

(Aus der Abteilung für physikalische Chemie und Elektrochemie des Staatlichen
Instituts für ärztliche Fortbildung in Leningrad.)

Über Nadi-Reaktion.

Von
Prof. Dr. Igor Remesow.

(Eingegangen am 23. Februar 1932.)

Der Gedanke, daß im Chemismus der bekannten intracellularen Oxydasereaktion, der sog. Nadi-Reaktion der Zellen und der Gewebe, die Lipoide eine besondere Rolle spielen, wurde schon von einer Reihe von Forschern (*Loele*¹, *Dietrich*², *Vernon*³, *Staemmler*⁴, *Haeberli*⁵, *Neumann*⁶, *Marinesco*⁷ u. a.) ausgesprochen. Jedoch haben die genannten Verfasser diese Frage nur in allgemeinen Zügen erörtert. *Dietrich* und *Vernon* geben nicht greifbar an, auf welche Art und Weise die Lipoide bei der Indophenolreaktion ihre Rolle erfüllen. *Gräff*⁸ beurteilt kritisch die verschiedenen Ansichten darüber und behauptet mit *Recht*, daß die Nadi-Reaktion sicher keine einfache Fettreaktion, sondern zweifellos schon eine Oxydasereaktion sei; die Lipoide spielen eben als *Sauerstoffüberträger* mit, doch sind sie nicht allein maßgebend.

Es sei noch erwähnt, daß nach *Staemmler* Lecithin die einzige Substanz ist, die *in vitro* zugesetzt, die Nadi-Reaktion verstärkt. *Loele* hat die Theorie aufgestellt, daß die „phenolbindende Substanz“ die Natur einer Aldehydamidobase habe, eines „Aldamins“. Andererseits hat *Neumann* eine „Lipoidtheorie“ entwickelt, die eine Kombination eines N-haltigen Stoffes mit einem Lipoid vermutet.

Wenn man möglichst objektiv das große Material der Schrifttumsangaben über G. Nadi-Reaktion zusammenzufassen versucht (vgl. *Katsunuma*⁹), so scheint es mir, daß bis heute die Rolle der Lipoide dabei noch sehr unklar, wenn auch schon als sicher festgestellt, auftritt.

Bei Durchsicht von histochemischen Präparaten meiner Versuche über Lipoidstoffwechsel (vgl. *Remesow* und Mitarbeiter¹⁰), welche auf meine Veranlassung von Herrn Dr. *G. Merkulow*¹¹ bearbeitet wurden, lenkte dieser meine Aufmerksamkeit darauf, daß die Nadi-Reaktion an diesen Präparaten ziemlich eigenartig erschien; in den untersuchten Fällen bekamen die Tiere parenterale Einführungen kolloidalen Cholesterins (Cholesterinsol), wobei die Gefäßlichtungen außer Cholesterinanhäufungen auch ständige Leukocytenansammlungen aufwiesen. An

solchen Stellen, wo ein Gemisch von Cholesterinmassen und vielkernigen weißen Blutzellen vorlag, erschien die Nadi-Reaktion recht diffus. Freilich gelang es darum in vielen Fällen nicht, die Blutkörperchen von den Sterinmassen, welche ebenfalls gefärbt worden waren, sicher zu unterscheiden.

Diese Beobachtung führte mich natürlich zu einer vergleichenden Zusammenstellung mit der von mir neuerdings entdeckten „Oxydasereaktion“, welche durch Cholesterin mit Paraphenyldiamin und Toluylendiamin bewirkt wird (vgl. Remesow¹²⁾). Dieser Vergleich veranlaßte die vorliegende Untersuchung. Sie bezweckte die Klärung der Rolle des Cholesterins in der Nadi-Reaktion und bestand darin, daß ich die Nadi-Reaktion mit reinem molekular-dispersem und kolloidalem Cholesterin *in vitro* anstelle.

Tabelle 1.

