

Zur Kritik der klinischen Verwertbarkeit von Gefrierpunktsuntersuchungen.

Von
Fritz Eigenberger.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik R. v. Jaksch in Prag.)

(Der Redaktion zugegangen am 25. April 1918.)

Als relativ einfache Methode zur Ermittlung der osmotischen Konzentration ist die Gefrierpunktsbestimmung frühzeitig in der Medizin verwendet worden. Es zeigte sich in Übereinstimmung mit anderen Meßmethoden, daß Schwankungen im osmotischen Druck im lebenden Organismus bei physiologischen und auch pathologischen Zuständen nur innerhalb ziemlich enger Grenzen stattfinden.

Wohl gelingt es im Tierversuch⁽¹⁾ durch entsprechende Kochsalzzufuhr recht beträchtliche Erniedrigungen des Gefrierpunktes im Blute zu erzeugen, aber derartige Ausschläge kommen bei pathologischen Zuständen nie in Betracht und sind nur durch sehr stark eingreifende Experimente zu erzielen.

Die große Fähigkeit des Organismus, die osmotische Konzentration des Blutes und der Gewebe konstant zu erhalten, muß wohl in erster Linie durch die Möglichkeit, reversible Kolloid-Ionen eventuell auch Kolloid-Molekularbindungen zu bilden, erklärt werden. Ob diese Bindungen als rein chemische oder physikalisch-chemische anzusehen sind, müßte in jedem einzelnen Falle festgestellt werden. Während bei gewissen Ionen, insbesondere bei $+H$ und $-OH$, chemische Bindungen mit dem Eiweißmolekül angenommen werden, spielen sicher außer diesen physikalische adsorptive Bindungsvorgänge, die mit dem Dispersitätsgrade der Kolloide variieren, eine große Rolle. Diese Regulationen der osmotischen Konzentration finden naturgemäß in erster Linie in der Zelle, im lebenden Protoplasma

statt. Inwieweit die Kolloide des Blutplasmas daran beteiligt sind, ist derzeit schwer zu entscheiden.

Die Verhältnisse liegen jedenfalls sehr kompliziert. Es handelt sich durchwegs um höchst heterogene Systeme, in denen kolloidale, ionisierte und molekulardisperse Phasen den osmotischen Druck in der mannigfachsten Weise beeinflussen, wobei entsprechend den steten Lebensprozessen nie ein Gleichgewichtszustand zwischen den verschiedenen Phasen bestehen bleibt. Der gemessene osmotische Druck erlaubt natürlich gar keinen Schluß auf den Zustand und die Verteilung der einzelnen Phasen. Es scheint daher etwas zu verallgemeinern, wenn man z. B. gewisse pharmakologische Wirkungen, die mit Änderung des osmotischen Druckes einhergehen, nur durch diese Änderungen erklären will. Zustandsänderungen chemischer oder physikalisch-chemischer Natur bei den einzelnen Phasen spielen sicher die wichtigste Rolle. Und diese Zustandsänderungen können in verschiedenster Kombination gleiche osmotische Effekte herbeiführen.

Während unterhalb gewisser Konzentrationen für Molekularlösungen und, wenn man den Dissoziationsgrad in Betracht zieht, mit großer Annäherung auch für ionisierte Lösungen die Gasgesetze gelten, zeigen kolloidale Lösungen ein durchaus anderes Verhalten. Gefrierpunktsdepressionen werden bei reinen, salzfreien Kolloiden nicht beobachtet, wohl aber haben sie einen direkt meßbaren osmotischen Druck. Wie sehr dieser unter den verschiedensten Bedingungen variiert, zeigen besonders die Untersuchungen von R. S. Lillie⁽²⁾, Reid⁽³⁾, Biltz und v. Vegesack⁽⁴⁾ und Ducleaux⁽⁵⁾.

Ich habe nun versucht, mit der Gefrierpunktmethode das osmotische Verhalten von Kolloiden + verschiedenen molekularen und ionisierten Lösungen festzustellen, mit besonderer Berücksichtigung von normalen und pathologischen Blutseren. Zunächst muß bemerkt werden, daß Messungen der osmotischen Konzentration aus der Gefrierpunktsdepression keineswegs auch bei exaktester Methodik die direkten Messungen des osmotischen Druckes ersetzen können. Entspricht doch einer Gefrierpunktsänderung um 0,001 ° C. eine osmotische

Druckdifferenz von 9,2 mm Quecksilber; und die Fehlerdifferenzen bei der Gefrierpunktmethode sind bei exakter Arbeit schwer unter $0,005^{\circ}\text{C.}$ zu erhalten. Gewiß können Schwankungen im osmotischen Druck um einige Millimeter Quecksilber bei der großen Zustandslabilität der Kolloide auf die allerverschiedensten Bedingungen zurückzuführen sein; aber andererseits müssen schon geringe Schwankungen des osmotischen Druckes, hauptsächlich wegen der ihnen zugrunde liegenden Zustandsänderungen der Kolloide eine große Bedeutung für den Zellstoffwechsel haben.

