11. Fermentstudien bei der Krebskrankheit.

Von Dr. rer. nat. B. Brahn.

Die Ursache und der Verlauf der Krebskrankheit — unter den vielen Arbeiten über dieses Thema nehmen die über die Veränderung der Fermente bei dieser Krankheit an Zahl und Bedeutung ständig zu. Läßt sich auch die biologische Rolle der Fermente hier noch nicht genau festlegen, so runden und grenzen sich die Ergebnisse doch allmählich ab und werden, wie man zuversichtlich hoffen kann, Licht verbreiten über einige der wichtigsten Erscheinungen beim Krebs, wie die Entstehung von Metastasen und die Kachexie.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Arbeiten zusammengefaßt werden, die im Institut für Krebsforschung in Berlin ausgeführt wurden. Die erste von ihnen, von F. Blumenthal und mir¹⁾ war die Anregung zu zwei weiteren, die in den Sitzungsberichten der Kgl. Preuß. Akademie der Wissenschaften erschienen²⁾.

Die erst erwähnte Arbeit beschäftigt sich mit dem Katalasegehalt in normalen und carcinomatösen Lebern. Das katalytische Ferment, die Katalase, ist durch die Fähigkeit gekennzeichnet, Wasserstoffsuperoxyd in molekularen Sauerstoff und Wasser zu zerlegen, ohne daß dabei Oxydationsprozesse zustande kommen. Ihre quantitative Bestimmung geht so vor sich, daß man eine bestimmte Menge des fein zerkleinerten Organs oder Organauszugs auf eine gewisse überschüssige Menge von Wasserstoffsuperoxyd eine in allen Versuchen gleiche Zeit bei gleicher Temperatur einwirken läßt und dann die Menge des unzersetzt gebliebenen Wasserstoffsuperoxyds feststellt. Das kann mit Kaliumpermanganat geschehn oder auch jodometrisch. Schließlich kann man die Menge des freigemachten Sauerstoffs auch direkt bestimmen. Doch ist diese Methode viel umständlicher, ohne genauer zu sein.

Die Versuchsanordnung war folgende:

1. Normale Leber.

Je 50 g frische, möglichst fein zerkleinerte Leber wurden mit 500 g Chloroformwasser bei 37° im Brutschrank der Autolyse ausgesetzt. Nach bestimmten Fristen wurden der Autolyseflüssigkeit Proben von je 5 ccm mit der Pipette entnommen und mit einem Ueberschuß (10 ccm) von

1) F. Blumenthal und B. Brahn, Die Katalasewirkung in] normaler und in carcinomatöser Leber. Zeitschr. f. Krebsforschung. 1910. Bd. 8. H. 3.

2) B. Brahn, Die Wirkung krebskranker Organe auf den Katalasengehalt der metastasenfrenen Leber. Sitzungsber. d. Kgl. Preuß. Akad. d. Wissensch. vom 7. Juli 1910. — B. Brahn, Weitere Untersuchungen über Fermente in der Leber von Krebskranken. Sitzungsber. d. Kgl. Preuß. Akad. d. Wissensch. vom 6. April 1916.

Wasserstoffsperoxyd zwei Stunden stehen gelassen. Dann wurden die Mischungen mit $\frac{1}{10}$ normaler Kaliumpermanganatlösung so lange titriert, bis eben eine dauernde Rotfärbung eintrat. 10 ccm der gebrauchten H_2O_2 -Lösung entfärbten 206,5 ccm $\frac{1}{10}$ norm. KMnO_4 . Je größer also die bei der Titration bis zum Eintritt der Rotfärbung noch nötige Menge KMnO_4 -Lösung war, desto geringer die Menge, bzw. die Wirkung der in der Leber vorhandenen Katalase.

Tabelle I. Normale Leber.

