

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XV, 18

SECTIO D

1960

Z Katedry i Kliniki Neurologicznej Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: prof. dr med. Wiktor Stein

Wiesław KAWIAK

**Znaczenie frakcji globulinowej w płynie mózgowo-rdzeniowym
wytrącanej przy pomocy siarczanu cynkowego**

**Значение глобулиновой фракции в спинномозговой жидкости,
осаждаемой с помощью сернокислого цинка**

**The Meaning of the Sulphate Reaction in the Cerebrospinal Fluid.
Considerations Based on the Technique of Donovan, Foley and Moloney**

Na podstawie badań elektroforetycznych, przeprowadzonych w wielu ośrodkach badawczych (H. Delank, M. Mumenthaler i H. Markisen., C. Schmidt i H. Matiar, H. Bauer i I. Angelstein oraz A. Knapp), można przyjąć, że płyn mózgowo-rdzeniowy zawiera przede wszystkim albuminy oraz 5 frakcji globulinowych. Wszystkie wymienione frakcje białkowe są ciałami chemicznie czynnymi w stosunku do koloidów (A. Dowzenko). Albuminy wywierają działanie ochronne, natomiast globuliny (szczególnie γ -globuliny) powodują wytrącanie ciał koloidowych. J. Cervos-Navarro i H. Matiar uważają, że globuliny występujące w płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzą częściowo z układu nerwowego, częściowo zaś także z surowicy krwi częściej w wypadku uszkodzenia bariery krwio-płynowej. K. Scheid, L. Scheid i W. Schneidt nie obserwowali wyraźnej różnicy w działaniu wytrącającym γ -globulin otrzymanych z surowicy krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego. Korzystając z różnych mieszanin odpowiednich frakcji białkowych, uzyskanych z surowicy krwi, K. Scheid, L. Scheid i W. Schneidt otrzymywali dowolne krzywe koloidowe (T. Rymkiewicz).

H. Demme powołując się na prace Duenzinga podkreśla, że całkowita ilość globulin nie posiada wyłącznego znaczenia dla odczynów koloidowych. Przy tych samych ilościach globulin zawartych w płynie mózgowo-rdzeniowym w przebiegu różnych chorób ośrodkowego układu nerwowego, otrzymuje się różne krzywe koloidowe, a zatem rozstrzygającą rolę odgrywają tu stężenia poszczególnych frakcji globulinowych i ich stosunek do poziomu albumin (A. Dowzenko). Możliwe jest także, że na odczyny koloidowe mają wpływ produkty rozpadu białka, które występują w płynie mózgowo-rdzeniowym w różnych schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego (H. Bauer i I. Angelstein). W związku z tym można sądzić, że bardziej celowe jest oznaczanie ilościowe poszczególnych

frakcji białkowych w płynie mózgowo-rdzeniowym niż wykonywanie odczynów koloidowych, które są mniej czułe i w mniejszym stopniu patognomiczne.

Szczególnie duży wpływ na zjawiska koloidowe zdają się wywierać γ -globuliny, które są główną składową przeciwciała. Stężenie tej frakcji globulinowej w patologicznych płynach mózgowo-rdzeniowych jest często w dość dużym stopniu podwyższone (H. Demme, D. K. Ziegler i H. G. Ross, A. Knapp, H. Schinko i H. Tschabitscher, H. Delank). Spośród schorzeń ośrodkowego układu nerwowego, w których przebiegu obserwuje się wyraźny wzrost stężenia γ -globulin w płynie mózgowo-rdzeniowym, H. Schinko i H. Tschabitscher wymieniają przede wszystkim podostre zapalenie mózgu van Bogaerta, stwardnienie rozsiane, wiał rdzenia oraz porażenie postępujące.

