

**HISTOCHEMIE VAN FOSFOLIPIDEN
IN VERBAND MET
ATHEROSKLEROSE VAN DE AORTA**

STELLINGEN

I

De invloed van thyroxine op de ontwikkeling van het jonge dier wordt overschat.

HAMBURGH, M., E. LYNN en E. P. WEISS, Analysis of the influence of thyroid hormone on prenatal and postnatal maturation of the rat. *Anat. Rec.* 150: 147, 1964.

II

De opvatting van HALL en van BANGA en BALO dat de mucolytische en de lipolytische activiteit van respectievelijk elastomucase en elastolipoproteinase in wezen aan eenzelfde enzym moet worden toegeschreven, wordt niet gesteund door de feiten.

HALL, D. A., Elastolysis and ageing. publ. Thomas, Springfield, Ill., 1964 I. BANGA en J. BALO: Difference in mode of action between elastase and elastomucoproteinase. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 21: 301, 1962.

III

Het is onwaarschijnlijk dat bij de oxygenatie van zoogdierbloed een monomere vorm van haemoglobine een rol zou spelen, zoals BRIEHL voorstelt naar analogie van de door hem geconstateerde aggregatie en deaggregatie bij de zuurstofoverdracht in bloed van de prik (*Petromyzon marinus*).

BRIEHL, R. W., The relation between the oxygen equilibrium and aggregation of subunits in lamprey hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 238: 2361, 1963.

IV

Het is niet uit te sluiten dat de gewrichtsvergroeiing en de gewrichtsvorming in orgaancultures van skeletelementen van kip en eend respectievelijk van muis en cavia gewrichtsspecifieke en geen soortspecifieke verschijnselen zijn.

GOEDBLOED, E. Proefschrift, Leiden, 1965.

V

Tot de hulpverlening aan onderontwikkelde gebieden behoort het samenstellen van bruikbare Flora's.

BRENAN, J. P. M., The value of floras to underdeveloped countries.
Impact 13: 121, 1963.

VI

Commercialisatie van de wilde fauna kan leiden tot het behoud van soorten.

VII

Het onderzoek naar het verband tussen de thromboplastische activiteit van de lipiden van fatty streaks en atherogenese biedt meer perspectieven dan de relatie van deze grootheid met de plaqueinhoud oplevert.

TER HAAR ROMENY-WACHTER, C. CH. Proefschrift, Leiden. 1962

VIII

Voor de isolatie van voor chemische analyse bestemde celkernen zijn de methoden waarbij gebruik gemaakt wordt van saccharose en calcium-ionen te prefereren boven die waarbij citroenzuur een toepassing vindt.

GURR, M. I., J. B. FINEAN en J. N. HAWTHORNE, The phospholipids of liver-cell fractions. I The phospholipid composition of the liver-cell nucleus.
Biochim. Biophys. Acta. 70: 406, 1963.

IX

In de Nederlandse taal geschreven wetenschappelijke literatuur dient vrij te zijn van een overmatig gebruik van Engelse termen teneinde een voorbeeld te stellen aan het dagelijks taalgebruik, waarin dit euvel een te grote omvang aanneemt.

ZANDVOORT, R. W., Engels in Nederland: iets over linguïstische infiltratie.
Onze Taal 34: 21, 1965.

Behorend bij proefschrift E. Boelsma-van Houte, *Histochemie van fosfolipiden in verband met atherosclerose van de aorta.*

HISTOCHEMIE VAN FOSFOLIPIDEN IN VERBAND MET ATHEROSKLEROSE VAN DE AORTA

PROEFSCHRIFT

TER VERKRUIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
IN DE WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN
AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN, OP GEZAG
VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR. D. J. KUENEN,
HOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER WISKUN-
DE EN NATUURWETENSCHAPPEN, TEN OVER-
STAAN VAN EEN COMMISSIE UIT DE SENAAAT
TE VERDEDIGEN OP DINSDAG 29 JUNI 1965
TE 16.00 UUR

door

ELSJE BOELSMA-VAN HOUTE

geboren te Rotterdam in 1930

1965

H. E. STENFERT KROESE N.V. - LEIDEN

PROMOTOREN:

PROF. DR. D. J. KUENEN

PROF. DR. C. J. F. BÖTTCHER

INHOUD

INLEIDING	IX
---------------------	----

DEEL I

METHODIEKEN

HOOFDSTUK 1 Overzicht van klassieke histochemische methoden voor het kleuren van lipiden, speciaal van fosfolipiden	3
1.1 Baker's zure haemateïnemethode voor fosfolipiden	3
1.2 Fosfomolybdeenzuur voor cholinehoudende fosfolipiden . .	12
1.3 Het gebruik van Nijlblauw bij het kleuren van fosfolipiden en neutrale lipiden	13
1.4 De Liebermann-Burchardreactie ter bepaling van cholesterol	16
1.5 Methoden met Soedankleurstoffen voor vrije en gebonden lipiden.	17
HOOFDSTUK 2 Enige recente ontwikkelingen op het gebied van de histochemie van lipiden	21
2.1 Luxol fast blue en de kleuring van fosfolipiden	21
2.2 Hernieuwd onderzoek naar de toepassingsmogelijkheid van Nijlblauw	23
2.3 Aantonen van fosfolipiden en neutrale lipiden met OTAN .	25
2.4 Toepassing van molybdeenbevattende reagentia voor complexvorming met fosfolipiden	26
2.5 De PAN-kleuring voor cholesterol	28
HOOFDSTUK 3 Methode voor de identificatie van cholinehoudende fosfolipiden met cis-aconietzuuranhydride (CAZA)	31
3.1 Beschouwing van de kolorimetriscbe bepaling	31
3.2 Ontwikkeling van de histochemische methode	33
3.2.1 Polymerisatie van cholesterol met cobaltchloride en natriumperjodaat	36

3.2.2 Polymerisatie van lipiden in weefselcoupes met cobaltchloride en natriumperjodaat of kaliumpersulfaat . .	36
3.2.3 Polymerisatie van cholinehoudende fosfolipiden met cobaltchloride en natriumperjodaat of kaliumpersulfaat	38
3.2.4 Complexvorming van cholinehoudende fosfolipiden met CAZA en de invloed van cobaltchloride en natriumperjodaat	39
3.2.5 Complexvorming met CAZA van cholinehoudende fosfolipiden in weefselcoupes en de invloed van cobaltchloride en natriumperjodaat	40
3.3 Voorschrift voor de histochemische methode	41

DEEL II

**TOEPASSING VAN DE CAZA-METHODE BIJ HET ONDERZOEK
OVER ATHEROSKLEROSE VAN DE MENSELIJKE AORTA**

HOOFDSTUK 4 Morfologie van de aorta	45
4.1 Het macroscopische beeld	45
4.2 Microscopische en submicroscopische structuur	46
HOOFDSTUK 5 De topografie van cholinehoudende fosfolipiden in aorta's met verschillende graad van atherosklerose	49
5.1 Materiaal en werkwijze	49
5.2 Resultaten	51
5.2.1 De normale intima	51
5.2.2 De binnenste elastische membraan	51
5.2.3 Fatty streaks en spots	53
5.2.4 Plaques	54
5.2.5 Atheroom	55
5.2.6 De media	55
5.3 Discussie	57
5.4 Samenvatting en interpretatie van de resultaten	62
REPRODUCTIES t.o.	56
SAMENVATTING	64
SUMMARY	66
LITERATUUR	69

INLEIDING

Zoals het chemisch onderzoek naar de samenstelling van mengsels van lipiden lange tijd ten achter stond bij dat van andere groepen van chemische verbindingen door het ontbreken van deugdelijke isolatie-, scheidings- en analysemethoden, vertoont ook de histochemie van lipiden een achterstand op bijvoorbeeld de enzymhistochemie.

Toen enige jaren geleden de behoefte ontstond om, als aanvulling op de chemische analyse van aortalipiden, de verschillende klassen van lipiden te localiseren in de vaatwand, waren hiervoor vrijwel geen specifieke histochemische methoden beschikbaar. Het in deze dissertatie beschreven onderzoek is voortgekomen uit door Böttcher en medewerkers (1959) ontwikkelde nieuwe analysetechnieken op het gebied van de chemie van lipiden. Deze nieuwe methoden werden aanvankelijk toegepast om van aortapreparaten van intima en media tezamen het gehalte aan fosfolipiden, vrije vetzuren, vrij cholesterol, cholesterol-esters en triglyceriden, benevens de vetzuren-samenstelling van de daarvoor in aanmerking komende verbindingen te bepalen (Böttcher et al. 1960a). Later werden analyses uitgevoerd van intima, media en de verschillende soorten van atherosklerotische laesies afzonderlijk (Böttcher et al.: nog niet gepubliceerde resultaten). Tevens maakte een verfijning in de analysetechniek het mogelijk de fosfolipiden te splitsen in de verschillende typen en van elk type de vetzuren-samenstelling te bepalen (Böttcher en Van Gent 1961a).

Uit zuiver morfologisch standpunt leek het echter gewenst om in kleinere eenheden dan intima, media en laesies tot een nauwkeurige localisatie van de verschillende klassen van lipiden te komen. Bovendien ontstond daardoor de mogelijkheid om atherogenetische processen die zich op cellulair niveau afspelen, topografisch te achterhalen. De vraag doet zich bijvoorbeeld voor of het mogelijk is een door verschillende auteurs aangetoonde synthese van fosfolipiden (Zilversmit en McCandless 1959; Day 1962a) in de aortawand te situeren. Voorts is het van belang na te gaan of fosfolipiden een dispergerend effect vertonen ten

opzichte van cholesterol; als gevolg van een dergelijk proces zou de door cholesterol veroorzaakte sklerogenese (Adams 1963b), die bij het ontstaan van atherosklerotische plaques een belangrijke rol speelt, afgeremd worden.

Bij het begin van het onderzoek kwamen, zoals uit de literatuur blijkt, de volgende methoden voor de localisatie van lipiden in weefselcoupes in aanmerking (Pearse 1962):

- voor fosfolipiden stond de zure haematefnemethode van Baker ter beschikking;
- vrij cholesterol en
- cholesterolesters samen konden bepaald worden met de reactie van Liebermann-Burchardt of modificaties daarvan;
- vrije vetzuren en
- triglyceriden konden, en kunnen ook nu nog, niet histochemisch bepaald worden.

Voor lipiden in het algemeen stond kleuring met oplossingen van de Soedankleurstoffen ter beschikking, terwijl zure lipiden, dat zijn de fosfolipiden en de vrije vetzuren, van neutrale lipiden onderscheiden zouden kunnen worden door kleuring met Nijlblauw. Vrij cholesterol zou afzonderlijk te bepalen zijn door complexvorming met digitonine, welk complex dubbele breking vertoont onder de polarisatiemicroscop.

Gezien de toenmalige stand van de lipidenhistochemie werd het wenselijk geacht de hierboven genoemde methoden aan een kritische beschouwing te onderwerpen; de resultaten daarvan worden in hoofdstuk 1 weergegeven. Aangezien bij dit inleidende onderzoek bleek dat de specificiteit en de gevoeligheid of de localiserende eigenschappen van deze methoden zoveel te wensen overlieten, dat het gebruik ervan niet verantwoord was, werd besloten te trachten door eigen onderzoekingen tot nieuwe methoden te komen.

Het uitgangspunt voor deze onderzoekingen lag bij de analytische, meest kolorimetrische, reacties welke bij het kwantitatieve onderzoek van lipiden worden gebruikt.

Deze methoden moesten zodanig bewerkt en aangepast worden, dat ze histochemisch bruikbaar werden. Problemen die zich hierbij voordeden waren in de eerste plaats, dat te analyseren verbindingen voor kolorimetrische bepalingmethoden in oplossing gebracht worden, terwijl de essentie van het histochemisch onderzoek was deze zelfde stoffen ter plaatse te immobiliseren. Voorts was een moeilijkheid dat een kleuringsmethode specifiek kan zijn voor een bepaalde component in een mengsel van lipiden, maar dat onder de veelheid van verbindingen

die in een weefsel voorkomen, zich andere stoffen bevinden met een voor het ontstaan van de kleur verantwoordelijke chemische configuratie. Zo zullen kleuringsmethoden die essentieel zijn voor het amfotere karakter van fosfolipiden niet voldoen in aanwezigheid van, eveneens amfotere, eiwitten, met andere woorden niet in weefselcoupes. Hierbij wordt gedacht aan de tricomplexkleuringen (Van Niekerk 1961).

In één geval gelukte het om, ondanks de in de vorige alinea geschetste moeilijkheden, een voor de chemische analyse ontwikkelde methode om te zetten in een specifieke, histochemische kleuringsmethode. Dit resultaat werd bereikt bij de reactie op het kwaternair gebonden stikstof van cholinehoudende fosfolipiden met cis-aconietzuuranhydride. Een gelukkige omstandigheid hierbij was, dat het kwaternair gebonden stikstof practisch alleen in choline voorkomt. Het fixeren van deze cholinehoudende fosfolipiden kon op bevredigende wijze uitgevoerd worden. Het tot stand komen van de methode wordt in hoofdstuk 3 uiteengezet.

Enige mislukte pogingen tot het vinden van nieuwe histochemische technieken worden in hoofdstuk 2 vermeld, evenals enkele methoden voor de histochemische bepaling van fosfolipiden (Adams 1959) en één voor cholesterol (Adams 1961) die bekend werden, nadat een aanvang met het eigen onderzoek gemaakt was.

Tenslotte worden in hoofdstuk 5 de resultaten gegeven die met de genoemde methode voor cholinehoudende fosfolipiden gevonden werden in aorta's met verschillende mate van atherosklerose. Als inleiding hiertoe wordt in hoofdstuk 4 de morfologie van de aorta beschreven. De resultaten van hoofdstuk 5 worden in verband gebracht met enkele zienswijzen over het ontstaan van atherosklerotische laesies.

DEEL I
METHODIEKEN

HOOFDSTUK 1

OVERZICHT VAN KLASSIEKE HISTOCHEMISCHE METHODEN VOOR HET KLEUREN VAN LIPIDEN, SPECIAAL VAN FOSFOLIPIDEN

Betreffende het histochemisch onderzoek van lipiden volgens klassiek patroon geeft Pearse (1962) in zijn handboek voor histochemie in hoofdstuk XI een uitvoerig en kritisch overzicht. Enkele methoden die bij een eerste beschouwing het meest in aanmerking lijken te komen voor de localisatie van verschillende klassen van lipiden in de aortawand zullen wij aan een nadere bespreking onderwerpen.

1.1 BAKER'S ZURE HAEMATEÏNEMETHODE VOOR FOSFOLIPIDEN

De methode van Baker (1946) om met zure haemateïne histochemisch fosfolipiden aan te tonen, is gebaseerd op Weigert's (1896) ijzer-haematoxylinekleuring voor de myelineschede van zenuwen. Baker's motief voor de bewerking van de myelinekleuring is het feit dat bekend is dat fosfolipiden in de myelineschede van zenuwen voorkomen.

Baker's kleuring verloopt als volgt:

Weefsel wordt gefixeerd in formol-calciumchloride (4 % formaline met 1 % calciumchloride); calciumionen worden aan het fixatief toegevoegd om fosfolipiden te immobiliseren. Het gefixeerde weefsel wordt gedurende 18 uur in een oplossing van kaliumbichromaat (5 %, eveneens met 1 % calciumchloride) bij kamertemperatuur gehouden, vervolgens gedurende 24 uur bij 60° C. Volgens Baker worden daardoor de fosfolipiden gefixeerd ten gevolge van oxydatie en zou bovendien ter plaatse een basische component achterblijven die in een later stadium als beitsmiddel dient voor de kleurstof. Van het aldus gepreserveerde weefsel worden vriescoupes gesneden, deze worden nogmaals met bichromaat behandeld en wel gedurende 1 uur bij 60° C; dit is het zogenaamde nachromeren. Hierna wordt de eigenlijke kleuringsreactie uitgevoerd met een 0,1 % oplossing van haematoxyline die geoxydeerd wordt tot haemateïne met 0,02 % natriumjodaat, waarna 2 % ijsazijn toegevoegd wordt. Gekleurd wordt gedurende 5 uur bij 37° C. Differentiatie vindt plaats in een met borax (0,25 %) gebufferde ferricyanide-

oplossing (0,25 %) gedurende 18 uur bij 37° C. Als resultaat zijn fosfolipiden blauw, blauwzwart of grijs gekleurd. Baker ging de specificiteit van zijn methode na door een groot aantal in planten- en dierenrijk voorkomende organische verbindingen op papier te toetsen. Behalve fosfolipiden reageerde ook een aantal eiwitten positief. Om in coupes fosfolipiden van eiwitten te kunnen onderscheiden, extraheerde Baker de lipiden met pyridine en paste daarna de kleuring met zure haemateïne toe. Een eventueel positieve reactie zou dan toegeschreven moeten worden aan eiwitten; vergelijking met een niet-geëxtraheerde coupe geeft de localisatie van fosfolipiden aan.

Wanneer men zich verdiept in de chemische achtergrond van deze kleuringsmethode, twijfelt men onmiddellijk aan de specificiteit ervan. Wat Baker zelf namelijk een fixatie van fosfolipiden door oxydatie en tegelijkertijd een beitsing met behulp van het kaliumbichromaat noemt, grijpt niet aan op de fosfaatgroep — hetgeen men zou mogen verwachten bij een voor fosfolipiden specifieke kleuring — maar op de dubbele banden van de in de fosfolipiden gebonden onverzadigde vetzuren. Wanneer we ons beperken tot de lipiden, treffen we echter alleen al daarbij in alle klassen, en dus niet alleen in die van de fosfolipiden, verbindingen met onverzadigde structuurelementen aan.

De wijze waarop oxydatie en polymerisatie van onverzadigde lipiden zou plaats vinden, is door Heslinga (1957) in zijn proefschrift uitvoerig beschreven. Hij geeft de volgende, hypothetische, gang van zaken aan:

In eerste instantie worden reactieve oxydatieproducten van de dubbele banden gevormd. Er zijn aanwijzingen dat deze bestaan uit peroxyden of hydroperoxyden. De geoxydeerde verbindingen reageren met elkaar, waardoor netvormige polymerisatieproducten ontstaan. Het oxyderend agens wordt hierbij zelf gereduceerd, waarbij chromi-ionen ontstaan die in een waterige oplossing in evenwicht zijn met chromi-hydroxyde. Door afgifte van water geeft dit chromihydroxyde aanleiding tot onderlinge polymerisatie. Het driewaardig chroom wordt complex gebonden in de gepolymeriseerde lipiden. Op de aanwezigheid van de chromi-ionen berust in een volgend stadium van het kleuringsproces de vorming van gekleurde complexen met haemateïne.

In grote lijnen komt deze verklaring overeen met Baker's eigen visie op de taak van het bichromaat, zij het dat volgens Heslinga de oxydatie niet beperkt blijft tot de fosfolipiden en de reactie met de kleurstof geen simpele zuur-basereactie is. Heslinga toonde aan dat, evenals lecithine, ook onverzadigde triglyceriden, te weten trioleïne, lijnolie, gekookte lijnolie en chinese houtolie met bichromaat onoplosbaar in vetoplos-

middelen gemaakt konden worden en wel sneller en vollediger naarmate zij meer onverzadigd waren. Daarom noemt deze auteur Baker's kleuring niets anders dan een morfologisch misschien belangrijke modificatie van de bichromaatbeitsing met ten onrechte een histochemische naam en pretentie.

Aangezien Heslinga's onderzoek beperkt bleef tot onverzadigde triglyceriden, leek het ons de moeite waard het onderzoek uit te breiden tot andere klassen van lipiden. Hiervoor konden wij beschikken over een aantal preparaten van grote zuiverheid en bekende vetzurenstelling. De lipiden werden over het algemeen opgelost in chloroform, in een concentratie van 20—40 mg per ml; van deze oplossingen werd 5 mikrol. op papierstrookjes gebracht, die met silicagel geïmpregneerd waren. Dit silicagelpapier werd als achtergrond voor de te onderzoeken lipiden gebruikt, omdat deze, en vooral de fosfolipiden, er aan geadsorbeerd worden; hierdoor wordt in zekere zin het gebonden zijn van lipiden in weefselcoupes gefimiteerd, zij het ook dat de aard van de binding geheel anders is. De papierstrookjes werden volgens het voorschrift van Baker behandeld. In tabel 1 worden de resultaten weergegeven voor lipiden die een verschillende mate van onverzadigdheid bezitten; de intensiteit van de kleuringsreactie is subjectief vastgesteld.

Resultaat:

In verschillende klassen van lipiden komen Baker-positieve reacties voor; in het algemeen worden de poly-onverzadigde verbindingen het meest intensief gekleurd.

Conclusies:

1. Baker's zure-haemateïne methode is niet specifiek voor fosfolipiden.
2. Lipiden met in de koolstofketen van het vrije of gebonden vetzuur meer dan één dubbele band (linoleenzuur) of één dubbele band in combinatie met één of meer OH-groepen (cholesterol, glycerolmonoöleaat) of verbindingen die alleen twee OH-groepen bevatten (glycerolmonostearaat), geven onder de door Baker voorgeschreven condities een positieve reactie.
3. De intensiteit van de kleur is niet in alle gevallen evenredig met de mate van onverzadigdheid, aangezien het relatief weinig onverzadigde oleoyl-stearoyl-L- α -lecithine een sterker positieve reactie geeft dan bijvoorbeeld het poly-onverzadigde linoleenzuur.
4. Mogelijk is de mate van onverzadigdheid van de vrije of gebonden vetzuren bepalend voor het verloop van de omzetting met kaliumbichromaat en is daarenboven de aanwezigheid van OH-groepen of

Tabel 1 *Reactie van lipiden waarin de vetzuren in verschillende mate onverzadigd zijn met zure haemateïne.*

toetsobject	intensiteit van de kleurreactie	kleur van het complex	karakter van de vetzuren
FOSFOLIPIDEN			
di-heptanoyl-L- α -lecithine	—		verzadigd
di-palmitoyl-L- α -lecithine	+++	blauwzwart; lichtbruin	verzadigd
di-lignoceroyl-L- α -lecithine	+	bruin	verzadigd
di-palmitoyl-DL- α -lecithine	+++	grijsblauw; grijsblauw	verzadigd
oleoyl-stearoyl-L- α -lecithine	+++	blauw-bruin	mono-onverz.
di-oleoyl-L- α -lecithine	++	grijsblauw	mono-onverz.
di-lineoyl-L- α -lecithine	+++	blauwzwart	poly-onverz.
ei-lecithine	+++	donkerblauw	poly-onverz.
ei-lecithine (gezuiverd)	+++	bruinzwart	poly-onverz.
(β , γ) palmitoylfosfatidylcholine (lyso-lecithine)	+++	bruinzwart	verzadigd
di-palmitoylfosfatidylethanolamine	++	blauw	verzadigd
kephalinen-fractie	+++	blauw; donkerblauw	onverzadigd
singosine	+	grijs	
fosfatidylinositol	+	grijsblauw	
cerebrosiden (natuurlijke)	+++	donkerblauw	onverzadigd
VRJIE VETZUREN			
stearinezuur	—		verzadigd
oliezuur	—	enigszins bruingrijs	mono-onverz.
linoleenzuur	++	grijsblauw	poly-onverz.
STEROLEN			
cholesterol	+++	lichtblauw	
cholestanol	—		
cholestenon	—		
ergosterol	++	bruin	
STEROLESTER			
cholesterolstearaat	—		verzadigd
GLYCEROLESTERS			
glycerol- α -monostearaat	+	lichtblauw	verzadigd
glycerol- α -monoöleaat	+++	donkerblauw	mono-onverz.
tristearaat	—		verzadigd
trioleaat	—	zeer weinig lichtbruin	mono-onverz.

- een fosfaatgroep van invloed op kleur en intensiteit van die kleur van het met haemateïne gevormde complex. Deze veronderstelling zou een verklaring geven voor het gedrag van de onderzochte sterolen.
5. De positieve reactie van de verzadigde fosfolipiden kan alleen verklaard worden door aan te nemen dat de fosfaatgroep ook onafhankelijk een complex vormt met haemateïne, waarbij het kaliumbichromaat al dan niet een rol speelt.

De voorlaatste conclusie is verwant aan de opvatting van Chayen et al. (1964); zij menen dat een positieve reactie afhankelijk is van de aanwezigheid van dubbele bindingen in de vetzuren, en dat misschien zelfs de aanwezigheid van deze onverzadigde vetzuren in combinatie met een fosfaatgroep in hetzelfde molecuul een vereiste is. Ware deze laatste veronderstelling juist, dan zouden zij komen tot een grotere specificiteit van de reactie met zure haemateïne dan uit de reactie van de in tabel 1 onderzochte lipiden geconcludeerd kan worden.

Opgemerkt dient te worden dat de kleur van het gevormde complex mede afhankelijk is van het fabrikaat van de gebruikte kleurstof; dit verklaart het verschil dat verkregen werd door di-palmitoyl-L- α -lecithine met verschillende haematoxylines te behandelen (blauwzwart en lichtbruin).

Tabel 2 *Invloed van verlengde nachromering op Baker-negatieve lipiden.*

toetsobject	nachromeringstijd	intensiteit van de kleurreactie	kleur van het complex
oliezuur	1 uur	—	enigszins lichtblauw
	6 uur	—	enigszins lichtblauw
	24 uur	±	lichtblauw
	48 uur	+	lichtblauw
	7 dagen	+	blauw
trioleaat	1 uur	—	zeer weinig lichtbruin
	6 uur	—	lichtbruin
	24 uur	±	grijsbruin
	48 uur	++	blauw
	7 dagen	+++	blauw-donkerblauw
tristearaat	1 uur	—	
	6 uur	—	
	24 uur	—	
	48 uur	—	
	7 dagen	—	

De waarde die Baker zelf toekent aan een nauwkeurige conditionering bij de toepassing van zure haemateïne is in zoverre terecht, dat ook lipiden die onder de door hem voorgeschreven omstandigheden geen positieve reactie geven, dat wel doen wanneer de chromeringstijd verlengd wordt. In tabel 2 worden de resultaten weergegeven voor enkele lipiden die onderworpen werden aan een verlengde nachromering.

Conclusie:

Er is, wanneer geen hydroxyl- of fosfaatgroepen aanwezig zijn, tenminste één dubbele band in de koolstofketen van het vetzuur vereist voor complexvorming met zure haemateïne na behandeling met bichromaat. Het geheel verzadigde tristearaat vertoont ook na zeven dagen nachromeren geen spoor van een positieve reactie.

