

(Staatliche Landesstelle für öffentliche Gesundheitspflege.)

Versuche mit Naphtholoxonen.

Von

Dr. W. Loele, Dresden.

Mit 2 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 26. Dezember 1932.)

Bringt man zwei verschiedene Peroxydasen A und B in eine durch Kochsalz geklärte wässrige α -Naphthollösung, so läßt sich für die Reaktion, wenn man als X-Werte steigende Mengen H_2O_2 , als Y-Werte die

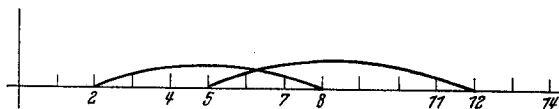


Abb. 1.

Stärke der Farbreaktion in der Zeiteinheit einsetzt, etwa das folgende Bild feststellen (Abb. 1).

Die Reaktionsbreite der einen Peroxydase geht von 2 bis 8, die der zweiten von 5 bis 12. Es sind demnach folgende Fälle möglich:

H_2O_2 -Wert = 1 A und B unwirksam
4 A +, B —
7 A +, B +
11 A —, B +
14 A und B negativ.

Außer von der H_2O_2 -Menge hängt der Ausfall der Reaktion noch ab von der Zeit und von der Temperatur. Von der Zeit in doppelter Hinsicht. Einmal wird bei niedrigen H_2O_2 -Werten die Farbreaktion mit der Zeit stärker, andererseits wird durch H_2O_2 die Peroxydase mit der Zeit zerstört und der gebildete Farbstoff wieder entfärbt. Die Temperatur hat insofern Einfluß, als bis zu einem bestimmten Temperaturgrad die Schnelligkeit des Eintretens der Reaktion mit Zunahme der Temperatur steigt.

Um diese gesetzmäßigen Vorgänge zu zeigen, sind als Material geeignet die Tränendrüse des Rindes, die verschiedene Peroxydasen besitzt oder menschliches Gewebe mit zahlreichen Eiterzellen. Der Einfluß der Zeit ist festzustellen an Keimblättern von Sonnenblumensamen, sobald Gefäße und Oberflächenzellen Peroxydasen enthalten, der Einfluß der Temperatur an Lösungen von Hammelblutkörperchen.

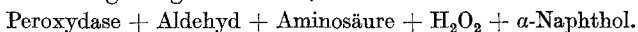
Bringt man Gefrierschnitte der Tränendrüse des Rindes in α -Naphthol-lösung und setzt wenig H_2O_2 zu, so färben sich nur die Granula der Drüsenepithelien violett, steigert man den H_2O_2 -Satz, dann färben sich noch die roten Blutkörperchen dunkelviolett, geht man noch höher, dann bleiben die Granula der Drüsenzellen ungefärbt. Die H_2O_2 -Werte sind somit für beide Peroxydasen verschieden. Im menschlichen Gewebe entspricht die Reaktion der Leukocytengranula der ersten, die der roten Blutkörperchen der zweiten Kurve. Untersucht man Gefrierschnitte des Keimblattes der Sonnenblume auf Naphtholperoxydasen, so überrascht es, wie schnell eine stark eintretende Färbung oft in wenigen Minuten wieder abbläßt. Den Temperaturversuch kann man so ausführen, daß man zu einem Gemisch von Hammelblutlösung und α -Naphthollösung die gleichen Mengen H_2O_2 gibt und das Eintreten der Reaktion bei verschiedenen Temperaturen beobachtet (Eis, Zimmertemperatur, Brutschrank). Man kann das System durch Herabsetzung der H_2O_2 -Mengen so einstellen, daß die Reaktion auch bei höheren Temperaturen langsam genug eintritt, um eine Beobachtung zu ermöglichen.

Es aktiviert also nicht schlechthin die Peroxydase das Wasserstoff-superoxyd, sondern die Reaktion tritt erst dann ein, wenn in der Reihe (System):



die einzelnen Glieder (Faktoren) in bestimmten Mengen anwesend sind. Jede Beeinflussung dieser Reihe verändert den Ausfall der Peroxydase-reaktion. So kann man die Kurve nach dem Nullpunkt verschieben, wenn man Formaldehyd zusetzt, obwohl Aldehyd allein zunächst keinen sichtbaren Einfluß auf die Oxydation der Naphthollösung ausübt. Der folgende Versuch ist zur Darstellung dieser Erscheinung geeignet. Man gibt zu einer Auflösung von menschlichen roten Blutkörperchen (0,5 ccm: 50,0 ccm Aq. dest.) verschiedene Mengen Aldehyd und die gleichen Mengen H_2O_2 . Es tritt dann kräftige Farbreaktion ein, wo die Blutlösung allein noch keine Reaktion gibt.

Weiter kann die Empfindlichkeit der Reaktion noch durch Zusatz von Aminosäuren gesteigert werden, so daß die Reihe nunmehr lautet:



Die beiden Faktoren NH_2COOH und $-COH$ findet man wieder in der Naphtholoxydase.

Legt man einen Schnitt der Tränendrüse des Rindes in eine alkalische α -Naphthollösung, so tritt keine Farbreaktion ein. Es scheint demnach hier die Oxydase mit der Peroxydase nicht zu tun zu haben. Nun läßt sich aber folgendes feststellen:

1. Naphtholoxydasen sind gleichzeitig Peroxydasen.
2. Geben die Zellen eines Organes eine Peroxydasereaktion, so findet man meist bei verwandten Tieren im gleichen Organ auch Oxydase-reaktion. Beide Reaktionen sind somit wahrscheinlich verwandt.

