

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Göttingen.
Direktor: Geh. Rat *Kaufmann*.)

Oxydasereaktion und Zellstoffwechsel.

Von

M. Staemmler, Chemnitz.

(Eingegangen am 7. Januar 1927.)

„Die Indophenolreaktion gibt einen Aufschluß über die oxydатiven Leistungen der lebenden Zellen“ (*Katsunuma*).

„Wenn ich noch daran erinnere, daß P. Ehrlich diese Indophenolblausynthese auch innerhalb der entsprechenden Zellen lebender Organismen vor sich gehen sah, dann kann man kaum mehr daran zweifeln, daß die Nadireaktion einen sicheren Aufschluß gibt über die oxydative Leistungsfähigkeit der lebenden Zelle“ (*Gräff*).

Liest man diese beiden wichtigsten Schlußfolgerungen aus den Arbeiten von *Gräff* und *Katsunuma*, so könnte man annehmen, es sei als eine gesicherte Tatsache anzusehen, daß wir aus dem Verhalten eines Gewebes, einer Zelle bei der Oxydasereaktion bindende Schlüsse auf die oxydатiven Fähigkeiten der Zellen ziehen könnten. Die Oxydasereaktion müßte also geradezu als morphologischer Maßstab für die Gewebsatmung gelten können.

Demgegenüber muß es stutzig machen, wenn *Gräff* in seiner Arbeit in ZiegL Btg. Bd. 70 in einer Anmerkung auf S. 15 die Einschränkung macht: „Der Ausfall der Nadireaktion ist zwar nicht an die Zeit des Fortbestehens einer Zellatmung geknüpft, jedoch ist die Reaktion an eine von der Zellart, Temperatur usw. abhängige, begrenzte Zeit der Reizbarkeit gebunden; die verschiedenen Zelfunktionen erlöschen allmählich, nacheinander; eine der längstdauernden scheint die Fähigkeit oxydativer Leistungen zu sein.“

Dieser Gegensatz, daß die Zelle imstande sein soll, oxydative Leistungen fermentativer oder katalytischer Art auszuführen, zu einer Zeit, wo ihre Atmung erloschen ist, brachte mich darauf, der Frage nachzugehen, inwieweit überhaupt die sog. Oxydasereaktion als eine „vitale“ oder „postvitale“ Zellreaktion anzusehen ist. Die Frage muß besonders deshalb von Interesse sein, weil mit ihrer Beantwortung auch die nach der funktionellen Auswertung der Oxydasereaktion im Zusammenhang steht: Kann man aus dem Ausfall der Oxydasereaktion Schlüsse auf den Funktionszustand von Zellen ziehen? Bedeutet „Hyperoxyda-

tose“ und „Hypoxydatose“, wie *Katsunuma* gesteigerten oder abgeschwächten Ausfall der Indophenolblausynthese bezeichnet, wirklich, daß eine vermehrte oder verminderte Tätigkeit der Zelle vorliegt? Und kann man umgekehrt aus einem „normalen“ Ausfall der Oxydasereaktion den Schluß ziehen, daß die Zelle sich in dem für sie üblichen Stoffwechselzustand befindet?

I. Kritik der Methoden.

Bevor ich an der Hand der Mitteilung neuer Versuche zu dieser Frage Stellung nehme, sei kurz die Methodik insoweit besprochen, als sie für die berührten Punkte von Bedeutung ist. In einem Gemisch von α -Naphthol und Dimethylparaphenyldiamin entsteht bei Gegenwart von Luftsauerstoff spontan ein blauer Farbstoff (Indophenolblau), der einer oxydativen Synthese seine Bildung verdankt. Diese Farbstoffbildung wird beschleunigt, wenn in das Reaktionsgemisch ein frisch dem Tierkörper entnommenes Gewebe gebracht wird. Das letztere muß also irgendeinen Stoff enthalten, der die Reaktion im Sinne eines Fermentes oder Katalysators beschleunigt.

Der neugebildete Farbstoff findet sich 1. in der Flüssigkeit und 2. in dem zugesetzten Gewebe. In diesem ist er in Form feinster dunkelblauer Körnchen im Protoplasma zu sehen. Das Gewebe ist im ganzen in mehr oder weniger großer Stärke blau gefärbt.

Die Prüfung des Ausfalls der Oxydasereaktion bestand nun bisher in der makroskopischen und mikroskopischen Untersuchung dieses Gewebes. Sein Gehalt an Indophenolblaugranula und die Schnelligkeit, mit der es sich färbte, galt als Maßstab für den Ausfall der Reaktion. Wenn man sich auch darüber nicht im klaren war, ob die blauen Körnchen im Zelleib etwas mit präformierten Granula des Protoplasmas zu tun hatten oder nicht (neuerdings wird das meist abgelehnt), so hatte auf jeden Fall eine Beurteilung ihrer Menge nur dann einen Sinn, wenn man dessen sicher war, daß wirklich alle Körnchen, die sich im Zelleib fanden, auch in diesem gebildet waren.

Ist das nun wirklich eine sicher feststehende Tatsache?

Folgender Versuch mag darüber Aufklärung geben.

Bringt man in ein 1proz. Oxydasegemisch einen Gefrierschnitt von einem längere Zeit in Formalin fixierten Organ, so tritt in dem Gemisch keine Beschleunigung der Farbstoffbildung ein, und das Gewebe selbst bleibt (bis auf geringste Spuren) ungefärbt. Setzt man aber der Flüssigkeit eine Spur H_2O_2 zu, so tritt augenblicklich eine tief dunkelblaue Farbe auf, und in kürzester Zeit ist auch das Gewebe dunkelblau gefärbt. Die mikroskopische Untersuchung zeigt, daß auch jetzt das Protoplasma der Zellen diffus von feinsten Farbkörnchen erfüllt ist, stärker als man es bei frischem Gewebe ohne Mitwirkung von H_2O_2 finden könnte.

Was ist daraus zu folgern? Das Gewebe ist imstande, auch aus dem Oxydasegemisch Farbstoff, der dort durch andere Einflüsse gebildet ist, in sich aufzunehmen. Der so aufgenommene Farbstoff ist morphologisch und in seiner Lokalisation im Zelleib nicht von dem zu unterscheiden, der unter Fermentwirkung im Protoplasma entstanden ist. Auf welche Weise das Indophenolblau in das Protoplasma aufgenommen und hier festgehalten wird, entzieht sich unserer Kenntnis. Es liegt nahe, anzunehmen, daß die Zellipoide hierbei eine Rolle spielen. Dafür spricht im besonderen die Tatsache, daß in Alkohol fixiertes Material sich in dem Oxydasegemisch nicht bläut, auch wenn H_2O_2 zugefügt wird. Wir werden also wohl annehmen können, daß irgend eine Adsorption an Zellipoide zu dem Auftreten der Farbstoffkörnchen im Zelleib führt.

Jedenfalls steht der eine Schluß fest: Aus dem Vorhandensein von Farbkörnern im Protoplasma ist nicht ohne weiteres zu schließen, daß sie dort gebildet sind. Und man könnte sich wohl vorstellen, daß Farbstoff, der (ohne Mitwirkung von H_2O_2) in dem Oxydasegemisch durch Fermentwirkung eines Teiles der Zellen entstanden ist, in anderen Zellen (die selbst nicht Fermentträger sind) adsorbiert wird. Jedenfalls darf die Menge der Indophenolkörnchen in einer Zelle nicht so ohne weiteres ein Gradmesser für die Stärke der Fermentwirkung in dieser Zelle sein.

Das ist der erste Nachteil der morphologischen Oxydasereaktion. Sie löst Gleichungen mit zwei Unbekannten. Aber es ist nicht der einzige.

Indophenolblau löst sich leicht in Fettsubstanzen. Sind solche in der Zelle vorhanden, so ziehen sie das gebildete Indophenolblau an und sind als violett gefärbte Tropfen im Protoplasma zu sehen. Wenn bei großtropfiger Verfettung auch keine Verwechslungen mit den eigentlichen Indophenolblaukörnchen der Oxydasereaktion möglich sind, so sind feinste Fettkörnchen, wie sie z. B. dem Abnutzungspigment beige-mischt sind, unter Umständen kaum von diesen zu unterscheiden.

