

# Untersuchungen über spezifische Einflüsse des Serums und Lebercytoplasmas auf den $[^3\text{H}]\text{TTP}$ -Einbau isolierter Leberzellkerne

Studies on the Specific Effects of Serum and Cytoplasm of the Liver on the  $[^3\text{H}]\text{TTP}$ -Incorporation of Isolated Liver Nuclei

R. Strasser und M. Volm

Deutsches Krebsforschungszentrum, Institut für Experimentelle Pathologie, Heidelberg

Z. Naturforsch. 33 c, 219–226 (1978); eingegangen am 5. September 1977/25. Januar 1978

Isolated Liver Nuclei, Partial Hepatectomy,  $[^3\text{H}]\text{TTP}$ -Incorporation, Serum, Cytoplasm

Previous authors have described that liver cytoplasm and serum from partially hepatectomized rats stimulate the DNA synthesis of isolated nuclei of liver cells. The aim of our investigation was to prove whether such stimulating effects are part of a specific regulation of growth. The sera and the cytoplasm supernatant (105 000  $\times g$ ) were isolated at several intervals after partial hepatectomy and laparotomy and were tested on isolated nuclei of liver cells from adult rats partially hepatectomized 20 hours before. The supernatants isolated at 8 and 16 hours after both partial hepatectomy and laparotomy have a significant stimulatory effect on the  $[^3\text{H}]\text{TTP}$ -uptake by nuclei.

The presence of serum (10%) causes a general elevation (75%) of the  $[^3\text{H}]\text{TTP}$ -uptake by isolated nuclei. The sera isolated 4 to 12 hours after operation from both partially hepatectomized and laparotomized rats have an additional stimulatory effect on the  $[^3\text{H}]\text{TTP}$ -uptake synthesis of nuclei. In no case did the sera and liver cytoplasm of partially hepatectomized rats have a significantly different and therefore "specific" effect on the nuclear DNA synthesis.

Additional experiments showed that frozen and thawed nuclei of liver cells respond only to the nutritive power but not to the stimulatory effects of the sera. Thus, thawed nuclei cannot be used for growth investigations.

In der Leber besteht – wie auch bei anderen Geweben – ein Gleichgewicht zwischen Zelluntergang und Zellneubildung. Selbst überdurchschnittliche Gewebeverluste – z.B. durch Teilhepatektomie – können durch eine reparative Regeneration aufgefangen werden. Auf Grund dieser Beobachtung wurde schon früh ein Regulationsmechanismus der Leberregeneration postuliert und nach Regulationsfaktoren gesucht [1, 2].

Da man die molekularen Angriffspunkte der wachstumsregulierenden Faktoren nicht kennt, wählte man Testsysteme auf verschiedenen Organisationsstufen der Leber. Neben *in vivo* Untersuchungen am Gesamtorgan wurden *in vitro* Experimente an Leberexplantaten und Leberzellkulturen [3–9] bzw. an isolierten Leberzellkernen durchgeführt [10–15]. Trotz zahlreicher Experimente ist aber der Regelmechanismus der Leberregeneration weitgehend ungeklärt geblieben. *In vivo* Untersuchungen mit Blutaustausch bzw. Versuche mit Leberzellen und Leberzellkernen nach Zusatz von Seren deuten zwar auf eine humorale Regulation

des Leberwachstums hin, cytoplasmatische Faktoren sind aber für die Regulierung des Leberwachstums nicht von vornherein auszuschließen [12, 13, 15].

Sowohl Lebercytoplasma als auch Seren teilhepatektomierter Ratten haben auf die DNS-Synthese isolierter Leberzellkerne eine stimulierende Wirkung [15]. In dieser Untersuchung sollte geklärt werden, ob die beschriebenen Einflüsse tatsächlich für die Leberregeneration relevant sind, oder ob die gefundenen Wirkungen auch durch Seren und Lebercytoplasma laparotomierter Ratten verursacht werden können.

## Material und Methode

### 1. Versuchstiere

Männliche Sprague-Dawley-Ratten (Fa. Mus-Rattus/Brunntal, München) wurden unter Standardbedingungen gehalten (Altromin®, Wasser ad libitum, 21 °C, 60% Luftfeuchtigkeit, 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus). 12 Stunden vor Versuchsbeginn wurde das Futter abgesetzt. Für die Gewinnung der Seren und Überstände, sowie der Leberzellkerne nach Teilhepatektomie wurden Tiere mit einem Gewicht von 200 g verwendet. Alle Versuchstiere wur-

Sonderdruckanforderungen an Professor Dr. M. Volm, Deutsches Krebsforschungszentrum, Institut für experimentelle Pathologie, Im Neuenheimer Feld 280, D-6900 Heidelberg 1.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

den streng zufällig verteilt. Die Teilhepatektomien (2/3) wurden nach dem von Higgins und Anderson [16] beschriebenen Verfahren durchgeführt. Als Kontrollen wurden laparotomierte und unbehandelte Ratten verwendet.

## 2. Substanzen

Zur Messung der DNS-Synthese wurde [ $^3\text{H}$ -Methyl]Thymidin-5-Triphosphat ([ $^3\text{H}$ ]TTP, Ammoniumsalz in 50-prozentiger Äthanollösung, Amersham Buchler, Braunschweig) mit einer spezifischen Aktivität von 30 mCi/mmol verwendet. Die unmarkierten 2'-Desoxyribonucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) lagen als Natriumsalze in wässrigen Lösungen vor (Fa. Boehringer, Mannheim). Als Energieträger wurde ATP (kristallines Dinatriumsalz) verwendet (Fa. Boehringer, Mannheim). Alle anderen Substanzen wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

## 3. Lösungen

Lösung I: 0,25 M Saccharose, 3 mM ( $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ), 0,025 M Tris-Puffer, pH=7,5 (eingestellt mit konzentrierter HCl).

