

# Untersuchungen über intracelluläre oxydierende Substanzen.

Von

Dr. Walter Loele, Dresden,

Staatliche Landesstelle für öffentliche Gesundheitspflege.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 30. April 1926.)

In Bd. 261 dieser Zeitschrift ist eine Zusammenstellung intracellulärer, oxydierender Substanzen gegeben, die als Alfanaphthoxydassen, Peroxydassen, Benzidinperoxydassen und formolbeständige Indophenolblauoxydassen bezeichnet sind. Eine Gesetzmäßigkeit in dem Auftreten der Substanzen ist unschwer zu erkennen. Über die Bedeutung der Farbreaktion herrscht zur Zeit noch keine Übereinstimmung. In Hinsicht auf die Indophenolblaureaktion sind 3 Theorien aufgestellt, die auch für die Erklärung der Naphthol- und Benzidinreaktionen herangezogen worden sind.

1. Die Stoffe mit positiver Indophenolblaureaktion sind oxydierende Fermente (*Ferdinand Winkler, W. H. Schultze*).

2. Die Indophenolblaureaktion ist keine Fermentreaktion, sondern eine katalytische Eisenreaktion [*Katsunuma*<sup>1)</sup>]. *Graeff*<sup>2)</sup>, der schon früher die Ansicht ausgesprochen hat, daß eine Eisenreaktion vorliegt, gibt die Fermentnatur für die Substanzen zu.

3. Die durch die Oxydasereaktion dargestellten Stoffe haben mit der Oxydation selbst nichts zu tun, sie binden nur den bei der Oxydation gebildeten Farbstoff [*Dietrich*<sup>3)</sup>, *A. Ch. Hollande*<sup>4)</sup>].

Nimmt man noch hierzu die Ansicht mancher Untersucher, wonach der Baso-Oxyphilie von Zellstrukturen keinerlei Bedeutung zugebilligt wird [*F. de Moulin*<sup>5)</sup>], so schwebt man gewissermaßen in der Luft.

Auf Grund des gesamten Materiales, das in den früheren Arbeiten zusammengestellt ist, soll hier untersucht werden, was sich sagen läßt:

1. Über die Bedeutung der Farbreaktionen;
2. über das Vorkommen oxydierender Substanzen;

---

<sup>1)</sup> Intracelluläre Oxydation und Indophenolblausynthese. Verlag S. Fischer, Jena. 1924.

<sup>2)</sup> *Abderhalden*, Biologische Arbeitsmethoden, Abt. IV, T. I, H. 1.

<sup>3)</sup> Zentrabl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. 1908.

<sup>4)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences 178. 1215.

<sup>5)</sup> Arch. f. für Zellforsch. 17, 397, 418.

3. über die Beziehungen der Oxydationsreaktionen und der oxydierenden Substanzen zueinander;

4. über die Beziehungen der oxydierenden Stoffe zu anderen Zellvorgängen und

5. über Herkunft und Rolle der Stoffe innerhalb der Zelle.

1. *Bedeutung der Farbreaktion.* Alfannaphtholreaktion.

Bei der Oxydation von Alfannaphthollösungen durch verschiedene Substanzen erhält man folgende Farbreaktionen.

	Oxydationsmittel	Farbreaktion	Farbreaktion nach Zusatz v. Kalilauge	Bemerkung
1	Lösung in 0,85proz. Kochsalzlösung, Luftoxydation	violett	gelbbraun	
2	Lösung in Soda oder Kalilauge	gelbbraun* (bei Naphtholüberschuß grünlich)		*Beim Verdunsten auf Filtrierpapier violett (Einfluß des Luft-sauerstoffes)
3	Lösung in Salmiakgeist	gelbbraun (bei Überschuß von Naphthol grün)		
4	Verdünnte Kupfersulfatlösung (Eisenchloridlösung)	violett	braun	
5	Schwach alkalische Kupfersulfatlösung	violett*	braun	*Einfluß des Metallions
6	Stark alkalische Kupfersulfatlösung	braun		
7	Chloramin (alkalisch reagierend)	violett*	braun	*Einfluß der N-Gruppe
8	Chloramin schwach alkalisch durch KOH	grün		
9	Stark alkalisch	braun		
10	Formol	gelb		
11	Formol und Alkali	In bestimmten Mengenverhältnissen olivgrün, sonst gelbbraun		
12	Peroxydase der roten Blutkörperchen	violett*	braun	*Abhängig von den Mengenverhältnissen zwischen $H_2O_2$ , Naphthol und Peroxydase. Bei einem Überschuß von Alfannaphthol tritt keine Färbung ein, bereits vorhandene Färbung verschwindet bei weiterem Zusatz von Alfannaphthol
13	Die gleiche Peroxydase und Formolzusatz	violett	violett*	*Einfluß der COH-Gruppe
14	Granula menschlicher eosinophiler Leukozyten	violett	violett	} Wahrscheinlich Einfluß von N- und COH-Gruppe.
15	Granula der Eiweißzellen von Arion	schwarz	schwarz	

Es gibt demnach nach dem Ausfall der Farbreaktion 3 verschiedene naphtholpositive Zellsubstanzen.

1. Zellstrukturen, die eine Violettfärbung annehmen, aber nicht in alkalischer Naphthollösung (13).

2. Strukturen, die auch in stark alkalischen Naphthollösungen eine deutliche Violettfärbung zeigen (14) (nicht eine Braunfärbung, wie *W. H. Schultze* und neuerdings *Katsunuma* behaupten).

3. Stoffe, die eine Schwarzfärbung annehmen (15). Schon aus diesem Verhalten geht hervor, daß es sich nicht um eine einfache Eisenreaktion handeln kann.

Gegen eine Eisenreaktion sprechen auch noch folgende Beobachtungen:

1. In einer wässerigen, alkali- und wasserstoffsuperoxydfreien Lösung zeigen die Substanzen auch noch nach 24 Stunden keine Veränderung. (Gegensatz zum Verhalten gegenüber verdünnten Lösungen von Eisensalzen und eisenhaltigen Kolloiden.)

2. Es gibt Naphtholperoxydasen, die keine Oxydasereaktion geben, hier würde das Eisen nur bei Gegenwart von  $H_2O_2$  wirksam sein.

3. Manche Naphtholoxidasen zerfallen bei ihrer Zersetzung in Peroxydasen und Indophenolblauoxydasen, wobei erst die Oxydase, dann die Peroxydase verschwindet. Wenn das Eisen in der Indophenolblaureaktion noch wirksam ist, warum nicht mehr bei der Naphtholoxydase- und Peroxydasereaktion?

4. Formaldehydlösungen begünstigen vielfach den Ausfall der Reaktion, manche Naphtholreaktionen kommen erst unter dem Einfluß von Aldehyd zustande.

Näher liegen folgende Deutungen. Die Naphtholoxydase enthält bei Anwesenheit von OH-Ionen eine peroxydbildende Gruppe (Oxydase nach *Bach* u. *Chodat* = Oxygenase + Peroxydase), die den Peroxydasen fehlt. Positiver Ausfall der Indophenolreaktion bei negativem Ausfall der Naphtholperoxydasereaktion spricht für Fehlen wirksamer NH-Gruppen in der Indophenoloxydase.

Bei der Naphtholperoxydasereaktion der roten Blutkörperchen scheint zunächst nur ein Oxydationsvorgang vorzuliegen. Das Naphthol dringt in die roten Blutkörperchen, der innerhalb der Blutzellen durch Oxydation entstehende Farbstoff kann nicht mehr heraustreten. Das würde ein einfacher physikalischer Vorgang sein. Zur Stützung dieser Auffassung kann man die folgende Beobachtung heranziehen:

Gibt man Alfanaphthol in Substanz in eine physiologische Kochsalzlösung, so löst sich zunächst nur ein Teil des Naphthols, das gelöste Naphthol wird allmählich oxydiert und fällt als violette Flockung aus.

Zwischen den 3 Phasen besteht ein Gleichgewichtszustand, der mit der Zeit zugunsten des oxydierten Naphthols verschoben wird. Mehrere

Monate alte Naphthollösungen färben sich zwar noch bei der Oxydation violett, es ist aber nicht möglich, mit ihnen die roten Blutkörperchen mit Hilfe der Peroxydasereaktion in violetter Farbe darzustellen, vielleicht weil die Naphtholmoleküle zu große Aggregate bilden, die nicht in die Blutkörperchen eintreten. Umgekehrt könnte man annehmen, daß aus dem gleichen Grunde auch der oxydierte Farbstoff von den roten Blutkörperchen festgehalten würde.

