

Die Verstärkung der Bradykininwirkung auf die glatte Muskulatur durch Proteasen tierischen, bakteriellen und pflanzlichen Ursprungs : ein Modell für die Luftwegsobstruktion

Autor(en): **Fellenberg, R. von / Pellegrini, A.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **122 (1980)**

PDF erstellt am: **20.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-593581>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 122, 565–572, 1980

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. H. Spörri)

Die Verstärkung der Bradykininwirkung auf die glatte Muskulatur durch Proteasen tierischen, bakteriellen und pflanzlichen Ursprungs. Ein Modell für die Luftwegsobstruktion.¹

R. von Fellenberg² und A. Pellegrini

Einleitung und Fragestellung

Die Entstehung des Lungenemphysems ist noch weitgehend unbekannt. Einige Risikofaktoren sind unbestritten, ihre Beziehung zur Pathogenese ist aber ungeklärt. Wohl wird angenommen, dass ein Missverhältnis zwischen Proteasen und Proteaseinhibitoren zu überschüssiger Proteaseaktivität führt, welche die Alveolarwände zerstört [8]. Wenige Anhaltspunkte und nur vage Vorstellungen hat man dagegen über die pathogenetischen Mechanismen, die an der Obstruktion der Bronchiolen beteiligt sind. Die Luftwegsobstruktion ist aber sehr häufig mit dem Emphysem vergesellschaftet. Zwei Beobachtungen deuten darauf, dass überschüssige Proteaseaktivität auch hier von Bedeutung sein könnte. Einmal haben Versuche am Hund gezeigt, dass die Inhalation von Proteasen die Empfindlichkeit der Bronchialmuskulatur auf Acetylcholin, das bronchokonstriktorisch wirkt, steigerte [10]. Unter Enzymwirkung resultierten schwerste Verteilungsstörungen mit pathologischen Blutgaswerten. Des weiteren wurde am Meerschweinchenileum nachgewiesen, dass Chymotrypsin die glatte Muskulatur auf die kontrahierende Wirkung von Bradykinin sensibilisierte [2].

Bradykinin und die damit verwandten Plasmakinine sind Mittlersubstanzen der Entzündung. Sie wirken erschlaffend auf die Gefässmuskulatur und senken deshalb auch den Blutdruck, kontrahieren jedoch die viscerale glatte Muskulatur. Freigesetzt wird Bradykinin einerseits spezifisch durch Kallikrein, eine Protease, andererseits aber auch unspezifisch durch Proteasen wie Trypsin und Plasmin. Vorläufer der Kinine sind bestimmte Plasmaproteine, von denen die Peptide abgespalten werden. So ist der Vorläufer von Bradykinin das Protein Kininogen [4]. Ein Plasmakinin, das durch saure Proteasen aus den Granula von Neutrophilen freigesetzt wird, ist Leukokinin [7]. Ein anderes, das neutrale Kinin, entsteht mit Hilfe einer neutralen Protease, die auf der Oberflächenmembran der neutrophilen Granulozyten lokalisiert ist [1, 11, 12].

Die biologische Aktivität der Kinine wird oft am Meerschweinchenileum und am Rattenuterus getestet [6]. Die Wirkung auf die viscerale glatte Muskulatur ist bisher aber praktisch nicht in pathophysiologische Zusammenhänge gebracht worden. Auf

¹ Diese Arbeit wurde mit der Unterstützung des Schweiz. Nationalfonds durchgeführt (Projekt Nr. 3.958–078).

² Adresse: PD Dr. R. von Fellenberg, Winterthurerstrasse 260, CH-8057 Zürich.

die schon erwähnten Resultate Ederys gestützt, dass Chymotrypsin die Empfindlichkeit des Meerschweinchenileums gegenüber Bradykinin steigerte [2], haben wir uns die Frage gestellt, ob durch andere Proteasen eine ähnliche Wirkung hervorgerufen werden könne. Dies schien uns deshalb wichtig, weil Ederly postulierte, dass der von ihm entdeckte Effekt für Chymotrypsin spezifisch sei. Pathophysiologisch interessierte uns, zu erfahren, ob bestimmte Proteasen nicht nur die Bradykininkontraktion, sondern möglicherweise auch die Histamin- und Acetylcholincontraktion veränderten. Die Versuche dienen uns als Grundlage für weitere Untersuchungen über die Sensibilisierung der Bronchialmuskulatur verschiedener Tierarten durch Proteasen.

