

Über den Einfluß aktiven Sauerstoffes auf Zellenmembranen und Granula.

Von

Dr. W. Loele.

(Landesstelle für öffentliche Gesundheitspflege, Dresden.)

(Eingegangen am 27. Mai 1924.)

Auf Grund seiner Untersuchungen über den Bau der roten Blutkörperchen kommt *Beckhold* zu dem Ergebnis, daß die roten Blutkörperchen eine Blase darstellen, deren Wand aus einem netzartigen gequollenen Proteingerüst besteht, deren Maschen erfüllt sind mit einer kolloiden Lösung von Cholesterin in gequollenen Lecithin und deren Inhalt eine hämoglobinhaltige Salzlösung bildet und sagt wörtlich: „Jede Einwirkung, welche den Quellungszustand des Proteingerüsts oder des Lecithins ungleichmäßig beeinflußt, muß Hämolyse zur Folge haben, ebenso jeder Eingriff, welcher den Lösungszustand des Cholesterins im Lecithin aufhebt.

Es hat viel Wahrscheinlichkeit für sich, daß das, was hier für die Blutkörperchen geltend erkannt wurde, auch für andere Zellen (Bakterien, Gewebe, Pflanzenzellen) mehr oder minder Übertragung verdient.“

Das umgekehrte Verhalten, daß eine Einwirkung das Eiweißlipoidgemisch der roten Blutkörperchen so beeinflußt, daß nicht Quellung oder Lösung, sondern Härtung eintritt, dürfte demnach in ähnlicher Weise auch in anderen Zellen vorkommen.

Es sind daher experimentelle Untersuchungen über Lösung und Härtung lipoider Granula dann von besonderem Interesse, wenn die Einwirkung genau bekannt und eine derartige ist, wie sie in den Zellen möglich ist.

Wichtige Beobachtungen geben zunächst menschliche eosinophile Leukocytengranula.

Bringt man eosinophile Leukocyten unfixiert in eine H_2O_2 -haltige Benzidin- oder Alfa-Naphthollösung, so verändern sie sich in der Regel, was die Größe anlangt, nicht. Mitunter aber sieht man bei Blutaussstrichen, daß einzelne Granula bei dieser Behandlung zu großen Napf- oder kugeligen Gebilden anschwellen, die aus der Zelle heraustreten. Es ist nicht das Austreten aus der Zelle die Ursache des veränderten Verhaltens, denn man findet unveränderte Granula auch außerhalb der Zellen, sondern es ist irgend etwas mit den Granula vorgegangen, das sie gegen H_2O_2 empfindlich machte. Noch besser kann man diese

Erscheinungen manchmal feststellen in Punktionsflüssigkeiten, die außer eosinophilen Zellen noch zahlreiche Lymphocyten enthalten. Die Quellungserscheinungen sind besonders dann leicht zu zeigen, wenn nach Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd allein fast augenblicklich alle Granula sich auflösen.

Findet diese Auflösung statt bei Gegenwart von aromatischen Körpern, z. B. von Alfa-Naphthol oder Benzidin, dann tritt eine Bindung der bei der Oxydation sich bildenden Chromogene an die sich lösende Substanz ein, und die Granula schwellen zu kugeligen Gebilden und oft wunderlichen Formen, die vielfach größer sind als die ganze Zelle.

Ganz ausgezeichnet konnte das Verhalten dieser Zellformen und ihrer Granula in einem Pleurapunktat verfolgt werden, das zur Untersuchung an die Landesstelle eingesandt war und von einem Manne stammte, der mit Alttuberkulin Koch behandelt war.

