

# Natürliche und künstliche Granula.

Von

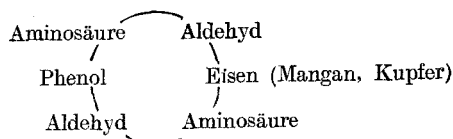
Dr. W. Loele, Dresden.

Mit 1 Tafel.

(Eingegangen am 3. Oktober 1932.)

Auf Grund vergleichender Untersuchungen der granulären Naphtholoxydasen habe ich 1912 diese als Aldehyd-Amidoverbindungen von wahrscheinlich ringförmigem Bau bezeichnet.

Inzwischen ist es gelungen, sowohl Naphtholoxydasen wie Granula im Reagensglase herzustellen nach der Formel



Die linke Seite bildet die Granula, die rechte die Naphtholoxydase. Bis auf den Eisengehalt herrscht gute Übereinstimmung mit der Theorie. In einer Zusammenstellung der Naphtholoxydasen ist über die Beziehungen dieser Stoffe zur Zellstruktur berichtet worden. (Die Phenolreaktion und ihre Bedeutung für die Biologie. 1920.)

Diese Beziehungen sind nach 4 Richtungen hin bemerkenswert:

1. Beziehungen zu lytischen Vorgängen.
2. Beziehungen zur Pigmentbildung.
3. Beziehungen zur eigentlichen Strukturbildung und zur Verschleimung.
4. Beziehungen zur Oxonbindung.

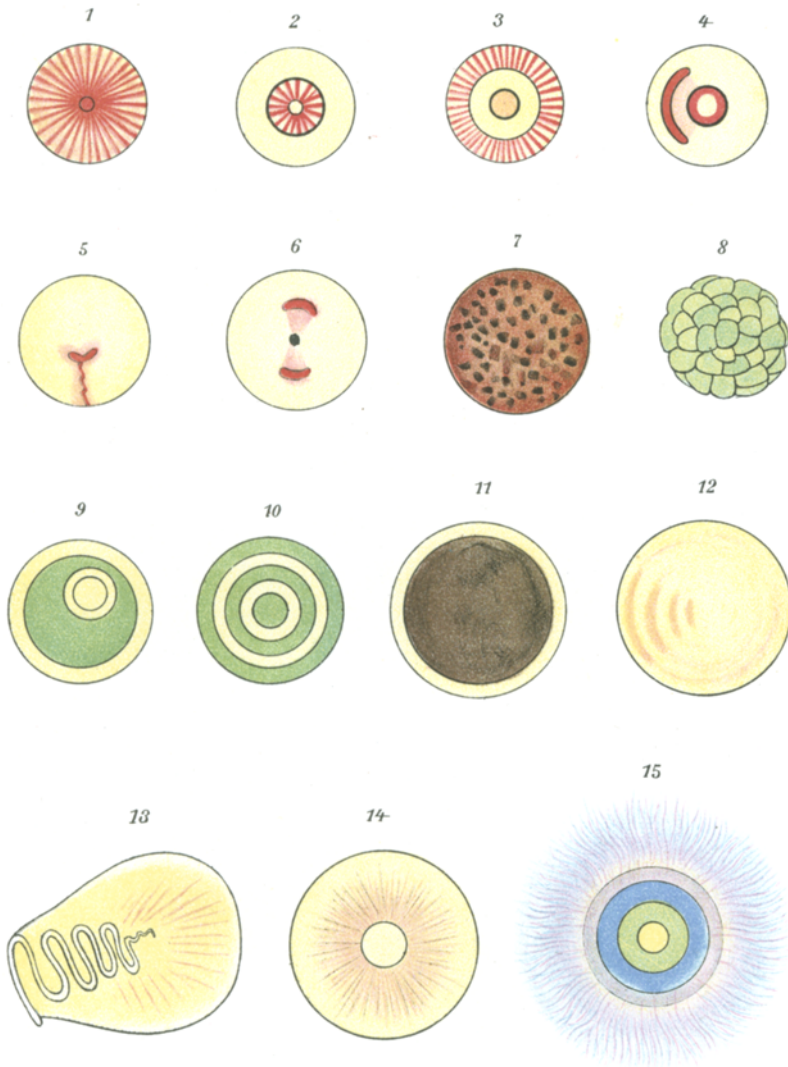
Die letzte Zusammenstellung naphtholpositiver Stoffe ist niedergelegt in *Lubarsch-von Ostertags* Ergebnissen der allgemeinen Pathologie und pathologischen Anatomie, Bd. 24, 1931, Seite 30—42 und 58—62.

