

Zur Abhängigkeit des Glucoseverbrauches von Ehrlich-Mäuse-Ascites-Krebszellen in-vitro von Temperatur und Hyperthermie-Vorbehandlung

M. VON ARDENNE und P. G. REITNAUER

Forschungsinstitut Manfred von Ardenne, Dresden-Weißer Hirsch

(Z. Naturforsch. **21 b**, 841—848 [1966]; eingegangen am 24. März 1966)

Über Messungen der Abhängigkeit des anaeroben Glucoseverbrauches von Ehrlich-Mäuse-Ascites-Carcinomzellen von der Glucose-Konzentration und von der Temperatur wird berichtet. Es zeigt sich, daß die anaerobe Gärung bei Übergang von 38 °C auf 44 °C im Fall eines hohen Glucosespiegels in vitro etwa auf 130% zunimmt und weiter, daß sie unter in-vivo-Bedingungen beim Übergang zu Extremhyperthermie-Temperaturen sich nicht ändert. Messungen über den Einfluß der Extremhyperthermie auf den anaeroben Glucoseverbrauch ließen für den Fall eines hohen Glucosespiegels (starke Gärung) erkennen, daß der beobachtete plötzliche Stopp des Gärungsstoffwechsels nach Hyperthermiedauern eintritt, bei denen die Atmung (Schädigungsmechanismus Typ II) gerade aufgehört hat. Für den Fall eines niedrigen Glucosespiegels (schwache Gärung) wurde gefunden, daß sich die Zeitdauer für den Stopp der anaeroben Gärung durch Extremhyperthermie verringert. Abschließend werden Schlußfolgerungen aus diesen Ergebnissen insbesondere zur Frage des zeitlichen Verlaufes des Glucosespiegel-Anstieges und der relativen Wachstumsbeschleunigung bei Krebsgeschwülsten im Anschluß an einen Extremhyperthermie-Prozeß gezogen.

Die Erkenntnis von der entscheidenden Bedeutung des Glucosespiegels im Tumor für die faktische Malignität (Verdoppelungszeit) in-vivo^{1,2} und die Schlußfolgerung, daß seine während und als Folge therapeutischer Prozesse endogen erfolgenden oder exogen gesteuerten Änderungen wesentliche Faktoren für die Optimierung der Krebsterapie darstellen können^{1,2}, aber auch unsere Bemühungen um die Aufklärung des cancerostatischen Geschehens in Extremhyperthermie³⁻⁷, lenkten unsere Aufmerksamkeit erneut auf den Glucoseverbrauch der Krebszellen.

Die Messung des Glucoseverbrauches erfolgte unter Bedingungen, bei denen in der Regel die in-vivo-Situation nachgeahmt oder berücksichtigt wurde. Insgesamt führten wir 151 Inkubationen durch. Bei diesen Untersuchungen, die z. T. auch der Ergänzung oder Kontrolle von mit der manometrischen Methode erzielten Ergebnissen dienten, sollte besonders folgenden Fragen nachgegangen werden:

a) Messung der Abhängigkeit des Glucoseverbrauches durch zugegebene Krebszellen von der Glucose-Konzentration. Das Ergebnis solcher Messungen gibt Auskunft über die Lage und Streu-

ung der wichtigen Grenzen zwischen ungesättigtem und gesättigtem Bereich der Krebszellenkennlinie (Abhängigkeit der Gärungsgröße von der Glucose-Konzentration).

b) Messung der Abhängigkeit des Glucoseverbrauches der Krebszellen von der Temperatur im ungesättigten und im gesättigten Bereich der Krebszellenkennlinie. Das Ergebnis dieser Messungen gibt Auskunft darüber, ob bei Temperatursteigerung eine Verstärkung der Gärung eintritt und wie groß diese Verstärkung ist.

c) Messungen über den Verlauf der Abnahme des Glucoseverbrauches der Krebszellen während und nach einer Extremhyperthermie-Behandlung. Die Ergebnisse dieser Messungen geben Hinweise über die Art der therapeutischen Schädigung⁵ und zur zeitweiligen Stimulierung des Wachstums der Krebsgeschwülste im Anschluß an eine Therapie².

Unser Interesse an diesen drei Fragestellungen ergab sich aus dem Wunsch, die Grundlagen für die Theorie des Gärungsstoffwechsels der Krebsgeschwülste und für die Hochzüchtung der Krebs-Mehrschritt-Therapie zu festigen und zu ergänzen.

¹ M. VON ARDENNE, Syncarcinokolyse in Gestalt der Mehrschritt-Chemotherapie. Vortrag im Heidelberger Krebsforschungszentrum am 25. 9. 1965.

² M. VON ARDENNE u. J. ELSNER, W. KRÜGER, P. G. REITNAUER u. F. RIEGER, Klin. Wschr. **44**, 503 [1966].

³ M. VON ARDENNE u. P. G. REITNAUER, Arch. Geschwulstforsch. **26**, 184 [1966].

⁴ M. VON ARDENNE u. W. KRÜGER, Z. Naturforsch. **21 b**, 373 [1966].

⁵ M. VON ARDENNE u. P. G. REITNAUER, Naturwissenschaften **53**, 88 [1966].

⁶ M. VON ARDENNE u. W. KRÜGER, Z. Naturforsch. **21 b**, im Druck, 1966.

⁷ M. VON ARDENNE u. P. G. REITNAUER, Arch. Geschwulstforsch. **27**, im Druck, 1966.

Methode

Ansatz der Inkubationsversuche mit EMAC-Zellsuspensionen

Bei allen 151 Inkubationen entnahmen wir die Zellen 8 bis 10 Tage alten Ehrlich-Ascites-Tumoren* weißer Mäuse** und suspendierten sie (0,1 bis 5,0, meist 1,0 Vol.-%) in Tyrode-Lösung unter anaeroben Bedingungen (Suspensionsvolumen meist 20 bis 50 ml).