Nog een stap verder met de conditionering van de chromering gaat Elftman (1954): door naast temperatuur, concentratie en duur van de inwerking van het bichromaat ook nog de zuurgraad op de juiste wijze in te stellen, meent deze auteur het chromeringsproces aan te kunnen passen aan de aard van de histochemisch aan te tonen verbinding. Elftman's bewering dat, door gebruik te maken van verschillende chromeringsintensiteiten, een aantal celcomponenten gedifferentieerd zichtbaar gemaakt kan worden, mag op zichzelf juist zijn. Het is echter te optimistisch om deze morfologische differentiatie te correleren met een histochemische. Elftman's zienswijze, dat door combinatie van de geconditioneerde chromering en gedifferentieerde extractie met vetoplosmiddelen een analyse mogelijk is van een grote verscheidenheid van lipiden in de verschillende weefsels, kunnen wij niet delen. Voor aorta-weefsel bijvoorbeeld is het beeld van een vetzurenanalyse binnen de verschillende klassen van lipiden daarvoor te gevarieerd en van de verschillende klassen onderling weer te weinig verschillend in zijn onverzadigd karakter (Böttcher et al. 1960) om tot een bevredigende identificatie van de verschillende lipiden te kunnen leiden.

Elftman (1958) beschrijft nog een aantal fixatiemethoden met kaliumbichromaat voor lipiden waarbij onder andere gebruik gemaakt wordt van een oplossing van kaliumbichromaat met sublimaat die op een pH = 2,5 gebracht wordt met zoutzuur. Het is niet ondenkbaar dat onder deze omstandigheden een partiële hydrolyse van fosfolipiden optreedt. Hierop moet men zelfs al bedacht zijn bij de chromering zoals die door Baker toegepast wordt: de pH van een 5 %-ige oplossing van kaliumbichromaat waaraan 1 % calciumchloride toegevoegd is, heeft namelijk een waarde van 3,90.

Om nog eens te meer vast te stellen dat althans Baker's methode niet bruikbaar is om fosfolipiden in de aortawand te localiseren, werden uit een aorta geïsoleerde lipidenfracties op papier onderzocht. In tabel 3 worden hiervan de resultaten vermeld, welke voor zichzelf spreken: alle fracties reageren positief.

Tabel 3 *Reactie met zure haemateïne van uit een aorta geïsoleerde lipidenfracties.*

lipidenfractie uit aorta	intensiteit van de reactie	kleur van het complex	aard van de vetzuren (Böttcher 1960b)		
			verzadigd	mono-onverz.	poly-onverz.
fosfolipiden	++	bijna zwart	62 %	17 %	22 %
vrije vetzuren	+	lichtgrijs	37 %	29 %	34 %
cholesterol	+	lichtblauw	—	—	—
cholesterolesters	++	blauw	18 %	36 %	46 %
triglyceriden	+	grijsblauw	35 %	46 %	19 %

Waar het uit theoretisch oogpunt al duidelijk gemaakt is waarom de methode met zure haemateïne niet specifiek is voor fosfolipiden en dit aan een gevarieerd proefmateriaal gedemonstreerd is, rest nog te verklaren waarom Baker's eigen proeven niet in die richting gewezen hebben. Bij beschouwing van de door Baker onderzochte lipiden blijkt, dat alleen in de groep van de fosfolipiden poly-onverzadigde verbindingen voorkomen (tabel 4).

Ricinoliezuur met één dubbele band en één OH-groep vertoont een licht positieve reactie, evenals cholesterol; dit laatste echter minder duidelijk dan in ons eigen onderzoek (tabel 1). Hack (1953) vermeldt een negatief resultaat voor cholesterol met haemateïne na behandeling met bichromaat tegenover een positieve reactie van fosfolipiden, ook met verzadigde vetzuren. Cain (1950) komt in een samenvattend artikel van resultaten uit een aantal weinig recente publicaties tot de conclusie dat het gedrag van cholesterol ten opzichte van de reactie met zure haemateïne verschilt. In ditzelfde artikel meent Cain dat het veiliger is de minder intensief gekleurde complexen te negeren; de methode zou specifiek zijn voor fosfolipiden mits alleen uitgesproken positieve reacties in aanmerking genomen worden en de aanwezigheid van cholesterol uitgesloten is. Volgens deze auteur is de chemische achtergrond van de kleuringsmethode niet bekend, noch welk deel van het fosfolipidemolecuul verantwoordelijk is voor de kleuringsmethode. Het zou volgens

Tabel 4 *Door Baker beproefde lipiden ter bepaling van de specificiteit van de reactie met zure haemateïne.*

toetsobject	reactie	aard van de vetzuren
POSFOLIPIDEN		
ei-lecithine	donkerblauw	onverzadigd
lecithine (hersenen)	donkerblauw, blauw	onverzadigd
kephaline	blauwzwart, donkerblauw, lichtblauw, groenblauw	onverzadigd
sfingomyeline	donkerblauw	onverzadigd
cerebrosiden (hersenen)	donkerblauw, blauw lichtblauw, zeer weinig lichtblauw	onverzadigd
VRJIE VETZUREN		
n-boterzuur	vrijwel niet gekleurd	verzadigd
palmitinezuur	vrijwel niet gekleurd	verzadigd
stearinezuur	vrijwel niet gekleurd	verzadigd
oliezuur	vrijwel niet gekleurd	mono-onverzadigd
ricinolieuzeur	zeer licht grijsblauw, vrijwel niet gekleurd	mono-onverzadigd
STEROLEN		
cholesterol	ondoorschijnend wit	
ergosterol	vrijwel niet gekleurd	
STEROLESTER		
cholesterololeaat	vrijwel niet gekleurd	mono-onverzadigd
TRIGLYCERIDEN		
tributyrat	vrijwel niet gekleurd	verzadigd
tristearat	vrijwel niet gekleurd	verzadigd
trioleaat	vrijwel niet gekleurd	mono-onverzadigd

hem onwaarschijnlijk zijn dat de vaak hoog onverzadigde vetzuren daarvan de oorzaak zijn; één van de argumenten daarvoor is dat sommige eiwitten intensief blauw gekleurd kunnen worden.

Baker onderzocht een aantal eiwitten, waarvan een gedeelte positief reageerde. Waarschijnlijk zijn de positief reagerende eiwitten verontreinigd met poly-onverzadigde lipiden. In tabel 5 zijn de door Baker onderzochte eiwitten in een aantal groepen gerangschikt naar de intensiteit van de reactie met zure haemateïne.

Van de meest positief reagerende eiwitten maakt de herkomst een contaminatie met lipiden waarschijnlijk (caseinogeen, gelatine); ook in de minder positief reagerende groep van eiwitten lijkt een vermenging met lipiden niet onmogelijk, zoals bijvoorbeeld van de uit bloed ge-

isoleerde eiwitten. Van de negatief reagerende eiwitten zijn de enzymen wel zuiver te isoleren.

Voorts onderzocht Baker nog een aantal vluchtige verbindingen (etherische oliën) en stoffen die in water oplosbaar zijn en dus verdampt, respectievelijk in het fixatief opgelost zijn, voordat sprake is van oxydatie en polymerisatie, laat staan van complexvorming met zure haemateïne. Verschillende suikers waarvan door het bezit van een aantal OH-groepen een positieve reactie verwacht mag worden, lossen voortijdig op.

Tabel 5 *Door Baker onderzochte eiwitten op hun reactie met zure haemateïne.*

toetsobject	reactie
caseinogeen	donkerblauw, zeer weinig lichtblauw
legumine	zwart, blauwzwart
gelatine	zwart, donkerbruin
mucoproteïnen	donkerblauw, lichtbruin, zeer licht grijsblauw, vrijwel niet gekleurd
fibrinogeen	zeer licht grijsblauw
ei-wit (ei)	lichtbruin, zeer licht grijsblauw
bloedserum	blauwbruin, zeer licht grijsblauw
bloedplasma	licht blauwbruin, geelwit
albuminen (bloed)	blauwbruin, licht blauwbruin
nucleoproteïnen	blauwbruin, lichtbruin
haemoglobine	grijs
trypsine	zeer licht grijsblauw, vrijwel niet gekleurd
collageen	geheel negatief
pepsine	vrijwel niet gekleurd

De eindconclusie luidt, dat Baker door een ongelukkige materiaalkeuze ten onrechte de complexvorming van zure haemateïne met gechromeerde verbindingen specifiek noemt voor fosfolipiden. Waarschijnlijk is de controle door extractie met pyridine op positief reagerende eiwitten — door Heslinga (1957) nog het beste deel van Baker's werk genoemd — overbodig omdat niet onomstotelijk bewezen is dat eiwitten positief reageren. Daarbij komt dat pyridine als extractiemiddel voor lipiden zeer ongebruikelijk is in de moderne experimenteertechniek en dat niet bekend is welke lipiden of klassen van lipiden ermee extraheerbaar zijn, noch hoe volledig een dergelijke extractie verloopt.

1.2 FOSFOMOLYBDEENZUUR VOOR CHOLINEHOUDENDE FOSFOLIPIDEN

Cholinehoudende fosfolipiden vormen met fosfomolybdeenzuur onoplosbare complexen die zichtbaar gemaakt kunnen worden door omzetting tot molybdeenblauw. Dit principe wordt gebruikt voor detectie van cholinehoudende fosfolipiden op papierchromatogrammen (Levine en Chargaff 1951) en voor kolorimetrische bepalingen van choline (Wheeldon en Collins 1958).

Landing et al. (1952) baseerden op de hierboven genoemde reacties hun methode om cholinehoudende lipiden in weefselcoupes aan te tonen. Criteria voor de specificiteit waren hierbij in de eerste plaats het gebruik bij de papierchromatografie, voorts de positieve reactie in weefsels waarvan het bekend was dat ze fosfolipiden bevatten en tenslotte dat het kleurbare materiaal alleen verwijderd kon worden met relatief polaire oplosmiddelen. Dit laatste argument betekent dat het niet gaat om neutrale vetten en vetzuren. Dat ook cerebrosiden gekleurd worden, schijnt geen argument tegen de specifieke kleurbaarheid voor cholinehoudende fosfolipiden te zijn.

Uitvoering van de methode:

- coupes kort fixeren in formalinedamp gedurende 10—15 minuten;
- na de coupes zorgvuldig gedroogd te hebben in aceton/ether 1 : 1 (v : v) dopen;
- vervolgens overbrengen in 1 % fosfomolybdeenzuur in ethanol/chloroform 1 : 1 (v : v) en gedurende 15 minuten in deze oplossing houden;
- spoelen in ethanol/chloroform 1 : 1 (v : v), vervolgens in chloroform en de coupes drogen;
- in 1 % stannochloride in 3N HCl dopen en tenslotte
- spoelen in water.

Als resultaat zijn cholinehoudende fosfolipiden in verschillende nuances blauw gekleurd.

Het gebruik van organische oplosmiddelen, waarbij zelfs het polaire ethanol voor het fosfomolybdeenzurreagens, maakt geen vertrouwenwekkende indruk. De kleurbaarheid van cerebrosiden en interstitiële weefselementen wijst niet op een grote specificiteit. Weefselementen worden in paraffinecoupes zelfs nog sterker gekleurd. Pearse (1962) prefereert de methode dan ook voor verse vriescoupes.

Ter vergelijking volgt een methode met fosfomolybdeenzuur van Liisberg (1962) voor de kleuring van bindweefsel; een tegenkleuring

voor spierweefsel wordt uitgevoerd met chromotroop 2R welke echter, als niet ter zake doende, niet beschreven wordt.

Na een korte fixatie worden weefsels ingebed in paraffine en de paraffinecoupes worden vanuit water gebracht in

- een 1 % oplossing van fosfomolybdeen-zuur in water voor een tijdsduur van 1 of 2 minuten;
- de coupes worden gespoeld in water;
- gedurende $\frac{1}{2}$ minuut behandeld met een 1 % oplossing van stannochloride in 0,1 N HCl en
- wederom gespoeld in water.

Nu is het resultaat dat bindweefsel donkerblauw, kraakbeen lichtblauw gekleurd is.

De uitvoering van beide methoden vertoont een opvallende gelijkenis, zelfs in de korte fixatietijd; het beoogde doel is totaal verschillend.

Liisberg veronderstelt dat het principe waarop de kleuring berust het volgende is: het polyvalente fosfomolybdeen-zuur wordt gebonden door een substraat dat rijk is aan basische groepen, zowel van eiwitten als andere verbindingen. In de sterk zure oplossing van het fosfomolybdeen-zuur zullen de eiwitten positief geladen zijn en met de negatieve groepen in het fosfomolybdeen-zuur een reactie aangaan. Dit zou een soort ammoniummolybdaat zijn waarvan de ammoniumgroep tevens een deel van het weefsel-eiwit is. Waarschijnlijk wordt een korte fixatietijd voorgeschreven om deze ammoniumgroepen beschikbaar te houden. Ammoniummolybdaten zijn vrijwel onoplosbaar, zodat deze de rest van de behandeling overleven. Door inwerking van stannochloride wordt het aan het weefsel gebonden fosfomolybdeen-zuur gereduceerd tot molybdeenblauw. Deze verklaring zou ook zeer goed kunnen dienen voor de cholinegroep van lecithinen en sfigomyelinen, maar ook voor de NH_2 -groep in cerebrosiden en andere fosfolipiden.

Conclusie:

De methode van Landing et al. is niet specifiek voor cholinehoudende fosfolipiden; de methode van Liisberg, na voorafgaande extractie van lipiden, lijkt ons zeer goed bruikbaar voor het kleuren van bindweefsel.

1.3 HET GEBRUIK VAN NIJBLAUW BIJ HET KLEUREN VAN FOSFOLIPIDEN EN NEUTRALE LIPIDEN

De onder de naam Nijlblauw in de handel gebrachte kleurstof bestaat uit een aantal componenten. De twee voornaamste hiervan zijn het pheno-

xazinesulfaat of Nijlblauwsulfaat dat ook blauw is, en het rode phenoxazon of Nijlrood (Howard 1960). Het resultaat van de toepassing van Nijlblauw wordt in de literatuur in verband gebracht met het verschil in chemische eigenschappen van deze componenten; daarom laten wij van beide hier de structuurformule volgen:

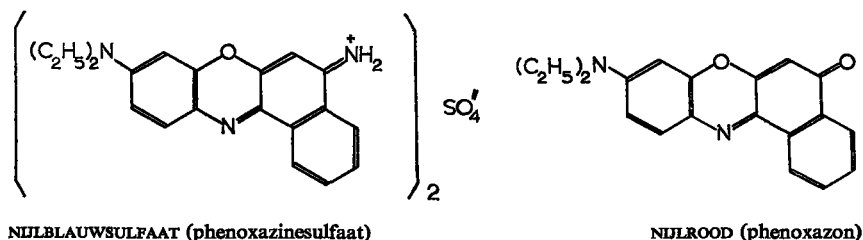


Fig. 1

Door het positieve karakter van de aminogroep van het phenoxazine-sulfaat verbindt dit zich met negatieve ionogene groepen uit verbindingen in weefselcoupes, terwijl het phenoxazon door het bezit van een ketogroep op de plaats van de aminogroep zich in dat opzicht neutraal gedraagt.

Het gebruik van Nijlblauw voor het kleuren van lipiden in weefselcoupes is voor het eerst door Lorrain Smith ingevoerd in 1907. Pas in 1947 werd het Nijlblauw opnieuw onder de aandacht gebracht door Cain nadat Lison in 1936 meende dat een blauwkleuring weinig of geen betekenis had, zelfs niet wees op de aanwezigheid van lipiden, en Knaysi in 1941 vond dat evengoed methyleenblauw, neutraalrood of malachietgroen gebruikt konden worden.

Hernieuwd onderzoek door Cain heeft uitgewezen dat van een gedeelte van de experimenten van Kaufmann en Lehmann (1926), waarop Lison mede zijn oordeel gebaseerd had, de waarde aan twijfel onderhevig is, omdat de onderzochte proefstoffen niet zuiver zouden zijn. Cain komt op grond van zijn onderzoekingen met lecithine, palmitinezuur en stearinezuur, cholesterol, cholesterolacetaat en cholesterolstearaat, glycerol en trioleaat en met mengsels van deze lipiden tot de conclusie, dat — wanneer men weet met lipiden te doen te hebben — het Nijlblauw gebruikt kan worden voor het onderscheid van neutrale en zure lipiden. Hij baseert dit op de volgende waarnemingen:

- triglyceriden worden rood gekleurd door diffusie van het oxazon;
- vetzuren worden blauw in verdunde oplossingen van Nijlblauw door zoutvorming met het Nijlblauwsulfaat, rood echter in geconcentreerde oplossingen van Nijlblauw, uitgezonderd oliezuur dat ook in geconcentreerd Nijlblauw een blauwe kleur aanneemt;

- lecithinen (wellicht alle fosfatiden) kleuren blauw, zowel in verdunde als geconcentreerde oplossingen van Nijlblauw, eveneens door zoutvorming met het Nijlblauwsulfaat;
- cholesterol wordt in het geheel niet gekleurd.

Naar aanleiding van deze bevindingen beveelt Cain de volgende procedure aan om zure van neutrale lipiden te kunnen onderscheiden:

1. Vriescoupes kleuren in een oplossing van Soedan Zwart.
2. Parallelcoupes kleuren in een 1 % oplossing van Nijlblauw in water bij 60° C gedurende 5 minuten;
 - snel wassen in water van 60° C;
 - differentiëren in 1 % azijnzuur van 60° C gedurende 30 seconden.
3. Parallelcoupes kleuren in een 1 % Nijlblauwoplossing zoals onder 2 beschreven is, herkleuren in een 0,02 % Nijlblauwoplossing in water bij 60° C gedurende 5 minuten;
 - eveneens wassen in water en differentiëren in azijnzuur.

De bedoeling van dit omslachtige proces is om in de eerste plaats met Soedan Zwart lipiden in coupes aan te tonen. Vervolgens worden in het geconcentreerde Nijlblauw van deze lipiden de fosfolipiden en het oliezuur blauw gekleurd, de neutrale lipiden en de overige vetzuren rood. In de coupes die eerst met geconcentreerd en daarna met verdund Nijlblauw gekleurd zijn, zijn alle vetzuren blauw gekleurd. Behalve een onderscheid tussen de roodgekleurde neutrale lipiden (uitgezonderd cholesterol) en de zure lipiden is ook een differentiatie verkregen van fosfolipiden plus oliezuur en de overige vetzuren.

Menschik beweerde in 1953 dat fosfolipiden de enige lipiden zijn die blauw worden door behandeling met het Nijlblauw, wanneer enkele door hem ingevoerde modificaties in acht genomen worden. Menschik's methode verloopt als volgt:

- vriescoupes worden gedurende 90 minuten gekleurd in een verzadigde oplossing van Nijlblauw in water (het Nijlblauw wordt van te voren gekookt met 1/10 deel 0,5 % H_2SO_4);
- de coupes worden in water gespoeld;
- 30 minuten met warme aceton behandeld;
- gedifferentieerd in 5 % azijnzuur gedurende 30 minuten;
- wederom gespoeld in water;
- nogmaals gedifferentieerd, nu in 0,5 % HCl gedurende 3 minuten en
- tenslotte weer in water gespoeld.

Menschik heeft waargenomen dat onder de door hem voorgestelde condities eiwitten eveneens blauw gekleurd worden, maar door hydrolyse met HCl weer ontkleurd worden, terwijl fosfolipiden blauw blijven. De opzet van gedifferentieerde extractie met aceton is om door verwijdering van de neutrale lipiden het ontstaan van mengkleuren van het Nijlblauwsulfaat en het Nijlrood, die de beoordeling van coupes moeilijk maken, te vermijden. Het is ook niet ondenkbaar dat, wanneer de neutrale lipiden niet geëxtraheerd worden, de door deze lipiden aangenomen rode kleur kleine concentraties van fosfolipiden maskeert. Waarom dan de kleurstof met zwavelzuur gekookt wordt is een raadsel, omdat daardoor een veel grotere hoeveelheid van de rode component gevormd wordt (Lorrain Smith 1907; Thorpe 1907).

Door Pearse (1962) wordt Menschik's methode met Nijlblauw nog het beste gebruik van deze kleurstof in de histochemie genoemd. Deze methode geeft geen onderscheid van zure en neutrale lipiden, maar volgens Menschik zelf zou de methode specifiek zijn voor fosfolipiden, althans even specifiek als de methode van Baker met zure haemateïne. Singh (1964) komt echter tot de conclusie dat Menschik's methode niet geschikt is om fosfolipiden in zenuwweefsel te kleuren: na het differentiëren verdween de kleur volledig uit de coupes. Baker's zure haemateïne, maar vooral Elftman's gedoseerde chromering gaven in zenuwweefsel wel positieve resultaten.

Recente ontwikkelingen van het gebruik van Nijlblauw in de histochemie van lipiden zullen, met enkele eigen waarnemingen met deze kleurstof, in hoofdstuk 2 behandeld worden.

1.4 DE LIEBERMANN-BURCHARDTREACTIE TER BEPALING VAN CHOLESTEROL

In de analytische chemie wordt gebruik gemaakt van de reactie van Liebermann-Burchardt voor de bepaling van cholesterol en cholesterol-esters; de reactie is specifiek voor 3β -hydroxy- Δ^5 -sterolen en hun derivaten. Het bij deze reactie toegepaste reagens bestaat uit een mengsel van azijnzuuranhydride en geconcentreerd zwavelzuur 20 : 1 (v : v).

Voor de toepassing van de methode in de histochemie wordt volstaan met enige druppels van een mengsel van azijnzuuranhydride en zwavelzuur in de verhouding van 1 : 1 (v : v) op coupes aan te brengen en het resultaat — cholesterol en cholesterol-esters worden groen — direct te bekijken. Ook worden wel de sterolen eerst geoxydeerd tot oxysterolen door coupes dagenlang aan het zonlicht bloot te stellen (Schultz 1924), door behandeling gedurende een week met een oplossing van ijzeraluin

of door een kortere oxydatie met ferrichloride. Pas daarna worden de coupes behandeld met azijnzuuranhydride en geconcentreerd zwavelzuur. De reactie op oxysterolen is eigenlijk een modificatie van de analytische methode van Lifschütz.

Een vrijwel onoverkomelijk bezwaar van deze methoden is, dat door de toepassing van geconcentreerd zwavelzuur een destructie van het weefsel optreedt. Hierdoor is localisatie van cholesterol een fictie.

Eenzelfde bezwaar is verbonden aan de door Ueda (1952) vermelde methode van Okamoto et al., waarbij gebruik gemaakt wordt van geconcentreerd zwavelzuur en jodiumtinctuur. Cholesterol wordt hierdoor groen of blauwgroen gekleurd. Waarschijnlijk berust ook deze methode uitsluitend op de reactie met zwavelzuur en is dus in wezen geen nieuwe bepaling.

Een door Grundland et al. (1949) ontwikkelde methode met bismuth-trichloride, die berust op de kolorimetrische methode van Clark en Thompson (1948) voor steroïden, is veel minder destructief. De specificiteit van de methode is echter niet vastgesteld en de resultaten schijnen onbetrouwbaar te zijn (Pearse 1962).

De localisatie van vrij cholesterol in weefselcoupes berust op de dubbele breking van het complex dat met digitonine gevormd kan worden. Onder de polarisatiemicroscoop is de localisatie van het digitonide te bepalen. De dubbele breking die ook door cholesterolesters veroorzaakt wordt, zou te elimineren zijn door de coupes met Soedan IV te kleuren: cholesterolesters nemen Soedan IV op en veroorzaken geen dubbele breking meer, het cholesterol/digitoninecomplex wordt niet gekleurd en blijft aansprakelijk voor een dubbele breking. Volgens Pearse (1962) blijken in de praktijk met deze methode geen bruikbare resultaten verkregen te worden, doordat in een met digitonine behandelde coupe alle lipiden met Soedan IV gekleurd worden en het vrije-cholesteroldigitonide daardoor niet te onderscheiden is.

Samenvattend kan gezegd worden dat de gangbare methoden voor de histochemische bepaling van cholesterol en cholesterolesters samen, noch de methode voor de bepaling van het vrije cholesterol afzonderlijk leiden tot een localisatie in weefselcoupes.

1.5 METHODEN MET SOEDANKLEURSTOFFEN VOOR VRIJE EN GEBONDEN LIPIDEN

Voor het kleuren van lipiden wordt gebruik gemaakt van de Soedankleurstoffen; deze behoren tot de groep van azokleurstoffen. De kleurende werking zou berusten op de oplosbaarheid van de kleurstoffen in

lipiden. De meest gebruikte vertegenwoordigers van de azokleurstoffen zijn Soedan III, Soedan IV, Oil red O en Soedan Zwart, waarvan het Soedan IV weer de meeste toepassing vindt.

Als oplosmiddelen voor deze kleurstoffen worden die organische oplosmiddelen gebruikt waarin de kleurstoffen minder goed oplossen dan in de te kleuren lipiden, echter nog in een dusdanige concentratie dat een redelijke kleuringsintensiteit verkregen kan worden. Als zodanig wordt vaak gebruik gemaakt van een mengsel van aceton en 70 % ethanol 1 : 1 (v : v), wat echter als bezwaar heeft dat lipiden erin oplossen. Bovendien kan tijdens het differentiëren in 70 % ethanol kleurstof uitkristalliseren op de coupes. In plaats van het gedurende korte tijd kleuren in een oplossing van Soedan IV in aceton/70 % ethanol wordt daarom wel de voorkeur gegeven aan een langere kleuringsperiode in een verdunde ethanolische oplossing. Soms wordt gebruik gemaakt van isopropanol als oplosmiddel (Lillie 1944). Chiffelle en Putt (1951) bevelen propyleen- en ethyleenglycol aan als oplosmiddel voor Soedan IV en Soedan Zwart B, omdat daarin geen lipiden zouden oplossen.