Und schließlich habe ich schon mehrfach darauf hingewiesen, daß eine Abschätzung der Menge der Farbkörper in der Zelle, und somit Schlüsse auf die Stärke der Fermentwirkung aus dem morphologischen Bild, nur dann einigermaßen sicher sind, wenn die Vergleichsbilder unmittelbar in demselben Präparat oder in Kontrollen zur Hand oder die Unterschiede so groß sind, daß Täuschungen sich ausschließen lassen.

Neben diesen Nachteilen hat die morphologische Oxydasereaktion auch Vorteile. Steht die Frage zur Erörterung, welche Zellen eines Gewebes vorzugsweise oder allein Träger der oxydierenden Fermente sind, so kann diese nur durch die mikroskopische Untersuchungsart entschieden werden. Aber gerade bei solchen Fragestellungen wird man sich immer darüber im klaren sein müssen, daß die Anwesenheit von Farbkörnchen in einer der Zellen noch nicht beweisend ist dafür, daß sie auch dort gebildet sind. Immerhin wird auch hier oft noch ein Ergebnis zu

erzielen sein, wenn man die Versuchsanordnung ändert, zur Isolierung von Zellen durch Zerzupfen des Gewebes seine Zuflucht nimmt und vor allem stark verdünntes Oxydasegemisch (1 : 5000) verwendet, in dem man tatsächlich stark gefärbte Körnchen im Protoplasma oft schon erkennen kann, wenn die Flüssigkeit selbst noch völlig oder fast völlig farblos ist. In solchen Fällen ist eine reine Adsorption von Farbe aus der Lösung kaum anzunehmen, sondern eher wirklich damit zu rechnen, daß alles oder fast alles, was man an Farbkörnchen in der Zelle sieht, auch dort entstanden ist. Zur mengenmäßigen Auswertung der Reaktion ist auch unter solchen Bedingungen die Methode schlecht geeignet, solange nicht der unmittelbare Vergleich verschiedener Zellen desselben Präparates Unterschiede mit unzweifelhafter Deutlichkeit hervortreten läßt.

Die Vorteile der morphologischen Methode, der Lokalisation des Fermentes in einzelnen Zellen, fehlen natürlich der chemisch-quantitativen Art der Oxydasereaktion, wie ich sie in Modifikation einer früheren Angabe von *Vernon* zusammen mit *W. Sanders* ausgearbeitet habe. Sie vermag nur anzugeben, wieviel Farbstoff im ganzen von einem Gewebe gebildet ist, und vergleicht diese Menge mit der, die in der gleichen Zeit-einheit spontan an der Luft entsteht. So ist sie imstande, die Fermentwirkung zahlenmäßig zu fixieren, und gestattet dadurch besser Vergleiche zwischen der Farbstoffbildung verschiedener Gewebe oder desselben Gewebes unter verschiedenen Bedingungen. Auch diese quantitative Methode hat noch Unzulänglichkeiten, die vielleicht mit der Zeit ausgeglichen werden können. Diese bestehen einmal in der Verschiedenartigkeit des Reaktionsgemisches. Setzt man mehrere Lösungen von α -Naphthol und Dimethylparaphenyldiamin gleichzeitig unter denselben Bedingungen frisch an und prüft die spontane Farbstoffbildung an der Luft ohne Zusatz von Gewebe, so kann man sich leicht überzeugen, daß diese Farbbildung nicht in allen Gläsern die gleiche ist. Woran die Unterschiede liegen, kann ich nicht mit Sicherheit sagen. Wahrscheinlich spielt vor allem der Wassergehalt des Dimethylparaphenyldiamin dabei eine Rolle, das, obwohl es in zugeschmolzenen Glasröhren geliefert ist, bald pulvrig-trocken, bald auffallend feucht, verklumpt ist. Ist aber die auf spontaner Oxydation beruhende Farbbildung nicht gleichmäßig, so ist die Vergleichsfarbe nicht ständig, somit das Ergebnis verschiedener, zu verschiedener Zeit, mit verschiedenen Lösungen angesetzter Versuche nicht exakt vergleichbar. Deshalb sind diejenigen Ergebnisse am sichersten, die mit der gleichen Lösung zu gleicher Zeit angesetzt und unmittelbar miteinander verglichen werden. Man kann dabei ganz auf die gewebsfreien Vergleiche verzichten und unmittelbar die Farbstofflösungen vergleichen, die unter Einwirkung der auf ihr Oxydaseferment zu prüfenden Gewebe gebildet worden sind. So

sind denn auch die meisten der später mitgeteilten Ergebnisse solchen direkten Vergleichen entnommen.

Die quantitativ-chemische Versuchsanordnung erfaßt den gesamten Farbstoff, der in der Versuchsschale gebildet ist, einerlei, ob er sich in den Zellen oder gelöst im Flüssigkeitsgemisch findet. Wo die Farbstoffbildung stattgefunden hat, darüber ist dabei keine Auskunft zu geben.

Und das ergibt gewisse Ungenauigkeiten, die durch ungewöhnliche Beimengungen zu den Geweben bedingt sein können. Dies sind einmal Bakterien. Daß solche imstande sind, Indophenolblau zu bilden (d. h. also Oxydasereaktion geben), ist seit den Untersuchungen von *W. H. Schultze* bekannt. Die Indophenolblaubildung war bei den einzelnen Bakterienarten übrigens recht verschieden, stark bei *Bac. pyocyanus*, *fluorescens capsulatus*, *anthracis*, *subtilis* und *Vibrio cholerae*; sie fehlte bei *Staphylococcus aureus*, *Bac. dysenteriae*, *pneumoniae* u. a. Beachtenswert ist übrigens, daß sämtliche Bakterienarten Reduktionswirkungen zeigten.

Es besteht somit die Möglichkeit, daß die Ergebnisse der quantitativen Oxydasereaktion durch Bakterienbeimengungen ungenau werden, eine Möglichkeit, auf die *Gräff* in einer Erörterungsbemerkung auf der Pathologentagung 1926 hingewisen hat.

Der Feststellung, wie stark die Beeinflussung durch Bakterien sein kann, diente eine Anzahl von Versuchen. In der ersten Versuchsreihe wurden 2 gewebsfreie Oxydasegemische von 2 ccm gleicher Zusammensetzung der Spontanoxydation an der Luft überlassen. Dem Glas *a* wird $\frac{1}{2}$ ccm Bakterienabschwemmung (der 4. Teil einer 24—48stündigen Agarkultur, die mit 2 ccm Ringer abgeschwemmt wurde) dem Glas *C* $\frac{1}{2}$ ccm Ringerlösung zugesetzt.

Die Ergebnisse sind bei quantitativer Auswertung folgende:

Typhus	a:C = 1,4:1
Pneumokokken	a:C = 1:1
Paratyphus B	a:C = 2:1
" A	a:C = 1:1
Coli	a:C = 1,2:1
Tetragenus	a:C = 1:1
Diphtherie	a:C = 1,4:1
Pneumokokken	a:C = 1,4:1
" Streptokokken	a:C = 1:1
Typhus	a:C = 1,2:1
Paratyphus B	a:C = 1:1
Staphylokokken	a:C = 1:1
Pneumokokken	a:C = 1:1,4
Staphylokokken	a:C = 1:1
Pneumokokken	a:C = 1:1
Coli	a:C = 1:1
Staphylokokken	a:C = 1:1

Staphylokokken	a:C = 1:1,3
Coli	a:C = 1,3:1
Staphylokokken	a:C = 1:1,2
Coli	a:C = 1:1
Staphylokokken	a:C = 1:1
"	a:C = 1:1,8
"	a:C = 1,3:1
Pneumobacillen	a:C = 1:1

Von den 26 Versuchen ist also in 14 Fällen kein Unterschied, 8mal ist im Bakterienglas mehr Indophenolblau gebildet, 4mal hat umgekehrt der Zusatz von Bakterien hemmend gewirkt.

Nur in einem Fall ist die Steigerung der Indophenolblaubildung beträchtlich, nämlich auf das Doppelte. Bedenkt man, daß unter dem Einfluß von Gewebe die Farbbildung, die Kontrolle als 1,0 angesehen, bei Nieren im Durchschnitt vielleicht 8,0, bei Herzmuskel 6,0, bei Leber 3,0 ist, so ist eine durchschnittliche Erhöhung von vielleicht 0,3 bedeutungslos, denn sie bleibt in der Breite der Ungenauigkeit von 10%, die dem Verfahren an sich anhaftet. Dabei darf aber auch nicht vergessen werden, daß der Zusatz von $\frac{1}{4}$ Agarkultur eine so ungeheure Gabe darstellt, wie sie beim Arbeiten mit frischem Material auch niemals nur im entferntesten erreicht werden kann. Die ganze Versuchsdauer beträgt etwa 10 Minuten. Wenn auch nur etwas auf Sauberkeit der Instrumente und Glasgefäß geachtet wird, ist es praktisch beim Arbeiten mit lebensfrischem Tiermaterial überflüssig, eine Beeinflussung durch Bakterienbeimischungen mit in Rechnung zu stellen.