Bei den Suspensionen, die ausschließlich mit Argon⁺ begast wurden (Versuch 1 bis 75), betrug der Gehalt der Tyrode-Lösung an NaHCO_3 1 g l^{-1} , so daß bei höheren Zellkonzentrationen (5 Vol.-%) eine auch etwa in vivo gegebene Ansäuerung des Milieus erreicht wurde. (Von $\text{pH} = 7,4$ auf 7,0 bis 6,8 in etwa 30 Min. bei 38°C .) Bei Begasung mit Argon (Versuche 76 bis 127) bzw. Stickstoff (Versuche 128 bis 151) + 5 Vol.-% CO_2 ⁺⁺ setzten wir normaler Tyrode-Lösung 60 ml isotonische NaHCO_3 -Lösung (2-proz.) zu, wonach mit insgesamt $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ NaHCO_3 die Lösung bei einem pH von rund 7,4 mit der Gasphase im Gleichgewicht stand (Puffer-Tyrode). Bei diesen Inkubationen waren die Veränderungen des pH -Wertes gering. Die Begasung erfolgte bei freier Durchströmung des Gasraumes der Gefäße mit 10 bis 15 l h^{-1} .

Bei allen Versuchen inkubierten wir mit wenigen Ausnahmen simultan mindestens 2 Suspensionen des gleichen Ansatzes im Schüttelthermostaten. Die Auswertung erfolgte relativ zu einer in allen parallelen Inkubationen enthaltenen Bezugsbedingung. So wurde bei der Untersuchung des Temperaturverhaltens des Glucoseverbrauches bei jeder Temperatur gleichzeitig ein Teil der Suspension bei 38°C (Kontrolle) inkubiert und die bei den anderen Temperaturen erzielten Ergebnisse relativ zur 38°C -Kontrolle gewertet.

Der Zeitpunkt t_0 unserer Glucoseverbrauchs-Kurven wurde durch Zusammengeben zweier vortemperierter und vorbegaster Teillösungen definiert. Beispiel eines Ansatzes:

Teil I	1 ml Zellen
	9,5 ml Tyrode-Lösung, glucosefrei
+ Teil II	9,5 ml Tyrode-Lösung, 200 mg-% Glucose
	20,0 ml Suspension, 100 mg-% Glucose
	5 Vol.-% Zellen

Ab Versuch Nr. 76 verwendeten wir Plexiglas-Zentrifugenbecher (16 ml) mit abnehmbaren Sedimentnöpfchen. Die Sedimentnöpfchen wurden nach dem Zentrifugieren der Ausgangssuspension in die vorbegasten

und vortemperierten Lösungen eingeworfen und innerhalb von 5 Sek. die Zellen durch kräftiges Schütteln suspendiert*. Den Beginn der 6. Sek. stoppten wir als den Zeitpunkt $t=0$ für den Ablauf der Inkubation. Die leeren Nöpfchen verblieben in den Inkubationsgefäßen.

Nach Beginn der Inkubation wurden in geeigneten Abständen je Suspension in der Regel 10 bis 14 Proben (je 0,1 bis 2,0 ml) durch die Gasauslaßöffnungen der Inkubationsgefäße entnommen. Die Inkubationszeiten betragen 5 bis 180 Minuten.

Alle Angaben von Glucose-Konzentrationen beziehen sich auf das extrazelluläre Volumen der Suspensionen. Die damit gegebenen Glucosemengen wurden den Berechnungen des Glucoseverbrauches zugrunde gelegt. Bei der Auswertung wurde, wo es zweckmäßig war, vom Anfangsverlauf der Kurve auf den Wert beim Zeitpunkt t_0 extrapoliert und alle anderen Werte hierauf bezogen. Als Dimension für den aus der Neigung der Konzentrationskurven ermittelbaren Glucoseverbrauch erwies sich für uns $\text{mg} \cdot \text{g}_{\text{Zt}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (g_{Zt} = Zellfrischgewicht in g = ml Zellvolumen) als sinnvoll. Mit dem Faktor 333 erhält man hieraus den Verbrauch in mg bezogen auf das Zelltrockengewicht in g und Stde., mit dem Faktor $0,012^{-1}$ die äquivalente manometrische Größe in $\text{mm}^3 \text{ CO}_2$ pro mg Zelltrockengewicht und Stde. (g_{Zt} = Zelltrockengewicht).

Die o-Toluidin-Methode. Zur Messung der Konzentration der in den Suspensionen gelösten Glucose bedienen wir uns der von HULTMANN 1958 inaugurierten⁸ und u. a. von DUBOWSKI⁹ eingehend beschriebenen o-Toluidin-Methode. Diese Methode zeichnet sich durch einfache und schnelle¹⁰ Handhabung, Genauigkeit, Wirtschaftlichkeit und relativ hohe Spezifität aus. Ihre Spezifität bezieht sich allerdings nicht ausschließlich auf Glucose, sondern Aldosen, wobei jedoch mit Abstand Glucose, Galaktose und Mannose erfaßt werden. In den vielen Fällen, bei denen Glucose — wie in unseren Suspensionen — praktisch den gesamten Anteil der vertretenen Aldosen darstellt, bringt die Anwendung der o-Toluidin-Methode gegenüber den alten Verfahren einschließlich der enzymatischen Bestimmung nur Vorteile mit sich. AHLERT und Mitarbb.¹¹ führten zum Vergleich der o-Toluidin-Methode mit der Glucose-Oxydase-Methode 364 Blutzucker-Doppelbestimmungen durch und fanden Mittelwerte für das erstgenannte Verfahren von $145,5 \text{ mg} \cdot \%$, für das zweitgenannte von $144,9 \text{ mg} \cdot \%$, worin sich eine hervorragende Übereinstimmung ausdrückt. Außerdem wird die Reproduzierbarkeit der Meßwerte von den Autoren bei der o-Toluidin-Methode höher als bei der Glucose-Oxydase-

* Seit Anfang 1964 in unserem Hause, zuvor im Institut für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem, gehalten.

** Zucht VEB Arzneimittelwerk Dresden.

⁺ 99,98 Vol.-% Ar; 0,003 Vol.-% O_2 ; N_2 ; CO_2 .

