

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. W. BÜNGELER)

Zur Biologie induzierter Wachstumsvorgänge in der Leber in vivo und im Explantat*

Von
H. WRBA, H. RABES und W. ZINTL

(Eingegangen am 17. März 1962)

Die Parabiose eines normalen Versuchstieres mit einem Tier, dem Teile der Leber entfernt wurden, führt zu Zellteilungen und Volumenvermehrung in der Leber des unbehandelten Parabionten (BUCHER, SCOTT und AUB 1950, WENNEKER und SUSSMAN 1951). Diesem Vorgang liegt offenbar ein Regenerationsfaktor zugrunde, der im Serum kreist (FRIEDRICH-FREKSA und ZAKI 1954), organ-spezifisch und nicht artspezifisch ist (WRBA, RABES, RIPOLL-GOMEZ und RANZ 1962). Durch Vereinigung gesunder Ratten mit hepatektomierten Tieren und Organexplantationen haben wir eine weitere Aufklärung der Biologie dieser Wachstumsvorgänge zu erreichen versucht.

Material und Methode

Zum Nachweis der stoffwechselsteigernden Wirkung in der Leber bestimmten wir die Größe der Aufnahme an radioaktivem Phosphat durch das nach der Rollerröhrchen-Methode explantierte Organ aus einem flüssigen Nährmedium, bestehend aus 10% Hühnchenembryonalextrakt, 20% Kälberserum, 70% Hankslösung und einem Zusatz von $0,3 \mu\text{C}$ radioaktiven Phosphaten pro Milliliter Medium (WRBA und RABES 1962). Die Größe der Phosphatinkorporation ist der Intensität der Phosphorylierungsprozesse im Explantat proportional und experimentell hemmbar (WRBA 1960). Das aufgenommene anorganische Phosphat wird zum großen Teil organisch gebunden und findet sich bei Säureextraktion im hochmolekularen Rückstand wieder.

Es wurde die Leber embryonaler Ratten, normaler erwachsener Ratten und von Ratten nach Zweidrittel-Resektion unter gleichen Bedingungen *in vitro* angesetzt. Beim direkten Vergleich der Stoffwechselleistung normaler Lebern und von Restlebern nach Teilresektion erfolgte die Gewinnung der regenerierenden Restlebern von 6—192 Std nach der Ausführung der Teilhepatektomie.

In anderen Versuchsreihen wurde die Leber von drei Gruppen parabiotisch vereinigter Ratten hinsichtlich ihrer Stoffwechselaktivität *in vitro* untersucht. Dabei wurden Leberteile von normalen, in Parabiose vereinigten Ratten 6 Tage nach der Parabioseoperation entnommen und explantiert. Diese Versuchsreihe sollte den Kontrollwert liefern. Damit verglichen wurde die Leber von parabiotisch vereinigten Tieren, bei welchen die Leber des Partnertieres 4 Tage nach der operativen Vereinigung zu zwei Dritteln reseziert worden war. Sowohl das Restorgan des hepatektomierten als auch die Leber des nicht hepatektomierten Parabionten wurden kultiviert. In diesen Fällen wurden die Lebern 48 Std nach der Teilhepatektomie, entsprechend 6 Tagen nach der Parabioseoperation, entnommen.

Die Explantate wurden nach einer Kulturdauer von 24 Std aus der Nährlösung genommen und in der üblichen Weise gewaschen und gemessen (WRBA und RABES 1962).

* Die Arbeit wurde mit Unterstützung der deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Ergebnisse und Besprechung

Entsprechend früheren Befunden (WRBA und KALB 1959) zeigt sich, daß die Leber embryonaler Tiere im Gegensatz zu erwachsener Leber eine sehr hohe Wachstumsneigung besitzt. Überraschend ist das Ergebnis, daß explantierte regenerierende Leber (48 Std nach Teilhepatektomie) Phosphat in der gleichen Größenordnung aufnimmt wie die embryonale Leber (Tabelle 1). Bei dieser

Tabelle 1. *Vergleich der Aufnahme an radioaktivem Phosphat durch embryonale, erwachsene und regenerierende Rattenleber (48 Std nach partieller Hepatektomie) in vitro.*

Die Zahlen geben die gemessenen Impulse pro Minute an. Mittelwerte aus der Messung von je 18 Explantaten.

