

EUR 160.d

REPRINT

EUROPÄISCHE ATOMGEMEINSCHAFT - EURATOM

SYNTHESE DES DESOXYRIBONUCLEINSÄURE
IN DER ISOLIERTEN PERFUNDIERTEN
RATTENLEBER

I. Der Einbau von ^3H -Thymidin in normale Leber
und in Leber nach Partieller Hepatektomie

von

G.B. GERBER J. REMY-DEFRAIGNE

1963



Sonderdruck aus
ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG
Band 18b, Heft 3 - 1963

HINWEIS

Das vorliegende Dokument ist im Rahmen des Forschungsprogramms der Kommission der Europäischen Atomgemeinschaft (EURATOM) ausgearbeitet worden.

Es wird darauf hingewiesen, dass die Euratomkommission, ihre Vertragspartner und alle in deren Namen handelnden Personen:

- 1° — keine Gewähr dafür übernehmen, dass die in diesem Dokument enthaltenen Informationen richtig und vollständig sind oder dass die Verwendung der in diesem Dokument enthaltenen Informationen oder der in diesem Dokument beschriebenen technischen Anordnungen, Methoden und Verfahren nicht gegen gewerbliche Schutzrechte verstößt;
- 2° — keine Haftung für die Schäden übernehmen, die infolge der Verwendung der in diesem Dokument enthaltenen Informationen oder der in diesem Dokument beschriebenen technischen Anordnungen, Methoden oder Verfahren entstehen könnten.

This reprint is intended for restricted distribution only. It reproduces, by kind permission of the publisher, an article from „ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG“ Band 18b, Heft 3 - 1963, 216-218. For further copies please apply to Verlag der Zeitschrift für Naturforschung — Tübingen, Deutschland.

Dieser Sonderdruck ist für eine beschränkte Verteilung bestimmt. Die Wiedergabe des vorliegenden in „ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG“ Band 18b, Heft 3 - 1963, 216-218 erschienenen Aufsatzes erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Herausgebers. Bestellungen weiterer Exemplare sind an Verlag der Zeitschrift für Naturforschung — Tübingen, Deutschland, zu richten.

Ce tiré-à-part est exclusivement destiné à une diffusion restreinte. Il reprend, avec l'aimable autorisation de l'éditeur, un article publié dans le « ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG » Band 18b, Heft 3 - 1963, 216-218. Tout autre exemplaire de cet article doit être demandé à Verlag der Zeitschrift für Naturforschung — Tübingen, Deutschland.

Questo estratto è destinato esclusivamente ad una diffusione limitata. Esso è stato riprodotto, per gentile concessione dell'Editore, in « ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG » Band 18b, Heft 3 - 1963, 216-218. Ulteriori copie dell'articolo debbono essere richieste a Verlag der Zeitschrift für Naturforschung — Tübingen, Deutschland.

Deze overdruk is slechts voor beperkte verspreiding bestemd. Het artikel is met welwillende toestemming van de uitgever overgenomen uit „ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG“ Band 18b, Heft 3 - 1963, 216-218. Meer exemplaren kunnen besteld worden bij Verlag der Zeitschrift für Naturforschung — Tübingen, Deutschland.

EUR 160.d

REPRINT

SYNTHESE DER DESOXYRIBONUCLEINSÄURE IN DER ISOLIERTEN PERFUNDIERTEN RATTENLEBER - I. Der Einbau von ^3H -Thymidin in normale Leber und in Leber nach Partieller Hepatektomie, von (in alphabetischer Folge) G.B. GERBER und J. REMY-DEFRAIGNE.

EUROPÄISCHE ATOMGEMEINSCHAFT - EURATOM.

Sonderdruck aus „Zeitschrift für Naturforschung“, Band 18b, Heft 3 - 1963, S. 216-218.

Der Einbau tritium-markierten Thymidins in die DNS wurde in der isolierten perfundierten Leber nach partieller Hepatektomie untersucht. Ähnlich wie im intakten Tier nimmt in der perfundierten Leber die DNS-Synthese 18-36 Stdn. nach partieller Hepatektomie zu und danach wieder ab. Das radioaktive Thymidin wird durch die Leber rasch abgebaut, so daß 30 Min. nach Gabe von ^3H -Thymidin bereits 60 % des Tritiums in flüchtiger Form vorliegt. Von dem zugegebenen ^3H -Thymidin wird etwa 0,7 % in die DNS normaler Leber und bis etwa 13 % in die DNS partiell hepatektomierter Leber eingebaut.

EUR 160.d

REPRINT

SYNTHESIS OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID IN ISOLATED PERFUSED RATS' LIVERS - I. The incorporation of ^3H -Thymidine in normal livers and in livers subjected to partial hepatectomy by (in alphabetical order) G.B. GERBER and J. REMY-DEFRAIGNE.

European Atomic Energy Community - EURATOM.

Reprinted from „Zeitschrift für Naturforschung“, Vol. 18b, No. 3 - 1963, pages 216-218.

The incorporation of tritium-marked thymidine in DNA was examined in isolated perfused livers after partial hepatectomy. As in the case of the intact animal, the DNA synthesis increases in the perfused liver 18-36 hours after partial hepatectomy, after which it drops again. The radioactive thymidine is rapidly reduced by the liver, so that 30 min. after administration of the ^3H -thymidine as much as 60 % of the tritium is present in volatile form. Of the ^3H -thymidine which is administered, about 0.7 % is incorporated in the DNA of normal liver and up to about 13 % in that of liver which has undergone partial hepatectomy.