3. Wenn der Oxydaseträger autolytisch sich zersetzt, so bleibt die Peroxydase länger erhalten als die Oxydase.

4. Wenn pathologischerweise Naphtholoxone auftreten, erscheint die Peroxydase vor der Oxydase.

5. Man kann gelöste Peroxydasen durch Zugabe von Faktoren in Mengen, die an sich keine Naphtholoxidasereaktion geben, in Naphtholoxidasen verwandeln.

Als Beispiele dieser 5 Punkte sind für die folgenden Versuche als Material geeignet:

Zu 1. Gefrierschnitte durch hyperplastische Gaumenmandeln oder Wurmfortsätze (eosinophile und neutrophile Leukocyten). Die in zoologischen Geschäften leicht erhaltbare Teichschnecke *Limnaea* (Becherzellen der Haut). Wurzeln keimender Maispflanzen. Man bringt die Schnitte oder die unfixierten Pflanzen zum Teil in eine alkalische Naphthollösung, zum Teil in eine α -Naphtholkoohsalzlösung mit H_2O_2 . Wenn die Naphtholkoohsalzlösung noch trübe ist, so kann man sie klären durch Kochsalzzusatz und nachträgliche entsprechende Verdünnung. In den tierischen Gewebsschnitten decken sich beide Reaktionen, bei der Pflanze wird durch die Peroxydasereaktion mehr dargestellt als durch die Oxydasereaktion.

Zu 2. Positive Oxydasereaktion geben die Parotis des Menschen und die Submaxillaris des Schweines. Die Luftröhre der Ziege gab nur Peroxydase-, die des Schafes auch Oxydasereaktion (Deckzellen).

Zu 3. Die Oxydase der Bronchien des Schafes schwindet bei entzündlichen Vorgängen der Lunge und nach längerem Aufenthalt in Formollösung, während die Peroxydase nicht angegriffen ist.

Zu 4. Man läßt Mandelsamen keimen und überzeugt sich, daß nur die Indophenolreaktion positiv in den Gefäßbündeln und Oberflächenzellen ausfällt. Dann verletzt man die Oberfläche und untersucht von Zeit zu Zeit auf Naphtholoxone.

Zu 5. Man macht zunächst folgenden Vorversuch:

α -Naphthollösung (0,5 g + 100 cem 1% KOH) . . .	0,5 cem
Glykokoll (2%) + Formol (2%) ää	0,1 „
	0,2 „
	0,3 „
	0,4 „
	0,5 „
Eisenchlorid (1 : 100).	0,1 „

Man findet: 0,1 negative, 0,3 langsam eintretende schwach positive, 0,5 stark positive Naphtholreaktion.

Gibt man in jedes Gläschen vor dem Eisenzusatz 0,5 cem Kochsalzlösung, so ändert sich nichts, enthält aber die Kochsalzlösung bestimmte Mengen Aminosäuren oder Aldehyd, dann tritt Farbreaktion ein. Wie derartige Kochsalzlösungen mit Zusatz von Aminosäuren oder Aldehyd wirken nun peroxydasehaltige Auszüge aus Pflanzen (Kartoffel, Rettich, Rüben, Spargel).

Es sind nicht immer Aminosäuren oder Aldehyde, welche diese Verstärkung verursachen. Nimmt man in dem Versuche mit 0,1 Gemisch 0,5 cem 1%ige Rhodanammoniumlösung, so wird die Reaktion ebenfalls positiv. Das Wirksame ist auch hier die NH_2 -Gruppe, da mit dem Kalisalz keine Färbung eintritt. Auch Chromogene können als Verstärker dienen.

Die drei wichtigsten Faktoren der Naphtholoxydase sind Aminosäure, Aldehyd und Eisen. Bei dem Zusammentreten dieser drei Stoffe bilden sich komplexe labile fermentartige Verbindungen, in denen das Eisen teilweise nicht ionisiert, sich dem direkten Nachweis entzieht. Das, was entsteht, kann als ein chemisches Individuum bezeichnet werden.

Die naphtholoxydasehaltige Zelle ist demnach nicht der Ausdruck für die Bildung geheimnisvoller Stoffe, die in anderen Zellen nicht vorkommen, sondern nur der Ausdruck einer bestimmten Plasmamischung, eines bestimmten Ab- oder Aufbauzustandes, der in jeder Zelle möglich ist. In der tierischen Zelle ist das Auftreten der Naphtholoxydase wohl meist die Folge eines Kern und Kernkörperchenabbaues, in der pflanzlichen Zelle häufiger die Folge der assimilatorischen Vorgänge, da die Pflanze Aminosäure und Aldehyd aus chemischen Grundstoffen aufzubauen vermag. Aber auch bei der keimenden Pflanze entstehen die ersten Naphtholoxone durch Abbau, durch autolytischen Zerfall der Eiweiß- und Stärkevorräte, wobei Aminosäuren, Aldehyd und Eisen frei werden. Positive Naphtholreaktion ist da zu erwarten, wo die Reservevorräte zuerst zerfallen, in den Gefäßen und den Randzellen, wie es tatsächlich auch beobachtet wird. Daß bei der Lösung von Stärke Aldehyde frei werden, kann man im Reagensglase zeigen, wenn man einen 5%igen Kartoffelstärkekleister mit Eisenchlorid und H_2O_2 löst. Gibt man zu 50,0 ccm Kleister 0,5 ccm Eisenchlorid und 30 ccm einer 3%igen H_2O_2 -Lösung, so färbt sich die Stärke zunächst braunviolett, dann beginnt sie nach einigen Minuten unter lebhaftem Schäumen sich zu klären zu einer gelblichen Flüssigkeit. Setzt man zu der nunmehr stark sauren Lösung nach Neutralisierung Glykokoll, so tritt mit alkalischer Naphthollösung violette Naphtholreaktion ein, weil nunmehr die drei Faktoren zugegen sind.

