

Über die Fermente der Leukocyten.

Von

M. Tschernoruzki.

(Aus dem chemischen Laboratorium des Kaiserl. Institutes für experimentelle Medizin
in St. Petersburg.)

(Der Redaktion zugegangen am 3. September.)

Die Fragen über die fermentative Energie der Leukocyten sind zurzeit noch fast gar nicht aufgeklärt. In dem Lehrbuch von Oppenheimer⁽¹⁾ finden wir z. B. nur über die Leukoprotease nähere Angaben, bei den anderen Fermenten wird nur im allgemeinen auf die Wahrscheinlichkeit ihres eventuellen Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins in den Leukocyten hingewiesen.⁽²⁾

Indessen sind aber diese Fragen von ungeheurem Interesse, einerseits wegen der wichtigen Rolle, welche die Leukocyten im Leben, sowohl des normalen, wie des kranken Organismus spielen, und andererseits wegen der Bedeutung, welche den fermentativen Prozessen augenscheinlich bei den vielseitigen Funktionen der Leukocyten zukommt. So tritt z. B. in den letzten Jahren, dank den Arbeiten von Metalnikoff,⁽³⁾ Bergell,⁽⁴⁾ Fiessinger und Marie⁽⁵⁾ die interessante Rolle der Lipase bei der tuberkulösen Infektion hervor, ebenso wie die interessante Tatsache, daß die Lipase nur in den Elementen des lymphatischen Systems gefunden wird.

Als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen der fermentativen Funktionen der Leukocyten dienten bis jetzt fast ausschließlich derartig komplizierte Substrate, wie Eiter, Exsudate, leukämisches Blut und verschiedene Organe (Lymphdrüsen, Milz, Knochenmark). Nur Mancini⁽⁶⁾ benutzte isolierte, vom Pferde gewonnene Leukocyten.

In der vorliegenden Arbeit, welche ich auf Anregung und unter der Leitung von Frau Dr. Sieber-Schumowa ausführte,

untersuchte ich isolierte Leukocyten vom Hunde auf ihren Gehalt an einigen Fermenten. Zu diesem Zwecke wählte ich gerade Hunde, weil diese augenscheinlich, den Eigenschaften ihrer Leukocyten nach, dem Menschen näher stehen, als alle anderen Tiere mit Ausnahme des Affen; wie bekannt besitzen nur Mensch, Affe und Hund Leukocyten mit echten neutrophilen Granula und nur hier erscheinen die polynukleären Leukocyten als Träger des proteolytischen Fermentes.¹⁾

Meine Untersuchungen wurden an vier vollkommen gesunden Hunden angestellt; nur der Hund Nr. 1 unterschied sich von den anderen dadurch, daß ihm im Verlauf von 5 Monaten 60,4 g reines *Natr. nucleicum* (Merck) in allmählich ansteigenden Dosen intraperitoneal eingeführt worden wären, wobei die letzte Injektion zu 18,15 g drei Tage vor dem Tode des Tieres (durch Verblutung) stattfand.

Um die Leukocyten rein und in größerer Menge darzustellen, bediente ich mich des Klingschen Verfahrens mit einer kleinen Modifikation.⁽⁷⁾ Den Hunden wurde ein positiv chemotaktisch wirkendes, selbstverständlich vorher sterilisiertes Gemenge von Aleuronat mit Weizen- und Kartoffelmehl in die Pleurahöhle eingeführt; die von mir dabei beobachteten Tatsachen allgemeinen Charakters erlaube ich mir an dieser Stelle kurz anzuführen.

Alle Hunde reagierten schon nach Ablauf von 3–4 Stunden nach der Injektion mit Temperaturerhöhung (bis zu 40° C.) und deutlicher Störung des Allgemeinbefindens: die vorher munteren und gesunden Hunde wurden apathisch, matt, reagierten fast gar nicht auf die Umgebung (sogar auf Schmerzempfindungen erfolgte fast keine Reaktion), sie verloren den Appetit und machten überhaupt einen schwerkranken Eindruck. Im Blute der Tiere wurde während dieser Zeit Hypoleukocytose konstatiert, wobei die Leukocytenzahl sich, im Vergleich mit dem Befund vor der Injektion, um 2000–4000 Leukocyten verminderte. Am nächsten Tage war das Befinden ein wenig besser, wenn auch noch stark alteriert; Temperatur gegen 39,0

¹⁾ Übrigens fand Mancini (loc. cit.) in den Leukocyten des Pferdes ein proteolytisches Zymogen.

bis $39,5^{\circ}$ C.: im Blute immer noch Hypoleukocytose nachweisbar mit Ausnahme von einem Fall (Hund Nr. 2), wo während dieser Zeit eine ausgesprochene Hyperleukocytose bestand (Steigerung der Leukocytenzahl von 7950 auf 31850). Nach der zweiten Injektion wurde wieder Verschlimmerung des Befindens, wieder Temperaturerhöhung und von neuem Hypoleukocytose beobachtet (bei dem Hunde Nr. 3 fiel die Leukocytenzahl bis auf 3900).