Reaktionsbedingungen	Reaktionsergebnis	
	sofort	nach 24 Std.
„Nadi“-Reagens + 0,1—1,0 Mol. HCl	rot	purpurrot
„ + Chloroform (saure Reaktion)	rot	purpurrot
„ + Chloroform + 0,1 Mol. HCl	grün, Chloroformschicht, obere rot	braun
„ + Chloroform + NH ₃ konz.	hellrosa	rot (oben blau)
„ + Chloroformlösung des Cholesterins (von 0,001 bis 10%ige Lösung	purpurrot, obere Flüssigkeit nimmt blaue Farbe an	braunrot
„ + Alkohollösung des Cholesterins	grünlichblau	tiefblau
„ + festes Cholesterin	hellblau	tiefblau
„ + Chloroformlösung des Cholesterins + HCl	grünlichblau	grünbraun
„ + Chloroformlösung des Cholesterins + NH ₃	purpurrot	braunrot
„ + kolloidales Cholesterinsol	blau (Flockung)	blau
p-Phenyldiamin, frisch hergestellt ebenso α-Naphthol	grünlichviolett	blau (oben rot)
„ + Alkohollösung des Cholesterins	hellgrün	farblos
„ + festes Cholesterin	hellblau	blau
„ + kolloidales Cholesterinsol	hellblau	blau
„ + Chloroformlösung des Cholesterins + HCl	farblos	farblos
„ + Chloroformlösung des Cholesterins + NH ₃	rotviolett	schwarz
„ + reines Lecithin im Aceton	graugrün (Verseifung)	hellblau
„ + reines Lecithinsol	grau (Flockung)	grau
„ + Lecithin ex Ovo im Alkohol	grünblau	blau

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 angegeben und zeigen mit voller Sicherheit, daß *das Cholesterin mit Nadi-Reagens (p-Phenyldiamin und α -Naphthol) eine positive Indophenolreaktion gibt*. Allerdings bot dieses Ergebnis keine Überraschung, nachdem die katalytischen Eigenschaften des Cholesterins von mir nachgewiesen waren (*Remesow, a. a. O.*). Wenn man die erhaltenen Ergebnisse (Tabelle 1) näher untersucht, so geht aus ihnen hervor, daß die Nadi-Reaktion in ihrer typischen Form nur mit festem molekular-dispersem Cholesterin oder mit alkoholischer Lösung des Cholesterins (am schärfsten aber mit kolloidalem Cholesterin) eintritt.

Die Chloroformlösungen, mit und ohne Cholesterin, zeigten keine Indophenolreaktion, sondern einen sofortigen purpurroten Farbenton, was auf thermodynamische Redoxverhältnisse des Systems und vor allem auf den Einfluß der Acidität der Lösungen in bezug auf Oxydation des p-Phenyldiamins zurückzuführen ist.

Es scheint lohnend, bevor man zur Erörterung des Mechanismus der Nadi-Reaktion übergeht, auf gewisse, diese Reaktion kennzeichnende Einflüsse einzugehen.

Die Wirkung des Alkohols, der Einfluß des Chloroforms, optimale p_H des Mediums usw. (*Reed*¹³, *Marinesco*¹⁴) stimmen in Einzelheiten mit den Reaktionsbedingungen der „Oxydonen“ von *Batelli-Stern* und mit denselben der „Cholesterinreaktion“ von *Remesow* (a. a. O.) überein. Andererseits kann die Granulabildung, welche gleichzeitig den Eintritt der Indophenolreaktion charakterisiert, auch wohl als ein typisches Merkmal für diese Reaktion dienen. Ob die dabei sichtbar entstandenen Granula fertige protoplasmatische Gebilde sind (*Katsunuma, a. a. O.*), oder ob es sich hier um reine Ausflockungsscheinungen im Zelleib, also um rein physikalisch-chemische Veränderungen des Systems (*v. Möllendorff, a. a. O.*) handelt, diese für die Erörterung des Mechanismus der Nadi-Reaktion so wesentliche Frage kann bis jetzt noch nicht als endgültig geklärt gelten.

