

**DISTRIBUTIE EN SAMENSTELLING VAN ZURE
MUCOPOLYSACCHARIDEN IN NORMAAL EN
ATHEROSCLEROTISCH HUMAAN AORTAWEEFSEL**

PROEFSCHRIFT

**TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN
DE WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN AAN DE
RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN, OP GEZAG VAN DE
RECTOR MAGNIFICUS DR. W. DEN BOER, HOOGLERAAR
IN DE FACULTEIT DER LETTEREN, TEN OVERSTAAN
VAN EEN COMMISSIE UIT DE SENAAT TE VERDEDIGEN
OP WOENSDAG 1 JULI 1964 te 14 UUR**

DOOR

FOPPE BONNO KLYNSTRA
GEBOREN TE 'S-GRAVENHAGE IN 1917

DRUCO DRUKKERIJBEDRIJVEN - LEIDEN

Promotor: Prof. Dr. H. Veldstra

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek maakt deel uit van een project over de chemische aspecten van atherosclerose en thrombose, dat onder leiding van Prof. Dr. C.J.F. Böttcher en onder auspiciën van de Gezondheidsorganisatie T.N.O. wordt uitgevoerd.

Voor dit onderdeel van het project werd de gastvrijheid van het Biochemisch Laboratorium van de Rijksuniversiteit te Leiden genoten.

STELLINGEN

I Het splitsen in homogene fracties van zure MPS-mengsels uit humaan aortaweefsel door middel van fysisch-chemische scheidingsmethoden wordt door onderlinge interactie bemoeilijkt.

II De wijze van behandeling van het onderwerp "mucopolysacchariden" in het boek "Atherosclerosis and its Origin" is niet verantwoord.

S. Bertelsen, *Atherosclerosis and its Origin*, Ed. Sandler en Bourne, Academic Press, New York, London 1963, pp. 119-165.

III De bewering van Buddecke, dat de aortawand ongeschikt is voor de biosynthese van glycoproteinen, mist elke grond.

E. Buddecke, *Z. physiol. Chem.*, 318 (1960) 33.

IV Het trekken van kwantitatieve conclusies uit histochemische kleurings-intensiteiten is niet verantwoord.

Vlg. S. Lindsay, I.L. Charkoff, *A.M.A. Arch. Pathol.*, 63 (1957) 460.
J.F. Rinehart, L.D. Greenberg, *A.M.A. Arch. Pathol.*, 51 (1951) 12.
F.T. Zugibe, K.D. Brown, *Circulation Res.*, 8 (1960) 287.

V Het vermogen van de cambiumcel om een bepaald hout-element te leveren is, bij *Corylus avellana* L. "Contorta", onder meer afhankelijk van zijn lengte.

F.B. Klynstra, J.C. Lycklama, A.M. Siebers, P.D. Burggraaf, *Acta Bot. Neerlandica*, 22 (1964).

- VI De gradient-inductie hypothese van J. en P.M. Warren Wilson valt moeilijk te rijmen met de wijze waarop bij *Combretum* (Combretaceae) en bij *Strychnos* (Loganiaceae) het interxylair phloem wordt gevormd.

A.J. Eames en L.H. MacDaniels, *An Introduction to Plant Anatomy*, London 1925, blz. 258.
J. en P.M. Warren Wilson, *New Phytol.* 60 (1960) 63.
J. en P.M. Warren Wilson, *Ann. Bot. N.S.*, 25 (1961) 104.

- VII Horn's onderverdeling van het genus *Megacephala* Gistel (Coleoptera, Cicindelinae) in subgenera vindt geen steun in zijn phylogenetische beschouwing.

W. Horn, *Genera Insectorum Coleoptera Adephaga Fam. Carabidae Subfam. Cicindelinae*, 132.

- VIII De bewering van Burtt en Catton, dat meer dan één van de beelden, welke in een ommatidium optisch waar te nemen zijn, het "oog" zouden kunnen prikkelen, is aan bedenkingen onderhevig.

E.T. Burtt en W.T. Catton, XI Int. Kongress für Entomologie, Verhandlungen I, 670, Wien 1960.

- IX De conclusie van Kayne en Alpert, dat er bij de hond geen causaal verband bestaat tussen zuurstofschuld en melkzuurophoping na spierarbeid, in aanvechtbaar.

H.L. Kayne en N.R. Alpert, *Am. J. Physiol.* 206 (1964) 51.

- X De conclusie van Hochachka, dat het sneller aflossen van zuurstofschuld bij forellen uit snelstromend water, in vergelijking met forellen uit rustig water, verklaard kan worden uit de grotere buffercapaciteit van het bloed, is niet overtuigend.

P.W. Hochachka, *Can. J. Zool.*, 39 (1961) 767.

- XI Er zijn sterke aanwijzingen, dat er een verband bestaat tussen het concentratie-effect en het Bohr-effect bij haemoglobine.

R. Hill en H.P. Wolvekamp, Proc. Royal Soc. London, Series B No. 819 vol. 120 (1936) 484.

- XII De omstandigheid, dat men zijn conclusies veelal aan de hand van gegevens verkregen uit steekproeven zal moeten trekken, confronteert ook de bioloog met de noodzakelijkheid om statistische informatie te kunnen begrijpen, beoordelen en gebruiken.

Aan de nagedachtenis van mijn vader

I N H O U D

	blz.
I INLEIDING EN MOTIVERING VAN HET ONDERWERP	7
 II LITERATUUROVERZICHT	 11
1. De zure mucopolysacchariden van de aortawand	11
2. Mucopolysacchariden en atherosclerose	16
3. Methodieken:	24
A. Isolering	24
B. Zuivering	25
C. Fractionering	25
4. Nomenclatuur van de mucopolysacchariden	28
 III GEBRUIKTE MATERIALEN EN METHODEN	 33
1. Chemicaliën en reagentia	33
2. Onderzocht aortaweefsel	33
3. Behandeling van het aortaweefsel voor de MPS iso- lering	34
4. Isolering en zuivering van de zure MPS	36
5. Splitsen van het zure MPS-mengsel	41
 IV RESULTATEN	 51
1. Gehalte aan zure MPS van intima-plus-media prepa- raten	51
2. Distributie van de zure MPS in de aortawand	55
3. Samenstelling van de zure MPS-mengsels	61

	blz.
V DISCUSSIE EN SAMENVATTING	73
Summary	79

I INLEIDING EN MOTIVERING VAN HET ONDERWERP

De wand van de grote arteriën kunnen wij van binnen naar buiten in drie lagen onderverdelen: de tunica intima, de tunica media en de tunica adventitia. De intima wordt naar het lumen toe begrensd door een endothelium. De laag direct onder het endothelium is normaliter dun. Hij is opgebouwd uit enige dunne, ineengevlochten vezels en vibroblasten. De daaropvolgende intimale laag bestaat uit een dicht vlechtwerk van elastische vezels, waartussen collagene vezels, fibroblasten en kleine bundels gladde spiercellen gelegen zijn. Naar buiten toe gaat deze laag over in een elastische membraan, de membrana elastica interna. Deze membraan vormt de grens van de intima met de media. De media bestaat hoofdzakelijk uit elastisch weefsel. In de humane aorta is hij uit vijftig tot vijf en zestig concentrische elastische membranen samengesteld. Deze membranen zijn van een op kant gelijkende structuur en zijn onderling verbonden. De ruimte tussen deze elastische membranen is met collagene vezels, fibroblasten en gladde spiercellen opgevuld. De gladde spiercellen zijn omhuld door collagene vezels en vormen zo een extra verbinding tussen de membranen onderling. Al deze verschillende structuren, zowel bij de intima als bij de media, liggen in de amorphe grondsubstantie ingebed.

Slechts de buitenlagen van de media worden door bloedcapillairen, de vasa vasorum, verzorgd. De rest van het weefsel is voor de gehele aan- en afvoer op diffusie aangewezen.

De amorphe intercellulaire grondsubstantie bestaat uit eiwitten, mucopolysacchariden, water, electrolyten en lipiden. De eigenschappen van de mucopolysacchariden en hun interrelatie tot de overige componenten zijn bepalend voor het goed functioneren van de grondsubstantie. De waterhuishouding, permeabiliteit, ionenuitwisseling, zuurgraad, adsorptievermogen, diffusie van stoffen, mechanische en andere eigenschappen van de grondsubstantie zijn

een functie van de chemische en macromoleculaire structuur van deze mucopolysacchariden (6, 12, 14).

Bovendien zijn zure MPS betrokken bij het verwijderen van lipiden uit het bloed (clearing) en oefenen zij een remmende werking uit op de bloedstolling (11).

Veranderingen in de grondsubstantie behoren volgens de huidige opvatting tot de primaire processen in de atherogenese (6, 10, 12, 14).

Histologisch-histochemisch vormt verhoogde metachromasie van de grondsubstantie een der eerst waarneembare veranderingen bij atherosclerose (9, 12, 15, 17, 18). Metachromasie is een verandering in het absorptiespectrum van kleurstoffen door hun interactie met het oppervlak van de zogenaamde chromotrope stoffen. Hiertoe behoren, in ons geval, alle sulfaatgroepdragende macromoleculen, zoals de meeste zure mucopolysacchariden, maar ook andere stoffen met talrijke zuurgroepen en wel carboxy- en fosfaatcolloïden (12).

Er heerst in de literatuur geen eensgezindheid over de vraag of tijdens atherogenese de zure mucopolysacchariden (zure MPS) in de arteriewand een relatieve toename ten opzichte van andere componenten vertonen.

Uit histochemische waarnemingen heeft men wel tot een toename willen concluderen, omdat bij toenemende graad van atherosclerose een intensievere kleuring met bepaalde kleurstoffen werd bereikt. Het is echter nimmer geoorloofd om kwantitatieve conclusies te trekken uit dergelijke kleurreacties. Behalve het reeds vermelde gebrek aan strenge specificiteit van metachromasie zijn er bij de kleuring op zure MPS in weefselsneden tenminste vijf verschillende oorzaken welke tot verhoging in kleurintensiteit kunnen leiden:

- a. een toename in gehalte aan zure MPS;
- b. een verandering in hun chemische samenstelling (13);
- c. een toe- of afname in hun polymerisatiegraad;
- d. een verminderde koppeling met proteïnen en fosfolipiden;
- e. een losser worden van het weefsel, waardoor de kleurstoffen beter toegang tot de groepen, waarmede interactie optreedt, krijgen.

De toepassing van chemische analyse op aortamateriaal heeft evenmin tot een eensluidend antwoord mogen leiden. Zowel een toename (6, 8) als een afname (1, 16) in zure MPS concentratie bij toenemende graad van atherosclerose werd vermeld.

Omtrent de distributie van zure MPS over de verschillende lagen van de arteriele wand is nog minder bekend dan over de totale hoeveelheid. Om bovengenoemde redenen zijn histologische of histochemische studies ook hier minder geschikt om ons inzicht te verdiepen. De enige chemische studie over de distributie van zure MPS in de aortawand is die van BERENSON (1). Deze auteur splitste de aortawand van mensen en runderen in twee lagen: een binnenlaag bestaande uit de intima plus ongeveer 20% van de media en een buitenlaag, welke de rest van de media plus de adventitia omvatte.

Als gevolg van het chemisch-analytisch onderzoek van de lipiden van "normale" en atherosclerotische aortaweefsels door ons instituut (2, 3, 4, 5) kregen wij de beschikking over ruime hoeveelheden ontvet weefsel. Deze preparaten vormen een ideaal uitgangsmateriaal voor aansluitende MPS-isolatie. De omstandigheid, dat over het gehalte aan zure MPS van de onaangetaste intima en media en de afzonderlijke laesies niets bekend was, gevoegd bij het feit, dat hier een unieke kans lag om uit hetzelfde uitgangsmateriaal, met uitsluiting van verschillen in voorbehandeling en biologische variabiliteit, zowel gegevens omtrent de lipiden als de MPS te verkrijgen, deed ons besluiten om naast het bestaande lipidenonderzoek het onderzoek naar de concentratie, distributie en samenstelling van de MPS als functie van de graad van atherosclerose ter hand te nemen. Het doel van dit onderzoek is het verkrijgen van een beter inzicht in de ruimtelijke betrekkingen tussen vetophoping en MPS-concentratie in de atherosclerotische aortawand in het algemeen en van die van beider afzonderlijke componenten in het bijzonder.

In dit proefschrift zullen de distributie en samenstelling van de zure MPS in humaan aortaweefsel als functie van de graad van atherosclerose nader worden behandeld.

LITERATUUR

1. Berenson, G.S., J. Atheroscler. Res., 1 (1961) 386.
2. Böttcher, C.J.F., J.G. Keppler, C.C. ter Haar Romeny-Wachter, E. Boelsma-van Houte en C.M. van Gent, Lancet (1958) 1207.
3. Böttcher, C.J.F., F.P. Woodford, C.C. ter Haar-Romeny-Wachter, E. Boelsma-van Houte en C.M. van Gent, Lancet (1960 I) 1378.
4. Böttcher, C.J.F. en C.M. van Gent, J. Atheroscler. Res., 1 (1961) 36.
5. Böttcher, C.J.F. en F.P. Woodford, Fed. Proc., 21 (1962) 15.
6. Buddecke, E., Angew. Chem., 72 (1960) 663.
7. Buddecke, E., Z. physiol. Chem., 318 (1960) 33.
8. Buddecke, E., J. Atheroscler. Res., 2 (1962) 32.
9. Faber, M., A.M.A. Arch. Path., 48 (1949) 342.
10. Gerö, S., J. Gergely, T. Devényi, L. Jakab, J. Székely en S. Virág, J. Atheroscler. Res., 1 (1961) 64.
11. Kirk, J., The Arterial Wall, Ed. A.I. Lansing, Williams and Williams Corp., Baltimore 1959, 161.
12. Lindler, J., Arteriösklerose, Aetiologie, Pathologie, Klinik und Therapie, red. G. Schattler, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1961, 51.
13. Manley, G., Dissecting aneurism of the aorta, Thesis, Bristol 1962.
14. Schallock, G., J. Atheroscler. Res., 2 (1962) 25.
15. Schultz, A., Virchows Arch. path. Anat., 239 (1922) 415.
16. Uotila, U., E. Levonen en J. Laekallio, Acta Endocrinol., 36 (1961) 1.
17. Wexler, B.C., T.E. Brown en B.F. Miller, Circulation Res., 8 (1960) 287.

II LITERATUUROVERZICHT

1. De zure mucopolysacchariden van de aortawand.

Onder zure mucopolysacchariden worden die macromoleculaire samengestelde aminosuikers verstaan, welke onder meer hexuronzuren en/of zwavelzuurresten als bouwstenen bevatten. Tot nu toe zijn acht verschillende zure MPS beschreven welke in bindweefsel voorkomen. Twee daarvan bevatten geen zwavelzuurresten, n.l.

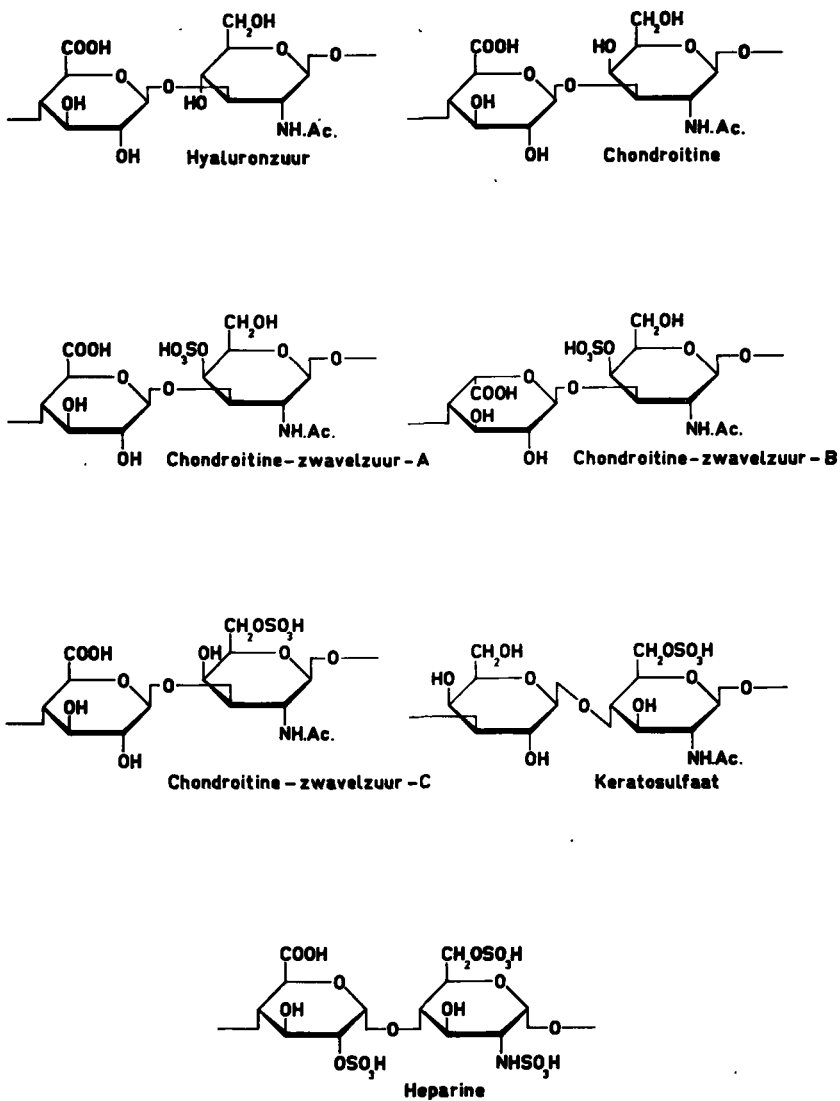
Hyaluronzuur (HA). Een onvertakte polymeer, die equimolaire hoeveelheden N-acetyl-D-glucosamine en D-glucuronzuur bevat (fig. 1.). Het is in zeer vele dierlijke weefsels aangetoond en werd het eerst door MEYER en PALMER (46) uit het glasachtig lichaam van het runderoog geïsoleerd. Het moleculair gewicht varieert van $1 \cdot 10^6$ tot 2.5×10^6 (vergelijk 11). Testiculaire zowel als bacteriele hyaluronidase breken deze polymeer af tot disaccharide eenheden.

Chondroitine. Een aan hyaluronzuur analoog polymeer, waarin het D-glucosamine door D-galactosamine vervangen is. Het is tot nu toe slechts met zekerheid in de cornea aangetoond (48). Chondroitine wordt eveneens afgebroken door zowel bacteriele als testiculaire hyaluronidase (67).

De zes gesulfateerde mucopolysacchariden zijn:

Chondroitine zwavelzuur A (CSA-A). Opgebouwd uit disaccharide eenheden, waarin D-glucuronzuur in de β -configuratie gekoppeld is aan de C-3 van N-acetyl-D-galactosamine. Aan de C-4 plaats van de aminosuiker bevindt zich een zwavelzuurrest (28). Het is een stof met een moleculair gewicht van 40.000 à 50.000 en komt onder andere voor in kraakbeen, been en cornea. CSA-A is bestand tegen bacteriele hyaluronidase, maar wordt door het testiculaire enzym afgebroken.

Chondroitine zwavelzuur B (CSA-B) (syn. β -heparine). Het D-glucu-



Figuur 1

ronzuur is in deze polymeer vervangen door L-iduronzuur; verder komt de bouw overeen met het CSA-A. Vooral in de huid wordt het CSA-B aangetroffen. Noch bacteriele noch testiculaire hyaluronidase vermogen het molecuul af te breken.

Chondroïtine zwavelzuur C (CSA-C). Dit polysaccharide is evenals het CSA-A opgebouwd uit D-glucuronzuur en N-acetyl-D-galactosamine, doch de zwavelzuurrest zit hier op de C-6 plaats. CSA-C werd uit de huid, beenderen, pezen en hartklepjes geïsoleerd. Het is resistent tegen bacteriele, maar niet tegen testiculaire hyaluronidase.

Keratosulfaat (KS). Door de afwezigheid van een hexuronzuur als bouwsteen neemt het keratosulfaat een aparte plaats in onder de zure mucopolysacchariden. Het bevat equimoleculaire hoeveelheden N-acetyl-glucosamine, galactose en zwavelzuur. Voor het eerst werd het in 1953 door MEYER et al. (48) uit cornea geïsoleerd. Ook de nucleus pulposus van de tussenwervelschijven (25) en het costale kraakbeen (50) bleken rijk aan keratosulfaat te zijn. De structuur werd in 1962 door HOFFMAN en MEYER (29) opgehelderd, het zwavelzuur bleek aan de C6-OH van het glucosamine te zijn veresterd. Keratosulfaat is zowel tegen bacteriele als testiculaire hyaluronidase resistent.

Heparitine sulfaat. Onder de naam van heparine monosulfaat werd het in 1948 door JORPES en GARDELL (33) uit runderlever en longweefsel geïsoleerd. De nauwkeurige structuur is nog steeds niet opgehelderd. De bouwstenen zijn N-acetyl-glucosamine, glucuronzuur en zwavelzuur. De verhouding van zwavelzuur tot glucosamine is niet constant, slechts een deel van de glucosamine bevat een sulfaatgroep (57). Het is waarschijnlijk, dat ook slechts 50 à 70% van de aminogroepen van het glucosamine geacetylerd zijn. Noch bacteriele noch testiculaire hyaluronidase vermogen deze zure MPS af te breken.

