

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Göttingen. — Direktor: Geheimrat Kaufmann.)

Weitere Untersuchungen über Oxydasen mittelst der quantitativen Methode.

Von

M. Staemmler.

(Eingegangen am 13. September 1925.)

In seiner im Jahre 1924 erschienenen Monographie über die „intracelluläre Oxydation und Indophenolblausynthese“ hat *Katsunuma* das zusammengetragen, was wir seit den grundlegenden Untersuchungen von *Röhmann* und *Spitzer*, *Winkler*, *W. H. Schultze* und *v. Gierke* an neuen Tatsachen von der Wirkung und dem Wesen der sog. Oxydasen kennengelernt haben. In ausgedehnten eigenen Untersuchungen kann er die weite Verbreitung der Oxydasen in allen tierischen Geweben bestätigen, kann Angaben über ihr Vorkommen im embryonalen und postembryonalen Leben, in den verschiedensten Altersstufen, bei höheren und niederen Tieren machen und legt mit seiner großen Arbeit einen Grundstock, auf dem weitere Forschung aufbauen kann.

Es lag nahe, daß die mikroskopische Nachweisbarkeit der Oxydasen auch den pathologischen Anatomen reizen mußte, nach Veränderungen in ihrer Wirkung bei pathologischen Prozessen zu fahnden. Und doch ist die Ausbeute, die das Werk von *Katsunuma* in dieser Hinsicht bietet, eine recht geringe. Er kann von einer Anzahl eigener Beobachtungen berichten, die aber wenig Systematisches an sich haben, er vermag kaum über ähnliche Ergebnisse früherer Untersucher Mitteilung zu machen. So sehen wir, daß (von Untersuchungen der Leukocyten abgesehen) die Entdeckung der Oxydase-Reaktion bisher für die Krankheitsforschung recht unfruchtbar geblieben ist.

In einer mit *Fäulein W. Sanders* gemeinsam veröffentlichten Arbeit habe ich betont, worin ich den Grund für diese Unfruchtbarkeit sehe. Es ist nach dem mikroskopischen Schnitt, zumal da er aus unfixiertem Material gemacht werden muß und daher ungleich dick ausfällt, nicht möglich, die Mengenverhältnisse des gebildeten Indophenolblaus zu beurteilen. Wenigstens wird der Versuch dazu immer die Eigenschaft einer sehr subjektiven Schätzung behalten. Gewiß müssen wir auch bei anderen Zellsubstanzen oft versuchen, nach dem mikroskopischen

Bild auf die Menge zu schließen. Aber ich fand, daß dieser Schluß bei kaum einer Substanz so unsicher ist, wie gerade bei den in feinsten Verteilung den Zelleib ausfüllenden Indophenolblaukörnern.

Deswegen haben *W. Sanders* und ich versucht, der üblichen histologischen Methode eine quantitative an die Seite zu stellen, die darauf beruht, daß das in einer Zeiteinheit von einer bestimmten Gewebsmenge gebildete Indophenolblau extrahiert und dann seine Menge durch Farbvergleich bestimmt wird. Diese Methode soll die histologische keineswegs ersetzen, sondern nur ergänzen. Denn sie kann selbstverständlich immer nur etwas über die Gesamtmenge des gebildeten Farbstoffes aussagen, nie etwas über seine Lokalisation.

Bei weiteren, im Laufe dieses Jahres angesetzten Versuchen mit der quantitativen Methode wurden zunächst die früheren Ergebnisse bestätigt. Was bei der beschriebenen Methodik, wie auch bei der üblichen histologischen das Urteil über die Mengenverhältnisse im ganzen etwas unsicher macht, das ist die Inkonstanz der Lösungen. Vor allem scheint das (in zugeschmolzenen Glasröhrchen aufgehobene) Dimethylparaphenylandiamin in seiner Zusammensetzung und vor allem in seinem Wassergehalt nicht so gleichmäßig zu sein, wie man es verlangen müßte. Und ich glaube, daß sich hieraus Fehler ergeben können, wenn man die zu verschiedenen Tagen erhaltenen Versuchsergebnisse miteinander vergleicht. Ich habe deshalb zunächst besonders auf den Vergleich von solchen Versuchen Wert gelegt, die unmittelbar nebeneinander unter auch sonst unbedingt gleichen Bedingungen angesetzt waren.

Das Ziel meiner gleich näher mitzuteilenden Versuche war, gewisse Grundlagen für die Anwendung der Methodik am pathologisch veränderten Material zu schaffen. Im besonderen wollte ich die Frage klären, ob die Gewebsoxydasen in ihrer Wirkung durch innere oder äußere Umstände beeinflusst werden können, Faktoren, die entweder im Funktionszustande der untersuchten Gewebe liegen, oder die in Form von zugesetzten Stoffen fördernd oder schädigend in den fermentativ-katalysatorischen Vorgang eingreifen.

