

(Aus der Landesstelle für öffentliche Gesundheitspflege Dresden [Hygienische Abteilung Prof. Kuhn].)

## Untersuchungen über die Naphthol-Peroxydase des Blutes.

Von

Dr. W. Loele.

(Eingegangen am 9. Dezember 1923.)

Setzt man zu einer Blutlösung eine Lösung von  $\alpha$ -Naphthol und von Wasserstoffsuperoxyd, so tritt eine dunkelviolette Färbung ein. Der Ausfall der Reaktion ist abhängig von der Konzentration der einzelnen Lösungen.

Die Blutlösung stellt man sich her, indem man einen Teil frisch-entnommenen Blutes in 50 Teilen destilliertem Wasser oder einen Teil roter Blutkörperchen in 100 Teilen Wasser löst. Auszüge von Blutflecken können colorimetrisch eingestellt werden.

Eine farblose und annähernd konstante Naphthollösung erhält man, wenn man einen gehäuften Teelöffel von  $\alpha$ -Naphthol in einen Liter physiologischer Kochsalzlösung bringt und schüttelt. Nach 3 Stunden ist die Lösung gesättigt. Durch die Anwesenheit des Elektrolyten wird die allmählich durch Oxydation sich bildende violette Farbsäure ausgeflockt, und die Lösung ist nach dem Filtrieren stets klar. Die Wasserstoffsuperoxydlösung stellt man sich her, indem man einen Teil der 30proz. Merckschen Perhydrollösung mit 29 Teilen destilliertem Wasser verdünnt. (1%).

### *Konzentration der Blutlösung.*

Gibt man in Wassermann-Gläschen je 1 ccm der Naphthollösung, 1 ccm der 10fach verdünnten Perhydrollösung (1‰) und auf 1 ccm mit Wasser aufgefüllt von 0,1 bis 1,0 steigende Mengen einer Lösung von Hammelblutkörperchen (ein Teil gewaschene Hammelblutkörperchen + 99 Teile destilliertes Wasser), so erhält man eine völlig gesetzmäßig abfallende Farbreaktion, die bei den stärkeren Blutkonzentrationen mit einer schwärzlichen Ausflockung verbunden ist. Die Reaktion ist bei 0,1-Blut sehr schwach und nimmt allmählich an Stärke zu.

*Konzentration der Naphthollösung.*

Fast die gleiche Abstufung der Reaktion erhält man, wenn man die Naphtholmengen stufenweise einwirken läßt. Bei 0,1-Naphthol ist die Reaktion sehr schwach und nimmt allmählich an Stärke zu.

*Konzentration der Wasserstoffsuperoxydlösung.*

Verändert man die Mengen der 1 promill. Perhydrollösung von 0,1 bis 1,0 bei konstantem Blut- und Naphtholgehalt, so ist die Abstufung nicht so deutlich. Bei 0,1 ist die Reaktion sehr schwach, aber bereits bei 0,2 fast so stark wie bei den stärkeren Konzentrationen.

Verdünnst man die Blutlösung und gleichzeitig die Naphthollösung, so zeigt sich, daß bei schwächeren Naphthollösungen eine stärkere Naphtholreaktion eintritt, wenn das Blut verdünnt war. Ist die Blutlösung vierfach verdünnt, dann erhält man die besten Ergebnisse auch mit einer vierfach verdünnten Naphthollösung.

*Einfluß der Art des Blutes.*

Stellt man sich Lösungen von menschlichem und tierischem Blute verschiedener Arten her und gibt auf 1 ccm Blutlösung 1 ccm der Naphthollösung und verschiedene Mengen von Wasserstoffsuperoxyd, so erhält man wesentliche Unterschiede. Frisches Hundeblood gibt die Naphtholreaktion bereits bei 0,005 Wasserstoffsuperoxyd (1proz. Lösung), Hammelblut bei etwa 0,01 ccm. Es folgen dann Rind und Pferd. Die Reaktion von Mäuseblut tritt ein bei 0,05.

Wesentlich höhere Mengen von Wasserstoffsuperoxyd braucht frisches Blut von Meerschweinchen, Mensch und Kaninchen. Die Reaktion ist bei Meerschweinchen bei etwa 2,0 ccm deutlich, bei Menschen und Kaninchen oft erst bei Mengen von über 3 ccm. Starke Reaktion geben auch Schwein, Karpfen, Schleie, Gans, Huhn, fast negativ war Aalblut.

