

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Greifswald.)

## **Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Indophenolblausynthese durch Sauerstoff übertragende Zellbestandteile.**

Von

**M. Staemmler und W. Sanders.**

(Eingegangen am 23. Februar 1925.)

Die gewöhnlichen physiologisch-chemischen Methoden der Fermentforschung zeigen nur die Endprodukte des fermentativen Vorganges oder geben Anhaltspunkte für die chemische Natur des Enzyms selbst. Die in der mikroskopischen Technik übliche Oxydasereaktion, im besonderen die am frischen, unfixierten Material, hat vor diesen Methoden den Vorzug, daß sie sich direkt unter dem Mikroskope beobachten läßt (*W. H. Schultze, v. Gierke*). Sie zeigt uns, daß nicht alle Körperzellen gleiche Mengen Indophenolblau bilden, daß die Oxydasewirkung vielmehr in den verschiedenen Körperzellen recht verschieden stark ist. So sind, wie aus den Untersuchungen von *Gräff* und neuerdings besonders *Katsunuma* hervorgeht, in der Leber die Zellen der Peripherie der Acini vor denen im Zentrum bevorzugt, die Kupfferschen Sternzellen lassen regelmäßig Indophenolbaubildung erkennen. In der Niere ist die Rinde und das obere Drittel des Markes stark oxydasehaltig; in einer sichelförmigen, scharfen Linie setzt sich diese Zone gewöhnlich von den fast ungefärbten unteren Dritteln ab. Die Herzmuskulatur gibt in ihrer Gesamtheit eine positive Reaktion. Das Reizleitungssystem zeichnet sich dabei durch einen besonders hohen Fermentgehalt aus (*Katsunuma*). Durch die Stärke der Reaktion lassen sich rote und weiße Körpermuskulatur differenzieren, und zwar sind die roten Fasern stärker positiv als die weißen.

Ein großer Nachteil dieser Methode aber ist, daß sie die gebildete Indophenolblaumenge nicht zahlenmäßig angibt. Zudem ist der Farbstoff nicht zuverlässig fixierbar, es lassen sich also von den Schnitten schlecht Dauerpräparate herstellen. Will man daher ein Urteil über die jeweils in einem frischen Schnitt enthaltene Indophenolblaumenge abgeben, so ist man auf einen Vergleich mit Erinnerungsbildern angewiesen, soweit nicht Stellen desselben Schnittes verglichen werden. Die Angaben sind also in diesen Fällen rein subjektiv. Wohl werden grobe Unterschiede

in der Reaktion kaum Anlaß zu Täuschungen geben, desto mehr aber die mittleren und feineren. Weiterhin macht sich für die Schätzung der gebildeten Indophenolblaumenge die verschiedene Schnittdicke sehr störend bemerkbar.

Um diese Fehlerquellen nun auszuschalten, um zu einem objektiven Urteil zu gelangen, suchte *Vernon* das aus Nadigemisch + Gewebe gebildete Indophenolblau quantitativ zu bestimmen. Seine Methode ist kurz folgende:

Man nimmt ein Gemisch von  $\alpha$ -Naphthol, Dimethylparaphenyldiamin und Soda, und zwar in einem Mengenverhältnis, daß in 5 ccm der Versuchsflüssigkeit 1/150 m  $\alpha$ -Naphthol und Paraphenyldiamin + 0,17% (1/62 m) Natriumcarbonat enthalten sind. 5 ccm von diesem Reagens werden in einer Petrischale von 8,8 cm Durchmesser mit 0,5 g zerkleinertem Gewebe zusammengebracht, gründlich durchmischt und bei ca. 17° eine Stunde lang der Oxydation überlassen. Durch Hinzufügen von 10 ccm 96% Alkohols wird diese unterbrochen. Dabei wird gleichzeitig das in unlöslicher Form auf dem Organbrei angesammelte Indophenol ausgezogen. Nachdem der Alkohol eine halbe Stunde eingewirkt hat, wird das Gemisch filtriert und der Indophenolgehalt der Auszuges colorimetrisch durch Vergleich mit einer Testlösung bestimmt. Zur Herstellung dieser Standardflüssigkeit nimmt man 1,5 Teile des oben angegebenen Reagens und verdünnt sie mit 200 Teilen Alkohol (50%). Die Lösung bleibt, bis das Höchstmaß an Farbe durch vollständige Umwandlung in Indophenolblau erreicht ist, offen stehen. Erst nach einigen Tagen wird die Teströhre fest verschlossen. Allwöchentlich muß die Normallösung erneuert werden, da das Indophenolblau nicht sehr haltbar ist und nach ungefähr 14 Tagen verblaßt. Im übrigen wird sie nur solange benutzt, wie sie unbedingt einwandfrei erscheint. Zum colorimetrischen Vergleich gibt man eine gemessene Menge des Filtrats in eine andere Teströhre von genau demselben Durchmesser und verdünnt, bis die gleiche Farbstärke wie die der Standardlösung erreicht ist. Als Verdünnungsflüssigkeit dienen Alkohol, Wasser oder ein Gemisch von beiden. Die Farbe schwankt zwischen rötlichblau und violett. Eine geeignete Veränderung der Verdünnungsflüssigkeit gleicht diese Farbschattierungen aus. Und zwar erhält man durch Zugabe von Alkohol ein „dünnes Violett“, durch Wasser ein „rötliches Rosa“, Mischungen von beiden ergeben die Zwischenfarben. Der Farbvergleich zwischen Testlösung und verdünntem Filtrat findet über einem Blatt Papier bei wiederholter Vertauschung der Stellung statt.

