

**KfK 4443**  
**August 1988**

**Untersuchungen zur  
Hepatotoxizität von Cer:  
In vivo-Versuche an Ratten  
und in vitro-Studien mit  
Hepatocyten und Makrophagen**

**M. Wiener-Schmuck**  
**Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen**

**Kernforschungszentrum Karlsruhe**



KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Institut für Genetik und für Toxikologie  
von Spaltstoffen

KfK 4443

UNTERSUCHUNGEN ZUR HEPATOTOXIZITÄT VON CER:  
IN VIVO-VERSUCHE AN RATTEN UND IN VITRO-STUDIEN  
MIT HEPATOCYTEN UND MAKROPHAGEN

Manuela Wiener-Schmuck

Dissertation genehmigt von der Fakultät für Bio- und  
Geowissenschaften der Universität Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

## Zusammenfassung

Durch Organverteilungsstudien an Ratten konnte gezeigt werden, daß nach Injektion von Gewichts-dosen das Cer bei beiden Geschlechtern vor allem in den Kupfferzellen abgelagert wird. Nach Trägerfreier Elektrophorese waren auch nach Gewichts-dosen noch mindestens 50% des Cers an enzymatisch aktive Lysosomen gebunden, dabei zeigten diese Lysosomen keine erhöhte Fragilität als möglichen Ausdruck einer toxischen Schädigung. Durch Licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen sowie durch Enzymmessungen im Serum konnte nachgewiesen werden, daß ein geschlechtsabhängiger Unterschied in der Empfindlichkeit auf  $CeCl_3$  besteht. Die Weibchen reagierten bereits auf 1,3 mg/kg  $CeCl_3$  mit erhöhter Fettablagerung, Kupfferzellschwellung, Hepatocytennekrosen sowie pathologisch erhöhten Serumenzymkonzentrationen. An kultivierten Rattenhepatozyten konnte nach Cer keine Schädigung nachgewiesen werden. Die als Modell für die Kupfferzellen eingesetzten Ratten- und Rinderalveolarmakrophagen zeigten jedoch morphologisch und biochemisch eindeutige toxische Reaktionen. Die in vivo- und in vitro-Ergebnisse sprechen bei den Weibchen für einen durch Kupfferzellschädigung bedingten, indirekten Leberschaden. Die geringere Empfindlichkeit der Männchen auf  $CeCl_3$  scheint an Geschlechtshormone gebunden zu sein.

Investigations on the hepatotoxicity of Cerium:  
In vivo experiments with rats and in vitro studies with hepatocytes and macrophages.

## Abstract

After intravenous injection of  $^{141}Ce$  with stable  $CeCl_3$  Kupffer cells were found to be the main deposition site for Cerium in both female and male rats. After carrier-free electrophoresis at least 50% of the Cerium remained bound to enzymatic active lysosomes. These lysosomes showed no higher fragility as a possible sign of toxic damage. Lightmicroscopy, electronmicroscopy, and measurement of serum enzymes showed a higher sensitivity of female rats to Cerium compared to male rats. Injection of 1,3 mg/kg  $CeCl_3$  to female rats resulted in an increase of fat deposition, in the swelling of Kupffer cells, in hepatocyte-necrosis, and in the pathological elevation of serum enzyme concentration. No signs of damage were discovered in isolated rat hepatocytes after in vitro cultivation with Cerium. However rat and bovine alveolar macrophages, which were used as a model system for Kupffer cells, showed unequivocal toxic morphological and biochemical reactions to Cerium. In female rats the in vivo and in vitro results suggest that the observed liver damage is an indirect one, caused by the damage of the Kupffer cells. The lower susceptibility of the male rats to Cerium seems to be linked to sex-hormones.

## Inhaltsverzeichnis

|           | Seite  |    |
|-----------|--|----|
| 1.        | Einleitung   | 1  |
| 2.        | Material und Methoden  | 6  |
| 2.1.      | Injektionslösungen, Nuklidmeßtechnik und Sedimentierbarkeit des $^{141}\text{Ce}$        | 6  |
| 2.2.      | Versuche mit Ratten  | 8  |
| 2.2.1.    | Versuchstiere  | 8  |
| 2.2.2.    | Gewichte und Proteingehalt von Rattenlebern  | 8  |
| 2.2.3.    | Präparation der subzellulären Fraktionen   | 8  |
| 2.2.4.    | Trägerfreie Elektrophorese   | 10 |
| 2.2.5.    | Saccharose-Dichtegradienten  | 10 |
| 2.2.6.    | Isolierung von Hepatocyten aus der Rattenleber   | 11 |
| 2.2.7.    | Monolayerkultur von Hepatocyten  | 12 |
| 2.2.8.    | Herstellung und Kultur von Hepatocyten-sphäroiden  | 14 |
| 2.2.9.    | Kupffer- und Endothelzellisolierung aus der Rattenleber und deren Kulturen               | 15 |
| 2.2.10.   | Kultur von Hepatocyten mit Überständen von Kupfferzellkulturen                           | 16 |
| 2.2.11.   | In vitro-Inkubationen des Mitochondrien-Lysosomen (ML)-Sediments                         | 17 |
| 2.2.11.1. | Inkubationen in Kammerpuffer   | 17 |
| 2.2.11.2. | Inkubationen in Cytosol  | 17 |
| 2.2.12.   | Bronchoalveoläre Lavage von Rattenlungen und Zellkulturen mit Rattenalveolarmakrophagen  | 18 |
| 2.3.      | Versuche mit Rinderalveolarmakrophagen   | 19 |
| 2.3.1.    | Bronchoalveoläre Lavage von Rinderlungen und Aufarbeitung der Makrophagen für die Kultur | 19 |
| 2.3.2.    | Kulturmedien für Rinderalveolarmakrophagen   | 20 |
| 2.3.3.    | Kultur von Rinderalveolarmakrophagen   | 20 |
| 2.3.4.    | Chemilumineszenzuntersuchungen mit Rinderalveolarmakrophagen in Kultur                   | 21 |
| 2.4.      | Protein- und Enzymbestimmung   | 21 |
| 2.5.      | Lichtmikroskopie   | 23 |
| 2.6.      | Transmissionselektronenmikroskopie   | 23 |

|          | Seite   |    |
|----------|---|----|
| 2.7.     | Rasterelektronenmikroskopie   | 24 |
| 2.8.     | Auswertungsverfahren und Präsentation<br>der Daten  | 24 |
| 3.       | Ergebnisse  | 27 |
| 3.1.     | Verhalten und Wirkung von Cer in der<br>Rattenleber in vivo   | 27 |
| 3.1.1.   | Einfluß von 2 mg/kg CeCl <sub>3</sub> auf die Verteilung<br>und Retention von <sup>141</sup> Ce in den Organen              | 27 |
| 3.1.2.   | Gehalt an <sup>141</sup> Ce in den Fraktionen nach<br>differentieller Zentrifugation  | 28 |
| 3.1.3.   | Verteilungsprofile von <sup>141</sup> Ce und Enzymen<br>aus der ML-Fraktion der Leber nach Träger-<br>freier Elektrophorese | 28 |
| 3.1.4.   | Verteilungsprofile von <sup>141</sup> Ce und Enzymen im<br>linearen Saccharosegradienten                                    | 29 |
| 3.1.5.   | Verhalten von Enzymen, Gesamtcholesterin<br>und Phospholipiden im Serum   | 29 |
| 3.1.6.   | Gehalt an Enzymen in den Fraktionen nach<br>differentieller Zentrifugation  | 31 |
| 3.1.7.   | Freisetzung von Enzymen aus der ML-Fraktion<br>von Lebern von Rattenweibchen in den Überstand                               | 31 |
| 3.1.8.   | Lichtmikroskopische Morphologie der<br>Rattenleber  | 32 |
| 3.1.9.   | Transmissionselektronenmikroskopische<br>Morphologie der Rattenleber  | 33 |
| 3.2.     | Verhalten und Wirkung von Cer in Zellkulturen   | 34 |
| 3.2.1.   | Aufnahmeversuche mit Hepatocyten im Monolayer<br>und in Sphäroiden  | 34 |
| 3.2.2.   | Wirkung von Cer auf Rattenleberzellen   | 35 |
| 3.2.2.1. | Hepatocyten in Waymouth-Medium  | 35 |
| 3.2.2.2. | Hepatocyten in RPMI-Medium  | 36 |
| 3.2.2.3. | Hepatocyten in Überständen von Kupffer-<br>zellkulturen   | 37 |
| 3.2.2.4. | Kupffer- und Endothelzellen   | 38 |
| 3.2.3.   | Wirkung von Cer auf Rattenalveolarmakrophagen<br>(Lichtmikroskopie)   | 38 |

## Abkürzungen

### Subzelluläre Fraktionen

|       |   |
|-------|---|
| N + E | Gesamtleberhomogenat (erhalten durch Vereinigung von N und E)                   |
| N     | Sediment, bestehend aus Zellkernen, Zelltrümmern und ganzen Zellen              |
| E     | Zellkernfreier Überstand  |
| ML    | Sediment, vorwiegend bestehend aus Mitochondrien und Lysosomen                  |
| X     | Überstand über ML   |
| S     | Cytosol   |
| P     | Sediment, bestehend aus Plasmamembranfragmenten und Endoplasmatischem Retikulum |

### Enzyme

|              |                                    |
|--------------|------------------------------------|
| AP           | Alkalische Phosphodiesterase       |
| AS           | Arylsulfatase A,B                  |
| GDH          | Glutamat-Dehydrogenase             |
| GLDH         | Glutamat-Dehydrogenase             |
| GOT          | Glutamat-Oxalacetat-Transaminase   |
| GPT          | Glutamat-Pyruvat-Transaminase      |
| $\gamma$ -GT | $\gamma$ -Glutamyl-Transferase     |
| LAP          | Leucin-Arylamidase                 |
| LDH          | Laktat-Dehydrogenase               |
| N-A-G        | N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase |
| SP           | Saure Phosphatase                  |

### Sonstiges

|       |   |
|-------|---|
| EDTA  | Äthylendiamintetraessigsäure                    |
| EGTA  | Äthylenglykoltetraessigsäure                    |
| ER    | Endoplasmatisches Retikulum                     |
| HEPES | N-2-Hydroxymethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure |
| i.p.  | intraperitoneal                                 |
| i.v.  | intravenös                                      |
| TX    | Triton X 100                                    |

## 1. Einleitung

Das Lanthanid Cer und seine Verbindungen sind in der Industrie weitverbreitete Werkstoffe. Man findet sie z.B. als Bestandteile von Legierungen mit Aluminium, Magnesium und Mangan, sie werden zum Polieren von Spiegeln und Linsen benutzt und Cermischmetalle finden Verwendung für Zündsteine. Ein ganz neuer Aspekt für die industrielle Nutzung von Seltenen Erden ist die Verwendung von Yttrium und Lanthan für die Herstellung von Hochtemperatursupraleitern (Rietschel et al. 1987). Das biologische Verhalten und die Dekorporation von Cer im Säugerorganismus war aber in den letzten 30 Jahren vor allem wegen seines Vorkommens unter den Spaltprodukten von Kernreaktionen das Objekt ausgiebiger Untersuchungen (Catsch 1956, Catsch und Lê 1957, Catsch 1961, Catsch et al. 1961, Moskalev 1961, Moskalev und Strel'tsova 1961, Hansmann et al. 1965, Takada 1978, Gachályi et al. 1986). In der vorliegenden Arbeit diente Cer als Modellsubstanz für die Untersuchung von Verhalten und Wirkungsmechanismen eines typischen hepatotoxischen und lysosomotropen Stoffes, wobei die Ratte als Versuchstier gewählt wurde.

Cer wird bei Ratten vor allem in der Leber abgelagert (Schmautz 1964, Altenstetter et al. 1966) und führt dort nach Verabreichung von Dosen im Bereich einiger mg/kg Körpergewicht zur Ausbildung einer Fettleber (wir werden in dieser Arbeit derartige Dosen als "Gewichtsdosen" bezeichnen im Gegensatz zum trägerfrei verabreichten  $^{141}\text{Ce}$ ). Bemerkenswert ist, daß Rattenweibchen schon nach Verabreichung von 1mg/kg einen erhöhten Gesamtlipidgehalt in der Leber hatten, während bei Männchen dafür mindestens 7mg/kg  $\text{CeCl}_3$  notwendig waren (Snyder et al. 1959). Das bedeutet, daß die Weibchen auf Gewichtsdosen von  $\text{CeCl}_3$  bedeutend empfindlicher reagieren als die Männchen. Der Gesamtlipidgehalt der Leber erreicht am 2. bis 3. Tag nach der Injektion sein Maximum und fällt am 6. bis 10. Tag wieder auf seinen Normalwert zurück (Kyker et al. 1957, Snyder et al. 1960).

Die Reaktion der Ratten auf  $\text{CeCl}_3$  war somit bekannt, unaufgeklärt war jedoch der Mechanismus der Cerhepatotoxizität. Es lag nahe, zur Aufklärung des Mechanismus zunächst die subzelluläre Bindungsstelle des Cers genauer zu bestimmen, nachdem die Arbeit

von Mahlum (1967) keine eindeutige Zuordnung des  $^{144}\text{Ce}$  zu Lysosomen oder Mitochondrien erbrachte. Dafür bot sich vor allem die in unserem Labor für die Fragestellung der subzellulären Radionuklidablagerung vielfach bewährte Trägerfreie Elektrophorese an (Seidel et al. 1984, 1985, 1986). Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, native Lysosomen unter Umgehung der oft diskutierten Nachteile der Gradientenverfahren (Winter und Seidel 1982, Sütterlin 1982) von anderen Zellorganellen zu trennen. Die Möglichkeit einer Artefaktbildung durch EDTA im Kammerpuffer darf dabei weitgehend ausgeschlossen werden.

An die licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur genaueren morphologischen Analyse der Leberschädigung sollte sich die Charakterisierung der Certoxizität durch Messung von Enzymen im Serum anschließen. Aus der klinischen Praxis ist bekannt, daß bestimmte Leberkrankheiten zur Erhöhung bestimmter Enzyme im Serum führen. Es sollte daher auch für die Ratte möglich sein, aus eventuellen Enzymveränderungen im Serum Rückschlüsse auf die Art der Schädigung zu ziehen.

Um die Cerhepatotoxizität einem bestimmten Leberzelltyp zuordnen zu können, erschien es angebracht, homogene Zellpopulationen unabhängig voneinander zu untersuchen. Dies ist jedoch nur in vitro anhand von Zellkulturen möglich. Für kultivierte Rattenhepatocyten konnten einige wichtige in vivo-Leberreaktionen nachgewiesen werden, so synthetisieren sie u.a. Albumin, Fibrinogen und Transferrin (Koj et al. 1984) und können außerdem die hauptsächlichen Phase I- und II-Reaktionen, die mit der Biotransformation in Zusammenhang stehen, in vergleichbarer Rate wie in vivo katalysieren (Jones et al. 1986). Die Fähigkeit zur Biotransformation ist ein wesentlicher Gesichtspunkt für die Toxizitätsuntersuchungen, da die dabei entstehenden Reaktionsprodukte manchmal toxischer sind als die eigentlichen Ausgangsverbindungen. Nakamura et al. (1985) untersuchten die Wirkung von  $\text{CCl}_4$  auf isolierte Rattenhepatocyten mit dem Ergebnis, daß es bei niedrigen Konzentrationen zu Permeabilitätsänderungen der Zellmembran und bei höheren Dosen zur Cytolyse der Zellen führt. Die Schädigungen waren von Enzymfreisetzungen ins Kulturmedium begleitet.  $\text{CCl}_4$  führte in Kultur bei Rattenhepatocyten außerdem zu morphologischen Veränderungen wie Mikrovilliverlust, so-

wie Schwellung des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien (Berger et al. 1987). Da an Mäusehepatocyten in vitro zudem noch die Bildung freier Radikale nach  $\text{CCl}_4$  nachgewiesen werden konnte (Ruch et al. 1986), darf festgestellt werden, daß hier die wesentlichen in vivo-Toxizitätskriterien auch in vitro beobachtet werden konnten.

Selbstverständlich waren bei unseren in vitro-Versuchen auch Kupffer-Zellen in Betracht zu ziehen. Die Gewinnung dieser Zellen und ihre Verwendung für quantitative Enzymstudien erwies sich jedoch rasch als außerordentlich problematisch. Diese Probleme (siehe Diskussion) hofften wir durch die Verwendung von Alveolarmakrophagen als Modellsysteme umgehen zu können. Alveolarmakrophagen entstehen wie die Kupfferzellen aus den Zellen des Knochenmarks, die als Monocyten in die verschiedenen Gewebe einwandern und erst dort - als Gewebemakrophagen - ihre endgültige Form annehmen (Lohmann-Matthes 1981). Da neben diesem gemeinsamen Ursprung zudem die Hauptaufgabe aller Makrophagen die Phagozytose und Verdauung von Zelltrümmern und körperfremden Stoffen ist, läßt dies auf ein prinzipiell ähnliches Verhalten aller Makrophagen schließen. Als Modellsystem sollten vor allem die von Müller (1986) und Taya (1986) in unserem Labor eingeführten Alveolarmakrophagen von Schlachtrindern benutzt werden, da sie nicht nur einfach zu isolieren sind, sondern auch preiswert in großer Zahl zu erhalten sind. An den Rinderalveolarmakrophagen konnte zudem bereits mehrfach die Beibehaltung makrophagenspezifischer Funktionen in Kultur bestätigt werden (siehe dazu McGuire und Babiuk 1982, Hotz et al. 1987). Da durch Seltene Erden eine Blockade des Retikuloendothelialen Systems in vivo beobachtet wurde (siehe u.a. Lazar 1973), sollte an diesen Zellen untersucht werden, ob es in vitro zu einer Hemmung der Phagozytose nach Inkubation mit  $\text{CeCl}_3$  kommt. Dazu sollte neben der Messung der unspezifischen Phagozytose von Latexpartikeln auch die Chemilumineszenzmessung herangezogen werden. Diese Methode beruht darauf, daß die Phagozytose der Makrophagen von einem Anstieg in der Bildung von Sauerstoffradikalen begleitet ist (Fels und Cohn 1986). Ein Absinken der Chemilumineszenz und damit der Phagozytoserate konnte für verschiedene

mineralische Stäube bei Meerschweinchenalveolarmakrophagen nachgewiesen werden (Tilkes und Beck 1983), ebenso auch für Kupfferzellen Galaktosamin behandelte Ratten (Shiratori et al. 1986).

Bei der Aufklärung von Toxizitätsmechanismen sind nicht nur die Erfassung der in vivo-Reaktionen des ganzen Organismus und die Analyse der Wirkung auf einzelne Zelltypen wichtig, sondern auch Kenntnisse über das subzelluläre Verhalten des Schadstoffs sehr nützlich. Wir hatten bereits früher (Seidel et al. 1986) die Lyso-somotropie von  $^{141}\text{Ce}$ -Citrat nachgewiesen. Wie wir zeigen werden, konnten wir dies in der vorliegenden Arbeit auch für  $\text{CeCl}_3$  bestätigen. Es lag daher nahe zu prüfen, ob Lyso-somotropie und Hepato-toxizität des Cers in einem ursächlichen Zusammenhang stehen. Dies sollte durch in vitro-Inkubationen von angereicherten Lyso-somenpräparationen unter verschiedenen Bedingungen geschehen. Ein lyso-somenschädigender Effekt von Cer sollte sich z.B. in einer reduzierten Lyso-somenlatenz mit anschließender Freisetzung hydrolytischer Enzyme ins Cytoplasma bemerkbar machen.

Die vorliegende Arbeit hatte somit folgende Ziele:

1. Beschreibung des biologischen Verhaltens sowie des zellulären und subzellulären Ablagerungsortes von intravenös injiziertem trägerfreiem  $^{141}\text{Ce}$  und  $^{141}\text{Ce}$  mit Gewichts-dosen an  $\text{CeCl}_3$  mittels subzellulärer Fraktionierung, Trägerfreier Elektrophorese und linearem Saccharosegradienten.
2. Charakterisierung der morphologischen Veränderungen der Ratten-leber nach intravenöser Verabfolgung von  $\text{CeCl}_3$  mittels Licht- und Elektronenmikroskopie, vor allem am für die Toxizität wichtigen 2. Tag nach der Injektion. Begleitend dazu durchgeführte Enzymbestimmungen im Serum sollten die morphologischen Befunde ergänzen.
3. Experimente mit homogenen Zellkulturen zur näheren Aufklärung der Wirkung von Cer auf Rattenhepatocyten, Ratten-Kupffer- und Endothelzellen sowie auf die als Modellsysteme eingesetzten Ratten- und Rinder-alveolarmakrophagen.

4. Beantwortung der Frage, ob die Lysosomotropie des Cers die Ursache für die Hepatotoxizität ist mittels Inkubationsversuchen mit einer angereicherten Lysosomenfraktion.
5. Nähere Beschreibung der Ursachen des ausgeprägten Geschlechtsunterschiedes in der Reaktion von Ratten auf  $\text{CeCl}_3$ .

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Injektionslösungen, Nuklidmeßtechnik und Sedimentierbarkeit des $^{141}\text{Ce}$

Die  $^{141}\text{Ce}$ -Lösung wurde trägerfrei von Amersham Buchler, Braunschweig, bezogen. Benutzt wurde eine Stammlösung von  $^{141}\text{Ce}$  in 0,1 M HCl. Aus dieser Stammlösung wurde durch Verdünnen mit 0,01 M HCl die trägerfreie Injektionslösung hergestellt. Für die Injektion von  $^{141}\text{Ce}$  mit 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  als Trägermaterial wurden die Tiere gewogen und dann soviel  $\text{CeCl}_3$  in der mit 0,01 M HCl verdünnten  $^{141}\text{Ce}$ -Stammlösung gelöst, daß die Tiere mit dem injizierten Dosisvolumen von 0,25 ml genau die für ihr Körpergewicht berechnete Trägerdosis erhielten. Die injizierte Radioaktivitätsmenge lag bei durchschnittlich  $4 \times 10^4 \text{ Bq}$ .

Die Herstellung der nicht radioaktiven Injektionslösungen von 1,3, 2 oder 2,101 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  bzw. 2 mg/kg  $\text{GaCl}_3$  erfolgte analog zur Herstellung der  $^{141}\text{Ce}$ -Injektionslösung mit 2mg/kg  $\text{CeCl}_3$  als Trägermaterial, jedoch wurde hier das  $\text{CeCl}_3$  oder  $\text{GaCl}_3$  in 0,01 M HCl ohne  $^{141}\text{Ce}$  gelöst.

Sowohl die Radionuklidinjektionen als auch die Injektionen von nicht radioaktivem  $\text{CeCl}_3$  oder  $\text{GaCl}_3$  erfolgten intravenös in eine der Schwanzvenen mit einem Dosisvolumen von 0,25 ml. Die Injektionen wurden unter leichter Äthernarkose verabreicht.

Der Nachweis der  $\gamma$ -Aktivität des  $^{141}\text{Ce}$  geschah in direkter Messung der jeweiligen Proben (ganze Organe, Zellfraktionen, Fraktionen der Trägerfreien Elektrophorese und der Saccharosegradienten, inkubierte Zellen und deren Überstände). Die Messung erfolgte in einem Gamma-Spektrometer mit NaJ(Tl)-Bohrloch Kristall (Gamma-8000 Beckman, 145 keV-Linie).

Da die Sedimentierbarkeit des Cers ein Maß für dessen kolloidales Verhalten ist, wurden je 20 ml der Injektionslösungen und Kulturmedien mit  $^{141}\text{Ce}$  ohne und mit  $\text{CeCl}_3$  bei 205000 g zentrifugiert. Nach 60 Min. wurden die Zentrifugenröhrchen erschütterungsfrei aus dem Rotor (Ti60) genommen und die zentrifugier-

ten Lösungen in vier 5 ml-Aliquots (Fraktion 1-4) entnommen. 5 ml Aqua bidest wurden in die Zentrifugenröhrchen gegeben und das "Sediment" mit einem Plastikspatel abgeschabt und resuspendiert (Fraktion 5). Diese Prozedur wurde auch durchgeführt, wenn kein sichtbares Sediment vorhanden war. Die Radioaktivität der Fraktionen wurde gemessen und dann folgendes berechnet:

Wiederfindbarkeit der  $^{141}\text{Ce}$ -Radioaktivität (%)

$$= \frac{\text{Summe über die Radioaktivität von Fraktion 1-5}}{\text{Radioaktivität in 20ml unzentrifugierter Lösung}} \times 100$$

Sedimentierte  $^{141}\text{Ce}$ -Radioaktivität in Fraktion 4+5 (%)

$$= \frac{\text{Radioaktivität in Fraktion 4 + 5}}{\text{Summe über die Radioaktivität von Fraktion 1-5}} \times 100$$

Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist, zeigten die beiden Injektionslösungen und die Inkubationsmedien mit HEPES ohne fötales Kälberserum das typische Verhalten von löslichem Cer: etwa 100% der Radioaktivität wurden wiedergefunden, 25-30% der Radioaktivität befanden sich in der bodenständigsten Fraktion und dem Sediment. Wenn man dem HEPES-Medium 10% fötales Kälberserum hinzufügt, werden 67-84% der  $^{141}\text{Ce}$ -Radioaktivität sedimentierbar, das  $^{141}\text{Ce}$  muß also zumindest teilweise kolloidal oder an Protein gebunden vorliegen. In RPMI-Medium lag das  $^{141}\text{Ce}$  ohne und mit 10% fötalem Kälberserum fast vollständig in kolloidaler Form oder an Protein gebunden vor, da 89-100% der  $^{141}\text{Ce}$ -Radioaktivität in Fraktion 4 + 5 gefunden wurden. Auffällig ist, daß in den Inkubationsmedien mit fötalem Kälberserum die Wiederfindbarkeit der Radioaktivität höher war als in den Medien ohne fötales Kälberserum. Dies ist vor allem dadurch zu erklären, daß man ohne Zusatz von Serum kein auffälliges Sediment erkennen kann, nach Zugabe von Serum färbte sich das Sediment dagegen braun-gelb und konnte so gut aus den Zentrifugenröhrchen herausgelöst werden.

## 2.2. Versuche mit Ratten

### 2.2.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche und männliche Ratten der Rasse Sprague Dawley, die von Charles River Wiga, Sulzfeld, bezogen wurden. Das Gewicht lag zwischen 180 und 250 g. Die Tiere hatten, wenn nicht anders angegeben, bis zur Sektion freien Zugang zu Futter und Wasser. Soweit nicht anders erwähnt, erfolgten die Sektionen unter Äthernarkose.

### 2.2.2. Gewichte und Proteingehalt von Rattenlebern

Um den Einfluß von  $\text{CeCl}_3$  auf Leberfrischgewicht, Lebertrockengewicht und Proteingehalt der Leber zu ermitteln, wurden gleichschweren Rattenweibchen 2 Tage vor der Sektion 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  verabreicht. Als Kontrollen dienten Weibchen, die am Injektionstag das gleiche Körpergewicht hatten wie die mit  $\text{CeCl}_3$  behandelten Tiere.

Den völlig ausgebluteten Tieren wurde am Sektionstag die Leber entnommen, äußerlich trockengetupft und dann das Leberfrischgewicht durch Wiegen bestimmt. Ein Aliquot von 3 g wurde von jeder Leber entnommen und solange bei 60 °C getrocknet, bis Gewichtsstillstand eintrat. Ein weiteres Aliquot wurde homogenisiert (siehe Kapitel 2.2.3.) und mit Homogenisationsmedium auf 30 ml aufgefüllt. Die Proben wurden 20 Sek. beschallt (Branson Sonifier Cell Disruptor B 15, 30% Intensität) und anschließend der Proteingehalt bestimmt.

### 2.2.3. Präparation der subzellulären Fraktionen

Die Präparation der subzellulären Fraktionen durch differentielle Zentrifugation aus Rattenleber erfolgte nach Gruner et al. (1981) und Stahn et al. (1970) mit leichten Modifikationen. Alle Präparationsschritte wurden auf Eis durchgeführt, die Zentrifugationen erfolgten bei 4 °C entweder in einer Beckman Zentrifuge, Spinco L 250 B oder in einer Contron Centrikon T-2060 Zentrifuge, jeweils mit einem Ti60 Rotor (Beckman).

Die Leber wurde entfernt und gewogen, jeweils 5 g mit einer Schere zerkleinert und in etwa 20 ml Homogenisationsmedium (=Kammerpuffer, siehe Kapitel 2.2.4.) aufgenommen. Die Homogenisation wurde in einem 30 ml Potter Elvehjem Homogenisator (Braun, Melsungen) mit Plastikpistill durch 3-4 Auf- und Abbewegungen bei 500 Umdrehungen pro Minute durchgeführt. Das Homogenat wurde mit Homogenisationsmedium auf 30 ml aufgefüllt und 5 Min. bei 1760 g zentrifugiert. Dadurch erhielt man den Überstand  $E_1$  und das Sediment  $N_1$ . Nachdem  $E_1$  abpipettiert war, wurde  $N_1$  mit einem Glaspistill der Spaltweite "S" in einem 15 ml Dounce-Homogenisator (Braun, Melsungen) durch 5 manuelle Auf- und Abwärtsbewegungen resuspendiert, mit Homogenisationsmedium auf 25 ml aufgefüllt und erneut 5 Min. bei 1760 g zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand  $E_2$  wurde mit  $E_1$  vereinigt und mit Homogenisationsmedium auf 50 ml aufgefüllt. Man erhielt so E, den zellkernfreien Überstand. Das verbleibende Sediment N (Zellkerne, Zelltrümmer, ganze Zellen) wurde in insgesamt 50 ml Homogenisationsmedium im 30 ml Dounce-Homogenisator durch 10 Auf- und Abwärtsbewegungen mit einem Glaspistill der Spaltweite "L" resuspendiert. Durch Vereinigung gleicher Teile N und E erhielt man N+E (Gesamtleberhomogenat). Für die weiteren Zentrifugations-schritte wurden 30 ml E abgenommen und 10 Min. bei 40600 g zentrifugiert. Man erhielt das ML-Sediment (Mitochondrien und Lysosomen) und den Überstand X. Aus X wurde durch 40-minütige Zentrifugation bei 102000 g das Sediment P (Mikrosomenfraktion) und der Überstand S (Cytosol) gewonnen. S wurde mit Homogenisationsmedium in einem 15 ml Dounce-Homogenisator durch 10 Auf- und Abwärtsbewegungen mit einem Glaspistill der Spaltweite "L" resuspendiert.

Um das ML-Sediment für die Trägerfreie Elektrophorese und die Saccharosegradienten weitgehend rein darzustellen, wurde es noch viermal gewaschen, d.h.: Resuspendierung des ML-Sediments in insgesamt 30 ml Homogenisationsmedium in einem 15 ml Dounce-Homogenisator durch 5 Auf- und Abwärtsbewegungen mit einem Glaspistill der Spaltweite "L" und anschließend 10 Min. Zentrifugation bei 40600 g.

Durch das Waschen gehen insgesamt maximal 16% an lysosomaler Enzymaktivität verloren, es wird jedoch ein großer Anteil des Endoplasmatischen Retikulums herausgewaschen (Gesamtverlust an NADPH-Cytochrom C-Reduktase etwas 50%), so daß der relativ geringe Verlust an lysosomaler Enzymaktivität zugunsten einer reineren Darstellung des ML-Sediments verantwortlich werden kann.

#### 2.2.4. Trägerfreie Elektrophorese

Die Vorschrift für die Herstellung von Elektroden- und Kammerpuffer wurde der Arbeit von Henning et al. (1974) entnommen, jedoch wurde eine höhere EDTA-Konzentration gewählt. Der Elektrodenpuffer enthielt jeweils 0,01 M Triäthanolamin, Essigsäure und Na<sub>2</sub>-EDTA, der Kammerpuffer enthielt jeweils 0,001 M Triäthanolamin, Essigsäure und Na<sub>2</sub>-EDTA sowie 0,306 M Saccharose. Elektroden- und Kammerpuffer wurden mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

Das aus der differentiellen Zentrifugation gewonnene, viermal gewaschene ML-Sediment wurde in 20 ml Kammerpuffer (=Homogenisationsmedium) resuspendiert und dann über einen Perfusor in die Elektrophorese-Trennkammer eingeschleust.

Trennbedingungen:

|                           |              |
|---------------------------|--------------|
| Perfusoreinstellung:      | 2-3 ml/Std.  |
| Durchflußgeschwindigkeit: | 350 ml/Std.  |
| Stromstärke:              | 220 - 240 mA |
| Spannung:                 | 1440 V       |
| Kammertemperatur:         | 5,5 °C       |

Das Gerät für die Trägerfreie Elektrophorese (Elphor VAP-11) stammte von der Firma Bender & Hobein, München. Die Wiederfindbarkeit des <sup>141</sup>Ce betrug 80-100%.

#### 2.2.5. Saccharose-Dichtegradienten

Die Vorschrift für die Auftrennung des ML-Sediments im linearen Saccharosegradienten wurde der Arbeit von Müller (1986) entnommen.

Das viermal gewaschene ML-Sediment wurde mit Homogenisationsmedium auf 15 ml aufgefüllt, 2 ml dieser Suspension wurden dann

auf den Gradienten gelegt. Die Zentrifugation erfolgte 2 Std. bei 4 °C im Vertikalrotor VTi50 in einer Contron Centrikon T-2060 Zentrifuge bei 60000 g. Danach wurden die Gradienten in 22 Fraktionen ausgetropft. Aus der im Abbè Refraktometer gemessenen Saccharosekonzentration der einzelnen Fraktionen konnte mittels der Int. Critical Tables of Numerical Data, Physical Chemistry and Technology (Vol. II, London, 1927) die dazugehörige Dichte ermittelt werden.

#### 2.2.6. Isolierung von Hepatocyten aus der Rattenleber

Die Hepatocytenisolation erfolgte nach der Methode von Ingebretsen und Wagle (1972), die Modifikationen wurden der Arbeit von Gebhardt und Mecke (1979) entnommen.

Die Betäubung der Tiere erfolgte i.p. mit 0,2 ml Nembutal (Na-Pentobarbital)-Stammlösung (30 mg Nembutal /ml A. bidest) pro 100 g Lebendgewicht der Ratte. Die Blutgerinnung wurde durch eine i.v. Injektion von 0,2 ml/100 g Ratte Vetren (Heparin-Na, 100 Einheiten/ml) verhindert.

Nach Öffnung des Bauchraums wurden drei lose Ligaturen mit chirurgischer Seide angelegt: zwei um die Vena portae und eine um die Vena cava caudalis oberhalb der Einmündung in den Nierenast. Während das mit O<sub>2</sub> gesättigte, 37 °C warme Präperfusionsmedium aus einer Tropfflasche lief, wurde eine Braunüle (Braun, Melsungen) in die Vena portae eingeführt und mit den beiden Ligaturen festgebunden. Gleichzeitig wurde die Vena cava caudalis unterhalb der Ligatur durchtrennt, so daß das Präperfusionsmedium ungehindert auslaufen konnte. Das Zwerchfell wurde aufgeschnitten und die Vena cava superior durchtrennt. Nach dem Abbinden der Vena cava caudalis war die Durchflußrichtung des Präperfusionsmediums eindeutig festgelegt: durch die Vena portae zur Vena cava superior. Das Präperfusionsmedium erfüllte die Aufgabe, die Leber blutfrei zu waschen und endogenes Ca<sup>2+</sup>, das am Zell-Zellkontakt beteiligt ist, mittels Komplexbildung mit EGTA herauszulösen. In der Perfusionsapparatur erfolgte der Wechsel von Präperfusionsmedium auf Perfusionsmedium, gleichzeitig wurde dem Perfusionsmedium Kollagenase (0,05 %) zugesetzt sowie CaCl<sub>2</sub> (4mM), da für die Kollagenaseaktivität Ca<sup>2+</sup> als Cofaktor notwendig ist.

Die Leber wurde bei Rattenweibchen 13 Min. und bei Rattenmännchen 15 Min. rezirkulierend bei 37 °C perfundiert, das Perfusionsmedium wurde währenddessen mit O<sub>2</sub> begast. Anschließend wurde die Leber mit einer Schere eingeschnitten und die Zellen aus ihrer Bindegewebskapsel in eiskaltem, O<sub>2</sub>-gesättigtem Isolationsmedium ausgeschüttelt. Die so erhaltene Zellsuspension wurde durch Nylongaze abfallender Maschenweite bis 100 µm filtriert, so daß schließlich weitgehend Einzelzellen vorlagen.

Die Abtrennung der Nicht-Parenchymzellen von den Leberparenchymzellen erfolgte durch drei Zentrifugationsschritte: einmal 80 g und zweimal 50 g, je 4 Min. in einer Digifuge GL (Heraeus). Die Leberparenchymzellen (Hepatocyten) befanden sich im letztlich erhaltenen Sediment, die Nicht-Parenchymzellen in den Überständen. Die Vitalität der Zellen wurde mit Trypanblau bestimmt und betrug durchschnittlich 80%, die Ausbeute lag im Mittel bei 320 Millionen Hepatocyten pro Leber.

#### 2.2.7. Monolayerkultur von Hepatocyten

Für die Hepatocytenkulturen wurden folgende Medien verwendet:

Waymouth MB 752/1 (Gibco) mit 10% fötalem Kälberserum, 2 mM Glutamin und 10<sup>-6</sup>M Dexamethason

Waymouth MB 752/1, supplemiert wie oben, jedoch zusätzlich mit 10<sup>-6</sup> oder 10<sup>-8</sup>M Insulin

RPMI 1640 (Gibco), supplemiert wie Waymouth MB 752/1

RPMI 1640 ohne Supplemente

Alle Medien enthielten 50 Einheiten Penicillin/ml und 50 µg Streptomycin/ml. Soweit nicht anders erwähnt wurde das fötale Kälberserum (Gibco) immer bei 65 °C 30 Min. hitzeinaktiviert.

Das in Kapitel 2.2.6. gewonnene Hepatocytensediment wurde in dem jeweils verwendeten, 37 °C warmen Kulturmedium resuspendiert und ein Zelltiter von 1,5 x 10<sup>6</sup> lebende Zellen pro Milli-

liter eingestellt. Dann wurden entweder 2 ml Zellsuspension auf 35 mm Petrischalen oder 4 ml Zellsuspension auf 55 mm Petrischalen (Nunc) gegeben, dies entspricht einer durchschnittlichen Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Die für die Hepatocytenkultur verwendeten Petrischalen waren 48 Std. vorher mit Rattenschwanzkollagen (selbst hergestellt) beschichtet worden. Ein bis zwei Stunden nach Aussäen der Zellen wurde das Medium gewechselt (2 ml Medium auf die 35 mm- und 4 ml auf die 55 mm Petrischalen), um so die nicht adhärenen Zellen zu entfernen. Die Zellen verblieben dann die zwei Tage bis zum Versuchsbeginn im Brutschrank (37 °C, 5-6% CO<sub>2</sub>, 100% Luftfeuchtigkeit), denn erst nach zwei Tagen hat sich ein für die Versuche verwendbarer Monolayer ausgebildet (siehe u.a. Ichihara et al. 1982), das Medium wurde täglich gewechselt. Die Abb. 1 und 2 sollen einen Gesamteindruck von Rattenhepatocyten in Monolayerkultur vermitteln. Die Abb. 1 a-c zeigen die Anheftungsphase und die beginnenden Knüpfungen von Zell-Zellkontakten nach 1 1/2 Stunden in Kultur. Abb. 2 zeigt eine Hepatocyte nach 2 Tagen in Kultur; während die Zellen nach der Anheftungsphase einen Durchmesser von 15-20 µm haben, hat die Hepatocyte am 2. Tag in Kultur mit fast 40 µm ihren Durchmesser verdoppelt.