Rattenleber	Versuch								Mittlere Abweichung gegen A
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
A Erwachsen	295	280	172	270	368	328	283	264	—
B Embryonal	855	692	554	458	811	634	575	680	+ 138 %
C Regenerierend	762	592	639	620	682	710	585	584	+ 134 %

Versuchsanordnung liegt die durchschnittliche Impulszahl für die Phosphataufnahme bei regenerierender und embryonaler Leber etwa gleich. Normale erwachsene Leber nimmt dagegen unter gleichen Bedingungen um 57% weniger an aktiver Substanz auf. Daraus ist abzuleiten, daß durch die Teilhepatektomie der Leber ein Wachstumsvorgang induziert wird, der auch nach Explantation nachweisbar bleibt und vom Milieu und humoralen Regulationen nicht abhängig ist. Dieser Befund ist bemerkenswert, weil damit eine direkte Wirkung des

Tabelle 2. *Aufnahme von radioaktivem Phosphat durch regenerierende Rattenleber in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Teilhepatektomie, zum Vergleich normale erwachsene Rattenleber.*

Die Zahlen geben die gemessenen Impulse pro Minute an.

	Entnahme aus dem Versuchstier in Stunden nach Teilhepatektomie					
	6	24	48	72	96	192
I. Normale erwachsene Rattenleber	521	503	530	535	533	534
II. Regenerierende Rattenleber . . .	356	678	970	878	589	644
Differenz von II. gegenüber I. (%) .	-32	+35	+83	+64	+10	+20

somatotropen Hormons unwahrscheinlich wird. Auch die Ergebnisse von HEMINGWAY und CATER (1958) in vivo lassen allenfalls einen Synergismus des „Regenerationsfaktors“ der Leber mit dem somatotropen Hormon der Hypophyse möglich erscheinen.

Bei der Untersuchung der Abhängigkeit der gesteigerten Stoffwechselleistung vom Zeitpunkt der Teilhepatektomie fällt auf, daß der Höhepunkt des Unterschiedes in der Phosphataufnahme zwischen normaler und regenerierender Leber erst 48 Std nach Teilhepatektomie erreicht wird (Tabelle 2). Noch nach 72 Std beträgt die Stoffwechselsteigerung der regenerierenden Leber 64% gegenüber der normalen Leber, und erst mehrere Tage nach der Hepatektomie nähern sich die beiden Werte dem Ausgleich. Für die bereits 6 Std nach Teilresektion in der Kultur angesetzte Leber liegt der Wert, offenbar unter der Wirkung des akuten Traumas, sogar niedriger als für das normale Organ.

Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen aus anderen Versuchsanordnungen (BUCHER, SCOTT und AUB 1950, WRBA, RABES, RIPOLL-GOMEZ und RANZ 1962), liefert aber eine besonders klare Aussage dafür, daß das Maximum der Wachstumsstimulierung 48 Std nach der Teilentnahme der Leber erreicht ist.

Es konnte mit diesen Versuchen auch am unabhängigen Bezugssystem in vitro der anhaltend gesteigerte Wachstumsprozeß nach Teilhepatektomie nachgewiesen werden, doch es blieb die Frage offen, wieweit das humorale induzierte Wachstum einer normalen Leber bei Parabiose des Tieres mit einem teilhepatektomierten Partner determiniert und in vitro erhalten bleibt.

Der Vergleich von Parabionten mit normalen Lebern und Parabionten aus Pärchen, bei welchen eine Leber teilweise entfernt wurde, ergibt ebenfalls

eine Abstufung in der Intensität der energie liefernden Stoffwechselprozesse. In Übereinstimmung mit den geschilderten Verhältnissen bei der regenerierenden Leber (Tabelle 1) nimmt die Leber des teilhepatektomierten Parabionten radioaktives Phosphat in einem Umfang auf, der sich etwa mit der Phosphatinkorporation

Tabelle 3. Aufnahme an radioaktivem Phosphat in vitro durch Leberexplantate von normalen erwachsenen Ratten nach Parabiose mit teilhepatektomierten Ratten

Kontrollen: Leberexplantate von unbehandelten Parabioseratten. Impulsmittelwerte aus je 21 Explantaten. 4 Versuche.

	Leberexplantate von Ratten in parabiotischer Vereinigung		Kontrolle	Aktivitätsmehraufnahme von Ib gegenüber der Kontrolle
	teilhepatektomierte Ratte Ia	unbehandelte Ratte Ib		
I	502	363	225	+ 61 %
II	486	340	311	+ 9 %
III	697	390	299	+ 30 %
IV	474	441	227	+ 94 %