Gegen diese Erklärung spricht aber die Tatsache, daß die roten Blutkörperchen nach der Naphtholfärbung ihre Eigenschaften vollkommen verändert haben, indem sie gegen Chemikalien und destilliertes Wasser unempfindlich geworden sind (*Loele*, Virch. Archiv 250, H. 3, S. 12).

Man kann daher die oxydierenden Stoffe auch nicht als Katalysatoren und Fermente im strengen Sinne bezeichnen, da nach der Naphtholfärbung die oxydierende Eigenschaft nicht mehr vorhanden ist. Bei katalytischen Vorgängen dürften die Katalysatoren nicht so schnell verändert werden. Das gleiche gilt auch für die violette Oxydasereaktion in alkalischen Naphthollösungen und noch mehr für die Schwarzfärbung. Wenn auch die oxydierenden Substanzen sich den Fermentgiften und der Erhitzung gegenüber wie Fermente verhalten, so ist doch die Fermenteigenschaft in dem Augenblicke verschwunden, wo die Phenolfarbstoffbindung eingetreten ist, im Gegensatz zur Indophenolblaureaktion, die man, sobald der blaue Farbstoff ausgezogen ist, beliebig wiederholen kann (*F. Winkler*).

Daß die naphtholbindenden Substanzen selbst Oxydasen enthalten, nicht bloß den Farbstoff binden, geht daraus hervor, daß auch isolierte Granula das gleiche Verhalten zeigen wie innerhalb der Zelle. Gelöste Oxydasen können aber das Protoplasma durchtränken. Die Ansichten von *Dietrich* und *Ch. Hollande* mögen daher für manche Zellen zutreffen. Im allgemeinen ist die Oxydase zugleich die phenolbindende Substanz.

Was nun die Bezeichnung für die oxydationsbeschleunigten Stoffe anlangt, so ist es am zweckmäßigsten, den Ausdruck Oxydase und Peroxydase beizubehalten, weil mit *einem* Worte ein ganzer Satz wiedergegeben ist. Es sind zwar verschiedene Bezeichnungen angegeben in der Literatur, *Unna* nennt solche Substanzen, in denen Oxydationsvorgänge festgestellt werden, Sauerstofforte, *Graeff* spricht von einem oxydierenden Agens, *Neumann* von einem oxydativen Prinzip, *Raciborski* nennt die pflanzliche Naphtholperoxydasen Leptomine, ich selbst habe die Bezeichnung phenol- (naphthol-) bindende Substanz vorgeschlagen und die ganze Gruppe dieser Substanzen als Aldamine bezeichnet, um die Wichtigkeit von Stickstoff- und Aldehydgruppen für den Ausfall der Reaktion hervorzuheben. Diese Bezeichnungen sind aber nicht

geeignet als kurzer Hinweis auf die Art der oxydierenden Eigenschaft, während mit dem Ausdruck Naphtholoxydase oder Naphtholperoxydase diese sofort gekennzeichnet ist.

Der positive Ausfall der Naphtholreaktion zeigt demnach nur an, daß eine Oxydationsbeschleunigung vorliegt und gleichzeitig eine Bindung des Farbstoffes erfolgt, die nicht auf einer einfachen Oxyphilie beruht, sondern mit chemischen Umsetzungsvorgängen verbunden ist, so daß sich aus der Reaktion allein über den eigentlichen Hergang und über die Eigenschaft der Oxydase selbst nichts Bestimmtes aussagen läßt.

## 2. Die Benzidinreaktion.

Bei der *Adlerschen* Blutreaktion wird Benzidin (als Base) in Eisessig gelöst und es tritt nach Wasserstoffsuperoxydzusatz bei Anwesenheit von Blut eine blaue bzw. eine Grünfärbung ein, die allmählich in Braun übergeht. Macht man die Benzidin-Lösung von vornherein alkalisch, so tritt nur eine Braunfärbung ein. Es ist demnach das Endprodukt der vollkommenen Benzidinoxydation ein brauner Farbstoff, dessen Bildung durch Säure nur gehemmt wird. Diesem Vorgange entsprechend, findet man Zellstrukturen, die in einer wässerigen Lösung von Benzidin sofort eine gelbe oder braune Färbung annehmen, während andere zunächst eine himmelblaue oder grünliche Färbung zeigen. Bei der Untersuchung mit Gemischen von sauren und basischen Farbstoffen findet man, daß die sich zunächst blau färbenden Stoffe sich meist mit basischen Farbstoffen darstellen lassen, demnach farbchemisch als saure Substanzen zu betrachten sind. Es gibt demnach der Ausfall der Benzidinreaktion ein Bild von dem Charakter der gefärbten Substanz. So färben sich z. B. die Wurzeln auf Watte auskeimender Pflanzen braun, während die in die Watte diffundierten Peroxydasen eine blaue Farbreaktion geben, demnach ihrem Charakter nach sich wie saure Stoffe verhalten. Man muß bei diesen Versuchen selbstverständlich das Untersuchungsmaterial ganz einheitlich behandeln. Schon der Zusatz von Alkohol genügt, daß manche Substanzen, die sonst sich braun färben, zunächst einen blauen oder grünen Farbton annehmen. Bei der Benzidinreaktion zeigt sich noch eine weitere Erscheinung. Wenn die Benzidinlösung beim Verdunsten an der Luft oxydiert, so bilden sich auch hier Farbstoffe, die an manchen Strukturen niedergeschlagen werden, ohne daß diese Struktur an sich eine Oxydationsbeschleunigung hervorruft. Indessen zeigen vergleichende Untersuchungen an Pflanzen, daß diese Substanzen meist mit den Benzidinperoxydasen übereinstimmen. Auch bei Hefen (*Soor*, *Torulaarten*), wo man mit der Verdunstungsreaktion oft außerordentlich bunte Bilder bekommt, gibt es immer einzelne Hefen, die eine fast augenblickliche Oxydationsreaktion geben, demnach fermentartige oxydationsbeschleunigte

Stoffe sind oder enthalten. Der Ausfall der Benzidinperoxydase-reaktion beweist demnach im Grunde auch nicht vielmehr wie die Naphtholreaktion, wenn auch hier über den Charakter der gefärbten Substanz nicht selten ein Urteil möglich ist. Eine Benzidinoxydase-reaktion kann als vitale Reaktion manchmal an Pflanzenwurzeln festgestellt werden, die in einer wässrigen Lösung von Benzidin ohne Wasserstoffsuperoxydzusatz eine dunkelbraune Farbe annehmen. Die gleichen Stellen geben auch eine Naphtholoxydase-reaktion. Die Benzidinperoxydase ist etwas häufiger wie die Naphtholperoxydase, was wahrscheinlich mit dem Einfluß der NH-Gruppe zusammenhängt, die dem Naphthol fehlt.

### 3. Die Indophenolblaureaktion.

Die Indophenolblaureaktion zeigt ebenfalls eine Oxydationsbeschleunigung und das Vorhandensein einer Gruppe, die den Farbstoff bindet, an, ist aber gleichzeitig noch eine Fettreaktion, die allerdings nicht blau, sondern, wie *F. Winkler* und *W. H. Schultze* immer betont haben, blauviolett aussieht, so daß sie sich von der eigentlichen Oxydase-reaktion gut unterscheiden läßt. [Fett gibt mit Naphthol im Formolgefrierschnitt eine gelbe Farbreaktion, im lebenden Tier eine Grünfärbung. (Injektion stark verdünnter alkalischer Naphthollösung.)]

*Neumann*<sup>1)</sup> behauptet, auch eine blaue Fettreaktion feststellen zu können. Nun haben die Oxydasen oft die Eigenschaft, nach ihrer Lösung auf Fetttröpfchen überzugehen. Es ist demnach sehr wohl möglich, daß die blaue Farbe von Fetttröpfchen bei Anstellung der Indophenolblaureaktion tatsächlich eine Oxydasereaktion und nicht eine Fettreaktion ist.

Wo die Indophenolblauoxydasen sich wie Fermente verhalten, ist die Bezeichnung „Oxydase“ gerechtfertigt.

*Graeff* unterscheidet zwischen Gewebs-Nadioxydasen und Myelooxydasen. Die Myelooxydasen sind identisch mit den stabilen Oxydasen von *v. Gierke* und den Indophenoloxidasen von *F. Winkler* und *Schultze*. Es erscheint zunächst zweckmäßig, die Myelooxydasen nur als besondere Abteilung der stabilen Oxydasen hinzustellen und die stabilen Oxydasen der Epithelien und anderer nicht myeloischer Zellen von ihnen zu trennen.

