

Lipide im atheromatösen Brei weicher Atherome menschlicher Coronararterien* ** Dünnschichtchromatografische Untersuchungen

K.-H. Bründel

Pathologisches Institut der Universität Göttingen, Abteilung für experimentelle Pathologie
(Prof. Dr. D. Sinapius)

Eingegangen am 6. Februar 1973

Lipids in Atheromatous Pulp of Human Coronary Arteries

Thin-Layer Chromatographic Investigations

Summary. Atheromatous pulp of human coronary arteries was investigated by thin-layer chromatography. The lipids and phospholipids found were compared with chromatograms of arterial walls and human serum. Mean lipids in the pulp are cholesterol, cholesterol esters and triglycerides. Free fatty acids, phospholipids and free amino acids are absent. This is explained by the fact that phospholipids are present in large amounts in the fibrous cap and smooth medial cells surrounding the pulp.

Zusammenfassung. Atheromatöser Brei menschlicher Coronararterien wurde dünn schicht-chromatographisch untersucht und seine Lipidzusammensetzung mit derjenigen von Coronararterienschnitten und menschlichem Serum verglichen. Der Brei enthält überwiegend Cholesterin und Cholesterinester sowie Triglyceride, dagegen keine freien Fettsäuren, Phospholipide und freie Aminosäuren. Im Schnitt nachweisbare Phosphatide entstammen der den Brei bedeckenden Bindegewebsschicht und den unterliegenden glatten Muskelzellen der Media.

In der Erforschung der Atherosklerose gewinnen in jüngster Zeit biochemische Untersuchungen morphologisch definierter atherosklerotischer Veränderungen zunehmend an Bedeutung (Böttcher, 1963; Smith, 1967, 1971; Slater und Smith, 1972; Künnett und Krug, 1970). Zu diesen Veränderungen gehört das weiche Atherom, das eine Sonderform des Stadiums III der Atherosklerose ist und als „soft, fatty, yellow type“ vom „hard, white, fibrous type“ abgegrenzt wird (WHO, 1958).

Bisher sind bei biochemischen und dünn schichtchromatographischen Lipidanalysen atherosklerotischer Veränderungen immer adventitiafreie Intima-Media-Präparationen, entweder als Extrakt oder als intakter Gefrierschnitt, untersucht worden (Böttcher, 1963; Tuna und Mangold, 1963; Liadsky und Woolf, 1967; Smith, 1967; Künnett und Krug, 1970).

Es fehlen in der Literatur jedoch Angaben über die Zusammensetzung des leicht gewinnbaren atheromatösen Materials aus weichen Atheromen mensch-

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des SFB 89 Cardiologie Göttingen.

** Herrn Prof. Dr. med. D. Sinapius zugeeignet.

licher Coronararterien. Wir berichten daher im folgenden über seine Lipidzusammensetzung, die wir mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie ermittelten.

Untersuchungsgut und Methode

	R_f nach Lit. Angaben	Lipide i.e.S. Petroläther/Diäthyläther/Eisessig Trennung der Präferenzsubstanzen 10 mm ³ Platten nach Besprühen mit 50% H ₂ SO ₄ erhitzt!
○ CHOLESTERINPALMITAT $R_f = 0,80$		
○ CHOLESTERIN $R_f = 0,06$	0	
○ PALMITINSÄURE $R_f = 0,15$		
○ SPHINGOMYELIN $R_f = \text{Substanz bleibt am Start liegen}$	0	
○ STEARINSÄURE $R_f = 0,16$		
○ CHOLESTERINSTEARAT $R_f = 0,83$		
○ CHOLESTERIN $R_f = 0,07$	0,22	
○ ÖLSÄURE $R_f = 0,20$	0,22	
○ LINOLSÄURE $R_f = 0,21$	0,22	
Start		

Abb. 1. R_f -Werte der Präferenzsubstanzen im Fließmittel (I) für Lipide, verglichen mit Literaturangaben

Aus sieben menschlichen Coronararterien (Durchschnittsalter 50 Jahre) wurden 750 mg atheromatösen Materials gewonnen, extrahiert und chromatographiert. Zum Vergleich wurden außerdem 10 m μ dicke Gefrierschnitte von weichen Atheromen menschlicher Coronararterien und menschliches Serum mitchromatographiert. Extraktion: 750 mg Brei wurden in 2 ml Chloroform-Methanol 2:1 24 Std bei Raumtemperatur im Dunkeln extrahiert.