Bei den Bestimmungen verwendete ich den gebräuchlichen Beckmannschen Gefrierpunktsapparat mit elektromagnetisch betriebenenem Rührer, um stets unter möglichst gleichen Bedingungen zu arbeiten. Es wurden immer zunächst einige Vorbestimmungen gemacht, dann die äußere Kältemischung um nur 1°C. tiefer gehalten als der zu erwartende Gefrierpunkt und wenn der Quecksilberfaden des Beckmannschen Thermometers den durch Versuche mit möglichster Annäherung ermittelten Gefrierpunkt passierte, sofort die Impfung mit der festen Phase vorgenommen. So konnten sehr geringfügige und immer gleiche Unterkühlungen von $0,1^{\circ}\text{C.}$ erzeugt und durch die langsame Abkühlung gleichzeitig der Fehler der Nachwirkung am Thermometer vermieden werden. Dem durch die Trägheit des Quecksilberfadens möglichen Fehler wurde durch häufiges seitliches Beklopfen des Thermometers entgegengearbeitet. Die auf diesem Wege gefundenen Werte differierten um höchstens $0,005^{\circ}\text{C.}$ und es wurde immer das arithmetische Mittel aus 4 Hauptbestimmungen genommen (der wahrscheinliche Fehler des Resultates berechnete sich für 3% Harnstofflösungen bei 10 Bestimmungen auf $\pm 0,0014$).

Zunächst wurden möglichst *salzfrei dialysierte zweiprozentige Gelatine- und Stärkelösungen* verwendet. Beide zeigten keine Gefrierpunktdepression. Zusatz von Molekulardispersionen (Harnstoff, Traubenzucker in 5%igen Lösungen zu gleichen Teilen mit den Kolloidlösungen) ergaben eine nur um wenig die Fehlergrenze überschreitende Abnahme der Gefrierpunktdepression gegenüber der berechneten. Zusatz beider Mole-

kularlösungen und zwar im Verhältnis 1 Kolloid + 0,5 Harnstofflösungen + 0,5 Glukoselösung ergab das gleiche Resultat. Siehe Tabelle 1. Ob man diesen geringfügigen Abweichungen Beobachtung schenken soll, ist nicht ohne weiteres zu entscheiden. Jedenfalls sind es kaum zufällige Schwankungen, weil sie nicht nach der anderen Seite hin auftraten; und auf den osmotischen Druck umgerechnet ergeben sie doch bemerkenswerte Änderungen. Daß die Ursache nicht in der Molekularlösung zu suchen ist, ergab die Kontrollbestimmung mit Wasser an Stelle des Kolloids. Die Erklärung der leichten Abnahme des osmotischen Drucks läßt sich wohl am zwanglosesten durch Annahme einer Adsorption an die Kolloide Phase geben.

Wechselnder waren die Resultate bei Verwendung von Elektrolyten. Es wurden wieder mit den gleichen Gelatine- und Stärkelösungen folgende Versuche ausgeführt: *Zusatz von NaCl*. Es wurden steigende Konzentrationen von Kochsalz zugesetzt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 wiedergegeben. Siehe Tabelle 2.

Man ersieht hieraus, daß die Gefrierpunktsdepressionen im Vergleich zu den berechneten Werten auch nur wenig geringer sind. Die Ursache der Verringerung muß in einer Abnahme der Zahl der freien, osmotisch wirksamen Teilchen gelegen sein. Eine Abnahme des Dissoziationsgrades ist kaum anzunehmen, sondern es kommt wieder eher eine Bindung von NaCl-Ionen mit dem Kolloid in Betracht. Bemerkenswert erscheint, daß bei der Stärkelösung besonders kleine und eigentlich erst mit steigender Konzentration von Kochsalz einigermaßen sichtbare Abweichungen zu erkennen sind.