Lösung II: 2,3 M Saccharose, 3 mM ( $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ), 0,025 M Tris-Puffer, pH=7,5 (eingestellt mit konzentrierter HCl).

Lösung III: 8 mM ( $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ), 8 mM KCl, 0,025 M Tris-Puffer, 0,235 M Saccharose, pH=8,0 (eingestellt mit konzentrierter HCl).

## 4. Testsubstanzen

### a. Serum

Das Blut wurde durch Herzpunktion entnommen. Nach Gerinnung (60 min bei 4 °C) wurden die Blutzellen sedimentiert (10 min, 4 °C, 1000  $\times g$ , Christ, UJ IV KS), anschließend das Serum abpipetiert und bis zum Beginn der Inkubationsversuche in Aliquots bei -100 °C eingefroren.

### b. Leberüberstand (105000 $\times g$ Überstand)

Nach Tötung der Tiere wurde die Leber *in situ* über die vena portae mit eiskalter, steriler Lösung III perfundiert. Anschließend wurde die Leber entnommen und das Bindegewebe abpräpariert. Das Leberparenchym wurde in Lösung III (Verhältnis 1:4) bei 1200 U/min homogenisiert (8 strokes, Elvehjem-Homogenisator, Braun, Melsungen). Das Homogenat wurde durch 3 Lagen sterile Mullgaze

filtriert und anschließend zentrifugiert (30 min, 36000  $\times g$ , 4 °C, Beckman JS 21, Rotor JA 20). Der so gewonnene Überstand wurde erneut zentrifugiert (90 min, 105000  $\times g$ , 4 °C, Beckman, Spinco, Rotor Ti 50), danach der Überstand unter Vermeidung einer Verunreinigung durch die flotierenden Lipide entnommen und in Aliquots bei -100 °C eingefroren.

## 5. Isolierung der Leberzellkerne

Für die Untersuchungen verwendeten wir regenerierende Leberzellkerne von erwachsenen Ratten, die 20 h zuvor teilhepatektomiert worden waren. Die Leberzellkerne wurden nach der von uns früher beschriebenen [15], modifizierten Methode nach Blobel und Potter [17] isoliert. Dabei wird die Leber *in situ* mit 20 ml steriler, eiskalter Lösung I über die vena portae perfundiert und unter sterilen Bedingungen entnommen. Nach Abpräparation des Bindegewebes wird das Leberparenchym mit Lösung I im Verhältnis 1:3 homogenisiert (1200 U/min, 8 strokes, Elvehjem-Homogenisator, Fa. Braun, Melsungen), das Homogenat durch 3 Lagen sterilen Mull filtriert und im Verhältnis 1:3 mit Lösung II gemischt. 20 ml der Mischung werden über 15 ml reine Lösung II geschichtet und zentrifugiert (60 min, 40000  $\times g$ , 4 °C, Beckman, Spinco, Rotor SW 27). Die in den Sedimenten enthaltenen Kerne werden darauf in Lösung III aufgenommen und auf die Kernzahl von  $10^7$  Kernen/ml eingestellt (Neubauer-Leukozyten-Zählkammer und Coulter-Counter). Anschließend wurden die Leberzellkerne sofort zur Inkubation verwendet oder zur Lagerung tiefgefroren.

## 6. Inkubation der Leberzellkerne und Bestimmung des Einbaues von [ $^3\text{H}$ ]TTP

Der [ $^3\text{H}$ ]TTP-Einbau wurde nach einem früher beschriebenen Verfahren bestimmt [15]. Pro Versuchsansatz wurden  $10^7$  Kerne (1 ml pro Kulturrohrchen) eingesetzt. Die Vorinkubation erfolgte bei 37 °C (30 min) mit Mercaptoäthanol (25  $\mu\text{M}$ ) zum Schutze der SH-Enzyme. Anschließend wurden alle 4 Desoxyribonucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 60  $\mu\text{M}$ ), ATP (2 mM) und [ $^3\text{H}$ ]TTP (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ) hinzugegeben. Gleichzeitig wurden die jeweiligen Testsubstanzen zugesetzt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit (60 min, wenn nicht anders angegeben) wurden aus jedem Versuchsansatz 100  $\mu\text{l}$  entnommen und auf Papierfilter

(Whatmann, Grade 3 mm, Size 2,3 cm) gegeben. Diese wurden unter warmem Luftstrom getrocknet (1 min) und anschließend zweimal während je 30 min in 5% Trichloressigsäure (TCA) bei 4 °C gewaschen (ca. 50 Filter in 500 ml TCA), um das nicht eingebaute [ $^3\text{H}$ ]TTP zu extrahieren. Die weitere Extraktion erfolgte über 20 min in einem Äthanol/Äther-Gemisch (1:1) und schließlich während 15 min in Diäthyläther (98%). Die getrockneten Filter wurden mit 5 ml Toluol-Scintillationslösung (80 ml Scintol 3, Fa. Koch-Light-Lab., auf 2,5 l Toluol) direkt in die Zählfläschchen gegeben und das eingebaute [ $^3\text{H}$ ]TTP im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Mark II, Searle Nuclear Chicago) gemessen.

### 7. Lagerung der Leberzellkerne

Die Zellkernsuspension wurde mit 20% Glycerin unter ständigem Rühren versetzt. Nach Diffusion des Glycerins während 30 min bei 4 °C wurde das Gemisch in Aliquots von 1 ml mit einer Abkühlung von 1 °C pro min auf -100 °C eingefroren und bei dieser Temperatur gelagert. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen waren die Kerne zuvor zwischen 6 und 9 Tagen gelagert.