EUR 160.d

REPRINT

SYNTHESIS OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID IN ISOLATED PERFUSED RATS' LIVERS - I. The incorporation of ^3H -Thymidine in normal livers and in livers subjected to partial hepatectomy by (in alphabetical order) G.B. GERBER and J. REMY-DEFRAIGNE.

European Atomic Energy Community - EURATOM.

Reprinted from „Zeitschrift für Naturforschung“, Vol. 18b, No. 3 - 1963, pages 216-218.

The incorporation of tritium-marked thymidine in DNA was examined in isolated perfused livers after partial hepatectomy. As in the case of the intact animal, the DNA synthesis increases in the perfused liver 18-36 hours after partial hepatectomy, after which it drops again. The radioactive thymidine is rapidly reduced by the liver, so that 30 min. after administration of the ^3H -thymidine as much as 60 % of the tritium is present in volatile form. Of the ^3H -thymidine which is administered, about 0.7 % is incorporated in the DNA of normal liver and up to about 13 % in that of liver which has undergone partial hepatectomy.

EUR 160.d

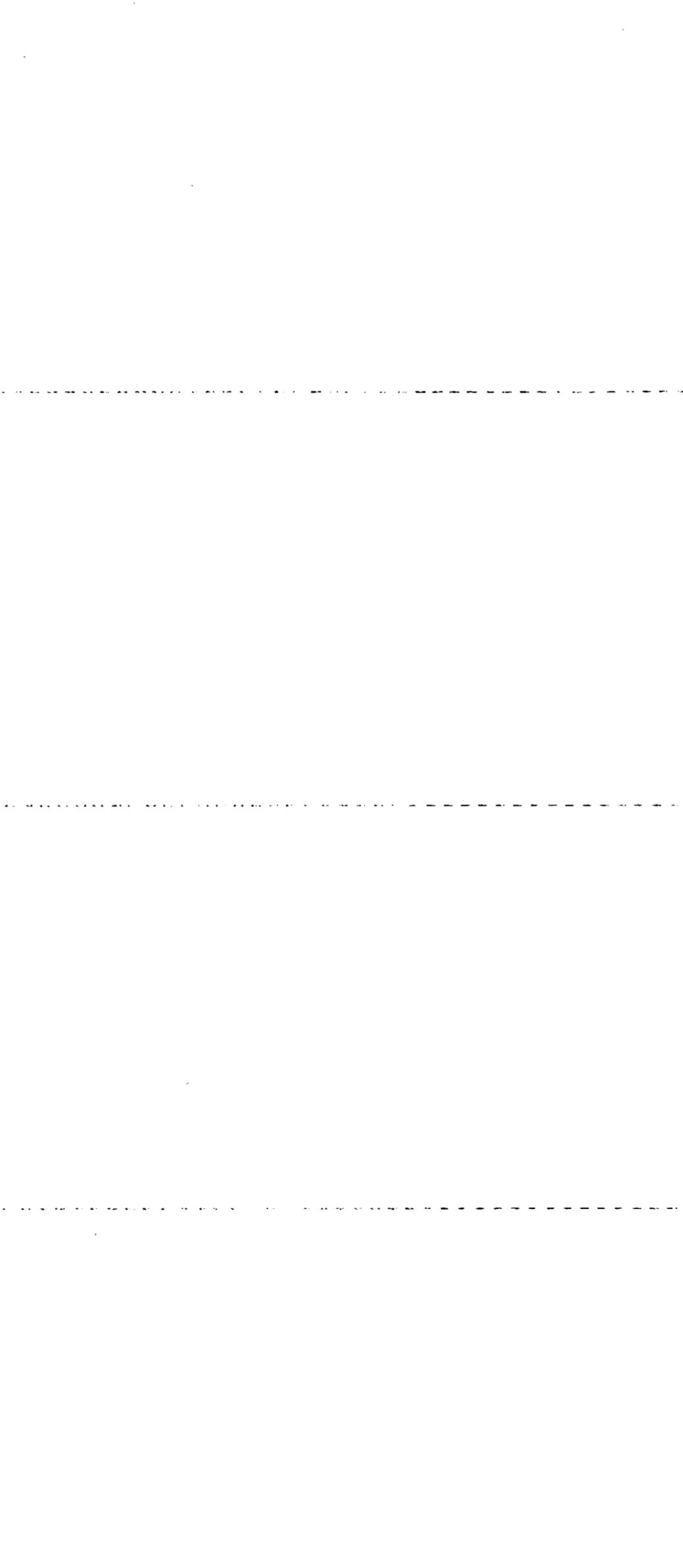
REPRINT

SYNTHESIS OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID IN ISOLATED PERFUSED RATS' LIVERS - I. The incorporation of ^3H -Thymidine in normal livers and in livers subjected to partial hepatectomy by (in alphabetical order) G.B. GERBER and J. REMY-DEFRAIGNE.

European Atomic Energy Community - EURATOM.

Reprinted from „Zeitschrift für Naturforschung“, Vol. 18b, No. 3 - 1963, pages 216-218.

The incorporation of tritium-marked thymidine in DNA was examined in isolated perfused livers after partial hepatectomy. As in the case of the intact animal, the DNA synthesis increases in the perfused liver 18-36 hours after partial hepatectomy, after which it drops again. The radioactive thymidine is rapidly reduced by the liver, so that 30 min. after administration of the ^3H -thymidine as much as 60 % of the tritium is present in volatile form. Of the ^3H -thymidine which is administered, about 0.7 % is incorporated in the DNA of normal liver and up to about 13 % in that of liver which has undergone partial hepatectomy.