Dauer der Autolyse	Leber 1	Leber 2	Leber 3
	ccm $\frac{1}{10}$ norm. KMnO_4		
1 Stunde	16,3	14,0	8,1
1 Tag	8,6	12,1	8,0
3 Tage	8,4	9,4	5,2
5 "	8,5	9,3	7,6
7 "	8,0	10,0	11,9
9 "	10,1	9,4	10,4
11 "	9,4	11,6	11,4
16 "	12,3	12,3	16,0
21 "	13,1	12,9	14,9
26 "	16,2	14,1	23,2
31 "	15,9	15,2	24,7

2. Versuche mit Lebercarcinomen.

Statt der Leber wurde je 50 g frisch herausgeschältes, möglichst von normalen Teilen freies, sehr fein zerkleinertes Lebercarcinom verwandt. Sonst alles wie bei den Versuchen mit normaler Leber.

Tabelle II. Carcinom.

Dauer der Autolyse	Carc. 1	Carc. 2	Carc. 3	Carc. 4	Carc. 5	Carc. 6	Carc. 7	Carc. 8
	ccm $\frac{1}{10}$ norm. KMnO_4							
1 Stunde	159,4	145,2	146,0	154,1	149,5	146,2	173,0	162,1
1 Tag	141,3	144,3	142,0	153,0	150,1	139,1	154,7	148,9
3 Tage	142,1	148,1	141,7	153,9	154,3	138,4	161,2	157,1
5 "	150,2	139,2	149,1	160,1	156,4	141,0	159,8	154,3
7 "	146,3	142,5	150,4	158,8	155,9	150,2	162,0	162,1
9 "	153,8	150,1	—	—	—	—	—	—
10 "	—	—	156,1	164,3	159,4	146,3	163,0	161,8
13 "	159,1	164,3	—	—	—	—	—	—
15 "	164,2	165,7	175,2	171,2	164,1	152,1	171,5	165,7
20 "	170,5	181,2	178,3	182,3	166,3	155,7	170,2	165,8
25 "	179,4	185,4	195,1	181,9	174,3	162,3	179,5	182,5
30 "	181,2	190,0	192,0	184,3	190,0	170,4	178,4	185,5
45 "	185,8	194,2	198,0	189,7	198,3	182,0	185,3	186,1

3. Gesunder Teil einer mit Krebsknoten durchsetzten Leber.
Versuchsanordnung wie vorher.

Tabelle III. Gesunder Teil von Krebslebern.

Dauer der Autolyse	1	2	3	4	5	6
	ccm $\frac{1}{10}$ norm. KMnO_4					
1 Stunde	117,7	92,1	131,0	103,4	95,1	84,4
1 Tag	116,1	93,4	132,0	115,4	94,3	79,1
3 Tage	116,0	100,1	134,1	124,1	94,2	78,2
5 "	118,4	98,4	138,4	129,2	96,3	80,9
7 "	125,8	98,4	137,9	129,1	102,1	79,8
10 "	125,1	99,8	137,8	129,2	101,7	91,4
15 "	131,2	110,0	142,1	130,0	112,1	91,0
20 "	132,9	112,3	151,2	140,4	113,3	102,4
25 "	140,0	111,0	157,1	137,1	117,0	107,3
30 "	143,1	117,0	157,9	140,6	121,4	108,1
45 "	144,3	124,3	162,1	141,2	124,9	117,4

Tabelle IV. Mischung von gleichen Teilen normaler Leber und Krebsleber.

Dauer der Autolyse	Versuch 1	Versuch 2
	ccm $\frac{1}{10}$ norm. KMnO_4	
1 Stunde	94,1	104,0
1 Tag	90,0	98,0
5 Tage	92,3	102,7
10 "	95,3	107,1
20 "	96,2	118,9
30 "	107,8	130,1

4. Je 30 g reines Sarkom mit 300 g Chloroformwasser.
Sonst wie vorher.

Tabelle V. Sarkome.

