

(Aus der Psychiatrischen Universitätsklinik zu Fukuoka, Japan  
[Vorstand: Prof. Dr. *M. Shinoda*].)

## Über Glykolyse und Glykogenolyse im Blut, Muskel und Sarkomgewebe sowie in der Leber von normalen und Sarkomkaninchen.

Von

Generalarzt Dr. **Hirotoshi Maruyama.**

(Eingegangen am 27. Juli 1940.)

### I. Einleitung.

Nach *Warburg*, *Posener*, *Negelein* u. a. <sup>1-9</sup> ist bekanntlich die Glykolyse in bösartigen Geschwülsten (Krebs und Sarkom), Retina und im Gehirn stärker ausgeprägt als in anderen Geweben. Ob für Glykogenolyse der gleiche Unterschied gilt, steht noch offen. Hauptsächlich um diese Frage zu entscheiden, daneben auch um die Glykolyse im Bereich des Themas nachzuprüfen, stellte ich meine Untersuchungen an. Seit April 1935 erzeugte ich nach dem *Yamagiwaschen* Verfahren<sup>10</sup> auf der Rückenhaut von 10 Kaninchen Cancroid durch Einreibungen mit Teer. Obwohl ich diese Einreibungen etwa 2 Jahre lang fortsetzte, entwickelte sich nur bei einem Kaninchen ein Cancroid, das in anderen Organen keine Metastase hervorbrachte. Bei 9 Kaninchen wuchs durch subcutane Fortpflanzung des kleinrundzelligen Sarkomgewebes ohne Ausnahme immer das Sarkom, das sich nach Verlauf von etwa 40—60 Tagen von Hühnerei- bis Faustgröße entwickelte und manchmal in anderen Organen (vor allem in Lunge, Leber, beiden Nieren und Milz) Metastasen bildete. Mit diesen 10 genannten und 10 normalen Kaninchen wurde die Glykolyse und Glykogenolyse im Blut, Muskel und Sarkomgewebe (nur ein Fall von Krebs) sowie in der Leber nach der folgenden Methode bestimmt.

### II. Untersuchungsmethode.

1. Die Glykolyse und Glykogenolyse in den verschiedenen Geweben wurde streng aseptisch (ohne Zusatz von Optochin) anaerob durchgeführt. Zur Bestimmung der Glykolyse in Gewebe und Blut wurden 2 g Gewebepaste (oder 2 ccm Blut) in einer 50 ccm Meßflasche mit 18 ccm einer mit Puffermischung versetzten, 0,1% Zucker enthaltenden *Ringer*-Lösung von 7,7 p<sub>H</sub>, in der kein Natriumbicarbonat enthalten ist (beim Blut 23 ccm einer 0,05% Zucker enthaltenden *Ringer*-Lösung) versetzt und geschüttelt. Das Gemisch wird durch ein feines Seidentuch filtriert damit die suspendierten feinen Fäserchen die Meßpipette nicht verstopfen, vom Filtrat werden 2 ccm in einen 10 ccm-Meßkolben überführt und mit kolloidalem Eisen wie gewöhnlich enteiweißt (beim Blut

nimmt man 5 ccm des Gemisches und einen 25 ccm-Meßkolben). Das restliche Gemisch wird bei 37° C im Brutschrank etwa 14 Stunden lang stehengelassen und Proben davon nach 2, 4 und etwa 14 Stunden jedesmal wie oben behandelt. Mit je 2 oder 1 ccm jeden Filtrates bestimmt man nach der *Bangschen* Methode den Reduktionswert. Der Zuckerverbrauch beim Stehenbleiben im Brutschrank stellt den glykolytischen Wert des Gemisches dar. Zur Kontrolle wird nach derselben Methode gleichzeitig der Reduktionswert eines Gemisches bestimmt, indem 2 ccm *Ringer*-Lösung und 18 ccm der 0,1% Zucker enthaltenden *Ringer*-Lösung (zur Kontrolle für den Versuch mit dem Blut 23 ccm der 0,05% Zucker enthaltenden *Ringer*-Lösung) enthalten sind.