Wprowadzenie odczynu złotowego do diagnostyki płynu mózgowo-rdzeniowego w roku 1912 (A. Dowżenko) pozwoliło wykazać wyraźne zmiany w zachowaniu się koloidalnego chlorku złotowego wobec płynu mózgowo-rdzeniowego, w którym wystąpiły ilościowe przesunięcia w stężeniu poszczególnych frakcji białkowych. Krytyczna ocena metody badawczej, opartej na właściwościach chlorku złotowego (odczynu złotowego) spowodowała poszukiwanie innych odczynów koloidowych (A. Dowżenko, T. Rymkiewicz). Zgodnie z nauką o koloidach stwierdzającą, że ciałami białkowymi wpływającymi na zjawiska koloidowe (wytrącanie ciał koloidowych) są przede wszystkim γ -globuliny, rozpoczęto poszukiwania odczynów chemicznych właściwych γ -globulinom. A. M. Donovan, J. M. Foley i W. C. Moloney opracowali w r. 1951 metodę wytrącania γ -globulin w płynie mózgowo-rdzeniowym przy pomocy 0,005 molarnego roztworu siarczanu cynkowego ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) zbuforowanego niewielką ilością mieszaniny kwasu dwuetylobarbiturowego i dwuetylobarbituranu sodowego. Metoda opracowana przez Donovaną, Foleya i Moloneya jest oparta na reakcji chemicznej (w pewnym stopniu także na zmianie ładunków elektrycznych), zachodzącej między γ -globulinami i siarczanem cynkowym ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), w wyniku której stopień rozproszenia cząsteczek γ -globulin ulega zmniejszeniu, powodując wytrącenie tej frakcji globulinowej. Zjawisko to można obserwować w postaci tworzącego się, w różnym stopniu wyraźnego strątu. Zgodnie ze sprostaczeniami autorów najbardziej dodatnie wyniki można uzyskać przy pomocy tej metody w przypadkach ilościowych schorzeń układu nerwowego, głównie wiału rdzenia, oraz w stwardnieniu rozsianym.

BADANIA WŁASNE

Badania przeprowadzone przez nas miały na celu wykazanie wartości klinicznej opisanej wyżej metody. W tym celu używaliśmy odczynnika o następującym składzie chemicznym:

1,44 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$.

3,62 g *acidi diaethylbarbiturici*.

1,20 g *natrii diaethylbarbiturici*.

Wymienione wyżej składniki należy rozpuścić w 1000 ml przekropionej wody, ogrzewając nieznacznie całość w łaźni wodnej i doprowadzić pH roztworu do wartości 6,9 co posiada duże znaczenie dla uzyskania prawidłowych wyników oznaczeń. Techniczne wykonanie odczynu cynkowego polega na zmieszaniu jednego ml odczynnika z jednym ml płynu mózgowo-rdzeniowego w próbówce o średnicy 0,5 cm. W celu dokład-

nego wymieszania należy probówkę wraz z jej zawartością ruchem niezbyt szybkim raz odwrócić i następnie odstawić na 4 godziny, umieszczając probówkę w ciemnym miejscu.

Poza odczynem cynkowym wykonaliśmy w każdym przypadku odczyn złotowy, odczyn Nonnego oraz oznaczyliśmy całkowite stężenie białka metodą Stolnikowa i ilość elementów komórkowych w badanym płynie mózgowo-rdzeniowym. Badania były powtarzane u tego samego chorego. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń ustalono następujące warunki prawidłowego wykonania odczynu cynkowego: 1) czasowa trwałość odczynnika wynosi około 2 tygodni. 2) pH odczynnika winno wynosić dokładnie 6,9 i przed każdym oznaczeniem wartość tę należy sprawdzić. Taka bowiem wartość pH środowiska ma duży wpływ na stopień wytrącenia γ -globulin. 3) Płyn mózgowo-rdzeniowy winien być użyty do wykonania próby tuż po dokonaniu nakłucia lędźwiowego i nie może zawierać krwi. 4) Probówkę należy odwracać tylko raz i ruchem niezbyt szybkim. 5) Stopień strącenia γ -globulin należy oceniać na ciemnym tle, po upływie 4 godzin. 6) Przy ocenie stopnia strącenia należy posługiwać się następującym schematem: osad na brzegu dna probówki (+), delikatny, zwarty osad (++) , osad i lekkie zmętnienie ponad nim (+++), znaczniejsze wytrącenie (++++) .

W doborze materiału badawczego uwzględniliśmy poza przypadkami wiału rdzenia i stwardnienia rozsianego, także przypadki kiły mózgowo-rdzeniowej, zapalnych schorzeń opon mózgowo-rdzeniowych, krwotoków podpajęczynówkowych oraz materiał kontrolny.

