

Lipidstoffwechsel normaler und atherosklerotisch veränderter Intima in menschlichen Femoralarterien *

A. K. Horsch, A. J. Day** und R. Sanwald

Medizinische Universitäts-Klinik (Direktor: Prof. Dr. G. Schettler)
und Pathologisches Institut (Direktor: Prof. Dr. W. Doerr) der Universität Heidelberg

Eingegangen am 8. Juni 1973

Differences in Lipid Metabolism between Normal Intima and Atherosclerotic Lesions in Human Femoral Artery

Summary. The uptake and incorporation of (1-¹⁴C)-oleic acid into phospholipid, triglyceride and cholesterol ester by fatty streak and fibro fatty lesions in human femoral arteries was investigated and compared with the uptake and incorporation into these lipid fractions in normal intima and media in the same arteries. In fatty streak lesions, increased incorporation of (1-¹⁴C)-oleic acid into triglyceride and phospholipid occurred in relation to the adjacent normal intima and media. Incorporation into cholesterol ester is particularly high (approximately 20 times) in fatty streak lesions compared with the adjacent normal intima. On the other hand, increased incorporation of oleic acid into the three lipid fractions is not marked in the fibro fatty lesion. The significance of metabolism of lipid in the pathogenesis of the early human lesions is discussed.

Zusammenfassung. Aufnahme und Einbau von ¹⁴C-Ölsäure in Phospholipide, Triglyzeride und Cholesterin-Ester von Fettstreifen (fatty streaks) und Atheromen (fibrofatty lesion) in menschlichen Femoralarterien wurde untersucht und mit Aufnahme und Einbau in die genannten Lipidfraktionen in benachbarten normalen Intima-Bezirken und in die Media derselben Arterien verglichen.

In Fettstreifen kommt es zu einem vermehrten Einbau von ¹⁴C-Ölsäure in Triglyzeride und Phospholipide im Vergleich zu der benachbarten normalen Intima und der darunter liegenden Media. Der Einbau in Cholesterin-Ester ist besonders hoch in Fettstreifen (ungefähr 20mal) verglichen mit der angrenzenden normalen Intima. Andererseits ist der vermehrte Einbau von Ölsäure in die drei Lipidfraktionen bei Atheromen nicht sehr ausgeprägt. Die Bedeutung des Lipidstoffwechsels in der Entstehung der frühen menschlichen atherosklerotischen Veränderungen wird diskutiert.

Einleitung

Die menschlichen Fettstreifen (fatty streaks) sind gekennzeichnet durch die Ansammlung verhältnismäßig großer Mengen von Cholesterin-Estern, deren Zusammensetzung sich von der des Plasmas oder der der normalen Intima unterscheidet, da sie eine große Menge von Cholesterin-Oleat und eine geringe Menge von Cholesterin-Linoleat enthalten (Smith, 1965; Smith *et al.*, 1967). Auch die Skleratheromatose (fibrofatty lesion) zeichnet sich durch eine Vermehrung der Cholesterin-Ester aus, aber nicht in diesem Ausmaß, und die

* Diese Arbeit ist im Rahmen des SFB 90 „Cardiovasculäres System“ durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert worden.

** Gastprofessor an der Universität Heidelberg 1972. Beurlaubt von der Universität Melbourne/Australien, Department of Physiology.

