

(Aus der Zoologischen Station Neapel.)

## Über oxydierende Substanzen in tierischen Zellen.

Von

**Dr. Walter Loele,**

Staatliche Landesstelle für öffentliche Gesundheitspflege, Dresden.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. Januar 1926.)

Die folgenden Untersuchungen wurden an der Zoologischen Station in Neapel auf dem Arbeitsplatze des Freistaates Sachsen im September und Oktober 1925 durchgeführt. Sie hatten den Zweck, zunächst einen Überblick über das Vorkommen oxydierender, innerhalb von Zellen liegender Substanzen besonders bei Mollusken, daneben aber auch bei anderen Tieren, wie sie in die Station eingebracht wurden, zu gewinnen und damit eine Grundlage für weitere systematische Untersuchungen und physiologische Versuche zu schaffen.

Die Härtung des Untersuchungsmaterials erfolgte in Meerwasser, dem 10% Formalin zugesetzt wurde. Das Schneiden der Gewebsstücke geschah mit dem vorzüglichen Jung'schen Gefriermikrotom des Institutes. Für diejenigen Herren, die die Absicht haben, mit dem Gefriermikrotom zu arbeiten, ist es zu empfehlen, sich vorher mit dem Leiter der Anstalt, Herrn Professor Dohrn, in Verbindung zu setzen, damit rechtzeitig die Beschaffung der Kohlensäurebomben geregelt wird. Wer viel schneidet, wird wöchentlich etwa 3 Bomben benötigen.

Die Gefrierschnitte wurden mit folgenden bereits früher mitgeteilten Methoden behandelt:

1. *Darstellung der Naphtholoxidase*<sup>1)</sup>. Zu einer Messerspitze  $\alpha$ -Naphthol wird im Reagensglas so lange tropfenförmig eine 10 proz. Kalilaugenlösung zugesetzt, bis unter ständigem Schütteln das Naphthol gelöst ist. Zu der Lösung werden 200 ccm destilliertes Wasser gegeben. Die Lösung wurde erst dann benutzt (nach 24 Stunden), wenn sie anfing schwach gelblich auszusehen.

Die die Oxydation beschleunigenden Substanzen färben sich in dieser Lösung meist sehr schnell hell- bis dunkelviolett, manchmal fast blauviolett. Auch eine Schwarzfärbung kommt vor. Die Reaktion wird als Naphtholoxidasereaktion bezeichnet.

1) Loele, Phenolreaktion und sekundäre Naphtholreaktion. Leipzig: Verlag Dr. Werner Klinkhardt.

2. *Naphtholperoxydasereaktion*<sup>1)</sup>. Überführen der Schnitte in eine alkalifreie Naphthollösung mit Zusatz von  $H_2O_2$  (1,0 ccm 1 proz. Wasserstoffsuperoxydösung [Merck, Darmstadt] auf 50 ccm Naphthollösung).

Man gibt in 1 l physiologischer Kochsalzlösung (0,85%) einen gehäuften Teelöffel  $\alpha$ -Naphthol, schüttelt einige Zeit und filtriert. Die Lösung wurde, ebenso wie die vorhergehende alkalische Naphthollösung, etwa 1 Monat lang benutzt.

Im allgemeinen fällt die Peroxydasereaktion ähnlich aus wie die Oxydasereaktion, doch gibt es Fälle, wo die Oxydasesreaktion schneller und intensiver erfolgt wie die Peroxydasereaktion. Andererseits kann die Peroxydasereaktion positiv ausfallen, wenn die Oxydasesreaktion negativ ist. Die mit dieser Methode nachgewiesenen Substanzen sind als Naphtholperoxydasen bezeichnet.

3. *Benzidinperoxydasereaktion*. Überführen der Schnitte in eine Benzidinlösung mit Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd.

Eine große Messerspitze Benzidin (Base) wird in eine, 200,0 ccm destilliertes Wasser enthaltende Flasche gebracht, diese kräftig geschüttelt und die Flüssigkeit vor dem Gebrauch filtriert. Auf 50 ccm Flüssigkeit wurde 1,0 der 1 proz. Wasserstoffsuperoxydösung gegeben.

Die oxydierenden Substanzen färben sich meist von vornherein gelb bis dunkelbraun. Manchmal nehmen sie zunächst eine blaue oder graublaue Farbe an, die mit der Zeit abblaßt oder in einen gelblichen Ton übergeht.

4. *Anstellung der Indophenolblaureaktion* (*F. Winkler, W. H. Schultz, v. Gierke, Graeff u. a.*). Die beiden Stammlösungen wurden in folgender Weise hergestellt:

Als Naphthollösung wurde die Naphtholkochsalzlösung, filtriert, verwendet. Die Aminlösung wurde so hergestellt, daß 0,5 g der Dimethylparaphenylenaminbase (nach der Vorschrift von Prof. *Schultz* bei Merck käuflich) zusammen mit dem geöffneten Röhrchen in eine dunkle Flasche mit 200 ccm destilliertem Wasser gebracht wurden. Beide Lösungen wurden filtriert und zu gleichen Teilen gemischt (wenn nötig mit Meerwasser verdünnt). Die Indophenolreaktion war fast immer da positiv, wo auch die Naphtholreaktion positiv ausfiel. In einer Anzahl von Fällen wurden die analogen Substanzen noch dargestellt, obgleich die Naphtholreaktion negativ ausfiel. Je kürzer die Formalineinwirkung auf das Untersuchungsmaterial ist, um so eher werden auch in anderen Zellen Indophenoloxidasen nachweisbar, die allmählich durch die Einwirkung von Formalin zerstört werden, eine Erfahrung, auf die bereits *v. Gierke* hingewiesen hat, der zeigte, daß auch die Naphthollösung allein die Substanzen (labile Oxydasen) angreift. Die Oxydasen dieser Gruppe sind als formolfeste Indophenoloxidasen bezeichnet.

5. Zur Darstellung von Dauerpräparaten der Naphtholoxidasen wurde folgende Methode angewendet:

Eine Messerspitze voll  $\alpha$ -Naphthol wird in 10 proz. Kalilauge gelöst, sodann die gleiche Menge Glycerin oder Glykol hinzugefügt (als Schutzkolloid, um die Ausfällung des Farbstoffes zu verzögern). Hierzu etwa die 10fache Menge Leitungswasser und einige Tropfen einer gesättigten alkoholischen oder wässrigen Lösung von Gentianaviolett, Methylviolett usw. Die Lösung wird filtriert, die Schnitte werden nach mehreren Stunden herausgenommen und kontrolliert, ob Blaufärbung eingetreten ist (Alkohol, Xylol, Balsam).

6. Darstellung der Naphtholperoxydasen im Dauerpräparat; a) Schnitte, b) Blutausstriche.

a) Sobald die oxydierenden Substanzen in der  $H_2O_2$ -haltigen Naphthollösung eine violette Farbe angenommen haben, werden, nach Abspülen der Schnitte,

<sup>1)</sup> Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. 1925, S. 8 und Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. 250, Heft 3, S. 677.

einige Tropfen einer Naphtholgentianaviolettlösung auf den Schnitt gebracht. Die Schnitte werden dann mit 50 proz. Alkohol differenziert, bis nur noch die naphtholpositiven Substanzen blau gefärbt bleiben. (Einschluß am besten in Glycerin oder Glyceringelatine, da bei Alkohol- und Xylolbehandlung der Schnitt etwas abblaßt.)