Auf Grund meiner Untersuchungen über den chemischen und besonders physikalisch-chemischen Zustand des Cholesterins und seiner Ester, auch auf Grund der in vorliegender Arbeit ausgeführten Versuche, erscheint mir der Mechanismus der Oxydasereaktion bzw. Nadi-Reaktion innerhalb der Zellen und der Gewebe, nebst den dabei vorkommenden Erscheinungen (Granula-Bildung), in Übereinstimmung mit dem tatsächlichen Material, folgendermaßen erklärbar:

Nadi-Reaktion ist *eigentlich eine oxydative Reaktion des Gewebscholesterins*. Einen unmittelbaren Beweis dafür stellen die hier ausgeführten Reaktionen dar. Auf diese Weise erhält also die grundsätzliche Frage über die Beziehungen der Zellipoide zur Oxydasereaktion ihre greifbare Lösung. Wenn man nun den Mechanismus dieser Reaktion an Hand des ganzen vorhandenen Materials von Tatsachen ermittelt, so läßt sich

Tabelle 2.

Reagens	Bestrahlte Cholesterinlösung (Dauer der Bestrahlung in Minuten)	Reaktionsergebnis	
		sofort	nach 24 Std.
Nadi-Reagens nach Gräff	mit Chloroformlösung des 15 Min. u. v. Cholesterins	braun	bräunlich- blau
"	mit Chloroformlösung des 15 Min. u. v. Cholesterins + HCl	tiefblau	tiefblau
"	mit Chloroformlösung des 15 Min. u. v. Cholesterins + NH ₃	rot	braun
"	mit Alkohollösung des 15 Min. u. v. Cholesterins	blau	blau
"	mit Alkohollösung des 15 Min. u. v. Cholesterin + HCl	hellrosa	bräunlich- violett
"	mit Alkohollösung des 30 Min. u. v. Cholesterins	blau	violettgrün
"	mit Chloroformlösung des 30 Min. u. v. Cholesterins	tiefblau	schwarzblau
"	mit Chloroformlösung des 120 Min. u. v. Cholesterins	violett	schwarzblau
"	mit Alkohollösung des 120 Min. u. v. Cholesterins	grauviolett	blau
"	mit Alkohollösung beteertes Cholesterin	grau	grünlichblau
"	mit Alkohollösung beteertes Oxycholesterin	grün	tiefblau- violett
"	mit Alkohollösung des Filtrats nach Digitoninfällung des 15 Min. u. v. Cholesterins	schwarzblau	schwarz
"	mit Alkohollösung des Filtrats nach Digitoninfällung des 15 Min. u. v. Cholesterins + HCl	braunrot	braunviolett
"	mit Alkohollösung des Filtrats nach Digitoninfällung des 15 Min. u. v. Cholesterins + NH ₃	violettrot	violett
"	mit Alkohollösung des Filtrats nach Digitoninfällung mit 120 Min. u. v. Cholesterins	tiefblau	grünlichblau
"	mit Alkohollösung des 15 Min. u. v. Cholesterindigitonid am Filter	hellgrün	blau
p-Phenyldiamin und α-Naphthol frisch hergestellt	mit Chloroformlösung des 15 Min. u. v. Cholesterins	grün	blau
"	mit Chloroformlösung des 30 Min. u. v. Cholesterins	blauviolett	tiefblau
"	mit Chloroformlösung des 60 Min. u. v. Cholesterins	violett	schwarzblau
"	mit Chloroformlösung des 120 Min. u. v. Cholesterins	graublau	blau
"	mit Chloroformlösung des Oxy- cholesterins	grau	blau (oben rot)
"	mit Chloroformlösung des be- teerten Cholesterins	grau	grau
"	mit Alkohollösung des Oxychole- sterins	grüngrau	grau

Bemerkung: Die Bestrahlung des Cholesterins wurde mit Hanau-Quarzlampe (Analysenmodell) ohne Filter (15 cm vom Brenner entfernt) ausgeführt.

vor allem die Granulabildung leicht erklären. Unter der Einwirkung des Nadi-Reagens (α -Naphthol und p-Phenyldiamin) tritt eine rein kolloid-chemische Cholesterinausflockung ein, welches sich im Zelleib in seinem kolloidalen Zustande befand. Als Ergebnis dieses Gerinnungsvorgangs erscheint das „präexistierende“ Cholesterin der Zellen, welches morphologisch als „unsichtbar“ bezeichnet werden kann — als „sichtbar“ durch Bildung der Gerinnsel oder der wohlbekannten Zelleibkörnelungen. Insofern diese Gerinnsel nichts anderes als ausgeflocktes kolloides Cholesterin darstellen, erscheint es verständlich, daß diese Granula gleichzeitig als Träger der oxydativen Eigenschaften betrachtet werden können.