Heparine. Ondanks de aandacht, die dit zure MPS wegens zijn grote remmende activiteit bij de bloedstolling mocht ontvangen, kon de structuur eerst zeer onlangs door HOFFMAN en MEYER (29) worden vastgesteld. De disaccharide eenheid van deze polymeer is opgebouwd uit D-glucuronzuur, N-sulfonyl-D-glucosamine en nog twee zwavelzuurresten, namelijk op de 6-positie van de aminosuiker en

op de 2 of 3 plaats van het glucuronzuur (zie figuur 1). Het moleculair gewicht bedraagt ongeveer 17000. Deze stof werd uit verschillende weefsels van zoogdieren geïsoleerd. Volgens WILANDER en HOLMGREN (68) is het gehalte aan heparine het hoogst in weefsel, dat rijk is aan mastcellen. Mastcellen liggen in grote getale in de wanden van bloedvaten. Evenals keratosulfaat, CSA-B en heparitine sulfaat is heparine resistent tegen zowel bacteriele als testiculaire hyaluronidase.

Ruim veertig jaar geleden extraheerde LEVENE (39) met verdund NaOH uit zeventig pond aorta's ongeveer 40 gram zure MPS. Hij was de overtuiging toegedaan met een homogene stof te maken te hebben en wel met chondroitine zwavelzuur. Het zou nog een kwart eeuw duren, voordat MEYER en medewerkers het complexe karakter van de zure MPS in de aortawand onderkenden. Aanvankelijk maakten ook deze onderzoekers gebruik van NaOH voor de extractie van de mucopolysacchariden, doch later onderwierpen zij het ontvette weefsel aan een proteolytische vertering met pepsine en trypsine (48). Gebruik makende van de trapsgewijze alcohol-fractionering splitsen zij het MPS mengsel aanvankelijk in twee componenten, namelijk het CSA-B en CSA-C (47). Hyaluronzuur werd een paar jaar later door deze school uit runderaorta geïsoleerd (49). Tenslotte kwam hier als vierde component het heparitine sulfaat bij (34).

Tot geheel andere resultaten leidde het onderzoek van BUDDECKE (13). Evenals KAPLAN en MEYER (34) werkte deze onderzoeker met menselijk aortamateriaal. Het ontvette weefsel werd ook hier aan een proteolytische vertering onderworpen, echter met behulp van het enzym papaine. De zure MPS werden volgens de methode van ANTONOPOULOS et al. (4) kolomchromatografisch in fracties gescheiden. Hij verkreeg op deze wijze vijf fracties, welke hij van de namen keratosulfaat, hyaluronzuur, chondroitine, chondroitine zwavelzuur A + B en heparine voorzag. In een lezing op 19-20 October 1961 te Tremsbüttel (16) verkondigde deze auteur echter, dat HA, CSA-B, CSA-C en HS typisch waren voor de humane aorta, dat heparine of in nog nooit nauwkeurig geïdentificeerde sporen of helemaal niet in de menselijke aorta voorkwam en voorts, dat KS slechts door MEYER (44) was aangetoond in aorta's bij Marfan's syndroom. Het opmerkelijke feit doet zich hier voor, dat BUDDECKE zijn vorige werk totaal negeert.

BERENSON (5) splitste de zure MPS, uit runderaorta's, aanvankelijk in drie fracties: HA, CSA-A en CSA-B. Een jaar later (6) gelukte het hem uit de hyaluronzuurfractie het heparitine sulfaat af te zonderen. In zijn lezing op het Symposium on Vascular and Haematological Factors in Arteriosclerosis te Tremsbuttel (West Duitsland) op 19-20 October 1961 (7) deelde deze onderzoeker mede, dat hij het zure MPS-mengsel uit de menselijke aorta met behulp van glaspapierchromatographie in CSA-A, CSA-B, CSA-C, heparitine sulfaat en heparine had kunnen opdelen.

Een ander interessant onderzoek naar de samenstelling van het zure MPS mengsel in de menselijke aorta werd verricht door DYRBYE en KIRK. Om de MPS te isoleren maakten zij gebruik van de pepsine-trypsine methode van MEYER en medewerkers (48). Het mengsel werd door middel van papier-electrophorese gescheiden in ongeveer 50% CSA-A (deze fractie zou even goed als CSA-C bestempeld kunnen worden), 15% CSA-B, 15% HA en een heparine-achtige fractie (19, 21, 37).

Indien wij bovenstaande resultaten in het kort samenvatten, dan zien wij, dat alle auteurs het er over eens zijn, dat het zure MPS-mengsel uit de menselijke aortawand uit minimaal vier componenten bestaat en dat HA en CSA-B hier zeker toe behoren. Ook is men het er over eens, dat er behalve CSA-B nog een ander chondroitine zwavelzuur in het mengsel voorkomt en wel in zeer hoge percentages (50 à 80%). Aanvankelijk dachten MEYER en RAPPORT (47) met CSA-A te maken te hebben, doch op grond van de oplosbaarheden van de calciumzouten in aethanol-water mengsels en van het specifiek draailingsvermogen kwamen MEYER en medewerkers (49) tot de slotsom, dat deze component met CSA-C overeenkwam.

BUDDECKE (13) meende aanvankelijk, dat CSA-C typisch is voor ongedifferentieerd bindweefsel, achtte op grond hiervan het voorkomen van CSA-C in de aorta uitgesloten en noemde om deze weinig overtuigende reden de door hem geïsoleerde fractie CSA-A. Twee jaar later was echter ook hij overtuigd met CSA-C te maken te hebben (16).

BERENSON (7) meent zowel CSA-A als CSA-C aangetoond te hebben in de aortawand. Te veel waarde mogen wij hieraan echter niet hechten, daar volgens hemzelf de identificatie incompleet is.

Tabel I De volgens aangegeven literatuur uit humaan aortaweefsel geïsoleerde zure mucopolysacchariden.

Literatuur	34	13	16	7	21
Hyaluronzuur	+	+	+	+	+
Chondroitine	-	+	-	-	-
CSA-A	-	+	-	+	+
CSA-B	+	+	+	+	+
CSA-C	+	-	+	+	-
Keratosulfaat	-	+	-	-	-
Heparitinesulfaat	+	-	+	+	?
Heparine	-	+	-	+	?

2. Mucopolysacchariden en atherosclerose.

Reeds ANITSCHKOW (1, 2, 3) wees op het verband tussen verhoogde metachromasie en vetophoping in atherosclerotisch aortaweefsel van konijnen en Guinese biggetjes. SCHULTZ (61) suggereerde, dat het begin van het vervettingsproces plaats vond in de mucoïde grondsubstantie. FABER (22) schreef de verhoogde metachromasie bij atherosclerose toe aan een toename van sulfaatgroepen in de mucopolysacchariden. Deze sulfaatgroepen zouden dan verantwoordelijk zijn voor het binden van een toenemende hoeveelheid cholesterol en zo het vervettingsproces inluiden. Ook RINEHART en GREENBERG (54) vonden, dat, zowel bij de Rhesus aap als bij de mens, een intensivering van de metachromasie tot een van de eerst waarneembare histologische veranderingen in de jonge laesies behoorde. Zij meenden echter kwantitatieve conclusies uit de kleurintensiteit te mogen trekken en beschouwden de toename in meta-

chromasie als een maat voor de toename in mucoïde substantie. Ophoping van mucopolysacchariden in de intima, gecombineerd met proliferatie van de cellen en vorming van collage en elastische vezels in de grondsubstantie, beschreven deze auteurs als primair voor de atherogenese bij de mens zowel als bij de Rhesus aap. De accumulatie van lipiden zou een secundair verschijnsel zijn, waarbij infiltratie vanuit de bloedstroom op de voorgrond zou treden.

In een studie over atherosclerose bij de baviaan, *Papio anubis*, kwamen LINDSAY en CHARKOFF (41) tot dezelfde conclusie. Proliferatie van fibroblasten en de vorming van mucopolysacchariden en collage en elastische fibrillen leidden volgens hen tot de vorming van intimale verdikkingen (plaques). Lipiden-ophoping vond plaats in de reeds gevormde "plaques" en wel in hoofdzaak nabij de nieuw gevormde elastische fibrillen. Voor deze fibrillen bleek hun affiniteit groter te zijn dan voor de mucoïde substantie. Volgens deze auteurs zou de atherogenese bij de baviaan grote gelijkenis vertonen met die bij de mens. Alhoewel hun zienswijze over de toename aan mucopolysacchariden juist moge zijn, moet er toch op gewezen worden, dat ook zij hun conclusie uitsluitend en alleen baseren op de resultaten van histologische kleuringsmethoden.

ZUGIBE en BROWN (70) gaan in hun uitspraak, de relatie tussen lipiden en elastische vezels betreffende, nog iets verder dan LINDSAY en CHARKOFF en ontkennen elke samenhang tussen lipiden en mucopolysacchariden. Ook zij zijn ervan overtuigd, dat atherogenese gepaard gaat met een toenemend gehalte aan zure MPS. Zij achten dit echter een secundair verschijnsel. Door een voorbehandeling van de weefselcoupes met testiculaire hyaluronidase, gevolgd door de gebruikelijke kleurmethoden hebben deze onderzoekers getracht om langs histochemische weg er achter te komen welke groep van zure MPS verantwoordelijk is voor deze "toename". Bij zuigelingen, baby's en kinderen van 1 - 10 jaar had deze voorbehandeling een aanzienlijke afname in alcian blue-kleurbaarheid ten gevolge, dit in tegenstelling tot de leeftijdsgroepen van 11 - 40 jaar, alwaar de kleurbaarheid nagenoeg onveranderd bleef. Uit dit onderzoek hebben deze auteurs geconcludeerd, dat de vermeende toename aan zure MPS tot stand komt door een toename aan CSA-B en/of HS.

Wij kunnen deze auteurs echter moeilijk in hun conclusies volgen. Het uitblijven van enig effect van de voorbehandeling met testiculaire hyaluronidase op de alcian blue-kleurbaarheid van de preparaten zou volgens hun gedachtengang toch moeten duiden op een volkomen afwezigheid van door dit enzym verteerbare componenten, met name HA, CSA-A en CSA-C. Maar dan is er geen sprake van slechts een toename aan CSA-B en/of HS in het mengsel, doch van een complete vervanging van HA en CSA-A en/of CSA-C door deze componenten.

Behalve de reeds door ons genoemde bezwaren tegen het trekken van kwantitatieve conclusies uit histologische kleurintensiteiten kleeft aan deze methode nog een bezwaar; het is namelijk onbewezen of het hyaluronidase in staat is om in dit soort weefselsneden kwantitatief een bepaalde stof zover af te breken, dat de kleurbaarheid tot nul gereduceerd wordt. Dit te bewijzen was voor deze onderzoekers des te gebiedender, daar TAYLER (65) voor alle door hem onderzochte leeftijdsgroepen, namelijk van 0 tot 100-jarigen, het totaal verdwijnen van de metachromasie bij met testiculaire hyaluronidase voorbehandelde preparaten vermeld heeft.

In tegenstelling tot deze ontkenning van enige relatie tussen lipidenophoping en verhoogde metachromasie meent de histochemicus LINDNER (40), dat juist de erkenning en verdere uitbreiding van de oude morphologische waarneming van ANITSCHKOW (1, 2, 3) betreffende het verband tussen verhoogde metachromasie en vetophoping bij atherosclerose, tot de belangrijkste histochemische resultaten behoren. LINDNER ziet echter het vrijkomen van reactieve sulfaatgroepen als mogelijke oorzaak van deze versterkte metachromasie. De sulfaatgroepen zouden uit hun binding met andere groepen vrij komen, doordat de gehele macromoleculaire structuur van de grondsubstantie door vanuit het bloedplasma geïnfiltreerde stoffen aangetast zou zijn. Deze vrije reactieve sulfaatgroepen zouden dan op hun beurt in staat zijn om behalve met de in de histochemie gebruikte kleurstoffen ook met, van uit het bloed geïnfiltreerde, lipoproteïnen te kunnen reageren.

Alhoewel dit proefschrift zich met de chemische analyse van de aortawand bezig houdt, was dit korte overzicht van de resultaten, hypothesen en theorieën verkregen met of gebaseerd op histologisch en histochemisch onderzoek noodzakelijk, daar juist zij de eerste

aanwijzingen gaven, dat atherogenese gekoppeld is aan bepaalde veranderingen in de mucopolysacchariden van de vaatwand. Welke deze bepaalde veranderingen zijn is echter een open vraag gebleven. Als GRESHAM en HOWARD (27) dan ook in hun overzichtsartikel over de vergelijkende histopathologie van de atherosclerotische laesies tot de conclusie menen te moeten komen, dat, van het standpunt van de histoloog uit bekeken, een hoog gehalte aan MPS kenmerkend voor de humane "fatty streak" is, dan poneren zij een hypothese als bewezen feit.

Langs chemisch-analytische weg is het niet slechts mogelijk om deze hypothese op haar juistheid te onderzoeken, maar bovendien kan uitsluitel verkregen worden of en in welke mate de samenstelling van het MPS-mengsel zich wijzigt als functie van de atherogenese. Het aantal publicaties op dit terrein is echter niet groot en de resultaten zijn met elkaar in tegenspraak. Alhoewel de onderzoeken naar concentratie en samenstelling van de arteriele MPS als functie van de leeftijd eigenlijk qua titel in dit overzicht niet thuis horen, zijn atherosclerose en leeftijd toch te innig verbonden om dit type onderzoeken hier niet te noemen.

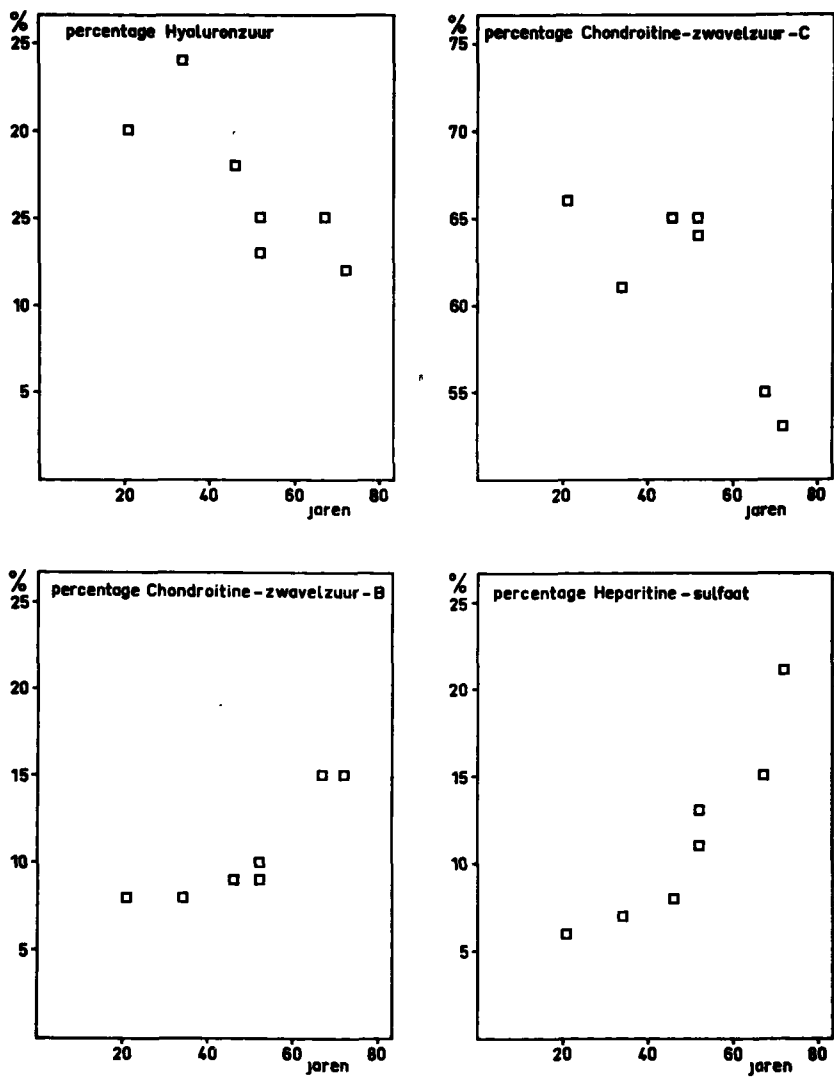
DYRBYE en KIRK (19) isoleerden, na pepsine-trypsine vertering van het weefsel, een gemiddelde van 4.9 mg MPS per gram vers gewicht uit aortae, afkomstig van kinderen van 0 tot 9 jaar, 4.8 mg MPS uit die van 20 tot 60 jaar, terwijl de opbrengst uit aortae van oudere individuen slechts een gemiddelde van 2.4 mg bedroeg. Het eiwitgehalte van de geïsoleerde MPS-mengsels bedroeg maximaal slechts drie procent (37). Het hexosamine-gehalte ervan bleek voor alle leeftijdsgroepen gelijk te zijn; wel kon een significante toename in de relatieve hoeveelheid galactosamine worden vastgesteld voor de leeftijdsgroep van 60 - 76 jaar ten opzichte van die van 1 - 59 jaar.

BERTELSEN en JENSEN (10) onderzochten in totaal 17 aortae, afkomstig van personen van 2 - 84 jaar. Zij vonden eveneens een afname in gehalte aan zure MPS bij toenemende leeftijd, namelijk 2.04% van het drooggewicht van het ontvette weefsel bij een 2-jarige tot 0.42% bij een 84-jarige. Zij behandelden het weefsel met pancreatine ter vrijmaking van de MPS en verkregen een geelachtig eindproduct, hetgeen op onzuiverheden wijst. Merkwaardig is, dat

BERTELSEN eveneens in 1960 (9) de resultaten van een ander onderzoek publiceert en daarin tot de tegenovergestelde conclusie komt! Het aantal onderzochte aortae bedroeg in dit geval slechts 5 stuks. De zure MPS werden door middel van natronloog geëxtraheerd zonder voorafgaande enzymatische vertering van het weefsel. De opbrengst aan zure MPS bedroeg nu het dubbele tot veertienvoudige in vergelijking met die, welke hij tezamen met JENSEN gepubliceerd heeft, namelijk 5.3% en 14.6% voor resp. aortae afkomstig van een 2- resp. 60-jarige.

Ook KAPLAN en MEYER (34) onderzochten de veranderingen in hoeveelheid en samenstelling van de zure MPS in de humane aorta als functie van de leeftijd. In totaal werden 33 aortae, afkomstig van 21- tot 72-jarigen onderzocht. Met toenemende ouderdom viel een toenemende graad van atherosclerose te constateren. De weefsels werden aan een pepsine-trypsine vertering onderworpen. Noch de opbrengst aan zure MPS noch het hexosaminegehalte van de aortae vertoonde enige correlatie met de leeftijd. Het gehalte aan zure MPS schommelde tussen 0.85 en 1.2% van het drooggewicht van het ontvette weefsel. Door middel van alcohol praecipitatie werd verder de samenstelling van de zure MPS quantitatief bepaald. Uit de op deze wijze verkregen gegevens concludeerden zij, dat het gehalte aan hyaluronzuur en CSA-C afneemt en het gehalte aan heparitinesulfaat en CSA-B toeneemt met toenemende ouderdom. Zie figuur 2.

BUDDECKE (13) ging de quantitative en kwalitatieve veranderingen van de zure MPS in de humane aorta als functie van de graad van atherosclerose na. De MPS werden uit het weefsel vrijgemaakt met behulp van papaine hydrolyse. De opbrengst uit schijnbaar normale aortae bedroeg 0.57% van het drooggewicht van het ontvette weefsel en steeg tot 1.38% bij de zwaar atherosclerotische vaatwand. Door gebruikmaking van met cetylpyridium chloride (CPC) behandelde cellulose kolommen, splitste hij de zure MPS in vijf fracties, welke hij met de namen keratosulfaat, hyaluronzuur, chondroitine, chondroitine zwavelzuur A + B en heparine aanduidde. Bij atherosclerotisch materiaal nam hij een relatieve toename ten opzichte van normale aortae waar bij de percentages keratosulfaat, CSA-A + B en heparine, een afname van die van HA en chondroitine, zoals in tabel II is weergegeven.



Figuur 2

Veranderingen in samenstelling van de zure MPS-mengsels in humaan aortaweefsel als functie van de leeftijd, volgens KAPLAN en MEYER (1960).

Tabel II Invloed van atherosclerose op de samenstelling van het zure MPS-mengsel in humaan aortaweefsel volgens BUD-
DECKE (1960).

	KS	HA	Chondro- itine	CSA	Heparine
normaal	22.2%	13.3%	15.5%	47.3%	1.6%
licht atheroscle- rotisch	14.9%	6.3%	4.0%	68.9%	1.8%
zwaar atheroscle- rotisch	26.0%	4.6%	3.4%	64.1%	1.8%

ANTONOPOULOS en medewerkers (4), die deze door BUDDECKE gebruikte kolomfractioneringsmethode hebben uitgedacht, wijzen er in hun publicatie nadrukkelijk op, dat een toevoeging van CPC aan de e-luens een conditio sine qua non is voor het verkrijgen van reproduceerbare fractioneringen. BUDDECKE heeft dit echter zonder opgave van redenen nagelaten.