Zur Darstellung der Naphtholgentianalösung gibt man in die Kochsalznaphthollösung (filtriert) so viel einer gesättigten alkoholischen Lösung von Gentianaviolett, bis die Mischung anfängt triib zu werden. Man setzt dann 70 proz. Alkohol zu, bis die Lösung wieder durchsichtig erscheint. Es ist zweckmäßig, die Lösung sich erst durch geeignete Versuche einzustellen, sie ist dann sehr lange gebrauchsfähig.

b) *Blutpräparate*: Der lufttrockene Blutausstrich wird mit 80 proz. Alkohol fixiert und dann mit der eben beschriebenen Naphtholgentianalösung übergossen, bis der ganze Ausstrich blau erscheint. Nach Abspülen gibt man Kochsalznaphthollösung mit Zusatz von Wasserstoffsperoxyd (wie bei Methode 2) darüber und läßt einige Minuten einwirken. Nach dem Abspülen mit Alkohol dürfen nur die Granula der myeloischen Zellen sich stark blau färben. Nimmt man reichlich Wasserstoffsperoxyd, so geben die roten Blutkörperchen eine Naphtholreaktion, während die Granula der weißen vielfach keine Peroxydasereaktion mehr zeigen. Bei Verwendung von absolutem Alkohol diffundieren die „Oxydasen“ oft in den Kern. Eine Ausnahme machen die naphtholpositiven eosinophilen Leukocyten.

7. Zur Feststellung, ob die Naphtholperoxydasereaktion nicht etwa nur auf einer Färbung mit Naphtholgentianaviolett beruht, wurden die Schnitte mit dieser allein behandelt. Es zeigt sich in der Tat, daß es Substanzen gibt, die sich mit dieser Methode färben, trotzdem die Naphtholperoxydasereaktion negativ ausfällt, und trotzdem alle anderen Zellstrukturen ebenfalls entfärbt werden.

*Blockfärbung*. Man kann auch im Block die Oxydase- und Peroxydasereaktion nach Methode 5 und 6 vornehmen und dann in Paraffin einbetten. Es sind nur die Teile des Blockes brauchbar, die das schwer eintretende Gentianaviolett aufgenommen haben.

In der folgenden Liste ist in der ersten Spalte das Ergebnis der Naphtholoxydasereaktion angegeben, in der 2. Spalte das Ergebnis der Peroxydasereaktion, in der 3. Spalte das Ergebnis der Benzidinperoxydasereaktion, in der 4. Spalte das Ergebnis der Indophenolreaktion (Nadireaktion von Graeff) nach Formolhärtung der Objekte; in der 5. Spalte ist das Ergebnis der Naphtholgentianaperoxydasefärbung aufgeführt, die manchmal positiv ausfällt, während die Naphtholperoxydasereaktion allein negativ ist (es ist diese Reaktion demnach ein Beweis dafür, daß das oxydierte Phenol, nicht der Farbstoff als Beize wirkt), in der 6. Spalte endlich ist das Ergebnis der Färbung mit der bloßen Naphtholgentianalösung angegeben.

Um zugleich eine Übersicht zu ermöglichen, welche Bestandteile durch die Reaktionen dargestellt wurden, sind 12 verschiedene Gruppen aufgestellt.

1: bedeutet, daß die Oberflächenepithelien in ganzer Ausdehnung positives Ergebnis zeigen (Abb. 1).

2: nur einzelne Epithelien in verschieden großen Abständen oder kurzen Ketten von Epithelien geben die Reaktion.

3: die positiven Epithelien haben die Form von typischen Schleimzellen (Becherform, Kerzenflammenform).

4: weit in die Tiefe reichende sackförmige oder korkzieherartig, oft sich verästelnde gewundene Schläuche, die innerhalb der Epithelien münden (Abb. 2).

5: Eiweißzellen, große meist runde, selten sternförmige Zellen mit großen Granula, die innerhalb des Gewebes liegen (also nicht identisch sind mit den sogenannten Eiweißzellen des Oberflächenepithels) (Abb. 1).

6: kleine Zellen, vom Aussehen der Wanderzellen höherer Tiere, vielfach auch zwischen den Epithelien hindurchtretend.

7: Pigmentzellen, die außer den oxydierenden Substanzen ein körniges Pigment enthalten (Abb. 1).

8: frei im Gewebe liegende Granula oder Körnchen.

9: große scheibenförmige Gebilde.

10: diffuse Färbung, besonders hornartiger Substanzen.

11: rote Blutkörperchen.

12: Kernkörperchen.

Die Tabelle führt die untersuchten Objekte in alphabetischer Reihenfolge an. Das Negativzeichen bedeutet, daß die Reaktion negativ ausfiel, die Zahl, daß die entsprechende Zellform oder Struktur die Farbreaktion gibt; wo die Reaktion nicht ausgeführt wurde, ist eine Lücke gelassen.

Kurz zusammengefaßt:

- |  |   |
|--|---|
| 1. Ununterbrochen Reihe von Epithelien   | } Epithelien, Ektoderm und<br>Endoderm. |
| 2. Einzelne Epithelien oder kurze Reihen |   |
| 3. Becherzellen.                         |   |
| 4. Tiefliegende Schleimzellen            | } Mesoderm.                             |
| 5. Eiweißzellen                          |   |
| 6. Leukocytoide Zellen (Wanderzellen)    |   |
| 7. Pigmentzellen.                        |   |
| 8. Granula und Körnchen.                 |   |
| 9. Scheiben.                             |   |
| 10. Diffuse Färbung.                     |   |
| 11. Rote Blutkörperchen.                 |   |
| 12. Kernkörperchen.                      |   |

#### Bemerkungen zur Tabelle.

1. *Amphioxus lanceolatus*<sup>1)</sup>. Wirft man Exemplare von *Amphioxus lanceolatus* in eine alkoholische  $\alpha$ -Naphthollösung mit Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd (wie sie zuerst *Raciborski* systematisch zum Nachweis pflanzlicher Peroxydasen verwendet hat), so erhält man ganz verschiedene Ergebnisse. Manche Exemplare färben sich fast in ganzer Ausdehnung violett, und zwar besonders stark die Ränder der Myo-

<sup>1)</sup> Die Bestimmung der untersuchten Tiere erfolgte durch den Präparator des Instituts.

Tabelle 1.

Bezeichnung	$\alpha$ -Naphthol		Benzidin Peroxydase	Indophenol blau Reaktion	Naphthol Peroxydase Gentiana	Naphthol Gentiana
	Oxydase	Peroxydase				
1. Amphioxus lanceolatus . . . . .	—	1	1	1	1	—
2. Anemone sulcata . . . . .	1. 2. 3. 6. 8	1. 2. 3. 6. 8	1. 2. 3. 6. 8	1. 2. 3. 6. 8	1. 2. 3. 6. 8	—
3 <sup>1)</sup> . Aplysia limacina . . . . .	—	—	—	5	5	—
4. Arce Noae . . . . .	—	—	—	5	—	—
5. Ascidia mentula . . . . .	—	—	—	6	6	6
6. Asterias gibbosa . . . . .	—	2. 3	2. 3	2. 3	2. 3	—
7. Bryozoen . . . . .	8. 10	8. 10	8. 10	8. 10	8. 10	—
8. Bulla striata . . . . .	4. 5. 10	4. 5. 10	4. 5. 10	4. 5. 10	4. 5. 10	—
9. Capsa fragilis . . . . .	—	—	—	—	—	—
trächtige Exemplare	5. 8	5. 8	5. 8	5. 8	5. 8	—
10. Cardita sulcata . . . . .	1. 5	1. 5	1. 5	1. 5	1. 5	—
11. Cardium oblongum . . . . .	—	—	—	—	2	—
12. Cardium tuberculatum . . . . .	1. 3	1. 3	1. 3	1. 3	1. 3	—
13. Cerithium vulgatum . . . . .	—	—	—	—	2	—
14. Chiton discrepans . . . . .	1. 3. 5	1. 3. 5	1. 3. 5	1. 3. 5	1. 3. 5	—
15. Collozoum inerme . . . . .	—	—	—	—	—	—
16. Conus mediterraneus . . . . .	—	—	—	2. 4	—	—
17. Cotylorhiza tuberculata . . . . .	—	—	—	10	—	—
18. Dolium galea . . . . .	2. 3	2. 3	2. 3	2. 3	2. 3	—
19. Doris verrucosa . . . . .	3	3	3	3	3	—
20. Dosinia obsoleta . . . . .	1	1	1	1	1	—
21. Eledone moschata . . . . .	—	—	—	—	—	—
22. Euthria cornea . . . . .	3. 4	3. 4	1. 3. 4	3. 4	3. 4	—
23. Gastropheron Meckelii . . . . .	—	—	—	9	9	9
24. Gibbula ardea . . . . .	—	—	—	2	—	—
25. Helix vermiculata . . . . .	4. 5	4. 5	4. 5	4. 5	4. 5	—
26. Hippocampus guttulatus . . . . .	6. 12	6. 11. 12	—	6. 11	11. 12	—
27. Holothuria tubulosa . . . . .	—	4. 5	4. 5	4. 5	4. 5	—
28. Lima hians . . . . .	3. 5. 8	3. 5. 8	3. 5. 8	3. 5. 8	3. 5. 8	—
29. Lithodomus dactylus . . . . .	1. 5.	1. 5	1. 5	1. 5	1. 5	—
30. Littorina coerulea . . . . .	3. 4.	3. 4	3. 4	3. 4	3. 4	—
31. Lobiger serradifolii . . . . .	—	—	—	4	—	—
32. Lucina lactea . . . . .	2. 4. 5. 8	2. 4. 5. 8	2. 4. 5. 8	2. 4. 5. 8	2. 4. 5. 8	—
33. Marsenia spuria . . . . .	—	—	2. 3	—	(2) (3)	—
34. Meretrix Chione . . . . .	1	1	1	1	1	—
35. Murex brandaris . . . . .	4. 5	4. 5.	4. 5	4. 5	4. 5	—
36. Mytilus galloprovincialis . . . . .	—	—	—	4. 5	4. 5	—
Nordsee	—	1. 5. 7	1. 5. 7	1. 5. 7	1. 5. 7	1. 5. 7
37. Nassa mutabilis . . . . .	—	—	(4)	(4)	4	—
38. Nassa reticulata . . . . .	—	—	—	4	4	—
39. Natica hebroea . . . . .	—	4	4	4	4	—
40. Natica Josephinia . . . . .	4	4	4	4	4	—
41. Ostrea edulis, Mittelmeer . . . . .	—	—	—	6	6	—
(Nordsee)	5	5. 6	5. 6	5. 6	5. 6	—
42. Octopus vulgaris . . . . .	—	—	—	—	—	—

