

(Aus der Nervenklinik [Prof. Dr. *de Crinis*] und der Chemischen Abteilung (Prof. Dr. *Hinsberg*) des Pathologischen Institutes [Prof. Dr. *Rössle*] der Universität Berlin [Charité].)

Über die Anwendung einer neuen und einfachen Methode zur getrennten Bestimmung kleinster Mengen von freiem und verestertem Cholesterin im Liquor cerebrospinalis bei verschiedenen Nerven- und Geisteskrankheiten.

Von

Helmut Selbach¹ und Wolfgang Trappe.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 25. März 1944.)

Das von *Trappe* ausgearbeitete einfache Verfahren zur getrennten Bestimmung von freiem und verestertem Cholesterin eignet sich ausgezeichnet zur exakten quantitativen Analyse der genannten Cholesterinfraktionen in Blut, bzw. im *Blutserum* (Tr.) und der minimalen Cholesterinmengen im *Harn* (Tr.). Es war naheliegend, dies Verfahren auch zur Bestimmung des sehr geringen Cholesteringehaltes im *Liquor cerebrospinalis* heranzuziehen. Hinsichtlich der Gewinnung des Cholesterins aus biologischen Flüssigkeiten sowie im Hinblick auf die Trennung von freiem und verestertem Cholesterin weicht die Methode von den bisher bekannten grundsätzlich ab. Das *Prinzip* des angewandten Analysenganges ist folgendes: Zu der — je nach dem zu erwartenden Cholesteringehalt — verdünnten oder unverdünnten biologischen Flüssigkeit wird ein geeignetes Adsorbens (Kiesel säure), welches das gesamte Cholesterin quantitativ adsorbiert, hinzugegeben. Nach dem Abzentrifugieren des Adsorbates und nach dem Abgießen der überstehenden Flüssigkeit wird Erstes im Vakuumexsiccatore getrocknet und in ein Adsorptionsrohr, nach der Art, wie diese zu der chromatographischen Adsorptionsanalyse Verwendung finden, über etwas Al_2O_3 gefüllt. Die fraktionierte Elution der Cholesterinfraktionen geschieht nach dem Prinzip der „flüssigen Chromatographie“. Das veresterte Cholesterin lässt sich elektiv und quantitativ mit Benzol, das freie Cholesterin danach quantitativ mit Äthyläther-Chloroform (Methylenchlorid) im Verhältnis 2:1 eluieren. Die Bestimmung der getrennt aufgefangenen Fraktionen kann dann auf colorimetrischem Wege mit Hilfe eines Absolut-Colorimeters leicht durchgeführt werden.

¹ Chemische Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für Hirnforschung, Berlin-Buch (Direktor: Prof. Dr. *Spatz*), mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Die bisher bekannten Verfahren zur Bestimmung des Cholesterin gehaltes in biologischen Flüssigkeiten erfordern alle eine umständliche und nur sehr schwer quantitativ zu gestaltende Extraktion desselben mit organischen Lösungsmitteln. Eine Trennung von freiem und verestertem Cholesterin war bisher nur durch Fällung des Ersteren mit Digitonin möglich. Auch die Digitoninfällung ist nur bei Beachtung besonderer Kautelen quantitativ und läßt sich bei den geringen Cholesterinmengen im Liquor cerebrospinalis, der naturgemäß nur in beschränktem Umfange zur Analyse zur Verfügung steht, nicht durchführen. Aus diesem Umstande erklärt sich die Tatsache, daß wir trotz zahlreicher, bereits von anderer Seite durchgeführter Cholesterinanalysen in der Rückenmarksflüssigkeit bisher keinerlei Kenntnis davon hatten, ob es sich dabei um freies Cholesterin oder um Cholesterinester handelt, bzw. in welchem Mengenverhältnis sich diese zueinander finden. Davon abgesehen ist es klar, daß eine fraktionierte Analyse des Liquorcholesterins gegenüber einer summarischen Erfassung des gesamten Cholesterins mehr Aussicht hat, unter Umständen *klinisch-diagnostische Bedeutung* zu erlangen. Das hier angegebene Verfahren bietet also gegenüber den bisher bekannten Methoden neben seiner größten *Einfachheit* in der Durchführung und der größeren *Genauigkeit* vor allem erstmalig die Möglichkeit zur *fraktionsierten Analyse des Cholesterins* im Liquor.

Die zur Untersuchung erforderliche Liquormenge ist in erster Linie abhängig von der Empfindlichkeit des der Fraktionierung nachfolgenden colorimetrischen Verfahrens. Gegenüber Methoden, welche nur das Gesamtcholesterin erfassen, muß man bei der getrennten Bestimmung von etwa der doppelten Liquormenge ausgehen. Da uns zu den durchgeführten Untersuchungen genügend Liquor nach Vornahme von Encephalographien zur Verfügung stand, haben wir auf eine allzu große Empfindlichkeit der colorimetrischen Bestimmung zunächst verzichtet und sind bei der Analyse von einer Menge von 15—30 ccm Liquor ausgegangen. Trotz dieser verhältnismäßig sehr großen Liquormenge kommen bei ihrem geringen durchschnittlichen Cholesteringehalt von etwa 200—250 γ %¹ doch schließlich in jeder Fraktion nur etwa 30—60 γ freies, bzw. verestertes Cholesterin zur colorimetrischen Analyse. Sicher wird eine Untersuchungsmethode, die eine relativ so große Liquormenge benötigt, für laufende klinische Untersuchungen nicht geeignet sein. Unsere Absicht, durch eine Abänderung der colorimetrischen Cholesterin-Bestimmungsmethode diese wesentlich empfindlicher zu gestalten, ohne dabei ihre Genauigkeit zu beeinträchtigen, kann durch kriegsbedingte Umstände zur Zeit nicht durchgeführt werden. Möglich wäre diese Verbesserung durch *Verringerung der Volumina* beim Ansatz der Farbreaktion und durch *Anwendung von Mikrocuvetten*, welche bei relativ großer

¹ Die Genauigkeit unserer Methode erlaubt eine Angabe in γ -% im Gegensatz zu den älteren Methoden.

Schichtdicke nur sehr kleine Flüssigkeitsmengen benötigten. Noch aussichtsreicher erscheint uns jedoch, die bei der von uns angewendeten roten Farbreaktion mit Essigsäure $ZnCl_2$ und Acetylchlorid nach *Tschugaeff* auftretende, intensiv gelbgrüne Fluoreszenz und ihre Messung mit einem empfindlichen lichtelektrischen Fluoreszenzmeter zur quantitativen Bestimmung allerkleinster Cholesterinmengen heranzuziehen. Es ist sicher, daß hierdurch die zu einer exakten Cholesterinbestimmung notwendigen Mengen gegenüber den üblichen colorimetrischen Verfahren stark herabgesetzt würden. Untersuchungen in dieser Richtung sind für später vorgesehen.