Uitgebreider is het onderzoek van de Amerikaan BERENSON (7). Deze auteur is de eerste, die er geen genoegen mee nam de aortawand als geheel te onderzoeken. Hij splitste de aorta in een binnenlaag, welke de intima plus 20% van de media omvatte en een buitenlaag, bestaande uit de rest van de media plus de adventitia. De zure MPS werden met behulp van een combinatie van loogextractie en enzymatische eiwithydrolyse uit het weefsel geïsoleerd. Meer dan honderd aortae werden onderzocht en van de totale MPS-opbrengsten werd zowel hun correlatie met leeftijd als met de graad van atherosclerose nagegaan. Hij vond weinig correlatie tussen het gehalte aan zure MPS en leeftijd; wel was er een tendens tot afname in het gehalte aan zure MPS zichtbaar bij toenemende graad van atherosclerose. Deze tendens was minder duidelijk voor de buitenlaag dan voor de intima-plus-20% media preparaten. De variabiliteit van de opbrengst aan zure MPS is echter wel wat

groot. Voor de buitenlaag van aortae van kinderen van ongeveer twee jaar oud vond hij, bij voorbeeld, waarden van 0.9 - 7.1% van het drooggewicht van het ontvette weefsel.

UOTILA en medewerkers (66) stelden een onderzoek in naar de invloed van krop op het MPS gehalte van de normale en atherosclerotische vaatwand. Zij onderzochten 64 aortae, afkomstig van mannelijke patienten tussen 40 en 60 jaar. Voor twee series van elk 16 aortae, afkomstig van patienten, die niet aan krop geleden hadden, vonden zij een opbrengst van resp. 3.38 ± 1.60 en 3.32 ± 2.24 mg per gram vers weefsel voor normale en atherosclerotische vaatwand. Het tweede getal stelt de door ons berekende standaard deviatie voor. Uitgedrukt in percentages van het drooggewicht van het ontvette weefsel komt dit op een opbrengst van ongeveer 1.5% neer. Het komt ons voor, dat het vinden van 16 patienten tussen 40 en 60 jaar oud zonder atherosclerose een opmerkelijk feit is!

In het kort samengevat vonden BERTELSEN en JENSEN (10), evenals DYRBYE en KIRK (19) een afname in het gehalte aan zure MPS in de aortawand bij toenemende ouderdom van de patienten; BERTELSEN (9) rapporteerde daarentegen een forse toename, terwijl KAPLAN en MEYER (34) geen correlatie vermochten te constateren. Bij stijgende graad van atherosclerose konden UOTILA en medewerkers (66), evenmin als KAPLAN en MEYER (34) een verandering in het gehalte aan zure MPS in de aortawand zien, terwijl BERENSON (7) een tendens tot afname en BUDDECKE (13) een toename kon vaststellen. Desalniettemin meende BUDDECKE (15) in een overzichtsartikel te mogen constateren: "Die Isolierung und chemische Analyse der sauren Mucopolysaccharide aus arteriosklerosefreien und arteriosklerotischen Aorten hat die absolute Zunahme der sauren Mucopolysaccharide bei Arteriosklerose zweifelfrei bestätigt."

Resumerende kunnen wij zeggen, dat het langs chemisch-analytische wegen nog niet gelukt is om aan te tonen of de toename in meta-chromasie van de atherosclerotische vaatwand al of niet gekoppeld is aan een toename in, of veranderde samenstelling van, de zure mucopolysacchariden.

3. Methodieken.

A. Isolering.

In de beginne werden de zure MPS met behulp van NaOH uit het arteriele weefsel geextraheerd (39). Alhoewel de opbrengst bevredigend genoemd kon worden kleefden aan deze methode toch enkele grote nadelen. Men isoleerde geen zuivere MPS, doch verkreeg o.a. CSA-proteïne complexen van uiteenlopende samenstelling. Een ander nadeel van loog als extractiemiddel ligt in het feit, dat de macromoleculen er veranderingen door ondergaan. Deze veranderingen liggen niet slechts in het physico-chemische vlak, maar kunnen ook zuiver chemisch zijn, zoals bij voorbeeld het verlies van sulfaatgroepen (35). Ter vermindering van deze storende degradatie heeft men gezocht naar bruikbare neutrale extractiemiddelen. Met een tien percentige calcium-chloride oplossing, evenals met 30% keukenzout, lukte het inderdaad om een ongedegradieerd, proteïne-vrij product te winnen (60). Het was echter niet mogelijk om met deze minder drastische methoden de MPS quantitatief te isoleren. De omstandigheid, dat sommige zure mucopolysacchariden stevige complexen met proteïnen vormen ligt hieraan ten grondslag (14).

Een zeer elegante methode, berustend op de afbraak van de eiwit-component door middel van proteolytische enzymen, werd door MEYER en zijn medewerkers (48) toegepast. Eerst werd door hen het eiwit met behulp van pepsine aangegrepen. Pepsine hydrolyseert bij voorkeur peptideverbindingen, waaraan een aromatisch aminozuur deelneemt. De aldus ontstane peptiden stelden zij aan de werking van trypsine bloot. Dit enzym hydrolyseert al die peptidebindingen, waaraan carboxylresten van L-arginine of L-lysine deelnemen. Nu zijn eiwitten over het algemeen tamelijk rijk aan deze beide aminozuren. Het eindproduct van deze proteolytische vertering zal dus voornamelijk uit goed oplosbare oligopeptiden bestaan. Het weefsel wordt dus als het ware in oplossing gebracht. Uit deze oplossing werden de MPS met alcohol neergeslagen en vervolgens verder gezuiverd. De zo uitgevoerde isolering resulteert in een nagenoeg eiwitvrij product. Ook DYRBYE en KIRK (19, 37) hebben deze pepsine-trypsine methode toegepast, evenals UOTILA en medewerkers (66).

Behalve pepsine en trypsine zijn ook pancreatine (10) en papaine (13) voor de isolatie van MPS uit aortaweefsel gebruikt.

Een combinatie van loogextractie en enzymatische eiwithydrolyse is door SCHILLER en medewerkers (58) en BERENSON (6, 7) toegepast.

B. Z u i v e r i n g .

Na de proteolytische vertering wordt de onderzoeker geconfronteerd met de moeilijkheid om de MPS in zuivere toestand af te zonderen uit de oplossing. Deze oplossing bevat naast de begeerde stoffen een overmaat aan aminozuren, peptiden, zouten, lipiden, nucleinezuren en de gebruikte enzymen. Verontreiniging van de oplossing met lipiden kan voorkomen worden door het weefsel van te voren met vetoplosmiddelen, zoals aceton, te extraheren (10, 13).

De eiwitten en eiwitbrokstukken worden meestal door middel van de Sevag techniek verwijderd (63). Deze methode berust op de denaturatie van proteïnen door de oplossing met chloroform en amylalcohol te schudden (13, 19). SCHILLER en medewerkers (58) praecipiteerden, na een gecombineerde loogextractie en trypsine vertierungsprocedure, de eiwitten met trichloorazijnzuur, een methode, die ook door BERENSON (6, 7) is toegepast op aortaweefsel.

De eenvoudigste methode om de aminozuren en zouten kwijt te raken is het neerslaan van de MPS met alcohol (13, 19, 23). De aldus neergeslagen mucopolysacchariden zijn echter, al naar gelang het weefsel waar men van uitgaat, min of meer verontreinigd met eiwitten en peptiden. Bij aortaweefsel als uitgangsmateriaal is een nabehandeling met proteïne adsorptie middelen vereist. Fullers aarde, syn. Lloyds reagens, is hiertoe met succes gebruikt (13, 19, 32).

C. F r a c t i o n e r i n g .

Het scheiden van de zure MPS van de glycoproteïnen werd bereikt door juiste keuze van de alcoholsterkte bij het neerslaan (19) en door extractie van het praecipitaat met 90% phenol (13, 23).

Het splitsen van de geïsoleerde zure MPS mengsels in hun afzonderlijke componenten heeft men op zeer uiteenlopende wijzen trachten te verwezenlijken. De nauwe chemische verwantschap van deze macromoleculaire stoffen en de gecompliceerdheid van de mengsels, waarin een der componenten veelal in grote overmaat aanwezig is, hebben de onderzoekers voor grote moeilijkheden gesteld.

Het valt buiten de opzet van dit proefschrift om alle scheidingsmethoden, waarmee men gepoogd heeft twee of meer zure mucopolysacchariden te scheiden, te bespreken. Zo lukte het b.v. aan KORN (38) om heparine langs papierchromatographische weg uit een zuur MPS mengsel af te scheiden. PICAR (53) gebruikte papierchromatographie om CSA en heparine af te scheiden. Het splitsen van de zure MPS mengsels uit de aortawand is echter nog nooit langs papierchromatographische weg verwezenlijkt. Wel hebben BERENSON en DALFERES (8) een chromatographische methode uitgewerkt om met behulp van metsilicagel geïmpregneert glaspapier en aethanol-zoutoplossingen de componenten van zure MPS mengsels te scheiden. Deze methode is echter niet vrij van overlapping van de afzonderlijke fracties, wat haar ongeschikt maakt voor quantitatief werk.

Papier-electrophorese is door DYRBYE, KIRK en WANG (21) toegepast om de zure MPS uit humaan arterieel weefsel in twee fracties te splitsen. De snelle fractie bezat dezelfde loopsnelheid als chondroitine zwavelzuur uit kraakbeen, terwijl die van de langzame meer met de snelheid van HA overeen kwam. Daar de langzame fractie zich bij kleuring metachromatisch in plaats van orthochromatisch gedroeg kon het echter moeilijk HA zijn.

Blok-electrophorese werd door GARDELL en medewerkers (24) toegepast om hyaluronzuur en chondroitine zwavelzuur te scheiden. Hyflo Super Cel werd door hen als drager gebruikt.

MULLER-EBERHARD (52) introduceerde Pevikon, een co-polymeer van polyvinyl-chloride en polyvinyl-acetaat als dragend medium. Hiermede kon de auteur een mengsel van een hexose, HA en CSA, in de drie oorspronkelijke componenten splitsen.

BERENSON (7) kon met Celite als drager duidelijke kwalitatieve verschillen tussen de zure MPS mengsels uit zijn "intimale" en

externe lagen van de aortawand aantonen. Voor het splitsen van de mengsels in afzonderlijke fracties echter is zijn methode ongeschikt, daar de overlapping van de fracties daartoe te uitgesproken is.

Een veel gebruikte methode voor de fractionering van MPS mengsels is de gefractioneerde praecipitatie met behulp van organische oplosmiddelen in aanwezigheid van metaalionen. Een methode, gebaseerd op de toevoeging van stijgende hoeveelheden aethanol bij een waterige MPS-oplossing welke calcium-ionen bevat, is door MEYER en medewerkers (48) uitgewerkt. KAPLAN en MEYER (34) hebben deze alcoholfractioneringsmethode toegepast bij hun studie over veranderingen in samenstelling van de zure MPS in de aortawand als functie van de leeftijd. Hun 18% en 23% alcoholfracties bevatten beide een mengsel van HS en CSA-B. Dit mengsel splitsten zij met behulp van de zuiveringsmethode voor CSA-B van CIFONELLI en DORFMAN (17) in zijn componenten. De 28% fractie was meestal te gering voor een nadere analyse. De 33% fractie bevatte voornamelijk HA, hetgeen de auteurs met behulp van het door HA specifieke pneumococcon-hyaluronidase verifieerden. Wat de overige zure MPS-componenten in deze fractie waren komt uit hun publicatie niet naar voren. Het CSA-C werd bij een alcoholconcentratie van 43% neergeslagen. Helaas werd echter soms reeds bij een concentratie van 28% het totale MPS-mengsel gepraecipiteerd.

Hetzelfde principe, maar met barium in plaats van calcium-ionen is door SMITH en GALLOP (64) en door JORPES en GARDELL (33) toegepast. Ook GARDELL (23) voert als bezwaar aan, dat de fracties niet altijd scherp gescheiden zijn.

Een andere methode, die door verschillende onderzoekers is toegepast, berust op het onderzoek van SCOTT (62) naar de oplosbaarheid van complexen van cetylpyridium-zouten met biologische polyanionen in waterig milieu als functie van de zoutconcentratie. De minimum zoutconcentratie, waarbij dit complextype in oplossing gaat, bleek reproduceerbaar en karakteristiek voor een gegeven mucopolysaccharide te zijn. ANTONOPOULOS en medewerkers (4) hebben hieruit een soort kolomchromatographische methode ontwikkeld, waarbij cellulose, glasfilterpapier of een ander poreus materiaal als een inerte drager functioneert, waarop de complexen als een dun laagje worden neergeslagen. Door elueren met oplossingen van

steeds toenemende zoutconcentratie worden de verschillende complexen in oplossing gebracht en opgevangen. Op deze wijze konden mooie resultaten geboekt worden bij het splitsen van mengsels, bestaande uit HA, CSA en heparine. Pogingen echter om mengsels van CSA-A en CSA-B te scheiden stuitten op grote moeilijkheden. Beide stoffen gaven namelijk meerdere pieken in het chromatogram. CSA-A verscheen hoofdzakelijk in de fracties, welke een zoutconcentratie van 0.4, 0.5, 0.6 en 0.7 M $MgCl_2$ bezaten, CSA-B in die van 0.4, 0.5, 0.6 en 1.0 M. Om de zure MPS-mengsels afkomstig uit normaal en atherosclerotisch humaan aortaweefsel te fractioneren werd van deze methode gebruik gemaakt door BUDDECKE (13) en MUIR (51). De eerste auteur heeft echter nagelaten om aan de eluens een weinig CPC toe te voegen. Volgens ANTONOPOULOS (4) is echter een CPC concentratie van 0.05 M absoluut vereist om reproduceerbare resultaten te verkrijgen.

Verskillende kolomchromatographische fractioneringsmethoden voor het scheiden van zure MPS-mengsels zijn in de recente literatuur beschreven. Celite en calcium fosfaat (12), Ecteola (55), Celite en cellulosepoeder (5) of DEAE-Sephadex (59) werden voor kolomvulling gebruikt. Slechts de beide laatste methoden hebben hun toepassing bij het scheiden van uit aortaweefsel afkomstige MPS gevonden. BERENSON (5) maakte van Celite-cellulose kolommen gebruik in aansluiting op een electrophoretische scheiding van de zure MPS in twee fracties. Hij wist hiermede de snelst lopende fractie in CSA-A en CSA-B te splitsen. Vrij van overlapping was deze scheiding echter niet. SCHMIDT (59) heeft aangekondigd, dat zij de zure MPS afkomstig van een enkele humane aorta met behulp van een DEAE-Sephadex kolom heeft kunnen scheiden. De resultaten moeten echter nog gepubliceerd worden.

In het kort samengevat kunnen wij constateren, dat er reeds veel baanbrekend werk verricht is, maar dat met geen der bestaande methoden een quantitative scheiding van het zure MPS-mengsel uit de humane aorta in zijn afzonderlijke componenten verkregen is.

4. N o m e n c l a t u u r v a n d e m u c o p o l y s a c c h a r i d e n .

De term "Mucopolysaccharide" werd voor het eerst gebruikt door MEYER (43) in de betekenis van "hexosamine-containing polysaccha-

rides of animal origin occurring either in a pure state or conjugated with protein through a salt linkage".

De grote vlucht, welke de inventarisatie van de samengestelde suikers in de levende natuur sindsdien heeft genomen, bracht vele onderzoekers ertoe om de term "Mucopolysacchariden" van een nieuwe omschrijving te voorzien. In de evolutie van het begrip "mucopolysacchariden" zijn twee hoofdrichtingen te onderkennen. De eerste heeft tot een nauwere begrenzing geleid, doordat naast aminosuikers ook uronzuren in de definitie werden opgenomen (31, 45). De andere heeft tot een verruiming van het begrip gevoerd. De aanwezigheid van aminosuikers wordt hier niet langer als obligaat gezien. Deze zienswijze heeft tot het geven van nieuwe namen aan de aminosuikers bevattende polysacchariden geleid, zoals "aminopolysacchariden" (35) en "glycosaminoglycan" (30).

WINZLER (69) heeft de mucopolysacchariden als hoog moleculaire, hexosamine bevattende polysacchariden gedefinieerd. Die mucopolysacchariden, die slechts neutrale suikers naast hexosaminen bevatten heeft deze auteur "neutrale mucopolysacchariden" genoemd. Van "zure mucopolysacchariden" spreekt hij, wanneer mucopolysacchariden behalve hexosamine ook uronzuur en/of zwavelzuur bevatten. Complexen van zure MPS met eiwitten worden door hem met het woord "mucoproteinen" aangeduid, terwijl stoffen met de eigenschappen van eiwitten, welke meer dan 0.5% hexosamine bevatten de naam "glycoproteinen" toebedeeld krijgen. Deze indeling is door vele onderzoekers op het gebied van de atherosclerose gebruikt (7, 14, 15, 16, 18) en wordt ook in dit proefschrift aangehouden.

LITERATUUR

1. Anitschkow, N., Beitr. path. Anat., 56 (1913) 379.
2. Anitschkow, N., Beitr. path. Anat., 59 (1914) 306.
3. Anitschkow, N., Beitr. path. Anat., 70 (1922) 265.
4. Antonopoulos, C.A., E. Borelius, S. Gardell, B. Hamnström, J.E. Scott, Biochim. Biophys. Acta, 54 (1961) 213.
5. Berenson, G.S., Biochim. Biophys. Acta, 28 (1958) 176.
6. Berenson, G.S., Circul. Res., 7 (1959) 889.
7. Berenson, G.S., J. Atheroscler. Res., 1 (1961) 386.
8. Berenson, G.S., E.R. Dalfères, Biochim. Biophys. Acta, 58 (1962) 34.
9. Bertelsen, Sv., Nature, 187 (1960) 411.
10. Bertelsen, Sv., C.E. Jensen, Acta pharmacol. toxicol., 16 (1960) 250.
11. Blumberg, B.S., A.G. Ogston, Ciba Foundation Symp. on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides, London 1958, pp 22-41.
12. Bowness, J.M., Arch. Biochim. Biophys., 91 (1960) 86.
13. Buddecke, E., Z. Physiol. Chem., 318 (1960) 33.
14. Buddecke, E., Angew. Chem., 72 (1960) 663.
15. Buddecke, E., Dtsch. med. Wschr., 86 (1961) 1773.
16. Buddecke, E., J. Atheroscler. Res., 2 (1962) 32.
17. Cifonelli, J.A., J. Ludowieg, A. Dorfman, J. biol. Chem., 233 (1958) 541.
18. Curran, R.C., The Biochemistry of Mucopolysaccharides of Connective Tissue, Bioch. Soc. Symp., 20, Cambridge, University Press, 1961, p. 24.
19. Dyrbye, M., J.E. Kirk, J. Gerontol., 12 (1957) 20.
20. Dyrbye, M., J.E. Kirk, J. Gerontol., 12 (1957) 23.
21. Dyrbye, M., J.E. Kirk, I. Wang, J. Gerontol., 13 (1958) 149.
22. Faber, M., A.M.A. Arch. Path., 48 (1949) 342.
23. Gardell, S., Biochem. Pharmacol., 6 (1961) 91.
24. Gardell, S., A.H. Gordon, S. Aquist, Acta Chem. Scand., 4 (1950) 907.
25. Gardell, S., Acta chem. Scand., 9 (1955) 1033.
26. Gerő, S., J. Gergely, T. Devényi, L. Jakab, J. Székely, S. Virág, J. Atheroscler. Res., 1 (1961) 64.

27. Gresham, G.A., A.N. Howard, J. Atheroscler. Res. 3 (1963) 161
28. Hoffman, P., A. Linker, K. Meyer, Federation Proc., 17 (1958) 1078.
29. Hoffman, P., K. Meyer, Federation Proc., 21 (1962) 1064.
30. Jeanloz, R.W., Arthritis and Rheumatism, 3 (1960) 233.
31. Jeanloz, R.W., "The Chemistry of Mucopolysaccharides", Proc. Third Intern. Congress Biochem., Brussel, 1955, pp 65-72, New York, Academic Press Inc. 1956.
32. Jorpes, J.E., Biochem. Z., 204 (1929) 354.
33. Jorpes, J.E., S. Gardell, J. biol. Chem., 176 (1948) 267.
34. Kaplan, D., K. Meyer, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 105 (1960) 78.
35. Kent, P.W., M.W. Whitehouse, Biochemistry of the aminosugars, London 1955, Butterworth's Scient. Publ., p. 3, 74.
36. Kirk, J., The Arterial Wall, Ed. A.I. Lansing, Williams and Williams Corp., Baltimore, 1959, p. 161.
37. Kirk, J., M. Dyrbye, J. Gerontol., 12 (1957) 23.
38. Korn, E.D., J. biol. Chem., 234 (1959) 1321.
39. Levene, P.A., Hexosamines; their derivatives and mucins and mucoids, New York, The Rockefeller Inst. for Med. Res., 18, July 7, 1922.
40. Lindler, J., Arteriosklerose, Aetiologie, Pathologie, Klinik und Therapie, Ed. G. Schettler, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, p. 51-88.
41. Lindsay, S., I.L. Charkoff, A.M.A. Arch. Pathol., 63 (1957) 460.
42. Manley, G., Dissecting aneurism of the aorta, Thesis, Bristol 1962.
43. Meyer, K., The chemistry and biology of mucopolysaccharides and glycoproteins, Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol., 6, (1938) 91.
44. Meyer, K., in I.H. Page, Connective Tissue, Thrombosis and Atherosclerosis, Academic Press, New York, London, 1959, p. 181.
45. Meyer, K., Harvey Lectures, 51 (1957) 88.
46. Meyer, K., J.W. Palmer, J. biol. Chem., 107 (1934) 629.
47. Meyer, K., M.M. Rapport, Science, 113 (1951) 596.
48. Meyer, K., A. Linker, A.E. Davidson, B. Weissman, J. biol. Chem., 205 (1953) 611.
49. Meyer, K., E. Davidson, A. Linker, P. Hoffman, Biochim. Biophys. Acta, 21 (1956) 506.

