

smear assay⁶ s.c. administered XII and XIII exhibited 16% and 18% the activity of s.c. administered estrone, respectively, and orally administered XII and XIII exhibited 37% and 17% the activity of s.c. administered estrone, respectively. In the ovariectomized rat treated with XIII and XV the inhibition of the increase of pituitary LH content was 140% and 15%, respectively, and of FSH content was 300% and 12%, respectively, that of estrone, when the compounds were administered s.c.

Hepatic excretory function, which can be altered by estrogen therapy in man and may be linked to changes in metabolic function in the liver⁷, was assessed following administration of XIII in both the rabbit and rat using

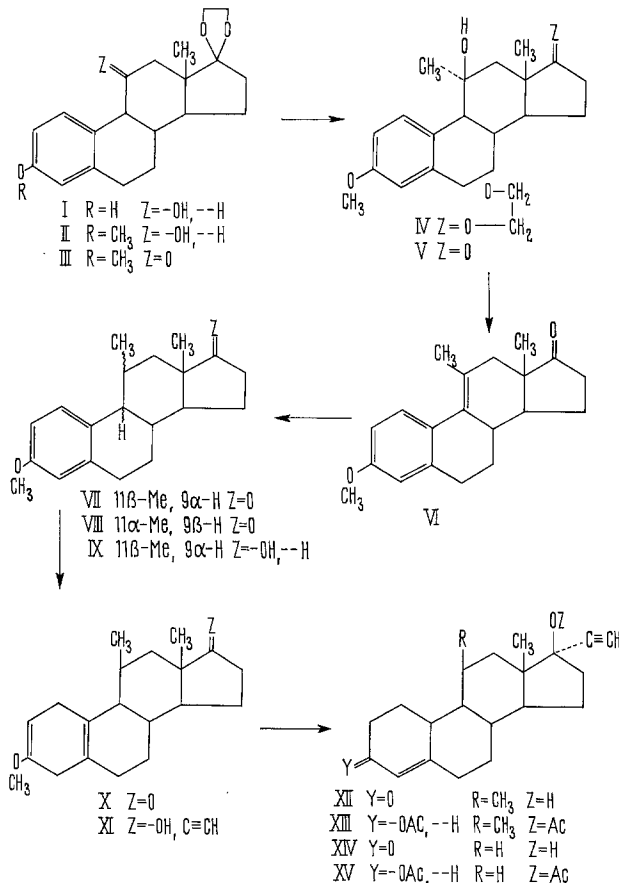
the sulforbromophthalein (BSP) test. The rabbit BSP test was performed according to the method of LENNON⁸ and the rat BSP test was done using a method similar to that reported by GALLAGHER et al.⁹ 17 α -Ethinyl estradiol, 17 β -estradiol, and sodium estrone 3-sulfate, when administered orally to rats at 0.5, 10 and 5 MPK per day, respectively, caused significant effects on BSP retention. The oral administration of XIII at 10 MPK per day for 4 days in the rabbit and at 20 MPK per day for 10 days in the rat failed to cause significant alteration in BSP retention¹⁰. In like manner, XV (Ethinodiol diacetate) and progesterone were devoid of effects on BSP retention in rats.

Thus, XIII may be similar to other progestational agents in failing to alter hepatic excretory function and may possess anovulatory properties without some of the metabolic effects which at times can be associated with mixtures of steroid hormones presently used in human fertility control. Because XIII also appears to exert, as a single substance, a buffering type of hormonal action, it may not exhibit some of the physiological effects exerted by higher doses of pure estrogenic or progestational agents.

Zusammenfassung. Die Synthese von 3 β ,17 β -Diacetoxy-17 α -Äthinyl-11 β -Methylestr-4-en (XII) wird beschrieben. Die Substanz besitzt besonders starke Antifertilitätseigenschaften, wie sie sonst nur Mischungen von Hormonen eigen sind, welche für die Humanfertililität benutzt werden, jedoch ohne deren Nebenwirkungen.

J. S. BARAN, H. D. LENNON,
S. E. MARES and E. F. NUTTING

Division of Chemical Research and
Division of Biological Research, G. D. Searle and Co.,
Skokie (Illinois 60076, USA), 23 February 1970.