Dauer der Autolyse	Sarkom 1	Sarkom 2
	ccm $\frac{1}{10}$ norm. KMnO_4	
1 Stunde	198,1	201,0
1 Tag	198,0	199,4
5 Tage	199,2	200,3
10 "	199,5	201,2
20 "	203,1	201,9
30 "	203,4	204,0

Zieht man aus diesen Versuchstabellen die Resultate, so ergibt sich:

1. Setzt man frische normale Leber und frische, einer Leber entnommene, Krebsknoten der Autolyse aus und stellt etwa einen Monat hindurch deren katalytische Wirkung quantitativ fest, so fällt sofort die bedeutend größere katalytische Wirkung der normalen Leber gegenüber derjenigen der Krebsknoten auf. Die normale Leber zersetzt eine Wasserstoffsperoxydlösung unter stürmischem Aufbrausen, während die Krebsknoten nur mäßige Gasentwicklung hervorrufen.

2. Die Katalasezahlen der normalen Leber ändern sich in der vierwöchigen Versuchszeit nur unwesentlich, während die niedrigen Zahlen des Carcinoms noch bedeutend geringer werden.

3. Das wichtigste Ergebnis der Arbeit schien zu sein, daß auch die gesunden Teile einer nur wenige Krebsknoten enthaltenden Leber eine viel geringere Katalasenwirkung hatten als normale Leber, daß hier also eine Schwächung des katalytischen Ferments in den gesunden Teilen einer Krebsleber durch den kranken Teil vorlag.

4. Mischungen von normaler und Krebsleber, auf ihre katalytische Wirkung untersucht, gaben nur Mischverhältnisse; eine Wirkung von Antifermenten fand also nicht statt.

5. Auch Sarkome wurden auf ihre katalytische Fermentwirkung untersucht und hier ein noch geringeres katalytisches Vermögen gefunden als beim Carcinom.

Nachdem der Einfluß der Krebsknoten in der Leber auf den gesunden Teil der Leber festgestellt war, schien mir die Frage von Interesse: Beeinflußt der Krebs anderer Organe auch schon die Katalasewirkung der Leber, wenn diese noch frei von Metastasen ist? Und weiter: Welche carcinomatösen Organe bringen diese Wirkung hervor und welche nicht?

Untersucht wurden in der zweiten der erwähnten Arbeiten die Lebern in drei Fällen von Carcinom des Uterus, in zwei Fällen von Carcinom der Speiseröhre und in zwei seltenen Fällen von Carcinom des Magens ohne Metastasen in der Leber.

Die Anordnung der Versuche war, bis auf wenige Veränderungen, die gleiche wie in der vorher erwähnten Arbeit. Die möglichst frische und möglichst fein zerkleinerte Leber wurde nach der von Salkowski eingeführten Methode mit der 10fachen Menge Chloroformwasser bei etwa 37° im Brutschrank der Autolyse ausgesetzt. Nach bestimmten Fristen wurden der Autolyseflüssigkeit Proben von je 5 ccm mit der Pipette entnommen, mit einem Ueberschuß von Wasserstoffsperoxyd versetzt, einmal umgeschüttelt und bei 8–10° im Dunkeln zwei Stunden lang ruhig stehen gelassen. Dann wurden die Proben mit verdünnter Schwefelsäure versetzt, stark mit Wasser verdünnt und mit $n/10$ Kaliumpermanganatlösung titriert. Je größer die bei der Titration bis zum Eintritt der Rotfärbung nötige

Menge Kaliumpermanganatlösung war, desto geringer die Wirkung der in der Leber vorhandenen Katalase.

Es folgen nun die erhaltenen Zahlen. Tabelle VI enthält die Zahlen der zum Vergleich herangezogenen normalen Leber, Tabelle VII, VIII und IX die Zahlen der metastasenf freien Lebern bei den durch die Sektion sichergestellten Carcinomen. Vorausgeschickt sei, daß zu je 5 ccm der Autolyseflüssigkeit je 15 ccm einer Wasserstoffsuperoxydlösung zugesetzt wurden, die im ganzen 217,3 ccm einer n_{10} Kaliumpermanganatlösung verbrauchten.