Dünnschichtchromatographie. Stoffklassen: Lipide i.e.S., Phosphatide, Aminosäuren.

Sorptionsschicht: Kieselgel G oder Kieselgel G-Fertigplatten.

Schichtdicke: 250 μ . Format: 20 \times 20 cm.

Trocknung: Lufttrocknung; Aktivieren der Platten: 30 min bei 110° C (Lipide), 30 bis 60 min bei 110° C (Phosphatide), 12—24 h (Aminosäuren).

Trennkammern: rechteckige Trogkammern; Trenntechnik: aufsteigende DC.

Sättigungszustand der Kammern: Kammersättigung.

Trennstrecke: 100 mm; Laufzeiten: Lipide 30 min; Phosphatide 45 min; Aminosäuren 115 min.

Fließmittelzusammensetzung und Gesamtvolume: 1. Lipide: Petroläther/Diäthyläther/Eisessig (90 + 10 + 1). 2. Phosphatide: Chloroform/Methanol/7n Ammoniak (77 + 30 + 7). 3. Aminosäuren: n-Butanol/Eisessig/Wasser (80 + 20 + 20).

Konzentration der Präferenzsubstanzen für Lipide, gelöst in Chloroform/Methanol (1:1/v/v) 0,1% (Cholesterin, Cholesterinstearat, Palmitinsäure, Ölsäure, Sphingomyelin).

Triglyceride: käufliches Olivenöl. Konzentration der Präferenzsubstanzen für Aminosäuren, gelöst in Wasser 1%.

Abstand der Startpunkte vom Plattenrand: 20 mm.

Aufgetragene Mengen: je 10 μ l Präferenzsubstanz und je 10 μ l Extrakt.

Bestimmung der R_f -Werte der Präferenzsubstanzen. Mittelwert aus drei Bestimmungen s. Abb. 1 und 3. R_f -Werte der Aminosäuren s. Randerath (1965).

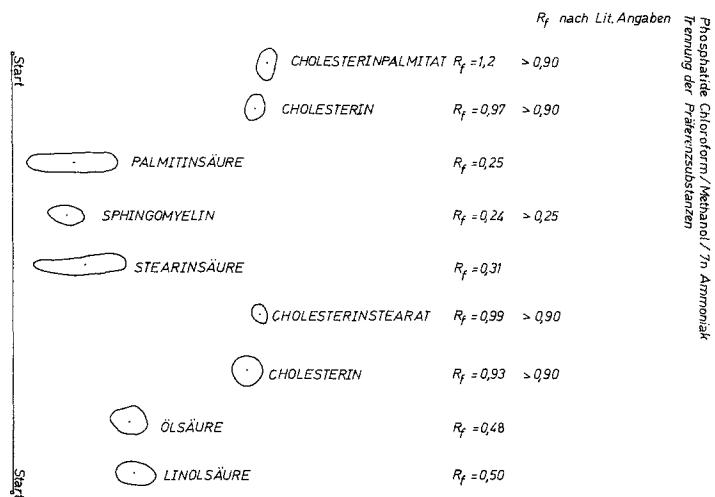


Abb. 2. R_f -Werte der Präferenzsubstanzen im Fließmittel (2) für Phosphatide, verglichen mit Literaturangaben

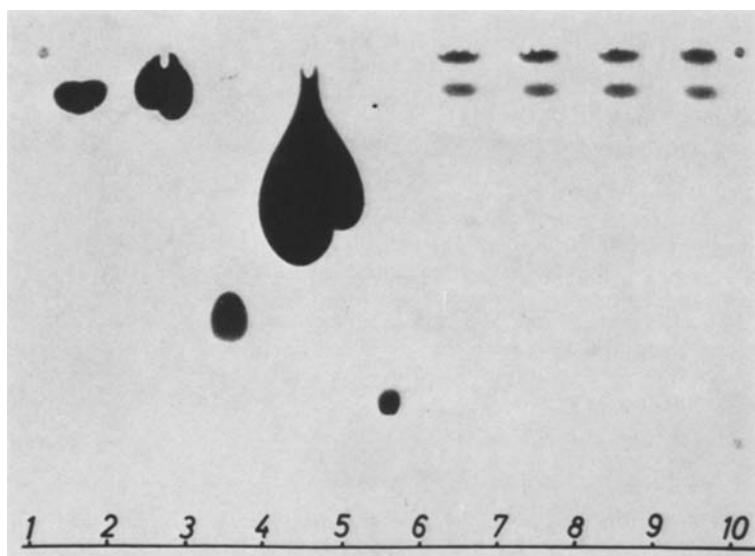


Abb. 3. Im Fließmittel für Phosphatide (2) sind aus dem atheromatösen Material keine Phosphatide auftrennbar. Präferenzsubstanzen (Art und Menge) wie in Abb. 2. Nachweis von Cholesterin und Cholesterinestern auf Höhe der Lösungsmittelfront. Entwicklung: Chromschwefelsäure