Zusatz von Alkali. Es wurde wie früher vorgegangen. Wieder machte sich ein und zwar diesmal deutlicher Unterschied zwischen Stärke- und Gelatinelösung geltend. Es gab wohl auch die Stärke-Alkalilösung geringere Gefrierpunktsdepressionen, als nach der Berechnung zu erwarten wäre, aber die Ausschläge sind lange nicht so große, wie bei Gela-

¹⁾ Lösliche Stärke nicht durch Dialyse gereinigt zeigt nach Friedenthal⁽⁶⁾ eine nachweisbare Gefrierpunktsdepression.

tine. Bei letzterer war die Dauer der Einwirkung nicht ohne Einfluß; wurde sofort nach KOH-Zusatz kryoskopiert, so fand sich im allgemeinen eine stärkere, d. h. dem berechneten Werte genäherte Gefrierpunktsdepression; nach einstündiger, noch deutlicher nach sechs- und mehrstündiger Einwirkung war die Gefrierpunktsdepression viel geringer. In einem Falle beobachtete ich sonderbarerweise eine stärkere Gefrierpunktsdepression, als selbst nach der Rechnung zu erwarten stand; nach einhalbstündigem Stehen aber verhielt sich das Gemisch genau wie die übrigen. Ich bin mir keiner besonderen, abweichenden Versuchsbedingungen bewußt, außer daß die KOH-Lösung erst im Gefrierapparate zugesetzt und sofort die Bestimmung vorgenommen wurde, während sonst immer einige Zeit verstrich. Während der zunächst angegebene Einfluß der Zeit auf die Gefrierpunktsdepression wahrscheinlich seine Ursache in einer allmählichen Bindung von KOH an Eiweiß hat, wäre eventuell der erwähnte tiefere Wert durch die Versuchsergebnisse von R. S. Lillie zu erklären. Dieser Forscher fand bei direkter Messung eine starke Steigerung des osmotischen Druckes der Gelatinelösung auf Zusatz von Lauge (Lauge inner- und außerhalb des Osmometers zugesetzt). Diese Steigerung würde in dem gefundenen tieferen Gefrierpunkt seinen Ausdruck finden zu einer Zeit, in der die KOH-Eiweißbindung erst einsetzt und die osmotischen Druckänderungen des Kolloids selbst noch nicht verdeckt. Doch ist diese Erklärung nicht sehr wahrscheinlich, da die von Lillie gemessene Steigerung des osmotischen Druckes eben in der Ioneneiweißbindung und dadurch bedingten Änderung ihres Dispersitätsgrades seine Ursache zu haben scheint, in den gleichen Ioneneiweißbindungen, die die osmotische Konzentration des ganzen heterogenen Systems erniedrigen. Solange nicht eine genaue Nachprüfung jeden Fehler ausschaltet, muß aber von einer Erklärung abgesehen werden. Siehe Tabelle 3.

Zusatz von Säure. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 ersichtlich. Im Prinzip liegen die gleichen Resultate vor, wie bei Alkalizusatz. Längere Dauer der Einwirkung hat in diesen Fällen keinen so deutlichen Einfluß ergeben. Nur bei höheren

Konzentrationen fanden sich wie bei Lauge starke Ungleichheiten bei langer Wirkungsdauer. Dann kommt aber vielleicht schon eine hydrolytische Spaltung der großen Moleküle in Betracht.

Ein Minimum des osmotischen Druckes, wie es R. S. Lillie bei Gelatine- und Hühnereiweißlösungen unter Säureeinwirkung fand und die Ähnlichkeit der diesen Wirkungen entsprechenden Kurve mit der Kurve der Quellbarkeit (W. Ostwald) konnte aus leicht einzusehenden Gründen nicht gefunden werden. Denn Lillie hat, wie oben angedeutet, durch Säure-, Alkali- usw. Zusatz in der Innen- und Außenflüssigkeit des Osmometers eben nur die hierdurch bedingten osmotischen Druckänderungen der Kolloide bestimmt, während hier das osmotische Verhalten des ganzen Gemisches dem Gefrierpunktwerte entspricht. Abgesehen davon, daß die durch Lillies Untersuchungen gewonnenen Werte am Gefrierpunkt kaum meßbare Unterschiede ergeben, wird durch die anzunehmende Eiweißionenbindung die osmotisch wirksame Konzentration, wie schon erwähnt, erniedrigt und alle die geringen Schwankungen im osmotischen Druck des Kolloides selbst verdeckt. Siehe Tabelle 4.

Die Resultate dieser Untersuchungen stimmen also im wesentlichen überein mit den Beobachtungen, die schon Bugarsky und Liebermann(?) gemacht hatten, nämlich, daß Alkali und Säurezusatz zu Eiweiß geringere Gefrierpunktsdepressionen ergeben, als aus der Summe der Komponenten berechnet werden kann.