*Einfluß der Zersetzung des Blutes.*

Durch Veränderung des Blutes verändern sich die Verhältnisse ganz wesentlich und bei verschiedenen Tieren ganz verschieden. Löst man einmal frisches Meerschweinchenblut in destilliertem Wasser und läßt weiter eine abgemessene Blutmenge auf Filtrierpapier eintrocknen und löst das eingetrocknete Blut nach einer Stunde in einer entsprechenden Menge von destilliertem Wasser, so gibt das direkt gelöste Blut bei Zusatz von 1 ccm der 1proz. Perhydrolösung höchstens eine Andeutung der Reaktion. Das angetrocknete Blut gibt dagegen eine schwache Reaktion bereits bei 0,1 Wasserstoffsuperoxyd.

Nach 24stündigem Stehen gab die frische Blutlösung erst bei 1,0- $\text{H}_2\text{O}_2$  eine deutliche Reaktion, nach längerem Stehen wird die Reaktion immer deutlicher und erfordert geringere Mengen  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Menschliches Blut gibt beim Eintrocknen in der Regel bei 0,5 ccm  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1%) eine schwache Reaktion. Löst man frisches Menschenblut in destilliertem Wasser und läßt die Lösung an der Luft stehen, wobei sie nicht fault, so wird nach einigen Wochen auch bei menschlichem Blut die Reaktion bei kleinen Mengen  $\text{H}_2\text{O}_2$  noch deutlich, im Gegensatz zu frischen Auszügen aus eingetrockneten Flecken, die nach den bisherigen Erfahrungen wenigstens nicht unter 0,5- $\text{H}_2\text{O}_2$  eine Reaktion gaben.

#### *Einfluß der Wärme.*

Bei 0° verläuft die Reaktion sehr langsam, durch Erwärmen wird sie beschleunigt. Gekochte Blutlösungen gaben die Reaktion nicht mehr. Im Gegensatz hierzu wird die Peroxydase-Reaktion mit Benzidin bekanntlich nicht durch Kochen zerstört.

#### *Einfluß von Säuren.*

Wurde zu 1 ccm Hammelblutlösung 1 ccm einer Normal,  $\frac{1}{10}$  N,  $\frac{1}{100}$  N,  $\frac{1}{1000}$  N,  $\frac{1}{10000}$  N-Säure gegeben, so war bei organischen wie anorganischen (Salz-, Salpeter-, Schwefel-, Oxalsäure) Säuren nach Zusatz von Naphthol- und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung bei Verwendung der  $\frac{1}{100}$  Normalsäure und höherer Konzentrationen die Reaktion negativ, dagegen bei Verwendung der  $\frac{1}{1000}$  Säure stärker positiv wie in der säurefreien Kontrolle. Normaloxalsäurelösungen geben eine schwache Färbung noch bei einer Verdünnung von  $\frac{1}{300}$ , während bei dieser Konzentration die anorganischen Säuren bereits die Peroxydase zerstören und erst von  $\frac{1}{400}$ -Lösungen ab unwirksam werden. Eine bestimmte H-Ionenkonzentration ist demnach für das Zustandekommen der Reaktion günstig.

#### *Einfluß von Phenolen.*

Phenole (Carbolsäure, Resorcin, Pyrogallol u. a.) geben an sich eine gelbe bis braune Peroxydasereaktion. Lösungen von menschlichem Blut geben bei Phenolzusatz die Naphtholreaktion mit kleineren Mengen  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### *Einfluß von Laugen.*

Verwickelter ist die Beurteilung der Wirkung von Laugen, weil hier mehrere Einflüsse nebeneinander hergehen. Der bei der Oxydation von Naphthol entstehende saure violette Farbstoff wird durch die Einwirkung von Laugen in einen gelben Farbstoff umgewandelt, so daß

schon aus diesem Grunde die Reaktion meist sehr bald nicht mehr zu beurteilen ist. Weiter wirken aber Laugen mit bestimmten Mengen  $\text{H}_2\text{O}_2$  außerordentlich stark reduzierend, so daß keine Farbreaktion eintritt. In einem derartigen Versuche mit Hammelblutlösung war bei Verwendung einer  $1/100$  Normalnatronlauge die Reaktion mit  $0,01\text{-H}_2\text{O}_2$  positiv, mit  $1,0\text{-H}_2\text{O}_2$  völlig negativ. Bei Verwendung von  $1/100$  und  $1/1000$  Normallösung war die Reaktion *schwächer*, wie in der alkalifreien Kontrolle. Durch Alkalisierung des Blutes schwinden die Artunterschiede, in Laugen gelöste Flecke von Menschenblut geben so starke Reaktionen wie Hammelblut.