Etwas ungleichmäßiger fielen übrigens die Versuche mit Bakterien aus, wenn ich diese erst auf Gewebe einwirken ließ ($\frac{1}{2}$ Stunde) und dann dem Gewebe-Bakteriengemisch in Glas *a* und dem Gewebe-Ringergemisch in Glas *b* je 2 ccm Oxydaselösung zusetzte. Die Versuche wurden sämtlich mit Geweben einer frisch getöteten Maus vorgenommen.

Die Ergebnisse waren (in der gleichen Reihenfolge mit den gleichen Bakterienkulturen angesetzt):

	Leber	Milz	Niere
Typhus	a:b = 1,2:1		
Pneumokokken	a:b = 1:1,9		
Paratyphus B	a:b = 1:1,4		
" A	a:b = 1:1,3		
Coli	a:b = 1:1,2		
Tetragenus	a:b = 1:1,5	1:1	
Diphtherie	a:b = 1:1,8	1:1,4	1:1
Pneumokokken	a:b = 1:1,2	1:1,5	1:1
"	a:b = 3,0:1	1:1	1:1
Streptokokken	a:b = 1:1	1:1	2,0:1
Typhus	a:b = 1,2:1	1,1:1	1:1,2
Paratyphus B	a:b = 1:1,3	1:1	1:1
Staphyloc. alb.	a:b = 1,2:1	1,4:1	1,4:1
Pneumokokken	a:b = 1,3:1	1:1,3	1,4:1

		Leber	Milz	Niere
Staphylokokken	a:b = 1,4:1	1:1,2	1,2:1	
Pneumokokken	a:b = 2,3:1	1:1	1,9:1	
Coli	a:b = 1,2:1	1:1,3		1:1,4
Staphylokokken	a:b = 1,5:1	1,2:1		1:1,3
"	a:b = 1,5:1	1:1		1:1
Coli	a:b = 1,5:1	1:1		1,2:1
Staphylokokken	a:b = 1,1:1	1:1,2		1,3:1
Coli	a:b = 1,4:1	1:1		1,3:1
Staphylokokken	a:b = 1,6:1	1:1		3,0:1
"	a:b = 1,3:1	1:1,2		1,6:1
"	a:b = 1,6:1	1,5:1		1,4:1
Pneumobacillen	a:b = 1,5:1	1:1		1,5:1

Aus diesen Ergebnissen könnte man vielleicht den Schluß ziehen, daß hier die Beeinflussung der Endzahlen durch den Zusatz von Bakterien-aufschwemmungen wesentlich stärker, wenn auch recht unregelmäßig ist. Doch darf man nicht vergessen, daß vielleicht die Bakterien schon irgendwelche Veränderungen in den Gewebszellen hervorgerufen haben können, die imstande sind, deren Fermentwirkung zu beeinflussen. Jedenfalls habe ich in früheren Untersuchungen gefunden, daß bei der Infektion des Tieres mit den gleichen Erregern sich in der Leber häufig eine Erhöhung des Oxydasegehaltes nachweisen läßt. Diese Erhöhung hängt nicht mit der Ansammlung von Bakterien in dem Organ zusammen, sondern ist mit Veränderungen der Leberzellen in Verbindung zu bringen.

Fragen wir also zusammenfassend, ob bakterielle Prozesse den Ausfall der quantitativen Oxydasereaktion merklich beeinflussen und ihre Brauchbarkeit herabsetzen können, so werden wir die durch sie verursachten Fehler nicht hoch einzuschätzen brauchen.

Eine 2. Frage ist, wie weit das Vorhandensein von *Leukocyten* in den Organen den Ausfall der Reaktion verschiebt. Im Schnittpräparat fällt bei der Oxydasereaktion die grobe, blauschwarze Granulierung der Leukocyten ja ganz besonders auf, und man sollte eigentlich annehmen, daß eine stärkere Anhäufung der Zellen das Gesamtergebnis erheblich verändert müßte. Ich habe deshalb Vergleichsversuche mit Leichenorganen angesetzt, die darüber entscheiden sollten. Bei mehreren Fällen mit croupöser oder katarrhalischer Pneumonie eines Lappens wurde mit gleichen Gewichtsmengen normaler und pneumonisch veränderter Lungenteile die Oxydasereaktion angesetzt und die Ergebnisse unmittelbar miteinander verglichen. Dabei fand ich in 3 Fällen das gleiche Ergebnis, 2mal war in den Gläsern mit normalen Geweben die Farbbildung gegenüber den pneumonisch veränderten erhöht. Das Verhältnis war wie 1,5 : 1. Daß Leukocyten in großer Zahl vorhanden waren, zeigte die mikroskopische Untersuchung. Es bleibt also eigentlich gar nichts anderes übrig, als anzunehmen, daß mengenmäßig die Bildung

von Indophenolblau durch Leukocyten gar nicht größer ist als die durch andere Zellen. Wenn sie trotzdem so stark blaugekörnt in den Präparaten hervortreten, so kann das daran liegen, daß sie in besonders starkem Grade zur Farbstoffadsorption neigen, daß sie also den sonst in der Flüssigkeit gebildeten Farbstoff in besonders starkem Grade an sich ziehen. Jedenfalls können auch die „Leukocytenfehler“ nicht hoch angeschlagen werden.

So scheint also die chemische Methode für die Abschätzung der Gesamtmenge des gebildeten Farbstoffes, also der oxydativen Leistung, geeigneter zu sein als die morphologische. Daß sie durch die morphologische Reaktion am Schnittpräparat ergänzt werden muß, versteht sich von selbst. Und wenn diese mit der nötigen Vorsicht angewandt wird, und man nicht ohne weiteres aus dem Gehalt an Farbstoffkörnchen restlos glaubt, die Fermentkraft einer Zelle erschließen zu dürfen, so wird sie auch geeignet sein, lokalisatorisch das Gesamtergebnis der quantitativen Methode auszuwerten.

Warnen möchte ich noch vor zu weitgehenden Schlüssen, die aus Ergebnissen an Leichenmaterial gezogen werden. Mir scheint darin besonders *Katsunuma* etwas weit gegangen zu sein.

Ich habe recht viele Leichenorgane nach beiden Methoden auf Oxydasen untersucht und bin dabei zu so auffallend verschiedenen Ergebnissen gekommen, daß ich vorläufig das Leichenmaterial für ungeeignet halte. Es spielen sich nach dem Tode so mannigfaltige chemische Vorgänge in den Zellen ab, deren Bedeutung für den Ausfall der Oxydasereaktion gar nicht zu übersehen ist, daß ich glaube, man tut zunächst besser, nur mit frischem, eben getöteten oder gestorbenen Tieren entnommenem Material zu arbeiten.

II. Oxydasereaktion und Gewebsatmung, Vergleich der Ergebnisse.

Nach dieser Kritik der Methodik komme ich auf die Hauptfrage, die nach dem Zusammenhang zwischen *Zellfunktion* und *Oxydasereaktion*, zurück. Da die Oxydasereaktion ja in letzter Linie eine Gewebsatmung anzeigen soll, muß es bedeutungsvoll sein, die Ergebnisse der Oxydasereaktion mit denen zu vergleichen, die bei Untersuchungen der Gewebsatmung mit anderen Methoden gewonnen wurden.

Es wurde zunächst geprüft:

Wie verhält sich die Oxydasereaktion der einzelnen Organe desselben Tieres? Zeigen sie alle die gleiche Größe oder bestehen Unterschiede?

Mit Hilfe der Oxydasereaktion wurden untersucht Milz, Leber, Herz, Nieren von Mäusen. Stets zeigte die Milz die geringste Reaktion, dann folgten Leber, Herz, Nieren. In letzteren war (bei gleichen Gewichtsverhältnissen) die Reaktion meist am stärksten. Im einzelnen bestehen Unterschiede, wie aus folgender Tabelle hervorgeht. Die Oxy-

dasereaktion in der Milz ist jeweils (als die kleinste Größe) = 1 gesetzt. Die absoluten Werte sind bei den verschiedenen Tieren natürlich nicht gleich. Es soll hier nur untersucht werden, wie die Werte in den einzelnen Organen desselben Tieres sich zueinander verhalten.