Tabel 6 *Reactie van gepolymeriseerde en niet-gepolymeriseerde lipidenfracties uit een aorta met Soedan IV.*

toetsobject	intensiteit van de reactie met Soedan IV	
	gepolymeriseerd	niet-gepolymeriseerd
fosfolipiden	++	±
vrije vetzuren	++	+
cholesterol	+	±
cholesterolesters	+++	+++
triglyceriden	++	+

De interpretatie van de resultaten die verkregen worden met de Soedankleurstoffen wordt beheerst door een aantal vooroordelen. Zo zouden alleen die lipiden gekleurd worden die zich in vloeibare toestand in het weefsel bevinden; cholesterol met een smeltpunt boven kamertemperatuur, de temperatuur waarbij de coupes gekleurd worden, zou dus niet kleurbaar zijn met Soedan. Het idee dat alleen vloeibare lipiden kleurbaar zijn met Soedan is gebaseerd op de gedachte dat de kleurstof bij een verdeling over lipiden en aceton/70 % ethanol gemakkelijker in de lipiden als oplosmiddel opgenomen wordt. Het is echter niet ondenk-

baar dat ook vaste stoffen door, zij het minder snel verlopende, diffusie de kleurstof opnemen. Als voorbeeld van vaste lipiden die kleurbaar zijn met Soedan IV kunnen gepolymeriseerde lipiden genoemd worden: van uit een aorta geïsoleerde en in fracties gescheiden lipiden werd 5 mikrol. op filtreerpapier gebracht en gepolymeriseerd met kaliumbichromaat volgens Baker (1946); de fracties werden gekleurd met een verzadigde oplossing van Soedan IV in aceton/70 % ethanol 1 : 1 (v : v) en vergeleken met identiek behandelde fracties welke evenwel niet gepolymeriseerd waren. De resultaten worden in tabel 6 vermeld.

Resultaten:

1. Met uitzondering van de cholesterolesters worden gepolymeriseerde, en dus vaste, lipiden sterker gekleurd door Soedan IV dan de niet-gepolymeriseerde.
2. Cholesterol vertoont in niet-gepolymeriseerde toestand een vrijwel negatieve reactie met het Soedan IV, terwijl het gepolymeriseerde cholesterol een duidelijk positieve reactie geeft.

De geringe kleurbaarheid van cholesterol in niet-gechromeerde weefselcoupes moet dan ook niet gezien worden als gevolg van het zich in vaste toestand bevinden in die weefsels, maar door oplossing tijdens het kleuringsproces. Dit is ook de verklaring van het onder 1 genoemde resultaat. Gezien deze resultaten werd bij het in hoofdstuk 5 beschreven onderzoek de voorkeur gegeven aan het polymeriseren van de lipiden met bichromaat alvorens de coupes met Soedan IV te kleuren.

Ook het feit dat vooral Soedan Zwart gebruikt wordt voor het kleuren van lipoproteïnefracties ter controle van het scheiden van lipoproteïnen in fracties door bijvoorbeeld elektroforese, is in tegenspraak met het uitsluitend kleurbaar zijn van vloeibare lipiden.

Kleuring van lipoproteïnen stemt evenmin overeen met de opvatting dat alleen de 'vrij' voorkomende lipiden door Soedan gekleurd zouden worden en niet de 'gebonden' lipiden. Met nadruk wordt er op gewezen dat de verdeling in 'vrije' en 'gebonden' lipiden niet gelijk gesteld moet worden met een onderscheid dat bij de analyse van lipiden wel gemaakt wordt naar een verschil in binding van lipiden in weefsels samengaan met een verschil in extraheerbaarheid met organische oplosmiddelen.

In de histochemische literatuur worden de gebonden lipiden aangeduid als 'masked lipids' en het teniet doen van de binding van lipiden met eiwitten of complexen van hogere orde wordt 'unmasking' genoemd. Verscheidene methoden worden aangegeven voor dit zogenaamde demaskeren:

toevoeging van bariumhydroxyde of ureum aan het fixatief (Serra 1958),
verhitting van de coupes of inwerking van proteolytische enzymen (Berenbaum 1958),
inwerking van ethanol, dioxaan, phenol, resorcinol, hydrochinon, pyrogallol en looizuur (Clayton 1958),
toepassing van cadmiumchloride en kwikchloride en tevens de invloed van formaline (Clayton 1959).

Het merendeel van deze methoden leidt tot dislocatie en/of oplossen van de lipiden. Een verhoogde kleurbaarheid van het weefselmateriaal, dat wil zeggen dat meer structuurelementen gekleurd worden, wordt meestal verkregen met Soedan Zwart, de minst specifieke van de Soedankleurstoffen. Door de Soedankleurstoffen, en het sterkst door Soedan Zwart (Kutt et al. 1959b), worden eiwitten in geringe mate gekleurd. Door Soedan Zwart te acetyleren zou de specificiteit voor lipiden toenemen (Casselmann 1954).

Door Kutt et al. (1959a) werden de kleurende eigenschappen voor lipiden van de Soedankleurstoffen onderzocht. Zij voerden een scheiding van de kleurstoffen in vier of vijf componenten uit met behulp van een papierchromatografische methode. De bruin- en geelachtige fracties bezaten de sterkste eiwitkleurende eigenschappen; de rode, rose en oranje fracties kleurden specifiek lipiden.

Uit de voorgaande beschouwing van enkele facetten van de toepassing van Soedankleurstoffen kan de conclusie getrokken worden, dat de methode gezien moet worden als middel om globaal de aanwezigheid van lipiden in weefselcoupes vast te stellen. Daarbij moet in het oog gehouden worden, dat niet het totaal aan lipiden gekleurd wordt, noch dat iets blijkt van de bindingstoestand van de lipiden in het weefsel.

HOOFDSTUK 2

ENIGE RECENTE ONTWIKKELINGEN OP HET GEBIED VAN DE HISTOCHEMIE VAN LIPIDEN

2.1 LUXOL FAST BLUE EN DE KLEURING VAN FOSFOLIPIDEN

De Luxol fast blue kleurstoffen hebben dezelfde basisstructuur als het Alcian blue dat gebruikt wordt voor het kleuren van zure mucopolysacchariden. Deze basis is het cuprophthalocyanine (CuPC); Luxol fast blue kleurstoffen zijn zouten van gesulfoneerd CuPC en aminen en kunnen voorgesteld worden door $(\text{CuPC})\text{SO}_3\text{H}\cdot\text{base}$. Er kunnen in dit type kleurstof 1 tot 4 sulfonylgroepen en een aantal verschillende basen voorkomen.

Door Klüver en Barrera (1953 en 1954) werd Luxol fast blue MBS in 1953 voor het eerst toegepast om de myelineschede van zenuwen in paraffinecoupes te kleuren. Hun argument voor het gebruik van deze kleurstof was de toepassing van een chemisch aan porphyrienen (deze komen in het centrale zenuwstelsel voor) verwante verbinding in de vorm van Luxol fast blue. Klüver en Barrera gaven geen chemische achtergrond voor hun kleuringsmethode. Deze methode is dan ook niet in hoofdstuk 1 opgenomen en zou ook hier onvermeld zijn gebleven, ware het niet dat Salthouse (1962a) het gebruik van Luxol fast blue in 1962 opnieuw onder de aandacht gebracht had. Alvorens de methode van Salthouse te vermelden, zal eerst besproken worden tot welke conclusies Pearse (1962) kwam ten aanzien van de chemische achtergronden van de kleuringsmethode van Klüver en Barrera.

Volgens Pearse leveren in gefixeerde weefsels, speciaal in paraffinecoupes, eerder de lipoproteïnen dan de lipiden een gekleurd product met het Luxol fast blue. Met het merendeel van de lipoproteïnen vindt de reactie niet plaats, meent hij, tenzij de kleurstof is opgelost in een organisch oplosmiddel. Het kleuringsprincipe zou in alcoholisch milieu berusten op een zuur/base reactie onder zoutvorming, waarbij het lipoproteïne als base de base van de kleurstof verdringt. Sfingomyelinen konden alleen gekleurd worden wanneer chloroform als oplosmiddel voor de kleurstof gebruikt werd, waarbij echter ook niet-lipide weefselcomponenten kleurden. De chemische basis voor de kleuring van

gangliosiden bleef een open vraag. Op grond van deze gegevens en veronderstellingen werd door Pearse de volgende methode naar Klüver en Barrera aanbevolen:

- gefixeerde vriescoupes of paraffinecoupes in absolute ethanol brengen,
- vervolgens kleuren in een 0,1 % oplossing in 96 % ethanol van Luxol fast blue MBS of Methasol fast blue 2G gedurende 6—18 uur bij 56—60° C,
- de coupes spoelen in 70 % ethanol, gevolgd door water en
- differentiëren in 0,05 % lithiumcarbonaat in water gedurende $\frac{1}{2}$ tot 2 uur,
- wederom spoelen in water, eventueel tegenkleuren, dehydrateren en via xyleen afdekken met een synthetische hars.

Gezien de wat dubieus blijvende chemische achtergrond en het veelvuldig gebruik van organische oplosmiddelen, is dit geen methode die in aanmerking lijkt te komen voor het kleuren van fosfolipiden.

Zoals gezegd bracht Salthouse (1962a) een methode met Luxol fast blue onder de aandacht en zelfs als een kwantitatieve histochemische methode voor de bepaling van fosfolipiden. Deze auteur onderzocht de complexvorming van Luxol fast blue G en ARN en van Luxol fast black L met fosfatidylcholine, fosfatidylethanolamine en fosfatidylserine. Op filtreerpapier gaven Luxol fast blue G en ARN, opgelost in absolute ethanol, stoichiometrische complexen met fosfatidylcholine en fosfatidylserine. Dit gegeven zou voldoende reden zijn de reactie ook in weefselcoupes als een kwantitatieve methode aan te bevelen. Blijkbaar doen de fosfolipiden die door voorafgaande spoelingen in absolute ethanol en tijdens het kleuren gedurende 1 uur, eveneens in een oplossing van absolute ethanol, in oplossing zouden kunnen zijn gegaan aan het kwantitatieve aspect geen afbreuk.

Nog in 1962 publiceerde Salthouse (1962b) een verbeterde methode voor myeline en fosfolipiden met Luxol fast blue ARN, die vrijwel niet afweek van de door Pearse aanbevolen methode. Het Luxol fast blue MBS was echter vervangen door Luxol fast blue ARN, omdat dit laatste fosfolipiden en myeline intensiever kleurde dan het door Pearse aangeraden Luxol fast blue MBS. Na kleuring met Luxol fast blue ARN volgens Salthouse vertoonden fosfolipidenbevattende weefselementen hetzelfde beeld als na behandeling met Baker's zure haemateïne; dit is echter nog geen waarborg voor een specifieke methode.

In 1964 raadde Salthouse (1964a) aan het Luxol fast blue ARN als kleurstof voor myeline te vervangen door Luxol fast blue G, waardoor myeline nog intensiever gekleurd zou worden, namelijk blauwzwart

tegenover een diep blauwrode kleur van het ARN. Als oplosmiddel voor de kleurstof zou isopropanol moeten dienen (1964b), omdat alleen in isopropanol de complexen met zowel fosfatidylcholine, -serine, -inositol, -ethanolamine als sfigomyeline alle onoplosbaar waren. In weefsels werd echter door een oplossing van de kleurstof in isopropanol ook tryptofaan gekleurd. In een oplossing van Luxol fast blue G in methanol werden elastine en collageen selectief gekleurd, terwijl fosfolipiden en tryptofaan niet gekleurd werden. Salthouse kwam dan ook tenslotte zelf tot de conclusie dat de Luxol fast blue kleurstoffen niet specifiek zijn voor fosfolipiden, een feit dat uit onze ervaringen met weefselcoupes van aorta's onderschreven moet worden.

2.2 HERNIEUWD ONDERZOEK NAAR DE TOEPASSINGSMOGELIJKHEID VAN NIJLBLAUW

Na Cain (1947) en Menschik (1953) introduceerde Dunnigan in 1964 een methode voor het gebruik van Nijlblauw in de lipidenhistochemie, die een vereenvoudiging is van Cain's techniek en een complicatie geeft bij de interpretatie van de kleuringsresultaten ten opzichte van Menschik's methode.

Ter bepaling van de topografie van fosfolipiden in atherosklerotische plaques paste Dunnigan het Nijlblauw op de volgende wijze toe: Kleuring van de coupes in een 1 % oplossing van, met zwavelzuur gekookt, Nijlblauw in water gedurende 15 minuten bij 60° C; differentiatie in 1 % azijnzuur gedurende een ½ minuut bij kamertemperatuur.

Dunnigan is van mening dat alleen Soedanofiele, volgens deze auteur niet aan eiwitten gebonden, fosfolipiden blauw gekleurd worden en dat alle vetzuren onder de door hem gebruikte condities als hydrofobe lipiden reageren en dus rood gekleurd worden.

Omdat hiermee weer de rode kleuring ingevoerd is die wellicht een maskering van een door fosfolipiden aangenomen blauwe kleur geeft, werd bij ons eigen onderzoek nagegaan, welke kleurende capaciteiten het echte Nijlblauw heeft. Hiertoe werd over een silicagelkolom het commerciële Nijlblauw gescheiden in het echte Nijlblauw, het phenoxazine, en Nijlrood, het phenoxazon, en een aantal kwantitatief minder belangrijke componenten. De scheiding in fracties werd tot stand gebracht door op een silicagelkolom het commerciële Nijlblauw opgelost in chloroform te brengen. De rode component werd met chloroform geëluëerd, de blauwe met methanol. De gewichtsverhouding van blauwe en rode component was bij het voor dit experiment gebruikte Nijlblauw ongeveer 4 : 1. Om vergelijkbare kleuringsresultaten te verkrijgen werd

voor de kleuring van weefselcoupes gebruik gemaakt van een oplossing van 0,8 % van het echte Nijlblauw en van 1 % van het commerciële Nijlblauw.

Coupes van atherosklerotische laesies: een fatty streak, een plaque en een atheroom (zie voor een beschrijving van deze laesies hoofdstuk 4), werden met het echte Nijlblauw gekleurd, terwijl parallelcoupes van deze zelfde laesies met het commerciële Nijlblauw behandeld werden, alle volgens de methode van Dunnigan. Als resultaat werden door het echte Nijlblauw veel meer weefselementen blauw gekleurd dan door het commerciële Nijlblauw. Dit kwam vooral duidelijk tot uiting bij de coupes van fatty streak en atheroom, welke laesies door de blauwe component alléén geheel blauw gekleurd werden. Deze resultaten maken het wel zeer waarschijnlijk dat een gedeeltelijke maskering van de blauwe kleur plaats vindt door de rode component. Er is ook een uitgebreide schakering van mengkleuren van blauw en rood waardoor de beoordeling van de coupes moeilijk is.

Het effect van het echte Nijlblauw en van het mengsel van Nijlblauw en Nijlrood op de media was gelijk. In beide gevallen werden de elastische lamellen gekleurd, terwijl in de interlamellaire ruimten gekleurde celkernen werden gevonden. Dit beeld was ook geheel gelijk aan het resultaat dat met cis-aconietzuuranhydride op de media verkregen wordt (het gebruik van het voor cholinehoudende fosfolipiden specifieke cis-aconietzuuranhydride wordt in de hoofdstukken 3 en 5 behandeld).

De resultaten van de kleuring van laesies en media door het echte Nijlblauw leiden tot een conclusie die tegengesteld is aan de mening van Dunnigan: de toepassing van zijn methode zou eventueel wel specifiek kunnen zijn voor 'gebonden' fosfolipiden, maar zeker niet voor de in de laesies voorkomende 'vrije', Soedanofiele fosfolipiden. Een dergelijke onderscheiding heeft op zichzelf echter weinig zin zolang het in weefselcoupes bepalen van de bindingstoestand van lipiden een omstreden kwestie is (hoofdstuk 1, par. 1.5).

De nodige reserve bij het vaststellen van de specificiteit van het Nijlblauw is tevens geboden door het eenzijdig gebruik van aortamateriaal. Lorrain Smith (1907) wees er al op dat levercoupes waarbij in de cellen lipidenglobulae voorkwamen, gewoonlijk rood gekleurd werden met Nijlblauw. Vaak echter kwam blauwkleuring voor wanneer de coupes enkele uren bij 37° C geïncubeerd werden in de kleurstofoplossing. Waar veel gal aanwezig was, werd het weefsel diepblauw. De, ook in aorta's voorkomende, mucopolysacchariden zijn eveneens niet uitgesloten van blauwkleuring.

Samenvattend moet gezegd worden dat het gebruik van Nijlblauw in

de lipidenhistochemie niet aanbevolen kan worden. Menschik's methode blijft de beste toepassing door de gedifferentieerde ontkleuring van de eiwitten.

2.3 AANTONEN VAN FOSFOLIPIDEN EN NEUTRALE LIPIDEN MET OTAN

In 1959 publiceerde Adams een methode die gebaseerd is op een fysisch-chemisch verschil tussen de diverse klassen van lipiden waardoor fosfolipiden (hydrofiële lipiden) gelijktijdig aangetoond kunnen worden met neutrale lipiden (hydrofobe lipiden) en wel door middel van osmiumtetroxyde en α -naphthylamine (OTAN).

Bij deze methode worden:

- in formaline gefixeerde vriescoupes 18 uur geïncubeerd in een oplossing van 1 % OsO_4 en 1 % KClO_3 in de verhouding 1 : 3(v : v),
- goed gespoeld in water,
- 20 minuten lang behandeld met een verzadigde oplossing van α -naphthylamine bij 37 °C.

Als resultaat zijn fosfolipiden rood, neutrale lipiden zwart gekleurd.

Het principe van deze kleuring zou zijn de oxyderende werking van het osmiumtetroxyde op de dubbele banden van de onverzadigde vetzuren van de lipiden, waarbij het OsO_4 zelf tot het zwarte, onoplosbare osmiumdioxiede gereduceerd wordt. In de vorm van kaliumchloraat wordt de hydrofiële lipiden een krachtiger, concurrerend oxydatiemiddel aangeboden, dat in de hydrofobe lipiden niet kan penetreren. Daardoor kan het zwarte OsO_2 niet gevormd worden, maar wel het rode osmium- α -naphthylaminecomplex.

Tegen deze methode zijn enkele bezwaren aan te voeren. Een praktisch bezwaar is dat blijkt dat fosfolipiden roodbruin, neutrale lipiden bruin-zwart gekleurd worden. Bij mengsels van fosfolipiden en neutrale lipiden is uit de verschillende nuances van bruin moeilijk de juiste localisatie van fosfolipiden vast te stellen. Voorts wordt de tegenstelling van hydrofiële tot hydrofobe lipiden wel zeer scherp gesteld. Op grensvlakken i.c. de celmembranen vertonen de fosfolipiden door ordening enerzijds een hydrofiel en anderzijds een hydrofoob karakter en aangezien de hydrofoob reagerende vetzuren door Adams als de reactieve centra gezien worden, zouden fosfolipiden in dat geval moeten reageren als hydrofobe lipiden. Verder is het niet onmogelijk dat kleine concentraties van fosfolipiden die afgeschermd worden door een overmaat aan neutrale lipiden, onbereikbaar zijn voor het hydrofiële KClO_3 . Dunnigan (1964) denkt dit laatste bezwaar te kunnen ondervangen door aan de OTAN-kleuring een extractie van de coupes met aceton te doen voorafgaan.

In een latere publicatie vermeldde Adams (1963) een modificatie van de OTAN-methode, waardoor het mogelijk wordt sfigomyelinen specifiek te kleuren. Door namelijk de glycerofosfolipiden te verzeppen met 2N NaOH in water gedurende 1 uur bij 37° C blijven alleen de sfigomyelinen achter die vervolgens met OTAN gekleurd kunnen worden. Adams zag hierbij in eerste instantie over het hoofd dat bij alkalische hydrolyse ook de plasmalogenen als lyso-verbindingen intact blijven. Speciaal in jonge, niet-atherosklerotische aorta's is het totaal aan plasmalogenen niet te verwaarlozen ten opzichte van het gehalte aan sfigomyelinen; het totaal plasmalogenengehalte is 4—7 % van het totaal aan fosfolipiden, het sfigomyelinengehalte is 20—24 % van de fosfolipiden (Böttcher 1963). Later heeft Adams (1964b) een rectificatie in deze zin aangebracht.

Afgezien van de chemische specificiteit is bij ons eigen onderzoek (hoofdstuk 5) als verdenking tegen de verzepingsmethode gerezen, dat gedeeltelijk ook het weefsel aangetast wordt, waardoor niet-verzepte lipiden door mechanische oorzaak uit het weefsel verdwijnen. Het zeer wisselend resultaat met betrekking tot de aanwezigheid van sfigomyelinen in de elastische lamellen van de media van aorta's valt hier wellicht uit te verklaren. Een aanwijzing voor beschadiging van de elastica door behandeling met loog wordt verkregen door de observatie van Ayer (1964) dat koken met verdunde loog resulteerde in een aanzienlijke destructie van het elastische weefsel.

Geconcludeerd kan worden dat Adams een methode tot de histochemische bepaling van fosfolipiden heeft bijgedragen die weliswaar niet feilloos, maar specifiekere dan de voorheen bekende kleuringen is. Hierbij maakte hij gebruik van zowel de aanwezigheid van dubbele bindingen in de verbinding (vergelijk de zure haemateïnemethode) als de tegenstelling in polair karakter van fosfolipiden en neutrale lipiden (vergelijk de reactie met Nijlblauw). De methode voor sfigomyelinen kent dezelfde bezwaren als de oorspronkelijke OTAN-methode en de genoemde bezwaren bij de verzeeping.

De resultaten die Adams met beide methoden verkreeg door toepassing op coupes van normale en atherosklerotische aorta's worden in hoofdstuk 5, par. 3 behandeld.

2.4 TOEPASSING VAN MOLYBDEENBEVATTENDE REAGENTIA VOOR COMPLEXVORMING MET FOSFOLIPIDEN

Molybdaat kan complexen met fosfaat vormen, welke bij reductie blauw gekleurd worden, en vindt daarom op verschillende manieren een toe-

passing bij de analyse van fosforverbindingen. Bij de kolorimetrische fosforbepaling worden zwavelzuur of perchloorzuur en ammoniummolybdaat toegepast, terwijl reductie van het gevormde complex plaats vindt met bijvoorbeeld een oplossing van ascorbinezuur of met sulfiet onder invloed van een katalysator. Voor detectie van fosfolipidenvlekken op papierchromatogrammen of dunnelaagplaatjes van silicagel zijn in gebruik het reagens van Zinzadse (1930), bestaande uit ammoniummolybdaat en zwavelzuur, en het reagens van Hanes en Isherwood (1949), dit laatste tevens in een modificatie van Dawson (1960), reagentia die in verschillende verhoudingen ammoniummolybdaat, perchloorzuur en zoutzuur bevatten. Bij toepassing van de beide laatste reagentia vindt reductie van het complex plaats onder invloed van ultraviolet licht.

Ook in de histochemie kent men een fosfaatbepaling met molybdaat (Cheng 1956). Hierbij wordt gebruik gemaakt van ammoniummolybdaat opgelost in verdund zwavelzuur; reductie tot het blauwe complex wordt tot stand gebracht met ascorbinezuur. Door de oplosbaarheid van het fosfomolybdaatcomplex in water is dit geen ideale histochemische methode.

Met de bovengenoemde reagentia hebben wij enkele experimenten uitgevoerd. Het reagens van Zinzadse werd gebruikt als incubatiemiddel voor coupes gedurende enkele dagen bij kamertemperatuur. Een zwak positieve reactie werd zichtbaar in de coupes, die evenwel voor een microscopische beschouwing onvoldoende was. Het reagens wijkt af van dat van de reeds bekende histochemische bepaling van fosfaat door een hogere concentratie aan molybdaat in een meer geconcentreerd zwavelzuur. Daar dit resultaat ontoereikend was, werd overgegaan op het veel sneller werkende reagens van Hanes en Isherwood in de modificatie van Dawson. Dit reagens werd door verstuiwing op de coupes aangebracht, een werkwijze die ook bij de chromatografische identificatie van fosfor in lipiden in gebruik is. Na met het reagens behandeld te zijn, werden de coupes gedroogd en gedurende 10 minuten met ultraviolet licht behandeld. Door deze bewerking verkregen wij in de weefselcoupes het blauwe complex. Als voorbeeld van het voorkomen van het fosfomolybdaatcomplex kan de grenslaag van plaques met het lumen van de aorta genoemd worden; met *cis*-aconietzuuranhydride konden wij in deze grenslaag eveneens een positieve reactie tot stand brengen (hoofdstuk 5). Een complicatie bij het gebruik van het reagens van Dawson was echter dat door het daarin voorkomende perchloorzuur cholesterol rood gekleurd werd. In de coupes van aorta's ontstonden daardoor mengkleuren met het blauw van het gereduceerde fosfomolybdaatcomplex die een localisatie van de fosfolipiden in de weg stonden. Om

deze reden werden coupes gekleurd met een overeenkomstig reagens waarin het perchloorzuur vervangen was door het niet-oxyderende zoutzuur (de werking van perchloorzuur op sterolen wordt in ditzelfde hoofdstuk 2, par. 2.5 behandeld) en met een dergelijk reagens dat in het geheel geen zuur bevatte. Door toepassing van dit laatste reagens ontstond geen positieve reactie; het reagens met zoutzuur alleen veroorzaakte een veel zwakkere kleurontwikkeling dan het oorspronkelijke reagens van Dawson.

Toepassing van de analytische methoden met ammoniummolybdaat in de histochemie bieden in zoverre weinig perspectieven dat de intensiteit van de gevormde kleur mede zal afhangen van de hydrolytische vrijmaking van het fosfaat. De conclusie moet althans getrokken worden, dat de toepassing van analytische molybdaatmethoden voor de fosfaatbepaling tot op heden onvoldoende mogelijkheden boden om de localisatie van fosfolipiden in weefselcoupes te bepalen.

2.5 DE PAN-KLEURING VOOR CHOLESTEROL

In 1961 verscheen van Adams (1961) een publicatie waarin hij aangaf hoe, gebruik makend van perchloorzuur en naphthochinon (PAN), een veel betere localisatie van cholesterol te verkrijgen is dan met enig andere van de oude histochemische methoden (1.4); bovendien is de PAN-methode veel gevoeliger dan de oude methoden. Om de specificiteit van de methode na te gaan, paste Adams de PAN-kleuring toe op een groot aantal vertegenwoordigers uit de groep van lipiden (fosfolipiden, vrije vetzuren, vrije en veresterde sterolen en triglyceriden), op aminozuren, purinen en pyrimidinen, koolhydraten en diverse andere organische verbindingen. Hieruit kon geconcludeerd worden dat de methode met perchloorzuur en naphthochinon precies diezelfde specificiteit had als de reactie van Liebermann-Burchardt en dus alleen reageerde op 3β -hydroxy- Δ^5 -sterolen en hun derivaten.