### Vorkommen der oxydierenden Stoffe.

Will man die stabilen Oxydasen bei Pflanzen und Tieren gemeinschaftlich betrachten, so ist folgende Einteilung angebracht:

1. Oxydierende Substanzen der Oberflächenzellen oder solcher Zellen und Zellgruppen, die ihr Sekret an einer Oberfläche entleeren.
2. oxydierende Substanzen innerhalb von Gefäßen;

<sup>1)</sup> *Folia haematol.* 32, Archiv H. 2, S. 169.

*I. Oberflächenzellen.*

Bei 46 verschiedenen Mollusken fand sich positive Reaktion		
in Epithelien . . . . .	28 mal,	Naphtholoxydase 20 mal
in tiefen Schleimzellen . . . . .	13 mal,	„ 9 mal
in Eiweißzellen . . . . .	11 mal,	„ 7 mal
in Leukocyten . . . . .	3 mal,	„ 2 mal
andere Strukturen (Granula, diffuse Färbung) . . . . .	5 mal,	„ 4 mal

Von 46 verschiedenen Mollusken zeigten 39 positive Oberflächenreaktion. Aus diesem Befund kann die Theorie abgeleitet werden, daß Tiere, deren Oberfläche aus einer Schleimhaut besteht, mit großer Wahrscheinlichkeit positive Oxydase- oder Peroxydasereaktion der Epithelien oder Schleimzellen geben. Das ist in der Tat der Fall, denn man findet die gleiche Reaktion bei Seeanemonen, Seesternen und dem Amphioxus (erste Klasse der Wirbeltiere), die eine ähnliche Oberfläche haben wie Mollusken. Ganz im Einklang mit diesem Befund steht die Tatsache, daß bei höheren Tieren eine positive Reaktion in Schleimdrüsen und entsprechenden Organen gefunden wird.

Die Frage, warum bei den übrigen Tieren die Oberflächenzellen negativ sind, kann so beantwortet werden, daß die übrigen Tiere eine Oberhaut besitzen, die durch eine Sekretion, zum Teil mit Zugrundegehen der Oberhautzellen, hornartige Massen bilden, die einen besonderen Schutz durch Ausscheidung von Schleim überflüssig machen. Tatsächlich ist der Unterschied in der Bildung von Schleim und Horn keineswegs groß. Bei Vögeln bilden sich die Hornlamellen des Magens aus einem verhornenden Schleim (*Boas*, Lehrbuch der Zoologie). Was im Magen innerhalb des Schleimes vorgeht, vollzieht sich in den Hornzellen gleichzeitig unter Degenerationerscheinungen von Kern und Protoplasma. Bei dieser Umwandlung wird die „Oxydase“ verbraucht. Die tieferen Schichten der Plattenepithelien geben noch eine labile Indophenolreaktion (*Katsunuma*) und die Dopareaktion *Blochs*.

Bei Pflanzen sind es ebenfalls meist die oberflächlichen Zellschichten der Blätter, der Stiele, der Wurzeln (die Schleimabsonderung an Wurzeln kann beträchtliche Grade erreichen), welche die Reaktion geben. Sehr gut läßt sich diese Bevorzugung der äußersten Zellschicht in den Keimblättern mancher keimenden Pflanzen zeigen. Sehr geeignet für derartige Versuche sind die Keimblätter von Johanniskraut, Kürbis, Sonnenblume. An keimendem Johanniskraut erhält man mit der Naphtholperoxydasereaktion Bilder, die zunächst eine strenge Lokalisierung der oxydierenden Substanzen auf die Oberflächenzellen und auf die Gefäßbündel zeigen (Abb. 1.). Eine sehr deutliche Oxydasereaktion findet sich auch in den Schließzellen vieler Pflanzen. Man kann die Reaktion ohne mechanische Verletzung bei keimender Brunnenkresse zeigen, die man in hohen Gefäßen bis zum Entfalten der ersten Blättchen züchtet und mit einer Alfanaphthollösung mit Zusatz von Wasserstoffsulphat-

oxyd übergießt. Nach einer Reihe von Stunden findet man dann, besonders wenn man die Keimlinge vorher längere Zeit einer starken Lichtquelle ausgesetzt hat, manchmal eine ausgezeichnete Darstellung oft sämtlicher Schließzellen, die man auch in Dauerpräparaten festhalten kann. Die Oxydase- und Peroxydasereaktion in den Oberflächenzellen von Pflanzen sind meist diffus, doch kann die Reaktion auch an granuläre Substanzen gebunden sein, z. B. an Eiweißkörner, die Reservevorräte darstellen, oder an granuläre Substanzen, die sich bei der Bildung der Spiralgefäße, Schraubentracheiden der Botaniker, beteiligen, mitunter auch an den Kern oder an Granula unbestimmter Natur.

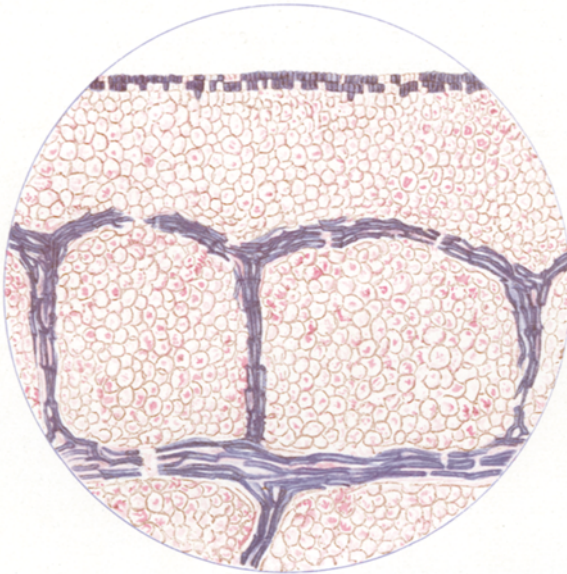


Abb. 1. Keimblatt Johanniskraut.

Die Benzindinperoxydasereaktion ist im Gegensatz zur Naphtholreaktion nicht in diesem Maße auf die Oberflächenzellen beschränkt.

#### Gefäßzellen.

Während bei Pflanzen der Inhalt der eigentlichen Gefäßzellen eine diffuse Reaktion gibt, so daß *Raciborski*, der zuerst eine positive Alfanaphtholperoxydasereaktion im Leptom feststellte, die oxydierenden Substanzen als Leptomine bezeichnete, finden sich die naphtholpositiven Zellen bei den höheren Tieren im strömenden Blute. Die verschiedenen allen Tieren gemeinschaftlichen Formen der Blutzellen sind:

1. Die roten Blutkörperchen,
2. die granulierten weißen Blutkörperchen und
3. die Lymphocyten.



Von diesen drei Zellarten geben nur die beiden ersten eine positive Oxydase- oder Peroxydasereaktion, die eigentlichen typischen Lymphocyten sind frei von oxydierenden Stoffen.

### 1. Die roten Blutkörperchen.

Die roten Blutkörperchen sind durch die Naphtholoxidasereaktion normalerweise nicht darzustellen, mit bisher einer Ausnahme, den roten Blutkörperchen des Hundshais. Diese gaben in Formolgefrierschnitten eine violette Oxydasereaktion. Dagegen geben die Granula der weißen Blutkörperchen dieses Fisches keinerlei Oxydasereaktion, auch nicht, wie bereits *Katsunuma* festgestellt hat, mit der labilen Indophenolblaureaktion. Mit der Indophenolblaureaktion ist in den roten Blutkörperchen vieler Fische eine besonders dicht um den Kern sitzende Granulierung festzustellen. *Katsunuma* fand diese Reaktion auch bei Amphibien. Die roten Blutkörperchen beim Menschen und bei anderen Wirbeltieren gaben, soweit ich Untersuchungen anstellen konnte, keine Indophenolblaureaktion.

Bei Zusatz entsprechender Mengen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  muß natürlich die Reaktion als Peroxydasereaktion positiv ausfallen.