Die von uns hier mitgeteilten Cholesterinwerte sind ausnahmslos durch *Doppelanalysen* gefunden worden. Die erhaltenen Vergleichswerte zeigen die Genauigkeit, mit welcher das Verfahren arbeitet. Abweichungen über $\pm 1\%$ kommen bei exaktem Arbeiten kaum vor.

Besonderes Augenmerk wurde natürlich auch darauf gerichtet, daß der Liquor bei der Gewinnung *nicht durch Blut verunreinigt* wurde. Eine solche Verunreinigung würde natürlich bei dem 500—1000mal höheren Cholesteringehalt des Blutes gegenüber dem des Liquors zu starker Erhöhung der gefundenen Werte führen. Auch das vollständige Abzentrifugieren der Erythrocyten würde den Liquor zur Analyse nicht verwertbar machen, da ja mit den Blutkörperchen auch Blutplasma in ihn gelangt ist. Außerdem haben wir den Liquor vor der Untersuchung stets zur Entfernung der *weißen Blutzellen* in spitzen Zentrifugengläsern bei 3000 bis 4000 Umdrehungen der Zentrifugalkraft unterworfen. Damit wollten wir der Gefahr entgehen, daß eine Cholesterinvermehrung durch Vermehrung des *Zellgehaltes* vorgetäuscht würde, was bei dem geringen Cholesteringehalt des Liquors unter stärkerer Zellvermehrung sehr wohl durch dieses Zellcholesterin der Fall sein könnte. Diese Zusammenhänge sind unseres Erachtens von anderen Untersuchern nicht genügend berücksichtigt worden. Die übrigen Einzelheiten des Analysenganges finden sich ausführlich am Schlusse dieser Arbeit. Die Beweise für die Zuverlässigkeit des hier angegebenen Verfahrens zur fraktionierten Cholesterinbestimmung in biologischen Flüssigkeiten findet sich in anderen Veröffentlichungen von *Trappe*, auf die hier verwiesen werden muß.

Bevor wir auf die Ergebnisse unserer Untersuchungen eingehen, soll zunächst noch kurz zu dem zur Zeit als *Standardmethode* geltenden Verfahren der Gesamtcholesterinbestimmung im Liquor von *Plaut* und *Rudy* Stellung genommen werden. Da diese Autoren im allgemeinen die gleichen Werte für das Gesamtcholesterin wie wir gefunden haben, darf ihre Methode als prinzipiell richtig angesehen werden. Die Durchführung des Verfahrens ist jedoch ungleich umständlicher und eignet sich unseres Erachtens — womit wir uns im Gegensatz auch zu *Roeder* und *Rehm* befinden — keineswegs für die klinische Anwendung. Wer hinreichende Erfahrungen mit Lipoïdbestimmungsmethoden hat, wird außerdem aus dem Analysengang des Verfahrens erkennen müssen, daß seine Genauigkeit keineswegs sehr groß sein kann. Insbesondere verbürgt das Extraktionsverfahren bei der Anwendung so geringer Lösungsmittelmengen, wie sie die Autoren angeben, nicht eine gleichmäßige

quantitative Extraktion, abgesehen von der Tatsache, daß die Verwendung der nicht farbkonstanten *Liebermann-Burchardtschen* Reaktion ebenfalls Ungenauigkeitsquellen enthält. Diese Methode beruht auf einer objektiven Messung der Farbtiefe, welche bei der grünen Farbreaktion des Cholesterins mit Essigsäureanhydrid H_2SO_4 mit Hilfe eines Colorimeters bestimmt werden kann. *Plaut* und *Rudy* beschränken sich jedoch lediglich auf einen subjektiven Vergleich der entstandenen Farbe mit der Färbung einer künstlich hergestellten Cholesterin-Konzentrationsreihe, was verständlicherweise erheblich auf Kosten der Genauigkeit der Methode geht, obgleich dadurch der Vorteil gewonnen wird, daß die Methode mit 1 cm³ Liquor durchgeführt werden kann. Bei gleichem Verfahren würde man bei der von uns angegebenen Methode verständlicherweise auch mit entsprechend geringen Liquormengen (mit etwa 2 ccm) auskommen. Die von uns angewendete, etwas modifizierte rote Farbreaktion mit Essigsäure-ZnCl₂ und Acetylchlorid nach *Tschugaeff* hat gegenüber der alten *Liebermann-Burchardtschen* Reaktion verschiedene Vorteile. Diese beruhen in größerer *Stabilität* und *Spezifität* der gebildeten Farbe und vor allem auf der Tatsache, daß mit diesem Verfahren — wie der Eine von uns an anderer Stelle zeigen konnte (*Trappe 1940/41*) — für das veresterte Cholesterin ohne Verseifung richtige Werte gefunden werden, was nach *Noyous* für die Reaktion mit Essigsäureanhydrid- H_2SO_4 nicht gilt. Auch die von anderen Autoren bisher benutzten Verfahren entsprechen im Prinzip mehr oder weniger dem Verfahren von *Plaut* und *Rudy*. Fast ausnahmslos wird zur quantitativen Bestimmung die *Liebermann-Burchardtsche* Farbreaktion benutzt. Die Messung der Farbtiefe geschieht teilweise mit *objektiven* Methoden (*Roeder*), wodurch die oben genannten Einwände jedoch nicht behoben sind. Die Behauptung einzelner Autoren, der normale Liquor sei cholesterinfrei, beruht auf einer zu geringen methodischen Empfindlichkeit, bzw. auf der Anwendung einer zu geringen Liquormenge. Ein weiteres Eingehen auf die bisher benutzten Verfahren liegt nicht in der Absicht dieser Arbeit.