Die 4 Beziehungen nun zeigen auch die künstlichen Granula.

Bevor sie besprochen werden, ist es nötig, zu untersuchen, welche Aminosäuren und Phenole mit Aldehyd granulabildend wirken.

Nimmt man als Phenol Phloroglucin, so erhält man große Granula mit folgenden Aminosäuren:

Glykokoll, Alanin, Asparaginsäure, l. Leucin, Glutaminsäure und Tyrosin (in Säurealkohol gelöst mit Resorcin). Kleinere Granula entstehen mit: Arginin, Cystin, Cystein, Hippursäure, Lysin. L. Prolin



### Künstliche Granula

- 1— 7 Phloroglucin - Glykokoll - Aldehyd - Silbernitrat. 1—6 Färbung mit Neutralrot  
 8—10 Eisenverteilung bei Autolyse. 8 10 Ferrocyanalkali. 9 Eisensulfat  
 11 Phloroglucin - Leucin - Cholesterin - Aldehyd - Saponin - Eiweiß - gelöste  
 Stärke. Jodreaktion  
 12—15 Phloroglucin - Leucin - Cholesterin - Aldehyd - Ferrocyanalkali Granula.  
 13 Bildung einer Spiralfaser  
 15 Leucin - Cholesterin Granula - Soda - Kohlensäure - Färbung mit Cresylviolett

gab keine Granula mit Kochsalz, wohl aber mit Ferrocyanalkali, das racemische Prolin verhielt sich umgekehrt.

Man kann somit sagen, daß die wichtigsten Aminosäuren sich an der Granulabildung beteiligen können.

### Einwirkung anderer Phenole.

Annähernd wie Phloroglucin wirkt Resorcin.

Die folgende Tabelle gibt die Granulabildung mit Resorcin, Glykokoll, Aldehyd und verschiedenen chemischen Verbindungen wieder:

Säure, Salz	10%	5%	1%	1/4%
Kochsalz . . . . .	3 (Hefengröße)	3	3	2 (Kokkengröße)
Silbernitrat . . . . .	3	3	3	2
Bleiacetat . . . . .	2	2	3	3
Kupferacetat . . . . .	—	—	—	3
Eisensulfat . . . . .	3	3	3	2
Ferrocyanalkali . . . . .	2	—	1	2
Ferricyanalkali . . . . .	3	3	2	2
Essigsäure . . . . .	—	—	—	—
Salzsäure . . . . .	3	3	—	—

Carbolsäure gab keine Granula mit Kochsalz-Aminosäure-Aldehyd, dagegen mit Ferrocyanalkali, Asparaginsäure und Lysin, Ferricyanalkali auch mit Cystein.

Brenzkatechin und Hydrochinon gaben Granula nicht mit Aminosäure-Kochsalz, dagegen mit Ferrocyanalkali und den Aminosäuren Asparaginsäure und Lysin, mit Ferricyanalkali mit allen im Versuch verwandten Aminosäuren. (Glykokoll, Alanin, Asparaginsäure, Leucin, Prolin [rac], Cystein und Lysin.)

Pyrogallol gibt mit Glykokoll-Kochsalz kleine Granula, nicht mit den anderen Aminosäuren. Man erhält mit Ferrocyanalkali größere Granula mit Glykokoll, kleinere mit Asparaginsäure und Lysin.

Ferricyanalkali gab besonders große Granula mit Lysin und Cystein, kleine Granula mit Glykokoll, Leucin und Asparaginsäure, keine Granula mit Alanin und Prolin.

Nun wirkt das Eisen in der Naphtholoxydase wie ein dreiwertiges Komplexeisen, ähnlich wie Ferricyanalkali.

