

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
10. Jg. 1972, S. 275—279

## $^3\text{H}$ -Cholesterinaufnahme in verschiedene Organe von normal und Mg-arm ernährten Ratten nach intravenöser Injektion von $^3\text{H}$ -Cholesterin

Von J. SCHMALBECK, F. DORN, H. J. MERKER und TH. GÜNTHER

*Physiologisch-Chemisches Institut, Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik und II. Anatomisches Institut der Freien Universität Berlin*

(Eingegangen am 12. November 1971)

Nach einmaliger intravenöser Injektion von  $^3\text{H}$ -Cholesterin, das an Lipoproteine gebunden war, wurde über 24 Stdn. die Aktivität des  $^3\text{H}$ -Cholesterin im Serum und in verschiedenen Organen von normal und Mg-arm ernährten Ratten gemessen. Die Mg-arm ernährten Ratten zeigten in der Leber eine schnellere  $^3\text{H}$ -Cholesterinaufnahme und schnellere Wiederabgabe als die Kontrollen, woraus ein stärkerer Abfall und ein höherer Wiederanstieg der  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Aktivität im Serum resultierte. Bei den anderen Organen fanden sich in der  $^3\text{H}$ -Cholesterinaufnahme keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen.

Autoradiographisch konnte das  $^3\text{H}$ -Cholesterin in den Leberzellen über dem Cytoplasma und in der Aorta extrazellulär zwischen den elastischen Lamellen und den glatten Muskelzellen lokalisiert werden.

### *The uptake of intravenously injected $^3\text{H}$ -cholesterol by different organs in normal and Mg-deficient rats*

After a single intravenous injection of  $^3\text{H}$ -cholesterol bound to lipoproteins, the radioactivity of  $^3\text{H}$ -cholesterol was followed over 24 hours in the serum and in different organs of the normal and Mg-deficient rats. In rats with a dietary deficiency of magnesium,  $^3\text{H}$ -cholesterol was taken up by the liver more rapidly and released again more rapidly than in the controls; these changes were reflected by a correspondingly stronger decrease and a higher subsequent increase in the  $^3\text{H}$ -cholesterol activity in the serum. There were no differences between the two groups with respect to the uptake of  $^3\text{H}$ -cholesterol by other organs.

$^3\text{H}$ -Cholesterin was located by autoradiography in the cytoplasm of the liver cells and extracellularly between the elastic lamellae and the smooth muscle cells in the aorta.

Bei der durch Mg-arme Ernährung induzierten Arteriosklerose der Ratte fanden wir keine Änderung des Cholesteringehaltes im Serum und in der Aorta, ebenso war das Lipoproteinspektrum im Serum unverändert (1). Bei der spontanen Arteriosklerose des Menschen und bei der durch Cholesterin-reiche Diät erzeugten Arteriosklerose einiger Tierarten gelangt der größte Teil des in den arteriosklerotischen Läsionen angesammelten Cholesterin aus dem Plasma in die Gefäßwand (2—5) und in frühen Stadien dieser Arterioskleroseformen wird ein erhöhter Austausch zwischen Gefäßwand- und Plasma-Cholesterin festgestellt (3, 6). Wir untersuchten deshalb, ob bei der Arteriosklerose des Mg-Mangels ein erhöhter  $^3\text{H}$ -Cholesterin-turnover in der Aorta und verschiedenen Organen besteht, denn durch die Abnahme der extrazellulären Mg-Konzentration und somit des membrangebundenen Mg sowie durch eine im Mg-Mangel auftretende Erhöhung der freien Fettsäuren im Serum könnte eine gesteigerte Permeabilität der Zellmembranen hervorgerufen werden.

Wir haben zusätzlich autoradiographisch geprüft, in welchen Gewebs- und Zellstrukturen das radioaktiv markierte Cholesterin lokalisiert ist und ob es bei der Mg-Mangel-Arteriosklerose zu einer Anreicherung des  $^3\text{H}$ -Cholesterin an den veränderten elastischen Fasern der Aorta kommt.