Die *Prüfung der Anwendbarkeit* unserer Methode wurde an 54 Liquores von 53 Kranken vorgenommen, wovon 48 Werte zur Verwendung kamen und 44 Fälle zur graphischen Darstellung herangezogen wurden. Es soll gleich vorweggenommen werden, daß wir bei der Auswahl der Kranken vorwiegend auf solche angewiesen waren, die zum Zwecke der Begutachtung in der Klinik encephalographiert werden mußten, ein Eingriff, der, abgesehen von Fall 14 (Ventralkpunktion) und Fall 1, bzw. 15 (Suboccipitalpunktionen), stets lumbal vorgenommen wurde. Auf diese Art wurden untersucht: 9 Kranke mit symptomatischer Epilepsie, 5 Kranke mit genuiner Epilepsie, 7 Kranke mit endogenem Schwachsinn und 8 Kranke mit Schizophrenie. Aus diagnostischen Gründen wurde weiterhin die Encephalographie an 2 Kranken mit Paralyse, 3 Kranken mit depressivem Symptomenkomplex, 5 Kranken mit dem Verdacht auf hirnatriphischen Prozeß, 6 Kranken mit Hydrocephalus, bzw. Hirntumor und 3 Kranken mit verschiedenartigen organischen Störungen des Zentralnervensystems, vorgenommen. Aus dieser Zusammensetzung ergibt sich, daß wir, abgesehen von den Kranken mit Hirntumoren, keine akuten organischen Erkrankungen des Zentralnervensystems auf ihren Liquor-Cholesteringehalt prüfen konnten, sondern uns vorwiegend auf Kranke mit chronischen Prozessen oder stationären Ausfällen beschränken mußten. Vor der Auswertung und Zusammenstellung der Analysen-

ergebnisse soll kurz vermerkt werden, daß sich eine Abhängigkeit des Cholesteringehaltes im Liquor von Geschlecht und Alter der Kranken im allgemeinen nicht feststellen ließ; auch zum Blutdruck, der im übrigen bei allen Untersuchten als normal anzusehen war, fand sich keine Beziehung. Die *Blutsenkungsgeschwindigkeit*, die nach *Westergren* jedesmal vorgenommen wurde, war in 14 der dargestellten Fälle erhöht, und zwar im Bereich von 10/27 mm bis zu 78/120 mm. Dabei zeigt sich, daß in 11 Fällen gleichzeitig die Liquor-Cholesterinwerte ebenfalls an der oberen Grenze der Norm, bzw. stark erhöht waren, während sie sich in den 3 restlichen Fällen im Bereich der Norm oder unter ihr befanden. Wie weit eine Abhängigkeit zwischen den geprüften Größen besteht, läßt sich an Hand des nur kleinen Krankengutes jedoch nicht endgültig sagen. Der *Gesamteiweißgehalt* des Liquors lag, abgesehen von 2 Fällen, stets im normalen Bereich zwischen $1\frac{1}{6}$ und $1\frac{1}{4}\text{ \%}$. Lediglich im Falle 39 war der Gesamteiweißgehalt auf $1\frac{1}{3}\text{ \%}$ angestiegen (progressive Paralyse) und im Falle 45 auf 1 \% erhöht (Hirnstammgliom). Eine Nachprüfung der Ansicht von *Knauer* und *Heidrich*, daß zwischen dem Eiweiß- und Cholesteringehalt ein gewisser Parallelismus bestehe, ist ebenfalls auf Grund des geringen Untersuchungsgutes nicht möglich. In beiden genannten Fällen lagen jedoch auch die Cholesterinwerte über der Norm, deren Höhe noch zu besprechen ist. Nach den Erfahrungen von *Plaut* und *Rudy* sowie von *Knauer* und *Heidrich* ist der Cholesteringehalt des Liquors auf den Ausfall der Colloidkurven (Goldsol- und Normomastixreaktion) ohne Einfluß. Abgesehen von Fall 39, bei dem eine typische Paralysekurve vorlag, haben wir nur Liquores mit normalen Colloidkurvenverläufen zugezogen mit Ausnahme der Kurve von Fall 45, bei dem eine Goldsolzacke bis zur Violettfärbung im mittleren Kurvenabschnitt auftrat. Auch auf die *Zellzahl* wurde Rücksicht genommen, zumal nach der Ansicht von *Roeder* gelegentlich bei Paralyse ein Parallelgehen von Cholesterinwerten und Liquorzellgehalt festzustellen sei, entgegen der Ansicht der oben genannten Autoren, die einen solchen Einfluß nicht gelten lassen wollen. Bei einer obersten Normalgrenze von 8/3 Zellen fanden sich unter unseren Fällen nur 4 mit erhöhter Zellzahl: Fall 13 mit 49/3, Fall 24 mit 12/3, Fall 39 mit 292/3 und Fall 9 mit 10/3. In den letztgenannten Fällen zeigten sich auch erhöhte, bzw. stark erhöhte (Fall 9) Cholesterinwerte. Die Möglichkeit einer Beeinflussung des Cholesteringehaltes durch Blutzutritt war bereits *Levinson*, *Landenberger* und *Howell* bekannt, die bei cerebralen Hämorrhagien sehr große Cholesterinmengen fanden. Auch *Betchoff* stellte bei Bluteinbruch in das Liquorsystem hohen Cholesteringehalt fest, eine Erfahrung, die auch von *Plaut* und *Rudy* wiederholt als wesentlich zur Beurteilung des Liquor-Cholesterins erwähnt wird. Wir haben, wie bereits mitgeteilt, stets unblutige Liquores verwandt und trotzdem in jedem Falle noch scharf zentrifugiert, so daß wir eine beachtbare Beimengung von Erythrocyten im Sediment

nur im Falle 26, 47 und 50 feststellten, wobei jedoch jedesmal die Cholesterinwerte sich innerhalb der Norm bewegen. Ähnlich dem von *Seubering* beschriebenen Verhalten der Phospholipoide, die innerhalb der Liquorsäule einen „Sedimentierungseffekt“, d. h. eine Anreicherung von ventrikulär nach lumbar aufweisen, war daran zu denken, ob auch der Cholesteringehalt von der Höhe der Punktionsstelle bestimmt werden könnte. Hatten schon *Holthaus* und *Wichmann* keine Unterschiede zwischen Lumbal- und Ventrikelliiquor feststellen können, so zeigen auch

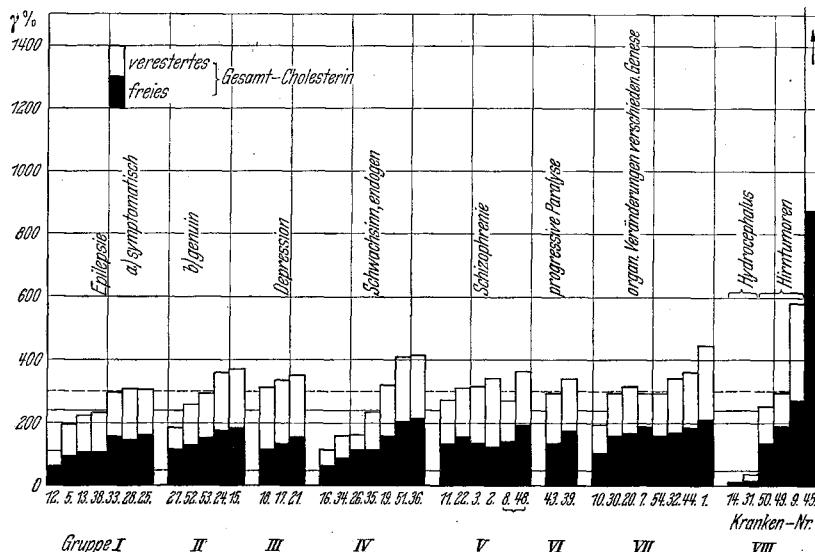


Abb. 1.

unsere Erfahrungen, daß eine Abhängigkeit der beiden Größen nicht besteht, zumal gerade die Suboccipitalpunktion (Fall 1 und 15) sehr hohe Gesamtcholesterinwerte ergaben, die weit über der angenommenen Norm der Lumbal-Liquoren liegen.