Analoge Untersuchungen habe ich weiter mit *Blutserum* ausgeführt und es interessierte besonders, ob gewisse pathologische Sera ein diesbezüglich anderes Verhalten zeigen als normale. Wenigstens steht zu erwarten, daß bei gewissen Fällen von Nephritis schon infolge der Salzretention das Ioneneiweißbindungsvermögen geändert erscheinen sollte, auch wenn der gemessene Gefrierpunkt keine wesentliche Abweichung zeigt; es würde dadurch das osmotische Regulationsvermögen Änderungen erfahren und es können sich Beziehungen zu dem Auftreten charakteristischer Erscheinungen bei Nephritis, wie

der Ödeme oder urämischer Symptome ergeben. Nichts als kausale Momente, sondern als, vielleicht sogar nur indirekt konditionale.

Wie aber aus den folgenden Resultaten ersichtlich ist (Tabelle 5 und 6), sind diese nicht ganz eindeutig. Ich zweifle nicht, daß manche Ausschläge im Sinne einer geänderten Regulationsfähigkeit gedeutet werden können.

Bei den höchst verwickelten Beziehungen, welche zwischen den einzelnen Blutbestandteilen bestehen, kann weder aus dem Gefrierpunkt, noch aus eventuellen Änderungen desselben auf verschiedene Zusätze irgend ein bindender Schluß gezogen werden.

H. Přibram nimmt an, daß bei nephritisch-urämischen Zuständen und anderen endogenen Toxikosen im Blutplasma chemisch und zwar genetisch verschiedene Kolloide auftreten, die charakteristische Vergiftungserscheinungen hervorrufen. Eventuell wäre auch an eine Änderung in den Kolloid-Ionenbindungen als ursächliches Moment für gewisse pathologische Erscheinungen zu denken. Über das alles aber können osmotische Messungen allein nichts aussagen.

Abgesehen davon erlaubt auch, wie oft betont, die Gefrierpunktmessung erst recht beträchtliche osmotische Druckschwankungen zu erkennen, ist also für hier nötige Untersuchungen zu wenig empfindlich und andererseits muß die große Beeinflußbarkeit der Resultate bei der Gefrierpunktsbestimmung durch alle möglichen Bedingungen in Betracht gezogen werden. Wenn man auch in homogenen Systemen genaue Werte erhält und für jede Abweichung Ursachen auffinden kann, ist das bei heterogenen Systemen, wie sie jede Kolloidlösung, insbesondere das Blut darstellt, oft ganz unmöglich.

Das sind die Hauptgründe, weshalb die Gefrierpunktsbestimmung wie die meisten physikalischen Meßmethoden für den klinischen Gebrauch weniger geeignet sind. Die Verwendung der Gefrierpunktmethod für klinische Zwecke geht ziemlich weit zurück. So fand R. v. Jaksch⁽⁸⁾ bei gewissen Formen von Nephritis mit urämischen Symptomen eine stärkere Gefrierpunktsdepression im Blut (Werte bis 0,72) bei gleichzeitiger Ver-

mehrung des Blutharnstoffes und zwar auf Grund dieser Befunde geneigt, wenigstens gewisse Formen von Urämie auf molekulare Konzentrationsänderungen im Blute zurückzuführen. In anderen Fällen von Nephritis mit ebenfalls urämischen Erscheinungen fand er hingegen weder eine besondere Harnstoffvermehrung, noch eine stärkere Gefrierpunktsdepression im Blute.

Dem hochverehrten Chef der Klinik, Herrn Hofrat R. v. Jaksch, bin ich für die Anregung zu obigen Untersuchungen und die auf seiner Klinik gebotene Möglichkeit zur Durchführung der Untersuchungen zu großem Danke verpflichtet.

Zusammenfassung.

1. Kolloidlösungen ergeben auf Zusatz von Molekularlösungen eine sehr geringe Verminderung der Gefrierpunktdepression gegen die berechneten Werte, ebenso auf Zusatz von Kochsalzlösungen.
2. Dagegen zeigen Kolloidlösungen auf Säure und Alkalizusatz beträchtliche Abnahmen der Gefrierpunktdepression gegenüber den berechneten Werten (Bestätigung der Resultate v. Bugarsky und Liebermann).
3. Aus den Änderungen des Gefrierpunktes von pathologischen Blutseren auf verschiedene Molekular- und Ionenzusätze im Vergleich zu normalem Serum läßt sich kein klinisch verwertbarer Schluß ziehen.

Literatur.