In dem Punktat waren nur kleine Lymphocyten, etwas größere lymphoide Zellen und eosinophile Leukocyten, dagegen keine neutrophilen Leukocyten vorhanden. Die lymphoiden Zellen und die eosinophilen Leukocyten zeigten ungewöhnliche Kernveränderungen. In den Kernen der lymphoiden Zellen fanden sich manchmal helle rundliche, etwa den Nucleolen entsprechende Stellen, in denen wetzsteinartige Krystalle lagen. Die Kerne nahmen innerhalb des Protoplasmas korallen- oder amöbenartige Bildungen an; zerfielen auch zuweilen in größere Bruchstücke. Der Zelleib war basophil, färbte sich nach Giemsa-Romanowsky schwach blau und führte oft rundliche oder längliche dunkelblaue Granula, auch neigte er zur Verschleimung. Oder er war oxyphil, färbte sich rot oder rotviolett, war dann granulafrei und zeigte schärfere Umrisse. Einzelne kernlose Gebilde hatten teils blaue, teils rote Granula.

In den eosinophilen Zellen war die Reduktion des Kernes besonders deutlich, oft war nur ein blauer kleiner Kernrest eben noch erkennbar, die gleichmäßig großen Granula färbten sich stark rot.

Die Behandlung eines unfixierten Ausstriches der Zellen mit einer wäßrigen Benzidinlösung und H_2O_2 ergab einen außerordentlich überraschenden Befund. Sämtliche eosinophilen Granula quollen augenblicklich zu kleinen oder größeren Kugeln und seltsamen kugeligen und lanzenspitzenähnlichen Gebilden auf, die oft größer waren, wie die selbst stark gequollene Zelle. Auch in der Wand der Blase fanden sich vielfach kleine Bläschen. Die Farbe der Kugeln war fleckig blaugrün, nur da, wo vereinzelte Granula kleiner geblieben waren, färbten sie sich braun. Da, wo die Granula ganz zerflossen, bildete sie ein Wabenwerk oder, wenn die Septen zerplatzten, eine Art Schleim mit eingesprengten kleinen Tröpfchen. Die Kerne der eosinophilen Zellen blieben manchmal unverändert, manchmal quollen auch sie stärker.

Dagegen zeigten die Kerne der lymphoiden Zellen infolge Quellung oft bizarre Formen. Auch im Protoplasma der lymphoiden Zellen lagen Granula, die mit der Benzidinlösung eine grünblaue Reaktion gaben.

Die Kerne der kleinen Lymphocyten blieben ganz unverändert, auch der Zelleib zeigte nicht immer Quellungserscheinungen.

Nach Zusatz von Formaldehyd zum Punktat traten diese Quellungserscheinungen nicht mehr auf, die Substanz der Granula sinterte bei Behandlung mit Benzidin und H_2O_2 zu braunen Schollen zusammen. Die Kerne der Leukocyten färbten sich manchmal blau (Bindung gelöster Granulasubstanz an die saure Kernmembran). Die Entstehung der großen Kugeln ist wohl so zu erklären, daß die Granulasubstanz unter dem Einfluß von aktivem Sauerstoff (die Granula enthalten Peroxydase) in Lösung gebracht wird, daß aber durch die sofortige Adsorption von Benzidinchromogenen dehnbare Membranen nach Art der Traubeschen Niederschlagsmembranen gebildet werden, die das Auseinanderfließen und das Platzen der sich ausdehnenden Kugeln verhindern. Durch die Einwirkung von Aldehyd wird die Löslichkeit der Granula herabgesetzt.

Einen ähnlichen Vorgang kann man beobachten, wenn man ein Exemplar von *Arion ater* in 5proz. Carbolsäure wirft. Der austretende Schleim bildet mit der Carbolsäure ballonartige Schläuche.

Es geht demnach in der Substanz der Granula folgender Vorgang vor sich. Die Substanz wird zunächst durch ein unbekanntes Etwas in eine bei Gegenwart von aktivem Sauerstoff in Wasser lösliche Form gebracht, die durch die Bindung von Phenolchromogenen unter Bildung einer Niederschlagsmembran erstarrt und zugleich sich insofern ändert, als sie nun nicht mehr saure, sondern basische Substanzen (Farbstoffe) adsorbiert.