- ⁶ J. D. BIGGERS and P. J. CLARINGBOLD, J. Endocrin. 11, 277 (1954).
⁷ M. N. MÜLLER and A. KAPPAS, J. clin. Invest. 44, 1214 (1965).
⁸ H. D. LENNON, J. Pharm. exp. Ther. 151, 143 (1966).
⁹ T. G. GALLAGHER JR., M. M. MÜLLER and A. KAPPAS, Trans. Ass. Am. Physicians 78, 187 (1965).
¹⁰ It should also be noted that oral administration of XIII at 5 MPK in the rat failed to cause any elevation of serum glutamic oxaloacetic transaminase levels.

Zur Leberregeneration der Ratte nach Teilhepatektomie während akuter CCl₄-Intoxikation¹

Nach Injektion von ³H-Thymidin wurde autoradiographisch der Ablauf der Leberzellproliferation bei gleichzeitiger kompensatorischer und reparativer Regeneration an eben ausgewachsenen Ratten untersucht. Als Reiz für die kompensatorische Regeneration diente dabei eine 2/3 Teilhepatektomie (2/3 TH) und als Stimulus für die reparative Regeneration eine akute CCl₄-Intoxikation, wobei wir relativ einheitliche, läppchenzentral gelegene, bis auf die Intermediärzone übergreifende Nekrosen induzierten. Als Funktion der Zeit nach diesen beiden Eingriffen überprüften wir folgende Faktoren: a) den Proliferationsumfang im Leberepithel gemessen am Prozentsatz DNS synthetisierender Kerne (³H-Index) und in Mitose befindliche Zellen (Mitose-Index), b) den Proliferationsmodus,

das heisst die DNS-Syntheserate (relative Neubildung/Zeiteinheit) sowie die Dauer der postsynthetischen Phase G₂ und der Mitose, c) den Proliferationsablauf in den Sternzellen. Die Befunde wurden solchen nach alleiniger 2/3 TH² konfrontiert.

Untersucht wurden männliche, im Mittel 240 g schwere Sprague-Dawley-Ratten, typische 2/3 TH zu beliebigen Tages- und Nachtzeiten, stets 3 h später CCl₄-Injektion i.p. (frisch bereitete 3% Lösung von reinem CCl₄ in

¹ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

² E. STÖCKER, Verh. dt. Ges. Path. 50, 53 (1966).

³ J. POST, A. KLEIN und J. HOFFMAN, Arch. Path. 70, 314 (1960).

Olivenöl, 0,03 ml/100 g Tiergewicht³), einmalige Injektion von 500 μ Ci 3 H-Thymidin i.p. (spez. Aktivität 3,0 Ci/mM, Schwarz Bio Research, USA) zwischen 8–10 h zu unterschiedlichen Zeiten (3–143 h) nach 2/3 TH, Tötung stets 3 h später, 2–3 Tiere/Zeitpunkt, Austausch des freien, nicht DNS gebundenen 3 H-Thymidins⁴, Autoradiographie mit Kodak AR 10 stripping film, Nachfärbung.

Aus der Figur ist abzuleiten, dass der 3 H-Index im Leberepithel nach alleiniger 2/3 TH schon 16 h, nach 2/3 TH + CCl₄ erst 24 h post operationem ansteigt. Der Kurvenverlauf ist bei 2/3 TH + CCl₄ zunächst ähnlich wie nach normaler 2/3 TH, allerdings liegt das Maximum höher und tritt mit etwa 16stündiger Verzögerung auf. Ab 48 h post operationem verläuft die Kurve jedoch anders als zu identischen postoperativen Zeitpunkten (32 h) nach alleiniger 2/3 TH; sie fällt nicht so stark ab und weist Nachgipfel auf. Die jetzt registrierten 3 H-Index-Werte und ihr Abfall bis zu 120 h stimmen sehr gut mit denjenigen nach singulärer CCl₄-Gabe überein^{5,6}. Ausserdem ist von nun an eine andere Topik DNS neubildender Kerne zu beobachten; sie liegen vornehmlich in der Zirkumferenz der CCl₄-Nekrosen. Dies beides ist ein Argument dafür, dass ab 48 h nach der Operation überwiegend die reparative, auf die CCl₄-induzierten Nekrosen zurückgehende Regeneration den Ablauf des Proliferationsumfangs bestimmt. Auch der Mitose-Index läuft gegenüber alleiniger 2/3 TH zeitlich verzögert ab.

