

KfK 3385
Oktober 1982

**Der Einfluß der Zeit auf die
subzelluläre Verteilung von
Transuranen und ^{59}Fe in der
Leber von Ratte und
Chinesischem Hamster**

U. Sütterlin
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe

KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 3385

Der Einfluß der Zeit auf die subzelluläre Verteilung von
Transuranen und ^{59}Fe in der Leber von Ratte und
Chinesischem Hamster *

U. Sütterlin

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

* Von der Fakultät für Biologie und Geowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH) genehmigte Dissertation

Als Manuskript vervielfältigt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
ISSN 0303-4003

Zusammenfassung

Die subzelluläre Verteilung von monomerem ^{239}Pu , ^{241}Am und Eisen in Ratten- und Chinesischer Hamster-Leber wurde mittels Sucrose-, Metrizamid- und Percolldichtegradienten untersucht. Lysosomen sind in der Rattenleber von Anfang an der Hauptablagerungsort, die Transurane bleiben aber auch nach mehreren Monaten überwiegend an diese Organellen gebunden. Auch beim Chinesischen Hamster sind die Lysosomen primär die Hauptbindungsstelle. Zu späteren Zeiten erfolgt jedoch vermutlich ein Übergang in Telolysosomen. Zu allen Zeitpunkten ist die subzelluläre Verteilung der Transurane sehr verschieden von jener des Eisens.

The subcellular distribution of ^{239}Pu , ^{241}Am and ^{59}Fe in the liver of rat and Chinese hamster as dependent on time

Abstract

The subcellular distribution of monomeric ^{239}Pu , ^{241}Am and iron in rat and Chinese hamster liver has been investigated by sucrose-, metrizamide- and Percoll-density gradients. In rat liver, the transuranium elements become and remain bound to typical lysosomes up to several months after incorporation. Lysosomes are also the primary storage organelle in Chinese hamster liver. However, their apparent density in sucrose decreases with time, which possibly indicates transition into telolysosomes. The transuranium nuclides show a subcellular distribution which is quite different from that of iron.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODE	6
2.1. Tierexperimentelle, chemische und radiochemische Methoden	6
2.1.1. Versuchstiere und Triton WR 1339-Behandlung	6
2.1.2. Radionuklidlösungen und Radionuklidnachweisverfahren	7
2.1.3. Atomabsorptionsspektroskopie	9
2.2. Fraktionierung von Leberzellen durch differentielle Zentrifugation	9
2.3. Dichtegradientenzentrifugation	10
2.3.1. Saccharosegradienten	10
2.3.2. Metrizamidgradienten	11
2.3.3. Percoll-Gradienten	12
2.3.4. Bestimmung der Dichten	13
2.4. Enzymbestimmungen	13
2.4.1. Bestimmung der Sauren Phosphatase, 5'Nucleotidase, Glukose-6-Phosphatase, Arylsulfatase A,B und Glutamatdehydrogenase	14
2.4.2. Bestimmung der N-Acetyl- β -Glukosaminidase und Alkalischen Phosphodiesterase	14
2.4.3. Bestimmung von Kathepsin D	16
2.5. Extraktion von Lipiden aus der nach differentieller Zentrifugation erhaltenen ML-Fraktion	18
2.6. Versuche zur Filtrierbarkeit von ^{239}Pu	18
2.7. Auswertungsverfahren und Präsentation der Daten	19
2.7.1. Radioaktivität in den Organen	19
2.7.2. Radioaktivität und Enzymaktivität in den nach differentieller Zentrifugation erhaltenen Zellfraktionen	19

	Seite
2.7.3. Daten aus dem Saccharose- und Metrizamid- dichtegradientenverfahren	20
2.7.4. Quantifizierung der "Triton WR 1339- Verschiebung".	20
2.7.5. Berechnung der Ergebnisse aus dem Percolldichte- gradientenverfahren	21
3. ERGEBNISSE	23
3.1. Verteilung und Retention von ^{239}Pu und ^{241}Am in Organen des Chinesischen Hamsters und der Ratte	23
3.2. Gehalt an ^{59}Fe in Organen von Ratte, Maus Chinesischem und Syrischem Hamster	23
3.3. Gehalt an Radionukliden, Eisen und Enzymen in den nach differentieller Zentrifugation erhaltenen Zellfraktionen	23
3.4. Dichtegradientenzentrifugation	25
3.4.1. Verteilungsprofile von Nukliden und Enzymen im Saccharosedichtegradienten	25
3.4.1.1. Verteilung von ^{239}Pu , ^{241}Am und Enzymen	25
3.4.1.2. Stabiles Eisen und ^{59}Fe im linearen Saccharosedichtegradienten	29
3.4.1.3. Einfluß der ^{239}Pu -Dosis auf die Verteilung des Radionuklids im Saccharosedichtegradienten	30
3.4.1.4. Verteilungsprofile von ^{234}Th nach Injektion einer ^{232}Th -haltigen ^{234}Th -Nitrat-Lösung	31
3.4.2. Verteilungsprofile von Radionukliden und Enzymen im Metrizamiddichtegradienten	32
3.4.2.1. ^{239}Pu -, ^{241}Am - und Enzymverteilung	32
3.4.2.2. Verteilung von ^{239}Pu , ^{241}Am und Enzymen im Metrizamiddichtegradienten unter dem Einfluß von Triton X-100	33

	Seite
3.4.2.3. Verteilung von ^{59}Fe im Metrizamiddichte- gradienten in Abhängigkeit von der Zentri- fugationszeit und unter dem Einfluß von TX 100	33
3.4.3. Ergebnisse im Percolldichtegradienten	34
3.5. Ergebnisse aus den Versuchen zur Lipid- extraktion	35
3.6. Filtrierbarkeit von ^{239}Pu	35
4. DISKUSSION	37
5. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUßFOLGERUNG	51
6. LITERATURVERZEICHNIS	53
7. TABELLEN UND ABBILDUNGEN	63

Abkürzungen

Enzyme

AP	Alkalische Phosphodiesterase
Aryl	Arylsulfatase A,B
GDH	Glutamatdehydrogenase
G-6-P	Glukose-6-Phosphatase
Kath.D.	Kathepsin D
5'N	5'Nucleotidase
N-A-G	N-Acetyl- β -Glukosaminidase
SP	Saure Phosphatase

Zellfraktionen (erhalten durch differentielle Zentrifugation)

N+E	Gesamtleberhomogenat (erhalten durch Vereinigung von N und E)
E	Zellkernfreier Überstand
N	Sediment, bestehend aus Zellkernen, Zelltrümmern und ganzen Zellen
ML	Partikulärfraktion, enthält den größten Teil der strukturierten Zellbestandteile
P	Mikrosomenfraktion, enthält Teile der Plasmamembranen und des ER
S	Cytosol

Sonstiges

i.v.	intravenös
i.p.	intraperitoneal
TWR	Triton WR 1339
TX 100	Triton X-100
ER	Endoplasmatisches Reticulum
RES	Reticuloendotheliäres System

1. Einleitung

Die Leber als dominierendes Stoffwechsel-, Speicher-, Ausscheidungs- und Entgiftungsorgan ist in vielen Fällen an der Aufnahme und Speicherung von Schwermetallen beteiligt. Häufig sind weder der genaue Aufnahmemodus noch die der Bindung und Speicherung zugrunde liegenden Mechanismen bekannt. Zu den Schwermetallen mit hoher Affinität zur Leber gehören auch einige Lanthaniden und Actiniden, so z.B. Lanthan, Cer, Actinium, Americium, Curium, in geringerem Ausmaß auch Plutonium und Californium (Durbin, 1962). Seit langem weiß man, daß die Ausscheidungsraten der Metalle aus der Leber weitgehend speziesabhängig sind. Ratte und Maus zeigen eine sehr rasche Elimination von Transuranen (Gruner, 1978; Winter und Seidel, 1982) und anderen Metallen, wie Blei (Klaasen und Shoeman, 1974), Arsen (Klaasen, 1974), oder Mangan (Klaasen, 1974). Dagegen werden die Schwermetalle aus der Leber von Hamstern, Kaninchen, Hunden, Affen und anderen Säugetierspezies viel langsamer ausgeschieden. Eine sehr geringe Elimination von ^{239}Pu findet beim Syrischen Hamster statt (Seidel, 1974; Volf und Seidel, 1974; Seidel, 1975). Praktisch völlig reteniert werden Transurane beim Chinesischen Hamster (Brooks et al., 1973). Auch für die Leber des Menschen ergaben sich Hinweise auf eine außerordentlich langfristige Retention von Lanthaniden und Actiniden (Durbin, 1971). Die Ursachen dieser Spezies-spezifischen Schwermetallelimination sind unbekannt. Auch Ort und Art der Bindung in der Leber ist für viele Schwermetalle noch weitgehend ungeklärt. Zahlreiche Untersuchungen hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von ^{239}Pu und anderen Transuranen wurden vor allem bei Hunden und Ratten durchgeführt. Bei der Ratte kann inzwischen die lysosomale Assoziation von Plutonium (Boocock et al., 1970; James und Rowden, 1969; Rahman und Lindenbaum, 1964; Gruner et al., 1981; Winter und Seidel, 1982), Americium (Popplewell et al., 1971) und Gallium (Aulbert und Haubold, 1974; Samezima und Orii, 1980; Hammersley und Taylor, 1979) als sehr wahrscheinlich gelten. Bei Hunden wurde eine lysosomale Bindung von Californium

(Bruenger et al., 1972) und Plutonium (Bruenger et al., 1976) beschrieben. Bhattacharya und Lindenbaum (1976) konnten lysosomale Assoziation von ^{239}Pu auch bei der Maus nachweisen. Winter untersuchte die subzelluläre Verteilung von Plutonium bei Ratte, Maus, Syrischem und Chinesischem Hamster (Winter, 1980) am 10. Tag nach Radionuklid-Injektion im linearen Saccharosedichtegradienten. Durch Verwendung von Triton WR 1339 konnte sie die lysosomale Assoziation des Nuklids bei Ratte und Maus bestätigen. Bei den Hamsterspezies war eine klare Zuordnung zu denjenigen Lysosomen, welche durch Saure Phosphatase- und Arylsulfatase-Aktivität, sowie Verschiebbarkeit durch TWR gekennzeichnet sind, nicht möglich. Es erhebt sich die Frage, ob das ^{239}Pu bei den Hamsterspezies vielleicht bevorzugt in eine Lysosomenpopulation aufgenommen wird, welche durch Bestimmung der Sauren Phosphatase und Arylsulfatase nicht erfaßt wird, und die nur unwesentlich an der Phagozytose von TWR beteiligt ist. Von vielen Autoren wird eine Heterogenität der Lysosomen beschrieben. Vielfach wird eine unterschiedliche Enzymausstattung der Lysosomen von Leberparenchym- und Nichtparenchymzellen diskutiert (Knook und Sleyster, 1980). Demnach sollen die Nichtparenchymzellen eine außerordentliche Anreicherung an Kathepsin D (van Berkel et al., 1975) und Arylsulfatase (Arborgh et al., 1973) aufweisen, die N-Acetyl- β -Glukosaminidase dagegen etwas mehr in Hepatozyten vertreten sein (van Berkel et al., 1975). Die Saure Phosphatase weist eine gleichmäßige Verteilung zwischen Parenchym- und Nichtparenchymzellen auf (van Berkel et al., 1975). Andere Autoren beschrieben eine Heterogenität der Lysosomen selbst innerhalb einer Zellpopulation (Groh und von Mayersbach, 1981). So fand Davies (1975) kleinere, weniger dichte Lysosomen mit Anreicherung an Saurer Phosphatase und größere, dichtere Lysosomen mit einem erhöhten Gehalt an Kathepsin D und Sauren Nukleasen. Um dieser offenkundigen Heterogenität der Lysosomen, bzw. ihrer Leitenzyme, Rechnung zu tragen, wurden zwei weitere lysosomale Leitenzyme, nämlich N-Acetyl- β -Glukosaminidase und Kathepsin D, in die Untersuchungen mit einbezogen. Auch bezüglich der Selektivität der 5'Nucleotidase als Leitenzym für Plasmamembranen bestehen gewisse Vorbehalte, die im einzelnen

in der Diskussion näher erläutert werden. Zur genaueren Charakterisierung der perizellulären Membranen wurde daher zusätzlich die Bestimmung der Alkalischen Phosphodiesterase neu eingeführt.

Die Behandlung mit TWR zwecks Lysosomenisolation führte bei Ratte und Maus zu einer Reduktion des ^{239}Pu -Gehaltes der Leber (Winter, 1980). Der Nuklid-Gehalt im Cytosol war unter dem Einfluß von TWR bei Ratte, Maus und Syrischem Hamster deutlich erhöht, was eventuell auf eine erhöhte Durchlässigkeit der Tritosomen-Membran (Henning und Plattner, 1975), oder deren erhöhte Fragilität zurückzuführen ist, und daraus resultierend zu Artefakten führen kann. Diese mit der Anwendung von TWR verbundene Problematik wurde bei Winter bereits ausführlich diskutiert (Winter, 1980). Auch die Verwendung von Dextran T 500 und eines Eisen-Sorbitol-Citrat-Komplexes zur Lysosomenisolierung brachten keine Klärung hinsichtlich der ^{239}Pu -Bindung bei den Hamstern.

Die lysosomale Assoziation des ^{239}Pu bei Ratte und Maus war somit durch Verwendung von TWR bestätigt, die Bedeutung der Lysosomen bei der Nuklidbindung in den Hamsterlebern weiterhin unklar. Von Wattiaux und Mitarbeitern (1978) wurde eine Methode zur Abtrennung der Lysosomen von den Mitochondrien und anderen Organellen beschrieben, welche im Gegensatz zur Triton-Methode keine Veränderung der Lysosomen voraussetzt. Es handelt sich hierbei um Metrizamid, ein trijodiertes Benzamido-Derivat der Glukose, welches im Vergleich zu Saccharose eine geringere Osmolalität und Viskosität aufweist und in Wasser nicht-ionische Lösungen bildet. Damit sollte die Inertheit des Mediums gewährleistet sein. Ein neueres Dichtegradientenmedium zur Analyse von Zellorganellen ist auch das kolloidale Silica-Sol Percoll (Pertoft und Laurent, 1977; Pertoft et al., 1978). Aufgrund seiner Isoosmolalität und geringen Viskosität gestattet das Percoll mit einem Dichtebereich von 1.0 - 1.25 eine breite Anwendung. Dieses Medium hat sich zwar in unserem Labor als wenig geeignet zur Trennung von Mitochondrien und Lysosomen erwiesen

(Seidel, unveröffentlichte Ergebnisse), erlaubt aber eine eindeutige Unterscheidung von perizellulären Membranen und Lysosomen (Seidel und Sontag, 1981). Mit dem Metrizamid- und Percoll-medium stehen somit zwei neuere Methoden zur Verfügung, um die im Saccharosedichtegradienten mittels TWR-Injektion erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen. Ein Hauptanliegen der Arbeit war es, diese Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Radionuklid-Injektion durchzuführen, um möglicherweise sich unter dem Einfluß der Zeit ergebende Speziesunterschiede hinsichtlich des subzellulären Verteilungsmusters festzustellen. Zu Beginn dieser Arbeiten wurden auch Ergebnisse elektronenmikroskopischer Untersuchungen bekannt (Hanke, 1977; Schmid, 1980), die darauf hinwiesen, daß der TWR-Metabolismus in Chin.Hamsterleberlysosomen von jenem in Rattenleberlysosomen deutlich verschieden ist. Zur Überprüfung der TWR-Methode wurden die Tiere daher auch zu späten Zeiten nach TWR-Injektion untersucht.

Eine Bindung von ^{239}Pu an eisenspeichernde Zellkomponenten wurde in früheren Arbeiten eingehend diskutiert (Bruenger et al., 1971; Boocock et al., 1970), die Befunde sind aber widersprüchlich, zumal in der Arbeit von Winter (1980) deutliche Hinweise enthalten sind, daß es sich bei der postulierten Assoziation an Eisenspeicherproteine um Artefakte handeln könnte. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit ein Vergleich des subzellulären Transuranverhaltens mit jenem von stabilem Eisen und ^{59}Fe systematisch mit einbezogen werden. Es war auch zunächst naheliegend anzunehmen, daß eine engere Verwandtschaft des ^{239}Pu - und Fe-Stoffwechsels auch ihren Ausdruck in einem ähnlichen Verhalten bezüglich der Organretention finden könnte. Es handelt sich hier zwar um eine sehr vereinfachende Annahme, in Anbetracht der sehr einfachen und raschen Methodik von Organverteilungsstudien sollte jedoch ein Vergleich der ^{59}Fe -Retention bei Ratte, Maus, sowie Syrischem und Chinesischem Hamster durchgeführt werden.

Zusammenfassend lassen sich die Ziele der vorliegenden Arbeit wie folgt charakterisieren:

Viele bisherige Befunde sprechen für eine lysosomale Bindung von Transuranen in der Rattenleber. Dies sollte mittels zweier neuerer Dichtegradientenverfahren (Metrizamid und Percoll) unter Einbeziehung weiterer, lysosomaler, und anderer Leitenzyme, sowie durch ein detailliertes Studium des subzellulären ^{59}Fe -Stoffwechsels überprüft werden. Diese neu einzuführenden Verfahren sollten vor allem auch weiteren Aufschluß über die bisher unklare Art der Anfangsablagerung von Transuranen in der Leber Chinesischer Hamster erbringen. Von der Analyse der Zeitabhängigkeit der subzellulären Verteilung der Transurane in der Leber beider Spezies würden Hinweise auf Ursachen der Speziesunterschiede in der Ausscheidungsrate der Transurane aus der Leber erwartet. Diese Untersuchungen mit der Leber als Modellorgan sollten einem klareren Verständnis des Verhaltens und der Wirkungen von Schwermetallen im Körper dienen.

2. Material und Methode

2.1. Tierexperimentelle, chemische und radiochemische Methoden

2.1.1. Versuchstiere und Triton WR 1339-Behandlung

Die von uns benutzten Versuchstiere sind in der folgenden Tabelle charakterisiert. Ein Einfluß der Rassenzugehörigkeit auf die Ergebnisse konnte nicht beobachtet werden. Zu den Versuchen wurden nur weibliche Tiere benutzt.

Spezies	Rasse	Gewicht	Bezugsquelle	Fütterung
Ratte	Heiligenberg	175-205 g	institutseigener Inzuchtstamm	Altromin-R-m-pellets,
	Sprague Dawley	180-200 g	Fa. Gaßner Sulzfeld	Standarddiät
Maus	NMRI	25-33 g	Zentralinstitut f. Versuchstierkunde Hannover	
Chinesischer Hamster	Auszucht-tiere aus 8 Inzucht-paaren	25-37 g	institutseigene Kolonie der Bundesforschungsanstalt f. Ernährung, Karlsruhe Dr. Renner	Altromin, Spezialdiät für Hamster
Syrischer Hamster	handelsübliche Tiere	60-150 g	Tierhandlung Metz, Karlsruhe	

Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser bis zur Sektion, die wie die Injektion unter Äthernarkose durchgeführt wurde. Alle Radionuklidinjektionen erfolgten intravenös (i.v.), bei der Ratte in eine freipräparierte Schwanzvene, bei Maus und beiden Hamsterspezies in die V. jugularis.

Das nichtionische Detergenz Triton WR 1339 (iso-octyl-phenyl-polyäthylen-glycol-formaldehydpolymer) bezogen wir als Produkt von Röhm und Haas, U.S.A. über die Firma Serva, Heidelberg. Die Injektion von TWR erfolgte intraperitoneal (i.p.) unter Äthernarkose. Zeitpunkt der Applikation war, sofern nicht anders vermerkt, vier Tage vor Sektion, da sich dieser Zeitpunkt auch für Nuklidbindungsstudien als optimal erwiesen hat (Gruner 1981). Die Dosis betrug $750 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TWR, bei der Ratte 0.6 ml einer 25 % Lösung (in 0.9 % NaCl), beim Chinesischen Hamster 0.75 ml der 1:10 verdünnten Stammlösung (pro Tier).

2.1.2. Radionuklidlösungen und Radionuklidnachweisverfahren

Die ^{239}Pu (IV)-Nitrat-, ^{241}Am (III)-Nitrat-, sowie ^{59}Fe (II)-Chloridstammlösungen wurden von der Firma Amersham-Buchler bezogen. Die radiochemische Reinheit wurde spektroskopisch überprüft. Das trägerfreie ^{234}Th wurde in unserem Labor durch Extraktion mit Diäthyläther und anschließendem Ionenaustausch von Uranyl-nitrat-hexahydrat abgetrennt und als Nitrat injiziert (0.1 ml je Tier) (Peter 1982). Zur Herstellung von trägerhaltigen Thoriumlösungen wurde eine Lösung von ^{232}Th -Nitrat (Radiochemical Centre Amersham, England) in 0.1 N HNO_3 angesetzt und unmittelbar vor der i.v. Injektion zu dem erforderlichen Volumen an ^{234}Th -Nitratlösung pipettiert. Die Trägermenge betrug $7\text{-}10 \text{ mg } ^{232}\text{Th} \cdot \text{kg}^{-1}$ Körpergewicht.

Monomere ^{239}Pu -, ^{241}Am -, und ^{59}Fe -Citratlösungen wurden nach dem Verfahren von Popplewell et al. (1971) hergestellt (pH 7-8) und davon 0,25 ml je Tier verabfolgt. Die verabreichte Dosis ist in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Nuklid	Chin. Hamster	Ratte	Syr. Hamster	Maus
	Bq · kg ⁻¹			
²³⁹ Pu	0.4-29.6 · 10 ⁴	5.0-51.1 · 10 ⁴	-	-
²⁴¹ Am	1.2-7.4 · 10 ⁴	2.6-28.7 · 10 ⁴	-	-
⁵⁹ Fe	0.4-4.4 · 10 ⁴	1.5-11.1 · 10 ⁴	0.4-5.2 · 10 ⁴	5.2-6.7 · 10 ⁴
²³⁴ Th	3.0 · 10 ⁴	-	-	-

Die Alphanradioaktivität von ²³⁹Pu sowie ²⁴¹Am in verschiedenen Organen, Zellfraktionen und Saccharosegradientenfraktionen wurden nach Seidel et al. (1972) nach Naßveraschung in einem Gemisch von 70 % HClO₄ + 30 % H₂O₂ (1:1) in Insta-Gel als Szintillator bestimmt. Metrizamid- und Percollgradientenfraktionen wurden sofort nach der Fraktionierung mit Insta-Gel aufgefüllt und im Flüssigkeitszintillationsspektrometer gemessen. Die Bestimmung der γ -Aktivität von ⁵⁹Fe und ²³⁴Th erfolgte in einem Szintillationsspektrometer (Gamma 8 000 Beckman) mit einem NaJ (Tl) - Bohrloch-Kristall.

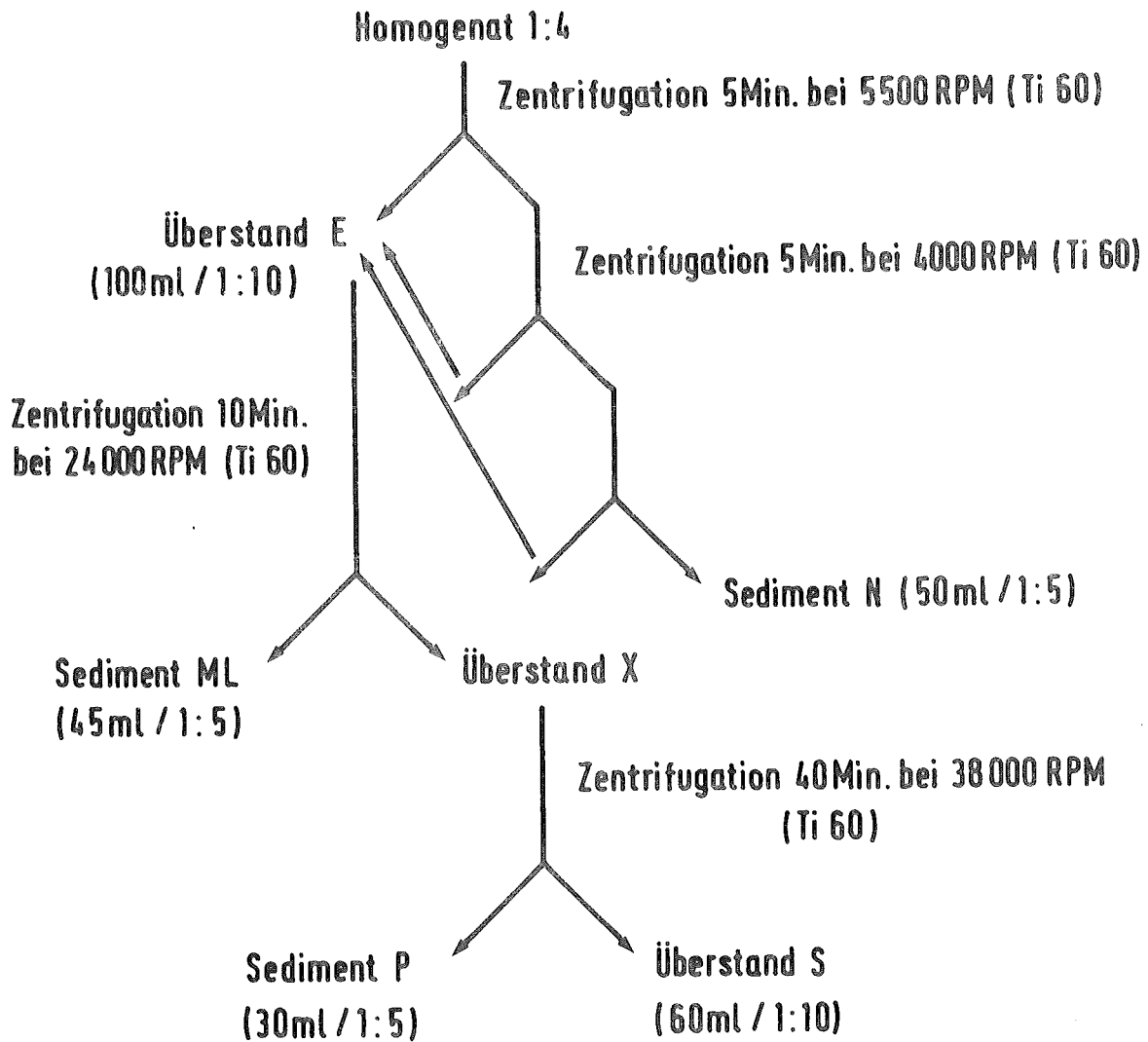
In einem speziellen Versuch, in dem Chinesischen Hamstern nur $0.4 \cdot 10^4$ Bq · kg⁻¹ ²³⁹Pu injiziert wurden, mußte die sehr geringe Radioaktivitätsmenge in den Saccharosedichtegradientenfraktionen nach Naßveraschung mit HNO₃ mittels eines Extraktionsverfahrens (Humphreys et al. 1976, Keough et al., 1970) bestimmt werden. Es wurden hierzu die Fraktionen gleicher Nummer aus 12 Röhren vereinigt. Bei diesem Verfahren wird nach Naßveraschung mit HNO₃ und HNO₃/HF der mineralisierte Rückstand in einem HNO₃-Borsäure-Harnstoff-Gemisch aufgenommen und das ²³⁹Pu durch Ausschütteln in eine organische Szintillator-Extraktionsmittelphease überführt. Der Radioaktivitätsgehalt in jeder Fraktion wurde anschließend im Flüssigkeitsspektrometer gemessen.

2.1.3. Atomabsorptionsspektroskopie

Stabiles Eisen in den Saccharosegradientenfraktionen (jeweils zehn Fraktionen derselben Nummer vereinigt) wurde mithilfe der Atomabsorptionsspektroskopie nach einer Methode von Prasard und Spiers (1978) bestimmt. Dazu mußte zunächst die Saccharose in den Gradientenfraktionen durch Aufheizen auf 500 °C entfernt werden. Nach der Trockenveraschung wurden die Rückstände in 5 ml 2N HCl (HCl suprapur) gelöst und im Trockenschrank bei ca. 110 °C eine Stunde erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit H₂O bidest quantitativ durch einen Schwarzbandfilter in 25 ml Meßkölbchen überführt. Alle hierbei verwendeten Geräte wurden vor der Benutzung mit konzentrierter HNO₃ und 3 % EDTA-Lösung metallfrei gespült. Die Eisenbestimmung erfolgte in einem Beckman Atomic Absorption Spectrophotometer / 1272 bei 251 nm mit einer Eisen-Hohlkathodenlampe und Deuteriumlampe.

2.2. Fraktionierung von Leberzellen durch differentielle Zentrifugation

Die Arbeitsschritte bei der differentiellen Zentrifugation entsprechen den von Winter beschriebenen Methoden (Winter 1980). Das Homogenisationsmedium (HM) war 0.25 M Saccharoselösung gepuffert mit 10 mM Triäthanolamin · HCl (pH 7.2 - 7.4). Jeweils 10 g perfundierte Leber (zwei Ratten-, bzw. sieben Hamsterlebern vereinigt) wurden in 30 ml HM in einem Potter Elvehjem Homogenisator durch 2-3 Auf- und Abbewegungen bei 500 RPM homogenisiert. Das Schema zeigt die dann folgenden Schritte (die Volumina in den Klammern geben das Endvolumen an, auf welches das Sediment bzw. die Überstände verdünnt wurden; die Angaben 1:10 usw. geben die Verdünnung gegenüber dem Ausgangsmaterial von 10 g Leber an).



Das für die Bestimmungen benutzte N+E (1:20) wurde durch Vereinigung von E und N unter Zugabe von HM hergestellt.

2.3. Dichtegradientenzentrifugation

2.3.1. Saccharosegradienten

Zur weiteren Auftrennung der Organellen wurden auf einen linearen Saccharosedichtegradienten (33 ml, 14.7 ml 62 % Saccharose + 18.3 ml HM, pH 7.4) 1.7 ml der ML-Fraktion aufgetragen. In einigen Versuchen wurde die ML-Fraktion vor dem Auftragen

0.1 %ig an Triton X-100 (TX 100) gemacht, um die Lysosomen zu zerstören (Winter 1980 und siehe Ergebnisse). Die Zentrifugation wurde in einem Schwingbecherrotor Beckman SW 27 in einer Beckman-Zentrifuge L2 65 B bei 88 000 g_{av} und 4 °C durchgeführt. Die Laufzeit betrug 4 oder 16 Stunden (ohne An- und Auslaufzeit), um eine ^{239}Pu -Bindung durch eisenbindende Zellbestandteile zu erkennen (vgl. Winter 1980 und Winter et al. 1982). Durch Probenentnahme vom Boden des Röhrchens wurde der Gradient in 22 Fraktionen aufgeteilt. Die Fraktionen 1 und 22 wurden verworfen (siehe auch 2.7.3.). Zur späteren Enzymbestimmung wurden die verbliebenen Fraktionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Bestimmung im Tiefkühlfach bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.2. Metrizamidgradienten

Metrizamid (2-[3-acetamido-5-N-methyl-acetamido-2,4,6-trijodobenzamido]-2-deoxy-D-glukose) wurde von der Firma Serva Feinbiochemika, Heidelberg, bezogen. Das Metrizamid verfügt über keine ionisierbaren funktionellen Gruppen und bildet daher in Wasser nicht-ionische Lösungen. Die Osmolalität von Metrizamidlösungen ist im Vergleich zur Saccharose sehr gering, in den von uns benutzten Lösungen betrug die Osmolalität zwischen 120 und 420 mOs/kg H_2O (Rickwood und Birnie, 1975). Die Metrizamidlösungen gewünschter Dichte wurden durch Zugabe von H_2O bidest. hergestellt. Die Analyse im linearen Metrizamidgradienten (33 ml, 14.7 ml 50.6 % Metrizamid + 18.3 ml 9.2 % Metrizamid, pH 7.6) erfolgte in einer etwas modifizierten Methode nach Wattiaux (Wattiaux et al. 1978). Bei einem Vergleich zwischen der Auftrennung nach Unter- bzw. Überschichtung von ML erwies sich die Überschichtung des Gradienten als schonender für die Organellen, insbesondere für die Mitochondrien (siehe Abb. 1 und 2).

* An dieser Stelle möchte ich Herrn Th. Mohr und P. Kindermann, Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen des KfK, für die Anfertigung der Gradientenaustropfvorrichtung danken.

1.7 ml der ML Fraktion wurden daher in allen Versuchen auf den Metrizamidgradienten aufgetragen. Eine sechsstündige Zentrifugationszeit im Schwingbecherrotor (SW 27, Beckman) bei 88 000 g_{av} und 4 °C war ausreichend für die Organellen, um ihre Gleichgewichtsdichte zu erreichen. Für den Vergleich von ^{239}Pu mit ^{59}Fe wurde auch hier zusätzlich eine 16-stündige Zentrifugationszeit gewählt. Das Austropfen des Gradienten erfolgte in der oben beschriebenen Weise.

2.3.3. Percoll-Gradienten

Percoll (Pharmacia, Freiburg) ist ein kolloidales Kiesel-Sol, dessen Partikel (durchschnittliche Größe etwa 17 nm) durch eine Ummantelung mit Polyvinylpyrrolidon nichttoxisch sind. Das Kolloid bildet in Wasser klare Lösungen mit einer geringen Osmolarität (< 20 mOs/kg H_2O) (Pertoft et al. 1978). Durch Zugabe von 1 Teil 2.5 M Saccharose zu 9 Teilen Percoll wird eine iso-osmotische Ausgangslösung (320 mOs/kg H_2O) mit einer Dichte von 1.13 ± 0.005 g/ml hergestellt. Die gewünschte Dichte der Percoll-Lösung kann durch Zugabe von 0.25 M Saccharose eingestellt werden (Informationsschrift der Firma Pharmacia Fine Chemicals: Percoll for density gradient centrifugation). Zur Herstellung unserer Percoll-Gradienten wurde die Ausgangslösung von Percoll/2.5 M Saccharose durch Zugabe von 0.25 M Saccharose so verdünnt, daß Medien der Ausgangsdichte 1.07 g/ml und 1.08 g/ml entstanden. 2ml ML wurden homogen mit 38 ml des jeweiligen Percollmediums vermischt, und 5 Minuten bei 33 000 g_{av} , 18 °C, im Beckman Vertikalrotor VTi 50 zentrifugiert. Die Gradienten wurden in der bereits beschriebenen Weise in 18 Fraktionen aufgeteilt. Die sich im Verlauf der Zentrifugation selbst bildenden Gradienten sind ausgesprochen sigmoidal. Ihre Form ist unabhängig von der Ausgangsdichte, sie wird im wesentlichen durch die Größe des Zentrifugenröhrchens, die Geometrie des Rotors, die Zentrifugationszeit und die Umdrehungszahl bestimmt (Pharmacia Fine Chemicals, Separation News 3, 1980).

2.3.4. Bestimmung der Dichten

Saccharose

Aus der Saccharosekonzentration (Abbé Refraktometer) wurde mittels der Int. Critical Tables of Numerical Data, Physical Chemistry and Technology (Vol. II, London 1927) die Dichte ermittelt.

Metrizamid

Bei Metrizamidgradienten wurde im Abbé Refraktometer der Brechungsindex der Gradientenprobe ermittelt. Bei bekanntem Brechungsindex c kann nach der folgenden Formel die Dichte δ bestimmt werden (Birnie et al. 1973):

$$\delta = 3.35 \cdot c - 3.462$$

Percoll

Ähnlich kann bei Percoll aus dem Brechungsindex x der Gradientenfraction mit Hilfe der Funktion

$$y = -8.448 + 7.042 \cdot x$$

die Percoll-dichte bestimmt werden.

2.4. Enzymbestimmungen

Die Zellorganellen wurden in den Zellfraktionen und Dichtegradientenfraktionen anhand von Leitenzymen nachgewiesen. Zur Charakterisierung der Lysosomen wurden die Enzyme Saure Phosphatase, N-Acetyl- β -Glukosaminidase, Kathepsin D und zum Teil Arylsulfatase A,B herangezogen. Die perizellulären Membranen wurden durch Bestimmung der 5'Nucleotidase und Alkalischen Phosphodiesterase nachgewiesen, die Mitochondrien durch Glutamatdehydrogenase. Zum Nachweis der Membranen des Endoplasmatischen Reticulums wurde die Glukose-6-Phosphatase bestimmt. Die Testansätze zur Bestimmung der Enzymaktivität in den nach differentieller Zentrifugation erhaltenen Zellfraktionen, sowie in den Dichtegradienten-

fraktionen sind in Tabelle 1 und 2 zusammengestellt. Nach 5-minütiger Vorinkubation wurde die Enzymreaktion durch Substratzugabe gestartet. Die Inkubation erfolgte bei 25 oder 37 °C (siehe Tabelle 1 und 2). Nach dem Abstoppen der Enzymreaktion wurden die Proben, soweit nicht anders vermerkt, 15 Minuten ins Eisbad gestellt, danach 15 Minuten bei 3000 RPM in der Hettich Laborzentrifuge zentrifugiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach den Angaben in Tabelle 1 und 2. Die Extinktion der Enzymreaktion wurde im Spektralphotometer M 25 der Firma Beckman bestimmt. Als Nullwert wurde, soweit nicht gesondert vermerkt, die entsprechende Zellfraktion oder eine Gradientenprobe eingesetzt, die Enzymreaktion wurde vor der Substratzugabe gestoppt.

2.4.1. Bestimmung der Sauren Phosphatase, 5'Nucleotidase, Glukose-6-Phosphatase, Arylsulfatase A,B und Glutamatdehydrogenase

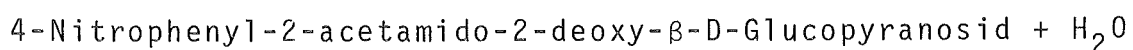
Die Bedingungen für diese Bestimmungen entsprechen hinsichtlich Molaritäten und Einwaagen jenen von Winter, 1980. Saure Phosphatase wurde nach Appelmans et al. (1955) mit β -Glycerophosphat, 5'Nucleotidase nach Michell und Hawthorne (1965) mit Adenosin-5'-monophosphat und Glukose-6-Phosphatase nach Appelmans et al., 1955 mit Glukose-6-Phosphat bestimmt. Die anorganische Phosphatkonzentration wurde nach Fiske und Subbarow (1925) gemessen. Die Messung der Glutamatdehydrogenasekonzentration erfolgte nach Williamson (1967), die Arylsulfatase A,B nach Roy (1954).

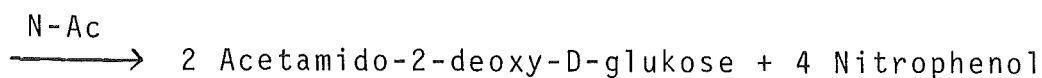
2.4.2. Bestimmung der N-Acetyl- β -Glukosaminidase und Alkalischen Phosphodiesterase (Beaufay et al. 1974)

Substratsättigung und linearer Verlauf der Enzymreaktion während der Inkubationszeit wurden zuvor in einer Testreihe ermittelt.

I. Pufferlösungen und Substrate

1. N-Acetyl- β -Glukosaminidase



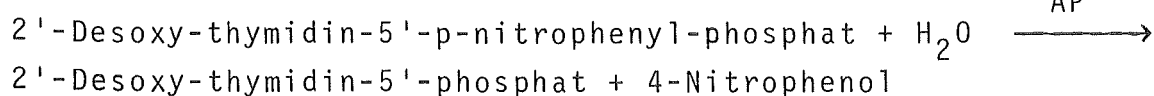


Puffer: 47.04 g Na-Citrat (0.16 M)
mit H₂O bidest auf 1 l auffüllen
mit 0.1 N HCl auf pH 4.5 einstellen

Substrat: 17.5 mM p-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranosid
Einwaage für 10 ml: 60 mg p-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranosid (Sigma Nr. 9376)

Nitrophenylbestimmung: 42 g Natriumhydrogencarbonat
(wasserfrei) 0.5 M
auf 1 l mit H₂O bidest auffüllen
zur Bestimmung: 0.5 ml Überstand der zentrifugierten
Probe + 2.5 ml NaHCO₃-Lösung

2. Alkalische Phosphodiesterase



Puffer: 17.84 g Glycin · HCl (0.16 M)
0.702 g Zinkacetat (3.2 mM)
mit konzentrierter NaOH auf pH 9.6 einstellen,
dann mit H₂O bidest auf 1 l auffüllen

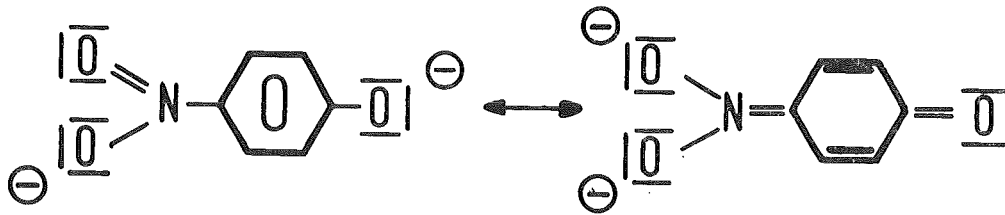
Substrat: 40 mM Thymidin-5'-phosphat-4-nitrophenol
Einwaage für 10 ml: 189.3 mg Thymidin-5'-phosphat-4-nitrophenol (Boer. Nr. 104256)

II. Stoppen der Enzymreaktion und Messung

Die Enzymreaktion wird mit gekühltem, absoluten Äthanol gestoppt (Menge siehe Tabelle 1 und 2), die p-Nitrophenolkonzentration wird bei 400 nm bestimmt.

