

Die jahreszeitliche Abhängigkeit der hochungesättigten Fettsäuren $C_{22:5}$ und $C_{22:6}$ in den Gesamtphosphatiden, dem Lecithin und dem Phosphatidyläthanolamin der Netzhaut 10 Tage alter Kaninchen

H. Weiss

I. Universitäts-Augenklinik Wien
Abteilung für experimentelle Ophthalmologie
(Vorstand: Prof. Dr. K. Hruby)

A. Graf

Laboratorium Etapharm Wien

Eingegangen am 17. April 1972

The Seasonal Dependence of the Polyunsaturated Fatty Acids $C_{22:5}$
and $C_{22:6}$ in the Phospholipids, the Lecithin and the Ethanolamine
Phosphoglyceride of the Retina of 10 Days Old Rabbits

Summary. The seasonal dependence of the fatty acids $C_{22:5}$ and $C_{22:6}$ in the phospholipids, the lecithin and the ethanolamine phosphoglyceride in the retina of ten day old rabbits was investigated. The ethanolamine phosphoglyceride has the highest content in $C_{22:5}$ and $C_{22:6}$. Moreover the share of both of these fatty acids shows in the ethanolamine phosphoglyceride modifications in correlation to the season. The quotient $C_{22:6}/C_{22:5}$ was a significant parameter for the characterization of these results.

Zusammenfassung. Die jahreszeitliche Abhängigkeit der Fettsäuren $C_{22:5}$ und $C_{22:6}$ in den Gesamtphosphatiden, im Lecithin und im Phosphatidyläthanolamin der Netzhaut bei 10 Tage alten Kaninchen wurde untersucht. Das Phosphatidyläthanolamin ist als der Hauptträger von $C_{22:5}$ und $C_{22:6}$ anzusehen. Darüber hinaus zeigt der Anteil dieser beiden Fettsäuren im Phosphatidyläthanolamin signifikante jahreszeitlich bedingte Verschiebungen, zu deren Charakterisierung der Quotient $C_{22:6}/C_{22:5}$ herangezogen wird.

Einleitung

In einer früheren Arbeit (Weiss und Graf) haben wir die Phosphatidkomponente der reifenden Kaninchennetzhaut untersucht. Als Kriterium der Reifung wurde das Verhältnis der Phosphatidfraktionen zueinander sowie das Fettsäurebild der Gesamtphosphatide gewählt. Der prozentuelle Anteil der langkettigen Fettsäuren $C_{22:5}$ und $C_{22:6}$ zeigte während der

postnatalen Reifung der Kaninchenretina charakteristische Veränderungen. Darüber hinaus fanden wir bei Tieren, die im Sommer geboren wurden, die Fettsäuren in einer anderen Größenordnung als bei Tieren, deren Geburt im Winter erfolgt war.

Da die beiden Hauptfraktionen Lecithin (L) und Phosphatidyläthanolamin (PÄ) etwa 75% der Gesamtposphatide ausmachen (Weiß und Graf, Anderson u. Mitarb., Broekhuysse), wurde in der vorliegenden Arbeit die Verteilung von $C_{22:5}$ und $C_{22:6}$ in diesen Fraktionen und den Gesamtposphatiden untersucht. Die Analysen wurden an Netzhäuten von Kaninchen am 10. Lebenstag vorgenommen, da zu diesem Zeitpunkt im Reifeprozess eine wesentliche Veränderung zu verzeichnen ist. Die Fettsäuren wurden über ein Jahr verteilt — von November 1970 bis November 1971 — monatlich bestimmt, um über die bisherige Einteilung „Sommertiere — Wintertiere“ hinaus den biologischen Ablauf mit größerer Kontinuität erfassen zu können.

Tiermaterial

Es wurden nur Tiere der Rasse „Gelb-Silber“ verwendet, die in freistehenden Käfigen geboren worden waren. Zum Zeitpunkt der Tötung waren in den Sommermonaten die Lidspalten bereits geöffnet, in den Wintermonaten noch geschlossen. Jede Bestimmung umfaßte die Netzhäute von 4—5 Tieren des gleichen Wurfes.