Unsere Versuche, mit dieser Vernonschen Technik zu arbeiten, scheiterten daran, daß eine zuverlässige colorimetrische Vergleichung nicht möglich war. Zwischen Versuchsflüssigkeit und Testlösung ließ sich keine Farbgleichheit herstellen. Alle Versuche, durch Veränderung der an-

gegebenen Verdünnungsflüssigkeiten Farbgleichheit zu erzielen, waren erfolglos. Eine weitere Schwierigkeit war die Inkonstanz der Standardlösung. Allwöchentlich mußte sie durch eine neue ersetzt werden. Dabei zeigte regelmäßig ein Vergleich von alter und neuhergestellter Lösung einen ziemlich großen Farbenunterschied.

Um diese Fehlerquellen auszuschalten, machten wir zuerst den Versuch, die Testlösung durch ein ihr im Farbton entsprechendes Glas zu ersetzen, um daran die Versuchsflüssigkeit zu korrigieren. Aber auch hier stellten sich unüberwindbare Schwierigkeiten ein.

Daraufhin nahmen wir von der Herstellung eines dauernden Standards Abstand und stellten uns zu jedem Versuche als Vergleich eine jeweilige Kontrolle ohne Gewebe her, bei der das Nadigemisch also nur der Selbstoxydation an der Luft ausgesetzt ist. Im übrigen wurde zunächst die Vernonsche Versuchsanordnung beibehalten. Aber auch dabei ließ sich durch Verdünnen keine Farbgleichheit erzielen. Die Ursache ist wohl der Wirkung des Alkohols zuzuschreiben. Und von dem Gedanken ausgehend, daß Indophenolblau sich in Fetten löst, ersetzten wir den Alkohol bei der Extraktion durch Olivenöl. Mühelos ließ sich damit eine vollständige Farbgleichheit erreichen. Aus rein praktischen Rücksichten ersetzten wir das Öl durch Xylol, das zugleich, ebenso wie der Alkohol bei der Vernonschen Versuchsanordnung, die Oxydation unterbricht, und hatten damit noch bessere Erfolge.

Für unsere Versuche änderten wir noch die Konzentration der Vernonschen Lösung und wechselten mit der Einwirkungszeit: Uns dient als Reagens ein Gemisch einer 1 proz.  $\alpha$ -Naphthol-, einer 1%igen Paraphenylendiamin- und einer 1,7 proz. Sodalösung. Und zwar nimmt man  $\alpha$ -Naphthol und Diamin zu gleichen Teilen und fügt  $\frac{1}{10}$  einer 1,7 proz. Sodalösung hinzu.

An einem Beispiel sei die neue Versuchsanordnung kurz erläutert. Zu untersuchen sind 0,2 g Gewebe. Ist das Organ sehr blutreich, so wird es zuvor mit Fließpapier abgetrocknet und von Blutgerinnseln befreit, dann wird es gewogen und mittels Schere oder Gefriermikrotom zerkleinert. Dabei hat es sich herausgestellt, daß ein nicht allzulanges Gefrierenlassen der Gewebe ohne schädigenden Einfluß auf die Oxydasen ist. Nun filtriert man 2 ccm  $\alpha$ -Naphthol in 1%-Lösung, 2 ccm Diamin, mischt beides und setzt 0,4 ccm der 1,7 proz. Sodalösung hinzu. 2 ccm dieses Gemisches werden in einem Glasschälchen von 6,5 cm Durchmesser mit den zu untersuchenden 0,2 g Gewebe vermischt. In eine zweite gleich große Schale kommen zum Vergleich gleichfalls 2 ccm des Nadigemisches mit Soda, aber ohne Gewebe. Beide bleiben 10 Min. der Oxydation überlassen. Die Flüssigkeit der Schale II ohne Gewebe wird dann blaßblau, die mit Gewebe stark dunkelblau. Um nun noch das im Gewebe enthaltene Indophenolblau herauszubekommen, zerreibt

man Gewebe und Reagens 3 Min. in einem Mörser, gießt es in ein Reagenzglas und bringt die doppelte Menge Xylol, in diesem Falle also 4 ccm, hinzu. Desgleichen wird die Flüssigkeit ohne Gewebe in ein Reagenzröhrchen gebracht und auch mit 4 ccm Xylol vermischt. Jetzt werden beide Röhrchen 3 Min. mit der Hand geschüttelt. Nach dieser Zeit erscheint der Bodensatz der Kontrolle trüb und farblos. Sämtliches Indophenolblau ist in das Xylol übergegangen. Jetzt vergleicht man beide Flüssigkeiten in einem Hämometer nach *Sahli*. Dabei wird die dunklere Gewebslösung solange mit Xylol verdünnt, bis sie dieselbe Farbe zeigt, wie die jeweilige hellere gewebefreie Vergleichslösung. Der so gefundene Verdünnungsquotient gibt nun an, wievielmals soviel Indophenolblau durch das Gewebe als spontan an der Luft gebildet ist. Man bekommt also die Fermentwirkung in einem Dezimalbruch ausgedrückt. Muß man z. B. in dem ersten Röhrchen die Indophenollösung von Teilstrich 20 auf 95 verdünnen, damit die Farbe gleich der der Kontrolle wird, so ist der Verdünnungsquotient  $95 : 25 = 3,8$ . Der Farbvergleich findet von einer mattierten elektrischen Birne statt. Im allgemeinen erhält man ohne weiteres den gleichen Farbton. Manchmal treten aber doch gewisse Farbunterschiede auf. Meist lassen sie sich aber vermeiden durch sauberes Arbeiten und gute Lösungen. Wichtig scheint zu sein, daß die Lösungen von  $\alpha$ -Naphthol und Diamin gleichaltrig sind und nicht länger als drei Tage aufgehoben werden. Treten aber trotzdem kleine Unterschiede in den Farben auf, so läßt sich die mehr rote Farbe der blauen dadurch angleichen, daß man eine Spur Carbolxylol zufügt.

Zu achten ist weiterhin auf das Verhältnis zwischen Glasschalengröße und Menge des gebrauchten Reagens. Es muß immer so sein, daß die Gewebsteilchen der Luft ausgesetzt und nur mit einer dünnen Flüssigkeitsschicht umgeben sind. Wichtig ist vor allem, daß bei Reihenuntersuchungen, bei denen Ergebnisse miteinander verglichen werden sollen, immer gleichgroße Schalen und dieselben Flüssigkeitsmengen benutzt werden.

