

Untersuchungen zur Lokalisation von Gallensäuren in der Leberzelle (I)* **)

Von U. LEUSCHNER, A. ALFURAYH, W. UHLMANN, H. J. WILDGRUBE und W. ERB

Unsere Kenntnisse über die Beteiligung von Zellorganellen am Gallensäurenstoffwechsel beruhen fast ausschließlich auf Untersuchungen mit der Fragestellung, ob Enzyme einer bestimmten Organellenfraktion einen definierten Syntheseschritt katalysieren können oder nicht (9, 10, 15, 16, 18, 27, 31, 43, 44). Über die Verteilung von Gallensäuren in der Leberzelle ist dagegen so gut wie nichts bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollten daher folgende Fragen bearbeitet werden: Sind Gallensäuren in der Leberzelle an Zellbestandteile gebunden oder frei gelöst? Liegen Gallensäuren an oder in Zellorganellen oder im Zytoplasma? Wie groß sind Gallensäuregehalt und Gallensäurenkonzentration in den einzelnen Organellenfraktionen?

Die Untersuchungen wurden an Rattenlebern durchgeführt. Die Präparation der Zellorganellen erfolgte durch Differentialzentrifugation. In der Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion sowie im Zytoplasma (Methode I und II, s. u.) bestimmten wir den Gallensäuregehalt mit Hilfe der Gaschromatographie. Da sich bei Voruntersuchungen aber zeigte, daß sich Gallensäuren weder dünn- noch gaschromatographisch in den üblicherweise zur Differentialzentrifugation verwendeten glukose- oder saccharosehaltigen Suspensionsmedien zufriedenstellend nachweisen ließen (34), präparierten wir die Organellenfraktionen mit einer von uns modifizierten Methode nach *Claude* (35) in gepufferter KCl-Lösung (Methode I). Zum Vergleich wählten wir das nur geringfügig geänderte, von *Claude* in der Literatur beschriebene Verfahren (19) (Methode II). Darüber hinaus wurden Reinheitsgrad und Strukturverhaltung aller Fraktionen sowie der Mikrosomenrest im flüssigen Überstand licht- und elektronenmikroskopisch kontrolliert. Bei den ersten 10 Untersuchungen bestimmten wir zusätzlich den Phospholipid-Phosphor-Gehalt in den Mitochondrien- und Mikrosomenfraktionen. Schließlich wurde der elektronenmikroskopische Befund der in KCl-Lösung gewonnenen Fraktionen mit dem solcher Fraktionen verglichen, die wir nach der Methode von *Sedgwick* und *Hübscher* (46) (Methode III) in einem saccharosehaltigen Suspensionsmedium erhielten.

Material und Methode

Als Versuchstiere dienten 33 männliche Wistar-Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 200–230 g. Alle Tiere wurden zwischen 8 und 9 Uhr vormittags getötet.

a. Differentialzentrifugation:

Die Tiere wurden in leichter Äthernarkose entblutet, und die Leber sofort auf eisgekühlten Glasplatten von der Lebervene her mehrfach mit einer gepufferten 0,3 M-KCl-0,05 M-EDTA-K-Lösung (pH 7,4) durchspült. Jeweils 2 g Gewebe wurden mit der gleichen Lösung im Verhältnis 1 : 10 versetzt und mit dem Homogenisator nach *Potter* und *Elvehjem* zerkleinert.

*) Herrn Prof. Dr. med. W. Siede zum 65. Geburtstag gewidmet.

**) Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft sowie die Harry-und-Peter-Fuld-Stiftung durchgeführt

U. Leuschner, A. Alfurayh, W. Uhlmann, H. J. Wildgrube und W. Erb

Methode I ($n = 13$): Eine Vorfraction (intakte Leberzellen, Gallengänge, Gefäßsysteme, Erythro- und Leukozyten, Leberkapsel) wurde in der Laborzentrifuge von Haereus abgetrennt, indem der Arbeitsgang nach Erreichen von 2000 U/min abgebrochen wurde. Die Vorfraction wurde verworfen, der Überstand in der Ultrazentrifuge „Automatic Superspeed“ 50 T. C. (MSE) mit dem Winkelrotor 8×25 ml, Becherneigung zur Rotorachse 20° , Zentrifugalkraft (g) bezogen auf Bechermitte, weiterverarbeitet. Temperatur $0-4^\circ$ C. Folgende Fraktionen wurden isoliert: Kerne: 600 U/min, 15, 10 u. 7 min; nach Verdünnung des Suspensionsmediums (0,15 M-KCl-0,025 M-EDTA-K) Mitochondrien: 3000 U/min, 15, 15 u. 7 min; Mikrosomen: 39 000 U/min, 2×60 min; Mikrosomenrest im flüssigen Überstand: 40 000 U/min, 120 min.

Methode II (nach Claude, $n = 10$): Suspensionsmedium und Vorfraction wie bei Methode I; Kerne: 3500 U/min, 15, 5 u. 3 min; Mitochondrien: 5000 U/min, 25, 20 u. 10 min; Mikrosomen: 17 500 U/min, 60 min; Mikrosomenrest im flüssigen Überstand: 40 000 U/min, 120 min.

Methode III (nach Sedgwick und Hübscher [46], modifiziert nach De Duve; $n = 10$): Suspensionsmedium: 0,3 M-Saccharose-0,002 M-EDTA. Kerne: 4000 U/min, 10 min; Mitochondrien: 8000 U/min, 2×20 min; Mikrosomen: 40 000 U/min, 60 min.

b. Licht- und elektronenmikroskopische Präparation:

Die Fixation der Sedimente erfolgte in einer auf pH 7,4 gepufferten 6,25 %igen Glutaraldehydlösung. Nach 24stündigem Spülen Kontrastierung mit 1 %igem OsO_4 und Entwässerung in aufsteigender Azetonreihe (70, 90, 100 %). Zwischenkontrastierung mit Phosphorwolframsäure-Uranylacetat. Das Material wurde in Durcupan ACM eingebettet und mit Bleihydroxyd am Schnitt nachkontrastiert. Für die Lichtmikroskopie wurden Semidünnschnitte mit Mallory Azur II gefärbt. Die elektronenmikroskopische Beurteilung erfolgte mit dem Elektronenmikroskop EM 9 S der Firma Zeiss.

c. Gaschromatographische Analyse:

Die Denturierung der Zellproteine erfolgte durch Sieden im absoluten Alkohol. Nach Filtration dreimalige Spülung in heißem Äthanol (29). Die Elimination der Neutralfette erreichten wir mit der Gegenstromverteilung nach Blankenhorn und Ahrens (11). Nach der Einengung der Äthanol-Phase am Rotationselevator erfolgte die alkalische Hydrolyse der Gallensäuren im Autoklaven und ihre Überführung in Äthylacetat. Aus dem nach abermaliger Einengung am Rotationselevator entstandenen Rückstand wurden Verunreinigungen durch Auswaschen entfernt. Der Extrakt wurde in Chloroform-Methanol aufgenommen und unter Stickstoff erneut eingengt. Vor der gaschromatographischen Analyse wurden die Gallensäuren mit Diazomethan in 1 ml Äther methyliert und mit 1 ml Trifluoressigsäureanhydrid azetyliert (48, 49). Ihre Aufteilung erfolgte an einem Gaschromatographen der Firma Packard (Serie 7500-7800). Säulenbedingungen: $180 : 0,2$ cm; Füllung: 3 % QF1 auf Gaschrom Q, 100-120 mesh; Temperatur: 237° C; Durchflußrate: (N_2) 40 ml/min; FID; Empfindlichkeit: $3 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-10}$. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe eines Inneren Standards.

d. Bestimmung des Phospholipid-Phosphors (PLP):

Die Bestimmung des PLP erfolgte gemäß den Angaben von Bartlett (3). Sie beruht auf der Messung der Extinktion im Eppendorf-Photometer, nachdem durch Zugabe eines Reduktionsmittels zur im Ansatz entstandenen Phosphomolybdänsäure eine blaue Farbreaktion ausgelöst wurde, die dem Phosphorgehalt direkt proportional ist.