2. Die Glykogenolyse im Gewebe und Blut wurde nach der Glykogenbestimmungsmikromethode von *Naka*<sup>11</sup> folgendermaßen bestimmt: In eine 30 ccm-Meßflasche gibt man 1 g Gewebepulver oder 1 ccm Blut und fügt 9 ccm einer mit Puffermischung versetzten, 0,1% Glykogen enthaltenden *Ringer*-Lösung ( $p_H = 7,7$ ) hinzu. Nach Schütteln füllt man 1 ccm des Gemisches in ein mit Kühler versehenes Röhrchen mit einem 10 ccm-Meßzeichen und setzt 1 ccm einer 60%igen Kaliumhydroxydlösung zu. Das restliche Gemisch wird sofort für etwa 14 Stunden bei 37° C in den Brutschrank gestellt und Proben davon nach 2, 4 sowie etwa 14 Stunden jedesmal wie oben behandelt. Unter zeitweiligem Schütteln jeden Röhrchens nach 2 Stunden langem Kochen im Wasserbad gibt man darauf je 2 ccm Aqua dest. und 8 ccm 96%igen Alkohols dazu und schüttelt. Das Röhrchen wird weiter bei Zimmertemperatur etwa 20 Stunden lang stehengelassen und dann zentrifugiert. Nach Entfernung der überstehenden Flüssigkeit trocknet man den Niederschlag jedes Röhrchens, fügt je 5 ccm Aqua dest. hinzu und kocht dann 20 Min. lang. Nach Abkühlen wird jedes Röhrchen mit 2,5 ccm Salzsäure (1,19) versetzt, mit Aqua dest. bis zu 10 ccm aufgefüllt und etwa 30 Min. lang zentrifugiert und dann die gewonnene Flüssigkeit langsam filtriert. Es ist hier vor allem zu bemerken, daß das Filtrat mit Sicherheit wasserklar sein muß, und daß auch bei nur geringster Trübung desselben das Resultat fehlerhaft wird. Je 5 ccm (oder 2,5 ccm) des Filtrates werden einzeln in ein anderes mit Kühler versehenes Röhrchen gefüllt und 40 Min. lang gekocht. Nach Abkühlung wird das Filtrat mit einem Tropfen einer 0,01%igen Methylrotlösung (mit Alkohol und Aqua dest. gelöst) versetzt und mit einer 30%igen Natriumhydroxydlösung sowie einer 3%igen Salzsäurelösung neutralisiert und dann mit Aqua dest. auf 10 ccm aufgefüllt; damit bestimmt man nach der *Bangschen* Methode den Reduktionswert, der als Zuckerwert ausgedrückt wird. Wie bei der Glykolyse stellt der Glykogenverbrauch beim Stehenlassen im Brutschrank den glykogenolytischen Wert des Gewebes oder des Blutes dar. Als Kontrolle kommt 1 ccm *Ringer*-Lösung an Stelle von 1 g Gewebepulver oder 1 ccm Blut zur Anwendung.

### III. Über Glykolyse und Glykogenolyse im Blut, Muskel und Sarkomgewebe sowie in der Leber von normalen und Sarkomkaninchen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 in Durchschnittszahlen zusammengefaßt. Die Glykolyse im normalen, etwa 2 Stunden nach dem Tode anaerob untersuchten Kaninchenblut betrug 29,7, 68,9 bzw. 232,6 mg-% im Mittel bei 2,4 bzw. etwa 14stündigem Stehenlassen im Brutschrank. Daraus geht hervor, daß die Glykolyse im Blut sehr langsam verläuft und daß dabei der relativ niedrige Endwert von 232,6 mg-% erhalten

Tabelle 1. Durchschnittswerte an Glykolyse im Blut, Muskel, Sarkomgewebe sowie in der Leber von normalen und Sarkomkaninchen in in mg-% Zuckerwert.

