

Sonderdruck

Bile Acids in Human Diseases

II. Bile Acid Meeting
Freiburg i. Br., June 30—July 1, 1972

EDITORS:

P. BACK and W. GEROK

Medizinische Universitätsklinik, Freiburg i. Br.

117 Figures, 40 Tables



F. K. SCHATTAUER VERLAG · STUTTGART-NEW YORK

Intracellular Distribution of Bile Acids in Liver Tissue

U. LEUSCHNER, A. ALFURAYH, H. J. WILDGRUBE und W. ERB

Zahlreiche Untersuchungen zum Gallensäurenstoffwechsel in der Leber wurden an isolierten Zellorganellen mit Hilfe enzymatischer Methoden durchgeführt. Über die Lokalisation von Gallensäuren in der Leberzelle selbst ist dagegen nur relativ wenig bekannt. Um die Verteilung der Gallensäuren in der Zelle zu ermitteln, haben wir durch präparative Differentialzentrifugation in 0,25 molarer Saccharose und 0,44 molarer Glukose Zellorganellen männlicher Wistar-Ratten isoliert und versucht, saure Sterine in diesen Fraktionen gaschromatographisch nachzuweisen. Leider mußten wir dabei feststellen, daß bei der alkalischen Hydrolyse die Zucker karamelisierten und ein großer Teil der Gallensäuren verloren ging. Wir haben daher zwei Wege beschritten:

Durch Zusatz von 2 g *Saccharomyces cerevisiae*/100 ml Testansatz bauten wir den Zucker bei 37° C in 48 Std. ab und bestimmten anschließend den Gallensäuregehalt. Diese Untersuchungen führten wir einmal an Testansätzen durch, die frei von Lebergewebe waren, und in glukosehaltigen und glukosefreien Leberhomogenaten. Während in den Testansätzen, also in den Ansätzen, die ohne Lebergewebe angesetzt worden waren, die Wiederfindungsrate der Gallensäuren praktisch identisch war, hatten wir bei den lebergewebshaltigen Ansätzen für die Cholsäure einen Verlust von etwa 35%, für die Chenodesoxycholsäure lag er bei 17%.

Wir haben für unsere Untersuchungen diesen Weg daher zunächst nicht beschritten, sondern zogen die Differentialzentrifugation in Kaliumchloridlösung vor. Wir arbeiteten mit 0,15 molarer KCl, 0,05 molarer EDTA Lösung und modifizierten die zahlreichen aus der Literatur bekannten Methoden der Differentialzentrifugation in dem Sinne, daß wir besonderen Wert auf die Trennung zwischen der mitochondrialen und der mikrosomalen Fraktion legten.

Unsere Untersuchungen wurden mit der Ultrazentrifuge MSE 50 TC durchgeführt, alle Angaben beziehen sich auf einen Winkelrotor mit dem Radius von 5,6 cm. Wir haben durch 2 Vorfraktionen einmal bei 2000 Umdrehungen und einmal bei 600 U/min das Bindegewebe und das Gefäßsystem sowie die Gallengänge und intakten Leberzellen und Zellkerne abgetrennt und aus dem dann verbleibenden Überstand bei 3000 Umdrehungen, das sind etwa 580 xg, die Mitochondrien isoliert. Die weitere Abtrennung bei 98 000 g = 39 000 U/min führt zur Sedimentation von kleinen Mitochondrien, von Mikrosomen, Membranen und Lysosomen und des Golgi-Apparates. Sämtliche Fraktionen wurden licht- und elektronenmikroskopisch auf Reinheit und Strukturhaltung kontrolliert, weiterhin haben wir in den Fraktionen den Phospholipid-Phosphorgehalt

bestimmt. Die Ergebnisse stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein. Abb. 1 zeigt einen Überblick über eine Mitochondrienfraktion. Man sieht stark geschrumpfte Mitochondrien, hier hydropisch geschwollene, da Mitochondrien, bei denen sich die äußere Mitochondrienmembran abgelöst hat, was einer mikrosomalen Kontamination ähnelt. Auf der Abb. 1 erkennt man geschrumpfte Mitochondrien, wie sie auch von der

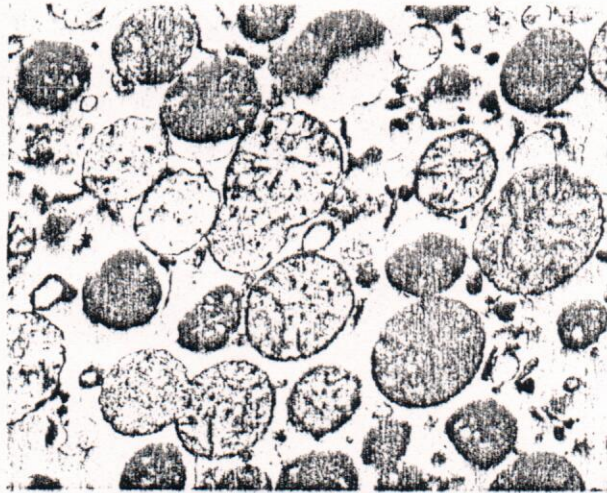


Abb. 1. Mitochondrienfraktion (0,15 M KCl, 0,05 M EDTA), 8000x.