Entgegen der Ansicht älterer Autoren, daß im normalen Liquor überhaupt kein Cholesterin enthalten sei, hatte schon *Roffo* die spurweise Gegenwart dieses Stoffes im Liquor festgestellt, eine Tatsache, die dann von *Knauer* und *Heidrich* endgültig gesichert wurde und von *Holthaus* und *Wichmann* grundsätzlich bestätigt werden konnte. Lediglich über die normale Schwankungsbreite ist bisher eine Einigung nicht in vollem Umfange erzielt worden. Ganz abgesehen von unserer Kritik an den bisher verwendeten, vorwiegend colorimetrischen Methoden ist diese Unstimmigkeit sicherlich eine Folge des unterschiedlichen methodischen Vorgehens der älteren Autoren. *Kulkow* und *Šamburov* gaben als normale Schwankungsbreite einen Gesamtcholesteringehalt im Liquor von 0,2—0,3 mg-% an, *Knauer* eine obere Grenze von 0,12 mg-%. Nach

Gruppe	Kranken-Nr.	Ge- schlecht	Alter	freies Chol. γ %	% vom Ges.- Chol.	verest. Chol. γ %	% vom Ges.- Chol.	Ge- samt- Chol. γ %	Diagnose
I	12	♀	6	62,4	57,7	45,7	42,3	108,1	Epilepsie: postencephal.
	5	♂	32	93,3	48,0	101,1	52,0	194,4	postmeningit.
	13	♂	28	101,2	43,4	121,7	54,6	222,9	posttraumat.
	38	♂	37	104,0	44,8	128,0	55,2	232,0	"
	33	♂	20	156,0	52,7	139,8	47,3	295,8	postencephal.
	28	♂	22	143,2	47,1	160,6	52,9	303,8	subcorticale A.
	25	♂	29	159,4	52,1	146,4	47,9	305,8	M. S. incip.
	23	♂	35	133,8	—	—	—	—	posttraumat.
	29	♂	43	195,5	—	—	—	—	Alkoholepilepsie genuin
II	27	♂	30	112,2	61,1	71,4	38,9	183,6	
	52	♂	15	131,8	50,2	127,8	49,8	259,6	"
	53	♂	31	151,2	51,1	144,6	48,6	295,8	"
	24	♂	19	172,8	47,8	188,0	52,2	360,8	"
III	15	♂	32	185,3	50,0	185,3	50,0	370,6	"
	18	♂	46	116,2	37,0	197,3	63,0	313,5	Depression (Klimax) desgl.
IV	17	♂	53	132,7	39,2	204,0	60,8	336,7	
	21	♂	45	152,3	43,4	198,2	56,6	350,5	"
	16	♂	17	65,8	56,6	50,4	43,4	116,2	Debilität
	34	♂	17	91,0	57,4	67,5	42,6	158,5	"
	26	♂	14	119,3	74,4	41,0	25,6	160,3	Idiotie
	35	♂	28	113,5	48,4	120,5	51,6	234,0	Debilität
V	19	♂	22	157,0	49,3	161,0	50,7	318,0	"
	51	♂	18	200,7	48,8	211,0	51,2	411,7	"
	36	♂	18	213,5	51,5	200,0	48,5	413,5	"
	40	♂	31	104,8	41,1	150,0	58,9	254,8	Hebephrenie
	6	♂	27	159,7	53,5	138,9	46,5	298,6	Dem. simpl.
	11	♂	36	131,0	48,3	140,3	51,7	271,3	Hebephrenie
VI	22	♂	49	155,5	51,1	154,5	49,9	310,0	Paranoid z.-B.
	3	♂	34	132,5	42,3	180,5	57,7	313,8	Katatonie
	2	♂	26	125,0	36,4	216,5	63,6	341,5	Hebephrenie
	8	♂	32	139,7	51,7	129,8	48,3	269,0	"
	48	♂	32	193,0	52,7	173,0	47,3	366,0	"
	43	♂	44	134,0	45,4	161,2	54,6	295,2	progr. Paralyse
VII	39	♂	53	171,3	50,7	166,3	49,3	337,6	"
	10	♂	16	101,6	51,5	95,7	48,5	197,3	postenceph.Z.-B.
	30	♂	42	158,5	53,2	139,7	46,8	298,2	posttraum. Z.-B.
	20	♂	62	166,0	52,8	147,8	47,2	313,0	Neuritis retrobulbaris
	7	♂	42	187,3	63,5	107,9	36,5	295,2	Präsklerose
VIII	54	♂	53	161,3	54,5	134,4	45,5	295,7	Encephalomal.
	32	♂	61	168,3	50,0	168,7	50,0	337,0	Arteriosklerose
	44	♂	52	184,5	51,6	172,5	48,4	357,0	"
	1	♂	63	208,5	47,0	234,9	53,0	443,4	(Korsakow)
	14	♂	17	10,7	100,0	00,0	00,0	10,7	Hydrocephalus
	31	♀	14	16,2	47,9	17,6	52,1	33,8	"
	50	♂	28	133,3	52,9	118,5	47,1	251,8	Acusticus- neurinom
	49	♀	54	190,5	64,3	105,6	35,7	296,1	Ca-Metastasen
	9	♂	41	270,9	46,8	308,0	53,2	578,9	Gliom
	45	♀	63	876,0	36,2	1540,0	63,8	2416,0	(Diabetes) Gliom.

