

(Aus der Chirurgischen Universitätsklinik Göttingen. — Direktor: Prof. Dr. *Stich.*)

Die Autolyse des Sarkomgewebes. Untersuchungen über den Fermentgehalt mesenchymaler Gewebe*).

Von
Prof. W. v. Gaza und Dr. B. Brandi.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 31. Mai 1926.)

Die *Fermente der eigentlichen Mesenchymzellen* sind bislang, abgesehen von der Leukocyten-tryptase, den autolytischen Fermenten der Milz und der Muskulatur, nicht untersucht worden. Diese Lücke in der Fermentlehre erklärt sich z. T. aus der besonderen morphologischen und physiologischen Eigenart der mesenchymalen Gewebe. So ist z. B. das nicht differenzierte Bindegewebe, wie wir es im ausgewachsenen Organismus der Säugetiere und des Menschen vor uns haben, sehr *arm an Zellen*. Zudem ist der Kern dieser Zellen schmal und *strukturarm*, die Menge des Protoplasmas ist gering. Der Gehalt eines Gewebes an Fermenten läuft aber weitgehend dem Strukturgehalt seiner Zellen parallel.

Auch in den hochdifferenzierten Stützgeweben (Sehne, Fascie, Knorpel, Knochen) treten die Zellen an Masse gegenüber der Grundsubstanz, den Fibrillen usw., die man auch als Paraplasma bezeichnet, stark zurück. Dieses Paraplasma der Stützgewebe besitzt aber keine vollwertige Lebensfunktion; es hat vielmehr wohl hauptsächlich rein mechanische Aufgaben, wobei ein wesentlicher Stoffverbrauch nicht stattfindet. So kann denn schon auf Grund morphologischer Tatsachen ein *starker Stoffwechsel* in den eigentlichen Stützgeweben *nicht erwartet* werden; doch bezieht sich dies nur auf die „*ruhenden*“ *Stützgewebe* des Erwachsenen. Im embryonalen und im Wachstumsalter sind die Stützgewebe weit zellreicher und die einzelnen Zellen strukturreicher; es findet ständig ein sehr lebhafter morphologischer Abbau und Anbau von Gewebsteilen statt. Dementsprechend ist in der *Entwicklungsperiode* der Stoffwechsel mesenchymaler Gewebe hochgestellt.

Ähnliche *Perioden lebhaftesten Umbaus* in den Stützgeweben finden sich nun im Leben des Individuums unter normalen Verhältnissen nicht wieder; wohl aber treten sie in gleicher oder stärkerer Intensität bei

*) Die Arbeit wurde angefertigt mit Unterstützung des Universitäts-Bundes Göttingen E. V.

der akuten Entzündung, der Wundheilung, im transplantierten Stützgewebe und in den bösartigen Gewächsen der Stützgewebe auf. Wir finden hier eine ungemein lebhaftere Zellvermehrung, einen starken Abbau der paraplasmatischen Substanzen und wie beim Embryo einen Nachbau der spezifischen Gewebsanteile. *Unter pathologischen Verhältnissen* erhebt sich also auch in den sonst stoffwechselarmen Stützgeweben der Stoffwechsel zu einer großen Höhe. In diesen Geschehen werden wir einerseits die Vermehrung jener überall vertretenen Fermente erwarten, welche die notwendige Voraussetzung der allgemeinen Lebensvorgänge in der Zelle der betreffenden Tierart überhaupt sind. Unsere besondere Aufmerksamkeit werden wir aber der Frage zuwenden müssen, ob es *spezifische Stützgewebsfermente* gibt, denen beim Abbau der besonderen Anteile des mesenchymalen Gewebes (Kollagen, Knochengrundsubstanz usw.) eine katalysatorische Funktion zugeschrieben werden muß.

Da in den meisten Stützgeweben die Eiweißbestandteile den wichtigsten Anteil der Gewebsmasse darstellen, so wird sich unser Augenmerk zuerst auf die proteolytischen Fermente richten müssen (bei den pathologischen Vorgängen im Fettgewebe würde der Nachweis von Lipasen bedeutungsvoll sein).