Vor den Inkubationsversuchen wurden die Kerne schnell (8 min) aufgetaut und nach zweimaligem Waschen mit je 5 ml Lösung III (Zentrifugation 10 min, 500 × g, 4 °C, Crist UJ IV KS) auf 10<sup>7</sup> Kerne pro ml eingestellt. Unmittelbar vor den Inkubationsversuchen wurden äquivalente Mengen aus den verschiedenen Kernisolierungen gepoolt.

### 8. Vergleich des [ $^3\text{H}$ ]TTP-Einbaues in frisch isolierte und in tiefgefroren gelagerte, regenerierende Leberzellkerne

Frisch isolierte Leberzellkerne weisen von Versuch zu Versuch verschiedene [ $^3\text{H}$ ]TTP-Einbauraten auf und erschweren damit ein Gesamturteil über mehrere Versuche. Bei verschiedenen Experimenten wurde deshalb eine einheitliche Kernpopulation eingesetzt. Dazu wurden von 49 teilhepatektomierten Ratten regenerierende Leberzellkerne gewonnen. Aus technischen Gründen wurden die Kerne in 7 Chargen getrennt isoliert und in kleinen, äquivalenten Mengen eingefroren. Für jeden Inkubationsversuch wurden dann gleich große Mengen Kernsuspension aus jeder Charge aufgetaut und gepoolt. Dadurch erhielten wir identische Kernpools für jeden Versuch. In Abb. 1 ist der Einbau von [ $^3\text{H}$ ]TTP in

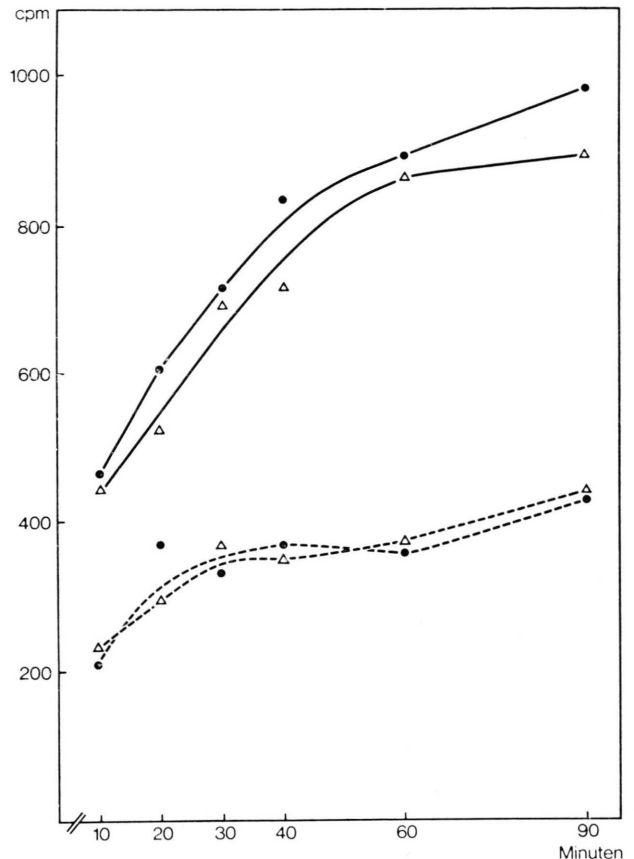


Abb. 1. Kinetik des [ $^3\text{H}$ ]TTP-Einbaues (cpm/10<sup>6</sup> Kerne) frisch isolierter (●) und aufgetauter (Δ) Zellkerne (Kerne aus Lebern 20 h nach Teilhepatektomie) bei Inkubation mit 10% Serum unbehandelter Tiere (—) und bei Inkubation ohne Serum (---). Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus 5 Meßwerten (=Kulturröhrchen) dar.

aufgetaute und frische Kerne ohne und nach Zusatz von Serum (100 μl/ml) ermittelt und miteinander verglichen worden. Über den untersuchten Zeitraum von 90 min ist der Einbau von [ $^3\text{H}$ ]TTP in frisch isolierte und aufgetaute Kerne bei Abwesenheit von Serum nahezu identisch. Der [ $^3\text{H}$ ]TTP-Einbau ist nach Zusatz von Serum wesentlich erhöht. Nach Zugabe von Serum weisen die Kerne nach Lagerung einen unwesentlich geringeren [ $^3\text{H}$ ]TTP-Einbau auf als frisch isolierte Leberzellkerne. Dieser Versuch zeigt, daß Einbaustudien auch mit zuvor eingefrorenen Kernen durchführbar sind.

### 9. Statistische Methoden

#### a. Datensatz

Als Einflußgrößen (Variable  $x$ ) wurden die Zeitpunkte nach Operation, zu denen die Testsubstan-

zen gewonnen worden waren, und als Antwortgröße (Variable  $y$ ) die Einbauwerte der Leberzellkerne gewählt. Zu jedem Zeitpunkt wurde jeweils die gleiche Anzahl neuer Tiere verwendet (streng zufällige Zuteilung). Die Tiere eines jeden Zeitpunktes wurden durchnummeriert und Tiere gleicher Nummer (= Tiergruppe) in je einem Inkubationsversuch getestet. Der einzelne Inkubationsversuch ist somit als Stichprobe aufzufassen.

#### b. Statistische Analyse \*

Der zeitliche Verlauf, d. h. die Abhängigkeit des radioaktiven Einbaues (cpm-Werte) vom Zeitpunkt der Operation wurde durch ein Polynom  $n$ -ten Grades geschätzt. Der Grad des Polynoms wurde so gewählt, daß die Matrix zur Schätzung der Polynomkoeffizienten  $b_i$  noch invertierbar war. Das Polynom für einen Versuch lautet:

$$y = \sum_{i=0}^n b_i t^i.$$

$y$ , geschätzter cpm-Wert;  $t$ , Zeit nach Operation;  $n$ , Grad des Polynoms.