Het reactiemechanisme is niet bekend, maar werd door Adams uitgelegd als de vorming van 3-steroliumzouten van perchloorzuur met de 3β -hydroxy- Δ^5 -sterolen. Het feit dat deze zouten onoplosbaar zijn in het reactiemilieu is waarschijnlijk een verklaring voor de sterk verbeterde localisatie van cholesterol ten opzichte van de oudere methoden. Onder invloed van de overmaat perchloorzuur wordt het steroliumzout onder onttrekking van 1 molecuul water omgezet in een 3,5-diëen-sterol. Mogelijk is additie van zuur aan het gevormde diëen de verklaring voor de waargenomen intermediair optredende rode kleur. Een blauwe kleur ontstaat tenslotte door additie van naphthochinon aan het diëen.

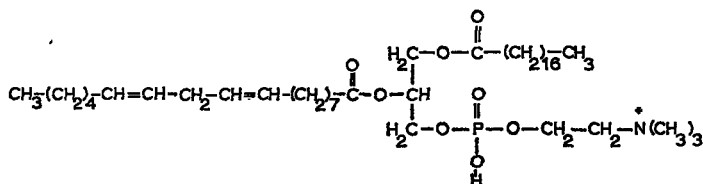
De PAN-kleuring voor cholesterol in weefselcoupes verloopt als volgt:

- een reagens met een samenstelling van 0,1 % 1,2-naphthochinon-4-sulfonzuur in een mengsel van ethanol, 60 % perchloorzuur, 40 % formaldehyde en water in de verhouding van 2 : 1 : 0,1 : 9(v : v) wordt in een dunne laag op de coupes aangebracht;
- de coupes worden 5-10 minuten verhit bij 60-65 °C totdat de aanvankelijk rode kleur overgaat in blauw,
- de coupes met perchloorzuur afdekken en binnen enige uren bekijken.

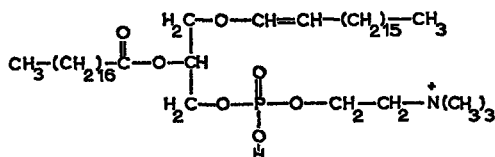
Wij vonden dat het vormen van een dun laagje van het reagens het eenvoudigst en zonder beschadiging van de coupes kan geschieden door het reagens met een verstuiver aan te brengen. Door de coupes vervolgens bij 70° C in plaats van bij 60—65° C te behandelen, vindt een betere kleurontwikkeling plaats.

Adams paste de PAN-kleuring onder meer toe op atherosklerotische aorta's en stelde daarbij vast dat de elastische lamellen van de media in het geheel niet en interlamellaire ruimten slechts vaag gekleurd werden. Macrofagen in de intima en de lipidenmassa van plaques werden intensief blauw gekleurd. Dit stemt geheel overeen met onze resultaten die verkregen werden door de PAN-methode op aorta's toe te passen.

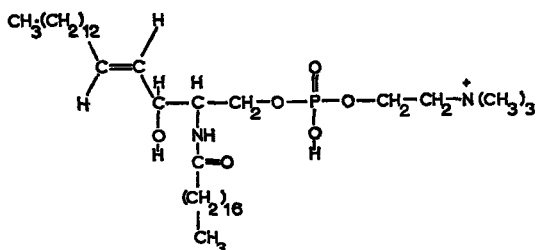
De methode van Adams voor de histochemische kleuring van cholesterol met per chloorzuur en naphthochinon is van grote betekenis voor de ontwikkeling van de histochemie van lipiden.



a. lecithine: 1-stearoyl-2-lineoyl-3-glycerofosforylcholine



b. plasmalogen van lecithine: 1-stearal-2-stearoyl-3-glycerofosforylcholine



c. sfingomyeline: N-stearoyl-sfingomyeline

Fig. 2 CHOLINEHOUDENDE FOSFOLIPIDEN

De drie meest voorkomende typen van cholinehoudende fosfolipiden zijn de lecithinen, de sfingomyelinen en de van lecithinen afgeleide plasmalogenen.

In de natuur worden uitsluitend de zogenaamde α -lecithinen gevonden; hierbij komt de fosforylcholinegroep op de 3-plaats (α -plaats) voor. Het vetzuur op de 1-plaats (ook wel γ - of α' -plaats) is in natuurlijke lecithinen hoofdzakelijk verzadigd, terwijl het op de 2-plaats veresterde vetzuur voornamelijk een onverzadigd karakter heeft.

In de natuurlijk voorkomende plasmalogenen is het vetzuuraldehyde overwegend gebonden door middel van een zogenaamde 'vinylether'-binding; daarbij komt het vetzuuraldehyde vrijwel uitsluitend op de 1-plaats gebonden voor en is het in de alkylketen verder verzadigd. Het vetzuur dat in de plasmalogenen op de 2-plaats veresterd is, heeft in natuurlijke producten een poly-onverzadigd karakter.

Sfingomyelinen bezitten, voor zover bekend is, uitsluitend N-acyl gebonden vetzuren.

Minder algemeen voorkomend, echter wel in aorta's, zijn de lyso-lecithinen. Voor de structuur van deze verbindingen kunnen we verwijzen naar fig. 2a, waarbij in aanmerking genomen moet worden dat op de 2-plaats geen vetzuur veresterd is.

HOOFDSTUK 3

METHODE VOOR DE IDENTIFICATIE VAN CHOLINEHOUDENDE FOSFOLIPIDEN MET CIS-ACONIETZUURANHYDRIDE (CAZA)

3.1 BESCHOUWING VAN DE KOLORIMETRISCHE BEPALING

Onze methode voor de histochemische identificatie van cholinehoudende fosfolipiden (Böttcher en Boelsma-van Houte 1964) werd ontwikkeld uit de kolorimetrische microbepaling van vrij en gebonden choline, beschreven door Böttcher, Pries en van Gent (1961b), welke weer gebaseerd is op de kolorimetrische bepaling van kwaternaire ammoniumbasen volgens Sass et al. (1958).

Cis-aconietzuuranhydride vormt complexen met zowel kwaternair als tertiair gebonden stikstof, naar Sass et al. op de volgende wijze:

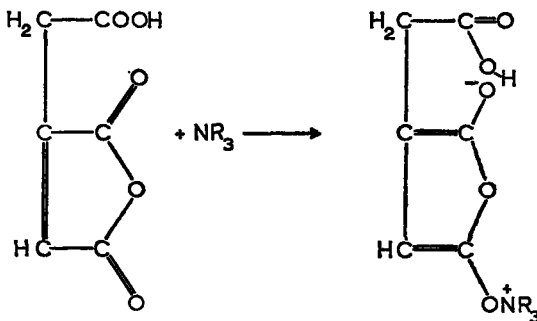


Fig. 3

Bij de methode van Sass et al. worden tertiaire aminen of kwaternaire ammoniumbasen gedurende 15 seconden op 100°C verhit met een reagens van cis-aconietzuuranhydride waardoor een roodpaars complex gevormd wordt. Böttcher et al. zochten naar een bepalingsmethode voor kwaternair gebonden stikstof in nog intacte fosfolipiden. Hierdoor zouden hun kwantitatieve analyses van fosfolipidenfracties uit de aortawand aanzienlijk gemakkelijker verlopen. Zij slaagden erin de

methode van Sass et al. te ontwikkelen tot een kolorimetrische bepalingmethode die aan hun eisen voldeed. De methode wordt als volgt uitgevoerd:

Een monster, dat 0,3—5 μg kwaternaire stikstof bevat, wordt opgelost in 2 ml toluen/azijnzuuranhydride 1 : 1 (v : v). Van het reagens van cis-aconietzuuranhydride (250 mg cis-aconietzuuranhydride in 40 ml azijnzuuranhydride en 60 ml toluen) wordt 1 ml toegevoegd en het mengsel wordt bij 120° C gedurende 12 minuten verhit. Na afkoeling en verdunning kan de extinctie van de oplossing gemeten worden. Een voordeel van deze werkwijze is, dat het bij 120° C gevormde groene complex een grotere waarde voor de extinctiecoëfficiënt (ϵ 530) heeft dan het bij 100° C gevormde roodpaarse complex (ϵ 515), zodat de gevoeligheid van de methode door langere tijd en bij 120° C te werken met 30 % vergroot wordt.

Zoals Sass et al. zelf opmerken is de kleuringsmethode met cis-aconietzuuranhydride gekenmerkt door het optreden van storende factoren. Behalve minerale zuren, alcoholen en water moeten hier tevens toe gerekend worden de Lewisbasen, zoals natriumacetaat en natriumfosfaat, die voorkomen als verontreinigingen van oplosmiddelen of als contaminaties van glaswerk. Dit laatste kan vermeden worden door het gebruik van Pyrexglas of kwartsglas.

Bij de aanpassing van de methode voor histochemisch gebruik treedt naast de reeds genoemde mogelijke storingen nog een aantal andere moeilijkheden op. Het altijd in weefsels aanwezige water — tot 80 % van het gewicht — waardoor cis-aconietzuuranhydride in het niet tot complexvorming in staat zijnde cis-aconietzuur omgezet wordt, dient zorgvuldig verwijderd te worden. Dit kan geschieden met een in concentratie toenemende ethanolreeks, eindigend met absolute ethanol. Ethanol zelf echter kan met cis-aconietzuuranhydride de eveneens onwerkzame ethylester van cis-aconietzuur vormen. Op zijn beurt zal het ethanol dus geëlimineerd moeten worden. In weefsels aanwezige bufferzouten, de Lewisbasen, vormen een roodpaars complex met het reagens van cis-aconietzuuranhydride. Dit veroorzaakt een specifieke achtergrondkleur welke in coupes de beoordeling van het specifieke cholinecomplex belemmert. Voorts is van belang dat niet alleen kwaternair, maar ook tertiair gebonden stikstof een kleurreactie geeft met cis-aconietzuuranhydride. Tertiair gebonden stikstof komt in weefsels onder andere voor in nucleïnezuren en histidine. Nucleïnezuren komen in de celkernen voor, histidine is een component van collageen en elastine. Een gelukkige omstandigheid is, dat de tertiaire aromatische aminen een aanzienlijk geringere kleuropbrengst geven, wat blijkt uit de door Sass

et al. opgegeven gevoeligheden: 70 $\mu\text{g/ml}$ voor pyridine, 600 $\mu\text{g/ml}$ voor chinoline, 300 $\mu\text{g/ml}$ voor dimethylaniline en geen kleurontwikkeling met triphenylamine, tegenover 3 $\mu\text{g/ml}$ voor kwaternaire aminen en ammoniumbasen. In een concentratiegebied waarin de kleuring voor kwaternair gebonden stikstof van een intensiteit is die een microscopisch goed beeld geeft, valt van een kleuring door tertiair gebonden stikstof weinig concurrentie te duchten. Het is echter raadzaam controle uit te oefenen met coupes waaruit de lipiden geëxtraheerd zijn.

Het kwaternair gebonden stikstof komt veel beperkter voor dan het tertiaire, hoofdzakelijk in het choline van lecithinen, lyso-lecithinen, plasmalogenen en svingomyelinen. Hieraan dankt de methode zijn specificiteit, ook voor weefselcoupes. Een moeilijkheid van weer andere aard is, dat bij kolorimetrische bepalingen de te analyseren verbindingen, hetzij tertiaire aminen of kwaternaire ammoniumbasen, hetzij cholinehoudende fosfolipiden, in oplossing gebracht worden. In weefselcoupes daarentegen moeten de te localiseren verbindingen geïmmobiliseerd worden. Verondersteld werd dat hiervoor gebruik gemaakt kon worden van de in hoofdstuk 1, par. 1.1 besproken chromeringstechniek. Door kaliumbichromaat toe te passen voor de polymerisatie van de lipiden werd echter weer een factor geïntroduceerd die een normale complexvorming met cis-aconietzuuranhydride in de weg stond.

Hoe uiteindelijk toch een voor cholinehoudende fosfolipiden specifieke histochemische methode tot stand kwam, wordt aan de hand van de daarbij betrokken experimenten beschreven in 3.2.

3.2 ONTWIKKELING VAN DE HISTOCHEMISCHE METHODE

Het is zonder meer duidelijk dat de temperatuur van 120° C van de oorspronkelijke bepalingsmethode niet gehandhaafd kon worden voor weefselcoupes. Geëxperimenteerd werd met temperaturen liggend tussen kamertemperatuur en 60° C. In weefselcoupes wordt daardoor niet het groene, maar het paarse complex met cis-aconietzuuranhydride gevormd.

Bekende storende factoren van de kolorimetrische bepaling zijn de aanwezigheid van water en van Lewisbasen. Om de vorming van gekleurde complexen door de Lewisbasen welke een achtergrondkleur in de coupes doen ontstaan te vermijden, werden in plaats van de normale objectglazen van zacht glas harde kwartsglazen gebruikt. Tevens werden speciaal voor dit onderzoek gemaakte kleurecuvetten van kwartsglas toegepast. Door zeer zuivere oplosmiddelen te gebruiken voor de bereiding der reagentia werden externe oorzaken voor de aanwezigheid van Lewisbasen en water uitgesloten.

Water werd uit de coupes verwijderd door zorgvuldige dehydratatie met successievelijk ethanol 30, 50, 60, 70, 80 en 96 %, ieder gedurende 1 minuut, en tenslotte met twee maal absolute ethanol ook gedurende 1 minuut. Om estervorming van ethanol met het cis-aconietzuuranhydride te voorkomen werd ethanol vervangen door toluen waarin de coupes gedurende 1 minuut gespoeld werden; vervolgens werden door 1 minuut te spoelen in toluen/azijnzuuranhydride 1 : 1 (v : v) eventuele laatste resten ethanol verwijderd. Bovendien werden de coupes hierdoor reeds in het mengsel van oplosmiddelen gebracht waarin vervolgens ook de eigenlijke kleuringreactie plaats vond.

De coupes kunnen voor de localisatie van fosfolipiden evenwel niet direct door een ethanolreeks gevoerd en in het reactiemilieu van toluen en azijnzuuranhydride gebracht worden. Hieraan moet een fixatie van de lipiden voorafgaan om oplossen te voorkomen. In hoofdstuk 1, par. 1.1 is besproken dat dit mogelijk is door polymerisatie met een oplossing van kaliumbichromaat. Aanvankelijk werd deze methode beproefd, waarbij echter bleek dat na de op de polymerisatie volgende dehydratatie van de coupes en behandeling met het kleurreagens niet de gewenste complexvorming optrad. Coupes van een atherosclerotische laesie (een plaque) werden na polymeriseren met bichromaat gedurende 5 minuten, een half uur en één uur met het reagens van cis-aconietzuuranhydride (CAZA) bij kamertemperatuur behandeld.

Resultaat:

Na een half tot één uur in CAZA zijn enkele details van de media (celkernen, enkele elastische vezels) paars; de plaque is in alle gevallen geheel negatief (zie voor morfologische details hoofdstuk 4).

Als oorzaak hiervan kan aangegeven worden dat het kaliumbichromaat zelf onoplosbare oxydatie- en polymerisatieproducten vormt. Doordat deze producten niet meer uit de coupes gespoeld kunnen worden, gaan ze — en mogelijk gemakkelijker dan het choline — zelf complexen vormen met het cis-aconietzuuranhydride of verhinderen in belangrijke mate de complexvorming met choline. Er diende dus naar een ander polymerisatiemiddel gezocht te worden. Hierbij moet voor ogen gehouden worden dat de werking van het kaliumbichromaat tweevoudig is. Enerzijds vindt een additie van chromi-ionen aan de dubbele banden van de onverzadigde vetzuren plaats. Hierdoor kan de andere fase van het proces, de oxydatie door chromaationen, gemakkelijker verlopen. Er moet een werkwijze gevonden worden, waarbij de beide reacties gescheiden worden uitgevoerd, zodat geen onoplosbare metaaloxiden ontstaan.

Het onoplosbaar maken van lipiden door oxydatie en polymerisatie

berust op hetzelfde principe als het gebruik van drogende oliën in verf. Drogende oliën bevatten een hoog gehalte aan onverzadigde vetzuren. Wanneer verf in een dunne laag aangebracht wordt, gaan de drogende oliën door oxydatie aan de lucht over in de bekende harde verflaag. Dit drogingsproces kan bespoedigd worden door aan de drogende oliën zouten van zware metalen, het zogenaamde siccatief, toe te voegen. Toevoeging van cobaltionen werkt het meest effectief: 1 deel cobaltionen is equivalent aan de werking van 8 delen mangaanionen of 40 delen loodionen (Fieser en Fieser 1944). Daarom viel voor de inleidende reactie tot oxydatie en polymerisatie de keuze op cobaltchloride.

Voor de eigenlijke oxydatie en polymerisatie werd geëxperimenteerd met natriumperjodaat en kaliumpersulfaat als zijnde milde oxydatiemiddelen, waardoor destructie van de coupes zoveel mogelijk zou kunnen worden beperkt. Een eerste reeks experimenten was gericht op het verkrijgen van een inzicht in de gunstigste combinatie van concentratie, duur van inwerking en temperatuur van de beide reagentia voor de fixatie van lipiden. Dit werd nagegaan aan lipiden die op strookjes filtreerpapier gebracht werden die met silicagel geïmpregneerd waren. Omdat, zoals in hoofdstuk 1, par. 1.5 aangetoond is, van de lipidenfracties uit de aortawand het cholesterol het moeilijkst te fixeren is, werd dit als toetsobject gekozen. In een tweede reeks proeven werd de gekozen combinatie van factoren beproefd op weefselcoupes; het effect werd bestudeerd door de coupes na behandeling te kleuren met Soedan IV. Toen bleek dat de voor lipiden gunstigste proefomstandigheden destructief voor de coupes waren, werd onderzocht welke omstandigheden nog juist wel door de coupes doorstaan konden worden. In een laatste reeks van polymerisatieproeven werd nagegaan of een acceptabele graad van polymerisatie bereikt was voor cholinehoudende fosfolipiden met de voor weefselcoupes tolerabele condities. Dit werd vastgesteld door cholinehoudende fosfolipiden op proefstrookjes te brengen, te behandelen en het resultaat zichtbaar te maken door kleuring met Soedan IV.

Nadat aldus de voorwaarden voor het immobiliseren van fosfolipiden vastgesteld waren, werd nagegaan bij welke temperatuur en duur van inwerking van het reagens van cis-aconietzuuranhydride de beste resultaten voor weefselcoupes werden verkregen.

Een laatste controle werd uitgeoefend door kleuring met CAZA te vergelijken van wel en niet gepolymeriseerde coupes en van gepolymeriseerde en met methanol/chloroform geëxtraheerde coupes.

3.2.1 *Polymerisatie van cholesterol met cobaltchloride en natriumperjodaat*

Van een 2 % oplossing van cholesterol werd 5 mikrol. op met SiO₂ geïmpregneerd filtreerpapier gebracht.

concentratie CoCl₂: ½, 1, 2, 3, 5 en 10 %

reactietijd: ½, 1, 2, 3 en 24 uur

temperatuur: kamertemperatuur

concentratie NaJO₄: 1, 2, 3, 5 en 10 %

reactietijd: 1, 2, 3, 4 en 6 dagen

temperatuur: kamertemperatuur, 37° C en 60° C

Combinaties van verschillende mogelijkheden werden toegepast.

Het resultaat werd beoordeeld naar de kleuring door Soedan IV en luidt als volgt:

Het polymeriseren van cholesterol kan het meest effectief uitgevoerd worden met een cobaltchlorideoplossing in water met een concentratie van 1 % gedurende ½ uur bij kamertemperatuur. Overmaat CoCl₂ uitspoelen met water. Overbrengen in een natriumperjodaatoplossing in water, concentratie 1 % gedurende 3 dagen bij 37° C.

3.2.2 *Polymerisatie van lipiden in weefselcoupes met cobaltchloride en natriumperjodaat of kaliumpersulfaat*

Toetsobject: 10μ. dikke vriescoupes van een vette plaque

concentratie CoCl₂: 1, 3,2 en 10 %

reactietijd: ½ en 24 uur

temperatuur: kamertemperatuur

concentratie NaJO₄: 1 en 2 %

reactietijd: ½, 1, 2 en 6 uur; 1, 2, 3 en 5 dagen

temperatuur: 37° en 60° C

concentratie K₂S₂O₈: 1 en 2 %

reactietijd: ½, 1, 2 en 6 uur; 1, 2, 3 en 5 dagen

temperatuur: 37° en 60° C

Polymerisatie werd al dan niet voorafgegaan door fixatie van de coupes. Dit geschiedde in 4 of 10 % formaline met 1 % CaCl₂; in plaats van CaCl₂ werd in een aantal gevallen het CoCl₂ aan het fixatief toegevoegd. De graad van polymerisatie werd beoordeeld door kleuring met Soedan IV. Combinatie van de verschillende factoren leidde tot de volgende resultaten:

1. Het recept voor het polymeriseren van cholesterol op met SiO₂ geïmpregneerd filtreerpapier, te weten met CoCl₂ 1 %, ½ uur bij kamer-

temperatuur en NaJO_4 1 %, 3 dagen bij 37°C , geeft slechte resultaten wanneer het op coupes toegepast wordt.

2. Concentratie en duur van inwerking van CoCl_2 beïnvloeden het resultaat niet. Om bij zeer vette weefsels zeker te zijn van voldoende penetratie van de waterige oplossing, werd de volgende methode gekozen: concentratie 10 %, duur van inwerking 1 dag, kamertemperatuur.

Bovendien is dit een gemakkelijke werkwijze in het geheel van het kleuringsproces.

3. Concentratie, duur van inwerking en temperatuur van het NaJO_4 zijn van uitermate groot belang: te stringente omstandigheden (concentraties van 2 % en hoger, tijd van inwerking langer dan enkele uren en een temperatuur van 60°C) veroorzaken destructie van het weefsel, waardoor het lijkt alsof de lipiden opgelost zijn.

De meest gunstige omstandigheden voor behoud van het weefsel en een redelijke graad van polymerisatie zijn: concentratie 1 %, duur van inwerking 1 uur, temperatuur 37°C .

4. Het gebruik van $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ als oxydatie- en polymerisatiemiddel in plaats van NaJO_4 geeft weinig verschil te zien. De indruk werd verkregen dat het iets destructiever werkt dan het NaJO_4 .
5. De concentratie van het fixatief geeft geen verschillen te zien. Toevoeging van het CoCl_2 aan het fixatief, waardoor het gehele proces met 1 dag bekort wordt, leidt soms tot een iets minder goed resultaat. De oorzaak hiervan is niet duidelijk.

Conclusie:

Het polymeriseren van lipiden in 10μ dikke coupes van aortaweefsel kan het beste als volgt uitgevoerd worden:

1. fixeren in 4 % formaline waaraan 1 % calciumchloride toegevoegd is, gedurende 1 dag bij kamertemperatuur,
2. additie van cobaltionen aan de dubbele banden van de onverzadigde vetzuren door behandeling in een 10 % oplossing van cobaltchloride in water gedurende 1 dag bij kamertemperatuur,
3. oxydatie en polymerisatie door 1 % natriumperjodaat in water gedurende 1 uur bij 37°C .

De resultaten van polymerisatie met kaliumbichromaat (hoofdstuk 1, par. 1.5) zijn beter: vooral in de media van de aorta zijn dan meer Soedan-positieve lipiden te onderscheiden.

3.2.3 Polymerisatie van cholinehoudende fosfolipiden met cobaltchloride en natriumperjodaat of kaliumpersulfaat

Toetsobject: dilineoyl-L- α -lecithine (12 % oliezuur, 6 % linoleenzuur)
dipalmitoyl-L- α -lecithine
dilignoceroyl-L- α -lecithine
lyso-lecithine

Hiervan werd 5 mikrol. van 2—4 % oplossingen op met SiO₂ geïmpregneerd filtreerpapier gebracht.

concentratie CoCl₂: 10 %
reactietijd: 24 uur
temperatuur: kamertemperatuur

concentratie NaJO₄: 1 %
reactietijd: 1, 2, 6 en 24 uur
temperatuur: 37° C

concentratie K₂S₂O₈: 1 %
reactietijd: 1, 2, 6 en 24 uur
temperatuur: 37° C

Het effect werd nagegaan door kleuring met Soedan IV.

Resultaten:

1. Reeds na een behandeling van 1 uur met NaJO₄ is het onverzadigde lecithine (C 18:2) kleurbaar met Soedan IV.
2. De verzadigde lecithinen (C 16:0 en C 24:0) zijn ook na 24 uur in NaJO₄ Soedan-negatief.
3. Het lyso-lecithine geeft na 1 uur in NaJO₄ een zwak positieve reactie met Soedan IV, een negatieve reactie na de langere behandelingsstijden; het lyso-lecithine lost waarschijnlijk op in het polymerisatiemedium.

Alle lecithinen geven na behandeling met kaliumbichromaat een Soedan-positieve reactie; het onverzadigde lecithine vertoont een intensievere kleuring dan na polymerisatie met cobaltchloride en natriumperjodaat. Het lyso-lecithine is ook dan Soedan-negatief.

Conclusie:

Onverzadigde lecithinen zijn te polymeriseren met cobaltchloride en natriumperjodaat; het lyso-lecithine wordt daarmee niet gefixeerd. Voor een uitspraak over het gedrag van verzadigde lecithinen verwijzen wij naar conclusie 2 van de volgende reeks experimenten (3.2.4.)

3.2.4 *Complexvorming van cholinehoudende fosfolipiden met CAZA en de invloed van cobaltchloride en natriumperjodaat*

Toetsobject: dilineoyl-L- α -lecithine (12 % oliezuur, 6 % linoleenzuur)
 dipalmitoyl-L- α -lecithine
 lyso-lecithine

5 mikrol. van 2—4 % oplossingen werd op met SiO₂ geïmpregneerd filtreerpapier gebracht.

Behandeling: – fixeren in 4 % formol-Ca, 1 dag;
 – polymeriseren in 10 % CoCl₂, 1 dag bij kamertemperatuur en 1 % NaJO₄, 1 uur bij 37° C;
 – dehydrateren in 30, 50, 60, 70, 80 en 96 % ethanol en twee maal in absolute ethanol, ieder 1 minuut;
 – overbrengen in toluen, 1 minuut en toluen/azijnzuuranhydride 1 : 1 (v : v), 1 minuut;
 – kleuren in CAZA, $\frac{1}{2}$ en 1 uur bij kamertemperatuur.

N.B. Doordat een sterke achtergrondkleur optreedt, moeten de proefstrookjes gedifferentieerd worden in toluen/azijnzuuranhydride, toluen, ethanol 96 % en water; de lipiden zijn dan gedurende een korte periode gekleurd; de kleur is niet bestendig door omzetting van CAZA door ethanol en water.