Methodik

Die Extraktion der Netzhäute und die Reinigung der Lipide wurde, wie bereits beschrieben (Weiss und Graf) durchgeführt. Die analytischen Methoden zur Charakterisierung der Extrakte — Bestimmung des Gesamt-P, Abtrennung der Phosphatide und Umesterung der Fettsäuren aus den Glycerophosphatiden — wurden ebenfalls der früheren Arbeit entnommen. Zusätzlich haben wir L und PÄ isoliert und nach Umesterung die Fettsäuremethylester dieser beiden Fraktionen gaschromatographisch bestimmt.

Isolierung von L und PÄ

4—5 mg Gesamtextrakt wurden auf einer Kieselgel-G-Platte in einer 8—10 cm langen Startlinie aufgetragen. Die Entwicklung des Chromatogrammes erfolgte mit CHCl_3 — CH_3OH — H_2O im Verhältnis 65:25:4 (Wagner u. Mitarb.) ca. 40 min lang aufsteigend. Nach dem Trocknen der Platte im Vakuumexsiccator für 10 min wurde diese mit einer 0,1%igen alkoholischen Rhodamin B-Lösung besprüht. Unter einer UV-Lampe erfolgte die Markierung der Zonen, die dem L und dem PÄ entsprechen. Das Kieselgel der betreffenden Areale wurde von der Platte abgeschabt, in eine Schliffprouvette überführt und mit 3 ml CH_3OH versetzt.

Die Umesterung der Fettsäuren erfolgte nach der Methode von Doss und Oette. Für die Gaschromatographie wurden die Fettsäuremethylester aus L und PÄ in 60 bzw. 40 μl PE (40—60°) gelöst; davon wurden 0,5—1,0 μl für eine Analyse verwendet. Die Bestimmung und Berechnung der einzelnen Werte erfolgte in der bereits beschriebenen Weise.

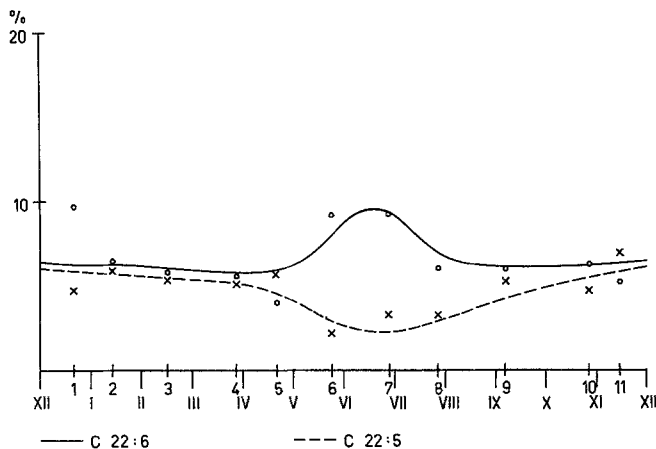


Abb. 1. Prozentuelle Verteilung von C_{22:6} und C_{22:5} in den Fettsäuren der Gesamtphosphatide der Netzhaut 10 Tage alter Kaninchen

Wir haben in der vorhergehenden Arbeit (Weiss und Graf, 1971) zwei langkettige, ungesättigte Fettsäuren als X und Y (relative Retentionszeit 6,06 und 6,92) bezeichnet. In der Zwischenzeit konnten diese Fettsäuren durch Chromatographie auf Kieselgelplatten, die mit AgNO₃ imprägniert waren, als C_{22:4} (X) und C_{22:5} (Y) identifiziert werden.

Ergebnisse¹

In den Gesamtphosphatiden steigt der Gehalt an C_{22:6} von Anfang Mai bis Mitte Juni kontinuierlich an. In der ersten Augusthälfte ist C_{22:6} wieder auf die Winterwerte abgesunken. Die signifikante Steigerung ist auf die Monate Mai-Juni-Juli beschränkt, die höchste Zunahme beträgt 50—60%. Die Abnahme von C_{22:5} verläuft im gleichen Zeitraum spiegelbildlich in einer vergleichbaren Größenordnung (Abb. 1). Im PÄ beginnt der Anteil von C_{22:6} schon im Monat April zuzunehmen und erreicht Mitte Juni mit einem Anstieg um 100% sein Maximum. Erst im Oktober kehrt C_{22:6} wieder zu den Winterwerten zurück. Beim C_{22:5} beobachtet man eine kontinuierliche Abnahme von Dezember bis Juni und sodann ein gleichmäßiges Ansteigen zu den Winterwerten, die im November erreicht sind. Der Grad der Abnahme beträgt ebenfalls 100% mit dem Maximum zu Ende Mai bis Anfang Juni (Abb. 2). Im L lassen sich die jahreszeitlichen Veränderungen, wie sie für die Gesamtphosphatide und das PÄ bei C_{22:5} und C_{22:6} gefunden wurden, nicht nachweisen. Aufgrund des geringen Gehaltes an diesen beiden hochungesättigten