Zu jeder Beobachtung  $y$  gehören als Einflußgröße die  $n$ -Potenzen des betreffenden Zeitpunktes  $t_i$ , also:

$$y_{ij} = f(t_i^1 + t_i^2 + \dots + t_i^n).$$

Der Index  $j$  kennzeichnet die laufende Nummer der Beobachtung zum Zeitpunkt  $i$ . Die Parameter  $b_i$  wurden geschätzt aus  $b_i = (T'T)^{-1} T'y$ , wobei  $T'T$  eine positiv definite, symmetrische Matrix von der Ordnung  $n$  ist. Die Erwartungswerte der Standardabweichungen wurden berechnet nach Kerridge [18]):

$$\sigma^2 \left( 1 + \frac{1}{N} \right) \left( \frac{N-2}{N-n-2} \right),$$

wobei  $N$  die Gesamtzahl der Beobachtungen in einem Versuch und  $n$  die Anzahl der Regressoren, d. h. hier der Grad des Polynoms ist.

Aus den Wiederholungen eines Versuches wurde die Polynomialregression errechnet als Regression innerhalb der einzelnen Versuche, d. h. durch Addition der Matrizen  $T'T$ .

\* Herrn Prof. Dr. E. Weber, Institut für Dokumentation, Information und Statistik am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg danken wir auch an dieser Stelle für die umfassende statistische Beratung.

## Ergebnisse

### 1. Untersuchungen an frisch isolierten Leberzellkernen

Die Wirkung der Leberüberstände bzw. der Seren von Ratten auf die DNS-Synthese isolierter Leberzellkerne wurde durch den [ $^3\text{H}$ ]Thymidintriphosphat (TTP)-Einbau der Kerne ermittelt. Es wurden Leberüberstände und Seren verwendet, die zu definierten Zeitpunkten (4, 8, 12, 16, 20, 24 h) nach Teilhepatektomie bzw. Laparotomie gewonnen worden waren (pro Zeitpunkt 6 teilhepatektomierte und 6 laparotomierte Tiere,  $n=72$  Ratten). Als Kontrollen dienten Überstände und Seren von 6 weiteren, jedoch unbehandelten Ratten. Die Tiere je eines Zeitpunktes wurden von 1 bis 12 durchnummeriert und die Tiere gleicher Nummer als „Tiergruppe“ zusammengefaßt. Die Seren bzw. Leberüberstände einer „Tiergruppe“ wurden in je einem Experiment untersucht (geschichtete Versuche). Jeder Leberüberstand und jedes Serum wurde in 6 voneinander unabhängigen Kulturröhrchen getestet.

#### a. Einfluß der Leberüberstände

In den hier vorliegenden Untersuchungen wurden Leberüberstände in einer Konzentration von 2% (20  $\mu\text{l/ml}$ ) überprüft. Überstände in dieser Konzentration ermöglichen den Nachweis sowohl von hemmenden als auch von stimulierenden Einflüssen.

Die Überstände teilhepatektomierter Ratten (Abb. 2, oben) bewirken bei den Zeitpunkten 8 und 16 h nach Operation eine Steigerung des [ $^3\text{H}$ ]TTP-Einbaues der Kerne gegenüber den restlichen Überständen. Diese Wirkung ist jedoch auch bei den entsprechenden Überständen laparotomierter Tiere nachweisbar (Abb. 2, unten). Diese Steigerungen sind statistisch signifikant (Wilcoxon,  $\alpha=5\%$ , zweiseitig, berechnete Kurven). Beide [ $^3\text{H}$ ]TTP-Einbaukurven zeigen jedoch das gleiche zeitliche Verhalten und ihr Verlauf ist voneinander nicht signifikant verschieden. Daraus folgt, daß zu keinem der überprüften Zeitpunkte nach Operation ein signifikanter Unterschied zwischen dem Einfluß der Überstände von teilhepatektomierten und laparotomierten Tieren nachzuweisen ist.

#### b. Einfluß der Seren

Die Zugabe von Serum (10%) verursacht eine allgemeine Erhöhung des [ $^3\text{H}$ ]TTP-Einbaues der Leberzellkerne um ca. 75%. Die Seren operierter Tiere bewirken eine zusätzliche Steigerung gegen-