Zusammensetzung der Cholesterin-Ester in solchen Atheromen ist im wesentlichen jenen der Plasmacholesterin-Ester ähnlich. Die unterschiedliche Zusammensetzung der Fettstreifen einerseits und der Atherome und normalen Intima andererseits ließ vermuten, daß die Cholesterin-Ester der Fettstreifen auf eine *in situ* Synthese zurückzuführen sein könnten (Smith *et al.*, 1967). Stoffwechseluntersuchungen, die an menschlichen Arterien — normalen und atherosklerotisch veränderten — durchgeführt wurden, die *in vitro* inkubiert worden waren, erbrachten experimentelle Beweise für diese Annahme (Wahlquist *et al.*, 1969). Bei diesen Arterien ist die Aufnahme von Ölsäure in den Fettstreifen mit einer im Vergleich zur normalen Intima gesteigerten Cholesterin-Ester-Synthese verbunden. In dieser Arbeit werden weitere Stoffwechseluntersuchungen an menschlichen Femoralarterien, die unmittelbar postmortal entnommen worden waren, vorgelegt. Der Einbau von Ölsäure in Cholesterin-Ester, Phospholipide und Triglyzeride wurde in Abhängigkeit vom Trockengewicht normaler Intima, Fettstreifen und Atheromen in derselben Arterie untersucht.

Methoden

Menschliche Femoralarterien von 25—67jährigen Patienten wurden postmortal entnommen. Die Arterie wurde innerhalb von 30 min nach Todeseintritt entnommen, von anhängendem Bindegewebe frei präpariert, längsgeschnitten und 5 cm lange Arteriensegmente *in vitro* 4 Std bei 37° in 10 ml Inkubationsmedium inkubiert. Das Inkubationsmedium bestand zu gleichen Teilen aus Humanserum und Medium 199 (TC Medium 199, Difco Lab. Detroit Michigan USA) und enthielt eine bekannte Menge (ungefähr 5 μ ci) 14 C-Ölsäure (59,7 μ ci/mM spezifische Aktivität, Radio Chemical Centre, Amersham, England). Penicillin und Streptomycin (10 mg/100 ml Medium) wurde vor Inkubationsbeginn zugegeben. Nach 4stündiger Inkubation wurden die Arteriensegmente in 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Atherosklerotische Veränderungen wurden getrennt von den normalen Intimabezirken abpräpariert und selbstständig weiter verarbeitet. In beiden Fällen, sowohl bei normaler Intima als auch bei atherosklerotisch veränderten Bezirken wurde die Intima in Höhe der Lamina elastica interna abpräpariert. Die gesamte verbleibende Media wurde getrennt untersucht. Die einzelnen Arterienbestandteile (Läsion, normale Intima und Media) wurden dann in Chloroform-Methanol (im Volumenverhältnis 2:1) extrahiert und die erhaltenen Extrakte nach der Methode von Folch *et al.* (1957) gewaschen. Gleiche Volumenanteile des Lipidextraktes wurden im Flüssigkeitsszintillations-Zähler gezählt (Liquid Scintillation Spectrometer, Packard Tri Carb Modell 3380). Die Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel in Phospholipide, Cholesterin, Fettsäuren, Triglyzeride und Cholesterin-Ester aufgetrennt. Als Fließmittel fand ein Gemisch aus n-Hexan, Diäthyl-Äther und Essigsäure im Verhältnis 100:38:3 Volumenanteilen Verwendung. Nach der Auftrennung wurden die Lipidbanden durch aufgespritztes 0,2%iges Dichlor-Fluorescein in alkoholischer Lösung nachgewiesen, die einzelnen Fraktionen wurden direkt von der Platte abgestrichen, in Zählröhrchen gegeben und nach der Methode von Snyder (1964) gezählt.

Ergebnisse

Der Einbau von Ölsäure in Gesamtlipide und in Phospholipide, Triglyzeride und Cholesterin-Ester in den drei untersuchten Arterienbezirken, nämlich atherosklerotische und normale Intima sowie Media, ist in Tabelle 1 dargestellt. In dieser Zusammenstellung wurden die Fettstreifen von den fibrösen Polstern und Atheromen gesondert wiedergegeben. Die Ergebnisse sind in cpm/mg Trockengewicht/10⁶ cpm im Inkubationsmedium ausgedrückt. Der relative Einbau von Ölsäure in Phospholipide, Triglyzeride und Cholesterin-Ester in bezug zur nor-