Die erste Frage war: Ist die oxydative Tätigkeit eines Organs abhängig vom *Alter* des Tieres?

Es werden 3 verschieden alte Mäuse aus demselben Stall gleichzeitig getötet und mit der Leber die Oxydase-Reaktion gemacht. Auf 0,2 g Leber werden 2 ccm des Nadi-Gemisches genommen, die Reaktion in üblicher Weise angesetzt und alle mit einer gemeinsamen gewebsfreien Kontrolle verglichen.

Protokolle.

1. Maus I	19,9 g	Kein Unterschied in der Oxydasereaktion
Maus II	6,1 g	der Lebern.
Maus III	4,6 g	

2. Maus I	13,3 g	Reaktion bei III eine Spur schwächer; bei
Maus II	5,5 g	I und II gleich.
Maus III	4,1 g	
3. Maus I	18,2 g	Oxydasereaktion bei I und II = 14,7; bei
Maus II	5,7 g	III = 6,2.
Maus III	3,2 g	
4. Maus I	18,5 g	Oxydasereaktion 9,0.
Maus II	5,3 g	Oxydasereaktion 8,5.
Maus III	3,1 g	Oxydasereaktion 3,1.
5. Maus I	15,0 g	Oxydasereaktion 8,0.
Maus II	6,2 g	Oxydasereaktion 8,0.
Maus III	4,1 g	Oxydasereaktion 4,2.
Maus IV	2,9 g	Oxydasereaktion 11,9.

Die Ergebnisse stimmen bei I und II also durchweg überein. Die Leber des wachsenden Tieres gibt an sich keine andere Reaktion als die des ausgewachsenen.

Bei III ist die Reaktion im allgemeinen etwas oder sogar beträchtlich niedriger. Das muß, wenigstens zum Teil, darauf beruhen, daß die Leber des noch saugenden Jungen stark fetthaltig ist und somit auf die Gewichtseinheit weniger oxydasenhaltigen Stoff enthält. Weshalb bei 5 IV die Reaktion so hoch ansteigt, ist nicht recht verständlich. Zunächst wird man sagen können, daß reine Alterseinflüsse nicht nachweisbar sind.

Die zweite Frage lautet: Ändert sich die Wirkung der Oxydasen mit der *Funktion* eines Organs?

Zunächst wurde geprüft, wie sich Organe im Hungerzustand verhalten.

Von 2 gleichschweren Mäusen wird die eine in üblicher Weise genährt, die zweite erhält während 24 St. nur Wasser.

Wie wechselnd die Ergebnisse sind, zeigen die 3 folgenden Niederschriften.

Versuch 1: a) Oxaydse-Reaktion in der Leber bei beiden Tieren gleich.

b) Oxydase-Reaktion in den Nieren beim gutgenährten Tier stärker. Verhältnis zum Hungertier wie 1,4: 1.

Versuch 2: a) Leberoxydase-Reaktion beim gutgenährten Tier höher, aber nur in Spuren 1,2: 1.

b) Nierenoxydase-Reaktion beim Hungertier höher 1,8: 1.

Versuch 3: a) Leberoxydase-Reaktion beim gutgenährten Tier höher 1,4: 1.

b) Niere } beiderseits gleich.
c) Herz }

Eine ganze Anzahl weiterer Versuche hatten durchaus wechselnde Ergebnisse. Bald zeigten die Organe des Hungertieres, bald die des anderen höhere Werte.

Die Funktion des Muskels wurde durch Gifte beeinflußt.

Von 2 gleichgroßen Mäusen oder Fröschen wird das eine Tier mit Strychnin, das andere mit Curare vergiftet. Der Tod tritt unter den typischen Erscheinungen (hochgradigsten Krämpfen beim Strychnintier, völliger Lähmung beim Curaretier) ein.

Die Oxydase-Reaktion ergibt:

2 mal stärkere Reaktion beim Strychnintier,

3 mal stärkere Reaktion beim Curaretier,

2 mal bei beiden gleiche Befunde.

Diese Ergebnisse müssen gegen eine Beeinflussung der Oxydase-Reaktion durch die Funktion des Organes sprechen. Sie stimmen mit denen überein, die *Katsunuma* durch faradische Reizung des Froschmuskels vom Nerven aus erzielte. Trotz hochgradigen Tetanus konnte er keine Veränderung in dem Ausfall der Oxydase-Reaktion gegenüber einem nicht gereizten Vergleichsmuskel feststellen.

Ähnlich waren die Ergebnisse, wenn ich Tiere durch rasches oder langsames Ersticken tötete und den Oxydasegehalt der Organe mit dem auf andere Weise getöteten Tiere verglich. Bald zeigten die Organe des erstickten, bald die des Kontrolltieres den höheren Gehalt an Oxydasen, wie ja solche Unterschiede auch sonst zwischen den einzelnen Individuen bestehen.