Von Aldehyden kommt für die Naphtholreaktion wesentlich der Formaldehyd in Betracht, der auf verschiedene Weise beim Kohlehydrat- und Eiweißstoffwechsel als Zwischenstoffwechselprodukt auftritt. Glucosamin, die Grundlage schleimiger und horniger Stoffe, enthält eine Aldehydgruppe, desgleichen ist diese in den Aldosen vorhanden, wenn auch hier wenig wirksam. Beim Eiweißabbau können Aldehyde abgespalten werden bei der Oxydation von Aminen, wobei Aldehyd und Ammoniak frei werden, ferner bei der Oxydation von Aminosäuren unter Abspaltung von Ammoniak und nachträglicher Decarboxylierung (*Guggenheim, Oppenheimer*). Von den Alkylaminen ist Trimethylamin wichtig, das bei dem Zerfall von Cholin und Lecithin entsteht, von den Alkanolaminen das Cholin, ein Baustein des Lecithins, als Antagonist des Adrenalins in der Nebennierenrinde reichlicher, und das Glucosamin, ein Aldehyd, der die Grundlage für manche Schleime und hornartigen Stoffen abgibt. Dem Cholin nahe steht das Neurin. Von den Diaminen wird das Cadaverin von der basischen Aminosäure Lysin abgespalten.

Zu den Guanidoverbindungen gehören Zerfallprodukte der Aminosäuren Arginin und Kreatin. Zu den Imidoazolverbindungen das Histamin, aus Histidin abgespalten. Weiter gehören hierher die Betaine, durch völlige Methylierung aus Aminosäuren gebildete quaternäre Amine und die ω -Aminosäuren mit endständigen NH_2 -Gruppen, die Phenylalkylamine, wie das Adrenalin, wahrscheinlich Zersetzungsprodukt des Oxyphenylalanins (*Bloch*) und das Indoläthylamin, vom Tryptophan abgespalten.

Der zweite Faktor des Systems sind Aminosäuren. Sie entstehen bei der Verdauung von Eiweiß durch Tryptasen und Proteasen und beim Abbau von Polypeptiden durch Ereptasen, werden also der Zelle zum Teil vom Darm aus durch Ernährung zugeführt, zum Teil werden sie in der Zelle beim autolytischen Zellzerfall gebildet. Die wichtigsten hier in Betracht kommenden Aminosäuren sind:

1. Aminofettsäuren: Glykokoll, Alanin, Arginin, Leucin, Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Kreatin.

2. Aminosäuren mit S-Gruppen: Cystein, Cystin.

3. Cyclische Aminosäuren mit Benzolringen: Phenylalanin, Tyrosin, Thyroxin.

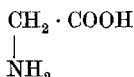
4. Cyclische Aminosäuren mit Benzol- und Pyrrolkern: Tryptophan.

5. Aminosäuren mit Pyrrolkern: Prolin.

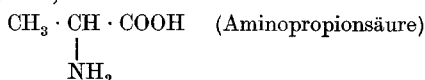
6. Aminosäuren mit anderen Ringen: Histidin.

Untersucht man die Wirkung verschiedener Aminosäuren auf das System, so ergeben sich bemerkenswerte Unterschiede.

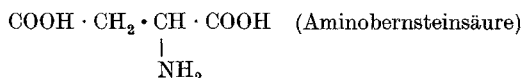
Von den einfachen Aminofettsäuren ist Glykokoll (Glycin, Aminoessigsäure) am wirksamsten:



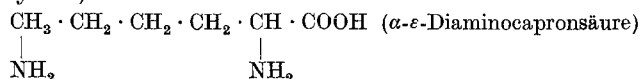
Etwas schwächer sind Alanin,



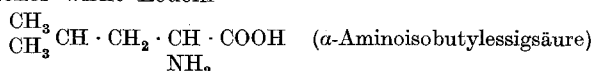
Asparaginsäure



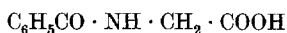
und Lysin (Chlorhydrat)



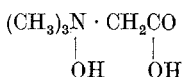
Wesentlich schwächer wirkt Leucin



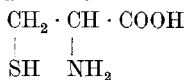
Nicht mehr wirksam sind Aminosäuren, in denen das H der N-Gruppe durch den Benzoylrest ersetzt ist, wie in der Hippursäure



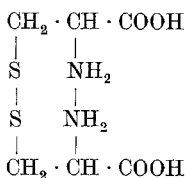
oder die völlig methyliert sind, wie im Betain



Aminosäuren mit S-Gruppen- Cystein, Cystin



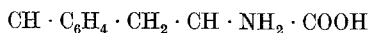
und



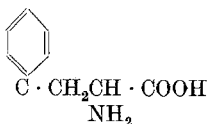
Cystein (Chlorhydrat) gab gute Reaktion, ebenso Cystin angesäuert.

Aminosäuren mit Benzolring:

Tyrosin gibt schwache Reaktion

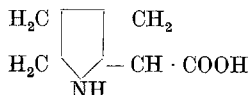


Phenylalanin gibt rötlichviolette Reaktion

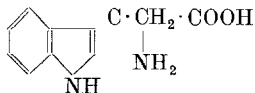


Aminosäuren mit Pyrrolring:

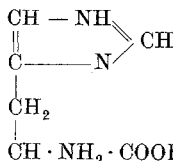
Prolin gibt gute Reaktion:



Aminosäuren mit Benzol-Pyrrolring, Tryptophan ist ohne wesentliche Wirkung.