Es besteht somit eine große Wahrscheinlichkeit, daß, wenn Eisen in dieser Form in der Zelle auftritt und gleichzeitig Aldehyd, Aminosäure und Chromogen vorhanden sind, dann Granula ausgefällt werden.

Bemerkenswert bei den Versuchen war die purpurrote Färbung der Lösung, die mit Prolin eintrat bei Gegenwart von Ferrocyanalkali, Brenzkatechin und Hydrochinon, gelbgrüne Farben lieferten Asparaginsäure und Lysin, rötliche Glykokoll, Alanin und Leucin, keine Farbe bildete Cystein.

Gibt man die Möglichkeit zu, daß Zellgranula auf ähnliche Weise wie die künstlichen entstehen, so gelten auch die Beobachtungen, die man an den künstlichen Granula macht, für die Zellgranula.

### Autolytische Veränderungen künstlicher Granula.

Was aus der Verbindung von Aminosäure, Aldehyd und Phenol hervorgeht, scheint zunächst ein Gebilde von gleichmäßiger Beschaffenheit zu sein, ist aber in Wirklichkeit noch eine Mischung, in der das Phenol und die Aminosäure leicht nachweisbar sind, während der Aldehyd sich infolge seiner Verharzung (Kondensation) dem Nachweis entzieht. Für die Untersuchungen autolytischer Vorgänge in den Granula eignen sich besonders die Silbergranula in dem folgenden System:

Phloroglucin (1%) . . . . .	1,0
Glykokoll (2%) . . . . .	0,5
Formaldehyd (2%) . . . . .	0,5
Silbernitrat (2%) . . . . .	1,0

Die mehrmals gewaschenen Granula untersucht man an verschiedenen Tagen und erhält Bilder wie sie bereits mitgeteilt sind und durch Abb. 1—7 der Tafel in weiteren Formen wiedergegeben werden.

Die Veränderungen sind durch folgende Überlegungen verständlich. Die Granula sind sehr empfindlich gegen OH-Ionen, nicht aber gegen H-Ionen. Steigt nun die OH-Konzentration in dem granulären System, so besteht die Neigung zur Auflösung, im gleichen Augenblick wird aber das Phenol zu einem Farbstoff oxydiert, der seinem Charakter nach sauer sein muß, damit steigt die H-Konzentration und das granuläre Gebilde festigt sich wieder. Dadurch, daß saure Kolloide mit basischen zusammentreffen, entstehen Fällungen, die sich durch basische Färbungen darstellen lassen.

Gehen diese Vorgänge gleichmäßig in dem Plasma der Kugel vor sich, so entstehen regelmäßige Bildungen, wie sie die Abbildungen der Tafel darstellen.

Die Entmischung geht nun in zwei Richtungen vor sich, einmal konzentrisch in Ringen, sodann radiär in Form von Radspeichen. Beide Formen können nebeneinander hergehen (1—3). Sind die Ringe und Radian nur teilweise ausgebildet, so entstehen Bilder wie 4, 5 und 6.

Bei diesem Lösungsvorgang kann auch gelöstes Silber sich gleichmäßig verteilen, es entstehen dann seltenere Formen, wie 7, in denen auf der äußeren Kapsel sich Schollen von Silberoxyd auflagern, während die Kugel selbst eine gleichmäßige kupferrote Färbung zeigt. Manchmal bleibt das Silberkorn unverändert im Zentrum der Kugel (Abb. 6), manchmal wird es als schwarzer Niederschlag an die Radspeichen gebunden.

Die Verteilung des Silbers erfolgt somit bei der Autolyse nicht gleichmäßig.

Ähnlich verhalten sich Eisensalze (8. 9. 10).

Die ausgesprochene Maulbeerform, wie sie Abb. 8 zeigt, bildete sich in dem System

Phloroglucin-Leucin- l. d. Prolin-Ferrocyankali-Kochsalz-Aldehyd neben runden Formen. Im Laufe der Zeit bleiben einzelne Granula ungefärbt, manche färben sich stark grün, manche gelbgrün. Die Oxydation des Eisensalzes hängt hier mit der Autolyse zusammen.

Eine zunächst gleichmäßige Verteilung des Eisensalzes erfolgte in den Granula der Reihe:

Resorcin-Leucin-Aldehyd-Eisensulfat.