<sup>1)</sup> Bei Mollusken ist die Zahl kursiv gesetzt.

Tabelle 1 (Fortsetzung).

Bezeichnung	α-Naphthol		Benzidin Peroxydase	Indophenol blau Reaktion	Naphthol Peroxydase Gentiana	Naphthol Gentiana
	Oxydase	Peroxydase				
43. Patella lusitanica . . . . .	5	5	5	1. 4. 5	1. 5	—
44. Pectunculus violaceus . . . .	—	(5)	4. 5	4. (5)	4	—
45. Pecten Jacobaeus . . . . .	1	1	1	1	1	—
46. Pedicellina . . . . .	—	—	—	8. 10	—	—
47. Phylline aperta . . . . .	—	—	—	—	—	—
48. Pinna nobilis . . . . .	—	—	—	—	—	—
49. Pleurobronchaea Meckelii .	—	10	10	10	10	—
50. Psamobia vespertina . . . .	1	1	1	1	1	—
51. Scylium canicula . . . . .	11	11	11	11	11	—
52. Scorpaena ustulata. . . . .	2. 6	2. 6. (11)	2. 6. (11)	2. 6. (11)	2. 6. (11)	—
53. Sepia . . . . .	—	—	—	—	—	—
54. Siphonostomum Rondeletii .	2. 6	2. 6. (11)	2. 6. (11)	2. 6. (11)	2. 6. (11)	—
55. Solenocurtus strigilatus. .	—	—	—	2. (7)	2. (7)	—
56. Spondylus gaederopus . . .	—	—	—	4	—	—
57. Suberites domuncula . . . .	—	—	—	6. 8	6. 8	—
58. Syngnathus arcus . . . . .	2. 6	2. 6. (11)	2. 6. (11)	2. 6. (11)	2. 6. (11)	—
59. Syngnathus phlegon, Em- bryonen . . . . .	6	6	6	6	6	—
60. Tapes decussatus. . . . .	1	1	1	1	1	—
61. Tellina exigua. . . . .	2. 4	2. 4	2. 4	2. 4	2. 4	—
62. Tellina planata . . . . .	—	—	—	—	—	—
63. Teredo navalis . . . . .	1	1	1	1	1	—
64. Tethys leporina . . . . .	—	—	—	—	—	—
65. Trigla corax . . . . .	1. 6	1. 6. (11)	1. 6. (11)	1. 6. (11)	1. 6. (11)	—
66. Tritonium nodosum. . . . .	2	2	2	2	2	—
67. Trochus magus . . . . .	—	—	—	1	—	—
68. Trochus turbinatus. . . . .	2	2	2	2	2	—
69. Trochurus trochurus . . . .	6	6. (11)	6. (11)	6. (11)	6. (11)	—
70. Venus gallina . . . . .	1	1	1	1	1	—
71. Venus verrucosa. . . . .	—	1. 3	1. 3	1. 3	1. 3	—
72. Zizyphinus dubius . . . . .	—	—	—	—	—	—

mere, so daß die fischschuppenartige Zeichnung sehr deutlich zutage tritt, manche Exemplare färben sich nur an einzelnen Stellen oder bleiben fast ganz blaß. Die Ausscheidung der naphtholpositiven Substanzen hängt demnach stark von der Tätigkeit der Zellen ab.

Schnitt man den Amphioxus unmittelbar nach dem Einlegen in Formol, so war die Reaktion selbst mit der Indophenolmethode meist nur schwach. Nach 24stündiger Härtung gaben sämtliche untersuchten Exemplare in ganzer Ausdehnung der Haut am Schnitt die Naphthol-peroxydasereaktion, die Benzidinperoxydasereaktion und die Indophenolreaktion. Es scheint, als ob die Formalinhärtung auf die Bildung der Substanzen zunächst günstig einwirkt. Die Reaktion tritt auf als eine feine Körnung sämtlicher Zylinderepithelien der Oberfläche.

Andere Zellen, wie die der Haut und des vorderen Darmabschnittes (nicht konstant), gaben keine Reaktion.

Nach etwa 8—14 Tagen werden die Naphthol- und Benzidinreaktionen schwächer oder sind bereits nicht mehr nachzuweisen, dagegen ist die Indophenolreaktion immer noch sehr stark. Später scheint aber auch diese negativ zu werden, wenigstens waren an den untersuchten Exemplaren nur noch einige Stellen positiv. Ein Urteil hierüber kann nur nach systematischen Reihenuntersuchungen abgegeben werden.

Der positive Ausfall der Naphtholperoxydasereaktion (eine Naphtholoxidasereaktion konnte nicht beobachtet werden) ist um so bemerkenswerter, als hier in der ersten Gruppe der Wirbeltiere das ganze Oberflächenepithel eine Reaktion gibt, die in den höheren Reihen nur noch myeloische Zellen, Speicheldrüsenepithelien und bei einigen Fischen die Magenepithelien geben.

**2. Anemone sulcata.** Ähnlich wie *Amphioxus* reagiert die Seeanemone.

Wurden lebende Exemplare in die alkoholische Naphthollösung geworfen, so färbte sich der ganze Stiel gleichmäßig violett, besonders bei kleineren Exemplaren war dies sehr deutlich. Härtete man in Formol und legte Schnitte einmal durch den Stiel und durch die Tentakeln, so ergab sich folgendes Bild:

Die Epithelien der Oberfläche, sowohl des Stieles als auch der Arme, sind gleichmäßig gekörnelt und geben sämtliche Reaktionen. Unter dem Oberflächenepithel, besonders des Stiels, aber auch der Arme, liegen große Massen freier Körnchen, die die gleiche Reaktion geben. In den Septen des Stieles finden sich innerhalb der Epithelien ziemlich reichlich Becherzellen, aber auch schmale Zellen mit positiven Reaktionen. Ferner fanden sich noch leukocytenähnliche granulierte Zellen im Zwischengewebe. Die Zooxanthellen waren negativ.