Die soeben erwähnten Erscheinungen erinnern sehr an das Krankheitsbild bei Infektionskrankheiten (wie bekannt, wird in dem Anfangsstadium jeder Infektion gleichfalls Hypoleukocytose beobachtet). Unwillkürlich drängt sich der Gedanke auf, daß das klinische Bild einer beliebigen Infektionskrankheit (in bezug auf Temperatur, Blutveränderung, subjektives Befinden) in letzter Linie nicht durch die Art der Infektion, sondern durch den, natürlich von der Infektion abhängigen Charakter der Reaktion des Organismus bedingt wird; es kommt also dabei auf den Charakter der Prozesse und Schutzkräfte an, deren sich der Organismus im gegebenen Falle für die Wiederherstellung des gestörten Gleichgewichtes bedient.

Methode der Gewinnung von Leukocyten und ihren Extrakten.

Das obengenannte Aleuronatgemenge (in unserem Falle 5%ig) wurde zu je 20—40 ccm (je nach Größe des Tieres) in eine der Pleurahöhlen, meist in die rechte, eingeführt. Nach den Erfahrungen unseres Laboratoriums besteht der Vorzug der Pleurahöhle vor der Peritonealhöhle (Kling), wenigstens bei großen Tieren (Hund, Schaf) darin, daß das Exsudat in ersterer vollkommen zugänglich ist und leicht beinahe quantitativ gesammelt werden kann. Etwa nach 20 Stunden wurde die Injektion in der gleichen oder in einer etwas kleineren Dosis wiederholt und 4 Stunden nach der zweiten Injektion das Exsudat entnommen. Die Erfahrungen unseres Laboratoriums lehren, daß die besten Resultate in quantitativer Beziehung bei Entnahme des Exsudates 3—4 Stunden nach der 2. Injektion erzielt werden.

Nach Eröffnung der Pleurahöhle wurde das Exsudat in

situ mit 1% Natr. citricum enthaltender physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und dann mittels Siphon in einem Kolben oder Zylinder gesammelt, wobei die Pleurahöhle mehreremal mit der genannten Flüssigkeit durchgespült wurde. Am nächsten Tage wurde die Flüssigkeit von den zu Boden gesunkenen Leukocyten entfernt und letztere von den ihnen noch anhaftenden Flüssigkeitsresten durch Zentrifugieren und mehrfaches Auswaschen mit physiologischer Kochsalzlösung befreit.

In drei Fällen (von vier) enthielt das Exsudat eine größere oder geringere Beimengung von Blut. Die Befreiung davon gelang in diesen Fällen nur durch mehrfaches (bis zu 10—15 mal) und kurzdauerndes (nicht länger als 1 Minute) Zentrifugieren und Auswaschen mit physiologischer Kochsalzlösung. In dieser Beziehung bestätigt mein Versuch vollkommen die Angaben von Mancini (l. c.).

Auch in der Pleurahöhle, in welche keine Injektion erfolgt war, wurde stets ein, wenn auch quantitativ geringeres Exsudat vorgefunden. Die von mir ausgeführte Zählung der Leukocyten in diesen Exsudaten ergab in derjenigen Pleurahöhle, in welche eine Injektion stattgefunden hatte, gegen 60000—70000 Leukocyten im Kubikzentimeter; in der intakten Pleurahöhle schwankten die Zahlen zwischen 32 750—131 700.

Die Menge der so gewonnenen Leukocyten schwankte bei den einzelnen Hunden, unabhängig von der Größe derselben, bedeutend. Die Hunde wogen 9—14 kg, die Menge der von ihnen gewonnenen Leukocyten schwankte aber zwischen 3,0—30,0 g. (Beim Hunde Nr. 1 — 10,0 g, bei Nr. 2 — 4,5 g, bei Nr. 3 — 3,0 g und bei Nr. 4 — 30,0 g.) Die letzte der angeführten Zahlen entspricht derjenigen Menge von Leukocyten, welche aus 30 l Pferdeblut gewonnen werden kann (Mancini, l. c.) — ein Umstand, der zugunsten der beschriebenen Methode der Leukocytengewinnung spricht.

Die ausgewaschenen Leukocyten stellen eine weißlich-graue, dickflüssige und zähe Masse dar, die sich bei Untersuchung an gefärbten Ausstrichpräparaten als fast ausschließlich aus polymorphkernigen Zellen erweist; die vereinzelt vorgefundenen Lymphocyten können im Vergleich mit der ganzen Masse

nicht in Betracht kommen; alle Untersuchungsergebnisse müssen daher auf die polymorphkernigen Leukocyten bezogen werden.

