

Die kliniese belang van fosfolipiede in longpatologie

D. H. VAN PAPENDORP, F. M. ENGELBRECHT

Summary

The phospholipid composition of 35 human lungs with pathological lesions was analysed by means of thin-layer chromatography and densitometric scanning. The pathological conditions studied were: bronchopneumonia, myocardial infarction, chronic heart failure, chronic obstructive airway disease and tuberculosis. The phospholipid composition was compared with that of a control group consisting of sudden death cases (due to unnatural causes), i.e. relatively normal lungs.

The phospholipid composition of the lungs in a specific pathological group showed the same pattern. However, significant differences were observed between corresponding phospholipid fractions from lungs in the various pathological groups. Compared with the lipid fractions from relatively normal lungs, these differences were even more marked. From the results it would appear that the abnormal composition of the phospholipid fractions might possibly be a cause of lung pathology. The increase and/or decrease in individual fractions and abnormal ratios between fractions might indicate abnormalities in the biosynthesis and catabolism of the lung phospholipids.

Further research is necessary to elucidate the association of phospholipids with lung pathology. Phospholipid analysis of lung lavages and lung biopsies could be helpful in the diagnosis of lung diseases. Phospholipids in aerosol form could perhaps be used in treating certain lung disorders.

S. Afr. med. J., 60, 176 (1981).

Fosfolipiede is belangrike strukturele komponente van selmembrane. Hulle speel 'n belangrike rol in die handhawing van die sellulêre argitektuur sowel as in die regulering van iontransport en deurlaatbaarheid¹ van membrane.

Veranderinge in die fosfolipiedsamestelling van weefsels word tans al hoe meer belangrik aangesien hulle 'n direkte verband toon met die abnormale biologiese gedrag van selmembrane.²⁻⁴ Daar kan dus geredelik aanvaar word dat enige afwyking in die sellulêre struktuur 'n verband met die membraan-gebonde fosfolipiedinhoud mag hê. Met ander woorde, abnormale fosfolipiedveranderinge mag die argitektuur en funksie van die membraan belemmer.

Op grond van bogenoemde is fosfolipiedontledings op patologiese menslonge gedoen en vergelyk met relatief normale

longe. Die volgende verskillende patologiese toestande is ondersoek: (i) brongopneumonie; (ii) miokardiale infarksie; (iii) chroniese hartversaking (kongestiewe); (iv) chroniese obstruktiwe lugwegsiekte; en (v) tuberkulose.

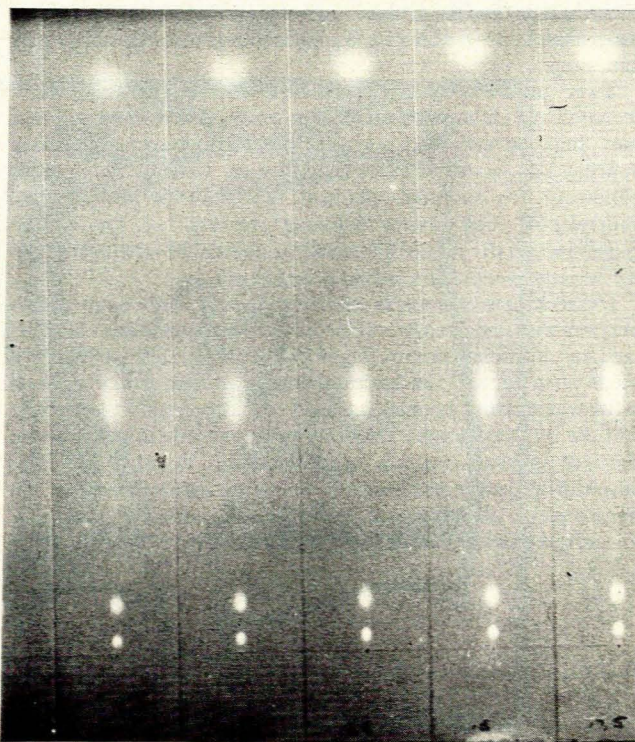
Gevalle van skielike, onnatuurlike dood (relatief normale longe) is ook ontleed om 'n vergelykende verband met die patologiese longe te verkry.