Synthese der Desoxyribonucleinsäure
in der isolierten perfundierten Rattenleber

I. Der Einbau von ^3H -Thymidin in normale Leber und in Leber nach Partieller Hepatektomie

Von G. B. GERBER und J. REMY-DEFRAIGNE

Synthese der Desoxyribonucleinsäure in der isolierten perfundierten Rattenleber

I. Der Einbau von ^3H -Thymidin in normale Leber und in Leber nach Partieller Hepatektomie

Von G. B. GERBER und J. REMY-DEFRAIGNE

Aus dem Euratom und Centre d'Etude de l'Energie Nucléaire, Dep. Radiobiologie, Mol-Belgien
(Z. Naturforschg. 18 b, 216–218 [1963]; eingegangen am 22. Dezember 1962)

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. A. BUTENANDT zum 60. Geburtstag gewidmet

Der Einbau tritium-markierten Thymidins in die DNS wurde in der isolierten perfundierten Leber nach partieller Hepatektomie untersucht. Ähnlich wie im intakten Tier nimmt in der perfundierten Leber die DNS-Synthese 18–36 Stdn. nach partieller Hepatektomie zu und danach wieder ab. Das radioaktive Thymidin wird durch die Leber rasch abgebaut, so daß 30 Min. nach Gabe von ^3H -Thymidin bereits 60% des Tritiums in flüchtiger Form vorliegt. Von dem zugegebenen ^3H -Thymidin wird etwa 0,7% in die DNS normaler Leber und bis etwa 13% in die DNS partiell hepatektomierter Leber eingebaut.

Methoden der Organperfusion haben es ermöglicht, viele biochemische und physiologische Funktionen unter Bedingungen zu untersuchen, unter denen die wechselseitige Beeinflussung verschiedener Organe und die hormonelle und nervöse Regulation ausgeschaltet werden können, die aber dennoch den Bedingungen im intakten Organismus weitgehend entsprechen. So haben Untersuchungen an der isolierten perfundierten Rattenleber gezeigt, daß dieses Organ über einen Zeitraum von 6–8 Stdn. in der Lage ist, komplexe biochemische Funktionen, wie Proteinsynthese und Abbau^{1–4}, Harnstoffbildung², Synthese von Cholesterin⁵ und Kreatin⁶ mit einer Ausbeute durchzuführen, die der im intakten Organismus etwa entspricht.

Die außerordentliche Regenerations-Fähigkeit der Leber nach partieller Hepatektomie, die sich in einer, z. T. synchronisierten, vermehrten DNS-Synthese und Mitosewelle und auch in einer Zunahme der Synthese von Proteinen und von anderen Makromolekülen ausprägt, hat die regenerierende Leber zu einem wertvollen Werkzeug für das Studium der Synthese von Desoxyribonucleinsäuren (DNS) und Proteinen gemacht. An der perfundierten Leber nach partieller Hepatektomie liegen jedoch bis jetzt nur

vereinzelte Untersuchungen vor, in denen vor allem Protein und Aminosäuren-Stoffwechsel und Aufnahme radioaktiven Chromats untersucht wurden^{7,8,9}. Die regenerierende, perfundierte Leber könnte aber auch ein geeignetes System darstellen, um die Synthese der DNS und das Verhalten der Vorstufen der DNS zu untersuchen, denn keine anderen Stoffwechselforgänge als die anabolischen und katabolischen Reaktionen der DNS in der Leber selbst brauchen hier berücksichtigt werden.

Experimentelles

Männliche Ratten vom Wistarstamm, denen 18 Stdn. vor der Perfusion bzw. der Blutentnahme das Futter entzogen wurde, wurden für alle Untersuchungen verwendet.

Partielle Hepatektomie der Leberdonor-Ratten – Entfernung von 60% der Leber – wurde zu verschiedenen Zeiten vor der Perfusion durchgeführt¹⁰. Für die Perfusion wurde nach der Methode von MILLER^{1,3} Pfortader, Gallengang und Vena cava inf. canüliert, die Leber isoliert, und in der Perfusions-Apparatur nach MILLER mit sauerstoffreichem Perfusat durchströmt. In dieser Anordnung war der Oxygenator durch einen neuer Konstruktion ersetzt, in dem sich drehende, schräge Plasticscheiben das Blut in Kontakt mit dem

¹ L. L. MILLER, C. G. BLY, M. L. WATSON u. W. F. BALE, J. exp. Medicine 94, 431 [1951].

² L. L. MILLER, W. T. BURKE u. D. E. HAFT, Federat. Proc. 14, 707 [1955].

³ M. GREEN u. L. L. MILLER, J. biol. Chemistry 235, 3202 [1960].

⁴ L. I. MILLER, Nutrit. Rev. 17, 225 [1959].

⁵ K. I. ALTMANN, L. L. MILLER u. C. G. BLY, Arch. Biochemistry 31, 329 [1951].

⁶ G. B. GERBER, G. GERBER, T. KOSZALKA u. L. L. MILLER, J. biol. Chemistry 237, 2246 [1962].

⁷ G. F. LEONG, R. L. PESOTTI u. R. W. BRAUER, Amer. J. Physiol. 197, 880 [1959].

⁸ W. T. BURKE, Cancer Res. 22, 10 [1962].