Blanco: in plaats van kleuring het reagens van cis-aconietzuuranhydride onder identieke omstandigheden met toluen/azijnzuuranhydride behandelen; kleuring met Soedan IV.

Controles: 1. polymerisatie achterwege laten, overigens gelijke behandeling;
 2. extraheren met methanol/chloroform, vervolgens kleuren met CAZA.

Resultaten:

1. Zowel het verzadigde als het onverzadigde lecithine reageren CAZA-positief; het lyso-lecithine vertoont geen reactie.
2. De overeenkomstige blanco van verzadigd en onverzadigd lecithine is Soedan-positief; de blanco-proef met lyso-lecithine vertoont geen reactie met Soedan IV.
3. Wanneer de lipiden niet gepolymeriseerd worden, reageren verzadigd en onverzadigd lecithine toch CAZA-positief.

4. De blanco's van niet-gepolymeriseerde lipiden reageren iets verminderd Soedan-positief in vergelijking met de blanco's van lecithinen die normaal gepolymeriseerd zijn.
5. Na op extractie met methanol/chloroform volgende kleuring met CAZA reageren het verzadigde en het onverzadigde lecithine negatief. De vergelijkbare blanco's zijn Soedan-negatief.

Conclusies:

1. De in de vorige proevenreeks (3.2.3.) vastgestelde methode voor het polymeriseren voldoet goed als voorbehandeling voor complexvorming met cis-aconietzuuranhydride.
2. De in die proevenreeks (3.2.3) geconstateerde negatieve reactie met Soedan IV van het met CoCl_2 en NaJO_4 behandelde verzadigde lecithine moet niet gezien worden als gevolg van het opgelost zijn van dit lecithine. Het blijkt namelijk wel kleurbaar te zijn met CAZA en de daarbij behorende blanco reageert zelfs Soedan-positief. Voor dit gedrag kan geen verklaring gegeven worden.
3. Tenzij lyso-lecithine in weefselcoupes een zodanig sterke binding met het weefsel heeft dat het anders reageert dan op filtreerpapier, moet het onwaarschijnlijk geacht worden dat het histochemisch met CAZA is te localiseren. Vermoedelijk lost het lyso-lecithine tijdens de voorbehandeling op.

3.2.5 Complexvorming met CAZA van cholinehoudende fosfolipiden in weefselcoupes en de invloed van cobaltchloride en natriumperjodaat

Toetsobject: 10 μ dikke vriescoupes van een vette plaque op objectglazen van kwarts.

Voorbehandeling als in de vorige proevenreeks (3.2.4).

Kleuring: – met cis-aconietzuuranhydride;
 – tijd: 5 en 15 minuten, $\frac{1}{2}$, 1, 3 en 24 uur;
 – temperatuur: kamertemperatuur en 60° C;

Blanco: in plaats van kleuren in het reagens van cis-aconietzuuranhydride onder overeenkomstige omstandigheden met toluen/azijnzuuranhydride behandelen; kleuren met Soedan IV

Controles: 1. polymerisatie achterwege laten, overigens gelijke behandeling
 2. extraheren met methanol/chloroform, vervolgens kleuren met CAZA.

Resultaten en conclusies:

1. Behandeling van een half tot één uur met het reagens van cis-aconietzuuranhydride bij kamertemperatuur geeft voor weefselcoupes goede resultaten.
2. Ondanks het polymeriseren met CoCl_2 en NaJO_4 neemt de Soedan-positiviteit van de blanco-coupes aanzienlijk af. Positief blijven echter diè details die ook CAZA-positief zijn. Waarschijnlijk is het verlies aan Soedan-positiviteit te wijten aan het oplossen van neutrale lipiden (vergelijk de proeven met cholesterol: 3.2.1).
3. Van niet-gepolymeriseerde coupes is, vooral bij voortgezette behandeling (1 uur in CAZA) de laesie verminderd CAZA-positief; de media daarentegen is sterker gekleurd. We moeten aannemen dat door polymerisatie de mogelijkheid tot complexvorming afneemt, wellicht door het inbouwen van het choline in het polymerisatie-product. Doordat de lipiden van de media waarschijnlijk moeilijker oplosbaar zijn dan die van de plaque, neemt in de media de kleurintensiteit toe, in de plaque af.
4. Extractie met methanol/chloroform geeft een vrijwel geheel CAZA-negatief beeld: alleen de elastische vezels van de media zijn, zij het plaatselijk zwak, nog gekleurd. Een positieve reactie mag dus toegeschreven worden aan het kwaternair gebonden stikstof van de cholinehoudende fosfolipiden en niet aan tertiair gebonden stikstof in bijvoorbeeld nucleïnezuren en in histidine van elastische vezels.

Aan de hand van de beschreven experimenten kan tenslotte het volgende voorschrift voor de histochemische methode voor kleuring van cholinehoudende fosfolipiden gegeven worden.

3.3 VOORSCHRIFT VOOR DE HISTOCHEMISCHE METHODE

- I. 10 μ dikke vriescoupes op objectglazen van kwarts brengen.
- II. De coupes fixeren in 4 % formol-Ca gedurende 1 dag.
De coupes spoelen in water en
- III. de lipiden polymeriseren
 1. in 10 % CoCl_2 gedurende 24 uur bij kamertemperatuur,
 2. de overmaat CoCl_2 zeer goed uitspoelen met water om neerslagen tijdens de volgende behandeling te voorkomen,
 3. behandelen in 1 % NaJO_4 gedurende 1 uur bij 37° C,
 4. spoelen met water.

IV. De coupes dehydrateren in ethanol 30 %

50 %

60 %

70 %

80 %

96 %

absolute ethanol 1

absolute ethanol 2,

alles gedurende 1 minuut.

Ethanol zorgvuldig uitwassen met:

tolueen, 1 minuut en conditioneren in

tolueen/azijnzuuranhydride 1 : 1 (v : v), 1 minuut.

V. De eigenlijke kleurreactie uitvoeren.

Het reagens bereiden in pyrexglas: 250 mg cis-aconietzuuranhydride oplossen in 40 ml azijnzuuranhydride, aanvullen tot 100 ml met tolueen.

24 uur laten staan alvorens te gebruiken, opdat het cis-aconietzuuranhydride volledig op kan lossen.

1. het reagens in kleurecuvetten van kwartsglas schenken; de preparaten daarin zetten en gedurende een half tot één uur laten staan bij kamertemperatuur,
2. spoelen in tolueen/azijnzuuranhydride 1 : 1 (v : v), 1 minuut,
3. overbrengen in tolueen,
4. afdekken met kunsthars en een dekglas van normaal glas.

Resultaat:

Cholinehoudende fosfolipiden zijn paars gekleurd. Aangezien de kleur niet stabiel is, moet het resultaat direct bekeken worden.

Behalve op coupes van aorta's, waarvan de resultaten in hoofdstuk 5 gegeven worden, werd de methode toegepast op coupes van coronairarterien, lever, perifere zenuwen en hersenweefsel.

DEEL II

**TOEPASSING VAN DE CAZA-METHODE BIJ HET
ONDERZOEK OVER ATHEROSKLEROSE VAN DE
MENSELIJKE AORTA**

HOOFDSTUK 4

MORFOLOGIE VAN DE AORTA

Ter inleiding van de in hoofdstuk 5 te bespreken topografie van cholinehoudende fosfolipiden in de aortawand wordt een uiteenzetting gegeven van de structuur van de aorta.

4.1 HET MACROSCOPISCHE BEELD

Als voorbeeld van een aorta waarin met het blote oog geen afwijkingen zijn te constateren, wordt in fig. 1 (zie reproducties) een afbeelding gegeven van een overlans opengeknpte aorta van een jongen van 2½ maand oud. Een aorta met atherosklerotische laesies van een vrouw van 47 jaar is afgebeeld in fig. 2.

De beschrijving van het macroscopisch aspect van deze laesies is in een rapport van de studiec commissie voor atherosklerose van de World Health Organization (1958) vastgelegd in de volgende definities, welke afgestemd zijn op praktische herkenbaarheid van de laesies:

The term 'fatty streak or spot' is applied to superficial yellow or yellowish-grey intimal lesions which are stained selectively by fat stains.

The term 'fibrous plaque' is applied to a circumscribed, elevated intimal thickening which is firm, and grey or pearly-white.

The term 'atheroma' is applied to an atherosclerotic plaque in which fatty softening is predominant.

Complicated lesions are defined as lesions with additional changes or alterations such as haemorrhage, thrombosis, ulceration, and calcareous deposits.

De definitie die in dit W.H.O.-rapport van atherosklerose gegeven wordt luidt:

Atherosclerosis is a variable combination of changes of the intima of arteries (as distinguished from arterioles) consisting of the focal accu-

mulation of lipids, complex carbohydrates, blood and blood products, fibrous tissue and calcium deposits, and associated with medial changes.

4.2 MICROSCOPISCHE EN SUBMICROSCOPISCHE STRUCTUUR

Evenals bij andere arteriën kan men bij de aorta drie concentrische lagen onderscheiden. Aan het lumen grenst de tunica intima, daarop volgt de tunica media, terwijl de tunica adventitia de verbinding vormt met het omringende weefsel. Kortheidshalve worden deze lagen gewoonlijk intima, media en adventitia genoemd.

Betreffende de structuur en de ontwikkeling van de *intima* geeft French (1964), die de morfologie van de arteriewand uitvoerig onderzocht heeft, de volgende gedetailleerde beschrijving:

De intima wordt aan de zijde van het lumen begrensd door een laag aaneensluitende endotheelcellen; de buitenste grens wordt gevormd door een gevensterde, elastische laag welke lamina elastica interna (binnenste elastische membraan) wordt genoemd. Tussen deze beide lagen in ligt de subendotheliale zone; de dikte hiervan neemt toe met toenemende leeftijd. Daarbij wordt allereerst de musculair-elastische laag gevormd, doordat gladde spiercellen vanuit de media door de binnenste elastische membraan de intima binnendringen. Bij het passeren van de membraan worden deze cellen bedekt met elastisch weefsel. Hierdoor maakt de binnenste elastische membraan een gespleten of geduplicateerde indruk. Het aantal gladde spiercellen in deze subendotheliale laag neemt toe òf door vermenigvuldiging van reeds gemigreerde spiercellen òf door nieuwe migratie. In dit stadium zijn de enige cellen in de intima, behalve de endotheelcellen, de gladde spiercellen. Daarom moeten de gladde spiercellen verantwoordelijk zijn voor de vorming van elastine en collageen welke in de zich verdikkende intima verschijnen.

Een volgende differentiatie is namelijk dat boven de elastisch-musculaire laag een elastisch-hyperplastische laag ontstaat die overgaat in een bindweefsellaag. In deze laag komen cellen voor die morfologisch op fibroblasten lijken.

Een strijdpunt is of, naast endotheelcellen en gladde spiercellen een derde soort cellen in de intima voorkomt of dat deze cellen, met name de fibroblasten, evenals alle intimacomponenten en zelfs de verdikkingen, ook derivaten zijn van endotheel en gladde musculatuur.

Niet alle auteurs zijn het eens met deze ideeën van French die ten dele van hypothetische aard zijn.

Een aantal van de hier beschreven ontwikkelingsprocessen is afgeleid uit electronenmicroscopisch onderzoek aan arteriën van varkens. Omdat er een grote overeenkomst bestaat tussen de structuur van de aorta van mens en varken en ook de zich later ontwikkelende atherosklerotische laesies grote gelijkenis vertonen, wordt door French aangenomen dat de ontwikkeling van de aorta bij mens en varken op vergelijkbare wijze verloopt.

Dat het al of niet voorkomen van fibroblasten in de intima een strijdpunt is, blijkt uit morfologische beschrijvingen door andere auteurs. Bertelsen (1964) meent dat de verdikking van de intima bestaat uit grondsubstantie van mucopolysacchariden en uit fibroblasten. Lehninger (1959) noemt in zijn beschrijving van de intima één celtype, de endothelcellen, en voorts het voorkomen van enkele primitieve bindweefselcellen.

De opvatting van French is gebaseerd op een morfologische bepaling van het voorkomen van gladde spiercellen met behulp van de electronenmicroscop. Hiermee worden de karakteristieke myofibrillen van de gladde spiercellen waargenomen. Om deze reden sluiten wij ons aan bij de mening van deze auteur betreffende het celtype in de intima. Hierin worden wij gesteund door Sachs (1965) die, eveneens met de electronenmicroscop, vaststelde dat bij menselijk aortamateriaal in de intima overwegend gladde spiercellen voorkomen.

De *media* bestaat uit concentrische elastische lamellen met daartussen grondsubstantie en gladde spiercellen. Doordat de aorta tot de elastische arteriën behoort, wordt het aandeel van de musculaire elementen in structuur en functie van de aorta nogal eens onderschat. De rol van de gladde spiercellen in de aorta met zijn elastische functie zou zijn het geven van een variabele spanning aan de elastische lamellen. Deze regulerende functie is van grote haemodynamische betekenis (Mommerts 1959). Met toenemende ouderdom neemt de elasticiteit van de aorta af; een eventuele samenhang met veranderingen in de musculaire elementen is niet bekend. Het elastinegehalte blijft na het tiende jaar merkwaardig constant gedurende het verdere leven en bedraagt ongeveer 42 % van het drooggewicht van een aorta (Lansing 1959).

In de *media* komen in beperkter mate dan de gladde spiercellen de zogenaamde mestcellen voor. Mestcellen zijn identiek aan basofiele leukocyten, niet alleen morfologisch, maar ook functioneel: beide produceren heparine. Mestcellen vormen misschien ook nog andere mucopolysacchariden. Aangezien mestcellen post mortem snel degenereren ten gevolge van autolyse, is het noodzakelijk het te onderzoeken weefsel 6—12 uur na de dood te bewerken (Parish 1964). Ook aan de

fixatie worden speciale eisen gesteld, zodat dit waarschijnlijk mede de verklaring is, dat in de beschrijving van hoofdstuk 5 van de bij ons eigen onderzoek betrokken aorta's de mestcellen niet voorkomen.

Voor de vorming van elastische vezels zouden fibroblasten aanwezig kunnen zijn; evenmin als dat voor het voorkomen van deze cellen in de intima het geval was, bestaat hierover voor de media overeenstemming van opvatting. De verantwoordelijke cel zou dezelfde kunnen zijn als die welke betrokken is bij de vorming van collageen, er zou echter ook een gespecialiseerde elastoblast kunnen bestaan.

De elastische lamellen van de media en de binnenste elastische membraan hebben geen homogene structuur, maar bestaan uit om elkaar heengewonden elastische vezels die in een matrix liggen. Lansing et al. (1952) stellen zich op grond van hun bevindingen met de electronen-microscop voor, dat de elastische lamellen van het nekligament van een koe bestaan uit vier vezels die twee aan twee als een koord inéén-gedraaid zijn; de beide paren zijn weer om elkaar heengewonden. Verder namen deze onderzoekers waar dat onder invloed van het enzymcomplex elastase lipiden uit de elastische lamellen vrijgemaakt kunnen worden. Sacks (1954) meent dat de matrix van de elastische lamellen van nekligament en aorta bestaat uit polysacchariden, maar ook lipiden zou kunnen bevatten. La Bella (1958) komt tot de overtuiging dat zich in de elastische vezels cerebrosiden bevinden. De histochemische bepaling van lipiden in de elastische lamellen wordt verder in hoofdstuk 5 besproken.

De *adventitia* bestaat uit bindweefsel en bevat veel lipiden, hoofdzakelijk triglyceriden, vasa vasorum en ook glad spierweefsel. De vasa vasorum zetten zich voort tot in de media, waardoor zij de zuurstofvoorziening van de buitenste lagen daarvan verzorgen.

Afwijkend van het beschreven normale microscopische beeld zijn de *atherosklerotische laesies*. De fatty streaks en spots bestaan voor een groot gedeelte uit schuimcellen, voorts zijn gladde spiercellen aanwezig en slechts enkele bindweefselementen. De plaques worden gevormd door een morfologisch vrijwel ongedifferentieerde massa van lipiden welke bedekt wordt door een bindweefsellag. De verhouding van de dikte van fibreuse overkapping en de zogenaamde lipidenbrij varieert sterk. Wanneer de bindweefselbedekking minimaal is, wordt gesproken van een atheroom. Het vrijwel afwezig zijn van een bindweefselkap komt ook macroscopisch tot uiting, zoals eerder in dit hoofdstuk (par. 4.1) beschreven is. De laesies worden gedetailleerder besproken in hoofdstuk 5.

HOOFDSTUK 5

DE TOPOGRAFIE VAN CHOLINEHOUDENDE FOSFOLIPIDEN IN AORTA'S MET VERSCHILLENDE GRAAD VAN ATHEROSKLEROSE

In aorta's werden cholinehoudende fosfolipiden, dat wil zeggen lecithinen, lyso-lecithinen en sfigomyelinen tezamen, gelocaliseerd met behulp van een methode waarbij met een reagens van cis-aconietzuuranhydride deze fosfolipiden paars gekleurd worden. De methode is beschreven in hoofdstuk 3.

5.1 MATERIAAL EN WERKWIJZE

Het gebruikte aortamateriaal was afkomstig van autopsieën die verricht werden in het Pathologisch Laboratorium der Rijksuniversiteit te Leiden.

Dezelfde eisen die golden voor aorta's bestemd voor lipidenanalyses, werden gesteld aan het materiaal voor het histochemisch onderzoek. Dit houdt in, dat het materiaal zo spoedig mogelijk — zeker niet meer dan 24 uren na de dood — in behandeling genomen werd. Geen aorta's werden bewerkt van patiënten waarvan het bekend was, dat ze geleden hadden aan een verstoring van het lipidenmetabolisme. Gevallen met diabetes, nierinsufficiëntie, lever- of schildklieraandoeningen werden van onderzoek uitgesloten. Een uitzondering werd gemaakt voor een aorta van stadium 0 van een jongen van 14 jaar met een nieraandoening. Hiervan werd echter een lipidenanalyse verricht van intima met media, nadat enkele stukjes weefsel voor histochemisch onderzoek geselecteerd waren. De resultaten van deze analyse wezen uit, dat de lipidensamenstelling overeenkomstig die van andere intima/mediapreparaten van niet-atherosklerotische aorta's van die leeftijd was.

De aorta's voor histochemisch werk werden ontdaan van het grootste gedeelte van de zeer vetrijke adventitia; slechts de aan de media grenzende lagen werden niet afgeprepareerd. Het verwijderen van vet verhoogt de snijbaarheid van het materiaal en voorkomt uitsmeren van dit weinig aan structuur gebonden vet over de coupes.

De graad van atherosklerose van de gehele aorta werd vastgesteld volgens de normen van de World Health Organization (1958):

- stadium O: met het blote oog geen laesies waar te nemen,
 stadium I: fatty streaks en spots aanwezig,
 stadium II: bovendien komen plaques en/of atheromen voor,
 stadium III: optreden van laesies met complicaties zoals ulceratie, verkalking, bloeding, thrombose.

Van 15 aorta's werden bij macroscopische beschouwing een normale indruk makende gedeelten en, afhankelijk van het stadium van atherosklerose, fatty streaks of spots en plaques onderzocht; tevens werd een atheroom uit een aorta van stadium II aan een histochemisch onderzoek onderworpen. Van dit materiaal behoorden

- 5 aorta's tot stadium O, in de leeftijd van 3 en 3½ week, 2½, 5 en 14 jaar,
 4 aorta's tot stadium I, variërend van 15 tot 30 jaar,
 3 aorta's tot stadium II, tussen 40 en 60 jaar en
 3 aorta's tot stadium III, van 40 tot 60 jaar.

Het aortamateriaal werd ongefixeerd gesneden in 10 μ dikke dwarscoupes met behulp van een microtoom in een cryostaat van het type Pearse bij -15° C. De coupes werden gefixeerd in 4 % formaline waaraan 1 % calciumchloride toegevoegd was (zie hoofdstuk 1, par. 1.1). Naast kleuring van de cholinehoudende fosfolipiden met het reagens van cisonietzuuranhydride (CAZA) gedurende ½ en 1 uur, ondergingen parallelcoupes:

- een kern/cytoplasmakleuring met haematoxyline en eosine,
- een kleuring van het elastische bindweefsel met Weigert's resorcine-fuchsine methode volgens een modificatie van Lawson (1936); een enkele maal werd met zure orceïne gekleurd (McManus 1960),
- een lipidenkleuring met Soedan IV,
- na extractie met methanol/chloroform 1 : 2 (v : v) een lipidenkleuring met Soedan IV,
- eveneens na extractie met methanol/chloroform 1 : 2 (v : v) de fosfolipidenkleuring met CAZA gedurende 1 uur,
- in een aantal gevallen na verzeping met NaOH (Adams en Bayliss 1963a) de fosfolipidenkleuring met CAZA gedurende 1 uur,
- een enkele maal de cholesterolkleuring van Adams (1961) met perchloorzuur en naphthochinon (PAN).

Toelichting op enkele van deze kleuringen:

De kleuring van lipiden met een verzadigde oplossing van Soedan IV in aceton/ethanol 70 % 1 : 1 (v : v) werd verricht nadat de coupes gefixeerd waren in Baker's formol-calciumchloride en de lipiden met

kaliumbichromaat. De lipiden werden geoxydeerd en gepolymeriseerd met een 5 % oplossing van kaliumbichromaat waaraan 1 % calciumchloride toegevoegd was, gedurende 24 uur bij kamertemperatuur, daarna nog eens 24 uur bij 60° C. Hierdoor wordt de oplosbaarheid van lipidenfracties uit de aorta in aceton/ethanol 70 % 1 : 1 (v : v) sterk verminderd en de kleurbaarheid met Soedan IV daardoor uitgebreid. Dit is in hoofdstuk 1, par. 1.5 met modelproeven aangetoond.

Extractie van de coupes met methanol/chloroform 1 : 2 (v : v) werd uitgevoerd na fixatie van de coupes, omdat door Edgar (1957) aangetoond is, dat de extraheerbaarheid van fosfolipiden uit hersenweefsel dan groter is vergeleken bij niet in formaline gefixeerd materiaal. Geëxtraheerd werd gedurende 24 uur bij 37° C, vervolgens 1 uur bij 60° C.

In enkele gevallen werden coupes behandeld met 2N NaOH in water gedurende 1 uur bij 37° C volgens voorschrift van Adams en Bayliss (1963a). Hierdoor worden lecithinen wel, sfgomyelinen alleen niet verzeept.

5.2 RESULTATEN

5.2.1 *De normale intima*

Hieronder verstaan we de intima die bij beschouwing met het blote oog geen atherosclerotische laesies vertoont. In hoofdstuk 4 over de morfologie van de aorta is reeds uiteengezet dat aangenomen wordt dat, afgezien van het endotheel, de in de zeer jonge intima voorkomende cellen gladde spiercellen zijn. Na de eerste decade werden in de ogenschijnlijk normale intima ook schuimcellen waargenomen.

De intima die vrij is van atherosclerotische laesies bleek niet veel cholinehoudende fosfolipiden te bevatten. Indien deze al aanwezig waren, bevonden ze zich voor het grootste gedeelte in gladde spiercellen, zowel in de zeer jonge aorta's van stadium O als in de aorta's van stadium I. In de wat oudere aorta van stadium O, die van een 14 jaar oude jongen, werden tevens schuimcellen gevonden die een zeer zwakke CAZA-positieve reactie vertoonden. In stadium I was de intercellulaire substantie een weinig CAZA-positief.

De fosfolipiden van de gladde spiercellen waren voor het grootste gedeelte extraheerbaar met methanol/chloroform, maar niet in alle gevallen totaal. De schuimcellen en de intercellulaire substantie reageerden na extractie geheel negatief op CAZA.

5.2.2 *De binnenste elastische membraan*

De opbouw van de binnenste elastische membraan door spiraalsgewijs om elkaar heengewonden elastische fibrillen met daaromheen een

amorfe laag is te zien bij de nog intacte membraan. Fragmentatie en duplicatie werd waargenomen bij de 2½ jaar oude aorta van stadium O en is een normaal verschijnsel bij de oudere aorta's, ook bij die van stadium O. De fragmenten en de duplicaties van de binnenste elastische membraan vertoonden eveneens de spiraalstructuur, maar de omhullende laag was dan meestal afwezig. In de sterk atherosklerotische delen van aorta's van stadium II en III was de binnenste elastische membraan niet meer te onderscheiden; slechts wat fragmenten waren terug te vinden.

De binnenste elastische membraan van de jonge aorta's, ongeveer tot 30 jaar, was soms licht Soedan-positief; bij de oudere aorta's bleek de membraan of bleken de fragmenten ervan in enkele gevallen sterk Soedanofiel te reageren.

Cholinehoudende fosfolipiden schijnen geen normaal bestanddeel van de binnenste elastische membraan te zijn; het voorkomen ervan lijkt althans niet aan een vaste regelmaat gebonden te zijn:

- bij de zeer jonge aorta's waren ze geheel afwezig,
- in de aorta van een 2½ jaar oud individu werden ze niet gekleurd na verblijf van een half uur in het reagens van cis-aconietzuuranhydride, maar wel na één uur, wellicht doordat slechts een geringe concentratie van fosfolipiden aanwezig was,
- CAZA-positieve lipiden werden niet gevonden in de aorta van een 5-jarige,
- maar waren wel aanwezig in een 14 jaar oude aorta van stadium O,
- lecithinen en/of sflngomyelinen werden gevonden in de binnenste elastische membraan van één aorta van stadium I en
- in één aorta van stadium II.

Een overzicht van de reactie op CAZA van de binnenste elastische membraan uit aorta's van stadium O en I wordt met enkele morfologische gegevens in tabel 7 verstrekt.

Behalve de reeds beschreven verschijnselen ziet men in deze tabel, dat zowel in histologisch als histochemisch opzicht de binnenste elastische membraan in verschillende delen van één aorta sterk verschilt. Dit komt vooral duidelijk tot uiting bij de CAZA-positieve reactie van de binnenste elastische membraan van een aorta van stadium I van een 30 jaar oud individu.

Wanneer CAZA-positieve lipiden in de binnenste elastische membraan voorkwamen, bleken deze niet volledig extraheerbaar te zijn met methanol/chloroform; na verzeping was de binnenste elastische membraan aanzienlijk verminderd CAZA-positief.