Versuchstier	Gewebsart	Zeitpunkt nach der Blutabnahme oder nach dem Tode		Anfangs-glucosegehalt	Glykolysewert				Kontrolle
		Dauer des Aufenthaltes bei 37° C in Stunden							
		Std.	Min.	0	2	4	etwa 14		
Normales Kaninchen	Blut . . . . .	2	9	683,8	29,7	68,9	232,6	465,2	
	Leber . . . . .	5	35	1442,7	16,7	19,9	1213,4	844,8	
	Muskel . . . . .	5	37	958,6	34,9	66,0	794,5	857,3	
Kaninchen mit Sarkom	Blut { normales . .	2	28	557,7	24,3	48,3	290,3	354,3	
		nach Wachsen des Sarkoms . . .	2	24	665,7	30,7	79,0	268,4	445,9
	Leber mit metastatischem Sarkom .	5	56	950,2	63,4	139,7	766,6	665,7	
	Sarkom selbst . .	5	59	847,5	62,6	236,3	689,8	741,0	
	Kaninchen mit Cancroid	Blut nach Wachsen des Cancroids	2	35	775,3	43,5	43,5	200,3	548,8
Leber ohne metastatischem Krebs .		40	5	557,5	0	52,2	278,7	383,3	
Cancroid selbst . .		40	4	461,8	113,3	261,5	418,3	383,3	
Normales Kaninchenhirn . . .		2	46	425,2	121,8	239,5	386,0	432,3	

Anmerkungen. 1. Bequemlichkeitshalber wurden die durchschnittlichen Resultate meines früheren, mit normalem Kaninchenhirn angestellten Versuches<sup>12</sup> hier in der letzten Reihe mitangeführt: Glykolyse wurde in 13,5 ccm einer 0,05% Zucker enthaltenden *Ringer*-Lösung mit 1,5 g Gehirnbrei (wobei der Zuckergehalt für die Endreaktion der Gehirnglykolyse meist mangelhaft ausfiel), Glykogenolyse unter Zusatz von 8,5 ccm einer 0,1% Glykogen enthaltenden *Ringer*-Lösung zu 1,5 g Gehirnbrei ausgeführt. 2. Die Leber, die durch Ausspülung mit *Ringer*-Lösung vom Blut befreit wurde, der blutarme Rückenmuskel und der blutarme Teil des Sarkomgewebes vom Kaninchen wurden möglichst fein zerrieben und kamen dann zur Untersuchung. 3. Unter 9 Kaninchen mit subcutan fortgepflanzten Sarkommetastasen wurde solche in der Leber bei 7 Fällen = 80% gefunden; unter ihnen war das Sarkom bei 3 Fällen sehr verbreitet und hatte die ganze Leber mit Sarkomgewebe erfüllt, bei 4 Fällen nur sehr spärlich, die Leber enthielt nur einige erbsengroße Metastasen. 4. Hier kam nur ein Kaninchen mit Cancroid zur Untersuchung. Dieselben Angaben gelten auch für die folgende Tabelle.

wird. Beim normalen Kaninchenmuskel, etwa  $5\frac{1}{2}$  Stunden nach dem Tode anaerob untersucht, verläuft die Glykolyse ebenso träge wie bei Blut, der erreichte Endwert liegt aber beim Muskel bei etwa 14stündigem Aufenthalt im Brutschrank ungefähr 3mal so hoch (794,5 mg-% im Mittel) wie beim Blut. Normale Kaninchenleber, etwa  $5\frac{1}{2}$  Stunden nach dem Tode anaerob untersucht, ergab den auffallend hohen Anfangsglucosegehalt von 1442,7 mg-% im Mittel gegenüber 844,8 mg-% bei den Kontrollen. Wahrscheinlich hat die *Ringer*-Lösung aus dem Leberbrei Glucose extrahiert. Die Leberglykolyse verlief so träge, daß sie bei dem geringen Wert von 16,7 bzw. 19,9 mg-% im Mittel für 2- bzw. 4stündigem Aufenthalt im Brutschrank praktisch fast völlig ausblieb. Nach etwa 14stündigem Stehenlassen wurde der hohe Wert von 1213,4 mg-% im Mittel erreicht. Die glykolytische Wirkung des Gewebes bei etwa 14stündigem Stehenlassen im Brutschrank erscheint um so stärker, je höher der Zuckergehalt in der Versuchsmischung ist.