Die reduzierende Wirkung einer alkalischen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung läßt sich an dem folgenden Versuch zeigen. Man stellt sich eine 0,25 proz. Lösung von Paraamidophenol-Chlorhydrat- und eine 1 proz. Carbolsäurelösung her und gibt zu je einem Kubikzentimeter der Lösungen (ää) steigende Mengen von Kalilauge und  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Man findet dann folgendes: Kleine Mengen von Alkali verursachen eine tiefblaue Färbung, die nach Zugabe größerer Mengen Alkali mehr violett wird. Auch die violetten Lösungen zeigen da, wo der Sauerstoff der Luft herantritt, eine stark blaue Farbe. Gibt man nun gleichzeitig noch  $\text{H}_2\text{O}_2$  hinzu, so tritt bei Verwendungen von kleinen Mengen Kalilauge statt der Blaufärbung eine grüne Färbung ein, während bei großen Alkalimengen die violette Farbe in eine gelbliche umschlägt. Größere Mengen  $\text{H}_2\text{O}_2$  entfärben die Lösungen völlig.

Es hängt also die Farbe in diesem System nicht ab von der Konzentration und der Beschaffenheit der Farbstoff bildenden Lösungen, sondern von den Reduktions-Oxydationsvorgängen innerhalb des Systems.

Die 4 Farben nebeneinander (in der Spektralanordnung) kann man durch folgenden Versuch darstellen. Man säuert die alkalische blaue Lösung mit Schwefelsäure, bis eine rote Farbe eintritt und schichtet dann die blaue Lösung darüber. An der Grenze beider Lösungen bildet sich ein gelber Ring und zwischen Gelb und Blau eine grüne Zwischenzone.

Verändert man das System durch Hinzufügen eines cyclischen oder heterocyclischen Aldehydes (Salicylaldehyd, Furfurol), der mit Amidophenollösung einen gelben Farbstoff bildet, so wird der nach Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei der Oxydation von Amidophenol sich bildende violette Farbstoff dabei reduziert, so daß die Lösung rein gelb bleibt. Bei steigendem Alkalizusatz geht die gelbe Farbe über Grün in Blau über.

Gibt man in eine derartige gelbe Lösung von Salicylaldehyd, Amidophenol und  $\text{H}_2\text{O}_2$  statt Carbolsäure  $\alpha$ -Naphthollösung, so bleibt die gelbe Farbe unverändert bestehen. Steckt man aber in diese Flüssigkeit eine junge Maispflanze, so tritt in einem Teil der Wurzel eine weinrote Verfärbung, in anderen Teilen (besonders in den größeren Seitenwurzeln) eine reine dunkelviolette Naphtholreaktion ein. Es läßt sich demnach bis zu einem gewissen Grade aus den Veränderungen des Farbsystems ein Schluß ziehen, in welcher Weise und durch welche Stoffe die Oxydations-Reduktionsvorgänge beeinflusst werden.

#### *Einfluß von quartären Aminen und von cyclischen Amidoverbindungen.*

Die quartären Amine wirken ähnlich wie Laugen (Cholin, Neurin).

Cyclische Amidoverbindungen in wäßriger Lösung oxydieren bei Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  an sich meist mehr oder weniger schnell. Wirkt

gleichzeitig  $\alpha$ -Naphthol ein, so entsteht in der Blutlösung nicht der violette Farbton des Naphthols, sondern es tritt eine rötliche Färbung ein (Amidophenol, Benzidin, Anilinöl,  $\alpha$ -Naphthylamin). Es kann aber die reine dunkelviolette Naphtholreaktion eintreten, wenn gleichzeitig ein cyclischer Aldehyd vorhanden ist, z. B. Para-Dimethylaminobenzaldehyd. Mit Pyrrol, das ja selbst nicht sehr schnell Farbstoffe bildet, tritt dagegen, wenn die Reaktion positiv ausfällt, die charakteristische violette Naphtholfarbreaktion ein.

#### *Einfluß von Salzen.*

Gibt man das Blut in Salzlösungen (isotonische), so wird bei Menschenblut die Reaktion bei kleineren Mengen  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,5) deutlich, wenn auch nur schwach, während die Lösung in destilliertem Wasser noch keine Verfärbung zeigt.

#### *Alkohol.*

96 proz. Alkohol in gleichen Teilen zur Blutlösung gegeben, zerstörte die Peroxydasen.

#### *Sulphydryle.*

Sulphydrylverbindungen hatten auf die Reaktion keinen Einfluß.