Ergebnisse

Die nach Methode I untersuchten Tiere hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 200 g. Das Lebergewicht schwankte zwischen 8,4 und 11,8 g und lag im Mittel bei $10,1 \pm 0,7$ g.

U. Leuschner, A. Alfurayh, W. Uhlmann, H. J. Wildgrube und W. Erb

Nach Differentialzentrifugation erhielten wir eine milchkaffeefarbene Mitochondrien-, eine rötlich-braune Mikrosomenfraktion und den flüssigen Überstand. Das Durchschnittsgewicht der Mitochondrienfraktion betrug $1,76 \pm 0,16$ g, der Mikrosomenfraktion $2,12 \pm 0,44$ g und des Zytoplasmas 3,1 g. Das entsprach einem Verhältnis von 1 : 1,2 : 1,8. Der Reinheitsgrad der Fraktionen und die Strukturhaltung der Organellen waren, verglichen mit den Ergebnissen nach Methode III sehr gut. Das Verhältnis zwischen dem PLP-Gehalt der Mitochondrien- und dem der Mikrosomenfraktion war nicht ganz 1 : 2.

In dem nach Abtrennung der Vor- und Kernfraktion untersuchten Leberzellhomogenat einer Leber fanden wir durchschnittlich 512,8 μ g Gallensäuren. Davon lagen 39,6 μ g (7,7 %) in der Mitochondrienfraktion, 450,0 μ g (87,8 %) in der Mikrosomenfraktion und 23,2 μ g (4,5 %) im flüssigen Überstand, dem sog. Zytoplasma. Die Gallensäurenkonzentration betrug in der Mitochondrienfraktion 22,5 μ g/g, in der Mikrosomenfraktion 212,0 μ g/g und im flüssigen Überstand 7,5 μ g/g (Tab. 1). Die durchschnittlichen Absolut- und Relativwerte der 5 wichtigsten Gallensäuren (Cholsäure [C], β -Muricholsäure [β -MC], Desoxycholsäure [DC], Chenodesoxycholsäure [CDC] und Lithocholsäure [LC]) finden sich in Tabelle 2—4. Die Konzentration aller Gallensäuren war in der Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion höher als im Zytoplasma. Die Unterschiede zwischen den Gallensäurenkonzentrationen in der Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion waren statistisch signifikant. Für DC und LC war $p < 0,01$, für C, β -MC und CDC $< 0,005$. Ebenfalls signifikante Unterschiede fanden sich zwischen den Konzentrationen in der mikrosomalen Fraktion und dem flüssigen Überstand. Für β -MC, LC und CDC war $p < 0,0025$, für C und DC $< 0,005$. Weiterhin ließen sich signifikante Differenzen zwischen den Konzentrationen in der Mitochondrienfraktion und dem flüssigen Überstand berechnen. Für C und DC war $p < 0,02$, für β -MC, CDC und LC $< 0,005$.

Die nach Methode II untersuchten Tiere hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 230 g und ein Lebergewicht von 15,4 g.

Die makroskopische Beschaffenheit der Organellenfraktionen entsprach der von Methode I. Das Durchschnittsgewicht der Mitochondrienfraktion betrug 1,82 g, der Mikrosomenfraktion 3,22 g und des Zytoplasmas 4,8 g. Das entsprach einem Verhältnis von 1 : 1,8 : 2,6. Elektronenmikroskopisch zeigte sich eine deutliche Kontamination der Mitochondrienfraktion und des flüssigen Überstandes durch mikrosomale Strukturen.