⁺⁺ Mit Analysennachweis belegte Darstellung vom VEB Technische Gase-Werke, Berlin.

⁸ E. HULTMAN, Nature [London] **181**, 78 [1958], zit. nach l. c.¹².

⁹ K. M. DUBOWSKI, Clin. Chem. [New York] **8**, 215 [1962], zit. nach l. c.¹¹.

¹⁰ E. HOFER u. G. AHLERT, Z. med. Labortech. **7**, 26 [1966].

* Die durch den Einwurf eines nicht vortemperierten Sedimentnöpfchens (ca. 20°C) mit 0,5 ml Zellen und 1 cm^3 Eigenvolumen in 50 ml Lösung von 40°C theoretisch gegebene Temperaturveränderung beträgt etwa $-0,2^\circ\text{C}$, kann sich aber infolge intensiver Wärmezufuhr von außen (Wasserbad) kaum meßbar auswirken.

¹¹ G. AHLERT, E. HOFER, W. HOFFMANN u. G. BESTVATER, Dtsch. Gesundheitswes. **19**, 2256 [1964].

Methode eingeschätzt. Auch in anderen Arbeiten wird die Brauchbarkeit dieser noch so wenig eingeführten Methode für die Glucosebestimmung z. B. im Blut^{12, 13} und im Liquor¹⁴ hervorgehoben und festgestellt¹², daß es sich hierbei um das gegenwärtig in der Routine des klinischen Labors zweckmäßigste Verfahren handelt. Wir möchten hinzufügen, daß auch in der wissenschaftlich-experimentellen Arbeit in vielen geeigneten(!) Fällen die *o*-Toluidin-Methode – mit der wir im Rahmen dieser Arbeit rund 2000 Glucosebestimmungen durchführten – wohl allen anderen derzeit bekannten Methoden überlegen ist.

Durchführung der Glucosebestimmungen. Das Farb-reagenz wurde als Lösung von 50 ml *o*-Toluidin* (reinst) und 1,5 g Thioharnstoff (p.a.) in 950 ml Eis-essig (90 bis 100%, p.a.) angesetzt. Bei hohen Glucose-Konzentrationen (100 bis 10-mg-%) wurden Proben von 0,1 oder 0,2 ml in 1,0 bzw. 2,0 ml 3,3-proz., bei niedrigen (10 bis 1 mg-%) Proben von 1,0 oder 2,0 ml in 0,1 bzw. 0,2 ml 33,3-proz. Perchlorsäure gegeben. Nach Zentrifugation gaben wir 0,6 oder 1,0 ml des Überstandes zu 6 bzw. 10 ml der oben angegebenen Reagenzlösung und erhitzen 10 Min. lang im siedenden Wasserbad. Nach Abkühlen der Proben in kaltem Wasser bestimmten wir innerhalb möglichst kurzer Zeit die Extinktion bei 630 nm und 20 bis 30 oder 50 (Glucose-Konzentration $c_{GK} \leq 1$ mg-%)** mm Schichtdicke mit Hilfe des Universal-Spektrophotometers VSU 1 (VEB Carl Zeiss Jena). Fast bei jedem Versuch wurde eine Reihe Kontrollwerte angesetzt, die bei gleichem Zellvolumenanteil definierte Glucose-Konzentrationen enthielt. Gemessen wurde entweder direkt ($c_{GK} \leq 1$ mg-%) oder indirekt über Wasser gegen Reagenzleerwerte. Abb. 1 zeigt eine routinemäßig gewonnene Eichkurve für Messungen bei $c_{GK} = 1$ mg-%

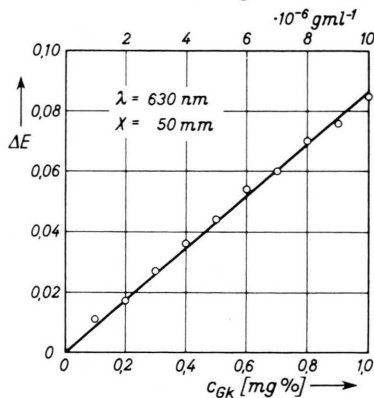


Abb. 1. Eichkurve für den Meßbereich $c_{GK} \leq 1$ mg-% bei der Messung der Glucose-Konzentration mit *o*-Toluidin.

¹² G. AHLERT, E. HOFER u. G. BESTVATER, Dtsch. Gesundheitswes. **20**, 349 [1965].

¹³ H. BRAUN u. J. HOFMANN, Dtsch. Gesundheitswes. **20**, 2271 [1965].

¹⁴ K. KRAUSE, Dtsch. Gesundheitswes. **20**, 2045 [1965].

* VEB Laborchemie Apolda.

** 50 mm nur nach Veränderung am Gerät.

¹⁵ O. WARBURG, K. GAWEHN u. A. W. GEISSLER, Z. Naturforsch. **11 b**, 657 [1956].

Prozent. Für eine Fehleranalyse wurden 10 separat angesetzte Proben (0,5 mg-% Glucose in Tyrode-Lösung) gemessen. Das hier zusammengefaßte Ergebnis

$$\begin{aligned} x &= 45,35 \pm 1,5 \cdot 10^3 \pm 0,5 \text{ mg-\%}^+ \\ \Sigma (\Delta x_n)^2 &= 96,02 \\ \delta x &= \pm 3,26 \pm 7,2\% \pm 0,036 \text{ mg-\%} \\ \delta x_n &= \pm 1,03 \pm 2,3\% \pm 0,011 \text{ mg-\%} \end{aligned}$$

zeigt, daß selbst im Bereich $c_{GK} \leq 1$ mg-% eine bemerkenswerte Genauigkeit erreicht wird.

