

Die katalytische Mutation der Ionen Al^{3+} und MoO_4^{2-} im H_2O_2 -Zerfall

Im homogenen H_2O_2 -Zerfall sind Ionen bis auf einige Ausnahmen (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+}) wenig wirksam. Wenn sie aber auf einem entsprechenden Träger die Funktion einer prosthetischen Gruppe übernehmen, so können sie eine beträchtliche Aktivität erlangen, die im günstigsten Fall in den anorganischen Superfermenten¹ ihren Höhepunkt erreicht. Falls man zwei verschiedene Ionen auf der Trägeroberfläche aufträgt, so können sie sich in ihrer Wirkung verstärken oder abschwächen². Schliesslich kann die Reihenfolge, in welcher die beiden Ionen an die Trägeroberfläche gelangen, von Bedeutung sein, wobei die Bildung von verschieden aktiven Dreistoffkatalysatoren (isomeren Oberflächen-Komplexverbindungen) möglich ist. Eine solche katalytische Mutation³ – eine strukturelle Begründung wurde bereits früher gegeben⁴ – trifft auch für die Ionen Al^{3+} und MoO_4^{2-} zu, wenn diese sich auf einem $\text{Cd}(\text{OH})_2/\text{Co}(\text{OH})_2$ -Mischträger befinden. Wie aus der Tabelle ersichtlich, ist das Ionenpaar $\text{Al}^{3+} + \text{MoO}_4^{2-}$ ohne Träger praktisch indifferent im H_2O_2 -Zerfall, und zwar unabhängig davon, ob man zuerst Al^{3+} oder MoO_4^{2-} in das Reaktionsmedium einführt. Auf dem genannten Mischträger hingegen beobachtet man in gut reproduzierbaren Versuchen Mutationserscheinungen: Die Kombination Träger/ $\text{Al}^{3+}/\text{MoO}_4^{2-}$ ist aktiver als die Kombination Träger/ $\text{MoO}_4^{2-}/\text{Al}^{3+}$. Letztere supprimiert sogar den H_2O_2 -Zerfall gegenüber der Eigenwirkung des $\text{Cd}(\text{OH})_2/\text{Co}(\text{OH})_2$ -Trägers; siehe hierzu die für eine

Reaktion erster Ordnung berechneten Geschwindigkeitskonstanten K , die gute Übereinstimmung ergaben (Tabelle). – Den $\text{Cd}(\text{OH})_2/\text{Co}(\text{OH})_2$ -Mischträger gewinnt man durch mechanisches Vermischen der Einzelbestandteile im Mol. Verh. $\text{CdO}:\text{CoO} = 1:1$. Zu diesem Zweck fällt man $\text{Cd}(\text{OH})_2$ und $\text{Co}(\text{OH})_2$ gesondert⁵ aus $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ resp. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung mit 2,3 Mol NaOH bei Raumtemperatur. Die sorgfältig ausgewaschenen Gele werden an der Luft getrocknet und durch Nylongaze (Porendurchmesser 0,12 mm) gesiebt. Der Gesamtwassergehalt des Kadmiumhydroxyds betrug nunmehr 31,5%, der des Kobalthydroxyds 27,5%. Zur Prüfung der katalytischen H_2O_2 -Zersetzung befeuchtet man zunächst 10 mg des Mischträgers gegebenenfalls mit 1 cm³ $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ - und 1 cm³ AlCl_3 -Lösung (1 mg Al^{3+} bzw. 1 mg MoO_4^{2-} enthaltend) in dieser oder in der umgekehrten Reihenfolge. Sodann versetzt man den Mischkatalysator mit 150 cm³ H_2O_2 -Lösung (0,3 prozentig) bei 37° und lässt das Reaktionsgemisch nach einmaligem gründlichem Umschwenken ohne Konvektion bis zum Abschluss der Messungen bei 37° ruhig stehen. In bestimmten Zeitabständen entnimmt man der Lösung 10 cm³-Proben und bestimmt die jeweils vorhandene H_2O_2 -Konzentration manganometrisch.