Um die in den Leukocyten enthaltenen Fermente in Lösung überzuführen, bereitete ich aus denselben nach der bekannten Methode mittels Gefrierenlassen und wieder Auftauen einen wässrigen Extrakt im Verhältnis von 1 : 10, wobei der erforderliche Grad der Zerstörung der Leukocyten an gefärbten Präparaten kontrolliert wurde. In diesen Extrakt wurde darauf NaCl in einem der physiologischen Kochsalzlösung entsprechenden Verhältnis hinzugefügt, der Rest der Leukocyten mittels Zentrifugierens entfernt und der durchsichtige etwas opaleszierende Extrakt als Ausgangsmaterial für alle weiteren Untersuchungen benutzt.

An dieser Stelle sei bemerkt, daß bei allen Manipulationen, die in dieser Arbeit beschrieben und erwähnt werden, selbstverständlich alle Vorsichtsmaßregeln ergriffen wurden, um eine Verunreinigung des zu untersuchenden Materials zu verhüten. Alles benutzte Geschirr, Wasser und Lösungen wurden vorher sterilisiert. Als Antiseptica wurden Chloroform und Toluol verwendet. Die Kontrollversuche wurden, wo erforderlich, mit Extrakt, der während 5 Minuten auf dem Drahtnetz gekocht hatte, angestellt.

Meine Untersuchungen bezogen sich auf folgende Fermente: Protease, Amylase, Diastase (Dextrinase), Katalase, Lipase, Nuclease und Oxydase.

Protease.

Daß die neutrophilen Leukocyten bei einigen Tieren als Träger des proteolytischen Fermentes erscheinen, ist eine zurzeit fest begründete Tatsache; meine Untersuchungen an isolierten Leukocyten vom Hunde stehen damit in vollkommener Übereinstimmung.

Das Vorhandensein und die digestive Energie des Fermentes bestimmte ich 1. nach der bekannten Methode von Gross-Fuld und außerdem 2. aus der Differenz in der Menge des nicht durch Essigsäure fällbaren Eiweißes in Parallelportionen mit lebendem und abgetötetem Ferment; die Eiweißbestimmung wurde am Filtrat durch Verbrennung nach Kjeldahl vorgenommen.

Versuchsdauer in beiden Fällen 24 Stunden. Temperatur 40° C., Versuchsobjekt 2‰ige Caseinlösung.

Nach der Methode von Gross-Fuld erhielt ich folgende Resultate:

Hunde	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4
Die zur vollständigen Verdauung von 2 ccm Casein erforderliche Extraktmenge aus Leukocyten in ccm	0,25	0,25	0,16	0,16
Caseinmenge in ccm, welche durch 1 ccm Extrakt verdaut werden kann	8	8	12,5	12,5

Folglich ist 1 g Leukocyten¹⁾ imstande, im Verlauf von 24 Stunden bei einer Temperatur von 40° C. durchschnittlich 102,5 ccm einer Caseinlösung oder 205 mg Casein zu verdauen.

Bei Bestimmung der Proteasewirkung aus der Menge des nicht durch Essigsäure fällbaren Eiweißes war das Resultat gleichfalls ein positives und die Differenz in der Menge des nach Kjeldahl bestimmten N in der Versuchsportion einerseits und der Kontrollportion anderseits stets deutlich.

Zur Illustration führe ich folgende Zahlen an (Hund Nr. 4).

Hund Nr. 4	mg N in 7 ccm Filtrat		mg N in der ganzen Menge		Differenz in mg N	Die entsprechende Differenz in mg Eiweiß
	Versuch	Kontrolle	Versuch	Kontrolle		
0,5 ccm Extrakt + 9,5 ccm Casein	2,1	1,1	3,0	1,6	1,4	8,75
0,1 ccm Extrakt + 9,9 ccm Casein	1,6	1,0	2,3	1,4	0,9	5,625

Das heißt, 1 g Leukocyten ist imstande, bei oben erwähnten Verhältnissen 175,0—562,5 mg Eiweiß zu verdauen.

Bei diesen Verdauungsversuchen waren die Resultate im allgemeinen die gleichen, gleichviel, ob der gewöhnliche oder ein erst im Verlauf einer halben Stunde bei einer Temperatur

¹⁾ d. h. die Menge des Extraktes, welche 1 g Leukocyten entspricht.

von 50° C. erwärmtes Extrakt verwendet wurde. Folglich erklärt sich die optimale Wirkung der Leukoprotease bei der genannten Temperatur bei Verwendung von Blut, Organen und ähnlichem Material als Fermentquelle wahrscheinlich nicht durch eine direkte Aktivierung des Fermentes, sondern entweder durch ein Freiwerden desselben aus den bei dieser Temperatur zerfallenden Leukocyten oder aber durch eine Zerstörung irgendwelcher thermolabiler, die Verdauung behindernder Substanzen. (8)

Amylase und Diastase.