Tabel 7 *Morfologie en reactie op CAZA van de binnenste elastische membraan van aorta's van stadium O en I.*

leeftijd van de aorta		spiraal-structuur	'coating'	fragmen-tatie	duplicatie	CAZA
3 weken	O	+	+	—	—	—
		+	—	—	—	—
3½ week	O	+	—	—	—	—
2½ jaar	O	+	+	±	+	+ ¹
		+	—	—	+	+ ¹
5 jaar	O	+	+	±	±	—
14 jaar	O	+	±	+	+	+
		+	—	+	+	+
15 jaar	I	+	—	+	+	—
		+	±	+	±	—
22 jaar	I	+	—	—	—	±
		+	—	—	±	—
		+	—	—	+	—
27 jaar	I	+	—	+	+	—
		+	—	+	+	—
30 jaar	I	+	+	+	+	+
		+	—	+	+	—
		+	—	+	+	++

1. CAZA-positief na één uur kleuren.

5.2.3 *Fatty streaks en spots*

Het celtype van de fatty streaks en spots is de schuimcel, al dan niet ontstaan uit gladde spiercellen; daarnaast komen gladde spiercellen en weinig of geen bindweefselvezels voor.

De laesies bevatten een zeer geringe hoeveelheid cholinehoudende fosfolipiden; deze CAZA-positieve lipiden werden gevonden in schuimcellen en — voor zover aanwezig — in bindweefselementen. In enkele gevallen werden in de grenslaag van de fatty streak met het lumen cellen met een CAZA-positieve inhoud gevonden. Basaal werden in een aantal laesies cellen aangetroffen met een kleine ronde kern; deze kernen reageerden intensiever dan de schuimcelkernen CAZA-positief. In de met haematoxyline en eosine gekleurde preparaten bleken dit chromatinrijke kernen te zijn. Dit celtype komt weer ter sprake bij de beschrijving van het overgangsgebied van intima en media.

Terwijl slechts weinig schuimcellen zwak CAZA-positief reageerden, bleken veel meer schuimcellen sterk Soedan-positief te zijn. De intercellulaire substantie van de fatty streaks was eveneens kleurbaar met Soedan IV, echter nooit met CAZA. De grens met het lumen daaren-

tegen was nooit Soedan-positief, bevatte in enkele gevallen wel CAZA-positieve lipiden.

De fosfolipiden in de grenslaag van de fatty streaks en spots bleken niet gemakkelijk extraheerbaar te zijn met methanol/chloroform; de CAZA-positieve cellen uit de inhoud van de laesie waren beter extraheerbaar, hoewel ze niet altijd geheel CAZA-negatief werden. Na verzeeping van de fatty streaks en spots waren de schuimcellen in het geheel niet meer kleurbaar met CAZA.

De fatty streaks en spots afkomstig uit aorta's met een verschillende graad van atherosklerose vertonen alleen een morfologisch verschil in die zin, dat in de laesies van aorta's II en III wat meer bindweefsel-elementen voorkomen. Histochemisch werden geen verschillen gevonden.

5.2.4 Plaques

De onderzochte plaques varieerden van geheel fibrotische laesies zonder lipidenmassa (zogenaamde brij) tot plaques met slechts een dunne fibrotische overkapping en een grote hoeveelheid lipidenbrij.

De verspreiding van cholinehoudende fosfolipiden blijkt nauw samen te hangen met deze morfologische eenheden. Wij vonden in de meeste plaques in de grenslaag van de fibrotische kap en het lumen concentraties van intracellulaire cholinehoudende fosfolipiden. De sterk CAZA-positieve cellen bleken in het geheel geen positieve reactie met Soedan IV te vertonen. In de diepere lagen van de fibreuse overkapping werden de CAZA-positieve lipiden in schuimcellen aangetroffen; in par. 5.3 wordt uiteengezet dat dit cellen zijn die waarschijnlijk uit gladde spiercellen ontstaan zijn en in de literatuur nu eens schuimcellen dan weer macrofagen genoemd worden. Ook extracellulair toonden wij cholinehoudende fosfolipiden aan, gelegen langs de bindweefselementen. De CAZA-positiviteit bleek grotendeels overeen te komen met de Soedanofilie van myogene schuimcellen en bindweefselementen, hoewel niet in alle gevallen Soedan-positieve eenheden ook CAZA-positief waren en omgekeerd. In de lipidenbrij kwamen cholinehoudende fosfolipiden gelijkmatig verspreid voor, echter in sterkere concentratie rondom cholesterol-naalden en in gecalificeerde plaques ook om kalkpartikeltjes heen. Slechts een enkele schuimcelkern vertoonde een CAZA-positieve reactie. Eventueel aanwezige bindweefselementen bleken eveneens cholinehoudende fosfolipiden te kunnen bevatten. In de overgang van brij naar media werden gedegeneerde elastische lamellen van de media aangetroffen welke CAZA-positief reageerden. De lipidenbrij van plaques werd met Soedan IV intensief gekleurd.

De cholinehoudende fosfolipiden uit alle delen van de plaque waren extraheerbaar met methanol/chloroform, maar niet uit alle elementen totaal. Verzeping gaf aanleiding tot een vrijwel CAZA-negatief beeld van plaques: de kleuring van bindweefselementen en om kalkdeeltjes heen nam het minst af.

Vergelijken we deze resultaten van de kleuring met CAZA van plaques met die van fatty streaks, dan valt op dat plaques veel meer CAZA-positieve elementen bevatten, die dan bovendien nog intensiever gekleurd zijn, dan fatty streaks. Verschillen tussen plaques uit aorta's van stadium II en III werden niet opgemerkt.

5.2.5 *Atheroom*

Uit één aorta van stadium II werd een atheroom onderzocht. Morfologisch kan een atheroom beschouwd worden als een plaque waarin overwegend brij voorkomt. Deze laesie bevatte maar heel weinig CAZA-positieve fosfolipiden. De aanwezige cholinehoudende fosfolipiden werden aangetroffen in een gering aantal celkernen, rondom enkele cholesterolnaalden en in de basis van het atheroom in gedegeneerde elastische lamellen van de media. De geringe CAZA-positiviteit vormt een grote tegenstelling met de zeer intensieve Soedankleuring van de voor het overgrote deel extracellulaire lipiden. Ook de dunne fibrotische, aan het lumen van het vat grenzende, laag van het atheroom was sterk Soedan-positief, zowel intra- als extracellulair; deze grenslaag was geheel CAZA-negatief.

De geringe hoeveelheid cholinehoudende fosfolipiden bleek compleet geëxtraheerd te kunnen worden met methanol/chloroform.

5.2.6 *De media*

De media bestaat uit concentrisch om de as van de aorta heen verlopende elastische lamellen; in de ruimten tussen de elastische lamellen liggen gladde spiercellen.

Het meest opvallende verschijnsel van de media was het positief reageren van de elastische lamellen op het reagens van cis-aconietzuuranhydride en wel volslagen onafhankelijk van het stadium van atherosklerose van de aorta. Slechts in de allerjongste aorta's, die van enkele weken oude individuën, waren de elastische lamellen van de media niet of slechts zeer weinig CAZA-positief. Onder de meest ernstige laesies die zich tot diep in de media voortzetten, waren de elastische lamellen zwakker CAZA-positief — waarschijnlijk door degeneratie van deze lamellen — dan in de normale media. Een gepsiraliseerde opbouw door fibrillen zoals dat bij de binnenste elastische membraan voorkomt, was

alleen bij een verder voortgeschreden degeneratie van elastische lamellen te zien. Voor het overige waren de elastische lamellen onveranderlijk homogeen CAZA-positief.

Cholinehoudende fosfolipiden bleken in de media behalve in de elastische lamellen voor te komen in gladde spiercellen. Zeer duidelijk waren deze CAZA-positieve cellen waar te nemen in de aorta's van stadium O, ook in de zeer jonge aorta's waarvan de elastische lamellen weinig of geen cholinehoudende fosfolipiden bevatten. In de latere stadia van atherosclerose waren deze CAZA-positieve gladde spiercellen niet altijd even gemakkelijk waar te nemen, vermoedelijk door toename van overige CAZA-positieve lipiden in de interlamellaire ruimten. Al beginnend in het oudere stadium O (14 jaar) zagen we in de interlamellaire ruimten bijna ronde, enigszins onregelmatig gevormde celkernen die sterk CAZA-positief waren. Ook van deze cellen nemen we een myogene afkomst aan. Diffuus verspreid in de interlamellaire ruimten kwamen in enkele gevallen ook cholinehoudende fosfolipiden voor, hoofdzakelijk in aorta's van stadium II en III.

In één aorta werd onder een fragmentatie van één van de elastische lamellen een extracellulaire ophoping van met CAZA kleurbare lipiden aangetroffen. De mogelijke betekenis hiervan wordt in de discussie behandeld.

De cholinehoudende fosfolipiden van de elastische lamellen van de media bleken goed extraheerbaar te zijn; zowel in stadium O, I, II als III konden de elastische lamellen na extractie met methanol/chloroform een geheel CAZA-negatieve reactie geven. De gladde spiercellen daarentegen vertoonden vaak zelfs geen verminderde CAZA-positiviteit na extractie. De interlamellair voorkomende myogene cellen waren gemakkelijker extraheerbaar. Het effect van verzeeping op de elastische lamellen is niet geheel duidelijk. In het merendeel der gevallen vond een afname, soms zelfs een sterke vermindering, van de CAZA-positiviteit plaats. Een aantal preparaten vertoonde echter geen afname van het gehalte aan cholinehoudende fosfolipiden in de elastische lamellen. Deze verschillen houden geen verband met het stadium van atherosclerose. De CAZA-positiviteit van de gladde musculatuur onderging in geen der gevallen een verandering door verzeeping.

De elastische lamellen van de media waren nooit Soedan-positief; interlamellair reageerde de media van de oudere aorta's, te beginnen in stadium I, zwak Soedan-positief.

Het meest tegen de intima aan gelegen gedeelte van de media, direct onder de binnenste elastische membraan dus, heeft vaak een andere structuur dan de diepere media. In dit overgangsgebied vormen de

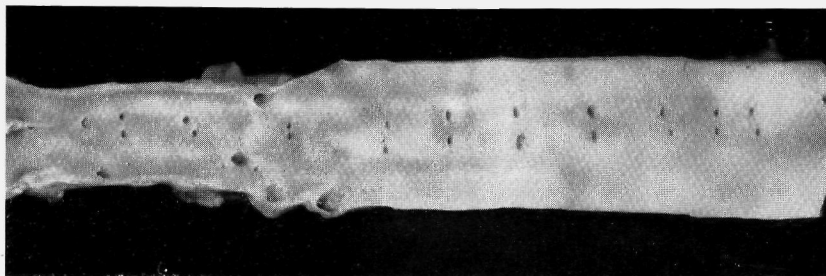


Fig. 1 Thoracal en abdominaal gedeelte van een niet-atherosclerotische aorta; ♂ 2½ maand. De aortaboog is niet afgebeeld, de bifurcatie is nog juist zichtbaar.

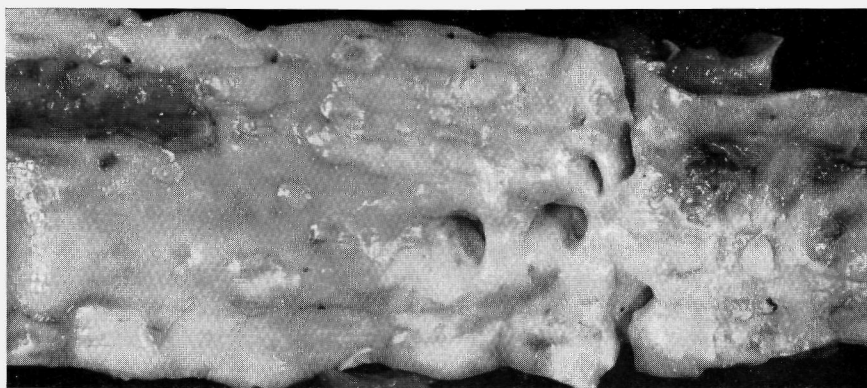


Fig. 2 Gedeelte van een thoracale aorta met atherosclerotische laesies; stadium III; ♀ 47 jaar. Links boven in de figuur is een thrombus zichtbaar, terwijl rechts boven geulcereerde laesies voorkomen; een groot aantal plaques is te zien als kleurloze verhevenheden; de overige, witte, laesies zijn fatty streaks.

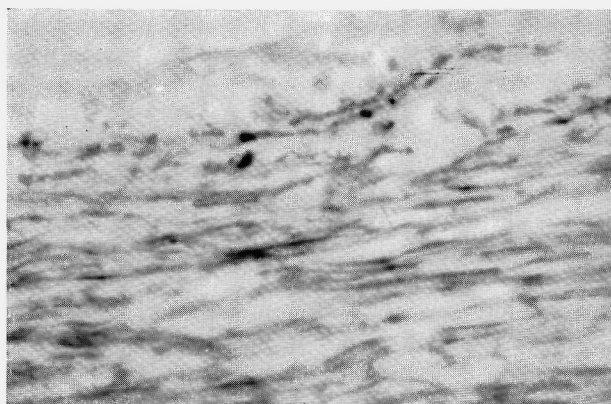


Fig. 3 Aorta stadium 0; ♂ 14 jaar. Intima met enkele zwak CAZA-positieve schuimcellen; fragmenten van de binnenste elastische membraan zijn positief, evenals gladde spiercellen en elastische lamellen in de media. CAZA 1 uur; 925 ×.



Fig. 4 Aorta stadium I; ♂ 22 jaar. In de normale intima zijn enkele CAZA-positieve spiercellen zichtbaar; van de binnenste elastische membraan zijn fragmenten positief; myogene cellen in het overgangsgebied van intima en media bevatten cholinehoudende fosfolipiden, evenals gladde spiercellen en elastische lamellen van de media. CAZA $\frac{1}{2}$ uur; 1100 \times .

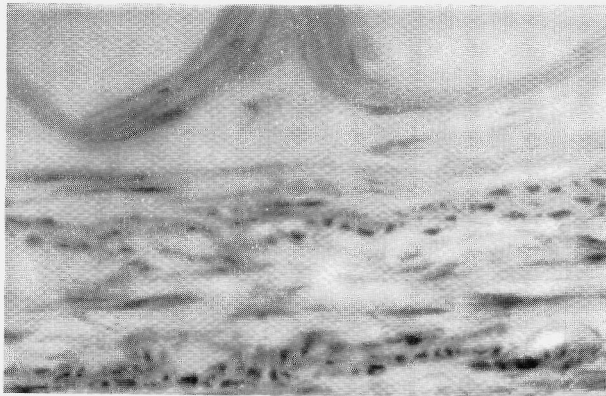


Fig. 5 Aorta stadium I; ♂ 22 jaar. Twee lagen van CAZA-positieve myogene cellen gelegen onder een normale intima met positieve gladde spiercellen; de binnenste elastische membraan is niet gekleurd. CAZA $\frac{1}{2}$ uur; 900 \times .

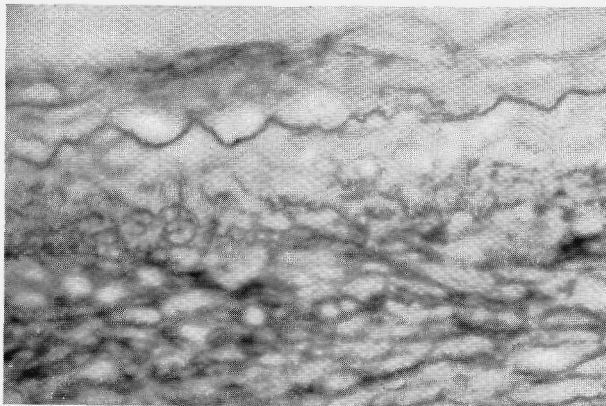


Fig. 6 Aorta stadium I; ♀ 30 jaar. De binnenste elastische membraan is zeer duidelijk CAZA-positief. CAZA $\frac{1}{2}$ uur; 300 \times .

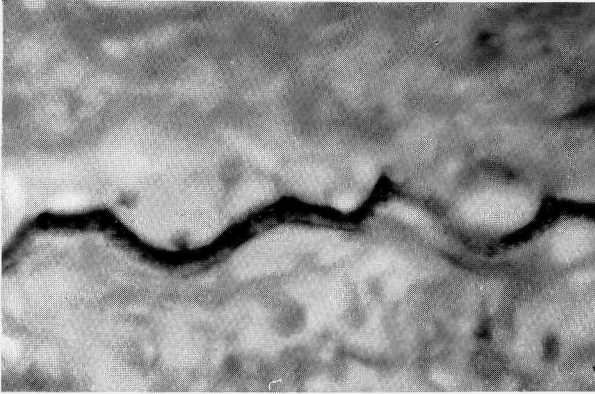


Fig. 7 Aorta stadium I; ♀ 30 jaar. Cholinehoudende fosfolipiden zijn niet homogeen verdeeld over de binnenste elastische membraan; plaatselijk is de laag welke de elastische fibrillen omhult waarneembaar; aan de rechterzijde een begin van fragmentatie. CAZA 1 uur; 1250 ×.

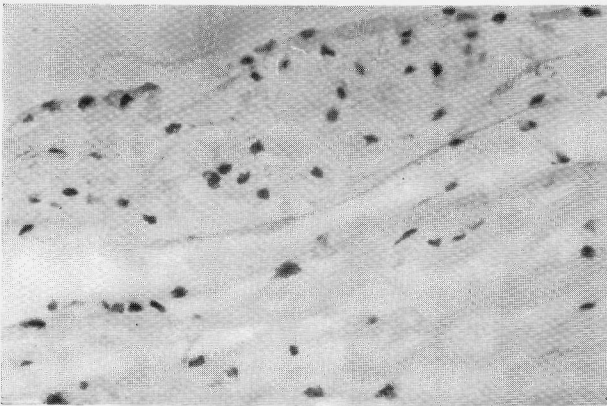


Fig. 8 Aorta stadium II; ♀ 39 jaar. Representatief beeld voor een uit schuimcellen bestaande fatty streak; ook in de media onder de laesie komen schuimcellen voor. H en E; 1000 ×.

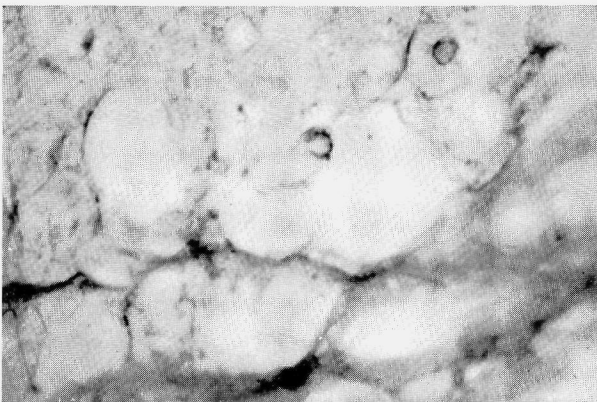


Fig. 9 Aorta stadium III; ♂ 61 jaar. Enkele zwak CAZA-positieve schuimcelkernen uit een fatty streak. CAZA 1 uur; 1100 ×.

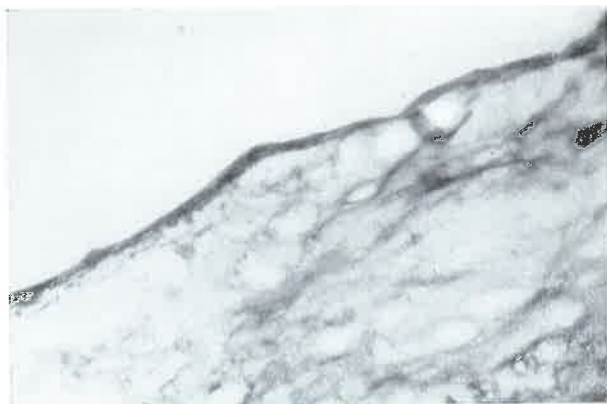


Fig. 10 Aorta stadium I; ♂ 15 jaar. Deel van een uitgebreide fatty streak waarvan de begrenzing met het lumen CAZA-positief is, CAZA $\frac{1}{2}$ uur; 500 \times .

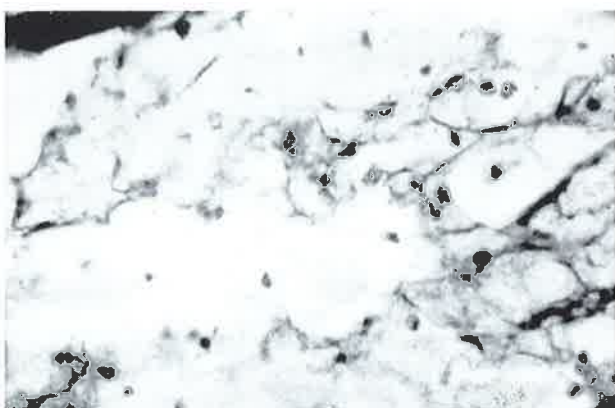


Fig. 11 Aorta stadium I; ♂ 15 jaar. Fatty streak met CAZA-positieve begrenzing van het lumen; celkernen en bindweefselementen bevatten eveneens cholinehoudende fosfolipiden. CAZA $\frac{1}{2}$ uur; 925 \times .



Fig. 12 Aorta stadium III; ♂ 61 jaar. Lipidenrij van een plaque waarin cholesterolkristallen omgeven zijn door CAZA-positieve fosfolipiden; de bindweefselkap is minder intensief gekleurd dan de onder de laesie gelegen media. CAZA 1 uur; 100 \times .

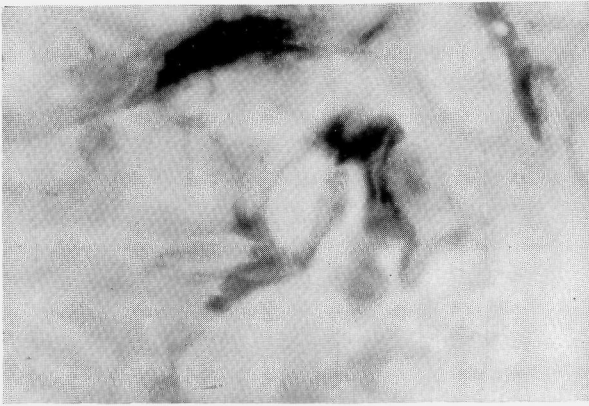


Fig. 13 Aorta stadium III; ♂ 61 jaar. Detail van de lipidenrij van een plaque waarin duidelijk zichtbaar is dat cholesterolkristallen omhuld worden door cholinehoudende fosfolipiden. CAZA 1 uur; 900 ×.

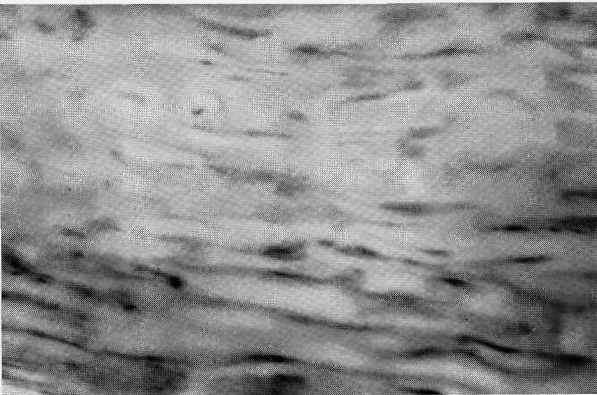


Fig. 14 Aorta stadium II; ♂ 58 jaar. Secundair CAZA-positieve schuimcellen (macrofagen) in de bindweefselkap van een plaque. CAZA ½ uur; 925 ×.

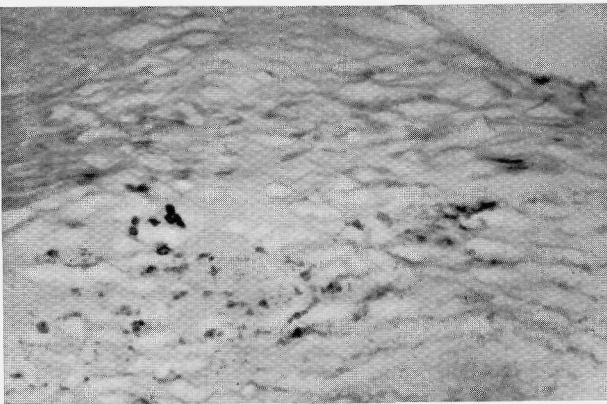


Fig. 15 Aorta stadium III; ♂ 61 jaar. Deel van een sterk verbindweefselde plaque met in de geringe hoeveelheid lipidenrij kalkdeeltjes die omgeven zijn door CAZA-positieve lipiden. CAZA 1 uur; 90 ×.

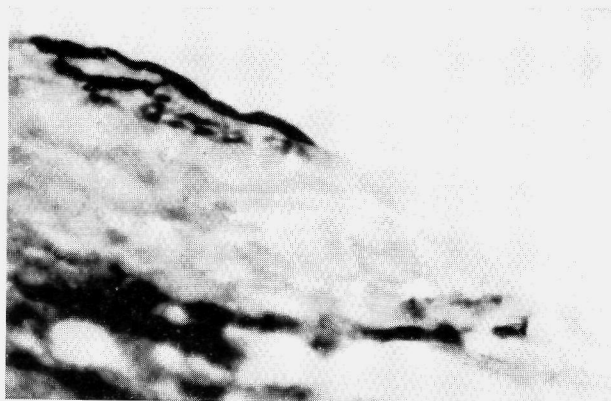


Fig. 16 Aorta stadium II; ♂ 58 jaar. Deel van een plaque waarvan de aan het lumen grenzende laag intensief CAZA-positief is; ook de dieper gelegen lagen van de bindweefselkap bevatten veel cholinehoudende fosfolipiden. CAZA 1 uur; 150 ×.



Fig. 17 Aorta stadium II; ♂ 58 jaar. Detail van de intensief gekleurde begrenzing van de plaque. CAZA 1 uur; 925 ×.

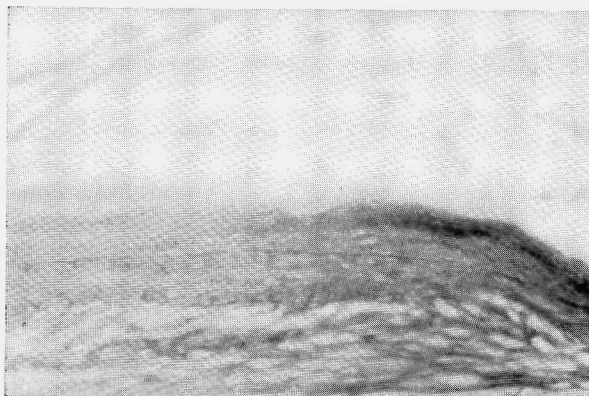


Fig. 18 Aorta stadium II; ♂ 58 jaar. Deel van een atheroom; de laesie zelf is vrijwel CAZA-negatief, terwijl zich aan de basis een ophoping van cholinehoudende fosfolipiden bevindt, afkomstig van gedegeneerde elastische lamellen. CAZA ½ uur; 100 ×.