Der epitheliale Proliferationsmodus² wird auch bei dieser Versuchsanordnung auf die schnelle Form umgeschaltet. Die Silberkorndichte (Silberkornzahl/ μ^2 Kern) als relatives Mass für die DNS-Syntheserate/Zeiteinheit wird verdoppelt, was auf eine Halbierung der S-Phasen-

länge von 15–18 h bei Kontrollen^{2,7} auf etwas mehr als 7 h bei 2/3 teilhepatektomierten Ratten^{2,4} schliessen lässt. Auch die Phase G₂ (2 h^{2,4}) und die Mitose (um 1,5 h^{2,4}) werden gegenüber der normalen Leberproliferation gleichalter Ratten (bis 6 bzw. 5,5 h⁷) deutlich verkürzt. Denn bei stets 3stündiger radioaktiver Versuchszeit steigt der Wert markierter Mitosen von etwa 5% vor auf mehr als 60% während der Regeneration⁸ an.

Im Gegensatz zu der Zeitverschiebung in der epithelialen Regeneration setzt die Proliferation in den Sternzellen nach 2/3 TH mit und ohne CCl₄-Behandlung zum gleichen postoperativen Zeitpunkt (32 h⁹) ein. Leberepithel und Sternzellen regenerieren also unabhängig voneinander^{8,10}.

Unter den gewählten experimentellen Bedingungen wird demnach die präproliferative Phase¹¹ bis zum Einsetzen der kompensatorischen Leberregeneration verlängert. Während der anschliessenden Proliferationsprozesse

⁴ E. STÖCKER und U. PFEIFER, *Naturwissenschaften* 52, 663 (1965); *Z. Zellforsch.* 79, 374 (1967).

⁵ C. M. LEEVY, R. M. HOLLISTER, R. SCHMID, R. A. MACDONALD und C. S. DAVIDSON, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 102, 672 (1959).

⁶ C. M. LEEVY, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 104, 939 (1963).

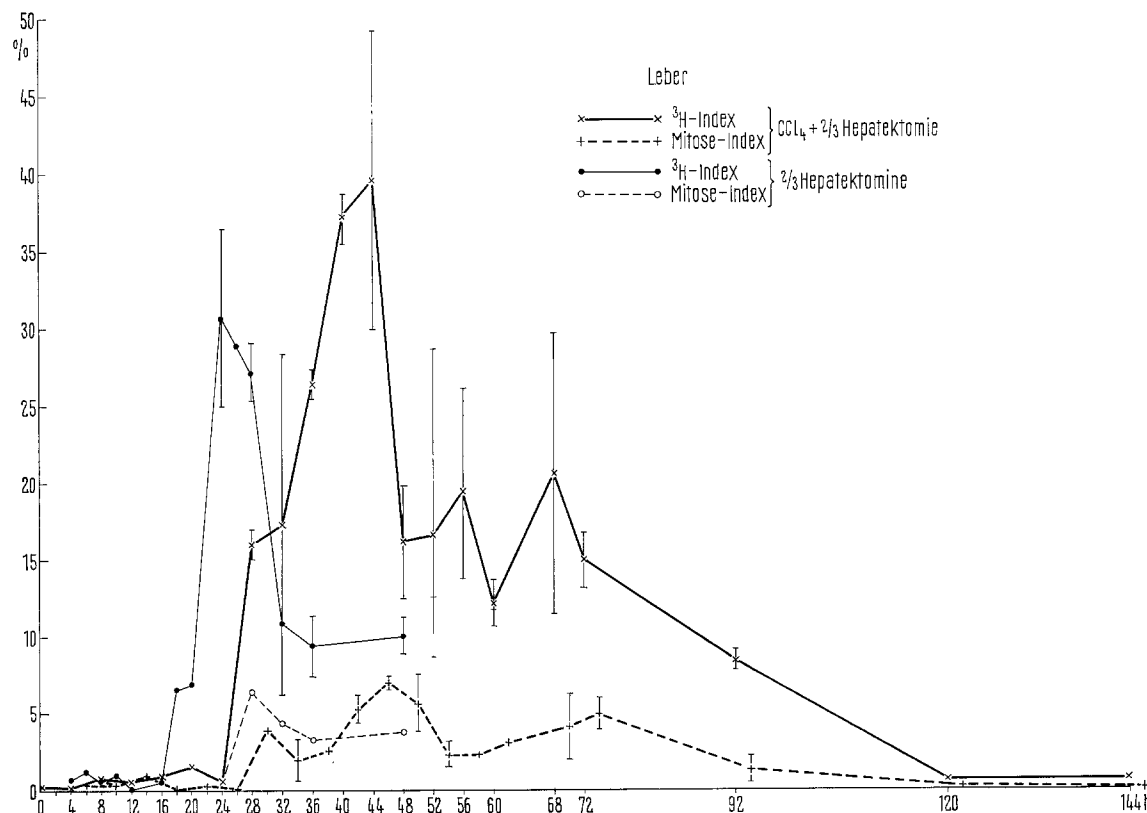
⁷ E. STÖCKER und W.-D. HEINE, *Beitr. path. Anat.* 131, 410 (1965).