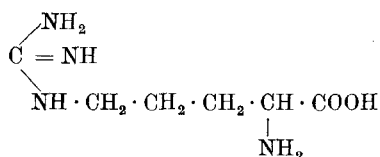


Aminosäure mit heterocyclischem Ring wie Histidin

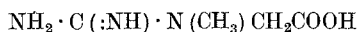


gibt positive Reaktion, aber mit grünlichem Farbton.

Bemerkenswert ist das Verhalten der stark basischen Aminosäure Arginin



und Kreatin



Arginin an sich gibt keine Reaktion, aber dann, wenn man als Nebenfaktor eine Säure, z. B. Essigsäure zugibt. Man stellt den Versuch so an, daß man in 10,0 ccm alkalischer α -Naphthollösung 0,2 g Arginin löst und folgende Reihen ansetzt:

α -Naphthol-Arginin . . .	0,5
Formollösung 2% . . .	0,5
1%ige Essigsäure . . .	0,1, 0,1, 0,3, 0,4 0,5
Eisenchlorid 1 : 100 . .	0,1

Bei 0,5 ccm Essigsäure sehr starke Reaktion, bei 0,1 ccm noch keine. Die Essigsäure ist der Gegenfaktor der Guanidogruppe.

Kreatin gibt auch mit Säure keine Reaktion.

Der dritte Faktor Eisen ist in jeder Zelle vorhanden und nach Warburg besonders wirksam in Form eines eisenhaltigen Pyrrolfarbstoffes, des Hämins.

Die Fermenteigenschaften des Systems: Aminosäure, Aldehyd, Eisen und das Verhalten des Systems verschiedenen Oxonreaktionen gegenüber lassen sich auch auf folgende Weise zeigen. Man fixiert in einem Gemisch von:

Formol 10%	5,0
Glykokollösung 2%	5,0
Eisenchloridlösung 1 : 100 . .	1,0

Gelatinescheiben, läßt sie 24 Stunden in der Lösung, wässert sie kurz und legt sie in Gelatine ein, so daß sie gewissermaßen wie die Granula in einer Zelle liegen. Ist die Gelatine erstarrt, dann übergießt man die Platte mit dem Oxonreagens und kann bei den Naphtholreaktionen sich auch einer Nachfärbung mit basischen Farbstoffen bedienen (Abb. 2). In der Abb. 2 stehen nebeneinander das Ergebnis der Naphtholoxydase-reaktion (Mitte), der Naphtholreaktion mit Nachfärbung mit Naphtholgentianaviolett (links) und der Paraphenyldiaminreaktion mit H_2O_2 (rechts). Die künstlichen Oxydasen verhalten sich wie die Naphtholoxidasen in der Zelle auch den Fermentgiften gegenüber. Beachtenswert ist, daß bei der Naphthol-Gentiana-Methode die Färbung noch da erfolgt, wo die Naphtholreaktion negativ ist und daß bei der Phenyldiaminfärbung die Umgebung stärker gefärbt ist als der Oxydaseträger selbst. Auch diese Erscheinung ist bei den natürlichen Naphtholoxonen der Zelle nachweisbar (Granula der eosinophilen menschlichen Leukocyten). Die Naphtholreaktion ist ein gutes Beispiel dafür, daß Eisen auch in Verbindung mit Lipoiden und Chromogenen nicht imstande ist,

die Naphtholoxidasereaktion auszulösen, sondern erst in Verbindung mit den Faktoren Aldehyd und Aminosäure. Da nun die Faktoren der Naphtholoxydase gleichzeitig wichtige allgemeine Bausteine der Zelle sind, gibt die Untersuchung ihres Verhaltens in solchen Zellen, wo die Reaktion vorübergehend oder dauernd positiv ausfällt, einen Einblick in den Zellstoffwechsel, wenn man gleichzeitig Struktur und sonstige chemische Leistungen der Zelle berücksichtigt.

Nach den derzeitigen Anschauungen ist die labile Indophenoloxydase eine Verbindung von sauren Lipiden und Eisen (*Katsunuma, Sehrt*), die Naphtholoxydase eine Verbindung von Indophenoloxydase + Aminosäure und Aldehyd, es tritt somit eine basische NH_2 -Gruppe hinzu, so

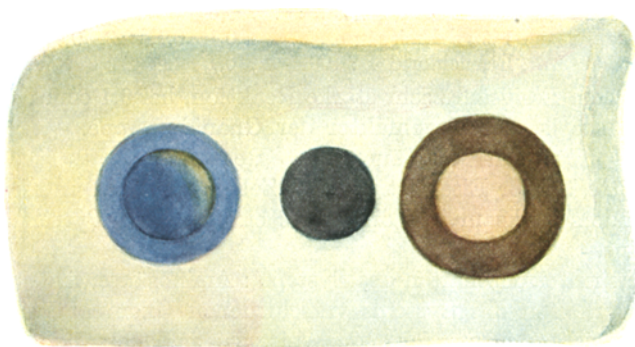


Abb. 2.

daß die saure labile Nadioxydase an die basische (amphotere) Naphtholoxydase adsorbiert zur stabilen Oxydase wird. Da die intermediär auftretende Aldehydgruppe da, wo die Oxydation in der Zelle gesteigert ist, nicht bestehen bleibt, kann die Naphtholoxydase nur da entstehen, wo eine Reduktionszone in der Zelle vorhanden ist.