Besonders bemerkenswert war die außerordentliche Geschwindigkeit, mit der die Lösung der Granula in H_2O_2 -haltigem Wasser oder die Quellung in H_2O_2 enthaltender Benzidinlösung eintrat. Die Vorgänge verlaufen so schnell, daß man nur das Endergebnis sieht. Ein ultra-visibles Körnchen von der Beschaffenheit der Alfagranula müßte demnach unter den gleichen Bedingungen zu einem sichtbaren kugeligen Korn aufquellen. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß auf diese Weise die eosinophilen Granula in der zunächst granulafreien Zelle entstehen.

Aktiver Sauerstoff wirkt demnach durch Vermittlung einer Peroxydase auf viererlei Art auf die Alfagranula ein.

1. Die Granula verändern sich nicht.

2. Die Granula lösen sich augenblicklich.

3. Die Granula verändern ihre Oberfläche, sie werden säurefest, basophil und grampositiv, wenn ein Phenolchromogen gleichzeitig vorhanden ist.

4. Die Granula quellen gleichzeitig mit der Oberflächenveränderung zu großen Kugeln auf.

Welcher Natur ist nun die Substanz, die die Granula in einen löslichen Zustand bringt. Hierfür gibt es folgende Anhaltspunkte:

1. Bei der Autolyse der Granula entstehen ähnliche Bildungen. Da die Substanz der Granula nach den Untersuchungen von *Petri* ziemlich indifferent ist, dagegen ihre Oberfläche die sehr aktiven phenolbindenden Substanzen trägt, darf man annehmen, daß das Lösungsmittel der Alfagranula durch Zersetzung der Oberflächenoxydase (Aldamin) entsteht.

2. Ständig lassen sich die Granula in einen löslichen Zustand (für aktiven Sauerstoff) überführen, wenn man sie mit einem Extrakt behandelt, der durch Einwirkung naphtholpositiver Substanzen auf Kernkörperchen entstanden ist (Molluskenextrakte). Auch hier spielt demnach die naphtholpositive Substanz eine Rolle.

3. In dem oben erwähnten Pleuraexsudat waren zahlreiche Lymphocyten vorhanden. Die Lymphocytenkerne unterscheiden sich von anderen Kernen dadurch, daß ihre Kernkörperchen nicht mit den gewöhnlichen Methoden färbbar sind, vielleicht, weil die färbbare Substanz der Nucleolen ständig abgebaut wird. Es ist nicht unmöglich, daß zwischen den Lymphocytenkernkörperchen und den Granula der eosinophilen Zellen gegenseitige Beziehungen bestehen (Einfluß des Tuberkulin?).

Ähnliche Erscheinungen wie an den Granula der eosinophilen Leucocyten findet man bei den roten Blutzellen.

Bringt man gewaschene Hammelblutkörperchen in eine Lösung von Alfanaphthol in destilliertem Wasser, so tritt sehr schnell Hämolyse ein. Ist aber der Lösung Wasserstoffsuperoxyd zugesetzt, so sind die roten Blutkörperchen augenblicklich gehärtet, und ihr Verhalten gegenüber von Säuren, Laugen und Fermenten hängt ab, wie in früheren Arbeiten¹⁾ gezeigt wurde, von der Konzentration des Wasserstoffsuperoxyds. Spritzt man derartig gehärtete rote Blutkörperchen einem Meerschweinchen in die Bauchhöhle, so sind sie noch nach 8 Tagen unverändert. Die sehr empfindliche Mischung von Lipoid und Eiweiß ist demnach außerordentlich widerstandsfähig, fast unzerstörbar geworden. Es ist hier ebenfalls ein Beispiel gegeben, wie eine lipoide Eiweißmischung in verschiedener Weise, man kann sagen der Menge nach geregelt, durch aktiven Sauerstoff verändert wird.