Material und Methoden

Die Lösungen von Reagentien und Enzymen wurden in physiologischer Na Cl hergestellt: Bradykinin (Fa. Sigma) 1 mg/500 ml. Histamin (Fa. Merk) 1 mg/ml, dann 1 : 1000 verdünnen. Acetylcholinchlorid (Fa. Serva) 1 mg/ml, dann 1 : 1000 verdünnen. Atropinsulfat und Mepyraminmaleat 10 mg/100 ml. Beide Substanzen wurden zur Tyrodelösung in einer Endkonzentration von 10 µg/50 ml gegeben. Die Stammlösungen aller Proteasen enthielten 10 mg Enzymprotein/ml. Chymotrypsin aus Rinderpankreas (Chymotrypsin A₄), Proteinase K, Pronase, Subtilisin, neutrale Protease (Dispase II), Bromelain und Ficin waren von der Fa. Böhlinger. Papain wurde bei der Fa. Fluka, Elastase bei der Fa. Serva und Trypsin (Trypure®) bei der Fa. Novo Industri gekauft.

Testansatz. Segmente des distalen Ileums von Meerschweinchen (350–450 g KG) wurden verwendet. Sie wurden in einem 50 ml fassenden Organbad montiert. Die Tyrodelösung wurde mit einem Gasgemisch von 97% O₂ und 3% CO₂ durchperlt, so dass ein pH von 7,4 resultierte. Die Versuche wurden bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Atropin und Mepyraminmaleat waren der Tyrodelösung beigegeben wenn Bradykinin, nur Atropin wenn Histamin und nur Mepyraminmaleat wenn Acetylcholin getestet wurden. Nach erfolgter Kontraktion wurde das Präparat 2 mal mit Tyrodelösung gespült. Zum Nachweis der Enzymwirkung wurde folgendermassen vorgegangen: Zuerst wurde eine Dosis-Wirkungskurve mit Bradykinin aufgenommen. Dann wurde Protease während einer Minute zum Präparat gegeben und nachfolgend gespült. Nach der Enzymbehandlung wurde wieder eine Dosis-Wirkungskurve erstellt und mit der ersten verglichen. Bei diesem Vorgehen stellte sich die Frage, ob die stärkere Kontraktion nach der Enzymbehandlung nicht etwa durch eine «Eigensensibilisierung» des Darmes als Folge der Einwirkung höherer Bradykinindosen vorgetäuscht werde. Dies konnte ausgeschlossen werden, indem in zahlreichen Experimenten die Kontraktionen mit zunehmenden und dann wieder abnehmenden Bradykininmengen getestet wurden, bevor die Behandlung mit Protease erfolgte. Eine «Eigensensibilisierung» wurde in keinem Fall beobachtet.

Resultate

Beeinflussung der Bradykininkontraktion durch Proteasen. In *Abbildung 1 A-K* sind die Wirkungen der 10 getesteten Proteasen auf die Bradykininkontraktion wiedergegeben. Alle Enzyme führten zu einer stärkeren Verkürzung der glatten Muskulatur, die hauptsächlich bei niedrigen Bradykinindosen zum Ausdruck kam. Die Enzymmenge, die zum eben erwähnten Effekt führte, betrug für alle Proteasen 1 mg. Die entsprechende Konzentration liegt bei der kurzen Einwirkungsdauer durchaus im Bereich, der *in vitro* zum Nachweis der katalytischen Funktion verwendet wird. Eine Ausnahme bildete Proteinase K. Bei diesem Enzym war die Dosierung 0,1 mg, also 10 ml geringer als bei den übrigen Fermenten. Mit 1 mg wurde der Darm geschä-