Zellkonzentration und Inkubationszeit. Bei allen Inkubationen sollten unabhängig von der Variation verschiedener Parameter gut meßbare Glucose-Konzentrations-Unterschiede entstehen. Da bei niedrigen c_{GK} -Werten die Glucose sehr schnell aufgebraucht ist, wurden anfangs die Meßproben in rascher Folge in den ersten Min. der Inkubation entnommen. Einige Male ergab sich hierbei für die Suspension mit geringer c_{GK} unerwartet ein höherer Verbrauch als für die Kontrolle mit höherer c_{GK} . Bei dieser Beobachtung dürften die Bedingungen vor der Inkubation eine Rolle spielen (z. B. Auffüllung des intrazellulären Speichers in den ersten Min. der Inkubation). Bei den Langzeitinkubationen wird dieser Starteffekt kaum beobachtet. Daher verglichen wir nur noch Inkubationen mit vergleichbaren Inkubationszeiträumen. Das war nur möglich, wenn bei sehr kleinen Glucose-Konzentrationen auch die Zellvolumenanteile entsprechend niedrig angesetzt wurden. In einigen Versuchen überzeugten wir uns davon, daß die Variation des Zellvolumens der Variation der Inkubationszeiten vorzuziehen ist, da letztere innerhalb weiterer Bereiche keine sekundären störenden Einflüsse mit sich bringt. Die Dosierung der Zellvolumina bei parallelen Inkubationen geschah in jedem Falle durch Abmessen verschiedener Anteile einer gemeinsamen Ausgangssuspension und Einbringung der hieraus gewonnenen Sedimente in die auf verschiedene Gefäße verteilte Inkubationslösung.

Die absolute Größe des Glucoseverbrauches von Krebszellen

WARBURG und Mitarb.¹⁵ haben folgende Werte für die anaerobe Gärung gemessen:

Anaerobe Gärung qaG gemessen in	$\text{mm}^3 \text{CO}_2$ $\text{mg}_{Zt}^{-1} \text{h}^{-1}$	mg Gk g_{Zt}^{-1} min^{-1}
Niedrig virulente Zellen	25	0,3000
Hochvirulente Zellen	70	0,840
EMAC-Zellen	90	1,080

Tab. 1 *. Werte der anaeroben Gärung.

* x = arithm. Mittel von 10 Einzelwerten aus je 2 Ablesungen; Extinktionswerte aus rechen-technischen Gründen mit 10^3 multipliziert. $\Sigma (\Delta x_n)^2$ = Summe aller Abweichungsquadrate; δx = mittlerer Fehler des Einzelwertes; δx_n = mittlerer Fehler des Mittelwertes.

* Auf Grund der Meßwerte in Tab. 1 formulierten die Verfasser: „Hiermit ist der Zusammenhang zwischen Gärung und Malignität unwiderleglich bewiesen.“

In einer anderen Arbeit¹⁶ gaben WARBURG und Mitarbb. für *anaerobe Gärung von EMAC-Zellen in verschiedenen Medien* diese Stoffwechselgrößen an:

Anaerobe Gärung q_{AG} gemessen in	$\text{mm}^3 \text{CO}_2$ $\text{mg}_{\text{Zt}}^{-1} \text{h}^{-1}$	mg Gk $\text{g}_{\text{Zt}}^{-1} \text{min}^{-1}$
Salzlösung	48	0,576
Ascites-Serum	72	0,864
Normal-Serum	97	1,163

Tab. 2.

Alle diese Ergebnisse wurden bei guter Versorgung der Zellen mit Glucose erhalten ($c_{\text{GK}} > 50 \text{ mg-\%}$). Von Bedeutung ist hierbei, daß in Normal-Serum doppelt so hohe Werte als in Salzlösung ge-

funden wurden. Im Mittel aus 12 Inkubationen von EMAC-Zellen in Puffer-Tyrode bei $c_{\text{GK}} = 100$ und $50 \text{ mg-\%}$ (s. unten Tab. 4) fanden wir bei 38°C und Argon/ CO_2 -Begasung Glucoseverbrauchswerte von $0,574 \text{ mg g}_{\text{Zt}}^{-1} \text{min}^{-1}$. Dieser Wert stimmt mit dem von WARBURG und Mitarbb. für Salzlösungen gefundenen sehr gut überein. In Normal-Tyrode betrug nach Tab. 3 der aus 14 Inkubationen ermittelte Wert für den anaeroben Glucoseverbrauch bei 38°C nur $0,405 \text{ mg g}_{\text{Zt}}^{-1} \text{min}^{-1} \triangleq 33,8 \text{ mm}^3 \text{CO}_2 \text{ g}_{\text{Zt}}^{-1} \text{h}^{-1}$. Diese Gärungsgröße beträgt nur 70% des oben genannten Mittelwertes für das Bicarbonat-reichere Medium, was ebenfalls mit von WARBURG und Mitarbb.¹⁷ erzielten Ergebnissen ungefähr übereinstimmt.

Nr.	Inkubation	$q_{\text{GK}}^{\text{AG}}$
		$\text{mgGk g}_{\text{Zt}}^{-1} \text{min}^{-1}$
1	2	0,360
2	4	0,392
3	6	0,418
4	8	0,247
5	9	0,304
6	11	0,348
7	13	0,370
8	15	0,356
9	17	0,380
10	19	0,591
11	21	0,525
12	64	0,570
13	66	0,426
14	68	0,392
Mittelwert		0,405

Tab. 3. Anaerober Glucoseverbrauch $q_{\text{GK}}^{\text{AG}}$ von 5 Vol.-% EMAC-Zellen in Normal-Tyrode. Glucose-Anfangskonzentration $c_{0\text{GK}} = 100 \text{ mg-\%}$. Temperatur $T = 38^\circ \text{C}$.