Sarkomkaninchen zeigen fast denselben Glykolysewert im Blut wie normale Tiere. In ihrer Leber, die manchmal metastatisches Sarkomgewebe enthielt, wurde die Glykolyse so beschleunigt, daß sie bei 2- bzw. 4stündigem Stehenlassen im Brutschrank bis auf 63,4 bzw. 139,7 mg-% im Mittel stieg, während sie wegen des niedrigen Anfangsglucosegehaltes (950,2 mg-%) auch bei etwa 14stündigem Stehenlassen 766,6 mg-% im Mittel, d. h. einen niedrigeren Wert als bei der normalen Leber zeigte. Im etwa 6 Stunden nach dem Tode anaerob untersuchten Kaninchen-sarkom stieg die Glykolyse bei 2- bzw. 4stündigem Stehenlassen im Brutschrank auffallend bis auf 62,8 bzw. 236,3 mg-% im Mittel an, wie dies schon von vielen Autoren <sup>1, 3, 5</sup> nachgewiesen wurde, blieb aber bei etwa 14stündigem Stehenlassen, entsprechend dem geringen Anfangsglucosegehalt mit 847,5 mg-% im Mittel auf dem niedrigen Wert von 689,8 mg-% im Mittel stehen.

Bei dem einzigen Cancroidkaninchen fiel die Glykolyse des Blutes ebenso aus wie bei Normaltieren. Auch in der Leber, die keine Metastasen enthielt, blieb die Glykolyse meist innerhalb normaler Grenzen mit dem Wert von 0 bzw. 52,2 mg-% bei 2- bzw. 4stündigem Stehenlassen im Brutschrank. Beim etwa 40 Stunden nach dem Tode anaerob untersuchten Cancroid zeigte die Glykolyse, entsprechend den Befunden vieler Autoren <sup>1, 5, 7</sup>, bei 2- bzw. 4stündigem Stehenlassen im Brutschrank die gleiche Steigerung bis auf 113,3 bzw. 261,5 mg-% wie beim Gehirn. Da der Anfangsglucosegehalt der Leber- sowie der Cancroidversuche niedrig (557,5 sowie 461,8 mg-%) lag, so blieb die Glykolyse auch bei etwa 14stündigem Stehenlassen im Brutschrank auf dem niedrigen Wert von 278,7 sowie 418,3 mg-%. Die Glykolyse des Blutes bleibt also vom Wachstum des Sarkoms oder Cancroids ganz unbeeinflußt; im Muskel und in der Leber verläuft sie überhaupt sehr träge,

bei genügend langem Stehenlassen im Brutschrank werden aber hohe Endwerte erreicht.

Tabelle 2. Durchschnittswerte der Glykogenolyse im Blut, Muskel, Sarkomgewebe sowie in der Leber von normalen und Sarkomkaninchen in mg-% Zuckerwert.

Versuchstier	Gewebsart	Zeitpunkt nach der Blutabnahme oder nach dem Tode		Anfangsglykogengehalt	Glykogenolysewerte				Kontrolle
		Dauer des Aufenthaltes bei 37° C in Stunden							
		Std.	Min.	0	2	4	etwa 14		
Normales Kaninchen	Blut . . . . .	2	11	840,4	388,8	441,3	496,8	802,8	
	Leber . . . . .	5	37	837,6	430,4	530,2	587,0	718,9	
	Muskel . . . . .	5	39	661,6	439,6	437,9	466,1	728,9	
Kaninchen mit Sarkom	Blut { normales . .	2	29	728,9	365,8	388,6	444,7	688,4	
		nach Wachsen des Sarkoms . .	2	25	745,3	331,3	380,5	424,5	747,2
	Leber mit metastatischem Sarkom .	5	58	903,2	373,2	589,0	658,5	732,9	
	Sarkom selbst . .	6	1	839,2	297,6	462,9	578,3	732,9	
Kaninchen mit Cancroid	Blut nach Wachsen des Cancroids . .	2	36	773,6	306,8	439,2	487,8	689,8	
	Leber ohne metastatischen Krebs . .	40	7	696,8	418,0	432,0	480,8	635,0	
	Cancroid selbst . .	40	6	752,6	442,0	627,2	615,4	635,0	
Normales Kaninchenhirn . . .		2	47	435,8	114,4	194,9	352,8	426,7	