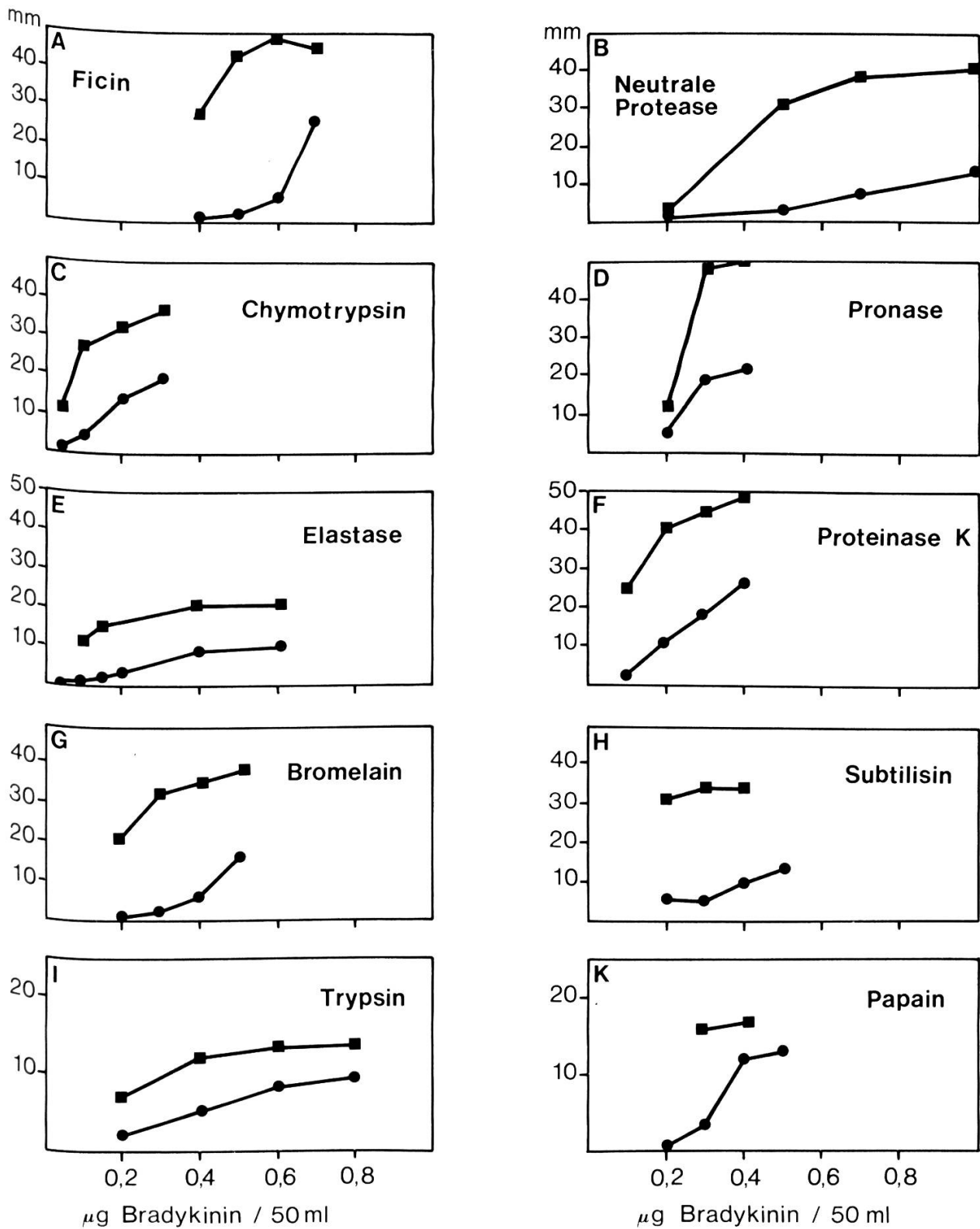


Abb. 1 Der Einfluss von Proteasen auf die Bradykininkontraktion des Meerschweinchenileums. Dosis-Wirkungskurve ●—● vor Proteasebehandlung und ■—■ nach Proteasebehandlung. Ordinate: mm Weg als Mass der Organverkürzung. Die Enzymkonzentration betrug 1 mg/50 ml für alle Proteasen mit Ausnahme von Proteinase K. Proteinase K wurde in einer Konzentration von 0,1 mg/50 ml verwendet. Die Einwirkungsdauer der Enzyme betrug 1 Minute.