¹ In den Abbildungen geben die arabischen Zahlen den Zeitpunkt der Untersuchungen im Verlauf der mit römischen Ziffern bezeichneten Monate an.

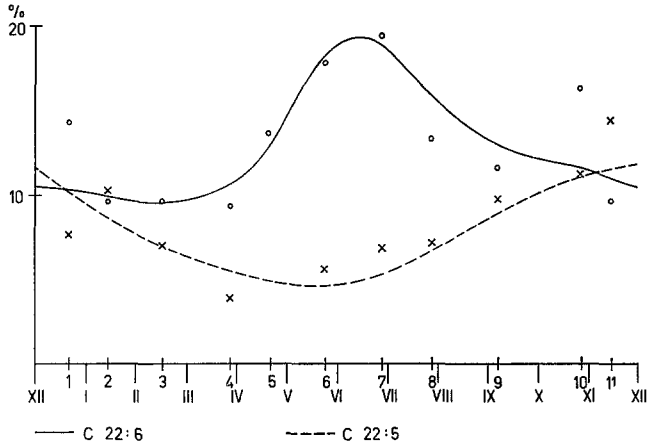


Abb. 2. Prozentuelle Verteilung von $C_{22:6}$ und $C_{22:5}$ in den Fettsäuren des Phosphatidylethanolamins der Netzhaut 10 Tage alter Kaninchen

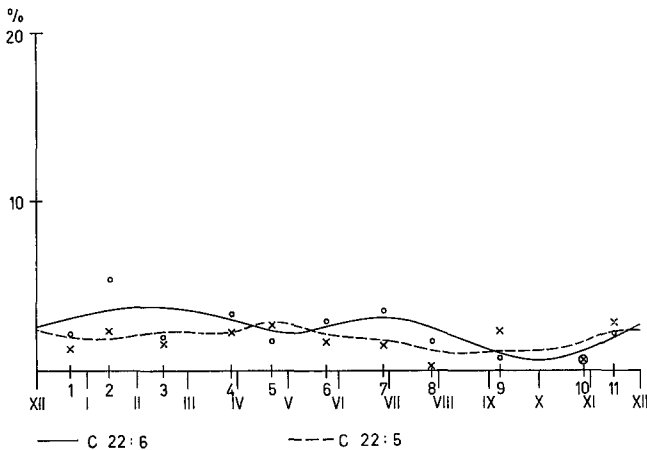


Abb. 3. Prozentuelle Verteilung von $C_{22:6}$ und $C_{22:5}$ in den Fettsäuren des Lecithins der Netzhaut 10 Tage alter Kaninchen

Fettsäuren im L dürften die beobachteten Schwankungen nahe der Fehlerbreite der Bestimmungsmethode liegen (Abb. 3). Zur Charakterisierung der jahreszeitlich bedingten Abhängigkeit im Reifeprozess der Kaninchenretzhaut haben wir zusätzlich den Quotienten $C_{22:6}/C_{22:5}$ herangezogen. Bei den Gesamtphosphatiden ist diese Kennzahl bis zum Monat Mai gleich 1 und steigt sodann bis Mitte Juli auf 4 an; dies entspricht einer Zunahme um 300%. Dem Anstieg folgt ein ebenso steiler