Dagegen geben die roten Blutkörperchen mit Alfanaphthol und Benzidin Peroxydasereaktionen, deren Ausfall von der Menge des zugesetzten Wasserstoffsuperoxydes abhängt, wie der folgende Versuch zeigt:

Man stellt sich eine 1 proz. Lösung von gewaschenen Hammelblutkörperchen in physiologischer (0,85 proz.) Kochsalzlösung her; zu je 1 ccm der Hammelblutlösung gibt man 1 ccm einer Naphthollösung (physiologische Kochsalzlösung). Zu dem ersten Gläschen gibt man 10 ccm Kochsalzlösung, zum zweiten 10 ccm der filtrierten Naphthollösung, in beide Gläschen  $\frac{1}{2}$  ccm einer 1 proz. Wasserstoffsuperoxydlösung. Während in der Kochsalzverdünnung die roten Blutkörperchen eine violette Farbe und ganz ausgesprochene Napfform annehmen, erscheinen sie in der Naphtholverdünnung gelblich, rund, fast wie strukturlose Hefen aussehend, sind aber ebenso unlöslich im destillierten Wasser wie die gefärbten roten Blutkörperchen. Es ist demnach die Konzentration der Naphthollösung nicht bloß von Einfluß auf die Färbung, sondern auch auf die Form der roten Blutkörperchen. Dieser Vorgang erscheint wichtig für die Beurteilung der Bildung und Färbung von Granula innerhalb von Zellen, die, wie die Membranen der roten Blutkörperchen, oft Lipoid-Eiweißgemische darstellen.

Was die Oxydationsreaktion der weißen Blutzellen anlangt, so sollen hier nur die Reaktionen der menschlichen granulierten Leucocyten besonders besprochen werden. Zur Darstellung der Granula mit der Naphtholperoxydase-Gentianamethode ist sowohl Zeit wie Konzentration von Einfluß. Hat man ganz frische Blutaussstriche

vor sich, die man mit 80proz. Alkohol fixiert, da absoluter Alkohol die Oxydasen zerstört (eine Ausnahme bilden die eosinophilen Granula), so muß man nach der Naphtholgentianafärbung Naphthollösungen nehmen, in denen die Wasserstoffsuperoxydmenge außerordentlich gering ist. Sehr zweckmäßig sind Lösungen vom vorhergehenden Tage. Sobald der  $H_2O_2$ -Zusatz zunimmt, lösen sich die Oxydasen und ziehen meist in den Kern der Leukocyten.

Sind die Blutpräparate dagegen älter, dann ist der Wasserstoffsuperoxydzusatz ohne größere Bedeutung. Die Granula der Monocyten hatten meist eine größere Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Wasserstoffsuperoxyd als die neutrophilen Körnchen. Die Granula der neutrophilen Leukocyten verhalten sich dem Wasserstoffsuperoxyd gegenüber nicht gleichmäßig. Auf die Färbung der eosinophilen Granula hat die Wasserstoffsuperoxydmenge, wenn sie nicht eine sehr hohe ist, keinen Einfluß. Die Granula der Blutmastzellen, die man besonders bei leukämischen Prozessen in so großen Mengen findet, daß eine genaue Untersuchung möglich ist, verhalten sich der Naphtholoxydase-reaktion gegenüber verschieden. Manche Granula geben eine Reaktion, manche Granula nicht. Diese Ungleichmäßigkeit der Granulafärbung tritt auch bei der Benzidinreaktion zutage, insofern als sich manche Granula blau, manche grün, manche von vornherein gelb färben.

#### Die Lymphocyten des Blutes.

Die Lymphocyten des Blutes werden in der Literatur verschieden beurteilt. Nach *Nägeli* sind sie immer negativ, *Maximow* ist der Ansicht, daß Lymphocyten bei Anwendung der Gewebeskultur in granulierten weiße Blutzellen übergehen können, doch wird das von anderen Autoren bestritten. *Katsunuma*, der Untersuchungen in dieser Hinsicht ausgeführt hat, konnte die Beobachtung *Maximows* nicht bestätigen, gibt aber zu, daß in manchen Lymphocyten Indophenolblauoxydasen auftreten können.

Man muß allerdings einen Unterschied machen zwischen Blutzellen des normalen und Blutzellen des kranken Menschen. Auch die roten Blutkörperchen geben, wenn sie pathologisch auftreten und kernhaltig sind, beim Menschen manchmal eine diffuse Naphtholoxydase-reaktion des Kernes, wie einzelner Granula, besonders die Mikronormoblasten.

Bei einem 6wöchigen Fetus fanden sich in der Leber keine stabilen Oxydasen in den kernhaltigen roten Blutkörperchen, wenn diese normales Aussehen hatten, dagegen fanden sich kleine kernhaltige rote Blutkörperchen mit schmalen Protoplasmasaum, deren Kern eine positive Naphtholoxydase-reaktion gab und sich mit der Peroxydase-gentianafärbung, wie ich sie für Leukocytengranula angegeben habe, auch bei einer Blockfärbung darstellen ließ.

So gibt es auch lymphocytenähnliche Zellen, die sowohl mit Indophenolblau, als auch mit der Benzidinmethode und der Naphtholperoxydase-Gentianamethode darstellbar sind. Ein Urteil über ihre Herkunft ist niemals mit Sicherheit zu geben.

Zellen, die man in Analogie mit den oxydasehaltigen weißen Blutzellen setzen kann, sind die leukocytoiden Zellen bei Mollusken und bei Daphnien. Auch die Eiweißzellen<sup>1)</sup> der Mollusken sind bis zu einem gewissen Grad auf eine Stufe mit den Myelocyten zu setzen. Bei Daphnien findet man die Oxydasegranula in Zellen, besonders an der Oberfläche, den Schalenplatten aufsitzend und innerhalb der Antennen, hier wie dort auch in Form kleinster freier Körnchen. Dauerpräparate kann man sehr leicht erhalten, wenn man die Tierchen zunächst in eine wasserstoff-superoxydhaltige alkoholische Naphthollösung bringt, bis Violettfärbung der Granula eingetreten ist und dann die Naphtholgentianaviolettfröbung mit Alkoholdifferenzierung anschließt.

In pflanzlichen Gefäßen ist die Reaktion, wie überhaupt meistens die Oxydasereaktion diffus, selten an Granula gebunden. Keimende Kürbissamen oder Johannisbrotsamen sind zunächst so gut wie frei von Naphtholperoxydasen, die Anlagen der Gefäßbündel sind beim Johannisbrot schon vollständig vorhanden, beim Kürbis teilweise. Die Gefäßzellen selbst unterscheiden sich zunächst nur durch ihre Form (langgestreckte Zellen) von den anderen Blattzellen. Die Spiralgefäße sind noch nicht zu sehen. Die Peroxydasereaktion tritt zunächst am stärksten da auf, wo später die Spiralgefäße erscheinen. Die Spiralen sind anfangs noch deutlich granulär und naphtholpositiv, später verschwinden die Oxydationsreaktionen der nunmehr homogenen Spiralen ganz, dagegen ist noch die Umgebung der Spiralgefäße stärker positiv. Teils von den Gefäßbündeln aus, teils vom Rand her werden allmählich auch die anderen Zellen des Blattes positiv, so daß schließlich in einem Schnitt durch das Keimblatt alle Zellen Naphtholperoxydasen enthalten. Bei Pflanzen besteht demnach keine so scharfe Trennung der Oxydasezellen von den nicht Oxydase enthaltenden Zellen, wie bei Tieren, doch ist die Bevorzugung der Oberflächenzellen und Gefäßzellen unzweifelhaft vorhanden.

#### **Beziehungen der Oxydationsreaktionen und der oxydierenden Substanzen zueinander.**

In der Regel sind die Naphtholperoxydasen auch durch die Peroxydasereaktion mit Naphthol und Benzidin und mit der Indophenolblau-methode darstellbar. Die Naphtholperoxydasen geben meist die Benzidin- und Indophenolreaktion und die Benzidinperoxydasen die Indo-

<sup>1)</sup> Da, wo sie die Oberfläche erreichen, sind sie leicht mit Schleimzellen zu verwechseln.