Der Einfluß der Glucose-Konzentration auf den Glucoseverbrauch

Bei den Messungen über die Abnahme der Glucose-Konzentration nach Zugabe von EMAC-Zellen in 38°C -Tyrodelösung als Funktion der Zeit fanden wir beim Arbeiten mit der Anfangskonzentration $10 \text{ mg-\%}$ drei besonders charakteristische Verläufe, die in Abb. 2 wiedergegeben sind. Im Fall A folgt die Abnahme bereits von der genannten Anfangskonzentration ab nach einer e -Funktion. Im Fall B wurde zunächst ein nahezu linearer Konzentrationsabfall gemessen, der nach Erreichen von $4 \text{ mg-\%}$ in eine e -Funktion übergeht. Im Fall C reicht der annähernd lineare Konzentrationsabfall bis zu $1,3 \text{ mg-\%}$, um erst dann in eine e -Funktion überzugehen. In diesen unterschiedlichen Verläufen spiegelt

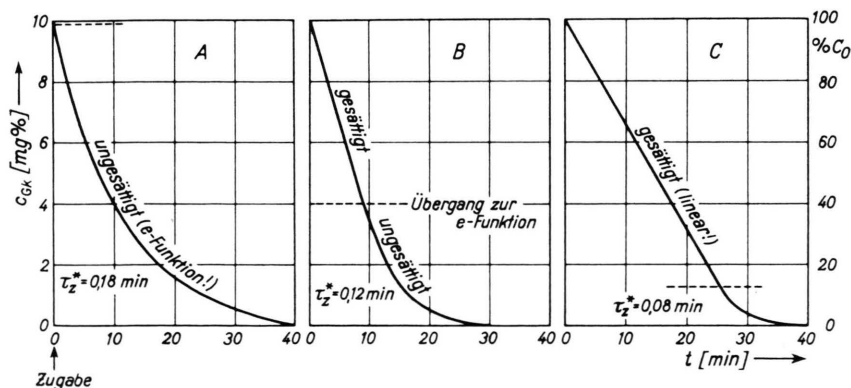


Abb. 2. Abnahme der Glucose-Konzentration c_{GK} nach Zugabe von 1 Vol.-% EMAC-Zellen in 38°C -Tyrodelösung als Funktion der Zeit t . Die Messungen zeigen, daß für EMAC-Zellen der Übergang zur „ungesättigten“ Glykolyse bei sehr verschiedenen Glucose-Konzentrationen liegen kann.

¹⁶ O. WARBURG, W. SCHRÖDER, H. S. GEWITZ u. W. VÖLKER, Z. Naturforsch. **13b**, 591 [1958].

¹⁷ O. WARBURG, K. POSENER u. E. NEGELEIN, Biochem. Z. **152**, 309 [1924].

sich die große *Streuung der Michaelis-Konstante* K_m bei EMAC-Zellen wider. Bei diesen Zellen schwankt der Übergang vom ungesättigten zum gesättigten Bereich der Krebszellen-Kennlinie zwischen Glucose-Konzentrationen von etwa 1 und 10 mg-Prozent. Dieses Ergebnis ist für die in vitro-Simulation von in-vivo-Bedingungen des Gärungsstoffwechsels von Bedeutung.

Durch einfache Differentiation der Konzentrationsabnahme-Kurven erhält man den Zusammenhang zwischen Glucoseverbrauch (Gärung) und Glucosekonzentration, d.h. die Funktion, für die wir den Begriff „Krebszellen-Kennlinie“ geprägt haben².

Aus Kurven nach Art der Abb. 2 läßt sich sowohl der Maximalwert der Gärungsgröße (Sättigungswert) als auch die Zeitkonstante des Glucoseverbrauches für den Krebszellenanteil $\varepsilon_Z = 0,5 = 50 \text{ Vol.-%}$ (Annäherung an die Verhältnisse im Krebsgewebe) ermitteln. Die Ableitung erfolgt in der Weise, daß zunächst die Konzentration $c_{Gk} \approx K_m$ des Überganges zur e -Funktion ermittelt wird. Der Sättigungswert der Gärung sollte dann bei 5 bis 10-mal so hoher Glucose-Konzentration ($c_{Gk} \gg K_m$) mit Hilfe folgender Beziehung bestimmt werden:

$$q_{Gkmax}^a = - \frac{dc_{Gk}}{dt} \quad (1)$$

Die Zeitkonstante des Glucoseverbrauches im 50 Vol.-%-Krebsgewebe ergibt sich bei einer Glucose-Konzentration $c_{Gk} \ll K_m$ nach folgender Beziehung:

$$\tau_Z^* = - \frac{2 \varepsilon_Z c_{Gk}}{\frac{dc_{Gk}}{dt}} \quad (2)$$

ε_Z = Krebszellenanteil in der Zellsuspension.

Nach Gl. (2) aus den Kurven Abb. 2 berechnete Werte von τ_Z^* sind neben den Kurven miteingetragen. Für Normal-Serum ergeben sich nach Tab. 2 etwa halb so große τ_Z^* -Werte. Damit finden wir eine

ausgezeichnete Übereinstimmung mit aus manometrischen Messungen für EMAC-Zellen abgeleiteten Werten dieser Zeitkonstante².

Aus 38 in sich vergleichbaren Inkubationen (Puffer-Tyrode und Argon-CO₂-Begasung, 38 °C) wurde der obere Teil der in Abb. 3 eingetragenen Kurve (Krebszellen-Kennlinie) über die Abhängigkeit des Glucoseverbrauches von der Glucose-Konzentration gemessen. Eine statistische Bearbeitung dieses Materials ist in Tab. 4 zusammengefaßt.

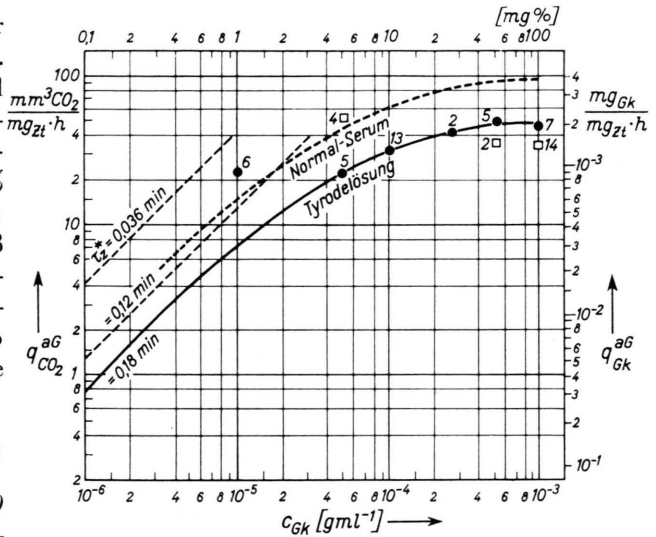


Abb. 3. Anaerober Glucoseverbrauch q_{Gk}^a (Gärung) von EMAC-Zellen in 38°C-Tyrodelösung als Funktion der Glucose-Konzentration c_{Gk} . Mittelwerte aus zahlreichen Messungen. Bei Verwendung von Normal-Serum ergeben sich etwa die doppelten q -Werte und die halben τ_Z^* -Werte.