**3. Aplysia limacina.** Die fußlange, an der Oberfläche des Meeres mit den geblähten segelförmigen Hautlappen wie ein schwarzer Schwan dahinsegelnde Schnecke, die wenigstens im Mittelmeer mit einem „Seehasen“ keinerlei Ähnlichkeit hat, gab die Oxydationsreaktionen nur mit der Indophenol- und der Naphtholgentianareaktion. Die Reaktion fand sich in großen unregelmäßigen Zellen des Leibes, gebunden an große rundliche Granula. Auch in der alkalischen Naphthollösung und in der Benzidinlösung, in letzterer langsamer, trat eine Farbreaktion ein, indem die Granula sich schwarz färben. Diese Reaktion dürfte indessen nicht auf die Anwesenheit und die Oxydation von Naphthol oder Benzidin zurückzuführen sein, sondern darauf, daß durch einen oxydativen Prozeß die in den Zellen bereits vorhandenen Chromogene in einen schwärzlichen Farbstoff umgewandelt werden. Die Granula haben an sich eine gelbliche Farbe.

Bei *Aplysia* konnte auch eine Art sekundäre Reaktion nachgewiesen werden, insofern, als das geschichtete und verhorrende Epithel des Schlundes die diffundierenden Indophenoxydasen adsorbierte und nunmehr sowohl durch die Indophenolmethode als auch durch die Benzidinmethode dargestellt werden konnte.

**4. Arce Noae.** Der sehr kleine Fuß der Muschel gab nur positive Indophenolreaktion in Eiweißzellen innerhalb des Gewebes. Die übrigen Reaktionen fielen negativ aus.

**5. Ascidia mentula.** Die Tunicaten, deren Mantel aus einer gallertartigen der Cellulose nahestehenden Substanz (Tunicin) bestehen, gaben keine Oxydasereaktion, abgesehen von einer schwachen Indophenolreaktion der im Mantel zerstreuten Amöboidzellen. Sie sind bereits durch eine Färbung mit dem Naphtholgentianaviolett allein darstellbar. Da sich sonst mit dieser Methode keinerlei Zellteile färben lassen, nehmen die Granula dieser Zellen eine gesonderte Stellung ein. Der positive Ausfall dieser Farbreaktion und der Indophenolreaktion spricht dafür, daß die Wanderzellen wohl eine gewisse Verwandtschaft zu den myeloischen Wanderzellen höherer Tiere besitzen.

**6. Asterias gibbosa.** Der Seestern gab an seiner Oberfläche positive Peroxydasereaktionen und die Indophenolreaktion, dagegen keine Naphtholoxydasereaktion. Die positiven Zellen haben vielfach das Aussehen von Becherzellen, zum Teil sind es schmale Zylinderepithelien.

**7. Bryozoen.** Die Moostierchen verhalten sich sehr verschieden, manche Tiere, besonders die Vorderkörper, geben eine diffuse Reaktion, doch finden sich sowohl vereinzelte Granula wie auch granulierte Zellen innerhalb der Körper. Die Reaktion war nicht immer mit allen Methoden in gleicher Weise nachweisbar.

**8. Bulla striata.** Diese Schnecke zeigte mit allen Methoden darstellbare, weit in die Tiefe gehende Schleimzellen, zwischen denen große Eiweißzellen, vielfach mit Fortsätzen versehen, sichtbar waren. Das Oberflächenepithel zeigte in ganzer Ausdehnung eine schwärzliche Pigmenteinlagerung. Zwischen den naphtholpositiven Eiweißzellen liegen gleichgroße Zellen mit sehr schwacher Reaktion oder Zellen, die mit hellbraunen Körnchen angefüllt sind. Man hat den Eindruck, als wenn sich Übergänge zwischen den einzelnen Zellarten vorfänden.

**9. Capsa fragilis.** Diese kleine Muschel war negativ.

In trächtigen Exemplaren waren aber die Schalen mancher Embryonen oft in ganzer Ausdehnung mit Granula gefüllt, die sämtliche Reaktionen gaben. An anderen Embryonen fanden sich nur wenig derartiger Granula, oder sie waren an einigen Stellen lokalisiert. Zwischen den jungen Muscheln lagen auch Eiweißzellen (?) mit positiver Reaktion. Die Reaktion ist insofern beachtenswert, als van Herwerden nachgewiesen hat, daß die Schalen junger Schnecken von *Limnaea ovata* eine durch die Indophenolreaktion darstellbare Bänderung zeigten, und daß die Reaktion besonders deutlich in der Wachstumszone der Schalen ist. (Biol. Zentralbl. 43, 2, S. 129—131. 1923.)

Außerdem zeigten die trächtigen Exemplare von Capsa eine feine naphtholpositive Granulierung einzelner Oberflächenepithelien, manchmal auch ganzer Reihen solcher Epithelien.

**10. Cardita sulcata.** Diese Muschel zeigte bemerkenswerte Unterschiede in dem Ausfall der verschiedenen Reaktionen.

Zunächst war der ganze Epithelrand mit sämtlichen Methoden als ein fein granulierter Saum darstellbar. Die Granula füllten manchmal die ganze Zelle vollkommen, manchmal lagen sie in einem Teil der Zellen, besonders an deren Basis. Ließ man die Schnitte länger in der alkalischen Lösung liegen, so verschwand hier die Reaktion, so daß die Epithelien fast negativ erschienen, nicht aber veränderte sich die Farbreaktion in den unter der Epithelschicht befindlichen Eiweißzellen, die an manchen Stellen noch in eine oberflächliche und tiefere Schicht geteilt war. Mit der Benzidinreaktion waren diese Zellen nicht darstellbar, dagegen mit der Naphtholoxydase- und Naphtholperoxydasereaktion. Die tiefer liegende Schicht ließ sich mit der Naphtholoxydasereaktion besser darstellen als mit der Peroxydasereaktion. Eine große Anzahl der oberflächlichen Eiweißzellen endet im Epithel, doch hat man nicht den Eindruck von eigentlichen Schleimzellen. Der verschiedene Ausfall der Reaktion zeigt, daß die Oxydasen und Peroxydasen nicht miteinander übereinstimmen, sondern daß die Granula an ihrer Oberfläche ein Gemisch der verschiedenen Substanzen enthalten.

**11. Cardium oblongum.** Diese Muschel, die einen bräunlichen langen Körper hervorschnebelt, war insofern eigenartig, als nur die Peroxydasereaktion mit  $\alpha$ -Naphthol mit einer Nachfärbung von Naphtholgentianaviolett gelang, während die Naphtholperoxydasesreaktion allein negativ ausfiel. Mit Naphtholgentianaviolett allein trat keine Färbung ein. Es ist demnach keine eigentliche Oxydationsreaktion, sondern nur eine Beizenfärbung, und zwar derjenigen Epithelien, die nicht mit dem braunrötlichen Pigment angefüllt sind. Die beiden Zellarten liegen ganz dicht nebeneinander, einzelne kurze Abschnitte färben sich blau, andere enthalten das braune Pigment. Da, wo die Zellen kein Pigment enthielten, gaben sie auch die Oxydationsreaktionen nicht.

**12. Cardium tuberculatum.** Die verwandte Art *Cardium tuberculatum*, deren Oberflächenepithelien kein Pigment enthielt, zeigt bezirksweise in sämtlichen Epithelien eine Granulierung, die mit allen Methoden nachweisbar war. Außerdem fanden sich noch in einzelnen Abschnitten massenhaft in ziemlich regelmäßigen Abschnitten stehende Becherzellen.

**13. Cerithium vulgatum**, eine Gehäuseschnecke. Zeigte, abgesehen von einer schwachen Naphtholgentianafärbung einzelner aneinander gereihter Epithelien keine positive Reaktionen.

**14. Chiton discrepans.** *Chiton discrepans* zeigte einmal Becherzellen, die mit der Peroxydase-Naphtholgentianamethode eine ziemlich diffuse Blaufärbung annahmen, die meist etwas in die Umgebung hineindiffundierte, daneben befanden sich im Gewebe zahlreiche Peroxydase enthaltende Zellen, die der Größe nach zwischen Eiweißzellen und Leukozyten standen. Da, wo durch die Haut gelbliche Stacheln in größerer Menge hindurchtreten, war auch die Epidermis in ganzer Ausdehnung fein granuliert und gab sämtliche Reaktionen.