phenolreaktion, nicht umgekehrt. Indessen kann jede dieser oxydierenden Substanzen auch selbständig auftreten, so gaben beispielsweise die Eiweißzellen von *Arce Noae* und die Schleimzellen von *Spondylus gaederepus* nur eine Indophenolreaktion. Die Eiweißzellen von *Pectunculus* gaben nur eine sehr kräftige Benzidinreaktion, fast keine Naphtholreaktion, die Eiweißzellen von *Cardita sulcata* keine Benzidinreaktion, dagegen die Naphtholreaktionen, die Eiweißzellgranula von *Arion* zunächst nur eine Naphtholoxidasereaktion, erst bei weiterer Spaltung Peroxydasereaktionen. Das spricht dafür, daß da, wo die Oxydasenaphtholreaktion positiv ist, entweder ein Gemisch der verschiedenen oxydierenden Substanzen vorliegt oder ein einheitlicher Komplex, von dem die übrigen oxydierenden Stoffe abgespalten werden. Die folgende Überlegung spricht dafür, daß jedenfalls eine Mischung vorhanden sein kann. Die Oxydasen werden in der Zelle ständig zersetzt. Wenn nun die Zersetzung in der Reihenfolge Peroxydase-Indophenoloxydase vor sich geht, so können oxydierende Substanzen zurückbleiben, die nicht Naphtholoxidasen sind, ihrerseits aber wieder Stoffe adsorbieren, an denen neugebildete Naphtholoxidasen sich niederschlagen. Die oxydierenden Substanzen würden in einem solchen Fall voneinander räumlich getrennt sein, also Mischungen darstellen. Wie auf der einen Seite die Oxydasen sich so zersetzen, daß schließlich nur die Indophenoloxidasen übrig bleiben, so findet man andererseits, daß Zellen, die gewöhnlich nur die Indophenolreaktion oder die Naphtholperoxydasereaktion geben bei Schädigungen des Gewebes, die nächsthöhere Substanz bilden, das spricht dafür, daß auch in diesen Zellen die gleiche Abspaltung der Indophenoloxidasen aus Naphtholoxidasen stattfindet. Die Indophenolblauoxydase ist die *erste* auftretende Oxydase.

Für die Möglichkeit einer Mischung sei noch ein Beispiel angeführt:

Die Auster des Mittelmeeres enthielt Leukocyten, die nur die Indophenolreaktion gaben. Bei der Auster der Nordsee waren sie auch mit der Peroxydasereaktion darstellbar. Bei der Konservierung der Nordseeauster in Formol gaben vorübergehend die Leukocytengranula aber eine Naphtholoxidasereaktion.

Da diese Reaktion besonders von den oberflächlich liegenden Leukocyten gegeben wurde, scheint sie auf einer Adsorption von Naphtholoxidasen zu beruhen, denn die Auster hatte neben den Leukocyten, besonders im Kiemen, Zellen mit großen Körnchen, die eine Naphtholoxidasereaktion gaben. Tatsächlich würden also die Granula der Auster hier an ihrer Oberfläche eine Mischung verschiedener oxydierender Stoffe tragen, wie sie vorher theoretisch angenommen wurde.

Von außerordentlicher Bedeutung wäre der Nachweis, daß auch die labilen Oxydasen (Geweboxydasen von *Graeff*) das Endprodukt

einer Abspaltung der Oxydasen sind (unbeschadet der Möglichkeit und Notwendigkeit der Entstehung dieser Stoffe wie auch der Naphtholoxidasen auch durch Assimilation). Zugunsten dieser Ansicht lassen sich folgende Befunde verwerten:

Die gesamten Epithelien des Darmkanals des Hundshai geben nach kurzer Formolfixierung eine (labile) Indophenolblaureaktion, bei längerer Fixation verschwindet diese zunächst im Darm, bleibt aber im Magen noch längere Zeit erhalten. Bei einer ganzen Reihe von anderen Fischen geben aber die Magenepithelien eine Naphtholoxidasereaktion<sup>1)</sup>. Weiter findet man bei manchen Mollusken, daß die Muskelfasern auch bei längerer Formolfixation noch Indophenolblauoxydase enthalten, während bei den meisten Mollusken die Muskelgranula äußerst empfindlich sind. Es gibt demnach Übergänge zwischen den stabilen und labilen Oxydasen was dafür spricht, daß die Stabilität der Oxydasen im wesentlichen davon abhängt, an welche Substanzen sie gebunden sind. Diese Auffassung, wonach die Widerstandsfähigkeit der Indophenoloxydase von der Bindung abhängt, scheinen auch *Graeff* und *Katsunuma* zu haben. Die Reihenfolge, in der der Oxydasekomplex sich zersetzt (umgekehrt sich aufbaut) würde also sein:

Naphtholoxydase . . . .	}	nur saure (OH) Gruppen am Oxydasereagens
Naphtholperoxydase . . . .		
(Benzidinperoxydase)	}	NH (basische) Gruppen am Oxydasereagens.
stabile Indophenoloxydase . .		
labile Indophenoloxydase . .		

Bei der weiteren Zersetzung der Naphtholoxydase treten wahrscheinlich noch 3 verschiedene Substanzen auf.

1. Stoffe, die zwar mit Naphthol Wasserstoffsuperoxyd keine Reaktion geben, nach dieser Behandlung aber sich noch mit Naphtholgentianaviolett (Gruppe 5) darstellen lassen.

2. Stoffe, die das Naphtholgentiana ohne  $H_2O_2$  Naphtholbehandlung annehmen (Amöboidzellen von Tunicaten) und

3. Stoffe, die sich zwar mit keiner dieser Reaktionen darstellen lassen, aber noch imstande sind, gelöste Oxydasen zu adsorbieren, so daß sie eine sekundäre Oxydationsreaktion geben.

Die Beantwortung der Frage, ob man die Oxydasen verschiedenartiger Zellen miteinander vergleichen kann, also die Feststellung, ob die Oxydasen der Oberflächenepithelien die gleichen sind, wie die Oxydasen der Blutzellen, ist sehr wichtig. Sind die Oxydasen die gleichen Substanzen, so ließe sich für alle Zellen das gleiche Gesetz

<sup>1)</sup> Die Epithelien des Fischmagens bilden demnach 4 Gruppen:

1. Alle Zellen immer negativ.
2. Vereinzelte Zellen positiv.
3. Das obere Drittel der Krypten positiv.
4. Die gesamten Drüsen positiv.

ableiten, und man erhielte durch das Studium der Naphtholzellen einen Einblick auch in den Stoffwechsel der oxydasefreien Zellen. Daß wahrscheinlich die Oxydasen der Wanderzellen die gleichen Eigenschaften haben, wie die Oxydasen der Oberflächenepithelien, dafür gibt es Unterlagen.

Bei der Schlamm Schnecke (*Limnaea*) findet man an der Oberfläche Stellen, wo Flimmerepithelien unmittelbar an naphtholpositive Becherzellen stoßen. In solchen Fällen, wo besonders reichlich Becherzellen vorhanden waren, fanden sich unterhalb des Flimmerepithels große Anhäufungen kleiner naphtholpositiver leukocytdoider Zellen, die unter dem Becherzellepithel fehlten. Man hat hier den Eindruck, als wenn der Schutz, der durch die Schleimzellen ausgeübt wird, da wo das Flimmerepithel anfängt, den Leukocyten übertragen ist.

Etwas Ähnliches findet sich im Magen der Roßmakrele. Die Magenschleimhautepithelien enthalten normalerweise keine Naphtholzellen wie sie bei anderen Fischen, teils vereinzelt, teils in flächenhafter Ausdehnung vorkommen. Hier zeigte sich, daß die in der Schleimhaut verstreuten reichlich vorhandenen Leukocyten auf mechanische Reize hin verschleimen und die ganze Schleimhaut mit ihren Sekreten durchtränken. Es kann dann vorkommen, daß manche Epithelien infolge Adsorption dieser Substanzen eine Oxydasereaktion der Kerne geben, wie man sie als sekundäre Oxydasereaktion auch bei menschlichen Leukocyten in allerdings seltenen Fällen vorfindet. Die Magenschleimhaut der Roßmakrele antwortet demnach auf eine Schädigung nicht mit einer Vermehrung der Leukocyten, sondern mit einer Hypersekretion derselben. Ist es nicht wahrscheinlich, daß hier die Leukocyten die gleiche Rolle übernehmen wie sonst die oxydasehaltigen Epithelien, die ebenfalls Schleim abscheiden?

Nun könnte auch noch der Einwand gemacht werden, daß zwar die tierischen Oxydasen und Peroxydasen gleiche oder verwandte Substanzen sind, daß aber die pflanzlichen Oxydasen etwas anderes darstellen. Das ist sehr unwahrscheinlich, denn die pflanzlichen Oxydasen (Peroxydasen) zeigen ein ähnliches Verhalten in ihrem Auftreten und bei ihrer Zersetzung. Auch das spricht für eine weitgehende Parallele, daß man mit tierischen Oxydasen auch pflanzliche Strukturen sekundär mit der Naphtholmethode darstellen kann, indem man die gelöste Oxydase als Beize verwendet und umgekehrt, daß es auch mit pflanzlichen Oxydasen gelingt, tierische Strukturen darzustellen. Natürlich ist damit nicht gesagt, daß die oxydasehaltige Struktur etwa bei Pflanzen und Tieren die gleiche ist. Wie die Erfahrungen mit der sekundären Oxydase-Naphtholreaktion beweisen, können die Oxydasen an die verschiedensten Strukturen adsorbiert werden, maßgebend ist nur die Oberfläche der Struktur, nicht ihre innere Zusammensetzung.