Plaut und *Rudy* liegt die obere Grenze bei 0,2 mg-%, und sie lassen eine Menge von 0,3 mg-% bereits als leichte Erhöhung gelten. *Holthaus* und *Wichmann* haben als Einzige diese Grenze weit überschritten und nehmen als Normalschwankungsbreite einen Gehalt zwischen 0,3 und 0,6 mg-% an. *Ederle* gibt als Durchschnittszahl 0,18 mg-% an und befindet sich damit in Übereinstimmung mit neueren Untersuchern, wie *Brown*, *Gildea* und *Man*, die eine Normalschwankungsbreite von 0,05—0,24 mg-% feststellten. Da unsere Methode vorerst eine große Liquormenge zur Verarbeitung beansprucht, konnten wir Untersuchungszahlen an psychisch und organisch Gesunden nicht gewinnen und sind daher nicht in der Lage, die Normalwerte endgültig anzugeben, die sich mit unserer Methode finden lassen werden. Zur Beurteilung der vorliegenden Analysenergebnisse wurden daher die bisher gebräuchlichen Höchstgrenzen beibehalten und sowohl der Grenzwert von *Plaut* und *Rudy* mit 300 γ-% als auch die Streuungsbreite nach *Brown*, *Gildea* und *Man* mit 50 und 240 γ-%, als Beurteilungsbasis genommen und in der graphischen Darstellung angedeutet. Über die normale Streuungsbreite des Gesamtcholesteringehaltes kann von uns allerdings nur in einem Falle in wiederholter Funktion nach $2\frac{1}{2}$ Monaten ein Unterschied von fast 100 γ-% am gleichen Kranken festgestellt werden (Fall 8 bzw. 48), und es fragt sich, ob nicht auch in jedem Falle der Liquor-Cholesteringehalt, selbst wenn er sich innerhalb der normalen Grenzen bewegt, wesentlichen individuellen Schwankungen unterworfen ist. Hierbei wäre auch darauf zu achten, ob das Verhältnis von freiem zu verestertem Cholesterin eine Änderung erfährt, was in unserem Falle jedoch nicht eingetreten war.

Von den Kranken mit *symptomatischer Epilepsie* zeigen 3 einen Gesamtcholesterinwert an der oberen Grenze der Norm, bzw. eine leichte Erhöhung. Das Verhältnis von freiem zu verestertem Cholesterin steht dabei durchweg im Zahlenwerte von 50:50%. Bei Fall 33 handelt es sich um ein postencephalitisches Zustandsbild und bei Fall 28 bestanden subcorticale Anfälle (*Zingerle*), die auf die gleiche Ätiologie zurückgeführt werden konnten. Bei Fall 25 bestand Verdacht auf eine beginnende multiple Sklerose, die sich durch leichten Nystagmus und anamnestische flüchtige Paresen bemerkbar gemacht hatte. Die Erhöhung des Gesamtcholesterins im letzteren Falle steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von *Goebel*, *Kulkow* und *Samburov* sowie *Plaut* und *Rudy* und auch zur Ansicht von *Holthaus* und *Wichmann*, die bei multipler Sklerose uncharakteristische Werte fanden. Im Gegensatze zu den Autoren, die bei posttraumatischen Störungen mit epileptiformen Anfällen eine Steigerung des Cholesterins im Liquor feststellen konnten (*Holthaus* und *Wichmann*, sowie *Barth*), ließ sich eine solche in unserem Falle 13 sowie 38 nicht nachweisen.

Aus der Gruppe der *genuine Epileptiker* zeigen 4 (von im ganzen 5) Fälle eine nicht unbedeutliche Erhöhung des Gesamtcholesterins, eben-

falls bei annähernd gleichen Prozentsätzen von freiem zu verestertem Cholesterin. Schon *Pighini* hatte Cholesterin im Liquor bei Epilepsie festgestellt. *Goebel* fand im freien Intervall keine Werte außerhalb der Norm, jedoch einen nicht zu übersehenden Anstieg unmittelbar vor den Anfällen, was *Knauer* und *Heidrich* bestätigten und auch *Holthaus* und *Wichmann* feststellten, während *Plaut* und *Rudy* eine Erhöhung der Werte weder im Intervall noch im Verlaufe der Krampfanfälle und in Dämmerzuständen finden konnten. Das vorliegende Untersuchungsgut reicht zur endgültigen Klärung nicht aus, und es wäre eine wesentliche Fragestellung, wieweit sich im Cholesteringehalt des Liquors die Vorgänge im Blut-Cholesterinbefunde bemerkbar machen, die bereits *de Crinis* ausführlich darstellte. Er fand bei Epileptikern einen im allgemeinen stark schwankenden Blutcholesteringehalt, der in der Zeit vor Eintritt der Anfälle allmählich konstant anstieg, im Anfalle ein Maximum zeigte und postparoxysmal auf subnormale Werte abfiel; traten mehrere Anfälle hintereinander ein, so machte sich die Cholesterinsenkung erst nach dem letzten Anfall bemerkbar. Ob bei der nach derzeitiger Meinung bestehenden Unabhängigkeit des Liquorcholesterins vom Blutcholesterin sich in beiden Substraten ähnliche oder gleiche Verhältnisse nachweisen lassen, wäre einer besonderen Bearbeitung wert, besonders dann, wenn auch auf Verschiebungen innerhalb des Verhältnisses von freiem zu verestertem Cholesterin gefahndet wird.

Die Cholesterinwerte der 3 Kranken, die ein *hypochondrisch-depressives Zustandsbild* boten, zeigen sämtlich eine Steigerung des Gesamtcholesteringehaltes, wobei auffallenderweise der veresterte Anteil im Mittel mit 60% eine Steigerung gegenüber dem freien Cholesterinanteil um 10% aufweist. Wie weit sich eine solche Verschiebung als charakteristisch bewerten läßt, müssen spätere Versuche erweisen, um so mehr, als es bei den vorliegenden Fällen nicht zu entscheiden ist, ob die Erhöhung des Gesamtcholesterins bei den 3 Kranken zwischen 45 und 53 Jahren auf zusätzliche sklerotische Veränderungen der Gefäße des Zentralnervensystems zu beziehen sind.

In der Gruppe des *endogenen Schwachsinn*s zeigen 3 von im ganzen 8 Fällen eine eindeutige Steigerung des Gesamtcholesteringehaltes, wobei ebenfalls jedoch das Verhältnis der veresterten und freien Cholesterinanteile mit jeweils 50% gewahrt bleibt. Lediglich im Falle 26, einer hochgradigen und, wie aus dem äußeren Zustandsbilde zu entnehmen, endokrin gestörten *Idiotie*, deren Gesamtcholesterinwert jedoch innerhalb der Norm liegt, zeigt der Anteil des freien Cholesterins eine Höhe von 74,4%, so daß das Verhältnis der Cholesterinanteile erheblich gestört erscheint.