**15. Collozoum inerme.** Diese Radiolarienkolonien zeigten keine Reaktionen.

**16. Conus mediterraneus.** *Conus mediterraneus* zeigte vereinzelte Epithelien und Schleimzellen, die nur mit der Indophenolmethode darstellbar waren.

**17. *Cotylorhiza tuberculata*.** Die schöne Lappenquelle mit veilchenblauen Saugkrausen zeigte auf Durchschnitten des Körpers außer einer diffusen schwachen Indophenolreaktion keinerlei Oxydationsreaktionen.

**18. *Dolum galea*,** große Gehäuseschnecke. Hatte an der ganzen Körperoberfläche, aber mit sehr verschiedener Verteilung, Epithelien und Becherzellen, die mit allen Methoden darstellbar waren. Die Naphtholoxydasereaktion war sehr stark, fast blauviolett; besonders zahlreiche und sehr große Becherzellen befanden sich an der Außenseite des Enddarmes. Auch an den warzigen Kopfauswüchsen waren die Zellen zahlreicher. Dicht aneinander standen die Naphtholzellen an der Kante des Umschlagblattes des Mantels.

**19. *Doris verrucosa*.** Diese Nacktschnecke gibt ungefähr dasselbe Bild wie es in früheren Untersuchungen an der Schlammschnecke (*Limnaea*) festgestellt wurde. Zahlreiche typische Becherzellen, die sich auch mit der Oxydasereaktion intensiv färben.

**20. *Dosinia (Artemis) obsoleta*,** eine Muschel- Zeigt starke Reaktion der Oberflächenepithelien mit allen Reaktionen.

**21. *Eledone moschata*.** Tintenfisch. Auch in direkten unfixierten Abstrichen aus dem Herzen keine Zellen mit positiver Reaktion feststellbar.

**22. *Euthria cornea*.** Gehäuseschnecke. Zahlreiche weit in die Tiefe gehende Schleimzellen, die mit allen Methoden darstellbar waren, daneben auch einzelne Becherzellen innerhalb des Epithels. Mit der Benzidinmethode gaben sämtliche Epithelien eine Blaufärbung. Bei einer späteren Untersuchung nach 4 Wochen fand sich positive Reaktion von Schleimzellen einer inneren Drüse und hoher, eigenartiger, auf schmalen Septen aufsitzender Zellen.

**23. *Gastrophoron Meckelii*.** Diese eigenartige wie geflügelt ausschende Schnecke zeigte an dem Rande der Flügel zahlreiche große runde Scheiben zwischen bräunlichen Pigmentzellen, die sowohl mit der Indophenolmethode darstellbar waren als auch mit der Naphtholgentianalösung allein sich blau färbten. Es handelt sich demnach hier nicht um eine Naphtholperoxydasereaktion, wenn auch der positive Ausfall der Indophenolreaktion dafür spricht, daß die Scheiben möglicherweise aus Substanzen hervorgegangen sind, die den Peroxydasegranula näher stehen.

**24. *Gibbula ardea*.** Diese kleine perlmutterglänzende Schnecke zeigte nur schwache Indophenolreaktion einzelner nichtpigmentierter Epithelien. Auch mit der Peroxydasegentianafärbung färbten sich diese schwach blau.

**25. *Helix vermiculata*.** Diese schön gezeichnete an *Helix arbustorum* erinnernde Landschnecke, die sich in zahlreichen Exemplaren in den Tempeln des alten Paestum (Pesto) vorfand, zeigte, mit allen Reaktionen darstellbar, zahlreiche Schleimzellen und Eiweißzellen. Die Verteilung der Zellen ist sehr unregelmäßig.

**26. *Hippocampus guttulatus*.** Die roten Blutkörperchen des Seepferdchens gab bereits mit geringen Mengen Wasserstoffsuperoxyd, eine starke Peroxydasereaktion, dagegen war die Reaktion negativ in Blautausstrichen, die mit Alkohol (80%) fixiert waren. In diesen Ausstrichen zeigen nur die Granula der weißen Blutkörperchen positive Reaktion. Mit der Indophenolmethode sind die roten Blutkörperchen unfixiert darstellbar, und zwar in Form einer feinen Granulierung, be-

sonders dicht um den Kern herum. Sehr auffallend war der Befund am Epithel des oberen Darmabschnittes (Magen) nach kurzer Formohärtung. Hier wurden durch die Oxydase- und Peroxydasemethoden alle Kernkörperchen der Epithelien dargestellt, mit der Indophenolmethode dagegen waren die Kernkörperchen negativ, dagegen zeigte das Protoplasma eine feine blaue Granulierung. Der ganz ungewöhnliche Befund einer primären Oxydasereaktion von Kernkörperchen dürfte so zu erklären ein, daß die gelösten Indophenoxydasen an die Kernkörperchen spezifisch adsorbiert wurden.

**27. Holothuria tubulosa.** Die Seegurke zeigte auf Durchschnitten zahlreiche große Eiweißzellen, vielfach rundlich, oft aber auch von ganz unregelmäßig zackigen Formen, daneben auch vereinzelte Schleimzellen mit positiver Peroxydase- und Indophenolreaktion.

**28. Lima hians.** Muschel. Lima hians hat zahlreiche Eiweißzellen, die alle Reaktionen geben. An einzelnen Stellen finden sich auch ziemlich weite Becherzellen und unter der Oberfläche des Pigmentepithels liegende Haufen von Granula mit positiver Naphtholreaktion.

**29. Lithodomus dactylus.** Lithodomus dactylus zeigt, direkt unter dem Pigmentepithel liegend, aber auch entlang dem Byssuskanal, Haufen von Eiweißzellen, so daß das Bild stark an das der Miesmuschel erinnert. Auch ein Teil der nicht pigmentierten Oberflächenepithelien zeigt zusammenhängend positive Reaktion.

**30. Littorina coerulea.** Gehäuseschnecke. Littorina coerulea hatte zahlreiche kurze, an Eiweißzellen erinnernde Schleimzellen neben einzelnen Becherzellen. Die Reaktion war mit allen Methoden positiv.

**31. Lobiger serradifolii.** Diese eigenartig grünlich schimmernde Schnecke hat an ihrer Oberfläche Schleimzellen, die mit der Indophenolmethode blau darzustellen sind. Mit der  $\alpha$ -Naphtholperoxydasemethode färbte sich der grünliche Schleim größerer sackförmiger Zellen braunrot, während er mit Alkali allein keinen Farbumschlag zeigte. Diese Reaktion hat mit Oxydation nichts zu tun.

**32. Lucina lactea.** Muschel. Lucina lactea zeigt nach verschiedenen Zeiten der Härtung verschiedene Reaktion. Nach 2ständiger Fixation konnten alle Reaktionen positiv gefunden werden in Epithelien, Schleimzellen, Eiweißzellen und freiliegenden unter der Oberfläche ganze Polster bildenden Körnchen. Nach 24 Stunden waren diese Zellen nur noch mit der Indophenolmethode darstellbar. Möglicherweise handelt es sich um individuelle Verschiedenheiten.

**33. Marsenia spuria.** Die Naphtholoxydase- und Peroxydasereaktion waren negativ, dagegen färbte sich mit der Benzidinmethode ein Teil der Schleimzellen blau.

**34. Meretrix Chione (Cytherea).** Muschel. Meretrix Chione (Cytherea) zeigte eine fortlaufende Reihe granulierter mit allen Methoden darstellbare Epithelien an der austretenden gelblichen Röhre, während der eigentliche rötliche Körper keine Reaktion gab. Nach 4 Wochen waren aus der Schale entfernte Exemplare negativ, in der Schale gehärtete gaben keine Naphtholoxydasesreaktion mehr.