## Material und Methoden

### Versuchstiere

Die Versuche wurden an männlichen Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 120—150 g durchgeführt, die 5 Wochen lang nach dem bereits beschriebenen Diätschema (1) ernährt wurden. Am Ende der Fütterungsperiode wurde den Tieren in Rattenserum gelöstes Cholesterin- $[\text{1}\alpha, 2\alpha\text{-}^3\text{H}]$  (The Radiochemical Centre, Amersham) in leichter Äthernarkose in die vena femoralis injiziert (Dosis: 50  $\mu\text{Ci/kg}$  Ratte). Die Gesamtcholesterin-Konzentration im Serum wurde dadurch nicht verändert, weil das  $^3\text{H}$ -Cholesterin eine hohe spezifische Aktivität aufwies (98 mCi/mg) und als Lösungsmittel nur kleine Mengen (1 ml/kg Ratte) von Rattenserum mit normaler Cholesterinkonzentration (500 bis 600 mg/l) injiziert wurden. Zu verschiedenen Zeiten wurde den Tieren Blut aus dem hyperämisierten Schwanz entnommen und nach 6-, 9- und 24-stdg. Versuchsdauer wurden Blut, Teile der Leber, des oberen Dünndarmes, des m. quadriceps femoris (von der der Injektion kontralateralen Extremität), Nieren, Herz (ohne Vorhöfe) und die Aorta thoracalis entnommen. Die Präparation der Aorta erfolgte in der bereits beschriebenen Weise (1).

### Herstellung der Injektionslösung

Das in Benzol gelöste  $^3\text{H}$ -Cholesterin wurde vorsichtig mit nativem (nicht inaktiviertem) Rattenserum (Cholesterin-Konzentration: 500—600 mg/l) unterschichtet und nach Abdampfen des Benzols im Stickstoffstrom 30 Min. unter leichtem Schütteln bei 25° inkubiert. Diese zum Gebrauch jeweils frisch bereitete Injektionslösung enthielt 50  $\mu\text{Ci/ml}$ .

### Extraktion des $^3\text{H}$ -Cholesterin

Die Blutproben wurden sofort nach Entnahme zentrifugiert und das Serum zweimal mit Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) extrahiert.

Die Organe wurden mit eiskalter KREBS-RINGER-Lösung gespült, in flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Die Extraktion des Cholesterin aus den Geweben erfolgte ebenfalls mit Chloroform-Methanol 2:1 (v/v).

**Elektrophoresen**

Zur Kontrolle der Verteilung des <sup>3</sup>H-Cholesterin im Serum der Versuchstiere nach verschiedenen-Versuchszeiten und in der Injektionslösung führten wir Elektrophoresen auf Celluloseacetatfolien durch. Die Elektropherogramme wurden bei einer Laufstrecke der Albuminfraktion von ungefähr 7 cm in 3 mm breite Streifen geschnitten, die Radioaktivität der einzelnen Streifen ohne vorherige Extraktion bestimmt und mit der Lage der Lipoproteinfraktionen nach Ölrot O-Färbung verglichen.

**Bestimmung der Radioaktivität**

Die Radioaktivität wurde in einem Packard TriCarb-Szintillations-Spektrometer (Modell 314 E) mit einer Szintillationslösung gemessen, die 4 g/l 2.5-Diphenyloxazol (PPO) und 0,1 g/l 1.4-Bis(2-(5-phenyl)-oxazolyl)benzol (POPOP) in Toluol enthält. Quenchkorrekturen wurden mit einem externen <sup>3</sup>H-Toluol-Standard (The Radiochemical Centre, Amersham) durchgeführt.

**Cholesterinbestimmung**

Cholesterin im Serum wurde nach WATSON (7) und in den Geweben mit einer Modifikation der Methode von ABELL und Mitarbeitern (8) bestimmt (1).

**Autoradiographie**

Die Gewebeproben wurden 24 Stdn. nach i. v. Injektion von 1 mCi/kg Ratte <sup>3</sup>H-Cholesterin entnommen, sofort in einer Kühlbox eingefroren und anschließend in einem Dittes-Kryostaten ohne weitere Vorbehandlung geschnitten. Die auf Objektträger aufgezogenen Schnitte verblieben im Kryostaten für weitere 48 Stdn. bei -25° in einem mit P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bestückten Behälter. Die getrockneten Schnitte wurden dann in der Siemens-Bedampfungseinheit so mit Kohle bedampft, daß ein zarter dunkler Schleier sichtbar wurde. Danach erfolgte die Überschichtung mit einer K-5-Emulsion (Ilford) nach einer 1:1 Verdünnung mit bidest. Wasser. Die Expositionszeit betrug 10 Tage. Zur Entwicklung benutzten wir Amidol, zur Gegenfärbung Hämatoxylin-Eosin.