Bei der Wahl des *Ausgangsmaterials* zu Fermentuntersuchungen an zellreichen mesenchymalen Geweben standen wir vor verschiedenen Schwierigkeiten. Es mußte uns daran liegen, *ausreichende Mengen einer gleichmäßig gebauten Gewebsart* zu erhalten. Nun finden wir zwar ein homogenes mesenchymales Gewebe beim Embryo und im wachsenden Organismus, doch ist es schwer in genügender Menge zu beschaffen. Das akut entzündete Gewebe aber ist ebenso wie das Wundgewebe zu verschiedenartig gebaut; neben gewucherten Fibroblasten finden sich hier alle Arten mesenchymaler Wanderzellen mit besonderen fermentativ — histolytischen Funktionen. Auch genügende Mengen eingewebig reiner Regenerate (Sehne, Knochen) sind nur schwer zu erhalten. Das an und für sich zu autolytischen Versuchen geeignete Gewebe der Milz (oder der Lymphknoten) schien uns bei unserer Fragestellung gleichfalls nicht brauchbar. Abgesehen davon, daß beide Gewebsarten heterogen zusammengesetzt sind (Lymphocyten und Reticuloendothelien, in der Milz zudem zerfallende Blutelemente), haben wir hier, wie im Knochenmark ganz spezifisch differenzierte Zellarten vor uns, nicht aber einfaches undifferenziertes mesenchymales Gewebe. Aus dem gleichen Grunde schied für unsere Untersuchungen das Muskelgewebe aus.

So bewogen uns verschiedene Gründe, besonders aber der Mangel eines in jeder Beziehung genügenden Ausgangsmaterials, *sarkomatöse Geschwülste* zur Prüfung des Stoffwechsels der mesenchymalen Zellen zu benutzen. Für Fermentuntersuchungen liegen die Verhältnisse bei den Sarkomen recht günstig. Größere Sarkome des Menschen mit aus-

reichender Gewebsmasse werden in chirurgischen Anstalten häufig gewonnen; sie können unmittelbar vom Operationstisch unter aseptischen Verhältnissen verarbeitet werden. Auch die *Forderung der Homogenität des Gewebes* ist bei vielen Sarkomen weitgehend erfüllt. Es gibt eine ganze Reihe sarkomatöser Geschwülste von sehr gleichmäßigem Gewebsbau, vor allem die Lymphosarkome und die Fibrosarkome; auch die polymorphzelligen Sarkome bestehen, wenn auch die Zellen in ihrer äußeren Gestalt schwanken, doch aus Sarkomgewebe als solchem. Zudem hat das Sarkom, abgesehen von den ernährenden Gefäßen kein andersgewebiges Stroma (wie z. B. das Carcinom); es ist eine ausgesprochen *eingewebige* Geschwulstart.

Für unsere ersten Versuche wählten wir aus der Reihe der Sarkome absichtlich *das fibroplastische Sarkom*. Einerseits sind solche Sarkome häufig von besonders gleichmäßigem Gewebsaufbau; sie bestehen neben den Gefäßen nur aus Sarko-Fibroblasten und kollagenen Fasern. Das Fibrosarkom vertritt also den *Typus des einfachen mesenchymalen Stützgewebes*, welches bereits die charakteristischen Fibrillen führt. Daher erwarten wir hier, wenn überhaupt irgendwo, das oder die spezifischen Fermente der Stützgewebsreihe zu finden. Weiterhin versprach der große Gehalt an struktureichen Zellen eine relativ große Fermentaubeute. Schließlich neigen gerade die Fibrosarkome weniger zu Nekrose als andere Sarkome; sie ulcerieren daher auch meistens nicht und sind also unter aseptischen Verhältnissen zu gewinnen.