Unterstützt werden diese Beobachtungen nun noch durch Untersuchungen an lebenden Zellen, an Hefen (am besten Soor oder einer der torulaartigen Wildhefen, die man aus der Luft, aus altem Käse usw. züchtet).

¹⁾ Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **251**, 156 und **250**, 677.

Behandelt man einen Hefeausschlag mit einer Lösung von alkali-freiem Alfanaphthol und Dimethylparaphenyldiamin zu gleichen Teilen mit Zusatz von etwas Wasserstoffsuperoxyd, dann findet man oft das Bild, wie es *W. H. Schultze* bei seinen Oxydaseuntersuchungen an Bakterien beschrieben hat, die ganze Hefezelle übersät von feinen blauen Körnchen und meist ein in Beziehung zur Vakuole stehendes Korn etwas größer und stärker blau gefärbt. Züchtet man nun die gleichen Hefen auf Nährböden mit Zusatz von Metallsalzen, so gelingt es, bei bestimmten Konzentrationen der Metallsalze ganz einheitliche Oxydationsbilder zu erhalten, die sich sehr charakteristisch voneinander unterscheiden. Auf eisenhaltigen Nährböden (Eisenammoniakalaun) werden die Granula besonders groß, auch das Vakuolenkorn ist meist sehr viel größer.

Bei Zusatz von Bleinitrat (das oft von den Hefen als Schwefelblei gespeichert wird) ist die Menge der oxydierenden Substanzen sehr stark verringert und meist nur beschränkt auf das Vakuolenkorn. (Das Vakuolenkorn läßt sich auch mit der Benzidinperoxydasereaktion in verschiedenen Farben darstellen, meist blau, grün oder braun, seltener rot; das letztere hängt vielleicht mit der Anwesenheit ringförmiger Substanzen zusammen, denn im Reagensglas tritt z. B. eine Rotfärbung bei der Oxydation von Benzidin auf, wenn gleichzeitig Alfanaphthol zugeführt wird.) Das Vakuolenkorn kann man teils in Beziehung zum Kernkörperchen, teils zum Kern der Hefe bringen. Bei Zusatz von Kupfer (Sulfat) ist die Menge der oxydierenden Stoffe vermehrt, aber sie haben die Neigung, zu zerfließen, so daß die ganze Zelle sich bläut. Man hat demnach den Eindruck, als wenn die Granula sich dadurch bildeten, daß von dem Vakuolenkorn sich die oxydierenden Substanzen lösen, sich im Protoplasma verteilen und dort Fällungserscheinungen hervorrufen. Unterstützt wird diese Ansicht durch Bilder, die man manchmal an 5 bis 6 Tage alten Hefeagarkulturen (Traubenzucker) erhält. Übergießt man derartige ältere Hefekulturen mit einer alkalifreien Lösung von Alfanaphthol und Paraphenyldiamin¹⁾ (nicht die Dimethylverbindung), mit Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd und beachtet besonders diejenigen Kolonien, die sich schneller dunkelviolett färben, so kann man in vielen Hefezellen nicht selten eine eigenartige Verlängerung des Vakuolenkornes, teils in Form von dornähnlichen Fortsätzen, teils von spiralförmigen, achter-, kreis- und posthornförmigen Gebilden feststellen. In einer Zelle treten nicht mehr als 2 derartige Bil-

¹⁾ Es sei hier darauf hingewiesen, daß manche Bakterien sich in H_2O_2 -haltigen Paraphenyldiaminlösungen intensiv bräunen (z. B. gramnegative Diplokokken, *Diplococcus catarrhalis*, *Meningokokkus*), während andere eher die Oxydation hemmen (*Staphylokokkus*) und farblos bleiben. Besonders gut erkennbar ist dieses Verhalten auf Serumplatten.

dungen auf, nur wenn die Zelle in die Länge wächst, können eine ganze Anzahl von Fäden vorhanden sein. Diese eigenartige Fadenbildung spricht dafür, daß von dem Vakuolenkorn aus ein Vorgang, der zu einer plastischen Veränderung führt, sich gesetzmäßig weiter verbreitet, ohne daß es zu einer Loslösung der in Frage kommenden Substanzen von dem Vakuolenkorn kommt.

