkalischer Lösung ein dem Grade nach von dem Eiweißgehalt abhängiges Absorptionsmaximum bei 215 $m\mu$ und eine flache Absorptionsbande zwischen 275—285 $m\mu$.

Literatur

EDERLE, W.: Die spektralphotometrische Analyse des Liquor cerebrospinalis im UV-Licht. Arch. Psychiat. Nervenkr. 199, 391 (1959).

Prof. Dr. W. EDERLE, Landeskrankenhaus, Weissenau, Württ.