Nach Behandlung der Granula mit 5%iger Schwefelsäure bildeten sich Hohlkugeln, in denen das Eisen durch die Berlinerblaureaktion im Innern der Kugel nachweisbar war.

Das Gegenteil, die Verlagerung des Eisens in die Kapsel, fand sich bei Granula der Reihe:

Phloroglucin-Leucin-Prolin-Aldehyd-Ferrocyankali

nach Behandlung der Granula mit Schwefelsäure und Eisenchlorid.

Die wichtigste Lehre der autolytischen Vorgänge ist die, daß in den Granula sich Vorgänge abspielen, ähnlich denen, wie sie bei Alkali- oder Säurezusatz verlaufen.

### Beziehungen der Granula zur Pigmentbildung.

Die Beziehungen zur Färbung erstrecken sich nach zwei Richtungen, einmal Auftreten von Farbstoffen durch Autolyse und zweitens Färbung der Granula mit Farbstoffen, die sekundär auf die Granula einwirken.

Die Färbungen der ersten Gruppe sind an das Phenol und zum Teil auch, wie die Versuche mit verschiedenen Aminosäuren zeigen, an die Anwesenheit der Aminosäure gebunden. (Prolin: purpurrot, Asparaginsäure und Lysin gelbgrün, Glykokoll, Alanin und Leucin gelbrötlich.)

Die Färbung der Granula mit Farbstoffen ist deshalb wichtig, weil sie Aufschluß darüber gibt, auf welche Weise nicht färbbare Strukturen färbbar werden und wodurch die Oxy-Basophilie bedingt wird. Die Granula sind zunächst nicht färbbar, manche nehmen auch niemals Farben an. Die Färbbarkeit kann daher nur in der Veränderung der Mischung liegen. Nun sind es gerade die Teile der Kugeln, die sich schwach gelblich färben, die auch den basischen Farbstoff annehmen. Es scheint somit, daß die Oxydation des Phenol die Färbbarkeit bedingt, allerdings erst in Verbindung mit anderen Umsetzungen.

Oxyphilie im Sinne einer Monooxyphilie wurde bisher noch nicht beobachtet. Eosin wird aber bei älteren Granula meist von zentralen Teilen der Körner gebunden, weiter sind die Riesengranula, die man mit Leucin erhält, auch oxyphil. Es sei daran erinnert, daß auch die nicht immer monooxyphilen, eosinophilen Leukocytengranula durch

Bindung von oxydierten Phenolen basophil werden. Eosinbildung kann man an jüngeren Granula auch erreichen, wenn man gelösten Blutfarbstoff an die Granula mit der Alkali-Kohlensäuremethode verankert.

### Bildung von Strukturen und Verschleimung.

Bereits die bei der Autolyse der Granula beschriebenen Veränderungen sind Strukturbildungen von außerordentlicher Regelmäßigkeit, man kann sie als Kapsel- und Speichenbildung bezeichnen. Selten, aber nicht weniger wichtig ist die Faserbildung. Abb. 13 stellt einen Spiralfaden dar, der durch Verbindung konzentrischer Schichten (12) mit radialen entstanden ist und an die Spiralfasern bei Pflanzen erinnert. Das Gebilde wurde durch Einwirkung konzentrierter Schwefelsäure auf Granula des Systems:

Phloroglucin-Leucin-Cholesterin-Aldehyd-Ferrocyanalkali  
gewonnen.

Auch das Gegenteil der Strukturbildung, die Verschleimung, kann im Reagensglase gezeigt werden (15).

Die Granula der Reihe: Phloroglucin-Leucin-Cholesterin-Aldehyd wurden mit Sodalösung und Kohlensäure behandelt und nach dem Auswaschen mit Cresylviolett gefärbt. Die meist blauen Granula sind von einem metachromatisch rötlich gefärbtem Schleim umgeben und zeigen einen wellenförmigen ebenfalls metachromatischen Strahlenkranz. Wo in der Mitte der Granula noch ein gelb gefärbter Kern vorhanden war, bildete sich eine smaragdgrüne Mittelschicht. Die Strahlen gehen manchmal von Körnchen aus.