⁹ L. L. MILLER u. W. STAIB, persönliche Mitteilung.

¹⁰ L. L. HIGGINS u. R. M. ANDERSON, Arch. Pathology 12, 186 [1931].

vorbeiströmenden Gasmisch (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxyd) brachten¹¹. Das Perfusat bestand aus 40–50 ml heparinisiertem, frischem Rattenblut, das durch Herzpunktion gewonnen wurde und das mit $\frac{1}{3}$ Volumen Ringer verdünnt wurde. Glucose (150 mg) wurde ebenfalls dem Perfusat zugesetzt.

Die Perfusion wurde unter einem Druck von 14 cm Wasser an der Pfortader durchgeführt und konnte für 5–7 Stdn. aufrecht erhalten werden. Der Durchfluß betrug 1–1,5 ml/min pro g Leber und war zu Beginn bei normalen und partiell hepatektomierten Lebern etwa derselbe. Nach 3–5 Stdn. fiel der Durchfluß in der partiell hepatektomierten Leber oft deutlich ab, während er in der normalen Leber konstant blieb. Die Perfusion wurde nach 6–7 Stdn. unterbrochen oder wenn der Fluß unter 0,9 ml/min pro g Leber gefallen war.

Gallenfluß war reichlich (1–2 μ l/min pro g Leber) in normaler Leber und von 48 Stdn. an nach partieller Hepatektomie. Zu früheren Zeiten nach partieller Hepatektomie konnte nicht bei allen Tieren ein befriedigender Gallenfluß erhalten werden.

Zu Anfang der Perfusion wurden 50 μ C ³H-Thymidin (1,5 · 10⁷ cpm, spezifische Aktivität 3 C/mMol) und nach 3 Stdn. eine gleich große zweite Dosis dem Perfusat zugegeben. Zu verschiedenen Zeiten während der Perfusion wurden dem Perfusat Proben (2 ml) entnommen. Vor Zugabe der zweiten Dosis Thymidin wurde ein Leberlappen abgebunden und entfernt. Am Ende der Perfusion wurde die restliche Leber von fremdem Gewebe gesäubert. Die Leberproben wurden gewogen, ein kleines Stückchen in Carnoy fixiert und der Rest in der 10-fachen Menge Wasser homogenisiert. Proteine und Nucleinsäuren wurden dann mit 1/10 Volumen 6-n. Perchlorsäure ausgefällt, die säurelöslichen Substanzen mit 0,6-n. Perchlorsäure ausgewaschen, das Präzipitat mit Alkohol und Aceton entfettet und schließlich die Nucleinsäuren mit 0,6-n. Perchlorsäure für 15 Min.

bei 90° extrahiert¹². In dieser Lösung wurde die Konzentration der DNS mittels der Burton'schen Modifikation des Dische-Tests¹³ und die Radioaktivität durch „Liquid scintillation counting“ (Packard Tricarb) bestimmt.

Die in Carnoy fixierten Leberstückchen wurden in Paraffin eingebettet, auf 5 μ Dicke geschnitten und Autoradiographien mit flüssiger Ilford L4-Emulsion hergestellt. Die Schnitte wurden für 3–5 Tage belichtet und nach Entwickeln mit Hämotoxylin-Eosin gefärbt.

Nach Enteiweißen mit Pikrinsäure wurde in dem Perfusat die gesamte und nicht flüchtige (nach Eintrocknen bei Zimmertemperatur) Radioaktivität, Glucose¹⁴, Harnstoff¹⁵ und Aminosäuren¹⁶ bestimmt. Glucoseverwertung, Harnstoffbildung und Aminosäurespiegel stellen Indikatoren für die Funktionstüchtigkeit der Leber dar^{3,4}.

Ergebnisse und Diskussion

Tab. 1 enthält Werte für die spezifische Aktivität der DNS nach Perfusion zu verschiedenen Zeiten nach partieller Hepatektomie. Es ist ersichtlich, daß in der normalen Leber während der Perfusion genau so wie im intakten Tier nur wenig Thymidin in die DNS eingebaut wird. Von 18 Stdn. an nach partieller Hepatektomie steigt der Einbau in der Perfusion jedoch sehr rasch an und erreicht ein Maximum zwischen 24 bis 48 Stdn. nach partieller Hepatektomie. Ein quantitativer Vergleich ist jedoch schwierig, da noch keine Werte für die spezifische Radioaktivität und Konzentration der Vorstufen der DNS vorliegen. Solche Bestimmungen sind jedoch derzeit im Gange.

Zeit nach partieller Hepatektomie [Stdn.]	Zahl der Tiere	Initiale Periode		Zweite Periode	
		DNS		DNS	
		Spezifische Aktivität [dpm/ μ g]	Gesamtaktivität [dpm · 10 ⁻⁶]	Spezifische Aktivität [dpm/ μ g]	Gesamtaktivität [dpm · 10 ⁻⁶]
Kontrolle	4	65	0,71	100,8	1,23
18	4	236	0,91	940	3,54
24	4	1450	6,15	3220	14,5
36	2	1750	8,75	3180	15,7
48	3	2510	12,8	4850	26,0
60	2	1370	8,10	2540	12,3
72	3	885	5,15	2200	12,2
96	1	870	5,80	1620	10,7

Tab. 1. Spezifische und Gesamtradioaktivität der DNS nach Perfusion der regenerierenden Leber mit ³H-Thymidin (zweimal 50 μ C [1,11 · 10⁸ dpm] im Abstand von 3 Stunden).