50. Meyer, K., P. Hoffman, A. Linker, *Science*, 128 (1958) 896.
51. Muir, H., *Biochem. J.*, 81 (1961) 8P.
52. Müller-Eberhard, H.J., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 12 (1960) 33.
53. Picar, J., *J. Chromat.*, 7 (1962) 223.
54. Rinehart, J.F., L.D. Greenberg, A.M.A. *Arch. Path.*, 51 (1951) 12.
55. Ringertz, N.R., P. Reichard, *Acta Chem. Scand.*, 14 (1960) 303.
56. Schallock, G., *J. Atheroscler. Res.*, 2 (1962) 25.
57. Schiller, S., *Biochim. Biophys. Acta*, 32 (1959) 315.
58. Schiller, S., M.B. Mathews, L. Goldfaber, J. Ludowieg, A. Dorfman, *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 531.
59. Schmidt, M., *Biochim. Biophys. Acta*, 63 (1962) 346.
60. Schubert, M., J. Einbinder, *J. biol. Chem.*, 185 (1950) 725.
61. Schultz, A., *Virchows Arch. path. Anat.*, 239 (1922) 415.
62. Scott, J.E., *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 428.
63. Sevag, M.G., *Biochem. Z.*, 273 (1934) 419.
64. Smith, H., R.C. Gallop, *Biochem. J.*, 53 (1953) 66.
65. Tayler, H.E., *Am. J. Pathol.*, 29 (1953) 871.
66. Uotila, U., E. Levonen, J. Laekallio, *Acta Endocrinol.*, 36 (1961) 1.
67. Walker, P.G., *The Biochemistry of Mucopolysaccharides of Connective tissue*, *Biochem. Soc. Symp.* no. 20, Cambridge 1961, pp 109-125.
68. Wilander, O., H. Holmgren, *Z. mikr. anat. Forsch.*, 42 (1937) 242.
69. Winzler, R.J., *Ciba Found. Symp. on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides*, Ed. G.E.W. Wolstenholme and M. O'Connor, London, Churchill Ltd., 1958, p. 246.
70. Zugibe, F.T., K.D. Brown, *Circulation Res.*, 8 (1960) 287.
71. Zugibe, F.T., K.D. Brown, *Circulation Res.*, 9 (1962) 897.

III GEBRUIKTE MATERIALEN EN METHODEN

1. Chemicalien en reagentia.

Voor het naspoelen van gereinigd glaswerk werd gedemineraliseerd leidingwater gebruikt, gevolgd door spoelingen met gedestilleerde aceton en gedestilleerde methanol.

Waterige oplossingen werden bereid uit aqua bidestillata of gedestilleerd gedemineraliseerd water en handelschemicalien met de hoogste graad van zuiverheid (Merck's pro analyse; British Drug Houses Ltd: AnalaR). Van dezelfde zuiverheid waren zwavelzuur (Merck) en zoutzuur (B.D.H.).

Aceton, chloroform en methanol werden voor het gebruik in een geheel glazen apparaat gedestilleerd.

De hieronder genoemde stoffen werden van de volgende firma's betrokken:

National Biochemical Corporation (chondroitine zwavelzuur; d-galactosamine-HCl; galacturonzuur; glucuronzuur, natriumzout; d(+) glucosamine, vrije base; heparine, natriumzout, 100 eenh./mg; hyaluronzuur; pancreatine, 5 x NF; papaine; pepsine, 3 x gekristalliseerd; trypsine, 2 x gekristalliseerd).

Fluka A.G. Chemische Fabrik, St. Gallen (de verschillende typen Dowex; furfurolvrije isoamylalcohol; phenol, pro analyse).

Firma Serva (testiculaire hyaluronidase; paardeserum).

British Drug Houses Ltd. England (Fuller's Earth).

Johns Manville Corporation (Hyflo Super Cel).

Oplossingen gebruikt bij de isolatie en zuivering van de zure MPS:

Praecipitatievloeistof: 1 gram kalium acetaat oplossen in 100 ml 96% aethanol en vervolgens 1 ml ijsazijn toevoegen.

Calcium acetaat buffer: 5 gram calcium acetaat oplossen in 100 ml 0.5 N azijnzuur.

2. Onderzocht aortaweefsel.

Het onderzochte aortaweefsel was afkomstig van sectie-materiaal van alle leeftijdsgroepen. Uitgesloten werd weefsel afkomstig van patienten bij wie de medici bepaalde stofwisselingsziekten hadden kunnen constateren. Tot deze ziekten behoren onder andere schildklieraandoeningen, nierziekten, leveraandoeningen en diabetes, waarbij een afwijkend lipidenbeeld verwacht kan worden.

Door de aan ons instituut verbonden prepareergroep onder leiding van mevrouw E. Sachs werd de aorta uitgeprepareerd. Het gedeelte gelegen 1 cm distaal van de aortaklep tot aan de bifurcatie werd vervolgens voor chemische analyse uitgesneden, ontdaan van de adventitia en in de lengte doorgesneden. Het oppervlak van de intima werd onder een prepareermicroscoop bij twaalfvoudige vergroting op pathologische veranderingen onderzocht. Op grond van dit onderzoek werden deze zogenaamde intima-plus-media preparaten naar de graad van atherosclerose ingedeeld volgens de richtlijnen van de World Health Organization Study Group on the Classification of Atherosclerotic Lesions, Washington U.S.A., 7 - 11 October 1957 (20).

Volgens deze indeling werden vier stadia onderscheiden, te weten:

stadium 0	geen waarneembare intimale laesies
stadium I	met fatty streaks or spots
stadium II	fibreuze plaques of atheroma
stadium III	laesies met verdere complicaties, zoals necrosis, ulcus, haemorrhage e.d.

Atherosclerosis is a variable combination of changes of the intima of arteries consisting of the focal accumulation of lipids, complex carbohydrates, blood and blood products, fibrous tissue and calcium deposit and associated with medical changes;

Fatty streaks or spots is applied to superficial yellow or yellow-grey intimal lesions which are selectively stained by fat stains;

Fibrous plaques is applied to a circumscribed, elevated intimal thickening which is firm, and grey or pearly white;

Atheroma is applied to an atherosclerotic plaque in which fatty softening is predominant;

Bovengenoemde definities zijn overgenomen uit World Health Organization, Technical Report Series nr. 143, Geneva 1958. Ter voorkoming van misverstanden worden de algemeen gebruikte medische termen "fatty streaks or spots" en "Plaques" in dit proefschrift niet door een of andere vertaalde uitdrukking vervangen.

3. B e h a n d e l i n g v a n h e t a o r t a w e e f s e l v o o r d e M P S i s o l e r i n g .

Voor een eerste benadering van het gestelde probleem betreffende

een eventuele correlatie tussen atherosclerose en het gehalte aan zure MPS in de aortawand werden de, in de vorige paragraaf genoemde, intima-plus-media preparaten als geheel chemisch onderzocht. Voor het verkrijgen van een antwoord op de vraag naar de distributie van de zure MPS in het gezonde en pathologische veranderde aortaweefsel werden de afzonderlijke laesies met behulp van een vlijmscherpe schaar uit de intima-plus-media geknipt. Het ogenschijnlijk gezonde weefsel werd onder het prepareermicroscop volgens de door TER HAAR ROMENY-WACHTER beschreven methode (10) gesplitst in intima en media. Van de uitgeknipte laesies werd zoveel mogelijk het omringende gezonde weefsel weggeprepareerd. Aangezien de afmetingen van de fatty streaks or spots gering zijn en zij meestal dicht opeen gepakt over min of meer uitgestrekte gebieden van de intima voorkomen, is het afzonderlijk uitprepareren niet wel doenlijk. Bij dit type laesies werd een zo scherp mogelijk begrensd stuk van het aangetaste weefsel uitgeprepareerd, zodat de preparaten, die in dit proefschrift met fatty streaks and spots worden aangeduid een zeker percentage ogenschijnlijk gezond intimaweefsel bevatten. Bovendien bevatten zij enig media-weefsel, omdat de streaks and spots meestal vanuit de intimale laag tot in de media uitpuilen.

Na het uitprepareren werden de preparaten gewogen, gevriesdroogd en daarna opnieuw gewogen. Het gevriesdroogde materiaal werd bij -20°C . in het donker bewaard onder methanol-chloroform (1:2). Intima-media preparaten, evenals afzonderlijke media van de stadia II en III, leverden over het algemeen voldoende uitgangsmateriaal voor een lipiden en een MPS analyse. Van de overige weefsels moesten meerdere preparaten bijeengevoegd worden tot zogenaamde verzamelpreparaten. Lipiden-extractie voor de betreffende analyse (1) ging vooraf aan gebruik van het materiaal voor MPS onderzoek. Als extractievloeistof diende methanol-chloroform 1:2. De extractie vond plaats onder roeren bij kamertemperatuur met uitsluiting van daglicht of te sterk lamplicht ter voorkoming van autoxydatie van de onverzadigde vetzuren. Na beëindiging van deze extractie werd het ontvette weefsel aanvankelijk direct in vacuo gedroogd. Het bleek echter, dat op deze wijze de in het weefsel aanwezige methanol-chloroform onvolledig werd verwijderd. Hierdoor werd een te hoog drooggewicht na ontvetten gevonden. Daar het MPS-gehalte door ons werd uitgedrukt in procenten daarvan, waren de aldus berekende percentages te laag. Door het weefsel gedurende 30 minu-

ten in een droogstoof bij 70°C. te verwarmen alvorens het in een exsiccator te plaatsen kon de methanol-chloroform geheel worden verwijderd. In deze vorm werd het materiaal in glazen flessen met ingeslepen stop bij kamertemperatuur bewaard.

4. Isolering en zuivering van de zure MPS.

Voor het isoleren zowel als voor het zuiveren van de zure MPS werd door ons de methode van DYRBYE en KIRK (8) toegepast. In plaats echter van vers aortaweefsel was het ontvet gevriesdroogd weefsel ons uitgangsmateriaal. Op deze wijze konden van één en hetzelfde object zowel de MPS als de lipiden onderzocht worden.

Bij de proteolyse werden de pepsine en trypsine vervangen door zuiverder enzym-preparaten, daar dit ons inziens de reproduceerbaarheid verhoogt.

Gedurende de eerste proefseries bleek ons, dat de resultaten gunstig werden beïnvloed door het aanbrengen van nog enkele modificaties (zoals proteolyse onder roeren en gedurende langere tijd dan opgegeven), waarop in het onderstaande schema nader zal worden ingegaan.

Het ontvette gevriesdroogde materiaal in een Buhler apparaat met water homogeniseren; homogenaat in erlenmeyer overbrengen; water toevoegen, totdat de uiteindelijke weefselconcentratie 10 gewichtsprocenten bedraagt. Met 4 N HCl brengen op pH 1.5; per gram versgewicht van het oorspronkelijk weefsel 10 mg pepsine (3 x gekristalliseerd) toevoegen; afdekken met laagje toluol tegen infectie door bacterien en onder constant roeren bij 37°C. incuberen. Na 72 uren de incubatie afbreken, met 4 N NaOH de zuurgraad op pH 7 a 8 brengen; 3 mg trypsine (2 x gekristalliseerd) per gram versgewicht toevoegen en gedurende een etmaal of langer, indien nodig, onder voortdurend roeren bij 37°C. laten inwerken.

Op een eventuele rest na is het weefsel op deze wijze als het ware in oplossing gebracht. Het residu werd in de centrifuge Junior III gedurende 15 minuten bij 3800 toeren neergeslagen. Dit residu wordt verder in het proefschrift met de omschrijving "onverteerbare rest" aangeduid. De grootte ervan, uitgedrukt als percentage van het drooggewicht van het ontvette weefsel, varieerde van 0% bij stadium 0 tot ruim 20% bij sommige stadia III preparaten.

Tabel III Samenstelling van enige "onverteerbare resten", uitgedrukt in procenten van de boven P_2O_5 gedroogde substantie.

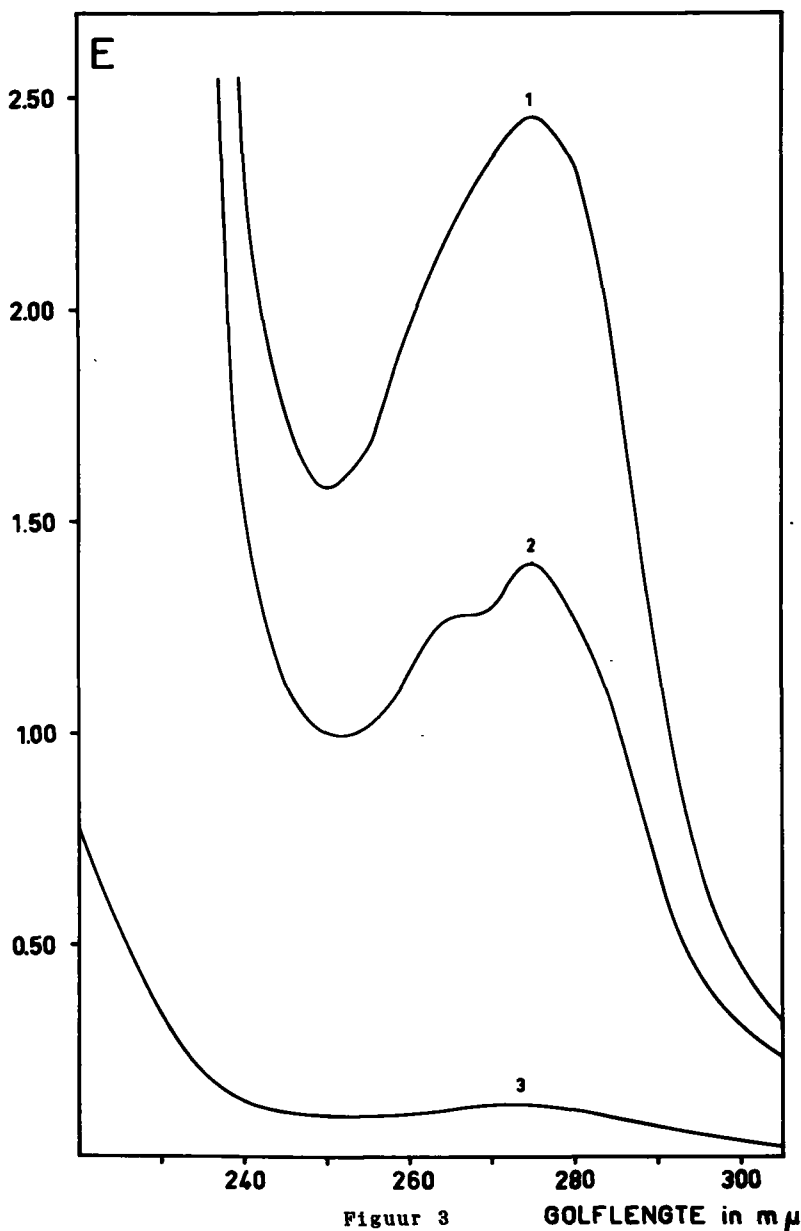
De analyses werden verricht door de Micro-analytische afdeling van het Laboratorium voor Organische Scheikunde der Universiteit van Amsterdam.

Elementen	Intima-plus-media (III)	Media	Streaks and spots	Plaques
C	18.59	24.21	28.02	18.57
H	2.89	3.60	4.46	2.94
N	3.51	6.20	7.05	4.96
S	neg.	0.49	1.02	0.74
P	11.59	8.72	8.23	9.89
Ca	22.67	22.16	15.59	20.78

De samenstelling van de onverteerbare resten van enige verzamel-preparaten van intima-plus-media, media, streaks and spots en plaques van stadium III is in tabel III weergegeven. De Ca/P-ratio bedraagt respectievelijk 1.96, 2.54, 1.89 en 2.10. Deze ratio is voor calcium fosfaat 1.94. Het is derhalve zeer aannemelijk, dat de onverteerbare rest voor een aanzienlijk deel uit calcium fosfaat zal blijken te bestaan.

Na het afcentrifugeren van de onverteerbare rest de oplossing krachtig schudden met 0.5 gram Hyflo Super Cel per gram oorspronkelijk vers weefsel en filtreren over Whatman 42. Het filtraat onder een warme luchtstroom bij $60^{\circ}C$. indampen tot stroperige consistentie. Onder voortdurend roeren 3 volumina praecipitatievloeistof druppelsgewijs toevoegen en de zure MPS bij $-20^{\circ}C$. laten neerslaan en afcentrifugeren.

De door DYRBYE en KIRK aangegeven tijd van 12 uren voor de praecipitatie bij $-20^{\circ}C$. bleek te kort te zijn. Wij brachten deze tijdsduur op 36 uur. Na deze eerste zuiveringsbewerking bevat het praecipitaat, naast zure MPS, nog vele stoffen, die verwijderd moeten worden. Het U.V.-spectrum van een waterige oplossing van dit neerslag vertoont een sterk uitgesproken maximum bij $275 m\mu$ (zie figuur 3), hetgeen tot een verontreiniging met eiwitten en



Figuur 3

Invloed van de zuiveringsprocedure op het U.V.-spectrum van de zure MPS-mengsels.

Concentraties van de ruwe MPS zijn identiek en komen overeen met 2 gram weefsel per 100 ml.

1. na de eerste precipitatie.

2. na schudden met chloroform-isoamylalcohol.

3. na schudden met Lloyd's Reagens.

glycoproteinen doet besluiten. De glycoproteinen werden met in totaal 10 volumina praecipitatievloeistof uit de supernatant neergeslagen. Alhoewel deze fractie door ons apart werd opgewerkt en ten dele reeds op gehalte aan stikstof, aminosuikers, pentosen e.d. is onderzocht, wordt er hier niet verder op ingegaan. De ruwe zure MPS werden volgens onderstaand schema verder gezuiverd:

Praecipitaat suspenderen in een 10% CaCl_2 -oplossing en wel 2 ml oplossing per gram oorspronkelijk versgewicht van het weefsel. Aan deze suspensie een vijfde volume aan chloroform-isoamylalcohol (4:1) toevoegen. Gedurende 48 uren in afgesloten buis bij kamertemperatuur op electromagnetische roermotor laten roeren in plaats van af en toe te schudden. Vervolgens gedurende 20 minuten bij 3800 toeren (Junior III) afcentrifugeren. De bovenlaag afpipetteren en in een andere buis overbrengen. De chloroform-isoamylalcoholhollaag plus het op deze phase drijvende praecipitaat nawassen met een weinig CaCl_2 -oplossing, afpipetteren en bij de eerste hoeveelheid voegen. Zure MPS neerslaan met 3 volumina praecipitatievloeistof bij -20°C . Na 12 uren afcentrifugeren in de Junior III (3800 toeren, 20 minuten).

Zowel in de chloroform-isoamylalcoholhollaag als in het gevormde neerslag kon eiwit worden aangetoond (biureetreactie U.V.-spectrum). Een kwalitatieve analyse van het neerslag, verkregen bij de zuivering van het verzamelpreparaat MPS 76 (intima-plus-media, stadium III), gaf als resultaat:

C 21.64%; H 3.67%; N 5.26%; S negatief; P 5.83%; Ca 19.03%.

Het hoge Ca-gehalte wil nog niet zeggen, dat calciumzouten als verontreiniging in het zure MPS-mengsel voorkwamen. Deze kunnen wel geheel of gedeeltelijk uit het oplosmedium afkomstig zijn. De afwezigheid van zwavel, gecombineerd met een negatieve carbazolreactie (7), maakt het waarschijnlijk, dat het neerslag geen zure MPS bevat. De totale hoeveelheid van het neerslag loopt nogal sterk uiteen, namelijk van 0.4 tot ruim 5% van het drooggewicht van het ontvette weefsel.

Het U.V.-spectrum van de zure MPS-oplossing wijkt echter na het uitschudden met chloroform-isoamylalcohol nog steeds sterk af van een oplossing van zuivere MPS. De absorptie beneden $250\text{ m}\mu$ is nog veel te groot en bovendien vertonen zuivere zure MPS geen absorptiemaxima bij 265 en $275\text{ m}\mu$. De verontreinigingen, die deze afwijkingen in het U.V.-spectrum veroorzaken, worden geheel of bijna geheel verwijderd door de oplossing te schudden met het magnesium-aluminium silicaat Lloyd's Reagens, ook wel Fuller's Earth genoemd (zie figuur 3).

Praecipitaat oplossen in 1 ml 1 N azijnzuur per 1.5 gram versgewicht van het uitgangsmateriaal. Per milliliter 50 mg Lloyd's Reagens toevoegen en gedurende 15 minuten flink roeren. Afcentrifugeren (15 minuten, 3800 r.p.m.). Vloeistof in andere buis overbrengen en het neerslag met 1 N azijnzuur gedurende 15 minuten goed roeren en opnieuw afcentrifugeren. Deze wasvloeistof bij de eerste supernatant voegen. De zure MPS neerslaan met 3 volumina praecipitatievloeistof bij -20°C . Na 12 uren afcentrifugeren.

Sommige onderzoekers achten het schudden met Lloyd's Reagens niet zonder gevaren. Het zou namelijk ook een deel van de zure MPS adsorberen (13). Inderdaad kon door ons worden vastgesteld, dat deze bewerking - indien toegepast op een oplossing van handels CSA - een verlies van 13% van het uitgangsmateriaal veroorzaakte. Controleproeven met door ons zelf gewonnen CSA-B en CSA-C gaven geen verlies te zien. Bij een proef met heparitine sulfaat bleek het verlies 11% te bedragen. Een natuurlijk mengsel zure MPS vertoonde een verlies van 4.5%. Het grotere verlies bij handelspreparaten moet waarschijnlijk aan het hogere eiwitgehalte worden toegeschreven. Handels-CSA bleek 4.44 - 4.5% stikstof te bevatten, door ons zelf gewonnen CSA-C 2.59 - 2.68%.