### Beziehungen zur Oxonbindung.

Die künstlichen Granula haben an sich oxydierende Eigenschaften insofern, als sie durch Sulfid reduziertes Fuchsin schnell in den Farbstoff verwandeln. Gleichzeitig sind sie sekundäre Naphtholoxydasen, d. h. es gelingt, gelöste Naphtholoxydasen an die Granula zu binden. Sie verhalten sich somit wie die granulären Träger primärer Oxydasen und — Schneckenextrakten (*Limax*) gegenüber — wie Kernkörperchen.

Auch hier gibt nur ein Teil der Granula die Reaktion. Die Ursache davon liegt wohl darin, daß bei der Bildung der Granula die Mengen von Aminosäure, Aldehyd und Phenol nicht überall die gleichen sind. Zuerst werden da sich Granula bilden, wo die Aldehydmengen am größten sind, damit verändern sich aber die Mengenverhältnisse der Nachbarschaft, die aldehydärmer wird.

Gerade die letzten Versuche zeigen, daß es möglich ist, die künstlichen Granula in der Zusammensetzung den Zellgranula durch Zusatz von Lipoiden, Kohlehydraten und Fermenten außerordentlich nahezu bringen.

Durch Beimengung von anderen Stoffen zu den granulären Systemen ist die Form der Granula sehr beeinflufßbar.

Zusatz von Prolin verhindert die Bildung der großen Leucingranula oder wirkt stark verkleinernd, wobei die Granula gleich groß werden, die mit Leucin allein sehr unregelmäßig sind.

Zusatz von Glutaminsäure zu Leucin machte die Granula auffallend glasig und ballonartig, Zusatz von Saponin verhinderte die Bildung der großen Leucingranula. Zusatz von Cholesterin kann die Ausbeute der Leucingranula wesentlich erhöhen und gibt den Scheiben eine feine radiäre Streifung (14).

Vergleicht man nun die Zusammensetzung der Granula mit der einiger fibrillärer Körperstrukturen, so ergibt sich die gemeinsame Tatsache, daß diese reich an Aminosäuren sind.

Die wichtigsten hierher gehörenden Fasern, sie man zu den Albuminoiden rechnet, sind die elastische und kollagene Faser, die Hornfaser, die Seidenfaser (Fibroin), das Chitin. Nach den Zusammenstellungen von *Abderhalden* und *Hollemann* enthält die elastische Faser 26% Glykokoll und 21% Leucin, das Keratin 10% Asparaginsäure und 7% Leucin, die kollagene Faser enthält Glykokoll, Leucin, Asparaginsäure, Arginin und Prolin, das Fibroin 21% Alanin und 10% Tyrosin. Diese Strukturen entstehen entweder aus Schleim durch einen Erstarrungsprozeß oder durch Lösung granulärer Gebilde. Sämtliche Strukturen geben mitunter eine sekundäre Naphtholreaktion.

Weiter ist es möglich, Granula herzustellen, die nach Zusatz von *Lugolscher* Lösung sich dunkelbraun färbten, sich somit verhielten wie *Corpora amylacea* (Abb. 11). Die Reaktion wurde durch Einbau gelöster Stärke in einem Teil der Leucingranula erzielt.

Zusammenfassend ist über die künstlichen Granula festzustellen:

1. Das System Aminosäure-Aldehyd-Phenol liefert, je nach der Art der Faktoren, verschieden große Granula von verschiedenem chemischen Verhalten (in bezug auf Löslichkeit, Färbbarkeit usw.).

2. Die zunächst meist homogenen Granula bilden durch Autolyse oder durch künstliche Lösungs-Fallungsprozesse Kapseln, Speichen, Fasern und Schleim.

3. Die zunächst meist nicht färbbaren Granula werden durch lytische Vorgänge teilweise färbbar, meist im Sinne einer Basophilie.

4. In die Granula lassen sich weiter Stoffe einbauen: Cholesterin, Stärke, Eiweiß, Blutfarbstoff, Oxydasen und Peroxydasen, weitere Aminosäuren usw.

5. Die Granula verraten, wie die granularen Naphtholoxidasen, Beziehungen zur Strukturbildung und Pigmentbildung.

---