Tab. 1: Gallensäurenkonzentration und Gallensäuregehalt in subzellulären Fraktionen der Rattenleber (n = 13) Methode I

	Mitochondrien	Mikrosomen	Überstand	Gesamt
\bar{x} (μ g/g)	22,5	212,0	7,5	
s	14,7	177,3	7,6	
\bar{x} (μ g)	39,6	450,0	23,2	512,8
s	25,2	380,0	33,0	
Verteilung (%)	7,7	87,8	4,5	

U. Leuschner, A. Alfurayh, W. Uhlmann, H. J. Wildgrube und W. Erb

Tab. 2: Gallensäurenspektrum der Mitochondrienfraktion normaler Versuchstiere (n = 13) Methode I

	C	β -MC	DC	CDC	LC
\bar{x} (μ g)	15,42	2,50	3,05	3,87	1,37
\bar{x} (μ g/g)	8,80	1,42	1,71	2,20	0,78

Tab. 3: Gallensäurenspektrum der Mikrosomenfraktion normaler Versuchstiere (n = 13) Methode I

	C	β -MC	DC	CDC	LC
\bar{x} (μ g)	163,38	38,85	21,84	49,78	9,45
\bar{x} (μ g/g)	77,80	18,50	10,40	23,80	4,50

Tab. 4: Gallensäurenspektrum im flüssigen Überstand normaler Versuchstiere (n = 13) Methode I

	C	β -MC	DC	CDC	LC
\bar{x} (μ g)	10,80	0,15	1,30	0,43	0,27
\bar{x} (μ g/g)	3,48	0,05	0,42	0,14	0,09

Bei höherem Ausgangsgewicht der Leber fanden wir im Leberzellhomogenat durchschnittlich 829,3 μ g Gallensäuren. Davon lagen 92,3 μ g (11,2 %) in der Mitochondrienfraktion, 685,0 μ g (82,5 %) in der Mikrosomenfraktion und 52,0 μ g (6,3 %) im flüssigen Überstand. Die Konzentration betrug in der Mitochondrienfraktion 50,6 μ g/g, in der Mikrosomenfraktion 212,0 μ g/g und im Zytoplasma 10,8 μ g/g (Tab. 5). Das Gallensäurenspektrum zeigte eine ähnliche Verteilung wie bei Methode I. In Tabelle 6 ist die prozentuale Verteilung der Gallensäuren, ermittelt nach Methode I und II, gegenübergestellt.

Diskussion

Wegen des hohen RNS-Verlustes und einer erheblichen Mitochondrienagglutination wurde die früher häufiger angewandte Präparation von Zellorganellen in Elektrolytlösungen bald wieder aufgegeben (13, 30). Der Mitochondrienverlust in die Kern-

U. Leuschner, A. Alfurayh, W. Uhlmann, H. J. Wildgrube und W. Erb

Tab. 5: Gallensäurenkonzentration und Gallensäuregehalt in subzellulären Fraktionen der Rattenleber (n = 10) Methode II

	Mitochondrien	Mikrosomen	Überstand	Gesamt
\bar{x} ($\mu\text{g/g}$)	50,6	212,0	10,8	
s	24,9	80,0	4,5	
\bar{x} (μg)	92,3	685,0	52,0	829,3
s	45,3	257,0	21,6	
Verteilung (%)	11,2	82,5	6,3	

Tab. 6: Prozentuale Verteilung der Gallensäuren in der Zelle nach Methode I (n = 13) und Methode II (n = 10)

	Mitochondrien (%)	Mikrosomen (%)	Überstand (%)
Methode I	7,7	87,8	4,5
Methode II	11,2	82,5	6,3
Verschiebung zw. I und II	+ 3,5	- 5,3	+ 1,8