Przebadano 50 przypadków stwardnienia rozsianego, w tym 12 z ostrymi objawami schorzenia. Uzyskano w 45 przypadkach tej choroby dodatni wynik odczynu cynkowego, w każdym zaś przypadku ostrej formy choroby wynik odczynu był zawsze wybitnie dodatni. Wśród przypadków stwardnienia rozsianego, w których wyniki odczynu cynkowego były ujemne, stwierdzano także fizjologiczny obraz chemiczno-białkowy płynu mózgowo-rdzeniowego. Wyraźny wpływ na dodatni wynik odczynu cynkowego miał skład białkowy płynu mózgowo-rdzeniowego, nie zaś pleocytoza. W początkowych okresach tej choroby wyniki odczynu cynkowego były zawsze wyraźniejsze, niż w późniejszych. W każdym przypadku zaostrzenia choroby uzyskiwano równie dodatni wynik odczynu, a zatem podobnie jak w początkowym okresie tego schorzenia.

Wśród 10 przypadków wiału rdzenia, uwzględnionych w naszym materiale, w 8 przypadkach istniały wyraźne zmiany patologiczne w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz dodatnie odczyny serologiczne w krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym. We wszystkich przypadkach tego schorzenia uzyskano wyraźnie dodatnie (60%) lub wybitnie dodatnie (40%)

wyniki odczynu cynkowego. W przeprowadzonym równolegle do powyższych oznaczeń odczynie złotowym obserwowano w tych przypadkach zawsze wyraźne zmiany zabarwienia po lewej stronie szeregu probówek. Na podstawie szczupłego materiału, dotyczącego przypadków wiađu rdzenia wydaje się, że nie ma ścisłej zależności wyników odczynu cynkowego od okresu tej choroby.

Przebadano także 15 przypadków kiły mózgowo-rdzeniowej i w 12 przypadkach tego schorzenia stwierdzono charakterystyczny wynik odczynu złotowego. Dodatkowo wyniki odczynu cynkowego obserwowano w 10 przypadkach. W większości objętych badaniem przypadków kiły mózgowo-rdzeniowej wyniki były średnio dodatnie, jakkolwiek w przypadkach bardziej zaawansowanych, a zatem z bogatym zespołem objawów klinicznych, stopień strącenia był zwykle znaczniejszy (++), w żadnym jednak nie osiągał tej wartości, jaką stwierdzono w wiađdzie rdzenia.

Wśród 25 przypadków gruźliczego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych obserwowano w odczynie złotowym zmiany zabarwienia z reguły w końcowych probówkach. W 12 przypadkach tego schorzenia uzyskano średnio dodatnie wyniki (++) odczynu cynkowego. Dodatkowo wyniki tego odczynu stwierdzano przede wszystkim w początkowym okresie omawianego schorzenia oraz w tych przypadkach gruźliczego zapalenia opon mózgowych, w których obserwowano bardzo wysoki poziom białka w płynie mózgowo-rdzeniowym (około 1000 mg%). Zatem wyniki odczynu cynkowego były w większości przypadków gruźliczego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych średnie, natomiast w nielicznych przypadkach wybitne (około 1%) i szybko zmniejszały się pod wpływem stosowanego leczenia.

W przebadanych natomiast 10 przypadkach limfocytowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych nie otrzymano ani jednego wyniku dodatniego odczynu cynkowego. Odczyn złotowy był, z wyjątkiem jednego przypadku, również ujemny.

W materiale badawczym uwzględniono także 11 przypadków krwotoków podpajęczynówkowych z różną zawartością krwi w płynie mózgowo-rdzeniowym. We wszystkich przypadkach krzywe w odczynie złotowym były patologiczne i miały charakter bądź krzywych obserwowanych w porażeniu postępującym, bądź zbliżony do tych krzywych. Wyniki odczynu cynkowego były we wszystkich przypadkach krwotoków podpajęczynówkowych dodatnie i tym wyraźniejsze, im krzywe złote były bardziej zbliżone do krzywych, charakterystycznych dla porażenia postępującego. Odczyn cynkowy stawał się stosunkowo szybko ujemny, jeśli chory powracał do zdrowia. Obserwowano przy

tym, że zmiany zabarwienia w odczynie złotowym utrzymywały się przez okres dłuższy niż dodatnie wyniki w odczynie cynkowym.

W badaniach naszych uwzględniono także 12 chorych, u których rozpoznano zapalenie wielonerwowe o różnej etiologii, znajdujących się w różnych okresach choroby. Spośród chorych tej grupy jedynie u 2 z zespołem Guillain-Barre wykazano średnio dodatnie wyniki odczynu cynkowego.