Tabelle 1.

Oxydase-Reaktion mit verschiedenen Organen des gleichen Tieres.				
Nr.	Milz	Leber	Herz	Niere
1	1,0	3,6	4,0	4,3
2	1,0	4,0	4,0	6,0
3	1,0	3,0	3,6	4,0
4	1,0	3,2	5,4	5,8
5	1,0	3,5	5,6	6,0
6	1,0	1,7	3,5	2,4
7	1,0	3,8	5,0	4,0
8	1,0	3,3	2,8	6,0
9	1,0	4,0	6,5	5,8
10	1,0	3,0	7,8	9,5
Summa:	10,0	33,1	48,2	53,8
Durchschnitt:	1,0	3,3	4,8	5,4

Etwas anders sind die Zahlen, die sich aus Untersuchungen des menschlichen Leichenmaterials ergeben. Da die Ergebnisse im einzelnen aus früher angeführten Gründen recht verschieden ausfallen, möchte ich nur Durchschnittszahlen angeben. Sie sind (die Milz wiederum als 1,0 gerechnet):

Milz	1,0
Leber	1,25
Niere	1,5
Herz	3,4

Auffallend ist also zunächst, daß 1. im ganzen die Organe sich weniger unterscheiden als bei der Maus, und 2., daß der Herzmuskel die anderen Organe, selbst die Niere, um das Doppelte übertrifft, während bei der Maus die Niere das Organ mit der höchsten Fermentwirkung war.

Wie verhalten sich nun diesen Zahlen gegenüber die *Ergebnisse*, wie sie mit den *Methoden* nach Warburg und nach Lipschitz gewonnen wurden?

Warburg, Negelein und Posener geben für normale Rattenorgane an (Bacrost-Warburgsche Methode):

Milz	7	oder, die Milz = 1,0 gerechnet
Leber	11	Leber 1,6
Niere	20	Niere 2,9

Wels bekommt insofern etwas andere Ergebnisse, als in seinen Versuchen bei Meerschweinchen, Kaninchen und Schafen die Werte für Milz stets größer sind als die für Leber. Die Niere übertrifft beide.

Grafe endlich kam in seinen Versuchen mit der Warburgschen Methode zu dem eigenartigen Ergebnis, daß sich keinerlei wesentliche Unterschiede zwischen den einzelnen Organen des gleichen und denen ver-

schiedener Tiere fänden, ein Ergebnis, dem aber schon von verschiedener Seite widersprochen worden ist.

Die Ergebnisse mit der Methode von *Lipschitz* (M-Dinitrobenzol) sind ähnlich wie die eben angeführten. Ich gebe 3 Reihen wieder:

1. *Neuschloss* (normale Rattenorgane):

Milz	80	oder Milz	= 1,0
Leber	100	„ Leber	= 1,25
Herz	109	„ Herz	= 1,4
Niere	210	„ Niere	= 2,6

2. *Löhr* (Meerschweinchen):

Leber	23	= 2:3
Niere	36	

3. *Hess* (Taube):

Leber	15,5
Niere	23,2
Herz	2,7

Die Muskulatur, die bei der Oxydasereaktion ebenfalls hohe Werte zeigt, fand *Löhr* sogar nur mit 0,95 bis 1,9.

Also im ganzen ist ziemlich einheitlich die Atmung von Milz und Leber relativ klein, die der Nieren am größten. Auffallende Unterschiede finden sich beim Herzen. Besonders in den Versuchen von *Hess* fällt der Wert für den Herzmuskel so stark heraus, daß er gar nicht zu den entsprechenden Ergebnissen mit anderen Versuchsanordnungen stimmt. Wie die auffallend gleichförmigen Werte *Grafe*s herauskommen, ist auch nicht ohne weiteres zu sagen.

Wenn also im einzelnen noch ziemlich beträchtliche Unterschiede in den Ergebnissen der verschiedenen Untersucher bestehen, selbst dort, wo sie mit derselben Versuchsanordnung arbeiten, so stimmt doch die Mehrzahl der Werte ungefähr mit denen bei der Oxydasereaktion überein, so daß man wenigstens sagen kann, die *Oxydasereaktion mit den Organen des normalen, frisch getöteten Tieres, geht ungefähr den gefundenen Werten ihrer Gewebsatmung parallel*.

Anders werden die Verhältnisse, wenn wir den *Einfluß postmortaler Vorgänge* berücksichtigen.

Ich habe in einer früheren Untersuchung systematisch den Einfluß postmortaler Prozesse auf den quantitativen Ausfall der Oxydasereaktion geprüft. Auf Tab. 3—6 der früheren Arbeit sind die Ergebnisse dieser Versuche wiedergegeben. Die zeigten, daß allmählich zwar eine gewisse Herabsetzung der Indophenolblaubildung im Vergleich mit dem Gewebe des eben frisch getöteten Tieres eintrat, daß aber auch recht lange nach dem Tode noch eine deutliche Oxydasereaktion nachweisbar war. Auch unter aseptischen Bedingungen, wenn also eine Mitwirkung von bakteriellen Prozessen auszuschließen war, war noch nach 3, ja selbst

nach 10 Tagen eine deutliche Fermentwirkung festzustellen, die vielfach nur unwesentlich hinter der des frisch entnommenen Organs zurückblieb. In den ersten Stunden nach dem Tode war sogar hier und da eine deutliche Steigerung zu beobachten, wie sie auch *Katsunuma* festgestellt hat. Dies Ergebnis steht nun im deutlichen Widerspruch zu den Erfahrungen bei der Untersuchung der Gewebsatmung. Wenn hier auch exakte, zahlenmäßige Angaben über die Abnahme der Gewebsatmung nach dem Tode noch nicht vorliegen, so stimmen doch alle Untersucher darin überein, daß sehr bald nach Entnahme der Organteile aus dem Tierkörper oder nach dem Tode des Tieres die Gewebsatmung auf ein Mindestmaß zurückgeht (*Minami, Wels, Grafe, Lipschitz*). Ich habe schon damals aus diesem Gegensatz den Schluß gezogen, daß der *Ausfall der Oxydasereaktion nicht ohne weiteres als Maß für die Atemfähigkeit der Zellen angesehen werden kann*. Und es stimmt dieser Schluß zu der Bemerkung von *Gräff*, daß „*der Ausfall der Nadireaktion nicht an die Zeit des Fortbestehens einer Zellatmung geknüpft ist*“.

Es muß also zur Zellatmung noch etwas anderes gehören als Wirksamkeit der oxydierenden Fermente. Die Oxydasen erweisen sich gegenüber postmortalen Einflüssen als verhältnismäßig festgefügten, während der andere Faktor hinfälliger Natur sein muß. Diese gleiche Stabilität der Oxydasen zeigt sich auch in Versuchen, ihre Wirksamkeit künstlich zu steigern.

Auch darin habe ich in früheren Untersuchungen mannigfache Erfahrungen gesammelt und veröffentlicht.

Zunächst wurde der Einfluß des *Funktionszustandes* eines Organes auf den Ausfall der Oxydasereaktion geprüft. Es zeigte sich, daß die Leber während der Verdauung die gleiche Oxydasereaktion gab wie im Zustand des Hungers, ja sogar beim Hungertod des Tieres. Im Gegenatz dazu stellte *Barcroft* in der Leber eine 10fache Steigerung des Sauerstoffverbrauches bei der Verdauung fest.

Ebenso zeigt der Froschmuskel unter Strychninwirkung keine Steigerung der Oxydasereaktion gegenüber dem durch Curare gelähmten. Zu dem gleichen Ergebnisse ist *Katsunuma* mit der morphologischen Versuchsanordnung gekommen. Wie hoch der O_2 -Verbrauch des Gewebes unter den gleichen Bedingungen ist, darüber sind mir zwar genaue Angaben nicht gegenwärtig, aber daß er unter Strychninwirkung gesteigert, unter Curarewirkung herabgesetzt ist, darüber kann wohl kein Zweifel sein. Also auch hier sehen wir, daß *Gewebsatmung und Oxydasereaktion nicht gleich laufen*.