Über die Arbeitsweise der neuen Methode sollen die nun folgenden Versuchsreihen Auskunft geben. Untersucht wurden Leber, Nieren, Herz und Muskeln von weißen Mäusen.

Der Prüfung auf genaues und quantitatives Arbeiten galten die ersten beiden Versuchsanordnungen.

#### Ia.

Von einer *Mäuseleber* werden 2 mal 0,2 g zur gleichen Zeit und unter gleichen Bedingungen behandelt.

#### Schale I und III.

In jede der Schalen kommt 0,2 g fein zerkleinerte Mäuseleber und 2 ccm Nadigemisch (0,9 ccm  $\alpha$ -Naphthol, 0,9 Diamin und 0,2 ccm der 1,7proz. Soda-lösung).

## Schale II und IV

enthalten jeweils 2 ccm desselben Nadigemisches ohne Gewebe.

Alle 4 Schalen bleiben 10 Minuten der Luftoxydation ausgesetzt.

Hiernach wird der Inhalt von Schale I und III je 3 Minuten in einem Mörser zerrieben. Dann wird der Inhalt aller 4 Schalen in Reagensgläser gegossen und mit 4 ccm Xylol ausgeschüttelt. Nach 3 Minuten wird im Sahli der Farbvergleich angestellt, d. h. es wird die Flüssigkeit der Schalen I mit II und III mit IV verglichen und die Verdünnungsquotienten berechnet.

*Ergebnisse.*

Organ	Versuch I	Versuch II
	Schalen I und II	Schalen III und IV
0,2 Leber	3,5	3,6
	5,8	5,9
	6,0	6,2
	6,0	6,6
	6,5	7,0
	4,8	4,9
	5,8	5,7
	8,6	8,5
	8,5	8,9
	8,4	8,03
	4,3	4,7
	2,6	2,7

## I b.

*Doppelversuche mit den Nieren.* Die Versuchsanordnung ist die gleiche wie bei Ia, nur wird für 0,2 g Leber eine Niere gesetzt.

Diese wird zuvor gewogen und mit einer ihrem Gewichte entsprechenden Nadimenge versetzt. Also zu 0,1 g Gewebe kommt 1 ccm Nadi, zu 0,2 g 2 ccm, zu 0,3 g 3 ccm.

I. 1 Niere + 2 ccm Nadi und eine 2 ccm Nadikontrolle.

II. Andere Niere desselben Tieres + 2 ccm Nadi und eine 2 ccm Nadikontrolle.

*Ergebnisse.*

Organ	Versuch I	Versuch II
Niere	4,0	4,3
	5,0	5,0
	5,0	5,2
	5,9	6,0
	6,5	6,5
	8,6	8,4
	8,1	8,6

Die Ergebnisse beider Versuchsreihen waren somit im allgemeinen insofern zufriedenstellend, als größere Abweichungen zwischen dem gleichzeitig angesetzten Versuch I und II nicht vorkamen. Der höchste Unterschied war 0,6. Meist bewegte er sich um 0,2—0,3. Dieser muß als die gewöhnliche Fehlerbreite angesehen werden. Bei einem unbedingten Durchschnittswert von 6,0 würde das eine Ungenauigkeit von 5% bedeuten, die in 2 Fällen bis zu 10% hinaufging. Ob in den beiden letzteren Fällen kleine Versuchsfehler vorlagen, oder ob die beiden nebeneinander

untersuchten Gewebstücken doch nicht die völlig gleiche fermentative Zusammensetzung hatten, ließ sich nicht entscheiden. Im allgemeinen wird man jedenfalls nur mit einer Fehlergrenze von 5% zu rechnen brauchen.

## II.

Es wird bei gleicher Gewebsmenge mit der Menge des Nadigemisches gewechselt.

Man vergleicht also

- I. 0,2 g Muskelgewebe + 2 ccm Nadi + eine 2 ccm Nadikontrolle mit
- II. 0,2 g desselben Muskels + 4 ccm Nadi und einer 4 ccm Nadikontrolle.

<i>Ergebnisse.</i>		
Organ	Versuch I 0,2 + 2	Versuch II 0,2 + 4
Muskel 0,2 g	2,3	1,2
	2,8	1,4
	2,8	1,6
	2,8	1,5
	3,0	1,7
	3,7	1,7
	4,4	2,2
	4,4	2,0
	5,0	2,3
	5,0	2,8
	7,0	3,9

Der Verdünnungsquotient der Versuche I ist in diesen Fällen etwa doppelt so groß wie der der Versuche II. Mit andern Worten, das jeweils in 0,2 g enthaltene Oxydationsferment bildet unter den angegebenen Bedingungen in derselben Zeiteinheit nur eine bestimmte Menge Indophenolblau. Da nun im Versuch II dieses in der doppelten Menge Xylol gelöst wird, muß der Verdünnungsquotient II auf die Hälfte sinken. Die Fehlergrenze ist auch bei diesen Verdünnungsreihen ungefähr dieselbe wie in der ersten. Sie beträgt bis 10%.

## III.

Die mikroskopische Untersuchung von Oxydasepräparaten ergibt stets, daß die Leukocyten besonders lebhaft Indophenolblaubildung in den Granula ihres Protoplasmas zeigen. Um nun zu sehen, wie stark das Gesamtergebnis in unsern Versuchen von etwa in dem Gewebe enthaltenen Leukocyten beeinflußt ist, wurde durch eine vorherige 12stündige Formolfixation die sogenannte labile Oxydase vernichtet. Dann setzt man den Versuch mit dem in Formol fixierten Gewebe an, in dem also nur Oxydasen in Leukocyten enthalten sind, und vergleicht das Ergebnis mit dem des entsprechenden sofort nach Tötung des Tieres frisch untersuchten Gewebsteiles.

