

- ²⁹ O. WARBURG, Science [Washington] **124**, 269 [1956].
- ³⁰ H. EAGLE, Science [Washington] **122**, 501 [1955].
- ³¹ L. C. CLARK, JR., R. WOLF, D. GRANGER, and Z. TAYLOR, J. appl. Physiol. **6**, 189 [1953].
- ³² U. GLEICHMANN and D. W. LÜBBERS, Pflügers Arch. ges. Physiol. **271**, 431 [1960].
- ³³ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry **193**, 265 [1951].
- ³⁴ V. I. OYAMA and H. EAGLE, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **91**, 305 [1956].
- ³⁵ A. J. PAPPENHEIMER, J. exp. Medicine **25**, 633 [1917].
- ³⁶ M. D. EATON, A. R. SCALA, and M. JEWELL, Cancer Res. **19**, 945 [1959].
- ³⁷ K. KARZEL and I. SCHMID, Arzneimittel-Forsch. **18**, 1500 [1968].
- ³⁸ R. W. MCKEE, K. LONBERG-HOLM, and J. JEHL, Cancer Res. **13**, 537 [1953].
- ³⁹ J. H. QUASTEL and I. J. BICKIS, Nature [London] **183**, 281 [1959].
- ⁴⁰ W. KUNZ and W. SCHMID, Z. Naturforsch. **12b**, 743 [1957].
- ⁴¹ B. BICZOWA, J. KIELER, and J. MOORE, Europ. J. Cancer **4**, 67 [1968].
- ⁴² J. PAUL, in: Cell and Tissues in Culture (ed. E. N. WILLMER), p. 239, Vol. I, Academic Press, London, New York 1965.
- ⁴³ H. G. HEMPLING, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **112**, 503 [1966].

Beziehungen zwischen der Änderung des Kupferspiegels im Plasma und dem Wachstum des Morris-Hepatoms 3924

Relation between the Alteration of the Copper Level in Plasma and the Growth of Morris-Hepatooma No. 3924

K. WAYSS, M. VOLM, H. WESCH und J. ZIMMERER

Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Institut für experimentelle Pathologie, Institut für Nuklearmedizin

(Z. Naturforsch. **27 b**, 846—849 [1972]; eingegangen am 23. März 1972)

During the growth of Morris-hepatoma No. 3924 in rats changes in the level of trace elements were observed using neutron activation analysis. The increase of copper concentration in the plasma correlated with the incorporation of ³H-thymidine in the tumor. In contrast to our investigations on Yoshida-sarcoma, the decrease of manganese in the liver did not correlate with the incorporation of tritiated thymidine in the hepatomas.

Systematische Untersuchungen an Ratten mit Transplantationstumoren (Yoshida - Sarkom, Walker-Carcinosarkom) erbrachten Änderungen im Spurenelementspiegel in verschiedenen Organen des Wirtes¹⁻³. Die mit Hilfe der Neutronenaktivierungsanalyse gefundenen Veränderungen in der Spurenelementkonzentration zeigten Beziehungen zum Wachstum der Tumoren. So waren bei Ratten mit soliden Yoshida-Sarkomen sowohl die Erhöhung des Kupferspiegels im Plasma als auch die Erniedrigung des Manganspiegels in der Leber mit dem Einbau von ³H-Thymidin im Tumor korreliert². Da das Yoshida-Sarkom ein schnell wachsender Tumor ist, wurden die dort gefundenen Ergebnisse an dem langsamer wachsenden Morris-Hepatom 3924 überprüft.

Sonderdruckanforderungen an Priv.-Doz. Dr. M. VOLM, Deutsches Krebsforschungszentrum, Institut für experimentelle Pathologie, D-6900 Heidelberg 1, Kirschner Str. 6.

Material und Methode

Tier- und Tumormaterial: Die Versuche wurden an 50 männlichen ACI-Ratten (3 Monate alt, random bred, Tierlabor des Institutes für experimentelle Pathologie) durchgeführt. Die Versuchstiere wurden unter Standardbedingungen gehalten (21 °C Raumtemperatur, Makrolonkäfige, Standarddiät Altromin® und Wasser ad libitum). Das von uns benützte Morris-Hepatom 3924 wird im Tierlabor des Institutes für experimentelle Pathologie seit längerer Zeit in laufenden Passagen als solider und Ascites Tumor auf ACI-Ratten gehalten.