Wahrscheinlich werden die pflanzlichen Oxydasen ganz oder teilweise beim Aufbau der tierischen Zelle verwendet.

#### Beziehungen oxydierender Substanzen zu anderen Zellvorgängen.

Alle granulären Oxydasen können unter Auflösung ihrer Strukturen verschleimen. Der Schleim verliert dabei seine Oxydasefähigkeit in der Regel. Bei Mollusken ist die Naphtholoxidasereaktion so häufig in den Schleimzellen positiv, daß man die Schleimzellen geradezu als „Oxydase-Zellen“ ansehen darf. Nun ist der Verschleimungsvorgang meist ein Eiweißlösungsvorgang, mit dem gleichzeitig häufig noch eine Lipidlösung oder eine Lösung kohlehydrathaltiger Strukturen verbunden ist. Dieser Lösungsvorgang geht bei den Oxydasegranula sehr häufig auch noch im Reagensglas vor sich. Besonders lehrreich in dieser Hinsicht sind die Lösungs- und Quellungsvorgänge (autolytische Vorgänge), wie ich sie an den eosinophilen Körnchen menschlicher Leukocyten und an den Eiweißzellgranula mancher Mollusken beschrieben habe. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Oxydasen selbst gleichzeitig noch mit lytischen Substanzen verbunden sind. Bei den menschlichen und vielen tierischen Wanderzellen des Blutes ist eine eiweißlösende Fähigkeit festgestellt (*Jochmann*), die menschlichen Leukocyten vermögen nicht nur bakterielles Eiweiß, sondern auch bakterielle Lipide und Kohlehydrate aufzulösen. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß auch der Fermentkomplex für die Verdauungsfermente zunächst eine Einheit darstellt, die nur unter verschiedenen Verhältnissen verschieden gespalten wird. Betrachtet man die menschlichen Blutzellen auf die Wirkungsweise der Fermente hin, so ist festzustellen, daß die Eiterzellen kernlösende und kohlehydratlösende Fermente besitzen, aber keine freien fettlösenden Fermente<sup>1)</sup>. Sonst könnten sich keine lipoiden Strukturen im Protoplasma bilden. Umgekehrt die Lymphocyten, also die oxydasefreien Zellen, deren hauptsächlichster Vertreter sein Protoplasma durch einen Lösungsprozeß abgestoßen hat (peptischer Prozeß), enthalten Lipasen. Das zeigt, daß da, wo in der Zelle ein tryptisches Ferment gebildet wird, dieses an eine lipoide Struktur gleichzeitig mit einer Naphtholoxydase adsorbiert werden kann, umgekehrt daß da, wo in der Zelle ein peptischer Vorgang abgelaufen ist, wohl Lipasen auftreten, daß die Naphtholoxidasen aber hierbei völlig zersetzt werden. Nimmt man einen gemeinschaftlichen Komplex für die Naphtholoxidasen und die lytischen Fermente an, so können nur unter verschiedenen Verhältnissen verschiedene Fermente entstehen, d. h. die Ausbildung der verschiedenen Fermentzellen muß an ver-

<sup>1)</sup> Der neutrophile Leukocyt enthält zwar keine „Lipase“, kann sie aber bilden, der Lymphocyt enthält Lipasen (*Bergel*). Es ist ein Unterschied zwischen Lipase und lipolytischem System.

schiedenen Orten erfolgen, die Lipasezellen an Orten erhöhter Oxydation, die Oxydase-Tryptasezellen an Orten erhöhter Reduktion, da die Oxydase durch Oxydation zersetzt wird. Die Reihenfolge in der Spaltung der Komplexe mit zunehmender Oxydation und umgekehrt entsprechend der Aufbau durch Reduktion wäre demnach:

*Tryptase, Diastase, Lipase, Peptase.*

Betrachtet man daraufhin die Sekrete der großen Verdauungsdrüsen, so ist festzustellen, daß der Magen neben einer Peptase eine Lipase bildet. Die Bauchspeicheldrüse neben einer Tryptase und einer Diastase noch eine Lipase. Würde diese Lipase nicht im Pankreas gebildet, so könnte die Bauchspeicheldrüse die tryptischen Fermente granulär an Lipoiden gebunden speichern, gleichzeitig aber Naphthol-oxydase enthalten. Diese Speicherung würde für die Drüse eine große Gefahr bedeuten einmal, weil, wie in den Leukocyten, der Kern und damit die Regenerationsfähigkeit der Zellen angegriffen würde, andererseits, weil die Möglichkeit einer plötzlichen Lösung der Granula vorläge mit dem sofortigen Zellzerfall.

Diese Gefahr muß auch bei einheitlicher Fermentgrundsubstanz in den Magenepithelien bestehen, die Pepsin bilden. Wird sehr viel Substanz gebildet, aus der die Fermente (darunter auch Trypsin) abgespalten werden, so muß diese Abspaltung, wenn nicht genügend Sauerstoff zur Oxydation vorhanden ist, nicht auf der peptischen, sondern auf der tryptischen Seite erfolgen. Damit ist aber die Gefahr des Auftretens von Zellzerfall gegeben. Diese Gefahr infolge ungenügender Blutversorgung liegt vor bei Verengung oder Verstopfung der Gefäße der Schleimhaut; die Folge dieser Vorgänge wird ein Ulcus sein. Eine weitere Folgerung ist, daß alte Belegzellen mit sklerotisiertem Kanalsystem keine Fermente und keine Salzsäure mehr zu bilden imstande sind.

In 2. Linie gibt das Untersuchungsmaterial Anhaltspunkte dafür, daß zwischen Pigmentbildung und Vorkommen von oxydierenden Substanzen Beziehungen bestehen, und zwar derart, daß Zellen, in denen Pigmente auftreten, im allgemeinen frei sind von oxydierenden Substanzen. Ebenso finden sich in Zellen, die Pigmente bilden, dann keine Pigmente, wenn die Oxydasereaktion positiv wird. Hierfür einige Beispiele (weitere Beispiele finden sich in den Bemerkungen zu der in der früheren Arbeit aufgestellten Tabelle).

Bei älteren Miesmuscheln ist in der Regel der ganze Epithelsaum des Fußes mit bräunlichen Pigmentkörnern gefüllt. Exemplare, die wenig Pigment enthalten, enthalten dafür Naphtholperoxydasen und es ist deutlich zu erkennen, daß mit Zunahme der Pigmentbildung die Peroxydasereaktion abnimmt. Hierfür gibt es 2 Erklärungen, entweder wird bei vollständiger Oxydation die Oxydase selbst zersetzt



und es werden hierbei freiwerdende Chromogene phenolartiger Natur in Pigment umgewandelt, das sich dann, da die Oxydase selbst eine phenolbindende Substanz ist, auf der nichtzersetzten Oxydase niederschlägt und die ursprünglichen Oxydasegranula in Pigmentgranula verwandelt, oder man muß annehmen, daß in den Pigmentzellen überhaupt keine Oxydase gebildet wird. Das letztere ist unwahrscheinlich, da man Zellen findet, die sowohl Oxydasen wie Pigmente enthalten, und in denen manchmal deutlich erkennbar ist, daß die Naphtholoxidasen teilweise als Schleim noch ausgeschieden werden. Das beweist eine Zersetzung der Oxydasegranula, die der Pigmentbildung vorhergeht.

Nehmen wir nun an, daß intermediär Oxydasen immer neu gebildet und verbraucht werden, so wird ihre Speicherung durch die Bildung der Pigmentkörnchen verhindert und wahrscheinlich der oxydative Zerfall der Oxydasen durch die Anwesenheit des Pigmentes beschleunigt.