- I. 0,2 g frisches Gewebe + 2 ccm Nadi und eine 2 ccm Nadikontrolle.  
 II. 0,2 g formolfixiertes Gewebe + 2 ccm Nadi und eine 2 ccm Nadikontrolle.

*Ergebnisse.*

Organ	I. Frisches Gewebe	II. Formolfixiertes Gewebe	Mikroskopischer Befund von II. labile Oxydase	Befund von II. Leukocytenoxydase
0,2 g Leber	6,0	1,5	±	+ (einz. Leukoc.)
	6,6	1,8	±	+
	4,8	2,3	±	+
	4,9	2,3	±	+
	5,9	1,7	0	+
	5,7	1,1	0	+
	6,5	1,15	0	0
Niere	5,0	1,1	±	0

Es zeigt sich, daß, wenn der mikroskopische Befund auch so gut wie negativ ist, doch noch eine nachweisbare Farbstoffbildung vorhanden ist, die durch die oft sehr geringe Menge von Leukocyten nicht recht erklärt zu sein scheint. Nach den Untersuchungen von *Loele* bildet sich nun zwischen  $\alpha$ -Naphthol und einer Formollösung durch Aufnahme von Luft-sauerstoff ein Farbstoff, der zunächst grün, dann blau und schließlich grau-schwarz aussieht. In unseren Versuchen könnte sich dieser Farbstoff zu dem gebildeten Indophenolblau hinzufügen und dadurch die unverhältnismäßig hohen Werte bedingen. Außerdem haben neue Untersuchungen von *Menten* und *Gräff* ergeben, daß Formolbehandlung die Wirkung der Gewebsoxydasen nicht völlig aufhebt.

Vergleichsversuche ohne Gewebe zwischen Nadi mit Formol einerseits und Nadi ohne Formol andererseits zeigten regelmäßig die gleichen Erscheinungen, nämlich eine stärkere Farbstoffbildung bei dem formolhaltigen Nadigemisch. Dieser Formol-Koeffizient ist aber noch genauer zu bestimmen.

## IV.

Um zu zeigen, daß die oxydative Wirkung an das Überleben des Gewebes gebunden ist, wird ein Teil des Gewebes sofort untersucht, der andere vor dem Versuch erst längere Zeit gekocht.

- I. 0,2 g frisches Gewebe + 2 ccm Nadigemisch und 2 ccm Nadikontrolle.  
 II. 0,2 g gekochtes Gewebe + 2 ccm Nadigemisch und 2 ccm Nadikontrolle.

*Ergebnisse.*

Organ	I. Frisches Gewebe	II. Gekocht. Gewebe
Leber 0,2 g	3,3	1,2
	7,0	1,0
	5,2	1,2
Niere	6,1	1,1
	3,3	1,1
	5,5	1,1

Mikroskopisch war im gekochten Gewebe keinerlei Oxydase mehr nachzuweisen. Die quantitative Untersuchung ergab desgleichen keine

nennenswerte Farbstoffbildung. Die Helligkeitswerte waren die gleichen, der Farbton wurde allerdings in dem mit gekochtem Gewebe angesetzten Versuch stets trüber und dichter. Dadurch wurde der Vergleich der Helligkeitswerte nicht unwesentlich erschwert. Wenn die Indophenolblaumenge in dem Versuch mit gekochtem Gewebe regelmäßig um eine Kleinigkeit größer zu sein scheint, als in der reinen Nadikontrolle, so scheint das auf die schlechte Vergleichbarkeit der Farbe infolge dieser Trübung zurückgeführt werden zu müssen.

## V.

Anschließend sei noch eine Versuchsreihe mitgeteilt, deren Ergebnisse sich vorläufig noch nicht recht verstehen lassen.

- I. 0,2 g Leber + 2 ccm Nadigemisch mit einer 2 ccm Nadikontrolle.  
 II. 0,4 g Leber + 4 ccm Nadigemisch mit einer 4 ccm Nadikontrolle.

<i>Ergebnisse.</i>		
Organ	I. 0,2 + 2	II. 0,4 + 4
Leber	3,1	3,1
	4,3	3,7
	4,6	4,8
	5,2	3,0
	5,2	4,5
	5,6	3,0
	6,0	4,6
	9,1	5,0
	10,5	8,4
	11,7	7,9

Warum die Versuchsergebnisse in I fast regelmäßig höhere Werte aufweisen als die von II, obwohl doch das Verhältnis von Gewebsmenge zur Menge des Nadigemisches dasselbe bleibt, ist unklar. Wir dachten zunächst, daß die Größe der benutzten Schalen insofern eine Rolle spiele, als bei gleicher Schalengröße die größeren Flüssigkeitsmengen II das darin enthaltende Gewebe höher bedecken und mehr vom O<sub>2</sub> der Luft abschließen müßten. Doch auch, wenn wir die zweite Lösung in eine größere Schale gaben als die erste, blieb das Ergebnis das gleiche.

Für die praktische Anwendung der Methode ist jedenfalls aus dieser Tatsache der Schluß zu ziehen, daß nur solche Versuchsergebnisse miteinander verglichen werden dürfen, die nicht nur mit denselben relativen, sondern auch mit denselben absoluten Mengen Gewebe und Gemisch angesetzt sind.

Ersieht man aus den vorausgehenden Ergebnissen, inwiefern die Methode genau mengenmäßig arbeitet, so sollen die nun folgenden Versuche Fehlerquellen aufdecken und ihre Bedeutung für das Endergebnis zeigen.



## VI.

Es wird mit der Einwirkungszeit des Gewebes auf das Nadigemisch gewechselt und das Ergebnis verglichen mit demjenigen eines Parallelversuches desselben Organes, welches, wie üblich, bei 10 Min. dauernder Einwirkung erzielt wurde.