Versucht man nun den Stoffwechsel einer Naphtholholzelle auf eine einfache Formel zu bringen, so läßt sich dieser in folgender Weise darstellen:

NO	NP	st. I.	la I.			gesteigerte Oxydation.
0	1	2	3	4	5	6

Bei Punkt 0 seien keine Oxone vorhanden, durch Zellabbau werden bei 1 Naphtholoxidasen nachweisbar, mit zunehmender Oxydation schwindet dann zuerst die Aldehydgruppe, die Oxydasereaktion wird negativ, die Peroxydasereaktion bleibt noch positiv, bei weiterer Oxydation werden die freien Aminosäuren angegriffen. Die Naphtholperoxydasereaktion wird negativ. Durch Verseifung oder Veresterung werden die Lipide zerstört und damit die stabilen und labilen Indophenoloxidasen.

Bei Punkt 5 ist die Zelle oxonnegativ.

Gibt es nun für diese Bewegung einen physiologischen Anhalt? Nach den jetzigen Anschauungen ist der Eiweißabbau in der Zelle ein durch Proteasen bewirkter Vorgang, der nicht einsetzt, wenn die Atmung der Zellen unbehindert ist. Der Grund hierfür ist nach *Oppenheimer* darin zu suchen, daß die Protease durch Thiole erst aktiviert werden muß. Ein solcher Aktivator ist das Glutathion, ein Tripeptid aus Cystein, Glykokoll und Glutaminsäure. Es sei hier *Oppenheimer* wörtlich angeführt:

„Die Aktivierung hängt am *reduzierten* Cysteinzustand, das dehydrierte Cystin ist ohne Wirkung. Das will sagen: *bei voller Sauerstoffsättigung der atmenden Zelle sistiert der Eiweißabbau, bei Sauerstoffmangel setzt er ein*¹. Das hat sicherlich einen tiefen Sinn für die Regulierung der Lebensvorgänge, so etwa um alt gewordene, mangelhaft funktionierende Zellen im ganzen oder auch nur Zellkolloide als Teilsysteme durch Einsetzen einer Proteolyse abzubauen, während es in der frischen gesunden Zelle keinen umfangreichen, den Bestand bedrohenden Eiweißabbau gibt“.

Der letzte Satz gilt indessen nicht für alle Zellen. Es sind im Gegenteil eine ganze Reihe autolytischer Vorgänge gesunder Zellen bekannt, um proteolytische Fermente zu liefern (Arthropoden), um Eizellen und Früchte zu ernähren, um Zwischensubstanzen zu bilden. Die Atmung wäre bei höheren Tieren nicht möglich, wenn nicht ein Teil der Körperzellen, die roten Blutzellen, durch Autolyse geopfert würde.

Die Asphyxie hat zweierlei Folgen. Sie setzt den autolytischen Vorgang in Gang, wobei oxydierende Stoffe gebildet werden, welche die Atmung steigern, wenn Sauerstoff zugeführt wird und sie erhält die Oxone in bestimmten Zellen, von wo aus sie dem Körper zur Verfügung stehen. Atmung und Verdauung, die im Körper räumlich getrennt sind, liegen in der Zelle nebeneinander.

Kehren wir nun zu der graphischen Darstellung zurück!

Während die Punkte 1—4 durch entsprechende Oxonreaktionen gekennzeichnet sind (1 = Naphtholoxydase, 2 = Peroxydase, 3 = stabile Indophenolreaktion, 4 = labile Nadirekation) scheinen Reaktionen für Punkt 0 und 5 zu fehlen. Es ist daher wichtig, eine Reihe von Reaktionen zu kennen, die wenigstens darauf hindeuten, daß in einer Zelle, die sonst negativ ist, der gleiche Mechanismus intermediär spielt.

Da, wo die Naphtholoxydasereaktion positiv ausfällt, ist der Träger der Oxydase ein zusammengesetzter Körper, der in dem Maße, wie die Oxone zerfallen, ebenfalls abgebaut wird. Es bleibt aber ein Teil der Grundlage übrig, und dieser Rest ist besonders geeignet, ausgeschiedene gelöste Oxone zu adsorbieren. Wenn sich demnach in einem Gewebe an sich oxonnegative Stoffe, Schleime oder Lipoide finden, die Oxone adsorbieren, ist es nicht unwahrscheinlich, daß sie Teile eines Naphthol-Oxonkörpers sind. Zur Stützung dieser Auffassung kann herangezogen werden, daß bei Mollusken häufig hyaline oder myelinartige Einlagerungen in Gestalt von Schläuchen und Scheiben gefunden werden oder Schleime,

¹ Im Original nicht kursiv gedruckt.

die bei manchen Tieren Oxonreaktion geben, bei anderen nicht, stets aber bei diesen Oxone adsorbieren (sekundäre Granulareaktion). Eine zweite Reaktion, die auf einen Zusammenhang deutet, ist die folgende: Behandelt man einen Schnitt, in dem die Naphtholperoxydase mit α -Naphthol dargestellt sind, mit einer α -Naphthol-Gentianaviolettlösung, so nehmen die Peroxydase den basischen Farbstoff an, wobei Naphthol als Beize dient: die gleiche Reaktion läßt sich auch ausführen, wenn die Naphtholperoxydase sich bereits zersetzt hat. Dieser Versuch läßt sich auch künstlich nachahmen! (Abb. 2 links, Umgebung der Naphthol-oxydase.) Da, wo diese beiden Reaktionen positiv ausfallen, sind meist auch die folgenden Färbungen möglich:

1. Die Färbung mit Turacin.

Man laugt einige rote Federn des Pisangfressers mit einer alkalischen Lösung aus und legt Gefrierschnitte in die Farblösung. Gewisse Gebilde färben sich dann stärker rot (z. B. die eigenartigen Schläuche am Fuß von *Helix pomatia*).