**Ergebnisse**

**Verteilung des <sup>3</sup>H-Cholesterin im Serum**

Die Elektropherogramme zeigten, daß das <sup>3</sup>H-Cholesterin in der Injektionslösung zu etwa 50% an Lipoproteine gebunden ist. Bereits 30 Min. nach der Injektion sind über 80% des <sup>3</sup>H-Cholesterin im Serum der Versuchstiere in den α- und β-Lipoproteinen zu finden (Abb. 1). Nach 1 Std. liegt dieser Anteil bei 90% und verändert sich danach nicht weiter. Zwischen Mg-Mangelratten und Kontrolltieren besteht kein Unterschied in der Verteilung des <sup>3</sup>H-Cholesterins im Serum.

**<sup>3</sup>H-Cholesterin-Aktivität im Serum**

Nach i. v.-Injektion von <sup>3</sup>H-Cholesterin fällt die spezifische Aktivität des Gesamt-Cholesterin im Serum innerhalb von 2 Stdn. auf 33% des Ausgangswertes, steigt bis zur 9. Std. auf etwa 40% an und erreicht nach 24 Stdn. 22% der anfänglichen Aktivität (Abb. 2). Bei den Mg-arm ernährten Ratten erfolgt der Abfall schneller und der Wiederanstieg erreicht mit 55% einen höheren Wert. Auch der 24-Stdn.-Wert liegt etwas höher als bei den Kontrolltieren. Da sich der Verlauf der Serum-Aktivitäts-Kurve bei den drei Kontrollgruppen nicht

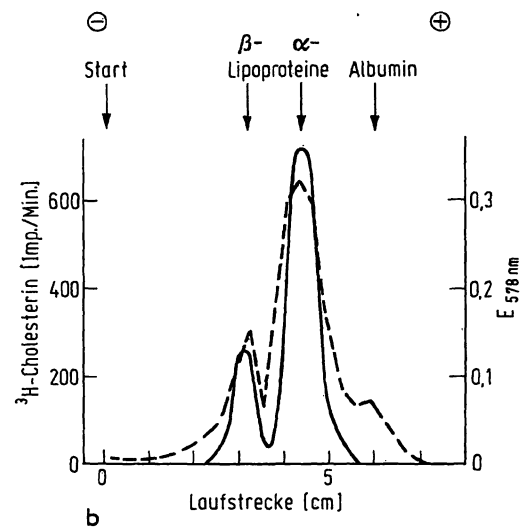
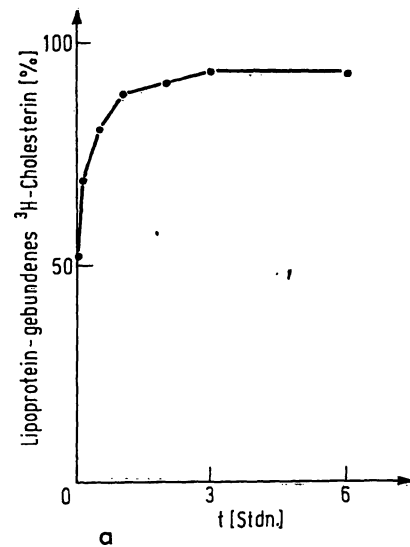


Abb. 1 Verteilung des <sup>3</sup>H-Cholesterin im Serum nach i. v. Injektion

a) Prozentualer Anteil des in α- und β-Lipoproteinen gebundenen <sup>3</sup>H-Cholesterin an der Gesamtaktivität im Serum in Abhängigkeit von der Zeit nach Injektion. Als Nullwert ist das an Lipoproteine gebundene <sup>3</sup>H-Cholesterin der Injektionslösung angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte von je 4-6 Tieren

b) Vergleich der Lage der mit Ölrot O angefärbten Lipoproteine (gemessen als E<sub>578 nm</sub>) (—) mit der <sup>3</sup>H-Cholesterin-Verteilung (· · · · ·) im Elektropherogramm eines Serums, das 60 Min. nach der Injektion des radioaktiven Cholesterin entnommen wurde

unterschied, wurde in Abbildung 2 auf eine gesonderte Darstellung der einzelnen Kontrollgruppen verzichtet.