Metodes

Alle nekropsiemonsters is vanaf die long-apices se periferie geneem. Ná ontvangs van die monster is dit deeglik in 'n 0,9% soutoplossing gespoel om bloedkontaminasie te beperk. Daarna is dit in 1 x 1 mm blokkies gesny en tussen kladpapier gedroog.

Van die longweefsel is 1 g afgeweeë en 20 ml van 'n 2:1 chloroform/metanolmengsel is daarby gevoeg. Die blokkies longweefsel is vir 4 minute met 'n Ultra Turrax gehomogeniseer en die lipiede vir 12 uur in 'n yskas by 4°C geëkstraheer. Die metode van Folch *et al.*⁵ vir die ekstraksie en suiwering van die lipiede is gevolg.

Die ekstrakt is gefiltreer deur vetvrye filtreerpapier en het lipiede sowel as nie-lipiedkontaminante bevat. Om van die wateroplosbare nie-lipiedkontaminante ontslae te raak, is 5 ml van 'n 0,29% natriumchloriedoplossing by die filtraat gevoeg, die mengsel goed geskud en vir 24 uur gelaat om in twee fases te skei. Die boonste fase, wat die wateroplosbare nie-lipiedkontaminante bevat, word afgesuig en verwyder. Die onderste



Afb. 1. Chromatografie van die standaard fosfolipiedfraksies.

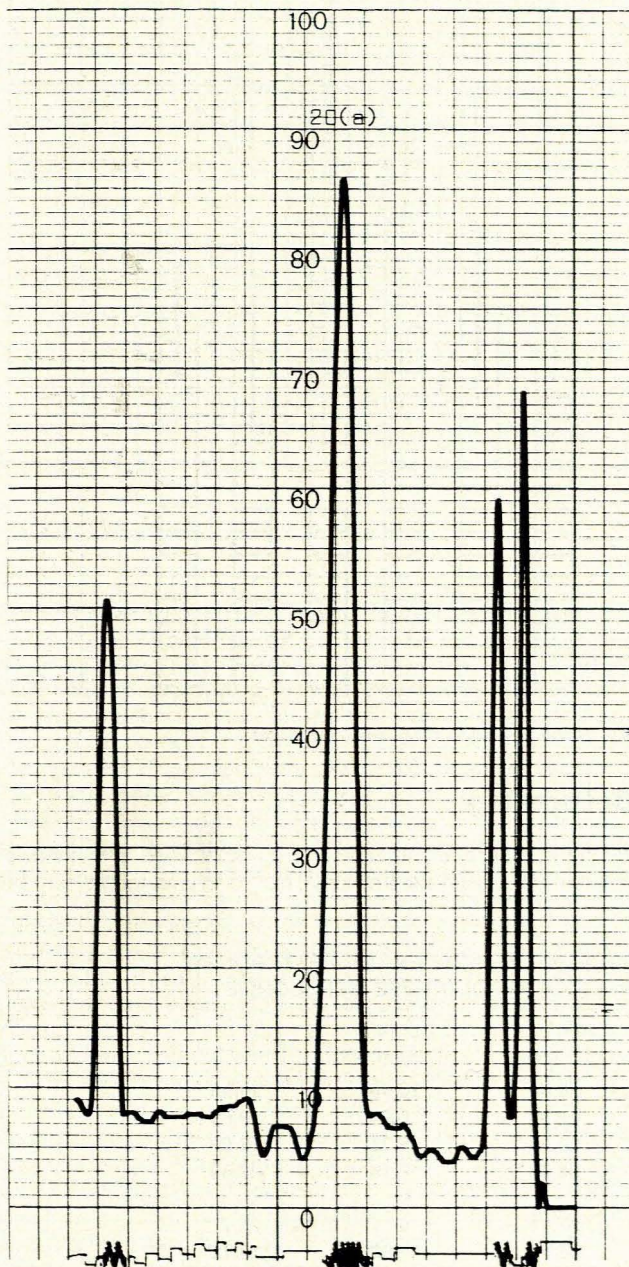
Departement Geneeskundige Fisiologie en Biochemie,
Universiteit van Stellenbosch, Parowvallei, KP
D. H. VAN PAPENDORP
F. M. ENGELBRECHT

fase (lipiede) word drooggedamp, in 'n dessikator geplaas, geweeg en na die verlangde konsentrasies opgemaak.