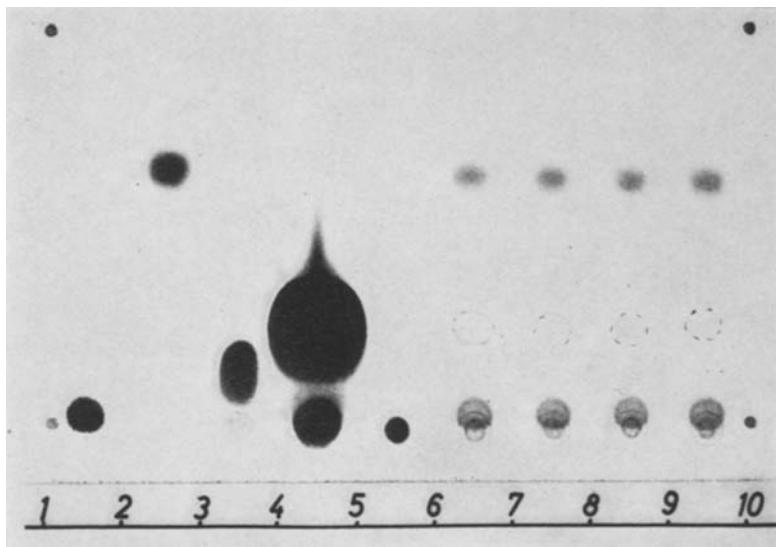


Abb. 4. Fraktionierung der Lipide des atheromatösen Breies im Fließmittel (1). Präferenzsubstanzen (je 10 µl): 1—2 Cholesterin; 2—3 Cholesterinstearat; 3—4 Ölsäure; 4—5 Triglyceride; 5—6 Sphingomyelin; 6—10 je 10 µl Extrakt. Nachweis von Cholesterin, Cholesterinestern, Spuren von Triglyceriden und geringen Mengen von Sphingomyelin, das am Start liegen bleibt. Entwicklung: Chromschwefelsäure

Nachweise der Trennprodukte: nach kurzer Lufttrocknung (3—5 min). Besprühen eines Teils der Platten mit gesättigter Chromschwefelsäurelösung und Entwicklung bei 110° C.

Besprühen der anderen Platten nacheinander mit Ninhydrin (Aminophosphatide), Dragendorffs Reagens (cholinhaltige Phosphatide) und Bromthymolblau (universeller Lipidnachweis). Abb. 3 und 4 sind Entwicklungen mit Chromschwefelsäure.

Argentations-Dünnschichtchromatographie. Zur Subfraktionierung von Cholesterinestern Lösen von 30 g Kieselgel G in 60 ml 5% AgNO₃-Lösung. Ausstreichen mit dem Streichgerät nach Stahl. Anschließend Lufttrocknung und 30 min Aktivieren bei 110° C. Übriges Vorgehen wie oben angegeben. Nachweis der Aminosäuren: Trocknen der Platten 10 min bei 110° C, anschließend Besprühen mit Ninhydrin.

Dokumentation: Photographie der entwickelten Platten oder Aufzeichnen der Fraktionen. Da Triglyceridflecken leicht verblasen, sollten sie sofort markiert werden.

Verwendete Reagentien. Kieselgel G, Kieselgel G-Fertigplatten, Cholesterin, Cholesterinester, Aminosäuren und Fließmittel p.A. von der Fa. Merck, Darmstadt. Sphingomyelin, Ölsäure und Linolsäure von der Fa. Schuchardt, München. Argentationschromatographie mit der Grundausrüstung nach E. Stahl (Fa. Desaga, Heidelberg).

Ergebnisse

Bei Auftrennung des atheromatösen Breies in Fließmittel für Lipide sind Cholesterin, Cholesterinester, Triglyceride und Spuren von Sphingomyelin, das am Start liegen bleibt, nachweisbar. Freie Fettsäuren und freie Aminosäuren fehlen. Die Lipidgruppe der Phosphatide konnte im Brei nicht nachgewiesen werden, obwohl ein spezifisches Fließmittel verwendet wurde. Cholesterin und Cholesterinester wandern mit der Lösungsmittelfront.