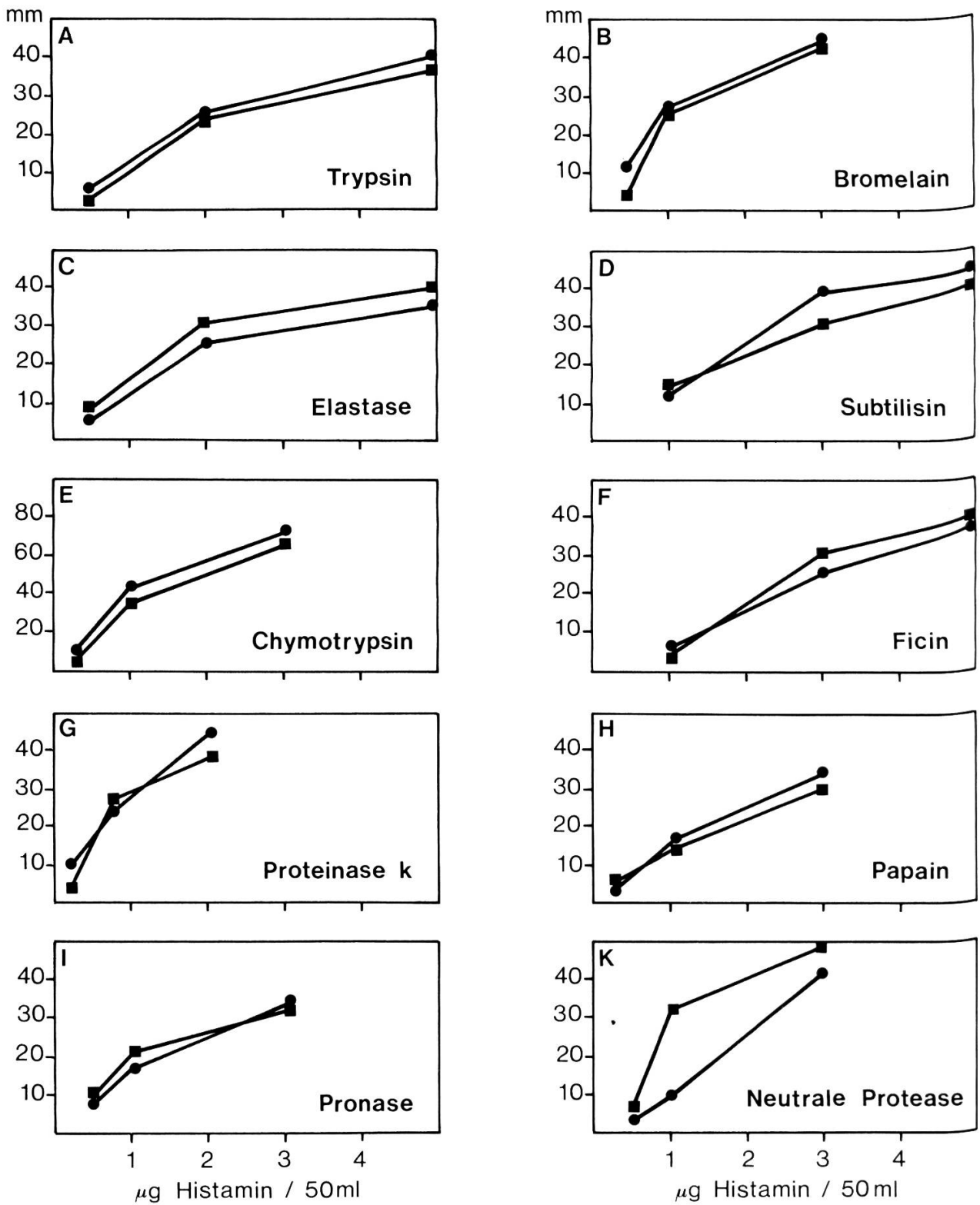


Abb. 2 Der Einfluss von Proteasen auf die Histaminkontraktion des Meerschweinchenileums. Dosiswirkungskurve ●—● vor Proteasebehandlung und ■—■ nach Proteasebehandlung. Ordinate: mm Weg als Mass der Organverkürzung. Die Enzymkonzentration betrug für alle Proteasen 1 mg/50 ml mit Ausnahme von Proteinase K. Proteinase K wurde in einer Konzentration von 0,1 mg/50 ml verwendet. Die Einwirkungsdauer der Enzyme betrug 1 Minute.

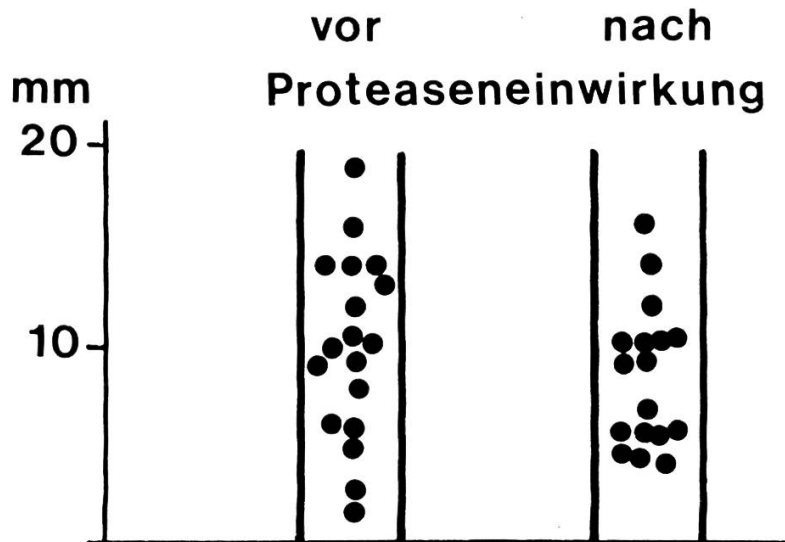


Abb. 3 Einfluss von Proteasen auf die durch Acetylcholin vermittelte Kontraktion des Meerschweinchenileums. Zusammenfassende Darstellung von 8 Experimenten mit den Proteasen Chymotrypsin, Trypsin, Elastase, Pronase, Bromelain, Subtilisin, Papain und Ficin. Ordinate: mm Weg als Mass der Organverkürzung. Die Kontraktionen wurden mit je 2 gepaarten Dosen Acetylcholin vor und nach Einwirkung von 1 mg Protease während einer Minute gemessen. Die Acetylcholidosen lagen zwischen $0,05 \mu\text{g}/50 \text{ ml}$ und $0,4 \mu\text{g}/50 \text{ ml}$.

dig, so dass das Kontraktionsvermögen aufgehoben war. Proteinase K ist ein Enzym mit sehr hoher spezifischer Aktivität, das vor allem auch die Eigenschaft besitzt, native Eiweisse anzugreifen.

