

Cholesterinbestimmung in β -Lipoproteinen*

Von C. C. Heuck**, Klinisches Institut für Herzinfarktforschung an der Medizinischen
Universitätsklinik Heidelberg

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Cholesterinsynthese durch das Apolipoprotein B, das hauptsächliche Apolipoprotein der β -Lipoproteinfraktion, gesteuert wird. Da die herkömmliche Differenzierung einer Hyperlipoproteinaemie vom Typ II auf der Bestimmung von β -Lipoproteincholesterin-Konzentrationen beruht und nur wenige Untersuchungen über den Apolipoprotein-B-Gehalt im Serum uns in der LDL-Fraktion bekannt sind, wurde eine vergleichende Untersuchung an 500 Normolipämikern und Hyperlipoproteinämikern (Typ IIa, IIb, IV) durchgeführt. Mit Hilfe der Ultrazentrifugation wurde der β -Lipoprotein-Cholesteringehalt und mit der radialen Immundiffusionstechnik der Apolipoprotein-B-Gehalt aus den Seren der Patienten ermittelt. Es zeigte sich, daß in den Seren von Typ II-Patienten der Gesamt-Apo-B-Gehalt und LDL-Apo-B-Gehalt im Serum signifikant gegenüber dem Typ IV und Normolipämikern erhöht ist. Zusätzlich ist das Verhältnis β -Cholesterin zu LDL-Apo-B zu höheren Werten verschoben. Im Kollektiv der Normolipämiker konnte eine altersabhängige Veränderung des Apolipoprotein-B-Gehaltes im Serum festgestellt werden. Die Ergebnisse werden im Hinblick auf ihre physiologische und diagnostische Bedeutung diskutiert.

Lipoproteine unterscheiden sich von den Serumproteinen dadurch, daß sie neben dem Eiweißanteil auch Lipide enthalten. Über ihre Oberflächenstruktur ist bis heute nur wenig bekannt. Aus Röntgenstrukturanalysen, chemischen und physiko-chemischen Untersuchungen lassen sich jedoch einige Hinweise auf die Unterschiede der Oberflächenstruktur in den einzelnen Lipoproteinklassen gewinnen. Die vier Lipoproteinklassen, Chylomikronen, VLDL-, LDL- und HDL-Lipoproteine zeichnen sich durch ein typisches Verhalten bei der Ultrazentrifugation in einem Dichte-Gradienten aus. Ebenso können sie in der Elektrophorese voneinander getrennt werden. Die HDL wandert in der Fraktion der α_1 -Globuline, die VLDL in der Fraktion der α_2 -Globuline und die LDL in der Fraktion der β -Globuline. Das Merkwürdige ist dabei, daß alle Lipoproteine ein 10- bis 100faches Molekulargewicht gegenüber den Globulinen haben, die in gleicher Position wandern. Die durch ihre Größe bedingte Hemmung der Wanderungsgeschwindigkeit wird jedoch durch eine erhöhte negative Ladungsdichte kompensiert. Da die Zusammensetzung der Aminosäuren im Proteinanteil der Lipoproteine sich nicht wesentlich von anderen Serumproteinen unterscheidet, kann man annehmen, daß vor allem Phospholipide, die sich an der Oberfläche der Lipoproteine befinden, zu der hohen negativen Ladungsdichte beitragen. Diese Annahme wird dadurch bestätigt, daß Lipoproteine, deren Phosphatanteil in den Phospholipiden enzymatisch abgespalten wurde, nicht mehr im elektrischen Feld wandern.