Eventueel in het oorspronkelijk weefsel aanwezig glycogeen is door deze bewerking echter nog niet verwijderd. Hiertoe werd een incubatie met α -amylase ingelast (11).

Praecipitaat oplossen in 10 ml 1% natrium acetaat. Drie tot vijf mg α -amylase toevoegen en met een weinig tolueen gedurende 5 à 6 uren bij 37°C . incuberen. Zure MPS neerslaan met 3 volumina praecipitatievloeistof bij -20°C . Na 12 uren afcentrifugeren (Junior III, 3800 r.p.m., 15 minuten). Praecipitaat oplossen in Ca-acetaat buffer en wel in 1 ml per 3 gram versgewicht van het uitgangsmateriaal. De zure MPS neerslaan met 4 volumina aethanol 96%. Wegzetten bij -20°C . en na 12 uren de MPS afcentrifugeren (Junior III, 3800 r.p.m., 15 minuten). Praecipitaat oplossen in aqua bidestillata en filtreren over een glasfilter 3G3. Vier volumina praecipitatievloeistof toevoegen, gedurende 12 uren bij -20°C . laten staan en afcentrifugeren. Het neerslag twee maal wassen met absolute aethanol en tweemaal met aether p.a.; daarna gedurende 12 uren in vacuo drogen, en wegen.

De aldus verkregen zure MPS-mengsels bezitten een grote mate van zuiverheid. Het stikstofgehalte bedroeg gemiddeld 2.74% met 2.32% als laagste en 3.54% als hoogst gemeten waarde. Het berekende stikstofgehalte voor CSA-C bedraagt 2.62%. De stikstofbepalingen werden uitgevoerd volgens de methode van BÖTTCHER, VAN GENT en PRIES (5). Verlies aan zure MPS tijdens deze langdurige isolering is niet te voorkomen. Hoe groot dit verlies is kan slechts bij

benadering worden geschat. In een drietal experimenten werd door ons een afgewogen hoeveelheid van een reeds gezuiverd MPS-mengsel aan de complete serie van bewerkingen onderworpen. Er werd 85.0, 85.6 en 87.6% van het uitgangsmateriaal teruggewonnen. Bij isoleren en zuiveren uit weefsel kunnen deze percentages afwijken onder invloed van de aanwezige verontreinigingen. Van veel invloed op de eindconclusies van het onderzoek zullen deze verliezen echter niet kunnen zijn. De conclusies berusten op onderling vergelijkbare van zure MPS-mengsels, welke allen onder dezelfde streng uniforme condities werden geïsoleerd en waarvan de verliezen dus vergelijkbaar zijn.

De reproduceerbaarheid van de opbrengsten is zeer goed te noemen. In een tweetal experimenten werd dit aangetoond. Gezond runderaortaweefsel werd in twee even grote en vergelijkbare porties verdeeld, welke naast elkaar werden opgewerkt. De opbrengsten aan zure MPS bedroegen respectievelijk 205 en 209 mg en 109 en 111 mg.

5. S p l i t s e n v a n h e t z u r e M P S - m e n g s e l .

Het splitsen van zure MPS-mengsels heeft men tot nu toe steeds langs fysisch-chemische weg trachten te realiseren (vergelijk hoofdstuk II,3). Sommige kunstmatige mengsels konden op deze wijze goed worden gescheiden. Pogingen om natuurlijke mengsels in scherp omschreven fracties te splitsen verliepen minder succesvol. Het onderling overlappen van componenten tijdens een fractionering of de mogelijkheid om twee of meer componenten van een mengsel te scheiden zijn twee van de meest voorkomende tekortkomingen van deze scheidingsmethoden. Indien de mate van overlapping binnen redelijke grenzen blijft en de componenten niet te sterk in quantiteit verschillen, kunnen zulke methoden veelal toch voldoende informatie over de samenstelling van een mengsel geven. Anders wordt het wanneer de reproduceerbaarheid te wensen overlaat. Een dergelijk verschijnsel beschreven KAPLAN en MEYER. Deze onderzoekers maakten gebruik van de alcohol-fractioneringsmethode bij hun onderzoek naar de samenstelling van zure MPS-mengsels in humaan aortaweefsel als functie van de leeftijd. De mengsels werden in de volgende fracties gesplitst: de 18% plus de 23% alcoholfractie, welke het CSA-B plus HS bevatte, de 28% frac-

tie (deze bevatte te weinig stof voor een analyse), de 33% fractie (HA) en de 43% alcoholfractie (CSA-C). In sommige gevallen echter bleek, dat reeds bij een alcoholconcentratie van 28% alle componenten werden neergeslagen:

Isolation and fractionation of MPS of aorta present greater difficulties than that from any other tissue studied so far. The reasons for these difficulties are not obvious and may reside, in part, in the protein complexes in which they occur in vascular tissue. By reason of the abnormal behaviour towards alcohol fractionation, it is necessary to make the conditions as uniform as possible. Even so, occasionally, the 28% alcohol concentration appeared to precipitate all 4 fractions (12).

Om na te gaan of dit afwijkende gedrag voor de MPS-mengsels inderdaad door eiwitresten veroorzaakt zou kunnen worden, zoals KAPLAN en MEYER veronderstelden, hebben wij eiwitvrije MPS-mengsels (N; 2.39 - 2.50%) op boven omschreven methode gesplitst. Het bleek, dat ook een van deze mengsels zich afwijkend gedroeg. Noch de 18% noch de 23% fractie bevatte hier enig neerslag. Het HS en CSA-B praecipiteerde eerst boven de 25% alcoholconcentratie. Incubatie van de fracties met testiculaire hyaluronidase toonde bovendien aan, dat het percentage aan HA plus CSA-C in een aantal 18% plus 23% fracties varieerde van 1.5 tot 47%.

Deze resultaten wijzen erop, dat het geconstateerde gebrek aan reproduceerbaarheid moeilijk aan de invloed van eiwitresten kan worden toegeschreven.

Daar de fractioneringen streng uniform werden uitgevoerd dringt zich de vraag op of wij hier misschien met een intrinsieke eigenschap van deze speciale mengsels te maken hebben. Het is namelijk niet onmogelijk, dat de fysisch-chemische eigenschappen van de afzonderlijke deeltjes in zo'n mengsel niet slechts een functie zijn van hun eigen moleculaire structuur, doch tevens worden beïnvloed door die van de hen omringende deeltjes. Wij moeten hierbij bedenken, dat men bij hyaluronzuur b.v. bij concentraties van 2 milligram per milliliter niet langer spreken kan van "omringende" deeltjes, daar men met "overlappende" deeltjes te maken heeft. De sterk gekronkelde ketens (kluwens) doordringen namelijk bij deze concentratie elkaar. (At concentrations of 0.2g./100 ml and above, the domains occupied by individual particles overlap, and the chains interpenetrate (2)). Bij de alcoholfractionerings-

methode bedroegen de beginconcentraties 10 mg per milliliter. Het zou dan ook niet verwonderlijk zijn, indien ook bij onze proeven dit onderlinge contact van de MPS-moleculen onder bepaalde omstandigheden het fysisch-chemisch gedrag van de individuele deeltjes zou vermogen te beïnvloeden. Indien dit verschijnsel zich reeds openbaart bij de betrekkelijk lage concentraties, waarmee men bij deze fractioneringstechniek werkt, dan zou het zich zeker moeten manifesteren bij kolomchromatografische methoden, waar de concentraties bij het opbrengen veel hoger liggen. Inderdaad konden wij zowel bij fractioneringen over Dowex I (16) als over Ecteola (14) deze veranderingen in fysisch-chemisch gedrag constateren.

Vooral het fractioneren van zure MPS-mengsels uit humaan aortaweefsel over Ecteola-kolommen toonde dit verschijnsel duidelijk en zeer frequent.

Deze kolomchromatografische scheidingsmethode van RINGERTZ en REICHARD werd door de auteurs met succes toegepast op kunstmatige mengsels van HA, CSA-A en heparine. De anionen-wisselaar Ecteola, welke als kolomvulling werd gebruikt, is een cellulose product met van triaethanolamine afkomstige basische groepen. De afmeting van de kolommen bedroeg 1 x 10 cm. Het elueren geschiedde trapsgewijs met oplossingen van 0.1 M tot 3.0 M NaCl-HCl (1:1).

Uit onze experimenten met uit humaan aortaweefsel geïsoleerde en vervolgens met behulp van de alcohol-fractioneringsmethode gesplitste zure MPS-mengsels bleek, dat de 43% alcoholfractie (CSA-C) tussen 0.6 - 1.5 M NaCl-HCl (1:1) geelueerd werd met een duidelijk maximum bij 0.9 - 1.0 M.

Handels-HA bleek overeenkomstig de opgaven van RINGERTZ en REICHARD met 0.1 M NaCl-HCl geelueerd te worden. Het uit de 23% alcoholfractie, volgens CIFONELLI et al. (6), geïsoleerde CSA-B verscheen in de eluaten van 0.1 - 1.0 M met een maximum bij 0.5 - 0.6 M. Het HS werd naast CSA-B volgens de methode CIFONELLI et al uit de, na incubatie met testiculaire hyaluronidase en van de CSA-C plus HA brokstukken ontdane, MPS-mengsels gewonnen en bleek tussen 0.1 - 0.7 M geelueerd te worden met een onduidelijk maximum bij 0.2 M, terwijl bovendien nog een piek bij 1.7 M viel waar te nemen.

Daar onze zure MPS-mengsels voor ruim de helft uit CSA-C bestaan (zie hoofdstuk II,1 en hoofdstuk IV,3) en deze stof tussen 0.6 - 1.5 M NaCl-HCl wordt geelueerd, zou men verwachten, dat bij het fractioneren van de zure MPS-mengsels over Ecteola-kolommen het percentage van deze mengsels, dat tussen 0.0 en 0.6 M geelueerd wordt, beneden de 50% moet liggen. Dit bleek nu meestal niet het geval te zijn. Bij de MPS-mengsels, afkomstig uit verzamelpreparaten van intima I, fatty streaks and spots I en media 0, I, II zowel als III, bedroeg dit percentage respectievelijk 78, 88, 75, 80, 97 en 66 procent.

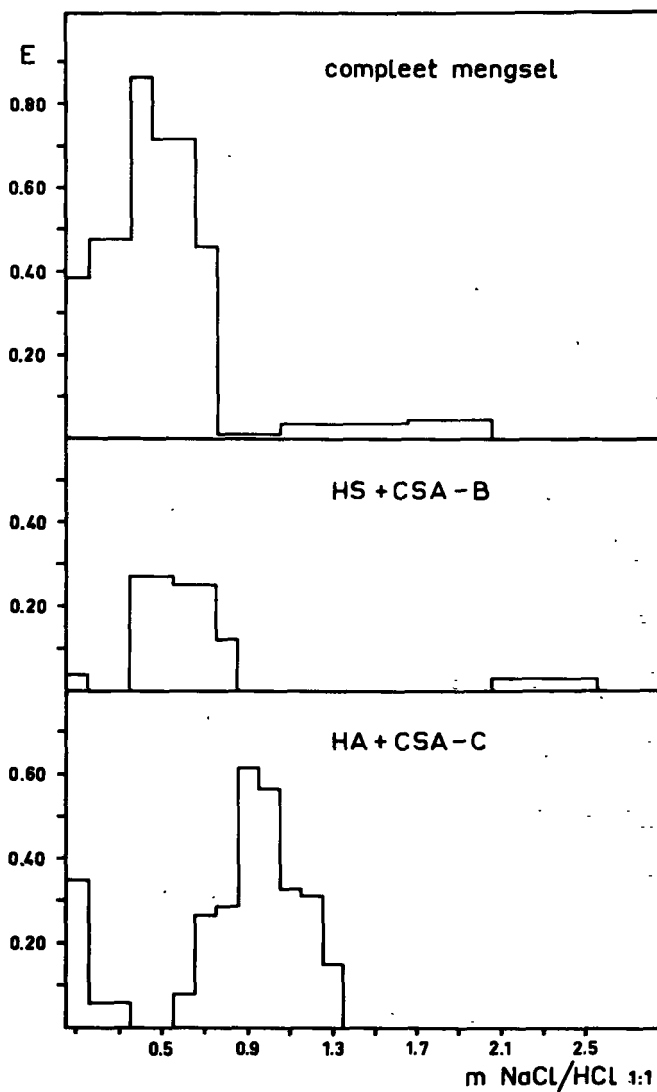
Om na te gaan of hier inderdaad sprake is van beïnvloeden van de

fysisch-chemische eigenschappen van het CSA-C door de overige componenten in het mengsel, werd het zure MPS-mengsel MPS 106 (media II) in drie porties verdeeld. Elk van de porties was van te voren, na oplossen in Ca-acetaat-buffer, met alcohol neergeslagen. De eerste portie werd in zijn geheel over een Ecteola-kolom geelueerd. Van de tweede portie werden, na incubatie met testiculaire hyaluronidase, verwijdering van het afgebroken HA plus CSA-C en ontzouten over Sephadex G.25, de voor testiculaire hyaluronidase resistente componenten (CSA-B en HS) over Ecteola geelueerd. Hetzelfde geschiedde met de 33% plus 48% alcoholfractie (HA plus CSA-C) van de derde portie. In figuur 4 staan de drie chromatogrammen onder elkaar weergegeven. De hoeveelheden zure MPS in de fracties zijn uitgedrukt in hun carbazolwaarde volgens BITTER en MUIR (1). De plaats van het CSA-C in het onderste chromatogram komt geheel overeen met die, welke wij reeds voor zes andere CSA-C-preparaten vonden. Voor het complete mengsel is een verschuiving van het CSA-C naar eluaten van lagere molariteit duidelijk te zien. Het valt moeilijk om deze verschuiving anders te verklaren dan met onderlinge beïnvloeding van de componenten van het mengsel.

Dat niet slechts van het CSA-C de fysisch-chemische eigenschappen een verandering kunnen ondergaan blijkt uit een fractionering van een, met behulp van incubatie met testiculaire hyaluronidase uit een MPS-mengsel gewonnen, CSA-B plus HS mengsel.

De kolomvulling bestond uit de sterk basische ionenwisselaar Dowex I. Het elueren geschiedde trapsgewijs met 0.1 - 2.0 M NaCl (16). Het op boven vermelde wijze geïsoleerde CSA-B en HS werd respectievelijk bij 0.8 M en 1.25 M NaCl geelueerd. Ook bij twee CSA-B plus HS-mengsels werden de componenten slechts in deze beide eluaten teruggevonden. Een derde mengsel daarentegen werd eerst met de 2.0 M NaCl-oplossing geelueerd. Het eluaat werd opgevangen in twaalf fracties van 10 ml. Er werden twee pieken gevonden, namelijk bij de buisjes nr. 3 en nr. 10. De fractie 3 tot en met 6, evenals 10 plus 11, werden samengevoegd. Na ontzouten en indampen werden beide componenten opnieuw over Dowex I geelueerd. Van de eerste component werd 27% in het 0.8 M, 53% in het 1.25 M en 20% in het 2.0 M eluaat aangetroffen, terwijl de tweede component in zijn geheel met 1.25 M werd geelueerd.

Eenzijds is het hier niet de plaats om nader op deze onderlinge beïnvloeding van de componenten in zure MPS-mengsels in te gaan. Anderzijds menen wij, dat voor een goed begrip van de door ons



Figuur 4

Verschuivingen in het elueringspatroon van zure MPS bij kolom-chromatografische fractionering over Ecteola, veroorzaakt door interactie van de componenten. Carbazolwaarden van de fracties uitgezet tegen molariteit van de eluens.

ontwikkelde methodieken deze korte behandeling van dit tot nu toe onbekende verschijnsel gewenst is.

Op grond van de geconstrueerde onderlinge beïnvloeding van de componenten in zure MPS-mengsels, afkomstig van humaan aortaweefsel, menen wij, dat deze mengsels zich minder goed lenen voor fysisch-chemische scheidingsmethodieken.

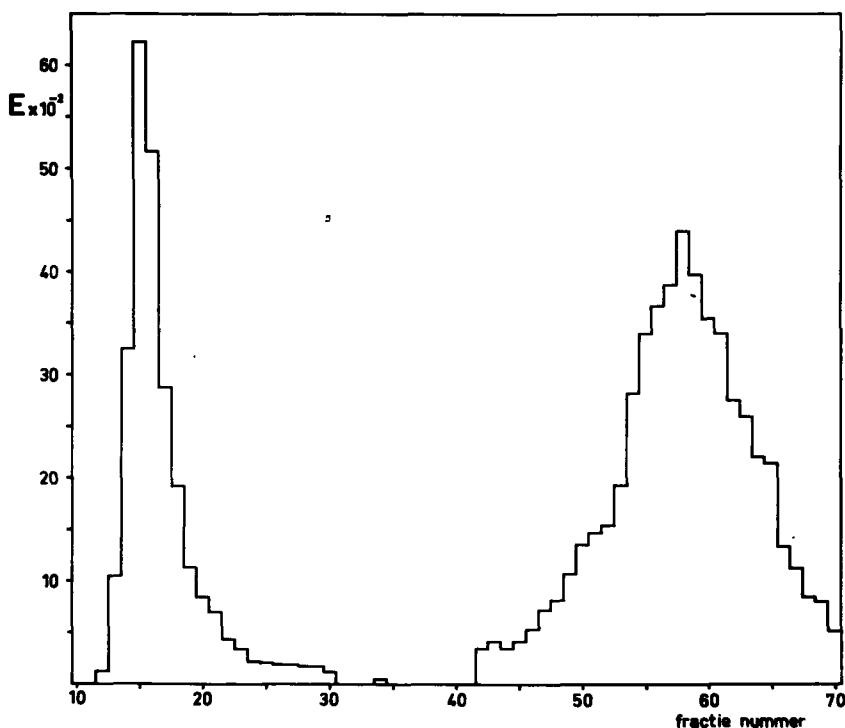
De door ons ontwikkelde methode van onderzoek is gebaseerd op de specifieke werking van de bacteriele en testiculaire hyaluronidasen. Staphylococceen hyaluronidase breekt specifiek HA en chondroitine af, testiculaire hyaluronidase bovendien CSA-A en CSA-C (18).

Staphylococceen hyaluronidase werd bereid volgens de methode van ROGER (crude preparation) (15). De bacterien werden gekweekt door Dr A.G. Audier in een vloeibaar medium bestaande uit 10 gewichtsprocenten, door papaine verteerd, paardespierweefsel, 0.25% glucose, 2.5% Na- β -glycerofosfaat en 1% gelatine. De organismen werden uit de oplossing verwijderd door middel van een bacterienfilter. Hierna werd 70 gewichtsprocent aan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ toegevoegd. De oplossing werd gedurende 16 uur onder constant roeren bij $+4^\circ\text{C}$. geplaatst, afgecentrifugeerd bij 20.000 r.p.m., 20 minuten, in een Omega ultracentrifuge, het neerslag opgenomen in 0.1 M acetaatbuffer pH 6.0 en gedurende 40 uur tegen deze buffer gedialyseerd. De enzymoplossing werd bij -20°C . bewaard. Gemeten volgens de turbidimetrische methode van VOLKSDORF (17) bleek 0.02 ml van deze enzymoplossing, bij een incubatietijd van 60 minuten, 1 mg HA voor 50% te verteren.

Als eerste stap in het onderzoek naar de samenstelling van de zure MPS-mengsels werd het percentage bepaald van de tegen testiculaire hyaluronidase resistente componenten. De incubatie van het mengsel met dit enzym werd volgens de methode van WEISSMANN et al (19) uitgevoerd.

Als milieu voor de enzymatische afbraak van bepaalde componenten in een zuur MPS-mengsel werd een 0.1 M acetaatbuffer pH 5.0 gebruikt, waaraan 1 gram gelatine plus 8.6 gram NaCl per liter was toegevoegd. Het hyaluronidase werd, evenals het MPS-mengsel, eerst vlak voor de incubatie in deze buffer in oplossing gebracht en wel 10 mg MPS plus 4 mg testiculaire hyaluronidase per milliliter. De incubatietijd bedroeg 24 uur bij 37°C .

Voor het afscheiden van de verteringsproducten uit het mengsel werd gebruik gemaakt van de zogenaamde uitsluitings-chromatografie (gel filtration). Alhoewel het moleculaire gewicht van HS en CSA-B ongeveer 50.000 bedraagt en de brokstukken van het HA en



Figuur 5

Scheiding, over Sephadex G 100, van de na incubatie met testiculair-hyaluronidase onafgebroken en afgebroken componenten van zure MPS-mengsels.

Carbazolwaarden van de fracties uitgezet tegen het fractie nummer.

CSA-C 500 of een veelvoud daarvan moeten zijn, bleek bij gebruik van Sephadex G.25 geen scheiding op te treden. Verlenging van de incubatietijd noch verhoging van de enzymconcentratie konden daar verbetering in brengen. Uiteindelijk lukte de scheiding zeer fraai over Sephadex G.100 met als eluens 0.5 M Ca-acetaatbuffer pH 4.60 (zie figuur 5). Het eluaat werd opgevangen in fracties van 10 ml. Door middel van de carbazolreactie (7) werd het gehalte aan zure MPS bepaald.