**<sup>3</sup>H-Cholesterin-Aufnahme in Leber, Niere, Herz, Dünndarm, Skelettmuskel und in die Aorta**

Zur Messung der <sup>3</sup>H-Cholesterin-Aufnahme in die einzelnen Organe wählten wir, um die Aufnahme bei relativ konstanter <sup>3</sup>H-Cholesterin-Konzentration im Serum erfolgen zu lassen (s. Abb. 2), die Zeiten von 6 bis 24 Stdn. nach der Injektion (bei der Leber auch 3 Stdn. p. i.). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt. Nach 3 Stdn. weist die Leber die höchste spezifische Aktivität auf. Bis zur 9. Std. nimmt sie schnell, danach erheblich langsamer ab und erreicht

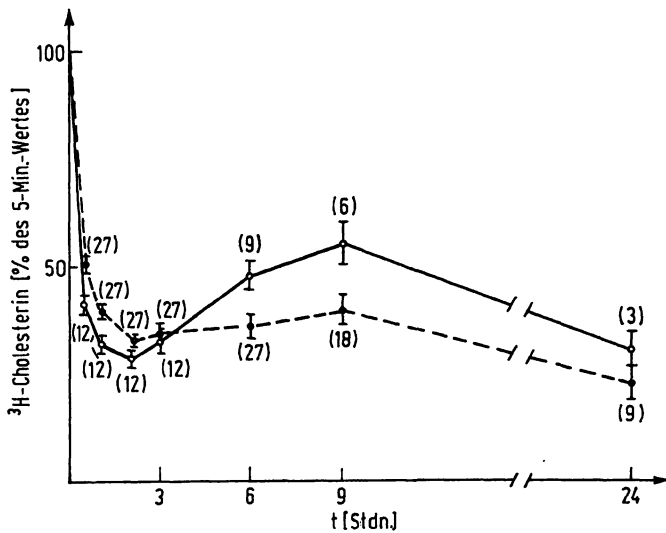


Abb. 2

$^3\text{H}$ -Cholesterin-Aktivität im Serum von Mg-arm ernährten Ratten (o—o) und von Kontrolltieren (•---•). Die Werte der einzelnen Versuchszeiten wurden jeweils auf den 5 Min.-Wert (= 100%) bezogen. Mittelwerte und ihr mittlerer Fehler. In Klammern Zahl der Versuchstiere

nach 24 Stdn. etwa 20% des 3-Stdn.-Wertes. Alle anderen untersuchten Organe zeigen einen langsamen, während der Versuchszeit linearen Anstieg der  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Aktivität. Dabei nehmen Skelettmuskel und Aorta etwa 10mal weniger  $^3\text{H}$ -Cholesterin auf als Dünndarm, Niere und Herz. Bei den Mg-Mangelratten findet sich nach 3 Stdn. eine höhere  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Aktivität in der Leber als bei den Kontrollen, die schneller wieder absinkt und nach 24 Stdn. etwa den Wert der Kontrolltiere erreicht. Bei allen anderen untersuchten Organen sind keine deutlichen Unterschiede in der  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Aufnahme zwischen den Mg-arm ernährten Tieren und den Kontrolltieren festzustellen. Die verschiedenen ernährten Kontrollgruppen zeigten untereinander in der  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Aufnahme in die Organe keine Unterschiede. Sie wurden deshalb in Abbildung 3 zu einer Kontrollgruppe zusammengefaßt.