¹¹ G. B. GERBER, J. appl. Physiology, im Druck.

¹² W. C. SCHNEIDER, J. biol. Chemistry **161**, 293 [1945].

¹³ K. BURTON, Biochem. J. **62**, 315 [1956].

¹⁴ N. NELSON, J. biol. Chemistry **153**, 375 [1944].

¹⁵ J. M. LEVINE, R. LEON u. F. STEIGMANN, Clin. Chem. [New York] **7**, 488 [1961].

¹⁶ H. ROSEN, Arch. Biochemistry **67**, 10 [1957].

Der Einbau von Thymidin in die DNS erfolgt nicht nur während der initialen Periode der Perfusion, sondern auch, wie Tab. 1 zeigt, während des zweiten 3-Stdn.-Intervalls. Fällt diese Zeit in eine Periode rascher Zunahme der DNS synthetisierenden Aktivität, wie z. B. von 21 bis 24 Stdn. im Vergleich zu 18 bis 21 Stdn. nach partieller Hepatektomie, so findet sich oft eine Zunahme der DNS-Synthese auch in der perfundierten Leber. In anderen Worten, nicht nur die DNS-Synthese selbst bleibt während der Perfusion intakt, sondern auch die Vorgänge, die zur DNS-Synthese führen und sie induzieren.

Die Anzahl markierter Zellkerne ist gering (370 pro 10^5 Kerne) in normaler Leber, erreicht ein Maximum nach 24–48 Stdn. ($13\ 300$ pro 10^5) und fällt dann wieder ab. Ein quantitativer Vergleich mit

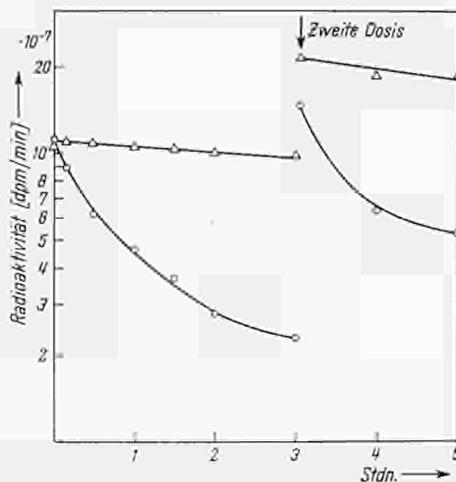


Abb. 1. Gesamte und nichtflüchtige Radioaktivität während der Perfusion einer isolierten Rattenleber nach Zusatz von ^3H -Thymidin ($50\ \mu\text{C}$ bei Beginn der Perfusion, $50\ \mu\text{C}$ nach 3 Stunden). Es handelte sich um eine 24 Stdn. vor der Perfusion partiell (60%) hepatektomierte Leber von 4,2 g Gewicht. Ein Leberlappen (0,43 g) wurde nach 3 Stdn. entfernt. Das Volumen des Perfusats betrug 45 Milliliter.

den Verhältnissen im intakten Tier erscheint aus den erwähnten Gründen auch hier unsicher.

Die gesamte Radioaktivität im Perfusat nimmt nur wenig ab (Abb. 1), dagegen fällt die nicht flüchtige Radioaktivität unter gleichzeitiger Bildung flüchtiger radioaktiver Verbindungen (Tritiumwasser) rasch ab. Es ist daher anzunehmen, daß schon verhältnismäßig kurze Zeit (60 Min.) nach der Gabe radioaktiven Thymidins nur noch wenig davon für die DNS-Synthese zur Verfügung steht. Dies stimmt mit den Beobachtungen NYGAARDS¹⁸ überein, der im intakten Tier ebenfalls 1 Stde. nach Injektion von ^3H -Thymidin keine nennenswerte Menge Radioaktivität in der Thymidinfraction nachweisen konnte.

Die Verteilung der Radioaktivität in der nicht-flüchtigen Fraktion des Blutes ist noch nicht bekannt. Vorläufige Untersuchungen zeigen, daß ein Teil davon in Form von β -Aminoisobuttersäure vorliegt und daß die Radioaktivität in dieser Fraktion während der Perfusion zunächst zu- und dann wieder abnimmt. Von der gesamten als Thymidin zugegebenen Radioaktivität werden etwa 0,7% in die normale Leber und bis 13% in die Leber nach partieller Hepatektomie eingebaut. In der säurelöslichen Fraktion finden sich zwischen 2 und 5%, davon stellen etwa 0,3–1% nichtflüchtige radioaktive Bestandteile dar.

Weitere Untersuchungen, z. T. unter Verwendung ^{14}C -markierten Thymidins und anderer Nucleotide, sollen klären wie groß „Pools“ und Umsatz der Vorstufen der DNS-Synthese sind, insbesondere wieviel von dem *de novo* synthetisierten Thymidin tatsächlich für die DNS-Synthese verwandt wird und wieviel davon abgebaut wird. Immerhin zeigen die gegenwärtigen Ergebnisse, daß die isolierte perfundierte Rattenleber in der Lage ist DNS zu bilden und daß dieses System für die Untersuchung verschiedener Aspekte der DNS-Synthese brauchbar ist.

Mme LAMBIKT-COLLIER danken wir für ihre Hilfe bei der Herstellung der Autoradiographien.

¹⁷ A. A. NOVIKOFF u. V. R. POTTER, J. biol. Chemistry **173**, 223 [1948].