Wir haben nun *zum Nachweis von Fermenten* im Fibrosarkom nicht die gebräuchlichsten Extrahiermethoden angewandt, sondern die *Autolyse des Sarkomgewebes* in vitro untersucht. Diese Autolyse in vitro ist ein sehr verwickelter fermentativer Vorgang, dessen Bedeutung noch umstritten ist. So gibt es keine allgemein anerkannte Erklärung dafür, daß außerhalb des Organismus sich selbst überlassene Organteile nach kurzer Latenz einem weitgehenden Zerfall aus sich selbst heraus erliegen, der z. B. für das Eiweiß schließlich zu niederen, nicht mehr koagulablen Abbauprodukten führt. Für unsere Fragestellung ist es bedeutsam, daß schon die Ansichten über Herkunft und Wirksamkeit der autolytischen Fermente geteilt sind. Wir selbst sehen, wie auch eine Reihe anderer Forscher, in der Autolyse den Ausdruck einer postmortal fortgesetzten Tätigkeit bereits präformierter, d. h. physiologischer Zellfermente. Wir glauben demgemäß die Autolyse als ein wichtiges Kriterium normaler Fermentwirkung betrachten zu können.

Die *Autolyse bösartiger Gewächse* ist bislang nur an Carcinomgeweben untersucht worden, während uns Arbeiten über den Sarkomzerfall in vitro nicht bekannt geworden sind. Neuerdings haben Noyes, Falk und Sugiura¹⁾ die Autolyse eines Carcinoms untersucht und dabei eine optimale Fermentwirkung bei $p_H = 7,0$ gefunden.

Wenn nun überhaupt aus den Ergebnissen der Geschwulstautolyse in vitro Schlüsse auf das Stoffwechselproblem gezogen werden sollen, so erheben sich gegen die Verwendung wenigstens des menschlichen Carcinomgewebes gewisse, auf unsere Kenntnisse von der Morphologie des Carcinoms begründete Bedenken. Bekanntlich eignen sich zur Autolyse am besten zellreiche, gleichmäßig gebaute, an Zwischensubstanz arme, also homogen strukturierte Gewebe (vor allem die Leber); Carcinome dieser Art sind aber sehr selten. In der Regel besitzen Carcinome ein Stroma, welches sogar an Menge weit überwiegen kann. Vor allem sind in diesem Stroma fast regelmäßig Lymphocyten, Plasmazellen, in ulcerierten Geschwülsten auch Leukocyten eingelagert, häufig in sehr erheblicher, die Geschwulstteile übertreffender Masse. E. Kaufmann spricht geradezu von einem Carcinoma granulomatosum, wenn das Stroma aus gewucherten Fibroblasten, Angioblasten und allen Bestandteilen des entzündlichen Granulationsgewebes besteht.

In neuerer Zeit haben zuerst Sørensen und Michaelis für die Fermente allgemein, Derby, Hedin und Bradley*) für den speziellen Fall der Autolyse gezeigt, daß eine weitgehende Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration, also dem aktuellen Säuregrad des Mediums besteht, und daß man von der Lage der optimalen Fermentwirkung auf die Natur des Enzyms rückschließen kann. Wir haben denselben Weg beschritten und unsere Versuchsanordnung folgendermaßen gestaltet.

Das Material stammte von einer 59jährigen Frau und stellte ein rezidivierendes faustgroßes Bauchdeckensarkom dar. Histologisch erwies es sich als ein besonders gleichmäßig gebautes fibroplastisches Sarkom. Es wurde unmittelbar vom Operationstisch keimfrei in einer Fleischmaschine zu Brei zerkleinert und darauf mit physiologischer Kochsalzlösung möglichst homogen aufgeschwemmt. Genau gleiche Gewichtsteile wurden sodann in keimfreie Erlenmeyerkolben einpipettiert und mit den entsprechenden Puffergemischen von wechselndem p_H im Verhältnis 1:5 versetzt. Die mit Toluol überschichteten Kölbchen wurden im Brutschrank bei 37° der Autolyse überlassen. Nach 10, 20 und 30 Stunden wurde jedem gut durchgeschütteltem Kölbchen eine gleiche Menge entnommen, das Autolysat zentrifugiert und die übrig bleibende Flüssigkeit mit Gerbsäurelösung gefällt. Nach 1 Tag hatte sich alles fällbare Eiweiß abgesetzt; die übrig bleibende klare Flüssigkeit wurde filtriert und der noch in Lösung befindliche Stickstoff nach der Mikro-Kjeldahl-Methode in der Modifikation von Bang bestimmt. Dieser aus einfachen Eiweißabkömmlingen stammende Stickstoff wurde als das Maß der Autolyse angesehen.