fraktion soll bis zu 50 % des gesamten Organellenbestandes betragen haben (45). Diese Gefahr ließ sich durch Abtrennung einer Vorfraktion bei hoher, und der Mitochondrien bei relativ niedriger Umdrehungszahl reduzieren (21). Durch Zugabe von EDTA und Änderung der Zentrifugalkräfte sowie der Dauer und Anzahl der Waschvorgänge konnten wir die Methode (I) endlich soweit modifizieren, daß die Reinheitskontrollen weit bessere Ergebnisse lieferten als für Methode II (7, 39). Wegen der bei Methode II höheren Zentrifugalkraft zur Isolierung der Kern- und Mitochondrienfraktion kam es zum Verlust von Mitochondrien in die Kernfraktion und zum Übertritt mikrosomaler Strukturen in die Mitochondrienfraktion; wegen der relativ geringen Zentrifugalkraft bei der Isolierung der Mikrosomenfraktion verblieben Reste dieser Organellen — wie die elektronenmikroskopische Kontrolle zeigte — im flüssigen Überstand. Das mit den Angaben aus der Literatur (7, 23, 32) gut übereinstimmende Gewichtsverhältnis zwischen den Fraktionen der Methode I verschob sich bei Methode II daher zuungunsten der Mitochondrienfraktion. Durch den erwähnten Übertritt mikrosomaler Strukturen in die Mitochondrienfraktion und das Zytoplasma stieg der Gallensäuregehalt um 3,5 % bzw. um 1,8 % an, während er in der Mikrosomenfraktion um 5,3 % abfiel. Obwohl diese Verschiebung im Gallensäuregehalt die Bestätigung des elektronenmikroskopischen Befundes darstellt, sei aber darauf hingewiesen, daß die mit Methode I und II ermittelten Resultate grundsätzlich nicht stark differieren. Bei beiden Versuchsanordnungen befanden sich über 80 % aller Gallensäuren in der Mikrosomenfraktion und nur

U. Leuschner, A. Alfurayh, W. Uhlmann, H. J. Wildgrube und W. Erb

etwa 10 % in den beiden anderen Kompartimenten. Beide Methoden der Differentialzentrifugation führten somit zu einer Konzentration gallensäurehaltiger Zellstrukturen in einer Fraktion. Abgesehen von den geringfügigen, präparativ bedingten Unterschieden in der Gallensäurenverteilung bestätigten die mit Methode II ermittelten Ergebnisse damit die genaueren der Methode I.

1 g Lebergesamthomogenat soll nach Angaben aus der Literatur (28, 33, 40) zwischen 75 und 110 μ g Gallensäuren enthalten. Da wir in der Vor- und Kernfraktion ungefähr 30 %, und zwar überwiegend gallensäurefreies Gewebe (Bindegewebe, Gefäßsysteme) abgetrennt und verworfen hatten, wäre der von uns in 1 g Zellhomogenat bestimmte Gallensäuregehalt um etwa 30 % zu hoch, wenn man ihn auf das Gesamthomogenat übertragen würde. Aufgrund dieser Überlegung errechnet sich der Gallensäuregehalt in 1 g Gesamthomogenat bei uns auf etwa 55 μ g. Dies bedeutet gegenüber den Angaben aus der Literatur eine Differenz von 25–50 %. Möglicherweise stellt sie die bei Versuchen mit Lebergesamthomogenaten eintretende Kontamination durch Gallensäuren der Gallengänge dar.

Das Vorkommen von über 80 % aller Gallensäuren in der Mikrosomenfraktion stimmt mit unseren heutigen Kenntnissen über den Gallensäurenstoffwechsel gut überein. So läuft die Mehrzahl aller Syntheseschritte, wie die Hydroxylierung am Cholesterinringsystem, die Verlagerung von Doppelbindungen, die Seitenkettenoxydation, die Aktivierung sowie die Konjugation mit Taurin und Glyzin wahrscheinlich in dieser Fraktion ab (14, 15, 17, 18, 20, 26, 27, 42). Es ist vorstellbar, daß sich die de novo synthetisierten Gallensäuren am Ort ihrer Entstehung anreichern oder über das Schlauchsystem des endoplasmatischen Retikulums an Lysosomen zur Ausscheidung weitergegeben werden. Beziehungen zwischen diesen beiden Organellenarten sind beschrieben worden (1, 2, 4).