Materiał kontrolny obejmuje 30 przypadków, w których płyn mózgowo-rdzeniowy nie był zmieniony zarówno pod względem cytologicznym, jak i chemicznym. Jedynie w 2 z przebadanych przypadków kontrolnych uzyskano dodatnie wyniki w odczynie cynkowym. Wyniki te były słabo dodatnie. Wyniki odczynu złotowego były we wszystkich przypadkach prawidłowe.

Grupy opisane wyżej obejmują 163 przypadki, w tym 30 przypadków kontrolnych. W 68 przypadkach odczyn cynkowy był wyraźnie ujemny, natomiast w 95 w różnym stopniu dodatni. Wyniki badania ujęto w tabeli 1. Poza tym obserwowano dodatnie lub ujemne wyniki tego odczynu w różnych chorobach układu nerwowego (np. rwa kulszowa, guzy rdzenia). Ze względu jednak na szczupłą ilość przypadków nie można było połączyć ich w grupy.

Tab. 1 Zestawienie wyników doświadczeń
Results of the experiments

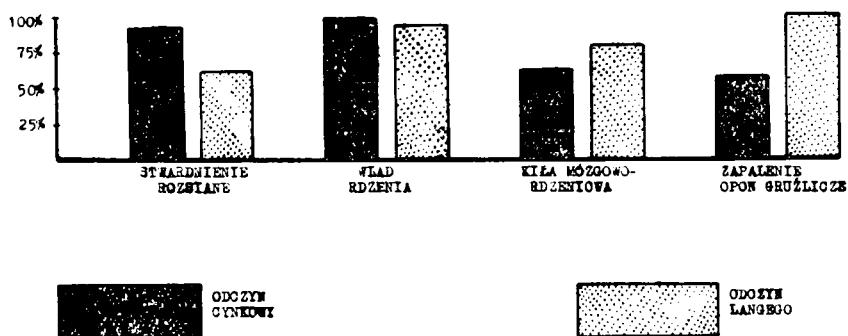
Rodzaj choroby	Ilość przypadków	Wyniki dodatnie				Ilość wyników dodatnich	Ilość wyników ujemnych
		słabe (+)	średnie (++)	znaczne (+++)	wybitne (++++)		
Stwardnienie rozsiane	50	3	2	30	10	45	5
Wiąd rdzenia	10			6	4	10	
Kiła mózgowo-rdzeniowa	15	1	6	3		10	5
Gruźlicze zapalenie opon mózgowych	25	2	10		2	14	11
Limfocytowe zapalenie opon mózgowych	10						10
Krwotok podpajęczynówkowy	11	5	3	2	1	11	
Zapalenie wielonerwowe	12		3			3	9
Materiał kontrolny	30	2				2	28
R A Z E M	163	13	24	41	17	95	68

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Na podstawie uzyskanych wyników badań można wyprowadzić następujące wnioski:

1. Odczyn cynkowy wypada dodatnio przede wszystkim w tych przypadkach, w których zmiany zabarwienia w odczynie złotowym występują po stronie lewej szeregu probówek.

2. Istnieje znaczna zgodność wyników uzyskanych przy pomocy obydwu wymienionych odczynów. Procentową zależność wyników uzyskanych w obydwu odczynach, na których oparte są nasze badania ilustruje ryc. 1.



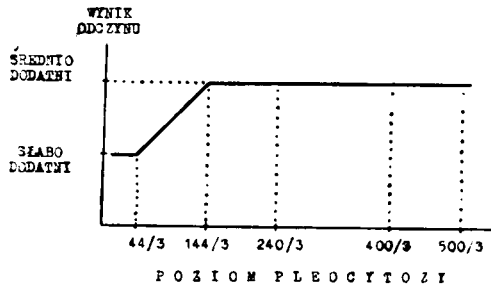
Ryc. 1. Zestawienie procentowych stosunków wyników otrzymanych w badaniach z odczynem cynkowym i złotowym.

Percentage relations between the results obtained from investigations on zinc and gold reactions

3. Na podstawie przebadanego materiału wydaje się, że odczyn cynkowy w porównaniu z danymi procentowymi dodatnich wyników uzyskanych w odczynie złotowym jest metodą równie czułą jak odczyn złotowy, a w przypadkach władu rdzenia i stwardnienia rozsianego może nawet bardziej czułą niż odczyn złotowy.