Zu Versuchsbeginn wurde das Medium abgesaugt, der Hepatocytenmonolayer ein- bis zweimal mit Medium gewaschen und dann das jeweilige Medium ohne oder mit CeCl<sub>3</sub> auf die Zellen gegeben (für den Versuch mit RPMI ohne Supplemente waren die Zellen bis zum Versuchsbeginn in RPMI mit Supplementen inkubiert worden). Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und die darin enthaltenen, nicht adhärenen Zellen bei 80 g abzentrifugiert. Man erhielt einen zell- und zellbruchstückfreien Überstand. Der Hepatocytenmonolayer wurde zweimal mit 0,9%iger NaCl gewaschen und dann in Kochsalzlösung von der Petrischale abgeschabt. Zur Untersuchung der Aufnahme von Cer in den Hepatocytenmonolayer wurde vorgewärmtes bzw. vorgekühltes Medium mit trägerfreiem <sup>141</sup>Ce oder <sup>141</sup>Ce mit 10 µM CeCl<sub>3</sub> auf die Zellen gegeben, die dann anschließend entweder bei 37 °C

im Brutschrank oder bei 0-2 °C im Kühlschrank 4 Std. inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurde der Überstand abgenommen, die Zellen zweimal mit 0,9%iger NaCl gewaschen und die Hepatocyten in Kochsalzlösung abgeschabt. Die Radioaktivität der Proben wurde bestimmt und der Proteingehalt der Zellsuspension gemessen. Die Wiederfindbarkeit der Radioaktivität in Überstand, Waschflüssigkeit und Zellen betrug zwischen 90 und 100% der auf die Kulturschalen gegebenen Radioaktivitätsmenge.

#### 2.2.8. Herstellung und Kultur von Hepatocytensphäroiden

Die Herstellung und Kultur der Hepatocytensphäroide erfolgte nach einer bisher unveröffentlichten Arbeit von F. Schuler. Um hochreine Hepatocyten zu erhalten, wurde das in Kapitel 2.2.6. gewonnene Hepatocytensediment einer Dichtegradientenzentrifugation in Percoll (Pharmacia) bei 4 °C unterworfen (Kreamer et al. 1986), das dabei erhaltene Hepatocytensediment wurde in Isolationsmedium aufgenommen und bei 80 g abzentrifugiert. Das Sediment enthielt hochreine und hochvitale (Vitalität  $\geq 90\%$ ) Hepatocyten, die nun mit 37 °C warmem Waymouth-Medium (supplementiert wie für die Hepatocytenkultur) auf einen Zelltiter  $2 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt wurden. 10 ml dieser Zellsuspension wurden nun auf 90 mm Petrischalen gegeben; diese Petrischalen waren nicht mit Rattenschwanzkollagen beschichtet, um eine Anheftung der Zellen zu verhindern. Wenn sich nach ein bis zwei Tagen im Brutschrank Zellaggregate gebildet hatten, wurden die Zellaggregate von je 20 Petrischalen in eine Spinnerflasche überführt (Bellco Brotechnology) und bei 37 °C in den Wärmerraum gestellt. Die Sphäroide wurden ständig gerührt (90 Umdrehungen pro Minute) und mit einer Mischung aus 95% Luft und 5% CO<sub>2</sub> begast. Das Medium wurde täglich gewechselt (supplementiertes Waymouth-Medium). Nach zwei Tagen Kultur in der Spinnerflasche konnten die Sphäroide für den Versuch benutzt werden. Sie hatten einen Durchmesser von durchschnittlich 200 µm und bestanden aus etwa 400 Zellen.

Für die Inkubationsversuche mit <sup>141</sup>Ce wurden die Sphäroide durch Beschleunigung auf 200 g abzentrifugiert, in <sup>141</sup>Ce-haltigem Medium (RPMI, wie für Hepatocytenkultur supplementiert) ohne und mit 10 µM CeCl<sub>3</sub> resuspendiert und wieder in die

Spinnerflaschen überführt. Die Inkubationen erfolgten unter Rühren entweder bei 37 °C im Wärmerraum oder bei 0 °C auf Eis. Nach Ende der Versuchsdauer wurden die Sphäroide abzentrifugiert, zweimal in 0,9 %iger NaCl gewaschen und die Radioaktivität von Sphäroiden und Überständen gemessen. Außerdem wurde der Proteingehalt der Sphäroide bestimmt.

#### 2.2.9. Kupffer- und Endothelzellisolierung aus der Rattenleber und deren Kulturen

Die Isolation der Kupffer- und Endothelzellen erfolgte im Prinzip wie bei Smedsrød und Pertoft (1985) aus den Überständen mit den Nicht-Parenchymzellen von Kapitel 2.2.6.

Die Überstände wurden bei 800 g abzentrifugiert (Cryofuge 6-6, Heraeus Christ) und das Sediment in 10 ml Isolationsmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf einen Gradienten aufgetragen, dieser bestand aus 20 ml Percoll der Dichte 1.037 g/ml und 15 ml der Dichte 1,066 g/ml. Nach 15 Min. Zentrifugation bei 800 g ( 4 °C, Bühler Dichtegradient Zentrifuge ZS mit Spezialseparationsgefäß 50 ml) enthielt die Bande in der Grenzschicht zwischen den beiden Percolldichten Kupffer- und Endothelzellen. Diese Bande wurde abgesaugt, mit dem gleichen Volumen Isolationsmedium versetzt und bei 800 g pelletiert. Da ein Auszählen der Zellen wegen der geringen Anzahl und Größe mit unseren Methoden nicht möglich war, wurde das Sediment standardmäßig in 9 ml RPMI (ohne Supplemente) aufgenommen und 2 ml-weise in 35 ml Glaspetrischalen ausgesät. Nach 15 Min. hatten sich die Kupfferzellen festgesetzt, der Überstand wurde abgenommen und noch zweimal mit RPMI gewaschen. Die Kupfferzellen wurden in 2 ml Waymouth-Medium mit 30% fötalem Kälberserum weiterkultiviert. Zur Gewinnung der Endothelzellen erfolgte eine Zentrifugation des zellhaltigen Überstandes, der nach 15 Min. von den Kupfferzellen abgenommen worden war, bei 800 g; das Sediment wurde in 9 ml Waymouth-Medium (30% fötales Kälberserum) resuspendiert und je 2 ml auf mit Rattenschwanzkollagen beschichtete 35 mm Petrischalen gegeben. Nach 2 Std. wurde das Medium der Endothelzellkulturen durch frisches Waymouth-Medium (30% fötales Kälberserum) ersetzt, nach 24 Std. erfolgte der Mediumwechsel durch

Waymouth-Medium ohne und mit  $10 \mu\text{M CeCl}_3$ . Die Inkubation der Zellen erfolgte 20 Std. bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank, danach wurde der Überstand abgenommen und bei  $800 \text{ g}$  die freischwimmenden Zellen abzentrifugiert. Die auf der Kulturschale festsitzenden Zellen wurden in  $2 \text{ ml } 0,9\%$ iger  $\text{NaCl}$  abgeschabt.

Um einen Eindruck von der Reinheit der Kupfferzellen in Kultur zu gewinnen, wurde eine Peroxidasefärbung durchgeführt (nach Summerfield et al. 1982). Die Anfärbung erfolgte nach 24 Std. in Kultur, also vor Versuchsbeginn. In Abb. 3 ist zu erkennen, daß alle Zellen mehr oder weniger stark Peroxidase-positiv waren; da die positive Peroxidase-reaktion als Hauptunterscheidungskriterium für Kupffer- und Endothelzellen gilt (siehe u.a. Smedsrød und Pertoft 1985 sowie Wisse 1974) kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei Versuchen mit Ratten-Kupfferzellen um sehr reine Kulturen handelte.

Um die Phagocytoseaktivität kultivierter Kupfferzellen zu prüfen, wurden die Kulturen nach 24 Std. für 1 Std. in Waymouth-Medium (30% fötales Kälberserum) mit Latex (Dow-Latex, Serva, Durchmesser  $2,02 \mu\text{m}$ ) inkubiert. Die Weiterbehandlung der Zellen erfolgte wie bei den mit Latex inkubierten Rinder-alveolarmakrophagen (Kapitel 2.3.3.). Aus Abb. 4 ist zu ersehen, daß die Kupfferzellen ihre typische Makrophagenfunktion, die unspezifische Phagocytose von Latexpartikel, auch nach 24 Std. in Kultur beibehalten hatten, zu Versuchsbeginn lagen somit voll funktionsfähige Makrophagen vor.

Während es sich bei den Kupfferzellkulturen also um sehr reine Kulturen handelte, waren die Endothelzellkulturen mit bis zu 30 % Hepatocyten und Kupfferzellen verunreinigt.

#### 2.2.10. Kultur von Hepatocyten mit Überständen von Kupfferzellkulturen

Rattenhepatocyten wurden mit einer Dichte von ca.  $3 \times 10^5$  Zellen/ $\text{cm}^2$  in  $90 \text{ mm}$  Petrischalen ausgesät und 36 Std. in Waymouth-Medium (10 % fötales Kälberserum) kultiviert. Die Ratten-Kupfferzellen desselben Tieres wurden 24 Std. in Waymouth-Medium (30 % fötales Kälberserum) gehalten und anschließend 6 Std. in Waymouth-Medium (30 % fötales Kälberserum)

ohne und mit  $10 \mu\text{M CeCl}_3$  inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und mit dem gleichen Volumen Waymouth-Medium (10% fötales Kälberserum) ohne und mit  $10 \mu\text{M CeCl}_3$  versetzt. Es wurden 8 ml dieser "Überstandsmedien" auf die Hepatocytenmonolayer gegeben und 18 Std. inkubiert. Die Überstände wurden dann abgenommen und bei 80 g zentrifugiert, die Zellen wurden in 0,9 %iger NaCl abgeschabt.

#### 2.2.11. In vitro-Inkubationen des Mitochondrien-Lysosomen (ML)-Sediments

Für die Inkubationsversuche wurde durch differentielle Zentrifugation ein ML-Sediment wie in Kapitel 2.2.3. hergestellt, Abweichungen von diesem Schema sind im Text angegeben. Homogenisation und Zentrifugationen erfolgten in Kammerpuffer (siehe Kapitel 2.2.4.), das ML-Sediment wurde einmal gewaschen.

##### 2.2.11.1. Inkubationen in Kammerpuffer

Für diesen Versuch wurden 6,5 g Leber von Kontrollweibchen und von Weibchen mit 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  (2. Tag nach Injektion) homogenisiert und daraus 60 ml E hergestellt. Das ML-Sediment wurde durch Zentrifugation aus 45 ml E gewonnen, es wurde dann mit  $37^\circ\text{C}$  warmem Kammerpuffer auf 150 ml aufgefüllt und bei  $37^\circ\text{C}$  ins Wasserbad gestellt. Zu verschiedenen Zeiten nach Inkubationsbeginn wurden je 2 x 10 ml Probe entnommen, sofort auf Eis gestellt und anschließend bei 40600 g die Mitochondrien und Lysosomen abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 10 ml Kammerpuffer resuspendiert. Sowohl die Überstände als auch die resuspendierten Sedimente wurden mit 10% TX versetzt (1%ig in den Proben) und 20 Sek. beschallt.

##### 2.2.11.2. Inkubationen in Cytosol

Aus 6,2 g Leber von Kontrollweibchen und Weibchen, die 16 Std. vor der Sektion 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  erhielten, wurden 60 ml E gewonnen, der ML-Lauf erfolgte mit 55 ml E. Der Überstand X wurde mit Kammerpuffer auf 60 ml aufgefüllt, bei 102000 g zentrifugiert und das so gewonnene Cytosol (= S der differentiellen Zentrifugation) mit Kammerpuffer auf 60 ml aufgefüllt und auf

37 °C vorgewärmt. Die ML-Sedimente von Kontrolltieren wurden entweder mit dem Cytosol anderer Kontrolltiere oder dem Cytosol der mit  $\text{CeCl}_3$  behandelten Tiere bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten nach Inkubationsbeginn entnahm man je 2 x 5 ml Probe, die weitere Verarbeitung der Proben wurde wie in Kapitel 2.2.11.1. vorgenommen.

#### 2.2.12. Bronchoalveoläre Lavage von Rattenlungen und Zellkulturen mit Rattenalveolarmakrophagen

Die bronchoalveoläre Lavage wurde in enger Anlehnung an die Arbeit von Müller (1986) durchgeführt. Eine Stahlkanüle (0,8 x 120mm, an der Spitze zur Abstumpfung mit einem Tropfen Zweikomponenten-Lack überzogen) wurde in die Trachea eines ausgebluteten Tieres eingeführt, dort festgebunden und auf eine 5 ml-Spritze aufgesteckt. 5 ml 0,9%ige NaCl (Raumtemperatur) wurden sehr langsam vier- bis fünfmal in die Lunge hineingedrückt und wieder zurückgezogen, dieser Vorgang wurde drei- bis viermal wiederholt.

Die so gewonnenen Zellen wurden bei 300 g (Hettich Rotixa/K) 10 Min. abzentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. Die mit Trypanblau bestimmte Vitalität lag im Durchschnitt bei 94%, die gewünschte Zellzahl wurde mit RPMI-Medium (ohne fötales Kälberserum und Supplemente, mit 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) eingestellt und 1 ml Zellsuspension auf 35 mm Plastik-Petrischalen gegeben. Ein bis zwei Stunden nach Aussäen der Zellen wurde das Medium über den abgesetzten Zellen abgesaugt und durch 2 ml Medium ohne und mit  $\text{CeCl}_3$  ersetzt. Die Rattenalveolarmakrophagen verblieben dann für die Dauer der Inkubation bei 37 °C im Brutschrank.

Da die Ausbeute an Alveolarmakrophagen aus einer Rattenlunge maximal  $3 \times 10^6$  Zellen betrug, wurden pro 35 mm Petrischale durchschnittlich  $7 \times 10^5$  Zellen ausgesät. Wegen der geringen Zellzahl mußte auf Enzymbestimmungen in Zellen und Überständen verzichtet werden, die Versuchsauswertung beschränkte sich somit auf lichtmikroskopische Untersuchungen.

### 2.3. Versuche mit Rinderalveolarmakrophagen

#### 2.3.1. Bronchoalveoläre Lavage von Rinderlungen und Aufarbeitung der Makrophagen für die Kultur

Die Gewinnung von Rinderalveolarmakrophagen durch bronchoalveoläre Lavage wurde ähnlich wie bei Müller (1986) und Taya (1986) durchgeführt.

Die Rinderlungen stammten von gesunden Tieren beiderlei Geschlechts und verschiedenen Alters, Bezugsquelle war die Metzgerei Mayer, Karlsruhe-Weingarten oder der Städtische Schlachthof in Karlsruhe\*. Die Lungen wurden 1-2 Std. nach dem Tod der Tiere mit ca. 20 l 0,9% NaCl (Raumtemperatur) gewaschen, die so gewonnene Lavageflüssigkeit wurde durch vier Lagen Mullgaze sowie eine Lage Gaze der Maschenweite 150 µm filtriert und bei 300 g 10 Min. zentrifugiert (Beckmann J2-21-Zentrifuge mit JA 10 Rotor, 4 °C). Das Zellsediment wurde in eiskalter Kochsalzlösung gewaschen, in wenig 0,9%iger NaCl resuspendiert und auf Eis gestellt. Deutlich mit Erythrocyten verunreinigte Zellsedimente wurden verworfen. Aus einer Lunge konnten bis zu  $1,5 \times 10^9$  Zellen gewonnen werden, die mit Trypanblau bestimmte Vitalität lag bei durchschnittlich 85%; mehr als 90% der Zellen waren Makrophagen (Hemacolor-Färbung, siehe auch Esterase-Färbungen in Abb. 24). Bei einem Teil der Versuche mit Rinderalveolarmakrophagen wurde ein Reinigungsschritt über Ficoll-Paque (Pharmacia) durchgeführt. Dazu wurden 20 ml des in 0,9% NaCl resuspendierten Makrophagensediments mit 30 ml Ficoll-Paque unterschichtet und 20 Min. bei 200 g zentrifugiert; die vitalen Makrophagen reicherten sich dabei in der Grenzschicht an während der größte Teil der toten Zellen und Zelltrümmer im Sediment wiedergefunden wurde. Die Zellen in der Grenzschicht wurden abgenommen und nochmals mit Kochsalzlösung bei 300 g gewaschen.

Es wurde nachgewiesen, daß der Ficoll-Paque-Gradient zwar die Vitalität um ca. 10-15% erhöht, jedoch war es für die Versuchs-

---

\* Herrn Mayer (Metzgerei Mayer) sowie Herrn Dr. Botzenhardt und den Mitarbeitern des Städtischen Schlachthofes Karlsruhe danke ich für die Bereitstellung der Rinderlungen.

ergebnisse unerheblich, ob die Zellen diesem Reinigungsschritt unterworfen worden waren oder nicht. Daher wurde in den Ergebnissen kein Unterschied zwischen den ungereinigten und den über Ficoll-Paque gereinigten Makrophagen gemacht.

### 2.3.2. Kulturmedien für Rinderalveolarmakrophagen

Für die Inkubation der Rinderalveolarmakrophagen wurden folgende Medien verwendet:

HEPES-Medium (siehe Müller 1986), jedoch mit Zusatz von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,4.

RPMI 1640-Medium

Beide Medien enthielten 100 Einheiten Penicillin/ml sowie 100  $\mu\text{g}$  Streptomycin/ml und wurden je nach Versuch ohne und mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum verwendet.

### 2.3.3. Kultur von Rinderalveolarmakrophagen

Das durch die Arbeitsschritte in 2.3.1. erhaltene Makrophagensediment wurde in 37 °C warmem Medium resuspendiert, dabei wurde eine Zellzahl von  $3 \times 10^6$  lebende Zellen/ml eingestellt. 2 ml dieser Zellsuspension wurden auf 35 mm Plastik-Petrischalen ausgesät. Nach 3 Std. wurde das Medium über den abgesetzten Zellen (mit den nicht-adhärennten Zellen) abgesaugt und durch 2 ml Medium ohne und mit  $\text{CeCl}_3$  ersetzt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und bei 300 g abzentrifugiert; die Zellen wurden in 0,9% NaCl abgeschabt.

Für die Inkubation von Rinderalveolarmakrophagen mit Latexpartikeln wurden die Zellen auf Deckgläschen in 35 mm Petrischalen ausgesät und 3 Std. absitzen lassen. Nach 14 Std. Inkubation im jeweiligen Medium mit und ohne  $\text{CeCl}_3$  wurde das Medium abgesaugt und durch Medium mit Latex ersetzt (Dow-Latex, Serva, Durchmesser 0,8 oder 2,02  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{g}$  Latex/ml Medium). Nach einer Stunde bei 37 °C wurden die Deckgläser aus den Petrischalen herausgenommen, mit Kochsalzlösung abgespült und die Zellen in der Fixierlösung der Hemacolor-Schnellfärbung fixiert. Die Auflösung der nicht-phagozytierten Latexpartikel erfolgte in Xylol (van Furth und Diesselhoff-den Dulk 1980).

#### 2.3.4. Chemilumineszenzuntersuchungen mit Rinderalveolar- makrophagen in Kultur

Die Chemilumineszenzmessungen wurden mit Herrn Dr. Baader, Fakultät für Biologie, Universität Konstanz, an einem Raytest LEA Luminescence Emissions Analyzer gemeinsam durchgeführt. Die Kultivierung der Rinderalveolarmakrophagen erfolgte wie in Kapitel 2.3.3. Bis zum Versuchsbeginn verbleiben die Zellen 14-16 Std. bei 37 °C in RPMI-Medium ohne fötales Kälberserum. Danach wurden die Makrophagen entweder direkt vor der Messung mit RPMI-Medium ohne und mit  $\text{CeCl}_3$  versetzt oder 3-5 Std. in Medium mit  $\text{CeCl}_3$  bei 37 °C inkubiert und dann gemessen.

Zu Beginn der Messung wurde Luminol (Endkonzentration 5  $\mu\text{M}$  im Medium) direkt in die 35 mm-Petrischalen auf 2 ml Medium gegeben und die Petrischale in die auf 37 °C temperierte Meßkammer eingeschoben. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Meßbeginn wurde Zymosan (0,5 mg/ml Medium, Zymosan war mit Humanblutserum opsoniert) zum Medium zupipettiert und der Verlauf der Chemilumineszenz der Zellen (gemessen in cps, Ordinate) über eine bestimmte Zeit (gemessen in Minuten, Abszisse) beobachtet.

#### 2.4. Protein- und Enzymbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte mit dem "BIO-RAD Protein Assay" (BIO-RAD-Laboratories, München), die Eichkurve wurde mit Rinderserumalbumin als Proteineichsubstanz erstellt. Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT, E.C. 2.6.1.1.), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT, E.C. 2.6.1.2.), Glutamat-Dehydrogenase (GLDH, E.C. 1.4.1.3.) und Leucin-Arylamidase (LAP, E.C. 3.4.11.) wurden als typische Enzyme der Leberdiagnostik ausgewählt und mit Test-Kits der Fa. Boehringer, Mannheim, im hämolysefreien Rattenserum sowie in Leberzellen in Kultur und deren Überstände bestimmt. Ebenfalls mit Test-Kits wurden die  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT, E.C. 2.3.2.2.) sowie Phospholipide und Gesamtcholesterin des Serums gemessen. Außerdem wurden in

den verschiedenen Versuchen folgende Leitenzyme gemessen:

| Kompartiment                | Enzym                                      | Referenz                   |
|-----------------------------|--|----------------------------|
| Cytoplasma                  | Laktat-Dehydrogenase (LDH)                 | Bergmeyer und Bernt (1970) |
| Mitochondrien               | Glutamat-Dehydrogenase (GDH)               | Williamson et al. (1967)   |
| Endoplasmatisches Retikulum | NADPH-Cytochrom C-Reduktase (CCR)          | Sottocasa et al. (1967)    |
| Lysosomen                   | N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase (N-A-G) | Beaufay et al. (1974)      |
|                             | Arylsulfatase A,B (AS)                     | Roy (1954)                 |
|                             | Saure Phosphatase (SP)                     | Appelmans et al. (1955)    |
| Perizelluläre Membranen     | Alkalische Phosphodiesterase (AP)          | Beaufay et al. (1974)      |

Sowohl frische als auch aufgetaute Zellsuspensionen wurden zur Bestimmung von Protein- und Enzymgehalt 20 Sek. beschallt. Alle Extinktionsmessungen erfolgten in einem Beckman M25 Spektralphotometer.

Bei den mit Testkits bestimmten Enzymen konnten die Enzymaktivitäten in Units pro Liter den Tabellen des Herstellers entnommen werden, 1 Unit katalysiert hier die Umsetzung von 1  $\mu$ Mol Substrat pro Minute bei 25 °C. Auch die Konzentrationen an Phospholipiden und Gesamtcholesterin wurden in mg/dl den Herstellertabellen entnommen. Die Glutamat-Dehydrogenase wurde nach zwei verschiedenen Methoden bestimmt: Zum einen mit einem Test-Kit (im Ergebnis- und Diskussions- teil als GLDH bezeichnet) und zum anderen nach Williamson et al. (1967, als GDH bezeichnet). Die Enzymaktivität der Laktat-Dehydrogenase wurde durch die Abnahme der Absorption von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  bei 365 nm bestimmt, der Molare Extinktionskoeffizient von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  war  $3,3 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$  bei 25 °C (Netheler 1970), die Schichtdicke der Küvette betrug 1 cm. Die Enzymaktivitäten von N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase und Arylsulfatase A,B wurden durch Endprodukt-eichkurven ermittelt, im Fall von N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase mit 4-Nitrophenol und für Arylsulfatase A,B mit Nitrocatechol. Da beide Enzyme bei 37 °C inkubiert wurden, katalysiert hier 1 Unit die Umsetzung von 1  $\mu$ Mol Substrat pro Minute bei 37 °C.

## 2.5. Lichtmikroskopie

Die pathohistologische Begutachtung von formolfixierten Lebern wurde durch Herrn Prof. Dr. W. Gusek (Pathologisches Institut des Städtischen Klinikums Karlsruhe) sowie Herrn Dr. E. Schäfer (Institut für Biologie, Abteilung für Pathologie, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München) vorgenommen. Die routinemäßige Anfärbung von Rinder- und Rattenalveolarmakrophagen erfolgte mit der Hemacolor-Schnellfärbung für Blutaussstriche (Merck), diese Färbung wurde auch für die Latex-inkubierten Kupfferzellen und Rinderalveolarmakrophagen nach deren Xylol-Behandlung gewählt.

Der histochemische Nachweis für das Vorhandensein von unspezifischer Esteraseaktivität in den Rinderalveolarmakrophagen in Kultur wurde mit der "Lymphocyte Enzymes  $\alpha$ -Naphthyl Esterase"-Testpackung (Sigma Diagnostics) durchgeführt.

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurde ein Leitz Diaplan Mikroskop mit einem Wild MPS51 Kamerakörper und MPS45 Photoautomaten benutzt, als Film wurde der Professional Film Kodak Ektachrome 50, Kunstlicht, EPY 135-36 gewählt.

## 2.6. Transmissionselektronenmikroskopie

Für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden Leberstückchen von Rattenweibchen und -männchen ohne und mit 1,3 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  oder 2 mg/kg  $\text{GaCl}_3$  mit 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,4, fixiert.

Rinderalveolarmakrophagen wurden 14 Std. in HEPES-Medium (mit 10% fötalem Kälberserum) ohne und mit  $\text{CeCl}_3$  (1000  $\mu\text{M}$  oder 1  $\mu\text{M}$ ) inkubiert, dann erfolgte eine 1std. Inkubation im jeweiligen Inkubationsmedium mit Latex (Durchmesser 0,8  $\mu\text{m}$ ). Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen dreimal mit 0,9% NaCl abgespült. Die Alveolarmakrophagen wurden in Kochsalzlösung auf Eis abgeschabt, bei 300 g abzentrifugiert, nochmals in NaCl gewaschen und anschließend wie oben fixiert.

Zur weiteren Präparation wurden sowohl die Leberproben als auch die Rinderalveolarmakrophagen dreimal mit 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen und 2 Std. im Eisbad mit Osmiumsäure nach Palade nachfixiert. Nach Entwässerung in der Alkoholischen Reihe verblieben die Proben zweimal 1 Std. in Propylenoxid bei 20 °C, um anschließend in Epon-Araldit eingebettet zu werden. Nachdem die Proben 3 Tage bei 60 °C getrocknet waren, wurden an einem Sorvall MT2-B Ultramikrotom Ultradünnschnitte hergestellt und mit Uranylacetat (1 Min.) und Bleicitrat (5 Min.) doppelkontrastiert. Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen stammten von einem Elmiskop IA der Fa. Siemens.\*

### 2.7. Rasterelektronenmikroskopie

Um einen Eindruck von der Formveränderung kultivierter Rattenhepatocyten zu gewinnen, wurden zum einen die Zellen direkt nach 1 1/2 Std. Absitzen und zum anderen am 2. Kulturtag auf der Petrischale mit 2,5% Glutaraldehyd fixiert (Kultur in supplementem Waymouth Medium).

Für den Versuch mit Rinderalveolarmakrophagen wurden Zellen in RPMI-Medium (ohne fötales Kälberserum) ohne und mit  $\text{CeCl}_3$  14 Std. inkubiert und nach dem Waschen der Zellen mit Kochsalzlösung direkt auf der Platte wie für Transmissionselektronenmikroskopie fixiert. Die Zellen auf den Petrischalen wurden nach der Fixierung in der alkoholischen Reihe entwässert und anschließend mit Gold bedampft. Alle rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten an einem Phillips SEM 515.

### 2.8. Auswertungsverfahren und Präsentation der Daten

Zur Bestimmung der  $^{141}\text{Ce}$ -Radioaktivität in den Organen der Ratte wurde die verabreichte Dosis mit 100% angenommen. Für die Ermitt-

---

\* Herrn Prof. Dr. G. Hotz und Frau R. Mauser, Institut für Genetik und Toxikologie von Spaltstoffen, Kernforschungszentrum Karlsruhe, danke ich für die Hilfe bei der Herstellung der transmissionselektronenmikroskopischen Präparate.

lung des Radionuklidanteils in den nach differentieller Zentrifugation erhaltenen Fraktionen wurde entweder die  $^{141}\text{Ce}$ -Radioaktivität des Gesamtleberhomogenates (N+E) oder der zellkernfreie Überstand (E) als 100%-Wert gesetzt. Für die Verteilung von Enzymen in den Fraktionen der differentiellen Zentrifugation wurde die Extinktion von E mit 100% angenommen und unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung der prozentuale Anteil des Enzyms in der Fraktion ermittelt.

Bei den Versuchen zur Trägerfreien Elektrophorese zeigte sich, daß nach Fraktion 49 keine Enzym- bzw. Radioaktivität mehr nachweisbar war, daher wurden zur Auswertung nur die ersten 49 Fraktionen benutzt. Die Summe über die Radioaktivitäten bzw. Enzymaktivitäten (als Extinktionswerte) in diesen 49 Fraktionen wurde als 100%-Wert angenommen und die Aktivität in den einzelnen Fraktionen wurde als Prozentsatz hiervon ausgedrückt.

Die Auftragung der Verteilungsprofile für die Saccharose-Dichtegradienten erfolgte nach Beaufay et al. (1976).

Für die Zellkulturversuche wurde als Maß für die Zelladhärenz der Proteingehalt (in mg) pro Petrischale bestimmt; es handelt sich hierbei um die auf der Platte noch festsitzenden Zellen nach Beendigung der Inkubationszeit. Dieser Proteingehalt diente auch als Bezugssystem für die Enzymaktivitäten in den Zellen, es wurde die Enzymaktivität (in Milliunits) pro mg Zellprotein berechnet. Obwohl es bei wiederholten Zellkulturversuchen mit Rattenleberzellen zum Teil zu Abweichungen in Protein- oder Enzymeinzelwerten zwischen den Versuchen kam, wurde je ein Versuch als repräsentativ ausgewählt, da die Gesamtaussage des Versuchs davon nicht betroffen war.

Um zu überprüfen, ob 0,1 mM  $\text{CeCl}_3$  in RPMI-Medium (ohne fötales Kälberserum) bei Rinderalveolarmakrophagen eine Hemmung der unspezifischen Phagozytose von 2,02  $\mu\text{m}$ - Latexpartikeln hervorruft, wurden sowohl bei Kontrollen als auch bei den Cer-Kulturen auf je 3 Deckgläsern je zweimal 100 Zellen an verschiedenen Stellen ausgezählt. Die Anzahl der Zellen, die die entsprechende Anzahl von Latexpartikeln beinhaltet (in %, Ordinate) wurde gegen die Zahl der Latexpartikel pro Zelle (Abszisse) aufgetragen.

In den in vitro-Lysosomeninkubationsversuchen wurde die Enzymaktivität im ML-Sediment zum Zeitpunkt 0 als maximal in den Überstand freisetzbare Enzymaktivität angenommen und als 100% gesetzt. Die Enzymaktivität im Überstand zum Zeitpunkt 0 war der Nulleffekt und wurde folglich von der Enzymaktivität im Überstand zu den verschiedenen Inkubationszeitpunkten subtrahiert.

Zur Beantwortung der Frage, ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen zwei Mittelwerten besteht, wurde der t-Test nach Student herangezogen. Die Signifikanzschranke wurde auf  $2p=0,05$  festgesetzt: wenn der 2p-Wert kleiner als 0,05 war lag ein statistisch signifikanter Unterschied vor.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Verhalten und Wirkung von Cer in der Rattenleber in vivo

##### 3.1.1. Einfluß von 2 mg/kg CeCl<sub>3</sub> auf die Verteilung und Retention von <sup>141</sup>Ce in den Organen

In Tab. 2 ist das Retentionsverhalten von trägerfreiem <sup>141</sup>Ce bzw. von <sup>141</sup>Ce mit 2 mg/kg CeCl<sub>3</sub> als Trägermaterial dargestellt. Bei den Weibchen kommt es nach Injektion der Gewichts-dosis zu einer drastischen Verzögerung der Ausscheidung des <sup>141</sup>Ce aus der Leber, ebenso ist eine ausgeprägte Erhöhung des Milzgehalts durch das Trägermaterial sichtbar. Im Femur der Weibchen findet eine Anreicherung des <sup>141</sup>Ce mit der Zeit statt, statistisch signifikante Unterschiede zwischen trägerfreiem <sup>141</sup>Ce und <sup>141</sup>Ce mit 2 mg/kg CeCl<sub>3</sub> bestehen nur am 2. und 9. Tag nach der Injektion. Bei Rattenmännchen führt die Injektion von <sup>141</sup>Ce mit 2 mg/kg CeCl<sub>3</sub> zu einem Anstieg des <sup>141</sup>Ce-Gehalts der Leber gegenüber dem trägerfreien <sup>141</sup>Ce, die Erhöhung ist jedoch nur am 2. Tag statistisch abgesichert. Wie bei den Weibchen ist auch bei den Männchen der Trägereffekt in der Milz deutlich zu erkennen. Im Femur der Männchen ist sowohl am 2. als auch am 9. Tag nach Injektion bei <sup>141</sup>Ce mit 2 mg/kg CeCl<sub>3</sub> signifikant weniger <sup>141</sup>Ce eingelagert als bei trägerfreiem <sup>141</sup>Ce.

Außer dem durch die injizierte Cer-Dosis bedingten Unterschied in der Organverteilung besteht z.T. auch ein geschlechtsbedingter Unterschied im Organgehalt, der besonders auffallend am 2. Tag nach Injektion von trägerfreiem <sup>141</sup>Ce ist.

Die Rattenweibchen hatten am 2. Tag nach der Injektion von 2 mg/kg CeCl<sub>3</sub> als Trägermaterial ein räudiges Aussehen und zeigten bei der Sektion eine sehr helle, offensichtlich schlecht durchblutete Leber (siehe auch 3.1.8.). Dieser Effekt tritt nur bei Rattenweibchen und nur am 2. Tag nach der Injektion auf, er ist reversibel und bereits am 9. Tag nach Injektion nicht mehr zu beobachten.

### 3.1.2. Gehalt an $^{141}\text{Ce}$ in den Fraktionen nach differentieller Zentrifugation

Die subzelluläre Verteilung von  $^{141}\text{Ce}$  in der Leber in Abhängigkeit von Trägerdosis und Geschlecht ist in Tab. 3 und 4 dargestellt. Unabhängig vom Geschlecht bewirkt der Trägerzusatz eine Erhöhung des  $^{141}\text{Ce}$ -Gehaltes in N und eine entsprechende Erniedrigung in E am 2. Tag, bei Männchen auch am 9. Tag nach der Injektion (Tab.3). An dem für die geschlechtsabhängigen toxischen Wirkungen wichtigen 2. Tag ist nach Injektion von Trägerdosen der relative Gehalt an  $^{141}\text{Ce}$  in N und E bei Weibchen und Männchen mit jeweils ca. 50% praktisch identisch.

Der Bezug der Daten von ML, P und S auf den  $^{141}\text{Ce}$ -Gehalt in E (als 100%, Tab. 4) ist vorzuziehen, da hier eventuelle Ungleichmäßigkeiten der Homogenisation nicht ins Gewicht fallen. Bei beiden Geschlechtern führt der Trägerzusatz am 2. Tag zu einer Zunahme des  $^{141}\text{Ce}$ -Gehalts im ungewaschenen ML und einer Abnahme in P und S. Der Verlust an  $^{141}\text{Ce}$ -Radioaktivität aus dem ML-Sediment durch das Waschen unterliegt weder bei Weibchen noch bei Männchen einer systematischen Ordnung und beträgt durchschnittlich 16%.

### 3.1.3. Verteilungsprofile von $^{141}\text{Ce}$ und Enzymen aus der ML-Fraktion der Leber nach Trägerfreier Elektrophorese

Das  $^{141}\text{Ce}$ -Verteilungsprofil ist sowohl bei Rattenweibchen (Abb.5) als auch bei Rattenmännchen (Abb.6) am 2. und 9. Tag nach der Injektion von trägerfreiem  $^{141}\text{Ce}$  eingipflig. Auch die Profile der lysosomalen Enzyme SP, N-A-G und AS bei den Weibchen sowie - als repräsentatives lysosomales Enzym - die N-A-G der Männchen sind eingipflig, die Maxima der lysosomalen Enzyme sind nie mehr als zwei Fraktionen vom  $^{141}\text{Ce}$ -Maximum getrennt. Bei beiden Geschlechtern decken sich die Verteilungsprofile von  $^{141}\text{Ce}$  und lysosomalen Enzymen zu über 90%. Die AP wurde nur bei den Weibchen gemessen, sie ist um 3 Fraktionen vom Radioaktivitätsmaximum getrennt. Das Maximum der eingipfligen GDH ist sowohl bei Weibchen als auch bei Männchen um 6 Fraktionen deutlich von  $^{141}\text{Ce}$ -Maximum getrennt.

Bei Injektion von  $^{141}\text{Ce}$  mit 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  sind die  $^{141}\text{Ce}$ -Profile am 2. und 9. Tag nach der Injektion sowohl bei den Weib-

chen (Abb. 7) als auch bei den Männchen (Abb. 8) zweigipflig, die Maxima sind um 11 bzw. 12 Fraktionen voneinander getrennt. Eine Korrelation besteht nur zwischen den Profilen der lysosomalen Enzyme und dem rasch wandernden  $^{141}\text{Ce}$ -Maximum.

#### 3.1.4. Verteilungsprofile von $^{141}\text{Ce}$ und Enzymen im linearen Saccharosegradienten

Nach Injektion von trägerfreiem  $^{141}\text{Ce}$  sind die Verteilungsprofile aus der ML-Fraktion von Lebern von Rattenweibchen und -männchen am 2. und 9. Tag nach der Injektion alle eingipflig (Abb. 9 und 10). Sowohl das  $^{141}\text{Ce}$ -Profil als auch die lysosomalen Enzyme SP, N-A-G und AS erreichen ihren Maximalwert bei einer Dichte von etwa  $1,2 \text{ g/cm}^3$ . Ähnlich verhält sich die GDH, das AP-Maximum liegt dagegen bei  $1,15 \text{ g/cm}^3$ .

Die Injektion von  $^{141}\text{Ce}$  mit  $2 \text{ mg/kg CeCl}_3$  als isotopischem Träger führt am 2. und 9. Tag nach der Injektion weder bei Weibchen (Abb. 11) noch bei Männchen (Abb. 12) zu einer Veränderung der Verteilungsprofile gegenüber denen des trägerfreien  $^{141}\text{Ce}$ .

Es ist deutlich, daß die Verteilungsmuster von  $^{141}\text{Ce}$  und Enzymen im Saccharosegradienten unabhängig vom Geschlecht und von der Verabreichung von  $2 \text{ mg/kg CeCl}_3$  als Trägermaterial sind: Weder bei den Radionuklid- noch bei den Enzymprofilen kann eine Dichteverschiebung festgestellt werden, was insbesondere im Zusammenhang mit der früher vermuteten Lipideinlagerung wichtig ist (siehe Diskussion).

#### 3.1.5. Verhalten von Enzymen, Gesamtcholesterin und Phospholipiden im Serum

In Tab. 5-7 sind die Ergebnisse mehrerer Versuchsreihen zusammengefaßt, nämlich Kurzzeitversuche (bis 48 Std.) mit einer Dosis von  $2 \text{ mg/kg CeCl}_3$  (Tab. 5) sowie Langzeitversuche mit  $1,3 \text{ mg/kg CeCl}_3$  und  $2 \text{ mg/kg GaCl}_3$  (Tab. 6 und 7). Die Werte für die Kontrolltiere sind für beide Versuchsserien vereinigt worden. Aus den drei Tabellen kann ersehen werden, daß die Wirkung des Cers abhängig von Geschlecht, Zeit und injizierter Dosis ist.

Tab. 5 zeigt, daß es bei den Rattenweibchen 24-48 Std. nach Injektion von 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  zu einer Erhöhung von GOT, GPT, LAP und GLDH im Serum kommt; die lysosomalen Enzyme N-A-G und AS sind nur unwesentlich erhöht, das Gesamtcholesterin und die Phospholipide sind gegenüber der Kontrolle deutlich erniedrigt. Bei Rattenmännchen kommt es nach Verabreichung von 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  zu einer Erhöhung von GOT und GLDH sowie von AS nach 24-48 Std.

Ausgehend davon, daß Männchen am 2. Tag nach Injektion etwa 4% weniger Cer in der Leber zurückbehalten als die Weibchen (Tab. 2), wurde Männchen 2,101 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  verabreicht; bei dieser Dosis haben dann die Männchen die gleiche Cerkonzentration in der Leber wie die Weibchen mit 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$ . Doch auch hier ergibt sich keine große Veränderung gegenüber den injizierten 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  (Tab. 5, unterste Zahlenreihe); GOT, GLDH und AS sind jedoch etwas stärker erhöht als mit 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$ . Nach Injektion von 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  kommt es also während der ersten 48 Std. bei Rattenweibchen zu Veränderungen von Enzymen, Phospholipiden und Gesamtcholesterin im Serum, die völlig verschieden sind von den Änderungen bei den Männchen nach Injektion von 2 oder 2,101 mg/kg  $\text{CeCl}_3$ . Für die Langzeitversuche mit 1,3 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  bzw. 2 mg/kg  $\text{GaCl}_3$  (Tab. 6 und 7) wurden mit GOT, GPT, GLDH und  $\gamma$ -GT vier typische Enzyme der Leberdiagnostik gemessen. Bereits 1,3 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  verursachen bei Rattenweibchen (Tab. 6) am 2. Tag nach der Injektion eine Erhöhung von GOT, GPT und GLDH gegenüber der Kontrolle, die Erhöhungen sind jedoch geringer als nach Verabreichung von 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  zum gleichen Zeitpunkt. Die Erhöhung der Enzyme im Serum ist reversibel und bereits am 9. Tag nach der Injektion nicht mehr nachweisbar.