Schwieriger ist die Interpretation des — wenn auch nur geringen — Gallensäurenvorkommens in der Mitochondrienfraktion. Zwar soll in diesen Organellen die Seitenkettenoxydation des Cholesterinmoleküls, die Synthese von Cholyl-CoA sowie von Chenodesoxycholsäure mit Lithocholsäure als Zwischenprodukt erfolgen (8, 22, 36, 38, 47, 50), doch ist nichts darüber bekannt, ob diese Verbindungen hier auch gespeichert werden können. Von der feinstrukturellen Beschaffenheit der Organellen her ist dies eher unwahrscheinlich. Da aber die möglicherweise an der Konjugation der Gallensäuren oder in ihrer Ausscheidung in die Galle beteiligten Lysosomen (41, 42, 44) mit der Mitochondrienfraktion sedimentieren (24, 25), könnte der Gallensäuregehalt dieser Fraktion auch lysosomaler Herkunft sein.

Im Zytoplasma fanden wir den niedrigsten Gallensäuregehalt überhaupt. Aus der Literatur ist allerdings auch kein einziges zytoplasmatisches Enzymsystem bekannt, das den letzten Schritt der Synthese von Gallensäuren katalysiert (12). Lediglich Zwischenprodukte, wie ungesättigte Ketone, wurden beschrieben. Zwei der an ihrem Stoffwechsel beteiligten Enzyme (4,5-Ketosteroid 5 β -Reduktase, 3 α Hydroxysteroid-Dehydrogenase) konnten sogar isoliert werden (5,6). Der niedrige Gallensäuregehalt (4,5 %) im flüssigen Überstand weist darauf hin, daß Gallensäuren in der Zelle struktur- und organellengebunden sind. Wären sie frei im Zytoplasma gelöst, so hätten sie gerade im flüssigen Überstand vermehrt nachweisbar sein müssen. Sollte jedoch während der Präparation die mizellare Löslichkeit unterschritten worden sein, was zum Ausfall der Gallensäuren geführt hat, so wäre ihre gleichmäßige Verteilung auf die Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion zu erwarten gewesen.

U. Leuschner, A. Alfurayh, W. Uhlmann, H. J. Wildgrube und W. Erb

Ähnliche Untersuchungen wie die mitgeteilten sind uns nur von *Okishio* und *Nair* (40) sowie *Minato* u. Mitarb. (37) bekannt. Die erstgenannten Autoren fanden nach Präparation der Fraktionen in einer 0,25 M-Saccharoselösung 60 % aller Gallensäuren im Zytoplasma und je 8–11 µg in je 1 g Kern-, Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion. Diese Verteilung könnte u. E. jedoch auf einen präparativ bedingten Gallensäurenverlust in den drei Organellenfraktionen hinweisen. So konnten wir an anderer Stelle zeigen (34), daß sich Gallensäuren aus einer reinen Saccharoselösung leichter extrahieren ließen als aus einem Gemisch von Saccharoselösung und Gewebsbrei. Das bedeutet aber, daß der Gallensäurenverlust in den gewebereichen, nur wenig verdünnten Organellenfraktionen wesentlich stärker sein dürfte als im stark verdünnten flüssigen Überstand. — *Minato* u. Mitarb. (37) fanden nach Gabe von ³⁵S-Taurin 93–97 % des radioaktiv markierten Materials im Zytoplasma, doch scheint uns der Schluß nicht ohne weiteres zulässig, daß es sich hierbei um Gallensäurenkonjugate gehandelt hat. Wie *Bremer* (14) nämlich bereits 1955 beobachtete, hat die Gabe von Taurin nur geringen Einfluß auf die Synthese von Gallensäurenkonjugaten, da der Tauringehalt der Rattenleber mit 0,35–0,90 mg/g bereits ziemlich hoch ist.

Zusammenfassung:

In subzellulären Fraktionen der Rattenleber, die wir nach zwei verschiedenen Methoden der Differentialzentrifugation präparierten, wurden Gallensäuregehalt und Gallensäurenkonzentration mit Hilfe der Gaschromatographie bestimmt. In der Mitochondrienfraktion fanden sich 39,6 µg (7,7 %), in der Mikrosomenfraktion 450,0 µg (87,8 %) und im Zytoplasma 23,2 µg (4,5 %). Das entsprach einem Gallensäuregehalt von etwa 55 µg/g Lebergesamthomogenat. Die Untersuchungen ergaben weiterhin, daß Gallensäuren in der Zelle strukturgebunden sind und nicht frei im Zytoplasma gelöst.