Die Ergebnisse über Glykogenolyse faßt Tabelle 2 zusammen. Sie verläuft im normalen, etwa 2 Stunden nach der Abnahme anaerob untersuchten Kaninchenblut, im Gegensatz zur Glykolyse, so rasch, daß sie mit dem hohen Wert von 388,8 bzw. 441,3 mg-% im Mittel schon bei 2- bzw. 4stündigem Stehenlassen im Brutschrank dem Endwert nahekkommt; weiteres 14stündiges Stehenlassen gibt nur noch die geringe Zunahme auf 496,8 mg-%. Muskel, Sarkomgewebe und Leber verhalten sich ähnlich. Während beim normalen, etwa 5½ Stunden nach dem Tode anaerob untersuchten Kaninchenmuskel die Glykogenolyse in fast gleicher Weise wie beim Blut ausfiel, stieg sie bei der Leber bis auf 530,2 bzw. 587,0 mg-% im Mittel bei 4- bzw. etwa 14stündigem Stehenlassen im Brutschrank. Beim Sarkom- sowie Cancroidkaninchenblut (nur ein solcher Fall wurde aber untersucht) gab sie fast den gleichen Wert wie bei normalen Tieren; das Wachsen des Sarkoms sowie des Cancroids beeinflußt also die Blutglykogenolyse auch nicht. Die Glykogenolyse in der etwa 6 Stunden nach dem Tode anaerob untersuchten Leber, die reichlich Sarkommetastasen enthielt, nahm bei 4- bzw. etwa 14stündigem Aufenthalt im Brutschrank stärker als bei der

normalen Leber zu, d. h. bis auf 589,0 bzw. 658,5 mg-% im Mittel. Auch beim Sarkomgewebe vom Kaninchen, etwa 6 Stunden nach dem Tode anaerob untersucht, stieg die Glykogenolyse bei 4- bzw. 14stündigem Stehenlassen im Brutschrank in gleicher Weise bis auf 462,9 bzw. 578,3 mg-% im Mittel an wie bei der normalen Kaninchenleber. Beim etwa 40 Stunden nach dem Tode anaerob untersuchten Kaninchencarcinoid verlief sie mit großer Geschwindigkeit bei 2- bzw. 4stündigem Stehenlassen im Brutschrank (442,0 bzw. 627,2 mg-%), während sie beim Kaninchenhirn langsam verlief und nur die sehr niedrigen Werte von 114,4 bzw. 194,9 mg-% erreichte. Die Glykogenolyse nimmt in der Leber bei normalen Kaninchen bei langdauerndem Stehenlassen im Brutschrank stärker als im Muskel und im Blut zu; im Sarkom steigt sie in gleicher Weise wie bei der normalen Kaninchenleber und bei einem Kaninchencarcinoid noch weiter an.

#### IV. Schlußfolgerungen.

1. Im normalen, etwa 2 Stunden nach der Abnahme anaerob untersuchten Kaninchenblut verläuft die Glykolyse langsam und gibt bei 2- bzw. 4stündigem Stehenlassen im Brutschrank den geringen Wert von 29,7 bzw. 68,9 mg-% im Mittel; bei etwa 14stündigem Stehenlassen als Endwert mit 232,6 mg-% im Mittel. Auch beim Blut vom Kaninchen mit Sarkom oder Carcinoid bleibt sie innerhalb normaler Grenzen.

2. Während die Glykolyse im normalen, etwa  $5\frac{1}{2}$  Stunden nach dem Tode anaerob untersuchten Kaninchenmuskel ebenso langsam wie beim Blut verläuft, liegt bei etwa 14stündigem Stehenlassen im Brutschrank der Endwert ungefähr 3fach höher als beim Blut.

3. Während die Glykolyse in der Leber vom normalen Kaninchen (etwa  $5\frac{1}{2}$  Stunden nach dem Tode anaerob untersucht) viel langsamer als beim Blut verläuft, gibt sie trotzdem bei etwa 14stündigem Stehenlassen im Brutschrank einen ungefähr 6fach höheren Wert als beim Blut.