Steigerung oder Herabsetzung der Funktion eines Organes zeigte somit keinen nachweisbaren Einfluß auf die Wirksamkeit der Oxydasen.

Wieweit läßt sich die Tätigkeit der Oxydasen durch *chemische Stoffe* beeinflussen?

Am bekanntesten ist die Wirkung des *Cyans*. Bringe ich einen frischen Gewebsschnitt nur kurze Zeit in eine Cyankalilösung, so ist jede spätere Oxydase-Reaktion negativ. Das läßt sich sowohl mit der histologischen, wie mit der chemisch-colorimetrischen Methode nachweisen. Damit scheint durchaus der Befund übereinzustimmen, daß bei Vergiftungen mit Cyan das Blut seine hellrote Farbe behält, weil die Organzellen infolge ihrer Fermentlähmung den O_2 nicht an sich reißen. Untersucht man aber die Organe vergifteter Tiere, so läßt sich eine normale Oxydase-Reaktion in ihnen nachweisen; diese Tatsache ist schon von verschiedensten Seiten (*Graeff*, *Katsunuma*, *Hallheimer* u. a.) festgestellt worden, und ich kann sie auf Grund eigener Versuche bestätigen. Nach Vergiftung von Mäusen durch Einspritzung von Cyankali war die Menge des im Versuch von der Gewichtseinheit der Leber gebildeten Indophenolblaus gegenüber der Kontrolle nicht herabgesetzt. In 1 Fall schien sie sogar erhöht zu sein.

Diese Tatsache muß doch recht bedenklich stimmen. Daß die Zellatmung bei der Cyankalivergiftung gestört, ja fast völlig gehemmt ist, darüber kann doch, nach dem Sauerstoffgehalt des Blutes, kein Zweifel bestehen. Wenn wir nun an der Indophenolblau-Oxydase

keinerlei Hemmung nachweisen können, so muß das Zweifel daran erwecken, ob denn die Oxydase, die wir mit unserer Methode nachweisen, in der Tat wesentlich für die Zellatmung ist. Wenn *Katsunuma* bei intravenöser Einspritzung von Blausäure eine Oxydase-Schädigung in verschiedenen Organen nachweisen konnte, so beweist das natürlich nicht allzu viel. Daß Cyankali ein Zell- und Fermentgift ist, darüber ist ja kein Zweifel. Das läßt sich auch an anderen Fermenten, z. B. den Diastasen, nachweisen. Warum soll es also nicht auch, wenn es in genügend konzentrierter Form an die Zellen herankommt, die Oxydase schädigen, wie es das ja auch im Reagenzglas tut. Viel wichtiger erscheint mir, daß die innere Atmung im Körper im höchsten Grade geschädigt sein kann, ohne daß an den Oxydasen etwas nachweisbar ist. Immerhin muß auch damit gerechnet werden, daß das Gift unmittelbar nach dem Tode von den Oberflächen, an denen es seine Wirkung entfaltete, entfernt wird, und so die Fermente wieder in Funktion treten können.

Ähnlich wie beim Cyan scheinen die Verhältnisse bei der *Phosphor*-vergiftung zu liegen.

Bringt man frische Gewebsschnitte in eine dünne P-Emulsion, so werden die labilen Oxydasen so geschädigt, daß eine Farbstoffbildung später nicht mehr stattfindet.

Bei der P-Vergiftung wird von einem Teil der Forscher, besonders von pharmakologischer Seite, eine Oxydasehemmung angenommen.

Und prüft man, wie ich das in einer früheren Arbeit getan habe, die Wirkung der Oxydasen in der bei der P-Vergiftung doch vorzugsweise geschädigten Leber, so ist die Indophenolblaubildung hier nicht nur nicht herabgesetzt, sondern sogar erhöht.

Wir haben also wiederum eine Unstimmigkeit zwischen den Ergebnissen der Reagenzglasversuche und denen im Tierkörper, Unstimmigkeiten, die den Anschein erwecken, als ob Oxydasetätigkeit und Gewebsatmung nicht einfach gleichgestellt werden dürfen.

Die folgenden Versuche sollen die Frage beantworten, ob es möglich ist, die Oxydasen durch irgendwelche Stoffe im Sinne einer *Verstärkung* zu beeinflussen.

Es lag nahe, hier in erster Linie die Sekrete von *endokrinen Drüsen* zu benutzen.

Es wurden also Versuche mit Novothyral (*Merck*), einer wasserlöslichen Schilddrüsensubstanz, mit Adrenalin, Pituglandol und Insulin angestellt. Jeder Versuch umfaßte 4 Reaktionen:

- a) Organ und Nadigemisch und Inkret,
- b) Organ und Nadigemisch ohne Inkret,
- c) Nadigemisch und Inkret, ohne Organ,
- d) Nadigemisch ohne Inkret, ohne Organ.

c) und d) mußten deswegen mit angesetzt werden, weil ja die Möglichkeit bestand, daß die Zuführung des Inkretes schon an sich (ohne Einwirkung auf ein Ferment) eine Farbveränderung in dem Gemisch hervorrief, die dann das Ergebnis der eigentlichen Versuche a) und b) beeinflusste. a) und b) wurden direkt colorimetrisch verglichen.