Wirkung von Proteasen auf die Histamin- und Acetylcholinkontraktion. Aus der *Abbildung 2 A-K* ist ersichtlich, dass keine der Proteasen einen Einfluss auf die Histaminkontraktion ausübte. Ebenso wenig wurde die Kontraktion durch Acetylcholin verändert (siehe *Abbildung 3*).

Diskussion

Die vorliegenden Resultate zeigen deutlich, dass alle geprüften Proteasen die Empfindlichkeit und Kontraktilität des Meerschweinchenileums gegenüber Bradykinin verstärkten. Die durch Histamin und durch Acetylcholin ausgelösten Kontraktionen blieben demgegenüber unbeeinflusst. Diese Befunde bestätigen und erweitern Ederys Resultate [2]. Der Autor, der den Effekt mit Chymotrypsin entdeckte, nahm an, dass die Wirkung für Chymotrypsin spezifisch sei. Ausser mit dem Enzym konnte nämlich die gleiche Wirkung auch mit Chymotrypsinogen, dem inaktiven Proenzym ausgelöst werden. Dies könnte dahin deuten, dass die Wirkung nicht auf einem katalytischen Vorgang beruht, sondern Folge der Bindung eines Liganden ist, der dem Chymotrypsinogen und dem Chymotrypsin gemein ist. Auch wäre es vorstellbar,