Gewöhnlich werden diese Benennungen als Synonyma zur Bezeichnung eines und desselben, der Verwandlung von Stärke in Zucker dienenden Fermentes gebraucht. Auch die zwei Arten der quantitativen Bestimmung dieses Fermentes, sowohl die kolorimetrischen Methoden, denen die Jodreaktion auf Stärke zugrunde liegt, wie diejenigen, die auf der Bestimmung des sich bildenden Zuckers beruhen, gelten als gleichwertig zur Bestimmung dieses Fermentes, eine Differenz zwischen denselben soll nur in bezug auf Genauigkeit und Bequemlichkeit der Ausführung bestehen. (9, 10)

Wenn wirklich mit beiden Methoden die Wirkung eines und desselben Fermentes bestimmt wird, so müssen bei Untersuchung gleicher Organe beim gleichen Tiere ungefähr parallele Resultate erzielt werden und die Abweichungen davon dürfen nicht das Maß der der Methode anhaftenden Fehlerquellen überschreiten. Wir sehen indessen bei gleichzeitiger Bestimmung der diastatischen Wirkung von Organen einerseits nach Wohlgemuth⁽¹⁰⁾ und andererseits aus der Menge des aus Stärke gebildeten Zuckers, daß ein solcher Parallelismus meist nicht besteht und im Gegenteil oft eine ausgesprochene Inkongruenz beobachtet wird, wie wir dies an dem großen Material von Aljoschin⁽¹¹⁾ erkennen und wie auch ich an einer Reihe eigener Untersuchungen konstatieren konnte.

In Anbetracht dieser Tatsachen neige ich zu der Ansicht, daß zwei Fermente an dem Prozeß der Verwandlung von Stärke in Zucker teilnehmen: (12) die Amylase, welche Stärke in Dextrin verwandelt und nach der Methode von Wohlgemuth

bestimmt wird, und die eigentliche Diastase (oder richtiger Dextrinase), welche Dextrin in Zucker überführt und aus der Quantität des letzteren bestimmt wird.

Weiter unten führe ich die an Leukocyten sowohl nach der einen wie nach der anderen Methode gewonnenen Resultate an und auch hier läßt sich wieder der obengenannte Mangel eines Parallelismus konstatieren.

Für die Annahme, daß die Leukocyten ein amylytisches oder diastatisches Ferment enthalten, sprechen sich eine ganze Reihe von Autoren mit größerer oder geringerer Bestimmtheit aus, so Berestnew, Castellino und Paracca, Achalme, Zabolotny, Tarchetti, Haberlandt, Mancini.⁽¹³⁾

Zur Bestimmung der Amylase bediente ich mich der Methode von Wohlgemuth mit der kleinen Abänderung, daß zum Titrieren statt einer $\frac{1}{10}$ -n-Jodlösung eine $\frac{1}{100}$ -n-Jodlösung (2 Tropfen auf 1 Reagenzglas) verwendet wurde. Versuchsobjekt: *Amylum solubile* (Kahlbaum). Versuchsdauer 1 Stunde. Temperatur 40° C. (im Wasserthermostaten).

Die amylytische Wirkung des Leukocytenextraktes war bei allen 4 Hunden die gleiche (ein geringer Unterschied bestand nur in der Intensität der violetten Färbung des limes — Reagenzglases) und betrug in der von Wohlgemuth vorgeschlagenen Einheit $D_{60}^{40^{\circ}} = 12,5$, d. h., 1 g der Leukocyten ist imstande, im Verlaufe einer Stunde bei einer Temperatur von 40° C. 125 ccm einer 1%igen Stärkelösung oder 1,25 g reiner Stärke zu verdauen.

Zur Bestimmung der Diastasewirkung wurden die Experimente in folgender Weise angelegt: Ein Gemenge von 1 ccm Extrakt, das mit Wasser bis zu 10 ccm verdünnt war, und 10 ccm einer 1%igen Stärkelösung wurden auf 24 Stunden bei einer Temperatur von $37,5^{\circ}$ in den Thermostaten gebracht. Nach Ablauf dieser Zeit wurde darin nach der Methode Lehmann-Riegler⁽¹⁴⁾ die entstandene Zuckermenge bestimmt (in den Kontrollversuchen waren nur Spuren einer Reduktion mit Fehlingscher Lösung zu konstatieren).

Hunde	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4
Die 1 ccm Extrakt entsprechende Zuckermenge in mg	9,9	25,05	13,7	8,7
Die 1 g Leukocyten entsprechende Zuckermenge in mg	99	250,5	137	87

Folglich ist 1 g Leukocyten imstande, aus Stärke bei oben angegebenen Verhältnissen durchschnittlich 143,4 mg Zucker zu bilden.¹⁾

Katalase.