Eine besondere Eigenschaft ist in der Klasse der VLDL-Lipoproteine bemerkenswert. Diese Lipoproteine bestehen hauptsächlich aus neutralen Lipiden, die nicht zu einer negativen Ladung beitragen. VLDL-Lipoproteine sind etwa 10mal größer als LDL-Lipoproteine. Sie enthalten beide etwa die gleiche absolute Menge an Pro-

Determination of Cholesterol in β -Lipoproteins

Recent studies have shown that cholesterol synthesis is regulated by apolipoprotein B, the main apolipoprotein of the β -lipoprotein fraction. Since the customary differentiation of a hyperlipoproteinaemia type II is based on the determination of cholesterol concentration in β -lipoprotein, and, since little studies are known on the apolipoprotein-B content of serum LDL-fraction, a comparative investigation was carried out on 500 normolipaemics and hyperlipoproteinaemics (type IIa, IIb, IV). In the sera of patients, the cholesterol content of β -lipoprotein was determined by ultracentrifugation and apolipoprotein-B content was determined by the radial immunodiffusion technique. It was found that in the sera of type II patients the total apo-B content and the LDL-apo-B content of the serum is significantly higher compared to type IV patients and normolipaemics. In addition, the ratio of β -cholesterol to LDL apo-B is moved to higher values. In the group of normolipaemics, an age-dependent alteration of apolipoprotein-B content in serum was found. The results are discussed with respect to their physiological and diagnostic significance.

tein. Eigenartigerweise zeigen die VLDL jedoch eine größere elektrophoretische Mobilität als die LDL-Lipoproteine. Das kann nur durch die Tatsache erklärt werden, daß die negative Ladungsdichte an der Oberfläche dieser Partikel wesentlich höher ist als in den LDL-Lipoproteinen.

Röntgenstrukturanalysen weisen darauf hin, daß sich an der Oberfläche von VLDL-Lipoproteinen sowohl Lipide als auch Proteine befinden¹. Ähnlich ist die Oberfläche der HDL-Lipoproteine von Protein und von Phospholipiden besetzt. Hingegen ist der Lipidanteil in den LDL-Lipoproteinen fast vollständig durch einen Mantel von Protein eingeschlossen. Diese Beobachtungen werden durch chemische Untersuchungen bestätigt.

Es stellt sich die Frage, ob diese strukturellen Oberflächen-Unterschiede von physiologischer Bedeutung sind und insbesondere der spezifische hydrolytische Abbau der Lipide in den Lipoproteinen davon beeinflusst ist.

Hinweise ergeben sich hierfür aus den strukturellen Eigenschaften lipolytischer Enzyme. In neuesten, sehr eleganten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die spezifische Bindungsseite der pankreatischen Phospholipase A₂ durch eine Sequenz lipophiler Aminosäuren in unmittelbarer Nachbarschaft einer basischen Aminosäure Arginin charakterisiert ist². Diese Konformation gestattet eine spezifische hydrophobe Wechselwirkung zwischen langkettigen Fettsäureresten in Glyceriden und der lipophilen Seite der Aminosäuresequenz. Sie führt somit zu einer Stabilisierung des Enzymsubstratkomplexes, wodurch im Folgeschritt die Hydrolyse der Esterbindung eingeleitet werden kann.

Ähnliche Prozesse laufen bei der Hydrolyse von Estern langkettiger Fettsäuren ab, die durch synthetische kationische Polymere katalysiert werden. J. M. Klotz und Mitarbeiter haben beobachtet, daß Polyäthylenimin (PEI) besser als Albumin Lipide wie z. B. Methylorange zu

* Vortrag anlässlich der DGF-Vortragstagung in Münster/Westf. am 4. Oktober 1976.

** Anschrift des Verfassers: Dr. Dr. C. C. Heuck, Klinisches Institut für Herzinfarktforschung an der Medizinischen Universitätsklinik Heidelberg, Bergheimer Straße 58, 6900 Heidelberg.

¹ D. Morrisett, R. L. Jackson u. A. M. Gotto Jr., Ann. Rev. Biochemistry 44, 83 [1975].

² M. C. E. van Dam-Mieras, A. J. Slotboom, W. A. Pieterse u. G. H. de Haas, Biochemistry 14, 5387 [1975].

binden vermögen³. Die durch Polyäthylenimin katalysierte Hydrolyse von Nitrododecoylbenzoesäure läuft 400mal schneller als die gleiche Reaktion, wenn sie durch Propylamin katalysiert wird. Verwendet man ein mit Laurylsäure verestertes Polyäthylenimin unter physiologischen Bedingungen bei pH 7,4, dann ist die Reaktion auf das 850fache beschleunigt. Sie ist damit in der gleichen Größenordnung wie eine durch Chymotrypsin enzymatisch katalysierte Hydrolyse.