Skeiding van die fosfolipiedfraksies is met dunlaag-chromatografie uitgevoer volgens die metode van Owens.⁶

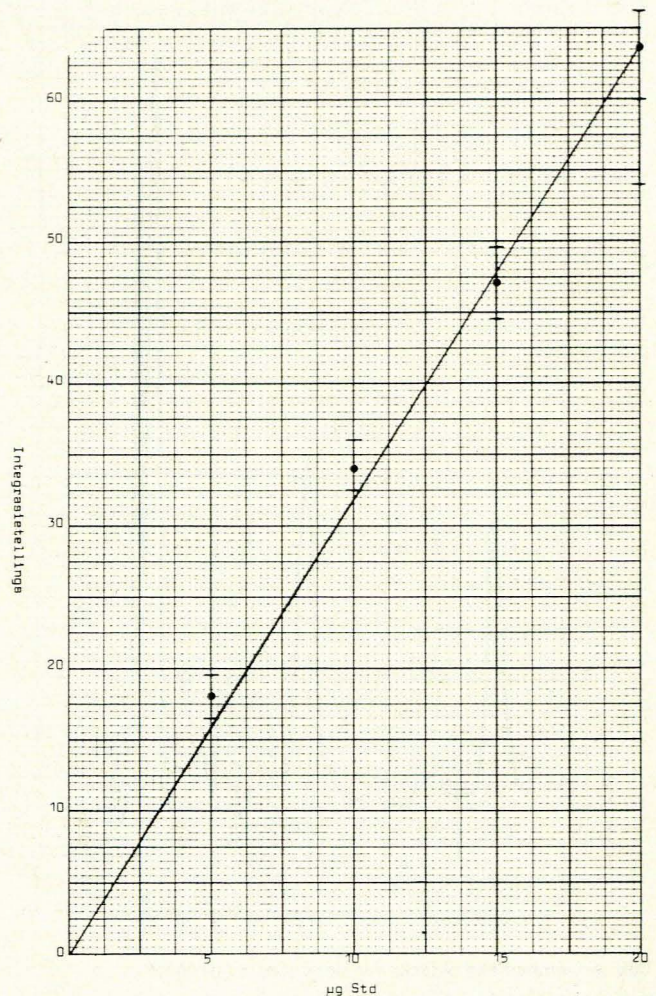
Standaard fosfolipiedoplossings (Supelco) in konsentrasies van 5, 10, 15 en 20 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ is in triplaak op geaktiveerde nie-fluoreserende silika-gel-plate (Merck) aangewend. Die standaard lipiedmengsel het gelyke konsentrasies van lisofosfatidielcholien (lisolesitien), fosfatidielcholien (lesitien), fosfatidieletanolamien en cholesterol in chloroform opgelos, bevat.

Die fosfolipiedfraksies op die plate is deur middel van 'n twee-fase-tegniek geskei. Vir die eerste fase is 'n chloroform : metanol : water : asynsuur (65:43:3:1) mengsel gebruik. Hierna is die plate drooggedamp en 'n tweede fase bestaande uit petroleum : diëtleter : asynsuur (80:20:1) vir volledige skeiding aangewend. Hierna is die plate met Primulien in asetoon (1 mg%) behandel^{7,8} waardeur die individuele fosfolipiedfraksies fluoreserend onder ultravioletlig geword het (Afb. 1).



Afb. 2. Skandeerpatroon van standaardoplossing.

Die fluoreserende fosfolipiedfraksies is met behulp van 'n Flying Spot Vitatron Densitometer TLD 100, gekoppel met 'n elektroniese integreerder, geskandeer^{9,10} (Afb. 2). Op grond van die integrasietellings is standaard grafieke teenoor elke konsentrasie fosfolipied opgestel (Afb. 3 vir fosfatidielcholien).



Afb. 3. Standaardkurwe II (fosfatidielcholien).

Die fosfolipiedfraksies (10 en 20 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$) van die geëkstraheerde nekropsie-longmonsters is deur dieselfde prosedures geskei en geskandeer. Op grond van hul integrasietellings is die konsentrasie (μg lipied) van elke fraksie bereken.