Tabelle 1

Stoffklassen	R _f -Werte Fließmittel		Athero- matöser Brei	Gefrier- schnitt durch Atherom	Serum
	1	2			
1. Lipide i.e.S.					
Cholesterin	0,06	>0,90	+	+	+
Cholesterinester	0,83	>0,90	+	+	+
Freie Fettsäuren	0,21	0,48	Ø	Ø	+
Triglyceride	0,40	—	(+)	(+) bis Ø	+
2. Phosphatide					
Sphingomyelin	0	0,25	(+)	+	+
Lysolecithin	—	0,17	Ø	+	+
Lecithin	—	0,34	Ø	+	+
Phosphatidyl-äthanolamin	—	0,47	Ø	+	(+)
3. Freie Aminosäuren					
s. Randerath			Ø	Ø	+

Ø = fehlender Lipidnachweis; + = deutlicher Lipidnachweis; (+) = schwacher oder flüchtiger Lipidnachweis. Die R_f-Werte wurden mit Literaturangaben verglichen (s. Abb. 1 und 2).

Der Gefrierschnitt enthält außer freien Fettsäuren und freien Aminosäuren die übrigen Substanzen. Der Triglyceridnachweis ist nur schwach positiv.

Im Serum wurden alle Stoffklassen ermittelt.

Eine weitere Auf trennung der Cholesterinester gelang nicht.

Diskussion

Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß der zellfreie atheromatöse Brei Cholesterin, Cholesterinester und in geringeren Mengen Triglyceride enthält, dagegen fast keine Phosphatide. Wir konnten lediglich Spuren von Sphingomyelin nachweisen, das in Abb. 4 am Start zu erkennen ist. Sie fehlen jedoch bei der Wahl eines anderen Fließmittels (Abb. 3).

In Übereinstimmung mit Böttcher (1963), Tuna und Mangold (1963), Liadsky und Woolf (1967) sowie Künnett und Krug (1970) konnten wir aus Gefrierschnitten außer Cholesterin, Cholesterinestern und Triglyceriden vor allem Sphingomyelin auftrennen.

Künnett und Krug (1970, 1971) haben aus fatty streaks und Plaques von Aorten sechs Cholesterinesterfraktionen dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt. Wir konnten dagegen weder die Cholesterinester des atheromatösen Breies noch die Gefrierschnitte subfraktionieren, auch nicht mit Hilfe der Argentationschromatographie (Morris, 1963). Dieses könnte an der unterschiedlichen Wahl der Fließmittel liegen. Künnett und Krug (1971) verwendeten Petroleum/Diisopropyläther.

Im zellfreien atheromatösen Brei waren keine freien Fettsäuren nachweisbar. Sie sind jedoch in atherosklerotisch veränderten Aorten vorhanden (Tuna und Mangold, 1962; Liadsky und Woolf, 1967; Randerath, 1965; Bründel und Sina- pius, 1970; Künnett und Krug, 1971). Künnett und Krug (1971) klassifizierten

an Aorten mit Hilfe dünnssichtchromatographisch nachgewiesener Fettsäuren fatty streaks als Ölsäure- und Plaques als Linolsäuretyp atherosklerotischer Veränderungen.

In Gefrierschnitten von Coronararterien fanden wir keine freien Fettsäuren.

Der Anteil an Triglyceriden im atheromatösen Brei ist gering. Während Böttcher (1963), Tuna und Mangold (1963), Randerath (1965), Liadsky und Woolf (1967) Triglyceride in atherosklerotischen Plaques von Aorten dünnssichtchromatographisch nachweisen konnten, gelang uns der Nachweis dieser Lipidgruppe an Gefrierschnitten von Coronararterien nur selten.

Unsere Trennmuster der Lipide und ihre R_f -Werte stimmen mit Angaben von Malins und Mangold (1960) und Mangold (1967) überein.