Der Liquor-Cholesteringehalt in der Gruppe der *Schizophrenie* übersteigt in 4 von insgesamt 7 Fällen die obere Grenze der Norm und liegt in den 3 restlichen Fällen in ihrer unmittelbaren Nähe. *Plaut* und *Rudy*

hatten unter 34 Fällen von Schizophrenie zwar keine Erhöhung, jedoch eine Lage der Werte an der oberen Grenze der Norm gefunden. *Holthaus* und *Wichmann* fanden eine Steigerung der Cholesterinwerte (25 Fälle) besonders in Erregungszuständen bei im allgemeinen uncharakteristischen Werten, während *Barth* eine leichte Erhöhung der Gesamtcholesterinzahl meist erst im zweiten oder dritten Schub, nicht jedoch bei frischerkrankten Schizophrenen angibt. Auch im Verhältnis von freiem zu verestertem Cholesterin zeigt sich bei unseren Fällen keine deutliche Änderung, mit Ausnahme von Fall 2, bei dem der veresterte Anteil 63,6% ausmacht. Wieweit dies auf den Zustand nach einer abgeklungenen Otitis media und einer immer noch hohen Senkung von 68/110 mm zurückzuführen ist, läßt sich im vorliegenden Falle nicht entscheiden. Die Beobachtung der Verhältniszahlen innerhalb der Cholesterinanteile wäre auch im Hinblick auf die Fragestellung wertvoll, ob sich bei akuten Schizophrenien (Katatonien und halluzinanten Zustandsbildern) im Liquor eine ähnliche Verschiebung zugunsten des freien Cholesterins bemerkbar macht, wie dies *Greving* im Blut nachgewiesen hat. Er fand nämlich, daß das Blutcholesterin, abgesehen von seiner konstitutionell bedingten Wertlage, bei den Schizophrenien, vergleichbar dem „Estersturz“ bei Leberparenchymenschäden, eine Verminderung des Esteranteiles erfährt. Dieser macht normalerweise zwei Drittel des Gesamtblutcholesterins aus, während er — was auch beachtenswert sein dürfte — im Liquor, wie bereits erwähnt, die Hälfte beträgt.

Liquor-Cholesterin hat bereits *Pighini* bei der *progressiven Paralyse* nachgewiesen und *Goebel* fand eine Vermehrung, ebenso wie *Serény*, *Plaut* und *Rudy* (in 50% der Fälle) und auch *Barth* feststellten, während *Kulkow* und *Samburov* (allerdings mit älterer Methodik) normale Werte fanden. *Holthaus* und *Wichmann* beschreiben eine Cholesterinerhöhung im Liquor lediglich unmittelbar nach Durchführung einer Fieberkur. Leider verfügen wir nur über 2 Kranke dieser Gruppe, deren Cholesteringesamtwerte die oberste Grenze der Norm erreichen, bzw. deutlich überschreiten, wobei die Verhältniszahlen der einzelnen Anteile etwa 50% betragen. Daß eine positive *Wassermannsche* Reaktion keinen Einfluß auf die Höhe der Werte hat, konnten bereits *Goebel*, *Knauer* und *Heidrich* sowie *Plaut* und *Rudy* nachweisen.

In den folgenden *organischen* Krankheitsfällen (Nr. 10, 30 und 20) liegen die Gesamtcholesterinwerte ebenfalls an der oberen Grenze der konventionellen Norm, Befunde, die das insbesondere für die posttraumatischen Zustandsbilder bereits bei der symptomatischen Epilepsie Be sprachene ergänzen. Die erhöhten Werte im Falle 20 (62 Jahre alt) könnten jedoch auch auf eine gleichzeitig bestehende sklerotische Veränderung der Hirngefäße zurückzuführen sein.

Daß gerade bei Prozessen, die auf dem Boden einer *Arteriosklerose* am Zentralnervensystem sich abspielen, die Cholesterinwerte deutlich

gesteigert sein können, fanden bereits *Plaut* und *Rudy*, *Holthaus* und *Wichmann* sowie *Barth*. Letzterer besonders bei frischen Blutungen und Erweichungen, wobei zu berücksichtigen ist, daß unter Umständen Serumbeimengungen zum Liquor eine solche Erhöhung vortäuschen können. Auch *Ederle* fand einen auffallend gesteigerten Cholesterinwert in einem Falle mit multiplen Erweichungsherden (5,5 mg-%!). Unser Fall 54 mit röntgenologisch nachgewiesenem encephalomalacischem Herd zeigt einen Gesamtcholesterinwert an der obersten Grenze der Norm, der aber von den 3 weiteren Fällen (32, 44 und 1), bei denen eindeutige arteriosklerotische Veränderungen diagnostiziert werden konnten, bei weitem übertroffen wird. 2 Fälle von *Hydrocephalus*, bei denen bereits *Fabris* stets ein absolutes Fehlen von Cholesterin, auch mit den älteren Methoden, beschrieben hat, zeigen entsprechend den Angaben von *Knäuer* und *Heidrich* sowie *Holthaus* und *Wichmann* verminderte Cholesterinwerte, die mit unserer Methode sogar eindeutig unterhalb der untersten Grenze der Norm liegen und bei Fall 14 den veresterten Cholesterinanteil völlig vermissen lassen, während sich im Fall 31 die Verhältniszahlen in normaler Höhe bewegen.

In der Gruppe der *Hirntumoren* liegen die Werte bei uns an, bzw. über der obersten Grenze der Norm, und übersteigen diese Grenze in Fall 9 um ein Vielfaches des Normalwertes, ganz abgesehen von Fall 45, bei dem es sich um ein in das Liquorsystem eingebrochenes Gliom handelte, das zu dem außerordentlich hohen Werte von 2416,0 γ-% geführt hat. Die Verhältniszahlen bewegen sich auch in dieser Gruppe im allgemeinen entsprechend der Norm, abgesehen von Fall 45, bei dem die veresterten Anteile 63,8 mg-% ausmachen. Wie weit hier die stark erhöhte Senkung von 78/120 mm oder der erhöhte Gesamteiweißgehalt im Liquor mit 1,0% ursächlich beteiligt sind, entzieht sich unserer Kenntnis. Daß bei der Anwesenheit von Hirntumoren das Gesamtcholesterin im Liquor im allgemeinen stark vermehrt sein kann, haben bereits *Roffo*, *Kulkow* und *Samburov*, *Knäuer* und *Heidrich*, besonders auch *Plaut* und *Rudy* nachgewiesen. *Holthaus* und *Wichmann* konnten zeigen, daß dies besonders für zerfallende Tumoren zutrifft, während infiltrierend wachsende Geschwülste normale Liquor-Cholesterinwerte boten. Auch bei Gefäßtumoren bewegten sich nach *Barth* die Werte entsprechend der Norm. Eine Artdiagnose läßt sich jedoch mit Hilfe der Cholesterinwerte vorläufig (auch nach unserer Meinung) nicht ohne weiteres ableiten, was auch *Ederle* betonte.