Ist diese Ansicht richtig, dann wird verständlich, warum bei Schnecken, die Eiweißzellen oder Leukocyten oft in großen Mengen unmittelbar an der Oberfläche zeigen, da wo zahlreiche Pigmente gefunden werden, diese Naphtholzellen nur spärlich vorhanden sind, weil bei der Pigmentbildung gleichzeitig Schutzsubstanzen infolge Zersetzung der Oxydasen abgespalten wurden, die die Zuwanderung der Leukocyten unnötig machen. Natürlich gelten diese Betrachtungen hauptsächlich da, wo die Zelle ihre Chromogene durch Abbau selbst erzeugt. Aber auch da, wo die Chromogene von außen her in die Zellen gelangen, müssen ähnliche Erscheinungen vorhanden sein. Da die Chromogene an die phenolbindenden Substanzen (Oxydasen) gebunden werden, muß an diesen Stellen die Pigmentreaktion positiv und die Oxydase-reaktion negativ ausfallen und das Neuauftreten von Oxydasen wird teils durch die erhöhte Zelloxydation, teils durch Bindung der Chromogene verhindert. Für die Pigmentbildung sind die Konzentrationsverhältnisse zwischen Chromogen und Farbstoff außerordentlich wichtig. Wie aus dem oben beschriebenen Färbungsversuch der Hammelblutkörperchen mit Naphthollösungen und Wasserstoffsuperoxyd hervorgeht, kann ein Überschuß von Naphthol die Färbung direkt verhindern. Ebenso tritt keine Farbstoffbildung ein, wenn die Peroxydase im Überschuß vorhanden ist. In ähnlicher Weise braucht eine Zelle, auch wenn sie viele farblose Chromogene oder viel Peroxydase enthält, keinen sichtbaren Farbstoff zu bilden.

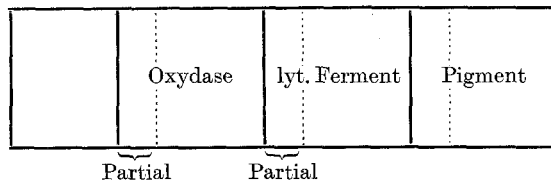
#### **Herkunft und Rolle der oxydierenden Stoffe.**

Über die Herkunft der oxydierenden Substanzen ist noch wenig bekannt. Die Granula der Eiweißzellen von Arion stammen sehr wahrscheinlich von den Kernkörperchen direkt ab, da man auch in Schneckenexemplaren, die nicht in Formol fixiert sind, einzelne Kernkörperchen findet, die in einer alkalischen Alfanaphthollösung sich in gleicher

Weise wie die formolfixierten Granula schwarz färben. Bisweilen findet man auch Teilungsvorgänge in den Kernkörperchen in Form von Längenwachstum und Spaltung. Die Eiweißzellen entstehen teils durch Sekretion von Nucleolarsubstanz mit sekundärer Fällung oder durch direkte Abschnürung von Nucleolarsubstanz. Die Granula der Eiweißzellen bei *Arion* spalten bei Behandlung mit Alkali einen braunen Farbstoff ab, der auf die Granula beschränkt sein kann, häufig aber die benachbarten Fasern durchsetzt. Bei längerer Konservierung in Formol nehmen mit der Zeit alle Kernkörperchen die Eigenschaft einer Naphtholoxydase an. Extrakte aus derartigen Schnecken gestatten die Darstellung pflanzlicher und tierischer Kernkörperchen (sekundäre Naphtholreaktion der Nucleolen). Bei positivem Ausfall der Oxydationsreaktion findet man nicht selten Quellungserscheinungen der Kernkörperchen und Umwandlung in ein eigenartiges lichtbrechendes rundliches Gebilde, das, wenn die Naphtholreaktion selbst abgeblaßt ist, noch als gelbes Körperchen erhalten bleibt. Hier sieht man tatsächlich noch die Verbindung von oxydierender Substanz, Chromogenen und lytischer Substanz. Auch bei der Bildung der Granula der menschlichen neutrophilen Leukocyten ist das Kernkörperchen beteiligt. Die ausgebildeten Leukocyten haben kein Kernkörperchen mehr, die Substanz des Kernkörperchens ist aus dem Kern ausgetreten und in entsprechender Umwandlung zur Bildung der neutrophilen Granula verwendet worden, die nun wahrscheinlich ihrerseits auf assimilatorischem Wege den Aufbau wichtiger Fermente gewährleisten. Der Aufbau der Nucleolarsubstanz muß, wenn ihr Abbau über Oxydase, lytisches Ferment und Pigment geht, auch in der gleichen Weise erfolgen. Nun hat *Graeff* es als sehr wahrscheinlich bezeichnet, daß jede Zelle Indophenolblauoxydasen labiler Art bilden kann. Wenn jede Zelle Nucleolarsubstanz zersetzt und jede Zelle Indophenolblauoxydasen bilden kann, so muß zwischen beiden auch die Möglichkeit des Auftretens von Phenoloxidasen, lytischen Fermenten und Pigmenten liegen.

Worin ist nun der Grund zu suchen, daß diese Substanzen so selten in den Zellen nachweisbar sind?

Der Grund liegt wahrscheinlich darin, daß der Sammelkomplex (Nucleolarkomplex) je nach der spezifischen Struktur der Zelle in verschiedener Weise gespalten wird. Man kann sich das bildlich an der folgenden Figur darstellen.



Zerfällt die Ausgangssubstanz in den ausgezogenen Linien, so ist keine Fermentreaktion oder kein Pigment nachweisbar, zerfällt sie in den punktierten Linien, so ist das Ferment oder Pigment nachweisbar. Der zwischen punktierter und ausgezogener Linie gezogene Teil ist ein Partial. Tritt dieses Partial zwischen zwei Glieder, die aufeinander an sich nicht einwirken, so kann nunmehr eine Einwirkung erfolgen, also z. B. ein (spezifisches) *lytisches* System zustande kommen, wenn das Partial von dritter Seite herantritt oder ein *autolytisches* System, wenn das Partial von der Zelle selbst gebildet wird. Anhaltspunkte für diese Auffassung gibt es bereits in der Serologie. Das Komplement stellt im hämolytischen Versuch ein derartiges Partial zwischen zwei aufeinander nicht sichtbar reagierende Substanzen vor (Amboceptor, rote Blutkörperchen).

Auch durch einige Beispiele aus der Färbetechnik kann diese Auffassung gestützt werden. Extrakte aus Wegschnecken sind erst dann als Kernkörperchenbeizen verwendbar, wenn die Kernkörperchen der Schnecke selbst eine Naphtholoxidasereaktion geben. Behandelt man demnach einen Gefrierschnitt menschlicher Haut mit einem unreifen Extrakt, so erhält man, abgesehen von manchen roten Blutkörperchen keinerlei sekundäre Reaktion. Ist aber die Haut geschwürig verändert, dann geben die Nucleolen der Epidermiszellen an der Grenze zwischen Geschwür (Eiterzellenansammlung) und unversehrter Haut eine positive sekundäre Naphtholreaktion. Es ist demnach hier ein Partial vorhanden und die Wahrscheinlichkeit besteht, daß dieses Partial sich aus aufgenommenen Leukocytenoxydasen gebildet hat, das an die Kernkörperchen niedergeschlagen ist.

Ein weiteres Beispiel gaben die Zellen des Substantia coerulea der Hirnschenkel. Hier gelang die sekundäre Naphtholreaktion der Kernkörperchen mit unreifen Extrakten nur in den pigmentierten Ganglienzellen, während andere Zellen keine sekundäre Naphtholreaktion gaben. Da sich diese Zellen durch ein autogenes Pigment von den übrigen Ganglienzellen unterscheiden, ist es naheliegend, daran zu denken, daß bei der Bildung des Pigmentes das entsprechende Partial entstand und am Kernkörperchen zurückblieb.

Ein Partial ist auch die NH-Gruppe bei der Färbung der Gewebsmastzellgranula. Die Färbung gelingt nur mit einem basischen NH-haltigen Farbstoff, nicht z. B. mit Eisenhämatoxylin<sup>1)</sup>, das sich infolge der Eisenbeize wie ein basischer Farbstoff verhält.

Außer den roten Blutkörperchen geben meist die eisenhaltigen Pigmente eine sekundäre Naphtholreaktion nach Behandlung mit sonst

<sup>1)</sup> Die Färbbarkeit mit einem Hämatoxylinlack spricht für das Vorhandensein basischer Gruppen im Eiweiß. Alaunhämatoxylin verhält sich wie ein saurer Farbstoff (*Unna*).

unwirksamen Schneckenextrakten. Es gibt demnach eine Oxydationsstufe der Oxydase, die eine besondere Affinität zum Eisen aufzuweisen hat. Die Oxydase selbst hat infolge ihres basischen Charakters kein Adsorptionsvermögen für Eisen. In dem Augenblick aber, wo saure Chromogene vorhanden sind, erhält sie als phenolbindende Substanz durch Bindung der Chromogene sauren Charakter und vermag Eisen zu binden. Tatsächlich kann man eosinophile Granula unter Verwendung von Naphthol als Beize mit Eisenhämatoxylin färben.