**35. Murex brandaris.** Die Purpurschnecke zeigt weit in die Tiefe gehende Schleimzellen neben spärlicheren Eiweißzellen, die sich mit allen Methoden darstellen lassen.

**36. Mytilus galloprovincialis.** Die Miesmuschel gab mit der Indophenolmethode etwa das gleiche Bild, wie es früher an der Miesmuschel der Nordsee auch mit der Naphtholperoxydasemethode darzustellen war. Dicht unter der Oberfläche Haufen von großen granulierten Zellen,

daneben in einzelnen Abschnitten des Byssuskanals Schleimzellen. Diese Schleimzellen waren bei der Miesmuschel der Nordsee bisweilen erst nach längerer Fixierung mit der Peroxydasenaphtholfärbung nachzuweisen, während sie zunächst negativ waren. Es spricht dies dafür, was auch schon früher festgestellt werden konnte, daß die diffundierenden Oxydasen da adsorbiert und erhalten werden, wo entsprechende Stoffe vorhanden sind. Auch einzelne Stellen nichtpigmentierten Oberflächenepithels gaben die 4. und 5. Reaktion.

**37. *Nassa mutabilis*.** Gehäuseschnecke. Mit der Benzidin- und Indophenolmethode waren einzelne Schleimzellen nicht sehr deutlich darzustellen, die aber mit der Naphtholperoxydasegentianafärbung gute Reaktionen gaben.

**38. *Nassa reticulata*.** Die Schleimzellen waren mit der Indophenolmethode ebenso deutlich darzustellen, wie mit der Naphtholperoxydasegentianafärbung.



Abb. 1.

**39. *Natica hebroea*.** Gehäuseschnecke.

**40. *Natica Josephinia*.** Bei *Natica Josephinia* waren die Schleimzellen mit allen Reaktionen darzustellen, während sie bei *Natica hebroea* keine Naphthol-oxydasereaktion, sonst aber die übrigen Reaktionen gaben.

**41. *Ostrea edulis*.** Die untersuchten Austern des Mittelmeeres unterscheiden sich von denen der Nordsee dadurch, daß die Wanderzellen nur mit der Indophenolmethode und der Naphtholperoxidasegentianafärbung darstellbar waren, während die letzteren auch eine gute Naphthol- und Benzidinoxidasereaktion haben.

**42. *Octopus vulgaris*.** Tintenfisch. *Octopus vulgaris* gab keinerlei Reaktion.

**43. *Patella lusitanica*.** Diese Meeresschnecke, die wie eine flache Schildkröte an Steinen oder anderen Gegenständen sitzt, zeigte in der ganzen Umrandung zahlreiche sich verästelnde Eiweißzellen, die mit allen Methoden darstellbar waren. Einzelne dieser Eiweißzellen münden wie Schleimzellen an der Oberfläche. Mit der Indophenol- und der Naphtholperoxydasegentianamethode zeigte auch der oberflächliche Epithelbelag eine gleichmäßige positive Körnelung.

**44. *Pectunculus violaceus*.** Muschel. Mit der Benzidinperoxydidasereaktion waren hier Eiweißzellen mit großen Granula besonders deutlich nachzuweisen

(stark braune Farbe der Granula), die mit den anderen Methoden nur teilweise und schwache Reaktionen gaben.

**45. Pecten Jacobaeus.** Muschel. Die Epithelien der Oberfläche sind gleichmäßig granuliert, mit sämtlichen Methoden färbbar.

**46. Pedicellina.** Nur mit der Indophenolmethode waren Granula oder eine diffuse Reaktion festzustellen.

**47. Philine aperta.** Diese Nacktschnecke, die in Formol sich nicht kontrahierte, gab keine Reaktion.

**48. Pinna nobilis.** Der winzige Fuß der Byssusmuschel gab keine Reaktion.

**49. Pleurobronchaea Meckelii.** Nacktschrecke. Eine diffuse Färbung der Radula konnte mit allen Methoden, abgesehen von der Naphtholoxydasmethode, erzielt werden.

**50. Psamobia vespertina.** Muschel. Das Oberflächenepithel war fortlaufend mit sämtlichen Methoden als ein granulierter Saum färbbar.

**51. Scyllium canicula.** Frische Blutausstriche des Hundshais zeigten mit und ohne Alkoholfixierung eine Färbung der kernhaltigen roten Blutkörperchen mit der Peroxydasereaktion, während granulierte weiße Blutzellen nicht darzustellen waren. Mit der Indophenolmethode, die am besten ohne Fixierung vorgenommen wird, zeigten die roten Blutkörperchen eine starke Granulierung, während die Naphtholperoxydasereaktion nur eine diffuse Färbung ergibt. Es scheint, als wenn die Granulierung erst unter dem Einfluß der basischen Dimethylparaphenyldiaminlösung entstände. (Nach den Untersuchungen von *Bokorny* und *Ferdinand Winkler* bewirken basische Substanzen eine Granulierung der lebenden Zelle.) Bei Gefrierschnitten der Milz waren nach der Formolhärtung auch die roten Blutkörperchen mit der Naphtholoxydasmethode, wenn auch nicht sehr stark, darstellbar im Gegensatz zu allen anderen bisher untersuchten roten Blutkörperchen. Als ein auffälliger und noch nicht genügend geklärter Befund wurde einmal festgestellt, daß die oxydierenden Substanzen aus den roten Blutkörperchen verschwunden waren, daß dagegen innerhalb der Pulpa nunmehr mit der Indophenolmethode granulierte Zellen nachweisbar waren, wie man sie sonst bei anderen Fischen und höheren Tieren vorfindet, ebenso zeigte das Epithel der Milzkapsel besonders gut an Tangentialschnitten eine außerordentlich feinkörnige Granulation von dunkelblauer Farbe in allen Zellen. Während sonst die Indophenolfärbung schnell abblaßt, blieb sie hier erhalten und ist nach einigen Monaten noch genau so deutlich wie am ersten Tage nur nicht blau, sondern schwarzlich. Es ist demnach hier irgendeine noch unbekannte Farbstoffsynthese eingetreten. Völlig negativ waren die Zellen der großen Follikel und die anderen Zellen der Milz. Beim Haifisch gab nach etwa 2 stündiger Fixierung das Epithel der Krypten des Magenepithels (Blindsack) besonders in den unteren Schichten sehr deutliche blaue Granulierung mit der Indophenolmethode. Auch im Darmepithel war stellenweise diese Granulierung noch vorhanden. Nach längerer Konservierung war sie nicht mehr nachweisbar.

**52. Scorpæna ustulata.** Blutausstriche des „Drachenkopfes“ gaben nach Alkoholfixation nur eine Färbung (Methode 2) der Leukocytengranula. In der Milz sind die myeloischen Zellen sehr zahlreich. Im Magen ist etwa das obere Drittel der Epithelien der tiefgehenden Krypten stark granuliert und mit allen Reaktionen darstellbar.

**53. Sepia.** Wie die anderen Tintenfische, so zeigte auch dieser keine Reaktion.

**54. Siphonostomum Rondeletii.** An Blutausstrichen nach Alkoholfixierung gaben nur die weißen Blutzellen in ihren Körnchen die Naphtholperoxydasereaktion bei der angewandten  $H_2O$ -Konzentration. In Gefrierschnitten gaben die roten Blutkörperchen eine starke Reaktion mit der Peroxydasemethode. Die Oberflächenepithelien der zottenartigen Magenschleimhaut geben mit allen Reaktionen positives Ergebnis.

**55. Solenocurtus strigilatus.** Muschel. Die nichtpigmentierten Oberflächenepithelien der austretenden Röhre lassen sich ähnlich wie bei *Cardium oblongum*, sowohl mit der Indophenol- als auch mit der Naphtholperoxydasegentianafärbung, darstellen.