Entsprechen im großen und ganzen unsere Befunde unter Beibehalt der konventionellen Normwerte den Ergebnissen der Voruntersucher — wobei hier Fragen der unterschiedlichen Methode außer acht gelassen werden sollen — so erlaubt es unser Krankengut nicht, zur Frage des Cholesteringehaltes im Liquor bei akut-entzündlichen Prozessen, insbesondere den *Meningitiden*, Stellung zu nehmen. Bei diesen

Erkrankungen ist eindeutig, auch mit älterer Methodik von allen Voruntersuchern, insbesondere auch von *Eskuchen* und *Lickint*, eine zum Teil erhebliche Steigerung der Gesamtcholesterinwerte nachgewiesen worden, so daß man bis jetzt unabhängig von aller Methodik, zusammenfassend sagen darf, daß eindeutige *Steigerungen* des Gesamtcholesterins zweifelsfrei bei *malignen, liquornahen Tumoren* und bei *akut-entzündlichen Veränderungen* an den Hirnhäuten auftreten, während subnormale Werte sich bei *Hydrocephalus (hypersecretorius)* finden, wobei über Verschiebungen im Verhältnis von freiem zu verestertem Cholesterin Aufschlüsse erst in Zukunft zu erwarten sind.

Eine endgültige Stellungnahme zu den Problemen des Cholesterinstoffwechsels im Liquor, insbesondere auch zur Frage seiner Herkunft und des Zusammenhangs mit dem Blut-Cholesterin, der von *Plaut, Rudy* u. a. abgelehnt wurde, aber auch zur Frage der Abhängigkeit des Cholesteringehaltes von der Funktion der Blut-Liquorschranke, bzw. Blut-Hirnschranke und von destruktiven Prozessen am Nervenparenchym, kann erst nach weiterer methodischer Ausgestaltung des adsorptionsanalytischen Vorgehens in *Angiff* genommen werden. Entscheidend dürfte im Cholesterinstoffwechsel des Liquors das *vegetative Nervensystem*, insbesondere sein Einfluß auf die Schrankensysteme, sein, wie es auch aus den Befunden von *Holthaus* und *Wichmann* hervorgeht, die bei elektrisch Verunfallten solange Cholesterinerhöhung im Liquor feststellten, wie auch die allgemeinen vegetativen Krankheitssymptome anhielten. Auch der von *Wichmann* betonte erhöhte Cholesteringehalt bei Migräne dürfte seine Ursache in der Änderung der allgemeinen vegetativen Tonuslage haben. Die Absicht dieser Arbeit lag lediglich in dem Nachweis der Anwendbarkeit der adsorptionsanalytischen Methode auf den Liquor cerebrospinalis.

Ausführung der Cholesterinbestimmung im Liquor.

Reagenzien: 1. Kieseläurehydrat, rein (Schering); 2. Aluminiumoxyd zur chromatographischen Adsorptionsanalyse, standardisiert nach *Brockmann* (Merck); 3. Kieselgur, mit Säure gewaschen und geäugt (Schering); 4. Natriumsulfat; 5. Benzol; 6. Äthyläther; 7. Chloroform oder Methylenchlorid; 8. Acetylchlorid, rein; 9. 20%ige Lösung von wasserfreiem Zinkchlorid in Eisessig (20,0 g $ZnCl_2$ mit 76,0 ccm Eisessig bei Zimmertemperatur in der Schüttelmaschine gelöst; bei Trübung durch Glasfilter, G4 filtrieren); 10. Cholesterin-Standardlösung: 0,1 oder 0,2 mg in 1,0 ccm Chloroform. Die Lösungsmittel müssen vollkommen rein und wasserfrei sein.

Adsorption der Cholesterinfaktionen aus dem Liquor: 15—30 ccm Liquor, welcher durch scharfes Zentrifugieren in spitzen Zentrifugengläsern nach unblutiger Punktion vom Sediment vollständig befreit ist, werden in Zentrifugengläsern entsprechender Größe mit rundem Boden mit destilliertem Wasser zu etwa 50 ccm ergänzt. In dieser Liquorverdünnung wird 1,0 g Natriumsulfat gelöst. Dazu werden etwa 2,5 g Kieseläurehydrat gegeben und nach wiederholtem, kräftigem Aufschütteln des Adsorbens wird dieses scharf abzentrifugiert, die überstehende klare Flüssigkeit von dem fest am Boden haftenden Zentrifugat abgegossen und das Zentrifugenglas für eine Weile umgekehrt auf Filtrierpapier gestellt. Das Adsor-

bat wird im Vakuumexsiccator mit CaCl_2 oder konzentrierter H_2SO_4 vollständig getrocknet. Beim ständigen Saugen mit einer gut ziehenden Wasserstrahlpumpe, bzw. in einem absolut dichtschließenden Exsiccator ohne ständiges Saugen ist der Trocknungsprozeß nach etwa 10 Stunden beendet, schneller in einem heizbaren Vakuumexsiccator. Von den von uns bisher untersuchten Adsorptionsmitteln eignet sich nur das Kieselzsäurepräparat der Firma Schering-Berlin zur quantitativen Adsorption des Cholesterins aus biologischen Flüssigkeiten. Auch die von Merck-Darmstadt hergestellte Kieselzsäure ist zu diesem Zwecke nicht brauchbar¹.

Einrichtung zur chromatographischen Fraktionierung: Als Adsorptionsrohr eignen sich einfache Glasrohre von etwa 20 mm Weite und 150—200 mm Länge, welche unten durch eine eingeschmolzene Glasfilterplatte mit der Porenweite G4 abgeschlossen sind und mit einem engeren, etwa 150 mm langen Ablaßrohr enden (zu beziehen durch die Firma Schott und Gen., Jena). Das Adsorptionsrohr wird auf einem gewöhnlichen Vakuumexsiccator, welcher sowohl im Deckel wie seitlich einen Stutzen besitzt, mit Hilfe eines durchbohrten Gummistopfens besetzt. Zum Auffangen der Eluate werden *Erlenmeyer*-Kolben mit Schliff von etwa 50 ccm Inhalt verwendet. Das Ablaßrohr des Adsorptionsrohres soll in dieses hineinragen. Der Fuß des Exsiccators muß mit Sand ausgefüllt und gegen den oberen Teil durch eine Glasplatte abgeschlossen werden. Mit einem Dreiwegehahn am seitlichen Stutzen läßt sich die Verbindung mit einer Wasserstrahlpumpe nach Belieben herstellen oder das Vakuum aufheben. Die Regulation des Vakuums geschieht durch einen seitlichen Gummischlauch mit Klemmschraube².