Versuchsordnung: Die Ratten wurden vor Versuchsbeginn streng zufällig (Zufallszahlen) auf zwei Gruppen verteilt: Die eine Hälfte erhielt subcutan (Rücken) Ascites Tumorzellen (15 Mio. Zellen/0,5 ml/Ratte), die andere (Kontrollgruppe) Hank'sche Salzlösung injiziert. An 5 Tagen (16., 22., 30., 37. und 44. Tag nach Tumortransplantation) bekamen je 5 ausgeloste Tiere pro Gruppe eine Stde. vor dem Entbluten ³H-Thymidin injiziert (Dosierung: 0,5 µCi/g Körpergewicht; 100 µCi in 0,5 ml physiol. Kochsalzlösung;

spezifische Aktivität: 25 Ci/mMol; Radiochemical Centre Amersham).

Nach Narkotisierung durch Nembutal® wurde in die V. femoralis 0,3 ml Heparinlösung (Liquemin®, Hoffmann La Roche) injiziert. Dadurch konnte das Blut nach Punktion der Aorta abdominalis mit einer Plastiknüle (Braunüle® Gr. 0, Braun Melsungen) freifließend in Polystyrolröhrchen aufgefangen werden. Dabei wurde jeweils der erste ml verworfen. 60 Min. nach der Injektion des markierten Thymidins war die Blutentnahme beendet. Die Tiere wurden dann getötet und zur Bestimmung der eingebauten radioaktiven Substanz die Tumoren in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Bestimmung der Spurenelemente wurden die Organe metallfrei entnommen, äußerlich kurz mit gereinigtem Wasser (Ionenaustauscher) abgespült und staubsicher verpackt. Das Blut wurde unmittelbar nach der Entnahme zentrifugiert und das Plasma in Plastikröhrchen aufbewahrt.

Bestimmung des ^3H -Thymidin-Einbaues: Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Tumoren wurden nach einem Verfahren weiter aufgearbeitet, das auf einer Modifikation der von MANS und NOVELLI⁴ angegebenen Methode beruht⁵: Die gesamten Tumoren wurden gewogen, in Aqua dest. (1 : 20) im Potter-Elvehjem homogenisiert, Papierrundfilter mit einem Aliquot der Suspension (100 μl) beschichtet (3 Filter/Probe), getrocknet und anschließend mit eiskalter Trichloressigsäure das nicht eingebaute radioaktive Material extrahiert. Die Aktivität der nicht extrahierten Substanz auf den Rundfiltern wurde unter Verwendung von Toluolszintillator im Flüssigkeitsszintillationszähler (Tricarb, Packard) bestimmt.

Bestimmung von Kupfer und Mangan: Mit der Neutronenaktivierungsanalyse können auch geringe Konzentrationen von Elementen bestimmt werden. Die Nachweisgrenzen für Mn liegen bei ca. $10^{-5} \mu\text{g}$, die für Cu bei $10^{-4} \mu\text{g}$. Die metallfrei entnommenen Proben kommen nach Gefriertrocknung in ein Bestrahlungsgefäß und werden bei einem Neutronenfluß von $2 \cdot 10^{12} \text{ n s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ (Triga Mark I, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) bestrahlt (Leberproben 1 Stde., Plasmaproben 4 Stdn.). Zur Kupferbestimmung werden Störelemente (Na, K, Cl, Br und P) in einem Schnellverfahren⁶ abgetrennt, wobei Cu als Chelatkomplex in ein organisches Lösungsmittel extrahiert wird. Die ^{64}Cu -Aktivität wird durch γ -Spektroskopie der 511-keV-Linie des β^+ -Zerfalls bestimmt. Die ^{56}Mn -Aktivität der Leberproben kann direkt mit einem 40 cm^3 GeLi-Detektor durch Spektroskopie der 845-keV-Linie bestimmt werden. Die Fehler des Verfahrens liegen unter 5%.