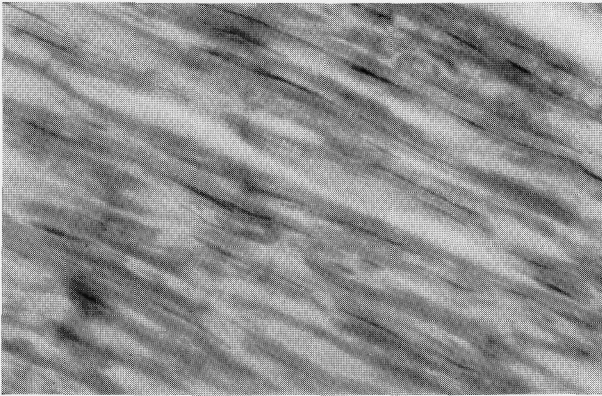


Fig. 19 Aorta stadium O; ♀ 2½ jaar. In de media van deze aorta zijn de gladde spiercellen duidelijker CAZA-positief dan de zwakker gekleurde elastische lamellen. CAZA 1 uur; 900 ×.

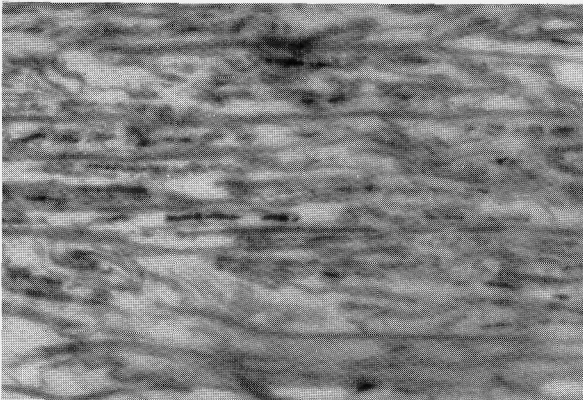


Fig. 20 Aorta stadium O; ♂ 14 jaar. Media met in de interlamellaire ruimten CAZA-positieve cellen van myogene oorsprong; ook de elastische lamellen zijn positief. CAZA ½ uur; 900 ×.

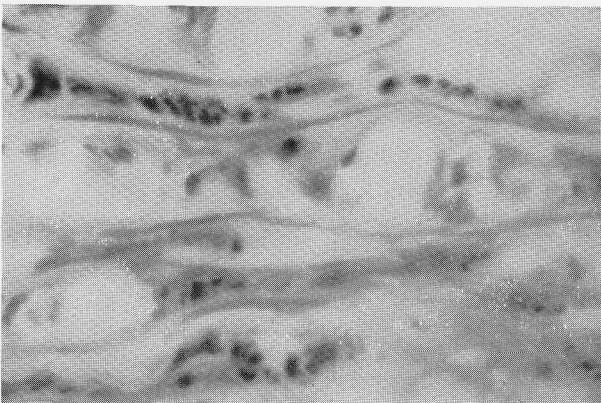


Fig. 21 Aorta stadium I; ♂ 22 jaar. Myogene cellen in de interlamellaire ruimten van de media: een deel van deze cellen vertoont overeenkomst met de cellen in het grensgebied van intima en media (fig. 4 en 5); elastische lamellen zijn eveneens CAZA-positief. CAZA 1 uur; 1150 ×.

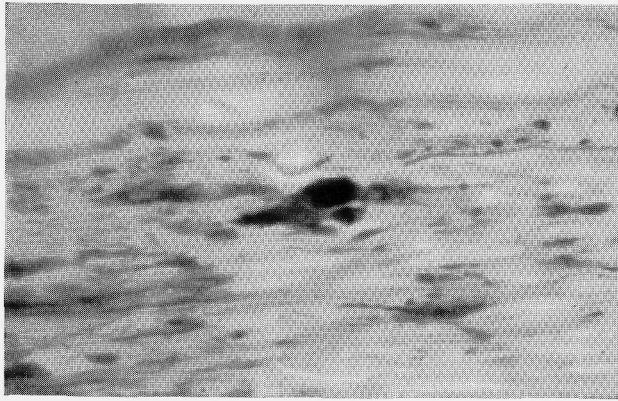


Fig. 22 Aorta stadium I; ♂ 22 jaar. Ophoping van cholinehoudende fosfolipiden onder een fragmentatie van elastische lamellen van de media; de er boven gelegen intima is normaal met positieve gladde spiercellen; de binnenste elastische membraan is zwak CAZA-positief. CAZA $\frac{1}{2}$ uur; 900 \times .

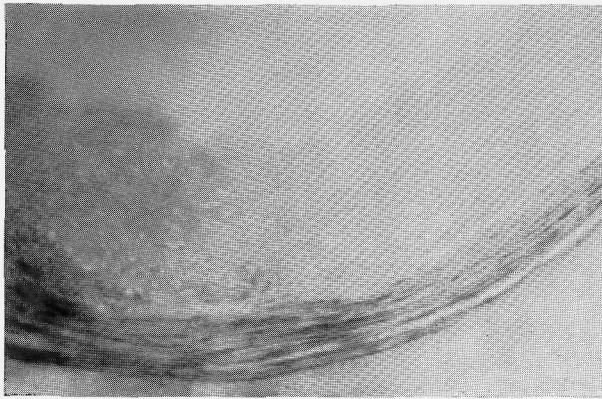


Fig. 23 Coronairarterie; ♀ 44 jaar. De intima is vele malen dikker dan de media en geheel CAZA-negatief; elastische elementen in de media zijn CAZA-positief. CAZA $\frac{1}{2}$ uur; 220 \times .

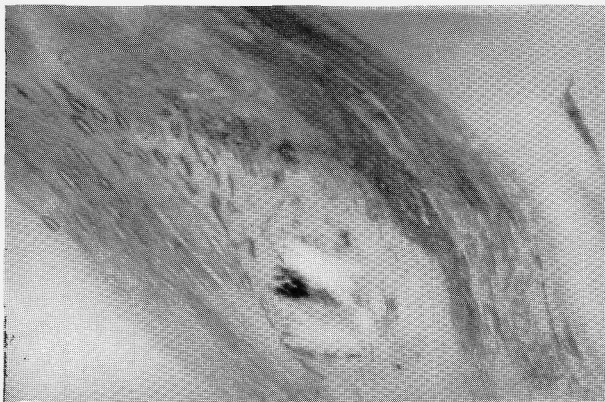


Fig. 24 Coronairarterie; ♂ 53 jaar. Gecalcificeerde plaque met CAZA-positieve fosfolipiden in de bindweefselkap en in de lipidenrij o.a. om kalkpartikeltjes heen; de media is in geringere mate positief. CAZA 1 uur; 90 \times .

elastische lamellen door anastomosen een soort netvormige structuur. Er komen vele kleine, ronde celkernen in voor die positief reageerden op CAZA; tevens bleken ze intensief kleurbaar met haematoxyline te zijn. Deze zelfde celkernen werden ook wel in de basis van fatty streaks gevonden. Anastomosen van de elastische lamellen van de media werden het meest aangetroffen onder fatty streaks.

5.3 DISCUSSIE

'relating static structure to a dynamic process is necessary but is hazardous . . .'¹

Zonder de resultaten die verkregen werden door toepassing van de histochemische CAZA-methode op de aortawand een kwantitatieve schijn te willen verlenen, zal het verkregen kwalitatieve beeld in verband gebracht worden met gegevens die door chemische analyse van vergelijkbaar materiaal ter beschikking staan. Een geval waarin kleuring en chemische analyse goed aansluiten wordt gevonden bij de fatty streaks en spots. Wij kunnen namelijk een verschil verklaren dat bij chemische analyses gevonden werd tussen het gehalte aan cholinehoudende fosfolipiden van fatty streaks die los geprepareerd werden van de aortawand en dat van de inhoud van fatty streaks die daaruit als het ware geschept werd. In het eerste geval werd onvermijdelijk een gedeelte van het omringende weefsel mee uitgesneden, terwijl in het tweede geval welbewust de beter samenhangende weefselstructuur aan de basis van de laesie niet inbegrepen was. Bij de chemische analyse van de fatty streaks als geheel werd in het totaal aan geëxtraheerde lipiden 35—55 % fosfolipiden aangetroffen waarvan 30—38 % lecithinen en ongeveer 30 % sfingomyelinen was (Böttcher 1963). Het verkregen lipidenmateriaal uit de eigenlijke inhoud van de fatty streak bestond voor slechts 9—13 % uit fosfolipiden, waarvan ongeveer de helft tot drie vierde gedeelte lecithinen, de rest sfingomyelinen was (Böttcher et al.: nog niet gepubliceerde resultaten). Dit verschil in analyseresultaten wordt begrijpelijk doordat histochemisch in de bij de inhoud in beperkte zin niet inbegrepen basis van de fatty streaks en spots het merendeel van de in geringe hoeveelheid gevonden cholinehoudende fosfolipiden aangetroffen werd.

De resultaten met CAZA zijn op histochemisch gebied te vergelijken met resultaten die Adams en Bayliss (1963a) verkregen door toepassing van

1. McGill en Geer, Evolution of the atherosclerotic plaque, pag. 65, ed. Jones, Chicago 1963.

de OTAN-methode voor fosfolipiden en de gewijzigde OTAN-methode voor sfigomyelinen op normale en atherosklerotische aorta's. Volgens deze auteurs zijn sfigomyelinen (met cholesterol) de karakteristieke lipiden van de aorta. Sfigomyelinen zijn gelocaliseerd in de elastische lamellen van de media — naar de opvatting van Adams (1964a) vanaf de geboorte — en in de basis van de zich ontwikkelende plaque.

Bij kleuring van coupes van aorta's met CAZA was de positieve reactie van de elastische lamellen eveneens het meest opvallende verschijnsel. Geen of zeer weinig cholinehoudende fosfolipiden waren echter aanwezig in de elastica van enkele weken oude individuen. In de basis van plaques werden cholinehoudende fosfolipiden aangetroffen die, evenals Adams en Bayliss dat voor OTAN-positieve fosfolipiden waarnamen, zeer duidelijk van gedegenererde elastische lamellen van de media afkomstig waren. Naast deze overeenkomsten bestaat als verschil tussen de resultaten met CAZA- en OTAN-methode de reactie van de gladde spiercellen die op CAZA duidelijk positief, op OTAN zwak of negatief was. Toepassing van beide methoden na voorafgaande verzeeping, waardoor zowel met OTAN als CAZA sfigomyelinen aangetoond worden, leverde weinig punten van overeenkomst op. Terwijl Adams en Bayliss uitsluitend sfigomyelinen vonden, was met CAZA het resultaat in de media wisselend en in de basis van de plaque vrijwel negatief. In de gladde spiercellen werden weliswaar door beide methoden sfigomyelinen aangetoond, maar doordat met CAZA het niet-verzepte uitgangsmateriaal veel intensiever reageerde, was het eindresultaat met CAZA veel duidelijker positief.

Men vraagt zich af waar Adams en Bayliss de glycerofosfolipiden situeren die bijvoorbeeld in de niet-atherosklerotische aorta bij chemische analyse als lecithinen voor 30—40 % van het totaal aan fosfolipiden en voor 15—30 % van het totaal aan lipiden aanwezig blijken te zijn (Böttcher et al. : nog niet gepubliceerde resultaten).

De reeds genoemde CAZA-positiviteit van de gladde spiercellen werd waargenomen zowel in de intima als in de media. In de normale intima, ook van de allerjongste aorta's, zijn de gladde spiercellen de enige elementen die cholinehoudende fosfolipiden bevatten. Dit maakt het aannemelijk dat deze lipiden een normaal bestanddeel van deze cellen zijn en zo ergens, dan zou in de gladde spiercellen een synthese van fosfolipiden kunnen plaats vinden. Synthese van fosfolipiden in situ werd door Zilversmit en McCandless (1959) waarschijnlijk gemaakt, doordat bij proefdieren zowel in de normale als de atherosklerotische aorta de incorporatie van radioactief gemerkt fosfor (P^{32} aangeboden in

de vorm van fosfaat en lipoproteïnen) onafhankelijk was van de concentratie van plasmafosfolipiden. Mede doordat voor afzetting van fosfolipiden uit het bloed in de aorta nooit een direct bewijs geleverd was, geloven deze auteurs in een synthese van fosfolipiden ter plaatse.

In de nog normale intima van een wat oudere aorta van stadium O (van een 14-jarige jongen) werden schuimcellen aangetroffen. In hoofdstuk 4 is uiteengezet dat in de normale intima alleen gladde spiercellen voorkomen en dat volgens French (1964) alle andere weefselementen daaruit gevormd zouden moeten zijn. De waargenomen schuimcellen zouden dus van myogene oorsprong moeten zijn en aangezien deze schuimcellen slechts zwak CAZA-positief reageerden, zou de transformatie van gladde spiercellen tot schuimcellen samen kunnen hangen met een storing in de fosfolipidensynthese.

Locale toename van het aantal schuimcellen doet de macroscopisch waarneembare fatty streaks ontstaan. Uitbreiding van reeds gevormde fatty streaks zou basaal in de laesie kunnen plaats vinden eveneens door overgang van gladde spiercellen, al dan niet vanuit de media (French 1964, hoofdstuk 4, par. 4.2 en Parker 1960) naar schuimcellen. In de basis van fatty streaks werden namelijk cellen aangetroffen die intensiever dan de schuimcellen CAZA-positief reageerden, wellicht doordat ze een tussenstadium in de omzetting van gladde spiercellen naar schuimcellen vertegenwoordigen. Het celtipe komt overeen met de beschrijving die Haust en More (1963) geven van de cellen die naast gladde spiercellen in zeer vroege fatty streaks voorkomen en door deze auteurs histocyten genoemd worden (histiocyten of macrofagen; schuimcellen zijn lipidenbevattende macrofagen). Haust en More namen met behulp van de electronenmicroscopie waar dat de eerste wijzigingen in de gladde spiercellen bestonden uit de afscheiding binnen de cel van aggregaties van lipiden. In dit verband kan de observatie van Klotz uit 1915 genoemd worden van vetgranulae in het protoplasma van gladde spiercellen in de media.

Van de ontwikkeling tot atherosklerotische laesies geven Haust en More de volgende voorstelling: na een verdere ontwikkeling van schuimcellen uit de gladde spiercellen kunnen de schuimcellen door ruptuur aanleiding geven tot het voorkomen van extracellulaire lipiden. De extracellulaire lipiden kunnen gefagocyteerd worden door macrofagen die op hun beurt te gronde gaan en daarbij de voor latere laesies typische lipidenbrij vormen.

Evenals Haust en More zijn McGill en Geer (1963) de mening toegedaan dat insluitsels van lipiden in gladde spiercellen karakteristiek zijn

voor de vroege fatty streaks; zij allen hebben de opvatting dat het gaan produceren van lipiden een afwijking is van het metabolisme van de gladde spiercellen. Uit onze eigen onderzoeken lijkt het echter waarschijnlijk dat synthese van fosfolipiden door de gladde spiercellen een normaal verschijnsel is, terwijl een vermindering van, of zelfs in het geheel geen productie van lipiden als één van de eerste uitingen van atherogenese beschouwd moet worden.

McGill en Geer verkregen van de meer uitgebreide fatty streaks in oudere aorta's een electronenmicroscopisch beeld dat van dat van de vroege fatty streaks verschilde door bijvoorbeeld het voorkomen van extracellulaire lipiden en een toegenomen hoeveelheid bindweefsel. Naar de mening van McGill en Geer bevindt dit soort laesies zich in een overgangsstadium van fatty streak naar plaque. In deze fase gaan andere processen dan alleen een verstoring van het lipidenmetabolisme van de gladde spiercellen een rol spelen: afzetting van fibrine, imbibitie van lipiden uit het plasma en bindweefselproliferatie vinden plaats.

Bij het onderzoek naar de CAZA-positiviteit van fatty streaks is gebleken dat enkele van deze laesies in de grenslaag met het lumen intensief CAZA-positief waren. Bij plaques was dit een normaal verschijnsel. Daarom kan aangenomen worden dat fatty streaks die in de grenslaag CAZA-positief zijn zich in een door McGill en Geer beschreven overgangsstadium naar plaque bevinden. Deze indruk wordt versterkt doordat bij dergelijke laesies een verhoogd aantal bindweefselementen aangetroffen werd. De CAZA-positieve fosfolipiden zouden de door McGill en Geer genoemde passief de aortawand binnengekomen lipiden uit het plasma kunnen vertegenwoordigen die dan reeds intracellulair opgenomen zijn.

Wij menen dat fagocytose van de geïmbibeerde plasmalipiden zou kunnen geschieden door cellen die later in de bindweefselkap van plaques aangetroffen worden en door vele auteurs macrofagen genoemd worden. Ook deze cellen moeten beschouwd worden als myogene cellen die evenwel secundair CAZA-positief geworden zijn (vergelijk Haust en More die denken aan fagocytose van de lipiden uit de primaire schuimcellen).

De voorstelling van de rol van de macrofagen komt gedeeltelijk in conflict met de opvattingen die Day (1962b) daarover heeft. Deze auteur komt op grond van een positieve reactie met Baker's zure haemateïne-methode tot de conclusie dat in de aortawand van konijnen de fosfolipiden in vroege en meer gevorderde laesies uitsluitend in macrofagen voorkomen. Eerder hadden Day en Fidge (1962a) vastgesteld dat macrofagen (reticulo-endotheliale cellen uit de peritoneale holte van ratten)

in vitro met C¹⁴ gemerkt natriumpalmitaat konden opnemen, waarvan het grootste gedeelte werd ingebouwd in triglyceriden en fosfolipiden. In combinatie met de door Zilvermit en McCandless (1959) waarschijnlijk gemaakte actieve synthese van fosfolipiden in de aortawand, beschouwt Day daarom de macrofagen als de cellen die de fosfolipidensynthese tot stand brengen. In een overzichtsartikel van Day (1964) betreffende de rol van de macrofagen in het atherosklerotische proces worden deze cellen niet alleen voor de synthese van fosfolipiden verantwoordelijk gesteld, maar ook de infiltratie van lipiden en het metaboliseren van de geïnfiltreerde lipiden wordt de macrofagen toebedeeld. Alleen met deze laatste veronderstelling kunnen wij instemmen. Bij de localisatie van de fosfolipidensynthese komt Day tot een onjuiste conclusie door de incorporatie van verzadigde vetzuren in fosfolipiden aan te willen tonen met een methode (met zure haemateïne) die niet specifiek is voor fosfolipiden en alleen onverzadigde verbindingen aantoonde. Wanneer wat Day macrofagen noemt inderdaad cellen van myogene afkomst zijn, is het eveneens onjuist deze cellen een rol toe te bedelen bij de infiltratie van lipiden. Ook kan de lipidensynthese van reticulo-endotheliale cellen uit de peritoneale holte dan niet in verband gebracht worden met die van macrofagen in de aortawand.

De uitbreiding aan de zijde van het lumen van fatty streaks tot plaques zou zoals eerder opgemerkt is, plaats kunnen vinden door imbibitie van plasmalipiden; daardoor zou proliferatie van bindweefsel optreden. Het zeer plaatselijke karakter van de CAZA-positiviteit wijst misschien meer op reeds georganiseerde microthrombi in de zin van Duguid (1957).

Basale uitbreiding van de fatty streaks zou, zoals hiervoor beschreven is, kunnen geschieden door een toename van myogene schuimcellen. In een later stadium leveren de elastische lamellen van de media een bijdrage tot de vorming van de zogenaamde lipidenbrij. In deze lipidenbrij werden rondom cholesterolnaalden en kalkpartikeltjes concentraties van cholinehoudende fosfolipiden, gedeeltelijk sfigomyelinen, waargenomen. Wellicht is hier de dispersie van cholesterol door fosfolipiden zichtbaar die door Zilvermit en McCandless (1959) gesuggereerd en door Adams et al. (1963b) vastgesteld werd na onderhuidse injectie van cholesterol en mengsels van cholesterol en fosfolipiden. Na dispersie van het cholesterol door de fosfolipiden traden bij de proeven van Adams et al. niet de sklerotische laesies op die door de inwerking van cholesterol alleen wel ontstonden. De omringing van cholesterolkristallen en kalkdeeltjes door cholinehoudende fosfolipiden is een aanwijzing voor het opheffen van een mechanische irritatie van het weefsel.

Door tweezijdig aangrijpende processen zou een fatty streak op de beschreven wijze in een plaque kunnen overgaan. Blijft om welke oorzaak dan ook het proces aan de zijde van het lumen achterwege, dan ontstaat een atheroom. Het enkele atheroom dat onderzocht werd, was histochemisch aan de bovenzijde volkomen vergelijkbaar met een in de grenslaag CAZA-negatieve fatty streak en basaal met een plaque door het voorkomen van lipidenbrij en gedegenererde elastische lamellen. In de lipidenbrij waren cholesterolnaalden omgeven door CAZA-positieve fosfolipiden, waardoor sklerogenese kennelijk achterwege gebleven was.

De mogelijkheid van plaquevorming via fatty streaks is waarschijnlijk niet de enige ontstaanswijze van dit soort laesies. De ophoping van CAZA-positieve lipiden die in een onder een normale intima gelegen media aangetroffen werd bij fragmentatie van de elastica, wijst misschien op een directe plaquevorming door degeneratie van elastische lamellen.

De reeds zeer vroeg optredende fragmentatie en duplicatie van de binnenste elastische membraan wordt door French (1964) verklaard door migratie van gladde spiercellen vanuit de media door de binnenste elastische membraan naar de intima. De verklaring van Gillman (1959) dat fragmentatie en duplicatie optreden door expansie tengevolge van de normale groei is veel minder geforceerd en daardoor geloofwaardiger. Wij verkregen de indruk dat het door deze auteur beschreven pseudo-elastine van de duplicaties geen cholinehoudende fosfolipiden bevatte.

5.4 SAMENVATTING EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

De topografie van cholinehoudende fosfolipiden in aorta's met een verschillende graad van atherosklerose kan als volgt in het kort beschreven worden:

1. CAZA-positief zijn in aorta's van stadium O:
 - gladde spiercellen in de intima en
 - gladde spiercellen en de elastische lamellen in de media.Incidenteel CAZA-positief zijn:
 - schuimcellen in de intima en
 - de binnenste elastische membraan.
2. Cholinehoudende lipiden in aorta's van stadium I komen voor in:
 - gladde spiercellen en schuimcellen in de intima,
 - schuimcellen in fatty streaks,
 - gladde spiercellen en de elastische lamellen van de media.

Soms positief zijn:

- de intercellulaire substantie van de intima en
- de binnenste elastische membraan.

3. Aorta's van stadium II bevatten CAZA-positieve fosfolipiden:

- in fatty streaks in schuimcellen,
- in plaques in cellen van de grenslaag met het lumen, in myogene schuimcellen en langs bindweefselementen, diffuus in de lipidenbrij en geconcentreerd om cholesterolnaalden en kalkpartikeltjes, in gedegeneerde elastische lamellen,
- in de media in gladde spiercellen en myogene cellen, tevens in de elastische lamellen.

4. De topografie van cholinehoudende fosfolipiden in stadium III komt overeen met de verdeling van deze lipiden in stadium II.

Laesies met complicaties werden niet onderzocht.

Door combinatie met de in de discussie (5.3) ter sprake gebrachte ideeën van andere auteurs komen wij tot de volgende hypothetische voorstelling omtrent de ontwikkeling van atherosklerotische laesies in de aortawand: Een afwijking in het metabolisme van de gladde spiercellen geeft aanleiding tot een gedeeltelijke of zelfs totale afname van de 'normale fosfolipidensynthese door de gladde spiercellen. Er ontstaan in deze cellen de, met behulp van de electronenmicroscopie waargenomen, aggregaties van lipiden. Transformatie van de gladde spiercellen tot schuimcellen vindt plaats. Locale ophopingen van schuimcellen vormen de vroege fatty streaks. Uitbreiding van deze vroege laesies geschiedt door toename van het aantal schuimcellen in de basis van de laesie, misschien door omzetting van myogene cellen uit de media. Een ontwikkeling van de fatty streaks tot plaques kan tot stand gebracht worden door imbibitie van plasmalipiden, die aan de zijde van het lumen de oorzaak zijn van bindweefselvorming. Door opname van plasmalipiden door schuimcellen kunnen deze cellen in de bindweefselkap secundair CAZA-positief worden. Aan de mediazijde ontstaat door degeneratie van schuimcellen en van elastische lamellen van de media de lipidenbrij van de plaque. Wanneer aan de zijde van het lumen geen bindweefselkap gevormd wordt, ontstaat een atheroom.

SAMENVATTING

Het eerste gedeelte van dit proefschrift geeft een beschrijving van histochemische methoden voor de bepaling van lipiden. Deze methoden werden kritisch onderzocht, waarbij bleek, dat van de reeds geruime tijd in gebruik zijnde methoden geen enkele voldoet aan eisen van specificiteit, localiserend vermogen of gevoeligheid voor de aan te tonen verbindingen.

In het bijzonder van de zure haemateïnekleuring voor fosfolipiden werd de specificiteit beproefd door toepassing op een aantal verzadigde en onverzadigde verbindingen uit verschillende klassen van lipiden. Hierbij werd vastgesteld dat de methode niet specifiek is voor fosfolipiden, maar dat behalve verzadigde en onverzadigde fosfolipiden ook, hoofdzakelijk onverzadigde, verbindingen uit andere klassen van lipiden een positieve reactie vertoonden. Van de aan de eigenlijke kleuring voorafgaande behandeling van de weefselcoupes met kaliumbichromaat werd de indruk verkregen dat voor het verloop van de daardoor teweeg gebrachte polymerisatie van onverzadigde verbindingen het aantal dubbele banden in de vetzuurketens van die verbindingen maatgevend is. De aanwezigheid van een fosfaatgroep of van hydroxylgroepen is mede bepalend voor kleur en kleurintensiteit van de door haemateïne met de gechromeerde verbindingen gevormde complexen.