Frl. S. *Linnekoobl* danken wir für ihre ausgezeichnete Mitarbeit.

Literatur:

1. *Arstila, A. U.* u. *B. F. Trump*: Virch. Arch. Abt. B Zellpath. 2 (1969) 85. — 2. *Ashworth, C. T.* u. *E. Sanders*: Amer. J. Path. 37 (1960) 343. — 3. *Bartlett, G. R.*: J. Biol. Chem. 234 (1959) 466. — 4. *Bartok, J., V. Totovic* u. *P. Gedigk*: Virch. Arch. Path. Anat. 343 (1967) 1. — 5. *Berseus, O.*: Europ. J. Biochem. 2 (1967) 493. — 6. *Berseus, O.* u. *L. Björkhem*: Europ. J. Biochem. 2 (1967) 503. — 7. *Bielka, H.*: Endoplasmatisches Retikulum und Ergastoplasma; in: Molekulare Biologie der Zelle, G. Fischer Verlag, Stuttgart (1969) 414. — 8. *Björkhem, I.*: in: Bile acids in human diseases; F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York (1972) 9. — 9. *Björkhem, I., H. Danielsson*, u. *K. Einarsson*: Europ. J. Biochem. 2 (1967) 294. — 10. *Björkhem, I., H. Danielsson, K. Einarsson* u. *G. Johansson*: J. Clin. Invest. 47 (1968) 1573. — 11. *Blankenhorn, D. H.* u. *E. H. Ahrens*: J. Biol. Chem. 212 (1965) 69. — 12. *Boyd, G. S.* u. *I. W. Percy-Robb*: Amer. J. Med. 51 (1971) 580. — 13. *Brachet, J.* u. *R. Jeener*: Enzymologia 11 (1944) 196. — 14. *Bremer, J.*: Acta Chem. Scand. 9 (1955) 683. — 15. *Bremer, J.*: Acta Chem. Scand. 9 (1955) 268. — 16. *Bremer, J.*: Acta Chem. Scand. 10 (1956) 56. — 17. *Bremer, J.*: Akad. Trykningscentral, Blindern, Oslo (1956). — 18. *Bremer, J.* u. *U. Gloor*: Acta Chem. Scand. 9 (1955) 689. — 19. *Claude, A.*: J. Exp. Med. 84 (1946) 51. — 20. *Cronholm, T.* u. *G. Johanson*: Europ. J. Biochem. 16 (1970) 373. — 21. *Dalton, A. J., H. Kahler, M. G. Kelly, B. J. Lloyd* u. *M. J. Striebich*: J. Nat. Cancer Inst. 9 (1949) 439. — 22. *Danielsson, H.*: Acta Chem. Scand. 14 (1960) 348. — 23. *David, H.*: Mitochondrien; in: Molekulare Biologie der Zelle, G. Fischer Verlag, Stuttgart (1969) 465. — 24. *De Duve, C.*: Vth Internat. Congr. Biochem. Moscow 2 (1961) 7. — 25. *De Duve, C., J. Berthet* u. *H. Beaulay*: Progr. in Biophys. a. Biophys. Chem. 9 (1959) 325. — 26. *Einarsson, K.*: Europ. J. Biochem. 5 (1968) 101. —