Tabelle 1. Einbau von ^{14}C -Ölsäure in Gesamtlipide normaler und atherosklerotischer menschlicher Femoralarterien (cpm/mg Trockengewicht/ 10^6 cpm im Inkubationsmedium)

Arterie Nr.	Schweregrad der Atherosklerose	Läsion	Normale Intima	Media
<i>Phospholipide</i>				
1	Fettstreifen	82,5	11,6	8,8
2		83,0	29,2	10,4
3	Atherom	90,0	81,0	13,5
4		50,6	32,2	19,8
5		23,8	43,3	24,6
<i>Tryglyzeride</i>				
1	Fettstreifen	121,0	8,6	8,1
2		86,0	17,9	12,7
3	Atherom	87,5	70,5	19,0
4		35,9	20,5	28,4
5		14,2	33,8	25,2
<i>Cholesterin-Ester</i>				
1	Fettstreifen	59,2	1,9	0,8
2		52,7	2,4	1,1
3	Atherom	75,0	46,4	1,5
4		4,0	1,9	1,8
5		9,4	9,0	2,2

cpm = counts per minute.

malen Intima wird in der Tabelle 2 dargestellt, und zwar für die Fettstreifen und für die Atherome jeweils in Beziehung zu ihrer normalen Intima und Media. Der relative Aktivitätseinbau in die normale Intima wurde = 1 gesetzt.

Bei den Fettstreifen fand sich in allen Fällen ein höherer Einbau der drei untersuchten Lipidfraktionen in die normale Intima als in die darunter liegende Media. Andererseits zeigte die der normalen Intima benachbarte atherosklerotische Veränderung einen vermehrten relativen Einbau in Phospholipide, Triglyzeride und Cholesterin-Ester. Dieser vermehrte Einbau in Cholesterin-Ester ist am ausgeprägtesten; bei den Fettstreifen wurde 20—30mal so viel Ölsäure der Cholesterin-Ester-Synthese zugeführt wie in der benachbarten normalen Intima. Bei den Atheromen sind diese Unterschiede nicht so deutlich nachweisbar. Die Media zeigte wesentlich niedrigere Einbauraten der drei genannten Lipidfraktionen als die darüber liegende normale Intima. Der Vergleich atherosklerotischer Veränderungen mit der benachbarten normalen Intima ergibt, daß der vermehrte relative Einbau, der für den Fettstreifen charakteristisch ist, nur andeutungsweise in Atheromen stattfindet. Hier kommt es zu einer minimalen Vermehrung der Cholesterin-Ester-Synthese in einer Größenordnung vom Eineinhalb- bis Zweifachen der normalen Intima. Unterschiede hinsichtlich des Einbaus in Phospholipide und Triglyzeride sind noch weniger offensichtlich.

Tabelle 2. Relativer Einbau von ^{14}C -Ölsäure in Gesamtlipide normaler und atherosklerotischer menschlicher Femoralarterien

Die Werte für atherosklerotisch veränderte Intima und Media sind als Quotient der für die normale Intima ermittelten Werte dargestellt.

Arterie Nr.	Schweregrad der Atherosklerose	Läsion	Normale Intima	Media
<i>Phospholipide</i>				
1	Fettstreifen	7,02	1	0,74
2		2,85	1	0,35
3	Atherom	1,11	1	0,17
4		1,57	1	0,62
5		0,55	1	0,57
<i>Tryglizeride</i>				
1	Fettstreifen	14,2	1	0,93
2		4,8	1	0,71
3	Atherom	1,24	1	0,27
4		1,76	1	1,39
5		0,42	1	0,75
<i>Cholesterin-Ester</i>				
1	Fettstreifen	27,6	1	0,43
2		22,3	1	0,48
3	Atherom	1,61		0,03
4		2,06	1	0,94
5		1,27	1	0,29