¹⁸ O. F. NYGAARD u. R. L. POTTER, Rad. Res. **10**, 462 [1959].

Synthese der Desoxyribonucleinsäure
in der isolierten perfundierten Rattenleber

I. Der Einbau von ^3H -Thymidin in normale Leber und in Leber nach Partieller Hepatektomie

Von G. B. GERBER und J. REMY-DEFRAIGNE

Synthese der Desoxyribonucleinsäure in der isolierten perfundierten Rattenleber

I. Der Einbau von ^3H -Thymidin in normale Leber und in Leber nach Partieller Hepatektomie

Von G. B. GERBER und J. REMY-DEFRAIGNE

Aus dem Euratom und Centre d'Etude de l'Energie Nucléaire, Dep. Radiobiologie, Mol-Belgien
(Z. Naturforsch. 18 b, 216—218 [1963]; eingegangen am 22. Dezember 1962)

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. A. BUTENANDT zum 60. Geburtstag gewidmet

Der Einbau tritium-markierten Thymidins in die DNS wurde in der isolierten perfundierten Leber nach partieller Hepatektomie untersucht. Ähnlich wie im intakten Tier nimmt in der perfundierten Leber die DNS-Synthese 18—36 Stdn. nach partieller Hepatektomie zu und danach wieder ab. Das radioaktive Thymidin wird durch die Leber rasch abgebaut, so daß 30 Min. nach Gabe von ^3H -Thymidin bereits 60% des Tritiums in flüchtiger Form vorliegt. Von dem zugegebenen ^3H -Thymidin wird etwa 0,7% in die DNS normaler Leber und bis etwa 13% in die DNS partiell hepatektomierter Leber eingebaut.

Methoden der Organperfusion haben es ermöglicht, viele biochemische und physiologische Funktionen unter Bedingungen zu untersuchen, unter denen die wechselseitige Beeinflussung verschiedener Organe und die hormonelle und nervöse Regulation ausgeschaltet werden können, die aber dennoch den Bedingungen im intakten Organismus weitgehend entsprechen. So haben Untersuchungen an der isolierten perfundierten Rattenleber gezeigt, daß dieses Organ über einen Zeitraum von 6—8 Stdn. in der Lage ist, komplexe biochemische Funktionen, wie Proteinsynthese und Abbau¹⁻⁴, Harnstoffbildung², Synthese von Cholesterin⁵ und Kreatin⁶ mit einer Ausbeute durchzuführen, die der im intakten Organismus etwa entspricht.

Die außerordentliche Regenerations-Fähigkeit der Leber nach partieller Hepatektomie, die sich in einer, z. T. synchronisierten, vermehrten DNS-Synthese und Mitosewelle und auch in einer Zunahme der Synthese von Proteinen und von anderen Makromolekülen ausprägt, hat die regenerierende Leber zu einem wertvollen Werkzeug für das Studium der Synthese von Desoxyribonucleinsäuren (DNS) und Proteinen gemacht. An der perfundierten Leber nach partieller Hepatektomie liegen jedoch bis jetzt nur

vereinzelte Untersuchungen vor, in denen vor allem Protein und Aminosäuren-Stoffwechsel und Aufnahme radioaktiven Chromats untersucht wurden^{7,8,9}. Die regenerierende, perfundierte Leber könnte aber auch ein geeignetes System darstellen, um die Synthese der DNS und das Verhalten der Vorstufen der DNS zu untersuchen, denn keine anderen Stoffwechselvorgänge als die anabolischen und katabolischen Reaktionen der DNS in der Leber selbst brauchen hier berücksichtigt werden.

Experimentelles

Männliche Ratten vom Wistarstamm, denen 18 Stdn. vor der Perfusion bzw. der Blutentnahme das Futter entzogen wurde, wurden für alle Untersuchungen verwendet.

Partielle Hepatektomie der Leberdonor-Ratten — Entfernung von 60% der Leber — wurde zu verschiedenen Zeiten vor der Perfusion durchgeführt¹⁰. Für die Perfusion wurde nach der Methode von MILLER^{1,3} Pfortader, Gallengang und Vena cava inf. canüliert, die Leber isoliert, und in der Perfusions-Apparatur nach Miller mit sauerstoffreichem Perfusat durchströmt. In dieser Anordnung war der Oxygenator durch einen neuer Konstruktion ersetzt, in dem sich drehende, schräge Plastikscheiben das Blut in Kontakt mit dem

¹ L. L. MILLER, C. G. BLY, M. L. WATSON u. W. F. BALE, J. exp. Medicine 94, 431 [1951].

² L. L. MILLER, W. T. BURKE u. D. E. HAFT, Federat. Proc. 14, 707 [1955].

³ M. GREEN u. L. L. MILLER, J. biol. Chemistry 235, 3202 [1960].

⁴ L. L. MILLER, Nutrit. Rev. 17, 225 [1959].

⁵ K. I. ALTMANN, L. L. MILLER u. C. G. BLY, Arch. Biochemistry 31, 329 [1951].

⁶ G. B. GERBER, G. GERBER, T. KOSZALKA u. L. L. MILLER, J. biol. Chemistry 237, 2246 [1962].

⁷ G. F. LEONG, R. L. PESOTTI u. R. W. BRAUER, Amer. J. Physiol. 197, 880 [1959].

⁸ W. T. BURKE, Cancer Res. 22, 10 [1962].

⁹ L. L. MILLER u. W. STAIB, persönliche Mitteilung.