I. 1 Niere + 2 ccm Nadigemisch + 2 ccm Nadikontrolle; x Minuten oxydieren lassen.

II. 1 Niere + 2 ccm Nadigemisch und eine 2 ccm Nadikontrolle; 10 Minuten oxydieren lassen.

<i>Ergebnisse.</i>			
Organ	Einwirkungszeit	I.	II. (10 Minuten-Kontrolle)
Niere	5 Minuten	10,6	7,7
	20 „	6,0	9,1
	30 „	7,0	11,3
	40 „	4,8	9,1
	60 „	5,4	11,5
	70 „	5,9	8,8
	80 „	5,4	15,4
	90 „	4,4	16,1
	2 Stunden	3,9	10,2
	3 „	2,6	6,7
	5 „	3,5	7,0

Demnach ergibt Verkürzung der Einwirkungszeit ein Steigen des Verdünnungsquotienten gegenüber der 10 Min.-Kontrolle, eine bis 90 Min. verlängerte Einwirkungszeit eine allmähliche Abnahme. Bleibt der Versuch 2, 3 und 5 Stunden stehen, so wird das Verhältnis etwas unregelmäßiger, was wahrscheinlich auf Bakterienwirkung zurückzuführen ist. Das Sinken in den ersten Stunden deutet anscheinend auf irgendeine Hemmung des Fermentes hin. Es liegt am nächsten, anzunehmen, daß diese rein mechanisch dadurch zustande kommt, daß das Ferment durch die es allseitig einhüllenden Indophenolblaukörnchen vom Sauerstoff der Luft abgeschlossen wird und somit seine 0 = übertragende Fähigkeit nicht so frei entfalten kann.

## VII.

Wie sehr äußere Umstände bei den Versuchen eine Rolle spielen, zeigt der Einfluß der Temperatur, bei der die Reaktion angesetzt wird. Zu diesem Zwecke untersuchten wir von derselben Mäuseleber 3 mal 0,1 g. Und zwar wird der eine Versuch auf Eis angesetzt mit eisgekühltem  $\alpha$ -Naphthol und Diamin; der zweite bei einer Zimmertemperatur von 18–20° und der dritte in einem Thermostaten von 56–59°, in welchem die Lösungen zuvor 10–15 Min. vorgewärmt waren.

I. 0,1 g Leber + 1 ccm Nadi mit einer 1 ccm Nadikontrolle. 10 Minuten bei 0–3° oxydieren lassen.

II. 0,1 g derselben Leber + 1 ccm Nadi mit einer 1 ccm Nadikontrolle. 10 Minuten bei 18—20° oxydieren lassen.

III. 0,1 g derselben Leber + 1 ccm Nadi mit einer 1 ccm Nadikontrolle. 10 Minuten bei 56—59° oxydieren lassen.

Organ	Ergebnisse.		
	I. 0—3°	II. 18—20°	III. 56—59°
Leber 0,1 g	4,0	2,7	1,4
	5,3	3,8	3,5
	4,5	4,3	2,3
	5,3	7,9	2,0
	4,2	5,4	3,1
	4,4	8,8	2,8
	6,8	8,4	1,3
	7,9	7,9	3,9
	5,2	7,0	4,5
	4,3	5,3	3,2

Einheitliche Ergebnisse wurden nicht erzielt. Ständig jedenfalls ist eine Abnahme der Indophenolblaubildung bei 56—59°, von einer vollständigen Unterbindung der Oxydationsvorgänge kann aber noch keine Rede sein. Die Eisversuche zeigen wechselnde Ergebnisse. Verglichen mit den Wärmeversuchen sind die Verdünnungsquotienten immer größer, gegenüber den bei 18—20° ausgeführten Versuchen sind sie im allgemeinen niedriger. Die Zimmerversuche zeigen die größten Schwankungen und in der Regel die höchsten Werte.

### VIII.

Andere Fehlerquellen können durch postmortale Veränderungen des Gewebes bedingt sein. Dabei ist von Bedeutung

a) die Zeit, die nach eingetretenem Tod bis zur Versuchsausführung verstreicht;

b) die Aufbewahrungsart des Organes. Wir wollen im besonderen untersuchen, ob es gleichgültig ist, ob das Organ im Körper bleibt, oder ob es außerhalb desselben z. B. in einer feuchten Kammer aufgehoben wird.

a)

Man entnimmt einer Maus sofort nach dem Tode 0,2 g Leber oder 1 Niere und führt damit sofort die übliche Reaktion aus. Die andere Organhälfte bleibt noch eine bestimmte Stundenzahl im Körper, der wieder geschlossen und bei 8—10° aufbewahrt wird. Nach Ablauf der bestimmten Zeit wird dann der Rest des Organes herausgenommen und ebenfalls auf seinen Oxydasegehalt untersucht.

L. 0,2 g Leber oder 1 Niere + 2 ccm Nadigemisch mit einer 2 ccm Nadikontrolle.

Die Organe werden erst *x Stunden* nach der Tötung des Tieres untersucht.

II. 0,2 g Leber oder 1 Niere + 2 ccm Nadigemisch mit einer 2 ccm Nadi-kontrolle.

Die Organe werden sofort untersucht.

<i>Ergebnisse.</i>				
Organ	Zeit post mortem		I.	II.
1 Niere	5	Stunden	14,0	11,2
Leber 0,2 g	6	„	6,3	8,9
	9	„	5,2	3,3
	22	„	5,1	8,9
1 Niere	24	„	6,1	5,5
	72	„	7,9	8,4
0,2 g Leber	96	„	7,1	6,8
	100	„	9,4	8,7

Die quantitative Indophenolblaubestimmung zeigt merkwürdigerweise selbst bei einem erst 100 Stunden post mortem ausgeführten Versuch keine Abnahme der Indophenolbildung; sie ergibt im Gegenteil bis auf 3 Ausnahmen eine geringe Zunahme. Die in mehreren Fällen ausgeführten mikroskopischen Vergleiche entsprachen diesem Befunde nicht. Dort zeigte sich stets eine Abnahme der Indophenolgranula, aber auch kein vollständiger Schwund, wie es verschiedentlich am untersuchten älteren Sektionsmaterial der Fall war.

b)

Zur Feststellung der Rolle, die die Art der Aufbewahrung eines Organes spielt, wird einem frisch getöteten Tier ein Teil der Leber oder eine Niere sofort entnommen und in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Der Rest der Leber oder die andere Niere bleibt im Körper. Nach Verlauf bestimmter Zeit wird nun der Gehalt an Oxydase in beiden Organen getrennt bestimmt.