Summary. The catalytic mutation of the ions Al^{3+} and MoO_4^{2-} on the mixed carrier $\text{Cd}(\text{OH})_2/\text{Co}(\text{OH})_2(\text{Tr})$ is recognizable by the fact that the combination $\text{Tr} + \text{Al}^{3+} + \text{MoO}_4^{2-}$ is more active in the decomposition of H_2O_2 than the combination $\text{Tr} + \text{MoO}_4^{2-} + \text{Al}^{3+}$.

A. KRAUSE, F. DOMKA
und W. SLEZIAK

Die Ionen Al^{3+} und MoO_4^{2-} (je 1 mg) im H_2O_2 -Zerfall bei 37° an 10 mg $\text{Cd}(\text{OH})_2/\text{Co}(\text{OH})_2$ -Mischträger (Tr). Die Zahlenwerte geben den Verbrauch an 0,1 n-KMnO₄ (in cm³) für je 10 cm³ Reaktionslösung

Zeit in min	Tr	Tr + Al^{3+} + MoO_4^{2-}	Tr + MoO_4^{2-} + Al^{3+}	MoO_4^{2-} + Al^{3+} oder umgekehrt	H_2O_2 allein
0	17,6	17,6	17,6	17,6	17,6
60	11,2	10,4	13,3	17,4	17,5
120	7,3	6,2	10,0	17,3	17,4
180	4,6	3,8	7,5	17,1	17,3
$K \cdot 10^3$	7,4	8,7	4,7	–	–
im Mittel					

*Institut für Anorganische Chemie der Universität
Poznan (Polen), 30. November 1963.*

1. A. KRAUSE et al., C. R. mensuels Sé. Acad. polon., Cl. Sci. Math. natur. No. 5–10, 62 (1951); Naturwiss. 48, 693 (1961); 50, 41 (1963).
2. A. KRAUSE, Roczniki chem. (Ann. Soc. chim. polonorum) 27, 9 (1953).
3. A. KRAUSE, C. R. mensuels Sé. Acad. polon., Cl. Sci. Math. natur. No. 5–10, 57 (1951); Actes Ilième Congrès internat. Catalyse, Paris (1960).
4. A. KRAUSE und F. DOMKA, Chem. Ber. 95, 371 (1961).
5. Bei Gemeinschaftsfällung von $\text{Cd}(\text{OH})_2$ + $\text{Co}(\text{OH})_2$ tritt die in der Tabelle beschriebene Mutation kaum hervor. Solche Unterschiede im katalytischen Verhalten von Mischträgern sind oft anzutreffen; vgl. A. KRAUSE und F. DOMKA, Mh. Chem. 94, 793 (1963); Chem. Z. 88, 112 (1961); Naturwissenschaften 51, 133 (1964).

Glutathione Instability in Stored Blood

It was claimed from indirect evidence that the pentose phosphate pathway and the stimulating action of some reversible dyes on its activity decrease in red cells ageing *in vitro*¹ and in stored blood^{2,3}. The diminution of pentose phosphate pathway activity and the decrease of the dye stimulating effect result in inadequate supply of NADPH₂, normally provided by the action of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase, with subsequent fall of GSSG reduction in the NADPH₂ dependent glutathione reductase reaction, and finally in the drop of GSH in the glutathione stability test. These

changes were reported in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency⁴, and they are suggested as a cause of GSH instability described in hypoglycemia⁵, due to the lack of the substrate, and in the blood of new-born

1. J. PALEK, Exper. 19, 305 (1963).
2. J. MİRČEVOVÁ and J. VOŠKOVÁ, Vox sanguinis 6, 179 (1961).
3. R. F. SHEETS, H. E. HAMILTON, and E. L. DEGWON, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 87, 433 (1954).
4. A. R. TARLOV, G. J. BREWER, P. E. CARSON, and A. S. ALVING, Arch. int. Med. 109, 137 (1962).
5. E. HEIMANN-HOLLAENDER, J. BENBASSAT, and J. J. GROEN, Metabolism 11, 245 (1962).

children, supposedly due to the same changes⁶, and in other disorders⁷. A detailed study in stored blood had not up to this time been performed. Therefore, it was considered desirable to study the glutathione stability, the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and pentose production after incubation with glucose and with glucose and methylene blue during blood storage.