4. Während bei der Sarkomkaninchenleber, die reichlich Metastasen enthielt, die Glykolyse bei 2- bzw. 4stündigem Stehenlassen im Brutschrank auffallend beschleunigt (auf 63,4 bzw. 139,7 mg-% im Mittel) ist, gegenüber normaler Leber, liegt nach 14 Stunden der Endwert viel niedriger.

5. Während beim Sarkomgewebe von Kaninchen (etwa 6 Stunden nach dem Tode anaerob untersucht) die Glykolyse entsprechend den Befunden vieler Autoren bei 2- bzw. 4stündigem Stehenlassen im Brutschrank ebenso deutlich beschleunigt ist (auf 62,6 bzw. 236,3 mg-% im Mittel) wie beim Gehirn, gibt sie bei etwa 14stündigem Stehenlassen fast den gleichen Wert wie beim Muskel. Auch bei einem etwa 40 Stunden nach dem Tode anaerob untersuchten Kaninchencarcinoid verhielt sie sich ähnlich.

6. Beim normalen Kaninchenblut (etwa 2 Stunden nach der Abnahme anaerob untersucht) verläuft die Glykogenolyse, im Gegensatz zur Glykolyse, sehr rasch und gibt bei 2- bzw. 4stündigem Stehenlassen im Brutschrank den hohen Wert von 388,8 bzw. 441,3 mg-% im Mittel und erfährt bei etwa 14stündigem Stehenlassen nur eine geringe Zunahme bis auf 496,8 mg-% im Mittel. Im Muskel, Sarkom-, Cancroidgewebe und in der Leber verläuft sie im allgemeinen ähnlich rasch.

7. Während die Glykogenolyse im normalen Kaninchenmuskel fast den gleichen Wert wie beim Blut gibt, steigt sie bei der Leber auffallend (bis auf 530,2 bzw. 587,0 mg-% im Mittel bei 4- bzw. 14stündigem Stehenlassen im Brutschrank) an.

8. Beim Blut von Kaninchen mit Sarkom sowie Cancroid bleibt die Glykogenolyse innerhalb normaler Grenzen.

9. Das Wachstum des Sarkoms oder des Cancroids beeinflußt weder die Glykolyse noch die Glykogenolyse im Blut.

10. In der Leber, die einzelne Sarkometastasen enthält, ist die Glykogenolyse stärker als in der normalen Leber.

11. Auch das Sarkomgewebe selbst zeigt stärkere Glykogenolyse wie normale Kaninchenleber.

12. Beim Cancroid verläuft die Glykogenolyse rascher und gibt höhere Werte (mit 442,0 bzw. 627,2 mg-% bei 2- bzw. 4stündigem Stehenbleiben im Brutschrank) als beim Sarkomgewebe.

13. Beim Kaninchenhirn verläuft die Glykogenolyse sehr langsam (mit 114,4 bzw. 194,9 mg-% im Mittel), im Gegensatz also zu den oben erwähnten Geweben.

(Dieses Manuskript wurde am 5. September 1937 abgeschlossen.)

### Literaturverzeichnis.

- <sup>1</sup> Warburg, Posener u. Negelein: Biochem. Z. **152**, 309 (1924). — <sup>2</sup> Negelein: Biochem. Z. **158**, 121 (1925). — <sup>3</sup> Warburg u. Kubowitz: Biochem. Z. **189**, 242 (1927). — <sup>4</sup> Krebs: Biochem. Z. **189**, 57 (1927). — <sup>5</sup> Krebs u. Kubowitz: Biochem. Z. **189**, 194 (1927). — <sup>6</sup> Pentimalli: Z. Krebsforsch. **25**, 347 (1927). — <sup>7</sup> Fujita: Biochem. Z. **197**, 175 (1928). — <sup>8</sup> Kubowitz: Biochem. Z. **204**, 475 (1929). — <sup>9</sup> Nakashima: Biochem. Z. **204**, 479 (1929). — <sup>10</sup> Yamagiwa u. Ishikawa: Mitt. med. Fak. Tokyo **15**, 296 (1915). — <sup>11</sup> Naka: Zbl. Neur. **58**, 751 (1931). — <sup>12</sup> Maruyama: Arch. f. Psychiatr. **102**, 430 (1934); **103**, 294 (1935).