III. Prinzip der Nitrophenolbestimmung

Elektronenziehende Substituenten, wie das p-NO₂, erhöhen die Acidität von Phenolen, indem sie durch Konjugation das Pheno-
lation stabilisieren.



Dies ist allerdings nur im neutralen-alkalischen pH-Bereich der Fall, da bei Protonenüberschuß eine Protonierung des Oxid-Anions eintritt, und somit der Mesomerieeffekt herabgesetzt wird. Im neutralen-alkalischen pH-Bereich wird durch die Einbeziehung des freien Elektronenpaares am Sauerstoff der Mesomerieeffekt erhöht, die Zahl der konjugierten Chromophore im Molekül steigt damit an. Die maximale Absorption wird dadurch in den sichtbaren Bereich (400 nm) verschoben.

2.4.3. Bestimmung von Kathepsin D (Barrett, 1972)

Das Kathepsin D gehört zur Gruppe der Endopeptidasen. Sein pH-Optimum liegt bei pH 3 - 4.5. Kathepsin D hydrolysiert Proteine und Peptide, vorzugsweise am Carboxyl- oder Aminoende aromatisierter Aminosäuren. In unserem Enzymtest wurde Hämoglobin als Substrat eingesetzt. Der lineare Verlauf der Enzymreaktion innerhalb der Inkubationszeit wurde zunächst in einer Testreihe ermittelt. Die Enzymaktivität wurde durch die photometrische Messung Folin-positiver Aminosäuren bestimmt.

I. Pufferlösungen und Substrate:

Puffer: 500 ml 1 N Natronlauge
47 ml 98-100 % Ameisensäure
mit 1 N NaOH auf pH 3.3 einstellen
mit H₂O bidest auf 1 l auffüllen

Substrat: Hämoglobin vom Rind, lyophilisiert, rein
Proteasesubstrat nach Anson (Serva Nr. 24510)

Präparation des Hämoglobin-Substrates:

1 g Hämoglobin wurde in 10 ml H₂O bidest. durch Verreiben gelöst, danach 30 Min. bei 15 000 RPM und 4 °C zentrifu-

giert. Der Überstand wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und zur Enzymbestimmung bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad aufgetaut.

II. Stoppen der Enzymreaktion:

Die Enzymreaktion wird mit 3 % Trichloressigsäure gestoppt

III. Bestimmung der Folin-positiven Aminosäuren:

a) alkalisches Kupferreagenz

Lösung A: 1.0 g Na-Citrat \cdot 2 H_2O
 0.5 g Kupfersulfat \cdot 5 H_2O
 in 100 ml H_2O bidest lösen

Lösung B: 16.0 g Natriumhydroxyd
 50.0 g Natriumcarbonat (wasserfrei!)

1 ml Lösung A + 79 ml H_2O bidest + 20 ml Lösung B

b) Folin-Ciocalteus-Reagenz

Folin-Ciocalteus-Reagenz im Verhältnis 1:3 mit H_2O bidest verdünnen

zur Bestimmung:

1 ml Überstand der zentrifugierten Probe + 2.5 ml Kupferreagenz
 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehenlassen, dann 250 μl
 Folin-Ciocalteus-Reagenz (1:3 verd.) zugeben und mischen

Nach genau 30 Min. wird im Photometer bei $\lambda=500\text{ nm}$ die Extinktion gemessen.

IV. Nullwert

Als Nullwert wurde die entsprechende Zellfraktion oder jede Gradientenprobe eingesetzt (eigener Nullwert zu jeder Fraktion, da sowohl Metrizamid als auch Triäthanolamin im Saccharosegradienten in Abhängigkeit von ihrer Konzentration bei der Kathepsin-Bestimmung positiv reagieren). Die Nullwerte wurden vor der Substratzugabe mit Säure gestoppt (siehe Tabelle 1 und 2), danach sofort weiterverarbeitet, da längere Säureeinwirkung zu einer unspezifischen sauren Hydrolyse der Proteine führt, und somit den Nullwert verfälscht.

2.5. Extraktion von Lipiden aus der nach differentieller Zentrifugation erhaltenen ML-Fraktion

Die Lipidextraktion erfolgte nach einer etwas modifizierten Vorschrift nach Morris Kates (1972).

1.7 ml der ML-Fraktion wurden in der Laborzentrifuge bei 4000 RPM (etwa 3 200 g_{av}) 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand (=Überstand 1 zur ^{239}Pu -Bestimmung) wurde dekantiert. Die Lipide wurden aus dem Pellet (=Pellet 1) durch dreimaliges Ausschütteln mit 5 ml eines Chloroform/Methanol Gemisches (2:1) und Ultraschallbehandlung (10 Minuten) extrahiert, wobei jeweils bei 3.200 g_{av} neu abzentrifugiert wurde (15 Min.). Die Überstände wurden jeweils durch ein Whatman Glasfaserfilter mittels Millipore-Filtrationsgerät filtriert. Die drei so erhaltenen Filtrate wurden vereinigt. Eventuell noch verbliebene Lipide wurden aus dem zuletzt erhaltenen Pellet durch weitere dreimalige Extraktion mit 5 ml Chloroform/Methanol (1:1) entfernt, die Ultraschallbehandlung und Zentrifugation erfolgte wie in der oben beschriebenen Weise. Die Filtrate wurden mit den zuvor erhaltenen vereinigt. Danach wurde der ^{239}Pu -Gehalt im letzten Pellet (=Pellet 2) und im Extrakt mittels des in 2.1.2. beschriebenen Verfahrens in Insta-Gel gemessen. Das Chloroform mußte wegen seiner großen Löschwirkung zuvor durch Erwärmen des Extraktes auf 60 °C entfernt werden. Es wurde die relative Verteilung der ^{239}Pu -Aktivität zwischen Pellet 2 und dem Extrakt bestimmt. Die Ausbeute errechnete sich aus dem ^{239}Pu -Gehalt von (Pellet 2 + Filter) + Extrakt + Überstand 1 und wurde auf den Gesamtgehalt an ^{239}Pu in 1.7 ml ML als 100 % bezogen.

2. 6. Versuche zur Filtrierbarkeit von ^{239}Pu

Jeweils 1.7 ml ML wurden unter möglichst gleichmäßigem Druck durch Millipore-Membranfilter der Porengröße 1.2 μm sowie 0.45 μm filtriert. Die 4 oder 5 Saccharosedichtegradientenfraktionen mit dem höchsten ^{239}Pu -Gehalt wurden vereinigt und Aliquots von 1.7 ml durch die Millipore-Membranfilter (1.2 μm und 0.45 μm Porengröße) filtriert. Bei ^{59}Fe -haltigen Proben wurde der Radionuklidgehalt auf dem Filter, im Filtrat, sowie in 1.7 ml einer unfiltrierten

Probe γ -spektroskopisch bestimmt. Bei Verwendung von ^{239}Pu als Radionuklid wurden die Membranfilter vor Auffüllen mit Insta-Gel in Essigsäureäthylester gelöst, bzw. die Filtrate nach der in 2.1.2. beschriebenen Methode naßverascht. Der Radionuklidgehalt in den 1.7 ml der unfiltrierten Probe wurde als 100 % angenommen und der prozentuale Anteil des Radionuklids auf dem Membranfilter bzw. im Filtrat darauf bezogen.

2.7. Auswertungsverfahren und Präsentation der Daten

2.7.1. Radioaktivität in den Organen

Die verabreichte Dosis pro Tier wurde mit 100 % angenommen. Der ^{239}Pu -Gehalt des Skeletts wurde berechnet durch Multiplikation der Aktivität des Femurs mit 20 für die Ratte (Rosenthal et al. 1972), mit 27.5 für Chinesische Hamster. Zur Ermittlung dieses Faktors wurden die Skelette von 4 Chinesischen Hamstern völlig zerlegt und der ^{239}Pu -Gehalt am 10., 36. und 70. Tag nach Nuklid-Injektion in den einzelnen Knochen gemessen (siehe Tabelle 3). Bei ^{241}Am wurde ein Faktor von 20 für Ratte und von 34 für den Chinesischen Hamster angenommen (Seidel 1977). Bei ^{59}Fe ist immer der ^{59}Fe -Gehalt eines Femurs angegeben, da für eine Umrechnung auf das Gesamtskelett die Daten fehlten. Bei einem Radioaktivitätsgehalt eines Organs von weniger als 0.1 % der injizierten Dosis, wurde auf 0.1 % aufgerundet.

2.7.2. Radioaktivität und Enzymaktivität in den nach differentieller Zentrifugation erhaltenen Zellfraktionen

Der Radionuklidgehalt wurde in jeweils gleichen Mengen jeder Zellfraktion gemessen. Der prozentuale Radioaktivitätsanteil wurde in jeder Fraktion bezogen auf das Gesamtleberhomogenat (N+E) als 100 % bestimmt. Die Enzymkonzentration wurde in jeweils gleichen Probenmengen gemessen. Die Extinktion im Gesamtleberhomogenat (N+E) wurde als 100 % angenommen, der prozentuale Anteil jeder Zellfraktion danach berechnet (unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung).

2.7.3. Daten aus dem Saccharose- und Metrizamiddichtegradientenverfahren

Die Verteilungsprofile der Radionuklide und Enzyme wurden nach Beaufay et al. (1976) in der Form $\Delta Q / \Delta p$ (Ordinate) als Funktion der Dichte (Abszisse) aufgetragen. ΔQ entspricht dem prozentualen Anteil der einzelnen Fraktion gemessen an der Gesamtaktivität des Gradienten, Δp ist der Dichtezuwachs innerhalb der einzelnen Fraktion. Die Fläche jeder Fraktion ist direkt proportional dem prozentualen Anteil der Fraktion an der Gesamtfläche. Die Gesamtfläche ergibt sich als die Summe der Flächen von Fraktion 2 bis Fraktion 21 und ist damit 1. Die erste und letzte Fraktion wurden verworfen, da sie nicht eindeutig definiert sind. Die Abbildungen wurden mittels computergesteuertem Zeichenautomaten angefertigt (Programme von Dr. Thies und Dr. Haffner, IGT, Kernforschungszentrum). Zur Charakterisierung der Verteilungsprofile wurden die Modale und Mediane Dichte jeder Verteilungskurve berechnet (Tabellen 22, 23, 27, 28). Die Modale Dichte entspricht der Mittleren Dichte jener Fraktion, in welcher das Aktivitätsmaximum auftritt. Die Mediane Dichte entspricht dem Dichtewert, in dem durch eine Parallele zur Ordinate die Verteilungskurve in zwei gleiche Hälften geteilt wird. Die Mediane Dichte wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$\rho_m = \sum \frac{(\Delta Q_i \cdot \rho_i)}{Q}$$

ρ_m = Mediane Dichte

ΔQ_i = prozentuale Aktivität in den Fraktionen

ρ_i = mittlere Dichte der Fraktionen

2.7.4. Quantifizierung der "Triton WR 1339-Verschiebung"

Der Einfluß von Triton WR 1339 auf die Verteilungsprofile von Saurer Phosphatase und ^{239}Pu zu verschiedenen Zeiten nach Radionuklid-Injektion wurde quantitativ berechnet (Tabelle 24). Als Kontrolle dienten die entsprechenden Verteilungsprofile ohne TWR Einfluß (Abb. 3, 6, 8). Der TWR-beeinflußte Anteil eines Vertei-

lungensprofils errechnet sich nach der folgenden Formel:

$$\text{TWR-Verschiebung [in \%]} = \sum_{n=2}^{n=21} \Delta Q_T - (\Delta Q_T \cap \Delta Q_K)$$

ΔQ_T = prozentualer Aktivitätsanteil in den Fraktionen des Gradienten nach TWR-Behandlung

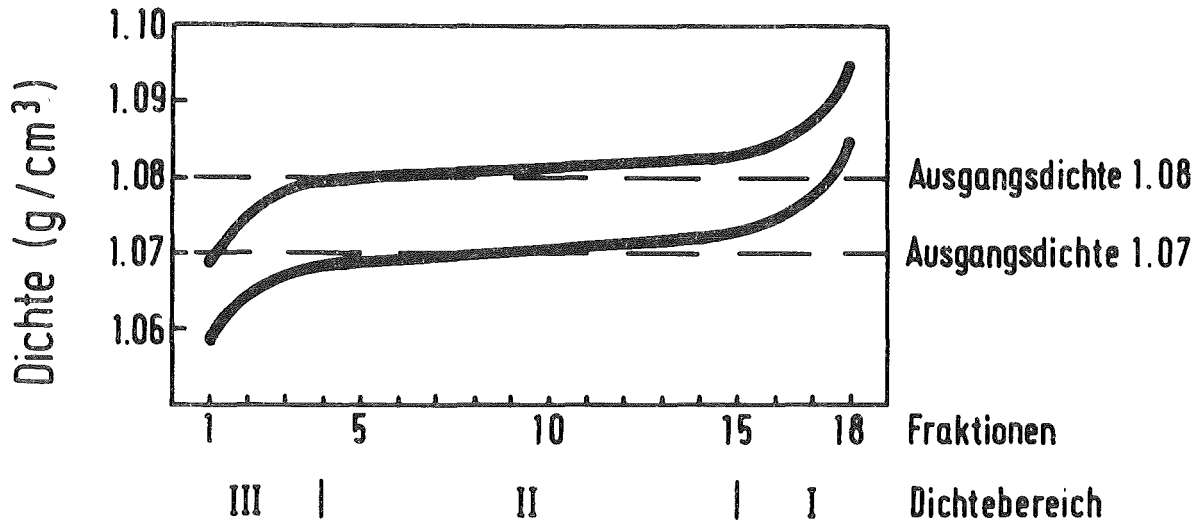
ΔQ_K = prozentualer Aktivitätsanteil in den Fraktionen bei Kontrollieren

Die "TWR-Verschiebung" entspricht also dem Mindestprozentsatz von ^{239}Pu oder Enzym, der durch TWR beeinflusst werden kann.

Wie später gezeigt wird (Abb. 6 und 8, Tabelle 22 und 23), ergaben sich bei den Saccharosegradienten Hinweise für eine Dissoziation der Verteilungsprofile von ^{239}Pu und Saurer Phosphatase. Deshalb wurde versucht, quantitativ die Übereinstimmung der ^{239}Pu -Verteilungsprofile zu verschiedenen Zeiten nach Nuklid-Injektion mit dem Verteilungsprofil der Sauren Phosphatase zu berechnen. Dazu wurde die gemeinsame Fläche der beiden sich überlappenden Verteilungsprofile bestimmt. Die Größe der gemeinsamen Fläche ist ein mögliches Maß für die maximale Assoziation von ^{239}Pu an Saure Phosphatase-haltige Lysosomen (Tab. 25).

2.7.5. Berechnung der Ergebnisse aus dem Percolllichtegradientenverfahren

Zunächst wurde jeder Percollgradient entsprechend seiner Ausgangsdichte in drei Dichtebereiche aufgeteilt (siehe auch Tabelle 29). Die Einteilung in diese drei Dichtebereiche erfolgte entsprechend dem sigmoiden Verlauf der Percollgradientendichte:



Ausgangsdichte (in g/cm^3)	Dichtebereich (in g/cm^3)		
	I ("schwer")	II ("mittel")	III ("leicht")
1.07	≥ 1.073	$< 1.073 \geq 1.069$	< 1.069
1.08	≥ 1.083	$< 1.083 \geq 1.080$	< 1.080

Die Summe des ^{239}Pu in den Fraktionen wurde als 100 % angenommen und der ^{239}Pu -Gehalt in den drei Dichtebereichen jeweils hierauf bezogen. Entsprechend wurde die gesamte, aus den 18 Fraktionen erhaltene Enzymaktivität zu 100 % angenommen und der prozentuale Anteil in jedem Dichtebereich ausgerechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Verteilung und Retention von ^{239}Pu und ^{241}Am in Organen des Chinesischen Hamsters und der Ratte

Die Retention der beiden Radionuklide ist in den Tabellen 4 - 7 dargestellt. Der eingangs schon beschriebene Speziesunterschied bezüglich der Ausscheidungsrate aus der Leber wird erneut deutlich. Auch ist im Falle des ^{239}Pu die Gesamtmenge in der Hamsterleber erheblich größer als bei der Ratte. Dagegen findet man bei der Ratte 50 - 60 % des ^{239}Pu im Skelett, beim Chinesischen Hamster sind es nur 30 - 40 %.

3.2. Gehalt an ^{59}Fe in Organen von Ratte, Maus, Chinesischem und Syrischem Hamster

In den Tabellen 8 - 11 ist die Retention von ^{59}Fe in Organen von Ratte, Maus und den beiden Hamsterspezies zusammengefaßt. Auffallend waren die starken Schwankungen in den Ergebnissen zwischen den Versuchen, so daß die Daten in den Tabellen nicht immer zusammengefaßt werden konnten. Es kann aber dennoch festgestellt werden, daß die Ausscheidungsraten aus der Leber bei Ratte und Maus nicht mit jenen des ^{239}Pu vergleichbar sind. Andererseits findet bei den Hamstern - im Gegensatz zum ^{239}Pu - eine Elimination des ^{59}Fe aus der Leber statt. Einen allgemein interessanten Befund stellt das stark unterschiedliche Verhalten des ^{59}Fe in der Milz bei den Hamstern, verglichen mit Ratte und Maus, dar.

3.3 Gehalt an Radionukliden, Eisen und Enzymen in den nach differentieller Zentrifugation erhaltenen Zellfraktionen

^{239}Pu und ^{241}Am

Die Tabellen 12 - 16 zeigen die relative subzelluläre Verteilung der Nuklide bei Kontrolltieren und nach Behandlung mit Triton WR 1339. Sehr wesentlich ist, daß bezüglich ihres Verhaltens zwischen ^{239}Pu und ^{241}Am kein Unterschied festzustellen war. Beim Chinesischen Hamster nimmt der ^{239}Pu -Gehalt im Cytosol sehr rasch ab, entsprechend einer Zunahme in der ML-Fraktion. Bereits am 10. Tag nach Nuklid-Injektion sedimentieren über 90 % des ^{239}Pu

des zellkernfreien Überstandes (E) mit der ML-Fraktion, am 36. bis 119. Tag sind es zwischen 95 und 100 %. Aus den Daten von Gruner (1978) ist ersichtlich, daß bei der Ratte der Nuklidgehalt im Cytosol zunächst auch stark abnimmt, korreliert mit einer Zunahme in der MLP-Fraktion. Nach dem Erreichen eines Maximums etwa am 8. Tag nach Nuklid-Injektion fällt die Radioaktivitätsmenge in MLP, bzw. ML, wieder auf etwa 75 % (E) ab, parallel erfolgt eine Zunahme im Cytosol auf 16 % (E). Nach TWR-Behandlung ist der Radionuklidgehalt der ML-Fraktion sowohl bei der Ratte als auch beim Chinesischen Hamster vermindert, im Cytosol entsprechend erhöht.

Stabiles Eisen und ^{59}Fe

Ein Vergleich der subzellulären Verteilung beider Eisenisotope zeigt (Tab. 17 und 18), daß sowohl beim Chinesischen Hamster als auch bei der Ratte die Verteilungsmuster prinzipiell übereinstimmen und somit durch ^{59}Fe alle Eisenspeicher ausreichend markiert werden. Bei beiden Tierspezies bleibt der Eisengehalt des Cytosols bei etwa 50 % von E, beim Chinesischen Hamster scheint der Eisengehalt der ML-Fraktion höher zu sein als bei der Ratte. Es bestehen bei beiden Spezies grundsätzliche Unterschiede zur Verteilung der Transurane.

Enzyme

Die relative subzelluläre Verteilung von Markerenzymen der Lysosomen, perizellulären Membranen und Membranen des Endoplasmatischen Reticulums ist den Tabellen 19 bis 21 zu entnehmen. Beim Chinesischen Hamster stimmen die Verteilungsmuster der lysosomalen Enzyme weitgehend überein. Bei der Ratte ist der extrem hohe Gehalt der ML-Fraktion an N-Acetyl- β -Glukosaminidase, korreliert mit einer sehr geringen Enzymmenge im Cytosol, auffallend. Bei beiden Tierspezies ist das Verteilungsmuster von Kathepsin D durch TWR-Behandlung am stärksten beeinflusst, der Enzymgehalt der Cytosolfraktion beträgt nach TWR-Behandlung über 40 % (E).

Die Verteilungsmuster der 5'-Nucleotidase und Glukose-6-Phosphatase stimmen bei Chinesischem Hamster und Ratte mehr oder weniger weitgehend überein. Die Mikrosomenfraktion der Rattenleber weist

einen etwas erniedrigten Gehalt an Alkalischer Phosphodiesterase auf, verglichen mit dem Gehalt an 5'Nucleotidase. Die Verteilung der Glutamatdehydrogenase wurde nicht untersucht, nach Winter (1980) befinden sich 100% von E in MLP. Es kann somit festgestellt werden, daß wir in ML jeweils mehr als zwei Drittel der ^{239}Pu -, ^{241}Am - und Enzymaktivität erfaßt haben.

3.4. Dichtegradientenzentrifugation

3.4.1. Verteilungsprofile von Nukliden und Enzymen im Saccharosedichtegradienten

3.4.1.1. Verteilung von ^{239}Pu , ^{241}Am und Enzymen

In Abb. 3 sind die Verteilungsprofile der lysosomalen Enzyme bei Kontrolltieren und nach Behandlung mit Triton WR 1339 dargestellt. Sowohl bei den Kontrollen als auch nach TWR-Behandlung stimmen die Verteilungsprofile bei beiden Tierspezies prinzipiell überein. Die Verteilungsprofile aller getesteten lysosomalen Enzyme sind unter TWR-Einfluß zu leichteren Dichten verschoben, was in einer Änderung ihrer Medianen Dichte deutlich zum Ausdruck kommt (Tab. 22). Die Unterschiede zwischen Kontroll- und TWR-Tieren hinsichtlich der lysosomalen Enzymverteilung sind bei der Ratte stärker ausgeprägt als beim Chinesischen Hamster. Als Repräsentant für die lysosomalen Enzyme wurde in den folgenden Abbildungen immer die Saure Phosphatase als lysosomales Leitenzym zum Vergleich dargestellt. Abb. 4 zeigt die Verteilungsprofile der Markerenzyme von Lysosomen, Mitochondrien, Plasmamembranen und Endoplasmatischem Reticulum. Die Verteilungsprofile stimmen zwischen beiden Tierspezies weitgehend überein. Die Glutamatdehydrogenase (GDH) und Glukose-6-Phosphatase (G-6-P) sind durch TWR nicht beeinflussbar, die Daten aus Kontroll- und TWR-Versuchen konnten daher vereinigt werden. Eine nachweisbare Verschiebung durch TWR zeigt die 5'Nucleotidase. Wie aus Abb. 5 hervorgeht, ist der TWR-Einfluß auf das Verteilungsmuster der Alkalischen Phosphodiesterase weit weniger ausgeprägt, was auch in den Medianen Dichten in Tabelle 22 zum Ausdruck kommt. Der TWR-Effekt bei der 5'Nucleotidase ist nicht durch unspezifische Saure Phos-

phatase-Aktivität bedingt, wie ein Vergleich der Profile ohne und mit NaF zeigt (Abb. 5). Hinsichtlich ihrer Verteilung im Saccharosedichtegradienten konnte zwischen den beiden Transuranen weder beim Chinesischen Hamster noch bei der Ratte ein deutlicher Unterschied festgestellt werden, die beiden Radionuklide können daher gemeinsam abgehandelt werden. Wie aus Tabelle 23 hervorgeht, hat eine Verlängerung der Zentrifugationszeit von 4 auf 16 Stunden keinen signifikanten Einfluß auf die Verteilungsmuster von ^{239}Pu und ^{241}Am im Saccharosedichtegradienten, so daß in den Abb. 6 bis 9 die Ergebnisse aus den 16 Stunden-Versuchen nicht berücksichtigt wurden. Abb. 6 und 7 zeigen die Verteilungsprofile von ^{239}Pu und ^{241}Am beim Chinesischen Hamster und bei der Ratte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Radionuklid-Injektion. Bei der Ratte ändert sich das Verteilungsmuster beider Nuklide im Verlaufe der Zeit nicht wesentlich. Dies zeigen auch die Medianen Dichten der Verteilungsprofile in Tabelle 23. Vom 10. zum 70. Tag nach Radionuklid-Injektion findet man lediglich eine angedeutete Verminderung der Medianen Dichte beim ^{239}Pu , bei ^{241}Am ist diese etwas stärker ausgeprägt. Beim Chinesischen Hamster dagegen verschieben sich die Verteilungsprofile vom 10. zum 70. Tag systematisch zu geringeren Dichten. Die Medianen Dichten unterscheiden sich bereits am 36. Tag statistisch signifikant von jenen der lysosomalen Enzyme (Tab. 22 und 23). Die Verminderung der Medianen Dichte erfolgt von 1.162 am 4. Tag nach ^{239}Pu -Injektion sehr rasch auf 1.154 am 10. Tag, danach linear bis zum 70. Tag auf 1.138.

In den Abb. 8 und 9 ist der Einfluß von TWR auf die Verteilungsprofile von ^{239}Pu und ^{241}Am zu verschiedenen Zeiten nach Radionuklid-Injektion dargestellt. Die i.p. Injektion erfolgte 4 Tage vor der Sektion, beim 4-Tage Versuch mit Chinesischen Hamstern (Abb. 8) wurde TWR 6 Stunden nach der Nuklid-Injektion verabreicht. Bei der Ratte werden am 10. Tag nach Nuklid-Injektion unter dem Einfluß von TWR die Verteilungsprofile beider Radionuklide zu leichten Dichten verschoben, entsprechend vermindern sich die Medianen Dichten (Tab. 23).

Bei Ratten werden am 10. Tag etwa 64 % der Sauren Phosphatase und ca. 50 % des ^{239}Pu durch TWR verschoben (Tabelle 24). Zu späteren Zeiten nach Nuklid-Injektion ist dieser TWR-Effekt immer noch deutlich vorhanden, wenn auch etwas geringer ausgeprägt. So können am 70. Tag nach ^{239}Pu -Injektion unter entsprechender Verminderung der Medianen Dichte (Tabelle 23) noch immer 31 % der Radionuklid-Aktivität zu leichten Dichten verschoben werden. Beim Chinesischen Hamster ist am 4. Tag nach ^{239}Pu -Injektion ebenfalls ein deutlicher TWR-Effekt vorhanden (Abb. 8, Tab. 23 und 24). Wie bereits erwähnt und aus den Abb. 6 - 9, sowie Tabelle 23 ersichtlich, verschieben sich die Radionuklidverteilungsprofile beim Chinesischen Hamster bereits bei Kontrollen vom 4. bis zum 70. Tag kontinuierlich zum leichten Dichtebereich. Im Gegensatz zu der Ratte ist daher beim Chinesischen Hamster zu späteren Zeiten kein "typischer" TWR-Effekt nachweisbar, am 70. Tag nach ^{239}Pu -Injektion ist nach TWR-Behandlung sogar eine Erhöhung der Medianen Dichte von 1.138 auf 1.165 festzustellen. Zusammenfassend kann man also sagen, daß bei der Ratte zu allen untersuchten Zeiten eine deutliche Korrelation zwischen dem Verhalten der Sauren Phosphatase und dem der beiden Radionuklide besteht, während dies beim Chinesischen Hamster nur zu ganz frühen Zeiten nach Radionuklid-Injektion festzustellen ist. Den Ergebnissen in Tabelle 25 zufolge, nimmt die Übereinstimmung der Verteilungsprofile von ^{239}Pu und der Sauren Phosphatase bei der Ratte von 90 % am 10. Tag nach Nuklid-Injektion bis zum 36. Tag um etwa 10 % ab, bleibt aber dann bis zum 70. Tag konstant bei etwa 80 %. Eine genaue Analyse der ^{239}Pu -Verteilungskurven zeigt, daß diese Abnahme der Übereinstimmung mit dem Saure Phosphatase-Profil auf einer leichten Abflachung des ^{239}Pu -Verteilungsprofils im Maximumbereich korreliert mit einer geringen Zunahme im schweren und leichten Dichtebereich, beruht. Die Modale Dichte ändert sich hierbei nicht. Diesen Befund bestätigen auch die Ergebnisse in Tabelle 26. In den Fraktionen 2 -11 (entspricht einem Dichtebereich von 1.19 - 1.14) befinden sich rund 89 % der Saure Phosphatase-Aktivität und 88 % der ^{239}Pu -Aktivität am 10. Tag nach Nuklid-Injektion. Zum 70. Tag vermindert sich der ^{239}Pu -Gehalt in diesem Dichtebe-

reich um lediglich 7 %. Beim Chinesischen Hamster nimmt die Übereinstimmung der Profile kontinuierlich von ca. 91 % am 4. Tag auf 71 % am 70. Tag nach Nuklid-Injektion ab (Tabelle 25). Diese Abnahme beruht auf einer Verschiebung des ^{239}Pu -Profils ausschließlich in den leichten Dichtebereich, wobei im Gegensatz zur Ratte auch die Modale Dichte von 1.19 auf 1.14 verringert wird. Ganz deutlich kommt dies in Tabelle 26 zum Ausdruck. In den Fraktionen 2 - 11 sind 78 % der Sauren Phosphatase und 80 % des ^{239}Pu -Gehaltes am 4. Tag nach Nuklid-Injektion angereichert. Der ^{239}Pu -Gehalt in diesem Dichtebereich verringert sich auf 76 % am 10. Tag und 55 % am 70. Tag nach Radionuklid-Injektion. In einer Sonderversuchsreihe wurde TWR nicht 4, sondern 24 Tage vor Sektion und 6 Tage nach ^{239}Pu -Injektion verabreicht. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in den Abb. 10 und 11 und den Tab. 22 und 24 dargestellt. Sowohl beim Chinesischen Hamster als auch bei der Ratte sind alle getesteten lysosomalen Enzyme unter dem TWR Einfluß zum leichteren Dichtebereich verschoben (siehe Abb. 10). Bei der Ratte ist dieser Effekt nun allerdings weit weniger ausgeprägt, verglichen mit den 4-Tage-TWR-Versuchen. Die Medianen Dichten nach 24 Tagen TWR sind deutlich höher als die 4-Tage-Werte (Tabelle 22), wohingegen beim Chinesischen Hamster die Medianen Dichten nach 4 bzw. 24 Tagen TWR-Einfluß keinen signifikanten Unterschied aufweisen. Auffallend ist bei beiden Tierspezies die Übereinstimmung der Medianen Dichten von N-Acetyl- β -Glukosaminidase und Arylsulfatase nach 24 Tagen TWR. Sowohl beim Chinesischen Hamster als auch bei der Ratte weisen diese beiden Enzyme die höchsten Medianen Dichten auf, gefolgt von der Sauren Phosphatase. Das Kathepsin D hat bei beiden Tierspezies nach 24 Tagen TWR die geringste Mediane Dichte. Abb. 11 zeigt das Verteilungsmuster von ^{239}Pu 24 Tage nach TWR-Injektion (nach 4- und 16-stündiger Zentrifugationszeit), sowie nach Zugabe von Triton X-100 zu der ML-Fraktion vor Beginn der Zentrifugation. Die Verteilungsprofile von ^{239}Pu in Kontrollversuchen 36 Tage nach Nuklid-Injektion (siehe auch Abb. 6) wurden bei diesen Versuchen als Kontrolle zum Vergleich herangezogen. Nach 4 und nach 16 Stunden Zentrifugation ist bei beiden Tierspezies die ^{239}Pu -Aktivität unter dem Einfluß von

TWR zum leichten Dichtebereich verschoben. Die quantitative Berechnung in Tabelle 24 zeigt, daß das TWR bei beiden Tier- spezies eine Verschiebung der ^{239}Pu -Aktivität um 34 % und der Sauren Phosphatase um fast 50 % der jeweiligen Kontrolle bewirkt. Zum Vergleich sei daran erinnert, daß bei den zuvor beschriebenen Versuchen mit nur 4-tägiger TWR-Einwirkungszeit beim Chinesischen Hamster nur 16 % des ^{239}Pu beeinflußt werden konnten (Tabelle 24). Bei der Ratte wird unter dem Einfluß von TX 100 in den 24-Tage-TWR-Versuchen im gleichen Maße wie in den Kontrollversuchen ein beträchtlicher Anteil der ^{239}Pu -Aktivität unsedimentierbar. Beim Chinesischen Hamster erfolgt diese Radionuklidfreisetzung durch TX 100 nur im 24-Tage-TWR-Versuch, im Kontrollversuch zeigt das TX 100 keinen nachweisbaren Effekt (siehe unten).

In den Abb. 12 -14 ist der Einfluß von TX 100 auf die Verteilungsprofile der lysosomalen Enzyme und der Radionuklide gezeigt. Aus Abb. 12 ist zu ersehen, daß die Zugabe von TX 100 zu der ML-Fraktion vor Beginn der Zentrifugation zu einer Zerstörung der Lysosomen führt. Als Folge davon werden alle lysosomalen Enzyme in unterschiedlich starkem Maße unsedimentierbar. Das Kathepsin D zeigt bei beiden Tierspezies einen geringeren Effekt, auch ist bei der Ratte kaum N-Acetyl- β -Glukosaminidase-Aktivität freigesetzt, das Verteilungsprofil ist jedoch sehr breit über den gesamten Gradienten verteilt. Beim Chinesischen Hamster ist die N-Acetyl- β -Glukosaminidase nahezu völlig unsedimentierbar. Das TX 100 bewirkt bei der Ratte zu allen untersuchten Zeitpunkten eine Freisetzung beider Radionuklide. Beim Chinesischen Hamster ist nur am 10. Tag nach Radionuklid-Injektion ein eindeutiger Effekt durch TX 100 nachweisbar, zu späteren Zeiten kann ein TX 100-Einfluß nicht mehr gesichert werden (Abb. 13 und 14).

3.4.1.2. Stabiles Eisen und ^{59}Fe im linearen Saccharosedichte- gradienten

Abb. 15 zeigt einen Vergleich der Verteilungsprofile von stabilem Eisen und ^{59}Fe nach 16-stündiger Zentrifugationszeit.

Bei der Ratte stimmen die Verteilungsmuster beider Isotope recht gut überein, beim Chinesischen Hamster weist das ^{59}Fe eine breitere Verteilung auf als das stabile Eisen. Die Modalen Dichten sind jedoch identisch, so daß bei beiden Tierarten das ^{59}Fe als hinreichend zuverlässiger Marker für das Eisenspeichersystem der Leber gelten kann. In Abb. 16 sind die Verteilungsprofile von ^{59}Fe nach 4 und 16 Stunden Zentrifugation, sowie unter dem Einfluß von TX 100 dargestellt. Beim Chinesischen Hamster ist die ^{59}Fe -Radioaktivität nach 4-stündiger Laufzeit sehr breit über den Gradienten verteilt, die Ausdehnung der Zentrifugationszeit auf 16 Stunden bewirkt eine Verschiebung des Profils zum höheren Dichtebereich. Die Mediane Dichte erhöht sich entsprechend von 1.161 auf 1.176 (Tab. 23). TWR-Behandlung der Hamster führt unabhängig von der Zentrifugationszeit zu einer geringen Verschiebung in den leichten Dichtebereich, damit verbunden zu einer Verminderung der Medianen Dichte von 1.161 auf 1.145. Das ^{59}Fe -Profil bei der Ratte weist nach 4-stündiger Laufzeit eine deutlich bimodale Verteilung auf. Der Radioaktivitätsanteil im leichten Dichtebereich wird durch Verlängerung der Zentrifugationszeit auf 16 Stunden völlig in den höheren Dichtebereich verschoben, einhergehend mit einer Erhöhung der Medianen Dichte von 1.159 nach 4 Stunden auf 1.196 nach 16 Stunden Zentrifugation. Eine TWR-Behandlung wurde bei der Ratte bei den ^{59}Fe -Versuchen nicht durchgeführt. Unter dem Einfluß von TX 100 verschwindet nach 4-stündiger Zentrifugation der ^{59}Fe -Peak im schweren Dichtebereich bei beiden Tierarten, nach 16-stündiger Zentrifugation ist ein TX 100-Effekt nicht mehr gesichert nachzuweisen. Für die spätere Diskussion wurden die Verteilungsprofile von ^{59}Fe und ^{239}Pu in den Abb. 17 vergleichend zusammengestellt.

3.4.1.3. Einfluß der ^{239}Pu -Dosis auf die Verteilung des Radionuklids im Saccharosedichtegradienten

In diesem Sonderversuch wurde untersucht, ob der Einfluß der ^{239}Pu -Dosis bei der Verteilung des Radionuklids im Dichtegra-

dienten eine Rolle spielt. Es sollte geprüft werden, ob die Verschiebung der ^{239}Pu -Profile beim Chinesischen Hamster (Abb. 6) eventuell durch eine radiogene Schädigung der Leber am 70. Tag bedingt sein könnte. Die üblicherweise verabfolgte Dosis lag bei $3 \cdot 10^4 \text{ Bq} \cdot \text{kg}^{-1}$. Eine histologische Untersuchung der Lebern von 16 Chinesischen Hamstern 70 Tage nach Injektion dieser Dosis hatte keine pathologischen Befunde erbracht *. Verglichen wurden die ^{239}Pu -Verteilungsprofile nach Injektion von $4.26 \cdot 10^5 \text{ Bq} \cdot \text{kg}^{-1}$ und $2.96 \cdot 10^3 \text{ Bq} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^{239}Pu -Citrat 70 Tage nach der Nuklid-Injektion. Abb. 18 zeigt, daß sowohl nach der hohen als auch nach der geringen Dosis die Verteilungsprofile zum leichten Dichtebereich verschoben sind.

3.4.1.4. Verteilungsprofile von ^{234}Th nach Injektion einer ^{232}Th -haltigen ^{234}Th -Nitrat-Lösung

Durch Injektion einer ^{234}Th -Nitrat-Lösung mit ^{232}Th als Träger beim Chinesischen Hamster sollte eine Markierung des Reticuloendotheliären Systems der Leber erzielt werden. Der ^{234}Th -Gehalt der Leber betrug in allen Versuchen zwischen 60 und 75 % der injizierten Dosis, ein deutlicher Hinweis darauf, daß das Radionuklid in einer polymeren Form vorlag. Am 4. Tag nach Nuklid-Injektion erhält man ein ^{234}Th -Verteilungsprofil, dessen Mediane Dichte (1.19) noch höher ist als die des ^{239}Pu am 4. Tag (1.16), und das keinesfalls mit den Verteilungsprofilen der Transurane am 70. Tag übereinstimmt (Abb. 19 und Tab. 23).

* An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Hofmann, Pathologisches Institut der Universität Heidelberg, für die Durchführung der histologischen Untersuchungen herzlich danken.