1. Nagelschmidt, Zeitschrift für klin. Med., Bd. 42, S. 274 (1901).
2. R. S. Lillie, Amer. Journ. Physiol., Bd. 20, S. 127 (1907).
3. E. W. Reid, Journ. of Physiol., Bd. 31, S. 439 (1904); Bd. 33, S. 12 (1905).
4. W. Biltz und A. V. Vegesack, Zeitschr. f. physik. Chem., Bd. 68, S. 357 (1909); Bd. 73, S. 481 (1910).
5. J. Ducleaux, Compt. rend., Bd. 140, S. 1468, 1544 (1905); Journ. Chem. physik., Bd. 5, S. 40 (1907); Bd. 7, S. 407 (1909); Kolloid Zeitschr., Bd. 3, S. 126 (1918).
6. H. Friedenthal, Physiol. Zentralblatt, Bd. 12, S. 849 (1899).
7. St. Bugarsky und Liebermann, Pflügers Arch. f. Physiol., Bd. 72, S. 51 (1898).
8. R. v. Jaksch, Zeitschrift für Heilkunde, Int. Med., Bd. 24, S. 401 (1903).

Tabelle 1.

2%ige Gelatinelösung	Δ	2%ige Stärke- lösung Δ	Be- rechnete Werte Δ
Ohne Zusatz	0	0	0
Zusatz von gleichen Teilen: 5%ige Harn- stofflösung	-0,795	-0,792	-0,800
Zusatz von gleichen Teilen: 5%ige Glu- koselösung	-0,260	-0,259	-0,268
1 Kolloid + 0,5 Harnstofflösung 5% . . + 0,5 Glukoselösung 5% . .	-0,529	-0,530	-0,535

Tabelle 2.

2%ige Gelatinelösung	Δ	2%ige Stärke- lösung Δ	Be- rechnete Werte Δ
Zusatz von gleichen Teilen einer:			
0,1 %igen NaCl-Lösung	-0,020	-0,033	-0,032
0,25 %igen >	-0,070	-0,078	-0,080
0,5 %igen >	-0,149	-0,153	-0,160
0,1 %igen >	-0,300	-0,300	-0,310

Tabelle 3.

2%ige Gelatinelösung	Δ	2%ige Stärke- lösung Δ	Be- rechnete Werte Δ
Zusatz von gleichen Teilen einer:			
1 %igen KOH-Lösg. n. 30 Min. kryoskop.	-0,178	-0,298	-0,336
> 1 Std. >	-0,155	-0,297	-0,336
> 6 >	-0,140	-0,298	-0,336
0,5 %igen KOH-Lösg. n. 1 Std. kryoskop.	-0,11	-0,139	-0,169
0,25 %igen KOH- > > 1 >	-0,045	-0,068	-0,085
0,1 %igen KOH- > > 1 >	-0,018	-0,025	-0,034
0,1 %igen KOH-Lösg. unmittellb. >	-0,035	—	-0,034

Tabelle 4.

2%ige Gelatinelösung	Δ	2%ige Stärke- lösung Δ	Be- rechnete Werte Δ
Zusatz von gleichen Teilen einer:			
1 %igen HCl-Lösung	-0,385	-0,490	-0,514
0,5 %igen HCl- »	-0,199	-0,225	-0,256
0,25 %igen HCl- »	-0,070	-0,099	-0,128
0,1 %igen HCl- »	-0,030	-0,045	-0,052

Tabelle 5. Kryoskopisch normale Sera.

	Klinische Diagnose der Fälle, von denen das Serum stammt		
	Atherosklerose	CO-Vergiftung	Malaria
Δ des Serums	-0,570	-0,562	-0,560
Δ nach Zusatz gleicher Teile von:			
H ₂ O	-0,290	-0,280	-0,285
5%ige Harnstofflösung	-1,390	-1,385	-1,380
5%ige Glukoselösung .	-0,844	-0,835	-0,830
0,5%ige NaCl-Lösung .	-0,733	-0,729	-0,705
0,5%ige KOH-Lösung .	-0,655	-0,660	-0,615
0,5%ige HCl-Lösung .	-0,710	-0,745	-0,695

Tabelle 6. Nephritische Blutsera.

	Klinische Diagnose der Fälle, von welchen das Serum stammt		
	Akute Nephritis Oligurie	Akute Nephritis Anurie, Urämie	Chronische Nephritis
Δ des Serums	-0,645	-0,620	-0,575
Δ nach Zusatz gleicher Teile von:			
H ₂ O	-0,335	-0,330	-0,285
5%ige Harnstofflösung	-1,465	-1,450	-1,375
5%ige Glukoselösung .	-0,920	-0,895	-0,850
0,5%ige NaCl-Lösung .	-0,800	-0,745	-0,738
0,5%ige KOH-Lösung .	-0,725	-0,703	-0,660
0,5%ige HCl-Lösung .	-0,805	-0,799	-0,780