Fresh venous blood was put in standard acid-citrate-dextrose solution (containing Na citrici 2.13 g, Acidi citrici 0.74, glucosae 2.0, aquae 100 ml per 450 ml blood) and stored five weeks under standard blood storage conditions at 2-4° in a refrigerator. In the fresh blood and every week of blood storage, the samples were taken for the glutathione stability test, carried out as described by BEUTLER⁸, with the addition of glucose according to SZEINBERG⁹. Simultaneously, the glucose-6-phosphate de-

hydrogenase activity in red cells was determined according to KORNBERG¹⁰, with some modifications, as published in¹¹, and the production of pentose after the incubation of red cells with glucose and with glucose and methylene blue, as described in our previous communication¹.

The results of GSH stability during blood storage are summarized in Figure 1. The GSH content in stored blood decreases, as reported previously¹², and there is a progressive fall in glutathione stability. Between 23-25 days the post-incubation level of GSH falls below the level of 40 mg per 100 ml of packed red cells (3.6 μ M per 1 g of haemoglobin), which is considered as a critical level of GSH stability⁴. The results of pentose production after the incubation of the stored cells with glucose and with glucose and methylene blue are demonstrated in Figure 2. In the incubation mixture of glucose alone, the pentose production increased during the first week of storage, supposedly due to the increased NADPH₂ oxidation in stored blood. Then the progressive fall is demonstrable. In the incubation mixture of glucose and methylene blue, the progressive drop of pentose production corresponds to the decreased glutathione stability in red cells. The determination of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in red cells during blood storage revealed that the activity of this enzyme is not diminished. These results confirm the observations of¹³.

Since we performed the GSH stability test with sufficient glucose supply, the decrease of hexokinase activity in the cell, as a result of ATP fall during the blood storage, with subsequent drop in pentose phosphate pathway activity and of NADPH₂ supply, was considered a cause of GSH instability. In an attempt to confirm this presumption, stored blood 23-38 days old was preincubated with adenosine (5 μ M of adenosine per ml of blood) at 37°

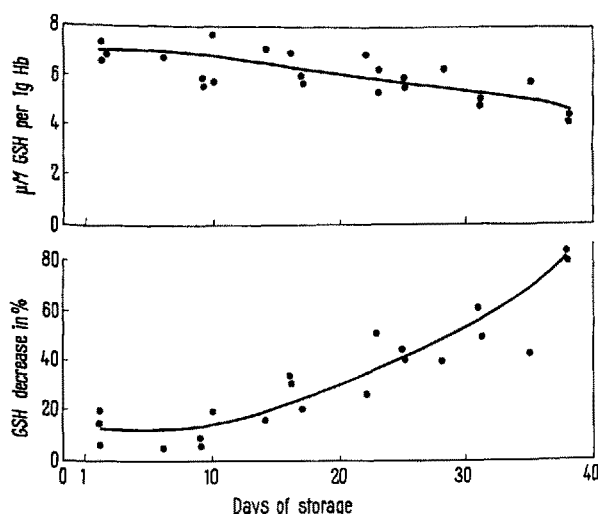


Fig. 1. GSH level in the non-incubated blood (upper Figure) and the decrease of GSH in the GSH stability test. The decrease is expressed in % of the initial GSH value. Four simultaneously stored blood samples.

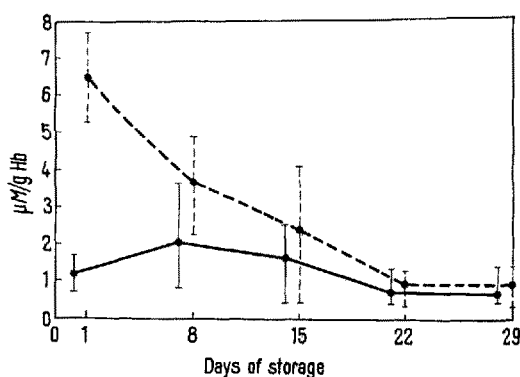


Fig. 2. The pentose production after incubation of red cells with glucose (—) and with glucose and methylene blue (----). Ordinate: μ M of pentoses increase per g Hb during 3 h incubation at 37°. In (—), the incubation mixture contained 0.5 ml packed red cells, 0.5 saline and 0.5 ml of Na, K isotonic phosphate buffer pH 7.4. D-glucose was added up to a final concentration of 1.2 mg per ml of the mixture. In (----), to this mixture was added methylene blue in a concentration of 0.014 mg per ml of the mixture. Average values of five observations.