3.4.2. Verteilungsprofile von Radionukliden und Enzymen im Metrizamiddichtegradienten

3.4.2.1. ^{239}Pu -, ^{241}Am - und Enzymverteilung

Die Verteilungsprofile der lysosomalen Enzyme stimmen nach 6-stündiger Zentrifugation bei beiden Tierspezies weitgehend überein (Abb. 20). Alle lysosomalen Enzyme sind im leichten Dichtebereich lokalisiert und zeigen eine deutlich bimodale Verteilung mit Aktivitätsmaxima um 1.12 und 1.06 (abgesehen von der N-Acetyl- β -Glukosaminidase bei der Ratte). Sie sind damit eindeutig von den Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Reticulum unterscheidbar, deren Markerenzyme Mediane Dichten von 1.15 - 1.20 aufweisen (Abb. 21, Tabelle 27). Auffallend ist das breite und schlecht reproduzierbare Verteilungsprofil der GDH bei der Ratte. Bei beiden Tierspezies haben die Verteilungsprofile von 5'Nucleotidase und Saurer Phosphatase eine auffallende Ähnlichkeit, lediglich das Aktivitätsmaximum um 1.06 ist bei der 5'Nucleotidase noch stärker ausgeprägt als bei der Sauren Phosphatase. Eine Hemmung der unspezifischen, fluorid-sensitiven Sauren Phosphatase mit NaF bei der 5'Nucleotidase-Bestimmung (siehe Abb. 22) hat keinen entscheidenden Einfluß auf die Verteilungskurve. Die Alkalische Phosphodiesterase-Aktivität ist sehr breit über den gesamten Gradienten verteilt. Sie unterscheidet sich bei beiden Spezies deutlich von der 5'Nucleotidase. In den Abbildungen 23 und 24 sind die Verteilungsprofile von ^{239}Pu und ^{241}Am im Vergleich zu denen der Sauren Phosphatase und GDH dargestellt. Radionuklide und Saure Phosphatase zeigen zu frühen Zeiten nach Radionuklid-Injektion bei Ratte und Hamster sehr ähnliche Verteilungsprofile und eine klare Dissoziation vom Verteilungsprofil der GDH und Glukose-6-Phosphatase. Am 70. Tag nach Nuklid-Injektion sind die Radionuklidprofile in geringem Maße und unsystematisch verändert, die Unterschiede lassen sich aber bis auf ^{239}Pu bei der Ratte nicht eindeutig statistisch sichern.

Entgegen den Resultaten im Saccharosedichtegradienten bewirkt eine Verlängerung der Zentrifugationszeit von 6 auf 16 Stunden im Metrizamiddichtegradienten eine mehr oder weniger deutliche Veränderung der Verteilungsprofile (Abb. 25 - 27, Tab. 27). Bei den lysosomalen Enzymen führt dies (mit Ausnahme der N-Acetyl- β -Glukosaminidase und des Kathepsin D bei der Ratte) zu einer Abnahme des Enzymgehaltes in den letzten leichten Fraktionen, die eindeutig bimodale Verteilung bleibt jedoch bestehen. Bei der Ratte werden die Leitenzyme der Plasmamembranen deutlich zum schweren Dichtebereich verschoben. Das GDH-Profil ist bei beiden Spezies verändert, es erscheint jetzt auch Enzymaktivität in den leichtesten Fraktionen. Der Laufzeiteffekt auf die ^{239}Pu -Verteilung ist vergleichsweise gering (Abb. 28, Tab. 28).

3.4.2.2. Verteilung von ^{239}Pu , ^{241}Am und Enzymen im Metrizamid-dichtegradienten unter dem Einfluß von Triton X-100

Die Zugabe von TX 100 zur ML-Fraktion vor der Zentrifugation führt auch im Metrizamidgradienten zur Unsedimentierbarkeit der lysosomalen Enzyme. Einzige Ausnahme ist auch hier die N-Acetyl- β -Glukosaminidase der Ratte (Abb. 29). Das Verteilungsprofil dieses Enzyms wird unter dem Einfluß von TX 100 deutlich in den schweren Dichtebereich verschoben. Aus Abb. 30 ist ersichtlich, daß das TX 100 in gewissem Grade auch die Verteilungsprofile der anderen Markerenzyme beeinträchtigt. Allein die Aktivitätsverteilung der 5'Nucleotidase zeigt keinerlei TX 100-Effekt. In auffallendem Gegensatz zur Ratte bewirkt TX-Zugabe beim Hamster keine wesentliche Umverteilung der Nuklide (Abb. 31 und 32).

3.4.2.3. Verteilung von ^{59}Fe im Metrizamiddichtegradienten in Abhängigkeit von der Zentrifugationszeit und unter dem Einfluß von TX 100

Nach 6-stündiger Zentrifugationszeit ist die ^{59}Fe -Radioaktivität mit einer Medianen Dichte von 1.144 beim Chinesischen Ham-

ster und 1.153 bei der Ratte im leichteren Dichtebereich lokalisiert (Abb. 33, Tab. 28). Beim Chinesischen Hamster ist bereits nach 6-stündiger Zentrifugation ein kleiner ^{59}Fe -Peak im schweren Dichtebereich angedeutet, der durch die Verlängerung der Zentrifugation auf 16 Stunden etwas verstärkt wird. Die Mediane Dichte erhöht sich entsprechend auf 1.161. Bei der Ratte bewirkt die Ausdehnung der Laufzeit eine deutliche Verschiebung von ^{59}Fe in den schweren Dichtebereich, es resultiert ein bimodales Verteilungsmuster mit einer Medianen Dichte von 1.191. Beim Chinesischen Hamster wurden die Verteilungsprofile von ^{59}Fe ebenso wie jene der Transurane durch die Zugabe von TX 100 nicht eindeutig verändert. Bei beiden Spezies führt die Verlängerung der Laufzeit zu einer Verschiebung in den schwereren Dichtebereich. Ein ausgeprägter TX 100 Einfluß ist nicht zu erkennen. Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei den Transuranen, hat TX 100 auch bei der Ratte im Falle des ^{59}Fe keinen wesentlichen Effekt.

3.4.3. Ergebnisse im Percolllichtegradienten

Die im Percolllichtegradienten erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 29 zusammengefaßt. Im Percoll-Gradienten ist es unter bestimmten Bedingungen möglich, die Leitenzyme für perizelluläre Membranen und Lysosomen besser voneinander zu unterscheiden, als in Saccharose - und vor allem in Metrizamiddichtegradienten. In unseren Versuchen erwiesen sich Percoll-Ausgangsdichten von 1.07 und 1.08 g/cm^3 als gut geeignet zur deutlichen Trennung von lysosomaler Enzymaktivität von jener der perizellulären Membranen. Die Enzymverteilung wird durch Erhöhung der Percoll-Ausgangsdichte von 1.07 auf 1.08 kaum beeinflusst. In beiden Percollgradienten weisen die lysosomalen Enzyme und die Enzyme der perizellulären Membranen, ein eindeutig gegensinniges Verhalten bezüglich ihrer Anreicherung in Dichtestufe I oder III auf. Die Verteilung des ^{239}Pu stimmt am 10. Tag mit jener der lysosomalen Enzyme qualitativ insofern überein, als nur ein relativ kleiner Anteil in den leichten Fraktionen (Stu-

feIII) lokalisiert ist. Im Gehalt in Stufe II unterscheidet sich ^{239}Pu deutlich von N-Acetyl- β -Glukosaminidase und Kathepsin D. Eine Korrelation mit 5'Nucleotidase oder Alkalischer Phosphodiesterase ist in keiner Weise erkennbar. Analog zu den Ergebnissen im Saccharosedichtegradienten (vgl. Abb. 6) nimmt der ^{239}Pu -Gehalt im schweren Dichtebereich unabhängig von der Percoll-Ausgangsdichte vom 10. zum 70. Tag linear ab, korreliert mit einer linearen Zunahme im leichten Dichtebereich. Eine eindeutige Korrelation mit einer der beiden Enzymgruppen ist am 70. Tag nicht mehr erkennbar.

3.5. Ergebnisse aus den Versuchen zur Lipidextraktion

Die Versuche zur Extraktion von ^{239}Pu mit Lipiden brachten folgende Ergebnisse (je ein Experiment):

Tage nach ^{239}Pu -Inj.	^{239}Pu -Gehalt (in %)		
	im Lipidextrakt	im Rückstand	Ausbeute
4	5.0	95.0	88.2
10	5.5	94.5	76.2
10	4.3	95.7	83.2
70	4.9	95.1	99.4
70	10.1	89.9	72.2

Der ^{239}Pu -Gehalt im Lipidextrakt- und Rückstand erwies sich als unabhängig vom Zeitpunkt der Radionuklid-Injektion, die Daten wurden daher vereinigt. Im Lipidextrakt waren 6 ± 1 %, im Rückstand 94 ± 1 % des sedimentierbaren ML-Anteils.

3.6. Filtrierbarkeit von ^{239}Pu

Auch hinsichtlich der Filtrierbarkeit von ^{239}Pu durch Millipore-Filter war kein "Zeiteffekt" erkennbar (Tab. 30). Aus der ML-

Fraktion waren ca. 80 % des Nuklids durch einen 1.2 μm -Filter und nur 10 - 15 % durch den 0.45 μm -Filter filtrierbar. Die entsprechenden Werte für die Gradientenfraktionen lagen bei 32 - 56 % für 1.2 μm - und zwischen 6 - 12 % für 0.45 μm - Filter. Der filtrierbare ^{59}Fe -Anteil in der ML-Fraktion war im Falle des 1.2 μm -Filters ähnlich jenem des ^{239}Pu , beim 0.45 μm -Filter jedoch deutlich höher als ^{239}Pu . Erwähnt sei, daß 70 - 80 % des ^{59}Fe in der Mikrosomenfraktion und im Cytosol selbst durch ein 0.45 μm -Filter filtrierbar waren. Die Ausbeuten lagen bei diesen Versuchen bei über 90 % der eingesetzten Radionuklidaktivität.

4. Diskussion

Die Hauptaufgabe der Arbeit bestand darin, den primären Ablagerungsort für Plutonium in der Leberzelle zu definieren, und den Einfluß der Zeit hierauf zu analysieren. Eine große Bedeutung bei diesem Problem kam hierbei dem in der Einleitung beschriebenen Speziesunterschied und dessen Ursachen zu. Der Vergleich von ^{239}Pu mit ^{241}Am sollte klären, inwieweit nuklidspezifische Effekte vorliegen. Die Kombination mehrerer Gradientenmethoden und Charakterisierung der Zellorganellen anhand von Leitenzymen sollten eine eindeutige Zuordnung des ^{239}Pu ermöglichen und aufzeigen, ob Unterschiede bezüglich des Transuran-Bindungsortes den Speziesunterschied bedingen. Eine mögliche Beteiligung des Eisenspeichersystems bei der Transuranbindung wurde mit Hilfe von ^{59}Fe und stabilem Fe untersucht. Dabei ergaben sich interessante Aspekte hinsichtlich des Eisenstoffwechsels.

Zunächst sollen die Ergebnisse der differentiellen Zentrifugation und Dichtegradientenzentrifugation besprochen werden. In Übereinstimmung mit den von Boocock et al. (1970) sowie von Gruner (Gruner, 1978) erhaltenen Daten für die Ratte erfolgt auch beim Chin. Hamster eine rasche Aufnahme beider Radionuklide vom Cytosol in die Partikulärfraktion (Tab. 12 und 14), (vergl. auch Winter und Seidel 1982). Während jedoch beim Chin. Hamster zu keiner Zeit eine Nettoausscheidung der Nuklide aus der ML-Fraktion stattfindet, fällt der Transurangehalt in der ML-Fraktion bei der Ratte nach Erreichen eines Maximums wieder ab (Tab. 15 und 16, Gruner, 1978), möglicherweise ein Ausdruck der bereits vonstatten gehenden Elimination der Transurane aus der Rattenleber. Bei beiden Spezies sedimentiert der größte Teil der Radionuklide mit der ML-Fraktion, der Transurangehalt in der Mikrosomenfraktion und im Cytosol ist dagegen vernachlässigbar gering. Die nachfolgend diskutierten Ergebnisse beschränken sich daher auf die Verhältnisse in der ML-Fraktion.

Es wurden drei unterschiedliche Medien benutzt, die es ermöglichen sollten, die Profile der Zellorganellen möglichst deutlich voneinan-

der unterscheidbar zu machen. Bezüglich des Verhaltens der einzelnen Leitenzyme traten hierbei keine solchen Speziesunterschiede auf, die im Hinblick auf das Hauptanliegen der Arbeit näher diskutiert werden müßten. Es sei lediglich darauf hingewiesen, daß in Übereinstimmung mit den in der Einleitung erwähnten Befunden im Saccharosegradienten die Saure Phosphatase bei beiden Tierspezies das "leichteste" lysosomale Enzym ist, wohingegen N-Acetyl- β -Glukosaminidase und Kathepsin D eine übereinstimmende, signifikant höhere Mediane Dichte aufweisen. Alle lysosomalen Enzyme zeigen eine deutliche TWR-Verschiebbarkeit (Abb.3, Tab.22) und damit verbunden eine klare Dissoziation von den Verteilungsprofilen der Glukose-6-Phosphatase und GDH (Abb.4), die beide durch TWR nicht beeinflussbar sind. Sowohl in den Kontrollversuchen wie auch nach Behandlung mit TWR bestehen jedoch deutliche Überlagerungen von lysosomaler Enzymaktivität mit jener der perizellulären Membranen, besonders im Falle der Sauren Phosphatase und 5' Nucleotidase. Die Alkalische Phosphodiesterase zeigt bedeutend weniger Übereinstimmung mit dem lysosomalen Leitenzym und ist außerdem im Gegensatz zur 5' Nucleotidase nicht TWR-verschiebbar (Abb.5, Tab.22). Zusammenfassend kann man feststellen, daß im Saccharosegradienten durch direkte Beeinflussung der Lysosomen mit TWR eine klare Trennung von den Mitochondrien und dem ER erzielt wird. Überlagerungen von Lysosomen und Plasmamembranen bestehen bezüglich der 5'Nucleotidase, bei der Alkalischen Phosphodiesterase sind sie weit weniger ausgeprägt.

Die Verwendung von Metrizamid als Gradientenmedium erlaubt eine Trennung der Lysosomen von den Mitochondrien und dem ER, ohne dabei auf die Zellorganellen direkten Einfluß nehmen zu müssen (Wattiaux et al., 1978). Entgegen den Befunden von Wattiaux, der eine Dissoziation der Enzymprofile nur nach Unterschichtung des Metrizamidgradienten erzielte (Wattiaux et al., 1978), zeigen die Abbildungen 1 und 2 eine gute Trennung der lysosomalen Enzyme von der Glukose-6-Phosphatase und GDH auch nach Überschichtung des Gradienten. Die GDH besitzt im Metrizamid- und Saccharosegradienten ähnliche Mediane Dichten (Tab.22 und 27), die mit den

von Rickwood und Beaufay im Sucrosegradienten ermittelten Gleichgewichtsdichten für Lebermitochondrien gut übereinstimmen (Beaufay und Berthet, 1963; Rickwood und Birnie, 1975). Verglichen mit dem Saccharosegradienten weisen die Lysosomen im Metrizamidgradienten eine erheblich geringere Dichte auf (Tab.22 und 27), was von Rickwood mit einem Schwellen der Lysosomen im leicht hypotonischen Medium begründet wird (Rickwood und Birnie, 1975). Die ausgeprägte bimodale Verteilung der lysosomalen Enzyme im Metrizamidgradienten mit einem mehr oder weniger beträchtlichen Enzymgehalt in den leichtesten Fraktionen, könnte auf einer Freisetzung von lysosomaler Enzymaktivität beruhen. Inwieweit dies jedoch wirklich der Fall ist, kann nach den vorliegenden Versuchen nicht entschieden werden. Ein ebenfalls bimodales und die lysosomalen Enzyme weitgehend überlagerndes Verteilungsprofil, zeigt die 5' Nucleotidase (Abb.21). Wie im Saccharosegradienten ist jedoch die Übereinstimmung von lysosomalen Enzymen mit der Alkalischen Phosphodiesterase weniger ausgeprägt. Zusammenfassend ergibt sich, daß durch die Verwendung des Metrizamidgradienten eine sehr gute Trennung der Lysosomen von den Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Reticulum erzielt wird. Die Überlagerung der lysosomalen Enzyme mit jenen der Plasmamembranen, insbesondere der 5'Nucleotidase, lassen eine eindeutige Zuordnung zu Lysosomen oder perizellulären Membranen nicht zu.

Eine klare Trennung von Lysosomen und Plasmamembranen ist hingegen im Percollgradienten möglich. Das Percoll-Medium soll aufgrund seiner physiologischen Ionenstärke, Isoosmolalität und geringen Viskosität die Sedimentations-Eigenschaften von Zellorganellen nicht verändern (Pertoft und Laurent, 1977). Die im Percollgradienten erhaltene Gleichgewichtsdichte sollte daher mit der nativen Dichte eines Zellorganells übereinstimmen. Pertoft beschrieb Gleichgewichtsdichten von 1.04 - 1.11 für Rattenleberlysosomen und 1.02 - 1.03 für Rattenleberplasmamembranen. Wie Tab. 29 zeigt, weisen 80 - 90% der Lysosomen aus der Chin. Hamsterleber eine Gleichgewichtsdichte von 1.08 oder höher auf, wogegen 90% der Plasmamembranen über eine Gleichgewichtsdichte von höchstens 1.07 verfügen. Die Verwendung von Percollgradienten geeigneter

Ausgangsdichte erlaubt somit eine klare Trennung der Lysosomen von den perizellulären Membranen.

Die subzelluläre Verteilung von ^{59}Fe stimmt im wesentlichen mit der von stabilem Fe überein (Tab.17 und 18). Auch Deter und Thiers fanden ca. 50% des stabilen Eisens im Cytosol und 10 - 15% in der ML-Fraktion (Deter, 1975; Thiers und Vallee, 1957). Auch im Saccharosegradienten ergaben sich keine grundsätzlichen Unterschiede hinsichtlich der Verteilung der beiden Eisenisotope (Abb.15). Demnach kann man wohl davon ausgehen, daß durch das ^{59}Fe eine ausreichende Markierung der Eisenspeicher erfolgt. Die durch Verlängerung der Zentrifugationszeit verschiebbare ^{59}Fe -Radioaktivität repräsentiert den Nuklid-Anteil, der vermutlich an "freies" Ferritin (weder lysosomal- noch ER- assoziiert) gebunden ist. Darüberhinaus ist bei beiden Tierspezies eine zweite ^{59}Fe -bindende Komponente nachweisbar, bei welcher es sich vermutlich um Lysosomen handelt, was die TWR-Verschiebbarkeit beim Chin.Hamster eindeutig demonstriert (Abb.16, Tab.23). De Duve und Beaufay schätzen, daß etwa 10% des Zell-Ferritins in Lysosomen gebunden sind, und der größte Anteil des verbleibenden Ferritins sich im Cytosol befindet (De Duve und Beaufay, 1957). Peters konnte in Lysosomen eindeutig Ferritin und Hämosiderin nachweisen (Peters und Seymour, 1976) und auch Essner beschrieb Ferritin in Saure Phosphatase - aktiven "Residual Bodies" (Essner und Novikoff, 1960). Bradford zufolge liegt ein Großteil des Speichereisens der Rattenleber als Hämosiderin und Ferritin in sekundären Lysosomen vor, welches dann zum Teil über die Galle ausgeschieden wird (Bradford et al., 1969). Auch im Metrizamidgradienten besteht eine deutliche Ähnlichkeit zwischen den Verteilungsprofilen der lysosomalen Enzyme und jener des ^{59}Fe . Wie im Saccharosegradienten ist auch im Metrizamidgradienten eine weitere Eisenbindungskomponente nachweisbar, welche durch Verlängerung der Zentrifugationszeit eine deutliche Verschiebung erfährt (Abb.33, Tab.28). Durch die Kombination der soeben beschriebenen Verfahren sollte es also möglich sein, eine Bindung des Plutoniums an die verschiedenen Zellorganellen, bzw. an Eisenbindungskomponenten, eindeutig zu bestimmen.

Die initiale Bindung des ^{239}Pu in der Partikulärfraktion wurde bei der Ratte am 10.Tag, beim Chin.Hamster am 4.Tag nach Nuklid-Injektion untersucht. Bei beiden Tierspezies zeigt das ^{239}Pu übereinstimmend mit den Lysosomen eine ausgeprägte TWR-Verschiebbarkeit, verbunden mit einer klaren Dissoziation von den Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Reticulum (Abb.4 und 8). Auch im Metrizamidgradienten stimmt das ^{239}Pu -Profil mit jenen der lysosomalen Enzyme überein, wobei ebenfalls eine deutliche Trennung von den Mitochondrien und dem ER erzielt wurde (Abb.20-23). Damit ist gezeigt, daß auch ohne direkte Einflußnahme auf die Eigenschaften der Lysosomen mit TWR eine Übereinstimmung von Plutonium- und Lysosomenverteilung besteht, und entgegen den Ausführungen von Pépin (Pépin und Boudene, 1974) eine Plutoniumbindung an Mitochondrien ausgeschlossen werden kann. Auch das Endoplasmatische Reticulum ist an der Transuranbindung nicht beteiligt. Die Verlängerung der Zentrifugationszeit hat keinen Einfluß auf die ^{239}Pu -Verteilung (Tab.23), somit kommt eine Assoziation an nicht-lysosomales Ferritin nicht in Betracht. Eine bedeutende Rolle der Plasmamembranen bei der Transuranbindung kann aus mehreren Gründen verneint werden. Eine Anreicherung des Nuklids in isolierten Plasmamembranfraktionen konnte nicht beobachtet werden (Seidel, unveröffentlichte Ergebnisse). Auch Gurney konnte keine ^{239}Pu -Assoziation an Plasmamembranen bei der Ratte nachweisen (Gurney and Taylor, 1975). Im Saccharosegradienten liegen deutliche Unterschiede zwischen den Verteilungsprofilen von Leitenzymen der perizellulären Membranen und jenem des ^{239}Pu vor, besonders im Hinblick auf die Alkalische Phosphodiesterase. Die von Gruner und Winter (Gruner et al., 1981; Winter und Seidel, 1982) beschriebene Assoziation von Plutonium an Lysosomen konnte somit sowohl im Saccharosegradienten unter Verwendung von TWR, als auch im Metrizamidgradienten für die Ratte bestätigt werden und ist auch im Fall des Chinesischen Hamsters die wahrscheinlichste Schlußfolgerung aus unseren Befunden. Dies steht auch in Einklang mit den Befunden von Boocock und Popplewell, die eine lysosomale Assoziation für die Transurane ^{239}Pu , ^{241}Am und ^{244}Cm in der Rattenleber postulierten (Boocock et al., 1970; Popplewell et al., 1971). James und Rowden konnten ^{241}Pu durch elektronenmikroskopische Autoradiographie in Lysosomen-ähnlichen Strukturen nach-

weisen (James und Rowden, 1969). Auch für ^{67}Ga wurde lysosomale Assoziation beschrieben (Aulbert und Haubold, 1974; Hammersley und Taylor, 1979; Samezima und Orii, 1980).

Unter dem Einfluß der Zeit treten jedoch deutliche Speziesunterschiede bezüglich der Verteilung der Transurane auf. Bei der Ratte bleibt die initiale, lysosomale Assoziation des ^{239}Pu auch zu späten Zeiten nach Nuklid-Injektion (≥ 70 Tage) weitgehend erhalten (Abb.8 und 23). Die zu diesen Zeitpunkten etwas verminderte TWR-Beeinflußbarkeit der Transuran-Profile könnte in einer reduzierten Phagozytoseaktivität der Radionuklid-haltigen, sekundären Lysosomen begründet sein. Beim Chin.Hamster zeigt das ^{239}Pu -Profil sowohl im Saccharose-, als auch im Percollgradienten eine mit fortschreitender Zeit linear erfolgende Dichteverminderung, welche im Saccharosegradienten zu einer deutlichen Dissoziation von den lysosomalen Enzymen führt (Abb.3 und 8). Eine eindeutige Zuordnung des Radionuklids zu einem Zellorganell ist nicht mehr möglich. Eine Bindung an "freies" Ferritin oder sonstige Eisenspeicherproteine kann aus mehreren Gründen ausgeschlossen werden:

1. Die Verlängerung der Zentrifugationszeit übt keinen Effekt auf die ^{239}Pu -Verteilung aus (Tab.23).
2. Der ^{239}Pu -Gehalt im Cytosol beträgt etwa 3%, jener des stabilen Fe und ^{59}Fe etwa 50% (Tab.12 und 17).
3. Das ^{59}Fe im Cytosol ist zu rund 80% durch ein $0.45\ \mu\text{m}$ -Filter filtrierbar, das ^{239}Pu der ML-Fraktion nur zu etwa 10 - 15% (Tab.30).

Daraus ergeben sich jedoch zwei wichtige Gesichtspunkte, die zu einer groben Größeneinschätzung des ^{239}Pu -bindenden Zellbestandteils führen. Für das Eisen wird im Cytosol eine Bindung an Ferritin angenommen (Beaufay und Berthet, 1963; Beaufay et al., 1959), welches als sehr großes Proteinmolekül mit einem Molekulargewicht von 450 000 - 850 000 (Bruenger et al., 1971) bei der differentiellen Zentrifugation größtenteils unsedimentierbar ist. Demgegenüber sedimentieren nahezu 100% des ^{239}Pu mit der ML-Fraktion. Das $0.45\ \mu\text{m}$ -Filter sollte für Proteine gut passierbar sein, was die Filtrierbarkeit des ^{59}Fe im Cytosol auch deutlich beweist. Das ^{239}Pu ist durch das $0.45\ \mu\text{m}$ -Filter kaum filtrierbar. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß das ^{239}Pu auch zu späten Zeiten nach Nuklid-Injektion mit größter Wahrscheinlichkeit mit

einem Partikel assoziiert ist, das zumindest annähernd die Größe von Zellorganellen besitzt.

Es erhebt sich nun die Frage nach der Natur dieser Zellkomponente, an welche zu späten Zeiten die Transurane beim Chinesischen Hamster gebunden sind. Denkbar wäre ein Transfer von den Lysosomen zu einem anderen Zellorganell. Mitochondrien und Endoplasmatisches Reticulum kommen hierfür nicht in Betracht, da das ^{239}Pu -Profil sowohl im Metrizamid-, als auch im Saccharosegradienten (ohne TWR-Behandlung!) eine klare Dissoziation von der GDH und Glukose-6-Phosphatase aufweist (Abb.4,8,21,23; Tab.22,23,27,28). Peroxisomen besitzen im Metrizamid- und Sucrosegradienten eine Gleichgewichtsdichte von $1.20 - 1.25 \text{ g/cm}^3$ (Wattiaux et al., 1978; Leighton et al., 1968). Ein Transfer des ^{239}Pu an diese Organellen ist somit ebenfalls auszuschließen. Die Plasmamembranen zeigen im Saccharose- und Metrizamidgradienten deutliche Überlagerungen mit dem ^{239}Pu -Profil (Abb.5,8,22,23 Tab.22,23,27,28). Einem Transfer des Radionuklids an Plasmamembranen widersprechen jedoch eindeutig die Ergebnisse im Percollgradienten (Tab.29), die zu keiner Zeit eine Korrelation zwischen ^{239}Pu und den Plasmamembran-Leitenzymen erkennen lassen. Eine Beteiligung des Golgi-Komplexes an der Transuranbindung ist ebenfalls äußerst unwahrscheinlich, da sowohl die 5'Nucleotidase, wie auch die Glukose-6-Phosphatase als Konstituenten des Golgi-Komplexes nachgewiesen sind (Whaley, 1975), und wie oben ausgeführt, mit diesen Enzymen keine Übereinstimmung besteht.

Möglich wäre auch ein unspezifischer Effekt aufgrund radiogener Schädigung der Lysosomen, bzw. der Transuran-haltigen Leberzellen durch das ^{239}Pu . Der Vergleich zweier um den Faktor 100 verschiedener ^{239}Pu -Dosen erbrachte keinen Unterschied bezüglich der Nuklid-Verteilung (Abb.18). Daraus ergibt sich, daß die Verschiebung des Transuran-Profiles in den leichten Dichtebereich im Sucrosegradienten nicht als Folge eines Dosis-Artefaktes gedeutet werden kann. Huterer beobachtete bei Ratten, daß TWR von den Hepatozyten in die Kupferzellen transportiert wird, und schloß daraus auf eine

Umverteilung von lysosomalem Material von Parenchymzellen in Kupfferzellen (Huterer et al., 1975). Auch aus einer solchen Umverteilung könnte eine Dichteänderung resultieren, wenn man von einer "Heterogenität der Eigenschaften" von Lysosomen in Parenchym- und Nichtparenchymzellen ausgeht. Das Verteilungsprofil von kolloidalem ^{234}Th , für welches eine Bindung an RES-Zellen als äußerst wahrscheinlich angenommen werden kann (Arborgh et al., 1974, konnten durch elektronenmikroskopische Untersuchungen kolloidales Thoriumdioxid im RES nachweisen), ist mit dem Verteilungsprofil des ^{239}Pu am 70. Tag keinesfalls identisch, oder auch nur annähernd ähnlich (Abb.19). Ein Transfer in Kupfferzellen als Ursache der Dichteverminderung ist somit ebenfalls auszuschließen. Im Gegensatz zur Rattenleber werden in Hamsterleber- und Fibroblastenlysosomen häufig Lipide gespeichert (Warburton und Wynn, 1977; Nehemiah und Novikoff, 1974). Dementsprechend wäre auch ein Transfer des ^{239}Pu an Lipide denkbar. Bulman konnte 'in vitro' Pu, Am und Cm mit Phospholipiden aus Citrat- und Transferrinkomplexen extrahieren (Bulman und Griffin, 1978). Eine Extraktion des ^{239}Pu mit Lipiden war zu keiner Zeit möglich, so daß eine Bindung des Radionuklids an Lipide als nicht sehr wahrscheinlich angesehen werden kann (siehe 3.5.). Der Vergleich mit ^{241}Am zeigt, daß sowohl bezüglich der subzellulären Verteilung, als auch des Verhaltens in den Dichtegradienten, keine statistisch nachweisbaren Unterschiede zwischen Plutonium und Americium bestehen (Abb.6-9, 23,24; Tab.12,14,23,28). Auch Hafnium zeigt im Saccharosegradienten ein mit den beiden Transuranen identisches Verhalten (Winter et al., unveröffentlicht). Dies zeigt, daß dem "Zeiteffekt" beim Chin.Hamster auch kein nuklid-spezifisches Verhalten des ^{239}Pu zugrunde liegt, sondern daß es sich um ein allgemeines Phänomen handelt.

Ausgehend von der oben getroffenen Feststellung einer initialen Bindung des ^{239}Pu in Lysosomen der Chin.Hamsterleber erhebt sich die Frage, ob die Nuklide nicht auch zu späten Zeiten an lysosomale Partikel gebunden sind, die aufgrund möglicher Veränderungen nicht mehr "typischen" Lysosomen entsprechen. Das ^{239}Pu -Profil

zeigt in der Tat im Metrizamid- und Percollgradienten deutliche Überlagerungen mit den Lysosomen (Abb.20,23; Tab.27-29). Dies steht allerdings eindeutig im Widerspruch zu den Ergebnissen im Saccharosegradienten, wo eine klare Dissoziation zwischen Transuranen und Lysosomen besteht. Diese Diskrepanz könnte eventuell durch die folgende Hypothese erklärt werden: In den weitgehend isoosmolaren Metrizamid- und Percollgradienten zeigen die Lysosomen ihre native Gleichgewichtsdichte und entsprechend ihrer Assoziation mit Transuranen Übereinstimmung der Enzym- und Radionuklidprofile. Im stark hyperosmolaren Saccharosegradienten "schrumpfen" die Lysosomen und sind daher zunächst mitsamt den Transuranen zu höheren Dichten verschoben. Im Verlaufe ihres Alterungsprozesses werden die Transuran-haltigen sekundären Lysosomen zunehmend osmotisch resistenter, möglicherweise infolge verstärkter Lipidspeicherung. Nach Milsom resultiert aus einer erhöhten Lipidspeicherung eine größere osmotische Resistenz der Lysosomenmembran (Milsom und Wynn, 1973). Die zunehmende osmotische Resistenz bewirkt nun im hyperosmolaren Saccharosegradienten eine kontinuierliche Verminderung der Gleichgewichtsdichte. Damit einhergehend verringert sich möglicherweise auch die Phagozytoseaktivität der alternden Lysosomen und ihre Bereitschaft, mit primären Lysosomen zu fusionieren. Für den Ablauf eines solchen Prozesses spricht die kontinuierlich nachlassende TWR-Verschiebbarkeit. Im Verlaufe des Alterungsprozesses degenerieren diese Telolysosomen immer mehr, bis sie sich, unter Verlust ihrer Enzymaktivität, in die von De Duve beschriebenen Postlysosomen, nahezu völlig inerte Restkörper, umgewandelt haben (De Duve und Wattiaux, 1966).

Ein Verlust der Enzymaktivität ist allerdings nur dann möglich, wenn die Telolysosomen nicht mehr mit primären, oder hydrolaseaktiven sekundären Lysosomen fusionieren können. Dies steht in eindeutigem Widerspruch zu den von Schellens beschriebenen Befunden, wonach experimentell erzeugte "Residual Bodies" in der Mäuseleber mit funktionell jüngeren Lysosomen fusionieren (Schellens, 1974). Demnach müssten zwischen den Hamsterspezies und den Muriden tiefgreifende Unterschiede bezüglich des Lysosomenmetabolismus bestehen, die auch durch andere Ergebnisse bestätigt werden. Dazu gehört die

bereits erwähnte Fettspeicherung in Hamsterlysosomen, die bei den Muriden nicht beobachtet wurde. Auch bezüglich der Elimination von unverdaulichen Restkörpern aus der Leber, z.B. Schwermetallen oder Detergentien, nehmen die Muriden eine Sonderstellung ein, denn nicht nur die Transurane, sondern auch andere Schwermetalle werden rasch eliminiert. So erfolgt z.B. die Exkretion von Blei bei der Ratte 50 mal schneller als beim Hund (Klaasen und Shoeman, 1974). Hanke konnte elektronenmikroskopisch zeigen, daß TWR sehr rasch aus der Rattenleber eliminiert wird (Hanke, 1977), wohingegen Schmid beim Chinesischen Hamster eine Zunahme der Tritosomenzahl und ihrer Fläche beobachtete (Schmid, 1980). Diese Befunde decken sich mit den Abb.10 und 11. Beim Chin.Hamster sind selbst 24 Tage nach TWR-Injektion alle lysosomalen Enzyme noch völlig im leichten Dichtebereich lokalisiert, die Medianen Dichten nach 4 und 24 Tagen TWR sind praktisch identisch (Tab.22). Bei der Ratte dagegen weisen die lysosomalen Enzyme zwar noch einen TWR-Effekt auf, jedoch ist dieser im Vergleich zum 4-Tage-TWR-Versuch weit weniger ausgeprägt. Seidel (Seidel, unveröffentlichte Ergebnisse) konnte zeigen, daß selbst nach 60 Tagen TWR beim Chin.Hamster im Gegensatz zur Ratte nur ein geringfügiger Rückgang des TWR-Effektes festzustellen ist. Daraus resultiert allerdings, daß entgegen der vorher gemachten Annahme, eine Fusion der als "Residual Bodies" anzusehenden Tritosomen mit primären Lysosomen erfolgt. Es ist bekannt, daß TWR die Eigenschaften von Lysosomen verändert (Wattiaux et al., 1963; Trout und Viles, 1979; Henning und Plattner, 1975), vermutlich infolge des TWR-Einflusses auf die Lysosomenmembran. Möglicherweise ist das Fusionsvermögen der Hamsterlebertritosomen durch TWR induziert. Diese Beispiele legen es nahe, daß zwischen Chin.Hamsterleber und Rattenleber profunde Unterschiede bezüglich des Lysosomenmetabolismus bestehen, und unterstützen damit die Hypothese, daß das ^{239}Pu bei beiden Tierspezies auch zu späteren Zeiten in Lysosomen, bzw. deren Folgekörpern, lokalisiert ist. Der beobachtete Speziesunterschied wäre somit im unterschiedlichen Lysosomenmetabolismus begründet.

Prinzipiell denkbar, wenn auch unwahrscheinlich, ist die Möglichkeit, daß die Übereinstimmung von lysosomalen Enzymen und ^{239}Pu

im Metrizamid- und Percollgradienten nur zufallsbedingt ist, und aus ähnlichen Dichten von Lysosomen und Nuklid-bindendem Zellorganell resultiert. Dies würde eine lysosomale Assoziation vortäuschen, die 'in vivo' nicht besteht. Lediglich im Saccharosegradienten zeigen die Lysosomen aufgrund ihrer osmotischen Eigenschaften eine klare Dissoziation vom ^{239}Pu -bindenden Zellpartikel. Die kontinuierliche "Dichteverminderung" des Nuklid-bindenden Zellbestandteils im Saccharose- und Percollgradienten könnte somit ein Ausdruck der Umverteilung des Nuklids von den Lysosomen an ein durch unsere Methoden nicht identifizierbares Zellorganell sein.

Abschließend seien noch kurz einige andere Aspekte dieser Arbeit angesprochen.

Diese betreffen in erster Linie die Selektivität von Leitenzymen. So zeigt die 5'Nucleotidase in Übereinstimmung mit anderen Autoren (Wattiaux et al., 1978; Gruner, 1978; Winter, 1980) eine ausgeprägte TWR-Verschiebbarkeit (Abb.4, Tab.22). Ein Einfluß einer unspezifischen Sauren Phosphatase kann hierbei ausgeschlossen werden, da eine Hemmung mit NaF (Hübscher und West, 1965) keine signifikante Änderung des Verteilungsprofils erbringt (Abb.5). Die TWR-Verschiebbarkeit der 5'Nucleotidase könnte in der von vielen Autoren beschriebenen 5'Nucleotidase-Aktivität der Lysosomenmembran begründet sein (Wattiaux et al., 1978; Pletsch und Coffey, 1972; Widnell, 1972). Bemerkenswert hierbei ist, daß die Alkalische Phosphodiesterase keinen statistisch nachweisbaren TWR-Effekt zeigt (Tab.22; Abb.5). Das unterschiedliche Verhalten der beiden Plasmamembran-Leitenzyme könnte auf einer Heterogenität der Plasmamembranen beruhen, wie sie z.B. von Toda beschrieben wurde (Toda et al., 1975). Die möglichen Gründe für das unterschiedliche Verhalten der beiden Enzyme zu suchen, würde den Rahmen der vorliegenden Arbeit übersteigen. Es wird daraus jedoch deutlich, daß die Selektivität der 5'Nucleotidase kritisch geprüft werden sollte, und daß die Hinzunahme eines weiteren Leitenzyms zur Organellcharakterisierung dringend angezeigt ist.

Auch bezüglich des Verhaltens der lysosomalen Enzyme ergaben sich deutliche Unterschiede. So ist die Saure Phosphatase bei beiden Tierspezies nicht nur das "leichteste" lysosomale Enzym, darüberhinaus zeigt sie auch die geringste TWR-Verschiebbarkeit. Den ausgeprägtesten TWR-Effekt weist das Kathepsin D auf. Die unterschiedliche TWR-Beeinflußbarkeit der lysosomalen Enzyme beruht möglicherweise auf einer Selektivität einzelner Lysosomenpopulationen für bestimmte Substrate, wie sie z.B. von Davies für die Rattenleber beschrieben wurde (Davies, 1973). Ein von allen anderen lysosomalen Enzymen deutlich verschiedenes Verhalten zeigt auch die N-Acetyl- β -Glukosaminidase bei der Ratte (Abb.20 und 25, Tab.27). Dies kommt vor allem in der Reaktion auf TX 100 zum Ausdruck (Abb.29). Das Verhalten der N-Acetyl- β -Glukosaminidase auf TX 100-Behandlung legt den Schluß nahe, daß dieses Enzym eine von den anderen lysosomalen Enzymen unterschiedliche Bindung in den Rattenleberlysosomen aufweist. Wesentlich ist jedoch die aus diesem Verhalten resultierende wichtige Erkenntnis, daß die lysosomale Lokalisation einer Substanz nicht zwangsläufig eine Freisetzbarkeit durch TX 100 zur Folge haben muß. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, daß für eine genaue Lysosomencharakterisierung die Bestimmung mehrerer Leitenzyme unbedingt erforderlich ist.