In bezug auf den Katalasegehalt der Leukocyten existieren, soviel mir bekannt, keine speziellen Untersuchungen. Nur Batelli und Stern sprechen sich in einer ihrer Arbeiten (bei Berührung der Frage über die Verteilung der Katalase in den verschiedenen Blutelementen) auf Grund indirekter Beobachtungen dahin aus, daß dieses Ferment in den polynucleären Leukocyten nicht in merklichen Mengen enthalten sei; die Lymphe und die Lymphocyten seien folglich fast ganz frei von Katalase.⁽¹⁵⁾

Bei der Bestimmung der Katalase bediente ich mich der allgemein bekannten Kaliumpermanganatmethode. Als Versuchsobjekt diente 1%ige Wasserstoffsuperoxydlösung (Merck). Versuchsdauer 15 Min. Temp. 37,5° C. Der Versuch wurde in folgender Weise angelegt: wir nahmen 0,5—1,0 ccm (mit sterilem Wasser auf 10 ccm verdünnten) Extrakt auf 10—20 ccm einer 1%igen H₂O₂-Lösung. Nach Ablauf der Versuchsdauer wurde 1 ccm dieser Mischung in saurer Lösung (H₂SO₄) mit 1/50-n-Lösung von KMnO₄ (1 ccm = 0,00034 g H₂O₂) titriert. Nun ist es leicht, falls man vorher den Titrationsgrad der 1%igen H₂O₂-Lösung kennt, die Menge des gespaltenen H₂O₂ auf 1 ccm Extrakt und auf 1 g Leukocyten zu berechnen.

¹⁾ Nur in einem Falle, leider, prüfte ich an zwei Parallelportionen mittels der Polarisationsmethode die Wirkung des Leukocytenextraktes auf 2%ige Traubenzuckerlösung (im Verhältnis von 1 : 10) bei einer Temperatur von 37,5° C.: es erwies sich, daß der Ablenkungswinkel der Polarisationsenebe sogar nach 60 Stunden unverändert geblieben war.

Hunde	Die Menge des gespaltenen H_2O_2 , welche 1 ccm Extrakt entspricht	Dasselbe entsprechend 1,0 g Leukocyten	Die entsprechende Menge O_2 in ccm bei 0° und 760 mm auf 1,0 g Leukocyten
Nr. 1	81,6	816	268,5
» 2	69,6	696	229
» 3	129,2	1292	425,2
» 4	99,96	999,6	325

Im Durchschnitt ist folglich 1,0 g Leukocyten imstande, im Verlauf von 15 Minuten bei einer Temperatur von $37,5^\circ C$. eine Menge von 950,9 mg H_2O_2 zu spalten oder, mit anderen Worten, daraus 312,9 ccm O_2 in Freiheit zu setzen.

Vergleicht man diese Zahlen mit dem Katalasegehalt des Blutes, wo 1,0 g nach meinen Beobachtungen unter denselben Bedingungen gegen 1400 mg H_2O_2 (467 ccm O_2) spaltet, so kommt man zu dem Schlusse, daß die Leukocyten eine relativ hohe katalytische Wirkung besitzen: wir wissen ja, daß das Blut zu den besonders an Katalase reichen Geweben gehört.

Lipase.

Mancini⁽⁶⁾ konnte Lipase an isolierten Leukocyten vom Pferde (bei Prüfung an Mandelölemulsion) keine deutliche lipolytische Wirkung konstatieren.

Bergell,⁽⁴⁾ Fiessinger und Marie⁽⁵⁾ kommen auf Grund ihrer hauptsächlich an tuberkulösen Exsudaten und Eiter, ferner an Milz und Lymphdrüsen einiger Tiere angestellten Untersuchungen zum Schlusse, daß die Lipase ein ausschließlich dem lymphatischen Apparat angehöriges Ferment darstellt und in den polynucleären Leukocyten nicht enthalten ist.

Bei meinen Untersuchungen auf Lipase dienten mir sowohl künstliche wie natürliche Fette als Versuchsobjekte. Als Vertreter der ersten Gruppe benutzte ich Monobutyryn und Äthylbutyrat, als Vertreter der zweiten Gruppe Olivenöl und Butter. Jeder Versuch war von einer Kontrollprüfung an abgekochtem Extrakt begleitet. Aus der Differenz in der Acidität der Versuchsportion einerseits und der Kontrollportion andererseits schloß man auf Vorhandensein und Energie des Fermentes.

Der Versuch selbst wurde in folgender Weise ausgeführt:

Extrakt 1—2 ccm; 10 ccm einer 1%igen Lösung eines künstlichen Fettes; Olivenöl 0,5 ccm; Butter 0,1 g. Die Gesamtmenge der Mischung wurde mittels sterilen Wassers auf 30 ccm gebracht. Versuchsdauer 24 Stunden; Temperatur 37,5° C. Die Titration erfolgte mit $\frac{1}{100}$ n-Kalilauge; als Indikator diente Phenolphthalein.

Das Resultat war in allen vier Fällen, trotz mehrfach wiederholter Untersuchung, ein vollkommen negatives.

Ein solches Resultat könnte aber nicht nur durch wirkliche Abwesenheit des Fermentes, sondern auch dadurch bedingt sein, daß sich das Ferment im gegebenen Falle in inaktivem Zustand befindet.