4. Odczyn cynkowy może być dodatni przy prawidłowej ogólnej ilości białka w płynie mózgowo-rdzeniowym, a ujemny przy podwyższonym jego stężeniu, jakkolwiek w przypadkach gruczliczego i ropnego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych z dużą zawartością białka w płynie mózgowo-rdzeniowym (około 1000 mg⁰/o) obserwowano wyraźnie dodatnie wyniki tego odczynu z dość znacznym stopniem strącenia. Zdaje się być sprawą bardzo prawdopodobną, że w tych przypadkach wpływ na wynik odczynu wywierają także pozostałe frakcje globulinowe (przede wszystkim β -globuliny), których stężenie w płynie wzrasta w wyniku znacznego podwyższenia całkowitego poziomu białka.

5. Ilość i jakość elementów komórkowych w płynie mózgowo-rdzeniowym nie wpływa wyraźnie na wynik odczynu cynkowego, co przedstawia ryc. 2, ilustrująca zachowanie się poziomu pleocytozy i wyników odczynu cynkowego.



Ryc. 2. Zachowanie się poziomu pleocytozy i odczynu cynkowego w płynie mózgowo-rdzeniowym.

Behaviour of pleocytosis level and of zinc reaction in cerebro-spinal fluid

6. Obserwowano brak zupełnej zgodności wyników odczynu cynkowego i odczynu Nonnego. Zjawisko to jest zrozumiałe, jeśli zauważymy, że wynik odczynu cynkowego jest charakterystyczny przede wszystkim dla frakcji γ -globulinowej, zaś odczyn Nonnego jest zależny od stężenia wszystkich frakcji globulinowych w płynie mózgowo-rdzeniowym, a w pewnym stopniu także od poziomu albumin w tej cieczy ustrojowej (A. D o w ż e n k o).

7. Na podstawie wartości wyników odczynu cynkowego można w znacznej części przypadków stwardnienia rozsianego, wiału rdzenia i krwotoków podpajęczynówkowych ocenić czynność procesu chorobowego. Oczywiście jest to możliwe tylko w tych przypadkach spośród wymienionych chorób, w których rozwój schorzenia znajduje pełne odbicie w kształtowaniu się obrazu chemiczno-białkowego płynu mózgowo-rdzeniowego.

8. Odczyn cynkowy nie jest charakterystyczny wyłącznie dla przypadków stwardnienia rozsianego i wiału rdzenia, jakkolwiek w tych schorzeniach wypada według naszych spostrzeżeń dodatnio w 90%.

9. Odczyn cynkowy jest metodą czułą i prostą w wykonaniu i z tego powodu może być wykorzystany dla celów diagnostycznych i dla oceny przebiegu schorzenia w przypadkach stwardnienia rozsianego i wiału rdzenia. Wydaje się jednak, że odczyn ten może zastąpić tylko w pewnym stopniu elektroforetyczne badanie białek płynu mózgowo-rdzeniowego.