Aucheinige Aspekte hinsichtlich der benutzten Gradientenmedien seien erwähnt. Vor- und Nachteile der Triton WR1339-Methode zusammen mit Saccharosegradienten wurden bei Gruner und Winter (Gruner, 1978; Winter, 1980) bereits ausführlich diskutiert, hierauf soll nicht mehr näher eingegangen werden. Das Metrizamid erlaubt eine klare Trennung der Lysosomen von den Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Reticulum, ohne direkte Beeinflussung der Zellorganellen. Zur präparativen Lysosomenisolation ist diese Methode jedoch nicht ohne weiteres geeignet, da starke Überlagerungen von Lysosomen und Plasmamembranen bestehen. Unbedingt erwähnenswert ist auch die schlechte Reproduzierbarkeit der GDH-Profile bei der Ratte, und die Veränderung ihrer Profile bei Verlängerung der Zentrifugationszeit. Dies, sowie der beträchtliche Anteil lysosomaler Enzymaktivität in den leichtesten Gradientenfraktionen geben

Hinweise auf eine im Metrizamidgradienten erfolgende Veränderung, möglicherweise sogar Schädigung der Zellorganellen, die eine vorsichtige Interpretation der Resultate im Metrizamidgradienten nahelegen.

Durch Verwendung des Percollgradienten ist es möglich, Partikel sehr ähnlicher Dichten zu trennen. Die Separation von Zellorganellen kann mit sehr kurzen Zentrifugationszeiten von wenigen Minuten erzielt werden. Dies bedeutet, verglichen mit der 4-stündigen Laufzeit im Saccharose- und der 6-stündigen im Metrizamidgradienten, eine ausgesprochen schonende Isolierungsmethode für die Organellen. Ein großer Vorteil bei der Anwendung des Percolls besteht auch darin, daß die sich im Verlaufe der Zentrifugation selbst bildenden Dichtegradienten, völlig unabhängig von der Ausgangsdichte, unter konstanten Bedingungen nahezu parallelen Verlauf aufweisen (Pertoft et al., 1978).

Zum Abschluß seien noch einige Anmerkungen zur ^{59}Fe -Retention gestattet. Die Verteilung und Retention von ^{59}Fe in Organen von Ratte, Maus, Chinesischem und Syrischem Hamster zeigte, daß zwischen Transuranen und ^{59}Fe insofern kein einfacher, direkter Zusammenhang besteht, als der für die Transurane typische Speziesunterschied beim ^{59}Fe nicht beobachtet werden konnte (Tab.4 bis 12). Es ergaben sich jedoch interessante Hinweise auf einen Speziesunterschied zwischen Muriden und Hamstern bezüglich des Eisenstoffwechsels. Bei den Muriden nimmt der ^{59}Fe -Gehalt der Milz stark zu, wohingegen bei den Hamsterspezies keine statistisch nachweisbare Änderung erfolgt. Eine Diskussion dieses Befundes ist allerdings im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich.

Zusammenfassend läßt sich der Transuran-Metabolismus bei Ratte und Chin.Hamster durch folgende Modelle veranschaulichen: Das Transuran wird im Blut an Proteine gebunden zur Leberzelle transportiert und dort vermutlich über einen Endocytoseprozess in die Leberzellen aufgenommen. Die Transuran-haltigen Phagosomen fusionieren mit primären Lysosomen. Bei der Ratte werden die Radionu-

klide in den sekundären Lysosomen wahrscheinlich durch einen Exocytoseprozess hauptsächlich über die Galle ausgeschieden. Nicht ganz so eindeutig ist das Schicksal der Transurane beim Chin.Hamster. Eine Elimination über die Galle findet nicht statt. Nach unserer Meinung hat gegenwärtig das Modell die größte Wahrscheinlichkeit, wonach die transuranhaltigen sekundären Lysosomen unter allmählichem Enzymverlust im Verlaufe der Zeit inerte Restkörper bilden, die als Postlysosomen in der Leberzelle gespeichert werden.

5. Zusammenfassung und Schlußfolgerung

1. Die Retention von intravenös injiziertem, monomerem ^{239}Pu -, ^{241}Am - und ^{59}Fe -Citrat wurde in Ratte, Maus, Syrischem und Chinesischem Hamster bis zum 180. Tag nach Injektion untersucht. Die bereits früher bekannten Speziesunterschiede in der Ausscheidungsrate von Transuranen aus der Leber wurden bestätigt. Es wurden keine, diesen Speziesunterschieden analoge Unterschiede in der Retention von ^{59}Fe beobachtet.
2. Die subzelluläre Verteilung der Nuklide wurde in der Leber von Ratte und Chinesischem Hamster durch Analyse der ML-Fraktion entsprechender Homogenate mittels Saccharose-, Metrizamid- und Percoll-Dichtegradienten für Zeitpunkte zwischen 4 und 180 Tagen nach Nuklid-Injektion untersucht. Die Transurane werden bei beiden Spezies mit sehr großer Wahrscheinlichkeit innerhalb der ersten Tage in die Lysosomen transportiert. Dort finden sich nach 4 bis 10 Tagen etwa 90% der gesamten Radioaktivitätsmenge in der Leber. Bei der Ratte ergaben sich keine Hinweise für eine wesentliche Umverteilung der Nuklide zu späteren Zeitpunkten. Sowohl im Saccharose-, als auch im Percollgradienten, trat bei Chinesischen Hamstern mit fortschreitender Zeit eine Verminderung der Gleichgewichtsdichte bei den Transuranen auf. Derartige Phänomene wurden andererseits im Metrizamidgradienten nicht beobachtet. Es konnte aber auch keine Bindung an andere, von uns in Betracht gezogene Organellen nachgewiesen werden. Ferner ist es sehr unwahrscheinlich, daß dieser Dichteverminderung eine Umverteilung der Transurane von den Hepatocyten in RES-Zellen zugrunde liegt. Als zwar keinesfalls gesicherte, gegenwärtig aber wahrscheinlichste Hypothese könnte angenommen werden, daß jene Lysosomen in der Chin.Hamsterleber, in welche die Transurane zunächst abgelagert wurden, sich im Laufe der Zeit verändern und zu inerten Telolysosomen umwandeln.
3. Der subzelluläre ^{59}Fe -Stoffwechsel unterscheidet sich deutlich von jenem der Transurane. Durch ^{59}Fe wird das subzelluläre Verhalten des stabilen Eisens zuverlässig erfaßt. In den Lysosomen

befinden sich höchstens 20% des gesamten Zelleisens.

4. Die Effekte von TWR auf die lysosomale Dichte sind bei der Ratte innerhalb von 24 Tagen teilweise reversibel, beim Chinesischen Hamster jedoch nicht.

5. Die von uns erhaltenen Befunde sprechen insgesamt für wesentliche Unterschiede bezüglich der Speicherung von Schwermetallen in Leberlysosomen zwischen Ratten und Chinesischen Hamstern. Sie weisen auf Unterschiede im biologischen Schicksal dieser Lysosomen hin, welche möglicherweise die Speziesunterschiede hinsichtlich der Geschwindigkeit der Schwermetallausscheidung aus der Leber verursachen.

6. Literaturverzeichnis

- APPELMANS, F., WATTIAUX, R., DE DUVE, C., 1955
Tissue Fractionation Studies.
5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granule in rat liver, Biochem. J. 59, pp. 438-445.
- ARBORGH, B., BERG, T., ERICSSON, J.L.E., 1974
Evaluation of methods for specific loading of Kupffer cell lysosomes with heavy colloidal particles, Acta path. microbiol. scand. Sect. A 82, pp. 747.
- ARBORGH, B., BERG, T., ERICSSON, J.L.E., 1973
Quantitation of acid phosphatase and arylsulfatase in rat hepatic parenchymal and Kupffer cells, FEBS Letters 35, No. 1, pp. 51-53.
- AULBERT, E., HAUBOLD, U., 1974
Isolation of ⁶⁷gallium accumulating fraction in normal rat liver, Sonderdruck aus: Nuclear-Medizin XIII, No.1, pp. 72-84.
- BARRETT, A.J., 1972
Lysosomal enzymes, in: Lysosomes, a laboratory handbook, (J.T. Dingle, edit.) North-Holland Publishing Company, Amsterdam, pp. 46.
- BEAUFAY, H., BENDALL, D.S., BAUDHUIN, P., DE DUVE, C., 1959
Tissue Fractionation Studies.
12. Intracellular distribution of some dehydrogenases, alkaline deoxyribonuclease and iron in rat liver tissue, Bioch. 73, pp. 623-628, Cambridge University Press, 1963.
- BEAUFAY, H., BERTHET, J., 1963
Medium composition and equilibrium density of subcellular particles from rat liver, in: Methods of Separation of Subcellular Structural Components, Biochem. Soc. Symp. 23, pp. 66-85.
- BEAUFAY, H., AMAR-COSTESECC, A., 1976
Cell fractionation techniques, in: Methods in membrane biology, (E.D. Korn, edit.) Plenum Press, New York, pp. 1 - 100.

- BEAUFAY, H., AMAR-COSTESECC, A., FEYTMANS, E., THINÈS-SEMPOUX, D., WIBO, M., ROBBI, M., BERTHET, J., 1974
Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. I. Biochemical Methods, J. Cell Biol. 61, pp. 188-200.
- BIRNIE, G.D., RICKWOOD, D., HELL, A., 1973
Buoyant densities and hydration of nucleic acids, proteins and nucleoprotein complexes in Metrizamide, Biochim. Biophys. Acta 331, pp. 283-294.
- BHATTACHARYA, M.H., LINDENBAUM, A., 1976
Association of plutonium with isolated liver parenchymal cells following injection of monomeric plutonium into mice, Radiat. Res. 66, pp. 552-565.
- BOOCOCK, G., DANPURE, C.J., POPPLEWELL, D.S., TAYLOR, D.M., 1970
The subcellular distribution of plutonium in rat liver, Radiat. Res. 42, pp. 381-396.
- BRADFORD, W.D., ELCHLEPP, J.G., ARSTILA, A.U., TRUMP, B.F., KINNEY, T.D., 1969
Iron metabolism and cell membranes
I. Relation between ferritin and haemosiderin in bile and biliary excretion of lysosome contents, Am. J. Pathol. 56, No. 2, pp. 201-228.
- BROOKS, A.L., MEAD, D.K., PETERS, R.F., 1973
Distribution and retention of monomeric ^{239}Pu citrate in the Chinese hamster and its cytogenetic effect on testes, in: Lovelace Foundation Report LF-46, pp. 240-243.
- BRUENGER, F.W., ATHERTON, D.R., STEVENS, W., 1972
Intracellular distribution of ^{249}Cf in canine liver, Health Phys. 22, pp. 685-690.
- BRUENGER, F.W., STEVENS, W., ATHERTON, D.R., BATES, D.S., GRUBE, B.J., 1976
The subcellular distribution of ^{239}Pu in beagle livers as determined by zonal centrifugation and isoelectric focusing, in: The Health Effects of Plutonium and Radium, (W.S.S. Jee, edit.) pp. 199-210, J.W. Press, University of Utah, Salt Lake City.

- BRUENGER, F.W., STOVER, B.J., STEVENS, W., 1971
 $^{239}\text{Pu}(\text{IV})$: Its subcellular distribution and association with ferritin in the canine liver, Health Phys. 21, pp. 679-687.
- BULMAN, R.A., GRIFFIN, R.J., 1978
Interaction of plutonium, americium and curium with phospholipids, J. inorg. nucl. Chem. 41, pp. 1639-1641.
- DAVIES, M., 1973
The effect of Triton WR-1339 on the subcellular distribution of trypan blue and ^{125}J -labelled albumin in rat liver, Biochem. J. 136, pp. 57-65.
- DAVIES, M., 1975
The heterogeneity of lysosomes, in: Lysosomes in Biology and Pathology 4, (J.T. Dingle and K.T. Dean, edits.) pp. 303-348, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- DE DUVE, C., WATTIAUX, R., 1966
Function of lysosomes, in: Annual review of physiology, Palo Alto, Californien, pp. 28.
- DE DUVE, C., BEAUFAY, H., 1957
Altération précoce des lysosomes au cours de la nécrose massive d'un lobe hépatique, Arch. int. Physiol. Biochim. 65, pp. 156.
- DETER, R.L., 1975
The measurement of iron in rat liver tissue and subcellular fractions using atomic absorption spectroscopy, Texas Reports on Biology and Medicine 33, No. 3, pp. 407-413.
- DURBIN, P., 1971
Plutonium in man: a twenty-five year review, UCRL-20850.
- DURBIN, P., 1962
Distribution of the transuranic elements in mammals, Health Phys. 8, pp. 665-671.
- ESSNER, E., NOVIKOFF, A.B., 1960
Human hepatocellular pigments and lysosomes, J. Ultrastructural Research 3, pp. 374-391.

- FISKE, C.H., SUBBAROW, Y., 1925
The colorimetric determination of phosphorus,
J. Biol. Chem. LXVI, pp. 375-400.
- GROH, V., VON MAYERSBACH, H., 1981
Enzymatic and functional heterogeneity of lysosomes,
Cell Tissue Res. 214, pp. 613-621.
- GRUNER, R., SEIDEL, A., WINTER, R., 1981
The initial early distribution of monomeric ^{239}Pu and
 ^{241}Am in rat liver as determined by Triton WR 1339
injection, Radiat. Res. 85, pp. 367-379.
- GRUNER, R., 1978
Die Verwendung von Triton WR 1339 (TWR) zur quantitativen
Bestimmung der lysosomalen Bindung von Transuranen in
der Rattenleber, Dissertation, Fakultät für Bio- und
Geowissenschaften der Universität Karlsruhe.
- GURNEY, J.R., TAYLOR, D.M., 1975
The subcellular distribution of ^{239}Pu in rat liver
parenchymal cells after exposure in vivo and in vitro,
Health Phys. 29, pp. 655-661.
- HAMMERSLEY, P.A.G., TAYLOR, D.M., 1979
The role of lysosomal enzyme activity in the localization
of ^{67}Ga citrate, Eur. J. Nucl. Med. 4, pp. 261-270.
- HANKE, S., 1977
Einfluß von Triton WR 1339 auf die subzelluläre Morphologie
der Rattenleber, Examensarbeit, Fakultät für Bio- und
Geowissenschaften der Universität Karlsruhe.
- HENNING, R., PLATTNER, H., 1975
Formation of Triton WR 1339-filled rat liver lysosomes
I. Properties and intracellular distribution of (^3H)
Triton WR 1339, Exp. Cell Res. 94, pp. 363-376.
- HÜBSCHER, G., WEST, C.R., 1965
Specific assays of some phosphatases in subcellular
fractions of small intestinal mucosa, Nature 205,
pp. 799-800.

HUMPHREYS, E.R., METALLI, P., SEIDEL, A., SZOT, Z.,
VANDERBORGHT, O., 1976

The distribution of ^{239}Pu in several strains of mice -
a collaborative experiment, Int. J. Appl. Radiat. Isotop.
27, pp. 507-513.

HUTERER, S., WHERRETT, J.R., PHILLIPS, M.J., 1975

Effects of prolonged administration of Triton WR 1339
to the rat on morphology and phospholipids of liver,
Lab. Invest. 33, pp. 305-310.

International critical tables of numerical data, Physics,
Chemistry and Technology, 1927

(Washburn, E.W. edit.) II, 1st ed., Mc Graw-Hill Book
Company, New York.

JAMES, A.G., ROWDEN, G., 1969

An electron microscope autoradiographic study of
plutonium localization in rat liver using a plutonium-241
label, Int. J. Appl. Radiat. Isotop. 20, pp. 295-297.

KATES, M., 1972

Techniques of lipidology, in: Laboratory Techniques
in Biochemistry and Molecular Biology, North-Holland
Publishing Company, Amsterdam.

KEOUGH, R.F., POWERS, G.J., 1970

Determination of plutonium in biological materials by
extraction and liquid scintillation counting,
Analytical Chemistry 42, No. 3, pp. 419-421.

KLAASEN, C.D., 1974

Biliary excretion of arsenic in rats, rabbits, and dogs,
Toxicol. Appl. Pharmacol. 29, pp. 447-456.

KLAASEN, C.D., 1974

Biliary excretion of manganese in rats, rabbits, and
dogs, Toxicol. Appl. Pharmacol. 29, pp. 458-467.

KLAASEN, C.D., SHOEMAN, D.W., 1974

Biliary excretion of lead in rats, rabbits, and dogs,
Toxicol. Appl. Pharmacol. 29, pp. 434-446.

- KNOOK, D.L., SLEYSTER, E.C., 1980
Isolated parenchymal, Kupffer and endothelial rat liver cells characterized by their lysosomal enzyme content, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 96, No.1, pp. 250-257.
- LEIGHTON, F., POOLE, B., BEAUFAY, H., BAUDHUIN, P., COFFEY, J.W., FOWLER, S., DE DUVE, C., 1968
The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria, and lysosomes from the livers of rats injected with Triton WR-1339, *J. Cell Biol.* 37, pp. 482-513.
- MICHELL, R.H., HAWTHORNE, J.N., 1965
The site of diphosphoinositide synthesis in rat liver, *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 21, pp. 333-338.
- MILSOM, J.P., WYNN, C.H., 1973
The heterogenous distribution of acid hydrolases within a homogenous population of cultured mammalian cells, *Biochem. J.* 132, pp. 493-500.
- NEHEMIAH, J.L., NOVIKOFF, A.B., 1974
Unusual lysosomes in hamster hepatocytes, *Exp. Molec. Pathol.* 21, pp. 398-423.
- PÉPIN, G., BOUDENE, C., 1974
Localisation subcellulaire du citrate de Plutonium (^{239}Pu) dans l'hépatocyte du rat, *C.R. Acad. Sc. Paris, Série D* 279, pp. 2071-2074.
- PERTOFT, H., LAURENT, T.C., 1977
Isopycnic separation of cells and cell organelles by centrifugation in modified colloidal silica gradients, in: *Methods of Cell Separation, Vol. 1*, (N. Catsimopoulos edit.) Plenum Press, New York.
- PERTOFT, H., LAURENT, T.C., LÄÄS, T., KÄGEDAL, L., 1978
Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll), *Analytical Biochemistry* 88, pp. 271-282.

- PETER, E., 1982
Untersuchungen zum Biologischen Verhalten und zur Dekorporation von ^{234}Th bei der Ratte, Dissertation, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe.
- PETERS. T.J., SEYMOUR, C.A., 1976
Acid hydrolase activities and lysosomal integrity in liver biopsies from patients with iron overload, *Clinical Science and Molecular Medicine* 50, pp. 75-78.
- Pharmacia Fine Chemicals AB, 1979
Percoll - for density gradient centrifugation, Informationsschrift der Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden.
- Pharmacia Fine Chemicals, 1980
Separation News, 3, Pharmacia, Uppsala, Schweden.
- PLETSCH, Q.A., COFFEY, J.W., 1972
Studies on 5'-Nucleotidases of rat liver, *Biochim. Biophys. Acta* 276, pp. 192-205.
- POPPELWELL, D.S., BOOCOOCK, G., TAYLOR, D.M., DANPURE, C.J., 1971
The subcellular distribution of americium and curium in rat liver, in: *Radiation Protection Problems Relating to Transuranium Elements*, European Atomic Energy Communities, EUR - 4612 d-f-e, pp. 205-222.
- PRASARD, M., SPIERS, M., 1978
Comparative study of ashing techniques for the digestion of horticultural plant samples, *J. Agric. Food Chem.* 26, pp. 824-827.
- RAHMAN, Y.E., LINDENBAUM, A., 1964
Lysosome particles and subcellular distribution of polymeric tetravalent plutonium-239, *Radiat. Res.* 21, pp. 575-583.
- RICKWOOD, D., BIRNIE, G.D., 1975
Metrizamide, a new density-gradient medium, *FEBS-Letters* 50, No. 2, pp. 102-110.
- ROSENTHAL, M.W., MORETTI, E., RUSSEL, J., LINDENBAUM, A., 1972
Marrow deposition and distribution of monomeric and

polymeric ^{239}Pu in the mouse, estimated by use of ^{59}Fe ,
Health Phys. 22, pp. 743-748.

ROY, A.B., 1954

The sulphatase of ox liver, Biochem. J. 57- pp. 465-470

SAMEZIMA, K., ORII, H., 1980

In vivo localization of Ga-citrate in rat liver as
determined by cell fractionation with isopycnic rate -
zonal ultracentrifugation, Eur. J. Nucl. Med. 5, pp.281-
288.

SCHELLENS, J.P.M., 1974

Ageing of mouse liver lysosomes,
Cell Tiss. Res. 155, pp. 455-473.

SCHMID, P., 1980

Untersuchung des Einflusses von Triton WR 1339 auf Leber-
lysosomen vom Chinesischen Hamster (*Cricetus Griseus*),
Examensarbeit, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften
der Universität Karlsruhe.

SEIDEL, A., 1981

Private Mitteilung.

SEIDEL, A., 1977

The deposition of ^{241}Am and ^{252}Cf in the skeleton of
Chinese hamster, Syrian hamster, and the rat,
Health Phys. 33, pp. 83-86.

SEIDEL, A., 1974

Removal by DTPA of internally deposited ^{241}Am :
A comparative study on rats and Syrian hamsters,
Int. J. Nucl. Med. Biol. 1, pp. 197-200.

SEIDEL, A., 1975

Retention von ^{241}Am bei Ratte und Syrischem Hamster,
Strahlentherapie 149, pp. 442-449.

SEIDEL, A., SONTAG, W., 1981

Plutonium-239 in Skelett und Leber:
Vom Beschreiben zum Verstehen, KfK-Nachrichten 13,
No. 1-2, S. 102-111.

SEIDEL, A., VOLFF, V., 1972

Rapid determination of some transuranium elements in biological material by liquid scintillation counting, Int. J. Appl. Radiat. Isotop 23, pp. 1-4.

THIERS, R.E., VALLEE, B.L., 1957

Distribution of metals in subcellular fractions of rat liver, J. Biol. Chem. 226, pp. 920-991.

TODA, G., OKA, H., ODA, T., IKEDA, Y., 1975

Subfractionation of rat liver plasma membrane
Uneven distribution of plasma membrane-bound enzymes on the liver cell surface, Biochim. Biophys. Acta 413, pp. 52-64.

TROUT, J.J., VILES, J.M., 1979

Cellular changes associated with Triton WR-1339 accumulation in rat hepatocytes.

II. Lysosomal Triton WR-1339 accumulation, Exp. Molec. Pathol. 31, pp. 81-90.

VAN BERKEL, T.J.C., KRUIJT, J.K., KOSTER, J.F., 1975

Identity and activities of lysosomal enzymes in parenchymal and non-parenchymal cells from rat liver, Eur. J. Biochem. 58, pp. 145-152.

VOLFF, V., SEIDEL, A., 1974

Decorporation of ^{239}Pu and ^{241}Am in the rat and hamster by Zn-DTPA, Radiat. Res. 59, pp. 638-644.

WARBURTON, M.J., WYNN, C.H., 1977

The uptake of Triton WR-1339 and various lipids by liver lysosomes of the Syrian hamster (*Mesocricetus Auratus*), Int. J. Biochem. 8, pp. 305-309.

WATTIAUX, R., WIBO, M., BAUDHUIN, P., 1963

Influence of the injection of Triton WR 1339 on the properties of rat-liver lysosomes, Ciba Foundation Symposium on Lysosomes, pp. 176-200 (A.V.S. De Reuck, M.P. Cameron, edits.), A. + A. Churchill, London.

- WATTIAUX, R., WATTIAUX-DE CONINCK, S., RONVEAUX-DUPAL, M.-F., DUBOIS, F., 1978
Isolation of rat liver lysosomes by isopycnic centrifugation in a Metrizamide gradient, J. Cell Biol. 78, pp. 349-368.
- WHALEY, W.G., 1975
The Golgi apparatus,
Vienna: Springer, pp. 190.
- WIDNELL, C.C., 1972
Cytochemical localization of 5'-nucleotidase in subcellular fractions from rat liver, J. Cell Biol. 52, pp. 542.
- WILLIAMSON, D.H., LUND, P., KREBS, H.A., 1967
The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver, Biochem. J. 103, pp. 514-527.
- WINTER, R., 1980
Die subzelluläre Bindung von ^{239}Pu in der Leber ausgewählter Nagetierspezies, Dissertation, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe.
- WINTER, R., SEIDEL, A., 1981
Private Mitteilung.
- WINTER, R., SEIDEL, A., 1982
Comparison of the subcellular distribution of monomeric ^{239}Pu and ^{59}Fe in the liver of rat, mouse, and Syrian and Chinese hamsters, Radiat. Res. 89, pp. 113-123.

7. Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1 : Bedingungen bei den Enzymbestimmungen nach differentieller Zentrifugation

Enzym	Probe- menge (μ l)	Puffermenge	Substrat- menge (μ l)	Reaktions- temperatur $^{\circ}$ C	Reaktions- zeit Min.	Stopp- reagenz- menge μ l	Aufarbeitung	Messung bei Well- tenlänge λ (nm)
Saure Phosphatase	100	1 ml + 10 μ l TX 100	100	25	20	200	500 μ l Überstand zur Phosphatbestimmung	660
5' Nucleo- tidase	100	1 ml + 10 μ l TX 100	100	25	20	200	500 μ l Überstand zur Phosphatbestimmung	660
Glukose-6- Phosphatase	100	1 ml + 10 μ l TX 100	100	25	Ratte:20 Ch.Hamster:15	200	500 μ l Überstand zur Phosphatbestimmung	660
N-Acetyl- β - Glukosaminidase	100,1:2 verd.	500 μ l	100	37	15	500	500 μ l Überstand + 2.5 ml NaHCO ₃	400
Alk.Phospho- diesterase	100,1:101 verd.	500 μ l	100	37	15	500	-	400
Kathepsin D	100	100 μ l	100	37	60	1.9	1 ml Überstand + 2.5 ml Kupferreagenz + 250 μ l Folin-Reagenz	500

64

Nähere Erläuterungen siehe 2.4. Enzymbestimmungen

Tabelle 2: Bedingungen bei den Enzymbestimmungen in den Dichtegradientenfraktionen

Enzym	Probe- menge μl	Puffermenge	Substrat- menge μl	Inkuba- tions- tempera- tur °C	Inkuba- tions- zeit Min.	Stopp- reagenz- menge μl	Aufarbeitung	Messung bei Well- länge λ nm
Saure Phosphatase	200	1 ml + 10 μl TX 100	100	25	60	200	1 ml Überstand zur Phosphatbestimmung	660
5'Nucleo- tidase	200	1 ml + 10 μl TX 100	100	25	60	200	1 ml Überstand zur Phosphatbestimmung	660
Glukose-6- Phosphatase	200	1 ml + 10 μl TX 100	100	25	Ratte:60 Ch.Hamster:30	200	1 ml Überstand zur Phosphatbestimmung	660
N-Acetyl-β Glukosaminidase	100	500 μl	100	37	20	500	500 μl Überstand + 2.5 ml NaHCO ₃	400
Alk.Phospho- diesterase	100 Ratte:1:21 verd. Ch.Hamster: 1:6 verd.	500 μl	100	37	20	500	-	400
Kathepsin D	200	100 μl	100	37	60	1.9	1 ml Überstand + 2.5 ml Kupferreagenz + 0.25 ml Folin-Reagenz	365
Glutamat- dehydrogenase	Ratte: 25 μl Ch.Hamster:50 μl	1 ml	100	25	jeweils 0.5	-	-	365

65

Nähere Erläuterungen siehe 2.4.Enzymbestimmungen

Tabelle 3 : Verteilung von ^{239}Pu im Skelett des Chinesischen Hamsters am 10., 36., 70. Tag^a nach i.v. Injektion von ^{239}Pu -Citrat

% der ^{239}Pu -Dosis im Gesamt-Skelett

Femora	7.39	±	0.48
Humeri	5.15	±	0.10
Tibiae/Fibulae	4.77	±	0.23
Radii/Ulnae	2.70	±	0.15
Pfoten	2.65	±	0.25
Vertebrae	30.82	±	1.10
Pelvis	5.14	±	0.21
Costae, Sternum, Claviculae	8.58	±	0.33
Scapulae	3.89	±	0.20
Mandibulae	6.75	±	0.21
Cranium	20.18	±	1.67
Total	98.02		

$$\text{Skelettfaktor} = \frac{\text{Gesamtskelett}}{\text{Femur}} = 27.5 \pm 1.6$$

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern

^a Einen Wert für 10. und 36. Tag, 2 Werte für 70. Tag, die Werte konnten vereinigt werden.

Tabelle 4 : Retention von ^{239}Pu in Organen des Chinesischen Hamsters nach i.v. Injektion von ^{239}Pu -Citrat

Tage nach ^{239}Pu -Inj.	% der injizierten Dosis					n
	Skelett	Leber	Milz ^a	Nieren	Blut (1ml)	
0.04	9.8 ± 0.9	21.1 ± 2.6	0.09 ± 0.01	1.92 ± 0.23	8.00 ± 1.60	8
1	35.6 ± 3.7	34.9 ± 2.2	0.07 ± 0.02	2.06 ± 0.39	1.24 ± 0.28	3
2	32.2 ± 5.7	39.0 ± 3.8	0.03 ± 0.01	2.33 ± 0.51	0.18 ± 0.12	4
4	36.8 ± 1.3	36.6 ± 1.0	0.06 ± 0.01	1.07 ± 0.12	0.08 ± 0.01 ^b	45
6	38.1 ± 1.7	35.1 ± 1.3	0.07 ± 0.04	0.89 ± 0.15	-	3
10	33.9 ± 2.8	47.5 ± 3.8	0.04 ± 0.01	0.89 ± 0.10	-	15
	46.3 ± 1.7	34.4 ± 1.3	0.06 ± 0.01	0.72 ± 0.06	-	7
36	29.5 ± 1.7	41.7 ± 2.0	0.03 ± 0.01	0.31 ± 0.02	-	22
70	30.4 ± 1.5	42.6 ± 1.2	0.03 ± 0.01	0.22 ± 0.02	-	35
	29.6 ± 2.7	33.4 ± 2.3	0.08 ± 0.01	0.39 ± 0.07	-	6
119	28.1 ± 3.2	51.9 ± 2.4	0.03 ± 0.01	0.30 ± 0.03	-	8
176	20.1 ± 1.6	35.7 ± 0.9	0.04 ± 0.01	0.19 ± 0.02	-	19

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern; n = Zahl der Tiere

^aStandardfehler auf 0.01 aufgerundet, nähere Erläuterungen siehe 2.7.1.

^bn = 8

Tabelle 5 : Retention von ^{241}Am in Organen des Chinesischen Hamsters nach i.v.Injektion von ^{241}Am -Citrat

Tage nach ^{241}Am -Inj.	% der injizierten Dosis				n
	Skelett	Leber	Milz ^a	Nieren	
10	21.3 ± 0.7	28.9 ± 1.8	0.02 ± 0.01	2.21 ± 0.27	21
70	16.6 ± 1.3	33.6 ± 1.1	0.01 ± 0.01	0.32 ± 0.06	16
84	19.6 ± 0.8	38.8 ± 2.8	0.02 ± 0.01	0.22 ± 0.06	5
91	14.4 ± 0.9	32.3 ± 1.9	0.01 ± 0.01	0.20 ± 0.08	5

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern; n = Zahl der Tiere

^a Standardfehler auf 0.01 aufgerundet, nähere Erläuterungen siehe 2.7.1.

Tabelle 6: Retention von ^{239}Pu in Organen der Ratte nach i.v.Injektion von ^{239}Pu -Citrat

Tage nach ^{239}Pu -Inj.	% der injizierten Dosis				n
	Skelett	Leber	Milz	Nieren	
10	63.9 ± 3.0	14.5 ± 1.7	0.34 ± 0.02	0.60 ± 0.07	6
36	56.1 ± 2.6	3.8 ± 0.5 ^a	0.43 ± 0.03	0.32 ± 0.03	6
70	51.5 ± 1.8	2.7 ± 0.3	0.41 ± 0.02	0.20 ± 0.03	14
176	48.3 ± 0.5	1.7 ± 0.2	0.35 ± 0.05	0.12 ± 0.02	4

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern; n = Zahl der Tiere

^a_n = 4

Tabelle 7 : Retention von ^{241}Am in Organen der Ratte nach i.v. Injektion von ^{241}Am -Citrat

Tage nach ^{241}Am -Inj.	% der injizierten Dosis								n
	Skelett		Leber		Milz ^a		Nieren		
10	21.8	± 1.1	33.6	± 2.9	0.07	± 0.01	0.41	± 0.02	6
70	21.0	± 0.5	2.0	± 0.2	0.10	± 0.01	0.16	± 0.01	8
100	21.5	± 0.9	2.2	± 0.4	0.11	± 0.01	0.16	± 0.01	7

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern; n = Zahl der Tiere

^a Standardfehler auf 0.01 aufgerundet, nähere Erläuterungen siehe 2.7.1.

Tabelle 8 : Retention von ^{59}Fe in Organen der Ratte nach i.v. Injektion von ^{59}Fe -Citrat

Tage nach ^{59}Fe -Inj.	% der injizierten Dosis					n
	Femur	Leber	Milz	Nieren	Blut (1ml)	
10	0.16 ± 0.01	15.5 ± 0.8 ^a	1.03 ± 0.06	1.22 ± 0.07	5.9 ± 0.4 ^c	14
36	0.11 ± 0.01	12.4 ± 0.6 ^a	2.00 ± 0.27	0.80 ± 0.12	5.4 ± 0.2	8
	0.05 ± 0.01	5.7 ± 0.3 ^b	0.73 ± 0.05	0.31 ± 0.04	-	5
70	0.14 ± 0.01	13.3 ± 0.8 ^a	9.56 ± 0.76	0.70 ± 0.03	2.8 ± 0.2 ^d	8
	0.09 ± 0.01	9.7 ± 0.6 ^b	9.88 ± 0.43	0.56 ± 0.03	2.0 ± 0.1	5

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern; n = Zahl der Tiere

^a Einige Lebern perfundiert, mit Daten von unperfundierten Lebern vereinigt, da keine Signifikanz (p = 0.05)

^b unperfundierte Lebern

^c n = 4

^d n = 5

Tabelle 9 : Retention von ^{59}Fe in Organen der Maus nach i.v. Injektion von ^{59}Fe -Citrat

Tage nach ^{59}Fe -Inj.	% der injizierten Dosis					n
	Femur	Leber	Milz	Nieren	Blut (1ml)	
10	0.10 ± 0.01	11.6 ± 1.0 ^a	0.76 ± 0.08	1.51 ± 0.12	17.0 ± 0.6 ^b	12
36	0.12 ± 0.01	8.2 ± 2.2 ^c	2.61 ± 0.28	1.10 ± 0.09	20.4 ± 1.5	4
	0.17 ± 0.02	14.8 ± 1.3 ^d	2.59 ± 0.74	1.23 ± 0.18	14.6 ± 2.0	7
70	0.10 ± 0.02	5.3 ± 0.5 ^c	3.51 ± 0.27	0.72 ± 0.07	10.2 ± 0.8	5

72

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern; n = Zahl der Tiere

^a Einige Lebern perfundiert, mit Daten von unperfundierten Lebern vereinigt, da keine Signifikanz (p = 0.05)

^b n = 7

^c perfundierte Lebern

^d nicht perfundierte Lebern

Tabelle 10: Retention von ^{59}Fe in Organen des Chinesischen Hamsters nach i.v. Injektion von ^{59}Fe -Citrat

Tage nach ^{59}Fe -Inj.	% der injizierten Dosis					n
	Femur	Leber	Milz	Nieren	Blut (1ml)	
10	0.08 ± 0.01	9.0 ± 1.6 ^a	0.61 ± 0.07	1.49 ± 0.23	23.5 ± 0.2 ^b	8
	0.18 ± 0.01	17.3 ± 2.7 ^a	0.64 ± 0.07	2.18 ± 0.21	-	12
36	0.07 ± 0.01	4.3 ± 0.7 ^a	0.38 ± 0.07	0.81 ± 0.11	16.8 ± 0.3 ^c	9
	0.11 ± 0.02	8.7 ± 2.2 ^e	0.70 ± 0.06	1.32 ± 0.46	-	3
70	0.14 ± 0.01	6.5 ± 0.3 ^a	0.46 ± 0.01	1.30 ± 0.09	19.1 ± 1.2 ^d	20

73

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern; n = Zahl der Tiere

^a Einige Lebern perfundiert, mit Daten von unperfundierten Lebern vereinigt, da keine Signifikanz (p = 0.05)

^b n = 5

^c n = 5

^d n = 16

^e nicht perfundierte Lebern

Tabelle 11: Retention von ^{59}Fe in Organen des Syrischen Hamsters nach i.v. Injektion von ^{59}Fe -Citrat

Tage nach ^{59}Fe -Inj.	% der injizierten Dosis					n
	Femur	Leber	Milz	Nieren	Blut (1ml)	
10	0.12 ± 0.01	6.0 ± 0.8 ^a	0.65 ± 0.12	1.43 ± 0.18	8.8 ± 1.0	10
36	0.10 ± 0.01	3.0 ± 0.4 ^a	0.60 ± 0.10	0.50 ± 0.08	7.3 ± 0.8	9
70	0.19 ± 0.04	3.4 ± 0.8 ^b	0.50 ± 0.06	0.45 ± 0.07	3.8 ± 0.3	3

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern; n = Zahl der Tiere

^a Einige Lebern perfundiert, mit Daten von unperfundierten Lebern vereinigt, da keine Signifikanz (p = 0.05)

^b perfundierte Lebern

Tabelle 12: Relative subzelluläre Verteilung von $^{239}\text{Pu}^a$ nach differentieller Zentrifugation in der Leber von unbehandelten Chinesischen Hamstern

Tage nach ^{239}Pu -Inj.	% (N+E)					% E			n		
	E	N	ML	P	S	Ausbeute	ML	P		S	Ausbeute
0.04	84.8	16.9	13.9	6.3	64.3	101.5	16.4	7.5	75.8	99.7	1
1	86.8	12.9	32.0	10.5	44.7	100.1	36.9	12.0	51.5	100.4	1
2	79.9	18.1	46.4	6.7	25.9	97.0	58.1	8.4	32.4	99.0	1
4	65.1±2.6	34.5±2.6	48.7±2.6	4.1±0.6	11.4±0.8	98.7±0.8	74.6±1.4	6.4±0.9	17.5±1.4	98.6±1.5	5
6	82.2	17.1	69.9	3.3	8.7	99.0	84.4	4.0	10.5	99.0	1
10	67.7±5.8	33.4±5.8	63.2±6.5	1.9±0.4	3.6±0.4	102.1±1.0	93.0±1.8	2.8±0.2	5.3±0.5	101.1±1.9	3
36	63.8±1.9	36.3±2.8	60.2±3.6	1.7±0.5	2.4±0.4	100.6±0.4	94.2±2.9	2.6±0.8	3.8±0.8	100.7±1.6	3
70	65.3±3.6	34.0±3.8	62.4±2.6	1.6±0.6	2.2±0.4	100.1±1.2	95.9±1.7	2.4±0.9	3.2±0.5	101.5±1.2	5
119	72.6	28.9	73.0	0.7	1.5	104.0	100.4	0.9	2.0	103.4	1

75

Einzeldaten oder arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern

n = Zahl der Experimente

^a Applikation von ^{239}Pu i.v. als ^{239}Pu -Citrat

Nähere Erläuterungen und Abkürzungen siehe 2.2. und 2.7.2.

Tabelle 13 : Relative subzelluläre Verteilung von $^{239}\text{Pu}^a$ nach differentieller Zentrifugation in der Leber von Chinesischen Hamstern nach i.p. Injektion von $750 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Triton WR 1339 (TWR)

Tage nach ^{239}Pu -Inj.	Tage nach TWR-Inj.	% (N+E)						% E				n
		E	N	ML	P	S	Ausbeute	ML	P	S	Ausbeute	
4	3.75	49.2	51.3	30.1	3.4	14.0	98.7	61.1	6.8	28.5	96.4	2
36	4	50.1	49.4	43.5	2.7	5.5	101.0	86.8	5.3	10.9	103.0	1
70	4	48.2	52.8	41.0	1.6	4.4	99.8	85.1	3.2	9.2	97.6	1

Einzeldaten oder arithmetische Mittelwerte;

n = Zahl der Experimente

^a Applikation von ^{239}Pu i.v. als ^{239}Pu -Citrat

Nähere Erläuterungen und Abkürzungen siehe 2.2. und 2.7.2.