Damit werden also die beiden Ansichten über die Natur und die Rolle der Zelleibkörper von *Katsunuma* (l. c.) und von *v. Möllendorff* (l. c.) wohl ihre endgültige Vollendung gefunden haben. Man kann aus eben Dargelegtem wohl ersehen, daß beide Ansichten nur in bestimmten Grenzen zutreffen, aber nicht imstande waren, die Erscheinung erschöpfend zu erklären. Die aufgestellte Erklärung scheint aber diese Vollendung zu bringen und gleichzeitig beide Ansichten, ohne sie abzulehnen zu vereinigen.

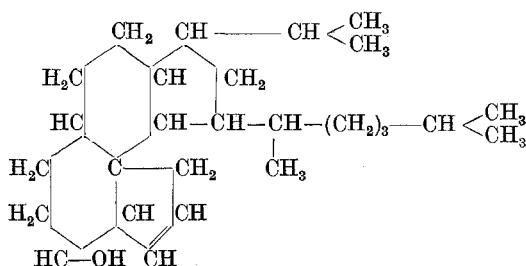
Der Mechanismus der Nadi-Reaktion, vom rein chemischen Standpunkt betrachtet, scheint mir demjenigen vollkommen zu entsprechen, welchen ich schon bei der „Cholesterinoxydasereaktion“ allseitig erörtert hatte (*Remesow*, l. c.). Allerdings möchte ich hier in aller Kürze denselben nochmals erwähnen, und zwar insofern die gefundenen Angaben der Analysen (Tabelle 2) mit Cholesterinmodifikationen noch einen Beweis für die Richtigkeit der aufgestellten Erklärung bieten. Im Prinzip der Nadi-Reaktion handelt es sich also um einen rein katalytischen Vorgang der p-Phenyldamindehydrierung mittels des Cholesterins der Zellen oder des Gewebes. Indophenolblaubildung tritt als Ergebnis dieser Wasserentziehung ein und wird offenbar durch Chinondiimin bedingt. Die Rolle des α -Naphthols ist dabei vollkommen der Rolle des p-Toluylendiamins, bei der von mir beschriebenen Cholesterinreaktion gleich und wird durch rein thermodynamische Verhältnisse des Dehydrierungsvorgangs bedingt.

Die katalytische Wirkung des Cholesterins wird auch hier durch seine *Tautomerie*, und zwar durch seine „Ketoform“, welche ich als „Cholesterinperoxyd“ bezeichnet hatte, bestimmt.

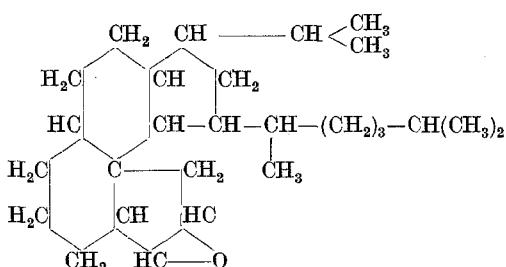
Diese Annahme wird noch mehr durch die Versuche mit bestrahltem Cholesterin begründet (vgl. auch *Remesow*, l. c.). Die ausgeführten Reaktionen mit Nadi-Reagens und durch ultraviolette Strahlen behandelten Cholesterins sind in der Tabelle 2 angegeben. Wie daraus zu ersehen ist, verstärkt die Bestrahlung ungemein die Indophenolblau- bzw. Nadi-Reaktion des Cholesterins. Infolge der ultravioletten Radiationen erhöht sich die Stärke der Oxydasereaktion, entsprechend der Zunahme eines Tautomers, Cholesterinperoxyds. Allerdings läßt sich dies nur