⁸ E. STÖCKER und G. BACH, *Naturwissenschaften* 52, 264 (1965).

⁹ V. HÖPER, *Inaug. Diss. Würzburg* (1968).

¹⁰ E. STÖCKER, W.-D. HEINE und CH. BERGIS, *Naturwissenschaften* 57, 41 (1970).

¹¹ H.-W. ALTMANN, *Verh. dt. Ges. Path.* 50, 15 (1966).



3 H-Index und Mitose-Index als Funktion der postoperativen Zeit (—, 3 H-Index; ---, Mitose-Index nach alleiniger 2/3 TH; —, 3 H-Index; ---, Mitose-Index nach 2/3 TH + CCl₄).

beeinflussen sich die kompensatorischen und reparativen Vorgänge nicht, sondern laufen nacheinander ab.

Summary. Following 2/3 hepatectomy + CCl_4 , the labeling- (^3H -thymidine) and mitosis-index of liver epithelia increases 8 h later than after an unique 2/3 hepatectomy, and the peak of compensatory regeneration is reached

16 h later. Then the curve declines and 48 h post operationem reparative regeneration due to CCl_4 necroses starts.

E. STÖCKER und W. BOECKER

*Pathologisches Institut der Universität,
D-87 Würzburg (Deutschland), 14. Januar 1970.*

Reversible Inhibition by CCl_4 of Bile Secretion During Isolated Liver Perfusion

A number of recent publications¹⁻³ deal with early hepatotoxic effects of carbon tetrachloride. The first detectable events are biochemical changes in the endoplasmic reticulum, occurring about 5 min after application of CCl_4 . Little attention, however, was paid to alterations in bile secretion as response to the hepatotoxin. Such an alteration is the decrease in bile secretion cumulatively measured over periods of some hours after intragastric administration of CCl_4 in rats⁴.

To avoid extrahepatic influences, we used isolated liver perfusion for studying early effects of CCl_4 on bile secretion. The haloalkane was introduced in gaseous form. Furthermore we measured bile production by visual counting of drop frequency to achieve the detection of quickly occurring bile flow changes.

Material and method. 15 livers of male Wistar rats (200–250 g) were perfused according to SCHIMASSEK⁵ with a suspension of bovine erythrocytes in albumin containing Tyrode solution. CCl_4 was introduced by switching the oxygen flow for 5–10 min from the humidifier to a gassing tower filled with CCl_4 . Thereby oxygen supply was maintained during CCl_4 application. In 5 experiments CCl_4 (20 μl) was injected directly into the portal vein cannula⁶. Hexobarbital metabolism was measured by estimation of the disappearance of substrate^{7,8}.