Tabelle 14 : Relative subzelluläre Verteilung von $^{241}\text{Am}^a$ nach differentieller Zentrifugation in der Leber von unbehandelten Chinesischen Hamstern und nach i.p. Injektion von $750 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Triton WR 1339 (TWR)^b

Tage nach ^{241}Am -Inj.	% (N+E)						% E				n
	E	N	ML	P	S	Ausbeute	ML	P	S	Ausbeute	
10	52.2	46.6	47.8	1.4	2.1	97.9	91.1	2.8	4.1	97.9	2
70	61.3	37.3	59.5	0.9	1.5	99.2	97.1	1.5	2.4	100.9	2
91	56.4	44.3	54.0	0.4	1.5	100.2	95.7	0.7	2.6	99.1	1
Triton WR 1339 - behandelt ^b											
10	36.7	62.4	27.3	2.2	6.2	97.9	73.5	6.2	16.5	96.1	1

Einzeldaten oder arithmetische Mittelwerte; n = Zahl der Experimente

^a Applikation von ^{241}Am i.v. als ^{241}Am -Citrat

^b i.p. Injektion von Triton WR 1339 4 Tage vor Sektion

Nähere Erläuterungen und Abkürzungen siehe 2.2. und 2.7.2.

Tabelle 15: Relative subzelluläre Verteilung von $^{239}\text{Pu}^{\text{a}}$ nach differentieller Zentrifugation in der Leber von unbehandelten Ratten und nach i.p. Injektion von $750 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Triton WR 1339 (TWR)^b

Tage nach ^{239}Pu -Inj.	% (N+E)						% E					n
	E	N	ML	P	S	Ausbeute	ML	P	S	Ausbeute		
10	77.0 ± 3.4	24.9 ± 3.0	62.3 ± 2.4	6.1 ± 1.0	9.1 ± 1.9	102.4 ± 1.0	80.9 ± 1.2	7.9 ± 1.5	11.7 ± 1.9	100.6 ± 0.8	3	
36	52.6 ± 1.5	46.4 ± 0.4	39.9 ± 1.3	5.2 ± 0.2	7.3 ± 0.3	98.9 ± 1.0	75.7 ± 0.3	9.7 ± 0.0	13.9 ± 0.7	99.7 ± 1.2	3	
70	45.1 ± 1.5	54.8 ± 1.7	33.8 ± 1.0	4.2 ± 0.3	7.4 ± 0.4	100.2 ± 1.0	74.9 ± 1.5	9.2 ± 0.5	16.4 ± 0.9	100.5 ± 1.0	5	
180	40.6 ± 2.1	58.7 ± 3.2	29.8 ± 1.9	4.3 ± 0.4	7.3 ± 0.6	100.0 ± 1.2	73.2 ± 2.0	10.6 ± 0.8	17.9 ± 1.4	101.7 ± 0.3	3	
Triton WR 1339 - behandelt ^b												
10	66.9	33.1	45.7	7.4	11.4	97.6	68.3	11.0	17.4	96.6	2	
36	55.0 ± 3.8	44.2 ± 3.9	34.4 ± 1.0	10.4 ^c	14.9 ± 0.7	98.2 ± 1.1	58.5 ± 1.1	17.8 ^c	27.2 ± 0.9	97.9 ± 2.4	3	
70	44.7 ± 3.2	55.0 ± 3.2	26.4 ± 3.2	8.5 ± 0.1	12.6 ± 0.6	102.5 ± 0.3	58.7 ± 3.1	19.3 ± 1.2	28.3 ± 1.7	106.2 ± 0.5	3	

78

Arithmetische Mittelwerte und Standardfehler; n = Zahl der Experimente

^a Applikation von ^{239}Pu i.v. als ^{239}Pu -Citrat

^b i.p. Injektion von Triton WR 1339 4 Tage vor Sektion

^c n = 1

Nähere Erläuterungen und Abkürzungen siehe 2.2. und 2.7.2.

Tabelle 16 : Relative subzelluläre Verteilung von $^{241}\text{Am}^a$ nach differentieller Zentrifugation in der Leber unbehandelter Ratten und nach i.p.Injektion von $750 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Triton WR 1339 (TWR) ^b

Tage nach ^{241}Am -Inj.	% (N+E)						% E				n
	E	N	ML	P	S	Ausbeute	ML	P	S	Ausbeute	
10	69.9±4.6	30.6±5.0	57.7±3.2	4.3±0.7	5.7±0.9	98.3±2.0	82.6±1.6	6.1±1.9	8.1±0.8	96.8±0.4	3
70	56.3±1.9	45.7±3.4	39.2±0.5	5.6±0.5	8.6±1.0	99.3±1.7	69.8±1.5	9.9±0.6	15.3±1.3	94.9±0.1	3
100	58.9	42.2	42.7	3.8	9.5	98.2	72.6	6.5	16.1	95.2	2
176	49.7	52.8	37.5	3.4	8.3	102.0	75.4	6.9	16.7	99.0	1
Triton WR 1339 - behandelt ^b											
10	64.4±1.2	36.7±2.3	48.4±2.1	4.4±0.4	9.9±0.5	99.4±2.3	75.1±1.9	6.8±0.6	15.4±1.0	97.2±0.7	3
70	62.5	37.6	38.2	7.2	13.0	95.9	61.0	11.5	20.1	93.3	2

79

Einzeldaten oder arithmetische Mittelwerte zum Teil mit Standardfehlern; n = Zahl der Experimente

^a Applikation von ^{241}Am i.v. als ^{241}Am -Citrat

^b i.p. Injektion von Triton WR 1339 4 Tage vor Sektion

Nähere Erläuterungen und Abkürzungen siehe 2.2. und 2.7.2.

Tabelle 17: Relative subzelluläre Verteilung von stabilem Eisen und $^{59}\text{Fe}^a$ nach differentieller Zentrifugation in der Leber von Chinesischen Hamstern

Isotop	Tage nach ^{59}Fe -Inj.	% (N+E)					% E					n
		E	N	ML	P	S	Ausbeute	ML	P	S	Ausbeute	
stabiles Fe	-	70.1	47.7	26.4	10.0	37.4	121.5	37.7	14.3	53.3	105.3	1
^{59}Fe	10	79.8	20.9	21.5	20.5	37.2	100.1	26.9	25.7	46.6	99.2	1
^{59}Fe	70	81.7	20.9	26.2	17.0	36.5	100.4	32.1	20.8	44.6	97.4	2

80

Einzeldaten oder arithmetische Mittelwerte; n = Zahl der Experimente

^a Applikation von ^{59}Fe i.v. als ^{59}Fe -Citrat

Nähere Erläuterungen und Abkürzungen siehe 2.2. und 2.7.2.

Tabelle 18: Relative subzelluläre Verteilung von stabilem Eisen und $^{59}\text{Fe}^a$ nach differentieller Zentrifugation in der Leber von Ratten.

Isotop	Tage nach ^{59}Fe -Inj.	% (N+E)					Ausbeute	ML	% E			n
		E	N	ML	P	S			P	S	Ausbeute	
stabiles Fe	-	94.6	12.6	10.2	22.0	47.8	92.6	10.7	23.3	50.6	84.6	1
^{59}Fe	10	87.8	12.4	14.0	27.2	50.6	104.3	15.9	31.0	57.7	104.5	1
^{59}Fe	70	84.1	14.8	17.1	29.0	39.4	100.2	20.3	34.5	46.8	101.6	1

Einzeldaten; n = Zahl der Experimente

^a Applikation von ^{59}Fe i.v. als ^{59}Fe -Citrat

Nähere Erläuterungen und Abkürzungen siehe 2.2. und 2.7.2.

Tabelle 19 : Relative subzelluläre Verteilung von lysosomalen Markerenzymen nach differentieller Zentrifugation in der Leber von unbehandelten Chinesischen Hamstern und nach i.p. Injektion von $750 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Triton WR 1339 (TWR)^a

Enzym	Behandlung	% (N+E)					% E					n
		E	N	ML	P	S	Ausbeute	ML	P	S	Ausbeute	
Saure Phosphatase	Kontrolle	71.7	28.6	55.3	6.3	8.5	98.7	77.8	9.3	11.8	98.8	2
	TWR	56.8	42.4	39.8	8.0	10.5	100.6	70.2	14.1	18.4	102.7	2
Kathepsin D	Kontrolle	63.4	29.0	55.0	1.9	6.0	91.9	86.8	3.0	9.5	99.2	2
	TWR	63.5	25.6	31.5	3.8	28.7	89.5	49.4	6.0	45.5	100.8	2
N-Acetyl- β	Kontrolle	66.5 \pm 3.5	32.9 \pm 3.5	51.2 \pm 4.4	1.5 \pm 0.4	11.4 \pm 1.8	98.7 \pm 2.1	76.9 \pm 5.3	2.3 \pm 0.5	17.2 \pm 2.8	96.4 \pm 3.5	5
Glukos-aminidase	TWR	58.7 \pm 3.5	37.2 \pm 3.8	36.1 \pm 6.6	2.3 \pm 0.2	16.7 \pm 2.9	92.3 \pm 1.7	60.5 \pm 7.3	4.0 \pm 0.2	29.3 \pm 6.0	93.8 \pm 1.6	4

82

Arithmetische Mittelwerte zum Teil mit Standardfehlern; n = Zahl der Experimente

^a i.p. Injektion von Triton WR 1339 4 Tage vor Sektion

Nähere Erläuterungen und Abkürzungen siehe 2.2. und 2.7.2.

Tabelle 20: Relative subzelluläre Verteilung von lysosomalen Markerenzymen nach differentieller Zentrifugation in der Leber von unbehandelten Ratten und nach i.p. Injektion von 750 mg·kg⁻¹ Triton WR 1339 (TWR)^a

Enzym	Behandlung	% (N+E)					% E			n		
		E	N	ML	P	S	Ausbeute	ML	P		S	Ausbeute
Saure Phosphatase	Kontrolle	84.1±4.5	19.7±3.6	69.8±2.9	5.9±1.1	7.5±2.0	102.4±3.8	83.9±5.1	6.8±1.3	8.5±2.0	99.2±5.5	5
	TWR	69.3	31.3	48.6	6.1	15.8	101.7	70.1	8.8	22.9	101.7	2
Kathepsin D	Kontrolle	63.1	28.9	41.8	4.2	11.5	86.3	66.6	6.9	17.6	91.1	2
	TWR	68.9	25.7	32.1	3.5	29.3	90.6	47.1	5.3	41.1	93.5	2
N-Acetyl-β	Kontrolle	75.7±2.5	23.6±2.6	75.0±0.5	2.4±0.4	2.6±0.6	103.6±3.3	99.3±3.8	3.2±0.5	3.3±0.8	105.8±3.4	4
Glukos-aminidase	TWR	68.9	35.2	52.2	4.3	4.4	96.0	74.9	6.4	6.7	87.9	2

83

Arithmetische Mittelwerte zum Teil mit Standardfehlern; n = Zahl der Experimente

^a i.p. Injektion von Triton WR 1339 4 Tage vor Sektion

Nähere Erläuterungen und Abkürzungen siehe 2.2. und 2.7.2.

Tabelle 21: Relative subzelluläre Verteilung von Leitenzymen des Endoplasmatischen Reticulums und der perizellulären Membranen nach differentieller Zentrifugation in der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern.

Tier- spezies	Enzym	% (N+E)						% E				n
		E	N	ML	P	S	Ausbeute	ML	P	S	Ausbeute	
Ratte	Glukose-6- Phosphatase	97.8	13.3	73.7	17.9	4.5	109.4	76.0	18.0	4.7	98.5	2
	5'Nucleo- tidase	62.2	26.3	46.5	16.8	5.1	94.6	77.1	25.9	8.0	110.6	2
	Alkalische Phosphodiesterase	57.5	42.0	49.3	9.1	3.5	103.8	85.7	15.7	6.1	107.6	1
Chin. Hamster	Glukose-6- Phosphatase	73.6±6.8	28.6±5.0	57.9±6.0	12.1±3.1	1.4±0.7	100.1±4.3	78.5±2.1	16.0±2.8	2.1±1.1	96.6±2.2	3
	5'Nucleo- tidase	51.6	41.6	37.7	11.7	3.9	94.8	73.6	23.1	7.5	104.1	2
	Alkalische Phosphodiesterase	38.0	55.2	25.3	9.9	1.5	91.9	66.5	26.1	4.0	96.5	1

84

Einzeldaten oder arithmetische Mittelwerte, zum Teil mit Standardfehlern; n = Zahl der Experimente

Nähere Erläuterungen und Abkürzungen siehe Methoden 2.2. und 2.7.2.

Tabelle 22: Mediane Dichten der Verteilungsprofile von Leitenzymen nach 4- und 16-stündiger^a Zentrifugation im Saccharosedichtegradienten einer ML-Fraktion^b aus der Leber unbehandelte Tiere und nach Injektion von Triton WR 1339^c

Tierspezies	Enzym	Behandlung	Tage nach TWR-Inj.	ML 4 + 16 h	n
Chin. Hamster	Saure Phosphatase	Kontrolle	-	1.161 [±] 0.003	23
		TWR	4	1.108 [±] 0.006	9
			24	1.115 [±] 0.004	3
	N-Acetyl- β-Glukosaminidase	Kontrolle	-	1.184 [±] 0.002	8
		TWR	4	1.123 [±] 0.004	6
			24	1.123 [±] 0.003	3
	Kathepsin D	Kontrolle	-	1.175 [±] 0.003	7
		TWR	4	1.113 [±] 0.002	4
			24	1.112 [±] 0.003	3
	5'Nucleotidase	Kontrolle	-	1.152 [±] 0.002	18
		TWR	4	1.125 [±] 0.007	5
	Alk. Phosphodiesterase	Kontrolle	-	1.145 [±] 0.002	5
		TWR	4	1.142 [±] 0.002	5
	Glutamatdehydrogenase	Kontrolle+TWR ^d	4	1.191 [±] 0.002	21
Glukose-6-Phosphatase	Kontrolle+TWR ^d	4	1.172 [±] 0.002	16	
Ratte	Saure Phosphatase	Kontrolle	-	1.183 [±] 0.001	8
		TWR	4	1.112 [±] 0.002	12
			24	1.137	2
	N-Acetyl- β-Glukosaminidase	Kontrolle	-	1.192 [±] 0.002	7
		TWR	4	1.121 [±] 0.002	6
			24	1.147	2
	Kathepsin D	Kontrolle	-	1.192 [±] 0.003	7
		TWR	4	1.117 [±] 0.003	5
			24	1.122	2
	5'Nucleotidase	Kontrolle	-	1.166 [±] 0.004	5
		TWR	4	1.128 [±] 0.007	10
	Alk. Phosphodiesterase	Kontrolle	-	1.151 [±] 0.002	9
		TWR	4	1.145 [±] 0.002	4
	Glutamatdehydrogenase	Kontrolle+TWR ^d	4	1.198 [±] 0.002	8
Glukose-6-Phosphatase	Kontrolle+TWR ^d	4	1.182 [±] 0.006	5	

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern

n = Zahl der Experimente

^a Einzeldaten nach 4- bzw. 16- stündiger Zentrifugationszeit vereinigt, da kein signifikanter (p = 0.05) Unterschied

^b ML-Fraktion erhalten nach differentieller Zentrifugation des Leberhomogenates. (s. Meth.2.2.)

^c i.p. Injektion von 750 mg · kg⁻¹ Triton WR 1339 (TWR)

^d Einzelwerte aus Kontroll- und TWR-Versuchen vereinigt, da kein signifikanter (p = 0.05) Unterschied

Nähere Erläuterungen siehe 2.7.3.

Tabelle 23: Mediane Dichten der Verteilungsprofile von ^{239}Pu , ^{241}Am und ^{59}Fe ^a nach 4 oder 16 Stunden Zentrifugation im Saccharosedichtegradienten einer ML-Fraktion^b aus der Leber unbehandelter Tiere und nach Injektion von Triton WR 1339^c

Tierspezies	Nuklid	Tage nach Nuklid-Inj.	Kontrolle				TWR	
			4 h	n	16 h	n	4 h	n
Chin.Hamster	^{239}Pu	4	1.162 ± 0.004	6	1.160 ± 0.004	3	1.141 ± 0.003	4
		10	1.154 ± 0.004	4	1.155	2	-	
		36	1.147 ± 0.002	5	1.143 ± 0.001	4	1.150	2
		70	1.138 ± 0.003	10	1.132 ± 0.004	9	1.165	2
	^{241}Am	10	1.147 ± 0.003	3	1.148	2	1.152	2
		70	1.128 ± 0.006	5	-		-	
		^{59}Fe	10 + 70	1.161	2	1.176	2	1.145
Ratte	^{239}Pu	10	1.189	2	1.186	1	1.127	2
		36	1.177 ± 0.005	4	1.181 ± 0.003	4	1.131 ± 0.005	3
		70	1.181 ± 0.004	7	1.176 ± 0.003	7	1.143 ± 0.006	4
	^{241}Am	10	1.184 ± 0.003	3	-		1.134 ± 0.001	3
		70	1.169 ± 0.003	6	-		1.139	2
		^{59}Fe	10 + 70	1.159	2	1.196	2	-

Einzeldaten oder arithmetische Mittelwerte, zum Teil mit Standardfehlern; n = Zahl der Experimente
a Applikation der Nuklide i.v. als Citrat
b ML-Fraktion erhalten nach differentieller Zentrifugation des Leberhomogenates
c i.p. Injektionen von $750 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Triton WR 1339 4 Tage vor Sektion
Nähere Erläuterungen siehe Methoden 2.7.3.

Tabelle 24: Einfluß von Triton WR 1339 (TWR)^a auf die Verteilung von Saurer Phosphatase sowie ²³⁹Pu^b nach 4 stündiger Zentrifugation im Saccharosedichtegradienten einer ML-Fraktion^c aus der Leber TWR-behandelter Tiere

	Tage nach ²³⁹ Pu-Inj.	Tage nach TWR-Inj.	durch TWR beeinflussbare Fraktion (% der jeweiligen Kontrolle)					
			Chin.Hamster	n	Kontrolle n	Ratte	n	Kontrolle n
²³⁹ Pu	4	3.75	34.4 ± 3.6	4	6	-		
	10	4	-		3	50.4	2	2
	36	4	15.6	2	5	35.8 ± 1.7	3	4
	70	4			10	31.4 ± 4.0	4	7
	30 ^d	24	33.7	2	5	34.4	2	4
Saure Phosphatase	-	4	48.3 ± 2.1	6	15	63.6 ± 1.5	8	5
	-	24	49.9 ± 3.0	3	15	47.0	2	5

Arithmetische Mittelwerte zum Teil mit Standardfehlern; n = Zahl der Experimente

^a i.p. Injektion von 750 mg · kg⁻¹ Triton WR 1339

^b Applikation von ²³⁹Pu i.v. als ²³⁹Pu-Citrat

^c ML-Fraktion erhalten nach differentieller Zentrifugation

^d Kontrolle zu diesem Versuch: Verteilung von ²³⁹Pu im Saccharosedichtegradienten nach 4-stündiger Zentrifugation einer ML-Fraktion aus der Leber unbehandelter Tiere 36 Tage nach Injektion von ²³⁹Pu-Citrat

Nähere Erläuterungen siehe 2.7.4.

Tabelle 25: Übereinstimmung des Verteilungsprofils von $^{239}\text{Pu}^{\text{a}}$ mit dem der Sauren Phosphatase^b nach vierstündiger Zentrifugation im Saccharosedichtegradienten einer ML-Fraktion^c aus der Leber unbehandelter Tiere.

Prozentuale Übereinstimmung

Tage nach ^{239}Pu -Inj.	Chin.Hamster	n	Ratte	n
4	90.5 ± 2.0	6	-	
10	85.0 ± 2.3	3	90.6	2
36	77.2 ± 2.8	5	78.0 ± 2.8	4
70	70.5 ± 3.7	10	81.7 ± 2.0	7

Arithmetische Mittelwerte zum Teil mit Standardfehlern; n = Zahl der Experimente

^a Applikation von ^{239}Pu i.v. als ^{239}Pu -Citrat

^b Berechnung siehe Methoden 2.7.4.

^c ML-Fraktion erhalten nach differentieller Zentrifugation des Leberhomogenates (s. Meth. 2.2.)

Tabelle 26: Gesamtgehalt an ^{239}Pu und Saurer Phosphatase in den Fraktionen 2 - 11 ($\rho = 1.19 - 1.14$) in % des Gesamtgehalts im Saccharosedichtegradienten^a

	Tage nach ^{239}Pu -Inj.	Gehalt in Fr.2-11 (in %)	n
Chinesischer Hamster			
Saure Phosphatase	-	78.1 ± 1.3	15
^{239}Pu	4	80.2 ± 1.4	6
	10	76.2 ± 1.3	4
	70	54.8 ± 0.9	10
Ratte			
Saure Phosphatase	-	88.8 ± 1.6	5
^{239}Pu	10	88.1 ± 2.1	2
	70	80.8 ± 1.4	7

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern

n = Zahl der Experimente

^a 4-stündige Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Saccharosedichtegradienten (siehe auch Abb. 6 und 8)

Tabelle 27 : Mediane Dichten der Verteilungsprofile von Leitenzymen nach 6 oder 16 Stunden Zentrifugation im Metrizamiddichtegradienten einer ML-Fraktion^a aus der Leber unbehandelter Tiere.

Tierspezies	Enzym	6 h	n	16 h	n
Chin.Hamster	Saure Phosphatase	1.109 ± 0.002	6	1.109 ± 0.004	4
	N-Acetyl-β-Glukosaminidase	1.110 ± 0.001	4	1.131 ± 0.003	3
	Kathepsin D	1.106 ± 0.000	4	1.115 ± 0.005	3
	5'Nucleotidase	1.097 ± 0.002	5	1.102 ± 0.001	3
	Alk.Phosphodiesterase	1.129 ± 0.006	4	1.133	2
	Glutamatdehydrogenase	1.201 ± 0.002	4	1.163	2
	Glukose-6-Phosphatase	1.160 ± 0.003	4	1.150 ± 0.002	3
Ratte	Saure Phosphatase	1.116 ± 0.004	5	1.119 ± 0.003	3
	N-Acetyl-β-Glukosaminidase	1.140 ± 0.005	6	1.157 ± 0.001	3
	Kathepsin D	1.122 ± 0.007	3	1.112 ± 0.003	3
	5'Nucleotidase	1.095 ± 0.004	4	1.121	2
	Alk.Phosphodiesterase	1.123 ± 0.002	5	1.143 ± 0.004	3
	Glutamatdehydrogenase	1.178 ± 0.003	4	1.159	1
	Glukose-6-Phosphatase	1.154 ± 0.005	5	1.161 ± 0.006	4

06

Einzeldaten oder arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern;

n = Zahl der Experimente

^a ML-Fraktion erhalten nach differentieller Zentrifugation des Leberhomogenates

Nähere Erläuterungen siehe Methoden 2.7.3.

Tabelle 28: Mediane Dichten der Verteilungsprofile von ^{239}Pu , ^{241}Am und ^{59}Fe ^a nach 6 oder 16 Stunden Zentrifugation im Metrizamiddichtegradienten einer ML-Fraktion^b aus der Leber unbehandelter Tiere.

Tierspezies	Nuklid	Tage nach Nuklid-Inj.	6 h	n	16 h	n
Chin.Hamster	^{239}Pu	4 + 10 ^c	1.132 ± 0.004	7	1.146 ± 0.004	5
		70	1.122 ± 0.004	4	1.129 ± 0.005	4
	^{241}Am	10	1.118	2	1.146	1
		70	1.111 ± 0.007	3	-	
	^{59}Fe	10 + 70	1.144	2	1.161	2
	Ratte	^{239}Pu	10	1.124 ± 0.006	3	1.147
70			1.149 ± 0.005	6	1.157 ± 0.007	3
^{241}Am		10	1.138 ± 0.004	3	-	
		70	1.128 ± 0.003	5	-	
^{59}Fe		10 + 70	1.153	2	1.191	2

Einzeldaten oder arithmetische Mittelwerte zum Teil mit Standardfehlern; n = Zahl der Experimente

^a Applikation der Nuklide i.v. als Citrat

^b ML-Fraktion erhalten nach differentieller Zentrifugation des Leberhomogenates

^c Einzeldaten aus 4- bzw. 10-Tage-Versuchen vereinigt, da kein signifikanter Unterschied (p = 0.05)

Nähere Erläuterungen siehe 2.7.3.

Tabelle 29: Relative Verteilung von $^{239}\text{Pu}^a$ und Leitenzymen der Lysosomen und perizellulären Membranen einer ML-Fraktion^b aus der Leber von Chinesischen Hamstern im Percoll-Dichtegradienten

Dichtebereich und Ausgangsdichte	in % der ^{239}Pu -Aktivität ^c Tage nach ^{239}Pu -Inj.			in % der Gesamt-Enzymaktivität ^c				
	10	36	70	N.A.G.	Kath.D	5 'N	AP	n
1.07								
I. ≥ 1.073	68.1	59.6	51.4	52.7	41.1	13.4	7.6	2
II. $<1.073 \geq 1.069$	14.4	16.8	17.8	36.3	42.1	45.2	24.5	2
III. <1.069	17.5	23.6	30.7	11.1	16.9	41.5	67.9	2
1.08								
I. ≥ 1.083	62.5	49.8	32.8	45.2	42.6	14.1	7.4	2
II. $<1.083 \geq 1.080$	15.7	14.8	18.6	41.9	37.8	25.6	33.3	2
III. <1.080	21.8	35.3	48.5	13.0	19.7	60.5	59.4	2

Einzelwerte oder arithmetische Mittelwerte;

n = Zahl der Experimente

^a Applikation von ^{239}Pu i.v. als ^{239}Pu -Citrat

^b ML Fraktion erhalten nach differentieller Zentrifugation des Leberhomogenates

^c Bezogen auf die jeweils erhaltene Gesamtaktivität (als 100 %) im Gradienten
Abkürzungen und nähere Erläuterungen siehe 2.3.3. und 2.7.5.

Tabelle 30 : Filtrierbarkeit von ^{239}Pu und ^{59}Fe durch Millipore-Filter in Fraktionen aus der Chinesischen Hamsterleber (siehe auch 3.6.)

Nuklid	Tag nach Nuklid-Inj.	Ausgangsmaterial	Porengröße (μm)	% der aufgetragenen Nuklidmenge		
				Filter	Filtrat	Ausbeute
^{239}Pu	4	ML	1.2	16.5	75.2	91.7
		ML	0.45	74.5	11.3	86.2
		Fr. 8-12 ^a	1.2	33.7	56.3	90.0
		Fr. 8-12 ^a	0.45	90.1	11.9	102.0
	10	ML	1.2	10.1	88.1	98.2
		Fr. 9-14 ^a	1.2	59.0	31.8	90.8
		Fr. 9-14 ^a	0.45	80.9	6.2	87.1
	70	ML	1.2	15.7	85.6	101.3
		ML	0.45	62.4	15.3	77.7
		Fr. 9-14 ^a	1.2	45.0	46.3	91.3
Fr. 9-14 ^a		0.45	92.1	5.7	97.8	
^{59}Fe	10	ML	1.2	22.5	70.5	93.0
		ML	0.45	57.1	30.3	87.4

Ein Experiment pro Wert, bei ML am 4. Tag zwei Experimente

^aFraktionen aus Saccharosedichtegradienten (entsprechend Abb. 6 und 8)

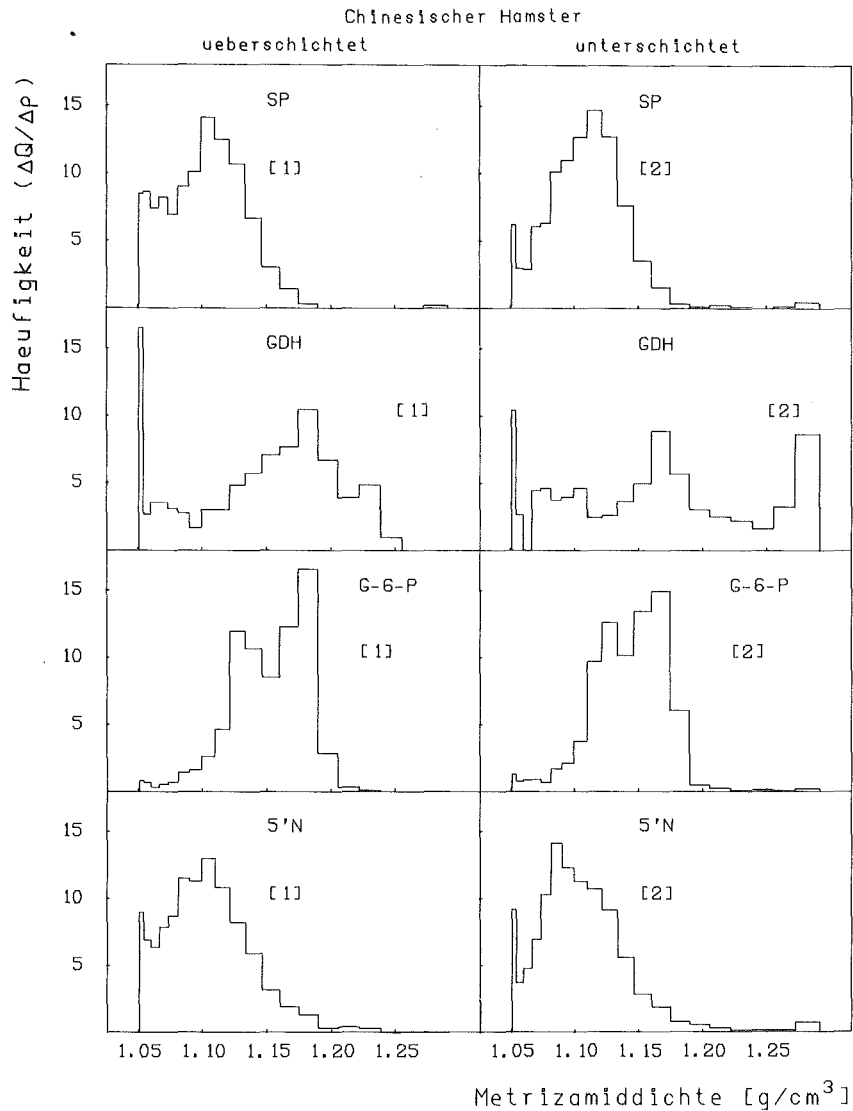


Abb. 1: Verteilung von Enzymen nach Zentrifugation der ML-Fraktion aus Chinesischen Hamsterlebern im linearen Metrizamiddichtegradienten (6 Stunden, $88\ 000\ g_{av}$). Linke Spalte: Gradient mit 1.7 ml ML ueberschichtet; rechte Spalte: Gradient mit 1.7 ml unterschichtet.

Einzeldaten oder arithmetische Mittelwerte, Zahl der Versuche in Klammern.

SP = Saure Phosphatase, GDH = Glutamatdehydrogenase, G-6-P = Glukose-6-Phosphatase, 5'N = 5'Nucleotidase. Nähere Erläuterungen zur Darstellung siehe auch 2.7.3.

ΔQ = relativer Gehalt der Komponente in der Fraktion,

Δp = Dichteunterschied zwischen den Fraktionen

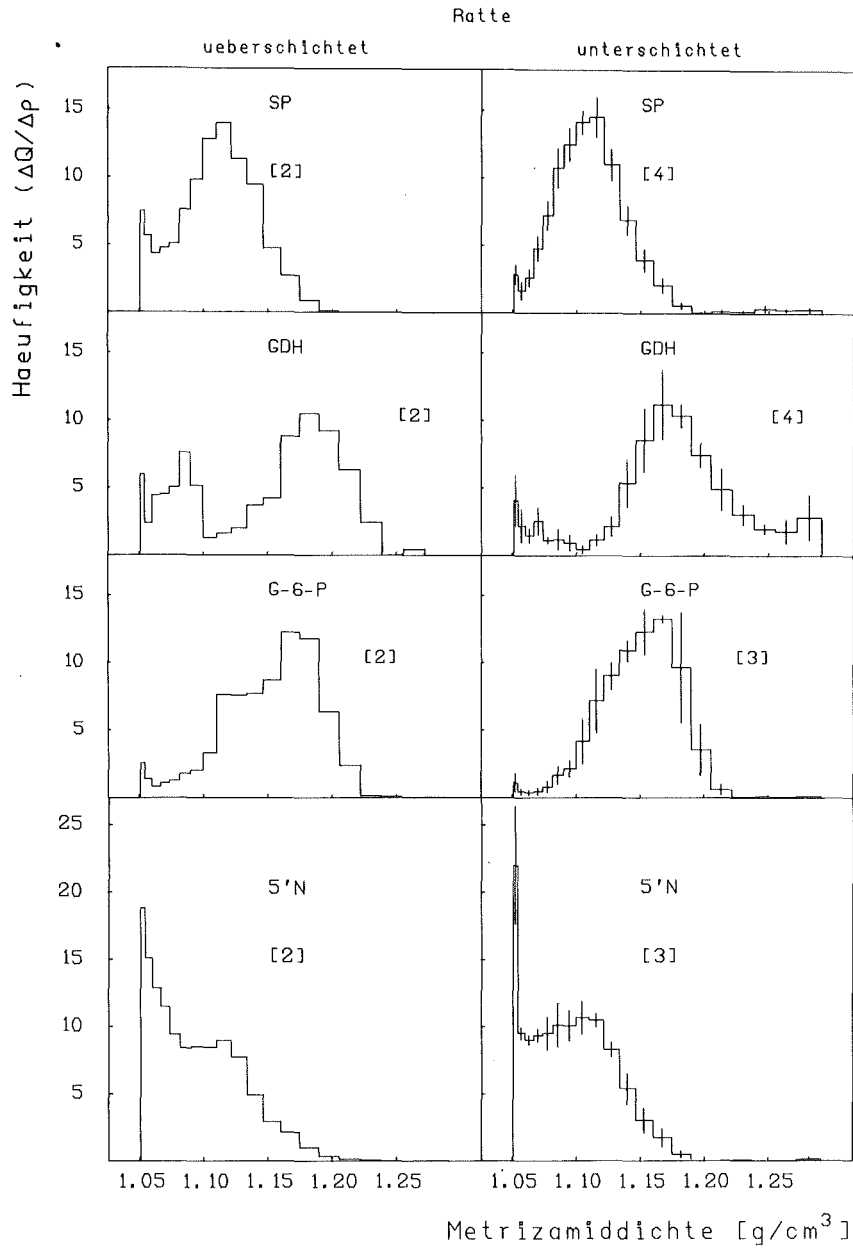


Abb. 2: Verteilung von Enzymen nach Zentrifugation der ML-Fraktion aus Rattenlebern im linearen Metrizamiddichtegradienten (6 Stunden, $88\ 000\ g_{av}$). Linke Spalte: Gradient mit 1.7 ml ML ueberschichtet, rechte Spalte: Gradient mit 1.7 ml ML unterschichtet. Nähere Angaben und Abkürzungen siehe Abb. 1.

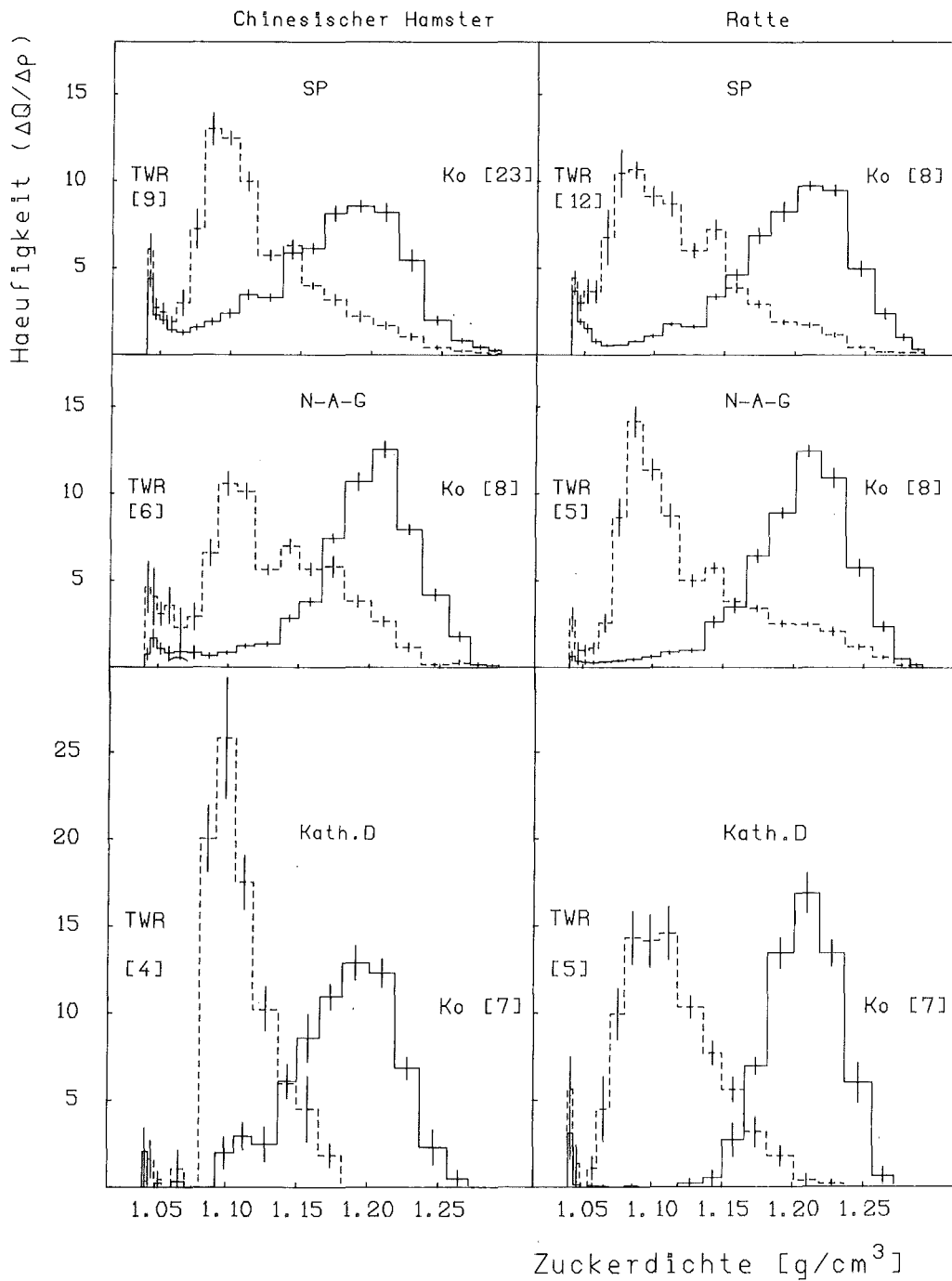


Abb. 3: Verteilung von lysosomalen Enzymen aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Saccharosedichtegradienten (Daten nach 4- und 16-stündiger Zentrifugation vereinigt, da kein signifikanter Unterschied [$p = 0.05$], 88 000 g_{av}). SP = Saure Phosphatase, N-A-G = N-Acetyl- β -Glukosaminidase, Kath. D = Kathepsin D. Nähere Angaben siehe Abb. 1.