Außerdem sind in der Darstellung Abb. 3 die Meßwerte von 20 weiteren Inkubationen miteingetragen. Der mittlere bis untere Bereich der Krebszellen-Kennlinie wurde aus der schon zuvor erwähnten Differentiation der Glucose-Konzentrationskurven

	1	2	3	4	5	6	1...6
$c_{0Gk} [\text{mg-}\%]$	1	5	10	25	50	100	1...100
n	6	5	13	2	5	7	38
$x [\text{mg g}^{-1} \text{ min}^{-1}]$	0,276	0,258	0,367	0,500	0,597	0,557	
$q_{Gk}^a [\%]$	49,5	46,3	65,9	89,8	105,5	100	
$\Sigma (\Delta x_n)^2$	0,0322	0,0457	0,4742	0,0000	0,02516	0,1677	0,9715
$\delta x^2 \pm$	0,0064	0,0091	0,0393	0,0000	0,0629	0,0279	
$\delta x_n \pm$	0,080	0,095	0,020	0,004	0,251	0,167	

Tab. 4. Statistische Daten von 38 vergleichbaren Inkubationen (EMAC-Zellen in Puffer-Tyrode; Argon + 5% CO₂) über die Abhängigkeit des Glucoseverbrauches q_{Gk}^a von der Glucose-Konzentration c_{Gk} .

von 20 Inkubationen ($c_{Gk} = 1$ bis $10 \text{ mg-\%}$) abgeleitet. Aus einer in großem Maßstab nach allen diesen Befunden aufgezeichneten Kurve wurden die in Tab. 5 zusammengestellten Zahlenwerte bestimmt.

Am 10. Impftag beobachteten wir im Ehrlich-Aszites-Carcinom einen mittleren Glucosewert (Mittelwert aus Messungen an 10 weißen Mäusen) von $0,56 \text{ mg-Prozent}$. Das bedeutet nach der in Abb. 3 gezeichneten EMAC-Zellen-Kennlinie, daß bereits eine Gärung von etwa 10% der Sättigungsgärung für ein immer noch hoch malignes Zellwachstum ausreicht.

c_{Gk}	q_{Gk}^{aG}	c_{Gk}	q_{Gk}^{aG}
[mg-%]	[%]	[mg-%]	[%]
0,025	0,3	0,9	14,8
0,05	0,8	1,0	16,2
0,1	1,0	2,0	27,2
0,2	2,5	3,0	35,1
0,3	4,5	4,0	41,0
0,4	6,5	5,0	44,9
0,5	8,5	10,0	63,9
0,6	10,2	25,0	87,2
0,7	11,9	50,0	100,0
0,8	13,4		

Tab. 5. Relativer anaerober Glucoseverbrauch q_{Gk}^{aG} von EMAC-Zellen in Puffer-Tyrode bei $T = 38^\circ \text{C}$ bei verschiedenen Glucose-Konzentrationen.

Der Einfluß der Temperatur auf den Glucoseverbrauch

In Ergänzung zu mit der manometrischen Methode durchgeführten Messungen über die anaerobe Gärung von EMAC-Zellen bei Übergang zur Extremhyperthermie wurde in Auswertung von 62 Inkubationen die *Temperaturabhängigkeit des anaeroben Glucoseverbrauches von EMAC-Zellen in Tyrode-Lösung* im Temperaturbereich von 0° bis 50°C bestimmt. Die auf den Glucoseverbrauch bei 38°C bezogenen Meßergebnisse sind in Abb. 4 eingetragen. Die Messungen wurden so durchgeführt, daß der Glucoseverbrauch unmittelbar nach Zugabe der EMAC-Zellen in die bereits auf der Temperatur T befindliche Tyrode-Lösung bestimmt wurde, damit insbesondere bei den Temperaturwerten über 38°C vor Versuchsbeginn keine thermische Schädigung des Gärungsstoffwechsels eintreten konnte. Deutlich zeichnet sich ab, daß bei dem angegebenen hohen Glucosespiegel z.B. bei Übergang von 38°C auf 44°C eine Steigerung des anaeroben Glucoseverbrauches (Gärung) eintritt und zwar im Mittel auf etwa 130 Prozent .

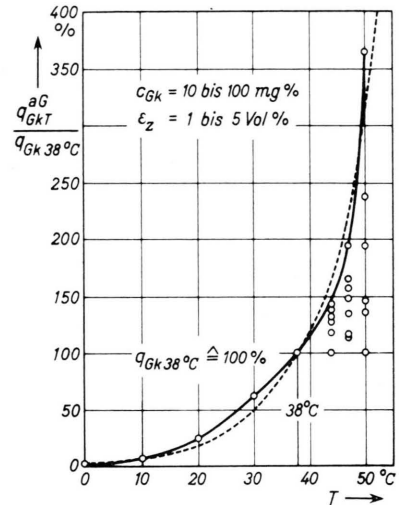


Abb. 4. Temperaturabhängigkeit des anaeroben Glucoseverbrauches von EMAC-Zellen in Tyrodelösung nach dem Ergebnis von 31 Doppelversuchen $\cong$ 62 Inkubationen mit zusammen über 600 Glucosebestimmungen. Die maximalen Verbrauchswerte liegen auf einer Kurve, die nahezu dem van't Hoff'schen Gesetz bei einem Q_{10} von 2,5 (gestrichelte Kurve) entspricht.