Organ	Zeit p. m.	I.	II.	III. Mikroskopischer Befund	
			Verdünnungs- quotienten	Gew. Oxydase und diffuse Blaufärbung	Leukocyten- oxydase
Niere	20 Stunden	a <sup>1)</sup>	5,02	+++	++
		b <sup>2)</sup>	5,02	+++	++
	22 „	a)	6,0	+++	++
		b)	5,9	+++	++
	40 „	a)	3,3	+	+++++
		b)	5,2	++	++
	50 „	a)	4,7	++	+++++
		b)	6,8	+	+++++
Leber 0,2 g	100 „	a)	1,3	+	++
		b)	1,8	+	++

Weitgehende Schlüsse lassen sich aus diesen wenigen Versuchen nicht ziehen. Mit gewisser Wahrscheinlichkeit kann man nur sagen, daß in

<sup>1)</sup> Im Körper aufbewahrt.

<sup>2)</sup> Außerhalb des Körpers aufbewahrt.

den ersten 20 Stunden nach dem Tode die Aufbewahrungsart der Organe, ob in oder außerhalb des Körpers, keinen Einfluß auf die Oxydase-wirkung hat. Vergleicht man 40–100 Stunden post mortem, so sinkt der Verdünnungsquotient der im Körper aufbewahrten Organe um das 1,3 bis 1,5fache gegenüber dem der in einer feuchten Kammer aufbewahrten Organe. Der mikroskopische Befund entspricht im allgemeinen diesen Angaben. Im übrigen zeigt der 100 Stunden nach dem Tode ausgeführte Versuch, genau wie in Tab. 8a, noch eine deutliche Indophenolblaubildung. Wir sind uns bewußt, daß diese Ergebnisse im Widerspruch stehen mit den bisherigen im Schrifttum angegebenen, die im allgemeinen einen raschen Oxydaseschwund nach dem Tode ergeben. Auch in unseren mikroskopischen Vergleichen nahm der Gewebsoxydasegehalt ständig ab, die Leukocytenoxydase hingegen blieb erhalten. Um so auffallender sind daher die hohen Mengenwerte. Wie läßt sich nun beides miteinander vereinbaren? Wie bekannt, zerstören die autolytischen Vorgänge die vorgebildeten Zellgranula. Dadurch werden die Oxydasen zwar von ihrer granulären Grundsubstanz losgelöst, behalten aber wohl, wie die diffuse Blaufärbung im mikroskopischen Bilde zeigt, ihre indophenolbildende Kraft bei. Ob diese diffuse Färbung nun unbedingt eine Oxydaseabnahme in sich schließen muß, oder ob nicht dieselbe Menge mit derselben Kraft nur in einer anderen Form wirkt, ist mikroskopisch schwer zu sagen, da sich erstens die diffuse Färbung durch das Auge schwer mengenmäßig erfassen und bestimmen läßt, und weil zweitens diese Oxydaseform sich durch eine noch viel geringere Widerstandsfähigkeit auszeichnet als die labile Art. Sie verschwindet z. B. durch Berührung mit Wasser oder anderen Flüssigkeiten schon viel früher als die labile. Es ist nun nicht ausgeschlossen, daß diese aus den Zellgranula ausgetretene Oxydase durch die Mengenbestimmung leichter und besser erfaßt wird, als es durch die mikroskopische Untersuchung der Fall ist. Andererseits könnte die Tatsache, daß wir 100 Stunden nach eingetretenem Tod noch keinen Oxydaseschwund haben, gegen die echte Fermentnatur des Stoffes sprechen.

## IX.

Ob und inwiefern die Wasserstoffionenkonzentration die Versuchsergebnisse beeinflusst, ist von uns nicht ermittelt. Da aber gerade fermentative Vorgänge, wie die Untersuchung der letzten Jahre gezeigt haben, weitgehend von der  $p_H$  abhängig sind, würde es jedenfalls von Bedeutung sein, jedesmal unter gleichen, optimalen Bedingungen zu arbeiten. Bei dem bislang gebrauchten Nadigemisch dürfte das wohl mit Schwierigkeiten verbunden sein, da auch von uns die stark hygroscopische Dimethylbase verwandt ist, die sich nach den Untersuchungen von *Graeff* und *Katsunuma* für eine genaue  $p_H$ -Bestimmung nicht eignet. Für

diesen Fall muß die Base durch das Diaminhydrochlorid ersetzt werden (*Graeff*). In unseren Versuchen hat sich aber das Hydrochlorid als weniger gut geeignet erwiesen, als die Base, deshalb haben wir von seiner Benutzung Abstand genommen. In unserm Gemisch wird durch den ständigen Zusatz der 1,7% igen Sodalösung eine gewisse Pufferung erzielt. Inwieweit diese aber befähigt ist, dem an sich stark sauren Nadi-gemisch die für einen Versuchsablauf optimale, alkalische Reaktion zu erteilen, haben wir nicht geprüft, sondern uns mehr bemüht, unter möglichst gleichbleibenden Bedingungen zu arbeiten, um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können. Für die mikroskopische Nadi-reaktion mit  $\alpha$ -Naphthol und Diaminhydrochlorid gibt *Graeff* eine Reihe tauglicher Pufferlösungen an.