Statistik: Zur statistischen Analyse der Meßdaten wurden zweifache Varianzanalyse und Kovarianzanalyse verwendet. Die Anwendung der Verfahren war möglich, da jeder Zelle (pro Tag und Gruppe) die gleiche Anzahl von Tieren streng zufällig (mittels Zufallszahlen) zugeteilt war. Die geforderte Normalverteilung wurde annähernd durch Logarithmieren der Ausgangsdaten erreicht.

Ergebnisse

Der zeitliche Verlauf der Tumorgewichte und des ^3H -Thymidin-Einbaus (AE = Produkt aus Tumorgewicht und Imp/min/0,1ml Tumorhomogenat) ist in Abb. 1 dargestellt. Die Tumorgewichte steigen bis etwa zum 35. Tag nach Tumortransplantation rasch an, um dann im Mittel annähernd konstant zu bleiben. Den Tumorgewichten entsprechend steigen auch die ^3H -Thymidin-Einbausraten bis zu einem Maximum am 37. Tag, um dann gerade in dem Zeitraum wieder abzufallen, in dem sich die Tumorgewichte wenig ändern.

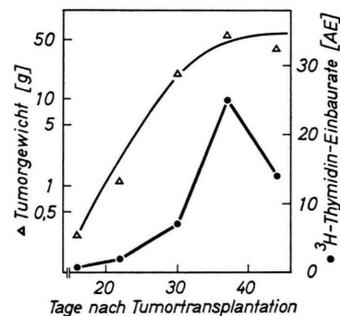


Abb. 1. Zeitlicher Verlauf der Tumorgewichte (Δ) und des ^3H -Thymidineinbaus in den Gesamttumoren (\bullet) während des Wachstums von Morris Hepatomen. Die Punkte sind das logarithmische Mittel von je fünf Tieren ($n=25$).

Die Kupferkonzentration im Plasma der Tumortiere (Abb. 2) zeigt in ihrem zeitlichen Verlauf einen deutlichen Anstieg gegenüber den Kontrolltieren, der am 37. Tag ein Maximum erreicht und am 44. Tag nahezu wieder auf den Wert der Kontrollen

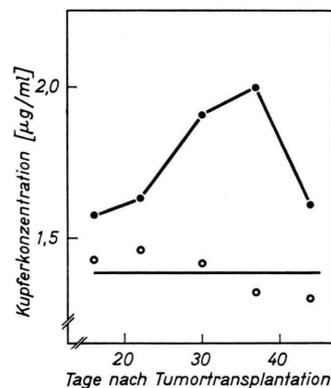


Abb. 2. Kupferkonzentration im Plasma von Tumorträgern (\bullet) und tumorfreien Kontrollen (\circ). Die Punkte sind Mittelwerte von je fünf Tieren, die durchgezogene Linie ist der Mittelwert aller Kontrollen während der Versuchszeit. Alle Angaben sind auf Frischgewicht bezogen ($n=50$).

abfällt. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist mit $p < 0,05$ gesichert.

Eine Kovarianzanalyse zwischen den ^3H -Thymidin-Einbauraten und den Kupferkonzentrationen im Plasma der Tumortiere ergibt, daß die beiden korreliert sind und der Einfluß weiterer Zeitfaktoren ausgeschlossen werden kann. Die Berechnungen ergaben weder in den Steigungen noch in den Abständen der Regressionsgeraden Unterschiede. Damit kann eine gemeinsame Regressionsgerade konstruiert werden. Die entsprechenden F-Werte liegen unter den Tabellenwerten (Tab. 1).

Quelle der Variation	F exp.	F 0,01
Cu-Plasmakonzentration	4,1	3,4
^3H -Thymidin-Einbau	11,3	3,4
Unterschied in den Abständen der Regressionsgeraden	1,3	4,0
Unterschied in den Steigungen der Regressionsgeraden	0,8	8,2

Tab. 1. Ergebnisse der Kovarianzanalyse für den Zusammenhang von Kupferkonzentration im Plasma und ^3H -Thymidin im Gesamttumor. Kupferkonzentration und ^3H -Thymidineinbau zeigen beide einen gesicherten zeitlichen Verlauf. Abstände und Steigungen der Regressionsgeraden sind ohne Unterschiede.