Results and discussion. The most striking observation was a sharp decrease in bile flow occurring at about 3 min after introduction of gaseous CCl_4 (Figure); 2–3 min later the bile flow stopped entirely. At this point the CCl_4 gassing was finished. After a lag period of 2–10 min the bile flow accelerated to a maximum and returned to control values at 30–50 min after CCl_4 treatment. In control perfusions, a steady slow decrease of bile flow rate was measured. During CCl_4 induced stop of bile secretion, a slight increase in blood flow (10–20%) could be observed. The pH of the perfusion medium was not affected by the CCl_4 treatment. Hemolysis in perfusion experiments with CCl_4 did not exceed control values (1.2–1.7% after 3 h).

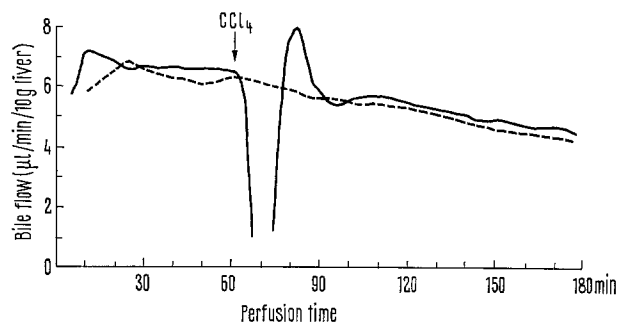
We also investigated the effect of CCl_4 when injected into the portal vein. The changes in bile flow (reversible decrease by about 30%) were less than in the case of gaseous CCl_4 , but blood flow simultaneously decreased as response to the hepatotoxin. In addition multiple anemic regions located subcapsularly and irregular granulation of the liver surface appeared within 30 min after CCl_4 injection. Similar liver alterations could be observed with gaseous CCl_4 only at 120–180 min after application or with gassing times longer than 10 min. Because of these disadvantages the intraportal injection was abandoned.

The course of bile flow inhibition by gaseous CCl_4 leads to following considerations:

1. The response of bile flow to application of gaseous CCl_4 during liver perfusion occurs with at least the same rapidity as the changes in the endoplasmic reticulum. Therefore the described decrease in bile flow is, to our knowledge, the earliest change in liver function as response to CCl_4 .

2. The occurrence of a maximum after restoration of bile flow suggests a retention of bile constituents inside the hepatocyte due to secretion inhibition during CCl_4 influence. A congestion in bile ducts due to smooth muscle contraction and following release of bile seems rather unlikely, since blood flow is increased at the same time. Changes in blood flow within the range of our experiments did not influence bile flow.

3. The reversibility of inhibition may be explained by the hypothesis of a physicochemical action of CCl_4 ⁷: mediated by its lipid solubility, CCl_4 can enter the lipid layer of membranes and thereby impair membrane properties. The restoration of normal membrane function in respect to bile secretion could be caused by rediffusion of CCl_4 out of the membranes after the end of application.



Bile flow during isolated perfusion of rat liver. Solid line: flow changes caused by gaseous CCl_4 . Dotted line: control perfusion. Each line represents one single perfusion experiment.

¹ K. S. RAO and R. O. RECKNAGEL, *Expl. molec. Path.* 9, 271 (1968).

² K. S. RAO and R. O. RECKNAGEL, *Expl. molec. Path.* 10, 219 (1969).

³ E. GORDIS, *J. clin. Invest.* 48, 203 (1969).

⁴ E. MEZEY, G. R. CHERRICK and P. R. HOLT, *J. Lab. clin. Med.* 71, 798 (1968).

⁵ H. SCHIMASSEK, *Biochem. Z.* 336, 460 (1963).

⁶ M. HEIMBERG, M. L. WATKINS and R. TOOKER, *J. Pharm. exp. Ther.* 145, 92 (1964).

⁷ J. V. DINGELL and M. HEIMBERG, *Biochem. Pharmacol.* 17, 1269 (1968).

⁸ B. B. BRODIE, J. J. BURNS, L. C. MARK, P. A. LIEF, E. BERNSTEIN and E. M. PAPPER, *J. Pharm. exp. Ther.* 109, 26 (1953).