Präparation mit Saccharoselösungen her bekannt sind. Die Abb. 2 zeigt die mikrosomale Fraktion. Man sieht Vesikel, Glykogenablagerungen und immer noch kleine Mitochondrien, die Kontamination war aber relativ gering; ferner ein Areal von vorwiegend rauhem endoplasmatischem Retikulum.

Die gas-chromatographische Analyse wurde nach den üblichen Verfahren durchgeführt, zur quantitativen Bestimmung von Gallensäuren verwendeten wir Desoxycholsäure und Lithocholsäure als inneren Standard. Wir haben den Gallensäuregehalt in jeweils 1 g Mitochondrien und Mikrosomenfraktion und im Gesamtüberstand von 230 bis 250 ml bestimmt. Diese Art der Berechnung ist bei der Leberzelle möglich, da sich Mikrosomen und Mitochondrien in der Zelle wie 1:1 verhalten, 10% der Zelle werden durch Kerne und 40% durch Zytoplasma dargestellt. Im Durchschnitt, wir haben hier nur 9 Versuche angeführt, Überstände haben wir 10 kontrolliert, fanden wir in 1 g Mitochondrienfraktion 32,2 μg , in 1 g Mikrosomenfraktion 369 μg Gallensäuren, was etwa einem Verhältnis von 1:11 entspricht. Im flüssigen Überstand hatten wir nur Spuren von Gallensäuren nachweisen können.

Die prozentuale Aufteilung der einzelnen Gallensäuren in den Fraktionen konnten wir nicht exakt ermitteln, dazu war die Anzahl unserer Untersuchungen noch zu gering.

Es fällt auf, daß die Lithocholsäure in der mikrosomalen Fraktion um 100% höher liegt als in der mitochondrialen, die β -Muricholsäure ist um etwa 50% erhöht. Da die Möglichkeit besteht, daß bei 98 000 xg, oder 39 000 U/min, Makromoleküle des Zytoplasmas mit den Mikrosomen sedimentieren und dadurch eine Kontamination der Mikrosomenfraktion durch sonst im Zytoplasma gelegene Gallensäuren entsteht, haben wir die von CLAUDE angewandte Methode nachvollzogen und die Mikrosomen mit 17 500 U/min oder 20 000 xg abgetrennt. Dabei fanden wir im Zytoplasma 60 μ g Gallensäuren/2 g, so daß wir, wenn wir unsere Befunde zusammenfassen, sagen können: 95% aller Gallensäuren sind in der Leber strukturgebunden, 5% im Zytoplasma gelöst. Von den gebundenen Gallensäuren fanden wir 11% in der Mitochondrienfraktion, 71% in der Mikrosomenfraktion, und 18% im Zytoplasma. Die im Zytoplasma vorhandenen Gallensäuren waren an solche Moleküle gebunden, die zwischen 20 000 und 98 000 xg sedimentierten.

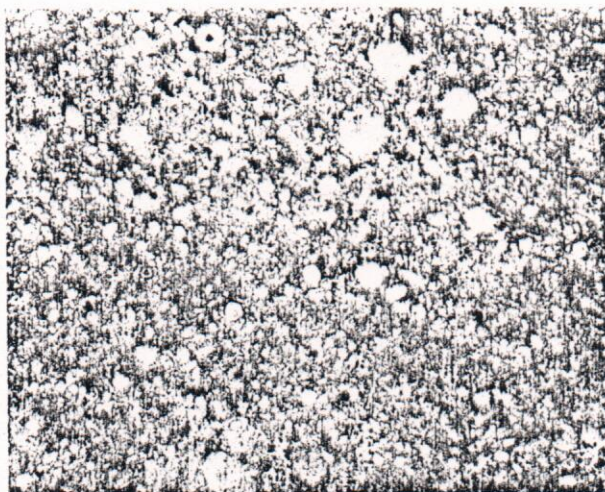


Abb. 2. Mikrosomenfraktion (0,15 M KCL, 0,5 M EDTA), 16 000x.

Summary

The analysis of bile acids by gas-chromatography in media containing glucose as used in preparative differential centrifugation of subcellular fractions was not possible because mono- und disaccharides became caramelised during alkaline deconjugation and acidic sterols were thereby lost. After degradation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*, the determination of bile acids was possible. Cholic acid showed a recovery of 65%, but the recovery of all the other cholanic acids was satisfactory. Because of the loss of cholic acid, we preferred differential centrifugation in an 0.15 molar potassium chloride solution. Bile acids were determined in the mitochondrial, microsomal fraction

and in the supernatant. Results: 95% of cellular bile acids were fixed to cell structures, and were not found to be soluble in cytoplasm. From this amount 71% were localised in the microsomal, and 11% in the mitochondrial fraction, 18% of bile acids were localised in the cytoplasm, and were fixed to macromolecules which settled between 20 000 and 98 000 xg, when differential centrifugation was performed.