Über diese Regressionsbeziehung können aus den experimentellen Mittelwerten der ^3H -Thymidineinbauraten die Erwartungswerte der entsprechenden Kupferkonzentrationen im Plasma errechnet werden.

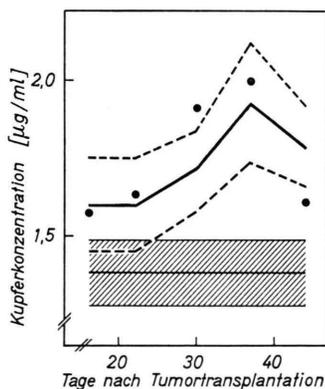


Abb. 3. Theoretischer Verlauf der Kupferkonzentration im Plasma der Tumortiere, korrigiert auf die ^3H -Thymidineinbauwerte der Gesamttumoren. Ausgezogene Kurve = theoretischer Verlauf, gestrichelte Kurven = Grenzen des 5%-Vertrauensbereiches, Schraffur = Streubereich der Kontrollen, Punkte = experimentell gefundene Kupferwerte. Alle Angaben sind auf Frischgewichte bezogen.

Dies ist in Abb. 3 dargestellt: die ausgezogene Kurve stellt den theoretischen Kupferverlauf dar, die gestrichelten Linien begrenzen den Vertrauensbereich für $p = 0,05$. Der Streubereich der Kontrollen ist schraffiert. Die experimentell gefundenen Kupferwerte (Punkte) liegen alle im oder sehr nahe am Vertrauensbereich der theoretischen Kupferkurve. Dies verdeutlicht die Korrelation der Kupferkonzentration im Plasma der Tumortiere mit den ^3H -Thymidineinbauwerten der Hepatome.

Der zeitliche Verlauf der Mangankonzentration in der Leber der Tumortiere (Abb. 4) zeigt, im Vergleich zu den Kontrolltieren, ab dem 20. Tag einen

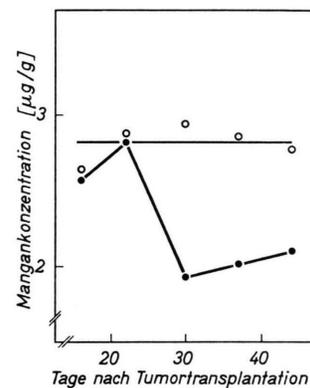


Abb. 4. Mangankonzentration in der Leber von Tumortägern (●) und Kontrolltieren (○). Die Punkte sind Mittelwerte von je fünf Tieren, die Gerade stellt den Mittelwert aller Kontrolltiere während der Versuchszeit dar. Alle Angaben sind auf Frischgewicht bezogen ($n = 50$).

steilen Abfall, um dann vom 30. Tag bis zum Versuchsende auf diesem niederen Niveau zu bleiben. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist mit $p < 0,05$ gesichert. Der fehlende Wiederanstieg der Mangankonzentration im Spätstadium des Tumorwachstums läßt keine Korrelation mit den ^3H -Thymidineinbauraten zu, denn diese fallen ja am 44. Tag wieder ab (Abb. 1).

Diskussion

In einer Untersuchung am Yoshida-Sarkom der Ratte² konnten wir zeigen, daß bei Tumortieren die Erhöhung der Kupferkonzentration im Plasma und die Erniedrigung der Mangankonzentration in der Leber mit dem ^3H -Thymidineinbau der Tumoren korreliert ist. Diese Korrelation besteht beim hier untersuchten Morris-Hepatoma 3924 zwischen Manganabfall und ^3H -Thymidineinbau nicht. Die-

ser Unterschied in der Reaktionsweise der Tumorträger auf das Wachstum der beiden Tumoren könnte in deren unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit liegen: Beim Yoshida-Sarkom werden schon 8 Tage nach Tumortransplantation maximale Tumorgößen erreicht, während diese beim Morris-Hepatom 3924 erst 37 Tage nach Tumortransplantation auftreten. Es wäre aber auch denkbar, daß sich die Wechselbeziehungen zwischen Tumor und Leber des Wirtstieres bei Hepatomen und leberfremden Tumoren grundsätzlich unterscheiden.