### Lokalisierung des $^3\text{H}$ -Cholesterin

Es gelang, das in die Leber und in die Aorta aufgenommene  $^3\text{H}$ -Cholesterin autoradiographisch zu lokalisieren (Abb. 4). 24 Stdn. nach der Injektion befand sich das  $^3\text{H}$ -Cholesterin in der Intima und in der Media der Aorta fast ausschließlich in den Interzellularspalten zwischen glatten Muskelzellen und elastischen Fasern, während in den Zellen kaum Aktivität nachzuweisen war. In der Leber lag die gesamte  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Aktivität dagegen intrazellulär über dem Cytoplasma. Zwischen Kontrolltieren und Mg-arm ernährten Ratten fand sich kein Unterschied in der Lokalisation des  $^3\text{H}$ -Cholesterin.

### Diskussion

Das  $^3\text{H}$ -Cholesterin lag in der Injektionslösung zum größten Teil, wie für Serum-Cholesterin physiologisch, an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Lipoproteine gebunden vor. Eine kleinere

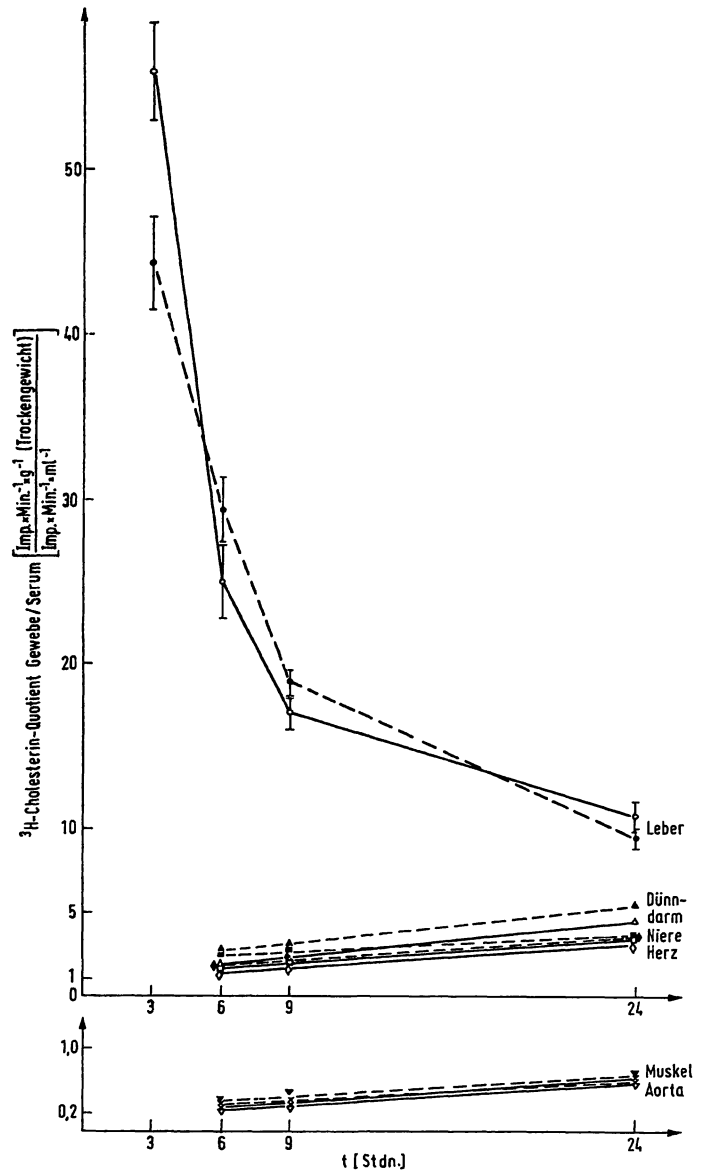


Abb. 3

$^3\text{H}$ -Cholesterin-Aktivität in verschiedenen Organen von normal und Mg-arm ernährten Ratten in Abhängigkeit von der Zeit nach i. v. Injektion bezogen auf die  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Aktivität im Serum. Mittelwerte und ihr mittlerer Fehler von jeweils 3 Mg-arm ernährten Ratten bzw. 9 Kontrolltieren

Mg-arm	Kontrolle	
o—o	•---•	Leber
△—△	▲---▲	Dünndarm
◇—◇	◆---◆	Herz
□—□	■---■	Niere
x—x	x---x	Muskel
▽—▽	▼---▼	Aorta