Bei niedrigem Glucosespiegel (1 bis $3 \text{ mg-\%}$) scheint (Streuung der Meßwerte!) keine Zunahme der Gärung beim Übergang von 38°C auf 44°C eintreten. Aus dieser Beobachtung würde sich z. T. die starke Streuung der Meßwerte bei Temperaturen über 38°C in Abb. 4 erklären. Offenbar wechseln bei diesen Meßpunkten Fälle mehr oder weniger gesättigter Glykolyse ab (s. auch oben Abb. 2). Die Verbrauchszunahme mit der Temperatur muß nach

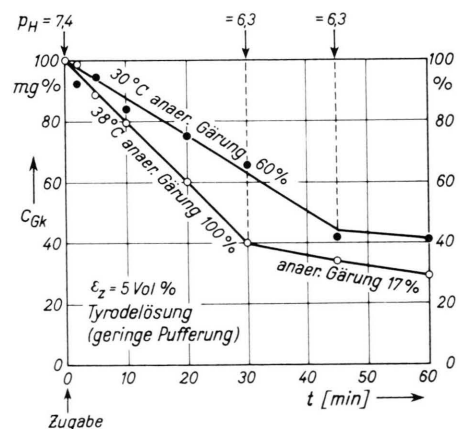


Abb. 5. Abnahme der Glucose-Konzentration c_{Gk} nach Zugabe von 5 Vol.-% EMAC-Zellen in 30°C bzw. 38°C Tyrode-Lösung als Funktion der Zeit t . Die Messungen zeigen einen sprunghaften Rückgang der anaeroben Gärung bei Erreichung des Wertes $p_H = 6,3$.

der erwähnten Einschätzung dann um so größer sein, je mehr der Meßfall sich dem Zustand völliger Sättigung nähert.

Ein interessantes Beispiel für die Bestimmung des Temperaturganges der anaeroben Gärung ist in Abb. 5 wiedergegeben. Hier wurde im Gegensatz zu den zuvor besprochenen Messungen unter solchen Bedingungen gearbeitet ($\varepsilon_Z = 0,05 \triangleq 5$ Vol.-% und Tyrode-Lösung ohne Pufferzusatz), daß während der Meßzeit eine Abnahme des p_H -Wertes um mehr als eine Einheit in der Lösung eintreten mußte. Die Messungen zeigen einen *sprunghaften Rückgang der anaeroben Gärung bei Erreichung des Wertes $p_H = 6,3$* . Dieses Ergebnis bildet eine interessante Ergänzung zu unseren früheren Messungen und Betrachtungen über die Aktivitätsabhängigkeit der Glykolysekette von p_H -Wert und Temperatur ⁴.

Der Einfluß einer Extremhyperthermie-Vorbehandlung auf den Glucoseverbrauch

In Anschluß an die Untersuchung der Wirkung von Extremhyperthermie-Dosen auf die Restatmung von Krebszellen ⁶ soll jetzt die Wirkung auf den Glucosestoffwechsel isoliert betrachtet werden. Aus der Messung Abb. 6 ist für EMAC-Zellen zu entneh-

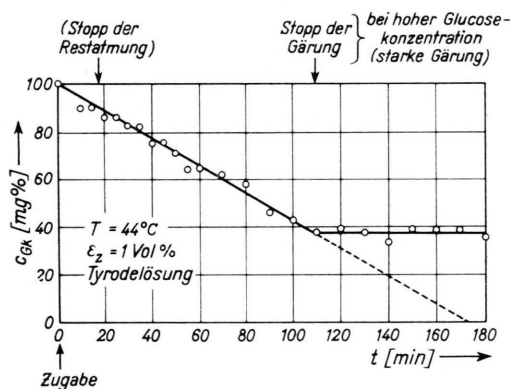


Abb. 6. Abnahme der Glucose-Konzentration c_{GK} nach Zugabe der EMAC-Zellen als Funktion der 44°C-Extremhyperthermiezeit t . Bei $t = 110$ min tritt ein irreversibler Stopp des Glucosestoffwechsels ein.

men, daß im Fall hoher Glucose-Konzentrationen (starke Gärung) bei 44°C-Extremhyperthermie nach längerer Zeit ($t = 110$ min in unserem Beispiel) ein plötzlicher Stopp der Gärung eintritt, der sich als irreversibel erweist. Unter ähnlichen Bedingungen (kleine Atmung $p_{O_2} \approx 7,5$ Torr) wurde ein Stopp der Atmung bereits nach $t = 18$ min beobach-

tet ⁶, während bei größerer Atmung ein allmähliches Aufhören der Atmung um $t = 110$ min (!) gefunden wurde ⁶. Mit Abnahme des Glucosespiegels (schwache Gärung) rückt der Stopp der Gärung in Richtung kürzerer Überwärmungszeit.

Weitere Messungen zur Temperaturabhängigkeit der Schädigung des anaeroben Glucosestoffwechsels von EMAC-Zellen in Tyrode-Lösung sind in Abb. 7 zusammengestellt. Die stark ausgezogene Kurve bezieht sich auf die irreversible Schädigung bei hohem Glucosespiegel (starke Gärung). Die bei kleinem Glucosespiegel (schwache Gärung) gewonnenen Meßpunkte liegen im Sinne des zuvor Gesagten bei kürzeren Hyperthermiezeiten.

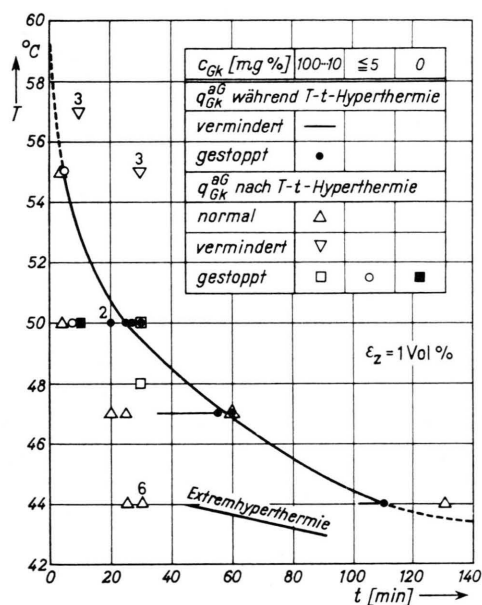


Abb. 7. Irreversible Schädigung des anaeroben Glucosestoffwechsels von EMAC-Zellen in Tyrodelösung als Funktion von Hyperthermietemperatur T und Hyperthermiezeit t .

