

# Untersuchungen über die regionale Kationenverteilung im menschlichen Gehirn\*

Von

**H. Bertha, A. Musil, W. Haas und O. Wawrschinek**

Aus dem Institut für anorganische und analytische Chemie der Karl-Franzens-Universität und dem Neurohistologischen Laboratorium der Universitäts-Nervenlinik Graz

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 14. Dezember 1961)

Es wird eine verbesserte Gehirnpräparation durch Verwendung einer Formalinatmosphäre beschrieben. Die Excision der Gehirnzentren wird mit Glas- oder Platingeräten durchgeführt, um Fremdioneneinschleppung hintanzuhalten. Auf einem Platinnetzchen mit Kapillardrähten erfolgt der Aufschluß und das Auftragen der mineralisierten Probe auf das Chromatographie-Papier.

In einigen Thalamusproben gelang der eindeutige tüpfelanalytische Nachweis von Silber.

Die Elemente Eisen und Kupfer wurden polarographisch bestimmt; die erhaltenen sehr unterschiedlichen Werte weisen auf spezielle Funktionen dieser Ionen hin.

Vermutlich üben Spurenelemente eine spezifische Kationenwirkung in Spezialzellen aus.

Mit Hilfe der beschriebenen Methodik können Fragen der Topochemie der Kationen des Gehirnes geklärt werden.

Anschließend an die Arbeit von *H. Bertha, H. Malissa* und *F. Pohl*<sup>1</sup> (1950) wurde das Problem der Kationenverteilung im menschlichen Gehirn weiter bearbeitet.

Im Gegensatz zu Untersuchungen von *A. Löwenthal*<sup>2</sup> (1958) wurde versucht, eine möglichst detaillierte Verteilung der wichtigsten Kationen im menschlichen Gehirn festzustellen.

\* Herrn Prof. Dr. *O. Kratky* zum 60. Geburtstag gewidmet.

<sup>1</sup> *H. Bertha, H. Malissa* und *F. Pohl*, *Mikrochim. Acta* [Wien] **36**, 989 (1951).

<sup>2</sup> *A. Löwenthal*, *Acta Medica Belgica* (1958), S. 16.

Da zu erwarten ist, daß die Konzentration der Kationen in einem bestimmten Zentrum verschieden ist von der Kationenkonzentration in der nächsten Umgebung des Zentrums, mußte von sehr geringen Substanzmengen (60 bis 100 mg Trockensubstanz) ausgegangen werden. Das Ziel dieser Arbeit soll eine Kationenverteilungskarte des zunächst gesunden Gehirns sein, um eine Verschiebung bei pathologischen Gehirnen erkennen zu können. Auf Grund der geringen Substanzmengen, die sich aus der Größe des betreffenden Zentrums ergeben, war es notwendig, eine spezielle Arbeitsmethodik zu entwickeln.

### Vorbereitung des Gehirnes

Das Gehirn wird nicht, wie bisher, in wäßrigem Formalin präpariert, sondern in einer Formalinatmosphäre in einem Exsikkator konserviert. Hiedurch soll das Ausschwemmen von Kationen, wie es beim Fixieren in wäßrigem Formalin mit Sicherheit eintritt, vermieden werden. Die Fixierungsdauer beträgt ca. eine Woche.

### Excision der zur Untersuchung gelangenden Gehirnzentren

Bedingt durch die kleine Probemenge sind die zu untersuchenden Kationen nur in Mikrogramm-Mengen vorhanden, und es sind daher besondere Vorsichtsmaßnahmen bei allen Arbeiten am Gehirn erforderlich. Es können beispielsweise Fremdionen durch die üblichen Metall-Skalpelle eingeschleppt werden. Dies verhinderten wir durch Verwendung von gläsernem bzw. Platinbesteck. Mit einem konisch zugeschliffenen Glasrohr wurde ein Zylinder mit Gehirnsubstanz ausgestanzt und mit einem Glasstab wieder aus dem Rohr geschoben. Die Enden des Zylinders wurden nochmals mit einem Glasmesser abgeschnitten, um etwaige Verunreinigungen, die an der Oberfläche des Gehirnzyllinders haften könnten, zu entfernen. Das auf diese Weise erhaltene Gehirnteilchen wurde in einem gewichtskonstanten Wägegläschen im Trockenschrank bei 120° C getrocknet. Nach einigen Tagen war die Probe gewichtskonstant, und es konnte nun der Aufschluß durchgeführt werden.