bis zu einem bestimmten Grade beobachten. Nach 2stündiger Bestrahlung (positive Reaktion von *Lipschütz* auf Oxycholesterin) ändert sich die Oxydasereaktion, um zuerst schwächer, dann atypisch zu erscheinen und zum Schluß vollkommen zu verschwinden. Das infolge sehr langer Bestrahlung beteerte Cholesterin, zeigte vollkommen negative Reaktion. Die Tatsache, daß ich die stärkste Nadi-Reaktion in den alkoholischen Filtraten des 15—30 Min. bestrahlten, mit Digitonin gefällten Cholesterin erzielen konnte, ist bemerkenswert. Auffallend erschien diese Tatsache noch darum, weil die Digitoninfällung vollständig war. Offenbar ist das Cholesterinperoxyd bzw. „Ketotautomer“ durch Digitonin nicht fällbar und stellt die aktive Fraktion des katalytisch wirkenden Cholesterins dar.

Diese tautomeren Verhältnisse lassen sich wohl aus der Zusammensetzung der Konstitutionsformeln des Cholesterins ersehen. Wenn man die Strukturformel für Cholesterin durch Indenbildung nach *Wieland* annimmt, so kann man sie dann für „Enolform“ des Cholesterins gelten lassen:



Dagegen läßt sich aber die „Keto“- oder „Peroxyd“form durch folgende Formel charakterisieren:



Auf diese Weise hat sich das Cholesterin nicht erst im Augenblick der Reaktion für die eine oder andere Konstitutionsformel zu entschließen, sondern kann in jedem Augenblick zwischen *beiden* Formeln, die miteinander im Gleichgewichte sind, wählen (vgl. z. B. das tautomere Gleichgewicht des Acetessigesters usw.).

Bei der Reaktion eines sich im Gleichgewicht befindenden tautomeren Cholesterinpaars mit dem p-Phenyldiamin hängt demnach der Verlauf

des chemischen Vorganges sowohl von der Lage des Gleichgewichtes und seiner Einstellungsgeschwindigkeit, als auch von der Geschwindigkeit dieser Reaktion ab. Die angeführten Angaben der Analysen von bestrahltem Cholesterin bestätigen wohl diese Reaktionsverhältnisse.

Alles oben Gesagte scheint mir genügend, um den Mechanismus der Nadi-Reaktion grundsätzlich, sowie auch im einzelnen in einem neuen Lichte erscheinen zu lassen. Es ist offenbar, daß in allen Zellen und Geweben, in denen das Cholesterin vorhanden ist, es sich bei der Nadi-Reaktion um seine „aktive Form“, welche hier als „Keto“- oder „Peroxid“form bezeichnet wurde, handelt. — Es ist auch möglich, daß im lebenden Körper eine Desmotropie des Cholesterins stattfindet, so daß in einigen Fällen das „Gewebscholesterin“ nur in seiner „inaktiven“ Enolform erscheint (keine Oxydasereaktion aufweisend) in anderen aber ausschließlich in seiner „aktiven“ Form, als Cholesterinperoxyd (Ketoform). In diesem Falle bestimmt sie also die beobachtete Indophenolblaureaktion.

Zum Schluß finde ich es überflüssig auf gewisse Theorien über „Sauerstofforte“ des Zellkerns (*Unna*¹⁵ u. a.) weiter einzugehen. Im Grunde genommen sind alle theoretisierenden Definitionen, welche zur glücklichen Stunde seit *Paul Ehrlich*¹⁶, *Unna* in seinen Erklärungen anführte, so verwaschen, daß eine auf solcher Grundlage aufgebaute Theorie keine genügend klaren Gesichtspunkte aufweisen kann. Auch die Arbeiten von *Drury*¹⁷, *Oelze*¹⁸, *Schneider*¹⁹ u. a. haben, schon vom rein morphologischen Standpunkt aus, diese Theorien genügend erschüttert.

Die vorliegende Untersuchung erlaubt mir anzunehmen, daß die sog. „Nadi-Reaktion“ nicht nur als eine reine Oxydasereaktion betrachtet werden muß, sondern auch als eine Abart von der von mir beschriebenen Diaminenreaktion zum Nachweis des Cholesterins, in dieser ihrer Ausführung also zum Nachweis von Cholesterin der Zellen und der Gewebe.