¹⁰ L. L. HIGGINS u. R. M. ANDERSON, Arch. Pathology 12, 186 [1931].

vorbeiströmenden Gasgemisch (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxyd) brachten¹¹. Das Perfusat bestand aus 40–50 ml heparinisiertem, frischem Rattenblut, das durch Herzpunktion gewonnen wurde und das mit $\frac{1}{3}$ Volumen Ringer verdünnt wurde. Glucose (150 mg) wurde ebenfalls dem Perfusat zugesetzt.

Die Perfusion wurde unter einem Druck von 14 cm Wasser an der Pfortader durchgeführt und konnte für 5–7 Stdn. aufrecht erhalten werden. Der Durchfluß betrug 1–1,5 ml/min pro g Leber und war zu Beginn bei normalen und partiell hepatektomierten Lebern etwa derselbe. Nach 3–5 Stdn. fiel der Durchfluß in der partiell hepatektomierten Leber oft deutlich ab, während er in der normalen Leber konstant blieb. Die Perfusion wurde nach 6–7 Stdn. unterbrochen oder wenn der Fluß unter 0,9 ml/min pro g Leber gefallen war.

Gallenfluß war reichlich (1–2 μ l/min pro g Leber) in normaler Leber und von 48 Stdn. an nach partieller Hepatektomie. Zu früheren Zeiten nach partieller Hepatektomie konnte nicht bei allen Tieren ein befriedigender Gallenfluß erhalten werden.

Zu Anfang der Perfusion wurden 50 μ C ³H-Thymidin (1,5 · 10⁷ cpm, spezifische Aktivität 3 C/mMol) und nach 3 Stdn. eine gleich große zweite Dosis dem Perfusat zugegeben. Zu verschiedenen Zeiten während der Perfusion wurden dem Perfusat Proben (2 ml) entnommen. Vor Zugabe der zweiten Dosis Thymidin wurde ein Leberlappen abgebunden und entfernt. Am Ende der Perfusion wurde die restliche Leber von fremdem Gewebe gesäubert. Die Leberproben wurden gewogen, ein kleines Stückchen in Carnoy fixiert und der Rest in der 10-fachen Menge Wasser homogenisiert. Proteine und Nucleinsäuren wurden dann mit $\frac{1}{10}$ Volumen 6-n. Perchlorsäure ausgefällt, die säurelöslichen Substanzen mit 0,6-n. Perchlorsäure ausgewaschen, das Präzipitat mit Alkohol und Aceton entfettet und schließlich die Nucleinsäuren mit 0,6-n. Perchlorsäure für 15 Min.

bei 90° extrahiert¹². In dieser Lösung wurde die Konzentration der DNS mittels der Burton'schen Modifikation des Dische-Tests¹³ und die Radioaktivität durch „Liquid scintillation counting“ (Packard Tri-carb) bestimmt.

Die in Carnoy fixierten Leberstückchen wurden in Paraffin eingebettet, auf 5 μ Dicke geschnitten und Autoradiographien mit flüssiger Ilford L4-Emulsion hergestellt. Die Schnitte wurden für 3–5 Tage belichtet und nach Entwickeln mit Hämotoxylin-Eosin gefärbt.

Nach Enteiweißen mit Pikrinsäure wurde in dem Perfusat die gesamte und nicht flüchtige (nach Eintrocknen bei Zimmertemperatur) Radioaktivität, Glucose¹⁴, Harnstoff¹⁵ und Aminosäuren¹⁶ bestimmt. Glucoseverwertung, Harnstoffbildung und Aminosäurespiegel stellen Indikatoren für die Funktionstüchtigkeit der Leber dar^{3, 4}.

Ergebnisse und Diskussion

Tab. 1 enthält Werte für die spezifische Aktivität der DNS nach Perfusion zu verschiedenen Zeiten nach partieller Hepatektomie. Es ist ersichtlich, daß in der normalen Leber während der Perfusion genau so wie im intakten Tier nur wenig Thymidin in die DNS eingebaut wird. Von 18 Stdn. an nach partieller Hepatektomie steigt der Einbau in der Perfusion jedoch sehr rasch an und erreicht ein Maximum zwischen 24 bis 48 Stdn. nach partieller Hepatektomie. Ein quantitativer Vergleich ist jedoch schwierig, da noch keine Werte für die spezifische Radioaktivität und Konzentration der Vorstufen der DNS vorliegen. Solche Bestimmungen sind jedoch derzeit im Gange.

Zeit nach partieller Hepatektomie [Stdn.]	Zahl der Tiere	Initiale Periode		Zweite Periode	
		DNS		DNS	
		Spezifische Aktivität [dpm/ μ g]	Gesamtaktivität [dpm · 10 ⁻⁶]	Spezifische Aktivität [dpm/ μ g]	Gesamtaktivität [dpm · 10 ⁻⁶]
Kontrolle	4	65	0,71	100,8	1,23
18	4	236	0,91	940	3,54
24	4	1450	6,15	3220	14,5
36	2	1750	8,75	3180	15,7
48	3	2510	12,8	4850	26,0
60	2	1370	8,10	2540	12,3
72	3	885	5,15	2200	12,2
96	1	870	5,80	1620	10,7

Tab. 1. Spezifische und Gesamtradioaktivität der DNS nach Perfusion der regenerierenden Leber mit ³H-Thymidin (zweimal 50 μ C [1,11 · 10⁸ dpm] im Abstand von 3 Stunden).

¹¹ G. B. GERBER, J. appl. Physiology, im Druck.