Um das Verhalten der Enzyme im Serum auf ein anderes bekanntes lysosomotropes Element zu testen, wurde den Ratten 2 mg/kg  $\text{GaCl}_3$  injiziert. Bei den Weibchen (Tab. 6) kommt es zu keinem Zeitpunkt nach Injektion von  $\text{GaCl}_3$  zu einer drastischen Änderung der Serumenzyme. Im Gegensatz zur 2 mg Dosis (vgl. Tab. 5) haben 1,3 mg/kg Ce bei Männchen offenbar

bereits keinerlei Kurzzeiteffekt mehr (Tab. 7), auch Gallium zeigt keine unmittelbare Wirkung auf die Serumenzyme. Auffallend sind aber die aus Tab. 7 zu erkennenden Enzymerhöhungen am 70. Tag.

Die  $\gamma$ -GT muß in Tab. 6 und 7 als weitgehend unverändert angesehen werden, da sich dieses Enzym im Rattenserum an der Nachweisgrenze bewegt und die Veränderungen wohl methodische Schwankungen sind.

### 3.1.6. Gehalt an Enzymen in den Fraktionen nach differentieller Zentrifugation

In Tab. 8 ist die Verteilung von Enzymen zwischen den einzelnen subzellulären Fraktionen aus Rattenleber als % von E am 2. Tag nach Injektion von 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  bei Rattenweibchen dargestellt. Sowohl bei den Kontroll- als auch bei den mit Cer behandelten Tieren enthält die ML-Fraktion eine hohe Anreicherung an lysosomalen Leitenzymen und an GDH. Von den lysosomalen Enzymen hat die SP mit 12 bzw. 15% den höchsten nicht sedimentierbaren Anteil. Die CCR-Enzymaktivität läßt sich etwa zur Hälfte in ML sedimentieren. Die geringe Anreicherung des GOT in ML erklärt sich aus der Tatsache, daß die GOT sowohl in Mitochondrien als auch im Cytoplasma vorkommt. Vergleicht man die relative Verteilung der Enzyme von Kontrollen und von Cer behandelten Tieren, so findet man lediglich bei der GOT in ML, der N-A-G in S und der SP in P einen statistisch signifikanten Einfluß von  $\text{CeCl}_3$ .

### 3.1.7. Freisetzung von Enzymen aus der ML-Fraktion von Lebern von Rattenweibchen in den Überstand

Aus Tab. 9 kann man entnehmen, daß bei Inkubation des ML-Sedimentes die drei gemessenen Enzyme (GOT, GLDH und N-A-G) sowohl bei den Kontrollen als auch bei den mit  $\text{CeCl}_3$  behandelten Tieren mit zunehmender Inkubationszeit in Kammerpuffer im Überstand ansteigen. Bei keinem der Enzyme kann ein deutlicher Unterschied zwischen dem Kontroll-ML und dem ML der mit Cer

behandelten Tiere festgestellt werden, es kann in diesem Inkubationstest keine erhöhte Fragilität der Mitochondrien und Lysosomen manifestiert werden.

Tab. 10 zeigt die Freisetzung von GOT und N-A-G aus den ML-Fractionen von Kontrolltieren, die entweder mit dem Cytosol anderer Kontrolltiere oder aber dem Cytosol von Tieren, die 16 Std. vor der Sektion 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  erhielten, inkubiert wurden. Mit zunehmender Inkubationszeit findet auch hier ein Anstieg der Enzymaktivität im Überstand statt. Ein Unterschied zwischen ML mit Kontrolltiercytosol und ML mit Certiercytosol kann weder bei GOT noch bei N-A-G zu irgendeinem Zeitpunkt gefunden werden, nach 240 Minuten sind die in den Überstand freigesetzten Enzymaktivitäten jedoch deutlich höher als bei der Inkubation im Kammerpuffer.

#### 3.1.8. Lichtmikroskopische Morphologie der Rattenleber

Aus Tab. 11 ist ersichtlich, daß die Verabreichung von 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  bei Weibchen eine Reduktion im Leberfrischgewicht und im Trockengewicht pro Gramm Leberfrischgewicht gegenüber der Kontrolle bewirkt, statistisch zur sichern war jedoch nur der Trockengewichtsverlust. Der Proteingehalt pro Gramm Leberfrischgewicht bleibt praktisch unbeeinflusst. Sowohl die frischen als auch die getrockneten Lebern haben bei den mit Cer behandelten Tieren eine deutlich hellere Farbe als die Kontrollen.

Die pathohistologische Begutachtung der Lebern erbrachte folgenden Befund: Sowohl die weiblichen als auch die männlichen Kontrolltiere weisen ein normal strukturiertes Lebergewebe auf mit einem mäßiggradigen Glykoproteidgehalt der Hepatocyten. Das Sternzellensystem scheint geringgradig aktiviert zu sein.

Die Versuchstiere zeigten insgesamt eine deutlichere "Sternzellschwellung", eine Faserveränderung gegenüber der Kontrolle oder eine signifikante Änderung an den Kernen war nicht festzustellen. Es läßt sich eine geringe Glykoproteidverarmung gegenüber den Kontrollen beobachten. Bei den Rattenweibchen, die 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  erhalten hatten, ist eine fein- bis mittelvakuoläre Cytoplasmaumgestaltung als deutlichster Befund erkennbar.

Die Vakuolen sind ohne Fettinhalt, so daß offenbar eine hydro-  
pische Vakuolisierung des Cytoplasmas vorliegt, ohne daß die  
Zellen jedoch angeschwollen wären. Es finden sich unter den  
Weibchen auch Versuchstiere mit scholligen oder globoiden Gly-  
koproteidablagerungen in einigen Hepatocyten oder extrazellu-  
lär. Alle weiblichen Versuchstiere haben gering bis mittelgra-  
dig Fett in den Zellen abgelagert.

Die Männchen zeigen am 2. Tag nach Injektion von 2 mg/kg  
CeCl<sub>3</sub> den gleichen Befund wie die Kontrolltiere. Auch die Er-  
höhung der Dosis auf 2,101 mg/kg CeCl<sub>3</sub> bringt keine wesentli-  
chen Änderungen gegenüber der Kontrolle. Lediglich ein Männ-  
chen zeigt eine Vakuolisierung des Cytoplasmas, Glykoproteid-  
ablagerungen und einen vermehrten Fettgehalt. Bei Rattenweib-  
chen, die nur 1,3 mg/kg CeCl<sub>3</sub> bzw. 2 mg/kg GaCl<sub>3</sub> erhielten,  
kann am 2. Tag nach der Injektion kein größerer pathologischer  
Befund entdeckt werden.

### 3.1.9. Transmissionselektronenmikroskopische Morphologie der Rattenleber

In Abb. 13 a und b sind Hepatocyten von Kontrollweibchen zu  
sehen. Die zahlreichen Mitochondrien sind hinsichtlich Größe  
und Innenstruktur uniform, sie haben intakte Membranen und  
sind fast durchweg vom Cristae-Typ. Im Cytoplasma sind nur  
wenige Lipidablagerungen zu sehen, die Zellkerne zeigen kaum  
Invaginationen, die Kernmembran ist intakt und einige wenige  
Nukleoli sind sichtbar.

Am 2. Tag nach 1,3 mg/kg CeCl<sub>3</sub> ist bei den Weibchen ultra-  
strukturell eine deutliche Umgestaltung der Hepatocyten er-  
kennbar (Abb. 14). Die Zellkerne zeigen z.T. Einstülpungen  
der Kernhülle, die Nukleolen erscheinen vergrößert (Abb. 14 a).  
Sowohl in Abb. 14a als auch in 14b ist eine Polymorphie der Mi-  
tochondrien erkennbar: neben normalen Mitochondrien erschei-  
nen einige aufgetrieben und z.T. sogar geplatzt. Die geschwol-  
lenen Mitochondrien sind gekennzeichnet durch eine Verdünnung  
der Matrix sowie durch Desorientierung und Reduktion der  
Cristae. Auffällig ist auch die Vakuolisierung des Cytoplas-  
mas sowie die Anhäufung verschieden großer Lipidablagerungen.  
Die Veränderungen der Hepatocyten der Rattenmännchen am 2. Tag

nach 1,3 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  (Abb. 15) sind wesentlich geringer als bei den Weibchen. Einige Mitochondrien erscheinen zwar aufgetrieben, die Mehrzahl ist jedoch intakt mit normaler Innenstruktur. Die Lipidablagerungen sind im Vergleich zu den Kontrollen etwas vermehrt, jedoch deutlich geringer als bei den mit Cer behandelten Weibchen.

Nach Injektion von 2 mg/kg  $\text{GaCl}_3$  ist am 2. Tag weder bei den Rattenweibchen (Abb. 16) noch bei den Männchen (Abb. 17) eine wesentliche Veränderung gegenüber der Kontrolle sichtbar (bei dieser detaillierten morphologischen Auswertung war Herr Prof. Gusek, Pathologisches Institut des Städt. Klinikums Karlsruhe, maßgeblich beteiligt).

### 3.2. Verhalten und Wirkung von Cer in Zellkulturen

#### 3.2.1. Aufnahmeversuche mit Hepatocyten im Monolayer und in Sphäroiden

In Tab. 12 sind die Ergebnisse der  $^{141}\text{Ce}$ -Aufnahmeversuche an Hepatocyten in Monolayer- und Sphäroidkultur zu sehen. Das Maß für die tatsächlich aufgenommene Radioaktivität ist hierbei die Differenz zwischen dem wiedergefundenen  $^{141}\text{Ce}$  bei 37 °C und 0 - 2 °C, da man bei 0-2 °C lediglich die membrangebundene, nicht internalisierte  $^{141}\text{Ce}$ -Aktivität wiederfindet.

Betrachtet man die relativ pro Milligramm Protein wiedergefundene  $^{141}\text{Ce}$ -Radioaktivität, so findet bei mit trägerfreiem  $^{141}\text{Ce}$  inkubierten Monolayern und Sphäroiden, unabhängig von der Wahl des Mediums, keine erkennbare Aufnahme statt; bei Inkubation mit  $^{141}\text{Ce}$  mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$  liegt die Differenz bei maximal 0,22 % (Waymouth-Medium).

Einen genauen Wert für die prozentual wiedergefundene Radioaktivität ergibt sich aus dem Absolutwert des wiedergefundenen  $^{141}\text{Ce}$ , weil hier das Angebot an  $^{141}\text{Ce}$  pro Milligramm Protein naturgemäß kleiner ist als das insgesamt angebotene  $^{141}\text{Ce}$ , daher kann auch eine geringe Aufnahme erfaßt werden. Auch hier läßt sich jedoch erkennen, daß unabhängig vom Medium und vom Vorhandensein des Trägers sehr wenig  $^{141}\text{Ce}$  in die Zellen aufgenommen wird, ein Differenzwert von 1,3 % wird nicht überschritten.

### 3.2.2. Wirkung von Cer auf Rattenleberzellen

Die Tab. 13-19 zeigen die Ergebnisse der Inkubationsversuche von Rattenhepatocyten in Monolayerkultur in Abhängigkeit von Cerdozis, Inkubationszeit, Geschlecht, Insulinzusatz, Medium und Hitzeinaktivierung des Serums. Die Daten wurden auf ihre Signifikanz überprüft, bei der Fülle der Daten kann aber nicht auf jeden einzelnen signifikanten Unterschied eingegangen werden. Man findet in Einzelfällen Erhöhungen und Erniedrigungen gegenüber der Kontrolle, diese sind jedoch unsystematisch, so daß man insgesamt keine Veränderungen in den Hepatocytenkulturen in Abhängigkeit von den oben angeführten Parametern erkennen kann.

#### 3.2.2.1. Hepatocyten in Waymouth-Medium

Tab. 13 zeigt den Effekt verschiedener  $CeCl_3$ -Konzentrationen in supplementiertem Waymouth-Medium (10% fötales Kälberserum) auf die Hepatocyten von Rattenweibchen. Lediglich im LDH-Gehalt der Zellen kann nach 4 und 21 Std. eine z.T. signifikante Erhöhung der Werte durch Cerzusatz festgestellt werden (die großen Unterschiede des absoluten Enzymgehalts ist in diesem speziellen Fall methodisch bedingt). Der Gehalt an Zellprotein auf den Petrischalen nimmt mit der Zeit ab, was offenbar auf ein natürliches Ablösen der Zellen aus dem Monolayer zurückzuführen ist und keinen Cer-induzierten Effekt darstellt.

Die korrespondierenden Überstände zu den Hepatocyten von Tab. 13 sind in Tab. 14 dargestellt. Es zeigt sich, daß die Enzymfreisetzung in den Überstand bei allen gemessenen Enzymen mit der Zeit ansteigt, jedoch ist kein Einfluß des Cers zu erkennen, der beispielsweise systematisch dosis- oder zeitabhängig wäre.

Auch in den in supplementiertem Waymouth-Medium (10% fötales Kälberserum) inkubierten Hepatocyten der Rattenmännchen (Tab. 15) kam - wie schon bei den Weibchen - keine wesentliche Änderung im Enzymgehalt der Zellen nach 20 Std. festgestellt werden, das Zellprotein auf den Petrischalen ist mit Cer eher höher als bei der Kontrolle. In den Überständen läßt sich als einzige deutliche Änderung eine Erniedrigung des GLDH-Gehalts bei 1 und 0,1  $\mu M$

CeCl<sub>3</sub> erkennen. Tab. 16 und 17 zeigen Ergebnisse von analogen Versuchen wie die soeben für Weibchen und Männchen beschrieben, jedoch wurde hier dem Medium 10<sup>-6</sup> bis 10<sup>-8</sup> M Insulin zugesetzt. Wiederum ergeben sich keine deutlichen Anhaltspunkte für eine durch Cer bedingte Zellschädigung nach 24 Stunden Inkubation. Enzymfreisetzungen bzw. -erniedrigungen in den Zellen sind zwar vorhanden, jedoch nicht gleichsinnig und auch nicht sehr ausgeprägt. Ein sehr ähnliches Ergebnis wurde auch nach 4 Stunden Inkubationsdauer erhalten (die Daten sind der besseren Übersicht halber nicht aufgeführt).

#### 3.2.2.2. Hepatocyten in RPMI-Medium

Tab. 18 zeigt die Ergebnisse der Inkubation von Hepatocyten von Rattenweibchen in supplementiertem RPMI-Medium (10% fötales Kälberserum). RPMI-Medium wird ebenfalls von vielen Autoren zur Hepatocytenkultur benutzt, hier wurde es aber verwendet, um einen direkten Vergleich zu den Alveolarmakrophagen zu haben, die z.T. in RPMI-Medium inkubiert wurden. Auch aus Tab. 18 läßt sich weder nach 4 noch nach 24 Std. ein Effekt von 10 µM CeCl<sub>3</sub> auf Zellen oder Überstände erkennen. Der starke GLDH-Abfall der Zellen mit Cer nach 24 Std. konnte im Wiederholungsversuch nicht bestätigt werden.

Ausgehend von der Überlegung, daß Cer unter in vivo -Bedingungen im Serum an ein Protein binden könnte, wurden Hepatocyten von Rattenweibchen in supplementiertem RPMI-Medium mit 10% nicht hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum inkubiert (Tab. 19), da durch die Hitzeinaktivierung etwaige Bindungs-Proteine inaktiviert werden könnten. Nach 22 Std. Inkubation läßt sich jedoch mit 10 µM CeCl<sub>3</sub> keine signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle bei den Zellen sichern. In den Überständen ist lediglich die GOT leicht, aber signifikant, erniedrigt.

Um einen Vergleich zu den z.T. ohne Serum inkubierten Alveolarmakrophagen zu haben, wurden Hepatocyten von Rattenweibchen bis zu 9 Std. in RPMI-Medium ohne fötales Kälberserum und Supplemente inkubiert (Tab. 20 und 21). Wie man aus Tab. 20 ersehen kann, ist der LDH-Gehalt der Zellen mit 100 µM CeCl<sub>3</sub>

nach 2, 4 und 9 Stunden erniedrigt, auch mit  $1 \mu\text{M CeCl}_3$  scheint die LDH der Zellen zumindest nach 9 Std. abgesunken.  $\text{CeCl}_3$  hat sicherlich zu keinem Zeitpunkt einen Einfluß auf den N-A-G-Gehalt der Zellen, dagegen ist der Proteingehalt auf den Petrischalen mit  $100 \mu\text{M CeCl}_3$  zu allen Zeitpunkten etwas niedriger als die Kontrolle, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht zu sichern. In Tab. 21 findet man den Enzymgehalt der Überstände zu den Zellen von Tab. 20. Es ist deutlich zu beobachten, daß die LDH im Überstand mit  $100 \mu\text{M CeCl}_3$  nach 2, 4 und 9 Std. erhöht ist, auch mit  $1 \mu\text{M CeCl}_3$  findet man zu allen Zeitpunkten höhere LDH-Werte als bei der Kontrolle. Der N-A-G-Gehalt der Überstände ist so niedrig, daß den signifikanten Erhöhungen keine Bedeutung beigemessen werden kann.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es bei Inkubation in Waymouth- oder RPMI-Medium mit fötalem Kälberserum, unabhängig von den gewählten Parametern, zu keiner ausgeprägten oder systematischen Änderung in Zellen oder Überständen kommt. Lediglich bei Inkubation in RPMI-Medium ohne Serum sieht man eine Reaktion: mit  $100 \mu\text{M CeCl}_3$  nimmt der LDH-Gehalt der Zellen ab und die LDH-Konzentration im Überstand zu.

### 3.2.2.3. Hepatocyten in Überständen von Kupfferzellkulturen

Da die Möglichkeit besteht, daß die Kupfferzellen nach in vivo- oder in vitro-Behandlung mit  $\text{CeCl}_3$  toxische Stoffe freisetzen, die dann eine schädigende Wirkung auf die Hepatocyten ausüben, wurden Hepatocyten von Rattenweibchen mit den Überständen von Kupfferzellen inkubiert. Wie man aus Tab. 22 ersehen kann, kommt es auch bei diesem Versuch mit  $10 \mu\text{M CeCl}_3$  zu keiner drastischen oder systematischen Änderung gegenüber der Kontrolle. Nur die GOT und GPT der mit Cer inkubierten Zellen sind erniedrigt, der Proteingehalt auf den Petrischalen bleibt dagegen unverändert. In den Überständen läßt sich keine Erhöhung oder Erniedrigung der Enzymkonzentration erkennen.

#### 3.2.2.4. Kupffer- und Endothelzellen

In Tab. 23 ist der Enzymgehalt von Ratten-Kupffer- und Endothelzellen nach 20 Std. Inkubation in supplementiertem Waymouth-Medium (30% fötales Kälberserum) ohne und mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$  dargestellt. Weder die Kupfferzellen der Männchen noch die der Weibchen zeigen mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$  eine statistisch signifikante Änderung im Enzymgehalt pro Milligramm Protein oder im Proteingehalt auf den Petrischalen gegenüber den Kontrollen. Auch bei den Endothelzellen der Weibchen ist keine Veränderung mit Cer feststellbar. Die teilweise sehr starke Streuung der Werte ist mit der kleinen Anzahl der Petrischalen und dem geringen Proteingehalt auf den Petrischalen zu erklären. Die zu den Kupffer- und Endothelzellen gehörigen Überstände sind in Tab. 24 zu sehen. Bei den Kupfferzellen der Männchen findet man keine signifikante Erhöhung der Enzyme im Überstand, bei den Weibchen erkennt man eine leichte Erhöhung von GOT und GLDH in den Kupfferzellüberständen. Bei den Endothelzellen der Weibchen tritt keine Änderung des Enzymgehalts mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$  auf.

Wie bei den Hepatocyten in Kultur läßt sich auch bei den kultivierten Kupffer- und Endothelzellen nach Inkubation mit  $\text{CeCl}_3$  kein Effekt feststellen, der die Änderung der Serumenzymwerte der Ratten am 2. Tag nach Injektion von 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  widerspiegelt.

#### 3.2.3. Wirkung von Cer auf Rattenalveolarmakrophagen (Lichtmikroskopie)

Die Einwirkung von  $\text{CeCl}_3$  auf Rattenalveolarmakrophagen wurde nur lichtmikroskopisch untersucht, die Befunde sind in Abb. 18 und Abb. 19 zu sehen. Für Abb. 18 a und b wurden Alveolarmakrophagen von Rattenweibchen 18 Std. in RPMI-Medium ohne (Abb. 18 a) und mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$  (Abb. 18 b) inkubiert. Die Kontrollzellen in Abb. 18 a sind zum Teil vakuolisiert; man erkennt, daß sich die großen Vakuolen vor allem im Randbereich der Zellen befinden. Die mit Cer inkubierten Makrophagen (Abb. 18 b) unterscheiden sich deutlich von der Kontrolle: ihr Zellvolumen hat stark

zugenommen, die diskrete Vakuolisierung des Cytoplasmas ist verschwunden, das Cytoplasma der Zellen ist durchsichtig und nicht mehr gut anfärbbar. Auch in den Alveolarmakrophagen der Rattenmännchen erkennt man in den Kontrollzellen (Abb. 19 a) eine Feinvakuolisierung des Cytoplasmas. Die mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$  inkubierten Zellen (Abb. 19 b) zeigen z.T. ebenfalls eine starke Zunahme des Zellvolumens und eine Abnahme der Anfärbbarkeit des Cytoplasmas. Das Material im Hintergrund stellt Überreste bereits zerstörter, wahrscheinlich geplatzter Zellen dar.

### 3.2.4. Wirkung von Cer auf Rinderalveolarmakrophagen

#### 3.2.4.1. Einfluß von $\text{CeCl}_3$ auf die Freisetzung von Enzymen

In Tab. 25 ist der Einfluß verschiedener  $\text{CeCl}_3$ -Konzentrationen auf kultivierte Rinderalveolarmakrophagen in verschiedenen Inkubationsmedien dargestellt. Ein deutlicher Effekt tritt vorwiegend in den Überständen der serumfreien Medien mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$  auf, hier findet man sowohl in RPMI- als auch in HEPES-Medium eine starke Erhöhung der LDH, ebenso ist in RPMI der N-A-G-Gehalt des Überstands drastisch angestiegen. Bei Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$  könnte es in RPMI- und HEPES-Medium ohne Serum zu einem Anstieg der Enzyme im Überstand kommen, dies ist jedoch durch die schmale Datenbasis nicht abzusichern. In den Medien mit 1  $\mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$  findet sich eine Erhöhung der N-A-G im Überstand in RPMI-Medium mit Serum. Bei den Zellen zeigt sich mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$  die einzige sichtbare Änderung in HEPES-Medium ohne Serum, hier kommt es zu einem Absinken des LDH-Gehalts pro Milligramm Protein gegenüber der Kontrolle. Eine Änderung des Proteingehalts pro Petrischale war nicht erkennbar (Daten nicht aufgeführt).

#### 3.2.4.2. Einfluß von $\text{CeCl}_3$ auf Phagozytose und Chemilumineszenz

Abb. 20 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Zahl aufgenommener Latexpartikel pro Zelle. Es läßt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontrollzellen und den mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$  inkubierten Rinderalveolarmakrophagen bezüglich der Phagozytoserate sichern. Etwa 50% der Zellen haben nach einer Stunde Inkubation mit Latex noch keinen Partikel aufgenommen, ungefähr 30% haben 1-3 Partikel phagozytiert und in den restlichen 20%

findet man 4-16 Latexpartikel.

In Abb. 21 ist die Chemilumineszenzmessung an Rinderalveolarmakrophagen bei Inkubation in RPMI-Medium ohne und mit  $\text{CeCl}_3$  dargestellt. Nach Zugabe von Zymosan allein zeigt sich das typische Bild der Luminol-abhängigen Chemilumineszenz (Abb. 21 a).  $\text{CeCl}_3$  allein führt nicht zur Auslösung von Chemilumineszenzreaktionen, weder sofort nach Cer-Zugabe (Abb. 21 b) noch nach Ablauf von 3-5 Std. (Abb. 21 c und d). Die Zymosan induzierte Chemilumineszenz ist auch in Anwesenheit von  $\text{CeCl}_3$  vorhanden, der Kurvenanstieg könnte jedoch nach 3 Std. Vorinkubation mit  $100 \mu\text{M CeCl}_3$  etwas verzögert und die Plateauphase leicht verlängert sein.

#### 3.2.4.3. Lichtmikroskopie von Rinderalveolarmakrophagen

Abb. 22 zeigt Rinderalveolarmakrophagen in Kultur nach 14 Std. Inkubation in RPMI-Medium ohne und mit  $100 \mu\text{M CeCl}_3$ . Gegenüber den Kontrollzellen (Abb. 22 a) haben die mit Cer inkubierten Zellen in Abb. 22 b ihr Volumen z.T. mehr als verdoppelt, das Cytoplasma dieser Zellen ist stark ausgebreitet und kaum noch anfärbbar. Die Kerne dieser Zellen sind an den äußersten Zellrand gepreßt, eine Cytoplasmaschicht zwischen Kern und Zellmembran ist nicht mehr erkennbar.

Die Zellen der Abb. 23 wurden zuerst 14 Std. in RPMI-Medium ohne und mit  $100 \mu\text{M CeCl}_3$  inkubiert und anschließend in ihrem jeweiligen Medium mit Zusatz von  $2,02 \mu\text{m}$  Latexpartikeln. Sowohl Kontrollalveolarmakrophagen (Abb. 23a) als auch die mit  $100 \mu\text{M CeCl}_3$  inkubierten Makrophagen (Abb. 23 b) haben Latexpartikel inkorporiert. Eine Verminderung der Phagozytose von Latexpartikel nach Inkubation mit  $\text{CeCl}_3$  ist nach 1 Std. nicht zu erkennen, selbst die deutlich angeschwollenen und vergrößerten Zellen sind noch zur unspezifischen Phagozytose von Latexpartikel fähig. Eine interessante Beobachtung kann man in Abb. 23 a machen: hier findet man eine Zelle, die sich gerade in der Mitose befindet und sogar einen Latexpartikel aufgenommen hat; sich teilende Zellen sind in den Rinderalveolarmakrophagenkulturen eine Seltenheit.

Abb. 24 zeigt, daß die Rinderalveolarmakrophagen auch nach 14 Std. in Kultur noch die für Makrophagen typische positive unspezifische Esterase-Reaktion zeigen. Man erkennt in Abb. 24 a die dunkle Färbung des Cytoplasmas, die lediglich die Kernregion ausspart (Pfeil: Kern). Auch die mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$  inkubierten Zellen (Abb. 24 b) weisen diese dunkle Esterase-Färbung auf, es läßt sich aber deutlich erkennen, daß das Cytoplasma der aufgeblähten Zellen nur sehr schwach angefärbt ist (Doppelpfeil). Die positive Reaktion erfaßt hier nicht das ganze Cytoplasma, sondern nur ein bestimmter, relativ scharf abgegrenzter Bereich ist dunkel angefärbt.

#### 3.2.4.4. Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie von Rinderalveolarmakrophagen

Die Abb. 25 a-d zeigen transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Schnitten durch Rinderalveolarmakrophagen, die Zellen wurden 14 Std. in HEPES-Medium (10% fötales Kälberserum) ohne und mit  $\text{CeCl}_3$  gehalten. In Abb. 25 a wurde ein Kontrollalveolarmakrophage aufgenommen. Die Zelle weist die für Makrophagen typische irreguläre Oberfläche mit pseudopodienartigen Ausläufern auf. Im Cytoplasma sind einige mittelgroße Vakuolen zu erkennen, ansonsten kann man Golgi-Membranen und Vesikel mit mehr oder weniger elektronendichten Einschlüssen finden. Die mit 1000  $\mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$  inkubierten Makrophagen sind in Abb. 25 b und c dargestellt, das auffälligste Unterscheidungsmerkmal gegenüber den Kontrollen ist das stark vakuolisierte Cytoplasma. Die Zelle von Abb. 25 d wurde mit 1  $\mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$  inkubiert, sie entspricht im wesentlichen der in Abb. 25 a gezeigten Kontrollzelle.

Die Abb. 26 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Rinderalveolarmakrophagen, die 14 Std. in RPMI-Medium ohne und mit  $\text{CeCl}_3$  inkubiert wurden und anschließend direkt auf der Platte fixiert wurden. Die in Kontrollmedium inkubierten Makrophagen (Abb. 26 a) sind rund bis halbkugelig und weisen zahlreiche Ausläufer auf, mit Hilfe derer sie auf der Plastikpetrischale veran-

kert sind; die Zelloberfläche ist deutlich strukturiert. Bereits auf dem Übersichtsbild der mit  $100 \mu\text{M CeCl}_3$  inkubierten Makrophagen (Abb. 26 b) kann man sehen, daß sich die Zellen eindeutig von den Kontrollen unterscheiden. Man erkennt Löcher (Pfeil) und große Einstülpungen (Doppelpfeil) in den Zellen, teilweise fehlt eine Strukturierung der verbleibenden Oberfläche. Die Einstülpungen und Löcher sind in Abb. 26 c noch besser zu sehen, hier kann auch beobachtet werden, daß innerhalb der Einstülpungen eine Strukturierung der Oberfläche vorliegt (Doppelpfeil). Die Gesamtoberfläche der geschädigten Zellen scheint jedoch insgesamt glatter zu sein als bei den Kontrollzellen. Ein ähnliches Aussehen wie die Kontrollzellen haben im Übersichtsbild (Abb. 26 d) die mit  $1 \mu\text{M CeCl}_3$  inkubierten Zellen. Sie weisen lediglich kleine Löcher auf (Pfeil), die jedoch auch in den Kontrollzellen beobachtet werden. In den größer dargestellten Zellen mit  $1 \mu\text{M CeCl}_3$  (Abb. 26e) können keine Löcher oder sonstige Unregelmäßigkeiten der Zelloberfläche beobachtet werden.

#### 4. Diskussion

Zu Beginn der Diskussion sei nochmals auf die Zielsetzung der Arbeit verwiesen. Sie bestand darin, das biologische Verhalten und die subzelluläre Bindungsstelle des Cers zu beschreiben, sowie die biochemischen und morphologischen Effekte von Cer in vivo und in vitro unter besonderer Berücksichtigung der Lysosomen zu untersuchen. Ein Grundgedanke dabei war, die Mechanismen der Cer-Wirkung allgemein aufzuklären und die Ursache für deren ausgesprochenen Geschlechtsunterschied aufzufinden. Entsprechend diesen Zielen soll die Diskussion der Ergebnisse gestaltet werden.

Zunächst soll die Organverteilung besprochen werden. In Übereinstimmung mit den für  $^{144}\text{Ce}$  in der Literatur vorhandenen Daten (Schmautz 1964, Altenstetter et al. 1966, Takada et al. 1970) ist der Hauptablagerungsort für  $^{141}\text{Ce}$  bei beiden Geschlechtern die Leber (Tab.2). Wir beobachten bei Weibchen nach Gewichts-dosen eine stark verzögerte Ausscheidung des  $^{141}\text{Ce}$  aus der Leber, können dies jedoch überraschenderweise, im Gegensatz zu Takada et al. (1970), für Männchen nicht nachweisen. Die Verabreichung des isotopischen Trägers führt aber bei beiden Geschlechtern zu einer gleichartig veränderten Verteilung des  $^{141}\text{Ce}$ , nämlich zu einer Zunahme in der Leber, einer über 10-fachen Erhöhung in der Milz und zur Abnahme im Skelett. Eine solche Verteilung ist typisch für kolloidale Stoffe und wird als retikuloendotheliales Verteilungsmuster bezeichnet. Seidel et al. fanden 1970, daß  $^{88}\text{YCl}_3$  nach Verabreichung mit inaktivem  $\text{YCl}_3$  ebenfalls bevorzugt im Retikuloendothel abgelagert wird, was die Autoren auf die Bildung unlöslicher oder kolloidaler Yttriumverbindungen zurückführten. In der Leber sind die Zellen des Retikuloendothels die Kupfferzellen; daß Radiokolloide von Lanthaniden dort tatsächlich bevorzugt abgelagert werden, konnten Grigorescu und Weber (1969) mittels Autoradiographie für  $^{147}\text{PmCl}_3$  mit  $\text{CeCl}_3$  als Träger für die Ratte zeigen, ebenso wiesen dies Graul und Hundshagen (1958) mit kolloidalem  $^{90}\text{Y}$  für das Meerschweinchen nach. In Übereinstimmung mit der entsprechenden Literatur für  $^{144}\text{Ce}$  (Schmautz 1964, Altenstetter et al. 1966) dürfte isotopisch verdünntes  $^{144}\text{Ce}$  im Blut in weitgehend kolloidaler Form vorliegen und so bei beiden Geschlechtern in den Kupfferzellen abgelagert werden.

Auch in den Endothelzellen, durch deren Fenster Partikel bis 0,1  $\mu\text{m}$  ungehindert passieren können (Wisse 1977, Seljelid 1980), könnte ein gewisser Teil der Kolloide deponiert werden. Bei trägerfreiem  $^{141}\text{Ce}$  scheint dagegen die monomere Form, die wohl vor allem in die Hepatocyten geht, vorzuherrschen.

Was die subzelluläre Verteilung betrifft, so fand bereits Mahlum (1967), daß  $^{144}\text{Ce}$  mit 4 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  bei Rattenweibchen und -männchen vorwiegend in der "mitochondrialen" Fraktion abgelagert wird, er räumte jedoch richtigerweise ein, daß in dieser Fraktion wahrscheinlich der größte Teil der Lysosomen enthalten ist. Somit dürfte diese "mitochondriale" Fraktion im wesentlichen unserer ML-Fraktion entsprechen, in der wir bei beiden Geschlechtern am 2. Tag nach 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  etwa 70% des  $^{141}\text{Ce}$  (% von E, Tab. 4) wiederfinden. Der relative Anteil in ML gegenüber der trägerfreien Applikation ist somit um etwa 20% angestiegen. Unterwirft man nun dieses ML-Sediment zur näheren Bestimmung der subzellulären Bindungsstelle des Cers einer Trägerfreien Elektrophorese, so sieht man, daß das Geschlecht keinen Einfluß auf die subzelluläre Bindung des  $^{141}\text{Ce}$  nach trägerfreier Injektion hat (Abb. 5 und 6): das Radionuklidprofil ist in beiden Fällen eingipflig und der überwiegende Teil des  $^{141}\text{Ce}$  erscheint an Lysosomen gebunden. Die Mitochondrien scheiden durch ihre scharfe Abtrennung vom  $^{141}\text{Ce}$ -Profil als Bindungsstelle für Cer weitgehend aus. Man findet zwar eine teilweise Überlappung des  $^{141}\text{Ce}$ -Profils mit den perizellulären Membranen, es kommt aber nicht zur Deckung der Profile. Eine Lysosomotropie von trägerfreiem  $^{141}\text{Ce}$  konnte auch für  $^{141}\text{Ce}$ -Citrat bei Rattenweibchen beobachtet werden (Seidel et al. 1986), ebenso für monomeres  $^{239}\text{Np}$ , das ebenfalls als hepatotoxisch gilt. Die Verabreichung von  $^{141}\text{Ce}$  mit 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  ändert das Verteilungsprofil des Radionuklids für beide Geschlechter gleichsinnig (Abb. 7 und 8). Es ist auch erwähnenswert, daß die subzelluläre Bindung des  $^{141}\text{Ce}$  am 2. und 9. Tag nach Injektion die gleiche ist, d.h. der Grund für die Reversibilität der Hepatotoxizität bei den Weibchen ist sicher nicht in der Umverteilung des Cers auf ein anderes Kompartiment zu suchen. Das  $^{141}\text{Ce}$ -Profil ist nach Verabreichung von Gewichts Dosen zweigipflig, eine Bindung von  $^{141}\text{Ce}$  an Mitochondrien oder perizelluläre Membranen darf aber wohl auch

hier ausgeschlossen werden. Während der anodenseitige Nuklidgipfel, der etwa 50% der  $^{141}\text{Ce}$ -Gesamtaktivität ausmacht, den Lysosomen zuzuordnen ist, kann der zweite Gipfel mit keinem Enzym in Einklang gebracht werden. Ähnliches wurde auch für 15 mg/kg  $^{237}\text{Np}$ -Nitrat bei weiblichen Ratten beobachtet (Seidel et al. 1986). Bei dieser elektrophoretisch langsamer wandernden Fraktion könnte es sich um enzymatisch inerte Speicherorganellen, sogenannte Telolysosomen, handeln, die ihre Enzymaktivität eingebüßt haben (Seidel et al. 1985).

Eine Denkmöglichkeit für die von vielen Autoren beobachtete Leberverfettung bei Rattenweibchen (siehe dazu Haley 1965, Schmautz 1964, Kyker et al. 1957, Snyder et al. 1960) ist die Einlagerung von Lipiden in Lysosomen. Lipidspeichernde Lysosomen wurden für den Syrischen Hamster beschrieben (Nehemia und Novikoff 1974, Warburton und Wynn 1977), sie müßten im linearen Saccharosegradienten eine geringere Dichte haben wie "normale" Lysosomen. Solche lipidspeichernden Lysosomen scheiden jedoch als Ursache der Fettleber aus, da weder der Trägerzusatz noch das Geschlecht einen Einfluß auf die Lysosomendichte hat (Abb. 9-12).

Zusammenfassend läßt sich zum bisher Diskutierten sagen, daß die Umverteilung in die Organe des Retikuloendothels und die Retentionsverlangsamung (die wir zumindest bei Weibchen beobachten) nach Injektion von Gewichts Dosen von Cer zusammen mit Befunden aus der Literatur deutlich für eine Kupfferzellablagerung bei beiden Geschlechtern sprechen, wobei noch mindestens 50% des  $^{141}\text{Ce}$  an enzymatisch aktive Lysosomen gebunden ist. Eine Lipidablagerung in den Lysosomen scheidet als Ursache für die Fettleber aus, Geschlechtsunterschiede im subzellulären Verhalten bestehen nicht.

Wenden wir uns nun der Morphologie der Leber zu, so ist schon am 2. Tag nach 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  bei Rattenweibchen makroskopisch eine Veränderung der Leber zu erkennen (siehe 3.1.1. und 3.1.8.). Die von Kyker et al. (1957) beschriebene Erhöhung des Lebergewichts sowie die Aufblähung der Leber und eine Zunahme des Trockengewichts kann jedoch nicht beobachtet werden (Tab.11). Wichtig ist

aber vor allem, daß es nach unseren Erkenntnissen zu keiner ödematösen Veränderung der Leber kommt. Dies deckt sich mit der lichtmikroskopisch-pathohistologischen Begutachtung, die keine ödematöse Schwellung der Hepatocyten nachweisen kann (siehe 3.1.8.). Man findet aber bei Weibchen Fettablagerungen, die für Männchen auch nach 2,101 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  nicht aufzufinden sind.

Auch nach Injektion von 1,3 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  läßt sich elektronenmikroskopisch nur am 2. Tag und nur bei Weibchen eine deutliche Veränderung gegenüber der unbehandelten Kontrolle erkennen (vgl. Abb. 13-15). Veränderungen der Leberzellstruktur wurden auch für die durch 12 mg/kg  $^{237}\text{Np}$ -Citrat hervorgerufene Fettleber beobachtet: hier kommt es zu ER-Dilatationen und dem Anstieg typischer Lipideinschlüsse (Berlin und Mahlum 1967). Daß diese ultrastrukturellen Veränderungen am 9. Tag nach  $\text{CeCl}_3$  nicht mehr zu finden sind, spricht erneut für die Reversibilität der Schäden.