Menge war unspezifisch an andere Serumproteine adsorbiert. Da bei der Elektrophorese der Injektionslösung zwischen 10% und 20% der aufgetragenen Radioaktivität am Start zurückblieben, kann man annehmen, daß dieser Teil des  $^3\text{H}$ -Cholesterin an denaturiertes Eiweiß gebunden war oder als Suspension vorlag. Im Serum der Versuchstiere ließ sich bereits 5 Min. nach der Injektion kein elektrophoretisch unbewegliches  $^3\text{H}$ -Cholesterin nachweisen, was auf eine schnelle Bindung dieser Fraktion an Zelloberflächen (Erythrocyten, RES) und/oder an Lipoproteine in vivo hindeutet. Da in späteren Versuchszeiten fast das gesamte  $^3\text{H}$ -Cholesterin an Lipoproteine gebunden war, erfolgte die von uns



Abb. 4

Autoradiographien von Leber und Aorta 24 Stdn. nach i. v. Injektion von 1 mCi/kg Ratte  $^3\text{H}$ -Cholesterin

a)  
Autoradiographie von Leberzellen einer Mg-arm ernährten Ratte mit einer relativ gleichmäßigen Verteilung der  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Aktivität über dem Cytoplasma  
N = Kern, bei ↓ angedeutete Zellgrenze  
Vergrößerung: etwa 1:700

b)  
Autoradiographie eines Querschnittes durch die Aortenwand einer Mg-Mangelratte  
Bevorzugte Lokalisation der  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Aktivität zwischen glatten Muskelzellen (M) und elastischen Lamellen (X) bzw. im Randbereich elastischer Lamellen. Der Pfeil bei E zeigt die Richtung auf die Intima an  
Vergrößerung: etwa 1:700

gemessene Aufnahme des  $^3\text{H}$ -Cholesterin in die Organe in erster Linie aus dieser physiologischen Form des Serum-Cholesterin.

Die erste Blutentnahme führten wir 5 Min. nach der Injektion durch, da zu dieser Zeit eine gleichmäßige Vermischung des injizierten  $^3\text{H}$ -Cholesterin-haltigen Serums mit dem Serum der Empfängertiere erfolgt ist. Der von diesem Ausgangswert aus gemessene schnelle Abfall der Serum- $^3\text{H}$ -Cholesterin-Aktivität kann auf eine Aufnahme des radioaktiven Cholesterin aus Lipoproteinen in die Leber (und Erythrocyten) zurückgeführt werden. Der Wiederanstieg der  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Aktivität im Serum läßt sich durch den  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Austritt aus der Leber erklären.

Austausch-Adsorption und Adsorption von  $^3\text{H}$ -Cholesterin an membrangebundenes inaktives Cholesterin der Zelloberflächen von Erythrocyten, Endothelzellen und anderen Zellen kann einen derartigen Verlauf der Serum-Aktivitätskurve nicht erklären, da diese Prozesse wahrscheinlich nicht mit zeitlicher Verzögerung zu einem Wiederanstieg der  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Aktivität im

Serum führen. Beim schnellen anfänglichen Abfall der  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Aktivität im Serum können Adsorption und Austausch-Adsorption beteiligt sein. Sie werden aber quantitativ nicht erheblich sein, denn die spezifischen Aktivitäten des Cholesterin in verschiedenen Organen weisen große Unterschiede auf.

Den Aktivitätsabfall im Serum zwischen 9 und 24 Stdn. kann man auf die  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Aufnahme in die langsam aufnehmenden Organe beziehen, welche die in diesem Zeitraum geringe Abgabe von  $^3\text{H}$ -Cholesterin aus der Leber (unter Berücksichtigung ihrer Anteile am Körpergewicht) übersteigt. Außerdem erfolgt eine Verdünnung des  $^3\text{H}$ -Cholesterin durch Abbau und Ausscheidung sowie durch Neusynthese und Resorption von inaktivem Cholesterin.

Deutliche Unterschiede im Cholesterin-turnover bestehen zwischen Mg-Mangeltieren und Kontrolltieren nur in der Leber und im Serum. In die Aorta Mg-arm ernährter Ratten fanden wir keine erhöhte  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Aufnahme. Eine gesteigerte Permeabilität der Aortenwand für Cholesterin bei der Mg-Mangel-Arteriosklerose läßt sich daher ausschließen.