Die Versuche mit Novothyral hatten zunächst das Ergebnis, daß regelmäßig die Farbstoffbildung in c) etwas stärker war als in d). Der Farbvergleich ergab Werte, die zugunsten von c) zwischen 1,2 und 1,3 schwankten. Wurde nun zum Gewebe-Nadigemisch $\frac{1}{4}$ ccm. einer 1 proz. N.-Lösung zugefügt, so war zwischen a) und b) entweder überhaupt kein Unterschied festzustellen oder die Farbe war bei a) um ein geringes verdunkelt, einem Wert, der aber ebenfalls nicht über 1,2 oder 1,3 hinausging, also nicht auf Fermentanregung zurückzuführen war.

Bei den *Adrenalin*-Versuchen, in denen zu 2 ccm des Nadigemisches 0,25 — 0,5 ccm Suprarenin — *Merck* — (in das Vergleichsschälchen 0,25—0,5 ccm Aqua dest.) zugefügt wurden, ergab sich zwischen c) und d) meist ein gewisser Unterschied zuungunsten von c). Er ging bis zur Größe von 1,5 hinauf; d. h. in einzelnen Fällen mußte d) um die Hälfte seiner Menge verdünnt werden, damit die Farbe c) entsprach.

In den Gewebsversuchen wurde unter 10 Versuchen die Indophenolblaubildung 6 mal gar nicht oder nur in gleichem Maße wie in der gewebsfreien Vergleichsschale beeinflusst, 1 mal wurde sie etwas herabgesetzt, 3 mal gesteigert. Von diesen 3 Fällen handelte es sich 2 mal um Nieren, 1 mal um Muskel.

Unter 20 Versuchen mit *Insulin*, in denen in der Regel 0,25 ccm auf 2 ccm Nadigemisch kamen, zeigte sich in 10 Fällen der Reaktionsausfall unbeeinflusst, 6 mal war er leicht verstärkt, 4 mal etwas herabgesetzt.

Die Kontrollen c) und d) zeigten im allgemeinen keine wesentlichen Unterschiede.

Dieselben Ergebnisse fanden sich, um es kurz zu sagen, beim Zusetzen von *Pituglandol*.

Wir können also zusammenfassend sagen, daß sich die Wirkung der Oxydasen durch Inkrete, selbst wenn ziemlich hohe Dosen zu dem Versuch zugesetzt wurden, nicht beeinflussen ließ.

Geringe Steigerungen und Hemmungen halten sich fast genau die Wage.

Über ganz entsprechende Befunde wird neuerdings von *Grafe* berichtet, der die Einwirkung von Inkreten auf die Atmung von Geweben mit der *Warburg*schen Versuchsanordnung prüfte.

Etwas positiver waren die Ergebnisse bei der Einwirkung von *Lecithin*. Daß die letztere Substanz die Fermenttätigkeit beeinflussen

kann, ist gerade in der letzten Zeit verschiedentlich festgestellt worden. So sah *Jacoby* die Harnstoffspaltung durch Bakterien unter dem Einfluß von Lecithin verstärkt. Er nimmt eine vermehrte Fermentbildung an. *Vernon* hat mehrfach darauf hingewiesen, daß die Wirkung der Oxydasen irgendwie von Lipoiden abhängig ist. *Lipschitz* fand bei seiner Versuchsanordnung eine Steigerung der Atmung durch Lecithin, und *Much* weist erst kürzlich darauf hin, daß Fermentwirkungen durch Lipoider gesteigert oder gehemmt werden können.

Oppenheimer geht in seinem Handbuch auf die Bedeutung des Lecithins für die Fermentwirkung kurz ein, ist aber der Ansicht, daß „etwas Konkretes bei den Lecithinversuchen noch nicht herausgekommen ist“ (Die Fermente, Lieferung 1, S. 77, 1924).

Die Arbeit mit Lecithin wird dadurch sehr erschwert, daß die Substanz in Wasser nicht löslich ist.

Zur Ansetzung meiner Versuche habe ich 0,2 g Lecithin in 5 ccm Methylalkohol gelöst, und 20 ccm Ringerlösung zugefügt. Es entsteht dann eine feine gelblich gefärbte Emulsion. Von dieser wurden 0,5 ccm zu 2 ccm Nadigemisch und zum Vergleich zugesetzt, während die Parallelversuche 0,5 ccm Ringerlösung allein erhielten.

Bevor man nun irgendwelche Schlüsse ziehen konnte, mußte erst festgestellt werden, ob der Methylalkohol selbst in 20% Lösung den Ausfall der Oxydase-Reaktion beeinflußt. Das war in einem einzigen von zahlreichen Versuchen in steigendem Sinne der Fall. Man kann durchaus als Regel aufstellen, daß der Gehalt der Emulsion an Methylalkohol ohne Einfluß auf das Versuchsergebnis ist.