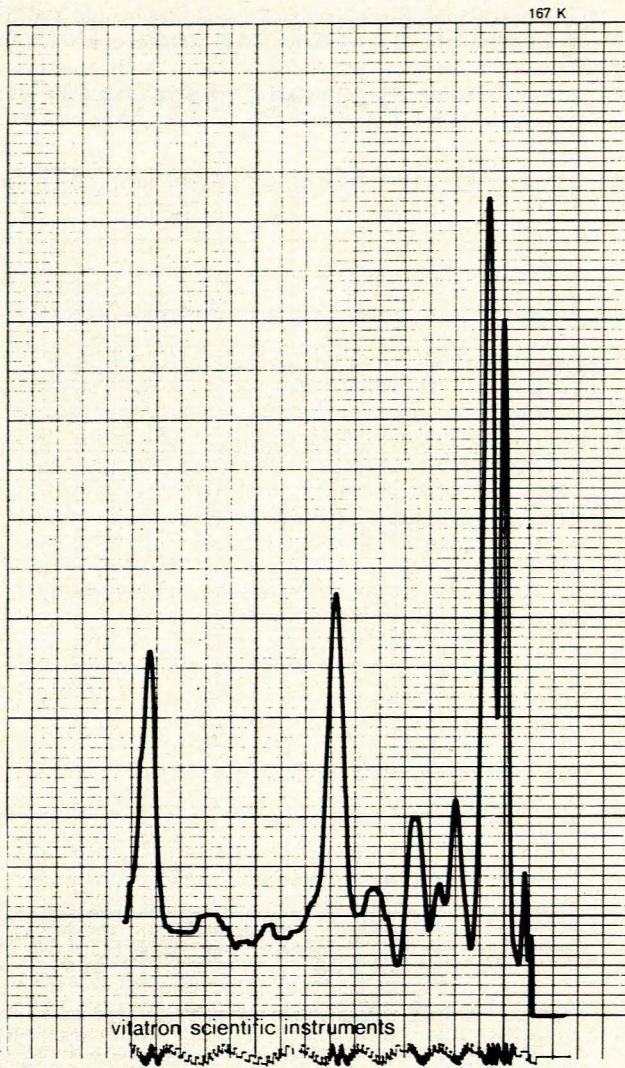
Resultate

Die lipiede van alle relatief normale longe (gevalle van skielike dood) gee op analise vyf fosfolipiedfraksies met die huidige metode nl. sfingomiëliën, fosfatidielcholien, fosfatidielserien, fosfatidielinositol en fosfatidieletanolamien (Afb. 4). Lipiede geëkstraheer uit patologiese longe het in die meeste gevalle slegs vier fraksies getoon; òf fosfatidielinositol òf fosfatidielserien was afwesig.

Die resultate in terme van die persentasie-verspreiding van die drie belangrike fosfolipiedfraksies en van cholesterol van normale en patologiese longe is in Tabel I opgesom.

Wanneer die fosfolipiedfraksies van normale en patologiese longe op 'n persentasiebasis vergelyk word, blyk die volgende:

1. Die sfingomiëliënfraksies is in alle patologiese longe hoër as in normale longe. Hierdie fraksie is egter in brongopneumonie die hoogste.



Afb. 4. Onnatuurlike oorsake van dood (relatief normaal).