10. Wyniki uzyskane w naszych badaniach są w dużym stopniu zgodne z osiągnięciami Donovana, Foleya i Moloneya.

PISMIENNICTWO

1. Bauer H.: Zur Frage der Identität der Liquorproteine mit den Eiweisskörpern des Blutserums. Deutsche Zeitschr. f. Nervenheilk. **175**, 354—377, 1956.
2. Bauer H., Angelstein I.: Zur Methodik der Gesamteiweissbestimmung im Liquor. Klin. Wochenschr., **11/12**, 277—279, 1952.
3. Cervos-Navarro J., Matiar H.: Zur Frage der intrathekalen Regulation und Genese der Liquorproteine. Deutsche Zeitschr. f. Nervenheilk. **179**, 614—638, 1959.
4. Delank H. W.: Klinische Erfahrungen mit elektroforetischen Liquoreiweissuntersuchungen. Deutsche Zeitschr. f. Nervenheilk **174**, 429—442, 1956.
5. Delank H., Machentanz E.: Das Syndrom der proteino-cytologischen Dissoziation im Liquor cerebrospinalis. Deutsche Zeitschr. f. Nervenheilk., **174**, 189—198, 1956.
6. Demme H.: Liquor. Fortschr. Neurol. Psych., **4**, 169—208, 1950.
7. Demme H.: Liquor. Fortschr. Neurol. Psych., **10**, 455—502, 1953.
8. Demme H.: Liquor. Fortschr. Neurol. Psych., **3**, 113—148, 1956.
9. Donovan A. M., Foley J. M., Moloney W. C.: The precipitation of cerebro-spinal fluid globulin by zinc sulphate. Labor. Clin. Med. **37**, 374—381, 1951.
10. Dowżenko A.: Płyn mózgowo-rdzeniowy w stwardnieniu rozsianym. Now. Lek., **10**, 178—184, 1947.
11. Dowżenko A.: Znaczenie badania białka w diagnostyce płynu mózgowo-rdzeniowego, Lekarski Instytut Naukowo-Wydawniczy, Warszawa 1947, 1—17.
12. Dowżenko A.: O pochodzeniu krzywej „paralitycznej”. Pol. Tyg. Lek., **41**, 1172—1174, 1947.
13. Knapp A.: Über die Papierelektrophorese des Liquor cerebrospinalis. Arch. Klin. Exper. Dermat., **201**, 446—477, 1955.
14. Mumenthaler M., Märki H.: Über die Liquorelektrophorese. Methodik und klinische Anwendung. Klin. Wochenschrift, **1**, 2—7, 1957.
15. Rymkiewicz T.: O odczynie kolargolowym Riebelinga. Neurol. Neurochirurg. i Psych. Pol., **6**, 675—691, 1952.
16. Scheid K. F., Scheid L., Schneidt W.: Studien zur pathologischen Physiologie der Liquor cerebrospinalis. V Mitteilung. Excerpta Medica, Sec. VIII, **2**, 343, 1949.
17. Schinko H., Tschabitscher H.: Der Quotient als Ausdruck der Relation Liquor — zu Serum — γ -Globulin. Eine statische Untersuchung bei Multipler Sclerose, Neuro-Lues, entzündlichen und degenerativen Erkrankungen des Nervensystems. Wiener Klin. Wochenschr., **38**, 705—713, 1957.
18. Schmidt C., Matiar H.: Das quantitative Verhältnis der Serum- und Liquorproteine. Deutsche Zeitschr. f. Nervenheilk., **174**, 443—459, 1956.
19. Ziegler D. K., Ross G.: Cerebrospinal fluid γ -globulin as a diagnostic test for multiple sclerosis. Neurology, **5**, 573—579, 1955.

РЕЗЮМЕ

Донован, фоли и Молони в 1951 году разработали метод определения степени концентрации γ — глобулиновой фракции в спинномозговой жидкости с помощью раствора сернокислого цинка, при употреблении буферной смеси диэтилбарбитуровой кислоты и диэтилбарбурата натрия. Авторами получены хорошие эффекты осаждения

γ — глобулинов в случаях сифилистических заболеваний нервной системы, главным образом при прогрессивном параличе, а также при рассеянном склерозе.

Целью произведенных исследований было показать клиническую ценность указанного выше метода. Установлено, что цинковая реакция не является характерной исключително для случаев рассеянного склероза и прогрессивного паралича, однако представляет в такой же степени чувствительный метод, как и золотая реакция, и может быть использована в клинической практике для диагностических целей и для оценки хода болезни в случаях рассеянного склероза и прогрессивного паралича. Решительное влияние на результат цинковой реакции оказывает уровень γ — глобулинов в спинномозговой жидкости, а не полный уровень белков в жидкости. Количество и род клеточных элементов в спинномозговой жидкости не влияет в более значительной степени на результат цинковой реакции.

Рис. 1. Сопоставление процентных отношений результатов, полученных в экспериментах с цинковой и золотой реакциях.

Рис. 2. Поведение уровня плеоцитоза и цинковой реакции в спинномозговой жидкости.

Табл. 1. Сопоставление результатов, полученных в исследованиях над применением цинковой реакции при различных заболеваниях нервной системы.

SUMMARY

Donovan, Foley and Moloney found in 1951 that in cases of syphilitic affections, mainly tabes dorsalis and of multiple sclerosis, zinc sulphate causes an important precipitation of γ -globulines in the cerebro-spinal fluid.

The author obtained strong positive results with multiple sclerosis and tabes, less marked reactions in cases of tuberculous meningitis and subarachnoid hemorrhage and found the reaction to be as marked as Lange's gold-sol test.

The zinc sulphate reaction can be of use for diagnostic purposes and for evaluation of the course of tabes and multiple sclerosis. The precipitation depends on the level of γ -globulines and not of the whole protein content. The reaction seems not to be influenced by the quantity and type of cells in the cerebro-spinal fluid.