Um möglichst der Lösung dieser Frage näher zu treten, stellte ich einige Versuche bei Gegenwart von mangansauren Salzen (MnO , $MnSO_4$) an, diese erhöhen, wie bekannt, die Tätigkeit der Lipase (Aktivierung?)⁽¹⁶⁾. Das Resultat war gleichfalls negativ.

Die eben angeführten Tatsachen geben uns, wie mir scheint, das Recht, mit Bestimmtheit zu behaupten, daß die polymorphkernigen Leukocyten vom Hunde keine Lipase enthalten,

Nuclease.

In betreff der Nuclease der Leukocyten fand ich in der mir zugänglichen Literatur keinerlei Angaben.

Dieses Ferment wurde von mir nach zwei Methoden untersucht: nach der kürzlich von Pighini⁽¹⁷⁾ vorgeschlagenen optischen Methode in allen 4 Fällen und außerdem in 2 Fällen auf chemischem Wege.

I. Die Nucleinsäure dreht, wie bekannt, die Polarisations-ebene nach rechts; bei Spaltung der Säure werden ihre optischen Eigenschaften verändert, der Ablenkungswinkel wird kleiner und aus der Änderung dieses Winkels kann man auf Vorhandensein und Stärke der fermentativen Wirkung schließen. Als Versuchsobjekt diente mir eine 2%ige Lösung von Nucleinsäure der Pariser Firma Le Prince. Als Polarisationsapparat benutzte ich das Polarimeter von Schmidt und Haensch. Die Länge der Röhre betrug 10 ccm. Das Verhältnis des Extraktes zur Nucleinsäure war 1 : 10.

In allen Kontrollversuchen (Nucleinsäure ohne Extrakt, Extrakt ohne Nucleinsäure und Nucleinsäure mit abgekochtem Extrakt) änderte sich der Ablenkungswinkel nicht während der Versuchszeit (nicht länger als 24 Stunden).

Von einer ganzen Reihe von Untersuchungen, die nach der optischen Methode ausgeführt wurden und bei mehrfacher Wiederholung im allgemeinen ein identisches Resultat ergaben, führe ich im folgenden je eine Untersuchung für jeden Fall als Beispiel an.

Zur größeren Anschaulichkeit gebe ich auch die nach dem Gesetz von Schütz-Borissow⁽¹⁸⁾ berechnete Konstante an.

Hund	Versuchsdauer in Minuten t	Der zu Anfang beobachtete Ablenkungs- winkel	Der gefundene Ablenkungs- winkel	Differenz x	$k = \frac{x}{t}$
Nr. 1	1080	2°	1° 40'	0° 20'	0,6084
» 2	840	2° 10'	1° 50'	0° 20'	0,6900
» 3	1080	2° 15'	1° 30'	0° 45'	1,3690
» 4	1440	2° 15'	1° 35'	0° 40'	1,0540

Aus diesen Angaben folgt mit Gewißheit, daß die Nucleinsäure durch Leukocytenextrakt gespalten wird.

II. Auf chemischem Wege wurde die fermentative Energie der Leukocyten aus der Menge des durch Nuclease in Freiheit gesetzten anorganischen Phosphors berechnet. Der Phosphor wurde nach Stutzer-Neumann⁽¹⁹⁾ bestimmt. Versuchsobjekt: Natrium nucleinic. (Merck) zu 0,5—1,0 g in ungefähr 2%iger Lösung. Versuchsdauer 24 Stunden. Temperatur — 37,5° C.

Nach dieser Methode wurde die fermentative Energie der Leukocyten beim Hunde Nr. 1 an 5 ccm Extrakt und beim Hunde Nr. 4 an 0,5 g Leukocyten per se bestimmt.

Hunde	Die gefundene Menge P ₂ O ₅ in mg entspricht 0,5 g Leukocyten			Die Menge P ₂ O ₅ in mg entspricht 1,0 g Leukocyten Differenz
	Versuch	Kontrolle	Differenz	
Nr. 1	40,29	18,45	21,84	43,68
» 2	23,10	9,86	13,24	26,48

Folglich ist 1,0 g Leukocyten vom Hunde Nr. 1 (welchen, wie oben angegeben, Natr. nucleinic. zugeführt wurde) imstande, im Verlauf von 24 Stunden bei einer Temperatur von $37,5^{\circ}$ C. eine Menge von 43,68 mg P_2O_5 aus Nucleinsäure in Freiheit zu setzen, während 1,0 g Leukocyten vom Hunde Nr. 4 während derselben Zeit und unter den gleichen Versuchsbedingungen nur 26,48 mg P_2O_5 in Freiheit setzt.

Die energischere Spaltung der Nucleinsäure durch die Leukocyten des Hundes Nr. 1 erklärt sich aller Wahrscheinlichkeit nach durch eine Verstärkung der Leukocytenuclease unter dem Einfluß der wiederholten Einführung von Nucleinsäure in den Organismus.