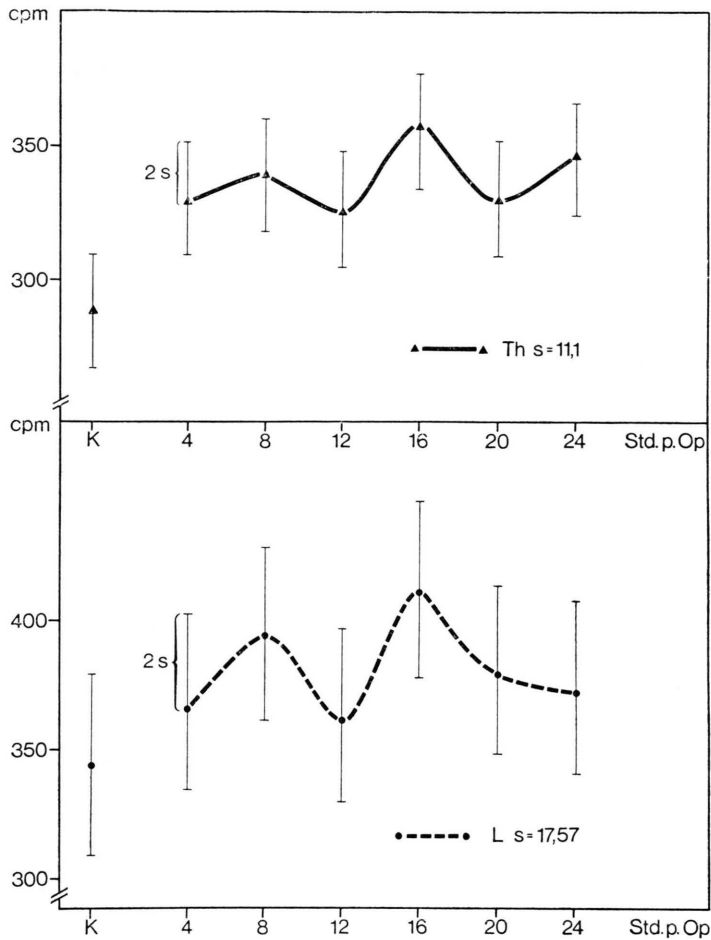


Abb. 2. Einfluß der Leberüberstände (2%) teilhepatektomierter (oben) und laparotomierter (unten) Ratten auf den  $[^3\text{H}]\text{TTP}$ -Einbau (Inkubation 60 min) frisch isolierter Zellkerne (Kerne aus Lebern 20 h nach Teilhepatektomie; cpm/ $10^6$  Kerne). Die Überstände waren zu den Zeitpunkten 4 bis 24 h nach Operation gewonnen worden. Als Kontrollen (K) wurden die Überstände unbehandelter Tiere verwendet. Dargestellt sind die mittleren Verlaufskurven aus je 6 Inkubationsversuchen, in denen jeweils 7 verschiedene Überstände getestet wurden. Jeder Überstand wurde in je 6 Kulturröhrchen untersucht. Jeder Punkt der Verlaufskurve repräsentiert den berechneten Wert für je 6 Überstände. Die Standardabweichung  $s$  wurde für alle Versuche mit Überstand teilhepatektomierter bzw. laparotomierter Tiere berechnet und die 2s-Bereiche eingezeichnet.

über Seren unbehandelter Tiere (Abb. 3). Aus den berechneten Kurven ist ersichtlich, daß bis zu 12 h nach Operation ein leichter Anstieg des  $[^3\text{H}]\text{TTP}$ -Einbaues der Kerne durch die Seren operierter Tiere bewirkt wird. Dieser Anstieg läßt sich jedoch statistisch nicht sichern. Der  $[^3\text{H}]\text{TTP}$ -Einbau der Kerne bei Inkubation mit Serum laparotomierter Tiere liegt höher als bei Inkubation mit Serum teilhepatektomierter Tiere. Es läßt sich jedoch über den ganzen überprüften Zeitraum keine Überschneidungsfreiheit der 2-S-Bereiche der mittleren Verlaufskurven erzielen. Der zeitliche Verlauf beider Kurven ist damit nicht signifikant voneinander verschieden. Daraus folgt, daß zu keinem der überprüften Zeitpunkte nach Operation ein signifikanter Unterschied zwischen dem Einfluß der Seren von teilhepatektomierten und laparotomierten Ratten nachzuweisen ist.

## 2. Untersuchungen an aufgetauten Leberzellkernen

In den folgenden Experimenten wurde die Wirkung der Seren eines großen Tierkollektives auf den  $[^3\text{H}]\text{TTP}$ -Einbau eines einheitlichen Kernpools untersucht, um dadurch eindeutig vergleichbare und repräsentative Ergebnisse zu erhalten. Weiterhin wurde untersucht ob deutlichere Effekte sichtbar werden, wenn die Seren nicht einzeln, sondern 'gepoolt' eingesetzt werden.

An vier aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Seren von je 4 teilhepatektomierten und 4 laparotomierten Tieren pro Zeitpunkt und Charge gewonnen (Chargen A bis D), so daß schließlich die Seren von jeweils 16 gleichartig behandelten Tieren pro Zeitpunkt vorlagen. Die Seren stammen von 7 Zeitpunkten (2,5 min, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h nach Operation). Als Kontrollen wurden wieder Seren von unbehandelten Tieren verwendet.