2. Die Färbung mit einer gelblichen wässrigen Hämatoxylinlösung.

Es tritt eine blaue oder schwarze Färbung der Stoffe ein, obwohl Eisen nicht mit den üblichen Reagenzien nachweisbar ist (Eiweißzellgranula von *Arion*: *Limax*).

Weiter lassen sich die gleichen Gebilde meist durch Versilberung (Schwärzung in Silbernitratlösung), durch Safranin-Pikrinsäure und durch die Färbung nach der *Gram*schen Methode darstellen.

Wie verhält es sich nun mit dem Punkt 1?

Zunächst ist nur bekannt, daß, da aus der Plasmamischung 1 die Naphtholoxydase hervorgeht, hier bereits Faktoren der Oxydase in abbaubarem Zustande vorhanden sind. Derjenige Zellbestandteil, der ein besonderes Adsorptionsvermögen für gewisse gelöste Naphtholoxydasen hat, ist das Kernkörperchen (sekundäre Kernkörperchenreaktion), das sich in manchen Zellen auch gut durch Safranin, Pikrinsäure darstellen läßt und auch in Hämatoxylinlösungen sich gelegentlich schwärzt, wenn auch hier meist Eisen farbchemisch nachweisbar ist.

Man ist also zu der Annahme berechtigt, daß in der lebenden Zelle an der Oberfläche der Nucleolen stets Faktoren der Naphtholoxydase neben Faktoren lytischer Systeme vorhanden sind.

Die Faktoren der Naphtholoxone sind aber in gewissen Mengenverhältnissen imstande, wie aus Versuchen hervorgeht, lytische Systeme zu hemmen und unwirksam zu machen, ohne sie zu zerstören.

Der Antagonismus zwischen Oxydase und lytischem Ferment liefert die Erklärung für manche Leukocytenbilder. Seit mehreren Jahren habe ich hyperplastische Mandeln, die ich dem Dresdener Kinderarzt Herrn Dr. *Krebs* verdanke, auf Leukocytenbilder mit der Naphthol-Peroxydase-Methode untersucht und konnte verschiedene Formen aufstellen:

I. In der Mandel nur ganz vereinzelte, granuliert Leukocyten in Capillaren, Epidermis frei.

II. Capillaren zum Teil vollgepfropft mit Leukocyten (Besenreißbild), perifollikuläres Gewebe noch frei. Durchtritte durch die Epidermis. Leukocyten rund, Epidermiszellen nicht angegriffen.

III. Anhäufung der Eiterzellen in den oberen Schichten der Epidermis. Austritt in die Lacunen. Zerfall der Epithelzellen und der Leukocyten. Zuwandernde Leukocyten in der Umgebung der Lymphknötchen zeigen abenteuerliche Clasmatoocytenformen (sternförmige Verästelungen) (Clasmatoocytenbild).

IV. Zerfall der Leukocyten. Oxydaseaustritt in die Umgebung der Leukocyten. Durchtränkung des Gewebes mit zersetzten Oxydasen, die vom retikulären Gewebe und den Capillarwänden adsorbiert werden. Bei Nachfärbung der Peroxydasen mit Naphthol-Gentianaviolett Capillarwände und Gitterfasern blau. In den imprägnierten Capillaren *keine* Leukocyten (Imprägnationsbild).

V. Ausgesprochene perifollikuläre Leukocytose.

VI. Ausgesprochene Eosinophilie. Die in Haufen liegenden eosinophilen Zellen zeigen starke Quellung der Zellkerne und der Granula, die im *Giemsa*präparat fehlt.

Vier Fragen sind zu beantworten:

1. Warum sind die Leukocyten einmal rund und das andere Mal vielgestaltig?

2. Warum besteht trotz erheblicher allgemeiner Leukocytose in den Gefäßen bei Imprägnation der Gefäßwand Leukopenie?

3. Warum wird die Epidermis das eine Mal angegriffen, das andere Mal nicht?

4. Warum quellen Zellkerne und Granula der eosinophilen Zellen?
Die Antwort lautet:

1. Die Leukocyten sind dann rund, wenn sie noch nicht selbst geschädigt sind und die Fähigkeit haben, sich in der Formollösung zusammenzuziehen, sie sind dann vielgestaltig, wenn sie, bereits geschädigt, unfähig sind, sich zusammenzuziehen.

2. Die Durchtränkung der Gefäßwände mit zersetzten Leukocytensekreten macht die Zuwanderung von Leukocyten überflüssig oder richtiger, sie schützt die Leukocyten vor Veränderungen, so daß sie in den Capillaren nicht hängen bleiben.

3. Die Epidermis wird nur da angegriffen, wo nach Zersetzung der Oxydasen die tryptischen Fermente frei werden.

4. Die Quellung der eosinophilen Granula ist eine Wirkung des durch die Peroxydase aktivierten Sauerstoffes. Die Lösung der Granula wird durch Chromogenbindung verhindert. Die Quellung ist das Ergebnis einer Lösung mit unmittelbar folgender Erstarrung.