De reactie werd in een iets gewijzigde vorm uitgevoerd. In plaats van 6 ml werd 5 ml H₂SO₄ aan 1 ml van de te onderzoeken oplossing toegevoegd, terwijl na het inpipetteren van 0.2 ml 0.1% alcoholische carbazol-oplossing nog gedurende 10 minuten in het water-

bad tot 100°C. werd verwarmd. Bovendien werd de handelscarbazon voor het gebruik vanuit methanol opnieuw gekristalliseerd. Hierdoor werd een verhoging van de kleurintensiteit met ruim 30% verkregen, terwijl de spectrophotometrische bepalingen nu direct na beëindiging van de reactie konden worden verricht.

De reproduceerbaarheid bij deze enzym-methode is goed. De duplo's in een serie bepalingen van het percentage aan voor testiculaire hyaluronidase onverteerbare componenten in zure MPS-mengsels van media 0, I, II en III en van fatty streaks and spots II en III bedroegen respectievelijk 33.3 - 35.6; 33.3 - 35.2; 27.6 - 27.6; 30.8 - 31.0; 31.8 - 31.9 en 27.7 - 29.0.

Ter bepaling van het gehalte aan HA werden de mengsels volgens deze zelfde methode behandeld, doch 1 ml staphylococcen hyaluronidase-oplossing verving de 4 mg testiculaire hyaluronidase bij de incubatie.

De fracties, welke de onafgebroken componenten bleken te bevatten, werden bijeen gevoegd en ontzout over een Sephadex G.25-kolom van 3 x 50 cm. Geelueerd werd met gedeïoniseerd water. Na indampen en vriesdrogen konden deze componenten, verontreinigd met gedenatureerd enzym, in droge vorm worden geïsoleerd. Volgens de zuiveringsmethode voor CSA-B (6) werd uit de onafgebroken componenten van de met testiculaire hyaluronidase geïncubeerde mengsels het CSA-B geïsoleerd. De rest bleek bij analyse 25% glucosamine, geen galactosamine, 2.76% zwavel en 43% hexuronzuur te bevatten en moet dus geheel uit HS bestaan. Het tegen testiculaire hyaluronidase resistente gedeelte van het zure MPS-mengsel bleek dus uit twee componenten te bestaan, het CSA-B en het HS. Deze stoffen bevatten verschillende hexosaminen, namelijk galactosamine en glucosamine. De onderlinge verhouding van het CSA-B en HS kon derhalve worden bepaald volgens de glucosamine-galactosamine-bepalingsmethode van GARDELL (9).

Hiertoe werden de over Sephadex G.25 ontzoute onverteerbare componenten ingedampt en in een exsiccator, in vacuo, boven NaOH gedroogd. De 5 à 10 mg MPS werd in 1 ml 6 N HCl opgelost, gedurende 4 uur bij 96°C. gehydrolyseerd en vervolgens over een Dowex 50-kolom (0.7 x 40 cm) geelueerd en in 2 ml fracties opgevangen. Een halve milliliter werd uit elk buisje gepipetteerd en met 1 ml acetylaceton gedurende een uur bij 96°C. verhit en daarna gekoeld met leidingwater. Vervolgens werden 10 ml 96% aethanol en 1 ml Ehrlich reagens toegevoegd. Gemeten werd bij 535 mμ en een Unicam SP 500 spectrophotometer.

De reproduceerbaarheid van de kleurintensiteit liet echter soms iets te wensen over. Daarom werd de concentratie aan hexosamine in de eluaten, ter controle, bovendien bepaald door middel van de kleuringsreactie volgens BOAS (3).

Op deze wijze kon de onderlinge verhouding van het HA, CSA-B, CSA-C en HS in de zure MPS-mengsels afkomstig uit humaan aorta-weefsel worden bepaald. De vier afzonderlijke componenten kunnen met behulp van deze techniek echter niet geïsoleerd worden. De term "splitsen" is hier dan ook overdrachtelijk gebruikt.

LITERATUUR

1. Bitter, T. en H. Muir, *Analytical Biochemistry* 4 (1962) 330.
2. Blumberg, B.S., A.G. Ogston, *Ciba Foundation Symp. on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides*, Ed. G.E.W. Wolstenholme and M. O'Connor, London, Churchill Ltd. 1958, 33.
3. Boas, N.M., *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 553.
4. Böttcher, C.J.F., F.P. Woodford, E. Boelsma-van Houte en C.M. van Gent, *Rec. trav. chim.*, 78 (1959) 794.
5. Böttcher, C.J.F., C.M. van Gent, C. Pries, *Rec. trav. chim.*, 80 (1961) 1157.
6. Cifonelli, J.A., J. Ludowieg, A. Dorfman, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 541.
7. Dische, Z., *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 189.
8. Dyrbye, M. en J. Kirk, *J. Gerontol.*, 12 (1957) 20.
9. Gardell, S., *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953) 207.
10. ter Haar Romeny-Wachter, C.Ch., *Thromboplastic activity of the atherosclerotic arterial wall*, Proefschrift, Leiden 1962, blz. 18-19.
11. Hobson, P.N., in *Biochemist's Handbook*, Ed. Cyril Long, E. and F.N. Spon, Ltd., London 1961, 231.
12. Kaplan, D. en K. Meyer, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 105 (1960) 78.
13. Muir, H., *persoonlijke mededeling*.
14. Ringertz, N.R., P. Reichard, *Acta Chem. Scand.*, 14 (1960) 303.
15. Roger, H.J., *Biochem. J.*, 40 (1946) 583.
16. Schiller, S., G.A. Slover, A. Dorfman, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 983.
17. Volksdorf, J., *J. Lab. Clin. Med.*, 34 (1949) 74.
18. Walker, P.G., *Biochemical Society Symposia* Nr. 20, Cambridge, At the University Press, 1961, 109.
19. Weissmann, B., K. Meyer, Ph. Sampson, A. Linker, *J. Biol. Chem.*, 208 (1954) 417.
20. World Health Organization, *Technical Report Series* nr. 143, Geneva, 1958.

IV RESULTATEN

1. Gehalte aan zure MPS van intima-plus-media preparaten.

Ter beantwoording van de vraag naar een eventuele correlatie tussen het gehalte aan zure MPS en de graad van atherosclerose van de aortawand werden ruim honderd en vijftig intima-plus-media preparaten onderzocht. De resultaten van dit onderzoek zijn in tabel IV weergegeven.

Twee correcties werden toegepast (1, 2). De eerste opent de mogelijkheid om de opbrengst aan zure MPS ook dan nog vrij nauwkeurig te berekenen indien de eiwitten niet volkomen konden worden verwijderd. Bij de berekening van de correctie werd uitgegaan van een gemiddelde van 2.5% stikstof voor eiwitvrije zure MPS-mengsels. Het stikstofgehalte voor eiwitten werd op 16% gesteld. Microbepalingen van stikstof werden uitgevoerd door C. Pries volgens de methode BÜTCHER, PRIES en VAN GENT (4). De simplificatie als zouden eiwitten de enige stikstofhoudende verontreiniging in onze zure MPS-mengsels zijn, is aanvechtbaar. Verontreiniging met glycoproteïnen (N. 7-13%) is niet onmogelijk, terwijl de schouder bij 265 m μ (zie figuur 3) in het absorptiespectrum op nucleoproteïnen zou kunnen wijzen. Het stikstofgehalte van de preparaten bedroeg gemiddeld 2.74%, met als hoogste waarde 3.73%, zodat bij de hier gevolgde isoleringsmethodiek deze correctie een ondergeschikte rol speelt.

De tweede is een correctie op het gewicht van het uitgangsmateriaal. Na proteolyse van het weefsel blijft een onoplosbaar residu, de onverteerbare rest, achter. Deze is te verwaarlozen bij de stadia 0 en I, maar kan bij preparaten van stadium III tot 22 gewichtsprocent van het gevriesdroogde en ontvette weefsel bedragen. Dit residu bestaat grotendeels uit calcium fosphaat (tabel III).

Tabel IV Opbrengst aan zure MPS in de "normale" en atherosclerotische humane aorta als percentage van het gewicht van het gevriesdroogde en ontvette weefsel.

Stadium atherosclerose	Gewicht in grammen van het gevriesdroogde en ontvette preparaat	Percentage zure MPS		
		Ongecorrigeerd	Gecorrigeerd op eiwitgehalte	Gecorrigeerd op eiwitgehalte en onverteerbare rest
0	2.3	1.50	1.50	1.50
	4.0	2.50	2.34	2.34
	4.8	2.05	2.05	2.05
	8.8	1.63	1.63	1.63
	Rekenkundig gemiddelde	1.92±0.39	1.88±0.34	1.88±0.34
	Gewogen gemiddelde	1.89±0.39	1.86±0.33	1.86±0.33
I	5.0	2.54	2.35	2.35
	6.6	1.71	1.71	1.71
	10.0	1.86	1.85	1.85
	14.2	2.47	2.33	2.33
	17.8	2.10	2.10	2.10
	28.9	1.98	1.98	1.98
	33.3	1.87	1.87	1.87
	Rekenkundig gemiddelde	2.07±0.28	2.03±0.23	2.03±0.23
	Gewogen gemiddelde	2.03±0.29	2.00±0.23	2.00±0.23

Zie vervolg pagina 53.

Stadium athero- sclero- se	Gewicht in grammen van het gevries- droogde en ontvet- te preparaat	Percentage zure MPS		
		Ongecorrigeerd	Gecorrigeerd op eiwitgehalte	Gecorrigeerd op eiwitgehalte en onverteerbare rest
II	6.3	1.76	1.64	1.76
	6.6	1.50	1.50	1.61
	7.7	1.47	1.47	1.58
	13.2	2.00	1.96	2.11
	15.5	2.06	2.06	2.18
	45.1	1.92	1.92	2.11
	48.0	1.97	1.88	1.96
	Rekenkundig gemiddelde	1.81±0.22	1.78±0.21	1.90±0.23
	Gewogen gemiddelde	1.94±0.25	1.90±0.22	2.00±0.25
III	3.1	2.00	2.00	2.50
	5.7	1.72	1.72	2.15
	6.8	1.48	1.48	1.84
	9.9	0.35	0.35	0.44
	10.3	0.65	0.65	0.81
	13.9	0.86	0.80	1.03
	16.5	1.48	1.42	1.61
	16.9	1.42	1.42	1.63
	18.0	1.64	1.64	1.86
	22.3	1.12	1.12	1.39
	22.7	0.93	0.89	1.15
	23.1	1.84	1.80	2.25
	24.5	0.86	0.86	1.01
	25.2	1.35	1.35	1.50
	33.4	1.06	1.06	1.42
	46.1	1.26	1.23	1.54
	Rekenkundig gemiddelde	1.25±0.44	1.24±0.44	1.51±0.53
	Gewogen gemiddelde	1.22±0.44	1.20±0.43	1.46±0.52

Het corrigeren van het gewicht van het weefsel op deze onverteerbare rest is gebaseerd op de veronderstelling, dat de bestanddelen, die als residu bij de analyse achterblijven niet rechtstreeks meer bij het metabolisme betrokken zijn. Enerzijds is het onlogisch om het weefselgewicht wel op lipiden doch niet op deze, ten opzichte van de proteolytische enzymen inerte, substantie te corrigeren. Anderzijds is ook deze correctie aanvechtbaar, daar de onverteerbare rest o.a. ook nog ongeveer 25% eiwit bevat. Het is niet onmogelijk, dat toekomstige onderzoeken zullen uitwijzen, dat het aanbeveling verdient om het gehalte aan zure MPS uit te drukken in procenten van het, op het gewicht van de as van dit residu, gecorrigeerde gewicht van het gevriesdroogde en ontvette weefsel.

Het gewicht van de aorta neemt sterk toe met de leeftijd en mede als gevolg hiervan met de graad van atherosclerose. Een verzamel-preparaat van 24 aortae stadium 0 woog, na vriesdrogen en ontvetten, 8.8 gram, 16 aortae stadium I 33.3 gram, 10 aortae stadium II 48.0 gram en 5 aortae stadium III 46.1 gram. (De gemiddelde leeftijd bedroeg resp. 4, 16, 42 en 73 jaar.) Om enigszins vergelijkbare gemiddelden te krijgen werd daarom 280 gram van stadium III tegen 20 gram van stadium 0, verdeeld in resp. 16 en 4 porties, onderzocht. De porties van de stadia I, II en III werden van sterk uiteenlopend gewicht genomen om na te gaan of de hoeveelheid uitgangsmateriaal van invloed is op de opbrengst aan zure MPS. Dit bleek niet het geval te zijn, zodat de gemiddelde opbrengsten van stadium 0 geheel vergelijkbaar zijn met die van de hogere stadia. De grote onderlinge verschillen in hoeveelheid uitgangsmateriaal maakte het gewenst om naast het rekenkundig gemiddelde ook het gewogen gemiddelde in de beschouwing te betrekken.

De ongecorrigeerde percentages aan zure MPS in humaan aortaweefsel blijken, uitgaande van stadium I, af te nemen met toenemende graad van atherosclerose. Dit geldt zowel voor de rekenkundige als voor de gewogen gemiddelden. De geringe correcties op eiwitgehalte veranderen dit beeld niet noemenswaardig. Na toepassing van de correctie op de onverteerbare rest boet deze afname echter sterk aan betekenis in. De gewogen gemiddelden van stadium I en II materiaal blijken nu gelijk aan elkaar te zijn.

Toepassing van de mathematische techniek van variantie-analyse wijst uit, dat er zowel voor de ongecorrigeerde gegevens als voor die, welke op eiwitgehalte en op eiwitgehalte plus onverteerbare rest werden gecorrigeerd, significante niveau-verschillen tussen de diverse stadia bestaan. De overschrijdingskansen bedragen in de drie series resp. 0.0002, 0.0002 en 0.04.

Teneinde na te gaan of en in hoeverre de aangetoonde niveau-verschillen zijn te localiseren is de toets van Scheffé toegepast. De uitkomsten hiervan rechtvaardigen de conclusie, dat, op het berekend 5% punt, stadium III een lager gehalte aan zure MPS bezit dan de overige stadia. Dit geldt zowel voor de ongecorrigeerde als voor de op eiwitgehalte gecorrigeerde waarden. Na toepassing van de correctie op de onverteerbare rest blijken de percentages van stadium III nog slechts op het 10% punt lager dan die van stadium I te liggen. Over de andere paren is, althans op statistische gronden, geen uitspraak mogelijk.

De wiskundige bewerking van de gegevens werd verricht door Drs. J.P.M. de Kroon, T.N.O. Afd. Bewerking Waarnemingsuitkomsten.

Uit deze gegevens kunnen wij concluderen, dat er in ieder geval geen sprake is van een toename van zure MPS bij toenemende graad van atherosclerose. Gaande van stadium I naar stadium III mogen wij zelfs van een significante afname spreken.

2. D i s t r i b u t i e v a n d e z u r e M P S i n d e a o r t a w a n d .

De in de vorige paragraaf beschreven verschillen in percentages zure MPS van intima-plus-media preparaten kunnen op uiteenlopende wijzen tot stand komen. De verandering in gehalte aan zure MPS kan zowel homogeen als meer gelocaliseerd in het weefsel plaats vinden. Gelocaliseerde veranderingen kunnen in dezelfde of tegen-gestelde zin gericht zijn.

Om dit na te gaan werden 66 verzamelpreparaten van de afzonderlijk uitgeprepareerde intimae, mediae, fatty streaks and spots, plaques en atheromae onderzocht. De resultaten van dit onderzoek zijn in de tabellen V, VI, VII, VIII en IX weergegeven. Een voorlopige mededeling, dit onderzoek betreffende, is reeds verschenen (3).

Het gewicht van de gevriesdroogde en ontvette intima bedroeg gemiddeld slechts 50 milligram bij stadium 0 en 180 milligram bij stadium III. Ook de opbrengsten aan streaks and spots, plaques II

Tabel V Opbrengst zure MPS uit INTIMA, uitgedrukt in procenten van het gewicht van het ontvette gevriesdroogde weefsel.

Stadium	Gewicht van het ontvette gevriesdroogde weefsel in grammen	Percentage zure MPS	
		Ongecorrigeerd	Gecorrigeerd op onverteerbare rest van het weefsel
0	1.78	2.20	2.20
	2.14	2.07	2.07
I	1.66	2.54	2.55
	1.72	2.41	2.43
	1.99	2.66	2.66
	2.07	2.31	2.33
II	0.98	2.35	2.35
	1.26	2.75	2.75
	1.53	2.80	2.80
	1.61	2.80	2.80
III	1.38	2.49	2.50
	1.43	2.45	2.45
	1.52	2.46	2.46
	2.50	2.46	2.47

en atheromae III waren per aorta minimaal te noemen. De schaarste aan materiaal van de lagere stadia, gevoegd bij het zeer tijdrovende uitprepareren, dwongen ons met kleine hoeveelheden uitgangsmateriaal te werken. De opbrengst aan zure MPS bedroeg daarvoor slechts enkele tientallen milligrammen. Deze geringe hoeveelheden maakten het onmogelijk om materiaal voor stikstof-analysen beschikbaar te stellen. Een twaalfstal steekproeven werd genomen. Het stikstofgehalte varieerde van 2.40 tot 3.37%

Wel werd de correctie op de onverteerbare rest toegepast. Intima en fatty streaks and spots bleken na proteolyse zo goed als geen

Tabel VI Opbrengst zure MPS uit MEDIA, uitgedrukt in procenten van het gewicht van het ontvette gevriesdroogde weefsel.

Stadium	Gewicht van het ontvette gevriesdroogde weefsel in grammen	Percentage zure MPS	
		Ongecorrigeerd	Gecorrigeerd op onverteerbare rest van het weefsel
0	1.81	1.47	1.47
	2.53	1.95	1.96
	3.00	1.41	1.41
	4.95	1.58	1.58
I	3.45	2.39	2.40
	3.50	2.04	2.27
	4.04	2.06	2.13
	4.16	1.75	1.76
	4.66	2.02	2.03
	5.52	2.00	2.00
	6.39	1.68	1.68
II	11.75	1.88	1.88
	2.56	2.32	2.49
	3.85	2.13	2.20
	4.68	1.96	2.12
	4.84	1.93	1.95
III	9.50	2.11	2.19
	2.45	1.67	1.82
	2.68	1.96	2.15
	8.80	1.79	2.02
	10.70	1.45	1.65

onverteerbare rest op te leveren, dit in tegenstelling tot de media, plaques en atheromae van de stadia II en III.

De gemiddelde opbrengst aan zure MPS uit mediaal zowel als uit intimaal weefsel (zie tabel IX) blijkt bij stadium 0 duidelijk lager te zijn dan bij de overige stadia. De, van stadium III aor-

Tabel VII Opbrengst zure MPS uit FATTY STREAKS AND SPOTS uitgedrukt in procenten van het gewicht van het ontvette gevriesdroogde weefsel.

Stadium	Gewicht van het ontvette gevriesdroogde weefsel in grammen	Percentage zure MPS	
		Ongecorrigeerd	Gecorrigeerd op onverteerbare rest van het weefsel
I	2.08	3.05	3.16
	2.48	2.80	2.80
	2.54	2.50	2.50
II	1.55	2.85	2.87
	1.60	2.94	2.97
	2.40	2.71	2.71
III	1.50	2.90	2.92
	1.52	2.82	2.83
	1.82	2.73	2.77
	2.14	2.83	2.96

tae afkomstige, mediae, intimae en plaques blijken op hun beurt weer minder zure MPS te bevatten dan overeenkomstige weefseltypen van stadium II.

Deze resultaten blijken de gegevens, verkregen bij het intima-plus-media onderzoek, op zinvolle wijze te ondersteunen. Toepassing van de mathematische techniek van de variantie-analyse met twee criteria (graad van atherosclerose en type weefsel) gevolgd door de toets van Scheffé op de gecombineerde resultaten wijst nu uit, dat het gehalte aan zure MPS in aortae van stadium 0 significant lager ligt dan van de stadia I, II en III, terwijl dat van stadium III significant lager ligt dan van stadium II. Dit geldt zowel voor de ongecorrigeerde als voor de gecorrigeerde data.

Ook tussen de weefseltypen blijken duidelijke verschillen te bestaan. Het gehalte aan zure MPS van de fatty streaks and spots

Tabel VIII Opbrengst zure MPS uit PLAQUES en ATHEROMAE (A) uitgedrukt in procenten van het gewicht van het ontvette gevriesdroogde weefsel.

Stadium	Gewicht van het ontvette gevriesdroogde weefsel in grammen	Percentage zure MPS	
		Ongecorrigeerd	Gecorrigeerd op onverteerbare rest van het weefsel
II	1.36	2.68	2.70
	2.32	2.18	2.30
	2.46	2.30	2.42
III	1.55	2.40	2.60
	1.75	2.34	2.51
	1.91	1.42	1.66
	2.09	1.70	1.79
	2.13	1.27	1.54
	2.16	2.96	3.14
	2.31	2.05	2.21
	2.43	1.62	1.74
	2.44	1.06	1.24
	2.45	1.43	1.68
	2.50	1.57	1.63
	2.57	1.45	1.69
	2.60	2.29	2.51
	3.22	1.45	1.52
	5.23	2.10	2.30
	1.86 (A)	1.21 (A)	1.33 (A)
	1.95 (A)	1.25 (A)	1.38 (A)
	2.33 (A)	0.52 (A)	0.65 (A)

ligt significant hoger dan dat van de intima, terwijl de intima op haar beurt weer een significant hoger percentage zure MPS bevat dan de media, plaques en atheromae. Tussen plaques en media bestaan geen significante verschillen. De atheromae zijn in vergelijking met de overige weefseltypen het armst aan zure MPS.