The effect of adenosine on GSH instability

Days of storage	No adenosine		Preincubation with adenosine	
	A	B	A*	B
38	4.30	82.0%	4.50	14.8%
38	4.16	81.5%	4.52	14.7%
35	5.35	42.5%	5.67	8.1%
23	5.23	50.5%	5.23	16.2%
23	6.13	66.2%	6.38	5.4%

A: The GSH level in μ M per 1 g Hb in stored blood before (A) and after (A*) preincubation with adenosine. B: The decrease of GSH in GSH stability test in % of the initial GSH value.

⁶ A. SZEINBERG, B. RAMOT, C. SHEBA, A. ADAM, I. HALBRECHT, M. RIKOVER, S. WISNIWISKY, and E. RABAN, *J. clin. Invest.* 37, 1436 (1958).

⁷ G. B. THEIL, Ch. E. BRODINE, and P. D. DOOLAN, *J. lab. clin. Med.* 58, 736 (1961).

⁸ E. BEUTLER, *J. lab. clin. Med.* 49, 84 (1957).

⁹ A. SZEINBERG, C. SHEBA, and A. ADAM, *Blood* 13, 1043 (1958).

¹⁰ A. KORNBERG and B. L. HORECKER, *Methods in Enzymology* (New York 1955), vol. 1, p. 722.

¹¹ L. VOLEK, J. PALEK, and R. PAPEŽOVÁ, in press.

¹² C. WAGENKNECHT, *Folia haemat.* 78, 77 (1962).

¹³ Doktorandenkollektiv des Physiologisch-Chemischen Institutes Berlin (1960/61), *Folia haemat.* 78, 352 (1962).

for 3 h. Marked improvement of GSH stability was observed (Table).

The significance of our observations must be further studied. The GSH instability in stored blood can be considered a result of storage lesion of red cells. Its reversal after incubation with adenosine supports the view that the ATP regeneration, which occurs *in vivo* in the stored red cells after transfusion¹⁴, improves greatly GSH stability.

Zusammenfassung. Das Sinken der Glutathionstabilität und der Pentosenbildung nach Inkubation mit Glucose und Glucose mit Methylenblau während der Blutlagerung

wurde beobachtet. Die Glutathioninstabilität kann durch Präinkubation mit Adenosin normalisiert werden.

J. PALEK and VL. VOLEK

*First Medical Clinic, Charles University,
Prague (Czechoslovakia), March 10, 1964.*

¹⁴ B. W. GABRIO, C. A. FINCH, and F. M. HUENNEKENS, *Blood* 11, 103 (1956).

Beobachtungen über das Auftreten von Keratohyalin granula im Zellkern

Das Oesophagusepithel der erwachsenen Ratte ist bis zum Drüsenmagen verhornt. Bereits bei Neugeborenen findet sich im Bereich der Pars cardiaca des Magens eine Verhornung, die in den darauf folgenden Tagen oralwärts fortschreitet und sich schon am 3. Tag *post partum* über den gesamten Oesophagus erstreckt (OEHMKE¹).