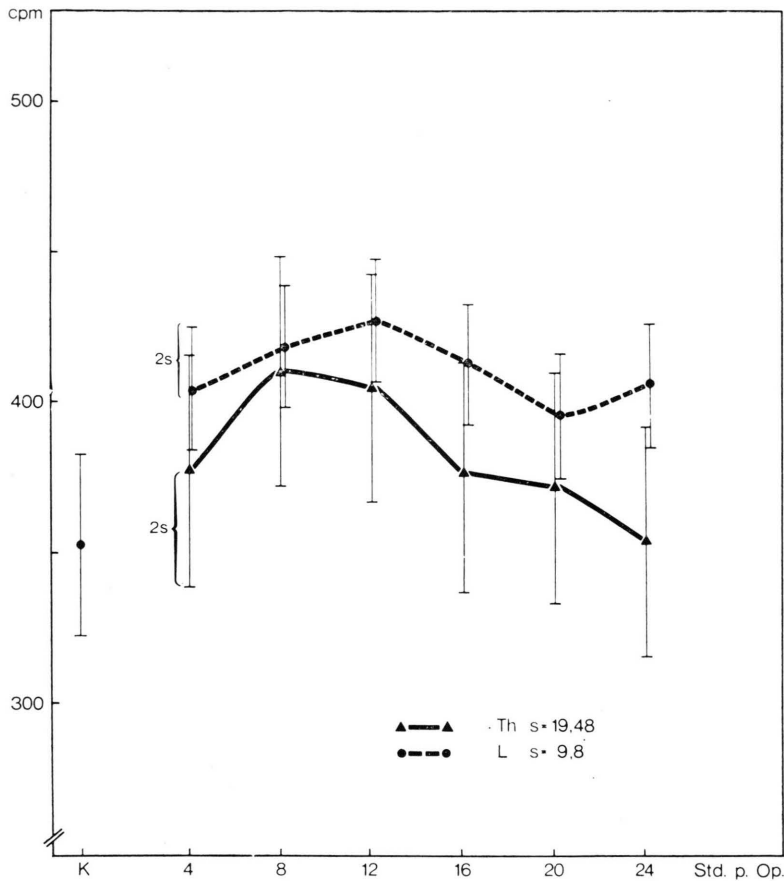


Abb. 3. Wirkung der Seren (10%) teilhepatektomierter ( $\Delta$ — $\Delta$ ) und laparotomierter ( $\bullet$ — $\bullet$ ) Ratten auf den  $[^3\text{H}]$ TTP-Einbau (Inkubation 60 min) frisch isolierter Zellkerne (Kerne aus Lebern 20 h nach Teilhepatektomie; cpm/ $10^6$  Kerne). Die Seren waren zu den Zeitpunkten 4 bis 24 h nach Operation gewonnen worden. Als Kontrollen (K) wurden die Seren unbehandelter Ratten verwendet. Dargestellt sind die mittleren Verlaufskurven aus je 6 Inkubationsversuchen, in denen jeweils 7 verschiedene Seren getestet wurden. Jedes Serum wurde in 6 Kulturröhrchen untersucht. Jeder Punkt der Verlaufskurve stellt den berechneten Wert für 6 Seren dar. Für alle Versuche mit Serum teilhepatektomierter bzw. laparotomierter Tiere wurde die Standardabweichung  $s$  berechnet und die 2s-Bereiche eingezeichnet.

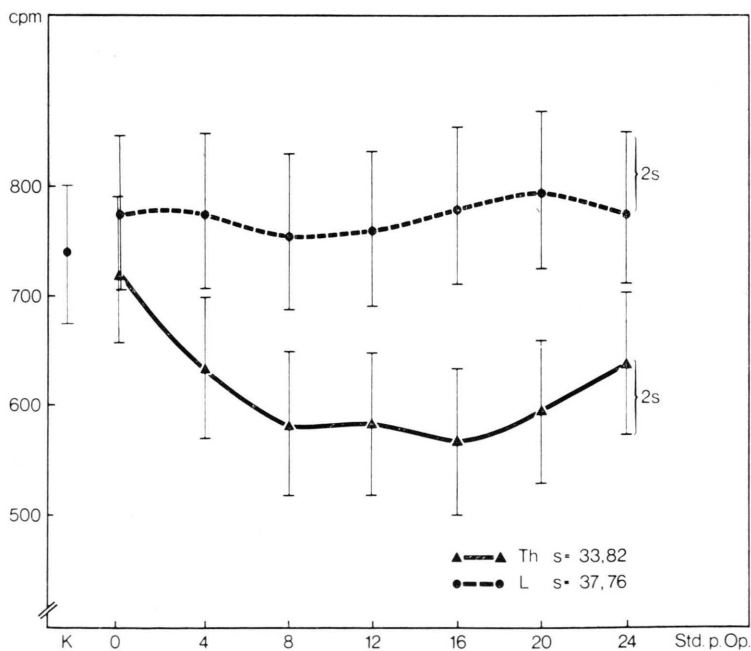


Abb. 4.  $[^3\text{H}]$ TTP-Einbau (cpm/ $10^6$  Kerne) aufgetauter Zellkerne aus Lebern 20 h nach Teilhepatektomie bei Inkubation (60 min) mit Seren teilhepatektomierter ( $\Delta$ — $\Delta$ ) bzw. laparotomierter ( $\bullet$ — $\bullet$ ) Ratten. Die Seren waren zu den Zeitpunkten 2,5 min bis 24 h nach Operation gewonnen worden (Abszisse). Als Kontrollen (K) wurden die Seren unbehandelter Tiere verwendet. Dargestellt sind die mittleren Verlaufskurven aus 4 geschichteten Inkubationsversuchen. Jeder Punkt stellt den berechneten Wert für 16 Seren dar, wobei jedes Serum in 2 Kulturröhrchen getestet wurde. Für alle Versuche mit Serum teilhepatektomierter bzw. laparotomierter Tiere wurden die Standardabweichungen berechnet und die 2s-Bereiche eingezeichnet.

### a. Wirkung der Seren (Einzelseren)

Aufgetaute Kerne, welche mit Serum laparotomierter Tiere inkubiert wurden, bauen 4 bis 24 h nach Operation signifikant mehr [ $^3\text{H}$ ]TTP ein als Kerne mit Serum teilhepatektomierter Tiere (Abb. 4). Lediglich Seren, die 2,5 min nach der Operation gewonnen wurden, zeigen einen gleich hohen radioaktiven Einbau. Zwischen der Wirkung der Seren unbehandelter und laparotomierter Tiere besteht kein Unterschied.

### b. Wirkung äquivalent gepoolter Seren

Unmittelbar vor den Inkubationsversuchen wurden bei 0 °C (Eiswasserbad) für jeden Zeitpunkt ein Pool aus 16 Seren teilhepatektomierter und ein Pool aus den 16 Seren laparotomierter Tiere hergestellt. Als Kontrolle diente ein Pool aus den 16 Seren unbehandelter Ratten. Jedes gepoolte Serum wurde in 8 voneinander unabhängigen Versuchsansätzen getestet. Auch in diesen Versuchen ist die [ $^3\text{H}$ ]TTP-Einbaurate der Kerne mit Serum teilhepatektomierter Tiere zu den Zeitpunkten 4 bis 24 h nach Operation durchschnittlich geringer als mit entsprechenden Seren laparotomierter Tiere. Eine stimulierende Wirkung der Seren operierter Tiere – entsprechend den Versuchen mit frisch hergestellten Kernen – läßt sich auch hier nicht nachweisen.