*W. H. Schultze* hält — zumal eine Gewebspufferung noch nicht möglich ist — eine genaue Pufferung des Nadi-gemisches für unnötig, „weil die einzelnen Zellen wieder eine verschiedene chemische bzw. physikalische Zusammensetzung haben, und deshalb eigentlich für jedes Gewebe wieder eine besondere Puffermischung gefordert werden müßte, und weil in der Zelle, in der sich eine Reaktion abspielt, infolge der elektiven Eigenschaften der überlebenden Zelle ganz andere Konzentrationsverhältnisse zustande kommen, als sie in der auf die Zellverbände zur Einwirkung kommenden Lösung hergestellt ist“.

Neuerdings hat nun *Graeff* zur Ermittlung der Gewebs-H-ionen-konzentration Versuche angestellt, die allerdings noch nicht zu einer einfachen, schnellen und sicheren Methode geführt haben.

## X.

Wie steht es nun um die absoluten Werte der errechneten Verdünnungsquotienten? Aus den bisherigen Tabellen geht zwar hervor, daß die von uns benutzte Methode bei Ausschaltung der Fehlerquellen quantitativ arbeitet. Besonders zeigten Parallelversuche des gleichen Organes jeweils weitgehende Übereinstimmung.

Auffallend muß es aber sein, daß die absoluten Zahlen bei Versuchen mit dem gleichen Organ verschiedener Tiere weitgehend voneinander abweichen, daß also, um ein Beispiel zu nennen, der Oxydasegehalt der verschiedenen Lebern bei gleicher Versuchsanordnung die stärkste Verschiedenheit erkennen läßt. Diese Zahlen sind allerdings insofern nicht ganz einwandfrei, da bei den ersten Versuchen nicht auf Bedeutung gewisser angeführter Fehlerquellen geachtet wurde (im besonderen Temperatur). Außerdem werden in diesen weitgehenden Unterschieden noch andere Einflüsse zur Geltung kommen: Alter des Tieres, Fütterungszustand, Funktion eines Organes können gegebenenfalls die Menge der Oxydase beeinflussen. So konnte *Graeff* eine Erhöhung des Oxydasegehaltes der Muskulatur des graviden Uterus gegenüber dem nicht gra-

viden feststellen. Daß Organe junger Tiere oftmals reicher an Oxydasen sind als die älterer, ist schon von den verschiedensten Seiten behauptet worden. Um nun vergleichbare absolute Werte zu erzielen, muß man auf all diese Einzelheiten achten und sie im Ergebnis vermerken. Aber von Bedeutung scheinen gerade diese Unterschiede der reinen Zahlen insofern zu sein, als sie vielleicht gestatten, feinere funktionelle Veränderungen der Zellen festzustellen, die weder im gewöhnlichen Schnittpräparat noch im mikroskopischen Oxydasepräparat erkennbar sind. Denn ein Vergleich der Ergebnisse der quantitativen Methode mit den mikroskopischen Präparaten zeigte sehr häufig, daß die mit der ersteren gefundenen Unterschiede im mikroskopischen Bilde nicht deutlich zum Ausdruck kamen.

### *Zusammenfassung.*

1. Es wird eine Methode angegeben zur Mengenmessung des durch Gewebsoxydase aus  $\alpha$ -Naphthol und Dimethylparaphenyldiaminbase gebildeten Indophenols. Sie beruht auf einem Farbvergleich mit einer zur gleichen Zeit angesetzten Nadikontrolle ohne Gewebe, wobei der gebildete Farbstoff mit Xylol ausgeschüttelt wird.

2. Die Methode arbeitet bis auf einen Unterschied von 5–10% genau mengenmäßig, wie aus den Parallelversuchen I a + b, II und IV zu ersehen ist.

3. Verlängert man die Einwirkungszeit des Gewebes auf das Nadigemisch, so nimmt der Verdünnungsquotient — wahrscheinlich infolge einer Fermenthemmung — regelmäßig ab.

4. Das Temperaturoptimum scheint bei den ausgeführten Versuchen zwischen 18 und 20° zu liegen. Eine Erhöhung auf 56–59° ergibt eine regelmäßige Abnahme der Indophenolblaubildung; die Eisversuche haben keine einheitlichen Ergebnisse, sie sind aber im allgemeinen höher als die der Wärmeversuche, aber kleiner als die der Zimmerversuche.

5. Die postmortalen Einflüsse machen sich häufig durch eine geringe Zunahme der Indophenolblaubildung geltend, die aber in keinem Verhältnis zu dem mikroskopischen Befunde steht. Vielleicht läßt sich dieser Unterschied durch die Annahme erklären, daß bei den autolytischen Vorgängen die Zellgranula zwar zerstört werden, die Oxydasen aber erhalten bleiben, jedoch in einer so wenig widerstandsfähigen Form, daß sie mit der üblichen mikroskopischen Methode schlecht zu erfassen sind.

6. Untersuchungen von formolfixiertem Gewebe zeigten, selbst wenn der mikroskopische Befund so gut wie negativ war, eine deutliche Farbstoffbildung, die durch die oft sehr geringe Leukocytenmenge nicht recht erklärt zu sein scheint. Ursache ist vielleicht die Addition eines zweiten Farbstoffes aus  $\alpha$ -Naphthol und Formol durch Aufnahme

von Luftsauerstoff (*Loele*) zu dem aus  $\alpha$ -Naphthol und Diamin gebildetem Indophenolblau.

7. Die Versuche mit gekochtem Gewebe ergaben regelmäßig keine Indophenolbildung.

8. Absolute Werte bringen die Versuche nicht. Um diese zu finden, muß geachtet werden auf das Alter der Tiere, ihren Ernährungszustand, auf die vorausgegangene Fütterung und den Funktionszustand des betreffenden Organes. Wahrscheinlich spielt noch die Wasserstoffionenkonzentration des Nadigemisches und der Gewebe eine gewisse Rolle.