**56. Spondylus gaederopus.** Muschel. Nur mit der Indophenolmethode sind Schleimzellen färbbar.

**57. Suberites domuncula.** Sowohl im Formolgefrierschnitt wie auch im direkten Präparat zeigte dieser Kieselschwamm in der äußersten Randpartie, oberhalb einer etwas stärker pigmentierten Zone granulierte Zellen wie einzeln liegende Granula, die die Indophenolreaktion gaben und sich mit der Peroxydasegentianafärbung darstellen ließen, nicht aber mit einer Naphtholgentianafärbung ohne Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd. Auch innerhalb des Schwamms fanden sich sowohl Körnchen wie einzelne Zellen mit der gleichen Reaktion.

**58. Syngnathus areus.** Verhielt sich ähnlich wie *Siphonostomum*.

**59. Syngnathus phlegon.** Hier konnten die Embryonen untersucht werden. Wurden die lebenden Embryonen in eine alkoholische  $H_2O_2$ -haltige Naphthollösung gebracht, so konnten stets, besonders dicht hinter dem Kopfansatz und in der großen Bauchflosse Leukocyten festgestellt werden mit zahlreichen violetten Körnchen, die sich mit Naphtholgentiana blau färben ließen. Lebende Exemplare, in die Indophenollösung gebracht, zeigten in seltenen Fällen eine Blaufärbung in sternförmigen Zellen; die völlig analog den schwärzlichen Pigmentzellen waren, manchmal auch bereits schwärzliches Pigment in den Ausläufern enthielten.

**60. Tapes decussatus.** Nur die beiden aus der Muschel ausgestreckten Fortsätze, nicht aber der Körper, zeigten eine gleichmäßige Körnung aller Epithelien, die mit sämtlichen Methoden darstellbar war.

**61. Tellina planata und 62. exigua.** Muscheln. Während *Tellina planata* keine Reaktion gab, zeigte *Tellina exigua* sehr reichlich alle Reaktionen gebende, oft sich verästelnde Schleimzellen. (Abb. 2.)

**63. Teredo navalis.** Diese Pfahlmuschel zeigt eine gleichmäßige Körnung der Oberflächenepithelien, die mit allen Methoden darstellbar ist.

**64. Tethys leporina.** Bei der Formolhärtung tritt keine Schrumpfung dieser Nacktschnecke ein. Auf Schnitten keinerlei Oxydationsreaktion festzustellen.

**65. *Trigla corax*.** Der Knurrhahn zeigt in seiner Milz eine außerordentlich starke Reaktion myeloischer Zellen. In der alkalischen Naphthollösung nimmt die Milz sehr rasch eine fast schwärzliche Färbung an. Auf Blautausstrichen bleiben bei der Leukocytendarstellung die roten Blutkörperchen ungefärbt. Im oberen Teil des Magens zeigten die Epithelien der Krypten eine gleichmäßige, mit allen Methoden darstellbare, Körnung.

**66. *Tritonium nodosum*,** große Gehäuseschnecke. *Tritonium nodosum* gibt ein ähnliches Bild wie *Dolium*.

**67. *Trochus magus* und 68. *Trochus turbinatus*,** kleine Gehäuseschnecken. Während *Trochus turbinatus* an einer Stelle Epithelien zeigte, die mit allen Methoden darstellbar waren, zeigte *Trochus magus* nur eine Bläbung der Oberflächenepithelien mit der Indophenolmethode an einzelnen Stellen.

**69. *Trochurus trochurus*.** Die Roßmakrele zeigte in der Milz neben schwärzlichen Pigmenthaufen zahlreiche myeloische Zellen mit positiver

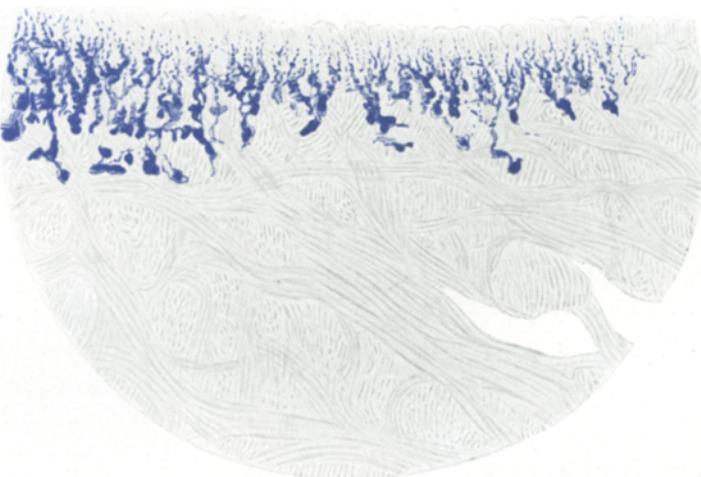


Abb. 2.

Oxydase- und Peroxydasereaktion; die roten Blutkörperchen gaben auch im Schnitt keine Naphtholperoxydasereaktion mit der gewöhnlichen Methode (kleine Mengen  $H_2O_2$ ), die Schleimhaut des Magens enthält massenhaft Leukocyten mit positiven Körnchen, zeigt aber für gewöhnlich keine positive Reaktion der Epithelien. Bei Einwirkung von manchen Fremdkörpern (in einem Fall wurde die Radula von Schnecken festgestellt) lösen sich die Leukocytengranula auf, und die Substanzen durchtränken die ganze Schleimhaut und treten als Schleim aus den Drüsen aus. In solchen Fällen bleibt mitunter eine positive Reaktion einzelner Epithelien und Epithelkerne zurück. Die Reaktion der Epithelien scheint hier demnach nur eine sekundäre Reaktion zu sein.

**70. *Venus gallina* und 71. *Venus verrucosa*.** Muscheln. Während bei *Venus gallina* der ganze Oberflächensaum mit allen Methoden dar-

stellbar war, ist bei *Venus verrucosa* nur ein Teil der Epithelien mit der Peroxydasemethode darzustellen, nicht mit der Oxydasemethode.

**72. *Zixyphinus dubius*.** Gehäuseschnecke. Keine deutliche Reaktion, nur färben sich die Schnitte mit der Indophenolmethode diffus blau.

Um eine Gesamtübersicht über das Vorkommen oxydierender formefester Substanzen in der Natur zu erhalten, sei hier noch kurz das Ergebnis früherer Untersuchungen herangezogen. (Mollusken *kursiv*.)

Tabelle 2.

	Naphthol		Benzidin	Indophenol	Bemerkungen
	Oxydase	Peroxydase	Peroxydase		
<i>Anodonta</i> . . . . .	2. 4. 6. 8	2. 4. 6. 8	2. 4 (6. 8?)		
<i>Arion ater</i> . . . . .			nicht		
„ <i>subfuscus</i> . . . .	5. 12	—	konstant	5. 12	Kernkörperchen
„ <i>rufus</i> . . . . .			5		erst nach Formol-
Bakterien . . . . .	—	—	—	8. 10	fixierung
<i>Bosmina</i> . . . . .	10	10	10	10	
<i>Cyclops</i> } des . . . .	6	6	6	6	
<i>Daphnien</i> } Süßwassers . . .	(6)	6	6	6	
<i>Hecht</i> . . . . .	2. 6	2. 6. (11)	2. 6 (11)	2. 6	2. Magen
<i>Hefe</i> . . . . .	—	—	8. 10	8. 10	
<i>Helix</i> , verschied. Arten	4	4	4	4	
<i>Karpfen</i> . . . . .	2. 6	2. 6. (11)	2. 6 (11)	2. 6	2. Magen
<i>Limax agrestis</i> . . . .	—	—	—		
<i>Limax cinereus maximus</i>	4. 5. 12		(4) (5)		
<i>Limnaea stagnalis</i> . . .	3. 6	3. 6	3. 6	3. 6	
<i>Napfschnecke</i> . . . . .	—	—	—		
Mensch (und viele Säugetiere) . . . . .	2. 6	2. 6. (11)	2. 6 (11)	2. 6	2. Speicheldrüse
<i>Paramaecium</i> . . . . .	(8) 10	(8) 10	8. 10	8. 10	
Pflanzenzellen . . . . .	8. 10	8. 10	8. 10	8. 10	
		Leptomine			
<i>Planorbis corneus</i> . . .	2	2	2	2	
Sperling . . . . .	6. 10	6. 10	6. 10		10. einzelne Horn- lamellen d. Magens b. neugeb. Sperling
Vorticellen . . . . .	10	10	8. 10	8. 10	10. Naphtholreaktion nur bei absterben- den Tieren

Man erhält über die Verbreitung der durch die 4 verwendeten Farbmethoden dargestellten oxydierenden Substanzen folgendes Bild:

1. Pflanzen: In erster Linie kommen Substanzen, die sich mit allen Farbreaktionen darstellen lassen, in den Oberflächenzellen und in den Gefäßen (dem Leptom) vor. Indessen kann man auch Zellen, die gewöhnlich sich durch diese Methode nicht darstellen lassen, zwingen, eine oder mehrere der angegebenen Reaktionen zu geben. Das ungemein häufige Vorkommen der Naphtholperoxydasen (*Molischi*, *Raciborski*) ist wohl

die Ursache, daß die Naphtholreaktion in der Botanik keine besondere Rolle spielt.