## Diskussion

Auf Grund zahlreicher Experimente über den Regulationsmechanismus des Leberwachstums gelangte man zu der Überzeugung, daß die wirksamen Faktoren im Blut vorhanden sein müssen [19, 20]. Auch das Cytoplasma der Leber zeigt einen Einfluß auf die Proliferation des Lebergewebes [12, 13, 15, 23–27]. Dabei konnte bisher nicht entschieden werden, ob die wachstumsregulierende Wirkung des Serums bzw. Leberüberstandes auf dem Verlust eines Inhibitors, auf dem Auftreten einer stimulierenden Substanz oder auf dem Zusammenspiel eines Inhibitors mit einem „Anti-Inhibitor“ [28] bzw. „Stimulator“ [29, 30] beruht.

Einzelne Autoren versuchten Hemmsubstanzen [24, 25, 31–33] oder stimulierende Substanzen [34–37], oder auch beides [28–30, 38–40], zu isolieren. Ein eindeutiger Nachweis einer Organspezifität dieser Faktoren gelang jedoch nur in

einem einzigen Fall [33]. Der Beweis einer für die Regulation der Leberproliferation relevanten „spezifischen“ Wirkung dieser Faktoren wurde bisher nicht erbracht.

Auch an isolierten Zellkernen aus regenerierenden der Leber konnte in früheren Untersuchungen eine DNS-Synthese stimulierende Wirkung des Serums bzw. des Leberüberstandes teilhepatektomierter Tiere festgestellt werden [14, 15].

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die nachgewiesenen Wirkungen nur durch Seren bzw. Leberüberstände teilhepatektomierter Tiere verursacht werden. Deshalb wurde der Einfluß von Seren bzw. Leberüberständen, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Teilhepatektomie bzw. Laparotomie gewonnen wurden, vergleichend auf den [ $^3\text{H}$ ]TTP-Einbau isolierter Leberzellkerne untersucht. Als Kontrollen dienten die Überstände bzw. Seren unbehandelter Tiere und außerdem Versuchsansätze ohne Testsubstanz. Die Untersuchungen wurden im stimulierten System, d. h. an regenerierenden Leberzellkernen erwachsener Tiere durchgeführt, da es in einem solchen System leichter ist, inhibitorische oder stimulierende Wirkungen aufzudecken [20, 41].

Lynch und Mitarbeiter [11] zeigten, daß die *in vivo* begonnene DNS-Synthese *in vitro* fortsetzbar ist. Probst und Mitarbeiter [42] wie auch Volm und Merz [15] fanden jedoch erhebliche Variationen der DNS-Syntheseaktivität isolierter Leberzellkerne durch Modifikationen im Testsystem, so daß nur Versuche innerhalb eines Testsystems exakt vergleichbar sind. Zusätzlich konnte festgestellt werden, daß in gleicher Weise – aber in getrennten Arbeitsgängen – isolierte Leberzellkerne verschiedener Ratten, die den gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzt worden waren, deutliche Unterschiede in ihrem [ $^3\text{H}$ ]TTP-Einbau aufwiesen. Ähnliche Befunde konnten bereits Thompson und McCarthy erheben [12]. Daraus ergibt sich, daß nur in größeren Querschnittsuntersuchungen mit statistischer Auswertung ausreichend zuverlässige Ergebnisse erzielt werden können. Daher wurden in dieser Arbeit zu jedem Zeitpunkt zahlreiche Seren bzw. Leberüberstände untersucht, wobei die einzelnen Experimente geschichtet wurden. Außerdem wurden gepoolte Seren bzw. gepoolte, aufgetaute Kerne verwendet.

An frisch isolierten Leberzellkernen beobachteten Volm und Merz [15] eine Steigerung des [ $^3\text{H}$ ]TTP-

Einbaues vor allem durch Serum von Ratten, das 4 bis 12 h nach Teilhepatektomie gewonnen wurde. Zur Klärung der „Spezifität“ dieser Wirkung wurden die Einflüsse der Seren teilhepatektomierter und laparotomierter Tiere vergleichend untersucht. Im Vergleich zu den Seren unbehandelter Tiere bewirkten die Seren operierter Tiere generell eine Steigerung des [ $^3\text{H}$ ]TTP-Einbaues.

Die Überstände teilhepatektomierter Tiere 8 und 16 h nach Operation verursachten offenbar einen signifikant erhöhten [ $^3\text{H}$ ]TTP-Einbau der isolierten Kerne (vgl. [15]). Es zeigte sich jedoch auch hier, daß die Überstände laparotomierter Tiere 8 und 16 h nach Operation ebenfalls eine signifikante Steigerung des [ $^3\text{H}$ ]TTP-Einbaues bewirken.

Während bei allen Versuchen mit frisch isolierten Leberzellkernen eine Steigerung des [ $^3\text{H}$ ]TTP-Einbaues durch die Seren bzw. Leberüberstände operierter Tiere gegenüber Seren bzw. Überstände unbehandelter Tiere feststellbar war, konnte dieser Effekt bei aufgetauten Leberzellkernen nicht mehr nachgewiesen werden. Bei den aufgetauten Leberzellkernen bewirkte vielmehr das an Nährstoffen und Proteinen ärmere Serum teilhepatektomierter Tiere [21], das zu den Zeitpunkten 4 bis 24 h nach Operation gewonnen wurde, einen signifikant geringeren [ $^3\text{H}$ ]TTP-Einbau als das entsprechende Serum laparotomierter Tiere. Somit reagieren zuvor eingefrorene Zellkerne nicht mehr wie frisch isolierte Zellkerne.