Versuche endlich, mit Hilfe chemischer Mittel die Oxydasereaktion zu steigern, sind fast restlos gescheitert. Die *Hormone*, von denen man am ehesten Ähnliches erwarten konnte, erwiesen sich sämtlich als unwirksam. Ich habe auch hierüber früher berichtet. Die Ergebnisse

stimmen zwar zu denen von *Grafe*, der auch eine Beeinflussung der Gewebsatmung durch Hormone vermißte (*Warburgsche Methode*), stehen aber doch im Gegensatz zu anderen Ergebnissen. So fand *Ahlgren* mit der *Methylenblau*-methode Steigerung der Gewebsatmung durch Adrenalin, Thyroxin, Pituitrin; *Adler* und *Lipschitz* sahen bei Benutzung des Dinitrobenzols Steigerung der Zelloxydationen durch Stoffe der Schilddrüse, Epithelkörperchen, Epiphyse und durch Adrenalin; Hemmung durch Thymus und Extrakt aus einem Nebennierenadenom. Ähnliches sah *Vollmer* an isolierten Kalbsdarmzellen. Insulin ist nach den verschiedensten Untersuchungen nicht geeignet, die Gewebsatmung anzuregen (s. *Born* und *Ivanovics*).

Immerhin zeigen diese Versuche mit Hormonen eine, wenn auch nicht starke, Beeinflußbarkeit der Gewebsatmung, während die Oxydasereaktion sich ganz refraktär verhält. Ganz ähnlich sind die Ergebnisse mit *Proteinkörpern*. Ich habe versucht, die Oxydation verschiedener Organe durch Milch, Caseosan, Novoprotin zu beeinflussen. Ob man nun die Substanz direkt dem Oxydasegemisch zusetzt oder dem lebenden Tier einspritzt und dann die Oxydasereaktion an den verschiedensten Organen prüft, niemals läßt sich eine irgendwie gleichmäßige Steigerung der Reaktion hervorrufen, während es doch nach den Untersuchungen von *H. Löhr*, *Gottschalk*, *Nakazava* und *Rondoni* mit den gleichen Mitteln gelingt, die Gewebsatmung im fördernden Sinne zu beeinflussen.

Dasselbe scheint auch aus einer neuen Arbeit von *E. Meyer* und *Reinhold* hervorzugehen. Sie prüften den Sauerstoffverbrauch der Gewebe am lebenden Tier oder Menschen auf spektroskopischem Wege und konnten ebenfalls eine deutliche Wirkung von unspezifischen Reizkörpern auf die Gewebsatmung feststellen. Auch bei Steigerung der Nierentätigkeit durch Kochsalz, Salicylsäure und Coffein läßt sich eine einigermaßen regelmäßige Steigerung der Oxydasetätigkeit nicht feststellen.

Fassen wir alle diese Ergebnisse zusammen, so sehen wir, daß die *Oxydasen* eine auffallende Konstanz ihrer Wirksamkeit zeigen und merkwürdig wenig zu beeinflussen sind, während doch die Gewebsatmung weitgehende Schwankungen, abhängig von äußeren Bedingungen, erkennen läßt.

Das einzige Mittel, mit dem es mir mit großer Regelmäßigkeit gelungen ist, eine Steigerung der Oxydasewirkung zu erzeugen, ist Lecithin, sei es, daß ich es in einer Emulsion mit verdünntem Methylalkohol verwandte, sei es, daß ich es unmittelbar dem Gemisch zusetzte. Es spielen da augenscheinlich gewisse Beziehungen zu Zellipoiden eine Rolle, auf die schon andere Umstände hinwiesen. Cholesterin zeigte keine Wirkung.

Unter den *Giften* rief am regelmäßigsten Blausäure schon bei stärkster Verdünnung eine Hemmung oder völlige Aufhebung der Oxydasereaktion hervor, wie das schon von den verschiedensten Untersuchern festgestellt worden ist. Auch Phosphor hemmte die Indophenolblaubildung stark.

Vergleichen wir nun noch einmal zusammenfassend Oxydasereaktion und Gewebsatmung, so laufen in mancher Beziehung wohl beide parallel, so in der Größenordnung, nach der sich die einzelnen Organe eines Tieres einreihen lassen, in ihrem Verhalten zu Blausäure, in ihrer Abhängigkeit von Temperatur, Wasserstoffzahl usw. In anderer Beziehung aber bestehen so starke Unterschiede, daß man Oxydasereaktion und Gewebsatmung nicht nur nicht gleichstellen darf, sondern sogar fragen muß, ob sie überhaupt etwas miteinander zu tun haben.

III. Ist die Oxydasereaktion eine Reaktion der lebenden Zellen?

Bevor wir nun zu der Frage Stellung nehmen, ob die Oxydasen eine Rolle bei der Gewebsatmung spielen und welches diese Rolle ist, müssen wir erst die andere beantworten:

Ist überhaupt die Oxydasereaktion eine „Lebensreaktion“? Spielt sie sich in der „lebenden“ oder „überlebenden“ Zelle ab?

Die Frage scheint ohne weiteres im bejahenden Sinne beantwortet werden zu müssen. Schon *Ehrlich* hat das Reaktionsgemisch lebenden Tieren eingespritzt und eine Indophenolblaubildung innerhalb des Tierkörpers festhalten können. Und umgekehrt wissen wir, daß Abtötung von Zellen durch Hitze, Formalin, Alkohol, Cyankali die Wirksamkeit der Oxydasen aufhebt, wenn auch neuere Untersuchungen von *Gräff* gezeigt haben, daß auch in Formalin fixiertes Material unter bestimmten Bedingungen die Oxydasereaktion geben kann.

Im allgemeinen ist jedenfalls die Ansicht vertreten, daß die Oxydasereaktion Zeichen für ein Überleben von Zellen ist.

Um die gestellte Frage zu entscheiden, mußten als Versuchsobjekte Zellen genommen werden, bei denen die Lebensfähigkeit durch ihre Beweglichkeit ohne weiteres ins Auge fiel. Ich habe deshalb diese Versuche mit *Protozoen* angestellt, die ich mir durch Heu- oder Blätteraufgüsse selbst züchtete. Da die Ergebnisse nicht ganz gleich waren, je nachdem, ob *Flagellaten* oder *Ciliaten* zu den Versuchen verwandt wurden, muß ich sie getrennt mitteilen.

Zunächst sei über die Versuche mit *Ciliaten* berichtet.

Die erste Frage ist: *Ist das Oxydasegemisch für Protozoen giftig?*

Die Versuche wurden so angesetzt, daß in den Ausschliff eines hohlgeschliffenen Objektträgers ein Tropfen der Ciliatenkultur gebracht, diesem ein Tropfen Oxydasegemisch in verschiedener Verdünnung zugefügt und der Objektträger ohne Deckglas in eine feuchte Kammer gelegt wird. So hat der Sauerstoff der Luft Zutritt, und das Präparat ist trotzdem vor dem Verdunsten geschützt.

Bei Zusatz von 1% Oxydasegemisch tritt sofort Stillstand der Protozoen ein. Daß dies den Tod der Ciliaten bedeutet, erkennt man daran, daß nach einiger Zeit Zerfall der Zellen sich einstellt.

Bei stärkerer Verdünnung ist die Zeit bis zur völligen Aufhebung der Bewegung etwas länger.

Bei 1:1000	ca. 10 Min.
„ 1:2000	„ 15 „
„ 1:4000	„ 40 „
„ 1:8000	„ 1 Stunde
„ 1:10000	„ 1,5 „

Erst bei Zusatz eines Oxydasegemisches von einer Verdünnung von 1 : 20 000 ist das Leben der Protozoen auch längere Zeit möglich. Ich habe Versuche gesehen, bei denen noch nach 12 Stunden alle Ciliaten flotte Bewegung zeigten und sich nicht wesentlich von solchen unterschieden, die in gewöhnlichem Leitungswasser gehalten wurden. Es sei dazu bemerkt, daß das Oxydasegemisch für diese Versuche mit Leitungswasser angesetzt werden muß. Destilliertes Wasser schädigt natürlich die Protozoen. Aber auch in Ringerscher Lösung gehen sie in kurzer Zeit zugrunde. Die physiologische Lösung für Ciliaten und Flagellaten ist eben das Leitungswasser.