### Aufschluß der Probe

Dieser Arbeitsgang wurde mit den als bisher am günstigsten bekannten Methoden der Aufschließung organischer Substanzen begonnen. Dies war die Behandlung der Probe mit roter, rauchender Salpetersäure in einem Quarztiegel. Hierbei resultierte eine rotgefärbte klare Lösung, die jedoch noch viel organische Substanz enthielt, die mit Salpetersäure allein nicht verbrannt werden konnte.

Kein besseres Ergebnis wurde durch die gleichzeitige Verwendung von konzentrierter Schwefelsäure erzielt. Auch in diesem Falle war sogar nach mehrmaligem Abrauchen der Säure organische Substanz vorhanden, die die anschließende Chromatographie der Kationen beträchtlich störte. Die sehr

oft empfohlene Schwefelsäure—Perchlorsäure-Mischung (*Löwenthal* und Mitarbeiter) verbrannte zwar etwas besser, jedoch niemals vollständig. Selbst bei einer Temperatur der Lösung von 200° C und mehrmaliger Zugabe von Perchlorsäure ( $d = 1,61$ ) war die organische Substanz nicht restlos verbrannt. Außerdem kam bei diesen Versuchen noch hinzu, daß die Schwefelsäure—Perchlorsäure-Mischung des öfteren explosionsartig reagierte und ein Großteil der Flüssigkeit dadurch verspritzte.

Weitere Methoden der nassen Veraschung wurden als nicht brauchbar befunden und daher folgende trockene Mineralisierung durchgeführt:

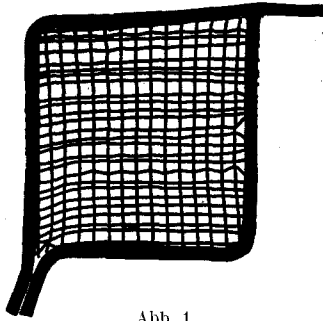


Abb. 1

Die getrocknete Gehirnprobe wird auf einem 1 cm<sup>2</sup> großem Platinnetzchen (Maschenweite 0,5 mm) (Abb. 1) mit einem Tropfen konzentrierter Salpetersäure angefeuchtet und zur Vertreibung der Salzsäure schwach erwärmt. Das Platinnetz ist mit einem 0,5 mm starken Platindraht eingefasst, mit einem von einer Ecke des quadratischen Netzes ausgehenden Platindraht in einem Glasstab eingeschmolzen und in einem Stativ befestigt. Die Einfassung des Netzes ist an der gegenüberliegenden Ecke nicht geschlossen, sondern es sind die Enden des Einfassungsdrahtes 3 mm weit vorstehend und am Ende halbkugelförmig abgeschliffen.

Nach erfolgter trockener Verbrennung der Probe wird die zurückbleibende Kohle mit einem Tropfen rauchender Salpetersäure befeuchtet und wiederum mit dem Mikrobrenner bis zur Dunkelrotglut erhitzt. Diese Operation ist mehrmals zu wiederholen, bis vollständige Mineralisierung eingetreten ist. Die zurückbleibenden Salze werden anschließend mit einem Tropfen verdünnter Salpetersäure (1:1) auf dem Netz in Lösung gebracht und nun kann die Lösung mittels der frei vorragenden Enden des Einfassungsdrahtes direkt auf den Startpunkt des Chromatographiepapiers aufgetragen werden. Zweckmäßig wird das Papier über einem Föhn eingespannt, um das Eintrocknen des Probetropfens zu beschleunigen. Mit einem zweiten und dritten Tropfen verdünnter Salpetersäure wird das Platinnetz nachgewaschen und die beiden Tropfen ebenfalls aufgetragen. Der auf diese Weise erhaltene Startfleck hat maximal einen Durchmesser von 3 mm.