- [1] P. Weiss, *Biological Specificity and Growth* (E. G. Butler, ed.), Princeton Univ. Press 1955.
- [2] P. Weiss u. J. L. Kavanau, *J. Gen. Physiol.* **41**, 1 (1957).
- [3] J. W. Grisham, G. F. Leong u. B. V. Hole, *Cancer Res.* **24**, 1474 (1964).
- [4] J. W. Grisham, G. F. Leong, M. L. Albright u. J. D. Emerson, *Cancer Res.* **26**, 1476 (1966).
- [5] G. F. Leong, J. W. Grisham, B. V. Hole u. M. L. Albright, *Cancer Res.* **24**, 1496 (1964).
- [6] F. L. Moolten u. N. L. R. Bucher, *Science* **158**, 272 (1967).
- [7] D. Paul, H. Leffert, G. Sato u. R. W. Holey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 374 (1972).
- [8] B. Sigel, L. B. Baldia, S. A. Brightman, M. R. Dunn u. R. I. M. Price, *J. Clin. Invest.* **47**, 1231 (1968).
- [9] M. Virolainen, *Control of Cellular Growth in Adult Organisms*, p. 232 (H. Teir u. H. Rytömaa, eds.), Academic Press, London 1967.
- [10] W. E. Lynch, R. F. Brown, T. Umeda, S. G. Langreth u. I. Liebermann, *J. Biol. Chem.* **245**, 3911 (1970).
- [11] W. E. Lynch, T. Umeda, M. Ueda u. I. Lieberman, *Biochim. Biophys. Acta* **287**, 28 (1972).
- [12] L. R. Thompson u. B. J. McCarthy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **30**, 166 (1968).
- [13] L. R. Thompson u. B. J. McCarthy, *Biochim. Biophys. Acta* **331**, 202 (1973).
- [14] K. Morioka, H. Shimada u. H. Terayama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **51**, 451 (1973).
- [15] M. Volm u. G. Merz, *Z. Naturforsch.* **30 c**, 107 (1975).
- [16] G. M. Higgins u. R. M. Anderson, *Arch. Path. (Chicago)* **12**, 186 (1931).
- [17] G. Blobel u. R. van Potter, *Science* **154**, 1662 (1966).
- [18] D. Kerridge, *Technimetrics* **9**, 2 (1967).
- [19] F. Becker, *Progress in Liver Disease*, Vol. III, p. 60 (H. Popper u. F. Schaffner, eds.), Grune und Stratton, New York 1970.
- [20] N. L. R. Bucher, *New England J. Med.* **277**, 686 (1967).
- [21] N. L. R. Bucher, *Regeneration of Liver and Kidney* (N. L. R. Bucher u. R. A. Malt, eds.), Little, Brown and Co., Boston 1971.
- [22] B. Fischer, P. Szuch, M. Levine u. E. R. Fischer, *Liver Regeneration*, Vol. 2, p. 117 (N. Fausto, M. Patterson, jr., R. Morais et al.), MSS Information Corporation, New York 1973.
- [23] N. L. R. Bucher u. N. J. Oakman, *Liver Regeneration*, Vol. 1, p. 82 (N. Fausto, M. Patterson, jr., R. Morais et al.), MSS Information Corporation, New York 1973.
- [24] P. Higuieret, E. Chany, S. Mousset, M. Gardes u. C. Tayssin, *CR. Acad. Sci. D.* **281**, 49 (1975).
- [25] A. Simard, L. Corneille, Y. Deschamps u. W. G. Verley, *J. Cell Biol.* **59**, 317 (1973).
- [26] W. G. Verley, Y. Deschamps, J. Pushpathadam u. M. Desrosiers, *Canad. J. Biochem.* **49**, 1376 (1971).
- [27] C. Grandjean u. H. Gracia, *Lab. Invest.* **32**, 552 (1975).
- [28] C. Nadal, *Virchows Arch. B.* **18**, 273 (1975).
- [29] H. Onda u. J. Yoshikawa, *Gann* **65**, 139 (1974).
- [30] H. Onda u. J. Yoshikawa, *Gann* **66**, 227 (1975).
- [31] H. Leffert u. D. M. Weinstein, *J. Cell Biol.* **70**, 20 (1976).
- [32] R. A. Menzies u. J. M. Kerrigan, *Exp. Cell Res.* **86**, 430 (1974).
- [33] G. Sekas u. R. T. Cook, *Exp. Cell Res.* **102**, 422 (1976).
- [34] R. Douglas, D. R. Labreque u. L. A. Pesch, *J. Physiol. (Lond.)* **248**, 273 (1975).
- [35] A. D. Glinos, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **90**, 592 (1960).
- [36] P. E. Hughes, *Austral. Asian. Med.* **9**, 41 (1960).
- [37] M. Zimmermann u. E. Celozzi, *Fed. Proc.* **19**, 139 (1960).
- [38] C. Nadal u. G. A. Boffa, *Cell Tiss. Kinet.* **8**, 297 (1975).
- [39] C. Nadal, M. N. Lombard u. F. Zajdela, *Virchows Arch. B.* **20**, 277 (1976).
- [40] H. Onda u. J. Yoshikawa, *Gann* **64**, 139 (1973).
- [41] N. L. R. Bucher, *Intern. Rev. Cytol.* **15**, 245 (1963).
- [42] G. S. Probst, E. Bikoff, S. J. Keller u. R. R. Meyer, *Biochim. Biophys. Acta* **281**, 216 (1972).