Wir können also zunächst feststellen, daß das Oxydasegemisch in der gewöhnlich angewandten Verdünnung für Protozoen ein starkes Zellgift darstellt, das sie rasch tötet. Bei der Untersuchung, welche Komponente des Gemisches die giftige ist, zeigte sich, daß beide Substanzen die Protozoen schädigen. Es besteht zwischen beiden kein großer Unterschied. Immerhin schien das Dimethylparaphenyldiamin, das ich als Base verwandte, eine Kleinigkeit giftiger zu sein als *a*-Naphthol. Diese Giftigkeit des Oxydasegemisches gilt übrigens nicht nur für Protozoen. Auch Mäuse vertragen intraperitoneale Einspritzung des Oxydasegemisches nur in sehr kleinen Gaben.

Wie verläuft nun unter diesen Versuchsbedingungen bei Protozoen die Oxydasereaktion, die ich hier übrigens, dem Objekt entsprechend, unter dem Mikroskop, also rein morphologisch beobachtete?

Bei Anwendung einer 1proz. Lösung tritt sie am schnellsten ein. In wenigen Minuten treten in den bewegungslos daliegenden Zellkörpern stark blaugefärbte Körnchen auf, deren Farbe eine solche Stärke annimmt, wie man sie bei stärkerer Verdünnung des Gemisches sonst nicht beobachtet. Nach einiger Zeit sieht man die Zellen zerfallen, die Körnchen sich in die Umgebung ausstreuen und hier oft noch lange liegenbleiben, so daß ein Körnerhaufen noch eine Weile die Stelle angibt, wo ein Protozoon gelegen hat.

Bei der stärksten Verdünnung, die ich anwandte, 1 : 20 000, bleibt die Bewegung, wie erwähnt, viele Stunden erhalten. Eine Oxydasereaktion ließ sich dabei in den Ciliaten nicht feststellen.

Dagegen war diese bei 1 : 10 000 noch deutlich zu beobachten. Hier zeigte sich nun ein sehr lehrreiches Bild. Zunächst war die Bewegung

der Ciliaten noch sehr lebhaft: kein Indophenolblaukörnchen im Protoplasma. Dann fing die Bewegung an nachzulassen, wurde ungeordnet, langsam, drehend. Gleichzeitig begannen die blauen Körnchen im Protoplasma aufzutreten. Die Granulierung nimmt zu, während allmählich die Bewegung ganz aufhört, und gewinnt noch an den völlig stillstehenden Tieren deutlich an Stärke.

Von 2 gleichzeitig mit 1 Tropfen einer Lösung 1 : 10 000 beschickten Präparaten hört in dem einen die Bewegung eher auf als in dem anderen. In dem ersten ist auch die Granulierung viel eher zu beobachten und erreicht früher hohe Grade.

Setzt man nebeneinander mehrere Versuche mit verschiedenen Konzentrationen zwischen 1 : 1000 und 1 : 10 000 an, so läßt sich deutlich sehen, daß jeweils bald nach dem Auftreten der ersten blauen Körnchen im Protoplasma die Bewegungen nachlassen und die volle Ausbildung der Oxydasereaktion mit dem Zelltod einhergeht.

Noch eindeutiger waren die Versuche mit *Flagellaten*, die übrigens gegen das Oxydasegemisch noch empfindlicher waren, so daß sie schon bei Verdünnungen von 1 : 20 000 in einigen Minuten starben. Hier ist nun zunächst zu bemerken, daß diese Verdünnung des Gemisches, die bei den Ciliaten nicht zu einer Indophenolblaubildung in den Zellen führte, bei den Flagellaten deutliche blaue Körnchen im Protoplasma erkennen ließ. Wenn also bei den Ciliaten eine Verdünnung von 1 : 20 000 keinen Erfolg gehabt hat, so liegt das augenscheinlich nicht daran, daß die Konzentration zu gering war, um schon eine mikroskopisch wahrnehmbare Wirkung zu erzeugen, sondern an der größeren oder kleineren Empfindlichkeit der Protozoen.

Vor allem ließen aber die Versuche mit Flagellaten bei den verschiedensten Konzentrationen eine andere Tatsache deutlich erkennen. Vielfach hören die Bewegungen der Protozoen nicht bei allen Tieren gleichzeitig auf, sondern einzelne standen schon still, während andere noch munter in der Flüssigkeit herumschwammen. Dabei ließ sich nun regelmäßig erkennen, daß die stillstehenden Flagellaten eine stärkere Oxydasereaktion geben als die bewegten. Wäre Oxydasereaktion gleich Gewebsatmung, so sollte man gerade das Gegenteil erwarten.

Aus allen diesen Tatsachen geht wohl das eine mit Sicherheit hervor: *Die Oxydasereaktion ist (wenn wir die Ergebnisse bei den Protozoen verallgemeinern dürfen) keine Reaktion der lebenden Zellen, sondern tritt erst beim Absterben oder nach dem Tode der Zellen auf. Man könnte sie eher als eine „Sterbereaktion“ bezeichnen.*

Zum Zustandekommen der Oxydasereaktion müssen, das können wir wohl mit Sicherheit annehmen, zwei Bedingungen erfüllt werden:

1. muß das Oxydasegemisch in das Innere der Zelle eindringen können und 2. muß es im Protoplasma mit einem Katalysator zusammentreffen, der den Oxydationsprozeß auslöst.

Die Reaktion findet nur bei einer Konzentration statt, die eine gewisse Schädigung der Zellen herbeiführt. Es liegt nahe, anzunehmen, daß diese Schädigung erst das Eindringen der Substanzen in die Zellen ermöglicht, daß es also vornehmlich eine Schädigung der Zellmembran ist. Oder aber das eindringende Oxydasegemisch führt zu gewissen Protoplasmaveränderungen im Innern des Zelleibes, die notwendig sind, um eine Berührung zwischen Katalysator und Reaktionsgemisch zu ermöglichen. Wie dem auch sei, die Tatsache steht fest, daß die Indophenolblaubildung nicht eine Reaktion der gesunden, sondern der sterbenden oder toten Zelle ist.

Hat sie, wenn das richtig ist, überhaupt noch einen Wert? Kann sie noch irgendwelchen Schlüssen auf Lebensfähigkeit, Funktion oder Stoffwechsel der Zelle zur Grundlage dienen? Es möchte scheinen, als ob mit der Feststellung der Zellschädigung bei der Oxydasereaktion nunmehr jeglichen Folgerungen auf die Zellfunktion die Grundlagen fehlen. Denn es galt gerade als ein besonderer Vorzug der Oxydasereaktion, daß sie eben eine vitale Reaktion der Zelle sei.

Und doch braucht die Oxydasereaktion deshalb nicht wertlos zu werden. Auch die meisten anderen chemischen und histologischen Methoden arbeiten ja mit geschädigten oder meist völlig abgetöteten Zellen und gestatten trotzdem hin und wieder, aus der Art der Reaktion des toten Protoplasmas Schlüsse auf dessen Funktionszustand während des Lebens zu ziehen.

IV. Oxydasereaktion und Zellschädigung.

Es erwächst nunmehr aber die Aufgabe, zu prüfen, ob die auf andere Weise geschädigte Zelle auch im Ausfall der Oxydasereaktion Abweichungen zeigt. Daß dies unter Umständen der Fall ist, ist aus früheren Untersuchungen zur Genüge bekannt. Die Cyankalivergiftung führt zum Zelltod und geht gleichzeitig mit Aufhebung der Oxydasereaktion einher. Dieselbe Beobachtung haben wir bei Phosphorvergiftung gemacht. Stärkere Erwärmung hat die gleiche Wirkung. Es gibt also zweifellos Zellschädigungen, die sich im Ausfall der Oxydasereaktion erkennen lassen, schon zu einer Zeit, wo sonstige morphologische Zellveränderungen noch fehlen.

Aber die Fragestellung ist eine andere. Sie muß heißen: Ist jede Zellschädigung mit einer Veränderung der Oxydasereaktion verbunden? Nur wenn diese Frage bejaht werden kann, können wir aus dem normalen Ausfall der Oxydasereaktion schließen, daß die Zelle gesund und funktionsfähig ist. Nur dann läßt der abweichende Ausfall der Oxydasereaktion weitgehende Schlüsse auf herabgesetzten oder gesteigerten oder aber normalen Stoffwechsel der Zelle zu. Auch diese Frage mußte sich am besten an Protozoen entscheiden lassen, bei denen die Beobachtung

der Bewegung am ehesten Schlüsse auf Zellschädigung und Tod der einzelnen gestattet.