Dafür, daß Chromogene durch Vermittlung von Oxonen Lipoid-Eiweißverbindungen in schwere oder unlösliche Membranen verwandeln, sind rote Blutkörperchen das beste Beispiel, und der folgende Versuch beweist gleichzeitig, daß die Oxone nur in bestimmten Systemen wirksam sind. Gibt man zu einem Gemisch von Menschen- und Hammelblutkörperchen in isotonischer Lösung α -Naphthollösung und H_2O_2 in Mengen, die nur von den Blutkörperchen des Hammels aktiviert werden, so färben sich nur diese violett und werden durch destilliertes Wasser nicht gelöst, während die ungefärbten menschlichen Blutkörperchen sich lösen. Der Einfluß von Chromogenen unter Vermittlung von Oxonen auf die Bildung von Strukturen zeigen auch Bakterien, die mit den Reagenzien der Indophenolreaktion behandelt werden. Besonders deutlich ist dieser Einfluß bei *Oidium lactis* festzustellen, wenn man Kulturen einmal mit Dimethyl-p-Phenylendiamin und α -Naphthol-, das andere Mal mit P-Phenylendiamin- und Naphtholgemisch betropft. In einem Falle entstehen große Kugeln, im andern mitochondrienartige Bänder. Wie sind nun diese Formen zu erklären?

Das gesamte Zellplasma ist, wenn auch scheinbar äußerlich unverändert, in Wirklichkeit immer nach zwei Seiten in Bewegung, nach der Sol- und Gelseite. Jede Bewegung über eine bestimmte Grenze wird durch den Stoffwechsel geregelt.

Wenn nun in dem Augenblicke, wo sich die Granula lösen, durch Vermittlung des Oxones das Indophenol niedergeschlagen wird, erstarrt das in Lösung begriffene Korn. Geht die Lösung schnell vor sich, entsteht eine große Kugel, geht sie langsamer vor sich, infolge stärkerer Gegenreaktion der Umgebung, die Bandform.

Das hängt wohl auch damit zusammen, daß konzentrisch das Plasma mit der Entfernung von einem Reaktionspunkt verschieden reagiert und der Kugelform ein Hindernis entgegengesetzt. Diese konzentrische Schichtung trifft man bekanntlich bei vielen kolloidalen Niederschlagsbildungen.

Es verbinden sich nunmehr die gelösten und wieder fixierten Granula in Form von Bändern, die eine Neigung zur Krümmung entsprechend den Diffusionsringen besitzen.

Allgemein ausgedrückt: Wenn eine bestimmte Plasmamischung durch Vermittlung von Oxonen Chromogene bindet, so wird ihre Auflösung verhindert, und es entstehen bei schnellem Verlauf Granula, bei langsamerem Verlauf oder wenn das Plasma konzentrische Schichten besitzt, Mitochondrien.

Alle diese Vorgänge verlaufen im Zwischenstoffwechsel, so daß sie sich dem direkten Nachweis entziehen. Sie lassen sich aber nachahmen an solchen Granula, die Naphtholoxone tragen. An geeignetem Materiale kann man nach Belieben, z. B. aus den eosinophilen Granula Bänder oder große Kugeln erzeugen. Für diese Versuche eignen sich auch die

großen in den Kiemen der Teichmuschel liegenden Granula. Die Eigenschaften der Naphtholoxydase liefern den Schlüssel zu einer Reihe von vier Beobachtungen, die an sich nicht ohne weiteres verständlich sind.

1. Woher stammen die sogenannten Typhuszellen?
2. Wo werden ausgeschiedene Oxone adsorbiert und bleiben erhalten?
3. Woher rührt der eigenartige Antagonismus zwischen primären und sekundären Naphtholoxydasen?

4. Warum sind bei der sekundären Kernkörperchenreaktion manche Extrakte bei bestimmten Kernkörperchen wirksam, bei anderen nicht?

1. Meist in der zweiten Woche der Typhuserkrankung treten in der Milz, im Knochenmark und in den Lymphknoten große phagocytaire Zellen auf, die auch in die Lymphgefäße abwandern und den Ductus thoracicus unter Umständen vollkommen verstopfen. Die Erklärung liegt wahrscheinlich darin, daß in dieser Zeit ein sehr starker Leukocytenzerfall mit unvollkommener Zersetzung der Zerfallstoffe in diesen Organen festgestellt werden kann, bei dem nicht nur Faktoren der Oxydase, sondern auch lytische Faktoren frei werden und gerade in solchen Zellen den Stoffwechsel beeinflussen, die mit den Leukocyten verwandt sind, wie in Pulpazellen, Stammzellen des Knochenmarkes und lymphoiden Zellen, in denen als Vorstufen die gleichen Faktoren in gebundenem Zustande vorhanden sind.

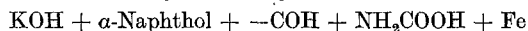
2. Ausgeschiedene Oxone werden wahrscheinlich da erhalten bleiben, wo bereits Oxonfaktoren vorhanden sind, wo also leichter diejenigen Mengen sich anhäufen, die zum Zustandekommen der Reaktion nötig sind. Schleime und hornige Ausscheidungen besitzen als Abkömmlinge des Glucosamin bereits Aldehyd und NH_2 -Gruppen.

3. Primäre Oxydasen werden von sekundären adsorbiert, umgekehrt sekundäre von primären, wobei die Oxydasereaktion nach vorübergehender Verstärkung oft verschwindet und der Oxydaseträger aufgelöst wird. Das hängt damit zusammen, daß die sekundären Oxydasen, wie bereits gesagt, Faktoren der primären Oxydasen enthalten und daß die primären Oxone häufig gleichzeitig Träger lytischer Stoffe sind, die den Oxonträger auflösen.