Diskussion

Frühere Arbeiten zeigten, daß die atherosklerotisch veränderte menschliche Arterie einen größeren Anteil von Ölsäure aufnimmt und in Cholesterin-Ester einbaut als dies bei der normalen Intima der Fall ist (Wahlquist *et al.*, 1969). Auf dieser Beobachtung aufbauend wurde der relative Einbau von ^{14}C -Ölsäure in die Lipidfraktionen der normalen und atherosklerotisch veränderten Intima sowie der Media ein und derselben Arterie untersucht. Der Fettstreifen ist charakterisiert durch eine ausgeprägte relative Steigerung der Einbaurate radioaktiver Ölsäure in Cholesterin-Ester, dieser Einbau entspricht etwa dem Zwanzigfachen dessen, was bei der angrenzenden normalen Intima gefunden wurde. Diese Veränderung geht einher mit einem Anstieg des Cholesterin-Estergehalts der atherosklerotischen Läsion und mag einfach Ausdruck einer Umlagerung der Fettsäure in Cholesterin-Ester in diesem vergrößerten pool sein. Zeitstudien wurden nicht durchgeführt, so daß über den Umsatz des Cholesterin-Esters in normaler und atherosklerotischer Intima keine Aussagen gemacht werden können. Dennoch scheint es naheliegend, daß der gesteigerte Einbau von Ölsäure Ausdruck einer im Vergleich zur normalen Intima vermehrten Cholesterin-Ester-Synthese der atherosklerotisch veränderten Bezirke ist und daß diese Synthese einen Teil jenes Mechanismus darstellt, der für die Atherogenese des menschlichen Fettstreifens verantwortlich gemacht werden muß. Die im Vergleich zu normalen

Gefäßbezirken unterschiedliche Zusammensetzung der atherosklerotischen Läsion ist ein Hinweis auf einen aktiven Synthesevorgang, der diese Zusammensetzung bedingt (Smith *et al.*, 1967). Der Unterschied zwischen dem Fettstreifen und den fibrösen Polstern ist zweifellos auf den verringerten Zellgehalt dieser letzteren zurückzuführen. In den Fettstreifen geht die Lipidsynthese mit der Stoffwechselaktivität der vorhandenen Schaumzellen einher (Wahlquist *et al.*, 1969). Nach Ausbildung der fibrösen Polster verschwinden die Schaumzellen und die Proliferation und Fibrosierung steht im Vordergrund dieser Läsion, während metabolische Veränderungen hinsichtlich der Lipide abgemildert werden. Im Frühstadium der Atherogenese dagegen spielen Stoffwechselumstellungen in Richtung auf die Cholesterin-Ester-Synthese eine wesentlich größere Rolle. Weitere Untersuchungen der cholesterinveresternden Enzymsysteme in der menschlichen Intima sind notwendig, um diesen Mechanismus aufzuklären.

Die Verfasser danken Fr. I. Leyendecker, Fr. M. Bastian und Fr. D. Goger für zuverlässige technische Hilfe.

Literatur

- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. biol. Chem.* **226**, 497 (1957)
- Smith, E.B.: The influence of age and atherosclerosis on the chemistry of aortic intima. Pt. I, The Lipids. *J. Atheroscler. Res.* **5**, 224—240 (1965)
- Smith, E.B., Evans, P.H., Downham, M.D.: Lipid in the aortic intima. The correlation of morphological and chemical characteristics. *J. Atheroscler. Res.* **7**, 171—186 (1967)
- Snyder, F.: Radio assay of thin layer chromatograms—a high resolution zonal scraper for quantitative ^{14}C and ^3H scanning of thin layer chromatograms. *Analyt. Biochem.* **9**, 183 (1964)
- Wahlquist, M.L., Day, A.J., Tume, R.K.: Incorporation of oleic acid into lipid by foam cells in human atherosclerotic lesions. *Circulat. Res.* **24**, 123—130 (1969)

Dr. Axel K. Horsch
Med. Universitätsklinik
D-6900 Heidelberg
Bergheimer Straße 58
Bundesrepublik Deutschland