Ich führe einige Beispiele an:

1. Sublimat. Ciliatenkultur mit lebhafter Bewegung. 1 Tropfen in hohlgeschliffenen Objektträger, Zusatz von Sublimatlösungen in verschiedenen Konzentrationen; Beobachtung des Einflusses der Lösung auf die Beweglichkeit der Protozoen. Dann Zusatz 1 Tropfens Oxydasegemisch in beliebiger Konzentration.

- a) Subl. 0,1/100 1 Tropfen: Sofortiger Stillstand der Protozoen. Oxydasereaktion negativ.
- b) Subl. 0,01/100 1 Tropfen: Sofortiger Stillstand, Oxydasereaktion fast negativ.
- c) Subl. 0,002/100 1 Tropfen: Sofortiger Stillstand. Oxydasereaktion geringer als in Kontrolle, aber positiv.
- d) Subl. 0,0001/100 1 Tropfen: Fast sofortiger Stillstand. Oxydasereaktion ebenso stark wie in Kontrolle.
- e) Subl. 0,00001/100 1 Tropfen: Bewegung verlangsamt. Oxydasereaktion ebenso stark wie in Kontrolle.
- f) Subl. 0,000001/100 1 Tropfen: Kein Einfluß auf Bewegung. Oxydasereaktion ebenso stark wie Kontrolle.

In diesen Versuchen ist also bei d und e schon eine deutliche Schädigung der Protozoen in ihrer Beweglichkeit nachweisbar, ohne daß sich diese Schädigung im Ausfall der Oxydasereaktion erkennen läßt.

2. Alkohol. Dieselbe Versuchsanordnung.

- a) 20 proz., 1 Tropfen: Sofortiger Stillstand. Oxydasereaktion ebenso stark wie in Kontrolle.
- b) 50 proz.: Dasselbe.
- c) 75 proz.: Sofortiger Stillstand. Oxydasereaktion gehemmt, aber nicht aufgehoben.
- d) 96 proz.: Sofortiger Stillstand. Aufhebung der Oxydasereaktion.

Auch hier erweist sich die Hemmung der Beweglichkeit als feineres Reagens als der Ausfall der Oxydasereaktion.

3. Formalin.

Hier geht die Hemmung der Beweglichkeit (Grenzwert ungefähr bei 1 : 5000) etwa der Hemmung der Oxydasereaktion parallel. Allerdings läßt sich auch hier an Ciliaten, die schon bewegungslos sind, noch eine deutliche, wenn auch etwas abgeschwächte Oxydasereaktion erzielen.

Die Anführung dieser 3 Versuchsreihen mag genügen. Sie beweisen, daß man aus dem normalen Ausfall der Oxydasereaktion nicht ohne weiteres schließen darf, daß die Zellen gesund, ungeschädigt sind.

Der folgende Versuch läßt den Wert der Oxydasereaktion noch zweifelhafter erscheinen.

Es wird je ein Tropfen einer Flagellatenkultur in zwei hohlgeschliffene Objektträger gebracht. Der eine Objektträger wird leicht erwärmt, bis die Beweglichkeit der (gegen Wärme sehr empfindlichen) Flagellaten eben aufgehoben ist.

Dann wird nach Erkalten des Objektträgers gleichzeitig zu beiden Präparaten ein Tropfen Oxydasegemisch 1 : 5000 zugesetzt. Der Erfolg war der folgende:

Zeit in Min.	Erwärmte Kultur unbeweglich	Normale Kultur
3	Auftreten der ersten blauen Granula	Flagellaten beweglich ohne Oxydasereaktion
5	deutliche Granula	die meisten Flagellaten beweglich ohne Granula; einzelne unbeweglich gekörnt
10	alle Flagellaten tiefblau gekörnt	Ein Teil gut beweglich ohne Körnelung, der Rest tot, granuliert
20	die Flagellaten zerfallen, freie Körnchenhaufen	Alles tot, teils starke Oxydasereaktion, teils noch schwach gekörnt.

In diesem Versuche verlief die Oxydasereaktion bei der normalen Kultur, wie stets, so, daß die Körnelung mit Beginn der Zellschädigung durch das Oxydasegemisch auftrat. In der erwärmten, also deutlich geschädigten Kultur trat die Oxydasereaktion eher auf und erreichte viel früher höhere Grade. Hier war augenscheinlich die Zellschädigung so stark, daß sie das Eindringen des Oxydasegemisches erleichterte, aber noch nicht stark genug, um den katalysatorischen Prozeß zu verhindern. Wird die Erwärmung stärker getrieben, so ist die Oxydasereaktion negativ, wie man das ja auch an jedem Gewebe warmblütiger Tiere beobachten kann.

In diesem Falle war also die *Oxydasereaktion der geschädigten Zellen stärker als die der normalen*. Daß hier eine gesteigerte Zellatmung vorliegt, ist wohl sicher auszuschließen. Am ehesten möchte ich annehmen, daß Membranveränderungen das Eindringen des Oxydasegemisches in die Zelle erleichtert haben.

Jedenfalls scheint mir die Beobachtung deshalb wichtig zu sein, weil sie beweist, daß *auch aus der verstärkten Oxydasereaktion nicht auf eine Steigerung der Zellaktivität, auf Erhöhung des Stoffwechsels ohne weiteres geschlossen werden darf*, sondern daß man immer daran denken muß, daß bei unveränderten (nicht geschädigten) Katalysatoren eine gesteigerte Durchlässigkeit der Zellmembran evtl. imstande ist, den Ausfall der Oxydasereaktion im Sinne einer Steigerung zu beeinflussen. Das bedeutet natürlich nicht, daß Verstärkung der Oxydasereaktion nicht auch Zeichen einer Stoffwechselsteigerung sein kann. Aber sie beweist eine solche nicht.

Auf Grund der Ergebnisse der eben mitgeteilten Versuche möchte ich glauben, daß manche der Schlußfolgerungen, die aus dem Ausfall der Oxydasereaktion auf Stoffwechselveränderungen gezogen worden sind, keine bindende Kraft haben. Und ich muß mich selbst schuldig bekennen, der Überlieferung gemäß derartige Schlüsse gezogen zu haben.

Wenn ich auch die zahlenmäßigen Ergebnisse meiner Untersuchungen über den Ausfall der Oxydasereaktion am kranken Organ (Niere bei Sublimat- und Chromvergiftung, Leber bei septischer Allgemeininfektion) aufrechterhalten kann, so sind die dort angedeuteten Schlußfolgerungen auf Stoffwechselsteigerungen insofern nicht bindend, als eben z. B. Zellmembran- oder Protoplasmaveränderungen mehr degenerativer Natur das Eindringen des Oxydasegemisches in die Zellen erleichtert und dadurch allein zu einer Verstärkung der Oxydasereaktion geführt haben können.

Ob umgekehrt auch eine Abschwächung der Oxydasereaktion bei unveränderter Zellfunktion und normalem Stoffwechsel vorkommt, kann ich vorläufig nicht sagen. Zunächst möchte es mir scheinen, als ob eine *Verminderung der Oxydasereaktion eher Schlüsse auf eine Zellschädigung zuläßt.*

V. Die Bedeutung der Oxydasen für die Zellatmung.

Fragen wir zuletzt, welche Stoffe es sind, die die Oxydasen in den Zellen schädigen, so sind es in erster Linie solche, die zu Gerinnungen des Protoplasmas oder zu Eiweißfällung führen. So hemmt Formalin schon in starker Verdünnung die Indophenolblaubildung, etwa in gleicher Konzentration, in der es auf die Beweglichkeit der Protozoen noch schädigend einwirkt; auch Sublimat wirkt schon bei starker Verdünnung. Geringe Erwärmung ist wirkungslos, stärkere hebt die Oxydasereaktion auf.

Alkohol wirkt auf die Beweglichkeit der Zellen eher als auf die oxydierenden Fermente. Erst bei 75% ist eine deutliche Hemmung nachzuweisen. Es wäre denkbar, daß hierin eine Einwirkung auf Zelllipide zum Ausdruck kommt. Für die Bedeutung von Lipoidsubstanzen könnte auch die Tatsache sprechen, daß Lecithinzusatz die Oxydasereaktion verstärkt.