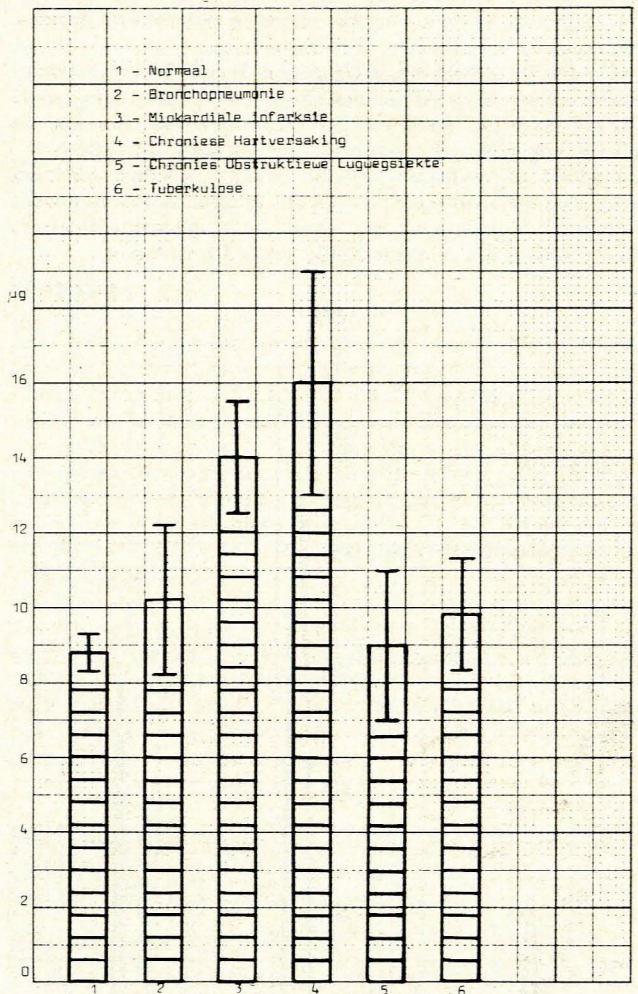
2. Die fosfatidielcholienfraksie is aansienlik verlaag in pasiënte met brongopneumonie. In pasiënte oorlede a.g.v. miokardiale infarksie is hierdie fraksie feitlik normaal.

3. Die fosfatidietanolamienfraksie is in alle patologiese longtoestande drasties verlaag. In chroniese obstruktiweweg siekte is dit totaal afwesig en in miokardiale infarksie bedra die waarde slegs die helfte van die normale.

Wanneer die sfingomiëlien : fosfatidielcholien-verhouding van die lipiedfraksies uit die verskillende patologiese longe vergelyk word, blyk dit dat: (i) normale en tuberkulose longe 'n

verhouding van ongeveer 1 : 1,3 het; (ii) in miokardiale infarksie, chroniese hartversaking en chroniese obstruktiweweg siekte hierdie verhouding ongeveer 1 : 1 is; en (iii) in brongopneumonie hierdie verhouding drasties verlaag is en dat dit slegs 1 : 0,56 bedra.

Die kwantitatiewe waardes van die verskillende fosfolipiedfraksies van die patologiese longe is vir vergelykende doeleindes in Afb. 5 - 7 opgesom.



Afb. 5. Vergelykende sfingomiëlienwaardes.

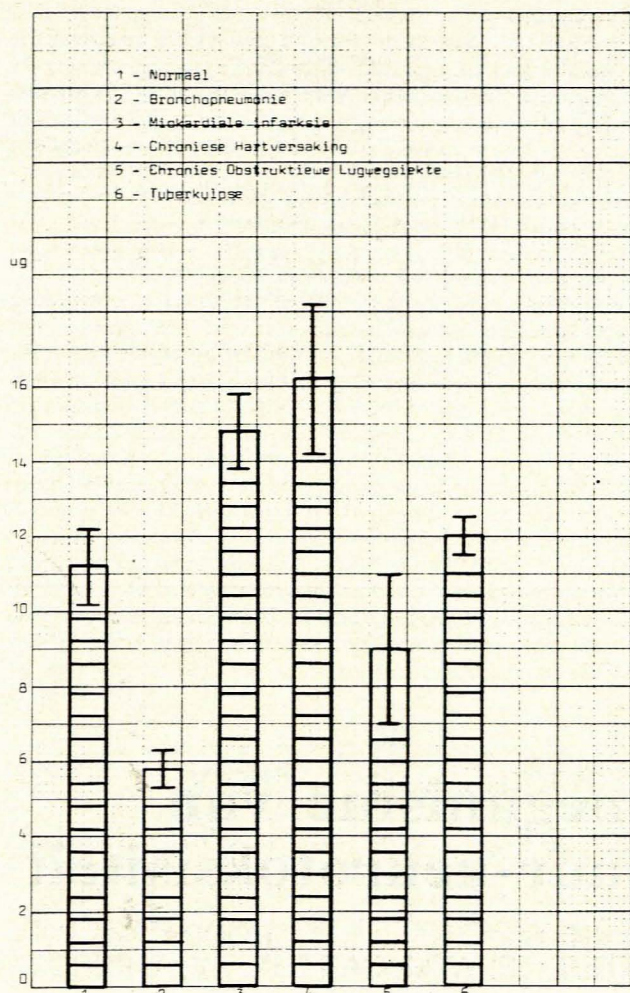
Bespreking

By die verskillende patologiese longsiektes word 'n toename of afname in fosfolipiedfraksies óf 'n verandering in die