4. Die Erklärung ist trotz der Verschiedenheit der Zellen im Grunde die gleiche. Mit *Limax* oder *Arion*extrakten behandelte Gewebsschnitte zeigen, auch wenn normales Gewebe noch keine Kernkörperchenfärbung mit alkalischen Naphthollösungen aufweist, eine Darstellung der Kernkörperchen in manchen bösartigen Geschwülsten, in Epidermiszellen dann, wenn in der Nähe ein stärkerer Leukocytenzerfall stattgefunden hat und in den Pigmentzellen der Substantia coerulea der Hirnschenkel. Bösartige Geschwülste sind besonders reich an Arginin, die Epidermiszellen haben wahrscheinlich Partiale der zerfallenen Eiterzellen in ihren Kernkörperchen aufgenommen, die Pigmentzellen zeigen durch die

Anwesenheit von Pigmenten, daß ein oxydativer Abbau ringförmiger Komplexe, der Phenolasen zu seiner Bildung voraussetzt, sich in der Zelle abgespielt hat, wobei ebenfalls Oxonfaktoren vorhanden sind.

Betrachtet man das oxydative System



bei Verwendung der beiden Aminosäuren Glykokoll und Arginin genauer, so ergeben sich einige Befunde, die auch auf andere auf Dispersität beruhende Systeme anwendbar sind.

Ist in dem System mit Glykokoll die Glykokollmenge so gering, daß keine Reaktion eintritt, so kann diese erzwungen werden, d. h. es kann das System aktiviert werden durch folgende Eingriffe:

I. Verdünnung der Lauge

a) durch Wasser,

b) Neutralisation durch Säure,

c) Einwirkung von Formaldehyd, obwohl die COH-Gruppe ein Gegenfaktor der Aminosäure sein kann.

II. Verstärkung der Aminosäurewirkung

a) durch Steigerung der Glykokollmenge,

b) durch Zusatz einer an sich unwirksamen Aminosäure (z. B. Hippursäure),

c) durch Zusatz von an sich unwirksamen Aminoverbindungen, die keine Aminosäuren sind (z. B. Rhodanammonium).

III. Durch Zusatz von Chromogenen.

IV. Durch Steigerung der Eisenmenge, obwohl in gewissen Mengenverhältnissen Eisen ein Gegenfaktor sein kann.

In dem System mit Arginin sind aber diese Eingriffe unwirksam, wenn nicht als Gegenfaktor eine Säure eingeführt wird (z. B. Essigsäure). Umgekehrt kann ein System mit positiver Reaktion in ein negatives verwandelt werden, z. B. durch Verstärkung der Lauge durch ein Amin. Es kann also ein Hauptfaktor, d. h. ein für das System notwendiger Faktor, wenn er unwirksam ist, durch einen Nebenfaktor, der an sich mit dem System nichts zu tun hat, verstärkt und wirksam gemacht werden.

Auf einen besonderen Fall angewendet, es kann ein unspezifisches schwaches Agglutinin durch einen unspezifischen Nebenfaktor so verstärkt werden, daß es als spezifisches Agglutinin erscheint. Unter diesem Gesichtspunkte betrachtet würden gewisse Fälle von Paragglutination, wie sie von *Kuhn* und *Woithe* beobachtet wurden, verständlich.

Auch manche lytische Vorgänge, wobei scheinbar Aminosäuren und Chromogene eine Rolle spielen, sind hierdurch dem Verständnis näher gerückt.

Die Naphtholreaktion ist geeignet, einen Einblick in manche biologische Zellvorgänge zu geben, es seien daher zum Schluß die Versuche

nochmals zusammengestellt, die auf einen Zusammenhang zwischen Atmung, Pigmentbildung und Verdauung hinweisen.

I. a) Naphtholoxydase. Darstellung im Gewebe (eosinophile Leukocyten),

b) Naphtholreaktion als Systemreaktion. Einfluß der Mengenverhältnisse der Faktoren Aminosäure, Aldehyd und Eisen. Unterschiede in der Wirkung verschiedener Aminosäuren. Verstärkungs- und Abschwächungsfaktoren,

c) künstliche Naphtholoxydasegranula, ihr Verhalten gegen Oxonreaktionen, gegen Temperatur und Fermentgifte.

II. a) Naphtholperoxydase (Luftröhre der Ziege, Tränendrüse des Rindes),

b) Peroxydase als Vorstufe oder Abbauprodukt der Oxydase,

c) Verwandlung einer Peroxydase in eine Oxydase im Reagensglase.

III. Naphtholoxydasefaktoren und Indophenoloxydase. Bedeutung der Aminosäure für die Thermolabilität der Oxone.

IV. Naphtholoxon und Pigment. Beispiele für

a) Abspaltung von Pigmenten aus dem Oxon durch Laugen und Autolyse,

b) Verschwinden der Oxone bei Auftreten des Pigmentes.

V. Naphtholoxydase und Amylolyse.

a) Aldehydbildung aus Stärke ($\text{Fe}_{(3)} + \text{H}_2\text{O}_2$). Einfluß von Aminosäure, Aldehyd und Eisen auf den amylytischen Vorgang,

b) Einfluß der drei Faktoren auf die Amylase des Speichels,

c) Beispiele für gleichzeitiges Vorkommen in Zellen,

d) Einfluß von Nebenfaktoren auf Amylase (Aminosäuren hemmen, heben aber die zerstörende Wirkung des Eisens auf, Amine setzen die hemmende Wirkung von Aminosäure herab.

VI. Hemmender Einfluß von Aminosäuren auf die Pepsin-Salzsäureverdauung.

VII. Naphtholoxydase und Trypsin: gleichzeitiges Vorkommen in einer Zelle. Aminosäuren heben die zerstörende Wirkung von Laugen auf Trypsin auf.

VIII. Naphtholoxydase und Zellabbau (Autolyse). Beispiele: Naphtholpositive Schleime und Strukturen.

IX. Naphtholoxon und Zellaufbau. Beispiele des Einflusses von Oxonfaktoren auf Strukturbildungen, Granula- und Mitochondrienbildung. Härtung roter Blutkörperchen.