Es stellt sich nun die Frage, ob und wie sich die elektronenmikroskopisch und lichtmikroskopisch beobachteten Veränderungen der Leberzellen bei der Messung der Enzyme der Leberdiagnostik niederschlagen. Dies ist in der Tat der Fall, wie die Betrachtung der Serumenzymwerte zeigt (Tab. 5 und 6). Auch der morphologisch erfaßte Geschlechtsunterschied ist in der Enzymreaktion vorhanden (vgl. Tab. 5 und 6 mit Tab. 7). Die Enzymerhöhung bei Weibchen ist dosisproportional und reversibel (Tab. 5 und 6). Die beschriebenen Enzymveränderungen sind sowohl typisch für experimentelle Leberschäden durch  $\text{CCl}_4$  (Yasuda et al. 1986, Mizrahi et al. 1987), das wie  $\text{CeCl}_3$  zur Verfettung (Dianzani 1976) und zu Zellnekrosen (Dinman et al. 1963) in der Leber führt, ebenso sind sie typisch für Leberzellschäden verschiedener Genese beim Menschen (siehe dazu Weiß 1976, 1979). Es sei an dieser Stelle erwähnt, daß nicht jedes lysosomotrope Metall unweigerlich eine hepatotoxische Reaktion herbeiführt, denn auch Gallium ist lysosomotrop (Berry et al. 1984), führt jedoch, wie man im Elektronenmikroskop (Abb. 16 und 17) und anhand der Serumenzyme (Tab. 6 und 7) erkennen kann, bei keinem der Geschlechter zu einer Schädigung der Leber nach Körperdosen von 2 mg/kg  $\text{GaCl}_3$ . Es sei hierzu aber erwähnt, daß  $\text{GaCl}_3$  in der Leber nur die zweithöchste Anreicherung nach den Knochen

hat (Heidenreich et al. 1974). Zusammenfassend sprechen die makroskopischen, histopathologischen und klinisch-chemischen Befunde für einen reversiblen Leberschaden nach Cer-Injektion bei den Weibchen.

Aus den bisherigen Ausführungen ergibt sich einerseits, daß durch Cer ein (direkter oder indirekter) Hepatocytenschaden hervorgerufen wird, andererseits sind es die Makrophagen, die das kolloidale Cer hauptsächlich speichern und die offenbar in vivo auch geschädigt werden (siehe 3.1.8. sowie Lazar 1973). Wie im folgenden besprochen werden soll, haben wir in den in vitro-Versuchen mit Makrophagen und Hepatocyten wohl Hinweise für Cer-Effekte auf Makrophagen erhalten, nicht jedoch für die Hepatocyten. Die Inkubationen von Kupffer- und Endothelzellen beider Geschlechter mit  $\text{CeCl}_3$  führt zu keiner Veränderung der gemessenen Enzyme in Zellen oder Überstand (Tab. 23 und 24). Wegen der kleinen Zahl der Parallelansätze sowie der geringen Zellgröße und Zellzahl kommt es jedoch zu einer breiten Streuung, in der evtl. vorhandene Effekte verloren gehen könnten. Es war daher und auch wegen des enormen methodischen Aufwands nahezu unumgänglich, weitere detaillierte Untersuchungen an Modellsystemen durchzuführen. Makrophagen sind aus der Rattenlunge problemlos, wenn auch nicht in allzu großer Menge, zu gewinnen. Bei aller Würdigung der Unterschiede zwischen Makrophagen verschiedener Gewebe haben wir zunächst Rattenalveolarmakrophagen als Testmodell eingesetzt. Tatsächlich läßt sich aus Abb. 18 und 19 ersehen, daß die Rattenalveolarmakrophagen beider Geschlechter auf  $100 \mu\text{M CeCl}_3$  mit einer starken Zunahme des Zellvolumens reagieren.

Eine Quelle für praktisch unbegrenzte Mengen an Makrophagen ist die Rinderlunge (Walser et al. 1987). Rinderalveolarmakrophagen reagieren z.B. auf Quarz sehr ähnlich wie Rattenalveolarmakrophagen (Schimmelpfeng et al. unveröffentlicht) und sind vor allem für Enzymfreisetzungsversuche hervorragend geeignet. Werden Rinderalveolarmakrophagen mit  $\text{CeCl}_3$  inkubiert (Tab. 25), findet man vor allem in den Medien ohne fötales Kälberserum eine Enzymfreisetzung ins Medium, wobei die Vitalität der adhärennten Zellen nicht wesentlich beeinflußt wird. Es wird also ohne Serumzusatz eine eindeutige Enzymfreisetzung aus den Alveolarmakrophagen

beobachtet. Ein völlig gleichartiger Effekt fand sich auch nach analogen Experimenten mit einer menschlichen, makrophagenartigen Zelllinie (Seidel unveröffentlicht). Bereits diese biochemischen Ergebnisse sprechen deutlich für einen cytotoxischen Effekt, der aber auch morphologisch beobachtet werden konnte (Abb. 22-26). Änderungen der Makrophagenmorphologie in Form von Gruben und Löchern in der Zellmembran sowie einer Abnahme der Oberflächenstrukturierung wurden für Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit  $\text{LaCl}_3$ ,  $\text{CdCl}_3$  und  $\text{CdO}$  beschrieben (Coin und Stevens 1986, Palmer et al. 1987). Eine Änderung der Makrophagenmorphologie scheint daher ein sehr sensitiver Cytotoxizitätsparameter für Makrophagen zu sein. Die morphologisch und biochemisch faßbaren Makrophagenveränderungen haben allerdings *in vitro* keinen Einfluß auf die Phagozytosefunktion, weder hinsichtlich der Latex-Phagozytoserate (Abb. 20 und 23) noch bezüglich der Chemilumineszenzphänomene während der Zymosan-Phagozytose (Abb. 21). Die von anderen Autoren *in vivo* nachgewiesene Blockierung der Phagozytosefähigkeit von Mäuse- und Ratten-Kupfferzellen (Lazar 1973, Husztik et al. 1980, Lazar et al. 1983, 1985) findet also *in vitro* zunächst kein Korrelat. Alle Befunde sprechen somit dafür, daß Lanthanide, hier speziell Cer, *in vivo* und *in vitro* toxisch für Makrophagen sind.

Der oben bereits angesprochene "Schutzeffekt" des fötalen Kälberserums auf die Rinderalveolarmakrophagen ist auch bei den Hepatocyten zu finden, denn auch hier kommt es nur ohne Serum zu einer deutlichen Reaktion der gemessenen Enzyme (Tab. 20 und 21). Eine Verminderung der Cytotoxizität (Parameter: LDH-Freisetzung und Zellwachstum) durch das Vorhandensein von Serum oder Serumalbumin im Medium konnte ebenfalls für  $\text{CdCl}_2$  an B14F28-Zellen, einer proliferierenden Zellkultur des Chinesischen Hamsters, beobachtet werden (Fischer 1985). Eine Erniedrigung akkumulierten Cadmiums mit steigendem Serumgehalt wurde auch für Kupffer- und Endothelzellen der Ratte nachgewiesen (Caperna und Failla 1984). Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, die Natur der Schutzwirkung eines Serumzusatzes aufzuklären.

Der Anstieg der Konzentrationen an GPT, GOT u.a. Enzymen im Serum weist nach allen experimentellen und klinischen Erfahrungen auf

eine direkte oder indirekte Schädigung von Hepatocyten hin. Es lag daher nahe, nach einer solchen Schädigung unter Verwendung von Hepatocytenkulturen zu suchen. Wie man aus Tab. 13-19 entnehmen kann, ist jedoch keine Reaktion erkennbar, die die in vivo-Enzymfreisetzung ins Serum der Weibchen am 2. Tag nach  $CeCl_3$  auch nur annähernd widerspiegelt.

Nachdem nun eine gewisse Klarheit darüber gewonnen ist, welche Zelltypen in die Cytotoxizität involviert sind, stellt sich die Frage, ob der subzelluläre Wirkungsort des Cers genauer definiert werden kann. Auf Grund der bereits besprochenen Lysosomotropie des Cers stehen hier naturgemäß die Lysosomen im Vordergrund. Da isolierte Lysosomen prinzipiell noch Mikropinocytose durchführen können (Marzella et al. 1980, Ahlberg und Glaumann 1985), wäre es denkbar, daß auch exogenes  $CeCl_3$  aufgenommen wird und zur Permeabilitätsstörung oder Destruktion der Lysosomenmembran führt, wie dies Lindquist (1968) nach Zusatz von Kupfer zu Lysosomenpräparationen beobachtete. Auch cytosolisches Cer könnte bereits einen toxischen Effekt auf die Lysosomen haben. Bei unseren Versuchen ergaben sich jedoch weder bei den in vivo mit Cer beladenen Lysosomen (Tab. 9) noch bei den mit Cer-haltigem Cytosol behandelten Lysosomen (Tab. 10) irgendwelche Hinweise für die Richtigkeit dieser Annahme. Ein einfacher Zusammenhang zwischen Lysosomotropie und Hepatotoxizität des Cers erscheint daher sehr unwahrscheinlich. Eher ist es wohl so, daß die Ablagerung des Cers in Lysosomen einen Schutzeffekt darstellt, was für andere Metalle durchaus auch diskutiert wird (siehe z.B. Helman et al. 1985).

Wir kommen nun zu der zentralen Frage, wie sich die Leberschäden bei Weibchen am 2. Tag nach Cer-Injektion deuten lassen und warum bei Männchen keine Effekte auftreten. Nachdem eine direkte Wirkung auf das Leberparenchym wohl auszuschließen ist, gehen wir derzeit von der Hypothese eines durch Makrophagen-Schädigung bedingten, indirekten Leberschadens aus. Dieser wäre zwanglos durch die Annahme eines ischämischen Leberschadens zu erklären, der sowohl von Erhöhungen der entsprechenden Enzymkonzentrationen im Serum als auch von morphologischen Veränderungen begleitet ist (Frederiks et al. 1983). In der Tat war die Perfundierbarkeit der Lebern von Rattenweibchen am 2. Tag nach Cerinjektion in unseren Versuchen

äußerst reduziert (Ergebnisse nicht aufgeführt). Mikrozirkulationsstörungen in der Leber durch Schädigung von Kupffer- und Endothelzellen konnten nach Endotoxingabe beobachtet werden (McCuskey et al. 1982) und sicherlich sind auch die von Lazar (1973) und Husztik et al. (1980) beschriebenen Funktionsausfälle des Leber-Retikuloendothels nach Injektion von Seltenen Erden ein sehr deutliches Indiz für eine drastische Makrophagenschädigung. Diese in vivo- und unsere in vitro-Befunde sprechen somit für die Möglichkeit eines Kupfferzellschadens mit nachfolgender Freisetzung von Prostaglandinen, reaktiven Sauerstoffspezies und anderen Mediatoren, wie dies für aktivierte Kupfferzellen bereits mehrfach nachgewiesen werden konnte (Decker 1986, Dieter et al. 1986, Laskin und Pilaro 1986, Shiratori et al. 1986).

Übrig bleibt nun die Frage, warum ein solch ausgeprägter Geschlechtsunterschied in der Reaktion auf  $CeCl_3$  besteht. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Verteilung, auch auf subzellulärem Niveau, können ausgeschlossen werden (Tab. 3 und 4). Auch scheint, in Übereinstimmung mit Schmautz (1964), die um etwa 4% höhere Cerablagerung in der Leber der Weibchen (Tab. 2) nicht der Grund für die Toxizität zu sein, da auch eine Erhöhung der Körperdosis auf 2,101 mg/kg  $CeCl_3$  bei den Männchen weder eine makroskopische Veränderung der Leber noch das Enzymmuster bei den Weibchen (Tab. 5) oder die für die Weibchen beobachteten pathologischen Veränderungen der Leber (siehe 3.1.8.) herbeiführt.

Unterschiedliche Reaktionen der Geschlechter auf hepatotoxische Stoffe sind aus der Literatur hinreichend bekannt, bieten jedoch kein einheitliches Bild. So reagierten Männchen auf 2-Acetylamino-fluoren (Jackson und Irving 1972, 1973, McQueen et al. 1986) und  $CCl_4$  (Julicher et al. 1984) empfindlicher als Weibchen, während die Weibchen empfindlicher für 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin waren (Al-Bayati et al. 1987). Für Weibchen konnte auch eine stärkere Sensitivität für das lysosomotrope  $^{237}Np$  nachgewiesen werden (Mahlum und Clarke 1966, Berlin und Mahlum 1967). Snyder et al. (1959) konnten zeigen, daß kastrierte Männchen nach Cer-Behandlung ähnlich hohe Lipidwerte in der Leber erreichen wie die Weibchen, und daß Testosteron eine signifikante Reduktion im Leberfett intakter und ovariectomisierter Weibchen verursacht. Die Induktion

einer Fettleber ist nicht nur für  $CeCl_3$  beschrieben, sie ist vielmehr ein Effekt des ersten Drittels der Seltenen Erden im Periodensystem, nämlich der Elemente Lanthan bis Samarium (Snyder et al. 1959, Kyker et al. 1957, Haley 1965). Da auch hier die Reaktion bei Weibchen und kastrierten Männchen immer ausgeprägter ist, wäre es denkbar, daß ein Hormoneinfluß bei der Empfindlichkeit der Leber auf  $CeCl_3$  besteht. Ob sich dieser schon bei der Wirkung von Cer auf Makrophagen bemerkbar macht (in unseren Versuchen mit Rattenalveolarmakrophagen war dies wohl nicht der Fall) oder erst bei der indirekten Schädigung der Hepatocyten nach Kupfferzellschädigung ist jedoch noch offen.

## 5. Zusammenfassung und Schlußfolgerung

1. Der Hauptablagerungsort für Cer ist bei beiden Geschlechtern die Leber. Die Injektion von Trägerdosen an  $CeCl_3$  führt zur Bildung von Kolloiden im Blut und daher zur erhöhten Ablagerung von Cer in den Organen des Retikuloendothels, d.h. in der Leber wohl vor allem in den Kupfferzellen. Mittels Trägerfreier Elektrophorese kann gezeigt werden, daß nach trägerfreier  $^{141}Ce$ -Applikation eine über 90%ige Korrelation zwischen dem Radionuklidprofil und den Lysosomen besteht. Auch nach Injektion von Cer-Gewichtsdosen bleiben noch mindestens 50% der Radioaktivität an enzymatisch aktive Lysosomen gebunden. Eine Dichteänderung der Lysosomen im Saccharosegradienten ist - unabhängig von der Verabreichungsform des Cers und des Geschlechts - nicht zu beobachten, was gegen Lipideinlagerungen spricht.

2. Anhand von licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Leber sowie von Enzymmessungen im Rattenserum kann nachgewiesen werden, daß am 2. Tag nach der Injektion ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Empfindlichkeit auf  $CeCl_3$  besteht. Weibchen reagieren schon ab 1,3 mg/kg  $CeCl_3$  mit der Ausbildung eines unspezifischen toxischen Leberschadens in Form erhöhter Fettablagerung, Sternzellschwellungen, Hepatocytennekrosen sowie pathologisch erhöhten Serumenzymkonzentrationen. Diese Schäden sind reversibel und bereits am 9. Tag nach der Injektion nicht mehr zu erkennen.

3. Während man bei den Hepatocyten in Kultur kaum eine direkte Schädigung nachweisen kann, reagieren die als Modell benutzten Ratten- und Rinderalveolarmakrophagen auf  $CeCl_3$ -Inkubationen mit einem Anschwellen der Zellen, Änderungen der Morphologie der Zelloberfläche und Enzymfreisetzungen. Eine Phagozytosehemmung kann jedoch nicht beobachtet werden. Fötale Kälberserum scheint sowohl auf die Hepatocyten als auch auf die Makrophagen einen Schutzeffekt auszuüben.

4. Die Leberlysosomen zeigen nach in vivo-Verabfolgung von Cer keine erhöhte Fragilität, weder bei der Zellfraktionierung selbst noch nach mehrstündiger Inkubation. Auch die Latenz in vitro inkubierter Lysosomen wird weder durch exogenes noch internali-

siertes Cer beeinflusst. Eine Lysosomenschädigung als primäres Ereignis der Hepatotoxizität ist daher unwahrscheinlich.

5. Durch die in vivo- und in vitro-Ergebnisse ergibt sich für die Rattenweibchen folgender Toxizitätsmechanismus: Kolloidales Cer wird in die Kupfferzellen inkorporiert und führt zu deren Schädigung. Vermutlich resultiert daraus eine Ischämie der Leber, so daß es indirekt zu der in vivo nachweisbaren Beeinträchtigung der Hepatocyten kommt.

6. Der ausgeprägte Geschlechtsunterschied in der Reaktion auf  $CeCl_3$  scheint auf den Einfluß von Geschlechtshormonen zurückzugehen. Da wir keinen Geschlechtseinfluß auf die Empfindlichkeit der als Modell für Kupfferzellen benutzten Rattenalveolarmakrophagen auf Cer gefunden haben, müßte ein solcher eher auf der Seite der Blutgefäße oder Hepatocyten liegen.

## 6. Literaturverzeichnis

AHLBERG, J., GLAUMANN, H., 1985

Uptake - microautophagy - and degradation of exogenous proteins by isolated rat liver lysosomes. Effects of pH, ATP, and inhibitors of proteolysis, *Exp. Molec. Pathol.* 42, pp. 78-88

AL-BAYATI, Z.A.F., MURRAY, W.J., STOHS, S.J., 1987

2,3,7,8 - Tetrachlorodibenzo-p-dioxin- induced lipid peroxidation in hepatic and extrahepatic tissues of male and female rats, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 16, pp. 159 - 166

ALTENSTETTER, F., BOHNE, F., CATSCH, A., 1966

Dekorporation von Radionukliden (Einfluß der isotopischen Verdünnung auf die Effektivität von DTPA), *Strahlentherapie* 131, pp. 361 - 370

APPELMANS, F., WATTIAUX, R., DE DUVE, C., 1955

Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver, *Biochem. J.* 59, pp. 438 - 445

BEAUFAY, H., AMAR-COSTESECC, A., FEYTMANS, E., THINES-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

BEAUFAY, H., AMAR-COSTESECC, A., 1976

Cell fractionation techniques, in: *Methods in membrane biology* (E.D. Korn ed.), Plenum Press, New York, pp. 1 - 100

BERGER, M.L., REYNOLDS, R.C., COMBES, B., 1987

Carbon tetrachloride - induced morphologic alternations in isolated rat hepatocytes, *Exp. Molec. Pathol.* 46, pp. 245 - 257

BERGMEYER, H.U., BERNT, E., 1970

UV-Test mit Pyruvat und NADH, in: *Methoden der enzymatischen Analyse* (Hrsg. H.U. Bergmeyer), Verlag Chemie, Weinheim, pp. 533 - 538

- BERLIN, J.D., MAHLUM, D.D., 1967  
Neptunium induced fatty livers in rats: electron microscopic and biochemical studies, in: Pacific Northwest laboratory annual report of 1966 to the USAEC division of biology and medicine (R.C. Thompson, E.G. Swezea eds.), BNWL-480, UC-48, pp. 43 - 46
- BERRY, J.-P., POUPON, M.-F., GALLE, S., ESCAIG, F., 1984  
Role of lysosomes in gallium concentration by mammalian tissues, Biol. Cell 51, pp. 43 - 52
- CAPERNA, T.J., FAILLA, M.L., 1984  
Cadmium metabolism by rat liver endothelial and Kupffer cells, Biochem. J. 221, pp. 631 - 636
- CATSCH, A., 1956  
Die Wirkung von Calcium- und Cer-diaminocyclohexantetraessigsäurem Natrium auf die Verteilung von Radiocer im Organismus der Ratte, Naturwiss. 22, pp. 520 - 521
- CATSCH, A., LE, D.K., 1957  
Removal of internally deposited radiocerium by the use of chelating agents, Nature 180, pp. 609
- CATSCH, A., 1961  
Die Dekorporation von Radionukliden (Untersuchungen an Radiocer und Diäthylentriaminpentaessigsäure), Strahlentherapie 114, pp. 565 - 576
- CATSCH, A., IMMEL-TELLER, H., SCHINDEWOLF-JORDAN, D., 1961  
Die Verteilung von Radiocer in den Leberzellen und ihre Beeinflussung durch die Diäthylentriaminpentaessigsäure, Z. Naturforschg. 16b, pp. 181 - 185
- COIN, P.G., STEVENS, J.B., 1986  
Toxicity of cadmium chloride in vitro: Indices of cytotoxicity with the pulmonary alveolar macrophage, Toxicol. Appl. Pharmacol. 82, pp. 140 - 150
- DECKER, K., 1986  
Biochemistry and functions of eicosanoids, in: Cells of the hepatic sinusoid, Vol. 1, (A. Kirn, D.L. Knook, E. Wisse eds.), pp. 53 - 58, The Kupffer Cell Foundation, Rijswijk

DIANZANI, M.U., 1976

Liver damage and regeneration after poisoning, in: The hepatobiliary system. Fundamental and pathological mechanisms (W. Taylor ed.), Plenum Press, New York, London, pp. 205 - 225

DIETER, P., SCHULZE-SPECKING, A., EYHORN, S., DECKER, K., 1986

Glucocorticoids inhibit prostaglandin formation by rat Kupffer cells in primary culture, in: Cells of the hepatic sinusoid, Vol. 1 (A. Kirn, D.L. Knook, E. Wisse eds.), pp. 77 - 82, The Kupffer Cell Foundation, Rijswijk

DINMAN, B.D., HAMDI, E.A., FOX, C.F., FRAJOLA, W.J., 1963

CCl<sub>4</sub> toxicity. III. Hepato-structural and enzymatic change, Arch. Environ. Health 7, pp. 630 - 646

FELS, A.O.S., COHN, Z.A., 1986

The alveolar macrophage, J. Appl. Physiol. 60, pp. 353 - 369

FISCHER, A.B., 1985

Factors influencing cadmium uptake and cytotoxicity of cultured cells, Xenobiotica 15, pp. 751 - 757

FREDERIKS, W.M., MYAGKAYA, G.L., BOSCH, K.S., FRONIK, G.M., VEEN, H.v.,

VOGELS, I.M.C., JAMES, J., 1983

The value of enzyme leakage for the prediction of necrosis in liver ischemia, Histochemistry 78, pp. 459 - 472

GACHALYI, A., NAMENYI, J., SZEGEDI, I., VARGA, P.L., 1986

Modification of <sup>144</sup>Ce tissue deposition by mixed ligand complex treatment in mice, Acta Phys. Hung. 68, pp. 233 - 240

GEBHARDT, R., MECKE, D., 1979

Perifused monolayer cultures of rat hepatocytes as an improved in vitro system for studies of ureogenesis, Exp. Cell Res. 124, pp. 349 - 359

GRAUL, E.H., HUNDSHAGEN, H., 1958

<sup>90</sup>Y-Organverteilungsstudien unter besonderer Berücksichtigung des autoradiographischen und papierelektrophoretischen Nachweisverfahrens, Strahlentherapie 106, pp. 405 - 417

GRIGORESCU, S., WEBER, K.M., 1969

The effect of carrier and DTPA on the distribution of  $^{147}\text{Pm}$  in the rat, ATKE 14-27, pp. 147 - 148

GRUNER, R., SEIDEL, A., WINTER, R., 1981

The initial early distribution of monomeric  $^{239}\text{Pu}$  and  $^{241}\text{Am}$  in rat liver as determined by Triton WR 1339 injection. Radiat. Res. 85, pp. 367 - 379

HALEY, T.J., 1965

Pharmacology and toxicology of the rare earth elements, J. Pharm. Sci. 54, pp. 663 - 670

HANSMANN, M., PERITI, P.F., HÜLSEN, W., CATSCH, A., 1965

Das metabolische Verhalten von Radiocer in der Leberzelle, Atompraxis 11, pp. 134 - 140

HEIDENREICH, P., KRIEGEL, H., HÖR, G., 1974

Biologische Untersuchungen zur Verteilung von  $^{67}\text{Ga}$ -Zitrat an Ratten in Abhängigkeit von Geschlecht und Applikationsart, Int. J. Appl. Radiat. Isotopes 25, pp. 557 - 565

HELMAN, R.G., ADAMS, L.G., PIERCE, K.R., BRIDGES, C.H., BAILEY, E.M., 1985

The role of lysosomes in the pathogenesis of copper-induced hepatotoxicity: Morphological studies, J. Comp. Path. 95, pp. 25 - 35

HENNING, R., HEIDRICH, H.-G., 1974

Membrane lipids of rat liver lysosomes prepared by free-flow electrophoresis, Biochim. Biophys. Acta 345, pp. 326 - 335

HOTZ, G., MÜLLER, H.-L., PÄTZOLD, S., SCHIMMELPFENG, J., SEIDEL, A.,

WIENER, M., 1987

Bovine alveolar macrophages and their organelles. Properties and use for studying uptake and effects of potentially hazardous dusts, in: Informal progress report on the european late effects project group, Newsletter 45 (J.R. Maisin ed.), pp. 65 - 69

HUSZTIK, E., LAZAR, G., PARDUCZ, A., 1980

Electron microscopic study of Kupffer-cell phagocytosis blockade induced by gadolinium chloride, Br.J. exp. Path. 61, pp. 624 - 630

ICHIHARA, A., NAKAMURA, T., TANAKA, K., 1982

Use of hepatocytes in primary culture for biochemical studies of liver functions, Mol. Cell. Biochem. 43, pp. 145 - 160

INGEBRETSEN, W.R., WAGLE, S.R., 1972

A rapid method for the isolation of large quantities of rat liver parenchymal cells with high anabolic rates, Biochem. Biophys. Res. Comm. 47, pp. 403 - 410

JACKSON, C.D., IRVING, C.C., 1972

Sex differences in cell proliferation and N-hydroxy-2-acetylaminofluorene sulfotransferase levels in rat liver during 2-acetylaminofluorene administration, Cancer Res. 32, pp. 1590 - 1594

JACKSON, C.D., IRVING, C.C., 1973

Effects of 2-acetylaminofluorene on liver cell proliferation after partial hepatectomy of female rats, Cancer Res. 33, pp. 397 - 401

JONES, T.W., THOR, H., ORRENIUS, S., 1986

In vitro studies of mechanisms of cytotoxicity, Fd. Chem. Toxic. 24, pp. 769 - 773

JULICHER, R.H.M., STERREBERG, L., HAENEN, G.R.M.M., BAST, A., NOORDHOEK, J., 1984

Sex differences in the cellular defence system against free radicals from oxygen or drug metabolites in rat, Arch. Toxicol. 56, pp. 83 - 86

KOJ, A., GAULDIE, J., REGOECZI, E., SAUDER, D.N., SWEENEY, G.D., 1984

The acute-phase response of cultured rat hepatocytes, Biochem. J. 224, pp. 505 - 514

KREAMER, B.L., STAECKER, J.L., SAWADA, N., SATTLER, G.L., HSIA, M.T.S., PITOT, H.C., 1986

Use of low-speed, iso-density Percoll centrifugation method to increase the viability of isolated rat hepatocyte preparations, In Vitro Cell. Develop. Biol. 22, pp. 201 - 211

KYKER, G.C., CRESS, E.A., SIVARAMAKRISHNAN, V.M., STEFFEE, C.H., STEWART, M., 1957

Fatty infiltration due to rare earths, Fed. Proc. 16, pp. 207 - 208

LASKIN, D.L., PILARO, A.M., 1986

Characterization of resident and inflammatory Kupffer cells using functional assays and specific monoclonal antibodies, in: Cells of the hepatics sinusoid, Vol.1 (A. Kirn, D.L. Knook, E. Wisse eds.), pp. 27 - 33, The Kupffer Cell Foundation, Rijswijk

LAZAR, G., 1973

The reticuloendothelial-blocking effect of rare earth metals in rats, J. Reticuloendothel. Soc. 13, pp. 231 - 237

LAZAR, G., HUSZTIK, E., RIBARSZKI, S., 1983

Reticuloendothelial blockade. The significance of the organ uptake studies, Ann. Immunol. hung. 23, pp. 161 - 169

LAZAR, G., HUSZTIK, E., RIBARSZKI, S., 1985

Reticuloendothelial blockade induced by gadolinium chloride. Effect on the humoral immune response and anaphylaxis, in: Macrophage biology (S. Reichard, M. Kojima eds.), Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 571 - 582

LINDQUIST, R.R., 1968

Studies on the pathogenesis of hepatolenticular degeneration. III. The effect of copper on rat liver lysosomes, Am. J. Path. 53, pp. 903 - 927

LOHMANN-MATTHES, M.-L., 1981

Der Makrophage, BIOZ. 5, pp. 135 - 143

MAHLUM, D.D., CLARKE, W.J., 1966

Neptunium-237 toxicity in the rat.-I. Histopathologic and chemical observations in liver and kidney, Health Phys. 12, pp. 7 - 13

MAHLUM, D.D., 1967

Neptunium-237 toxicity in the rat.II. Intracellular distribution of neptunium and cerium in rat liver, Toxicol. Appl. Pharmacol. 11, pp. 264 - 267

MARZELLA, L., AHLBERG, J., GLAUMANN, H., 1980

In vitro uptake of particles by lysosomes, Exp. Cell Res. 129, pp. 460 - 466

- MCCUSKEY, R.S., URBASCHEK, R., MCCUSKEY, P.A., URBASCHEK, B., 1982  
In vivo microscopic studies of the responses of the liver to endotoxin,  
Klin. Wochenschr. 60, pp. 749 - 751
- MCGUIRE, R.L., BABIUK, L.A., 1982  
In vitro culture characteristics of bovine alveolar macrophages,  
J. Reticuloendothel. Soc. 31, pp. 251 - 260
- MCQUEEN, C.A., MILLER, M.J., WILLIAMS, G.M., 1986  
Sex differences in the biotransformation of 2-acetylaminofluorene in  
cultured rat hepatocytes, Cell Biol. Toxicol. 2, pp. 271 - 281
- MIZRAHI, S., DOLBERG, L., JACOBSON, W.Z., 1987  
Alteration in aminotransferase levels in rats after acute hepatic  
injury, Isr. J. Med. Sci. 23, pp. 188 - 192
- MOSKALEV, Y.I., 1961  
Influence of an isotope carrier on distribution of cerium-144, in:  
Distribution, biological effects, and migration of radioactive isotopes,  
AEC-tr-7512, pp. 185 - 191
- MOSKALEV, Y.I., STREL'TSOVA, V.N., 1961  
Biological effects of small quantities of cerium-144 in: Distribution,  
biological effects, and migration of radioactive isotopes, AEC-tr-7512,  
pp. 279 - 286
- MÜLLER, H.-L., 1986  
Zum biologischen Verhalten von Uran-Plutonium-Mischoxidaerosolen:  
Inhalationsversuche mit Ratten und in vitro-Studien mit Alveolarmakro-  
phagen, Dissertation, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der  
Universität Karlsruhe
- NAKAMURA, T., TAKERU, F., ICHIHARA, A., 1985  
Enzyme leakage due to change of membrane permeability of primary cultured  
rat hepatocytes treated with various hepatotoxins and its prevention by  
glycyrrhizin, Cell Biol. Toxicol. 1, pp. 285 - 295
- NEHEMIAH, J.L., NOVIKOFF, A.B., 1974  
Unusual lysosomes in hamster hepatocytes, Exp. Molec. Pathol. 21,  
pp. 398 - 423

- NETHELER; H., 1970  
Absorptionsphotometrie, in: Methoden der enzymatischen Analyse, Band I,  
(Hrsg. H.U. Bergmeyer), Verlag Chemie, Weinheim, pp. 145 - 168
- PALMER, R.J., BUTENHOFF, J.L., STEVENS, J.B., 1987  
Cytotoxicity of the rare earth metals cerium, lanthanum, and neodymium  
in vitro: Comparisons with cadmium in a pulmonary macrophage primary  
culture system, Environ. Res. 43, pp. 142 - 156
- RIETSCHEL, H., MEYER, O., WÜHL, H., 1987  
Übersicht über die Hochtemperatursupraleitung in metallischen Keramiken,  
KfK-Nachricht 3, pp. 117 - 118
- ROY, A.B., 1954  
The sulfatase of ox liver, Biochem. J. 57, pp. 465 - 470
- RUCH, R.J., KLAUNIG, J.E., SCHULTZ, N.E., ASKARI, A.B., LACHER, D.A.,  
PEREIRA, M.A., GOLDBLATT, P.J., 1986  
Mechanisms of chloroform and carbon tetrachloride toxicity in primary  
cultured mouse hepatocytes, Environ. Health Perspect. 69, pp. 301 - 305
- SCHMAUTZ, E., 1964  
Geschlechtsabhängigkeit der Verteilung von Radiocer bei der Ratte,  
Strahlentherapie 123, pp. 267 - 278
- SEIDEL, A., VLADAR, M., VOLF, V., 1970  
Der Einfluß der isotopischen Verdünnung auf das Verhalten von Radio-  
yttrium im Säugetierorganismus, Strahlentherapie 140, pp. 717 - 720
- SEIDEL, A., SÜTTERLIN, U., BALANI, M., HAFFNER, H., 1984  
Comparison of the subcellular behaviour of transuranium elements in rat  
and Chinese hamster liver, in: Proc. of the 6th Internat. Congr. of the  
International Radiation Protection Association, Berlin, Verlag TÜV  
Rheinland, Köln, Vol. I, pp. 438 - 441
- SEIDEL, A., HEUMANN, H.-G., SÜTTERLIN, U., WIENER, M., HAFFNER, H., 1985  
Species differences in the handling of lysosomotropic metals and Triton  
WR 1339 by rat and Chinese hamster liver, Eur. J. Cell Biol. 37,  
pp. 89 - 97

- SEIDEL, A., WIENER, M., KRÜGER, E., WIRTH, R., HAFFNER, H., 1986  
Studies on the lysosomal binding of  $^{141}\text{Ce}$ ,  $^{239}\text{Np}$ ,  $^{239}\text{Pu}$  and  $^{241}\text{Am}$   
in rat and Syrian hamster liver using carrier-free electrophoresis,  
Nucl. Med. Biol. 13, pp. 515 - 518
- SELJELID, R., 1980  
Properties of Kupffer cells, in: Mononuclear phagocytes. Functional  
aspects (R.v. Furth ed.), Part I, Martinus Nijhoff Publishers, The  
Hague, Boston, London, pp. 157 - 199
- SHIRATORI, Y., TAKIKAWA, H., KAWASE, T., SUGIMOTO, T., 1986  
Superoxide anion generating capacity and lysosomal enzyme activities  
of Kupffer cells in galactosamine induced hepatitis, Gastroenterol.  
Jap. 21, pp. 135 - 144
- SMEDSRØD, B., PERTOFT, H., 1985  
Preparation of pure hepatocytes and reticuloendothelial cells in high  
yield from a single rat liver by means of Percoll centrifugation and  
selective adherence, J. Leukocyte Biol. 38, pp. 213 - 230
- SNYDER, F., CRESS, E.A., KYKER, G.C., 1959  
Liver lipid response to intravenous rare earths in rats, J. Lipid Res. 1,  
pp. 125 - 131
- SNYDER, F., CRESS, E.A., KYKER, G.C., 1960  
Rare-earth fatty liver, Nature 185, pp. 480 - 481
- SOTTOCASA, G.L., KUYLERNSTIRNA, B., ERNSTER, L., BERGSTRAND, A., 1967  
An electron transport system associated with the outer membrane of liver  
mitochondria. A biochemical and morphological study, J. Cell Biol. 32,  
pp. 415 - 438
- STAHN, R., MAIER, K.-P., HANNIG, K., 1970  
A new method for the preparation of rat liver lysosomes, J. Cell Biol. 46,  
pp. 576 - 591
- SÜTTERLIN, U., 1982  
Der Einfluß der Zeit auf die subzelluläre Verteilung von Transuranen  
und  $^{59}\text{Fe}$  in der Leber von Ratte und Chinesischem Hamster, Kernforschungs-  
zentrum Karlsruhe Report, KfK 3385

SUMMERFIELD, J.A., VERGALLA, J., JONES, E.A., 1982

Modulation of a glycoprotein recognition system on rat hepatic endothelial cells by glucose and diabetes mellitus, J. Clin. Invest. 69, pp. 1337 - 1347

TAKADA, K., FUJITA, M., SUZUKI, M., 1970

Effects of carrier on the retention, excretion and distribution of  $^{144}\text{Ce}$  in the rat. J. Radiat. Res. 11, pp. 24 - 31

TAKADA, K., 1978

Comparison of the metabolic behavior of  $^{144}\text{Ce}$  injected intravenously with that absorbed from the wound site in rats, Health Phys. 35, pp. 537 - 543

TAYA, A., 1986

Studies on the binding and transport processes of Americium -241 hydroxide polymers in rat lung and bovine alveolar macrophages, Dissertation, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe

TILKES; F., BECK, E.G., 1983

Macrophage functions after exposure to mineral fibers, Environ. Health Perspect. 51, pp. 67 - 72

VAN FURTH, R. DIESSELHOFF-DEN DULK, M.M.C., 1980

Method to prove ingestion of particles by macrophages with light microscopy, Scand J. Immunol. 12, pp. 265 - 269

WALSER, B., HOTZ, G., MÜLLER, H.-L., PÄTZOLD, S., WIENER, M., SEIDEL, A., 1987

Untersuchungen an Rinderalveolarmakrophagen vor und nach Kryopräservierung, Bericht des Kernforschungszentrums Karlsruhe, KfK-PEF 12, pp. 685 - 695

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

WEISS, G., 1976

Diagnostische Bewertung von Laborbefunden, J.F. Lehmanns Verlag, München

WEISS, G., 1979

Laboruntersuchungen nach Symptomen und Krankheiten, Springer Verlag,  
Berlin, Heidelberg, New York

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., SEIDEL, A., 1982

Comparison of the subcellular distribution of monomeric  $^{239}\text{Pu}$  and  
 $^{59}\text{Fe}$  in the liver of rat, mouse, and Syrian and Chinese hamsters,  
Radiat. Res. 89, pp. 113 - 123

WISSE, E., 1974

Observations of the fine structure and peroxidase cytochemistry of normal  
rat liver Kupffer cells, J. Ultrastruct. Res. 46, pp. 393 - 426

WISSE, E., 1977

Ultrastructure and function of Kupffer cells and other sinusoidal cells  
in the liver, in: Kupffer cells and other liver sinusoidal cells  
(E. Wisse, D.L. Knook eds.), Elsevier/North Holland, Biomedical Press,  
Amsterdam, pp. 33 - 60

YASUDA, H., IZUMI, N., SHIMADA, O., MARUYAMA, Y., KOBAYAKAWA, T., 1986

Protection against hepatic injury by a novel spiropiperidine derivate,  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 85, pp. 398 - 406

7. Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1: Sedimentierbarkeit von  $^{141}\text{Ce}$  in den Injektionslösungen und in den Inkubationsmedien für die Zellkulturen nach Zentrifugation bei 205 000 g

| Lösung   | Wiederfindung der Radioaktivität (%) | Von der gesamten Radioaktivität im Zentrifugenröhrchen befinden sich in Fraktion 4+5 (%) |
|--|--------------------------------------|--|
| $^{141}\text{Ce}$ in 0,01 M HCl<br>(= Injektionslösung trägerfrei)   | 103                                  | 26   |
| $^{141}\text{Ce}$ + 120 mg Ce-heptachlorid<br>in 50 ml 0,01 M HCl<br>(= Injektionslösung 2 mg/kg $\text{CeCl}_3$ ) | 109                                  | 25   |
| ohne $\text{CeCl}_3$ -Zusatz   | 74 ± 2                               | 28 ± 3   |
| $^{141}\text{Ce}$ in HEPES<br>ohne FCS   | mit 1 mM $\text{CeCl}_3$             | 101  |
|  | mit 0,1 mM $\text{CeCl}_3$           | 86 ± 1   |
|  | mit 0,001 mM $\text{CeCl}_3$         | 88   |
| ohne $\text{CeCl}_3$ -Zusatz   | 95                                   | 68   |
| $^{141}\text{Ce}$ in HEPES<br>mit 10% FCS  | mit 1 mM $\text{CeCl}_3$             | 99   |
|  | mit 0,1 mM $\text{CeCl}_3$           | 98 ± 2   |
|  | mit 0,001 mM $\text{CeCl}_3$         | 97 ± 1   |
| ohne $\text{CeCl}_3$ -Zusatz   | 37                                   | 100  |
| $^{141}\text{Ce}$ in RPMI<br>ohne FCS  | mit 0,1 mM $\text{CeCl}_3$           | 41   |
|  |                                      | 100  |
| ohne $\text{CeCl}_3$ -Zusatz   | 85                                   | 89   |
| $^{141}\text{Ce}$ in RPMI mit<br>10% FCS   | mit 0,1 mM $\text{CeCl}_3$           | 89   |
|  |                                      | 99   |

FCS = fötales Kälberserum

Fraktion 4 war die unterste Fraktion im Zentrifugenröhrchen,

Fraktion 5 war das Sediment

Mittelwerte ± Standardfehler aus zwei Versuchen bzw. Einzelwerte

Nähere Erläuterungen und Berechnungen siehe unter 2.1.