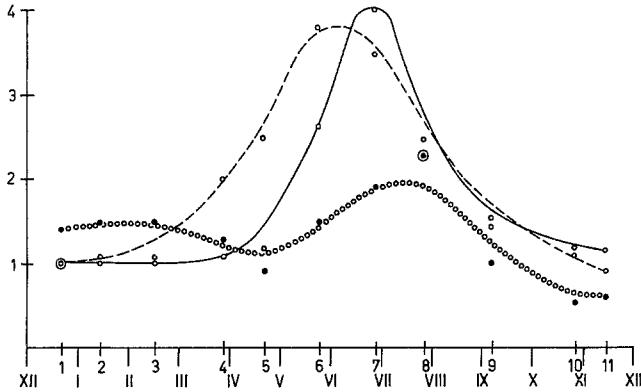


Abb. 4. Der Quotient aus den Fettsäuren $C_{22:6}/C_{22:5}$ der Gesamtposphatide, des Phosphatidylethanolamins und des Lecithins aus der Netzhaut 10 Tage alter Kaninchen. — Gesamtposphatide, ----- Phosphatidylethanolamin, ooooo Lecithin

Abfall, der zu Beginn des Monats Oktober beendet ist. Im PÄ finden wir den Quotienten 1 nur von November bis Mitte Februar. Das Maximum (3,7) wird Mitte Mai erreicht und verbleibt bis Ende Juni (3,5) auf dieser Höhe. Die Werte für L sind entsprechend der prozentuellen Verteilung von $C_{22:5}$ und $C_{22:6}$ nur Annäherungswerte (Abb. 4).

Diskussion

Nach unseren Ergebnissen ist in den Netzhäuten von 10 Tage alten Kaninchen das Phosphatidylethanolamin unabhängig von der Jahreszeit als Hauptträger der beiden hochungesättigten Fettsäuren $C_{22:5}$ und $C_{22:6}$ anzusehen. Es ist in diesem Lebensalter mit 26% in den Phosphatiden der Retina vertreten. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Werten, die von Anderson u. Mitarb. angegeben werden. Die Fettsäuren des Lecithins, welches am 10. Tag 53% der Gesamtposphatide darstellt, enthalten in den Wintermonaten nur ca. 3% $C_{22:6}$, während in denen des Phosphatidylethanolamins gleichzeitig 10% nachweisbar sind. In den Sommermonaten ist der Unterschied der Fettsäurezusammensetzung zwischen Lecithin und Phosphatidylethanolamin noch deutlicher als im Winter; dabei stehen den ca. 3% $C_{22:6}$ im Fettsäuremuster des Lecithins etwa 20% $C_{22:6}$ in dem des Phosphatidylethanolamins gegenüber. Das Verhältnis $C_{22:6}/C_{22:5}$ ist von Crawford eingehend untersucht worden. Bei einer dreimonatigen Mangeldiät an Polyenfettsäuren fand er in den Leberlipiden von Meerschweinchen ein Absinken des Quotienten von 4,1 auf 0,37. Eine analoge Verschiebung in fast gleicher Größenordnung — von 4 auf 1 — ließ sich in der vorliegenden Untersuchung an der reifenden Kaninchenretina nachweisen.

Das auslösende Moment für das Ansteigen bzw. Absinken des Quotienten $C_{22:6}/C_{22:5}$ ist allein die Jahreszeit, in der die Tiere geboren worden sind.

Literatur

- Anderson, R. E., Feldmann, L. S., Feldmann, G. L.: Lipids of ocular tissues. II. The phospholipids of mature bovine and rabbit whole retina. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **202**, 367—373 (1970).
- Broekhuysse, R. M.: Phospholipids in tissues of the eye. I. Isolation, characterisation and quantitative analysis by twodimensional thin-layer chromatography of diacyl and vinyl-ether phospholipids. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **152**, 307—315 (1968).
- Crawford, M. A.: Alterations in balance of long-chain metabolic derivatives in linolenic acid in the fat deficient guinea pig. *FEBS Letters* **11**, 117—120 (1970).
- Doss, M., Oette, K.: Schnellmethode zur Darstellung von Fettsäuremethylestern für die gaschromatographische Analyse. *Z. klin. Chem.* **3**, 125 (1965).
- Wagner, H., Hörhammer, L., Wolff, P.: Dünnschichtchromatographie von Phosphatiden und Glykolipiden. *Biochem. Z.* **334**, 175 (1961).
- Weiss, H., Graf, A.: Die Phosphatidkomponente der reifenden Kaninchenretina. *Klin. Mbl. Augenheilk.* **159**, 51—59 (1971).

Dr. H. Weiss
I. Univ.-Augenlinik
Spitalgasse 2
A-1090 Wien (Österreich)

Dr. A. Graf
Etapharm
Vormosergasse 3
A-1190 Wien (Österreich)