Die intramolekulare Struktur von PEI ist der spezifischen Bindungsseite der zuvor erwähnten Phospholipase sehr ähnlich. Es ist ein verzweigtes wasserlösliches Polykation mit primären, sekundären und tertiären Aminogruppen in der Nachbarschaft von lipophilen Alkylresten. Das veranlaßt uns, den Effekt von Polyäthylenimin auf Serumlipoproteine zu untersuchen. Die Ergebnisse der Untersuchungen werden im Folgenden dargestellt.

Setzt man einem Serum Polyäthylenimin zu, so führt das zur Bildung von Lipoproteinpolykationkomplexen mit nur geringer elektrophoretischer Mobilität. Hierbei werden jedoch nur die VLDL- und HDL-Lipoproteine gebunden, während LDL-Lipoproteine kaum eine Affinität zu den Polykationen aufzeigen. Ein Zusatz eines Polykationenaustauscher-Granulats bietet die Möglichkeit der Extraktion der Lipoproteinpolykationenkomplexe. Nach Zentrifugation der Mischung findet man nur LDL-Lipoproteine in Lösung, aus der dann der β -Cholesteringehalt nach üblichen Verfahren bestimmt werden kann (Abb. 1).

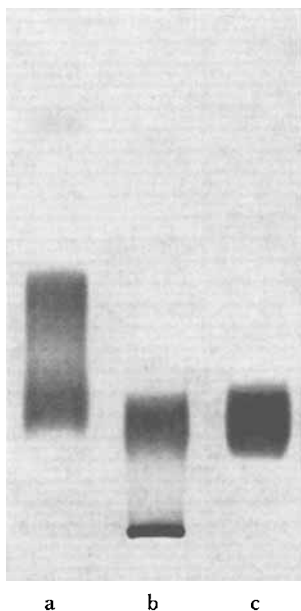


Abb. 1. Lipoproteinelektrophorese eines menschlichen Serums a: Natives Serum; b: Serum nach Zusatz von Polyäthylenimin; c: mit PEI behandeltes Serum nach Zusatz eines Kationenaustauschergranulats

Eine Untersuchung an isolierten Lipoproteinen ergab, daß die VLDL-Lipoproteine zu 93 % extrahiert werden können. Der Extraktionsgrad der HDL-Lipoproteine be-

³ J. M. Klotz, G. P. Royer u. A. R. Sloniewsky, Biochemistry 12, 4752 [1969].

trägt bei der Verwendung von Polyäthylenimin 60 %, verwendet man dodecoyliertes Polyäthylenimin, dann werden sie zu 75 % extrahiert. Hingegen werden isolierte LDL-Proteine nur zu 7 % extrahiert. Hierbei ist das Verhalten des Polykations gegenüber Lipoproteinen spezifisch. Ein Zusatz einer 6%igen Albuminlösung verändert nicht die Effizienz der Extraktion. Das weist darauf hin, daß die Wechselwirkung zwischen Polykation und Lipoproteinen nicht durch andere Serumproteine verändert wird. Wie ein Vergleich an 120 Seren zeigt, korreliert das Verfahren mit einem Koeffizienten von 0.95 gut mit der Bestimmung von β -Cholesterin mit Hilfe der Ultrazentrifugation, wie sie in der Differentialdiagnostik der Fettstoffwechselstörungen herkömmlicherweise eingesetzt wird (Abb. 2).