teilhepatektomierter Leber eines nicht in Parabiose lebenden Tieres deckt. Die Parabiose hat für sich also keinen wesentlichen Einfluß auf die Phosphataufnahme regenerierender Leber. In der Ratte, die mit einem teilhepatektomierten Tier in Parabiose lebte, ist die in vivo nachweisbare stimulierende Wachstumsneigung bei unserer Versuchsanordnung auch noch nach Explantation an der Leber vorhanden. Die an sich normale Leber dieses Parabionten zeigt nach 24stündiger Kultur wesentlich höhere Aktivitätswerte als die Leber von unbehandelten normalen Parabioseratten (Tabelle 3). Daraus ist abzuleiten, daß nicht nur der induzierte Wachstumsvorgang am operierten erwachsenen Organ nachweisbar bleibt, sondern daß auch die indirekte humorale Auslösung des Vorganges an der erwachsenen Leber zur Determinierung eines Prozesses an diesem Organ führt, der nach Explantation und Herauslösung des Gewebes aus seinem biologischen Regulationssystem erhalten bleibt.

Damit ist bewiesen, daß ganz unabhängig davon, ob der „Regenerationsfaktor“ im regenerierenden Organ oder in einer endokrinen Drüse oder in einem Reaktionssystem gebildet wird, sein dauernder Nachschub für die Aufrechterhaltung eines einmal induzierten Wachstumsvorganges nicht unbedingt notwendig ist.

Zusammenfassung

Das regenerative Wachstum der Leber nach Teilhepatektomie ist auch am explantierten Organ nachweisbar. 48 Std nach der Teilresektion der Leber

explantierte Organe von erwachsenen Ratten nehmen in der gleichen Größenordnung radioaktives Phosphat aus dem Nährmedium auf wie die explantierte Leber embryonaler Ratten und mehr als doppelt so viel wie die normale erwachsene Rattenleber. Daraus ergibt sich, daß für die Aufrechterhaltung dieses regenerativen Wachstums die kontinuierliche Ausschüttung eines endokrinen Faktors nicht Voraussetzung ist.

Die normale Leber von Ratten, die in Parabiose mit Tieren gehalten wurden, bei welchen ein Teil der Leber entfernt worden war, zeigen ebenfalls eine erhebliche Steigerung der Phosphorylierungsprozesse *in vitro*. Der in diesem Fall humorale induzierte Wachstumsvorgang eines normalen Organs bleibt auch nach Unterbrechung des Nachschubes der stimulierenden Substanz in vollem Umfang erhalten.

A comparison of induced growth of the liver *in vivo* and *in vitro*

Summary

The regeneration of the liver occurring after partial hepatectomy is also demonstrable in the explanted tissue. Forty-eight hours after the partial hepatectomy the explanted liver of adult rats takes up radioactive phosphate from the culture medium in the same range of magnitude as does the explanted liver of embryonal rats, but it takes up more than twice as much as the normal liver of adult rats. From this it is apparent, that for the maintenance of this regeneration a continuous secretion of an endocrine factor is not essential.

The normal livers of rats, which are maintained in parabiosis with animals from which a part of the liver has been resected, likewise show a considerable increase of the *in vitro* phosphorylation. The humorally-induced process of growth in the normal liver in this instance continues in full extent after interruption of the supply of the stimulating substance.

Literatur

- BUCHER, N. L. R., J. F. SCOTT and J. C. AUB: Regeneration of the liver in parabiotic rats. *Cancer Res.* **10**, 207 (1950).
- FRIEDRICH-FREKSA, H., u. F. G. ZAKI: Spezifische Mitoseauslösung in normaler Rattenleber durch Serum von partiell hepatektomierten Ratten. *Z. Naturforsch.* **9b**, 394—397 (1954).
- HEMINGWAY, J. T., and D. B. CATER: Effects of pituitary hormones and cortisone upon liver regeneration in the hypophysectomized rat. *Nature (Lond.)* **181**, 1065—1066 (1958).
- WENNEKER, A. S., and N. SUSSMAN: Regeneration of liver tissue following partial hepatectomy in parabiotic rats. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **76**, 683—686 (1951).
- WRBA, H.: Vitalitätsbestimmung durch Aufnahme und Umsatz markierter Verbindungen. *Z. Zellforsch.* **53**, 90—140 (1960).
- , u. H. W. KALB: Vergleich des Phosphatumsatzes embryonaler und adulter Organe *in vitro*. *Naturwissenschaften* **46**, 405 (1959).
- , u. H. RABES: Zur Methodik der quantitativen Bestimmung des Umsatzes an markierten Stoffen durch Organkulturen. *Exp. Cell. Res.* **26**, 62—69 (1962).
- , M. RIPOLL-GOMEZ u. H. RANZ: Die stoffwechselsteigernde Wirkung von Serum teilhepatektomierter Tiere auf Leberkulturen. *Exp. Cell. Res.* **26**, 70—77 (1962).