Tabelle VI. Normale Leber.

Dauer der Autolyse	Leber 1	Leber 2	Leber 3
	ccm n_{10} $KMnO_4$		
1 Stunde	28,9	37,0	22,8
1 Tag	34,1	28,4	20,1
3 Tage	29,4	28,0	26,4
5 "	26,9	31,4	35,0
10 "	40,1	39,1	35,9
15 "	38,2	48,0	40,0
20 "	43,2	46,4	48,3
30 "	42,8	44,1	51,2

Tabelle VII. Leber ohne Metastasen. Uteruscarcinom.

1 Stunde	34,9	28,2	21,5
1 Tag	41,4	27,0	32,1
3 Tage	49,2	32,1	26,7
5 "	46,3	31,6	23,4
10 "	50,0	34,7	32,4
15 "	51,2	38,7	38,1
20 "	49,2	40,1	37,2
30 "	48,8	42,3	39,6

Tabelle VIII. Leber ohne Metastasen. Speiseröhrencarcinom.

Dauer der Autolyse	Leber 1	Leber 2
	ccm n_{10} $KMnO_4$	
1 Stunde	41,0	28,4
1 Tag	34,1	34,2
3 Tage	39,7	34,3
5 "	38,1	33,7
10 "	46,4	40,0
15 "	50,1	36,4
20 "	48,2	42,1
30 "	51,3	44,8

Tabelle IX. Leber ohne Metastasen. Magencarcinom.

Dauer der Autolyse	Leber 1	Leber 2
	ccm n_{10} KMnO ₄	
1 Stunde	108,7	114,2
1 Tag	102,0	104,8
3 Tage	109,3	109,1
5 "	118,2	112,0
10 "	114,6	
15 "	112,1	
20 "	120,4	
30 "	127,0	

Die angeführten Versuche zeigen, daß von den untersuchten Carcinomen die der Gebärmutter und der Speiseröhre einen Einfluß auf den Katalasengehalt der Leber nicht ausübten, die des Magens dagegen auch schon in der noch metastasenfrenen Leber eine sehr deutliche Schwankung des katalytischen Ferments bewirkten.

Die Resultate regten zu der dritten der im Anfang erwähnten Arbeiten an. Es wurden zahlreiche Lebermetastasen, die nicht vom Magen herührten, untersucht und ferner krebsfreie Lebern bei Carcinomen der verschiedensten Organe. Im ganzen wurden in dieser Arbeit 47 Fälle untersucht, die mir durch das Entgegenkommen von Herrn Geheimrat Orth aus dem Kgl. pathologischen Institut der Berliner Universität überwiesen wurden. Die Methodik der Untersuchungen war dieselbe wie früher, nur wurde zur Bestimmung des überschüssigen Wasserstoffsuperoxyds nicht Kaliumpermanganat, sondern als praktischer der Zusatz von Jodkali und die Bestimmung des ausgeschiedenen Jods mit n_{10} Natriumthiosulfatlösung gewählt. In der Ausführung folgte ich der Bestimmung der Gehaltsprüfung von Wasserstoffsuperoxyd im Deutschen Arzneibuch V.

Hier alle Tabellen zu geben, würde zu weit führen. Die Ergebnisse waren die folgenden:

Von den 47 Fällen gaben 32 eine Katalaseverminderung und, entsprechend früheren Angaben von Salkowski und Yoshimoto, eine Autolysevermehrung, 15 waren ohne erstere. Betrachten wir zunächst diese 15 Fälle, so zeigt sich, daß es 8 Sarkome, 4 Carcinome des Uterus, 2 Carcinome des Kiefers und 1 Zungenkrebs waren. In diesen 15 Fällen fand bis auf 2 auch keine Autolysevermehrung statt. Es findet also in der Krebsleber zwar nicht immer eine Autolysevermehrung statt; ist sie aber vorhanden, so handelt es sich fast immer um Fälle, die auch eine Katalaseverminderung zeigen. Diese Wechselbeziehung scheint mir weitere Untersuchungen nötig zu machen in der Richtung, ob hier eine durchgehende Beziehung vorhanden ist, d. h. ob in den katalytischen und auto-

lytischen Fermenten etwa ein Kräftepaar vorliegt, das sich gegenseitig die Wage hält, so daß das Sinken der einen Seite immer mit einem Steigen der anderen einhergeht.