#### *Aldehyde.*

Eine sehr starke Wirkung auf die Blutlösung hat Formaldehyd. Bei Verwendung von konzentriertem Formol war die Reaktion des Menschenblutes bereits unter 0,1- $\text{H}_2\text{O}_2$  positiv. Nur die Ausflockung unterschied die Hammelblutlösungen vom Menschenblut, in dem keine stärkere Ausfällung vorhanden war. Wurde eine 10 proz. Formollösung verwendet, die an sich das menschliche Blut weniger stark beeinflusst, so konnten Reaktionen herbeigeführt werden, die auch, was die stärkere Ausfällung anlangt, völlig denen des Hammelblutes glichen, dann, wenn gleichzeitig eine  $\frac{1}{10}$  Normallauge hinzugesetzt wurde und zwar auch in Mengen der Lauge und des Wasserstoffsuperoxydes, bei denen ohne Formolzusatz keine Reaktion oder der gelbe Farbumschlag eintrat.

Es hängt demnach der positive Ausfall der Naphtholreaktion einer Blutlösung, die man als eine katalytische Reaktion, hervorgerufen durch fermentartige Substanzen (Naphtholperoxydasen) bezeichnen kann, ab von dem Vorhandensein der Peroxydase und von ganz verschiedenen anderen Umständen, durch deren Anwesenheit die Wirkung des Fermentes erhöht, verringert oder ganz ausgeschaltet mit andern Worten quantitativ geregelt werden kann. Diese Feststellung ist aber aus folgendem Grunde sehr wichtig:

Rote Blutkörperchen, die in einer isotonischen Lösung die Naphtholreaktion geben, sind nach dem Eintreten der Reaktion fast unzerstörbar geworden, widerstandsfähig gegen Säuren, Laugen und destilliertes Wasser. Gibt man z. B. in ein Gemisch von Menschen- und Hammelblutkörperchen in isotonischer Kochsalzlösung so viel Wasserstoffsuperoxyd, daß nur die Hammelblutkörperchen die Naphtholreaktion geben, und setzt nunmehr destilliertes Wasser zu, so tritt Hämolyse nur der menschlichen Blutkörperchen ein.

Durch die Versuche der Physiologen<sup>1)</sup> wissen wir, daß rote Blutkörperchen, in die Kohlensäure geleitet wird, eine Kochsalzlösung alkalisch machen, weil das Chlor des Kochsalzes infolge der Anionen-Durchgängigkeit der Membran in die Blutkörperchen hineintritt und sich mit dem Alkali des Carbonates zu Kochsalz verbindet, während die Kohlensäure mit den Natrium-Ionen der Außenlösung sich zu Karbonat vereinigt. Könnten die roten Blutkörperchen durch einen erhöhten Oxydationsprozeß (hierzu müßte das rote Blutkörperchen einen intakten Kern besitzen) reine Kohlensäure ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) bilden, so müßte sich innerhalb des roten Blutkörperchens Salzsäure bilden, während die Außenlösung alkalisch wird. Das rote Blutkörperchen würde sofort hämolysiert.<sup>2)</sup> Tritt nun gleichzeitig mit der Kohlensäure ein Phenolehromogen auf, das die Membran härtet, dann ist die Aufspeicherung von Salzsäure innerhalb der Zelle möglich, und die Membran könnte später dadurch wieder durchgängig gemacht werden, daß ihre lipoiden Anteile durch eine entsprechende Lipase gelöst werden. Ein entsprechender Vorgang findet in den Sekretkanälen der Belegzellen des Magens statt, man braucht nur anzunehmen, daß durch Vermittlung der Kernkörperchen Ferment-bildende<sup>3)</sup> und verbrennbare Stoffe in die Sekretkanäle ausgeschieden werden, bei deren Verbrennung gleichzeitig mit der Kohlensäurebildung eine Fixierung der Wand der Sekretkanäle eintritt, die durch die Wirkung einer Lipase wieder aufgehoben wird. Vielleicht spielt hier die Magenlipase eine Rolle.

Wie in den roten Blutkörperchen die Färbung und Fixierung abhängig ist davon, ob die Peroxydase in Wirkung tritt oder nicht, so ist bei den Oxydasen gewisser Molluskengranula, wie ich gezeigt habe, gerade das Gegenteil der Fall. Die lipoiden Granula der weißen Blutzellen und ähnliche Gebilde *lösen sich* in einer alkalischen Naphtholösung sehr schnell, wenn vorher die Mollusken (Arion) Oxydasen auf sie eingewirkt haben. Diese Oxydasen gehen durch Vermittlung der

<sup>1)</sup> Höber, Physiologie der Zelle.