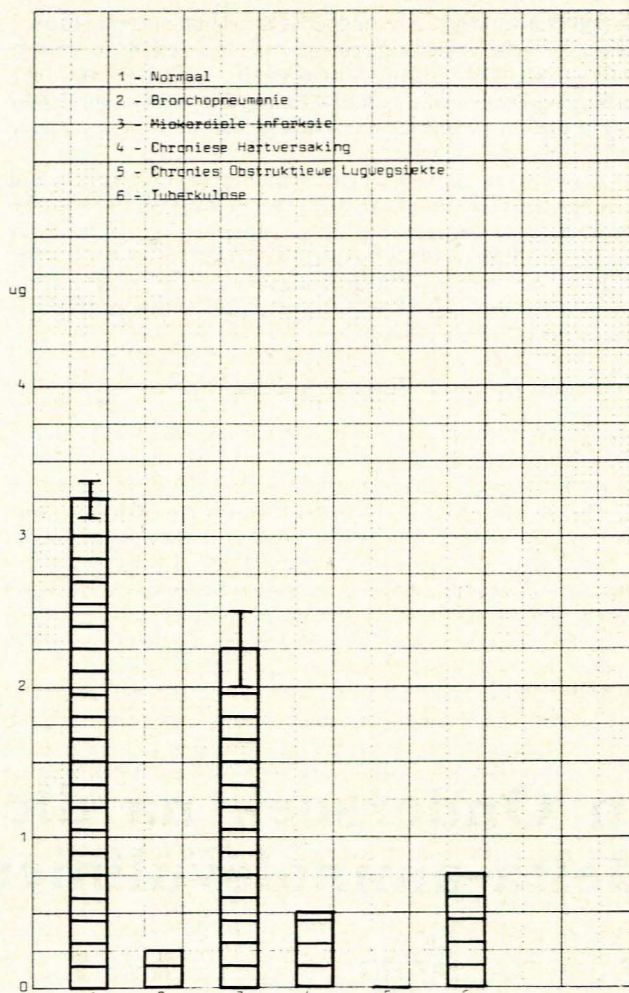
TABEL I. PERSENTASIE-VERSPREIDING VAN FOSFOLIPIEDE EN CHOLESTEROL IN GEÛKSTRAHEERDE LIPIEDE UIT NORMALE EN PATOLOGIESE MENSLONGE

	Sfingomiëlien	Fosfatidielcholien	Fosfatidietanolamien	Cholesterol
Normaal	28,00	36,00	10,40	25,60
Brongopneumonie	39,81	22,33	0,91	36,89
Miokardiale infarksie	33,14	34,91	5,33	26,63
Chroniese hartversaking	37,87	38,46	1,18	22,49
Chroniese obstruktiweweg siekte	37,11	37,11	0	25,77
Tuberkulose	35,07	43,17	1,98	19,78

* Slegs drie fosfolipiedfraksies word hier weergegee waarvoor standaardse beskikbaar was.



Afb. 6. Vergelykende fosfatidielcholieenwaardes.



Afb. 7. Vergelykende fosfatidieleetanolamienwaardes.

fosfatidielcholieen : sfgomiëliën-verhouding waargeneem. Die interpretasie van die kliniese verband van hierdie verandering met die patologiese prosesse in die long is baie moeilik. Dit wil egter voorkom asof hierdie veranderinge verband moet hou met òf die snelheid van biosintese van die verskillende fosfolipiedfraksies òf te wyte is aan die strukturele veranderinge van die weefsels en membrane tydens die patologiese toestand. Die waargenome veranderinge mag egter van groot kliniese betekenis wees omdat daar reeds bevestig is dat 'n lesitien : sfgomiëliën-verhouding van 2 : 1 in amnionvog 'n aanduiding is van die alveolêre stabiliteit en maturiteit van die fetale long.¹¹

Die relatiewe verhoging in die persentasie sfgomiëliën in die lipiede van patologiese longe ondersoek, dui daarop dat die biosintese-prosesse vir hierdie fraksie òf versnel is òf dat daar 'n akkumulasie van hierdie fraksie in die weefsels en membrane plaasvind. Geen verklaring kan in die literatuur gevind word vir hierdie relatiewe verhoging in sfgomiëliën in patologiese longtoestande nie.