Untersuchungen zur heterotopen auxiliären Lebertransplantation bei Wistar-Ratten

Von O. ZELDER, C. R. JERUSALEM u. CH. BODE

Mit auxiliären heterotopen Lebertransplantationen wurden bisher nur wenig befriedigende Resultate erzielt (1, 4, 6, 7, 11, 13, 18, 28, 29, 36). Die Gründe hierfür sind in verschiedenen Ursachen zu suchen, z. B. ungünstige hämodynamische Bedingungen (16, 20, 24, 26, 30), unspezifische funktionelle Konkurrenz zwischen Transplantat und Empfängerleber in Abhängigkeit von der portalen Versorgung (9, 12, 13, 18, 24, 33, 34) und unspezifische Abstoßungsreaktionen. Erfolgreiche heterotope, auxiliäre Lebertransplantationen mit Überlebenszeiten von mehr als 14 Monaten wurden erstmalig von Lee (18, 19) an isologen und später von Hess (9) an Ratten aus „geschlossener Zucht“ beschrieben. Demnach ermöglicht dieses Modell der Lebertransplantation an Ratten allgemeine Probleme der auxiliären heterotopen Transplantation zu studieren. In dieser Arbeit wird von über 60 Transplantationen an einem Wistar-Wistar-Modell nach der von Hess (9) angegebenen und nur geringfügig modifizierten Technik berichtet.

Material, Technik und Methode

Es wurden männliche Wistar-Ratten (Gewicht 300—400 g) verwendet; 37mal dienten Tiere der Fa. Ivanovas, Kisslegg/Allgäu, 23mal Tiere der Fa. Temmler, Marburg, sowohl als Spender wie als Empfänger. Es handelte sich nicht um SPF-Tiere. Die Operationen wurden in Äthernarkose und in der Regel mit sterilisierten Instrumenten durchgeführt, obgleich bei Ratten die Verwendung nur gereinigter Instrumente ausreichend ist (9, 18, 19).

a) *Spenderoperation*: Nach Medianschnitt wurde das Intestinum nach links geschlagen. Nach Ligatur der A. hepatica wurden die zwei linken kleinen Leberlappen reseziert, der Gallengang und die Pfortader skelettirt und deren Seitenäste ligiert und durchtrennt. Nach Präparation der V. cava inferior wurden nur die proximalen Lappen ligiert und reseziert. Während der Präparation des Empfängers blieb die Versorgung des Transplantates mit portalem Blut erhalten. Die beiden kaudalen Lappen, etwa 30% der Spenderleber, wurden als Transplantat verwendet. Es erfolgte eine kurze Perfusion über die Pfortader mit 4° C kalter Ringer-Laktatlösung unter Zusatz von 1000 E. Heparin und 1% Novocain unter einem Druck von 15 cm Wassersäule.

b) *Empfängeroperation*: Nach Medianschnitt, linksseitiger Verlagerung des Intestinums und Skelettierung der Pfortader wurde rechtsseitig nephrektomiert, um sowohl Raum für das Transplantat als auch eine optimale Position für die Ausflußanastomose zu gewinnen. Danach wurde die Ausflußanastomose subhepatisch, und zwar so proximal wie möglich, mit 7:0 Ethicon-silk als End-zu-Seit-Anastomose angelegt. Es wurde darauf geachtet, einen nur etwa 1 mm langen Cavastutzen zu verwenden, um eine Abknickung der Ausflußanastomose zu vermeiden (7, 17). Nach Abklemmung der A. mesenterica wurde eine End-zu-End-Anastomose beider Pfortadern mit 8:0 Suprylon/Pfrimmer angelegt. Nach Implantation des Gallenganges in das Duodenum wurde zunächst der Ausfluß, dann die Pfortader und zuletzt die A. mesenterica freigegeben. Letztlich wurde die Empfängerleber um etwa 50% reseziert, um eine funktionelle Atrophie des Transplantates zu vermeiden. Danach erhielten die Tiere 3 ml Gelatine-Plasmaexpander i. v. Die Ischämiezeit betrug etwa 35—40 min. Über die ersten postoperativen Tage wurden die Tiere mit Binotal, 10 mg/Tag behandelt. Venenblut für die Bestimmung der GOT, GPT und AP wurde nach 5 Stunden und danach täglich aus der Schwanzvene gewonnen. Zur Messung der Aktivität von Enzymen vorwiegend zytoplasmatischer Lokalisation in der Leber wurden Tiere in der agonalen Phase durch Entbluten in Narkose