Tabel IX Gemiddelde opbrengst aan zure MPS uitgedrukt in procenten van het gewicht van het gevriesdroogde en ontvette weefsel van humane aortae.

Het bovenste getal stelt de ongecorrigeerde waarde voor, het onderste het op de onverteerbare rest gecorrigeerde percentage.

Het tweede getal in elke kolom is de standaard afwijking.

	Stadium van atherosclerose			
	0	I	II	III
Intima (laesies verwijderd)	2.14±0.06	2.48±0.13	2.68±0.18	2.47±0.01
	2.14±0.06	2.49±0.12	2.68±0.18	2.47±0.02
Media (laesies verwijderd)	1.60±0.21	1.98±0.20	2.09±0.14	1.72±0.19
	1.60±0.21	2.02±0.23	2.19±0.17	1.91±0.15
Fatty streaks and spots		2.78±0.22	2.83±0.08	2.82±0.07
		2.82±0.27	2.84±0.09	2.87±0.09
Plaques			2.39±0.21	1.74±0.51
			2.47±0.24	1.98±0.51
Atheromae				0.99±0.34
				1.12±0.33

De fatty streaks and spots nemen in zoverre een speciale plaats onder de overige deelweefsels in, dat zij, bij toenemende graad van atherosclerose, een constant gehalte aan zure MPS blijken te bezitten.

Uit de resultaten van dit onderzoek mogen wij concluderen, dat de in paragraaf 1 van dit hoofdstuk geconstateerde verschillen tussen de percentages zure MPS van de intima-plus-media preparaten door parallel lopende veranderingen in de intima en media tot stand komen. Het lagere gehalte in stadium III wordt bovendien

nog geaccentueerd door het optreden van de, MPS-arme, atheromae en kalk-incrustaties.

3. Samenstelling van de zure MPS-mengsels.

De door ons gevonden verschillen in gehalte aan zure MPS kunnen al of niet gepaard gaan met verschillen in samenstelling van de desbetreffende zure MPS-mengsels. Het niet kunnen aantonen van verschillen in hoeveelheid wil nog niet zeggen, dat er geen verschillen tussen de mengsels bestaan. Deze eventuele verschillen kunnen schuilen in de onderlinge verhouding van de componenten, in de graad van polymerisatie, sulfatering enz. De onderlinge verhouding van de componenten, die in deze paragraaf behandeld zal worden, is van belang voor het juiste begrip van de rol, die de zure MPS bij het atherosclerotische proces spelen. Het splitsen van de mengsels door middel van fysisch-chemische scheidingsmethoden zou hier tot onbetrouwbare resultaten leiden (zie hoofdstuk III, 5); daarom werden enzymatische methoden gebruikt.

Als eerste benadering van het probleem werden 55 zure MPS-mengsels van het type intima-plus-media, intima, media, fatty streaks and spots, plaques en atheromae van de stadia 0, I, II en III gesplitst in een testiculaire hyaluronidase-resistent en een testiculaire hyaluronidase-niet-resistent deel (zie hoofdstuk III, 5). Het eerstgenoemde omvat de componenten HS en CSA-B, het tweede HA plus CSA-C. De resultaten van dit onderzoek staan in de tabellen X, XI en XII en in figuur 6 weergegeven.

Tussen de intimale en mediale mengsels vallen duidelijk verschillen in samenstelling te constateren. Onafhankelijk van de graad van atherosclerose blijken de laatst genoemden relatief rijker te zijn aan HS plus CSA-B (tabel X). Bekijken we echter de concentratie van deze componenten in het weefsel zelf (door de gevonden hoeveelheden, uitgedrukt in percentages van het desbetreffende ontvette en gevriesdroogde weefsel, onderling te vergelijken, zie tabel XI) dan zien wij, dat er geen sprake is van een hoger gehalte aan HS plus CSA-B in de media ten opzichte van de intima. De gemiddelde percentages voor mediaal weefsel liggen nu eerder iets lager. Het verschil tussen de hoeveelheden HA plus CSA-C in

Tabel X Percentage van de zure MPS-mengsels, bestand tegen testriculaire hyaluronidase.

	Graad van atherosclerose			
	0	I	II	III
Intima + media preparaten	29.1	36.4	28.8	17.2
	32.2	36.3	25.2	14.6
	30.4	39.9	29.0	22.8
	gem. 30.6	gem. 37.5	gem. 27.7	gem. 18.2
Intima	29.7	30.7	21.3	22.6
	29.5	29.0	21.1	23.8
	-.-	30.6	26.4	23.7
	gem. 29.6	gem. 30.1	gem. 22.9	gem. 23.4
Media	35.6	35.2	30.9	30.8
	33.3	33.3	27.6	31.0
	35.5	38.9	27.6	27.6
	31.4	42.1	29.6	28.2
	gem. 34.0	gem. 37.4	gem. 28.9	gem. 29.4
Fatty Streaks and Spots		31.3	31.9	25.2
		28.5	29.0	28.2
		gem. 29.9	gem. 30.5	gem. 26.7
Plaques			24.0	18.4
			27.7	10.6
			26.8	18.1
			27.4	21.9
			gem. 26.5	gem. 17.3
Atheromae				13.5
				10.6
				gem. 12.1

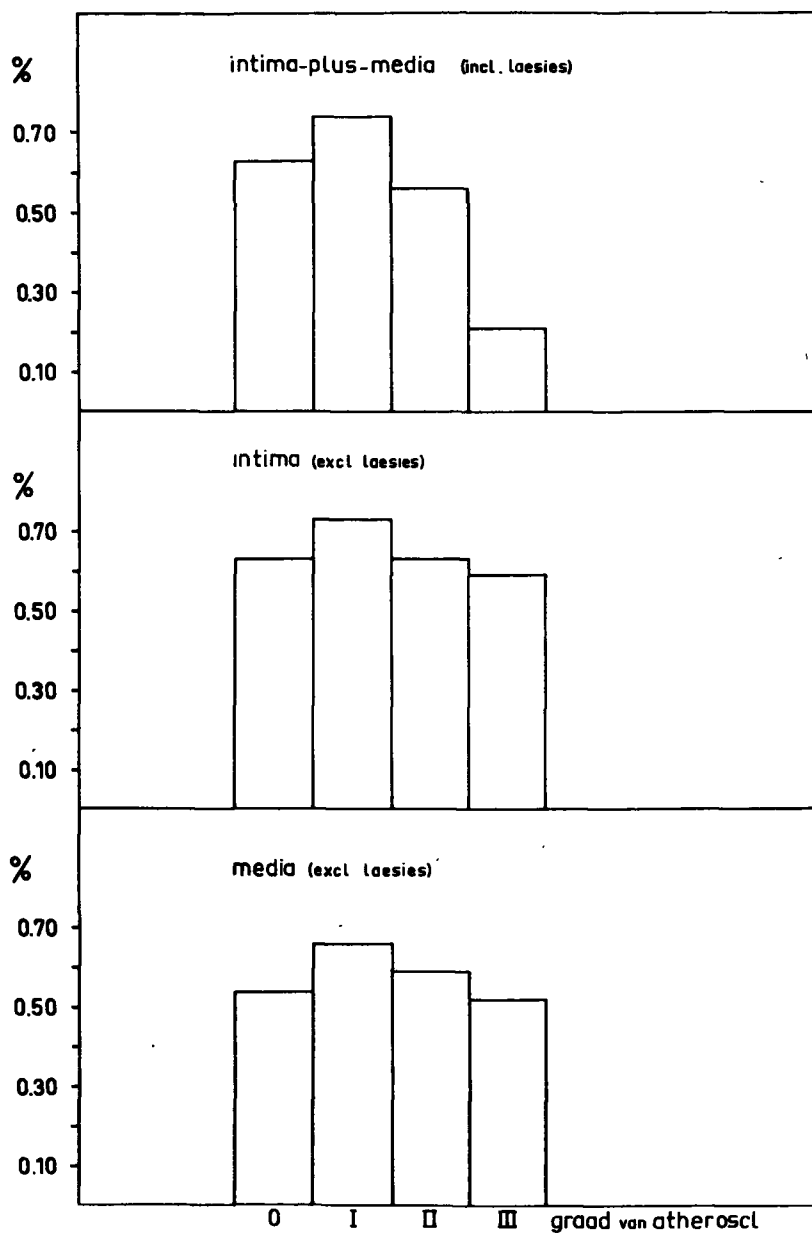
Tabel XI Gehalte van de weefsels aan, tegen testiculaire hyaluronidase resistente, zure MPS, uitgedrukt in percentage van het gevriesdroogde en ontvette weefsel.

De getallen, die tussen haakjes staan, stellen de percentages voor na correctie op de onverteerbare rest van het weefsel.

	Graad van atherosclerose			
	0	I	II	III
Intima + media preparaten	0.60	0.76	0.54	0.18
	0.66	0.79	0.52	0.16
	0.62	0.68	0.60	0.29
	gem. 0.63	gem. 0.74	gem. 0.52 (0.56)	gem. 0.21 (0.26)
Intima	0.61	0.78	0.60	0.56
	0.65	0.67	0.58	0.59
		0.75	0.69	0.59
	gem. 0.63	gem. 0.73	gem. 0.62	gem. 0.59
Media	0.55	0.62	0.66	0.55
	0.53	0.58	0.58	0.55
	0.50	0.73	0.58	0.40
	0.59	0.71	0.58	0.48
	gem. 0.54	gem. 0.66	gem. 0.59 (0.62)	gem. 0.52 (0.56)
Fatty Streaks and Spots		0.86	0.87	0.73
		0.88	0.80	0.80
		gem. 0.87	gem. 0.84	gem. 0.77
Plaques			0.55	0.27
			0.64	0.15
			0.58	0.37
			0.67	0.41
			gem. 0.61 (0.64)	gem. 0.30 (0.33)
Atheromae				0.17
				0.13
				gem. 0.15 (0.17)

Tabel XII Gehalte van de weefsels aan, tegen testiculaire hyaluronidase niet-resistente, zure MPS, uitgedrukt in percentage van het gevriesdroogde en ontvette weefsel. De getallen, die tussen haakjes staan, stellen de percentages voorna correctie op de onverteerbare rest van het weefsel.

	Graad van atherosclerose			
	0	I	II	III
Intima + media preparaten	1.45 1.39 1.48 gem. 1.44	1.41 1.21 1.19 gem. 1.27	1.37 1.54 1.46 gem. 1.46 (1.53)	0.88 0.90 0.98 gem. 0.92 (1.13)
Intima	1.46 1.55 gem. 1.51	1.76 1.64 1.71 gem. 1.70	2.20 2.17 1.94 gem. 2.10	1.90 1.87 1.88 gem. 1.88
Media	1.03 1.05 0.91 1.29 gem. 1.07	1.13 1.17 1.15 0.97 gem. 1.11	1.47 1.53 1.53 1.38 gem. 1.48 (1.53)	1.24 1.31 1.00 1.14 gem. 1.15 (1.32)
Fatty Streaks and Spots		1.92 2.17 gem. 2.05	1.85 1.96 gem. 1.91	2.17 2.02 gem. 2.10
Plaques			1.75 1.66 1.60 1.86 gem. 1.72 (1.82)	1.18 1.28 1.73 1.43 gem. 1.41 (1.55)
Atheromae				1.08 1.12 gem. 1.10 (1.21)



Figuur 6

De hoeveelheid tegen testiculaire hyaluronidase resistente zure MPS in humaan aortawefsel als functie van de graad van atherosclerose, uitgedrukt als percentage van het gewicht van het gevriesdroogde en ontvette weefsel.

beide weefsels is veel geprononceerder. De intima bevat 40 à 60% meer HA plus CSA-C dan de media (tabel XII). Het in de vorige paragraaf geconstateerde verschil in gehalte aan zure MPS van deze twee weefsels is dus terug te voeren op een verschil in hoeveelheid HA plus CSA-C.

Vergelijken we de samenstelling van de zure MPS-mengsels in media en intima als functie van de graad van atherosclerose, dan blijkt, dat in beide weefsels de mengsels bij stadium 0 en I relatief rijker zijn aan HS plus CSA-B dan bij de hogere stadia. Dit geldt ook voor de mengsels, afkomstig van de meer complexe intima-plus-media preparaten (vlg. Tabel X).

Doordat het gehalte aan zure MPS verandert met de graad van atherosclerose (zie vorige paragraaf) resulteert het hierboven beschrevene in een duidelijk maximum voor het gehalte aan HS plus CSA-B bij stadium I. Dit geldt zowel voor het intimale als voor het mediale weefsel en wordt eveneens bij de meer complexe intima-plus-media preparaten terug gevonden (zie tabel XI en figuur 6).

Bij de voor dit onderzoek gebruikte intima-plus-media stadium 0 bedroeg de gemiddelde opbrengst aan zure MPS 2,07% van het gevriesdroogde en ontvette weefsel tegen 2,01% bij intima-plus-media stadium I. Ondanks deze, zij het geringe, afname in gehalte aan zure MPS gaande van stadium 0 naar stadium I bleek, dat het gehalte aan HS plus CSA-B toch een stijging van 0.63 tot 0.74% te zien gaf. Het gehalte aan HA plus CSA-C daarentegen vertoonde een daling van 1.44 naar 1.27%. Duidelijker dan in de door ons onderzochte mediale en intimale mengsels komt hier naar voren, dat er, gaande van stadium 0 naar stadium I, zich een toename van HS plus CSA-B in de weefsels manifesteert, welke onafhankelijk is van de veranderingen in totale hoeveelheid aan zure MPS ter plaatse.

Uit tabel X volgt, dat het percentage HA plus CSA-C in de zure MPS-mengsels van media en intima een maximum vertoont bij stadium II (resp. 71.1 en 77.1%). Ook het gehalte in het weefsel aan deze component heeft een maximum bij dit stadium (tabel XII). Bij de intima-plus-media preparaten komt dit niet of nauwelijks tot uiting.

In stadium I is er geen verschil in samenstelling tussen de intimale mengsels en die van de fatty streaks and spots. Maar terwijl de intimale en mediale mengsels van stadium II een significant lager percentage HS plus CSA-B bevatten dan van stadium I, zien wij tussen die van de fatty streaks and spots II en I geen verschil. Gaande van stadium II naar stadium III is er in de uit deze laesies geïsoleerde mengsels wel een geringe afname in het percentage HS plus CSA-B te constateren. Het gehalte aan deze component in dit weefsel vertoont bij toenemende graad van atherosclerose een tendens tot afname (Tabel XI). Het gehalte aan HA plus CSA-C blijft echter constant (Tabel XII). In dit opzicht nemen de fatty streaks and spots een aparte plaats in onder de door ons onderzochte weefseltypen. Alle andere weefseltypen vertonen namelijk een duidelijke afname in gehalte aan HA plus CSA-C gaande van stadium II naar stadium III (tabel XII).

De samenstelling van de mengsels van plaques II is intermediair tussen die van intima II en media II (tabel X). Het gehalte aan HS plus CSA-B in hun weefsels vertoont geen verschil met dat in intima II of media II (Tabel XI). De geringere hoeveelheid zure MPS in plaques II ten opzichte van intima II wordt derhalve veroorzaakt door een vermindering van het HA plus CSA-C. Plaques III hebben, vergeleken met plaques II, een geringere hoeveelheid zure MPS, terwijl dit mengsel bovendien arm aan HS plus CSA-B is (tabel X). Het armst aan deze componenten zijn echter de atheromae III.

Door de incubatie van zure MPS-mengsels met testiculaire en bacteriele hyaluronidase te combineren (zie hoofdstuk III, 5) werden de hoeveelheden HA en CSA-C gescheiden bepaald. Het bepalen van het glucosamine- en galactosamine-gehalte in het tegen testiculaire hyaluronidase resistente deel van de zure MPS-mengsels maakt het berekenen van de afzonderlijke hoeveelheden HS en CSA-B mogelijk. In totaal werden van 17 MPS-mengsels de afzonderlijke percentages HA, HS, CSA-B en CSA-C bepaald (zie tabel XIII).

De zure MPS-mengsels bleken 50 tot 74% CSA-C, 14 tot 37% HS, 6 tot 15% HA en 2 tot 7% CSA-B te bevatten.

Het percentage CSA-C in de mengsels neemt toe met toenemende graad van atherosclerose. Een uitzondering vinden wij bij de fat-

Tabel XIII Samenstelling van de zure MPS-mengsels als functie van de graad van atherosclerose en localisatie in humaan aortaweefsel.

Uitgedrukt in percentages van het zure MPS-mengsel.

Preparaat	Stadium	HA	HS	CSA-B	CSA-C
Intima + media preparaten	0	16.3	24.3	6.1	53.3
	I	9.0	34.4	5.5	51.9
	II	7.8	24.1	3.9	64.2
	III	10.4	13.8	2.1	73.7
Intima	0	14.7	25.6	4.0	55.8
	I	13.5	24.4	6.2	55.9
	II	7.5	19.6	6.8	66.1
	III	8.2	17.1	6.6	68.1
Media	0	9.1	25.0	6.4	59.0
	I	8.3	36.5	5.6	49.6
	II	9.0	24.9	4.7	61.4
	III	7.8	23.0	5.2	63.6
Fatty Streaks and Spots	I	5.8	25.2	3.3	65.7
	II	5.6	23.4	5.6	65.4
	III	5.9	23.4	4.8	65.9
Plaques	II	9.3	21.2	6.2	63.3
	III	6.3	16.7	5.3	71.8

ty streaks and spots. Het CSA-C percentage van hun mengsels blijft onveranderd.

Het percentage HS neemt af met toenemende graad van atherosclerose, uitgezonderd bij media en intima-plus-media preparaten. Deze mengsels vertonen een uitgesproken maximum bij stadium I. Onafhankelijk van dit maximum aan HS blijkt de som van HS plus CSA-C nagenoeg constant te zijn, namelijk 84, 86, 86 en 87% voor de me-

diale mengsels van resp. stadium 0, I, II en III en 78, 86, 88 en 88% voor die van de intima-plus-media preparaten.

Interessant zijn de waarden 2.4, 1.4, 2.5, 2.8 en 2.2, 1.5, 2.7, 5.3 voor de ratio's CSA-C/HS der stadia 0, I, II en III voor resp. media en intima-plus-media preparaten. De intimale mengsels vertonen niet deze lage CSA-C/HS-ratio in stadium I (namelijk resp. 2.2, 2.3, 3.3 en 4.0).

Het percentage HA in intimale mengsels neemt eveneens af met toenemende graad van atherosclerose. Voor mediale mengsels lijkt het vrijwel constant te zijn. Een tweede serie, ter controle, gaf 9.6, 7.5, 7.6 en 6.5% voor de stadia 0 t/m III. Hier is wel een afname te constateren. Bekijken we echter het gehalte van de weefsels aan HA (tabel XIV) dan is de afname aan HA bij toenemende graad van atherosclerose zeer geprononceerd. De mengsels van de fatty streaks and spots kenmerken zich door het laagste percentage HA, die van intima 0 en I door het hoogste.

Of het percentage CSA-B in de mengsels afneemt bij toenemende graad van atherosclerose valt uit deze gegevens niet met zekerheid op te maken. Bij de mengsels van de intima-plus-media preparaten is wel een duidelijke afname te zien, maar deze wordt onvoldoende gesteund door de gegevens van media en intima om een conclusie te rechtvaardigen.

Vergelijken wij de hoeveelheden HA, HS, CSA-B en CSA-C, uitgedrukt in percentages van het gewicht van het gevriesdroogde en ontvette weefsel (tabel XIV) dan blijkt, dat de intima meer CSA-C bevat dan de media en ook rijker is aan HA en CSA-B (uitgezonderd bij stadium 0), terwijl de hoeveelheid HS in beide weefsels onderling gelijk is.

De fatty streaks and spots zijn gekenmerkt door een hoger gehalte aan HS en CSA-C dan de intima, media en plaques.

In het kort samengevat is uit het in deze paragraaf beschreven onderzoek komen vast te staan, dat, behalve de reeds genoemde verschillen in gehalte aan zure MPS, er ook verschillen in samenstelling van deze MPS-mengsels zijn te constateren. Zo zijn de mediale mengsels rijker aan HS dan de intimale, terwijl deze

Tabel XIV Samenstelling en distributie van de zure MPS-mengsels als functie van de graad van atherosclerose in humaan aortaweefsel.

Concentraties uitgedrukt in procenten van het gewicht van het gevriesdroogde en ontvette weefsel.