¹² W. C. SCHNEIDER, J. biol. Chemistry 161, 293 [1945].

¹³ K. BURTON, Biochem. J. 62, 315 [1956].

¹⁴ N. NELSON, J. biol. Chemistry 153, 375 [1944].

¹⁵ J. M. LEVINE, R. LEON u. F. STEIGMANN, Clin. Chem. [New York] 7, 488 [1961].

¹⁶ H. ROSEN, Arch. Biochemistry 67, 10 [1957].

Der Einbau von Thymidin in die DNS erfolgt nicht nur während der initialen Periode der Perfusion, sondern auch, wie Tab. 1 zeigt, während des zweiten 3-Stdn.-Intervalls. Fällt diese Zeit in eine Periode rascher Zunahme der DNS synthetisierenden Aktivität, wie z. B. von 21 bis 24 Stdn. im Vergleich zu 18 bis 21 Stdn. nach partieller Hepatektomie, so findet sich oft eine Zunahme der DNS-Synthese auch in der perfundierten Leber. In anderen Worten, nicht nur die DNS-Synthese selbst bleibt während der Perfusion intakt, sondern auch die Vorgänge, die zur DNS-Synthese führen und sie induzieren.

Die Anzahl markierter Zellkerne ist gering (370 pro 10^5 Kerne) in normaler Leber, erreicht ein Maximum nach 24–48 Stdn. ($13\,300$ pro 10^5) und fällt dann wieder ab. Ein quantitativer Vergleich mit

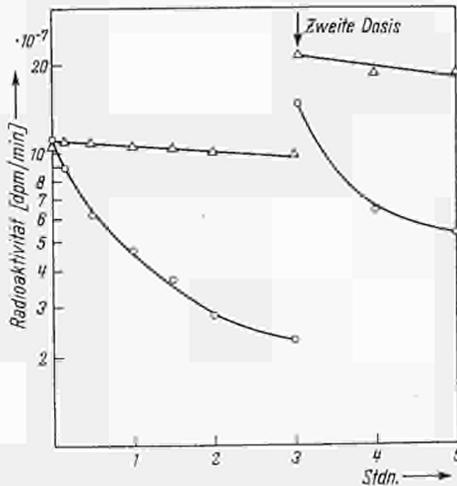


Abb. 1. Gesamte und nichtflüchtige Radioaktivität während der Perfusion einer isolierten Rattenleber nach Zusatz von ^3H -Thymidin ($50\ \mu\text{C}$ bei Beginn der Perfusion, $50\ \mu\text{C}$ nach 3 Stunden). Es handelte sich um eine 24 Stdn. vor der Perfusion partiell (60%) hepatektomierte Leber von 4,2 g Gewicht. Ein Leberlappen (0,43 g) wurde nach 3 Stdn. entfernt. Das Volumen des Perfusats betrug 45 Milliliter.

den Verhältnissen im intakten Tier erscheint aus den erwähnten Gründen auch hier unsicher.

Die gesamte Radioaktivität im Perfusat nimmt nur wenig ab (Abb. 1), dagegen fällt die nicht flüchtige Radioaktivität unter gleichzeitiger Bildung flüchtiger radioaktiver Verbindungen (Tritiumwasser) rasch ab. Es ist daher anzunehmen, daß schon verhältnismäßig kurze Zeit (60 Min.) nach der Gabe radioaktiven Thymidins nur noch wenig davon für die DNS-Synthese zur Verfügung steht. Dies stimmt mit den Beobachtungen NYGAARDS¹⁸ überein, der im intakten Tier ebenfalls 1 Stde. nach Injektion von ^3H -Thymidin keine nennenswerte Menge Radioaktivität in der Thymidinfraction nachweisen konnte.

Die Verteilung der Radioaktivität in der nichtflüchtigen Fraktion des Blutes ist noch nicht bekannt. Vorläufige Untersuchungen zeigen, daß ein Teil davon in Form von β -Aminoisobuttersäure vorliegt und daß die Radioaktivität in dieser Fraktion während der Perfusion zunächst zu- und dann wieder abnimmt. Von der gesamten als Thymidin zugegebenen Radioaktivität werden etwa 0,7% in die normale Leber und bis 13% in die Leber nach partieller Hepatektomie eingebaut. In der säurelöslichen Fraktion finden sich zwischen 2 und 5%, davon stellen etwa 0,3–1% nichtflüchtige radioaktive Bestandteile dar.

Weitere Untersuchungen, z. T. unter Verwendung ^{14}C -markierten Thymidins und anderer Nucleotide, sollen klären wie groß „Pools“ und Umsatz der Vorstufen der DNS-Synthese sind, insbesondere wieviel von dem *de novo* synthetisierten Thymidin tatsächlich für die DNS-Synthese verwandt wird und wieviel davon abgebaut wird. Immerhin zeigen die gegenwärtigen Ergebnisse, daß die isolierte perfundierte Rattenleber in der Lage ist DNS zu bilden und daß dieses System für die Untersuchung verschiedener Aspekte der DNS-Synthese brauchbar ist.

Mme LAMBIET-COLLIER danken wir für ihre Hilfe bei der Herstellung der Autoradiographien.

¹⁷ A. A. NOVIKOFF u. V. R. POTTER, J. biol. Chemistry **173**, 223 [1948].

¹⁸ O. F. NYGAARD u. R. L. POTTER, Rad. Res. **10**, 462 [1959].

CDNA00160DEC