Von den 32 Fällen mit Katalaseverminderung hatten 19 Metastasen in der Leber, die von anderen Organen ausgingen. In diesen Fällen mit Metastasen in der Leber ist die Verminderung der Katalase und die Vermehrung der Autolyse regelmäßig. Die hierhergehörenden Fälle von verminderter Katalase und vermehrter Autolyse ohne Metastasen in der Leber waren verschiedener Art. Es waren 8 Rektumcarcinome, 3 Carcinome der Gallenblase, 2 Magenkarzinome und 2 Pankreascarcinome.

Fasse ich zusammen, so ergaben meine Versuche folgendes: Metastasenhaltige Lebern zeigten immer eine starke Verminderung der Katalase und eine geringe Vermehrung der Autolyse im Vergleich mit normalem Lebergewebe.

Carcinome des Magens, des Darmes, des Rektums, des Pankreas und der Gallenblase gaben die obenerwähnten Fermentänderungen in der Leber auch dann, wenn Metastasen nicht vorhanden waren.

Sarkome, Carcinome der Gebärmutter, des Kiefers und der Zunge gaben keine Fermentänderungen in der metastasenfreien Leber.

In späteren Arbeiten wird die Anzahl und Auswahl der Fälle vermehrt werden.

Nachdem diese Untersuchungen katalytischer und autolytischer Fermente in Krebslebern bemerkenswerte Resultate ergeben hatten, schien es geboten, die Prüfung auch auf andere Fermente auszudehnen. Ich wählte zunächst die fettspaltenden Fermente aus und untersuchte Krebslebern auf ihren Gehalt an Lipase und Lezithinase, d. h. auf ihre Fähigkeit, Oel- und Lezithinemulsion zu spalten.

Die Methodik der Untersuchungen ist so, daß man eine bestimmte Menge Organextrakt eine gewisse Zeit auf eine bestimmte Menge Oel- oder Lezithinemulsion wirken läßt und durch Titration mit Normallauge die Menge der in Freiheit gesetzten Fettsäure bestimmt. Zur Kontrolle läßt man auf die gleichgroße Menge der Fettemulsionen gleiche Mengen Organextrakt einwirken, in dem man vorher durch Erhitzen das Ferment zerstört hat, und zieht die hier erhaltenen Werte von den ersten ab.

Es wurde die abgewogene Menge des Organs mit der gleichen Menge Quarzsand im Mörser sehr fein zerrieben, diese Mischung mit der doppelten Menge Wasser angerührt und zentrifugiert. Von der Flüssigkeit wurden dann zweimal 5 ccm, die zur Kontrolle dienen sollten, zur Zerstörung des Ferments erhitzt und mit je 10 ccm der Oel- bzw. Lezithinemulsion versetzt. In den gleichen Mengenverhältnissen wurde der eigentliche Versuch ebenfalls in zwei Proben angesetzt, nur daß hier natürlich die Erhitzung des Organextrakts fortfiel. Darauf wurden die vier Flaschen 24 Stunden

lang in den Brutschrank gestellt und dann auf ihren Gehalt an freier Fettsäure geprüft.

Die Oelemulsion stellte ich nach Kanitz¹⁾ so her, daß ich zu Olivenöl solange $\frac{1}{10}$ n. Natronlauge unter ständigem Schütteln zugab, bis bei Zusatz von ein paar Tropfen Phenolphthalein das Gemisch eine schwach rosarote Farbe zeigte. Wurde diese Emulsion tüchtig durchgeschüttelt, so blieb sie etwa 2—3 Tage lang gleichmäßig und haltbar.