1. Einzellige Pflanzen. Alle Reaktionen sind an geeigneten Pflanzen (Spirogyraarten) festzustellen. Die Reaktion ist sehr unregelmäßig.

2. Bakterien. In Kulturen war bisher nur die Indophenolreaktion positiv. Die durch die Reaktion dargestellten Granula sind aber nicht vergleichbar den positiven Granula höherer Tiere, da sie sich in vieler Hinsicht chemisch anders verhalten. Auch diffuse Färbungen (gram-negative Kokken) kommen vor.

3. Hefen und Schimmelpilze. Die Naphtholreaktionen sind noch negativ, dagegen erhält man mit Benzidinlösungen und mit der Indophenolblaumethode positive Ergebnisse, die aber zum Teil erst durch die Lebenstätigkeit der Zellen ermöglicht werden.

4. Protozoen. Manche Infusorien nehmen beim Absterben in verdünnten Naphthollösungen eine diffuse Violettfärbung an, die Nahrungs-vakuolen von Paramäcien konnten einmal als violette Kugeln, die z. T. mit violetten Körnchen gefüllt waren, dargestellt werden. Die Reaktion schien aber eine sekundäre zu sein. Mit der Benzidin- und Indophenolmethode sind die Nahrungs-vakuolen dagegen leicht darzustellen.

5. Coelenterata. Keine deutlichen granulären Reaktionen bei Quallen, Seeanemonen gaben alle Reaktionen (Epithelien, Leukocyten).

6. Schwämme. Der Kieselschwamm gibt Reaktionen granulierter Zellen und Granula (Indophenol, Naphtholperoxydasegentianafärbung).

7. Stachelhäuter. Seesterne und Seewalzen gaben positive Reaktion, mit Ausnahme der Naphtholoxydasereaktion (Epithelien, Eiweißzellen).

8. Würmer. Die bisherigen Untersuchungen an fixierten Objekten waren negativ.

#### 9. Arthropoden.

- a) Krebstiere, positive Reaktion bei Krebsen, Cyclops, Daphnien, Bosmina (leukocytoide Zellen, Granula; diffuse Reaktion).
  - b) Tausendfüßler
  - c) Insekten
  - d) Spinnentiere
- } bisher keine Reaktion an fixierten Objekten.

#### 10. Mollusken.

- a) Chitonen
  - b) Schnecken
  - c) Muscheln
  - d) Tintenfische: keine Reaktion.
- } sehr häufig positive Reaktion von Epithelien, Schleimzellen, Eiweißzellen, Leukocyten.

#### 11. Tunicaten. Positive Indophenolreaktion amöboider Zellen.

#### 12. Wirbeltiere.

- a) Acrania: Amphioxus. Oberflächenepithel positiv (Peroxydase).
- b) Fische: myeloische Zellen: rote Blutkörperchen und Epithel des Magens bei einzelnen Fischen.

- c) Lurche: Blutzellen.
- d) Reptilien: Blutzellen.
- e) Vögel: Blutzellen, gelegentlich diffuse Reaktion einzelner Magenschleimhauthornlamellen (sekundäre Reaktion).
- f) Säugetiere: Blutzellen, Epithelien der Speicheldrüsen (Tränen-drüse).

Nun lassen sich die oxydierenden Substanzen der verschiedenen Tierklassen nicht ohne weiteres miteinander vergleichen. Ein Vergleich ist aber möglich zwischen Zellen der gleichen Ordnung, soweit Verwandtschaft zwischen den Zellen besteht. Es lassen sich vergleichen unter sich die roten Blutkörperchen, die weißen Blutzellen, die Speicheldrüsenepithelien, die Magenepithelien bei Fischen, bei Mollusken die Schleimzellen, Eiweißzellen und Oberflächenepithelien.

Es zeigt sich hier, daß die entsprechenden Zellen entweder ganz negativ sind, daß nur einzelne Reaktionen positiv ausfallen, oder daß alle Reaktionen positiv sind. Es besteht demnach die Wahrscheinlichkeit, daß auch in den negativen Zellen die gleichen Stoffe im Zwischenstoffwechsel auftreten.

Diejenigen Substanzen, welche die Naphtholoxydasesreaktion geben, geben mit wenigen Ausnahmen alle anderen Reaktionen, sie stellen daher einen zusammengesetzten Körper vor oder eine Mischung verschiedener oxydierender Substanzen. Nun sind alle Naphtholoxydasen, in Formol fixiert, mit der Zeit zersetztbar, und die Erfahrung zeigt, daß zunächst die Eigenschaft der Oxydase verloren geht, dann die der Peroxydase und zuletzt die der Indophenolblauoxydase. Bei der Zersetzung der Oxydasen werden demnach die anderen Fermente abgespalten. Neuerdings stehen auch *Hirschfeld* (Mediz. Klinik 1924, 279) und *A. Neumann* (Folia Haematologica, Bd. 32, S. 95) auf Grund eigener Untersuchungen auf dem Standpunkt, daß die Peroxydase der Leukocytengranula ein Abspaltungsprodukt der Oxydase ist. (*Neumann*).

Nun sind die Oxydasen manchmal noch verbunden mit eiweißlösenden Fermenten und mit Chromogenen. Bei der Untersuchung oxydierender Substanzen ist daher in jedem Falle auf diese beiden Substanzen zu achten.

Noch nicht abgeschlossene Untersuchungen an keimenden Pflanzen zeigen das gleiche Verhalten wie die tierischen Zellen. Gleichartige Zellgruppen wie die Oberflächenzellen von Pflanzenkeimen und die Zellen der Gefäßbündel zeigen verschiedene Reaktionen, und zwar so, daß da, wo die Naphthol-Oxydasesreaktion positiv ausfällt, auch in der Regel die anderen Reaktionen positiv ausfallen, daß also auch hier die Naphtholoxydase ein zusammengesetzter Körper ist, der die anderen Fermente enthält. Weiter läßt sich durch künstliche Eingriffe erzwingen, daß Zellen, welche normalerweise negativ sind, doch positive Reaktion geben, oder

daß Zellen, welche nur die Indophenolreaktion geben, durch die Peroxydase oder Oxydasenaphtholreaktion darzustellen sind (Beschädigung der keimenden Samen durch Stiche oder Anschneiden).

Da auch die Kernkörperchen der Pflanzen sich gegenüber den Molluskenextrakten von formofixierten Egel- und Wegschnecken (sekundäre Kernkörperchenreaktion) genau so verhalten wie die tierischer Zellen, so daß man nach der Beizung mit dem Molluskenextrakt die Kernkörperchen oder bei der Teilung der Zelle die Oberfläche der Schleifen mit alkalischer Naphthollösung in schwarzer Farbe darstellen kann, so ist es wahrscheinlich, daß die Kernkörperchensubstanz sich bei Tieren wie Pflanzen in gleicher Weise zerspaltet unter Bildung von Oxydationsfermenten, Verdauungsfermenten und Farbstoffbildnern, und daß diese Spaltung einem gewissen Gesetze unterliegt. Nach Abschluß von Untersuchungen an keimenden Pflanzen soll auf diese Dinge näher eingegangen werden.

---