Es würden demnach dann Beziehungen zwischen Oxydase und Eisen vorhanden sein, wenn die Oxydase sich zum Teil zersetzt und Chromogene abspaltet und in anderer Gruppierung anlagert. Darnach bestände ein Parallelismus zwischen Oxydase- und Eisengehalt, der aber durchaus nicht gesetzmäßig zu sein braucht, da er abhängt einmal von den Mengen unzersetzter und zersetzter Oxydase, andererseits auch von der Menge der den Zellen von außen zugeführten Chromogene. Auf diese Weise würde es sich erklären, warum bei den labilen Indophenoloxidasen Oxydase und Eisengehalt parallel gehen (*Graeff, Katsunuma*).

Alle diese Betrachtungen sind zwar noch sehr spekulativ und es ist notwendig, die ganze Frage für jede Zelle, die Oxydase enthält, physiologisch-chemisch zu bearbeiten. Bereits aber sind einzelne Befunde vorhanden, welche die Berechtigung für die Aufstellung dieser Hypothesen geben. So fand neuerdings *Neumann*, daß die Oxydasereaktion der eosinophilen Granula vom Stickstoffgehalt der „Oxydasen“ abhängt. Weiter ist von französischer Seite (*v. Romieu, Prenant*) in der Granulasubstanz der eosinophilen Zelle Phosphor nachgewiesen worden (*Neumann*). Das spricht für ihren Ursprung aus dem Eiweiß des Kernes, der bei den eosinophilen Zellen stark abgebaut erscheint.

Zweifellos eignen sich manche Mollusken besonders für derartige physiologisch-chemische Zwecke, ebenso wie lebende Pflanzen mit Vorteil zu Untersuchungen herangezogen werden können, da der Nachweis der oxydierenden Substanzen auch in Dauerpräparaten möglich und somit ein Vergleich erleichtert ist.

Auch auf farbchemischem Wege dürften mit anderen Färbungen wichtige Feststellungen gemacht werden können. Wenn der Nucleolarkomplex, d. h. die Bildung des Kernkörperchens die Folge ist einer Zersetzung der Oberflächensubstanz der Schleifen (nach erfolgter Teilung), andererseits die Nucleolarsubstanz bei ihrer Zersetzung den Chromogen-Zymogen-Oxydasekomplex bildet, dann müssen auch farbchemisch bei schwankendem Oxydasegehalt Veränderungen am Kernkörperchen und am Chromatin festzustellen sein. Daß der Oxydasegehalt einer Zelle beeinflußt werden kann, beweisen die folgenden Untersuchungen: Durchsticht man einen keimenden Kürbissamen mit

einer Nadel und zieht einen Faden durch die Stichöffnung, dann tritt in der Umgebung des Stiches eine erhebliche Peroxydasebildung in allen Zellen ein. Die unmittelbare Umgebung des Stiches ist frei von Peroxydasen, darauf folgt eine charakteristische Abgrenzungszone. War der Faden vorher mit Terpentin benetzt, so blieb diese Reaktion aus. Die vermehrte Bildung von Peroxydasen dürfte daher die Folge von dem Eindringen von Wasser- und Luftsauerstoff sein. Der Zweck der Demarkation ist wahrscheinlich der, zu verhindern, daß die vorhandenen leicht angreifbaren Reservestoffe in Gestalt runder cholesterinhaltiger Eiweißkugeln sich durch Bakterieninfektion zersetzen.

Entsprechende Versuche an tierischem Material sind ebenfalls durchführbar und für histochemische Untersuchungen mit verschiedenen Färbemethoden besonders geeignet.

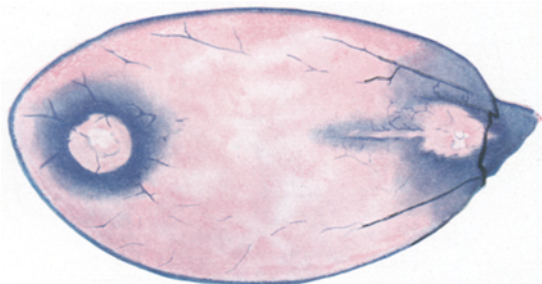


Abb. 2. Keimblatt vom Kürbis. Peroxydasereaktion in der Umgebung eines Stichkanals.

Auch die Capillarisationsmethode von *Grüß*<sup>1)</sup> kann zur Untersuchung von oxydierenden Fermenten, wie bereits *Grüß* festgestellt hat, mit Nutzen verwendet werden, um einen Aufschluß zu bekommen über die Natur der oxydierenden Fermente.

Läßt man einen Auszug von keimenden Kürbissamen, dem man vorher Alfanaphthollösung hinzugesetzt hat (etwa vom 5. bis 6. Tage), auf Filtrierpapier auslaufen, so muß da, wo Peroxydasen vorhanden sind, wenn man mit Benzidinlösung und Wasserstoffsuperoxyd betupft, überall eine carmoisinrote Färbung eintreten, wo Naphthol vorhanden ist. Tatsächlich tritt aber am Rande eine reine Blaufärbung ein, d. h. das Naphthol wandert nicht so weit wie die Peroxydase. Macht man den gleichen Versuch mit Carbolsäure statt mit Naphthol, so erhält man manchmal dasselbe Ergebnis. Hieraus folgt, daß die Peroxydase nicht deshalb schneller wandert, weil sie kleiner ist wie das Naphtholmolekül, sondern weil das Naphthol bzw. die Carbolsäure durch irgendeine basische Substanz zurückgehalten wird.

Macht man den Capillarisationsversuch mit einem Gemisch von Alfanaphthol und Carbolsäurelösung und betupft die verschiedenen

<sup>1)</sup> *Abderhalden, Arbeitsmethoden* Abt. IV, T. I, H. 1, S. 37.

Stellen der Filtrationszone mit einer Chloraminlösung zum Zwecke der Oxydation und Farbstoffbildung, so tritt das ein, was man erwarten kann, daß der Rand sich gelb, die mittlere Zone violett färbt, da die Carbolsäure schneller wandert, wie das größere Naphtholmolekül.

Die Schnelligkeit der Wanderung bei der Carbolsäure ist, wie Parallelversuche zeigen, etwa so groß wie die der Peroxydase. Der Filtrationsversuch zeigt also, daß die Peroxydase etwa die Molekulargröße von Carbolsäure hat oder kleiner wie diese ist,

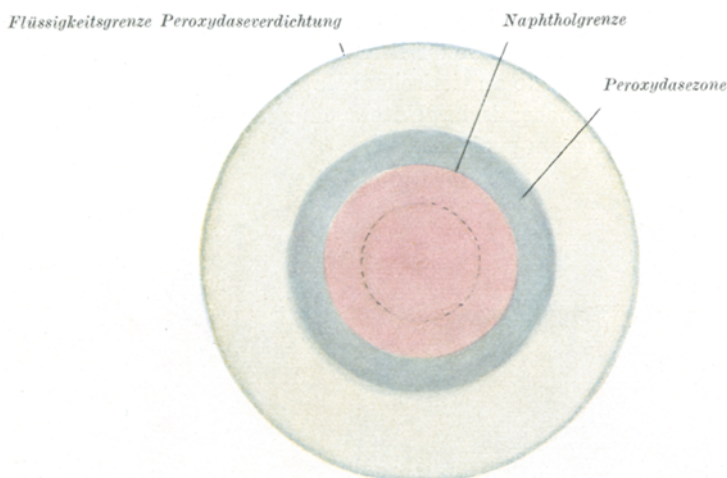


Abb. 3.

2. daß die Peroxydase innerhalb der Zelle an eine basische Gruppe gebunden ist, von der sie sich sehr leicht loslöst (Gelbfärbung innerhalb der Zelle mit Benzidin  $H_2O_2$ ),

3. daß vielleicht die saure Peroxydase selbst eine basische Gruppe besitzt, weil sie nicht zurückgehalten wird.

An der in den Zellen vorhandenen Naphtholoxydase sind daher mindestens 4 Gruppen vorhanden, eine peroxydbildende Gruppe, eine oxydierende Gruppe (Peroxydase), eine farbstoffbindende Gruppe und Stickstoffgruppen, die nicht unmittelbar zur Oxydase gehören, sondern durch Stickstoffgruppen des Reagens ersetzt werden können, also Partiale sind. Jedenfalls handelt es sich, selbst bei den Substanzen der Oberfläche oxydierender Granula, um zusammengesetzte Körper. Der Träger der „Oxydase“ vollends kann sehr verschiedener Natur sein.