Wanneer die resultate kwantitatief beoordeel word (Afb. 5), is hierdie fraksie slegs in gevalle van miokardiale infarksie en chroniese hartversaking statisties hoër as die normale waarde. Die persentasie-verspreiding van fosfatidielcholieen in die verskillende longsiektetoestande toon 'n uitgesproke verlagings van hierdie fraksie in bronchopneumonie-gevalle. Kwantitatief beoordeel bestaan daar ook 'n verlagings in hierdie fraksie in gevalle van chroniese obstruktiwiese lugwegsteekte (Afb. 6). Hierdie twee toestande word gekenmerk deur hipowentilasie met asidose, longstuwings, oedeem, gedeeltelike atelektase en soms 'n

selryke eksudaat. Al hierdie faktore, maar veral hipoksie, het 'n direkte onderdrukkende effek op lipiedsintese.^{12,13} Laasgenoemde faktor sal beide die CDP-choliensintese-pad asook die metilasie-pad^{14,15} onderdruk en kan dus moontlik 'n verklaring bied vir die verlaagde konsentrasie van fosfatidielcholieen in hierdie gevalle.

Die feitlik normale persentasie-verspreiding van die fosfatidielcholieenfraksie by pasiënte oorlede aan miokardiale infarksie (Tabel I) kan moontlik verklaar word a.g.v. die kort oorlewingsyd van hierdie pasiënte. Die biologiese halflewe van fosfatidielcholieen is ± 14 uur.^{11-13,16}

Die persentasie-verspreiding van fosfatidieleetanolamien is in alle patologiese gevalle bestudeer drasties verlaag, behalwe in miokardiale infarksie waar slegs 'n 31% verlagings voorkom (Afb. 7), d.w.s. in alle chroniese longsiektes is hierdie fraksie beduidend verlaag. Dit wil dus voorkom asof die metilasie-pad van fosfatidieleetanolamien-sintese via fosfatidieserien moontlik onderdruk mag wees in chroniese toestande. In gevalle van miokardiale infarksie, waar die dood skielik ingetree het, was die verlagings minder uitgesproke.

Wanneer die lesitien : sfgomiëliën-verhoudings krities beoordeel word, is dit opmerklik dat by normale longweefsel (gevalle van skielike dood) 'n verhouding van 1 : 1,3 gevind word. 'n Dergelike verhouding word ook in die longe van pasiënte met tuberkulose gevind. In al die ander longsiektetoestande is hierdie verhouding ongeveer 1 : 1 behalwe in bronchopneumonie waar 'n verhouding van 1,0 : 0,56 gevind is. In gevalle van respiratoriese noodsindroom (hialienmembraansiekte) word 'n kleiner

verhouding van lesities : sfigomiëliën in amnionvog aangetref, soos ook hierbo in die longe van pasiënte met brongopneumonie gekry is. Dit dui waarskynlik daarop dat die fosfolipiedmetabolisme tydens brongopneumonie erg versteur is. Dit mag 'n bydraende oorsaak wees van sterfte van pasiënte wat aan hierdie toestand ly.

Op grond van ons voorlopige bevindings wil dit voorkom asof fosfolipiedanalise klinies van baie groot belang mag wees. Indien toegepas op longspoele, kan dit inligting verskaf wat tot beter diagnose en selfs tot nuwe terapeutiese prosedures mag lei. Sulke analises kan selfs op longbiopsiemonsters uitgevoer word. Toediening van surfaktant (fosfolipiede) deur middel van aërosol, word reeds gedoen.

Ons dank aan mej. E. Badenhorst vir haar hulp en samewerking.