Unsere Ergebnisse bei relativ kurzer Versuchsdauer stimmen mit den in Langzeitstudien gewonnenen (6, 9, 10, 11) überein, wonach sich ein schnell austauschender Cholesterin-pool, bestehend aus Leber, Erythrocyten und Teilen der Eingeweide, und ein langsam austauschender Cholesterin-pool, bestehend aus Muskulatur, Haut und Gefäßen, unterscheiden lassen.

Diese unterschiedliche  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Aufnahme kommt bei einem Vergleich der Silberkorndichte der Autoradiographien von Leber und Aorta nicht zum Ausdruck. Ein quantitativer Vergleich der Autoradiographien ist aber nicht möglich, da die Schnitte für die autoradiographische Exposition mit Kohle bedampft wurden, um die Einwirkung reduzierender Substanzen des Schnittes auf die Photoemulsion zu verhindern. Die Dicke der Kohleschicht kann nicht exakt reproduziert werden, so daß bei der sehr geringen Zerfallsenergie des  $^3\text{H}$  von Bedampfung zu Bedampfung unterschiedliche Energien in der Kohleschicht absorbiert werden. Die Autoradiographien sind daher nur einzeln zu werten.

In der Aorta normaler und Mg-arm ernährter Ratten befand sich die gesamte  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Aktivität extrazellulär, was auch die geringe  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Aufnahme der Aorta unterstreicht. Das  $^3\text{H}$ -Cholesterin lag bei den Aorten zwischen den elastischen Lamellen und Zellmembranen der glatten Muskelzellen. Wegen der geringen Auflösung der Autoradiographie ist nicht zu entscheiden, ob das  $^3\text{H}$ -Cholesterin in die Zellmembranen eingebaut ist. Eine Bindung bzw. Ablagerung von  $^3\text{H}$ -Cholesterin an die Oberfläche elastischer Fasern ergänzt die Ergebnisse anderer Untersucher, wonach die ersten nachweisbaren Lipidablagerungen bei spontanen Arteriosklerosen auch am Elastin auftreten (12, 13).

Frau L. RICHTER und Frau A. THIELE danken wir für ihre gewissenhafte Mitarbeit.

## Literatur

1. SCHMALBECK, J., W. R. WILLEMS, F. DORN und TH. GÜNTHER, diese Z. 10, 270 (1972). — 2. FIELD, H., Jr., L. SWELL, P. E. SCHOOLS, Jr. und C. R. TREADWELL, *Circulation* 22, 547 (1960).
3. NEWMAN, H. A. I. und D. B. ZILVERSMIT, *J. biol. Chemistry* 237, 2078 (1962). — 4. DAYTON, S. und S. HASHIMOTO, *Exper. Molec. Pathol.* 13, 253 (1970). — 5. BOWYER, D. E. und G. A. GRESHAM, in „Atherosclerosis, Proc. of the Second Intern. Symp.“, ed. by R. J. Jones, p. 3, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1970). — 6. CHOBANIAN, A. V. und W. HOLLANDER, *J. clin. Invest.* 41, 1732 (1962). — 7. WATSON, D., *Clin. chim. Acta Amsterdam* 5, 637 (1960). — 8. ABELL, L. L., B. B. LEVY, B. B. BRODIE und F. E. KENDALL, *J. biol. Chemistry* 195, 357 (1952). — 9. GOODMAN, D. W. S., *l. c.* (5), p. 242. — 10. AVIGAN, J., D. STEINBERG und M. BERMAN, *J. Lipid Res.* 3, 216 (1962). — 11. BELL, F. P., H. B. LOFLAND, Jr. und T. B. CLARKSON, *Lipids* 5, 153 (1969). — 12. SMITH, E. B., P. H. EVANS und M. D. DOWNHAM, *J. Atheroscler. Res.* 7, 171 (1967). — 13. KRAMSCH, D. M. W. HOLLANDER und C. FRANZBLAU, *l. c.* (5), p. 115.

Prof. Dr. Th. Günther  
1000 Berlin 33  
Arnimallee 22