Die Lezithinemulsion wurde so dargestellt, daß 2 g Lezithin in einem Kölbchen in 5 ccm Methylalkohol gelöst wurden, worauf man zu der Lösung 100 ccm destilliertes Wasser gab und tüchtig schüttelte. Dann wurde die Lösung zur Verflüchtigung des Methylalkohols einige Minuten auf dem Wasserbade erhitzt und tüchtig geschüttelt. Auch diese Lösung blieb, kalt aufbewahrt, einige Tage haltbar.

Hatten die Organextrakte mit diesen Emulsionen die vorgeschriebene Zeit gestanden, so wurden die mit Oelemulsion angesetzten Proben mit je 5 ccm Aether und 50 ccm Alkohol, die mit Lezithinemulsion angesetzten Proben mit je 30 ccm Alkohol gemischt, einige Tropfen Phenolphthaleinlösung zugesetzt und bis zum Eintreten einer Rosafärbung mit $\frac{1}{10}$ n. Lauge titriert.

Drei derbe Knoten aus der Leber (Metastasen von Magenkrebsen) ergaben, so untersucht, keinen Gehalt an Lipase oder Lezithinase. Drei Fälle von normaler Leber gaben für je 5 ccm des wie oben angegebenen bereiteten Organextraktes einen Verbrauch von 2,4, 2,5 und 2,1 ccm $\frac{1}{10}$ n. Lauge bei der Lipaseprüfung und von 3,0, 2,8 und 3,1 ccm $\frac{1}{10}$ n. Lauge bei der Lezithinaseprüfung. Diese Zahlen zeigen die eigentliche Einwirkung der fettspaltenden Fermente, d. h. sie sind die Differenz aus den bei der Titration erhaltenen Zahlen minus den bei den Kontrollversuchen erhaltenen Zahlen.

In 14 Fällen wurde der gesunde Teil von Lebern untersucht, die Tumoren enthielten. In 2 Fällen war fett- oder lezithinspaltendes Ferment nicht nachweisbar. In den 12 anderen Fällen war es vorhanden und erreichte in einem Falle die Höhe des normalen Gewebes. In den übrigen 11 Fällen schwankten die Zahlen der freigemachten Fettsäure in der Art, daß zu ihrer Sättigung zwischen 0,4 und 2,0 ccm $\frac{1}{10}$ n. Lauge bei der Lipase und 0,6—2,7 ccm $\frac{1}{10}$ n. Lauge bei der Lezithinase verbraucht wurden.

Auch hier liegt also ein ähnliches Verhalten vor wie bei der Katalase. Der reine Tumor ist frei von fettspaltenden Fermenten, der gesunde Teil einer tumorhaltigen Leber enthält durchschnittlich deutlich geringere Mengen fettspaltender Fermente wie das normale Lebergewebe.

Die Versuche werden fortgesetzt.

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie. 1905. Bd. 46. S. 482.

Betrachten wir die Ergebnisse der Arbeiten im ganzen, so ergibt sich, daß carcinomatöse Erkrankungen eines zum Verdauungstraktus gehörigen Organs in der Leber Aenderungen, nämlich Schwankungen der untersuchten Fermente, des katalytischen sowohl wie des fettspaltenden, hervorrufen. Erkrankungen anderer Organe tun das nicht. Da dieselben Organe, deren Erkrankung eine Schwächung der Fermente in der Leber hervorruft, vielfach Metastasenbildungen in der Leber verursachen, liegt der Gedanke nahe, daß die Fermentabschwächung der Bildung von Metastasen den Boden bereitet. Auch zwischen Fermentänderungen und der Kachexie dürften Beziehungen bestehen. Hierüber wird durch Fermentuntersuchungen im Blute Krebskranker gegenwärtig im Institut für Krebsforschung gearbeitet.