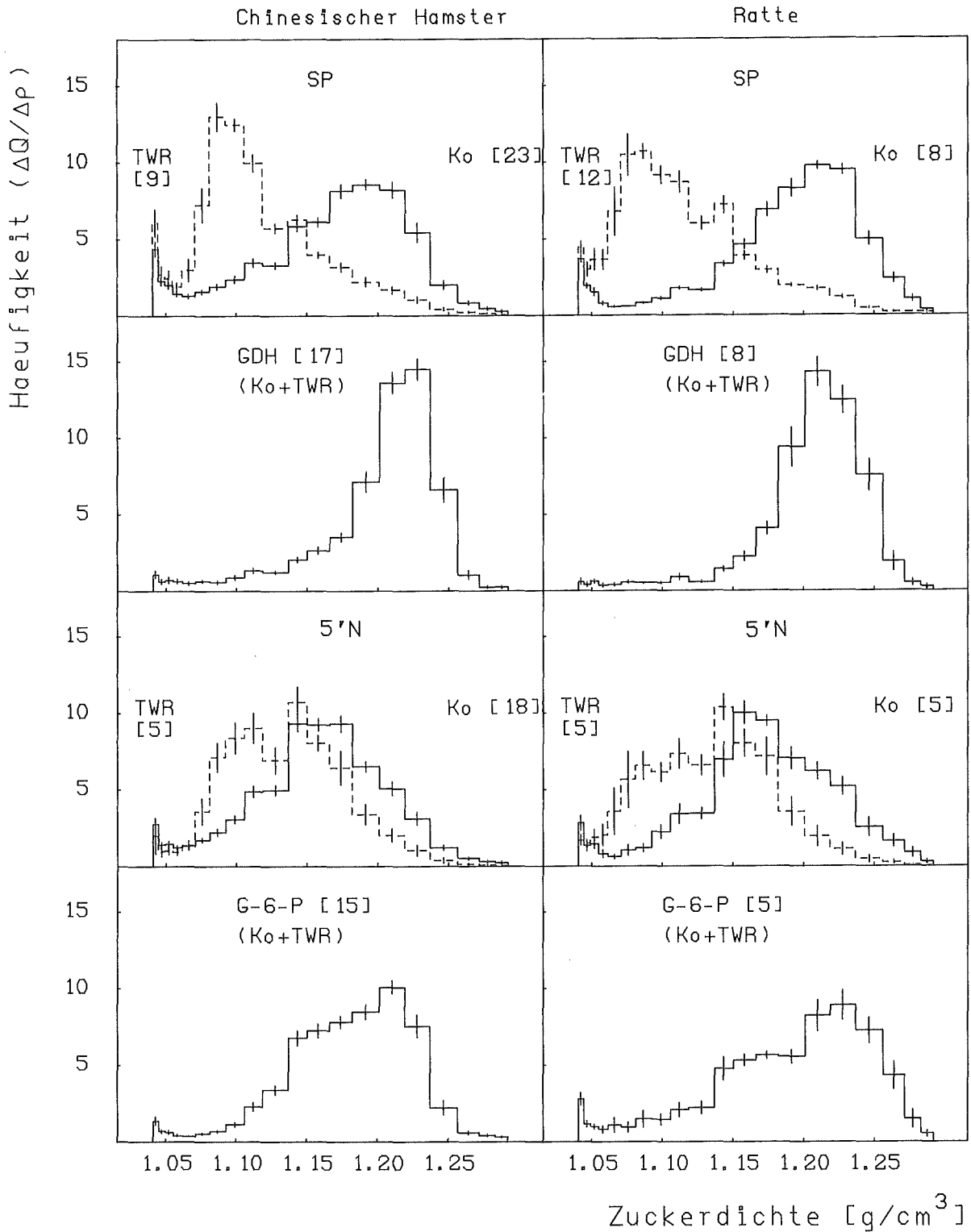


Abb. 4: Verteilung von Enzymen aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Saccharosedichtegradienten (Daten nach 4- und 16-stündiger Zentrifugation vereinigt, da kein signifikanter Unterschied [$p = 0.05$]). Nähere Angaben und Abkürzungen siehe Abb. 1.

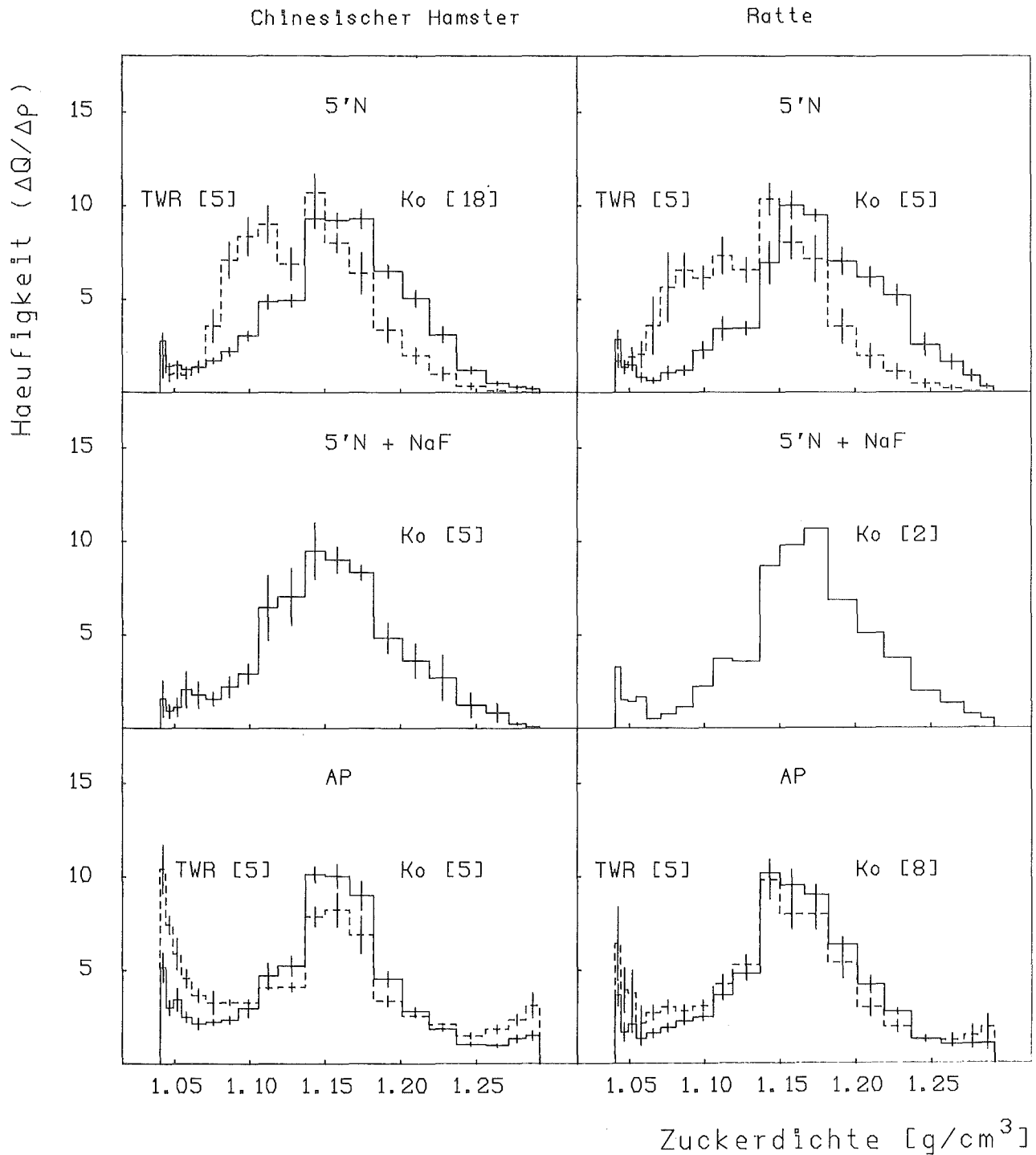


Abb. 5: Verteilung von Enzymen der perizellulären Membranen aus der Leber von Ratte und Chinesischem Hamster nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Saccharosedichtegradienten (Daten nach 4- und 16-stündiger Zentrifugation vereinigt, da kein signifikanter Unterschied [$p = 0.05$]), 5'N+NaF = 5' Nucleotidasebestimmung unter Zugabe von NaF zur Hemmung der fluoridsensitiven Sauren Phosphatase, AP = Alkalische Phosphodiesterase. Nähere Angaben siehe Abb. 1.

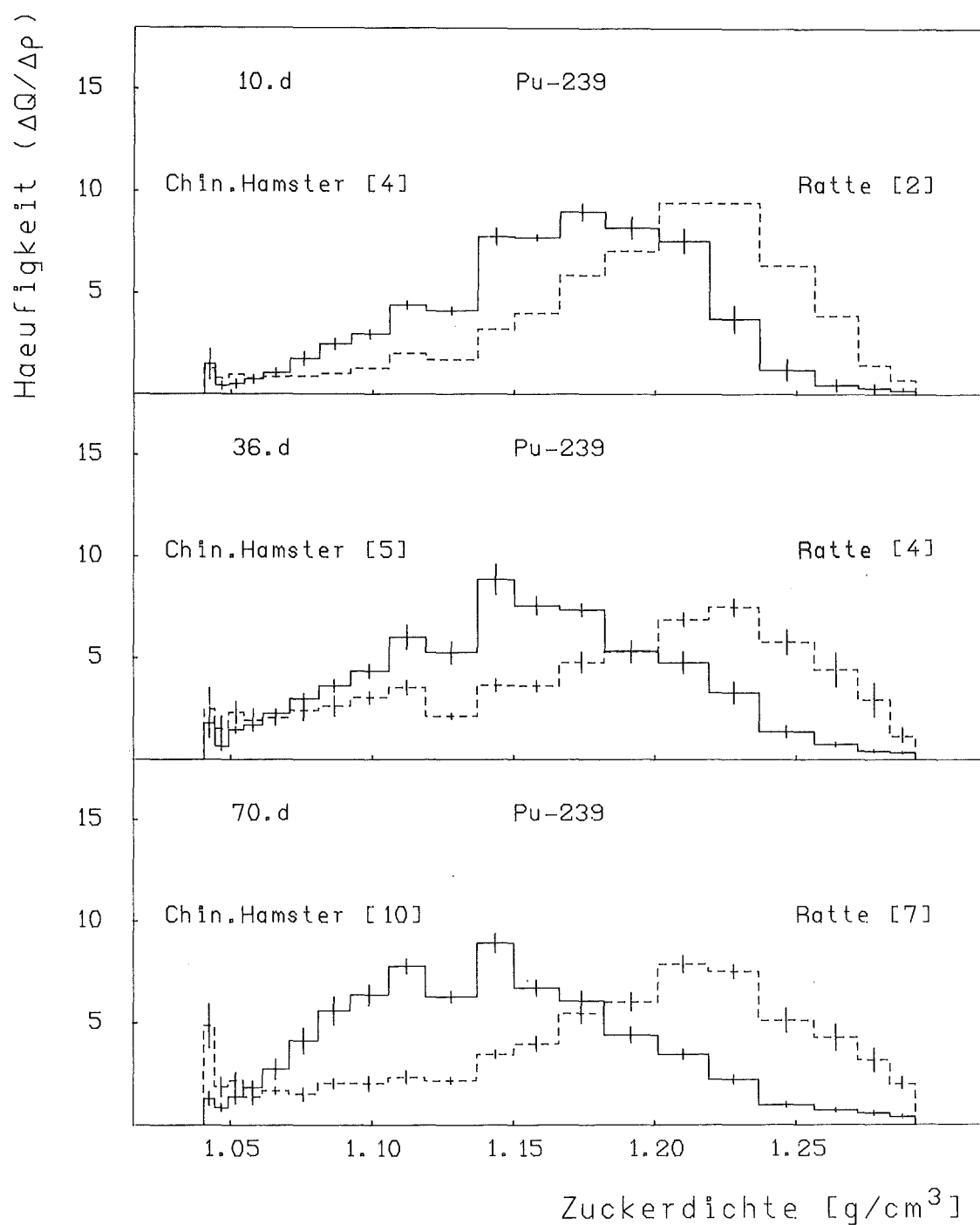


Abb. 6: Verteilung von ^{239}Pu -Aktivität aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Saccharosedichtegradienten (4 Stunden am 10., 36. und 70. Tag nach Nuklid-Injektion). Nähere Angaben siehe Abb. 1.

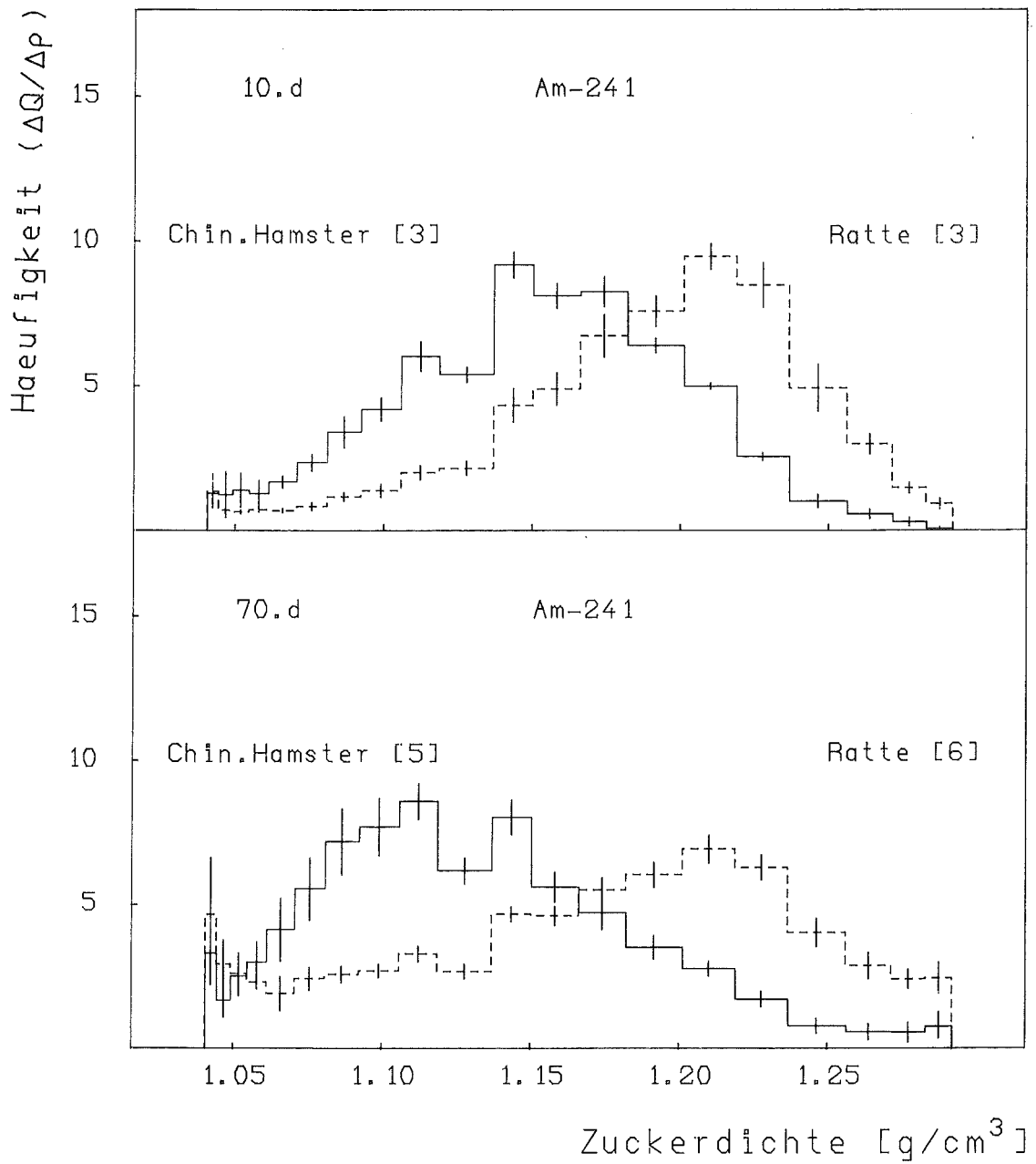


Abb. 7: Verteilung von ^{241}Am -Aktivität aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Saccharosedichtegradienten (4 Stunden am 10. und 70. Tag nach Nuklid-Injektion). Nähere Angaben siehe Abb. 1.

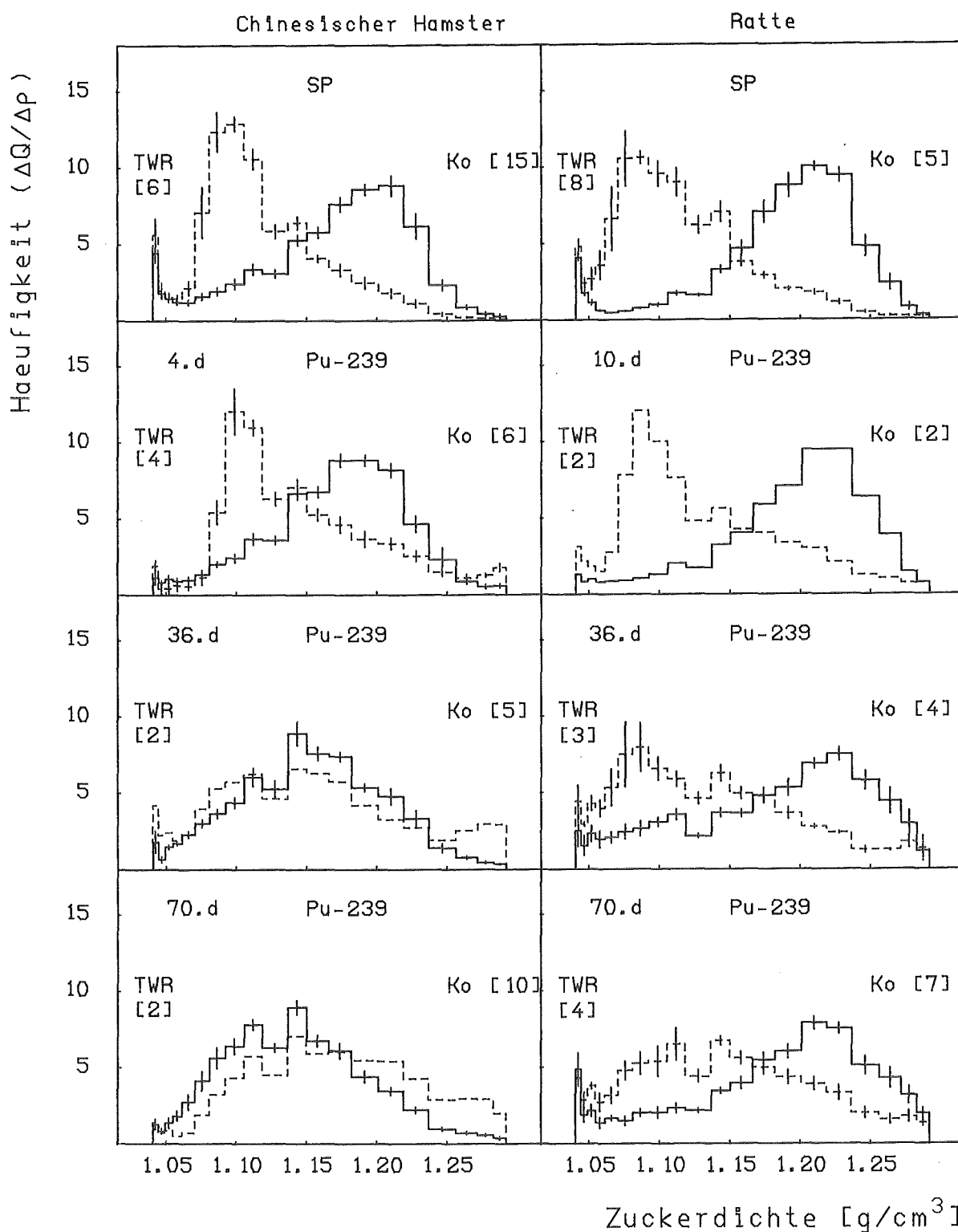


Abb. 8: Verteilung von Saurer Phosphatase und ^{239}Pu aus der Leber von Triton WR 1339-behandelten Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Saccharosedichtegradienten (4 Stunden). Sektion 4, 10, 36 oder 70 Tage nach Radionuklid-Injektion, TWR-Injektion 4 Tage vor Sektion (beim 4-Tage-Versuch TWR-Injektion 6 Stunden nach Nuklid-Injektion). Nähere Angaben siehe Abb. 1 (TWR-Profil = gestrichelte Linie).

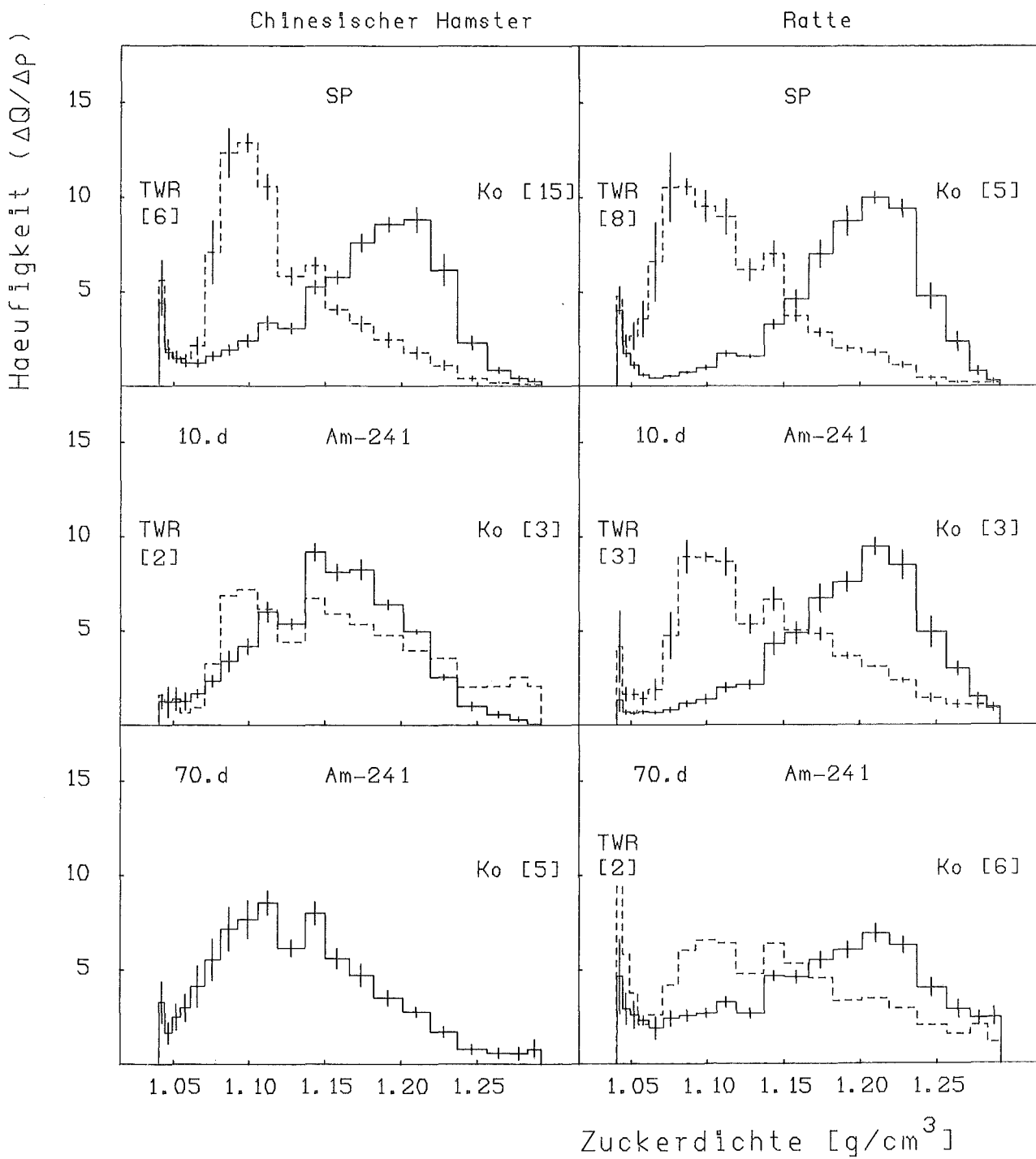


Abb. 9: Verteilung von Saurer Phosphatase und ^{241}Am aus der Leber von Triton WR 1339-behandelten Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Saccharosedichtegradienten (4 Stunden). Sektion 10 oder 70 Tage nach Radionuklid-Injektion, Applikation von TWR 4 Tage vor Sektion. Nähere Angaben siehe Abb. 1.

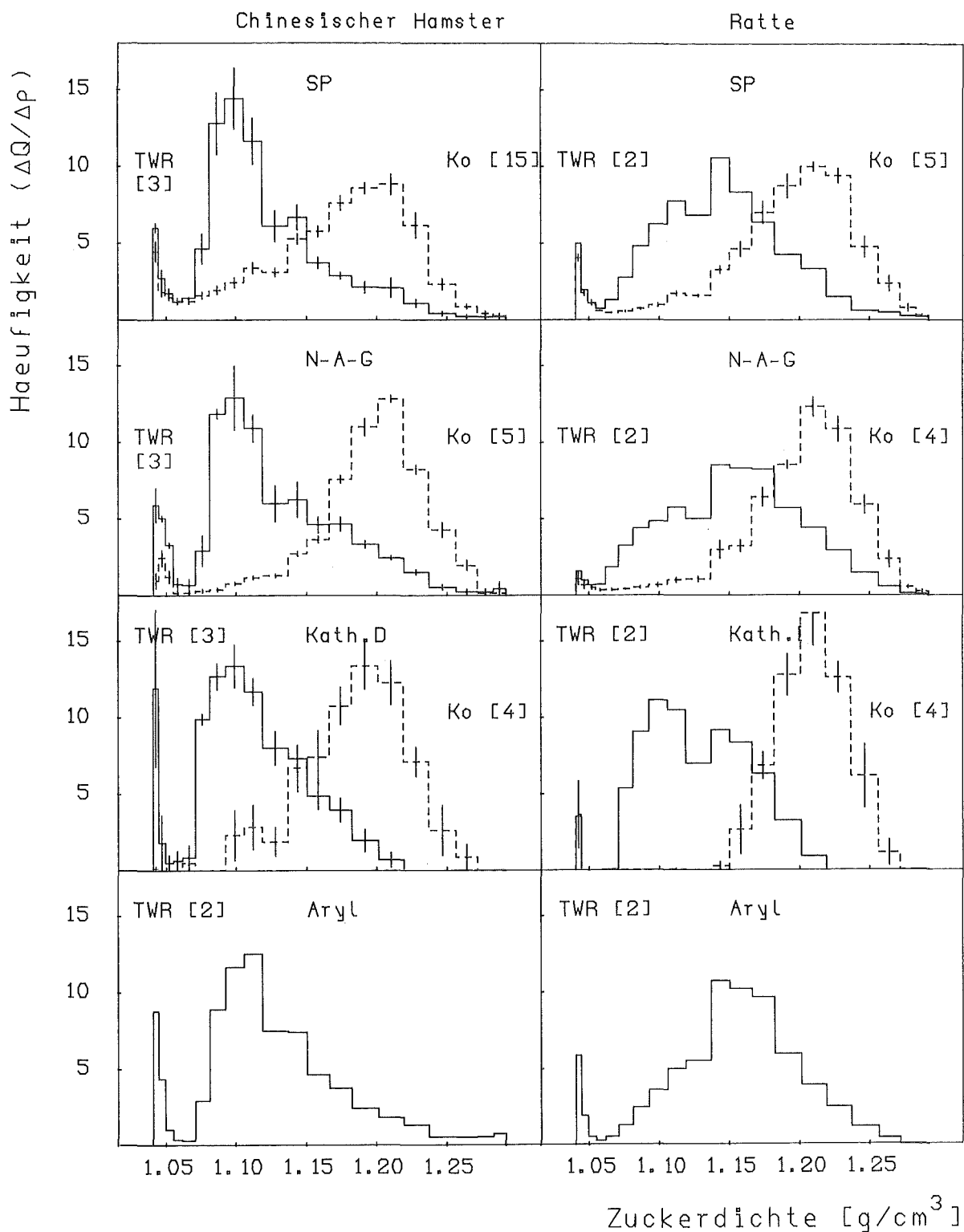


Abb. 10: Verteilung von lysosomalen Enzymen aus der Leber von Triton WR 1339-behandelten Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Saccharose-dichtegradienten (4 Stunden). Injektion von TWR 24 Tage vor Sektion. Aryl = Arylsulfatase A,B. Weitere Abkürzungen siehe Abb. 3, nähere Angaben siehe Abb. 1 (TWR-Profil = durchgezogene Linie).

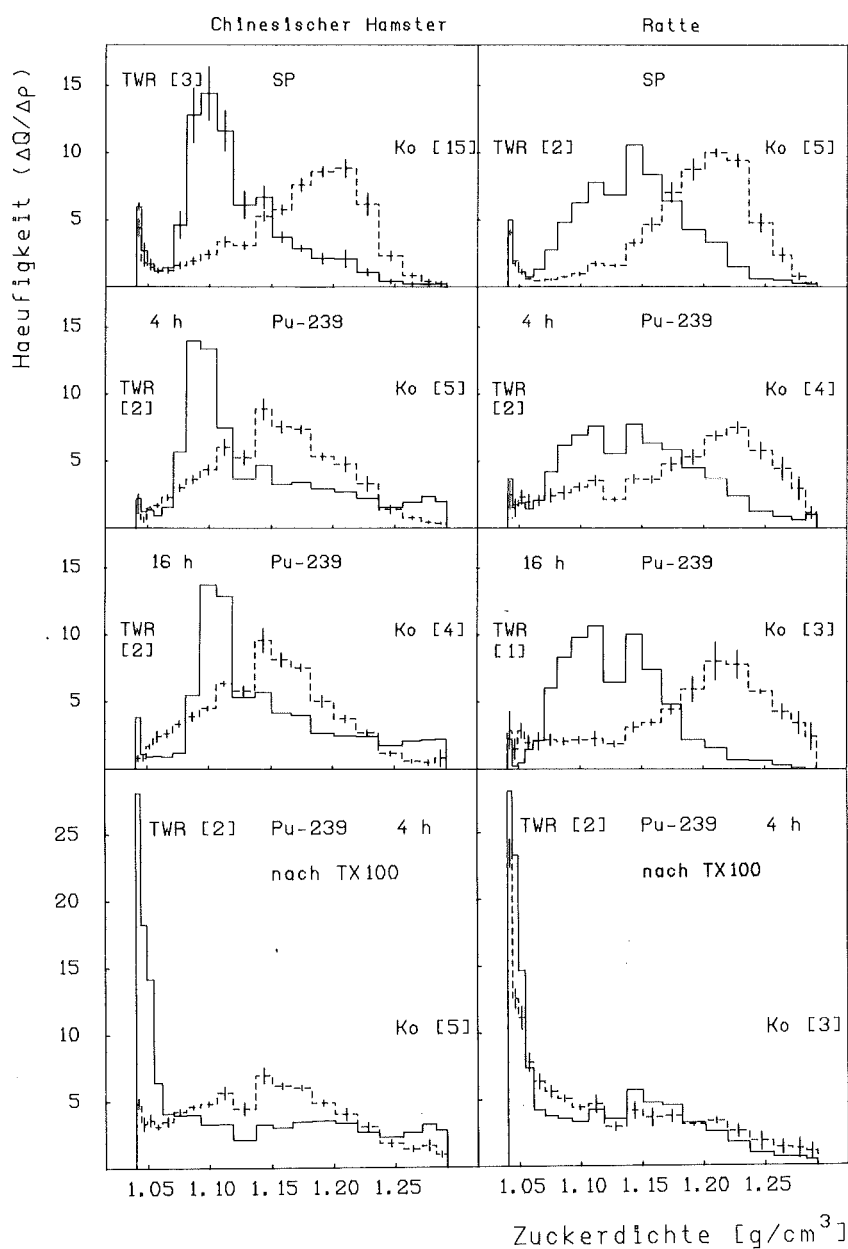


Abb. 11: Verteilung von Saurer Phosphatase und ^{239}Pu aus der Leber von Triton WR 1339-behandelten Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Saccharosedichtegradienten (4 oder 16 Stunden). Radionuklid-Injektion 30 Tage, TWR-Injektion 24 Tage vor Sektion. Zugabe von TX 100 zur ML-Fraktion vor dem Auftragen auf den Dichtegradienten. Nähere Angaben siehe Abb. 1 (TWR-Profil = durchgezogene Linie).

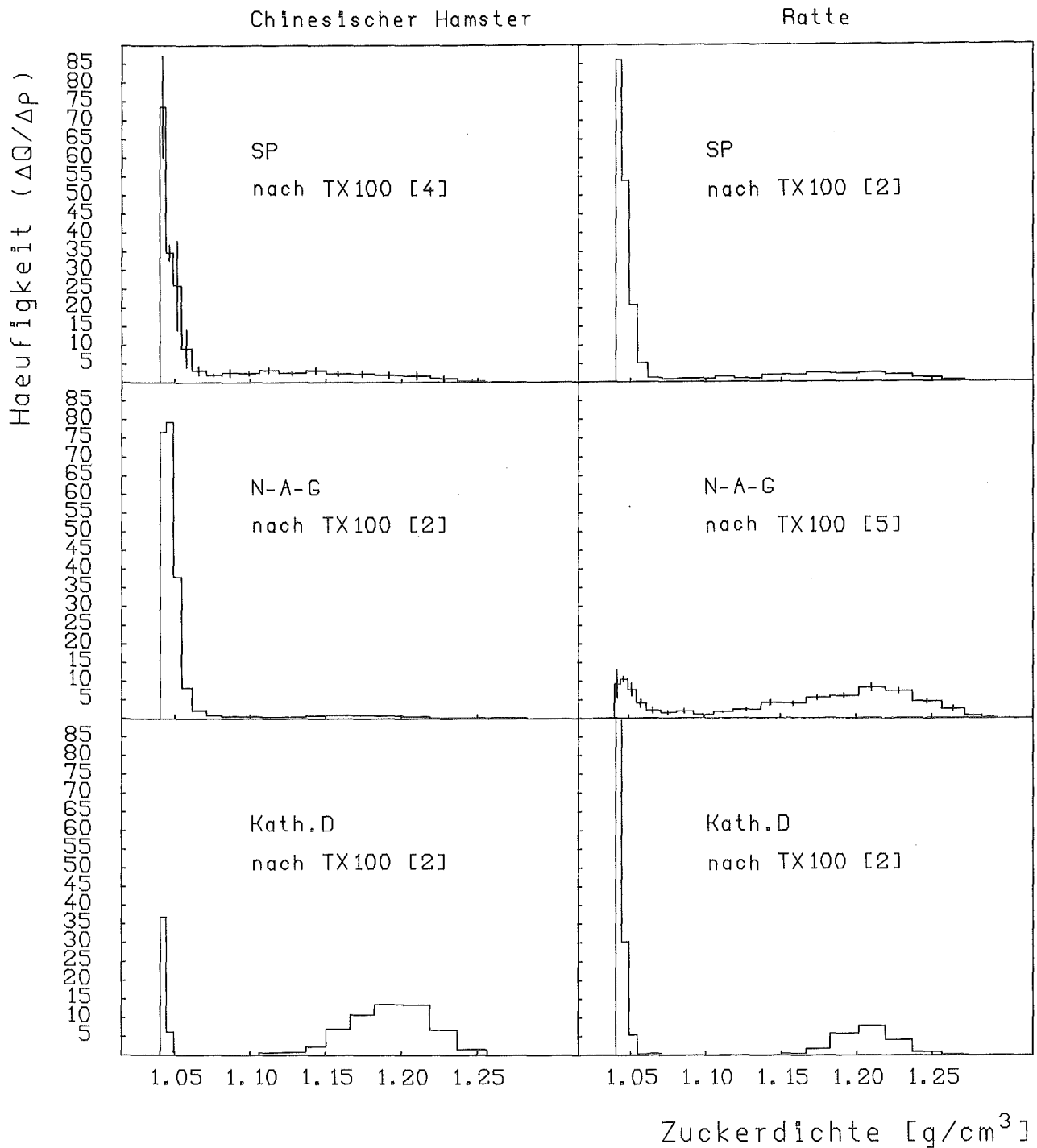


Abb. 12: Verteilung von lysosomalen Enzymen aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der mit TX 100-behandelten ML-Fraktion im linearen Saccharosedichtegradienten (4 Stunden). Abkürzungen siehe Abb. 3, nähere Angaben siehe Abb. 1.

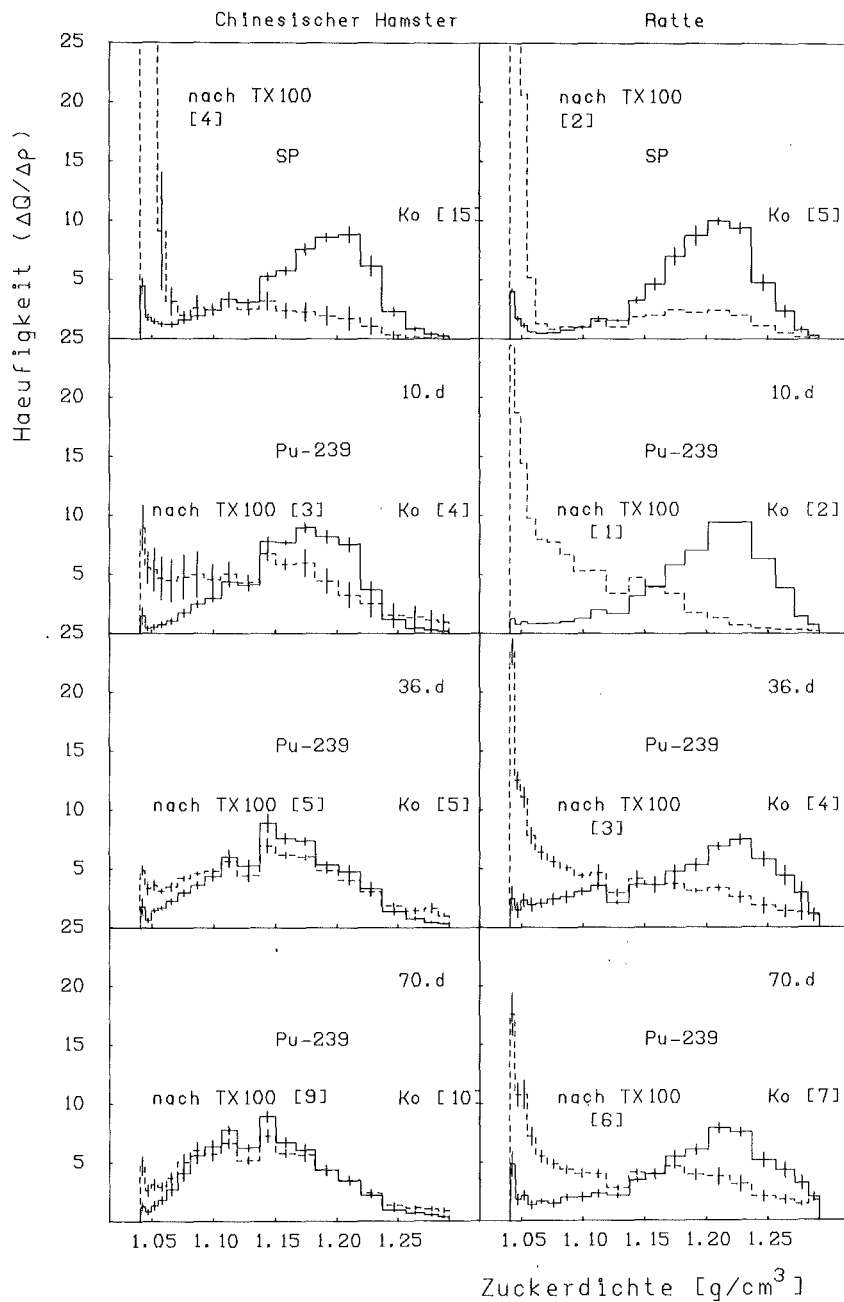


Abb. 13: Verteilung von Saurer Phosphatase und ^{239}Pu aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der mit TX 100-behandelten ML-Fraktion im linearen Saccharosedichtegradienten (4 Stunden). Sektion 10, 36 oder 70 Tage nach ^{239}Pu -Injektion. Nähere Angaben siehe Abb. 1.