Daß es sich hier um Stoffe handelt, die sich ähnlich auch in anderen Zellen verhalten, dafür sprechen Erfahrungen mit keimenden Pflanzen. Läßt man Kresse- oder Kerbelsamen in feuchter Watte auskeimen, der man Blei- und Eisensalze zusetzt, und stellt an den Keimlingen die Naphtholperoxydasereaktion an, so findet man auch hier in bestimmten Konzentrationen des Eisens eine außerordentliche Vermehrung der Peroxydasen, nicht nur in den Schließzellen, sondern auch in den dazwischenliegenden Gewebszellen, während durch den Einfluß von Blei die Menge der Substanzen entschieden verringert wird und oft nur auf die Schließzellen beschränkt bleibt. Mit dieser verschiedenen Wirkung der Eisen- und Bleisalze stimmt ja auch die klinische Erfahrung bei Bleivergiftungen überein. Nimmt man an, daß gleichzeitig mit der Bildung der Naphtholperoxydasen auch die Bildung tryptischer Fermente, wie in den Leukocyten, vor sich geht, so müssen in den Zellen, in denen tryptische Prozesse ablaufen, also in den roten Blutkörperchen, diese Vorgänge durch die Wirkung des Bleies auch verzögert werden, und diese Verzögerung wird sich einmal darin verraten, daß die Kerne nicht aufgelöst werden und weiter darin, daß die Kerne selbst gelegentlich Naphtholreaktion geben. Beides ist der Fall, wie man im Tierversuch bei Bleifütterung feststellen kann.

Bei den Hefen zeigten sich nun auch die gleichen Erscheinungen wie bei den Blutzellelementen.

Während die lipoide Substanz, an die das Zustandekommen der Peroxydasereaktion gebunden ist, durch fettlösende Mittel oder durch Säuren zerstört wird, bleibt sie erhalten, sobald die Bindung des Indophenolblaus oder des Benzidinfarbstoffes erfolgt ist, wenigstens dann, wenn die Oxydase an die Oberfläche des Vakuolenkorns adsorbiert ist, kleinere Granula lösen sich vielfach auch nach der Peroxydasereaktion in Xylol und Säuren auf. Es muß also auch am Vakuolenkorn eine besondere Mischung zwischen Lipoid und Eiweiß vorliegen.

Aus den Beobachtungen geht demnach hervor, daß in bestimmten Systemen aktiver Sauerstoff imstande ist, augenblicklich eine Struktur zu lösen, zu bilden und unlöslich zu machen oder zum Quellen zu bringen und gleichzeitig unlöslich zu machen. Diese Beobachtungen sind besonders wichtig für ein Organ, in dem der Lipoidstoffwechsel eine besondere Rolle spielt, für die Vorgänge im Gehirn. Alle Dinge der Außenwelt, welche auf dem Wege der nervösen Bahnen zum ersten Male die Nervenzellen

des Gehirnes treffen, verursachen dort eine Veränderung, die als eine genau der Menge nach begrenzte Ausfällung aufgefaßt werden kann. Die ausgleichende Tätigkeit der Zelle vermag den Niederschlag nicht völlig zu beseitigen, sie zerlegt ihn nur punktförmig. Die zwischen den einzelnen Bildpunkten liegende Substanz ist nicht unlöslich, sondern (z. B. auf den gleichen Reiz hin) löslich und bleibt auch bei der Wiederherstellung löslich. Es wird somit zwischen den unlöslichen Bildpunkten eine Art Weiche geschaffen, die die einzelnen Bildpunkte miteinander verbinden oder trennen kann. Die Weiche ist nicht, wie *Schleich* annimmt, eine physikalische, sondern eine chemische Weiche.