Reinigung des Chromatographiepapiers und der Laufmittel

Sämtliche im Handel erhältlichen Chromatographiepapiere waren, auch wenn sie als „ausgewaschen“ bezeichnet waren, ungeeignet. Sie enthielten vor allem Eisen, geringe Mengen Aluminium und andere Kationen. Des weiteren fand man an der Laufmittelfront nicht näher identifizierbare organische Substanzen in Form grünlichbrauner Streifen, die den

Nachweis des an der Lösungsmittelfront sich befindenden Eisens empfindlich stören. Als bestes Waschmittel erwies sich das später als Laufmittel verwendete Gemisch von  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , Pyridin,  $\text{HCl}$  (80:6:20). Diese allgemein verwendbare Mischung wäscht sämtliche anorganische und die oben erwähnten organischen Verunreinigungen restlos aus. Zur Reinheitsprüfung des gewaschenen Papiers wurde das Laufmittel in Reagensgläsern ein zweites Mal angewandt. Man erhält eine weder durch anorganische noch organische Substanzen verunreinigte Front. Für alle Untersuchungen wurde eine selbst hergestellte Salzsäure ( $d = 1,19$ ) verwendet, die keinerlei Reaktionen mit diversen Reagentien (z. B. Dithizon u. a.) zeigte. Pyridin und Eisessig wurde zur Nachreinigung mehrmals über Kolonnen destilliert.

### Chromatographie der mineralisierten Gehirnprobe

Es gelang, durch Entwickeln mit spezifischen Sprühereagentien in den Gehirnproben folgende Kationen in der Reihenfolge des Auftretens auf dem Chromatogramm nachzuweisen: Ag, Ca, Mg, Cu, Al, Fe.

Bemerkenswert ist, daß die hier angeführten Kationen keinesfalls in allen Gehirnproben anzutreffen sind. Beispielsweise wurden in ein und demselben Gehirn bei gleichen Gehirnsatzmengen folgende Kationen festgestellt:

Thalamus nucleus medialis rechts ... Cu, Al, Fe, Ca, Mg  
Thalamus nucleus medialis links .... — Al, Fe, Ca, Mg

Ebenfalls im Thalamus wurde das von *H. Bertha* auf funkenspektrographischem Wege bereits gefundene Silber durch folgende Reaktion nachgewiesen: Tüpfelpapier Nr. 601 der Firma Schleicher & Schüll wird mit  $n/10$  ÄDTA-Lösung und mit einer Lösung von 0,01 g p-Dimethylaminobenzylidenrhodanin in 100 ml Aceton getränkt und getrocknet. Die mineralisierte Gehirnprobe wurde mit 1—2 Tropfen 0,2 n Salpetersäure gelöst und auf das präparierte Papier gebracht. Am Auftragepunkt erscheint bei Anwesenheit von mindestens 0,01  $\mu\text{g}$  Silber ein rotvioletter Fleck. Durch Herstellen von Eichflecken mittels Lösungen analoger Zusammensetzung wurde dieser Nachweis gesichert.

### Polarographische Bestimmung des Eisens und Kupfers

Die quantitative Bestimmung des Eisens und des Kupfers wurde mit dem Apparat nach *Heyrovsky*, Type M 103, durchgeführt. Die bei  $105^\circ\text{C}$  zu konstantem Gewicht von 50—100 mg getrockneten Gehirnproben wurden im Quarztiegel mit einigen Tropfen rauchender Salpetersäure behandelt und nach Trocknung über der Flamme bei  $700^\circ\text{C}$  im Glühofen trocken verascht. Die zurückbleibenden Oxyde wurden mit 30—50 mg Kaliumbisulfat aufgeschlossen und nach Zusatz von Triäthanolamin, Kaliumhydroxyd und Kaliumchlorid polarographiert.

Die Eisenwerte von 250 untersuchten Zentren aus fünf verschiedenen Gehirnen betragen 8—147  $\mu\text{g}$  Fe/100 mg Trockensubstanz. Die Werte für

Tabelle 1

Zentrum	$\mu\text{g}/100$ mg Trockensubstanz	
	Fe	Cu
pons .....	8,0	0,9
nucleus niger .....	127,0	2,2
P <sub>F</sub> .....	45,2	3,5
P <sub>Fm</sub> .....	36,7	2,9
P <sub>HT</sub> .....	49,0	29,0

Die Benennung der untersuchten Regionen der Hirnrinde erfolgte nach der arealen Hirnkarte von *v. Economo*.

Kupfer in denselben Zentren schwanken zwischen 0,5 und 29  $\mu\text{g}$  Cu/100 mg Trockensubstanz. Rund 90% der Eisenwerte liegen bei 35  $\mu\text{g}$  Fe und 90% der Kupferwerte bei 3  $\mu\text{g}$  Cu pro 100 mg Trockensubstanz.