dass Verunreinigungen aus dem Pankreas (z. B. Peptide mit Kininwirkung) eine Sensibilisierung vortäuschen. Unsere Resultate schliessen dies weitgehend aus, denn es ist sehr unwahrscheinlich, dass Proteasen so verschiedenen Ursprungs die gleiche Beimengung enthalten.

Die Proteasewirkung war insofern spezifisch, als nur die Bradykininkontraktion beeinflusst wurde, nicht jedoch die Kontraktion durch Histamin und Acetylcholin. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung Ederys wichtig, dass die Sensibilisierung durch Chymotrypsin nicht auf Bradykinin beschränkt blieb, sondern sich zudem auf die funktionell sehr nahe verwandten anderen Plasmakinine erstreckte. Im Gegensatz dazu beeinflusste Chymotrypsin die Wirkung der Peptide Substanz P, Eledaisin und Angiotensin auf das Meerschweinchenileum nicht [3].

Wie unsere Resultate demonstrieren, verstärkten auf der anderen Seite alle Proteasen die Bradykininkontraktion, obwohl die getesteten Enzyme biochemisch-systematisch verschiedenen Gruppen angehören (Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Proteinase K und Subtilisin sind Serinesterasen. Bromelain, Ficin und Papain gehören zu den Cysteinproteasen. Neutrale Protease ist ein Zinkenzym. Pronase ist kein reines Enzym, sondern besteht aus einem Proteasegemisch). Gemeinsam ist allen getesteten Proteasen eine breite Substratspezifität in bezug auf angegriffene Proteine, und eine Aktivität als Endopeptidase. Innerhalb der Peptidketten aber greifen die verschiedenen Enzyme preferentiell Peptidbindungen an, an denen Aminosäuren mit distinkten Seitenketten beteiligt sind [9].

Weder von den eigenen Resultaten noch aus den zitierten Befunden deuten Hinweise auf den Wirkungsmechanismus, der dem Enzymeffekt zugrunde liegen könnte. In Erwägung ziehen könnte man eine Veränderung der Zelloberfläche durch Proteasen, so dass die Rezeptoren für Bradykinin leichter zugänglich werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass Kininasen durch die Proteasen angegriffen werden [2]. Kininasen sind Enzyme, welche ihrerseits Kinine abbauen und inaktivieren. Eine Zerstörung der Kininasen, die auf der Oberfläche von Zellen lokalisiert sind [4], durch Proteasen würde ergeben, dass die gleiche Wirkung durch niedrigere Bradykinindosen erreicht werden könnte.

Die oben beschriebenen Wirkungen am Meerschweinchenileum sind nicht ohne weiteres auf die gesamte viscerale glatte Muskulatur extrapolierbar. Dazu müssen sicher auch noch Speziesunterschiede berücksichtigt werden. Und doch mögen uns die Resultate als Modell dienen, um sich vorzustellen, wie endogene Proteasen an der Luftwegsobstruktion beteiligt sein könnten; indem sie nämlich, zusätzlich zur Kininbildung, die Empfindlichkeit der Bronchialmuskulatur für die Kininwirkung erhöhen. Gerade beim Pferd, das eine so hohe Anfälligkeit für chronisch-obstruktive Lungenerkrankheiten besitzt, könnte der postulierte Mechanismus nicht unwichtig sein. In einer früheren Arbeit konnten wir nämlich nachweisen, dass das Pferd nur sehr beschränkte Möglichkeiten hat, proteolytische Enzymaktivität in den Luftwegen und der Lunge zu neutralisieren [12].

Herrn H.-R. Zweifel sei für die technische Assistenz herzlich gedankt.