Tabelle 2: Retention von  $^{141}\text{Ce}$  in den Organen von Rattenweibchen und -männchen nach i.v. Injektion von trägerfreiem  $^{141}\text{Ce}$  (=tf) bzw. von  $^{141}\text{Ce}$  mit 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  als Trägermaterial

|          | Tage nach Injektion                                 | n  | % der injizierten Dosis |           |           |           |
|----------|---|----|-------------------------|-----------|-----------|-----------|
|          |   |    | Leber                   | Milz      | Femur     |           |
| Weibchen | $^{141}\text{Ce}$ ,<br>tf                           | 2  | 8                       | 78±2      | 0,36±0,02 | 0,71±0,03 |
|          |   | 9  | 5                       | 60±5      | 0,32±0,04 | 0,83±0,01 |
|          |   | 30 | 3                       | 8±1 (2)   | 0,26±0,01 | 0,76±0,04 |
|          |   | 70 | 4                       | 2±0,3 (3) | 0,30±0,02 | 0,86±0,09 |
|          | $^{141}\text{Ce}$<br>+<br>2mg/kg<br>$\text{CeCl}_3$ | 2  | 7                       | 81±1      | 3,9 ±0,2  | 0,52±0,05 |
|          |   | 9  | 4                       | 68±4 (3)  | 3,9 ±0,4  | 0,65±0,06 |
|          |   | 30 | 5                       | 51±3      | 2,8 ±0,2  | 0,88±0,04 |
|          |   | 70 | 3                       | 40±2      | 2,6 ±0,4  | 0,98±0,07 |
| Männchen | $^{141}\text{Ce}$ ,<br>tf                           | 2  | 5                       | 53±3      | 0,26±0,05 | 1,54±0,15 |
|          |   | 9  | 6                       | 43±5      | 0,19±0,01 | 1,13±0,08 |
|          | $^{141}\text{Ce}$<br>+<br>2mg/kg<br>$\text{CeCl}_3$ | 2  | 6                       | 77±1      | 3,0 ±0,2  | 0,53±0,02 |
|          |   | 9  | 7                       | 54±2      | 3,6 ±0,3  | 0,52±0,03 |

Mittelwerte ± Standardfehler

n: Zahl der Versuchstiere. Abweichende Versuchstierzahlen sind jeweils in Klammern angegeben

Tabelle 3: Relative subzelluläre Verteilung von i.v. injiziertem trägerfreien (= tf)  $^{141}\text{Ce}$  bzw. von  $^{141}\text{Ce}$  mit 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  als Trägermaterial in der Leber von Rattenweibchen und -männchen nach differentieller Zentrifugation

| Tage nach Injektion | % von (N + E) |                        |             |               |             |  |             |               |               |                        |               |  |  |
|---------------------|---------------|------------------------|-------------|---------------|-------------|--|-------------|---------------|---------------|------------------------|---------------|--|--|
|                     | Fraktion      | Rattenweibchen         |             |               |             |  |             |               |               | Rattenmännchen         |               |  |  |
|                     |               | $^{141}\text{Ce}$ , tf |             |               |             | $^{141}\text{Ce} + 2\text{mg/kg CeCl}_3$ |             |               |               | $^{141}\text{Ce}$ , tf |               | $^{141}\text{Ce} + 2\text{mg/kg CeCl}_3$ |  |
|                     | 2             | 9                      | 30          | 70            | 2           | 9  | 30          | 70            | 2             | 9                      | 2             | 9  |  |
| N                   | 24±1<br>(7)   | 35±3<br>(5)            | 39±2<br>(3) | 47±2<br>(2)   | 51±1<br>(6) | 37±1<br>(4)                              | 40±3<br>(3) | 56±2<br>(3)   | 21±2<br>(4)   | 23±1<br>(6)            | 48±2<br>(4)   | 66±2<br>(5)                              |  |
| E                   | 76±1<br>(7)   | 66±3<br>(5)            | 62±2<br>(3) | 59±0,3<br>(2) | 50±2<br>(6) | 63±2<br>(4)                              | 61±3<br>(3) | 48±2<br>(3)   | 82±2<br>(4)   | 77±1<br>(6)            | 52±1<br>(4)   | 35±2<br>(5)                              |  |
| ungewaschenes ML    | 37±1<br>(6)   | 47±5<br>(4)            | 41±1<br>(3) | 33±0,5<br>(2) | 35±1<br>(4) | 35±1<br>(3)                              | 31±1<br>(3) | 26±0,1<br>(2) | 44±1<br>(4)   | 52±1<br>(6)            | 37±1<br>(4)   | 28±3<br>(5)                              |  |
| gewaschenes ML      | 31<br>(1)     | 34<br>(1)              |             |               | 20<br>(1)   | 21<br>(1)                                |             |               | 30±0,4<br>(2) | 37<br>(1)              | 34±0,3<br>(2) | 23<br>(1)                                |  |
| S                   | 19±1<br>(7)   | 9±1<br>(4)             | 9±1<br>(3)  | 11±1<br>(2)   | 9±1<br>(5)  | 14±2<br>(4)                              | 9±1<br>(3)  | 5±0,4<br>(3)  | 23±1<br>(4)   | 10±1<br>(6)            | 8±2<br>(4)    | 3±0,4<br>(5)                             |  |
| P                   | 14±0,3<br>(7) | 8±1<br>(4)             | 6±1<br>(3)  | 9±1<br>(2)    | 6±1<br>(5)  | 13±2<br>(4)                              | 17±1<br>(3) | 12±1<br>(3)   | 11±0,5<br>(4) | 11±1<br>(6)            | 3±0,2<br>(4)  | 3±0,2<br>(5)                             |  |

Mittelwerte ± Standardfehler oder Einzelwerte

Die Zahlen in Klammern geben die Zahl der Versuchstiere an

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Tabelle 4: Relative subzelluläre Verteilung von i.v. injiziertem trägerfreien (= tf)  $^{141}\text{Ce}$  bzw. von  $^{141}\text{Ce}$  mit 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  als Trägermaterial in der Leber von Rattenweibchen und -männchen nach differentieller Zentrifugation

| Tage<br>nach<br>Injektion | % von E                |             |             |             |   |             |               |              |                        |             |   |             |
|---------------------------|------------------------|-------------|-------------|-------------|---|-------------|---------------|--------------|------------------------|-------------|---|-------------|
|                           | Weibchen               |             |             |             |   |             |               |              | Männchen               |             |   |             |
|                           | $^{141}\text{Ce}$ , tf |             |             |             | $^{141}\text{Ce}$ + 2 mg/kg $\text{CeCl}_3$ |             |               |              | $^{141}\text{Ce}$ , tf |             | $^{141}\text{Ce}$ +2mg/kg $\text{CeCl}_3$ |             |
| Fraktion                  | 2                      | 9           | 30          | 70          | 2   | 9           | 30            | 70           | 2                      | 9           | 2   | 9           |
| ungewaschenes<br>ML       | 49±1<br>(6)            | 71±4<br>(4) | 67±2<br>(3) | 57±1<br>(2) | 69±1<br>(4)                                 | 54±1<br>(3) | 51±0,4<br>(3) | 55±4<br>(2)  | 54±1<br>(4)            | 68±2<br>(6) | 71±3<br>(4)                               | 77±1<br>(4) |
| gewaschenes<br>ML         | 40<br>(1)              | 54<br>(1)   |             |             | 40<br>(1)                                   | 36<br>(1)   |               |              | 36±1<br>(2)            | 48<br>(1)   | 65±1<br>(2)                               | 63<br>(1)   |
| S                         | 25±1<br>(7)            | 14±2<br>(4) | 14±2<br>(3) | 18±3<br>(2) | 18±3<br>(5)                                 | 22±3<br>(4) | 15±1<br>(3)   | 9±0,3<br>(3) | 28±0,5<br>(3)          | 14±1<br>(6) | 16±3<br>(4)                               | 8±1<br>(5)  |
| P                         | 19±0,4<br>(7)          | 12±1<br>(4) | 10±1<br>(3) | 15±2<br>(2) | 11±1<br>(5)                                 | 20±2<br>(4) | 28±1<br>(3)   | 25±1<br>(3)  | 13±0,4<br>(3)          | 14±2<br>(6) | 5±0,4<br>(4)                              | 8±1<br>(5)  |

Mittelwerte ± Standardfehler oder Einzelwerte

Die Zahlen in Klammern geben die Zahl der Versuchstiere an

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Tabelle 5: Verhalten von Enzymen im Serum sowie von Gesamtcholesterin und Phospholipiden im Serum bei Rattenweibchen und -männchen zu kurzen Zeiten (bis 48 Std.) nach der Injektion von 2 mg/kg CeCl<sub>3</sub> (zum Vergleich: Männchen, 2,101 mg/kg CeCl<sub>3</sub>, 48 Std. nach Injektion).

| t        | GOT <sup>a</sup> | GPT <sup>a</sup>                                       | LAP <sup>a</sup> | GLDH <sup>a</sup> | N-A-G <sup>b</sup> | AS <sup>b</sup> | Gesamt- <sup>c</sup><br>cholesterin | Phospho- <sup>c</sup><br>lipide |                |
|----------|------------------|--|------------------|-------------------|--------------------|-----------------|-------------------------------------|---------------------------------|----------------|
| Weibchen | Ko               | 55± 3<br>(8)   | 41± 4<br>(8)     | 26± 1<br>(7)      | 6± 2<br>(8)        | 18±1<br>(7)     | 12±1<br>(7)                         | 73±7<br>(7)                     | 130±10<br>(7)  |
|          | 30 Min.          | 46± 3<br>(4)   | 25± 4*<br>(5)    | 31± 1*<br>(5)     | 5± 1<br>(5)        | 18±2<br>(5)     | 12±1<br>(5)                         | 85±4<br>(4)                     | 129± 3<br>(4)  |
|          | 90 Min.          | 58± 3<br>(10)  | 15± 1*<br>(10)   | 31± 1*<br>(7)     | 6± 1<br>(5)        | 19±0,2<br>(7)   | 10±1<br>(7)                         | 65±6<br>(10)                    | 106± 8<br>(10) |
|          | 24 Std.          | 114± 6*<br>(9)   | 47± 3<br>(8)     | 43± 1*<br>(7)     | 27± 4*<br>(8)      | 25±1*<br>(6)    | 13±1<br>(6)                         | 30±11*<br>(8)                   | 53± 7*<br>(8)  |
|          | 48 Std.          | 463±193<br>(5)   | 303±134<br>(5)   | 63±11*<br>(5)     | 74±18*<br>(5)      | 22±2<br>(5)     | 15±1<br>(5)                         | 16± 5*<br>(5)                   | 46±11*<br>(5)  |
| Männchen | Ko               | 64± 3<br>(9)   | 41± 4<br>(8)     | 43± 4<br>(6)      | 7± 1<br>(8)        | 28±2<br>(5)     | 11±1<br>(5)                         | 82± 4<br>(6)                    | 117± 7<br>(6)  |
|          | 24 Std.          | 108± 4*<br>(6)   | 40± 3<br>(6)     | 45± 2<br>(6)      | 30± 2*<br>(6)      |                 |                                     | 85±13<br>(6)                    | 118±15<br>(6)  |
|          | 48 Std.          | 79± 4*<br>(5)  | 44± 2<br>(5)     | 41± 1<br>(5)      | 38± 6*<br>(4)      | 26±0,3<br>(5)   | 17±1*<br>(5)                        | 85± 7<br>(5)                    | 126±14<br>(5)  |
|          | 48 Std.          | zum Vergleich: Männchen, 2,101 mg/kg CeCl <sub>3</sub> |                  |                   |                    |                 |                                     |                                 |                |
|          | 109± 6*<br>(4)   | 42± 5<br>(4)   | 45± 2<br>(4)     | 59±22*<br>(4)     | 30±2<br>(4)        | 23±2*<br>(4)    | 60±13<br>(4)                        | 101±16<br>(4)                   |                |

Ko = Kontrolle

Mittelwerte ± Standardfehler

\*Statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (2 p < 0,05)

Die Zahlen in Klammern geben die Zahl der Versuchstiere an

<sup>a</sup>In U/l. 1 Unit (U) katalysiert 1 µMol Substrat pro Minute bei 25°C

<sup>b</sup>In U/l. 1 Unit (U) katalysiert 1 µMol Substrat pro Minute bei 37°C

<sup>c</sup>In mg/dl

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Tabelle 6: Verhalten von Enzymen im Serum von Rattenweibchen bis zum 70. Tag nach Injektion von 1,3 mg/kg CeCl<sub>3</sub> oder 2 mg/kg GaCl<sub>3</sub>

|                           | GOT <sup>a</sup> | GPT <sup>a</sup> | GLDH <sup>a</sup> | γ-GT <sup>a</sup>   |
|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|---------------------|
| Kontrolle                 | 55 ± 3<br>(8)    | 41 ± 4<br>(8)    | 6 ± 2<br>(8)      | 0,91 ± 0,21<br>(6)  |
| 2. Tag CeCl <sub>3</sub>  | 136 ± 27*<br>(3) | 72 ± 10*<br>(3)  | 27 ± 4*<br>(3)    | 0,82 ± 0,15<br>(3)  |
| 9. Tag CeCl <sub>3</sub>  | 44 ± 3*<br>(4)   | 40 ± 1<br>(4)    | 6 ± 1<br>(4)      | 1,45 ± 1,2<br>(4)   |
| 70. Tag CeCl <sub>3</sub> | 65 ± 2*<br>(4)   | 37 ± 3<br>(4)    | 9 ± 4<br>(4)      | 0,71 ± 0,08<br>(4)  |
| 2. Tag GaCl <sub>3</sub>  | 62 ± 9<br>(4)    | 36 ± 5<br>(4)    | 17 ± 7<br>(4)     | 0,19 ± 0,06*<br>(4) |
| 9. Tag GaCl <sub>3</sub>  | 45 ± 2*<br>(4)   | 31 ± 2<br>(4)    | 7 ± 2<br>(4)      | 2,2 ± 0,13*<br>(4)  |
| 70. Tag GaCl <sub>3</sub> | 68 ± 16<br>(4)   | 45 ± 8<br>(4)    | 24 ± 12<br>(6)    | 0,31 ± 0,11*<br>(4) |

Mittelwerte ± Standardfehler

\*Statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (2 p < 0,05)

Die Zahlen in Klammern geben die Zahl der Versuchstiere an

<sup>a</sup>In U/l. 1 Unit (U) katalysiert 1 μMol Substrat pro Minute bei 25°C

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Tabelle 7: Verhalten von Enzymen im Serum von Rattenmännchen bis zum 70. Tag nach der Injektion von 1,3 mg/kg CeCl<sub>3</sub> oder 2 mg/kg GaCl<sub>3</sub>

|                           | GOT <sup>a</sup> | GPT <sup>a</sup> | GLDH <sup>a</sup> | γ-GT <sup>a</sup>   |
|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|---------------------|
| Kontrolle                 | 64 ± 3<br>(9)    | 41 ± 4<br>(8)    | 7 ± 1<br>(8)      | 1,03 ± 0,13<br>(3)  |
| 2. Tag CeCl <sub>3</sub>  | 54 ± 1*<br>(4)   | 44 ± 5<br>(4)    | 5 ± 1<br>(4)      | 1,68 ± 0,24<br>(4)  |
| 9. Tag CeCl <sub>3</sub>  | 49 ± 1*<br>(3)   | 44 ± 2<br>(3)    | 5 ± 0,4<br>(3)    | 0,17 ± 0,17*<br>(3) |
| 70. Tag CeCl <sub>3</sub> | 65 ± 6<br>(4)    | 48 ± 5<br>(4)    | 23 ± 4*<br>(4)    | 0,23 ± 0,03*<br>(4) |
| 2. Tag GaCl <sub>3</sub>  | 50 ± 4*<br>(4)   | 48 ± 1<br>(4)    | 4 ± 0,4<br>(4)    | 1,13 ± 0,08<br>(4)  |
| 9. Tag GaCl <sub>3</sub>  | 56 ± 3<br>(3)    | 43 ± 2<br>(3)    | 4 ± 1<br>(3)      | 1,48 ± 0,17<br>(3)  |
| 70. Tag GaCl <sub>3</sub> | 109 ± 26<br>(4)  | 65 ± 9*<br>(4)   | 56 ± 28<br>(4)    | 1,34 ± 0,3<br>(4)   |

Mittelwerte ± Standardfehler

\*Statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (2 p < 0,05)

Die Zahlen in Klammern geben die Zahl der Versuchstiere an

<sup>a</sup>In U/l. 1 Unit (U) katalysiert 1 μMol Substrat pro Minute bei 25°C

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Tabelle 8: Relative subzelluläre Verteilung von Enzymen nach differentieller Zentrifugation der Leber (unbehandelte Rattenweibchen bzw. Weibchen am 2. Tag nach i.v. Injektion von 2 mg/kg CeCl<sub>3</sub>)

|                           | Enzym | ML      | % von E |        |
|---------------------------|-------|---------|---------|--------|
|                           |       |         | S       | P      |
| Kontrolle                 | NAG   | 92 ± 1  | 4 ± 0   | 4 ± 1  |
|                           | AS    | 124 ± 1 | 5 ± 1   | 4 ± 1  |
|                           | SP    | 84 ± 3  | 12 ± 2  | 13 ± 0 |
|                           | GOT   | 36 ± 0  | 49 ± 4  | 2 ± 1  |
|                           | GDH   | 91 ± 5  | 3 ± 1   | 5 ± 1  |
|                           | CCR   | 53 ± 3  | 18 ± 5  | 25 ± 1 |
| 2 mg/kg CeCl <sub>3</sub> | NAG   | 86 ± 3  | 8 ± 0*  | 4 ± 0  |
|                           | AS    | 121 ± 8 | 9 ± 1   | 3 ± 1  |
|                           | SP    | 81 ± 3  | 15 ± 2  | 8 ± 1* |
|                           | GOT   | 47 ± 0* | 41 ± 2  | 1 ± 0  |
|                           | GDH   | 97 ± 3  | 3 ± 1   | 4 ± 1  |
|                           | CCR   | 55 ± 2  | 20 ± 0  | 25 ± 3 |

Mittelwerte ± Standardfehler

\* Statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle  
(2 p < 0,05)

Je zwei Tiere pro Gruppe

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Tabelle 9: Freisetzung von Enzymen aus der ML-Fraktion von Lebern von Rattenweibchen in den Überstand (ML-Inkubation in Kammerpuffer, 37°C)

| Inkubationszeit<br>(Min.) | % der insgesamt freisetzbaren Enzymaktivität im Überstand |                   |           |                   |            |                   |
|---------------------------|---|-------------------|-----------|-------------------|------------|-------------------|
|                           | GOT   |                   | GLDH      |                   | N-A-G      |                   |
|                           | Kontrolle   | CeCl <sub>3</sub> | Kontrolle | CeCl <sub>3</sub> | Kontrolle  | CeCl <sub>3</sub> |
| 0                         | 0   | 0                 | 0         | 0                 | 0          | 0                 |
| 55                        | 1,9 ± 0,6   | 0,5 ± 0,5         |           |                   | 5,4 ± 0,6  | 6,6 ± 0,7         |
| 110                       | 4,2 ± 0,9   | 2,7 ± 0,5         |           |                   | 8,4 ± 0,4  | 9,0 ± 1,5         |
| 170                       | 6,7 ± 1,9   | 4,5 ± 1,2         |           |                   | 8,6 ± 1,1  | 10,5 ± 0,8        |
| 240                       | 8,6 ± 1,9   | 6,0 ± 0,7         | 9,9 ± 3,3 | 5,7 ± 0,8         | 12,9 ± 0,2 | 14,4 ± 1,5        |

Inkubiert wurde die ML-Fraktion von Kontrolltieren (2 Tiere)  
sowie die ML-Fraktion von Tieren, die 2 Tage vor der Sektion  
2 mg/kg CeCl<sub>3</sub> erhielten

Mittelwerte ± Standardfehler

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Tabelle 10: Freisetzung von Enzymen aus der ML-Fraktion von Lebern von Rattenweibchen in den Überstand (ML-Inkubation mit Cytosol, 37°C)

| Inkubationszeit<br>(Min.) | % der insgesamt freisetzbaren Enzymaktivität im Überstand |   |  |   |
|---------------------------|---|---|--|---|
|                           | GOT   |   | N-A-G  |   |
|                           | Kontroll-ML mit<br>Cytosol von<br>Kontrolltieren          | Kontroll-ML mit<br>Cytosol von<br>Ce-Tieren | Kontroll-ML mit<br>Cytosol von<br>Kontrolltieren | Kontroll-ML mit<br>Cytosol von<br>Ce-Tieren |
| 0                         | 0   | 0   | 0  | 0   |
| 65                        | 0,3 ± 0,3   | 0   | 0,5 ± 0,5  | 1,7 ± 0,5                                   |
| 120                       | 3,1 ± 3,1   | 0   | 2,8 ± 0,1  | 2,3 ± 0,8                                   |
| 180                       | 12,0 ± 2,8  | 7,3 ± 2,0                                   | 11,9 ± 0,7                                       | 8,3 ± 1,9                                   |
| 240                       | 27,4 ± 3,7  | 40,9 ± 18,6                                 | 25,7 ± 0,6                                       | 23,2 ± 6,0                                  |

Inkubiert wurde die ML-Fraktion eines Kontrolltieres mit dem Cytosol eines anderen Kontrolltieres (2 Ansätze) sowie die ML-Fraktion eines Kontrolltieres mit dem Cytosol eines Tieres, das 16 Std. vor der Sektion 2 mg/kg  $CeCl_3$  erhielt (2 Ansätze).

Mittelwerte ± Standardfehler

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Tabelle 11: Einfluß von 2 mg/kg CeCl<sub>3</sub> auf Lebergewichte und Proteingehalt bei Rattenweibchen am 2. Tag nach i.v. Injektion

|                           | Zahl der Versuchstiere | Leberfrischgewicht (g) | Trockengewicht pro Gramm Leberfrischgewicht (g) | Protein pro Gramm Leberfrischgewicht (mg) |
|---------------------------|------------------------|------------------------|---|---|
| Kontrolle                 | 5                      | 8,88 ± 0,48            | 0,31 ± 0,002                                    | 205 ± 2                                   |
| 2 mg/kg CeCl <sub>3</sub> | 6                      | 7,78 ± 0,20            | 0,29 ± 0,005*                                   | 200 ± 4                                   |

Mittelwerte ± Standardfehler

\*Statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle  
(2 p < 0,05)

Tabelle 12: Aufnahmeversuche an Hepatocyten in Monolayerkultur und Sphäroiden mit trägerfreiem  $^{141}\text{Ce}$  (= tf) bzw. mit  $^{141}\text{Ce}$  mit  $10\ \mu\text{M CeCl}_3$

|   |             | Medium   | wiedergefundene Radioaktivität pro mg Protein (%) |                  |                      |                  |
|---|-------------|----------|---|------------------|----------------------|------------------|
|   |             |          | relativ <sup>a</sup>                              |                  | absolut <sup>b</sup> |                  |
|   |             |          | 37°C  | 0-2°C            | 37°C                 | 0-2°C            |
| $^{141}\text{Ce}$ , tf                          | Hepatocyten | Waymouth | 1,24±0,17<br>(3)                                  | 1,24±0,14<br>(3) | 7,60±0,63<br>(3)     | 6,55±0,56<br>(3) |
|   |             | RPMI     | 1,03±0,13<br>(4)                                  | 1,03±0,3<br>(4)  | 4,87±0,36<br>(4)     | 4,42±1,18<br>(4) |
|   | Sphäroide   | RPMI     | 0,22±0,02<br>(2)                                  | 0,58<br>(1)      | 0,95±0,01<br>(2)     | 2,25<br>(1)      |
| $^{141}\text{Ce}$<br>+ $10\ \mu\text{M CeCl}_3$ | Hepatocyten | Waymouth | 0,72±0,12<br>(3)                                  | 0,50±0,09<br>(3) | 3,90±0,66<br>(3)     | 2,77±0,74<br>(3) |
|   |             | RPMI     | 0,87±0,16<br>(4)                                  | 0,66±0,11<br>(4) | 4,15±0,69<br>(4)     | 2,85±0,29<br>(4) |
|   | Sphäroide   | RPMI     | 0,30±0,14<br>(5)                                  | 0,25±0,05<br>(2) | 0,92±0,37<br>(5)     | 0,65±0,01<br>(2) |

Inkubationsmedium: Waymouth oder RPMI mit 10% fötalem Kälberserum

Inkubationszeit: 3 - 4,5 Std.

Mittelwerte ± Standardfehler oder Einzelwerte

Die Zahlen in Klammern geben die Zahl der Versuche an

<sup>a</sup>  $\frac{\text{pro mg Protein wiedergefundene } ^{141}\text{Ce-Radioaktivität}}{\text{insgesamt pro Hepatocyten bzw. Sphäroidkultur}} \times 100 (\%)$   
angebotene  $^{141}\text{Ce-Radioaktivität}$

<sup>b</sup>  $\frac{\text{pro mg Protein wiedergefundene } ^{141}\text{Ce-Radioaktivität}}{\text{pro mg Protein tatsächlich angebotene } ^{141}\text{Ce-Radioaktivität}} \times 100 (\%)$

**Tabelle 13:** Effekt verschiedener  $\text{CeCl}_3$ -Konzentrationen auf die Hepatocyten (Enzymgehalt in den Zellen und Zellprotein auf der Petrischale) von Rattenweibchen

|  | n | GOT <sup>a</sup> | GPT <sup>a</sup> | GLDH <sup>a</sup> | LAP <sup>a</sup> | LDH <sup>a</sup> | N-A-G <sup>b</sup> | mg Zellprotein pro Petrischale |
|--|---|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------------------|
| Kontrolle                                | 5 | 324± 9           | 177±4            | 157±35            | 4,9±0,7          | 81±22            | 49±0,4             | 2,09±0,07                      |
| 2 Std. 10 $\mu\text{M}$ $\text{CeCl}_3$  | 5 | 412±15*          | 172±5            | 137±20            | 6,8±1,8          | 83±24            | 46±1               | 2,09±0,06                      |
| 1 $\mu\text{M}$ $\text{CeCl}_3$          | 5 | 350±22           | 179±5            | 92±12             | 6,9±1,6          | 69±22            | 47±1               | 2,06±0,06                      |
| 0,1 $\mu\text{M}$ $\text{CeCl}_3$        | 5 | 354±28           | 184±3            | 108±18            | 7,5±1,1          | 91±26            | 47±1*              | 2,02±0,06                      |
| Kontrolle                                | 5 | 609±29           | 112±2            | 1670±28<br>(3)    | 4,6±1,1<br>(4)   | 316±40           | 46±1               | 2,02±0,04                      |
| 4 Std. 10 $\mu\text{M}$ $\text{CeCl}_3$  | 5 | 556±34           | 116±1            | 1612±59           | 5,2±1,3          | 369±63           | 44±1               | 1,96±0,07                      |
| 1 $\mu\text{M}$ $\text{CeCl}_3$          | 5 | 593±30           | 119±3            | 1621±29           | 3,7±1,5          | 464±45*          | 44±0,2             | 2,01±0,02                      |
| 0,1 $\mu\text{M}$ $\text{CeCl}_3$        | 5 | 523±23*          | 123±2*           | 1560±22*          | 6,3±0,8          | 468±49*          | 46±2               | 1,91±0,02*                     |
| Kontrolle                                | 5 | 234±67           | 52±2             | 1574±51           | 7,2±2,7          | 316±77           | 35±1               | 1,91±0,05                      |
| 21 Std. 10 $\mu\text{M}$ $\text{CeCl}_3$ | 3 | 139± 4           | 60±3             | 1534±28           | 1,7±1,7          | 614±15*          | 36±1               | 1,87±0,09                      |
| 1 $\mu\text{M}$ $\text{CeCl}_3$          | 4 | 162± 5           | 63±2*            | 1675±38           | 1,5±0,9          | 456±15           | 36±0,4             | 1,77±0,05                      |
| 0,1 $\mu\text{M}$ $\text{CeCl}_3$        | 4 | 155± 9           | 58±1*            | 1716±31*          | 0*               | 441±54           | 37±2               | 1,76±0,04*                     |

Inkubationsmedium: Waymouth mit 10% fötalem Kälberserum

Repräsentativ für zwei Versuche

Mittelwerte ± Standardfehler

\*Statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (2 p < 0,05)

n: Zahl der Petrischalen. Wenn die Zahl der Petrischalen von der in der entsprechenden Reihe angegebenen

Zahl abweicht, so ist sie in Klammern angegeben

<sup>a</sup>In mU/mg Zellprotein. 1 Unit (U) katalysiert 1  $\mu\text{Mol}$  Substrat pro Minute bei 25°C

<sup>b</sup>In mU/mg Zellprotein. 1 Unit (U) katalysiert 1  $\mu\text{Mol}$  Substrat pro Minute bei 37°C

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Tabelle 14: Effekt verschiedener  $CeCl_3$ -Konzentrationen auf die Freisetzung von Enzymen aus Hepatocysten von Rattenweibchen in den Überstand

|                             | n | GOT <sup>a</sup> | GPT <sup>a</sup> | GLDH <sup>a</sup> | LAP <sup>a</sup> | LDH <sup>a</sup> | N-A-G <sup>b</sup> |
|-----------------------------|---|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|--------------------|
| Kontrolle                   | 5 | 8,4±1,1          | 3,3±0,5          | 8,6±1,6           | 0                | 19±11            | 0,8±0,05           |
| 2 Std. 10 $\mu M$ $CeCl_3$  | 5 | 13,3±1,8*        | 6,9±1,6          | 12,3±2,2          | 1,2±0,7          | 76±29            | 0,6±0,2            |
| 1 $\mu M$ $CeCl_3$          | 5 | 13,1±1,2*        | 5,5±0,6*         | 9,8±1,0           | 0,6±0,2*         | 33±15            | 0,9±0,1            |
| 0,1 $\mu M$ $CeCl_3$        | 5 | 15,6±2,4*        | 9,1±1,7*         | 12,2±1,7          | 0,2±0,1          | 25±12            | 1,1±0,2            |
| Kontrolle                   | 5 | 13,0±1,3         | 5,4±0,3          | 7,5±0,7           | 0,2±0,1          | 49± 8            | 0,9±0,1            |
| 4 Std. 10 $\mu M$ $CeCl_3$  | 5 | 7,3±0,4*         | 3,4±0,3*         | 4,5±0,6*          | 0,5±0,1          | 16± 6*           | 1,0±0,1            |
| 1 $\mu M$ $CeCl_3$          | 5 | 18,2±1,7*        | 8,7±0,8*         | 12,0±1,5*         | 0,3±0,1          | 71±10            | 1,1±0,2            |
| 0,1 $\mu M$ $CeCl_3$        | 5 | 15,6±1,9         | 7,9±1,1          | 9,8±0,9           | 0,3±0,1          | 49± 9            | 0,8±0,1            |
| Kontrolle                   | 5 | 29,1±3,6         | 7,8±0,5          | 18,3±0,8          | 1,7±0,2          | 101±25           | 3,3±0,1            |
| 21 Std. 10 $\mu M$ $CeCl_3$ | 3 | 24,2±1,6         | 7,7±0,3          | 13,4±1,1*         | 1,7±0,1          | 73± 5            | 3,8±1,1            |
| 1 $\mu M$ $CeCl_3$          | 4 | 32,3±0,7         | 10,7±0,3*        | 16,3±0,9          | 1,9±0,05         | 111± 3           | 3,8±0,1*           |
| 0,1 $\mu M$ $CeCl_3$        | 4 | 34,6±4,7         | 12,0±1,6*        | 17,0±2,1          | 1,8±0,1          | 120±25           | 3,8±0,2            |

Inkubationsmedium: Waymouth mit 10% fötalem Kälberserum

Repräsentativ für zwei Versuche

Mittelwerte ± Standardfehler

\*Statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (2 p < 0,05)

n: Zahl der Petrischalen

<sup>a</sup>In mU/ml Überstand. 1 Unit (U) katalysiert 1  $\mu$ Mol Substrat pro Minute bei 25°C

<sup>b</sup>In mU/ml Überstand. 1 Unit (U) katalysiert 1  $\mu$ Mol Substrat pro Minute bei 37°C

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Tabelle 15: Effekt verschiedener  $\text{CeCl}_3$ -Konzentrationen auf Hepatocyten von Rattenmännchen nach 20 Std.

|                                       | n | GOT <sup>a</sup> | GPT <sup>a</sup> | GLDH <sup>a</sup> | LAP <sup>a</sup> | LDH <sup>a</sup> | N-A-G <sup>b</sup> | mg Zellprotein<br>pro Petrischale |
|---------------------------------------|---|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|--------------------|-----------------------------------|
| Kontrolle                             | 6 | 456±33           | 13±0,4           | 1411±104          | 8,5±0,3          | 162±14           | 48±3               | 1,80±0,05                         |
| 100µM $\text{CeCl}_3$                 | 6 | 380±19           | 12±1,1           | 1432±104          | 6,3±0,8*         | 149± 8           | 47±3               | 2,00±0,07*                        |
| Zellen 10 µM $\text{CeCl}_3$          | 6 | 409±41           | 13±1,0           | 1312± 46          | 6,7±0,6*         | 129±14           | 41±4               | 2,14±0,03*                        |
| 1 µM $\text{CeCl}_3$                  | 6 | 447±29           | 14±1,8           | 1330± 87          | 6,9±0,9          | 144± 3           | 51±3               | 1,91±0,11                         |
| 0,1µM $\text{CeCl}_3$                 | 5 | 433±19           | 20±5,1           | 1560± 49          | 7,7±1,0          | 122±15           | 53±3               | 1,94±0,09                         |
| Kontrolle                             | 6 | 49± 5            | 3,1±0,3          | 34± 9             | 0                | 159±20           | 0                  |                                   |
| 100µM $\text{CeCl}_3$                 | 6 | 47± 2            | 3,4±0,2          | 20± 4             | 0                | 189± 7           | 0                  |                                   |
| Über-<br>stände 10 µM $\text{CeCl}_3$ | 6 | 49± 2            | 3,0±0,1          | 35±14             | 0                | 194±14           | 0                  |                                   |
| 1 µM $\text{CeCl}_3$                  | 6 | 59± 2            | 3,0±0,4          | 11± 5*            | 0                | 212± 4*          | 0                  |                                   |
| 0,1µM $\text{CeCl}_3$                 | 5 | 56± 4            | 3,8±0,3          | 4± 4*             | 0                | 180±15           | 0                  |                                   |

Inkubationsmedium: Waymouth mit 10% fötalem Kälberserum

Repräsentativ für drei Versuche

Mittelwerte ± Standardfehler

\*Statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (2 p < 0,05)

n: Zahl der Petrischalen

<sup>a</sup>In mU/mg Zellprotein (Zellen) bzw. mU/ml Überstand (Überstände). 1 Unit (U) katalysiert 1 µMol Substrat pro Minute bei 25°C

<sup>b</sup>In mU/mg Zellprotein (Zellen) bzw. mU/ml Überstand (Überstände). 1 Unit (U) katalysiert 1 µMol Substrat pro Minute bei 37°C

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

**Tabelle 16:** Effekt von  $10^{-6}$  bzw.  $10^{-8}$  M Insulin sowie verschiedener  $\text{CeCl}_3$ -Konzentrationen auf die Hepatocyten (Enzymgehalt in den Zellen und Zellprotein auf der Petrischale) von Rattenweibchen nach 24 Std.

|                         | n                      | GOT <sup>a</sup> | GPT <sup>a</sup> | GLDH <sup>a</sup> | LAP <sup>a</sup> | LDH <sup>a</sup> | N-A-G <sup>b</sup> | mg Zellprotein pro Petrischale |            |
|-------------------------|------------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------------------|------------|
| Ohne Insulin            | Kontrolle              | 5                | 90±3             | 13±2              | 863±26           | 1,1±0,5          | 31±21              | 58±2                           | 1,56±0,03  |
|                         | 100 µM $\text{CeCl}_3$ | 5                | 87±9             | 15±2              | 694±62*          | 0,1±0,1          | 53±24              | 62±2                           | 1,46±0,02* |
|                         | 1 µM $\text{CeCl}_3$   | 5                | 93±3             | 18±4              | 815±38           | 0,6±0,6          | 12± 6              | 64±2                           | 1,48±0,03  |
| Mit $10^{-6}$ M Insulin | Kontrolle              | 5                | 51±2             | 19±1              | 751±43           | 0                | 137±26             | 44±1                           | 1,86±0,05  |
|                         | 100 µM $\text{CeCl}_3$ | 5                | 54±4             | 22±2              | 829±58           | 0                | 155±14             | 47±0,5                         | 1,85±0,04  |
|                         | 1 µM $\text{CeCl}_3$   | 5                | 47±3             | 17±2              | 699±59           | 0                | 128±33             | 45±1                           | 1,94±0,05  |
| Mit $10^{-8}$ M Insulin | Kontrolle              | 5                | 81±7             | 14±0,5            | 1005±53          | 0                | 103±40             | 51±2<br>(4)                    | 1,79±0,05  |
|                         | 100 µM $\text{CeCl}_3$ | 5                | 54±6*            | 19±2*             | 883±49           | 0                | 155±35             | 50±1                           | 1,88±0,02  |
|                         | 1 µM $\text{CeCl}_3$   | 4                | 56±2*            | 17±1*<br>(5)      | 785±30*          | 0                | 110±37             | 49±1                           | 1,83±0,02  |

Inkubationsmedium: Waymouth mit 10% fötalem Kälberserum

Repräsentativ für zwei Versuche

Mittelwerte ± Standardfehler

\*Statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (2 p < 0,05)

n: Zahl der Petrischalen. Wenn die Zahl der Petrischalen von der in der entsprechenden Reihe angegebenen Zahl abweicht, so ist sie in Klammern angegeben

Nähere Erläuterungen siehe Tab. 13

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

**Tabelle 17:** Effekt von  $10^{-6}$  bzw.  $10^{-8}$  M Insulin sowie verschiedener  $\text{CeCl}_3$ -Konzentrationen auf die Freisetzung von Enzymen aus Hepatocyten von Rattenweibchen in den Überstand nach 24 Std.

|                         |                        | n | GOT <sup>a</sup> | GPT <sup>a</sup> | GLDH <sup>a</sup> | LAP <sup>a</sup> | LDH <sup>a</sup> | N-A-G <sup>b</sup> |
|-------------------------|------------------------|---|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|--------------------|
| Ohne Insulin            | Kontrolle              | 5 | 10,6±1,4         | 4,8±0,4          | 0                 | 0                | 31±6             | 0,3±0,2            |
|                         | 100 µM $\text{CeCl}_3$ | 5 | 12,2±0,6         | 6,0±0,6          | 0                 | 0                | 39±2             | 0,9±0,5            |
|                         | 1 µM $\text{CeCl}_3$   | 5 | 11,2±0,3         | 4,4±0,2          | 0                 | 0                | 43±4             | 2,2±0,5*           |
| Mit $10^{-6}$ M Insulin | Kontrolle              | 5 | 11,5±0,9         | 4,2±1,0          | 0                 | 0                | 36±5             | 0,1±0,05           |
|                         | 100 µM $\text{CeCl}_3$ | 5 | 12,7±1,1         | 2,6±0,6          | 0                 | 0                | 35±7             | 0,4±0,2            |
|                         | 1 µM                   | 5 | 9,9±0,8          | 3,3±0,6          | 0                 | 0                | 36±6             | 0,1±0,04           |
| Mit $10^{-8}$ M Insulin | Kontrolle              | 5 | 9,6±1,4          | 4,7±0,6          | 0                 | 0                | 31±4             | 0,05±0,05          |
|                         | 100 µM $\text{CeCl}_3$ | 5 | 9,6±1,6          | 4,4±0,4          | 0                 | 0                | 25±5             | 0,2±0,1            |
|                         | 1 µM $\text{CeCl}_3$   | 4 | 10,9±0,8         | 6,4±1,4          | 0                 | 0                | 28±7             | 0,3±0,2            |

Inkubationsmedium: Waymouth mit 10% fötalem Kälberserum

Repräsentativ für zwei Versuche

Mittelwerte ± Standardfehler

\*Statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (2 p < 0,05)

n: Zahl der Petrischalen

Nähere Erläuterungen siehe Tab. 14

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Tabelle 18: Effekt von 10  $\mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$  auf Hepatocyten von Rattenweibchen in RPMI-Medium mit 10% fötalem Kälberserum

|            |         | n                                | GOT <sup>a</sup> | GPT <sup>a</sup> | GLDH <sup>a</sup> | LAP <sup>a</sup> | LDH <sup>a</sup> | N-A-G <sup>b</sup> | mg Zellprotein<br>pro Petrischale |           |
|------------|---------|----------------------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|--------------------|-----------------------------------|-----------|
| Zellen     | 4 Std.  | Kontrolle                        | 4                | 203± 8           | 32±1              | 1220±107         | 21±1             | 747±12             | 61±3                              | 4,23±0,08 |
|            |         | 10 $\mu\text{M}$ $\text{CeCl}_3$ | 4                | 229±15           | 33±1              | 1434± 82         | 15±2*            | 758±20             | 68±1                              | 4,10±0,16 |
|            | 24 Std. | Kontrolle                        | 4                | 229± 2           | 14±1              | 1351± 89         | 23±1             | 656±22             | 70±2                              | 4,18±0,11 |
|            |         | 10 $\mu\text{M}$ $\text{CeCl}_3$ | 4                | 201±21           | 16±1              | 1022± 33*        | 20±1             | 668±27             | 69±2                              | 4,09±0,04 |
| Überstände | 4 Std.  | Kontrolle                        | 4                | 4,9±0,4          | 1,0±0,2           | 0,2±0,2          | 0                | 8,4±3,6            | 0                                 |           |
|            |         | 10 $\mu\text{M}$ $\text{CeCl}_3$ | 4                | 5,3±0,8          | 0,6±0,2           | 0,3±0,1          | 0,02±0,02        | 4,8±1,9            | 0                                 |           |
|            | 24 Std. | Kontrolle                        | 4                | 26±1             | 0,2±0,2           | 0,1±0,1          | 0,2±0,1          | 11,9±4,6           | 0                                 |           |
|            |         | 10 $\mu\text{M}$ $\text{CeCl}_3$ | 4                | 20±2*            | 0,6±0,6           | 0,1±0,1          | 0,4±0,05*        | 10,7±4,9           | 0                                 |           |

Inkubationsmedium: RPMI mit 10% fötalem Kälberserum

Repräsentativ für zwei Versuche

Mittelwerte ± Standardfehler

\*Statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (2 p < 0,05)

n: Zahl der Petrischalen

Nähere Erläuterungen siehe Tab. 13 und 14

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Tabelle 19: Effekt von 10 µM CeCl<sub>3</sub> auf Hepatocyten von Rattenweibchen in RPMI-Medium mit 10% nicht hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum nach 22 Std.

|            |                         | n | GOT <sup>a</sup> | GPT <sup>a</sup> | GLDH <sup>a</sup> | LAP <sup>a</sup> | LDH <sup>a</sup> | N-A-G <sup>b</sup> | mg Zellprotein pro Petrischale |
|------------|-------------------------|---|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------------------|
| Zellen     | Kontrolle               | 3 | 317±33           | 18±1             | 619±76            | 14±3             | 387±23           | 47±4               | 3,69±0,10                      |
|            | 10 µM CeCl <sub>3</sub> | 4 | 262±28           | 20±2             | 375±94            | 6±3              | 392±35           | 39±4               | 3,60±0,14                      |
| Überstände | Kontrolle               | 3 | 25±0,4           | 2,7±0,2          | 0,6±0,2           | 0,6±0,3          | 52±16            | 0                  |                                |
|            | 10 µM CeCl <sub>3</sub> | 4 | 21±0,9*          | 2,2±0,2          | 0,8±0,2           | 0,6±0,1          | 62±13            | 0                  |                                |

Inkubationsmedium: RPMI mit 10% fötalem Kälberserum. Im Gegensatz zu allen anderen Hepatocytenincubationsversuchen war bei diesem Versuch das fötale Kälberserum nicht hitzeinaktiviert.