### Literaturverzeichnis.

- Bieling*, Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Atmung von Mikroorganismen und Zellen. Zentralbl. f. Bakteriöl., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, **90**. 1923. — *Batelli* und *Stern*, Die Oxydationsfermente. Ergebn. d. Physiol. **12**, 96. 1912. — *Dietrich*, Naphtholblausynthese und Lipoidfärbung. Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. 1908, S. 52. — *Euler*, *Hans*, Allgemeine Chemie der Enzyme. Ergebn. d. Physiol. **9**, 241. 1910. — *Euler* und *Bolin*, Zur Kenntnis biologischer Oxydationen. I. Teil. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **57**. 1908. II. Teil; **61**. 1909. III. Teil; **72**. 1909. — *v. Gierke*, Die oxydierenden Zellfermente. Münch. med. Wochenschr. 1911, Nr. 44. — *v. Gierke*, Die Rolle der inneren Fermente in Physiologie und Pathologie. Wien. klin. Rundschau 1913, Nr. 33. — *Graeff*, *Siegfried*, Intracelluläre Oxydation und Nadireaktion. Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **70**. 1922. — *Graeff*, *Siegfried*, Ein Verfahren zur Bestimmung der H-Ionenkonzentration im Gewebe mit Indicatoren. Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **72**, Heft 3. 1924. — *Graeff*, *Siegfried*, Die mikromorphologischen Methoden der Fermentforschung im tierischen und pflanzlichen Organismus. Abderhalden, Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden. Abteilg. 4, Teil I, Heft 1. — *Graeff*, *Siegfried*, Herstellung und Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration im Nadigemisch. Zeitschr. f. allg. Physiol. 1922, Nr. 20. — *Graeff*, *Siegfried*, Die physikalisch-chemischen Grundlagen des „Mi“-Effektes der Nadireaktion. Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **32**, Nr. 13. 1922. — *Graeff*, *Siegfried*, Die Naphtholblauoxydasereaktion der Gewebszellen nach Untersuchungen am unfixierten Präparat. Frankfurt. Zeitschr. f. Pathol. **11**. 1912. — *Graeff*, *Siegfried*, Der colorimetrische Nachweis von Zelloxydase unter optimalen Bedingungen. Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **35**, Nr. 16. 1925. — *Hedin*, *S. G.*, Über die Hemmung der Enzymwirkung durch Adsorption. Ergebn. d. Physiol. **9**, 443. 1910. — *Hatigan*, *J.*, Die klinische Bedeutung der Winkler-Schultze-Oxydasereaktion. Wien. klin. Wochenschr. 1913—1914, S. 537. — *Katsunuma*, *S.*, Histochemische Studie über die Oxydasereaktion im tierischen Gewebe. Jena 1924. — *Klopfer*, *A.*, Experimentelle Untersuchungen über die W. H. Schultzesche Oxydasereaktion. Zeitschr. f. exp. Pathol. **11**, 467. 1912. — *Loele*, Zur sekundären Naphtholreaktion. Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **31**, 17. 1921. — *Loele*, Über den farb-chemischen Nachweis einiger oxydierender Substanzen des Körpers. Münch. med. Wochenschr. 1914, Nr. 26. — *Loele*, Histologischer Nachweis und biochemische Bedeutung oxydierender und reduzierender Substanzen innerhalb der Zelle. Ergebn. d. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **16**, II. Abt. 1913. — *Loele*, Zur Theorie der Oxydasenfärbung. Fol. haematol. **14**, 26. 1912. — *Loele*, Über primäre und sekundäre Phenolreaktion. Zentralbl.

f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **30**, Nr. 20. 1920. — *Lipschütz*, Die Bedeutung der Gewebsatmung für klinische Fragestellungen. Dtsch. med. Wochenschr. 1923, S. 778. — *Michaelis*, Die Bestimmung der Wasserstoffzahl durch Indicatoren, Dtsch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 45. — *Michaelis*, Vereinfachung der Indicatorenmethode. Dtsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 17. — *Michaelis*, Erweiterung der vereinfachten Methode. Dtsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 24. — *Nakano*, Beiträge zur Kenntnis der histologischen Oxydasereaktion, der Supra-Vitalfärbung. Fol. haematol. **15**. 1913. — *Rostock*, Weitere Reagensglasversuche zur Feststellung von Gewebsschädigung und Gewebstod. Abderhalden, Fermentforschung N. F., Bd. I. 1923. — *Schlenner*, Über Technik der Oxydasereaktion und ihr Verhalten an Monocyten. Dtsch. med. Wochenschr. 1921. — *Schultze, W. H.*, Die Oxydasereaktion an Gewebsschnitten und ihre Bedeutung für die Pathologie. Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **45**, 1. 1909. — *Schultze, W. H.*, Weitere Mitteilungen über Oxydasereaktionen an Gewebsschnitten. Münch. med. Wochenschr. 1910, Nr. 42, S. 2171. — *Schultze, W. H.*, Referat im Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **33**. 1922—1923 über *Graeff*: Die mikromorphologischen Methoden der Fermentforschung im tierischen und pflanzlichen Organismus. — *Vernon*, Die Abhängigkeit der Oxydasewirkung von Lipoiden. Biochem. Zeitschr. **47**. 1912. — *Vernon*, Intracelluläre Fermente. Ergebn. d. Physiol. **9**, 158. 1910. — *Vernon*, Journ. of physiol. **42**. 1911. — *Warburg, O.*, Physikalische Chemie der Zellatmung. Biochem. Zeitschr. 1921, S. 134. — *Warburg, O.*, Untersuchung über die Oxydationsprozesse in Zellen. Münch. med. Wochenschr. 1911, S. 289. — *Warburg, O.*, Über Hemmung der Blausäurewirkung in lebenden Zellen. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **76**, 331. 1911—1912. — *Winkler*, Der Nachweis von Oxydase in den Leukocyten mittels der Dimethylparaphenylendiamin-Alpha-naphthol-Reaktion. Fol. haematol. **4**, Heft 3. 1907.

---