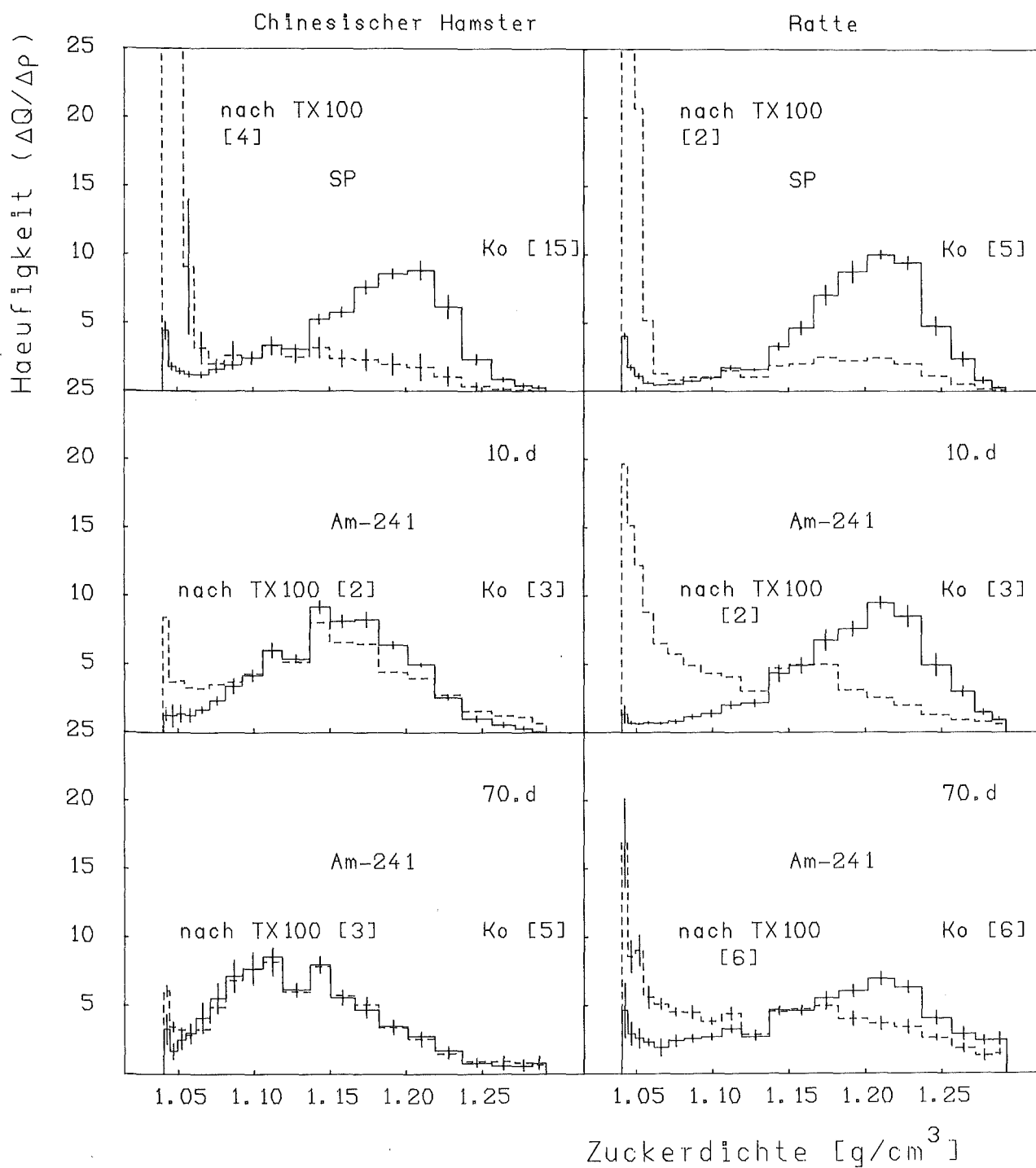


Abb. 14: Verteilung von Saurer Phosphatase und ^{241}Am aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der mit TX 100-behandelten ML-Fraktion im linearen Saccharosedichtegradienten (4 Stunden). Sektion 10 oder 70 Tage nach ^{241}Am -Injektion. Nähere Angaben siehe Abb. 1.

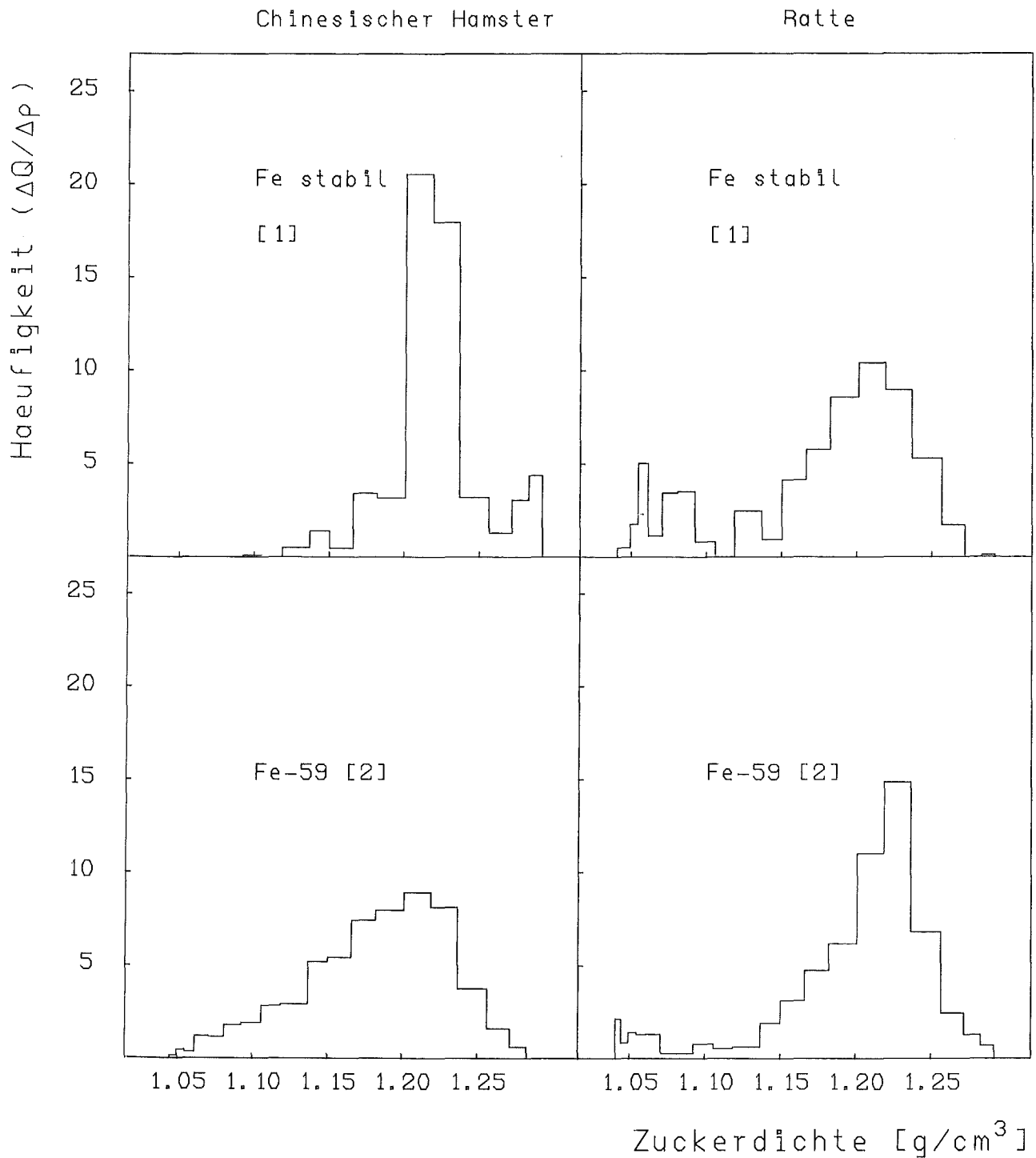


Abb. 15: Verteilung von stabilem Eisen und ⁵⁹Fe aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Saccharosedichtegradienten (16 Stunden). Sektion 10 oder 70 Tage nach ⁵⁹Fe-Injektion (Daten aus diesen beiden Versuchen vereinigt). Nähere Angaben siehe Abb. 1.

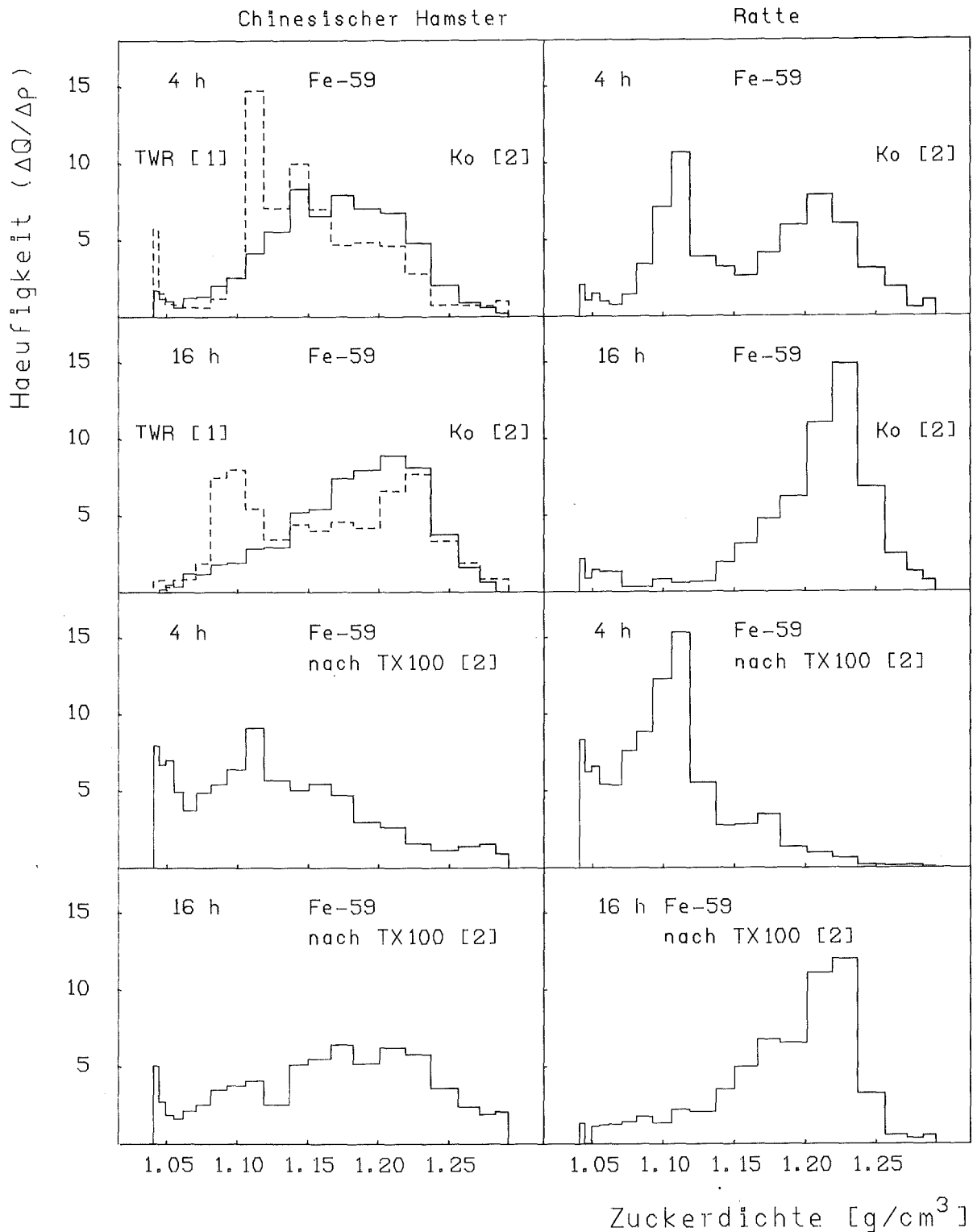


Abb. 16: Verteilung von ^{59}Fe aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern (und nach Behandlung von Chinesischen Hamstern mit Triton WR 1339 4 Tage vor Sektion) nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Saccharosedichtegradienten (4 oder 16 Stunden). Zugabe von TX 100 zur ML-Fraktion vor dem Auftragen auf den Gradienten. Sektion 10 oder 70 Tage nach ^{59}Fe -Injektion (Daten aus beiden Versuchen vereinigt). Nähere Angaben siehe Abb. 1.

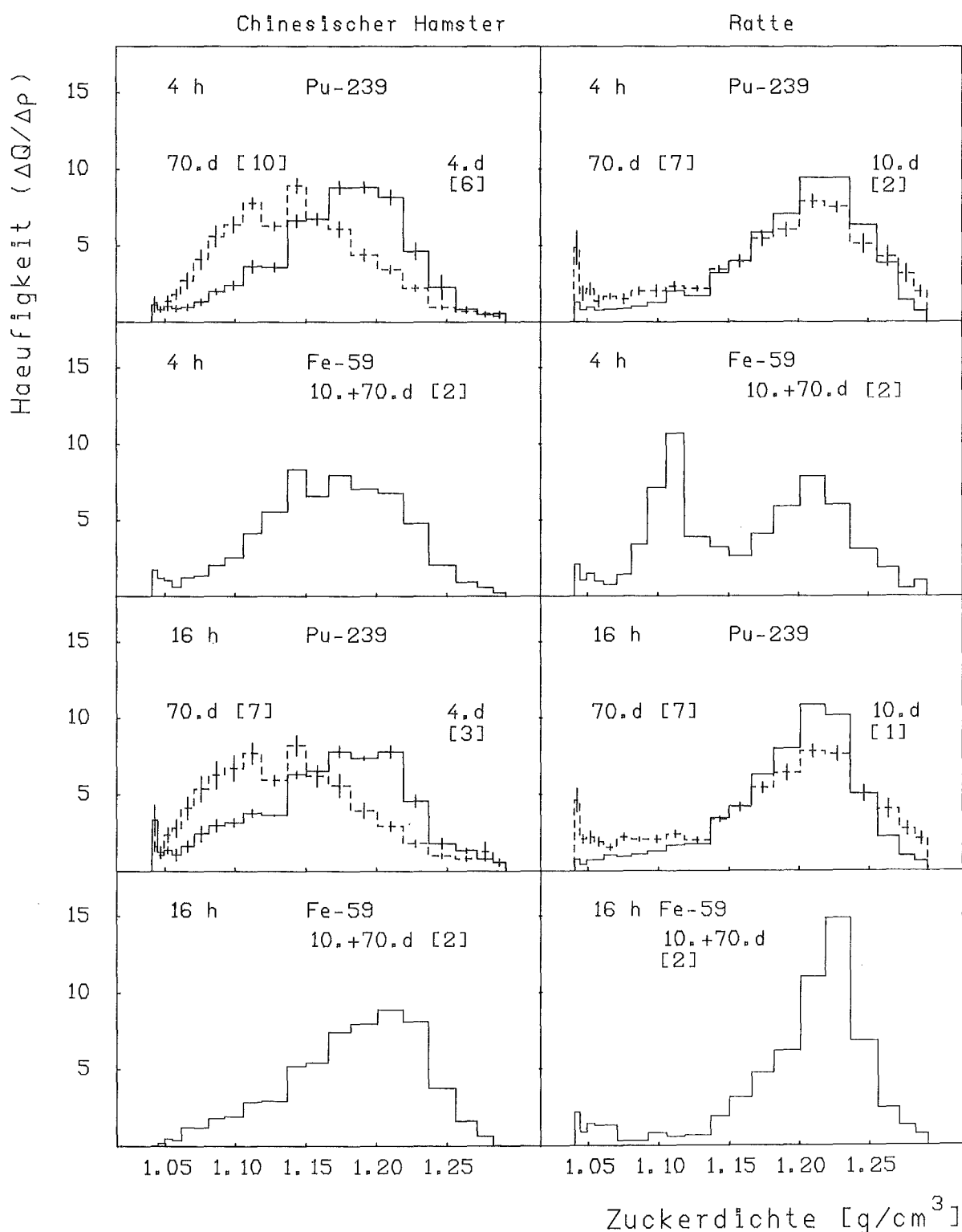


Abb. 17: Verteilung von ^{239}Pu und ^{59}Fe aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Saccharosedichtegradienten (4 oder 16 Stunden). Sektion 4, 10 oder 70 Tage nach ^{239}Pu - bzw. 10 oder 70 Tage nach ^{59}Fe -Injektion; (Daten aus beiden Versuchen vereinigt). Nähere Angaben siehe Abb. 1.

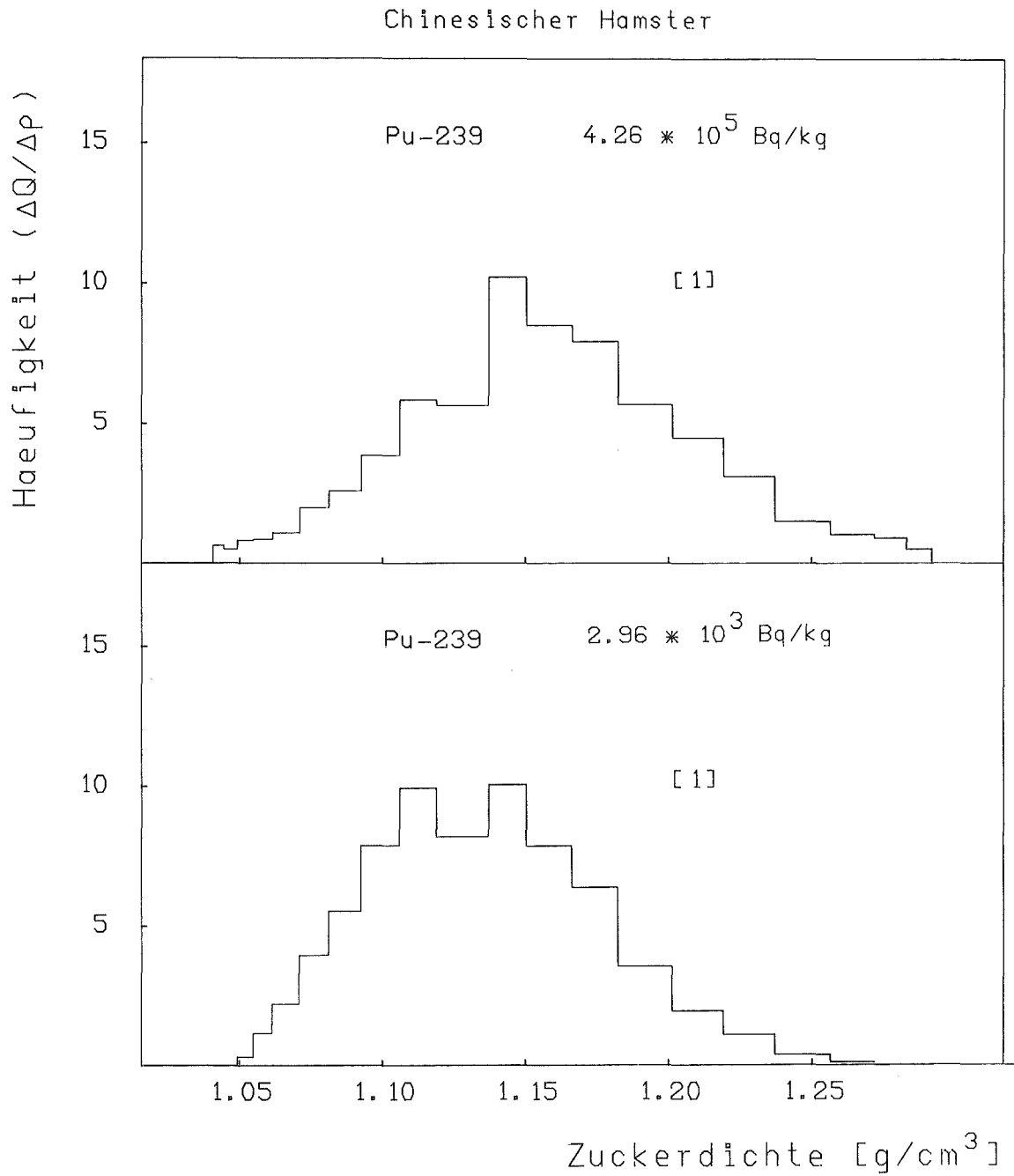


Abb. 18: Einfluß der ^{239}Pu -Dosis auf die Verteilung von ^{239}Pu aus der Leber von Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Saccharosedichtegradienten (4 Stunden). Injektion von $4.26 \cdot 10^5 \text{ Bq} \cdot \text{kg}^{-1}$ und $2.96 \cdot 10^3 \text{ Bq} \cdot \text{kg}^{-1}$. Sektion 70 Tage nach ^{239}Pu -Injektion. Nähere Angaben siehe Abb. 1.

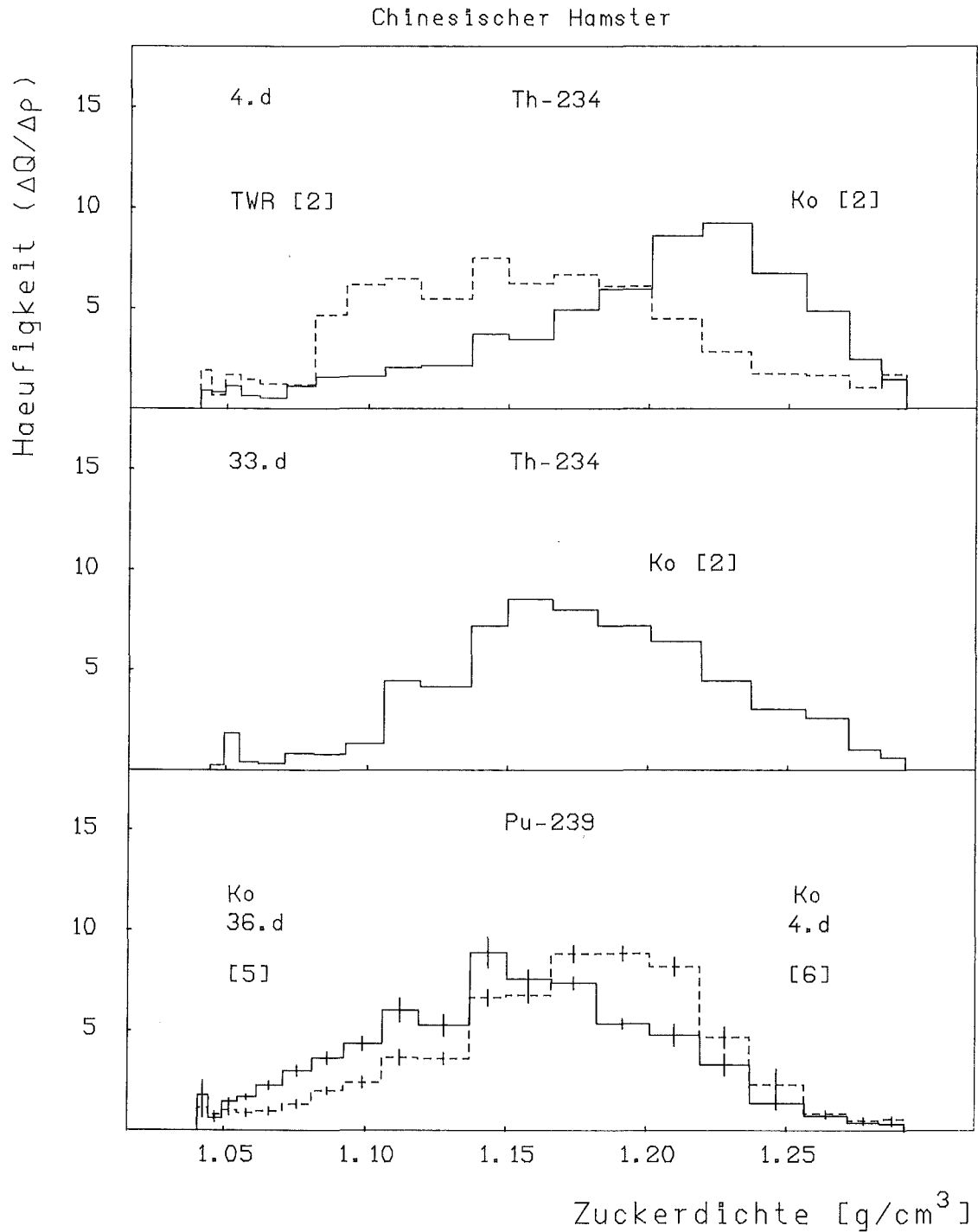


Abb. 19: Verteilung von ^{234}Th (mit ^{232}Th als Träger) und ^{239}Pu aus der Leber von Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Saccharosedichtegradienten (4 Stunden). TWR-Behandlung der Hamster erfolgt 6 Stunden nach Nuklid-Injektion, Sektion 4 oder 33 Tage nach ^{234}Th -Injektion bzw. 4 oder 36 Tage nach ^{239}Pu -Injektion. Nähere Angaben siehe Abb. 1.

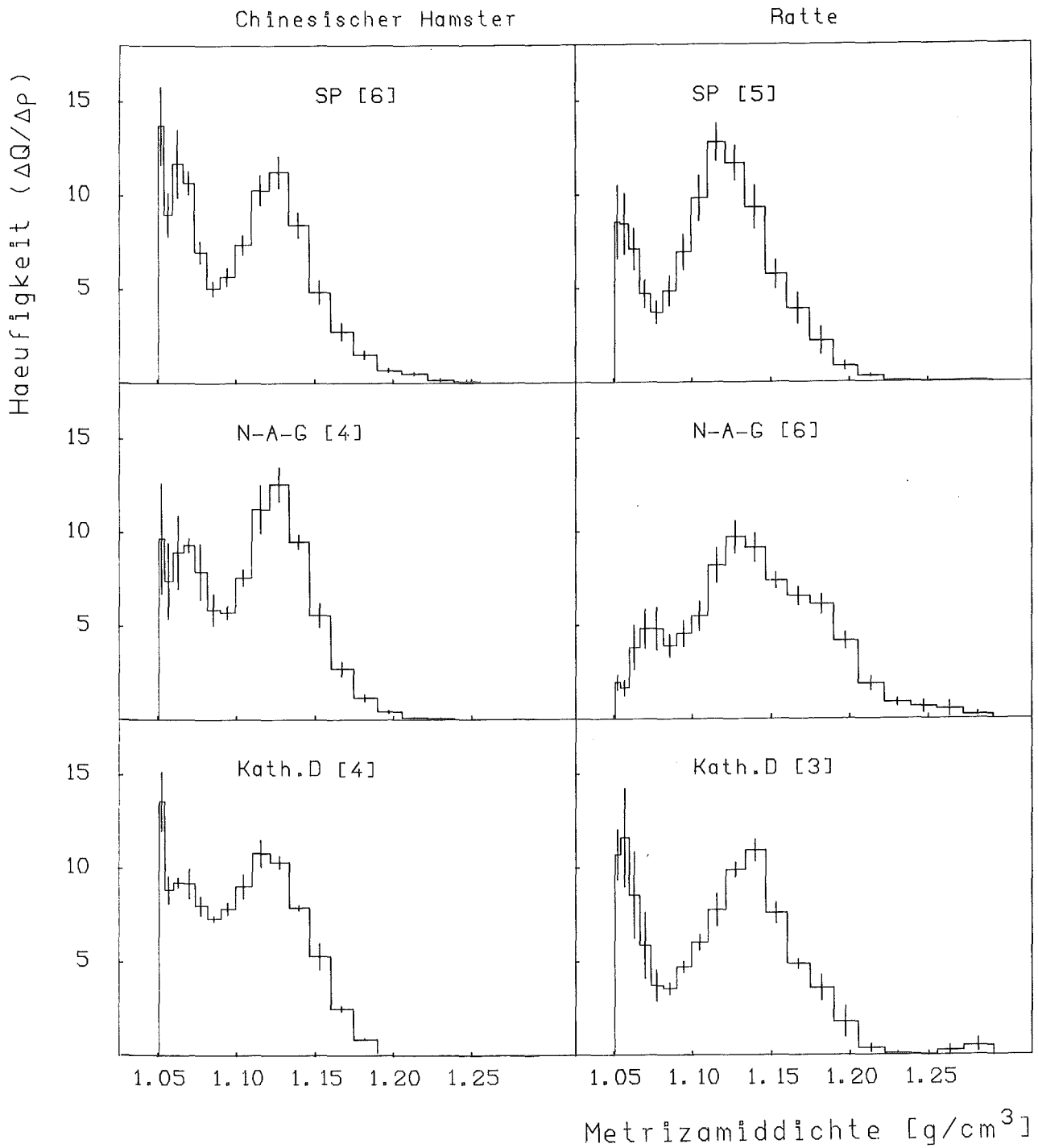


Abb. 20: Verteilung von lysosomalen Enzymen aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Metrizamiddichtegradienten (6 Stunden). Abkürzungen siehe Abb. 3, nähere Angaben siehe Abb. 1.

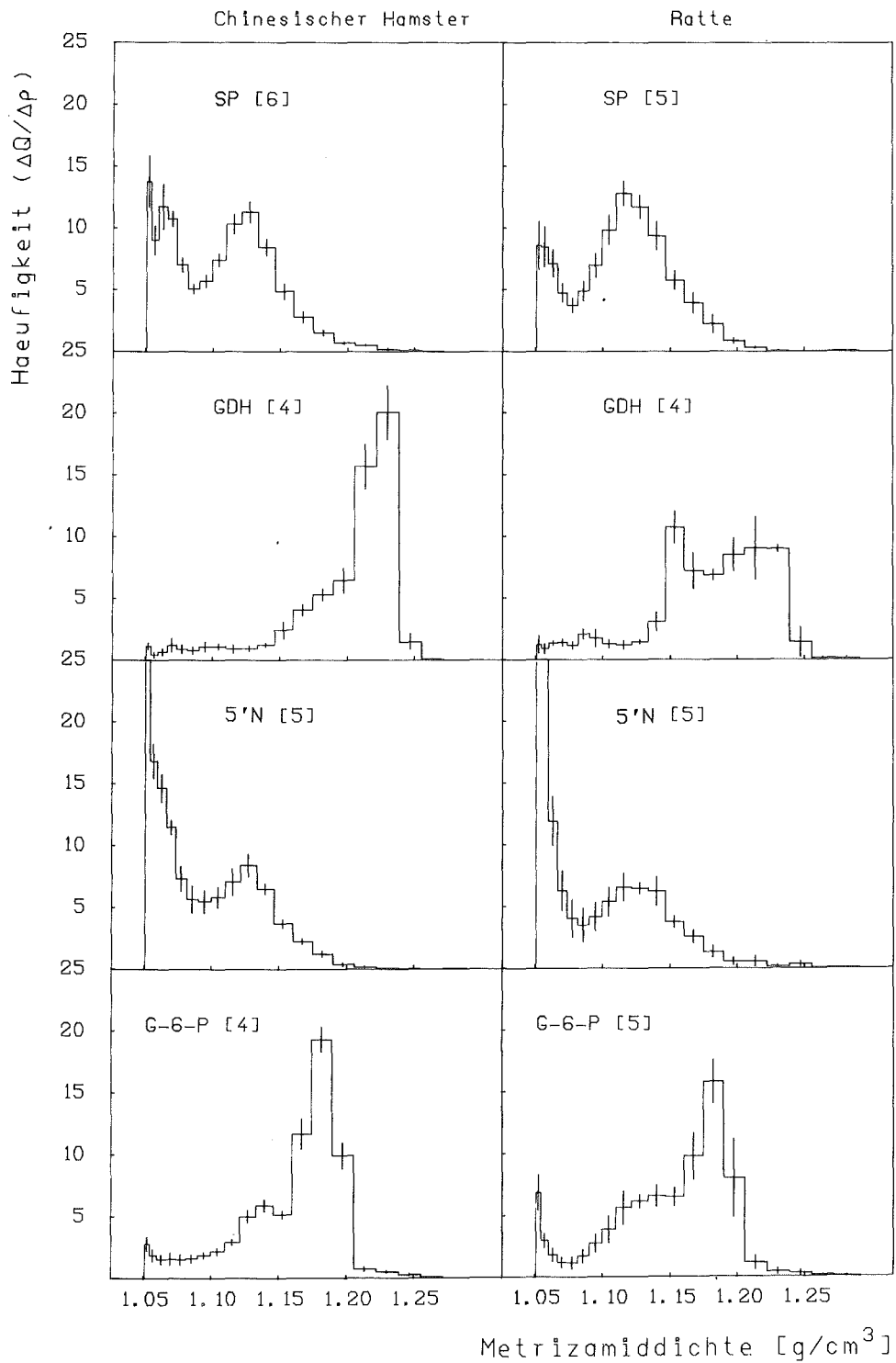


Abb. 21: Verteilung von Enzymen aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Metrizamiddichtegradienten (6 Stunden). Abkürzungen und nähere Angaben siehe Abb. 1.

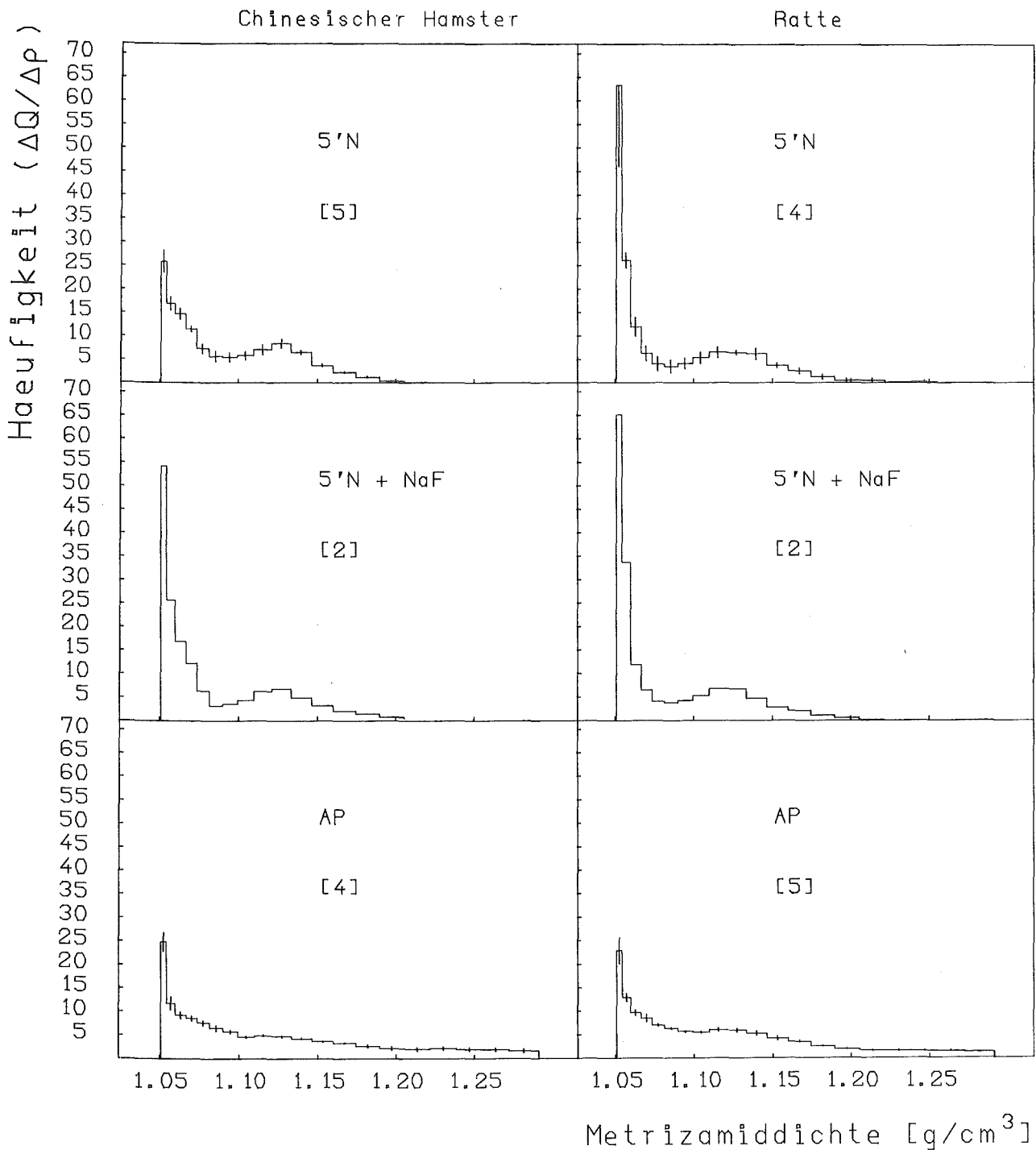


Abb. 22: Verteilung von Enzymen der perizellulären Membranen aus der Leber von Ratte und Chinesischem Hamster nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Metrizamiddichtegradienten (6 Stunden). 5'N+NaF = 5' Nucleotidasebestimmung unter Zugabe von NaF zur Hemmung der fluoridsensitiven Sauren Phosphatase, AP = Alkalische Phosphodiesterase. Nähere Angaben siehe Abb. 1.

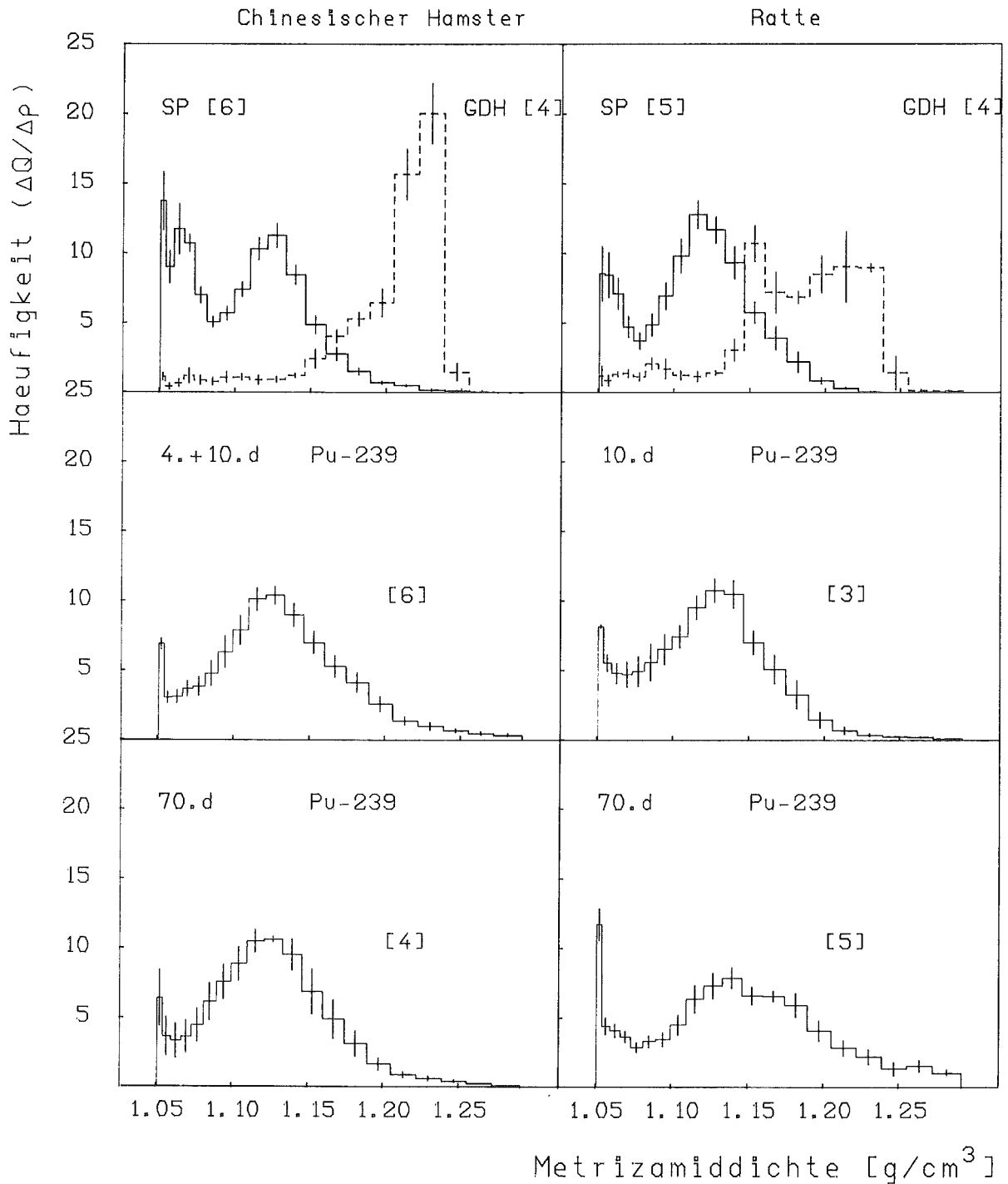


Abb. 23: Verteilung von Saurer Phosphatase, Glutamatdehydrogenase (GDH) und ^{239}Pu aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Mettrizamiddichtegradienten (6 Stunden). Sektion 4, 10 oder 70 Tage nach Radionuklid-Injektion (4- und 10-Tage Daten beim Chinesischen Hamster vereinigt, da kein signifikanter Unterschied [$p = 0.05$]). Abkürzungen und nähere Angaben siehe Abb. 1.