In einer zweiten Reihe von Versuchen wurde ohne Zusatz von Methylalkohol das Lecithin direkt mit dem Nadigemisch verrieben, bevor das letztere zum Gewebe zugefügt wurde.

In der folgenden Tabelle gebe ich die Ergebnisse mit dem in Methylalkohol gelösten Lecithin wieder. Ein + -Zeichen bedeutet, daß der Lecithinversuch, ein — Zeichen, daß der lecithinfreie Versuch ausgefallen ist.

Tabelle 1.

Versuchs-Nr.	Organ	Versuchsergebnis	
		a : b	c : d
73 a	Gehirn	+ 2,0	+ 1,1
72 b	Niere	+ 1,8	+ 1,5
90 a	Leber	+ 1,8	+ 1,3
49 b	Niere	+ 1,7	+ 1,3
48	Niere	+ 1,6	— 1,3
73 b	Niere	+ 1,6	+ 1,1
76 a	Niere	+ 1,6	+ 1,1
76 b	Niere	+ 1,6	+ 1,1
50	Niere	+ 1,5	— 1,4
51	Leber	+ 1,5	±

Versuchs Nr.	Organ	Versuchsergebnis	
		a : b	c : d
74b	Niere	+ 1,5	+ 1,1
74d	Gehirn	+ 1,5	+ 1,1
92c	Gehirn	+ 1,5	±
93b	Niere	+ 1,5	+ 1,1
94a	Leber	+ 1,5	±
94c	Gehirn	+ 1,5	±
74a	Niere	+ 1,4	+ 1,1
90b	Gehirn	+ 1,3	±
94b	Niere	+ 1,3	±
49a	Leber	+ 1,2	— 1,4
51b	Niere	+ 1,2	— 1,4
74c	Gehirn	+ 1,2	+ 1,1
91a	Leber	+ 1,2	±
91b	Gehirn	+ 1,2	±
93c	Gehirn	+ 1,2	+ 1,1
73c	Niere	+ 1,1	+ 1,1
92b	Gehirn	+ 1,1	+ 1,1
93a	Leber	+ 1,1	+ 1,1
47	Niere	±	— 1,1
92a	Leber	±	±
49c	Muskel	— 1,2	— 1,2
72a	Leber	+ 1,2	+ 1,5

Unter den 32 Versuchen zeigten somit 25 eine deutliche Steigerung der Fermentwirkung durch das Lecithin. 6 Versuche ergaben gleiche Indophenolblaubildung in Versuch und Vergleichsschale. In einem einzigen Fall scheint im Lecithinversuch die Farbstoffbildung insofern etwas schwächer, als auch in der gewebsfreien Kontrolle die lecithinhaltige Flüssigkeit eine etwas stärkere Verfärbung angenommen hatte.

Die Versuchsergebnisse sind im übrigen, gerade im Vergleich zu den mit Inkreten angesetzten, so gleichlautend, daß wir keine Zufälligkeiten annehmen können. Es scheint also das Lecithin imstande zu sein, die Wirkung der Oxydasen im steigenden Sinne zu beeinflussen.

Tabelle 2.

Versuchs-Nr.	Organ	Versuchsergebnis	
		a : b	c : d
32a	Leber	+ 2,9	—
32b	Leber	+ 2,6	—
32e	Niere	+ 2,2	—
31	Niere	+ 2,0	—
32d	Muskel	+ 1,8	—
34	Leber	+ 1,8	—
36	Herz	+ 1,7	—
41	Leber	+ 1,6	+ 1,1
44	Niere	+ 1,5	— 1,75
32c	Niere	+ 1,5	—
35	Leber	+ 1,3	—
45	Leber	+ 1,3	±

Tab. 2 ergibt dieselben Verhältnisse, wenn das Lecithin direkt mit dem Nadigemisch verrieben und dann die Suspension dem Gewebe zugesetzt wird. Einige Vergleichsversuche zeigen, daß auch in diesem Falle die Spontan-Bläung des Nadigemisches an der Luft durch den Lecithinzusatz nicht beeinflußt wird. Die Steigerung der Fermentwirkung scheint bei dieser Versuchsanordnung sogar noch etwas stärker zu sein. Das liegt wohl daran, daß etwas größere Lecithinmengen zugesetzt werden.

Dieselben Versuche mit *Cholesterin*, in Olivenöl gelöst, zeigten keine einheitlichen Ergebnisse. Es fand sich bald eine Steigerung, bald eine Hemmung der Oxydasewirkung.

Fassen wir kurz zusammen, was die bisherigen Versuche an Positivem ergeben haben, so ist es das, *daß es allein mit Lecithin gelingt, im Reagenzglasversuch die Wirkung der Oxydasen zu verstärken.*

Übrigens ist es mir bisher nicht gelungen, dieselbe Steigerung im Tierkörper dadurch hervorzurufen, daß ich Mäusen die Lecithin-emulsion subcutan oder intravenös einspritzte.