Mit Rücksicht darauf scheint es dann erlaubt zu behaupten, daß diese Reaktion sowohl in der Histochemie als auch in der Chemie der oxydativen Vorgänge ihren Platz finden muß.

Zusammenfassung.

1. Die intracellulare Oxydasereaktion, sog. „G. Nadi-Reaktion“, stellt eine *katalytische Reaktion des Cholesterins der Zellen und Gewebe* dar.
2. Insofern die katalytischen Eigenschaften des Cholesterins in bezug zur Dehydrierung der Diamine nachgewiesen werden (*Remesow*), erscheint der scheinbare Dualismus der Definition Nadi-Reaktion wohl erklärbar.
3. Der Mechanismus der Nadi-Reaktion gehört zu den rein physikalisch-chemischen katalytischen Dehydrierungsvorgängen, sowohl durch rein thermodynamische Verhältnisse des Systems, als auch durch tautomere Eigenschaften des Cholesterins bedingt.

4. Nadi-Reaktion mit bestrahltem (ultraviolette Licht) Cholesterin ausgeführt, liefert einen neuen Beweis zur Tautomerie des Cholesterins. Durch kurzdauernde ultraviolette Radiationen ändert sich offensichtlich das tautomere Gleichgewicht des Cholesterins zugunsten seiner „aktiven“ Ketoform, welche die katalytischen Eigenschaften bedingt.

5. Die Granulabildung im Zelleib, welche für Nadi-Reaktion eine charakteristische Erscheinung ist, stellt einen Ausflockungsvorgang des kolloidalen Cholesterins der Gewebe dar; in dieser Hinsicht also rein kolloid-chemischer Natur.

6. Die *Nadi-Reaktion* kann man auch als eine Abart der von *Remesow* beschriebenen Diaminenreaktion des Cholesterins betrachten, welche zum qualitativen Nachweis desselben in Zellen und Geweben dienen mag.

7. Die Angaben von *Staemmler* über die fördernde Wirkung des Lecithins für den Eintritt der Nadi-Reaktion konnten nicht bestätigt werden. Reines Lecithin allein zeigte negative Nadi-Reaktion im Reagensglas. Die Spuren von *Cholesterin* verursachten aber den Eintritt derselben.

Schrifttum.

- ¹ *Loele*: Virchows Arch. **250**, 677 (1924); Fol. haemat. (Lpz.) **25**, 190 (1920). —
- ² *Dietrich*: Zbl. Path. **19**, 3 (1908). — ³ *Vernon*: J. of Physiol. **42**, 402 (1910). —
- ⁴ *Staemmler*: Virchows Arch. **256**, 595 (1925). — ⁵ *Haeberli*: Virchows Arch. **221**, 333 (1916). — ⁶ *Neumann*: Biochem. Z. **148**, 524; **150**, 256 (1926). — ⁷ *Marinesco*: Bull Acad. Roum. 8, 5 (1923). — ⁸ *Gräff*: Beitr. path. Anat. **70**, 1 (1924). — ⁹ *Katsunuma*: Intracellulare Oxydation und Indophenolblau-Synthese. Jena: Gustav Fischer 1924. — ¹⁰ *Remesow* u. *Mitarbeiter*: Z. exper. Med. **77**, 67 (1931). — ¹¹ *Merkulow*: Zit. nach Manuskript (erscheint 1932). — ¹² *Remesow*: Zit. nach Manuskript (erscheint 1932, Biochem. Z.). — ¹³ *Reed*: J. of biol. Chem. **22**, 99 (1915). — ¹⁴ *Marinesco*: Soc. Biol. **87**, 32 (1922). — ¹⁵ *Unna*: Arch. mikrosk. Anat. **78** (1911); **87**, 96 (1915). — ¹⁶ *Ehrlich, Paul*: Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Berlin 1885. — ¹⁷ *Drury*: Proc. roy. Soc. (B) **88**, 166. — ¹⁸ *Oelze*: Z. Mikrosk. **31**, 51 (1914). — ¹⁹ *Schneider*: Z. Mikrosk. **31**, 43 (1914).