Zusammenfassung

Der Einfluss tierischer, pflanzlicher und mikrobieller Proteasen auf die Kontraktilität des Meerschweinchenileums wurde geprüft. Alle 10 getesteten Proteasen sensibilisierten die glatte Muskulatur für Bradykinin, indem sie die Kontraktionsamplitude vergrößerten und die minimal wirksame Bradykinindosis verringerten. Die Enzyme, bei denen es sich um Serinesterasen, Cysteinproteasen und Zinkproteasen handelte, hatten jedoch keinen Einfluss auf die Histamin- und die Acetylcholincontraktion. Die Versuche wurden durchgeführt, um vorerst an diesem Modell zu prüfen, wie Proteasen die viscerale glatte Muskulatur beeinflussen. Die erhaltenen Resultate weisen indirekt darauf, dass Proteasen durch Erhöhung der Kontraktilität der glatten Muskulatur auch an der Obstruktion der Atemwege beteiligt sein können.

Résumé

Les auteurs ont analysé l'effet de protéases d'origine animale, végétale et microbienne sur la contractilité de l'iléum chez le cobaye. Toutes les dix protéases testées ont sensibilisé la musculature lisse pour la bradykinine en augmentant l'amplitude des contractions et en diminuant la dose active minimale de la bradykinine. Les enzymes comme les sérinestérases, les cystéinoprotéases et les protéases au zinc n'ont eu cependant aucun effet sur la contraction due à l'histamine et à l'acétylcholine. Ces expériences ont été réalisées en premier lieu pour déterminer par ce modèle comment les protéases agissent sur la musculature lisse des viscères. Les résultats obtenus démontrent indirectement que les protéases, en augmentant la contractilité de la musculature lisse, participent aussi à l'obstruction des voies respiratoires.

Riassunto

È stato controllato l'influsso di proteasi animali, vegetali e microbiche sulla contrattilità dell'ileo di cavia. Tutte le dieci proteasi controllate hanno sensibilizzato la muscolatura liscia per la Bradichinina, aumentando l'ampiezza di contrazione e diminuendo la dose minima efficace di Bradichinina. Gli enzimi del tipo Serinesterasi, Cisteinproteasi e Zinco proteasi, non hanno avuto alcuna influenza sulla contrazione dovuta ad istamina e ad acetilcolina. Le indagini sono state condotte al fine di verificare, sulla base di questo modello sperimentale, l'influenza delle proteasi sulla muscolatura liscia viscerale. I risultati ottenuti mostrano indirettamente che le proteasi, in conseguenza della loro proprietà di aumentare la contrattilità intestinale, potrebbero avere un ruolo nell'ostruzione delle vie respiratorie.

Summary

The influence of animal, plant and microbial proteases on the contractility of the guinea pig ileum was investigated. All the 10 tested enzymes increased the sensibility of the smooth muscle preparation towards bradykinin by augmenting the amplitude of contraction and lowering the minimal reacting dose. The enzymes had no effect on the contraction by acetylcholin and histamin. The experiments were done with the aim to get insight into the effect proteases exert on smooth muscle activity. The results indirectly suggest that proteases could also be involved in airway obstruction by increasing the contractility of bronchial muscles.

Literatur

[1] Coblyn J. S., Austen F. K. and Wintroub B. U.: Purification and characterization of a human neutrophil neutral protease. The neutral peptide-generating protease. *J. Clin. Invest.* 63, 998–1005 (1979). – [2] Ederly H.: Potentiation of the action of bradykinin on smooth muscle by chymotrypsin, chymotrypsinogen and trypsin. *Brit. J. Pharmacol.* 22, 371–379 (1964). – [3] Ederly H.: Further studies of the sensitization of smooth muscle to the action of plasma kinins by proteolytic enzymes. *Brit. J. Pharmacol.* 24, 485–496 (1965). – [4] Erdös E. G.: Enzyme inhibitors of the kallikrein and