Die nächste Frage war die nach dem *Verhalten der Oxydasen* in den Organzellen *nach dem Tode* des Tieres. Systematische Untersuchungen darüber liegen nur ganz wenige vor. Und doch muß die Frage deswegen von Interesse sein, weil erst nach ihrer Lösung die Möglichkeit besteht, aus dem Verhalten der Oxydasen in Leichenorganen Schlüsse auf intravitale Vorgänge zu ziehen.

Katsunuma, der dem Einfluß der postmortalen Autolyse auf die Oxydasen seine Aufmerksamkeit schenkte, sah zunächst, daß Organe, die bei 37° aufgehoben waren, schon nach 1 Tag „fast keine Reaktion“ mehr gaben (S. 143).

Im Gehirn war der Ausfall der Reaktion verschieden, je nachdem, ob das Organ gleich nach dem Tode aus der Schädelhöhle herausgenommen und dann bei Zimmertemperatur aufgehoben wurde, oder ob es in der Schädelhöhle blieb. Im letzteren Falle hielten sich die Oxydasen mehrere Tage in unverändertem Zustand; im ersteren Falle gingen sie schon nach einigen Stunden zugrunde. Auf Eis ließen sie sich auch außerhalb der Schädelhöhle gut erhalten.

Bei den Baueingeweiden führte ein Belassen der Organe in der Bauchhöhle zu schneller Schädigung der Oxydasen. Bei Aufhebung im Eisschrank war auch hier die Reaktion oft noch nach Tagen erhalten.

Katsunuma stellt als allgemeine Regel auf:

„In der Regel verläuft die Oxydasereaktion parallel der postmortalen Zeit, und zwar, je später die Reaktion vorgenommen wird, desto schwächer fällt sie aus. In manchen Fällen ist dagegen keine Abschwächung, sondern im Gegensatz dazu eine Steigerung der Re-

aktion festzustellen, um nach einer gewissen Zeit wieder abzuschwächen“ (S. 21).

Meine Versuche, die die Feststellung des quantitativen Verhaltens der Oxydasen nach dem Tode zum Ziel hatten, mußten sich mit 2 Fragen beschäftigen:

1. Welchen Einfluß haben rein autolytische Vorgänge unter aseptischen Bedingungen?

2. Wie ändert sich das Verhalten der Oxydasen, wenn zu den autolytischen Fäulnisprozesse hinzutreten?

Es wurden zunächst einige Versuche mit höheren Temperaturen angesetzt und die Organstückchen, die dem frisch getöteten Tiere aseptisch entnommen waren, bei 37° im Brutschrank aufgehoben. Der Erfolg war der, den auch *Katsunuma* beobachtet hat:

Die Oxydasen nahmen sehr schnell ab und waren meist schon nach 24 St. fast gleich Null. Doch interessierten mich diese Versuche nicht so wesentlich, da sie für Verhältnisse des Leichenmaterials keine Klärung bringen konnten. Mir war es wichtiger zu wissen, wie sich die Organe bei gewöhnlicher Zimmertemperatur verhielten. Es handelte sich in der Hauptsache um Versuche, die in der heißen Jahreszeit (Juni bis Juli 1925) bei einer Durchschnitts-Zimmertemperatur von ca. 20° angestellt wurden.

Nach einigen Vorversuchen wurden die Untersuchungen so vorbereitet, daß einem durch Nackenschlag oder Verbluten getöteten Meerschweinchen unmittelbar nach dem Tode unter aseptischen Bedingungen Leberstückchen von etwa je 1 g entnommen und in keimfreie Gefäße gebracht wurden. Die Gefäße wurden durch Paraffin luftdicht abgeschlossen und so die Organstückchen zugleich vor dem Vertrocknen bewahrt.

Der Rest der Leber blieb in dem Tier und wurde in diesem, ebenso wie die keimfreien Gläser, bei Zimmertemperatur aufbewahrt, ohne jeden Schutz gegen Fäulnis.

Nun wurden nach verschiedenen Zeitabständen Proben aus den sterilen Gläsern und aus der im Tierkörper gebliebenen Leber entnommen, die Oxydasereaktion angesetzt und gegen eine gewebefreie Kontrolle, wie früher auseinandergesetzt, verglichen. Der jeweilige Verdünnungsquotient ist in Spalte 2 für die aseptischen, in 3 für die nichtaseptischen Stücke verzeichnet (s. Tab. 3—6).

Tabelle 3.

Stundenzahl	steril	nichtsteril
sofort p.mort.	2,8	2,8
1 Stunde	2,5	5,2
2 Stunden	6,0	7,9
3 „	3,5	5,5

Tabelle 4.