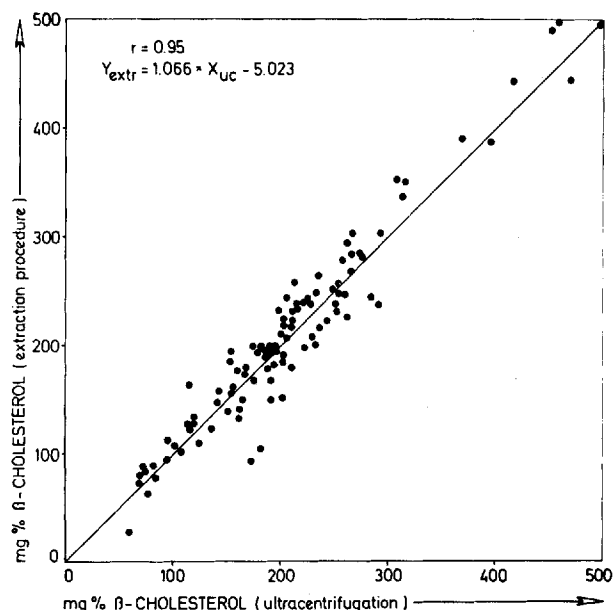


Abb. 2. Vergleich zwischen der LDL-Cholesterin-Bestimmung nach der Ultrazentrifugationsmethode und dem Extraktionsverfahren

Die Bestimmung von β -Cholesterin an einem Serum eines Typ IIb- und eines Typ IV-Patienten hat bei einer 16fach wiederholten Messung Variationskoeffizienten (2.8 und 3.2) ergeben, die nur bei optimalen Bedingungen in der Ultrazentrifugation erreicht werden (Tab. 1).

Tabelle 1

Vergleich der Präzision der LDL-Cholesterin-Bestimmung in einem Serum einer Person mit einer Typ IIb-Hyperlipoproteinämie und einer Person mit einer Typ IV-Hyperlipoproteinämie nach dem Extraktionsverfahren und der Ultrazentrifugationsmethode

	Typ IIb [mg/100 ml]	Typ IV [mg/100 ml]
Serum Triglyceride	189	221
Serum Cholesterin	509	248
β -Cholesterin (Extraktion)	445 \pm 26 (n: 15)	169 \pm 6 (n: 14)
β -Cholesterin (Ultrazentrifugation)	429 \pm 10 (n: 16)	182 \pm 6 (n: 15)

Das spezifische Verhalten des Polykations gegenüber den Lipoproteinen erklärt sich einerseits aus den chemischen Charakteristika des Polymers und andererseits aus den strukturellen Unterschieden der Oberflächen der einzelnen Lipoproteinklassen. Die Spezifität der Affinität des Polymers zu den Lipoproteinen wird durch hydrophobe Wechselwirkung zwischen neutralen Lipidresten

an der Oberfläche der Lipoproteine und den Alkylgruppen des Polymers, andererseits aber auch durch eine Salzbindung zwischen Aminogruppen von Polyäthylenimin und polaren Lipiden der VLDL- und HDL-Lipoproteine verursacht.

Eingegangen am 3. Dezember 1976.

Thermisch härtende Beschichtungsstoffe

Von K. A. van Oeteren*, Hermann Wiederhold, Lackfabriken, Hilden/Rhld.

Beschichtungsstoffe können je nach ihrem Filmbildungsmechanismus eingeteilt werden in:

1. Physikalisch härtend
2. Chemisch härtend
 - a) oxydativ
 - b) chemisch katalytisch
 - c) thermisch härtend

Die Bindemittel der chemisch katalytisch und thermisch härtenden Beschichtungsstoffe sind im ausgehärteten Zustand Duroplaste. Sie werden durch Polyaddition, Polykondensation oder Polymerisation vom flüssigen in den festen, unschmelzbaren und unlöslichen Zustand übergeführt. Die Anwendung erfolgt meist in Kombination mit Pigmenten und Extendern.

Thermisch oder wärmehärtende Beschichtungsstoffe sind Beschichtungsstoffe, die in der Wärme bei Temperaturen von 60 bis 250°C in Trockenöfen, Infrarotkammern u. a. getrocknet werden. Die weitverbreitete Bezeichnung Einbrennlacke ist nicht ganz zutreffend, da unter Einbrennen in der Technik wesentlich höhere Temperaturen als oben angegeben erforderlich sind.