Van de meer recente methoden bezitten de OTAN-kleuringen waarbij gebruik gemaakt wordt van kaliumchloraat en osmiumtetroxyde en van α -naphthylamine, een redelijke mate van specificiteit. Door toepassing van de oorspronkelijke OTAN-methode wordt een onderscheid verkregen tussen fosfolipiden en neutrale lipiden. Gaat aan de OTAN-methode een alkalische hydrolyse vooraf, dan is de kleuring specifiek voor sfigomyelinen. De PAN-methode voor de localisatie van cholesterol met perchloorzuur en naphthochinon betekent een grote vooruitgang ten opzichte van de oude bepalingsmethoden voor cholesterol in de histochemie van lipiden.

Experimenten die ons voerden tot een histochemische methode voor

de bepaling van cholinehoudende fosfolipiden met behulp van cis-aconietzuuranhydride (CAZA), zijn vermeld. Het uitgangspunt voor deze experimenten was een door onze werkgroep ontwikkelde kolorimetrische bepaling voor vrij en gebonden choline die afgeleid was uit een reeds bestaande methode voor kwaternaire ammoniumbasen. Localisatie van de cholinehoudende fosfolipiden werd tot stand gebracht door een, de reactie met CAZA niet in de weg staande, polymerisatiemethode met cobaltchloride en natriumperjodaat. Op het belang van een zorgvuldige dehydratatie van de weefselcoupes en eliminatie van de daarvoor toegepaste ethanol en op de noodzaak van het gebruik van objectglazen en kleurecuvetten van kwartsglas is gewezen. Van de cholinehoudende fosfolipiden worden de lyso-verbindingen waarschijnlijk niet gekleurd, zodat de histochemische CAZA-methode specifiek geacht mag worden voor lecithinen en sfingomyelinen.

De met deze CAZA-methode bereikte resultaten door toepassing op normale en atherosklerotische aorta's zijn in het tweede gedeelte van dit proefschrift vermeld. In verband hiermee zijn enkele morfologische aspecten van de aorta besproken.

De verkregen resultaten, gecombineerd met die van anderen, vooral op het gebied van de electronenmicroscopie, leidden ons tot de volgende hypothetische voorstelling omtrent de wijze waarop atherosklerotische laesies zich ontwikkelen:

Door een verstoring van de fosfolipidensynthese in de gladde spiercellen van de aortawand ontstaan aggregaties van lipiden in deze cellen als inleiding van een verdere transformatie tot schuimcellen. Door locale toename van het aantal schuimcellen ontstaan vroege fatty streaks. Deze breiden zich uit door vermeerdering van myogene schuimcellen in de basis van de laesies. Door een afzetting van lipiden uit het bloed in de begrenzing van de laesie met het lumen vindt bindweefselvorming plaats. De afgezette lipiden worden opgenomen door schuimcellen die daardoor secundair CAZA-positief worden. De voor een plaque typische bindweefselkap met fosfolipiden bevattende macrofagen is dan gevormd. De lipidenbrij kan ontstaan door degeneratie van basale schuimcellen en de daaronder liggende elastische lamellen van de media. In deze lipidenbrij wordt ten gevolge van dispersie van cholesterolkristallen en kalkdeeltjes door fosfolipiden een verdere sklerogenese tegengegaan. Wanneer aan de zijde van het lumen de vorming van bindweefsel achterwege blijft, wordt een atheroom gevormd.

Uit verdere onderzoekingen zal moeten blijken of deze werkhypothese een wijdere strekking heeft dan slechts het geven van een redelijke verklaring van de door ons gevonden resultaten.

SUMMARY

In part I of this thesis histochemical methods for the determination of lipids are described.

First of all the known classical methods, as there are Baker's acid-haematein test for phospholipids, Landing's phosphomolybdic acid method to show choline-containing phospholipids, Nile blue to distinguish phospholipids from neutral lipids, the Liebermann-Burchardt reaction as a method for cholesterol and the Sudan dyes for total lipids, are critically reviewed. None of these methods appeared to be as specific or to possess the localizing properties as the original authors had claimed. In particular the specificity of Baker's acid-haematein test was examined by applying it to a variety of saturated and unsaturated lipids. The method proved to show unsaturated lipids as well. There is a possibility that the number of double bonds in the fatty acid chains of the lipids determine their degree of polymerization, brought about by preceding treatment with potassium dichromate. The presence of hydroxyl or phosphate groups might be of influence on the shade and intensity of colour of the complex formed by haematein with the polymerized lipids.

Of the more recently developed staining procedures the OTAN methods are mentioned. The use of osmium tetroxide and α -naphthylamine together with potassium chlorate as a hydrophylic and stronger oxidizing agent leads to red-stained phospholipids and to black neutral lipids. Alkaline hydrolysis of the glycerophospholipids prior to application of the OTAN method makes it specific for sphingomyelins. Although these methods are not completely free from criticism they possess a relatively high specificity compared to the earlier methods. The perchloric acid-naphthoquinone reaction (PAN) is superior to all other methods for the histochemical localization of cholesterol.

The development of a method for choline-containing phospholipids, starting from a colorimetric determination by means of cis-aconitic anhydride (CAZA), is described. Localization of the choline-containing

phospholipids is effected by polymerizing them with the aid of cobaltous chloride and sodium periodate. Thus, no interference with the complex formation with CAZA occurs. Sections have to be carefully dehydrated and freed from the ethanol used for this purpose; the use of quartz slides and quartz staining vessels is essential. The staining reaction is performed in a solution of cis-aconitic anhydride in toluene/acetic anhydride for $\frac{1}{2}$ h to 1h at room temperature. As a result choline-containing phospholipids, probably with the exception of lyso-lecithins, form violet complexes.

In part II the distribution of choline-containing phospholipids in normal and atherosclerotic aortas is reported. The results can be summarized as follows:

1. In the undiseased, stage O, aorta a CAZA-positive reaction was observed in:

- smooth muscle cells of the intima and
- smooth muscle cells and the elastic lamellae of the media.

Sometimes positively stained were:

- foam cells in the intima and
- the internal elastic membrane.

2. Choline-containing phospholipids in stage I aortas were found in:

- smooth muscle cells and foam cells in the intima,
- foam cells in fatty streaks,
- smooth muscle cells and elastic lamellae of the media.

Occasionally stained were:

- the intercellular substance of the intima and
- the internal elastic membrane.

3. Choline-containing phospholipids in stage II aortas were found:

- in foam cells of the fatty streaks,
- in plaques intracellularly in the luminal margin, in myogenic foam cells (macrophages) and along connective tissue fibres, evenly spread in the undifferentiated mass of lipids with accumulations around cholesterol needles and deposits of calcium salts, in degenerated elastic lamellae,
- in the media in smooth muscle cells and myogenic cells as well as in the elastic lamellae.

4. The distribution in stage III aortas was identical to that in aortas of stage II; complicated lesions were not investigated.

The following hypothetical statements about the development of atherosclerotic lesions are put forward:

Due to a derangement in the phospholipid synthesis in the smooth muscle cells, a transformation to foam cells occurs via the stage of the electron-microscopically observable aggregations of lipids in the smooth muscle cells. An increase of the number of foam cells gives rise to an early fatty streak. Enlargement of these early fatty streaks occurs through an increase of myogenic cells at the basis of the lesion. At the luminal part of the lesion imbibition of plasma lipids can cause the formation of the fibrotic capsule of a plaque with secondary CAZA-positive foam cells (macrophages). Rupture of the basal foam cells and degeneration of medial elastic lamellae are the cause of the formation of the lipid mass in the plaque. In this lipid mass cholesterol needles and calcareous particles are dispersed by phospholipids, thus preventing their sclerogenic action. If, for some reason, the luminal fibrogenic process fails to come off an atheroma is formed.

Further investigations will be needed to firm up this hypothesis.

LITERATUUR

- ADAMS, C. W. M. (1959), A histochemical method for the simultaneous demonstration of normal and degenerating myelin, *J. Pathol. Bacteriol.* 77: 648, 1959.
- ADAMS, C. W. M. (1961), A perchloric acid-naphthoquinone method for the histochemical localization of cholesterol, *Nature* 192: 331, 1961.
- ADAMS, C. W. M. en O. B. BAYLISS (1963a), Histochemical observations on the localization and origin of sphingomyelin, cerebroside and cholesterol in the normal and atherosclerotic human artery, *J. Pathol. Bacteriol.* 85: 113, 1963.
- ADAMS, C. W. M., O. B. BAYLISS, M. Z. M. IBRAHIM en M. W. WEBSTER Jr. (1963b), Phospholipids in atherosclerosis: the modification of the cholesterol granuloma by phospholipid, *J. Pathol. Bacteriol.* 86: 431, 1963.
- ADAMS, C. W. M. (1964a), in: *Biological aspects of occlusive vascular disease*, pag. 134, ed. Chalmers en Gresham, Cambridge, 1964.
- ADAMS, C. W. M. (1964b), Persoonlijke mededeling.
- AYER, J. P. (1964), Elastic tissue, *International Review of Connective Tissue Research* 2: 40, 1964, ed. Hall, New York en London.
- BAKER, J. R. (1946), The histochemical recognition of lipine, *Quart. J. Microscop. Sci.* 87: 441, 1946.
- LA BELLA, F. S. (1958), Characterization of Schiff-positive substances in elastic fibres, *J. Histochem. Cytochem.* 6: 260, 1958.
- BERENBAUM, M. C. (1958), The histochemistry of bound lipids, *Quart. J. Microscop. Sci.* 99: 231, 1958.
- BERTENSEN, S. (1964), Studies in connective tissue in the human aortic wall. *Biological aspects of occlusive vascular disease*, pag. 32, ed. Chalmers en Gresham, Cambridge, 1964.
- BÖTTCHER, C. J. F., J. G. KEPPLER, C. CH. TER HAAR ROMENY-WACHTER, E. BOELSMA-VAN HOUTE en C. M. VAN GENT (1958), Analysis of lipids of the arterial wall, *Lancet* II: 1207, 1958.
- BÖTTCHER, C. J. F., F. P. WOODFORD, E. BOELSMA-VAN HOUTE en C. M. VAN GENT (1959), Methods for the analysis of lipids extracted from human arteries and other tissues, *Rec. Trav. Chim.* 78: 794, 1959.
- BÖTTCHER, C. J. F., F. P. WOODFORD, C. CH. TER HAAR ROMENY-WACHTER, E. BOELSMA-VAN HOUTE en C. M. VAN GENT (1960a), Fatty-acid distribution in lipids of the aortic wall, *Lancet* I: 1378, 1960.
- BÖTTCHER, C. J. F., E. BOELSMA-VAN HOUTE, C. CH. TER HAAR ROMENY-WACHTER, F. P. WOODFORD en C. M. VAN GENT (1960b), Lipid and fatty-acid composition of coronary and cerebral arteries at different stages of atherosclerosis, *Lancet* II: 1162, 1960.

- BÖTTCHER, C. J. F. en C. M. VAN GENT (1961a), Changes in the composition of phospholipids and phospholipid fatty acids associated with atherosclerosis in the human aortic wall, *J. Atherosclerosis Res.* 1: 36, 1961.
- BÖTTCHER, C. J. F., C. PRIES en C. M. VAN GENT (1961b), A rapid and sensitive colorimetric microdetermination of free and bound choline, *Rec. Trav. Chim.* 80: 1169, 1961.
- BÖTTCHER, C. J. F. (1963), Phospholipids of atherosclerotic lesions in the human aorta. *Evolution of the atherosclerotic plaque*, ed. Jones, Chicago, 1963.
- BÖTTCHER, C. J. F. en E. BOELSMA-VAN HOUTE (1964), Method for the histochemical identification of choline-containing phospholipids, *J. Atherosclerosis Res.* 4: 109, 1964.
- CAIN, A. J. (1947), The use of Nile Blue in the examination of lipoids, *Quart. J. Microscop. Sci.* 88: 383, 1947.
- CAIN, A. J. (1950), The histochemistry of lipoids in animals, *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.* 25: 73, 1950.
- CASSELMAN, B. W. G. (1954), Acetylated Sudan Black B as a more specific histochemical reagent for lipids, *Quart. J. Microscop. Sci.* 95: 321, 1954.
- CHAYEN, J., L. BITENSKY en C. LONG (1964), The acid haematin method and the detection of masked lipid. *Second International Congress of Histo- and Cytochemistry*, pag. 148, ed. Schiebler, Pearse en Wolff, Berlin, 1964.
- CHENG, K-K. (1956), Experimental studies on the mechanism of the total distribution of beryllium liver necrosis, *J. Pathol. Bacteriol.* 71: 265, 1956.
- CHIFFELLE, T. L. en F. A. PUTT (1951), Propylene and ethylene glycol as solvents for Sudan IV and Sudan Black B, *Stain Technol.* 26: 51, 1951.
- CLARK, L. P. Jr. en H. THOMPSON (1948), A new series of reagents for the colorimetric determination of steroids, *Science* 107: 429, 1948.
- CLAYTON, B. P. (1958), Unmasking of Sudanophil lipid in the testis of the house-cricket, *Acheta dom.*, *Quart. J. Microscop. Sci.* 99: 453, 1958.
- CLAYTON, B. P. (1959), The action of fixatives on the unmasking of lipids, *Quart. J. Microscop. Sci.* 100: 269, 1959.
- DAWSON, R. M. C. (1960), A hydrolytic procedure for the identification and estimation of individual phospholipids in biological samples, *Biochem. J.* 75: 45, 1960.
- DAY, A. J. en N. H. FIDGE (1962a), The uptake and metabolism of C¹⁴-labeled fatty acids by macrophages *in vitro*, *J. Lipid Res.* 3: 333, 1962.
- DAY, A. J. (1962b), The relationship of arterial macrophages to the phospholipid content in rabbit atheroma, *J. Atherosclerosis Res.* 2: 350, 1962.
- DAY, A. J. (1964), The macrophage system, lipid metabolism and atherosclerosis, *J. Atherosclerosis Res.* 4: 117, 1964.
- DUGUID, J. B. (1957), The pathogenesis of arterial narrowing, *Bull. schweiz. Akad. med. Wiss.* 13: 73, 1957.
- DUNNIGAN, M. G. (1964), The distribution of phospholipid within macrophages in human atheromatous plaques, *J. Atherosclerosis Res.* 4: 144, 1964.
- EDGAR, G. W. F. en C. H. M. DONKER (1957), Influence of lipid solvents on sphingolipids (sphingomyelins, cerebroside, gangliosides) in tissue sections, *Acta Neurol. Psychiat. Belg.* 57: 451, 1957.
- ELFTMAN, H. (1954), Controlled chromation, *J. Histochem. Cytochem.* 2: 1, 1954.
- ELFTMAN, H. (1958), Effect of fixation in lipid histochemistry, *J. Histochem. Cytochem.* 6: 317, 1958.

- FIESER, L. F. en M. FIESER (1944), in: *Organic chemistry*, pag. 398, Heath en Co., Boston, 1944.
- FRENCH, J. E. (1964), The structure of the tunica intima of arteries. *Biological aspects of occlusive vascular disease*, pag. 24, ed. Chalmers en Gresham, Cambridge, 1964.
- MCGILL, H. C. en J. C. GEER (1963), The human lesion, fine structure. *Evolution of the atherosclerotic plaque*, pag. 65, ed. Jones, Chicago, 1963.
- GILLMAN, T. (1959), Reduplication, remodeling, regeneration, repair, and degeneration of arterial elastic membranes, *A.M.A. Arch. Pathol.* 67: 624, 1959.
- GRUNDLAND, I., H. BULLIARD en M. MAILLET (1949), Détection histochimique du cholestérol par emploi du trichlorure de bismuth en solution dans le nitrobenzène anhydre, *Compt. Rend. Soc. Biol.* 143: 771, 1949.
- HACK, M. H. (1953), Analysis of lipids by spot test on filter-paper disk chromatograms, *Biochem. J.* 54: 602, 1953.
- HANES, C. S. en F. A. ISHERWOOD (1949), Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram, *Nature* 164: 1107, 1949.
- HAUST, M. D. en R. H. MORE (1963), Significance of the smooth muscle cell in atherogenesis. *Evolution of the atherosclerotic plaque*, pag. 51, ed. Jones, Chicago, 1963.
- HESLINGA, F. J. M. (1957), *De bichromaatbeitsing en de kleurbaarheid van gebeitst lipoid onderzocht met behulp van reflectometrie*. Dissertatie, Leiden, 1957, pag. 35 e.v.
- HOWARD, H. T. en G. R. RAMAGE (1960), Dyes derived from phenazine, phenoxazine and phenothiazine, and sulphur dyes. *Chemistry of carbon compounds*, deel IV C, pag. 1546, ed. Rodd, Amsterdam, 1960.
- KAUFMANN, C. en E. LEHMANN (1926), Kritische Untersuchungen über die Spezifitätsbreite histochemischer Fettdifferenzierungsmethoden, *Zentr. Allgem. Pathol. Pathol. Anat.* 37: 145, 1926.
- KLOTZ, O. (1915), Fatty degeneration of the intima of arteries, *J. med. Research* 32: 27, 1915.
- KLÜVER, H. en E. BARRERA (1953), A method for the combined staining of cells and fibres in the nervous system, *J. Neuropathol. Exptl. Neurol.* 12: 400, 1953.
- KLÜVER, H. en E. BARRERA (1954), On the use of azoporphin derivatives (phthalocyanines) in staining nervous tissue, *J. Psychol.* 37: 199, 1954.
- KNAYSI, G. (1941), On the use of basic dyes for the demonstration of the hydrolysis of fat, *J. Bacteriol.* 42: 587, 1941.
- KUTT, H., D. LOCKWOOD en F. McDOWELL (1959a), The lipid and protein staining properties of Sudan II, III and IV and their components, *Stain Technol.* 34: 197, 1959.
- KUTT, H., D. LOCKWOOD en F. McDOWELL (1959b), Decomposition of Sudan Black B by ultraviolet light and gases, its lipid and protein staining properties, *Stain Technol.* 34: 203, 1959.
- LANDING, B. H., L. L. UZMAN en A. WHIPPLE (1952), Phosphomolybdic acid as a staining reagent for lipids, *Lab. Invest.* 1: 456, 1952.
- LANSING, A. I., T. B. ROSENTHAL, M. ALEX en E. W. DEMPSEY (1952), The structure and chemical characterization of elastic fibres as revealed by elastase and electron microscopy, *Anat. Record* 114: 555, 1952.
- LANSING, A. I. (1959), Elastic tissue. *The arterial wall*, pag. 145, ed. Lansing, Baltimore, 1959.

- LAWSON, W. H. (1936), Elastic tissue staining. A modification of the Weigert-Sheridan method, *J. Technical Methods and Bull. Internat. Ass. Medical Museums* 16: 42, 1936.
- LEHNINGER, A. L. (1959), The metabolism of the arterial wall. *The arterial wall*, pag. 220, ed. Lansing, Baltimore, 1959.
- LEVINE, C. en E. CHARGAFF (1951), Procedures for the micro-estimation of nitrogenous phosphatide constituents, *J. Biol. Chem.* 192: 465, 1951.
- LISBERG, M. F. (1962), Chromotrope 2R and phosphomolybdic acid as differential stains for connective and muscular tissues, *Acta Anat.* 50: 296, 1962.
- LILLIE, R. D. (1944), Various oil soluble dyes as fat stains in the supersaturated isopropanol technic, *Stain Technol.* 19: 55, 1944.
- LISON, L. (1936), *Histochimie Animale*, Paris, 1936.
- LORRAIN SMITH, J. (1907), On the simultaneous staining of neutral fat and fatty acid by oxazine dyes, *J. Pathol. Bacteriol.* 12: 1, 1907/08.
- MCMANUS, J. F. A. en R. W. MOWRY (1960), Orcein stain for elastica. *Staining methods. Histologic and histochemical*, pag. 239, Hoeber, U.S.A., 1960.
- MENSCHIK, Z. (1953), Nile Blue histochemical method for phospholipids, *Stain Technol.* 28: 13, 1953.
- MOMMAERTS, W. F. H. M. (1959), Perspectives in the study of arterial muscle. *The arterial wall*, pag. 46, ed. Lansing, Baltimore, 1959.
- NIEKERK, H. P. G. A. VAN (1961), *Kwantitatieve aspecten van de tricomplexkleuring van fosphatiden*. Dissertatie, Leiden, 1961.
- PARISH, W. E. (1964), The distribution of mast cells and the possible function of some of their pharmacological agents. *Biological aspects of occlusive vascular disease*, pag. 84, ed. Chalmers en Gresham, Cambridge, 1964.
- PARKER, F. (1960), An electron microscopic study of experimental atherosclerosis, *Am. J. Pathol.* 36: 19, 1960.
- PEARSE, A. G. E. (1962), Hoofdstuk XI uit *Histochemistry. Theoretical and applied*, Churchill, London, 1962.
- SACHS, E. S. (1965), Persoonlijke mededeling.
- SACKS, N. (1954), Preliminary observations on the structure of elastic fibres. Some chemical properties of elastic fibres, *S. African J. Med. Sci.* 19: 135, 165 en 166, 1954.
- SALTHOUSE, T. N. (1962a), A quantitative histochemical method for estimating phospholipids, *Nature* 195: 187, 1962.
- SALTHOUSE, T. N. (1962b), Luxol fast blue ARN: A new solvent azo dye with improved staining qualities for myelin and phospholipids, *Stain Technol.* 37: 313, 1962.
- SALTHOUSE, T. N. (1964a), Luxol fast blue G as a myelin stain, *Stain Technol.* 39: 123, 1964.
- SALTHOUSE, T. N. (1964b), Differential solubility of Luxol-phospholipid complexes: Solvent dependent staining reactions, *J. Histochem. Cytochem.* 12: 35, 1964.
- SASS, S., J. J. KAUFMAN, A. A. CARDENAS en J. J. MARTIN (1958), Colorimetric estimation of tertiary and quaternary amines, *Anal. Chem.* 30: 529, 1958.
- SCHULTZ, A. (1924/25), Eine Methode des mikrochemischen Cholesterinnachweises am Gewebsschnitt, *Zentr. Allgem. Pathol. Pathol. Anat.* 35: 314, 1924/25.
- SERRA, J. A. (1958), Cytochemical demonstration of masked lipids, *Science* 128: 28, 1958.

- INGH, R. (1964), Observations on Menschik's Nile Blue sulphate method for histochemical detection of phospholipids, *J. Histochem. Cytochem.* 12: 42, 1964.
- THORPE, J. F. (1907), A reaction of certain colouring matters of the oxazine series, *J. Chem. Soc.* 91: 324, 1907.
- UEDA, M. (1952), Histochemical studies of lipids. I. Histochemical examination of Gaucher's disease, *Hyogo J. med. Sci.* 1: 17, 1952.
- WEIGERT, C. (1896), Die Markscheidenfärbung, *Erg. Anat. Entw.* 6: 3, 1896.
- WHEELDON, L. W. en F. D. COLLINS (1958), Studies on phospholipids. 3. Determination of choline, *Biochem. J.* 70: 43, 1958.
- World Health Organ. (1958), *Tech. Rep. Ser.* No. 143: Classification of atherosclerotic lesions.
- ZILVERSMIT, D. B. en E. L. McCANDLESS (1959), Independence of arterial phospholipid synthesis from alterations in blood lipids, *J. Lipid Res.* 1: 118, 1959.
- ZINZADSE, S. R. (1930), Mikrobestimmung von Phosphor- und Arsensäure mit Molybdänblau. Anwendung auf Bodenauszüge, *Z. Pflanzenernaehr. Dueng. Bodenk.* 15: 129, 1930.

CURRICULUM VITAE

Gevolg gevend aan de wens van de Faculteit der Wiskunde en Natuurwetenschappen beschrijf ik hier in het kort mijn universitaire opleiding en de daarop volgende loopbaan in academisch verband. Na een middelbare schoolopleiding in mijn geboortestad Rotterdam aan de 4de Gem. H.B.S. met 5-jarige cursus B — thans Willem de Zwijger H.B.S. — liet ik mij in 1948, het jaar van mijn eindexamen, inschrijven als studente in de biologie aan de Rijkuniversiteit te Leiden. In 1952 behaalde ik het candidaatsexamen in die studierichting, waarna ik ter voorbereiding van het doctoraal examen de zoölogie als hoofdvak koos. Onder leiding van de hoogleraren dr. D. J. Kuenen en dr. H. P. Wolvekamp verrichtte ik praktisch werk in de experimentele zoölogie, respectievelijk op oecologisch en fysiologisch terrein. Een histologisch onderzoek vormde het aandeel in de studie voor de beschrijvende zoölogie bij professor dr. C. J. van der Klaauw. Voor het bijvak botanie bewerkte ik zowel praktisch als theoretisch een onderwerp op het gebied van de plantenfysiologie. Het praktische werk, dat werd uitgevoerd in het Laboratorium voor Medische Chemie, stond onder dagelijkse leiding van dr. W. L. Loeven en onder supervisie van de hoogleraren wijlen dr. T. H. van den Honert en dr. H. L. Booy. De studie in het bijvak fysische chemie geschiedde onder leiding van professor dr. C. J. F. Böttcher. In 1955 legde ik het doctoraal examen af.

Kort daarna werd ik, in dienst van de Gezondheidsorganisatie T.N.O., betrokken bij het onderzoek naar de chemische aspecten van atherosclerose en coronair-thrombose, dat onder leiding van professor dr. C. J. F. Böttcher in verschillende laboratoria van de Rijksuniversiteit te Leiden werd uitgevoerd en thans wordt voortgezet in het Gaubius Instituut van de Universiteit.

Aanvankelijk lag mijn werk op het gebied van de fysisch-chemische scheidingsmethoden voor de analyse van lipiden uit de vaatwand. Enige jaren geleden verlegde ik mijn onderzoekingen naar histochemisch terrein. De resultaten die met dit laatste werk bereikt zijn, werden in dit proefschrift vastgelegd.

Gaarne wil ik mijn collega's bedanken voor hun raadgevingen op chemisch gebied die mij als bioloog van veel nut geweest zijn. In het bijzonder dr. C. Pries ben ik zeer erkentelijk voor zijn adviezen bij het ontwikkelen van de 'CAZA-methode' en voor zijn hulp bij het tot stand komen van dit proefschrift.

De voor het onderzoek benodigde aorta's werden afgestaan door het Pathologisch Laboratorium der Rijksuniversiteit te Leiden. Aldaar kreeg ik ook enige jaren de gelegenheid tot het verrichten van mijn onderzoek. Voor deze faciliteiten betuig ik mijn dank, evenals voor de ondervonden gastvrijheid van de afdeling Histologie van het Zoölogisch Laboratorium.