Phosphatide sind ein regelmäßiger Bestandteil atherosklerotischer Plaques. Sphingomyelin gilt als typisches Plaque-Phospholipid (Böttcher, 1963; Smith, 1970). Daher scheint es zunächst überraschend, daß Phosphatide, insbesondere Sphingomyelin und Lecithin, im atheromatösen Brei dünnssichtchromatographisch nicht nachzuweisen waren. Bisher sind aber stets mit der atheromatösen Nekrose auch zellhaltige Anteile der Plaques untersucht worden. Sphingomyelin und Lecithin werden in mesenchymalen Zellen der Intima, vor allem glatten Muskelzellen synthetisiert (Slater und Smith, 1972). Das Fehlen der Phosphatide im atheromatösen Brei könnte darauf beruhen, daß er keine Zellen enthält. Andererseits ist auch zu erwägen, ob das Fehlen des Lecithins methodisch bedingt ist. Marinetti (1962) hat darauf hingewiesen, daß z.B. Lyso-Lecithin, das in Wasser und organischen Lösungsmitteln löslich ist, bei der Rektifizierung eines Extraks verloren gehen könnte. Gegen diese Deutung spricht, daß sich Phosphatide sogar aus Gefrierschnitten abtrennen lassen, die aus destilliertem Wasser auf die Trennplatten aufgezogen wurden. Wir konnten, wie auch Liadsky und Woolf (1967), Phosphatide aus gewaschenen Gefrierschnittextrakten nachweisen.

Unsere R_f -Werte der Phosphatide stimmen mit Angaben von Skidmore und Entenman (1963) überein.

Im Serum konnten wir dieselben Phosphatidfraktionen wie Marinetti (1962) chromatographisch trennen.

Der Nachweis freier Aminosäuren gelang weder aus dem atheromatösen Brei noch aus den Gefrierschnitten. Wir fanden, ähnlich wie Liadsky und Woolf (1967), ninhydrin-positive Flecken am Start und manchmal weiter oberhalb des Startpunktes.

Die gemessenen R_f -Werte entsprechen jedoch eher Aminophosphatiden und nicht freien Aminosäuren.

Der atheromatöse Brei weist Reste kollagener Fasern auf. Es ist daher wahrscheinlich, daß er Proteine bzw. Polypeptide enthält.

Frau H. Liewald danke ich für ihre sorgfältige Mitarbeit.

Literatur

- Böttcher, C. J. F.: Phospholipids of atherosclerotic lesions in the human aorta. In: Evolution of the arteriosclerotic plaque. Chicago-London: Chicago Univ. Press 1963.
 Bründel, K.-H., Sinapius, D.: Fette im Intimaödem der Aorta. Virchows Arch. Abt. A **351**, 225—232 (1970).

- Künnert, B., Krug, H.: Zur Methode der Dünnschichtchromatographie von Gewebsschnitten. *Acta histochem. (Jena)* **37**, 194—196 (1970).
- Künnert, B., Krug, H.: The composition of cholesterol esters in fatty streaks and atherosclerotic plaques of the human aorta. *Atherosclerosis* **13**, 93—101 (1971).
- Liadsky, Ch., Woolf, N.: Thin layer histochromatographic analysis of lipids of arterial walls. *J. Atheroscler. Res.* **7**, 718—724 (1967).
- Malins, D. C., Mangold, H. K.: Analysis of complex lipid mixtures by thin-layer chromatography and complementary methods. *J. Amer. Oil Chemists' Soc.* **37**, 576—578 (1960).
- Mangold, H. K.: Aliphatische Lipide. In: *Dünnschichtchromatographie*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967.
- Marinetti, G. V.: Chromatographic separation, identification, and analysis of phosphatides. *J. Lipid Res.* **3**, 1—20 (1962).
- Morris, L. J.: Fractionation of cholesterol esters by thin-layer chromatography. *J. Lipid Res.* **4**, 357—359 (1963).
- Randerath, K.: *Dünnschicht-Chromatographie*. Weinheim: Verlag Chemie 1965.
- Slater, R. S., Smith, E. B.: The microdissection of large atherosclerotic plaques to give morphologically defined fractions for analysis. Part 1. The lipid in the isolated fraction. *Atherosclerosis* **15**, 37—56 (1972).
- Skidmore, W. D., Entenman, C.: Two dimensional thin-layer chromatography of rat phosphatides. *J. Lipid Res.* **3**, 471—475 (1962).
- Smith, E. B.: Lipid metabolism in the human arterial intima with aging and with atherosclerosis. Advance in experimental medicine and biology, vol. 16A. New York-London: Plenum Press 1971.
- Tuna, N., Mangold, H. K.: Fatty acids of the atheromatous plaque. In: *Evolution of the arteriosclerotic plaque*. Chicago-London: Chicago Univ. Press 1963.
- World Health Organisation: *Wld. Hlth. Org. techn. Rep. Ser.* **143**, 4 (1958).

Dr. med. K.-H. Bründel
Pathologisches Institut der
Universität Göttingen
D-3400 Göttingen, Gosslerstr. 10
Bundesrepublik Deutschland