Ein Versuch

Mittelwerte ± Standardfehler

\*Statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (2 p < 0,05)

n: Zahl der Petrischalen

Nähere Erläuterungen siehe Tab. 13 und 14

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Tabelle 20: Effekt verschiedener  $\text{CeCl}_3$ -Konzentrationen auf die Hepatocyten (Enzymgehalt in den Zellen und Zellprotein auf der Petrischale) von Rattenweibchen in RPMI-Medium ohne fötales Kälberserum.

|        |                        | n | LDH <sup>a</sup> | N-A-G <sup>b</sup> | mg Zellprotein<br>pro Petrischale |
|--------|------------------------|---|------------------|--------------------|-----------------------------------|
| 2 Std. | Kontrolle              | 4 | 1125 ± 31        | 35 ± 0,5           | 2,05 ± 0,05                       |
|        | 100 µM $\text{CeCl}_3$ | 4 | 750 ± 64*        | 34 ± 2             | 1,89 ± 0,11                       |
|        | 1 µM $\text{CeCl}_3$   | 4 | 892 ± 109        | 33 ± 1             | 1,99 ± 0,01                       |
| 4 Std. | Kontrolle              | 4 | 995 ± 40         | 32 ± 1             | 2,21 ± 0,03                       |
|        | 100 µM $\text{CeCl}_3$ | 4 | 651 ± 71*        | 32 ± 1             | 2,04 ± 0,09                       |
|        | 1 µM $\text{CeCl}_3$   | 4 | 972 ± 57         | 35 ± 0,3*          | 2,14 ± 0,10                       |
| 9 Std. | Kontrolle              | 4 | 915 ± 113        | 41 ± 1             | 1,53 ± 0,09                       |
|        | 100 µM $\text{CeCl}_3$ | 4 | 706 ± 19         | 41 ± 3             | 1,39 ± 0,05                       |
|        | 1 µM $\text{CeCl}_3$   | 4 | 563 ± 101        | 38 ± 2             | 1,52 ± 0,15                       |

Inkubationsmedium: RPMI ohne fötales Kälberserum und Supplemente

Ein Versuch

Mittelwerte ± Standardfehler

\*Statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (2 p < 0,05)

n: Zahl der Petrischalen

Nähere Erläuterungen siehe Tab. 13

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Tabelle 21: Effekt verschiedener  $\text{CeCl}_3$ -Konzentrationen auf die Freisetzung von Enzymen aus Hepatocyten von Rattenweibchen (in RPMI-Medium ohne fötales Kälberserum) in den Überstand

|        |                        | n | LDH <sup>a</sup> | N-A-G <sup>b</sup> |
|--------|------------------------|---|------------------|--------------------|
| 2 Std. | Kontrolle              | 4 | 65 ± 5           | 0,2 ± 0,1          |
|        | 100 µM $\text{CeCl}_3$ | 4 | 117 ± 9*         | 0,7 ± 0,1*         |
|        | 1 µM $\text{CeCl}_3$   | 4 | 106 ± 17         | 0,6 ± 0,1*         |
| 4 Std. | Kontrolle              | 4 | 103 ± 15         | 0,3 ± 0,1          |
|        | 100 µM $\text{CeCl}_3$ | 4 | 161 ± 12*        | 0,3 ± 0,2          |
|        | 1 µM $\text{CeCl}_3$   | 4 | 123 ± 16         | 0,2 ± 0,1          |
| 9 Std. | Kontrolle              | 4 | 116 ± 20         | 0,6 ± 0,4          |
|        | 100 µM $\text{CeCl}_3$ | 4 | 167 ± 7          | 0,6 ± 0,2          |
|        | 1 µM $\text{CeCl}_3$   | 4 | 180 ± 7*         | 0,7 ± 0,3          |

Inkubationsmedium: RPMI ohne fötales Kälberserum und Supplemente

Ein Versuch

Mittelwerte ± Standardfehler

\*Statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle

(2 p < 0,05)

n: Zahl der Petrischalen

Nähere Erläuterungen siehe Tab. 14

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Tabelle 22: Einfluß der Überstände von Kupfferzellen (nach 6 Std. Inkubation ohne und mit 10 µM CeCl<sub>3</sub>) auf Hepatocyten von Rattenweibchen (18 Std. Inkubation)

|  | n | GOT <sup>a</sup> | GPT <sup>a</sup> | GLDH <sup>a</sup> | LAP <sup>a</sup> | LDH <sup>a</sup> | N-A-G <sup>b</sup> | mg Protein pro Petrischale |
|--|---|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|--------------------|----------------------------|
| Hepatocyten Kontrolle                          | 2 | 726±14           | 123±1            | 1255± 62          | 0                | 711±24           | 47±1               | 5,56±0,15                  |
| Hepatocyten 10 µM CeCl <sub>3</sub>            | 3 | 641±48           | 112±2*           | 1237±153          | 0                | 702±51           | 48±2               | 5,55±0,16                  |
| Hepatocyten-Überstände Kontrolle               | 2 | 19,7±0,4         | 6,3±0,1          | 7,2±0,1           | 0,2±0,2          | 94±0             | 2,6±0,02           |                            |
| Hepatocyten-Überstände 10 µM CeCl <sub>3</sub> | 3 | 17,7±2,2         | 7,0±0,7          | 7,7±0,2           | 0,2±0,1          | 89±8             | 2,3±0,12           |                            |

Inkubationsmedium siehe 2.2.10.

Ein Versuch

Mittelwerte ± Standardfehler

\*Statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (2 p < 0,05)

n: Zahl der Petrischalen

Nähere Erläuterungen siehe Tab. 13 und 14

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Tabelle 23: Effekt von 10 µM CeCl<sub>3</sub> auf Kupffer- und Endothelzellen (Enzymgehalt in den Zellen und Zellprotein auf der Petrischale) von Rattenweibchen und -männchen in Kultur nach 20 Std.

|          |                                       | n | GOT <sup>a</sup> | GPT <sup>a</sup> | GLDH <sup>a</sup> | LAP <sup>a</sup> | LDH <sup>a</sup> | N-A-G <sup>b</sup> | mg Zellprotein pro Petrischale |
|----------|---------------------------------------|---|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------------------|
| Männchen | Kupfferzellen Kontrolle               | 2 | 86±15            | 0                | 180±18            | 0                | 201± 60          | 138±13             | 0,16±0,01                      |
|          | Kupfferzellen 10µM CeCl <sub>3</sub>  | 2 | 97±17            | 3,4±3,4          | 200±27            | 0                | 175±146          | 113±25             | 0,13±0,04                      |
| Weibchen | Kupfferzellen Kontrolle               | 3 | 40±17            | 8,1±4,2          | 17± 9             | 0                | 40± 35           | 14± 6              | 0,35±0,26                      |
|          | Kupfferzellen 10µM CeCl <sub>3</sub>  | 2 | 59±26            | 12,0±1,4         | 45±20             | 0                | 67± 15           | 2± 2               | 0,08±0,02                      |
|          | Endothelzellen Kontrolle              | 2 | 49± 5            | 0                | 95<br>(1)         | 0                | 44± 44           | 11± 5              | 0,15±0,04                      |
|          | Endothelzellen 10µM CeCl <sub>3</sub> | 2 | 44± 3            | 0                | 97± 0             | 0                | 53± 53           | 8± 1               | 0,09±0                         |

Inkubationsmedium: Waymouth mit 30% fötalem Kälberserum

Weibchen: Ein Versuch

Männchen: Repräsentativ für zwei Versuche

Mittelwerte ± Standardfehler oder Einzelwerte

\*Statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (2 p < 0,05)

n: Zahl der Petrischalen. Wenn die Zahl der Petrischalen von der in der entsprechenden Reihe angegebene Zahl abweicht, so ist sie in Klammern angegeben

Nähere Erläuterungen siehe Tab. 13

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Tabelle 24: Effekt von 10  $\mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$  auf die Freisetzung von Enzymen aus Kupffer- und Endothelzellen von Rattenweibchen und -männchen in Kultur in den Überstand nach 20 Std.

|          |                |                                  | n | GOT <sup>a</sup> | GPT <sup>a</sup> | GLDH <sup>a</sup> | LAP <sup>a</sup> | LDH <sup>a</sup> | N-A-G <sup>b</sup> |
|----------|----------------|----------------------------------|---|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|--------------------|
| Männchen | Kupfferzellen  | Kontrolle                        | 3 | 3,2±0,6          | 1,3±0,2          | 0                 | 0                | 2,2±0,5          | 1,2±0,5            |
|          |                | 10 $\mu\text{M}$ $\text{CeCl}_3$ | 3 | 4,0±0,8          | 0,8±0,5          | 0,9±0,5           | 0                | 11,5±5,0         | 2,5±1,3            |
| Weibchen | Kupfferzellen  | Kontrolle                        | 3 | 2,2±0,2          | 1,3±0,3          | 0,6±0,3           | 0,2±0,1          | 15,2±0,8         | 8,6±0,4            |
|          |                | 10 $\mu\text{M}$ $\text{CeCl}_3$ | 2 | 3,4±0,2*         | 1,4±0,5          | 2,4±0,2*          | 0,1±0            | 5,5±5,5          | 6,5±1,9            |
|          | Endothelzellen | Kontrolle                        | 2 | 3,8±0,6          | 1,4±0,2          | 2,7±0,3           | 0                | 13,5±9,8         | 7,3±3,0            |
|          |                | 10 $\mu\text{M}$ $\text{CeCl}_3$ | 2 | 2,5±0,3          | 1,3±0,6          | 1,7±0,1           | 0                | 13,5±4,9         | 8,1±2,6            |

Inkubationsmedium: Waymouth mit 30% fötalem Kälberserum

Weibchen: Ein Versuch

Männchen: Repräsentativ für zwei Versuche

Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler

\*Statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (2 p < 0,05)

n: Zahl der Petrischalen

Nähere Erläuterungen siehe Tab. 14

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Tabelle 25: Effekt verschiedener  $\text{CeCl}_3$ -Konzentrationen auf Überstände und Zellen kultivierter Rinderalveolarmakrophagen in verschiedenen Inkubationsmedien mit und ohne fötales Kälberserum (FCS)

| CeCl <sub>3</sub> -Konzentrationen |                         | % der Kontrolle <sup>a</sup> |                |               |                |               |               |                |               |
|------------------------------------|-------------------------|------------------------------|----------------|---------------|----------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
|                                    |                         | RPMI-Medium                  |                |               |                | HEPES-Medium  |               |                |               |
|                                    |                         | mit 10% FCS                  |                | ohne FCS      |                | mit 10% FCS   |               | ohne FCS       |               |
|                                    |                         | LDH                          | N-A-G          | LDH           | N-A-G          | LDH           | N-A-G         | LDH            | N-A-G         |
| Überstände                         | 100µM CeCl <sub>3</sub> | 75±14<br>(3)                 | 298±164<br>(5) | 236±18<br>(6) | 722±120<br>(6) | 130±58<br>(5) | 124±16<br>(5) | 409±127<br>(7) | 145±23<br>(7) |
|                                    | 10µM CeCl <sub>3</sub>  | 88±16<br>(3)                 | 88± 5<br>(2)   | 111<br>(1)    | 143<br>(1)     | 29±20<br>(2)  | 73± 4<br>(3)  | 200<br>(1)     | 135<br>(1)    |
|                                    | 1µM CeCl <sub>3</sub>   | 152±48<br>(2)                | 233± 67<br>(3) | 66±21<br>(3)  | 76± 27<br>(3)  | 52±22<br>(2)  | 116±31<br>(2) | 98± 35<br>(3)  | 102±24<br>(3) |
| Zellen                             | 100µM CeCl <sub>3</sub> | 98±7<br>(2)                  | 101±2<br>(2)   | 89±6<br>(4)   | 97±2<br>(4)    | 89<br>(1)     | 100<br>(1)    | 31±9<br>(3)    | 118±16<br>(3) |

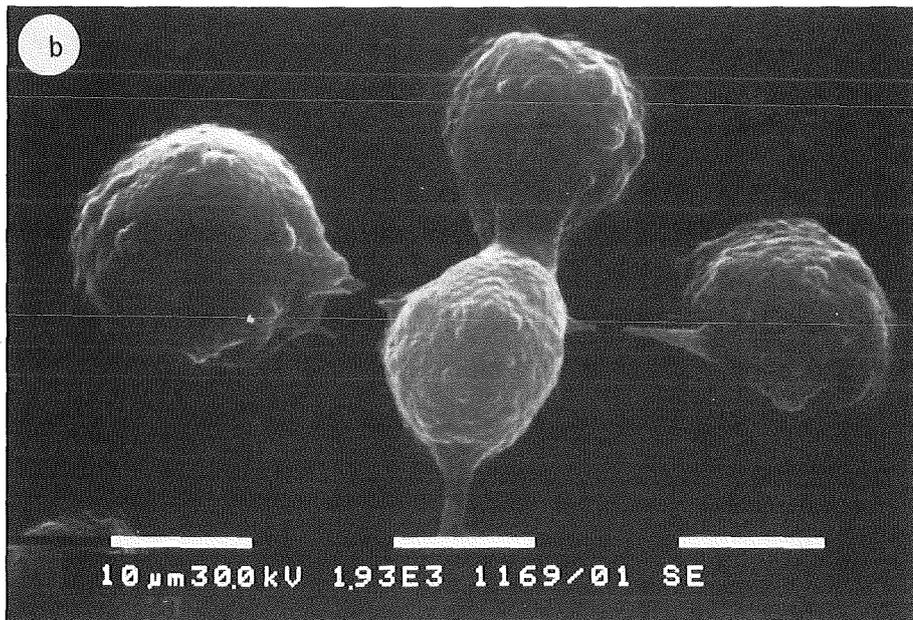
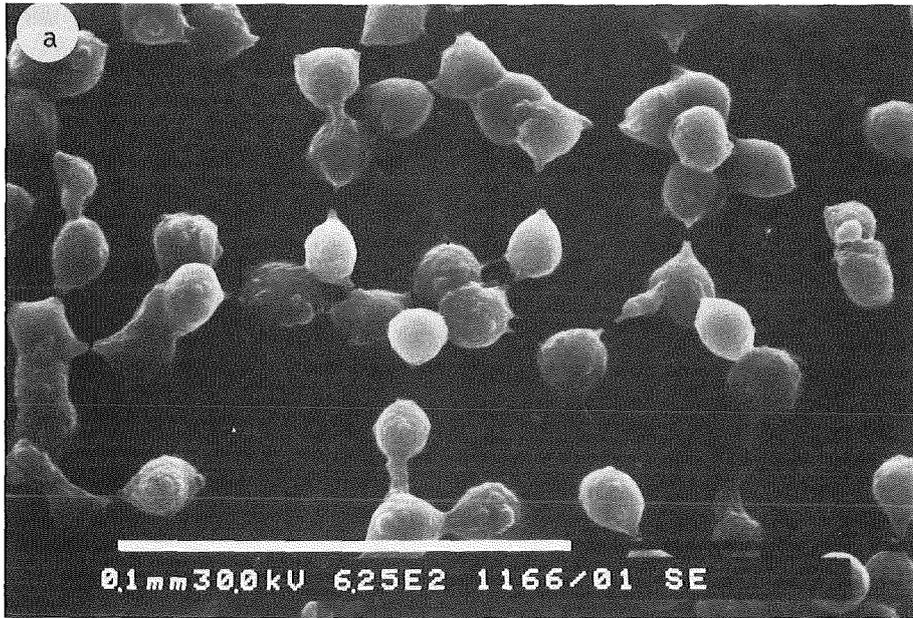
Inkubationszeit: 14 Std.

Mittelwerte ± Standardfehler oder Einzelwerte

Die Zahlen in Klammern geben die Zahl der Versuche an

<sup>a</sup>Die mU/ml Überstand (Überstände) bzw. die mU/mg Zellprotein (Zellen) der jeweiligen Kontrollen wurden als 100% gesetzt

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste



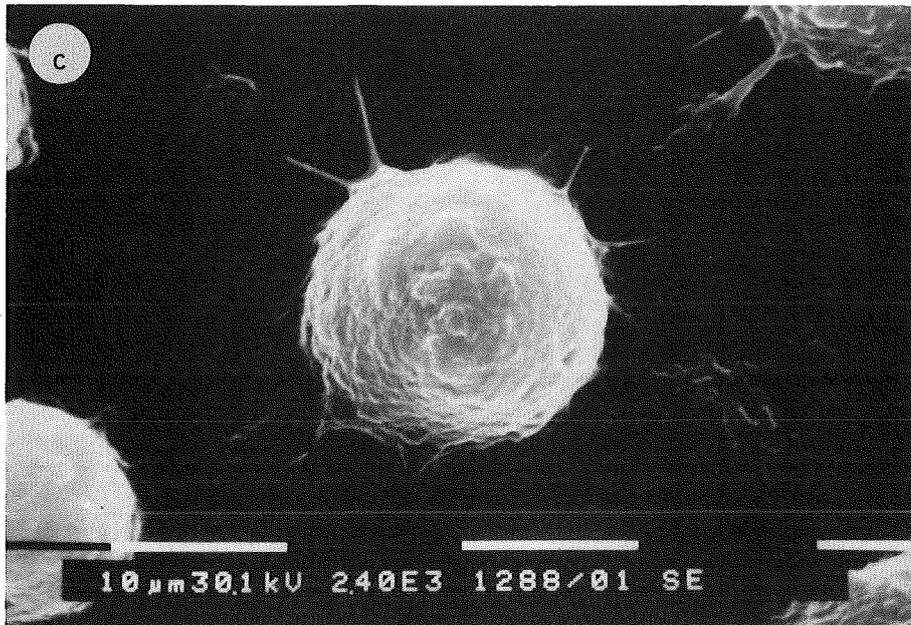


Abb. 1 : Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Rattenhepatocyten auf kollagenisierten Petrischalen nach 1 1/2-stündigem Absitzen in supplementiertem Waymouth-Medium (10% fötales Kälberserum)

1a: Übersichtsbild der festgesetzten Hepatocyten

1b: Festgesetzte Hepatocyten, die bereits Zell-Zellkontakte ausgebildet haben oder gerade ausbilden

1c: Festgesetzte Hepatocyte, die bereits mit dem Abflachen und Ausbreiten beginnt

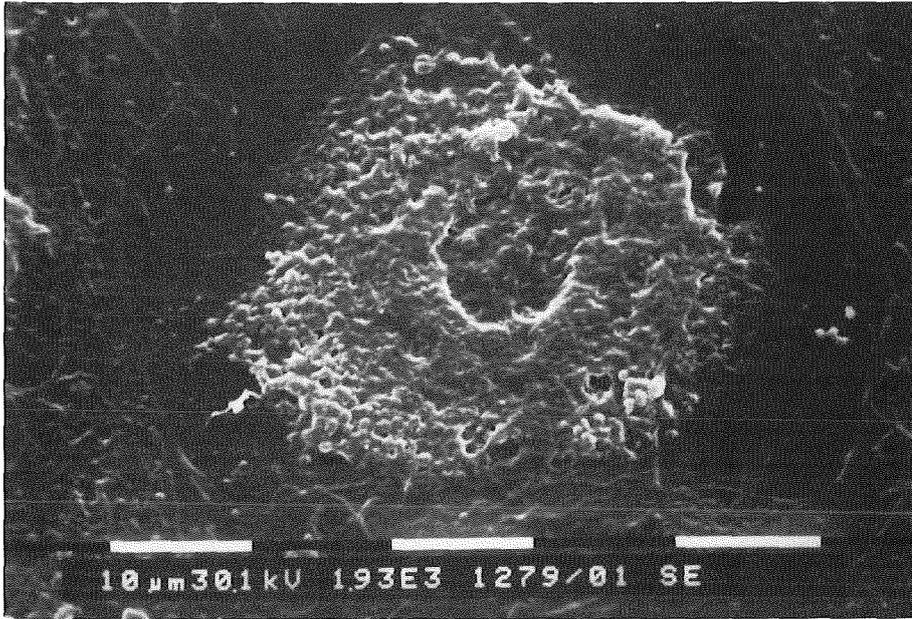


Abb. 2 : Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Rattenhepatocyte nach 2-tägiger Inkubation in supplementiertem Waymouth-Medium (10% fötales Kälberserum). Das Bild zeigt den Zustand der Zellen zu Versuchsbeginn. Der Kern ist zentral als Einbuchtung zu erkennen

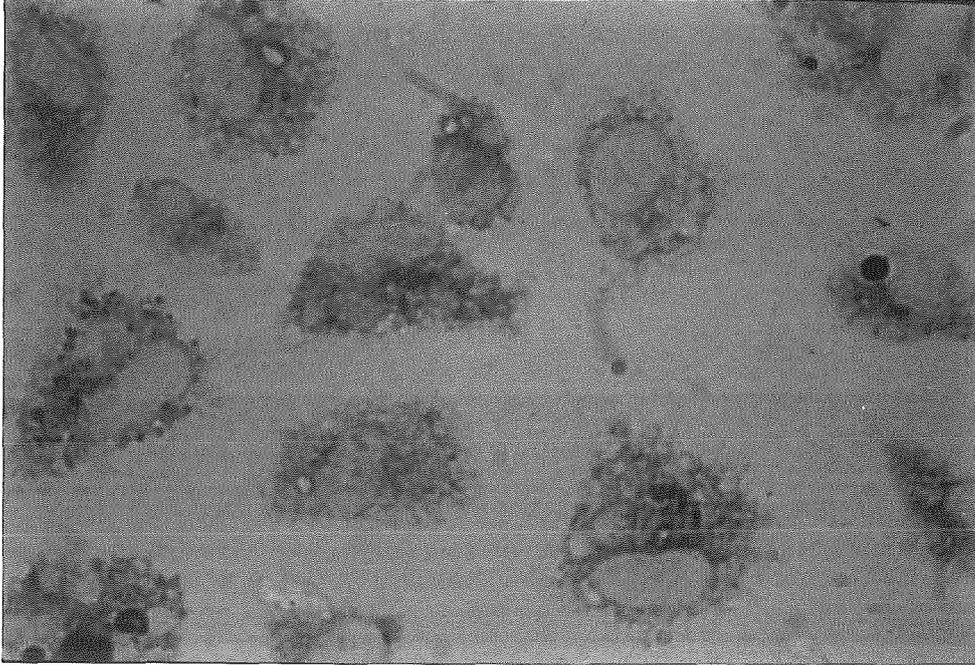


Abb. 3 : Färbung auf Peroxidaseaktivität an Kupferzellen von Rattenweibchen in Kultur nach 24-stündiger Inkubation in supplementiertem Waymouth-Medium (30% fötales Kälberserum). Das Bild zeigt den Zustand der Zellen zu Versuchsbeginn  
Vergrößerung: x1600

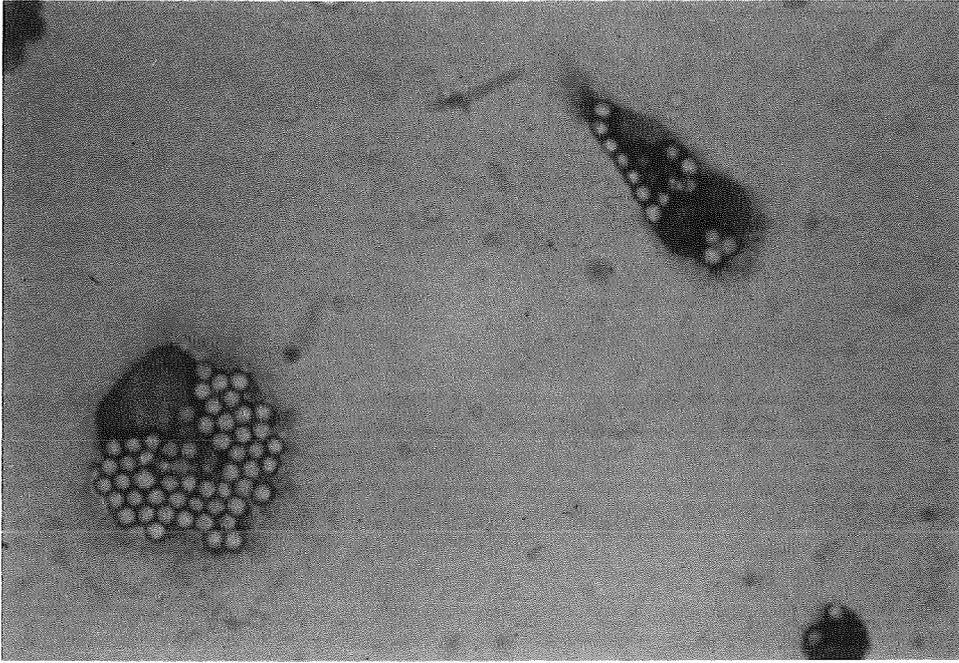


Abb. 4 : Kupferzellen von Rattenmännchen in Kultur nach 24-stündiger Inkubation in supplementiertem Waymouth-Medium (30% fötales Kälberserum) und anschließender 1-stündiger Inkubation in RPMI-Medium (ohne Supplemente) mit 2,02  $\mu\text{m}$  Latexpartikel  
Hemacolor-Schnellfärbung  
Vergrößerung: x1600

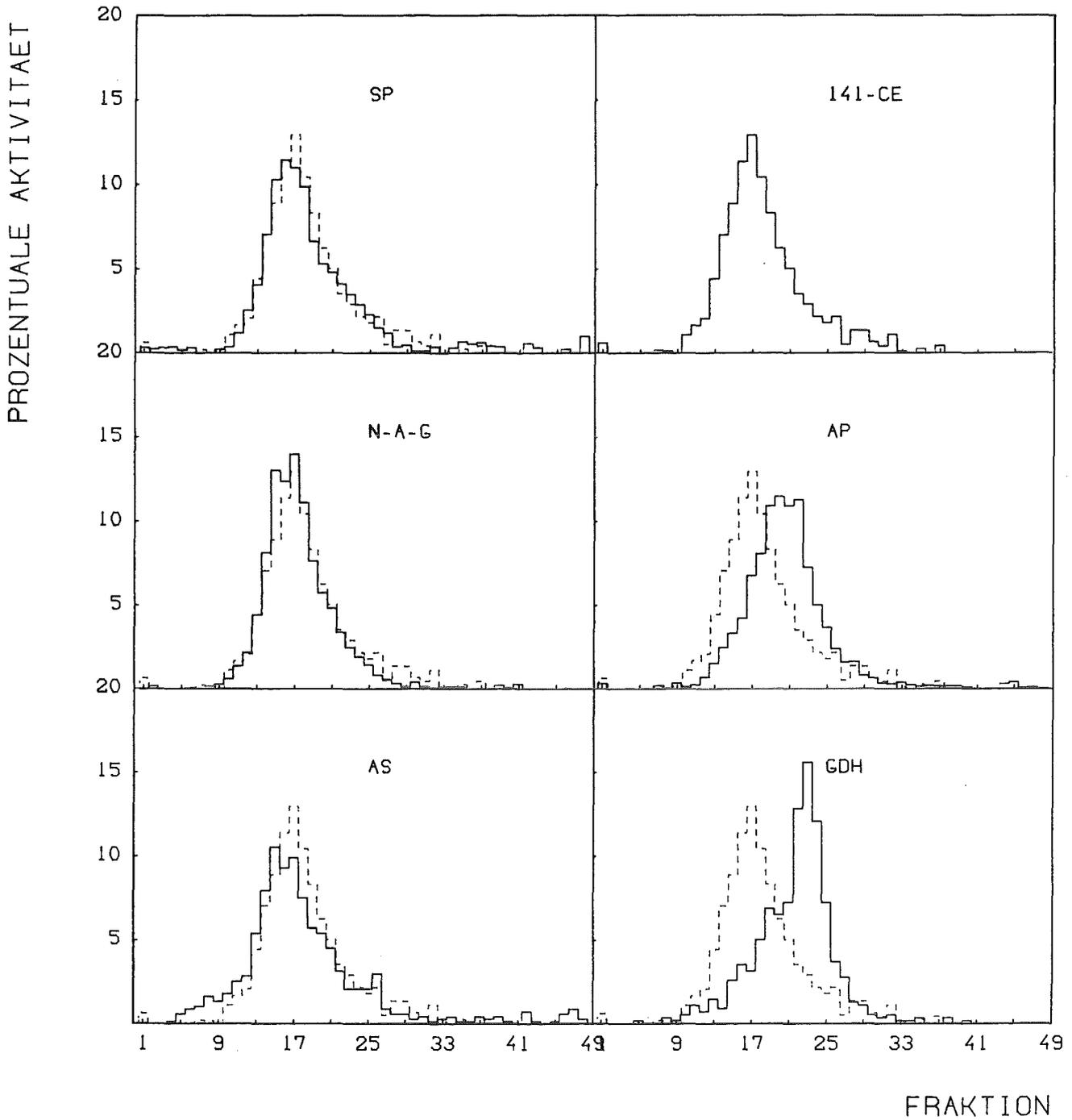


Abb. 5 : Verteilung von trägerfreiem  $^{141}\text{Ce}$  (2. und 9. Tag nach Injektion) und Enzymen aus der ML-Fraktion von Lebern von Rattenweibchen nach Trägerfreier Elektrophorese. Repräsentativ für zwei Versuche. Das  $^{141}\text{Ce}$ -Profil ist bei den Enzymen nochmals gestrichelt eingezeichnet.

Abszisse: Nummer der Fraktion  
Ordinate: Anteil der jeweiligen Komponente in der Fraktion als Prozentsatz der erhaltenen Gesamtaktivität in allen Fraktionen

Anode linke Seite

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

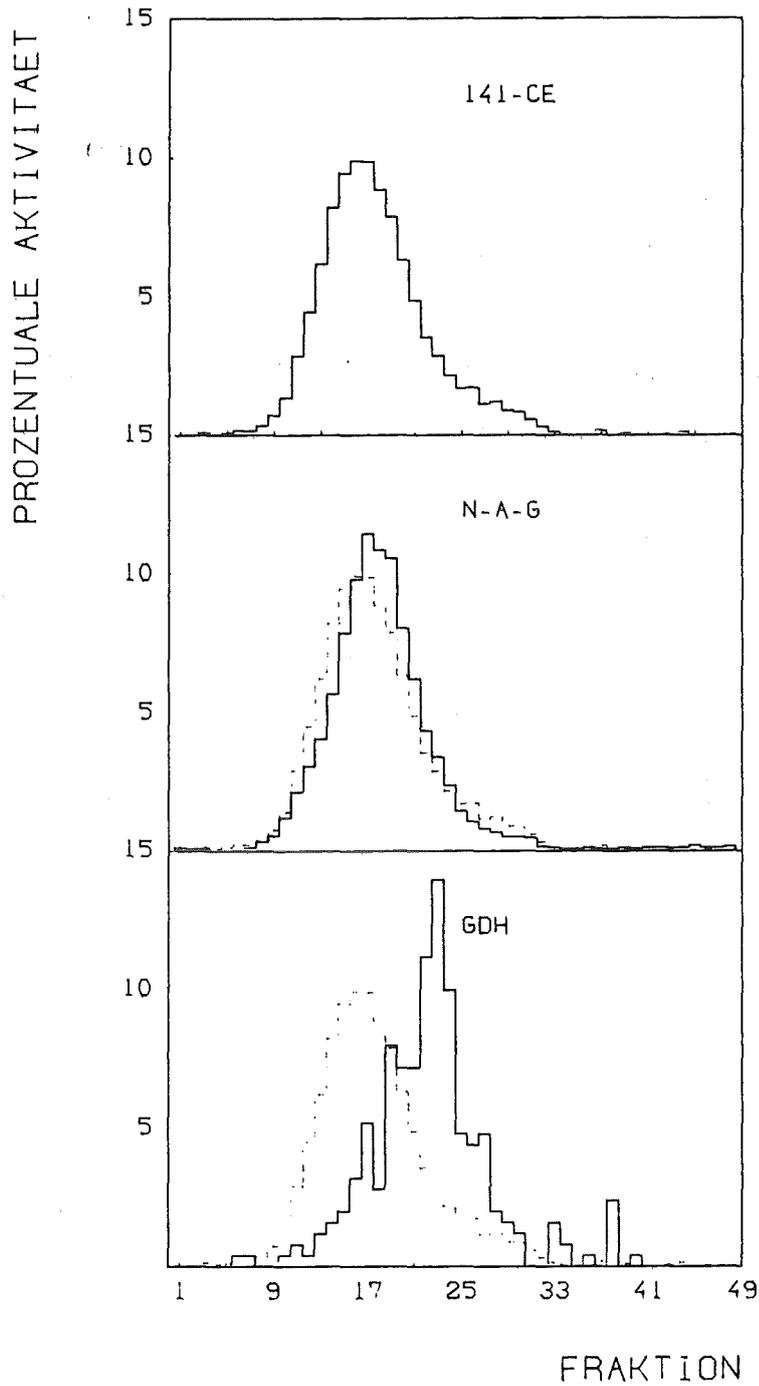


Abb. 6 : Verteilung von trägerfreiem  $^{141}\text{Ce}$  (2. und 9. Tag nach Injektion) und Enzymen aus der ML-Fraktion von Lebern von Rattenmännchen nach Trägerfreier Elektrophorese. Repräsentativ für drei Versuche. Das  $^{141}\text{Ce}$ -Profil ist bei den Enzymen nochmals gestrichelt eingezeichnet. Nähere Angaben siehe Abb. 5

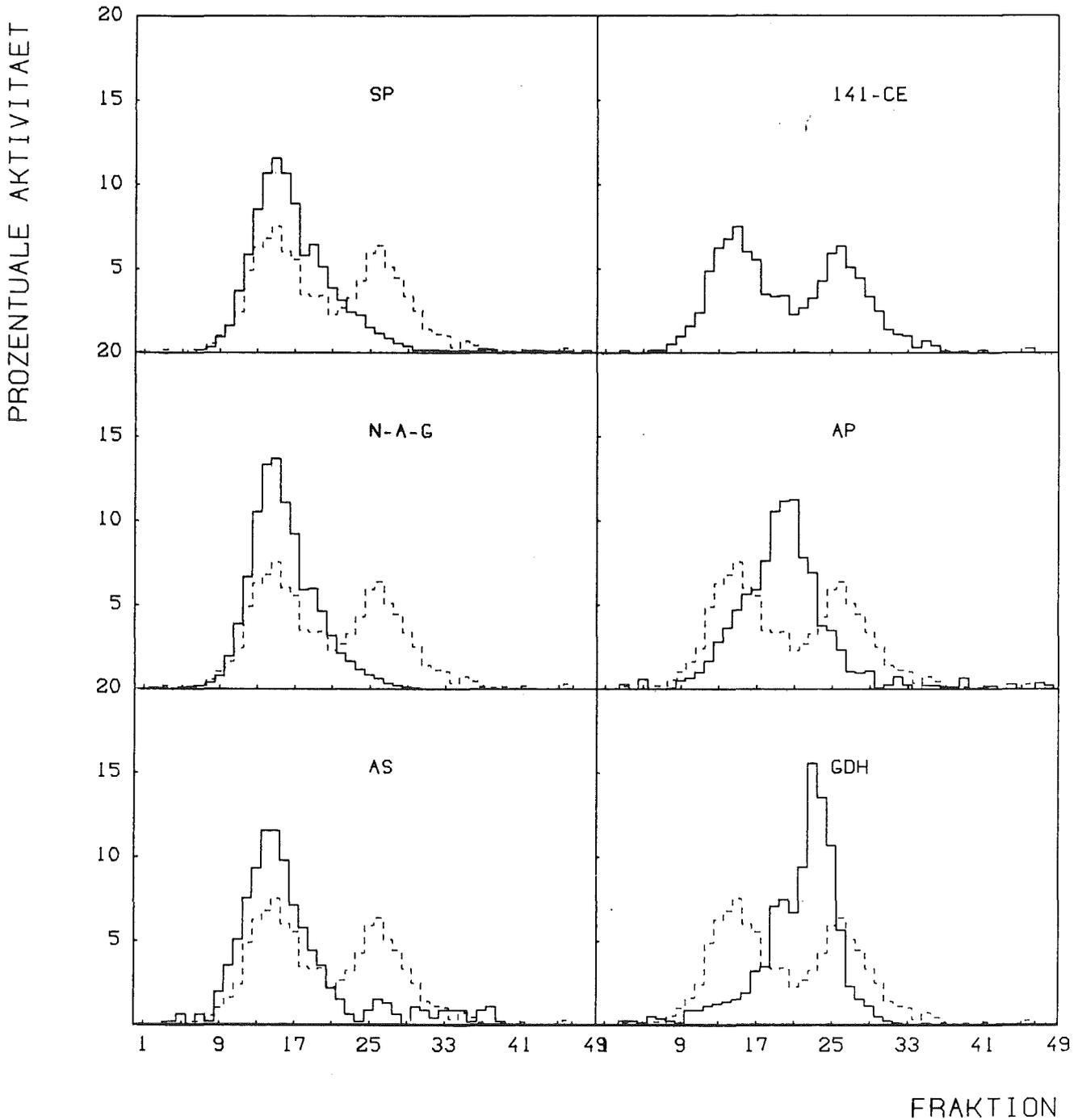


Abb. 7 : Verteilung von  $^{141}\text{Ce}$  (2. und 9. Tag nach Injektion) und Enzymen nach der Injektion von  $^{141}\text{Ce}$  mit 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  aus der ML-Fraktion von Lebern von Rattenweibchen nach Trägerfreier Elektrophorese. Repräsentativ für drei Versuche. Das  $^{141}\text{Ce}$ -Profil ist bei den Enzymen nochmals gestrichelt eingezeichnet. Nähere Angaben siehe Abb. 5