Versuch 1. Sarkombrei mit m_{15} Phosphatpuffergemischen, Reaktionsbreite p_H 4,4 bis 9,2. Die angegebenen Werte sind mg Stickstoff, aus mehreren Versuchen ermittelt.

*) Nähere Literatur siehe bei B. Brandt²⁾.

Tabelle 1.

p_H	mg Stickstoff nach		
	10 Std.	20 Std.	30 Std.
4,9	0,110	0,284	0,300
5,2	0,106	0,226	0,258
5,9	0,100	0,176	0,212
6,4	0,120	0,224	0,370
6,8	0,114	0,140	0,180
7,2	0,110	0,126	0,174
7,4	0,110	0,114	0,148
8,0	0,124	0,136	0,172
8,6	0,110	0,134	0,190

Versuch 2. Da für die stärker sauren Gebiete die Phosphatpuffer nicht ausreichten, verwandten wir Citratgemische. Reaktionsbreite p_H 5,0 bis 2,0.

Tabelle 2.

p_H	mg Stickstoff nach		
	10 Std.	20 Std.	30 Std.
1,4	0,198	0,218	0,258
2,2	0,254	0,336	0,358
2,9	0,212	0,318	0,336
3,5	0,174	0,336	0,480
3,9	0,158	0,346	0,522
4,4	0,126	0,378	0,462

Aus der beigegebenen graphischen Darstellung, bei der auf der Abszisse die verschiedenen p_H -Werte, auf den Ordinaten die Stickstoff-

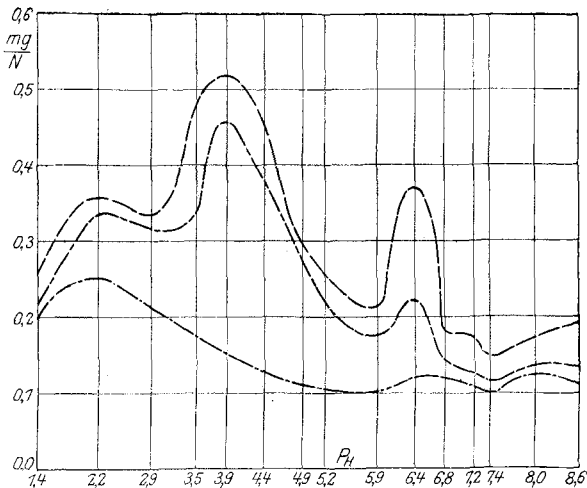


Abb. 1. Die auf der Abszisse verzeichneten Zahlen bedeuten die verschiedene H-Ionenkonzentration (p_H -Werte) der einzelnen Versuche. Auf den Ordinaten sind die bei diesen Konzentrationen ermittelten Reststickstoffwerte, die als Maß der Autolyse angesprochen wurden, aufgetragen. Die nähere Erklärung ist im Text gegeben.