Weefsel	Stadium	HA	HS	CSA-B	CSA-C	MPS-mengsel
Intima + media preparaten	0	0.33	0.52	0.13	1.07	2.05
	I	0.19	0.72	0.12	1.07	2.05
	II	0.16	0.50	0.07	1.33	2.06
	III	0.15	0.20	0.03	1.05	1.43
Intima	0	0.32	0.54	0.09	1.19	2.14
	I	0.33	0.60	0.15	1.38	2.46
	II	0.20	0.51	0.18	1.74	2.63
	III	0.20	0.43	0.16	1.68	2.47
Media	0	0.17	0.47	0.12	1.12	1.88
	I	0.14	0.62	0.09	0.83	1.68
	II	0.18	0.50	0.08	1.20	1.96
	III	0.13	0.39	0.09	1.01	1.62
Fatty Streaks and Spots	I	0.19	0.77	0.10	1.98	3.03
	II	0.14	0.64	0.16	1.82	2.76
	III	0.17	0.67	0.13	1.86	2.83
Plaques	II	0.24	0.52	0.15	1.62	2.53
	III	0.15	0.31	0.10	1.31	1.87

laatst een hoger percentage aan CSA-C bezitten. Fatty streaks and spots hebben MPS-mengsels met het laagste percentage aan HA. Als functie van de graad van atherosclerose zien wij, dat de mediale mengsels bij stadium I het rijkst zijn aan HS, terwijl die van Plaques III daar het armst aan zijn. Ook in de distributie van zure mucopolysacchariden vallen verschillen te constateren. Fatty streaks and spots zijn rijker aan CSA-C dan de intima en deze bevat weer beduidend meer van deze stof dan de media. Ook

zijn de fatty streaks and spots het rijkst aan HS. Bekijken we de distributie van de zure MPS als functie van de graad van atherosclerose dan zien wij een maximale hoeveelheid HS bij stadium I, terwijl bij stadium II het CSA-C gehalte het hoogst is. Stadium 0 kenmerkt zich door een maximum aan HA (Tabel XIV).

LITERATUUR

1. Böttcher, C.J.F., F.B. Klynstra, Lancet 1962 I, 1304.
2. Böttcher, C.J.F., F.B. Klynstra, J. Atheroscler. Res., 2 (1962) 263.
3. Böttcher, C.J.F., F.B. Klynstra, Lancet 1963 II, 439.
4. Böttcher, C.J.F., C. Pries en C.M. van Gent, Clin. Chim. Acta 7 (1962) 745.

V. DISCUSSIE EN SAMENVATTING

In hoofdstuk II, paragraaf 2, hebben wij gezien, dat er in de literatuur geen overeenstemming heerst over het gehalte aan zure MPS in de humane aortawand. BERTELSEN en JENSEN (3) vonden voor aortae van 2-jarigen 2.04% (procenten van het gedroogde en ontvette weefsel) tegen 0.42% voor 84-jarigen, waarden, welke geheel met onze gegevens overeenkomen. Ook DYRBYE en KIRK (7), bij hun onderzoek naar het gehalte aan zure MPS in de humane aorta als functie van de leeftijd, vonden overeenkomstige waarden, namelijk 4.9 mg per gram vers weefsel (0 - 9 jaar) tot 2.4 mg (60 - 67 jaar) of uitgedrukt in percentages van het gewicht van het gedroogde en ontvette weefsel resp. 1.90 en 1.00%. De door BERTELSEN gepubliceerde percentages (2) daarentegen liggen aanzienlijk hoger, 5.3% tot 14.6% voor aortae, afkomstig van een 2- resp. 60-jarige.

In het eerste geval maakten de auteurs, evenals wij, gebruik van enzymatische vertering, in het tweede geval werd daarentegen het intacte weefsel met NaOH behandeld. Hoogstwaarschijnlijk ligt een overvloedige eiwitverontreiniging aan deze door BERTELSEN gepubliceerde hoge percentages ten grondslag. Een stikstofbepaling door deze auteur ware hoogst gewenst geweest.

KAPLAN en MEYER (10) onderzochten verzamelpreparaten van aortae als functie van de leeftijd. Hun opbrengsten aan zure MPS bedroegen 0.85 à 1.20% van het gewicht van het gedroogde en ontvette weefsel en vertoonden, in het door hun onderzochte gebied tussen 20 en 78 jaar, geen correlatie met de leeftijd. Hun waarden komen overeen met die, welke wij voor aortae stadium III hebben gevonden ($1.20 \pm 0.43\%$), maar zijn aanmerkelijk lager dan onze, op eiwitgehalte gecorrigeerde, percentages voor aortae stadium I ($2.00 \pm 0.23\%$) en aortae stadium II ($1.90 \pm 0.22\%$). Hetzelfde verschijnsel doet zich voor bij het werk van BUDECKE (5). Deze onderzoeker isoleerde uit aortae stadium 0 slechts 0.57%, terwijl door ons $1.86 \pm 0.33\%$ werd verkregen. Wel komen de door hem gevon-

den percentages (1.37 en 1.38%) voor in sterke mate atherosclerotische aortae met onze waarden voor stadium III ($1.20 \pm 0.43\%$) overeen. De stikstofpercentages bedroegen bij BUDECKE resp. 4.1 en 3.5%.

De grote variabiliteit in opbrengst bij UOTILLA en medewerkers (19), namelijk 3.38 ± 1.60 en $3.32 \pm 2.24\%$ van het gewicht van het verse weefsel, overtreft de door ons gevonden variabiliteit (grootste standaard deviatie 0.53%) met een veelvoud. Het is niet onwaarschijnlijk, dat deze enorme variabiliteit mede door de gebruikte methodiek werd veroorzaakt.

Hetzelfde geldt voor de gegevens van de door BERENSON onderzochte intima-plus-20% media preparaten (1). Uitgedrukt in procenten van het gedroogde en ontvette weefsel bedroegen zijn opbrengsten aan zure MPS voor stadium 0-preparaten 1.4 tot 4.2%. Ook hier ontbreken gegevens omtrent de zuiverheidsgraad van de MPS-mengsels. Voor een vergelijking met ons onderzoek naar de distributie van de zure MPS over de onaangetaste media, intima en de laesies leent het werk van BERENSON zich niet. BERENSON heeft namelijk intima-plus-laesies-plus 20% van de media naast media-plus-adventitia onderzocht.

Wel vormen de resultaten van ons onderzoek een steun voor het standpunt van de histologen (8), dat voor de humane "fatty streak" een hoog gehalte aan MPS kenmerkend is.

De mening van LINDSAY en CHARKOFF (13), dat proliferatie van fibroblasten en de vorming van mucopolysacchariden en collagene en elastische fibrillen tot de vorming van intimale verdikkingen (plaques) zouden leiden, wordt, wat het aandeel van de MPS betreft, door onze chemische gegevens niet gesteund. In stadium II is er weinig verschil in gehalte aan zure MPS tussen plaques en onaangetast intimaal weefsel. Het gemiddelde percentage zure MPS in plaques ligt echter eerder iets lager en zeker niet hoger dan in de desbetreffende intima. Tussen plaques III en intima III is dit verschil echter geprononceerd, namelijk resp. $1.74 \pm 0.51\%$ en $2.47 \pm 0.02\%$. De variabiliteit in gehalte aan zure MPS in plaques III is nogal groot. Een van de oorzaken van deze variabiliteit bleek te schuilen in het feit, dat het gehalte aan zure MPS in dit type laesie afneemt met toenemende ouderdom van de patient.

Het gemiddelde percentage van 7 preparaten, afkomstig van patienten van gemiddeld 61 jaar bedroeg 2.29% en van 5 andere preparaten, gemiddelde leeftijd 76 jaar, slechts 1.35%.

De afzonderlijke plaques van een en dezelfde aorta zullen ongetwijfeld variëren in ouderdom. Indien nu het gehalte aan zure MPS met toenemende ouderdom van de plaques afneemt, dan houdt dat in, dat - daar wij een gemiddeld gehalte van alle plaques van een aorta bepalen - de jongste plaques een hoger percentage zure MPS moeten bezitten dan het door ons bepaalde gemiddelde. Hieruit volgt, dat enerzijds onze gegevens de mening van LINDSAY en CHAR-KOW niet steunen, maar er anderzijds ook niet mede in conflict behoeven te zijn.

Wel in conflict zijn onze uitkomsten met de conclusies, welke ZUGIBE en BROWN (20) uit hun histochemisch werk meenden te moeten trekken. Na voorbehandeling met testiculaire hyaluronidase zagen zij, dat de kleurbaarheid met alcian blue van aorta-weefselcoupes in de leeftijdsgroep 11 - 40 jaar nagenoeg onveranderd bleef in tegenstelling tot die van de leeftijdsgroep van 1 - 10 jaar, waar de alcian blue kleurbaarheid sterk bleek te zijn afgenomen. Hun conclusie, dat de eerstgenoemde mengsels voornamelijk uit HS plus CSA-B en de laatst genoemde uit HA en CSA-C bestaan, wordt in generlei opzicht door onze analytische gegevens gesteund. In beide gevallen bedraagt het gehalte aan testiculaire hyaluronidase-resistente componenten nog geen derde van het totaal. Dit steunt weer eens het door ons in de inleiding naar voren gebrachte feit, dat men geen kwantitatieve conclusies moet trekken uit histochemische kleuringsintensiteiten.

Uit onze bepalingen van het percentage aan zure MPS in de onaangetaste mediale en intimale weefsels kunnen wij enkele conclusies trekken over het gehalte aan zure MPS als functie van de leeftijd. Deze gevolgtrekkingen te maken uit gegevens van complete aortae (3, 7, 10) is niet goed mogelijk, omdat men ongelijkwaardige grootheden met elkaar vergelijkt. Men zoekt dan namelijk overeenkomsten tussen aortae zonder atherosclerotische laesies met die, welke deze wel bezitten, niet verkalkte met sterk verkalkte enz. Bovendien wijzigt zich de verhouding intimaal-mediaal weefsel, twee weefseltypen met verschillend gehalte aan MPS, met de leeftijd. Uit tabel IX blijkt, dat het gehalte aan zure MPS zowel

in onaangetast intimaal als mediaal weefsel van stadium 0 tot en met stadium II (gemiddelde leeftijd 42 jaar) toeneemt om daarna af te nemen. Deze afname is duidelijker in de media dan in de intima, doch aanzienlijk geringer dan tussen intima-plus-media II en III (tabel IV). Het optreden van meer kalkincrustaties in stadium III en het lagere percentage aan zure MPS van plaques III ten opzichte van plaques II accentueren de verschillen ontstaan door leeftijdsinvloed in deze preparaten niet onaanzienlijk. Het is verleidelijk om deze daling in hoeveelheid zure MPS in media III en intima III ten opzichte van media II en intima II aan de veranderde hormoonspiegels na en tijdens het climacterium toe te schrijven. Zoals wij echter in de vorige paragraaf zagen volgen de afzonderlijke componenten van het zure MPS-mengsel maar zeer ten dele de fluctuaties in hoeveelheid van het complete mengsel. Het gehalte aan HA heeft zijn maximum bij stadium 0, dat voor HS ligt bij stadium I en slechts CSA-C heeft zijn grootste concentratie bij stadium II.

Deze gegevens stemmen slechts zeer ten dele overeen met die, welke KAPLAN en MEYER (10) hebben gepubliceerd. Hun lage opbrengsten aan zure MPS staan er niet borg voor, dat er geen aanzienlijke verliezen tijdens de extractie zijn opgetreden. De kans, dat zulke verliezen zonder invloed op de samenstelling van de mengsels zijn, is gering te noemen. Bovendien is de door hen gebruikte alcohol-fractioneringsmethode minder geschikt voor het splitsen van dit soort mengsels (vergelijk hoofdstuk III, 5).

Meer overeenstemming heerst er tussen onze resultaten en die van KIRK en DYRBYE (11). Deze auteurs vonden, bij toenemende ouderdom, een relatieve toename in gehalte galactosamine, overeenkomend met de door ons geconstateerde relatieve toename aan CSA-B plus CSA-C in de mengsels (tabel XIII). Zij vonden een maximum gehalte aan glucosamine in de leeftijdsgroep van 20 - 39 jaar. Dit vertoont overeenkomst met het maximum voor HS bij stadium I.

Het recente werk van MANLEY en KENT (14) leent zich niet voor een vergelijking met onze gegevens. Deze auteurs bepaalden de verhouding glucosamine/galactosamine van gehomogeniseerd en vervolgens gevriesdroogd media-weefsel van humane aortae. Zij schreven het hogere gehalte aan glucosamine ten opzichte van de gegevens van KIRK en DYRBYE (11) toe aan de omstandigheid, dat deze laatste

onderzoekers verliezen aan zure MPS geleden zouden hebben tijdens de isolering van deze stoffen uit het weefsel. Zij vergaten hierbij echter het feit, dat zijzelf geen zure MPS onderzochten, doch zure-MPS-plus-glycoproteinen en dat glycoproteinen rijk zijn aan glucosamine (5). Bovendien vergeleken zij twee onvergelykbare preparaten (media met aorta).

Het beduidend hogere percentage CSA-C in intimaal weefsel ten opzichte van mediaal hangt waarschijnlijk nauw samen met de functionele verschillen tussen beide weefsels. Intima en aangrenzend deel van de media bevatten geen vasa vasorum; hun stofwisseling is daardoor nog meer op transport door diffusie aangewezen. Een groot deel van dit transport zal op de bloedstroom in het lumen van de aorta gericht zijn. De intima grenst aan dit lumen en haar fysiologische permeabiliteit werkt derhalve regulerend op dit transport. De voorname rol, die de zure MPS spelen bij het transport door de grondsubstantie wordt algemeen erkend (4, 12, 18).

Het CSA-C komt in situ voor als macromoleculen, welke uit een 20-tal CSA-C-eenheden (elk met mol.gew. 50.000) bestaan, die onderling door een specifiek eiwit verbonden zijn. Deze CSA-proteïne complexen kunnen tot 100 ml water per gram binden. De immobilisatie van water door zo'n CSA-proteïne-gel remt de diffusie van stoffen als functie van hun grootte en lading (6). Of het CSA-C ook inderdaad deze, theoretisch mogelijke, functie vervult in de aortawand is nog niet aangetoond, maar zijn concentratie in de intima (0.4 gm CSA-C op 78 ml water, waarvan nog een deel intracellulair gebonden is) stelt het er ongetwijfeld toe in staat, temeer daar het eveneens aanwezige HA een groot waterbindend vermogen heeft.

Fatty streaks and spots bezitten de hoogste concentratie CSA-C en dus ook het minst permeabele CSA-proteïne-gel. Dit zou dan de hypothese van SCHALLOCK (18) steunen: "We are convinced that the development of atheroma, like the new formation of connective tissue, is preceded by processes which impede the passage of metabolites. Only thus does it seem possible to understand that the physiological obstruction of permeability with ageing, while not in fact the cause of arteriosclerosis, does determine its gravity and extent". In dit licht bezien is het dan ook niet verwonderlijk, dat het optreden van plaques coincideert met het veel

hogere percentage CSA-C in intima II. In intima I zou het CSA-C-gehalte dan nog laag genoeg zijn om de natuurlijke afweermiddelen van het weefsel in staat te stellen plaque-formatie te voorkomen. Misschien mogen wij in het ongebonden voorkomende HS een van deze afweermiddelen zien. Zo bleek, dat heparinoiden o.a. de fibrinolyse en thrombolyse activeren (9, 16).

Ook aan HA wordt o.a. een diffusiesnelheid- en permeabiliteitsregulerende functie toegeschreven (15, 17). De concentratie van deze stof in intima 0 en I is slechts $1/4$ à $1/5$ van die van CSA-C, maar de waterretentie bedraagt daarentegen het 5-voudige. Het driedimensionale netwerk, dat door de HA-ketens wordt gevormd, is derhalve veel grover, terwijl de negatief geladen zwavelzuurres-ten geheel ontbreken. De permeabiliteit is derhalve in sommige opzichten groter. In intima II en III is de verhouding 1:10 en is de invloed van het HA op de fysiologische permeabiliteit ten dele door die van het CSA-C vervangen, wat een afname van permeabiliteit ten gevolge zal hebben.

Alhoewel het percentage lipiden geen functie van het gehalte aan zure MPS bleek te zijn, is er wel enige correlatie in intimaal weefsel te bespeuren tussen het gehalte aan CSA-C en dat aan lipiden. Voor de intima waren de gemiddelde percentages lipiden 2.7, 4.6, 10.0 en 9.6% voor resp. stadium 0, I, II en III. Dus ook hier een maximum bij stadium II.

Er is dus wel enig verband tussen hoeveelheid zure MPS en de samenstelling van deze mengsels met leeftijd en atherosclerose te constateren; er moet echter nog veel onderzoek verricht worden alvorens definitieve conclusies hierover mogelijk zijn. Vooral de graad van sulfatering van de MPS-componenten en de biochemische invloed hiervan zullen in het onderzoek moeten worden betrokken.

LITERATUUR

1. Berenson, G.S., J. Atheroscler. Res., 1, (1961) 386.
2. Bertelsen, Sv., Nature, 187 (1960) 411.
3. Bertelsen, Sv., C.E. Jensen, Acta pharmacol. toxicol., 16 (1960) 250.
4. Buddecke, E., Angew. Chem., 72 (1960) 663.
5. Buddecke, E., Z. physiol. Chem., 318 (1960) 33.
6. Buddecke, E., Angew. Chem., 75 (1963) 941.
7. Dyrbye, M., J.E. Kirk, J. Gerontol., 12 (1957) 20.
8. Gresham, G.A., A.N. Howard, J. Atheroscler. Res., 3 (1963) 61.
9. Halse, Th., Arzneimittel Forschung, 12 (1962) 574.
10. Kaplan, D., K. Meyer, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 105 (1960) 78.
11. Kirk, J.E., M. Dyrbye, J. Gerontol., 12 (1957) 23.
12. Lindler, J., Arteriosklerose, Aetologie, Pathologie, Klinik und Therapie, red. G. Schettler, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1961, 51.
13. Lindsay, S., I.L. Charkoff, A.M.A., Arch. Pathol., 63 (1957) 460.
14. Manley, G., P.W. Kent, Brit. J. Exp. Pathol., 44 (1963) 635.
15. Pigman, W., E. Gramling, H.L. Holley, Biochim. Biophys. Acta, 46 (1961) 100.
16. Pulver, R., Arzneimittel Forschung, 12 (1962) 582.
17. Roger, H.J., The Biochemistry of Mucopolysaccharides of connective Tissue, Biochem. Soc. Symp. No. 20, Cambridge 1961, pp. 50-79.
18. Schallock, G., J. Atheroscler. Res., 2 (1962) 25.
19. Uotilla, U., E. Levonen, J. Laekallio, Acta Endocrinol., 36 (1961) 1.
20. Zugibe, F.T., K.D. Brown, Circulation Res., 8 (1960) 287.

SUMMARY

This thesis is concerned with an investigation of the distribution and composition of acid mucopolysaccharides in the human aorta as a function of the degree of atherosclerosis.

In Chapter II a review of the literature on this subject is given. A large number of the publications on this topic is based on histochemical evidence. It is pointed out, that it is not permissible to draw quantitative conclusions from histochemical staining intensities.

Chapter III gives a detailed description of the material and methods employed. The complications in applying physico-chemical methods for fractionating the acid MPS-mixture of the human arterial wall is amply discussed. Interaction of the acid MPS-compounds during column-chromatography and alcohol-fractionation is experimentally demonstrated.

Chapter IV deals with the experimental data. From the investigation we can conclude that:

- the intima of normal and atherosclerotic aortae contains a higher percentage of acid MPS than the media. This difference is primarily due to a higher percentage of CSA-C (chondroitinic acid C);
- the percentage of testicular-hyaluronidase-resistant components of the acid MPS mixtures in the tissue shows a mathematical significant increase going from stage 0 to I. This increase could be found in the intima as well as in the media. Going from stage I to stages II and III there is a marked decrease in these components. It could be demonstrated that the increases and decreases, respectively, are mainly due to variations in the HS (heparitin sulphate) contents;
- intimal tissue is richer in HA (hyaluronic acid) than the media. In both tissues the percentage of HA decreases with increasing stage of atherosclerosis (and/or age);

- the percentage of CSA-C in the intima shows a maximum in stage II;
 - in all stages of the disease fatty streaks and spots show the highest percentage of HS. Their quantity of CSA-C equals that of the intima II;
 - the lowest percentage of HS is encountered in atheromae. III;
 - in plaques the percentage of acid MPS decreases with ageing.
- The quantity of HS decreases faster than that of CSA-C.

The hypothesis of SCHALLOCK (literature chapter V, nr 18) that plaque-formation is preceded by processes in the aortic wall which impede the passage of metabolites is found to be in concordance with the changes of the percentage of CSA-C in the intimal tissue and lesions.

Op verzoek van de Faculteit der Wiskunde en Natuurwetenschappen volgt hier een overzicht van mijn academische studie.

Na het behalen van het eindexamen H.B.S.-B aan het Instituut Wullings te Voorschoten in Juli 1937 liet ik mij in September 1954 voor het eerst inschrijven aan de Rijksuniversiteit te Leiden.

Het kandidaatsexamen Wis- en Natuurkunde, letter K, werd in October 1957 afgelegd.

Hierna werd de studie voortgezet onder leiding van de hoogleraren Dr. H. Veldstra, Dr. W.K.H. Karstens en Dr. H.P. Wolvekamp.

Het doctoraalexamen met hoofdvak biochemie en bijvakken planten-anatomie en dierfysiologie werd in Juli 1960 cum laude afgelegd. In Augustus 1960 werd ik aangesteld als wetenschappelijk medewerker aan het onderzoek van de chemische aspecten van atherosclerose en thrombose, dat onder leiding van Prof. Dr. C.J.F. Böttcher en onder auspiciën van de Gezondheidsorganisatie T.N.O. wordt uitgevoerd, in welke functie ik thans nog werkzaam ben.

Het is mij een behoefte op deze plaats de vele discussies met en de daadwerkelijke steun van mijn collega's en medewerkers, met name van Dr. J.A. van Melsen, mevrouw E.J. van der Laan-Feldbrugge en mej. H.J. van Goozen, te memoreren. Zij hebben een niet genoeg te waarderen bijdrage tot de totstandkoming van dit proefschrift geleverd.

De tekeningen in dit proefschrift werden gemaakt door de heer F. Passchier, de reproducties door de heer C. van Tol.