Es scheint also zur Wirksamkeit der Oxydasen erforderlich zu sein, daß die innere Zellstruktur erhalten ist, daß im besonderen Gerinnungsvorgänge fehlen, die Zellipoide keine groben Veränderungen zeigen, die Zellmembran eine bestimmte Durchlässigkeit hat.

Gegenüber den erwähnten Substanzen, die wohl eine Allgemeinwirkung auf das Zellprotoplasma haben, steht das Cyankali, das anscheinend ein mehr spezifisches Gift für die Oxydasen darstellt.

Nun wissen wir aus den Untersuchungen von Warburg, daß es keinen Stoff außer dem Eisen gibt, der die beiden Eigenschaften hat, Sauerstoff zu übertragen und mit HCN zu reagieren. Durch vergleichende Messungen hat Gräff festgestellt, daß die Indophenolblausynthese bei gleicher Konzentration des HCN gehemmt wird wie die Zellatmung, und er zieht daraus den Schluß, daß die Oxydasen mit dem Warburgschen Eisenkatalysator übereinstimmend sind. Die Oxydasereaktion wäre danach

also eine besondere Form der Eisenkatalyse, gewissermaßen ein Modellversuch auf die Wirksamkeit des Atmungseisens in den Zellen. Diese Aufassung ist wohl allgemein anerkannt und wird auch von *Oppenheimer* in seinem Handbuche der Fermente angenommen. Wenn *Oppenheimer* in ihm (S. 1254) sagt: *Die Zellatmung wird durch HCN deshalb ausgeschaltet, weil die Eisenkatalyse ausgeschaltet wird*, so könnte man in unserem Falle für Zellatmung Indophenolblaubildung sagen.

Außer der intakten Protoplasmastruktur und der Permeabilität der Zellmembran spielt also der Zustand des Eisenkatalysators für die Oxydasereaktion die entscheidende Rolle. Vielleicht beruht sogar der hemmende Einfluß der anderen Substanzen darauf, daß durch Einwirkung auf Zelleiweiß oder Lipoide auch der Fe-Katalysator irgendwie in Mitleidenschaft gezogen wird.

Jedenfalls wird uns ein normaler Ausfall der Oxydasereaktion anzeigen, daß der Eisenkatalysator der Zelle erhalten und funktionsfähig ist.

Überblicken wir jetzt kurz die Tatsachen, die sich im vorhergehenden ergeben haben:

1. Die Oxydasereaktion ist keine „Lebensreaktion“, sondern eine Reaktion der sterbenden oder toten Zelle.
2. Auch Zellen, die vorher durch andere Stoffe oder Eingriffe (Wärme) in ihrer Lebensfähigkeit geschädigt waren, können normale oder sogar gesteigerte Oxydasereaktion zeigen.
3. Die Oxydasereaktion ist nach dem Tode noch positiv, wenn die Zellatmung längst erloschen ist.
4. Die Oxydasereaktion ist eine Oxydation durch intracelluläres katalytisch wirkendes Eisen.

Aus dem Vergleich der 4 Thesen ergibt sich ohne weiteres, daß Zellatmung und Eisenkatalyse nicht dasselbe sein können. Und hierin scheint ein neuer Beweis für die Auffassung zu liegen, daß die Sauerstoffaktivierung (die Funktion des Eisenkatalysators) zur Zellatmung noch nicht ausreicht, sondern daß noch eine andere Komponente dazu gehört. Und diese Komponente wird vermutlich die Aktivierung des Wasserstoffes im Sinne von *Wieland* sein (eine Funktion von sog. Dehydrasen).

Es ist in der letzten Zeit mehrfach die Ansicht ausgesprochen worden, daß für die Oxydationsvorgänge in der Zelle sowohl eine Aktivierung des Sauerstoffes, wie eine solche des Wasserstoffes notwendig ist (*Szent Györgyi*). *Oppenheimer* hat auf Grund dieser Anschauungen die beiden Haupttheorien vom Wesen der Zellatmung von *Warburg* und *Wieland* zu einem System vereinigt, das sich kurz folgendermaßen wiedergeben läßt.

Die Zellatmung zerfällt in 2 Akte, die beide durch Fermente beherrscht werden.

Der 1. Akt besteht in einer Aktivierung und Mobilisierung des Wasserstoffes durch sog. Dehydrasen. Der Wasserstoff wird aus dem Molekül herausgenommen. Damit ist das Molekül oxydiert (eigentlich dehydriert).

Der 2. Akt besteht in einer Aktivierung des freien Sauerstoffes (durch Oxydasen), die wahrscheinlich eine Bildung von Peroxyden durch Eisenkatalyse ist. Nunmehr kann der aktive Sauerstoff zum Acceptor für den aktivierte Wasserstoff werden, und damit ist der Oxydationsprozeß abgeschlossen.

Die Aktivierung des Sauerstoffes ist durch HCN zu hemmen, die Aktivierung des Wasserstoffes nicht.

Beide Teile des Atmungsvorganges in der Zelle können nun unabhängig voneinander durch Farbreaktionen studiert werden.

Zum Studium des Dehydrierungsprozesses (Akt 1) dienen 2 Methoden, bei denen Zellen in Substanzen atmen, die als Wasserstoffacceptoren geeignet sind: Das sind vor allem Methylenblau und Dinitrobenzol oder Nitroanthrachinon. Diese Reaktionen sind durch HCN nicht oder wenig zu beeinflussen.

Zum Studium des Oxydationsprozesses (Akt 2) dient die Indophenolblausynthese (Oxydasereaktion).

Beide Reaktionen sagen einzeln nichts über die Atemfähigkeit der Zelle aus. In der Zelle müssen beide Fermentprozesse einander parallel laufen. Ist einer ausgeschaltet, so ist die Zellatmung zu Ende, auch wenn der andere noch funktionsfähig ist. Das zeigt sich ja am besten am HCN, das nur auf den 2. Akt wirkt und doch die ganze Atmung unterbricht.

Aber ebenso können wir uns vorstellen, daß die Dehydrasen durch irgendwelche Vorgänge geschädigt werden, zu einer Zeit, wo die Oxydasen noch funktionsfähig sind. Dann ist ebenfalls die Zellatmung zu Ende, die Oxydasereaktion aber gibt normale Werte. Und das kann anscheinend besonders leicht durch postmortale Einflüsse hervorgerufen werden. Wir müssen annehmen, daß die Dehydrasen gegen sie viel empfindlicher sind als die Oxydasen. Und so erklärt sich, daß Zellatmung und Oxydasereaktion nicht parallel laufen. Viele der vorher erwähnten Unstimmigkeiten können einfach dadurch bedingt sein, daß die Dehydrasen gegen manche Gifte empfindlicher sind als die Oxydasen.

Den eigentlichen Aufschluß über die Gesamtzellatmung gibt immer die Messung der Sauerstoffzehrung nach der Barcroft-Warburgschen Methode.

Gibt diese verminderte Werte an, so kann das auf einer Schädigung eines der beiden Atemfermente beruhen. Die Oxydasen können mit Hilfe der Indophenolblausynthese, die Dehydrasen mit der Methode von Lipschitz oder Bieling getrennt voneinander geprüft werden.

Bei ungewöhnlich erhöhter Gewebsatmung müssen beide Fermente beteiligt sein.

Eine gesteigerte Oxydasereaktion besagt für den Zellstoffwechsel nur etwas, wenn sich zugleich wirklich eine Erhöhung der Gewebsatmung nachweisen läßt. Sonst kann sie durch andere Einflüsse (erhöhte Durchlässigkeit der Zellmembran usw.) bedingt sein. Eine herabgesetzte Oxydasereaktion läßt anscheinend eher Schlüsse auf eine gestörte Gewebsatmung zu.

Es läßt sich somit der Satz von *Gräff*, daß die Nadireaktion einen sichereren Aufschluß gibt über die oxydative Leistungsfähigkeit der lebenden Zelle, nicht aufrechterhalten.

Literaturverzeichnis.

Gräff, Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **70**. 1922. — *Katsunuma*, Intracelluläre Oxydation und Indophenolblausynthese. Jena 1924. — *Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen. Leipzig 1926. — *Staemmler* und *Sanders*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **256**. 1925. — *Staemmler*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **259**. 1925; Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **115**. 1926. In diesen Arbeiten ist auch das andere Schrifttum angegeben. — *Meyer, E.* und *Reinhold*, Klin. Wochenschr. 1926.