— · — Autolyse nach 10 Std.; — — — nach 20 Std.; — — — nach 30 Std.

werte in mg angegeben sind, ergibt sich zunächst nach 20 und 30 stündiger Autolyse ein Optimum bei p_H 3,9 (nach 10 Stunden bei p_H 2,2), welches der Ausdruck einer primären Protease, d. h. eines pepsinähnlichen Fermentes ist. Ein zweites schwächeres Optimum findet sich bei p_H 6,4 und endlich strebt die Kurve im alkalischen Gebiet bei p_H 8,6 noch einem dritten Optimum zu. Für die letztere verhältnismäßig sehr kleine Erhebung fragt es sich, ob sie tatsächlich der Ausdruck einer speziellen Fermentwirkung ist oder ob die gefundenen Werte nur innerhalb der Versuchsfehlergrenze liegen. Wir möchten das erstere bejahen; einmal weil gleichmäßig alle drei Kurven bei demselben p_H denselben Anstieg zeigen und zweitens, weil der eine von uns²⁾ bei der Untersuchung der *Leberautolyse* ein ähnliches Bild wahrscheinlich machen konnte. Bei der Kaninchenleber fand sich bei p_H 5,9 ein Optimum, welches in Übereinstimmung mit anderen Forschern nicht als besondere Fermentwirkung, sondern als das *mittlere gemeinsame Optimum* angesehen wurde, bei der anscheinend alle Fermente, wenigstens Proteasen, wirksam sind. Umgekehrt möchten wir hier aus dem Optimum bei p_H 6,4, welches wir ebenfalls als Durchschnittsoptimum aller Proteasen der Sarkomautolyse ansehen, auf eine im alkalischen Gebiet wirksame Protease, d. h. ein tryptisches Ferment schließen, und p_H 8,6 — in Übereinstimmung mit anderen Forschern — eine Protease*) (ob sekundär oder tertiär bleibt zweifelhaft) annehmen. Die Sarkomzelle enthält also jedenfalls *mehrere Fermentsysteme*, wobei die Wirkung der primären Protease stark vorherrscht. Die übrigen Fermente können wir vielleicht als den Ausdruck einer Wirkung allgemeiner Zellfermente ansehen, die wir naturgemäß auch in mesenchymalen Zellen ebenso erwarteten, wie sie z. B. in Leberzellen usw. nachweisbar sind.

Die so gewonnenen Ergebnisse erscheinen um so wahrscheinlicher, als ja bekannt ist, daß das *Kollagen* wohl vom Pepsin, nicht aber vom Pankreastrypsin verdaut wird. Auf Grund dieser Tatsache hat der eine von uns⁵⁾ bereits vor längerer Zeit „die Anwesenheit eines pepsinähnlichen Fermentes“ für die Auflösung des Kollagens bei der Wundheilung verlangt, eine Annahme, die durch unsere Versuche wesentlich gestützt erscheint.

*) Als *primäre Protease* bezeichnet man nach dem Vorschlag von Bradley³⁾ und von Derby⁴⁾, die in jüngster Zeit das Problem der Autolyse weitgehend geklärt haben, alle *pepsinähnlichen* Fermente. Entsprechend werden die *trypsinähnlichen* Fermente *sekundäre Proteasen* und die *erepsinähnlichen tertiäre Proteasen* benannt. Die erwähnten Forscher weisen mit Recht darauf hin, daß Pepsin und Trypsin genau charakterisierte Fermente seien und daß man deshalb diese Bezeichnung nicht für ähnlich wirkende Fermente benutzen dürfe. Diese neuzeitliche Namensgebung, die in Deutschland noch wenig gebräuchlich ist, scheint nicht nur übersichtlich und klar, sondern auch notwendig; werden doch die Ausdrücke, wie Pepsinase, Peptase, Peptidase usw. oft verwechselt und falsch angewandt [vgl. Brandt²⁾ S. 598].

Wir sind uns natürlich bewußt, daß die am Sarkom gewonnenen Ergebnisse nicht ohne weiteres auf die „normalen“ mesenchymalen Gewebe übertragen werden dürfen; das Fermentleben der Sarkomzelle wird dem Grade und vielleicht auch dem Wesen nach von der Mesenchymmutterzelle ebenso abweichen, wie dasjenige der Carcinomzelle von der normalen Epithelzelle. Da aber in einem fibroplastischen Sarkom Kollagen sowohl angebaut wie abgebaut wird, werden wir immerhin das „kollagenolytische Ferment“ auch hier annehmen müssen.