Thermisch härtende Beschichtungsstoffe werden in den verschiedensten Formen angewandt, und zwar für die industrielle Beschichtung (Lackierung) in Form der Industrielacke, des Coil Coatings, der Plastisole, von Pulver und des schweren Korrosionsschutzes.

In der vorliegenden Arbeit soll nur der letzte Punkt behandelt werden.

Thermisch gehärtete Beschichtungen haben im Gegensatz zu luftgetrockneten Beschichtungen, da sie „vernetzbar“ Bindemittel enthalten, d. h. solche die bei der Temperatureinwirkung durch eine chemische Reaktion umgewandelt werden, eine wesentlich höhere chemische Widerstandsfähigkeit, Härte, Abriebfestigkeit usw. bei im allgemeinen guter Haftung. Sie sind ferner weitgehend antiadhäsiv und hydrophob. Dies gilt auch im Vergleich zu Beschichtungen, wie bei Zweikomponentenbeschichtungsstoffen, die bei Raumtemperatur vernetzt werden können. Vielfach können die für thermisch härtende Beschichtungen verwandten Bindemittel, z. B. Phenolharze, nur thermisch vernetzt werden; eine Lufttrocknung reicht nicht aus. Durch thermische Nachbehandlung kann aber auch die Beständigkeit lufttrocknender Systeme beträchtlich erhöht werden.

Bezüglich der Größe der zu behandelnden Gegenstände ist man an die Abmessungen der Trocknungs-

anlage gebunden. Die Ofentrocknung kann in der Regel nur bei Spezialfirmen erfolgen. Eine Trocknung auf der Baustelle ist durch Infrarotstrahler, Warmluft und Warmwasser möglich. Der Schutzwert der so getrockneten Beschichtungen ist bei einigen Typen jedoch geringer als bei der Ofentrocknung.

Thermisch härtende Beschichtungen im schweren Korrosionsschutz werden für zwei Anwendungsgebiete, die sich vielfach überschneiden, eingesetzt, und zwar:

zur Vermeidung der Korrosion bzw. um statt hochlegierte Stähle noch normale Stähle einsetzen zu können;

zur Vermeidung der Inkrustation durch Korrosionsprodukte und/oder pulvrige und klebrige Produktablagerungen.

Einige Beispiele für die Anwendung sind nachstehend aufgeführt:

Wasseraufbereitung: Behälter für vollentsalztes Kessel-
speisewasser

Wärmeaustauscher
und Kühler: Rohre der Kühlwasser- und/oder
Produktseite

Getränkewirtschaft: Bier-, Sekt-, Wein-, Saftlager-
behälter

Kunststoffindustrie: Zentrifuge bei der Niederdruck-
Polyäthylen-Herstellung, Granu-
latbunker

Abgasreinigungs-
anlagen: Stahlblechkamine, Filter, Wascher,
Warmwasserboiler usw.

Korrosionsbeständigere Werkstoffe oder beschichteter
Stahl?

Vielfach können aus kosten- oder korrosionstechnischen Gründen anstelle von Stahl bei Korrosionsproblemen keine korrosionsbeständigeren Werkstoffe eingesetzt werden. So wird z. B. ein austenitischer 18/8 Chrom-Nickel-Stahl als Kondensatorrohr durch Chloridionen durch Lochfraß schnell zerstört. Auch wird das Inkrustationsproblem nicht gelöst. Ferner werden vielfach aus statischen und Kostengründen z. B. Kühlrohre aus Messing, die Kopfplatte aus Stahl gewählt. Hier ist dann zur Vermeidung einer Kontaktkorrosion eine Beschichtung erforderlich.

Vermeidung der Inkrustation

Bei Rohren, z. B. in Kühlern, treten auf der Produktseite durch Abscheidungen aus dem Produkt und auf

* Anschrift des Verfassers: Obering. K. A. van Oeteren, Hermann Wiederhold, Lackfabriken, Düsseldorf Straße 102, 4010 Hilden/Rhld.