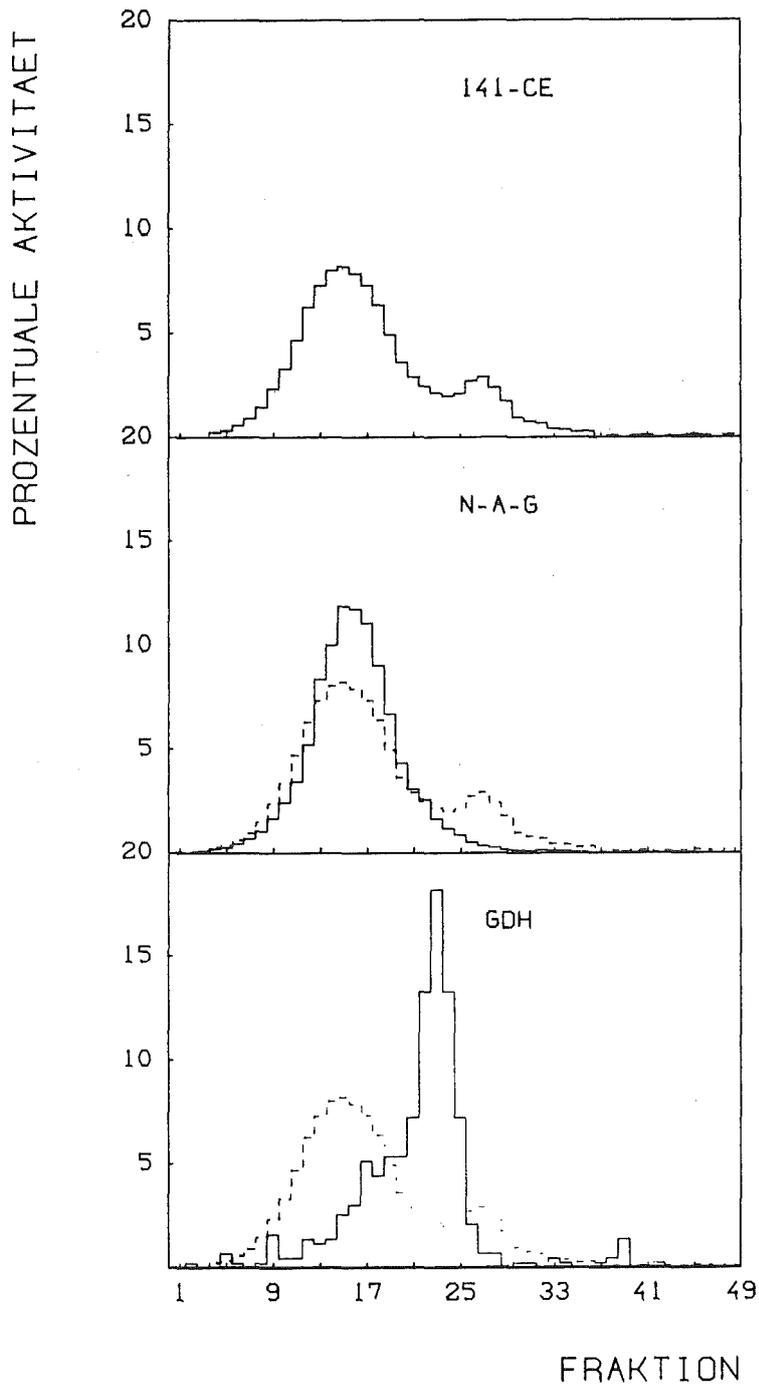


Abb. 8 : Verteilung von  $^{141}\text{Ce}$  (2. und 9. Tag nach Injektion) und Enzymen nach der Injektion von  $^{141}\text{Ce}$  mit 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  aus der ML-Fraktion von Lebern von Rattenmännchen nach Trägerfreier Elektrophorese. Repräsentativ für drei Versuche. Das  $^{141}\text{Ce}$ -Profil ist bei den Enzymen nochmals gestrichelt eingezeichnet. Nähere Angaben siehe Abb. 5

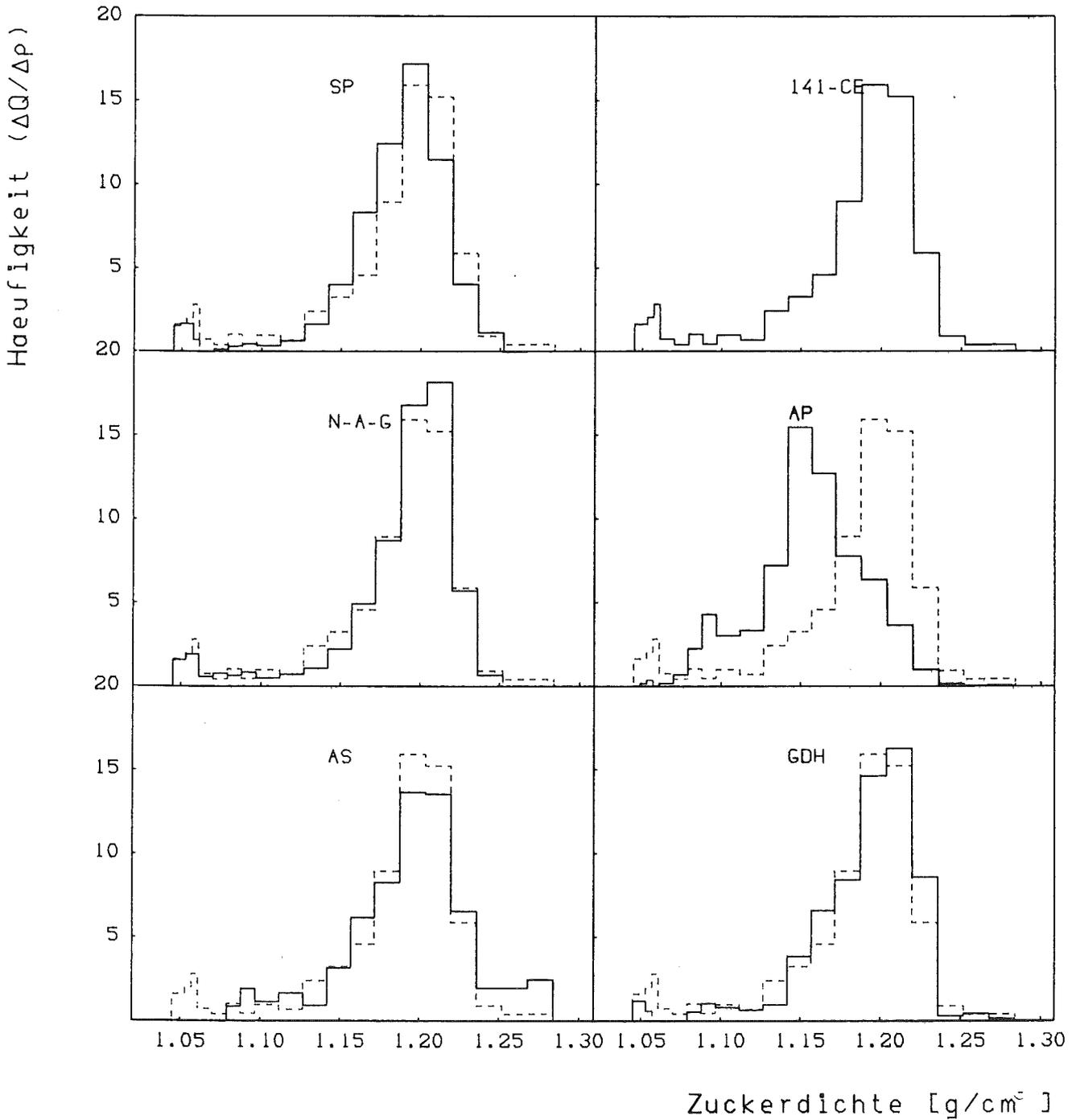


Abb. 9 : Verteilung von trägerfreiem <sup>141</sup>Ce (2. und 9. Tag nach Injektion) und Enzymen aus der ML-Fraktion von Lebern von Rattenweibchen nach Zentrifugation im linearen Saccharosegradienten. Repräsentativ für zwei Versuche. Das <sup>141</sup>Ce-Profil ist bei den Enzymen nochmals gestrichelt eingezeichnet.

Abszisse: Zuckerichte

Ordinate: Quotient aus relativem Gehalt der Komponenten in der Fraktion (ΔQ) und Dichteunterschied zwischen den Fraktionen (Δρ)

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

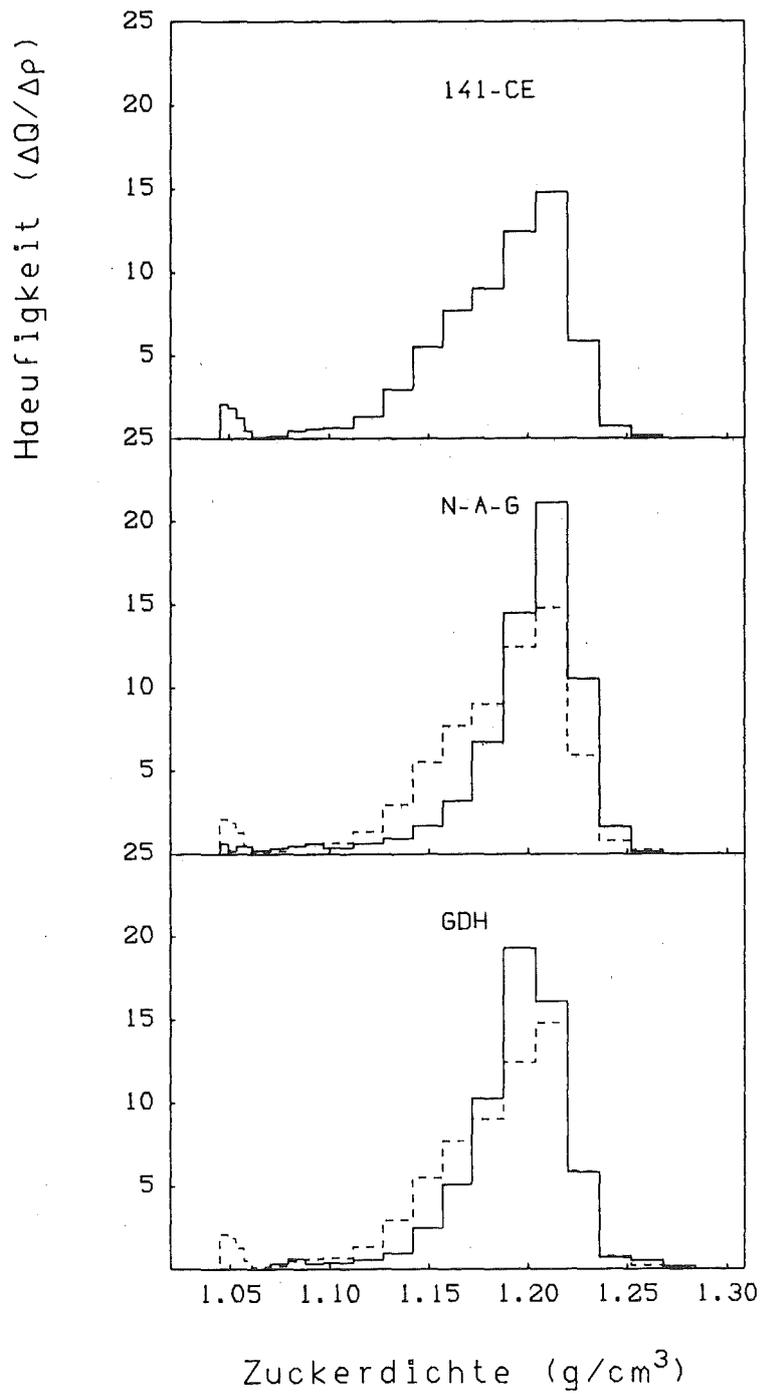


Abb.10 : Verteilung von trägerfreiem  $^{141}\text{Ce}$  (2. und 9. Tag nach Injektion) und Enzymen aus der ML-Fraktion von Lebern von Rattenmännchen nach Zentrifugation im linearen Saccharosegradienten. Repräsentativ für drei Versuche. Das  $^{141}\text{Ce}$ -Profil ist bei den Enzymen nochmals gestrichelt eingezeichnet  
Nähere Angaben siehe Abb. 9

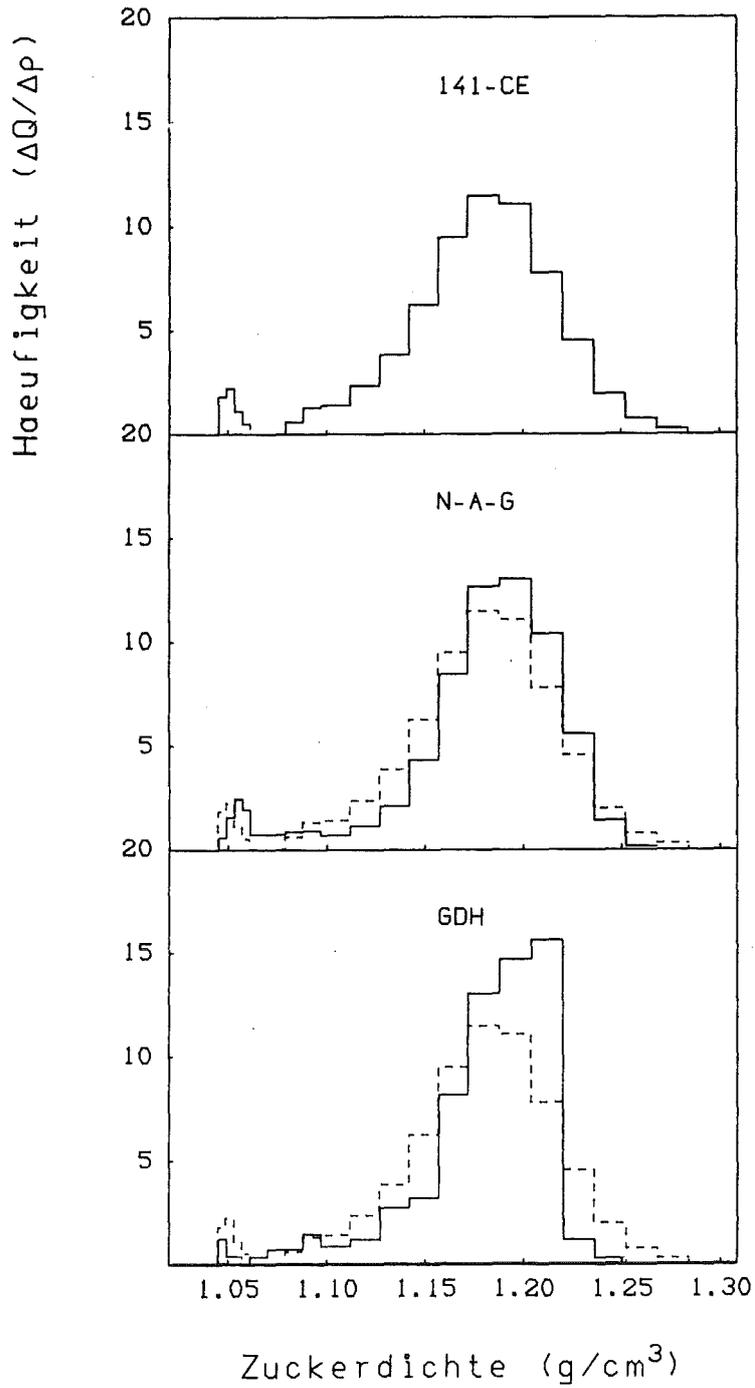


Abb.11 : Verteilung von  $^{141}\text{Ce}$  (2. und 9. Tag nach Injektion) und Enzymen nach Injektion von  $^{141}\text{Ce}$  mit 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$  aus der ML-Fraktion von Lebern von Rattenweibchen nach Zentrifugation im linearen Saccharosegradienten. Repräsentativ für drei Versuche. Das  $^{141}\text{Ce}$ -Profil ist bei den Enzymen nochmals gestrichelt eingezeichnet  
Nähere Angaben siehe Abb. 9

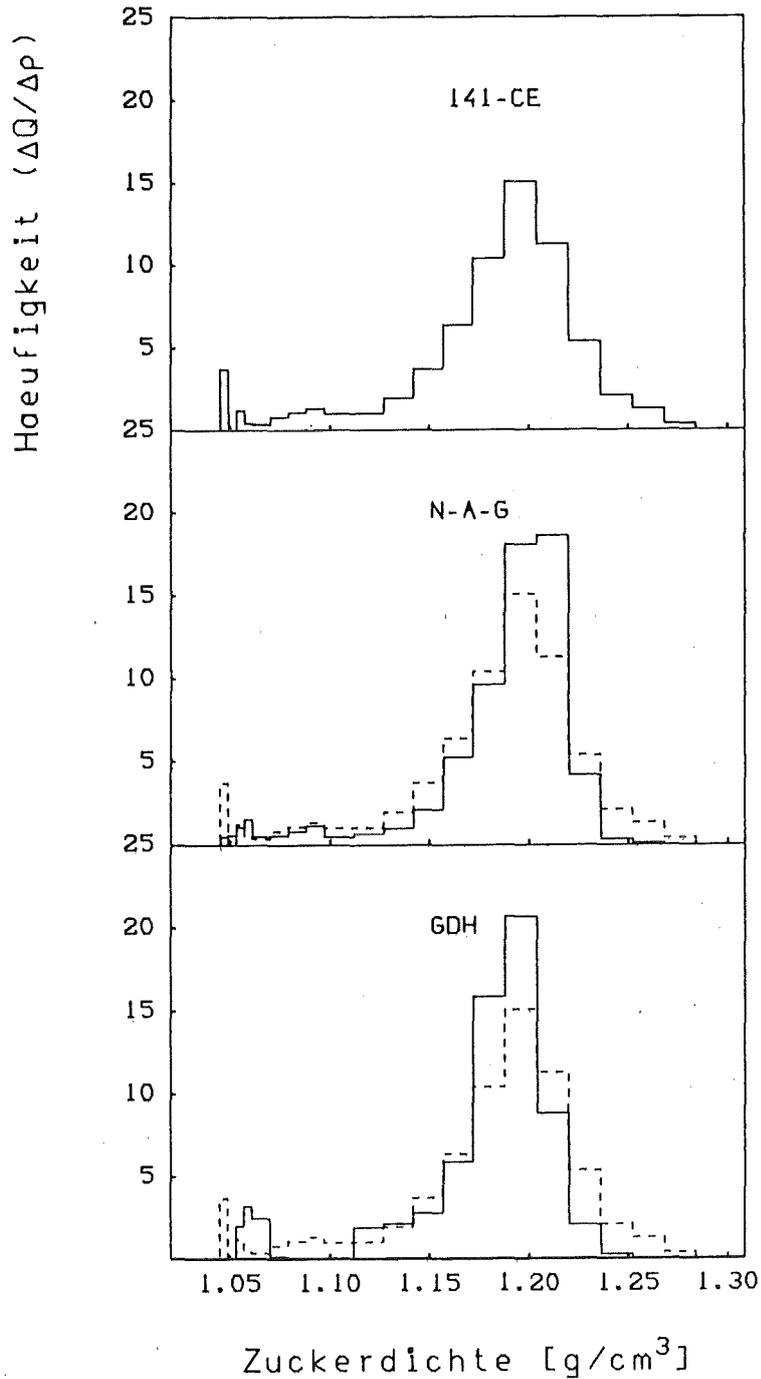


Abb.12 : Verteilung von  $^{141}\text{Ce}$  (2. und 9. Tag nach Injektion) und Enzymen nach Injektion von  $^{141}\text{Ce}$  mit  $2 \text{ mg/kg CeCl}_3$  aus der ML-Fraktion von Lebern von Rattenmännchen nach Zentrifugation im linearen Saccharosegradienten. Repräsentativ für drei Versuche. Das  $^{141}\text{Ce}$ -Profil ist bei den Enzymen nochmals gestrichelt eingezeichnet  
Nähere Angaben siehe Abb. 9

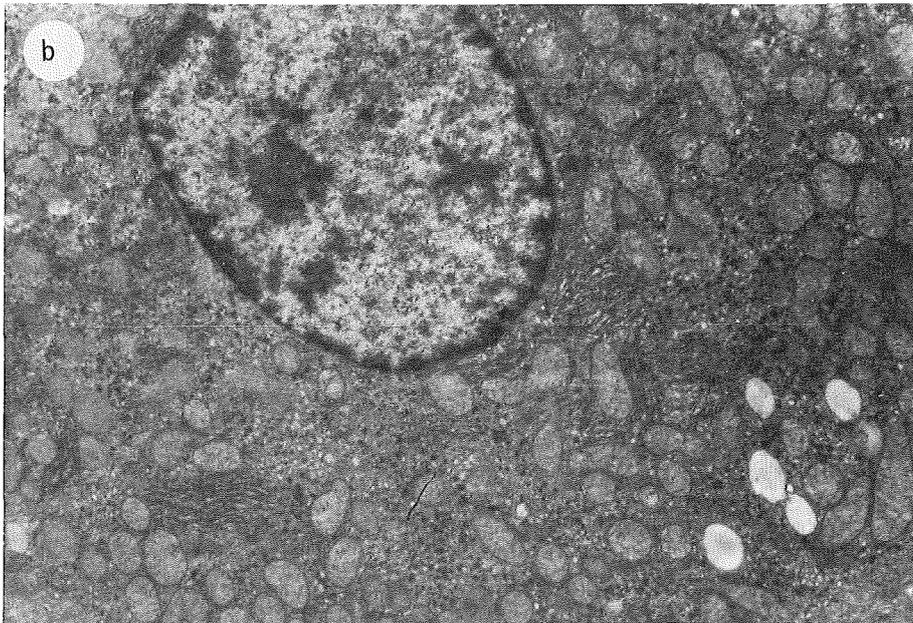
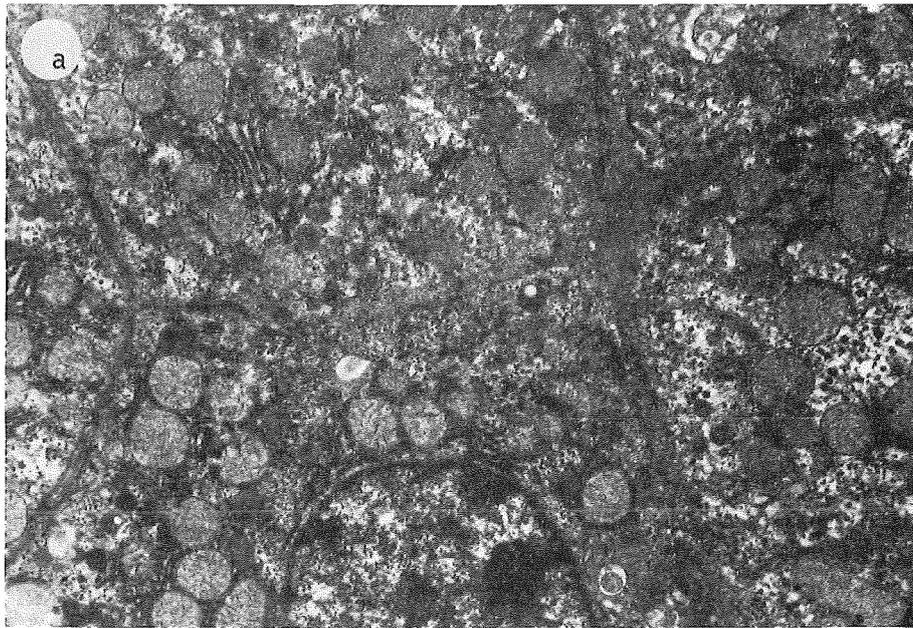


Abb.13 a+b: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Rattenlebern  
von Kontrollweibchen  
Vergrößerung: x6000

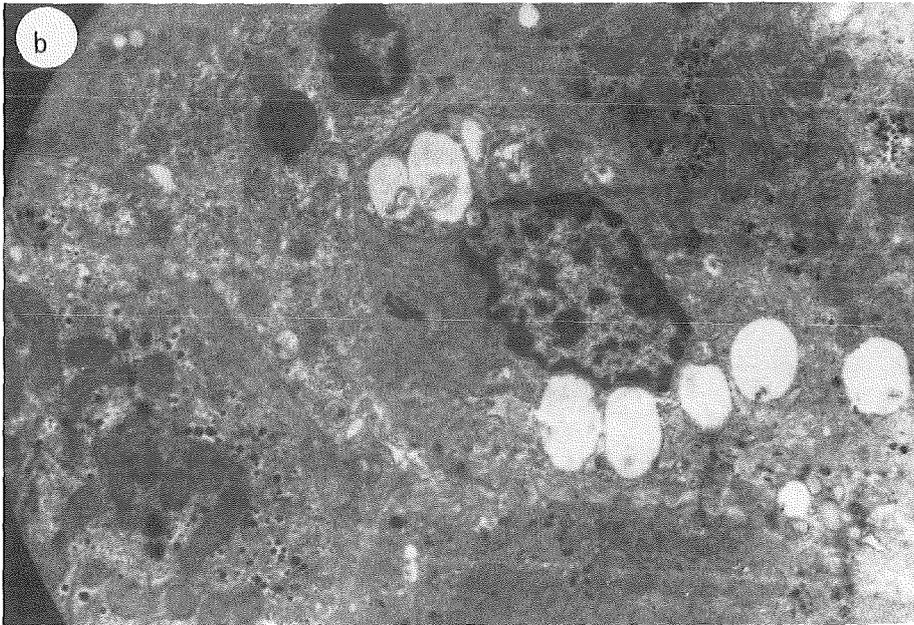
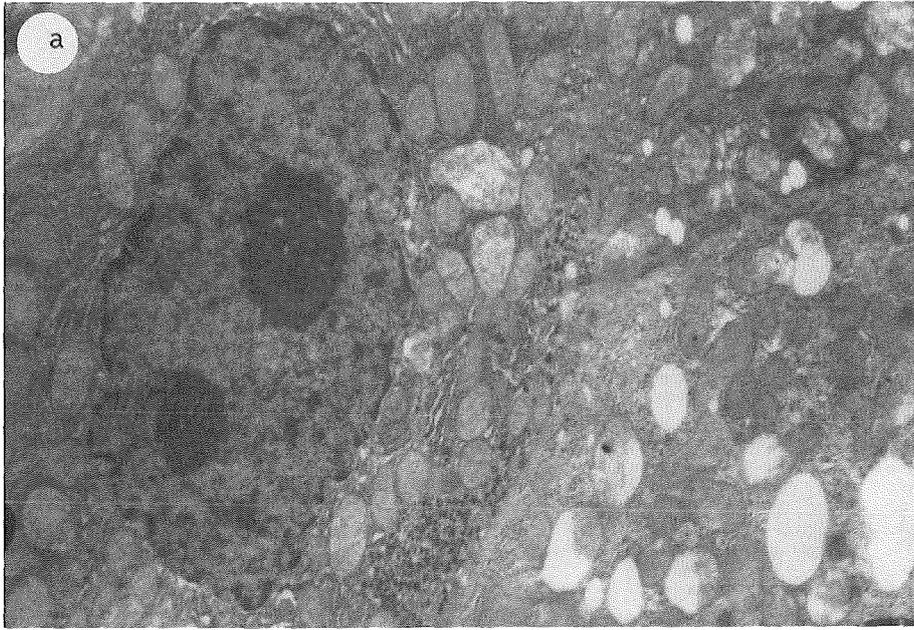


Abb.14 a+b: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Lebern von Rattenweibchen am 2. Tag nach der Injektion von 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$   
Vergrößerung: x6000

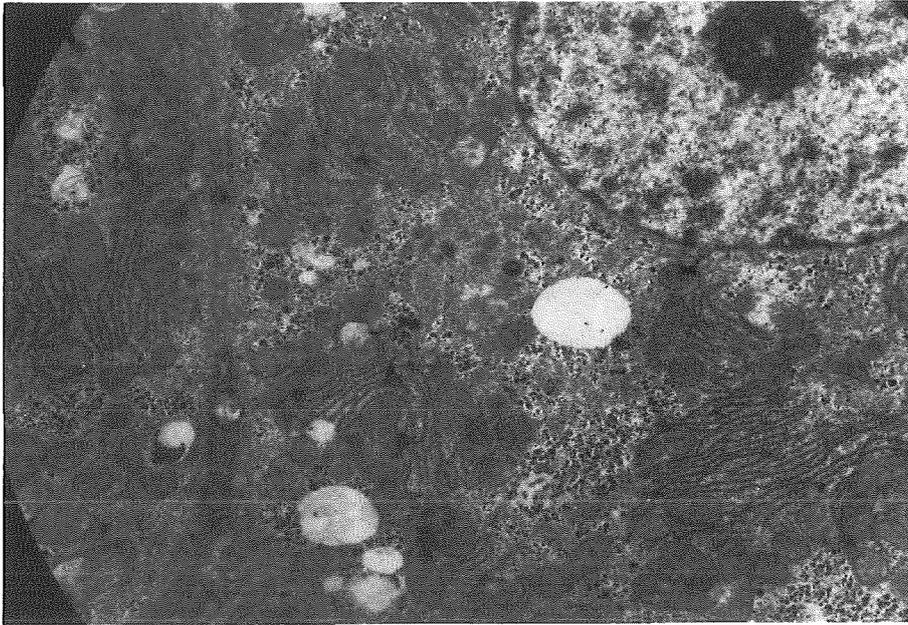


Abb.15 : Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Lebern von Rattenmännchen am 2. Tag nach der Injektion von 2 mg/kg  $\text{CeCl}_3$   
Vergrößerung: x6000

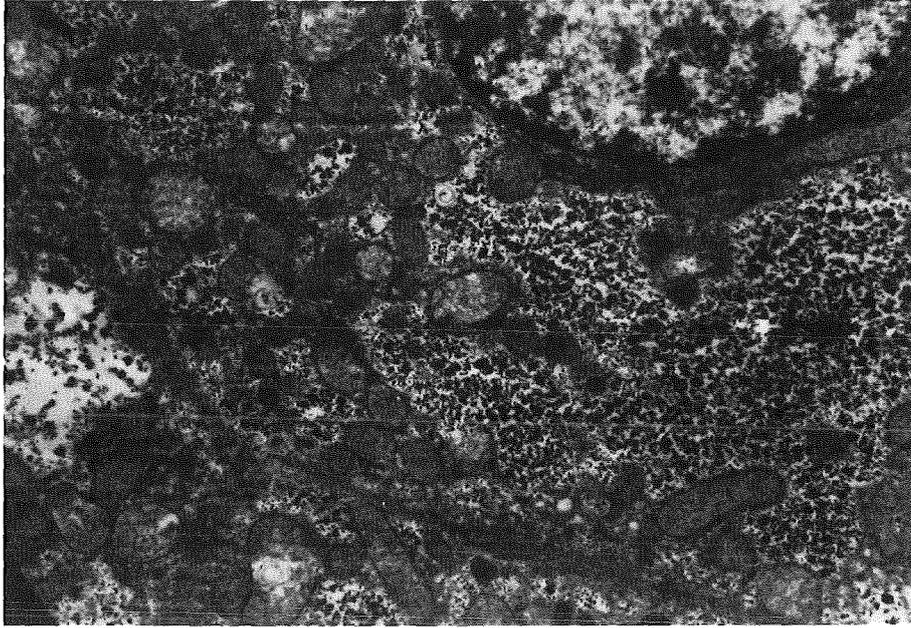


Abb.16 : Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Lebern von Rattenweibchen am 2. Tag nach der Injektion von 2 mg/kg  $\text{GaCl}_3$   
Vergrößerung: x6000

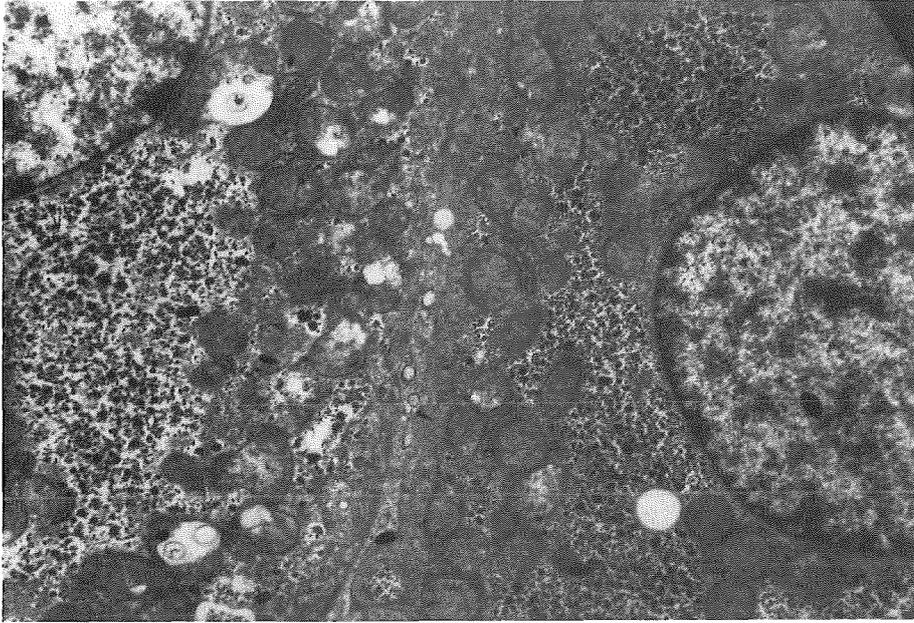


Abb.17 : Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Lebern von Rattenmännchen am 2. Tag nach der Injektion von 2 mg/kg  $\text{GaCl}_3$   
Vergrößerung: x6000

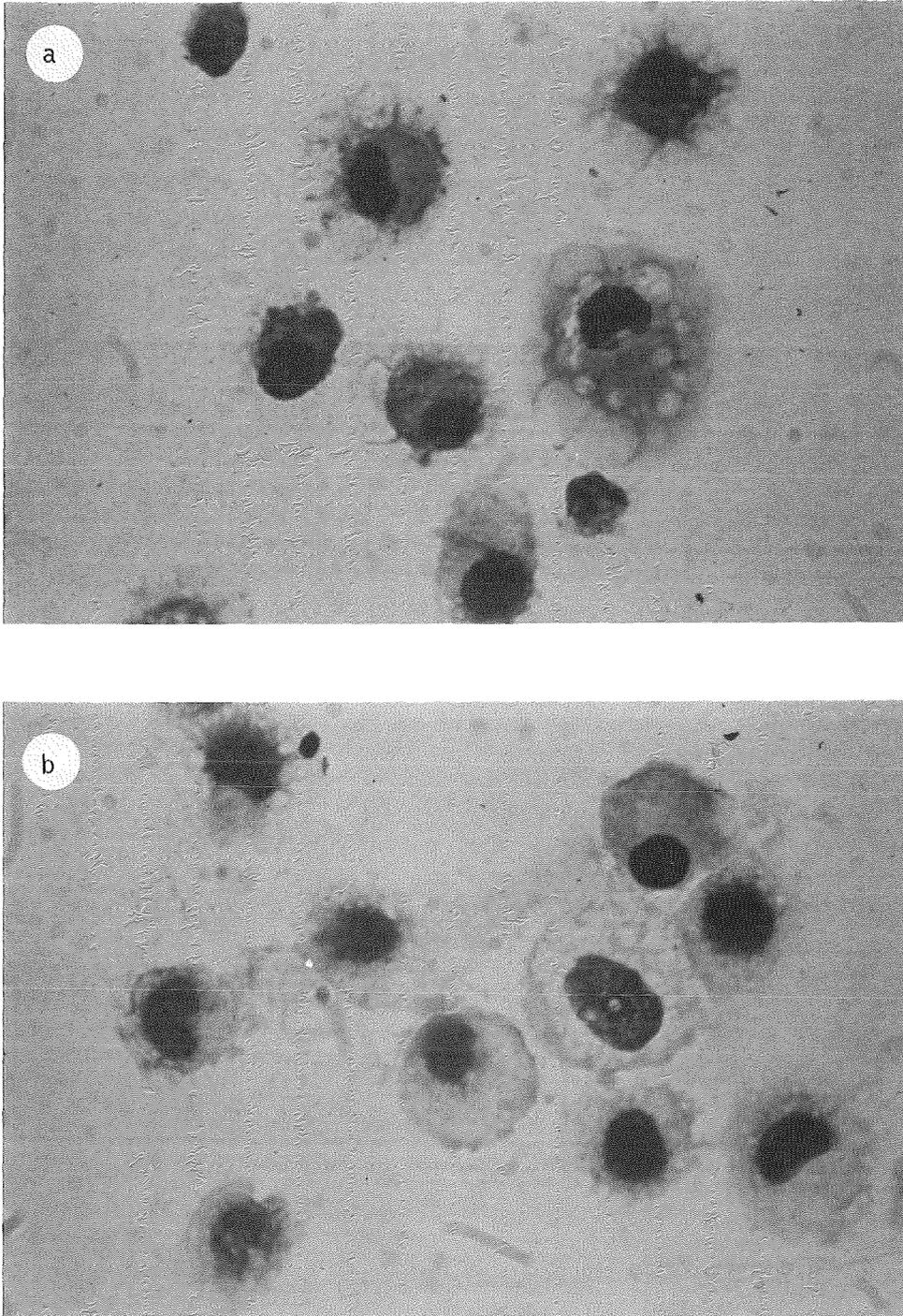


Abb.18 : Alveolarmakrophagen von Rattenweibchen in Kultur nach 18 Std. Inkubation in RPMI-Medium ohne und mit  $100 \mu\text{M CeCl}_3$   
Hemacolor-Schnellfärbung