Zum Vergleich mit der Wirkung der Leukocytenuclease führe ich im folgenden einige Zahlen an, die bei anderen, von mir angestellten Versuchen gewonnen wurden und zur Charakterisierung der nucleinspaltenden Tätigkeit einiger anderer Organe des normalen Hundes dienen. Diese Zahlen sind gleichfalls auf 1,0 g frisches Organ berechnet.

Knochenmark	Thymus	Pankreas
23,56 mg P_2O_5	16,42 mg P_2O_5	8,68 mg P_2O_5

Vergleicht man diese Zahlen mit denjenigen, die aus der Untersuchung der Leukocyten resultieren, so scheint (so weit man aus dieser geringen Zahl von Beobachtungen schließen darf) die Annahme gerechtfertigt, daß die Nuclease der polymorphkernigen Leukocyten eine relativ größere Aktivität besitzt.

Beim Vergleich der nach der optischen und der chemischen Methode für die Leukocyten des Hundes Nr. 1 und 4 gewonnenen Untersuchungsergebnisse fällt die ausgesprochene Inkongruenz derselben auf: möglicherweise handelt es sich hier um verschiedene Seiten eines komplizierten fermentativen Prozesses, welche durch die eine und die andere Untersuchungsmethode aufgeklärt werden.

Oxydase.

Über die oxydierenden Fermente der Leukocyten herrschen in der Literatur große Meinungsverschiedenheiten: während die einen, wie z. B. Brandenburg,⁽²⁰⁾ Meyer,⁽²¹⁾ eine Eiteroxydase nachweisen, finden andere wie Linossier,⁽²²⁾ Czyhlarz

und Fürth⁽²³⁾ darin Peroxydase, Winkler⁽²⁴⁾ und Schultze⁽²⁵⁾ wiesen Oxydase auf mikroskopischem Wege mit dem Röhmann-Spitzerschen Reagens nach, ebenso Mancini⁽⁶⁾ an isolierten Leukocyten vom Pferde, letzterer konnte aber mit anderen Reagenzien weder Oxydase noch Peroxydase darin entdecken.

Zur Bestimmung der oxydierenden Fermente in den Leukocyten des Hundes bediente ich mich der bekannten Reaktionen mit frisch zubereiteten: Guajakharztinktur, 1%iger Lösung von Guajakol und des Röhmann-Spitzerschen Reagens.

Ich prüfte sowohl auf Oxydase wie auf Peroxydase (nach der Terminologie von Bach und Chodat), in letzterem Falle wurden in das Reagenzglaschen einige Tropfen einer 3%igen Wasserstoffsuperoxydlösung (Merck) gebracht.

Je nach den Versuchsbedingungen zerfällt mein Material in zwei verschiedene Gruppen mit verschiedenen Resultaten.

Die Leukocytenextrakte von den Hunden Nr. 1, 2 und 3 wurden erst nach Ablauf von 2—4 Wochen nach der Herstellung untersucht (Aufbewahrung in der Kälte unter aseptischen und antiseptischen Kautelen). In allen 3 Extrakten wurde eine vollkommen deutliche Reaktion auf Peroxydase, aber keine Spur Oxydase konstatiert.

Das Extrakt vom Hunde Nr. 4 wurde sofort nach der Herstellung untersucht und in demselben weder Peroxydase noch Oxydase nachgewiesen.

Mir scheint, daß diese, einander scheinbar widersprechenden, Resultate in Übereinstimmung gebracht werden können, wenn man annimmt, daß das Resultat durch verschiedene die Oxydation hemmende Momente beeinflußt werden kann, wie z. B. durch die Anwesenheit sogenannter Reduktasen⁽²⁶⁾: vielleicht vermögen diese, falls sie in größeren Mengen im frisch zubereiteten Leukocytenextrakt vorhanden sind, den oxydierenden Prozessen entgegenzuwirken. Wenn dann im Laufe der Zeit die Reduktionsprozesse aufhören, kann man die in den Leukocyten enthaltene Peroxydase nachweisen. Zugunsten einer solchen Annahme spricht unter anderem der Umstand, daß die blaue Färbung der Guajakharz-

tinktur in den obengenannten Versuchen noch nach 2 Stunden wenig an Intensität eingebüßt hatte.

Vielleicht erklärt das Hinzutreten dieser noch wenig erforschten Prozesse zum Teil die Meinungsverschiedenheiten, welche in der Literatur in bezug auf die oxydierenden Fermente herrschen.

In demselben Maße, wie das Studium der fermentativen Prozesse im allgemeinen und der einzelnen Fermente im speziellen sich erweitert und vertieft, werden immer neue Tatsachen, immer neue Seiten der vielseitigen fermentativen Tätigkeit entdeckt. Ich möchte wenigstens auf folgende in der letzten Zeit aufgeworfene Fragen hinweisen, wie die Rolle der Lipase bei den hämolytischen Prozessen und bei dem Kampf des Organismus mit den säurefesten Bakterien, ferner auf die Frage über die antitoxische Wirkung der Katalase.⁽²⁷⁾

Die ausgesprochene Befähigung der Leukocyten zu vielseitiger und intensiver fermentativer Betätigung, die aus den angeführten Tatsachen hervorgeht, einerseits und die Vielseitigkeit der Fermente andererseits lassen uns die allgemein anerkannte Bedeutung der Leukocyten im Leben des Organismus noch verständlicher erscheinen.