renin systems. Fed. Proc. 38, 2751–2752 (1979). – [5] von Fellenberg R., Minder H., Wegmann Ch. und Frei F.: Lungen-, Sekret- und Blutproteaseinhibitoren von Pferd und Rind: Eine vergleichende Studie über endogene, prädisponierende Faktoren für chronisch-obstruktive Lungenkrankheiten. Schweiz. Arch. Tierheilk. 121, 355–365 (1979). – [6] Frey E. K., Kraut H., Werle E., Vogel R., Zickgraf-Rüdel G. und Trautschold I.: Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, Enke Verlag, Stuttgart (1968). – [7] Greenbaum L. M. and Kim K. S.: The kinin-forming and kininase activities of rabbit polymorphonuclear leucocytes. Brit. J. Pharmac. Chemother. 29, 238–247 (1967). – [8] Junod A. F.: Facteurs endogènes dans le développement de l'emphysème. Schweiz. Med. Wschr. 108, 260–262 (1978). – [9] Perlmann G. E. and Lorand L. eds.: Methods in Enzymology, Vo XIX: Proteolytic Enzymes. Academic Press, New York, N. Y. (1970). – [10] Ulmer W. T., Islam M. S. und Bakran I.: Untersuchungen zur Ursache der Atemwegsobstruktion und des überempfindlichen Bronchialsystems. Dtsche. Med. Wschr. 96, 1759–1763 (1971). – [11] Wintroub B. U., Goetzl E. J. and Austen F. K.: A neutrophil-dependent pathway for the generation of a neutral peptide mediator. Partial characterization of components and control by α -1-Antitrypsin. J. Exp. Med. 140, 812–824 (1974). – [12] Wintroub B. U., Goetzl E. J. and Austen F. K.: A neutrophil-dependent pathway for the generation of a neutral peptide mediator. II. Subcellular localization of the neutrophil protease. Immunol. 33, 41–49 (1977).

BUCHBESPRECHUNG

Beiträge zur Fischpathologie und -toxikologie – Contributions to Fish pathology and Fish toxicology.

Herausgegeben durch H. H. Reichenbach-Klinke in «Fisch und Umwelt», Heft 8, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1980 mit 156 Seiten, mit 50 Abbildungen und 27 Tabellen. Preis DM 44.–.

Das vorliegende 8. Heft ist dem Herausgeber Herrn Prof. H. H. Reichenbach Klinke zu seinem 65. Geburtstag gewidmet.

Der Inhalt der 13, teils in englischer Sprache verfassten Einzelbeiträge ist vielfältig und befasst sich mit:

Epizootologie der Fischkrankheiten; Klassifikation und Eigenschaften fischpathogener Viren; serologische Untersuchungen über das Vorkommen von Antikörpern gegenüber Rhabdovirus cario bei Karpfen in bayrischen Teichwirtschaften; Untersuchungen des roten Blutbildes bei Viraler Hämorrhagischer Septikämie (VHS); neuere Beiträge zur Ätiologie der Karpfenpocken; *Aeromonas salmonicida* als Erreger der «Fleckenseuche der Weissfische»; der asiatische Bandwurm *Bothriocephalus acheilognathi* in Nord-Amerika; Techniken zur Blutentnahme bei Süßwasserfischen; Untersuchungen zur Gerinnungszeit des Blutplasmas durch verschiedene Gewebsthrombokinase des Karpfens; der Fisch als Indikator für die Schwermetallbelastung der Gewässer; weitere Untersuchungen zur Auswirkung von Kupfersulfat in Fischteichversuchen: Transport und Speicherung von Quecksilber aus HgCl_2 und $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ in einer Nahrungskette; zum Nachweis von Pestizidvergiftungen bei Fischen.

Die Beiträge sind sehr heterogen; was aber nicht als Wertminderung dieser Beitragsreihe aufzufassen ist: Vermittelt sie doch dem allgemein interessierten Fischpathologen viele neue wissenschaftliche Erkenntnisse; die toxikologischen Beiträge dürften zudem auch den Personenkreis, der sich mit Umweltschutz befasst, ansprechen, ist doch der Fisch ein äusserst sensibler Umweltsindikator.

Generell darf zudem die gute Qualität der Abbildungen und die übersichtliche Darstellung der Tabellen erwähnt werden.

W. Meier, Bern