Stundenzahl	steril	nichtsteril
sofort p.mort.	4,0	4,0
1 Stunde	4,5	4,0
2 Stunden	8,0	8,0
3 „	7,5	6,5

Tabelle 3 (Fortsetzung).

Stundenzahl	steril	nichtsteril
4 Stunden	6,0	7,2
7 „	5,0	4,4
8 „	7,0	6,6
9 „	3,0	3,1
10 „	3,0	3,3
25 „	3,5	5,0
27 „	4,0	3,0
34 „	3,3	4,2
48 „	2,0	3,4
56 „	3,0	3,8
72 „	3,7	2,0
75 „	2,0	2,0
79 „	3,1	2,0

Tabelle 4 (Fortsetzung).

Stundenzahl	steril	nichtsteril
7 Stunden	7,5	6,0
8 „	5,0	4,65
9 „	6,0	3,0
24 „	6,0	6,0
25 „	5,8	6,0
27 „	3,8	3,5
33 „	6,0	6,0
48 „	4,0	3,8
51 „	4,0	3,8
57 „	6,0	3,0
72 „	3,5	3,5
82 „	3,7	1,2
96 „	3,0	0

Zwei Versuche, die noch länger geführt, allerdings nur mit aseptischem Material angesetzt wurden, hatten ein ähnliches Ergebnis:

Tabelle 5.

Stunden	steril
sofort p.mort.	4,7
1 Stunde	10,2
2 Stunden	7,2
3 „	6,75
6 „	5,3
7 „	6,45
8 „	5,0
9 „	4,7
25 „	6,0
31 „	5,0
47 „	5,0
144 „	6,0
168 „	1,8
200 „	0

Tabelle 6.

Stunden	steril
sofort p.mort.	6,0
20 Stunden	3,5
44 „	4,0
68 „	5,0
92 „	4,0
116 „	3,3
164 „	1,5
188 „	1,0
212 „	1,3

Nun verlaufen allerdings nicht alle Kurven so eindeutig wie die oben mitgeteilten. Es kommt hier und da vor, daß einzelne Zahlen aus den übrigen nach oben oder unten etwas stärker herausfallen; das wird in der Hauptsache durch doch hier und da auftretende bakterielle Verunreinigungen zu erklären sein. Im übrigen ist als regelmäßiges Ergebnis festzustellen, daß sich bei aseptischer Aufbewahrung eines Organes bei Zimmertemperatur die Oxydasen tagelang in unverminderter Stärke nachweisen lassen. Da ich ganz entsprechende Versuche auch mit der Herzmuskulatur ausgeführt habe, sind das Ergebnisse, die nicht etwa nur für ein Organ maßgebend sind. Selbst wenn die Organe der Fäulnis überlassen werden (und daß eine solche eingetreten war, ging schon aus dem üblen Geruch ohne jede bakteriologische Untersuchung hervor), wird dadurch der Ausfall der Oxydasereaktion erst recht spät beeinflusst.

Sehen wir die Einzelergebnisse genauer an, so können wir sogar meist in den ersten Stunden nach dem Tode einen Anstieg der Oxydasereaktion feststellen, dessen Höhepunkt um die 7. bis 8. Stunde nach dem Tode erreicht wird. Das ist ein Ergebnis, das mit der früher von *Katsunuma* mitgeteilten Beobachtung übereinstimmt und wohl, wie auch *Katsunuma* annimmt, mit einer Änderung der Wasserstoffionenkonzentration in den absterbenden Zellen zusammenhängt.

Unsere Versuche sind über Zeiten ausgedehnt, wie sie unter gewöhnlichen Verhältnissen bei den Sektionen keine Rolle spielen. Innerhalb der für uns in Betracht kommenden Zeit von höchstens 36 St. war kaum je die geringste Abnahme der Oxydasenwirkung festzustellen. Wir werden also zunächst wohl daraus den Schluß ziehen können, daß eine negative oder doch sehr schwache Oxydasereaktion am Leichenmaterial mit der Todesart des Individuums oder irgendwelchen Organveränderungen in Zusammenhang stehen muß. Zum mindesten müssen infolge irgendwelcher abnormer Einflüsse die autolytischen Vorgänge oder der ganze Zellchemismus so beeinflußt sein, daß dadurch die Oxydasen eher zerstört werden. *Der negative oder sehr schwache Ausfall der Oxydasereaktion läßt sich also auch am Leichenmaterial verwerten.*

Allerdings bedarf es noch sehr ausgedehnter Untersuchungen am menschlichen Material, um zunächst einmal Zahlen zu erhalten, die als Mindestwerte aufgestellt werden können.

Die oben festgestellten Ergebnisse scheinen mir aber auch noch einen theoretischen Wert zu besitzen.

Die Oxydasen behalten tagelang nach dem Tode volle Wirksamkeit.