Der Nachweis einer *vorherrschend wirksamen primären Protease* bei der Autolyse *im fibroplastischen Sarkom* entspricht jedenfalls der Erfahrung, daß im Naturgeschehen für besondere fermentative Aufgaben auch entsprechend eingestellte Fermente bereitstehen.

Auf die Frage, ob die Sarkomautolyse *in vitro* den *in vivo* zu beobachtenden Zerfallsvorgängen der Sarkome wesensgleich ist, soll andern Ortes eingegangen werden. Wir haben hierzu bereits einmal Stellung genommen⁶⁾, als wir eigenartige morphologische Zerfallserscheinungen in einem *vitalgefärbten Sarkom* als autolytischen Prozeß ansprachen. Da weiterhin der Nachweis geführt werden konnte, daß Vitalfarbstoffe die Autolyse *in vitro* nicht hemmen²⁾, so bestand in diesem Punkte zu jener Auffassung kein Widerspruch. — Unsere auf die gleiche Frage gerichteten Untersuchungen über die *Morphologie der Autolyse in vitro* sollen gleichfalls an anderer Stelle mitgeteilt werden.

Zusammenfassung.

1. Ausgehend von der Tatsache, daß über den *Fermentgehalt mesenchymaler Gewebe* nur sehr wenig bekannt ist, wurde versucht, an Hand der *Sarkomautolyse* einen Einblick in die in mesenchymalen Stützgeweben ablaufenden fermentativen Prozesse zu gewinnen.

2. Mit Rücksicht auf die Abhängigkeit fermentativer Vorgänge von der Reaktion wurde die Sarkomautolyse bei verschiedener *Wasserstoffionenkonzentration* untersucht.

3. Es ergab sich zunächst ein *Optimum im sauren Gebiet* (p_H 3,9), welches auf das Vorhandensein einer primären Protease (Anm. S. 401) bezogen wurde.

4. Von einem zweiten *im alkalischen Gebiet* (p_H 8,6) *liegendem Optimum* wird angenommen, daß es auf der Wirkung einer sekundären Protease (Anm. S. 401) beruht.

5. Ein dritter zwischen beiden liegender Höhepunkt der autolytischen Fermentwirkung wurde als der Ausdruck der optimalen Zusammenarbeit aller Proteasen angesehen.

6. Mit der Tatsache, daß das Kollagen, der Hauptbestandteil der mesenchymalen Stützgewebe nur vom Pepsin, nicht aber vom Trypsin

angegriffen wird, steht das von uns gefundene *Vorherrschen der primären Protease* gut im Einklang.

7. Es wird dargelegt, daß das Sarkom wegen der *Homogenität im histologischen Bau* zur Untersuchung des Fermentgehaltes bösartiger Geschwülste wesentlich besser geeignet ist als das Carcinom.

Literaturverzeichnis.

¹⁾ Falk, K. S., H. M. Noyes and K. Sugiura, Studies on enzyme action **20**; The protease actions of malignant human and rat tumor extracts at different hydrogen ion concentrations and in the presence of various salts. The Journ. of biol. chem. **53**, 75. 1922. — ²⁾ Brandi, B., Autolyse und Vitalfarbstoffe. Bruns' Beitr. z. klin. Chir. **135**, 595. 1926. — ³⁾ Bradley, H. C., Studies of autolysis **8**, The nature of autolytic enzymes. Journ. of biol. chem. **52**, 467. 1922. — ⁴⁾ Derby, K. S., Über die Nomenklatur der autolytischen Enzyme. Biochem. Zeitschr. **133**, 432. 1922. — ⁵⁾ v. Gaza, W., Der Stoffwechsel im Wundgewebe. Bruns' Beitr. z. klin. Chir. **110**, 347. 1917. — ⁶⁾ v. Gaza, W., Beobachtungen über Vitalfärbung an einem Knochensarkom. Bruns' Beitr. z. klin. Chir. **135**, 476. 1926.