VERWYSINGS

- Guidotti, G. (1972): *Arch. intern. Med.*, **129**, 194.
- Baum, K. F. en Beckman, D. L. (1976): *J. Trauma*, **16**, 782.
- Emara, S. H., El-Hawary, M. F., Abel-Karim, H. A. *et al.* (1976): *S. Afr. med. J.*, **50**, 1792.
- Emmelot, P. (1973): *Eur. J. Cancer*, **9**, 310.
- Folch, J., Lees, M. en Sloane Stanley, G. H. (1957): *J. biol. Chem.*, **226**, 497.
- Owens, K. (1966): *J. Biochem.*, **100**, 354.
- Skipski, V. P. (1975): *Gen. analyt. Methods*, **47**, 396.
- Wright, R. S. (1971): *J. Chromatogr.*, **59**, 220.
- Schute, J. B. (1970): *Pharm. Weekbl.*, **105**, 1025.
- Vitatron Manual TLD 100.
- Gluck, L. (1971): *Clin. Obstet. Gynec.*, **14**, 710.
- Morgan, T. E. (1971): *New Engl. J. Med.*, **284**, 1185.
- Scarpelli, E. M. (1969): *Advanc. Pediat.*, **16**, 177.
- Harper, H. A. (1971): *Review of Physiological Chemistry*, p. 271. Los Altos, Calif: Lange Medical Publications.
- White, A., Handler, P. en Smit, E. L. (1964): *Principles of Biochemistry*, p. 463. New York: McGraw-Hill.
- Van Golde, L. M. G. (1976): *Amer. Rev. resp. Dis.*, **114**, 977.

'n Ondersoek na die meganisme van delta-aminolevuliniensuur-neurotoksisiteit

J. J. F. TALJAARD, M. C. L. LAMM, L. TRUTER, B. W. McCARTHY, V. A. PERCY, A. C. NEETHLING

Summary

The neurotoxicity of δ -aminolaevulinic acid (ALA), porphobilinogen (PBG), glutamic acid, γ -aminobutyric acid and kainic acid was compared in order to investigate the possibility of a common neurotoxic mechanism. Only ALA (10 μ M) and glutamic acid (1 mM) were toxic towards neurons in culture, as measured by cell survival after 5 days' exposure. 3 H-kainic acid binds to striatal membranes with an equilibrium dissociation constant (K_D) of 57 nM and the number of binding sites was found to be 20 pmol/g striatal tissue. However, neither of the porphyrin precursors could displace kainic acid from these binding sites. Kainic acid alone caused neuronal degeneration after

intra-striatal administration, as determined by 3 H-spiroperidol binding to striatal membranes. The porphyrin precursors ALA and PBG thus do not share a common neurotoxic mechanism with the well-known neurotoxin kainic acid.

S. Afr. med. J., **60**, 180 (1981).

'n Kenmerk van die aangebore hepatiese porfirieë is die wye spektrum neurologiese simptome wat tydens die akute aanval kan voorkom. Die simptome kan wissel van akute abdominale pyn tot kwadriplegie, respiratoriese versaking en psigiatriese stoornisse.¹ Vele hipoteses is al voorgestel om die ontstaan van die neurologiese abnormaliteite te verklaar, maar twee teorieë het veral in die afgelope paar jaar baie aandag geniet. Intracellulêre uitputting van heem in neurone en/of glia as gevolg van spesifieke ensiemblokke in die heem-biosintetiese weg met sekondêre sellulêre dood word deur sommige navorsers voorgestel.² 'n Direkte neurotoksiese werking van die porfiriëvoorloper δ -aminolevuliniensuur (ALA) en/of porfobilinogeen (PBG) word ook as 'n moontlike meganisme beskou.¹ Soos die naam porphyria variegata impliseer, presenter die siektetoestand met 'n wye verskeidenheid simptome en 'n kombinasie van bogenoemde twee meganismes is moontlik die ware toedrag van sake.

MNR-Navorsingsgroep vir Neurochemie, Departement
Chemiese Patologie, Universiteit van Stellenbosch en
Tygerberg-hospitaal, Parowvallei, KP

J. J. F. TALJAARD, M.B. CH.B., M.D.

M. C. L. LAMM, DIP. MED. TEG. (CHEM. PAT.)

L. TRUTER, DIP. MED. TEG. (CHEM. PAT.)

B. W. McCARTHY, DIP. MED. TEG. (CHEM. PAT.), F.S.M.L.T.

V. A. PERCY, M.S.C., PH.D.

A. C. NEETHLING, M.S.C., PH.D.