Da der erwachsene Mensch gegen 25000 Millionen weißer Blutkörperchen besitzt, welche, an einer Stelle angesammelt, die Größe eines kompakten Organes von den Dimensionen der Schilddrüse ausmachen würden,⁽²⁸⁾ und da der Organismus in jedem Augenblick an beliebiger Stelle eine beliebige Menge von Leukocyten konzentrieren kann, so kann man sich vorstellen, was für ein mächtiges Werkzeug er bei seinem beständigen Kampfe ums Dasein in solch einer glänzend geschulten Armee besitzt.

Resumee.

Fasse ich nun die Ergebnisse meiner Untersuchungen kurz zusammen, so sehen wir, daß

1. die polynucleären Leukocyten des Hundes als Träger folgender Fermente erscheinen: der Protease, Amylase, Diastase, Katalase, Nuclease und Peroxydase und

2. daß die polynucleären Leukocyten des Hundes gar keine lipolytischen Eigenschaften besitzen.

Literatur.

1. C. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkung, 1910, II, S. 216—222.
2. C. Oppenheimer, loc. cit., I, S. 78.
3. S. Metalnikoff, Biochem. Zeitschrift, 1906, Bd. 1, S. 309.
4. Bergell, Münch. med. Wochenschr., 1909, Nr. 2.
5. Fiessinger et P. Marie, C. rend. de la Soc. de Biol., 1909, Bd. 67, S. 107, 177.
Fiessinger, Revue de la tuberculose, 1910, Bd. 7, S. 177.
6. Mancini, Biochem. Zeitschr., 1910, Bd. 26, S. 140.
7. C. Kling, Zeitschr. f. Immunitätsforschung usw., 1907, Bd. 7, Teil I, S. 1.
8. Müller und Jochmann, Münch. med. Wochenschrift, 1906, Nr. 29.
9. C. Oppenheimer, loc. cit., II, S. 70.
10. Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr., 1908, Bd. 9, S. 1.
11. Aljoschin, Petersburg. Dissert., 1911 (russisch).
12. C. Oppenheimer, loc. cit., II, S. 84—86.
13. Berestnew, Arch. des sciences biolog., 1895, Bd. 3, S. 40 (russisch).
Castellino et Paracca, Arch. italien. de Biologie, 1895, Bd. 23, S. 372.
Achalme, C. rend. de la Soc. de Biol., 1899, Bd. 51, S. 568.
Zabolotny, Russisches Archiv f. Pathol. usw., 1900, Bd. 9, S. 402 (russisch).
Tarchetti, Gazzetta degli osped., 1900, Nr. 90.
Haberlandt, Pflügers Archiv, 1910, Bd. 132, S. 175.
Mancini, l. c. (6).
14. K. Lehmann, Arch. f. Hygiene, Bd. 30, S. 267.
E. Riegler, Zeitschr. f. analytische Chemie, Bd. 37, S. 22.
15. Battelli et Stern, Archivio di Fisiologia, 1905, Bd. 2, S. 471.
16. Hoyer, Zeitschrift f. Physiologie, Bd. 50, S. 414—435, zit. Malys Jahresber., 1907, Bd. 37.
17. G. Pighini, Diese Zeitschrift, 1910, Bd. 70, S. 85.
Derselbe, Biochem. Zeitschrift, 1911, Bd. 33, S. 190.
Siehe gleichfalls C. Neuberg, Biochem. Zeitschr., 1910, Bd. 30, S. 505.
18. G. Pighini, Biochem. Zeitschr., 1911, Bd. 33, S. 190.
19. A. Stutzer, Biochem. Zeitschr., 1908, Bd. 7, S. 471.
A. Neumann, Diese Zeitschrift, 1902, Bd. 37, S. 129.
20. Brandenburg, Münch. med. Wochenschr., 1900, Nr. 6.
21. Meyer, Münch. med. Wochenschrift, 1904, Nr. 35.
22. Linossier, C. rend. de la Soc. de Biol., 1898, Bd. 50, S. 373.
23. Czyhlarz und Fürth, Beiträge zur chem. Physiol. u. Path., 1907, Bd. 10, S. 358.
24. Winkler, Folia haematolog., 1907, Bd. 4, S. 323.
25. Schultze, Zieglers Beiträge, 1909, Bd. 45, S. 127.
26. C. Oppenheimer, l. c., II, S. 391.
27. G. Billard, C. rend. de la Soc. de Biol., 1911, Bd. 70, S. 896.
28. Grawitz, Klinische Pathologie des Blutes, 1911, S. 237.