Schlußfolgerungen für Theorie und Praxis der Krebs-Mehrschritt-Therapie

Aus den besprochenen Meßergebnissen folgt unter Berücksichtigung unserer Untersuchungen über die Höhe und Bedeutung des effektiven Glucosespiegels in Tumoren ², daß beim Übergang von 38°C auf Extremhyperthermie-Temperaturen *in vivo* praktisch keine Zunahme der Gärung eintritt (niedriger Glucosespiegel *in vivo*, Fall schwacher Gärung). Diese Feststellung ist für die Theorie der therapeutischen Schädigung durch Extremhyperthermie von gewissem Interesse.

Weiter geht aus den Messungen hervor, daß *nach einer Extremhyperthermie-Dosis für hochprozentige therapeutische Schädigung der Krebszellen der Glucoseverbrauch der geschädigten Zellen sprunghaft abnimmt*. Infolgedessen tritt die posttherapeutische Zunahme des effektiven Glucosespiegels in den Krebsgeschwülsten² z. B. nach dem Extremhyperthermie-Schritt sofort ein. Dieses Ergebnis ist für

die Abschätzung der zeitweiligen Stimulierung des Wachstums der Krebsgeschwülste im Anschluß an die Therapie von praktischer Bedeutung.

Die vorstehenden Untersuchungen erfolgten im Auftrage des *Staatssekretariates für Forschung und Technik der DDR*. Für Hilfen bei den experimentellen Arbeiten haben wir unseren Mitarbeiterinnen Frl. M. RIEDEL und Frl. CH. LOSE herzlich zu danken.

Über ein aus menschlichen und tierischen Geweben isoliertes Nucleoprotein mit Kollagen-fällenden Eigenschaften III

Bindung des Nucleoproteins an ein Serumprotein

G. WILHELM

Max-Planck-Institut für Biophysik Frankfurt a. M.

(Z. Naturforschg. 21 b, 848—850 [1966] ; eingegangen am 19. April 1966)

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß im menschlichen Serum ein Serumprotein vorhanden ist, welches das aus menschlichem Gewebe gewonnene Nucleoprotein spezifisch bindet. Zur Zeit sind Untersuchungen im Gang, den Serumgehalt des Nucleoproteins und des spezifisch bindenden Serumproteins bei verschiedenen Erkrankungen des Bindegewebsapparates quantitativ zu erfassen.

Das beschriebene Nucleoprotein ergibt bei Gewinnung aus foetalen menschlichen Organen mit menschlichem Serum deutliche Reaktionen im *Ouchterlony-Test* (Modifikation nach BEALE und MASON¹).

Die Immunelektrophorese zeigt nun, daß sich das Nucleoprotein mit einem Serumprotein bindet, welches im Bereich des α -2-Makroglobulins liegt.

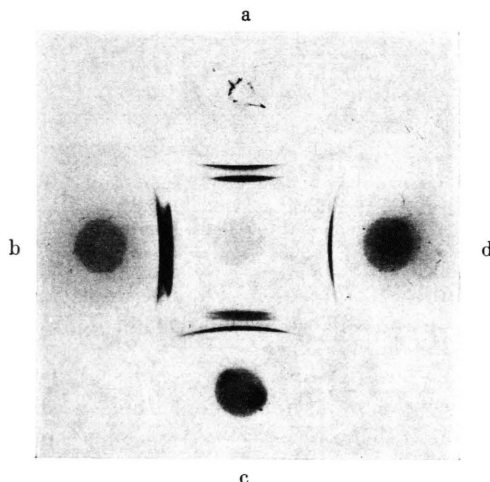


Abb. 1. In der Mitte Nucleoprotein aus foetalem Herz des Menschen (Verdünnung 1 : 1100). Außen vier menschliche Seren.

¹ A. J. BEALE and P. J. MASON, J. of Hyg. 60, 113 [1962]; P. GRABAR and C. A. WILLIAMS, Biochem. biophysica Acta [Amsterdam] 10, 193 [1953]; Ö. OUCHTERLONY, Ark. Kem., Mineralog. Geol., Ser. B 26, 1 [1958].

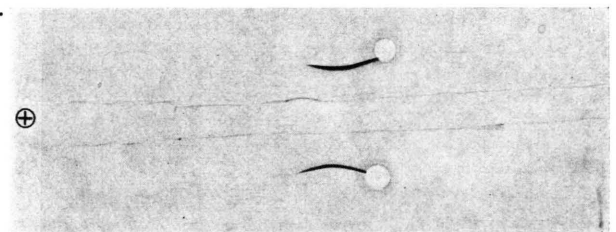


Abb. 2. Getrennt: Menschliches Serum, Veronalpuffer 0,1-m. pH 8,6, 50 Min., 200 V, diffundiert: Nucleoprotein aus foetalem Darm (Verdünnung 1 : 720).

Um die Spezifität der Bindung näher zu erfassen, wurden folgende Reaktionen ausgeführt:

- Nucleoprotein aus Kalbsdarm und Rattendarm ergibt gegen menschliches Serum im *Ouchterlony-Test* keine Reaktion.
- Nucleoprotein aus Hühnerblut ergibt gegen menschliche Seren im *Ouchterlony-Test* keine Reaktion.
- Nucleoprotein aus foetalen Organen des Menschen (Herz, Niere, Darm) ergibt mit menschlichen Seren deutliche Reaktionen, mit Kalbsdarm keine Reaktion.