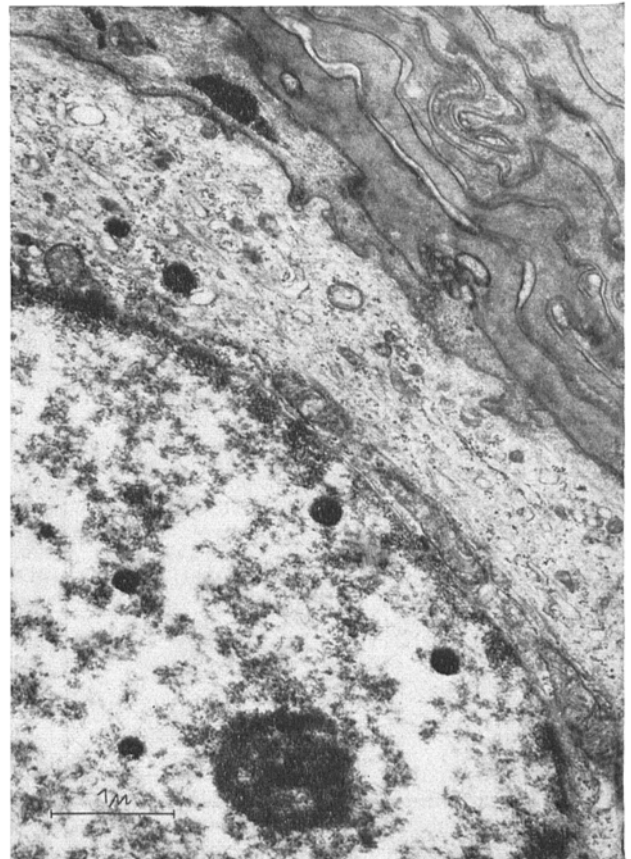
Dieser zeitlich relativ gut verfolgbare Prozess gestattet jeweils die verschiedenen Stadien der Verhornung zu erfassen. Das Keratin derartiger Verhornungen wird in der Literatur als «soft keratin» beschrieben. Der Verhornungsprozess als solcher unterscheidet sich von dem der Epidermis durch das Fehlen des charakteristischen Stratum lucidum.

Der bereits verhornte Epithelverband gliedert sich in 3 Zellgruppen: (1) Basale zylindrische Zellen (Gruppe I), die neben den üblichen normalen elektronenmikroskopisch feststellbaren Zellstrukturen relativ reichlich Ribosomen enthalten. (2) Die mittlere Zellage (Gruppe II) aus zunehmend sich abplattenden, an sich völlig intakten Zellen bestehend, deren Ribosomengehalt jedoch nach oben auffallend abnimmt (etwa 4–6 Zellagen). (3) Die obere Zellage (Gruppe III), aus 4–5 Zellen bestehend, die dem Verhornungsprozess unterworfen sind. Auch hier lassen sich drei verschiedene Gruppen von Zellen unterscheiden, über die im Einzelnen hier nicht berichtet wird.

Die zu beschreibenden Befunde wurden in den oberen Zellen der Gruppe II erhoben, in denen von basal nach apikal gegen die Gruppe III (verhornte Zellen) vermehrt Keratohyalin granula auftreten. Diese finden sich nun ausser im Cytoplasma auch innerhalb der Zellkerne in Form kleiner runder, elektronenmikroskopisch sehr dichter Granula mit einem Durchmesser von etwa 0,1–0,3 μ (teilweise mehr). Ihre Oberflächen sind relativ scharf begrenzt und zeigen einen Hof, der etwa die gleiche Dichte wie das strukturierte Karyoplasma besitzt. Die in diesem Hof auftretenden Strukturen haben keine Ähnlichkeit mit den cytoplasmatischen Ribosomen. Hin und wieder treten solche Granula (etwa 0,1 μ gross) bereits in unmittelbarer Nähe oder sogar im Nucleolus selbst auf, von dem sie sich durch ihre wesentlich dichtere Struktur gut unterscheiden lassen.

Die im Cytoplasma als Keratohyalin granula eindeutig zu identifizierenden Gebilde besitzen elektronenoptisch die gleiche Struktur. Ihre Grössendurchmesser sind sehr verschieden, jedoch entsprechen die kleinsten den im Kern vorkommenden, die grössten betragen etwa 2 μ

(gelegentlich mehr). Ausser durch die zum Teil sehr verschiedenen Grössen unterscheiden sie sich von den intranuclearen durch einen Besatz von Ribosomen, die sich in einer engen Randzone um die dichten, nunmehr meist



Oesophagusepithel Ratte, 3 Tage, oberflächliche Zellen der Gruppe II und Abschnitt der Gruppe III (siehe Text). Intranucleare und intraplasmatische Keratohyalin granula. Vergrößerung: 25 000 fach (nachvergrössert).

¹ H.-J. OEHMKE, 59. Vers. Anat. Ges. München, im Druck (1963).