Vergrößerung:  $\times 1600$

18a: Inkubation in RPMI-Medium ohne  $\text{CeCl}_3$

18b: Inkubation in RPMI-Medium mit  $100 \mu\text{M CeCl}_3$

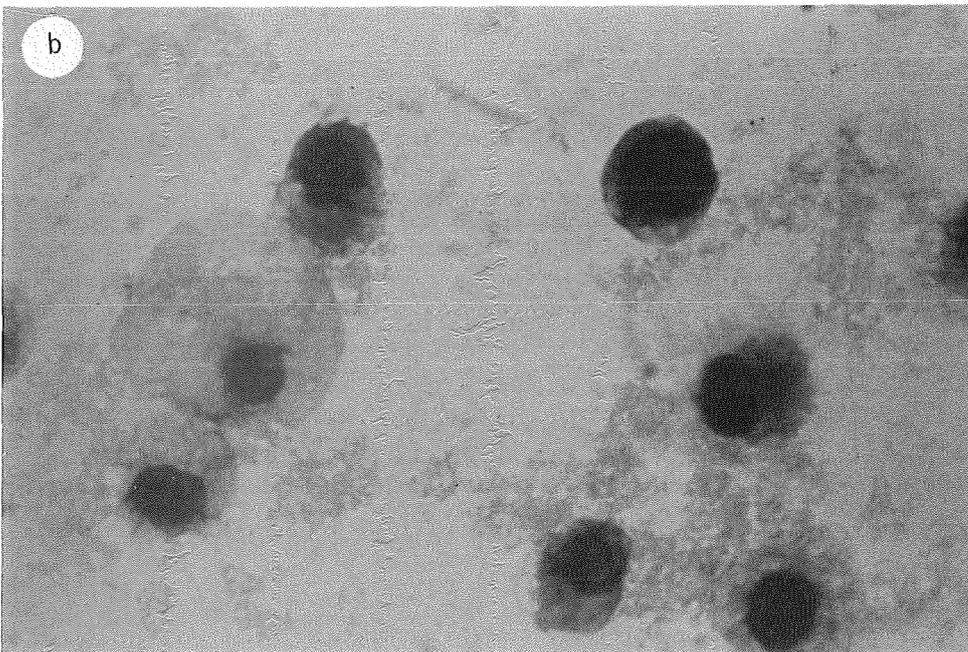
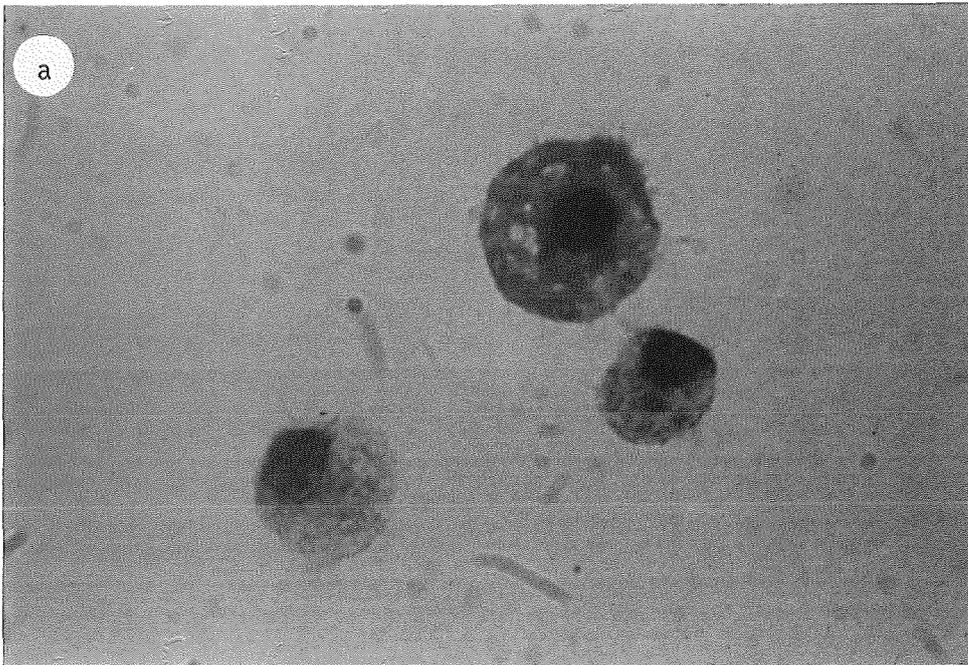


Abb.19 : Alveolarmakrophagen von Rattenmännchen in Kultur nach 18 Std. Inkubation in RPMI-Medium ohne und mit  $100 \mu\text{M CeCl}_3$   
Hemacolor-Schnellfärbung

Vergrößerung: x1600

19a: Inkubation in RPMI-Medium ohne  $\text{CeCl}_3$

19b: Inkubation in RPMI-Medium mit  $100 \mu\text{M CeCl}_3$

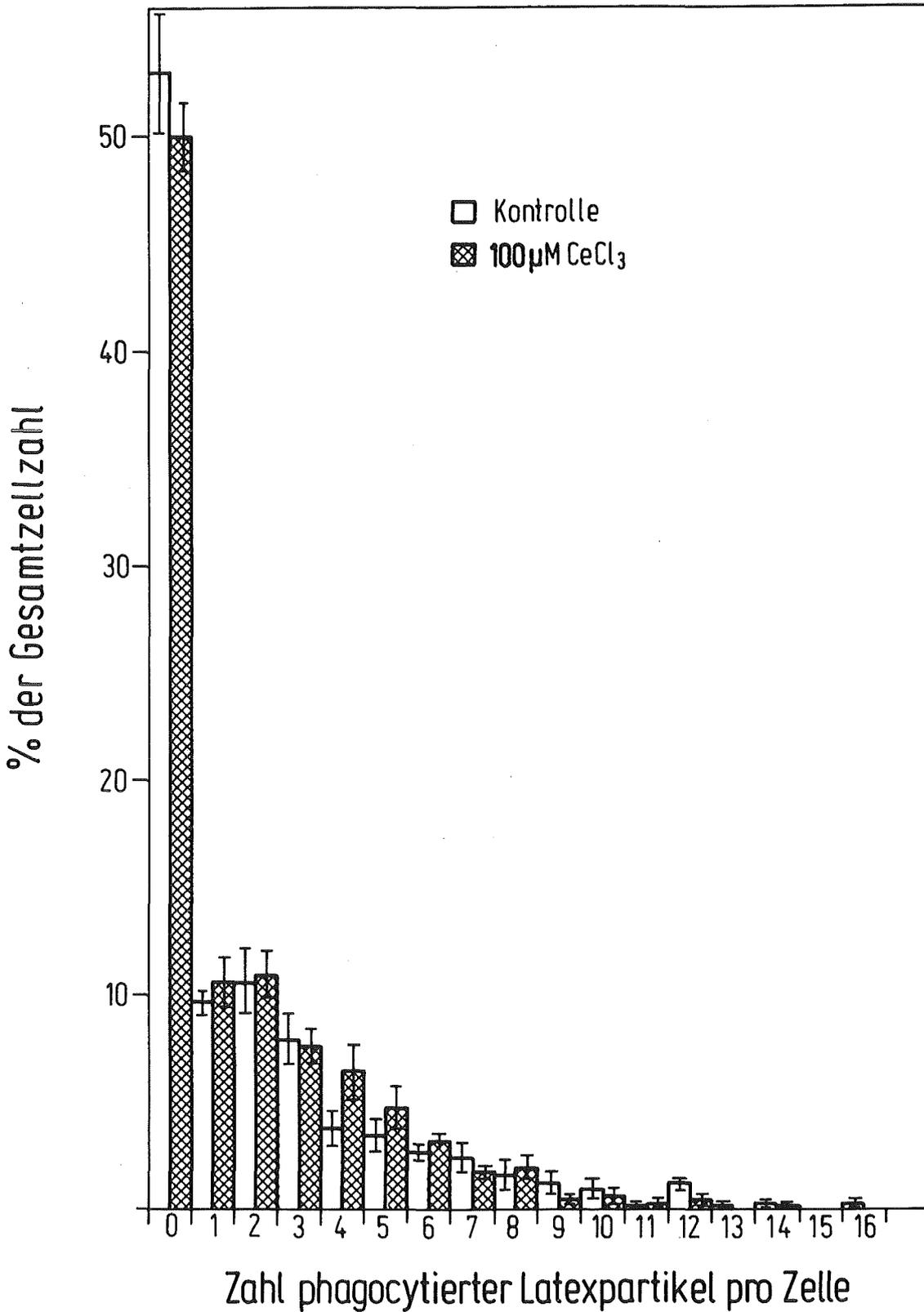


Abb.20 : Häufigkeitsverteilung der Phagozytose von Latexpartikel bei Rinder-alveolarmakrophagen in Kultur. Die Zellen wurden 14 Std. in RPMI-Medium ohne (=Kontrolle) und mit 100 µM CeCl<sub>3</sub> inkubiert und anschließend 1 Std. in ihrem jeweiligen Medium mit 2,02 µm Latexpartikel

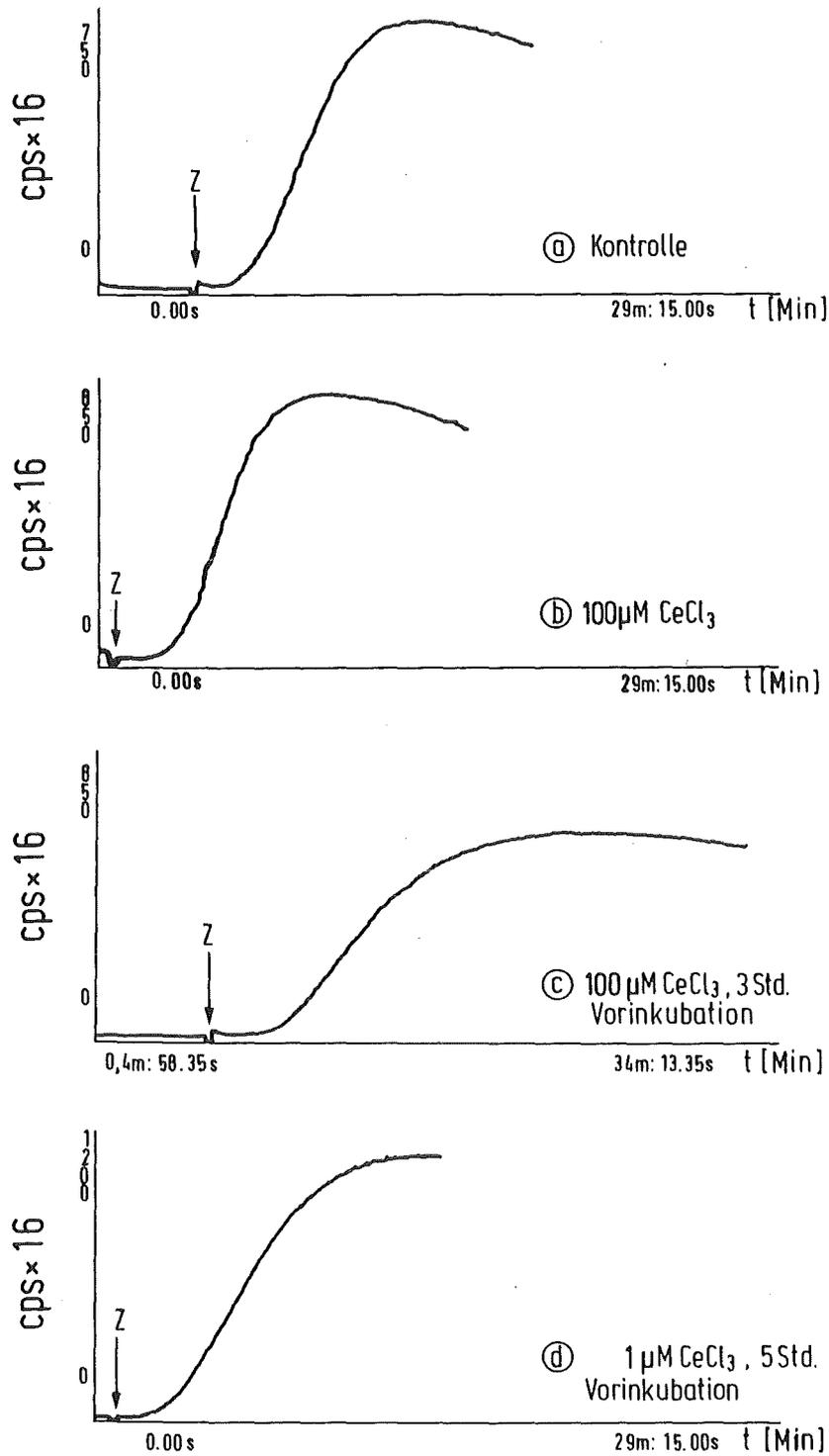


Abb.21 : Chemilumineszenzmessungen an Rinderalveolarmakrophagen in Kultur. Bis zum Versuchsbeginn (=Start der Messung oder Beginn der Vorinkubation) wurden die Zellen 14-16 Std. in RPMI-Medium ohne  $CeCl_3$  inkubiert. Z=Zymosanzugabe

- 21a: Kontrolle, Messung in RPMI-Medium ohne  $CeCl_3$
- 21b: Messung in RPMI-Medium mit  $100 \mu M CeCl_3$
- 21c: 3 Std. Vorinkubation in RPMI-Medium mit  $100 \mu M CeCl_3$ , anschließend Messung im selben Medium
- 21d: 5 Std. Vorinkubation in RPMI-Medium mit  $1 \mu M CeCl_3$ , anschließend Messung im selben Medium

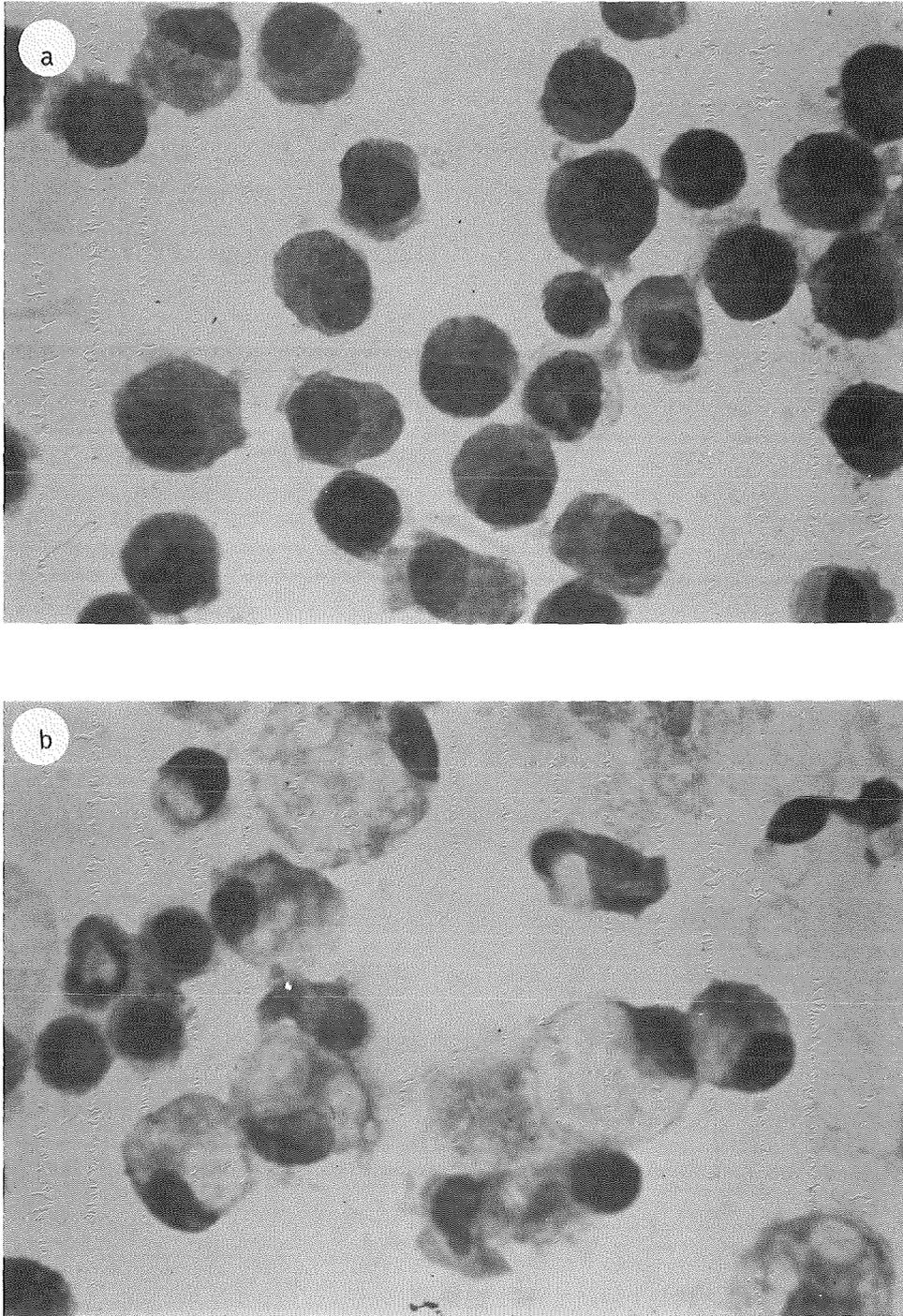


Abb.22 : Rinderalveolarmakrophagen in Kultur nach 14 Std. Inkubation in RPMI-Medium ohne und mit  $100 \mu M CeCl_3$   
Hemacolor-Schnellfärbung  
Vergrößerung: x1600

22a: Inkubation in RPMI-Medium ohne  $CeCl_3$

22b: Inkubation in RPMI-Medium mit  $100 \mu M CeCl_3$

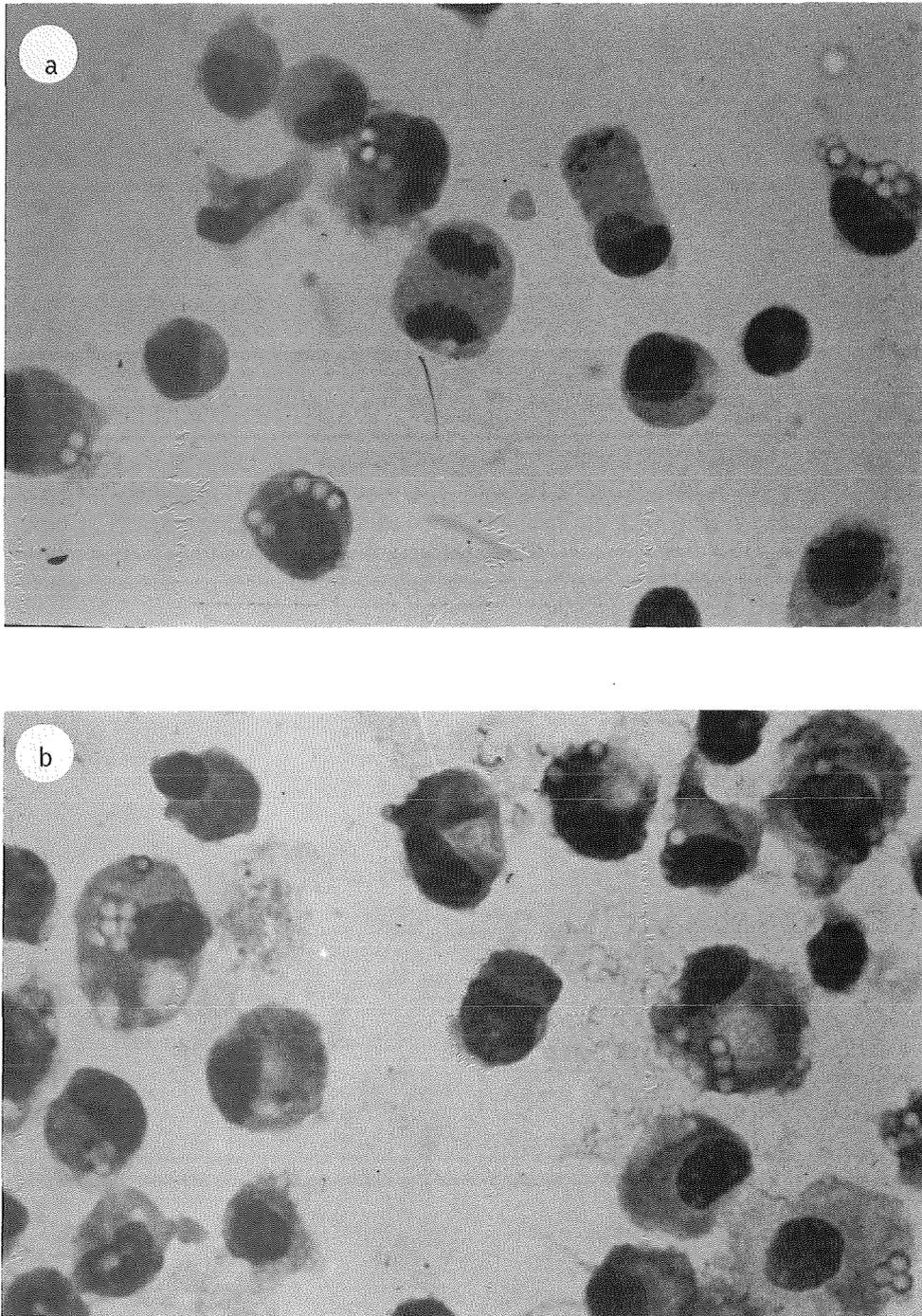


Abb.23 : Rinderalveolarmakrophagen in Kultur nach 14 Std. Inkubation in RPMI-Medium ohne und mit  $100 \mu\text{M CeCl}_3$  und anschließender 1-stündiger Inkubation im jeweiligen Medium mit  $2,02 \mu\text{m}$  Latexpartikel  
Hemacolor-Schnellfärbung

Vergrößerung: x1600

23a: Inkubation in RPMI Medium ohne  $\text{CeCl}_3$

23b: Inkubation in RPMI-Medium mit  $100 \mu\text{M CeCl}_3$

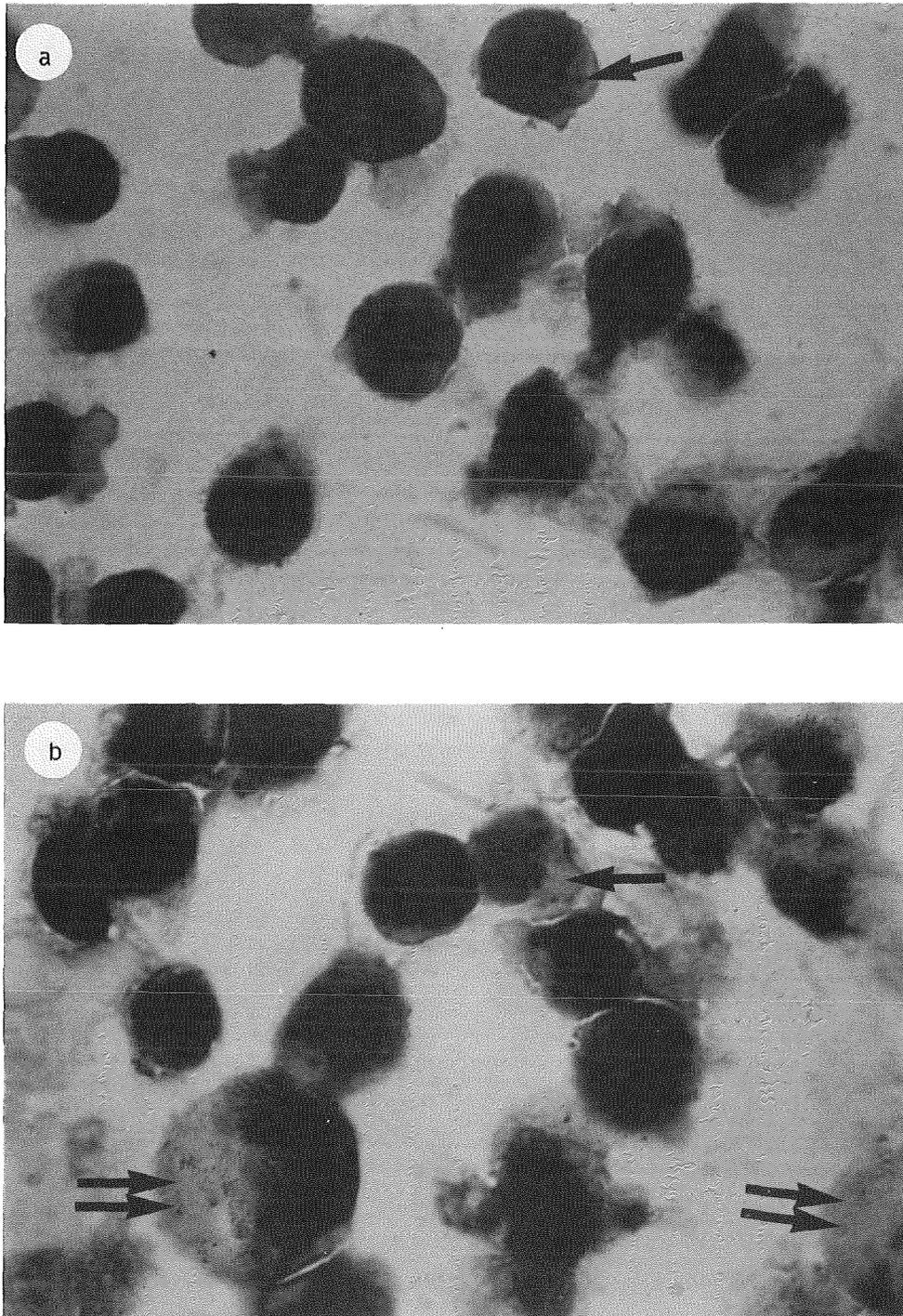
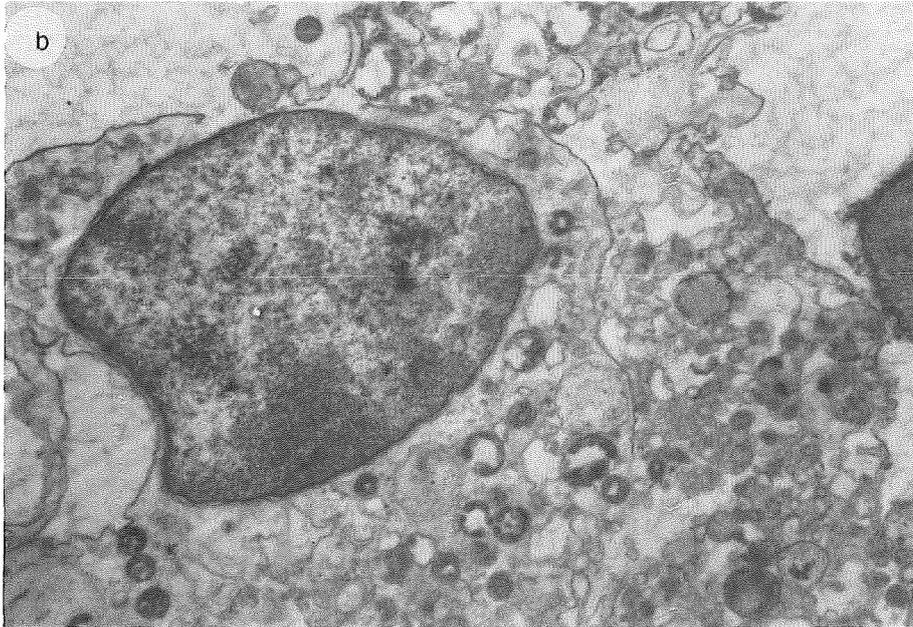
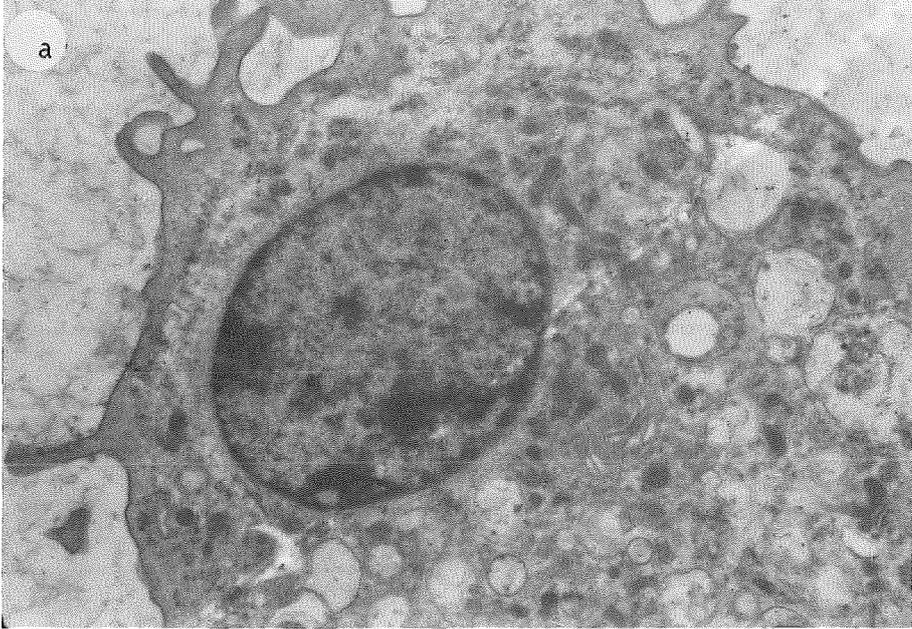


Abb.24 : Färbung auf Unspezifische Esteraseaktivität an Rinderalveolarmakrophagen in Kultur nach 14 Std. Inkubation in RPMI-Medium ohne und mit  $100 \mu M CeCl_3$ . Der Pfeil weist auf die Kerne hin  
Vergrößerung: x1600

24a: Inkubation in RPMI-Medium ohne  $CeCl_3$

24b: Inkubation in RPMI-Medium mit  $100 \mu M CeCl_3$ . Der Doppelpfeil weist auf das nur schwach angefärbte Cytoplasma der aufgeblähten Zellen hin



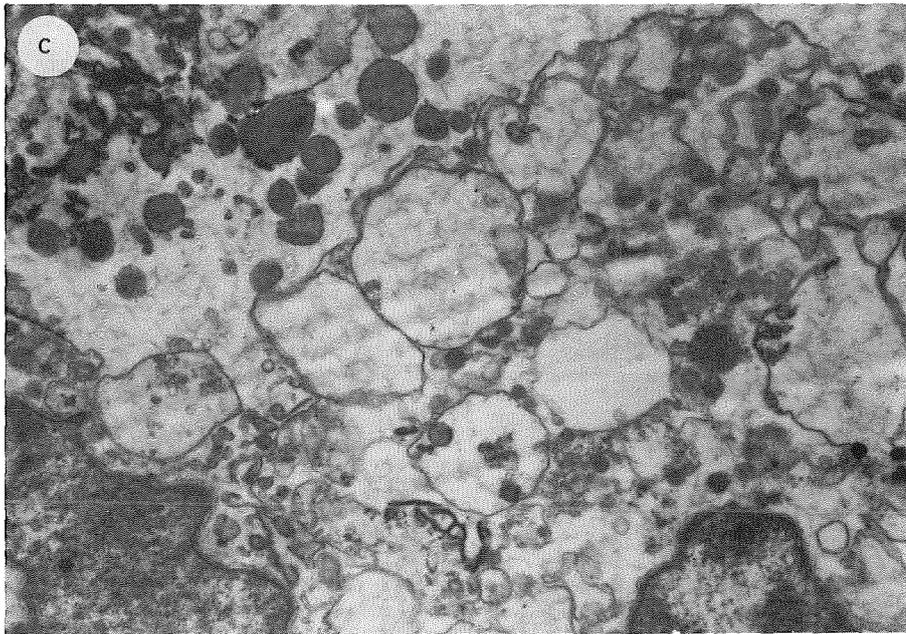
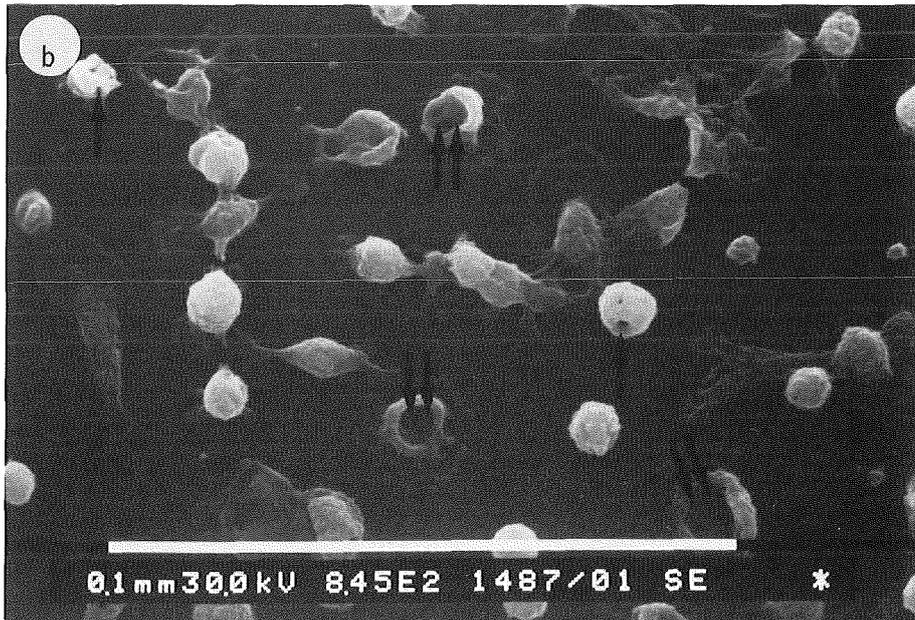
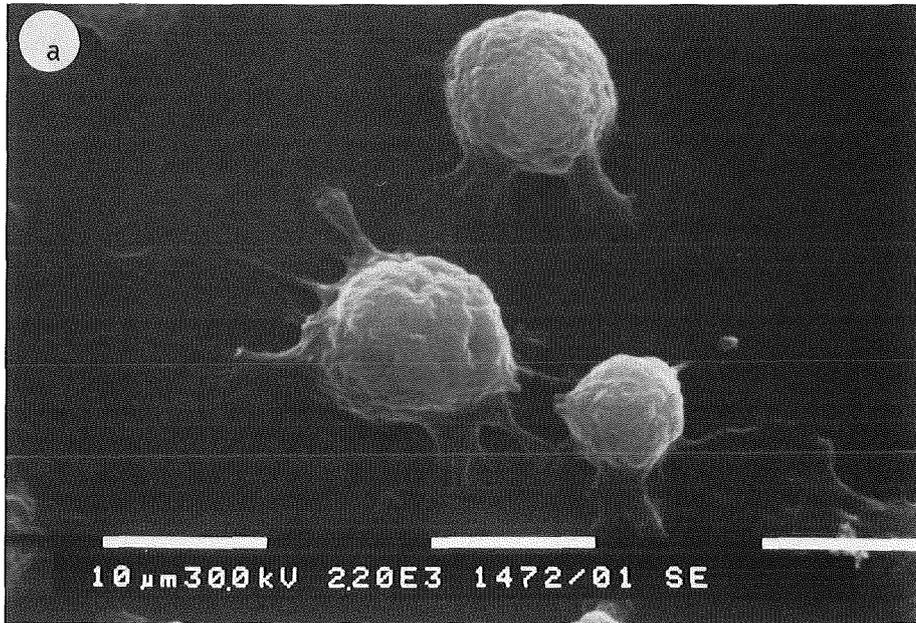
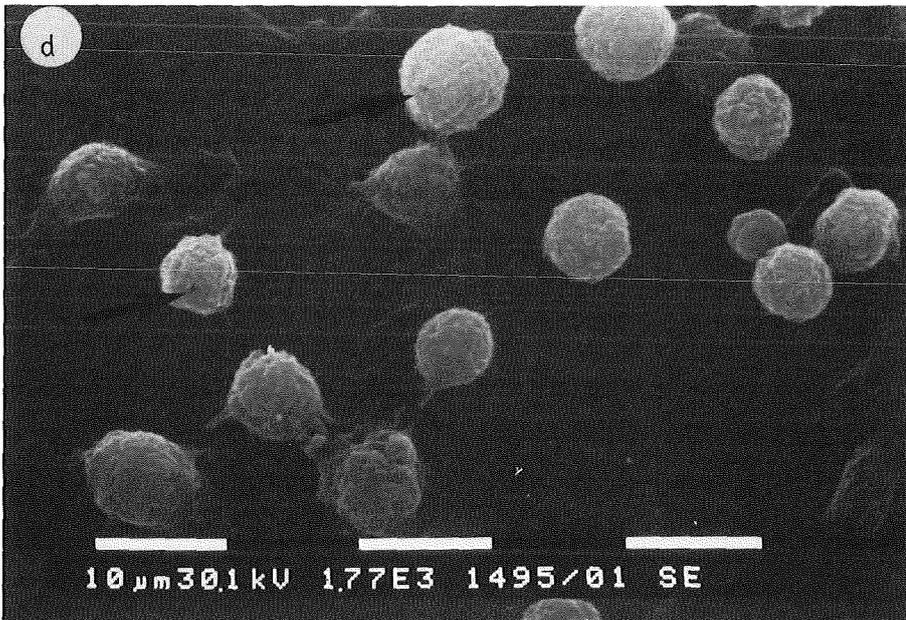
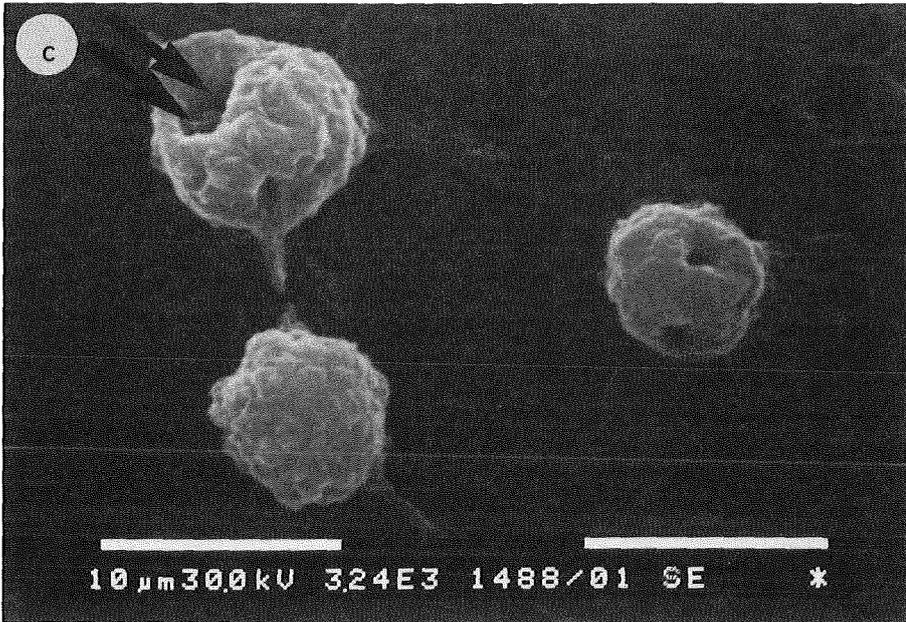


Abb.25 : Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Rinderalveolar-  
makrophagen in Kultur nach 14 Std. Inkubation in HEPES- Medium (10%  
fötales Kälberserum) ohne und mit  $\text{CeCl}_3$  und anschließender 1-stünd-  
iger Inkubation im jeweiligen Medium mit  $0,8 \mu\text{m}$  Latexpartikel  
Vergrößerung: x6000

- 25a: Inkubation in Medium ohne  $\text{CeCl}_3$
- 25b: Inkubation in Medium mit  $1000 \mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$
- 25c: Wie 25b
- 25d: Inkubation in Medium mit  $1 \mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$





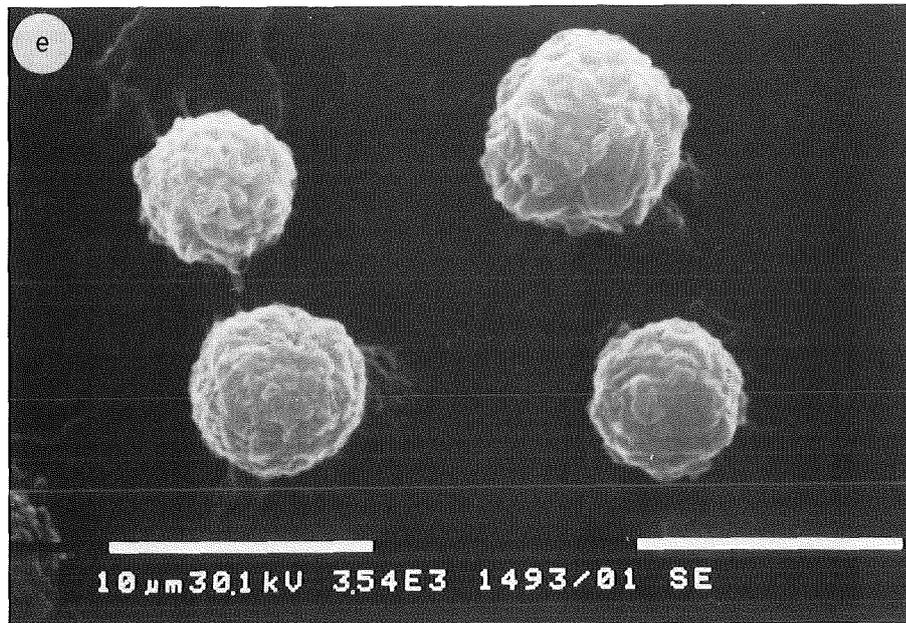


Abb.26 : Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Rinderalveolarmakrophagen in Kultur nach 14 Std. Inkubation in RPMI-Medium ohne und mit  $\text{CeCl}_3$ . Die Zellen verblieben für die Aufnahmen auf den Petrischalen. Der Pfeil weist auf die Löcher, der Doppelpfeil auf die Einstülpungen in den Zellen hin

- 26a: Inkubation in RPMI-Medium ohne  $\text{CeCl}_3$
- 26b: Inkubation in RPMI-Medium mit  $100 \mu\text{M CeCl}_3$ , Übersichtsaufnahme
- 26c: Inkubation in RPMI-Medium mit  $100 \mu\text{M CeCl}_3$
- 26d: Inkubation in RPMI-Medium mit  $1 \mu\text{M CeCl}_3$ , Übersichtsaufnahme
- 26e: Inkubation in RPMI-Medium mit  $1 \mu\text{M CeCl}_3$