Durchführung der chromatographischen Fraktionierung: In das Adsorptionsrohr werden 4,0 g Al_2O_3 (standardisiert nach Brockmann) gefüllt und unter Beklopfen des Rohres durch maximales Saugen mit der Wasserstrahlpumpe festgesaugt. Darüber kommt das vorher gut zerrührte getrocknete Adsorbat aus dem Zentrifugenglas, das ebenfalls unter Beklopfen festgesaugt wird. Als fester Abschluß dient eine kleine Menge Kieselgur. Diese Säule wird mit einem Stampfer unter starkem Saugen möglichst festgestampft. Hierauf erfolgt die vollständige Durchtränkung der Säule mit Benzol, indem dieses unter maximalem Saugen „fraktioniert“ eingesaugt wird, d. h. durch abwechselndes Saugen und Wiederaufheben des Vakuums. Durch diese Maßnahme wird am besten eine vollständige Durchtränkung der Säule erreicht³. Nach der Durchfeuchtung der Säule werden 30 ccm Benzol in 20—30 Min. durchgesaugt und in einem 50 cm Schliffkolben aufgefangen (Cholesterinesterfraktion). Nach dem Wechseln der Vorlage werden auf die gleiche Weise 30 ccm Äther-Chloroform oder Äther-Methylenchlorid 2 : 1 durchgesaugt (Fraktion des freien Cholesterins). Das Vertreiben der Elutionsmittel geschieht am besten im heizbaren Vakuumexsiccator bei etwa 50° (leicht herstellbar durch den Einbau eines elektrischen Sandbades in einem großen Vakuumexsiccator; Regulation der Temperatur durch einen Schiebewiderstand).

Farbreaktion und colorimetrische Messung: Der vollständig vom Elutionsmittel befreite Rückstand wird mit 1,0 ccm Chloroform gelöst. Dazu werden 3,0 ccm eines Gemisches von 2 Teilen 20%iger ZnCl_2 in Eisessig und 1 Teil Acetylchlorid, welches etwa eine halbe Stunde vor dem Gebrauch hergestellt worden ist, gegeben. Die zugesetzten Mengen müssen genau abgemessen werden. Nach 3ständigem Stehen der mit einem Schliffstopfen verschlossenen Kolben im Dunklen bei Zimmertemperatur werden 6,0 ccm Chloroform zugegeben (Gesamtvolumen 10,0 ccm). Die Photometrie geschieht in einem Absolutcolorimeter mit Filter S 53 in einer Cuvette von 20 mm Schichtdicke gegen einen Leerwert, welcher die Reagenzien der Farbreaktion enthält. Zur Berechnung ist es notwendig, 0,1 oder 0,2 mg

¹ S. hierzu auch Biochem. Z. 305, 154 (1940).

² S. hierzu auch Biochem. Z. 306, 320 (1940), Abb. 1.

³ Siehe hierzu auch Biochem. Z. 306, 331 (1940).

Cholesterin einer Standardlösung mit anzusetzen, da der Extinktionskoeffizient des Cholesterins in Abhängigkeit von dem Wassergehalt der Reagenzien, der sich nicht vollständig vermeiden läßt, etwas schwankt. Die Extinktionen des reinen Cholesterins sind oberhalb 0,300 und des veresterten Cholesterins zwischen 0,300 und 1,500 proportional der Konzentration. Außerhalb dieses Bereiches muß zur Konzentrationsbestimmung eine Eichkurve angelegt werden. 0,1 mg Cholesterin ergibt unter den angegebenen Bedingungen eine Extinktion von 0,500. Es ist ratsam, zur Kontrolle zwei getrennte Analysen gleichzeitig durchzuführen.

Zusammenfassung.

1. Es werden die Anwendbarkeit der adsorptionsanalytischen Methode zum quantitativen Nachweis des Cholesterins in der Rückenmarksflüssigkeit in Doppelbestimmungen an 53 Kranken untersucht und neben dem Gesamtcholesterin hier erstmalig auch die freien und veresterten Anteile fraktioniert bestimmt.

2. Unter Berücksichtigung der verschiedensten Fehlerquellen und mit Beibehalt einer konventionellen normalen Streuungsbreite von 50 bis 240 γ-% Gesamtcholesterin findet sich eine eindeutige Steigerung in der Mehrzahl der Fälle bei genuiner Epilepsie, Schizophrenie, altersbedingter Hirnatrophie, bei liquornahen Gliomen sowie bei einigen Fällen von endogenem Schwachsinn; eine Senkung unter diese Norm ließ sich bei Hydrocephalus nachweisen.

3. Eine Verschiebung des Verhältnisses von freiem zu verestertem Cholesterin (normaliter etwa 50:50%) um 10% zugunsten des freien Cholesterins fand sich bei 2 Fällen mit depressiv-hypochondrischem Symptomenkomplex.

4. Es werden neben genauen Angaben des Analysenganges Vorschläge zu weiterer Empfindlichkeitssteigerung der Methode (mit Hilfe der Fluoreszenzmessung) und damit zu ihrer Anwendung an kleinsten Liquormengen gemacht.

Schrifttum.

- Barth: Arch. Psychiatr. (D.) **105**, 191 (1936). — Betchov: Zit. in Zbl. Neur. **40**, 192 (1925). — Brown, Gildea and Man: Arch. neur. (Am.) **42**, 260 (1939). — Crinis de: Monographien Neur. **1920**, H. 22. — Ederle: Nervenarzt **10**, 190 (1937). — Eskuchen u. Lickint: Z. Neur. **113**, 214 (1928). — Fabris: Pediatria **29**, 1057 (1921). Ref. Ber. Physiol. **11**, 322 (1922). — Goebel: Ber. Physiol. **30**, 290 (1925); **39**, 406 (1927). — Greving: Zbl. Neur. **95**, 550 (1940). — Holthaus u. Wichmann: Arch. Psychiatr. (D.) **102**, 147 (1934). — Knauer: Mschr. Kinderhk. **51**, 378 (1932). — Knauer u. Heidrich: Z. Neur. **136**, 483 (1931). — Kulkow u. Šamburov: Z. Neur. **113**, 193 (1928). — Levinson, Landenberger u. Howell: Ber. Physiol. **7**, 586 (1921). — Noyous: Biochem. Z. **298**, 391 (1938). — Plaut u. Rudy: Z. Neur. **146**, 228, 262 (1933); **148**, 423 (1933); **150**, 172 (1934). — Roeder: Z. Neur. **155**, 608 (1936). — Roeder u. Rehm: Die Cerebrospinalflüssigkeit. Berlin: Springer 1942. — Roffo: Ber. Physiol. **43**, 220 (1928). — Serény: Zbl. Neur. **55**, 717 (1930). — Trappe: Biochem. Z. **305**, 150 (1940); **306**, 316 (1940); **307**, 97 (1941). — Klin. Wschr. **1942 I**, 651. — Z. Krebsforsch. **53**, 47 (1942). — Z. physiol. Chem. **273**, 177 (1942). — Tschugaeff: Ber. chem. Ges. **42**, 4631 (1909). — Wichmann: Z. Neur. **157**, 698 (1937). — Zingerle: Dtsch. Z. Nervenhk. **140**, 113 (1936).