Sehen wir nun in den Oxydasen *die* Atmungsfermente, (resp. Katalysatoren) der Zelle und in der Oxydasereaktion den morphologisch faßbaren Ausdruck für die Zellatmung oder wenigstens für die fermentative Fähigkeit zur Atmung, so müßten wir annehmen, daß die Atmung nach dem Tode bei Zuführung des nötigen Sauerstoffes noch tagelang weiterbestehen kann, also im Atemversuch nachweisbar sein muß. Solche Versuche sind gerade in letzter Zeit in großer Zahl unternommen worden. Als Methoden dienten einmal die manometrische von *Warburg* und zweitens die chemischen von *Lipschitz* und *Bieling*. Es wäre nun sehr wesentlich, zu wissen, wie sich bei diesen Versuchen postmortale Einflüsse bemerkbar machen. Systematische Untersuchungen habe ich darüber nicht finden können. Doch geht aus mannigfachen kurzen Angaben hervor, daß sehr bald nach dem Tode die Atemfähigkeit der Gewebe abnimmt. So betont *Minami*, der Mitarbeiter von *Warburg*, ausdrücklich, daß das Herauspräparieren der Organe schnell nach dem Tode erfolgen müsse. „Denn Sauerstoffmangel bei Körpertemperatur schädigt bzw. vernichtet das Atmungsvermögen vieler Gewebe in kurzer Zeit.“

Oder *Wels*: „Die wahre Atmungsgröße des überlebenden Gewebes läßt sich nur dann ermitteln, wenn zwischen dem Tode des Tieres und dem Beginn des Versuches eine sehr begrenzte Zeitspanne liegt. Werden die Organe *nur wenige Stunden* im Warmblüterkörper belassen, so ersticken sie, und die Gewebsatmung sinkt auf einen minimalen Betrag herab.“

Ähnlich sind die Erfahrungen von *Grafe*, die ich einer persönlichen Mitteilung von ihm verdanke.

Auch *Lipschitz* betont ganz ausdrücklich, den starken Abfall der Reduktion des Metadinitrobenzols durch die Gewebe mit der Zeit nach der Entnahme des Materials aus dem toten Tierkörper.

Da diese Autoren ja auch sämtlich an tierischem Material gearbeitet haben, besteht also ein auffälliger Gegensatz zwischen ihren Erfahrungen mit der Gewebsatmung und meinen mit den Oxydasen: Die Gewebsatmung sinkt nach dem Tode sehr bald stark ab; die Oxydasen behalten tagelang ihre *volle* Wirksamkeit.

Daraus scheint mir wiederum hervorzugehen, daß die mit Hilfe der Indophenolblausynthese nachweisbare Oxydasereaktion keineswegs ein Zeichen für die Atemfähigkeit der Zellen ist. Tätigkeit der Oxydasen und Zellatmung dürfen nicht gleichgestellt werden. Ich will nicht bestreiten, daß die Oxydasen Fermente oder fermentähnliche Katalysatoren sind, die etwas mit Sauerstoffübertragung zu tun haben. Der Umstand aber, daß sie noch ihre volle Wirksamkeit haben zu einer Zeit, wo die Zellatmung zum mindesten schon stark gehemmt ist, deutet darauf hin, daß ihre Tätigkeit entweder nur eine Teilerscheinung im Gebiet der Zellatmung ist, oder daß außer der Wirkungsfähigkeit der Fermente noch ein anderer Umstand vorhanden sein muß, das die Zellatmung mitbedingt. Vielleicht liegt dies Moment darin, daß die Sauerstoffacceptoren viel früher geschädigt werden als die Sauerstoffüberträger. Und das kann evtl. auch bei Vergiftungen eine Rolle spielen.

Literaturverzeichnis.

- Katsunuma, S.*, Intracelluläre Oxydation und Indophenolblausynthese. Jena: Fischer 1924. Hier auch die gesamte ältere Literatur. — *Staemmler, M.* und *W. Sanders*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **256**, 595. 1925. — *Hallheimer*, Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Physiol. **73**, 80. 1924. — *Staemmler, M.*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **257**. 1925. — *Grafe*, Nordwestdtsh. Ges. f. inn. Med. 30. und 31. I. 1925; Ref. Zentralbl. f. inn. Med. 1925, S. 398. — *Jacoby*, Biochem. Zeitschr. **77**, 124. 1916. — *Vernon*, Biochem. Zeitschr. **74**, 374. 1912 und **60**, 202. 1914. — *Lipschitz*, Dtsch. med. Wochenschr. 1923, S. 778. — *Much*, Nordwestdtsh. Ges. f. inn. Med., 30. und 31. I. 1925; Ref. Zentralbl. f. inn. Med. 1925, S. 401. — *Oppenheimer*, Die Fermente. 5. Aufl., 1924, Lieferung 1, S. 77. — *Minami*, Biochem. Zeitschr. **142**, 334. 1923. — *Wels*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **206**, 268. 1924. — *Lipschitz* und *Gottschalk*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **191**, 1. 1921.