Im Gegensatz zum Manganabfall ist der Kupferanstieg im Plasma der Tumortiere mit dem ^3H -Thymidin-Einbau der Tumoren korreliert. Weiter ist der Kupferanstieg mit einer korrelierten Erhöhung des Caeruloplasmaspiegels im Plasma verbunden. Da 90% des Kupfers im Serum an das Caeruloplasmin gebunden sind – die restlichen 10% sind unspezifisch in der Albuminfraktion gebunden – ist der Kupferanstieg mit einer Erhöhung der Caeruloplasminkonzentration gleichzusetzen^{7, 8}. Danach be-

stände zwischen dem Tumorwachstum und dem Kupferanstieg im Plasma folgender Zusammenhang: Die proliferierenden Tumorzellen (nur sie bauen ^3H -Thymidin ein) beeinflussen direkt oder indirekt die Leber – den einzigen Syntheseort von Caeruloplasmin – und induzieren dort eine erhöhte Synthese von Caeruloplasmin. Dadurch steigt der Caeruloplasminspiegel im Blut und damit die Kupferkonzentration im Plasma. Die Mechanismen, die die Caeruloplasminsynthese regulieren, sind jedoch noch ungeklärt⁹.

Der Kupferanstieg im Plasma von Tumorträgern^{2, 3, 10-12} ist so deutlich ausgeprägt, daß er eine Diagnosehilfe für malignes Wachstum sein könnte. Jedoch sind bei verschiedenen anderen Krankheiten (z. B. infektiöse Hepatitis, Lebercirrhose, verschiedene Infektionskrankheiten) Hypercuprämien mit Erhöhung des Caeruloplasminspiegels beschrieben worden¹³. Damit ist eine Kupfererhöhung im Blut eine unspezifische Reaktion auf verschiedenartige Krankheiten und kann daher für eine Krebsdiagnose nicht verwendet werden.

¹ J. ZIMMERER, H. WESCH u. E. B. DOGAN, Z. Krebsforsch. **74**, 15 [1970].

² J. ZIMMERER, M. VOLM, K. WAYSS u. H. WESCH, in: H. LETTRÉ u. G. WAGNER, Aktuelle Probleme aus dem Gebiet der Cancerologie III. Drittes Heidelberger Symposium, S. 119, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1971.

³ H. WESCH, J. ZIMMERER, K. WAYSS u. M. VOLM, in Vorbereitung.

⁴ R. MANS and G. NOVELLI, Arch. Biochem. Biophysics **94**, 48 [1961].

⁵ M. VOLM, R. SPIELHOFF u. R. SÜSS, Naturwissenschaften **55**, 390 [1968].

⁶ H. WESCH, J. ZIMMERER, and J. SCHUHMACHER, Int. J. Appl. Rad. Isot. **21**, 431 [1970].

⁷ A. G. BEARN and H. G. PUNKEL, Proc. Soc. Exp. Biol. **85**, 44 [1954].

⁸ J. LANGE, Eisen, Kupfer und Eiweiß am Beispiel der Leberkrankheit. Thieme, Stuttgart 1958.

⁹ I. H. SCHEINBERG, in: J. PEISACH, P. AISEN, and W. E. BLUMBERG (eds.), Biochemistry of Copper, Academic Press, New York, London 1966.

¹⁰ B. BOZHKOVA, N. POPORVA, and J. DRAGANOV, Z. Krebsforsch. **72**, 72 [1969].

¹¹ M. H. GAULT u. M. D. STEIN, Gastroent. **50**, 8 [1966].

¹² A. OTT, Östr. Z. Krebskrankh. **1**, 5 [1971].

¹³ J. TRIP, Folia Med. Nederl. **12**, 151 [1969].