<sup>2)</sup> Allerdings nur unterhalb einer bestimmten H-Ionen-Konzentration. N-Essigsäure löst, N-Salzsäure nicht.

<sup>3)</sup> Lokale Asphyxie muß bei Hyperacidität (Vermehrung dieser Substanzen) Ursache für das Auftreten tryptischer Vorgänge werden (ulcus).

Kernkörperchen hervor und lösen an sich ebensowenig, wie die Blut-peroxydasen fixieren.

Die Peroxydasen der roten Blutkörperchen unterscheiden sich von den Peroxydasen der weißen Blutkörperchen durch folgende Punkte:

1. Die Granula der weißen Blutkörperchen geben die Naphtholreaktionen bereits bei Anwesenheit sehr geringer Mengen von Wasserstoffsuperoxyd. Sie verhalten sich also wie die Peroxydasen des menschlichen Blutes, wenn gleichzeitig ein Aldehyd vorhanden ist oder eine cyclische ringförmige Amidoverbindung.

2. Die Naphtholreaktion der Granula der weißen Blutkörperchen tritt als violette Farbreaktion auch in stark alkalischen Naphthollösungen ein, ohne in Gelb umzuschlagen. Die Granula verhalten sich demnach wie die Peroxydasen der roten Blutkörperchen bei Gegenwart von Aldehyd und Alkali.

3. Die Granula der weißen Blutkörperchen, besonders die eosinophilen Granula, geben in einem Gemisch von Naphthol und Benzidinlösung nicht eine rote Farbe, wie Blutlösungen, sondern eine schwärzlich violette Naphtholreaktion. Sie verhalten sich also so, als wenn durch ein Aldehyd die Amidogruppe des Benzidin ausgeschaltet wird.

4. Die Granula der weißen Blutkörperchen geben in alkalischen Naphthollösungen die Oxydasereaktion, bilden demnach in alkalischer Lösung Peroxyde.

Daß auch in den roten Blutkörperchen Naphtholoxidasen auftreten können, und zwar in unreifen, noch kernhaltigen Blutkörperchen, kann man an den roten Blutkörperchen von Meerschweinchen zeigen, die man mit Bleinitrat füttert. Man findet dann gelegentlich, daß sowohl die ganzen Kerne wie auch einzelne Granula sich durch Naphtholreaktionen<sup>1)</sup> darstellen lassen, die sonst nur die Leukocytengranula geben. Es ist also anzunehmen, daß auch die Peroxydasen der roten Blutkörperchen auf demselben Wege entstehen wie die der weißen. In einem Falle einer pathologischen menschlichen Blutveränderung mit Vermehrung der eosinophilen Zellen und der Lymphocyten fanden sich vereinzelt am Kern sitzende durch die Naphtholperoxydase-reaktion darstellbare meist in Auflösung begriffene Granula in Lymphocyten, deren Protoplasma eine auffällige Verschleimung zeigte, so daß man annehmen kann, daß — intermediär wenigstens — für die myeolischen Blutzellen charakteristische Fermente auch in den Lymphocyten auftreten können, daß ihr Abbau nur entsprechend der spezifischen Struktur dieser Zellen in anderer Weise erfolgt. Normale Lymphocyten

<sup>1)</sup> Härtung mit 80 proz. Alkohol. Färben mit Carbolgentianaviolettlösung, Abspülen.  $H_2O_2$ -haltige  $\alpha$ -Naphthollösung wenige Minuten (0,05—1,0 1%  $H_2O_2$  auf 10,0 Naphthollösung). Alkohol, Wasser, verdünnte Fuchsinlösung. Leukocytengranula blau. Zentralbl. f. allg. Path. u. pathol. Anat. 24, 225.

gaben niemals eine Naphtholperoxydasereaktion. Die roten Blutkörperchen, myeolischen und lymphatischen Zellen entstehen zwar entwicklungsgeschichtlich nacheinander, so daß ihre Stammzellen als spezifische Mutationsformen aufzufassen sind (*Nägeli*). Das Nacheinander der Zellbildung hat aber darin seinen Grund, daß jede Zellart erst mit ihrem Entstehen die Bedingungen schafft für die Entstehung der folgenden Zellart. Werden durch pathologische Veränderungen die Bedingungen der Entstehung verändert, dann müssen Zwischenformen zwischen den drei Zellarten auftreten, die sich in Ähnlichkeit der Zellstruktur und Zelleistung äußern, weil die Fermentgrundsubstanzen in allen drei Zellarten die gleichen sind.

---