Es erscheint zwar zunächst als ein Widerspruch, daß der gleiche Reiz das erstemal eine unlösliche, die folgenden Male eine lösliche Fällung hervorruft. Es ist aber zu berücksichtigen, daß die ersten Reize, welche die Zelle treffen, auf ganz andere Verhältnisse stoßen, wie die Wiederholungsreize. Allerdings müssen sehr starke Wiederholungsreize die bereits vorhandenen unlöslichen Bildpunkte verstärken. Die Substanz, welche die Verbindung zwischen den unlöslichen Mosaikpunkten in ein lösliches System überführt, würde, entsprechend wie in den oben angeführten Versuchen, als eine Kernkörperchenausscheidung anzusehen sein. Da das Kernkörperchen der Nervenzelle von den Verästelungen weit entfernt ist, ist es notwendig, daß im Bereich der Fortsätze die Regulierung der Systeme (der Weichen) von besonderen Zellen ausgeführt wird, von den Gliazellen. Da, wo die Ganglienzellen an Größe stark voneinander abweichen, z. B. in dem Kopfganglion von Schnecken (*Arion*), bestehen ganz gesetzmäßige Beziehungen zwischen Kernkörperchengröße und Größe der Nervenzellen, während in Drüsenzellen das keineswegs immer der Fall ist.

Wer jemals einen Katatonischen beobachtet hat, dem fällt zweierlei auf, das Maschinenmäßige in den körperlichen und geistigen Vorgängen und die scheinbare Uermüdbarkeit. Histologisch ist nun bei diesen Kranken sowohl eine besonders ausgeprägte Tätigkeit der Gliazellen festzustellen (die Kerne der Glia bilden oft die sog. Kernhosen um die Ganglienzellen). Ferner findet man mit der sekundären Naphtholmethode, daß im Gegensatz zum normalen Gehirn und auch zum Paralytikerhirn nicht die Kernkörperchen allein sich schwarz färben, sondern in vielen Zellen die ganzen Kerne. Es findet demnach eine übermäßige Ausscheidung von Nucleolarsubstanz statt, und die Verbindung der einzelnen Mosaikpunkte kann dadurch wesentlich erleichtert werden. Die Nucleolarsubstanz enthält zugleich die wichtigen Aufbaukatalysatoren.

Da die Mosaikpunkte im Gehirn für die verschiedenen Eindrücke der Außenwelt teilweise gleichartig sein müssen, ist das Bewußtseinsbild gewissermaßen ein futuristisches. Bei Stoffwechselstörungen

können die Bilder leicht ineinander übergehen (Illusionen). Auch den seelischen Vorgängen liegen Stoffwechselvorgänge zugrunde, nur ist es durch eine sehr verwickelte Einrichtung erreicht, daß diese äußerst schnell ablaufen, so daß es den Eindruck macht, als wenn sich hier physikalische Vorgänge abspielten. Auch die Reizleitung in den Nerven ist ein Stoffwechselvorgang (*Verworn*). Es ist kein Grund vorhanden, nicht auch die den geistigen Vorgängen parallel verlaufenden Veränderungen im Gehirn als solche aufzufassen, trotz der Schnelligkeit, mit der sie verlaufen. Das Gehirn gleicht nicht einem Schrank mit einzelnen Fächern, sondern einem Raster, wie er bei der Autotypie verwendet wird. Der seelische Vorgang ist gebunden an einen bestimmten Zellzustand, der dem Stoffwechsel unterworfen ist. Natürlich ist das Denken nicht etwa eine Absonderung, die Sekretion der Nucleolen hat nur den Zweck, den wahrscheinlich außerordentlich geringen Materialverbrauch der verwickelten Systeme rechtzeitig zu ersetzen. Um einen groben Vergleich zu ziehen, entsprechen dem Bewußtseinsvorgang etwa der Geigenton, den Zellstrukturen die Saiten, den Zellabsonderungen das Kolophonium.