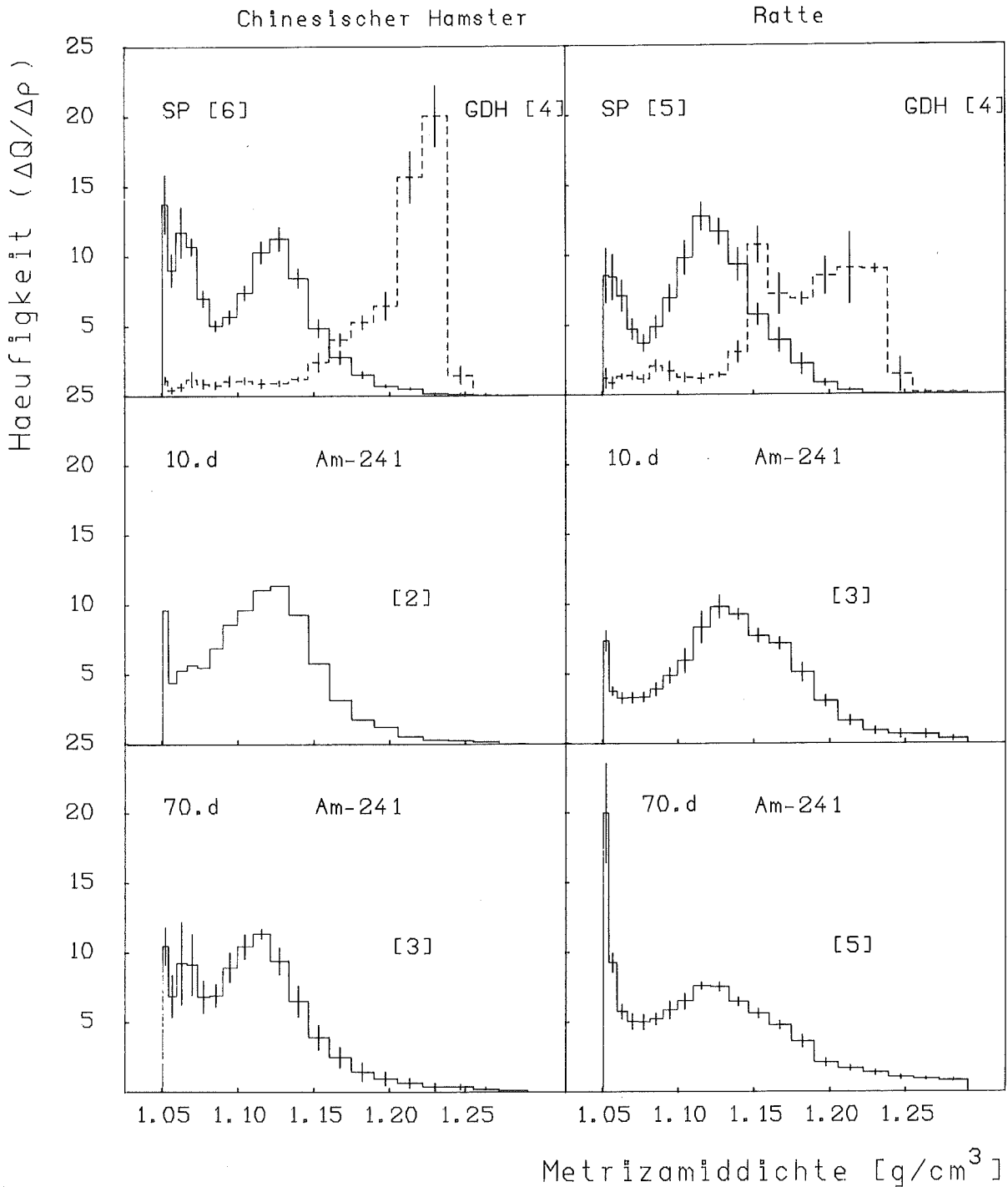


Abb. 24: Verteilung von Saurer Phosphatase, Glutamatdehydrogenase (GDH) und ^{241}Am aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Metrizamiddichtegradienten (6 Stunden). Sektion 10 oder 70 Tage nach Radionuklid-Injektion. Abkürzungen und nähere Angaben siehe Abb. 1.

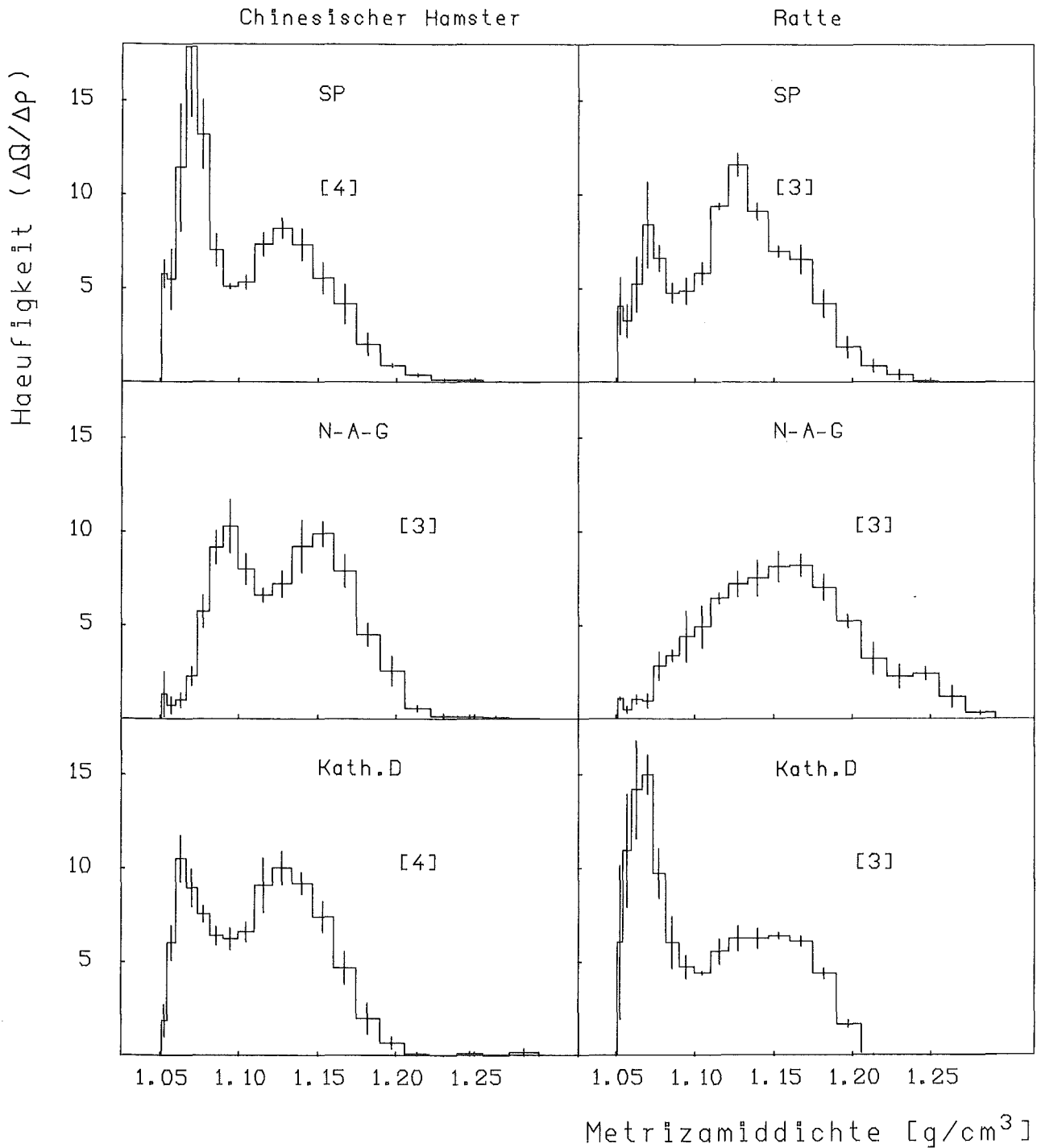


Abb. 25: Verteilung von lysosomalen Enzymen aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Metrizamiddichtegradienten (16 Stunden). Abkürzungen siehe Abb. 3, nähere Angaben siehe Abb. 1.

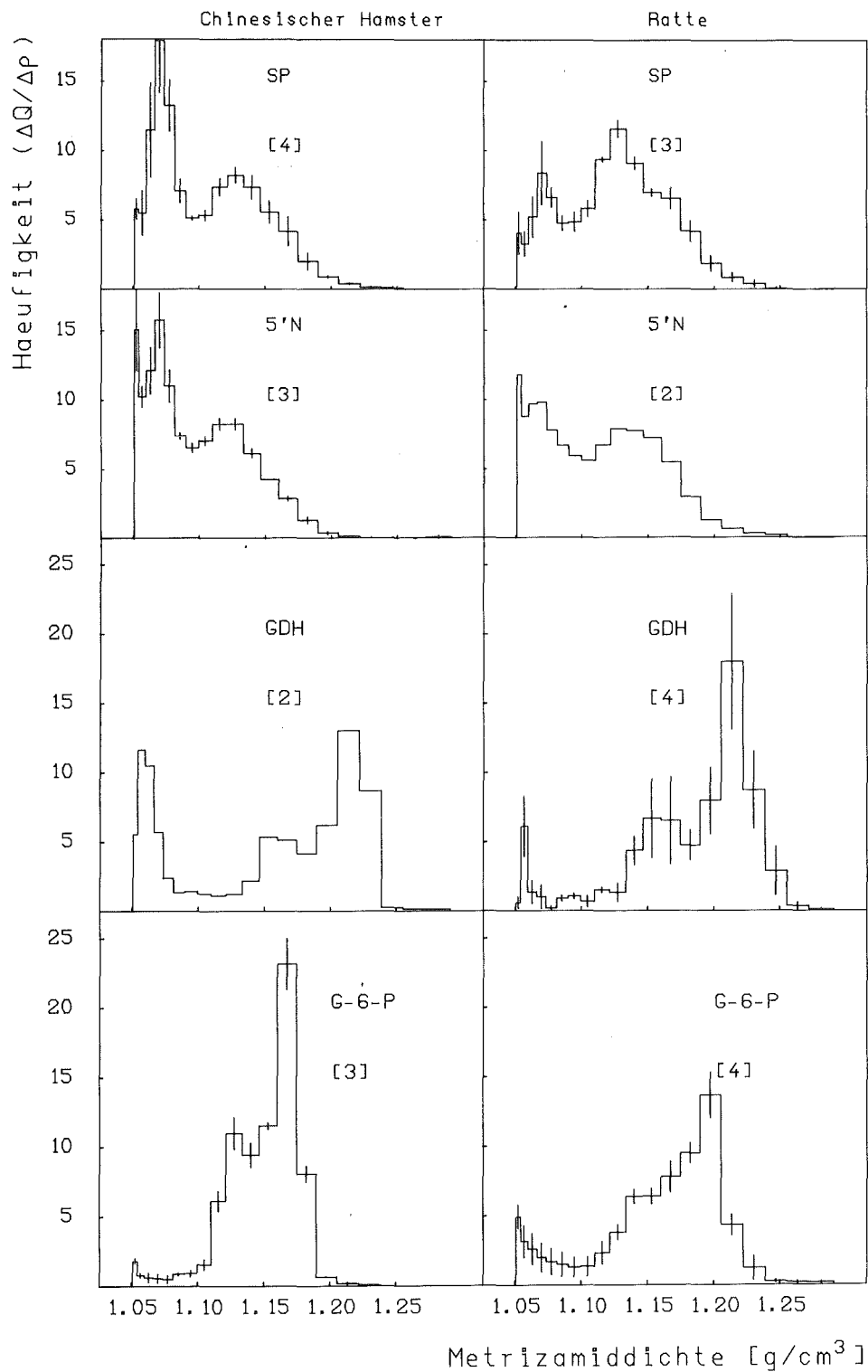


Abb. 26: Verteilung von Enzymen aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Metrizamiddichtegradienten (16 Stunden). Abkürzungen und nähere Angaben siehe Abb. 1.

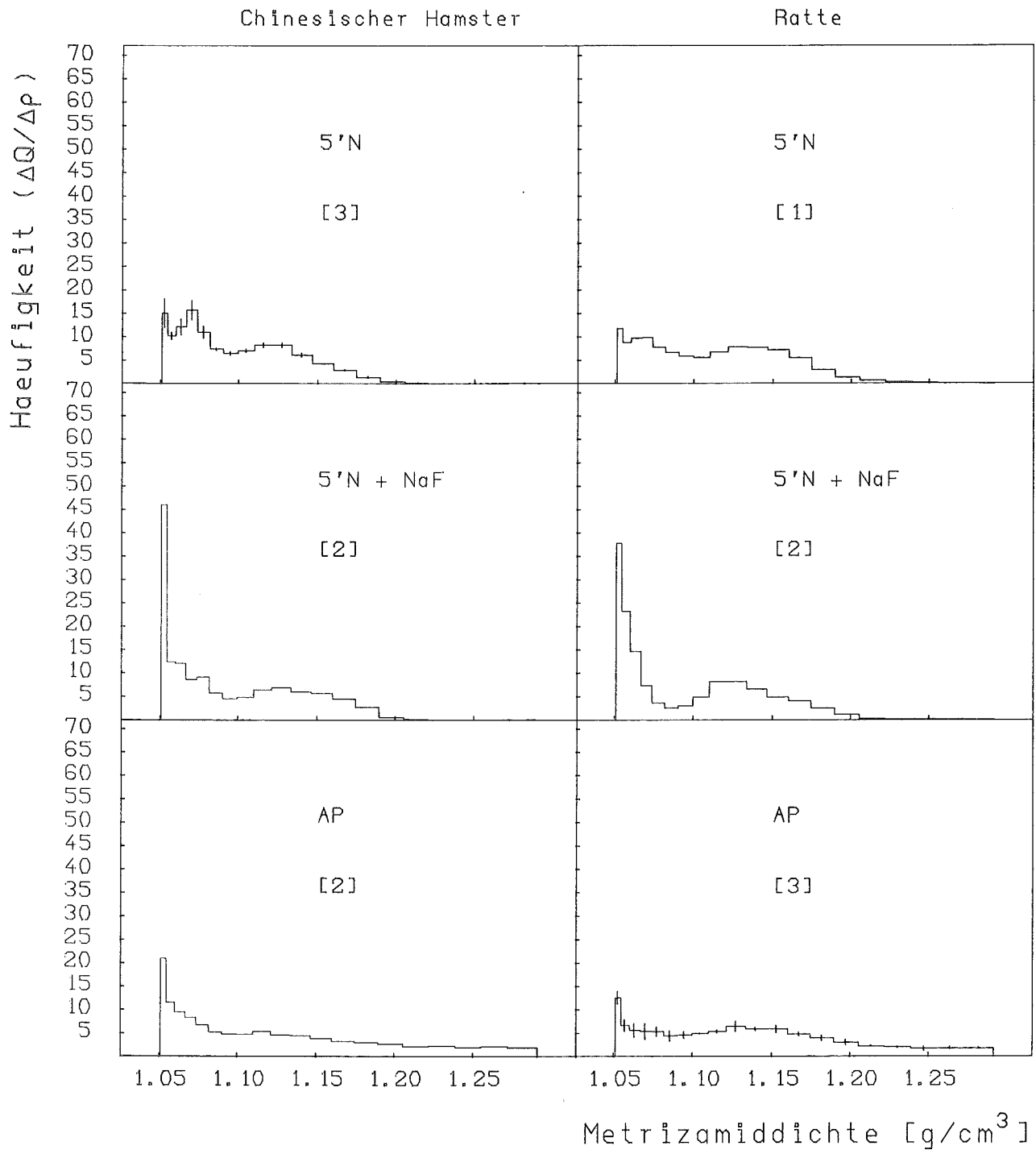


Abb. 27: Verteilung von Enzymen der perizellulären Membranen in der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Metrizamiddichtegradienten (16 Stunden, $88\ 000\ g_{av}$). 5'N+NaF = 5' Nucleotidasebestimmung unter Zugabe von NaF zur Hemmung der fluoridsensitiven Sauren Phosphatase, AP = Alkalische Phosphodiesterase. Nähere Angaben siehe Abb. 1.

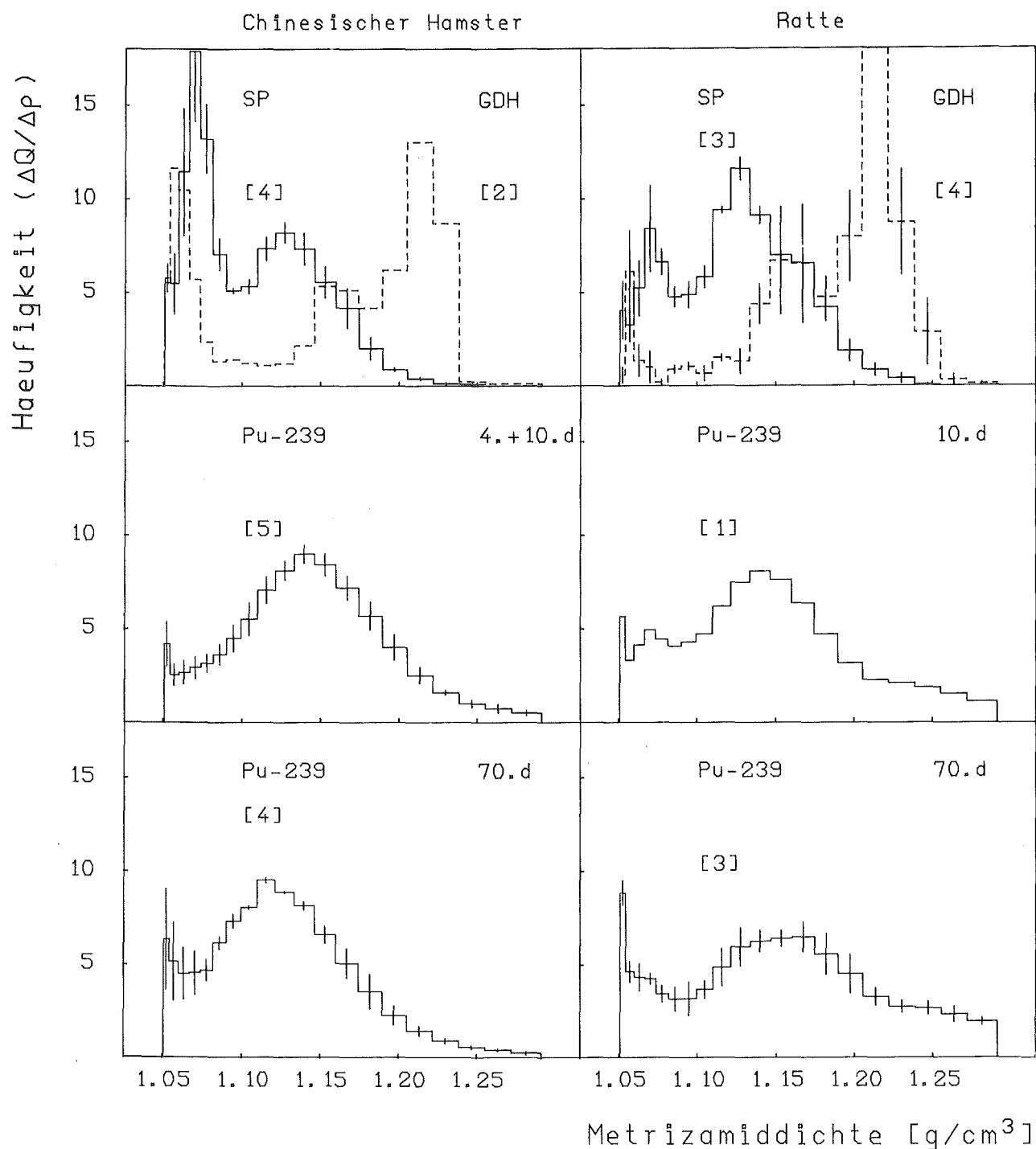


Abb. 28: Verteilung von Saurer Phosphatase, Glutamatdehydrogenase (GDH) und ^{239}Pu aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Metrizamiddichtegradienten (16 Stunden). Sektion 4, 10 oder 70 Tage nach Radionuklid-Injektion (4- und 10-Tage-Daten beim Chinesischen Hamster vereinigt, da kein signifikanter Unterschied [$p = 0.05$]). Abkürzungen und nähere Angaben siehe Abb. 1.

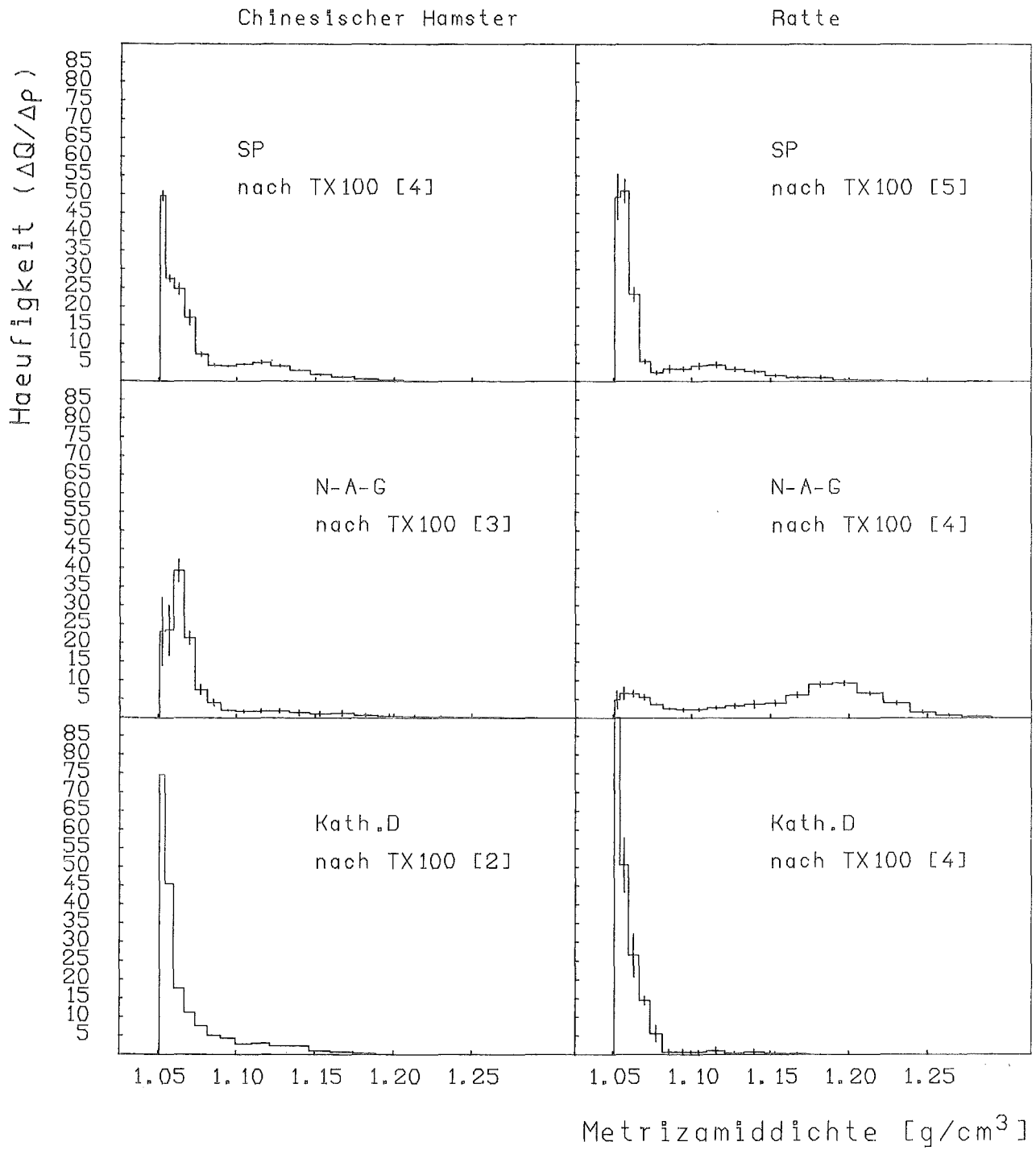


Abb. 29: Verteilung von lysosomalen Enzymen aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der TX 100-behandelten ML-Fraktion im linearen Metrizamiddichtegradienten (6 Stunden). Abkürzungen siehe Abb. 3, nähere Angaben siehe Abb. 1.

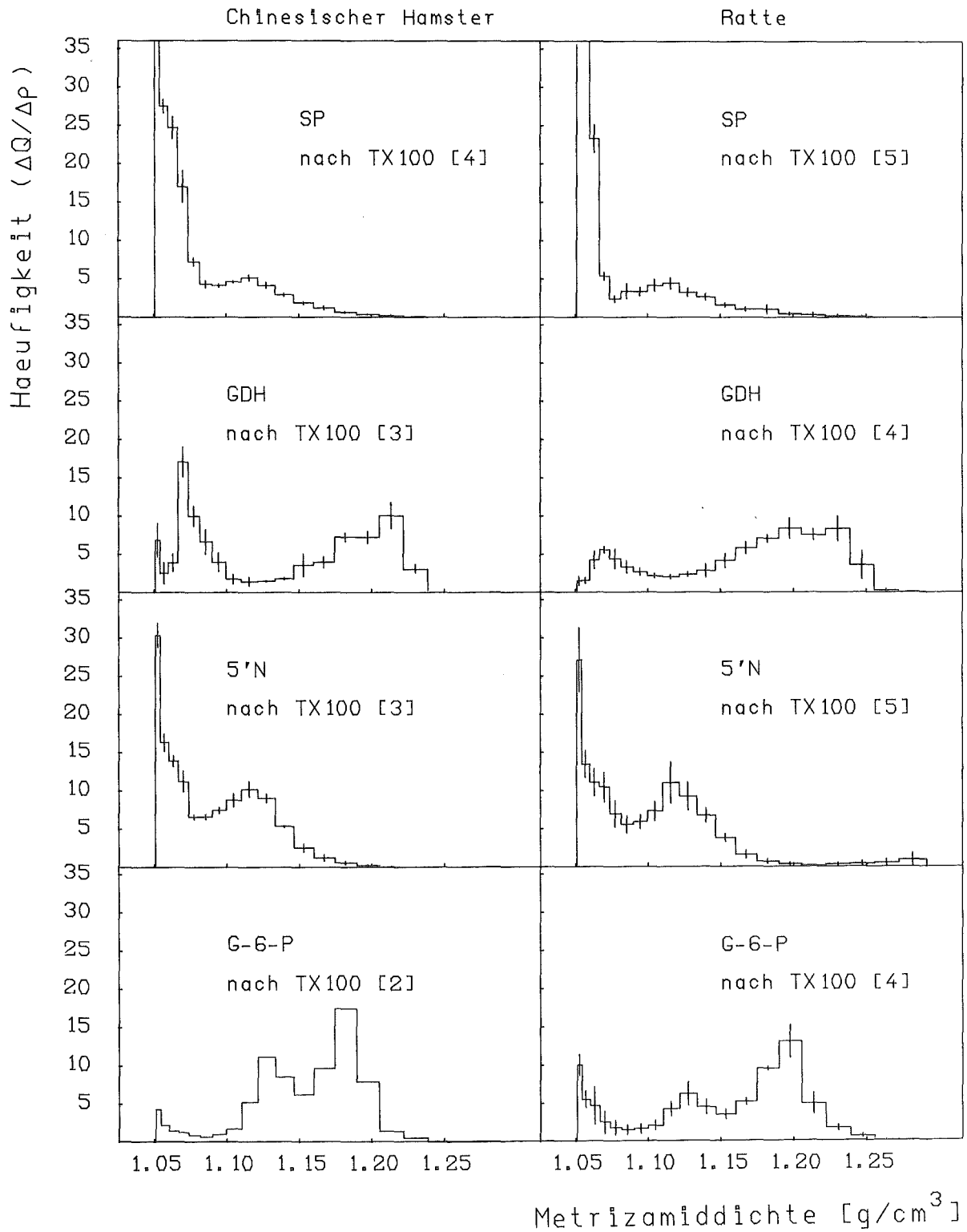


Abb. 30: Verteilung von Enzymen aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der TX 100-behandelten ML-Fraktion im linearen Metrizamiddichtegradienten (6 Stunden). Abkürzungen und nähere Angaben siehe Abb. 1.

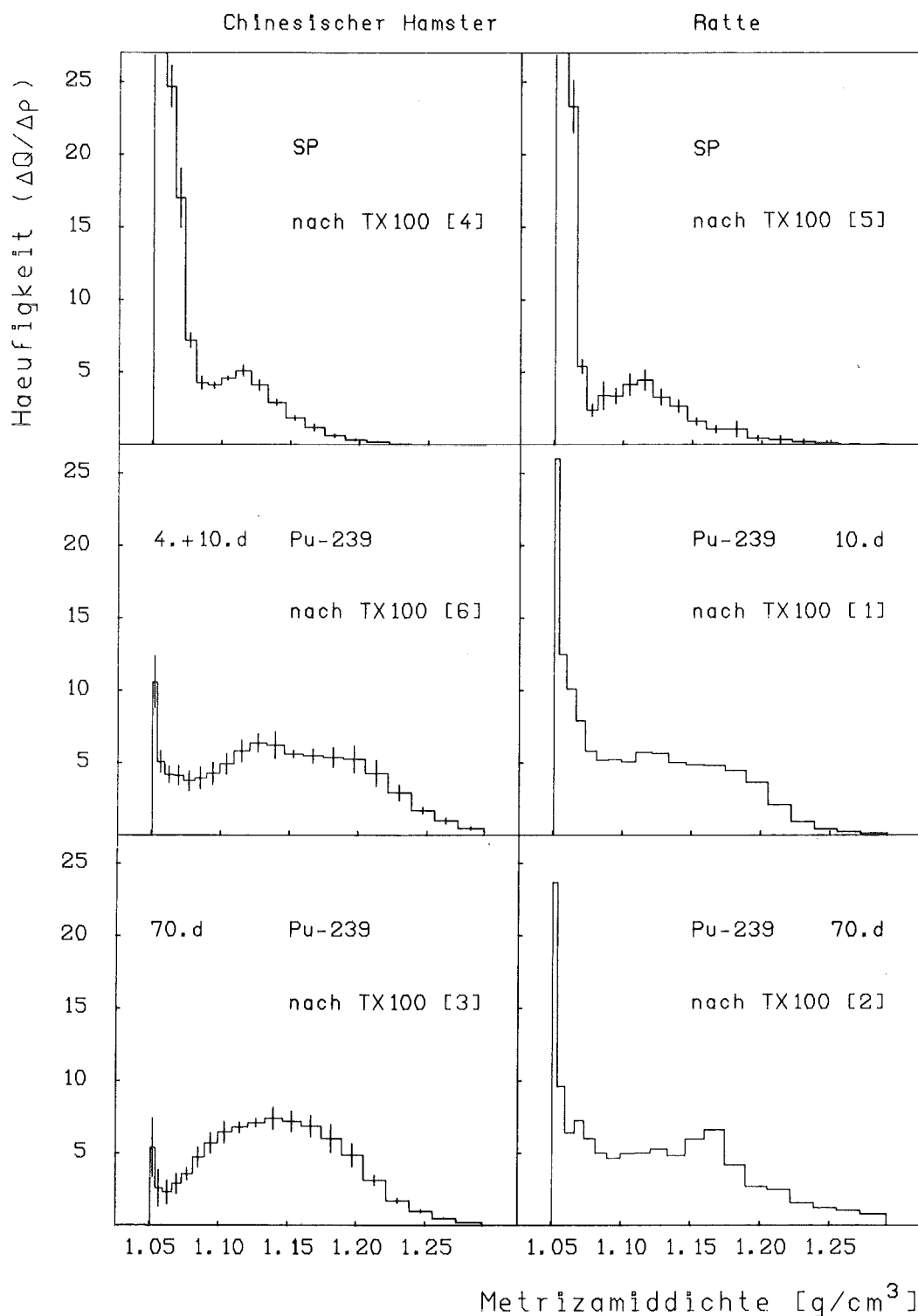


Abb. 31: Verteilung von Saurer Phosphatase und ^{239}Pu aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der TX 100-behandelten ML-Fraktion im linearen Metrizamid-dichtegradienten (6 Stunden). Sektion 4, 10 oder 70 Tage nach Radionuklid-Injektion (4- und 10-Tage-Daten beim Chinesischen Hamster vereinigt, da kein signifikanter Unterschied [$p = 0.05$]). Nähere Angaben siehe Abb. 1.

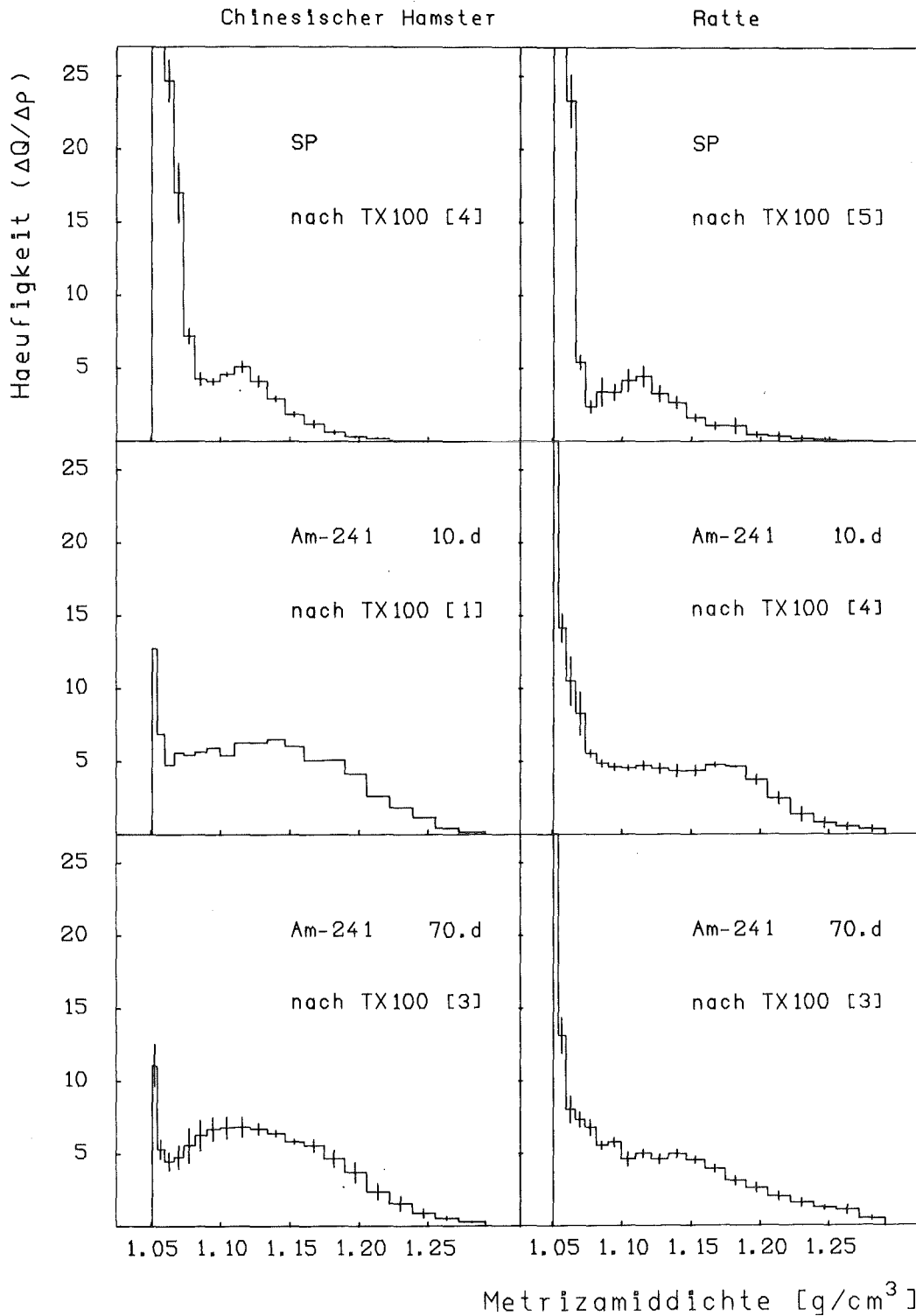


Abb. 32: Verteilung von Saurer Phosphatase und ^{241}Am aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der TX 100-behandelten ML-Fraktion im linearen Metrizamiddichtegradienten (6 Stunden). Radionuklid-Injektion 10 oder 70 Tage vor Sektion. Nähere Angaben siehe Abb. 1.

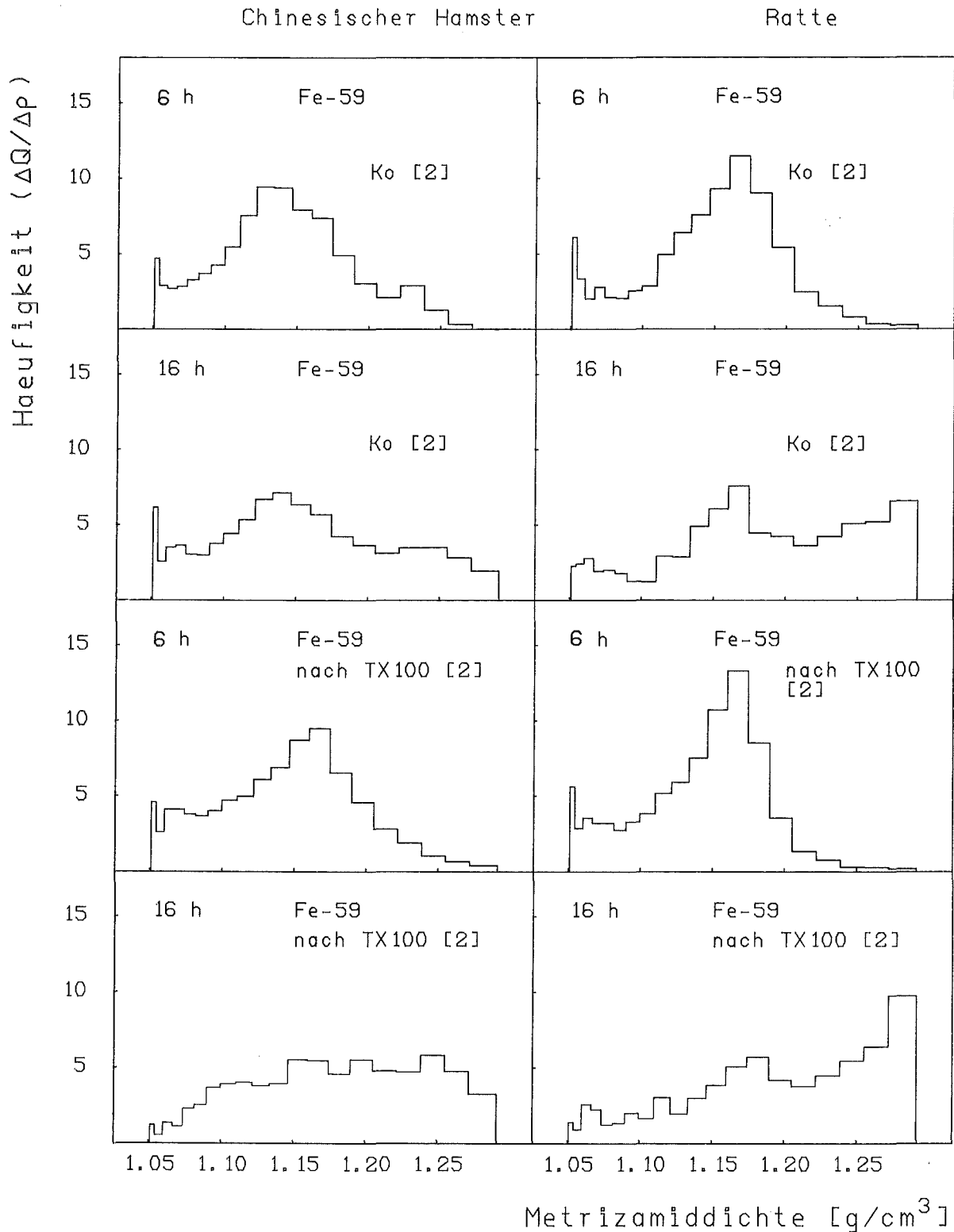


Abb. 33: Verteilung von ^{59}Fe aus der Leber von Ratten und Chinesischen Hamstern nach Zentrifugation der ML-Fraktion im linearen Metrizamiddichtegradienten (6 oder 16 Stunden). Zugabe von TX 100 zur ML-Fraktion vor dem Auftragen auf den Gradienten. Sektion 10 oder 70 Tage nach ^{59}Fe -Injektion (Daten aus beiden Versuchen vereinigt). Nähere Angaben siehe Abb. 1.