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

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 120 (1978)

Artikel: Vergleichende Studie über die Trypsininhibitoren aus der Lunge und dem Serum von Pferd und Rind

Autor: Fellenberg, R. von

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-592549

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 15.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Schweiz. Arch. Tierheilk. *120*, 343–355, 1978

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

Vergleichende Studie über die Trypsininhibitoren aus der Lunge und dem Serum von Pferd und Rind

von *R. von Fellenberg*

Einleitung und Fragestellung

Proteasen haben bei vielen pathophysiologischen Vorgängen eine grosse Bedeutung. So bestehen bestimmte Gerinnungsfaktoren aus Proteasen. Plasmin, das die Fibrinolyse bewirkt, und seine Aktivatoren stellen Proteasen dar. Bestimmte Komponenten des Komplementsystems, das durch Immunkomplexe aktiviert wird, haben proteolytische Aktivität. Kinine werden durch ein proteolytisches System, das Kallikreinsystem, freigesetzt. Neutrophile Granulozyten enthalten Elastase und Kathepsin G, die zusammen die meisten Proteine aus Bindegewebe abbauen können. Pathophysiologisch besonders interessant ist ihr Angriff auf Elastin der Lunge, die elastische Lamina der Arterien, Basalmembranen und Gelenksknorpel [22].

Die proteolytischen Systeme der Säugetierorganismen laufen normalerweise nicht unkontrolliert ab, sie sind gesteuert und geregelt [7]. Ihre Wirkung wird hauptsächlich durch Proteaseinhibitoren eingeschränkt. Man findet Proteaseinhibitoren einerseits im Plasma, andererseits in Geweben, Organen und Körpersekreten.

Die Proteaseinhibitoren des Plasmas sind selbst Glykoproteine [7]. Aus menschlichem Blut wurden bisher 6 Inhibitoren isoliert, drei weitere sind funktionell charakterisiert worden [7]. Die zwei hervorstechenden Proteaseinhibitoren des Plasmas sind α_1-Antitrypsin (α_1-AT) und α_2-Makroglobulin. α_1-AT hat ein Molekulargewicht von 54000 Daltons, seine Serumkonzentration beträgt im Mittel 226 mg/100 ml [7]. α_2-Makroglobulin besitzt ein Molekulargewicht von 725000 Daltons, seine mittlere Serumkonzentration beträgt 260 mg/100 ml [7]. Die Serumkonzentrationen der übrigen Inhibitoren sind 10–20mal kleiner. Beide eben erwähnten Inhibitoren haben ein breites Hemmspektrum, sie inhibieren nicht nur die katalytische Aktivität von Trypsin, sondern auch diejenige vieler anderer Proteasen, z.B. Chymotrypsin, Elastase, Kathepsin D, Plasmin, gewisse bakterielle Proteasen. Eine übersichtliche Zusammenfassung der Plasmaproteaseinhibitoren des Menschen gibt Ref. 7. Bei den Säugetieren scheint grundsätzlich eine ähnliche Situation zu bestehen wie beim Menschen. Beim Rind sind ein α_1- und ein α_2-Proteaseinhibitor isoliert worden [23]. Kaninchen besitzen den Hauptanteil an trypsininhibitorischer Kapazität im α_1-Bereich [13], dazu aber noch zwei α_2-Makroglobulinfraktionen [2, 18]. Die gleiche Situation besteht beim Hund [17].

Abkürzungen: TIC = trypsininhibitorische Kapazität; α_1-AT = α_1-Antitrypsin; BAPNA = N-Benzoylarginin-p-nitroanilid.

Gewebs- und Sekretproteaseinhibitoren findet man vor allem an Orten, die durch Proteasen gefährdet sind: in den Lungen, im Pankreas und auf den Schleimhäuten. Die Schleimhäute sind weniger endogenen, sondern mehr exogenen, mikrobiellen Proteasen ausgesetzt.

Spezifische Trypsininhibitoren sind im Pankreas aller untersuchten Haussäugetiere und des Menschen gefunden worden [4]. Inhibitoren mit einem breiteren Wirkungsspektrum wurden in der Submaxillarisdrüse (Hund) [4], im Bronchial- [11], Nasen- [20] und Cervixsekret [8] (Mensch), in den Tränen [12] (Mensch), in der Samenflüssigkeit [4] (Meerschweinchen) identifiziert. Auch im menschlichen Urin wurde ein Proteaseinhibitor nachgewiesen [19]. Ein Gewebsproteaseinhibitor des Rindes ist biochemisch besonders gut untersucht worden. Er ist unter dem Namen Trasylol® im Handel erhältlich. Es handelt sich um ein basisches Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 6500 Daltons. Der Inhibitor wurde zuerst in der Lunge nachgewiesen, kommt aber auch in der Parotis, der Leber und im Pankreas vor [26]. Der Inhibitor hat – im Gegensatz zum streng für Trypsin spezifischen Inhibitor des Pankreas – ein breites Hemmspektrum: Kallikrein, Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und einige bakterielle Proteasen werden inaktiviert. Im Gegensatz zum eben Erwähnten sind die Proteaseinhibitoren des Pferdes bis jetzt nur schlecht untersucht worden. Die trypsininhibitorische Kapazität von Pferdeserum wurde in einer einzelnen Arbeit im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen bestimmt [1]. Über den Nachweis von Gewebs- und Sekretinhibitoren sind uns beim Pferd keine Arbeiten bekannt.

Klinisch sind Proteasen und α_1-AT während der letzten 15 Jahre hauptsächlich beim Menschen mit chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen – vorwiegend dem chronisch-alveolären Lungenemphysem – in Zusammenhang gebracht worden [16]. Dies geht auf eine Beobachtung von *Laurell* und *Eriksson* [14, 15] zurück. Die Autoren fanden, dass α_1-AT-Mangel vererbbar ist und dass eine eindeutige Verbindung zwischen schwerem, genetischem α_1-AT-Mangel und chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen besteht. In der Folge konnte man experimentell an Versuchstieren Lungenemphyseme mit Hilfe von proteolytischen Enzymen oder Leukozytenextrakten, die proteolytische Aktivität besitzen, erzeugen [16]. Man vermutet deshalb heute, dass die elastolytische Aktivität von Proteasen aus neutrophilen Granulozyten und Alveolarmakrophagen an der Pathogenese des Lungenemphysems beteiligt sein könnte [7]. Normalerweise würden die Enzyme durch Proteaseinhibitoren gehemmt. Bei Inhibitorenmangel – wie dem vererbten α_1-AT-Mangel des Menschen – könnten die Proteasen destruktive Wirkungen auf das Lungengewebe ausüben [7]. Warum bei Inhibitorenmangel die Lunge als Zielorgan bevorzugt betroffen wird, ist eine offene Frage. Eine hypothetische Erklärung dafür mag sein, dass Leukozyten vorwiegend in den Lungenkapillaren sequestriert werden [10].

α_1-AT-Mangel erklärt nicht allein die Pathogenese des chronisch-alveolären Lungenemphysems beim Menschen: «normale» chronisch-obstruktive Lungenkrankheiten, die nicht auf α_1-AT-Mangel beruhen, sind weitaus häufiger als solche, die mit einem schweren α_1-AT-Mangel vergesellschaftet sind. Andererseits liegt das

Risiko zu erkranken bei Individuen, die einen schweren, genetischen α_1-AT-Mangel aufweisen, bei 75–85% [7]. Aus dieser Sicht scheint die Abwesenheit von Gewebs- und Sekretproteaseinhibitoren als weiterer pathogenetischer Faktor möglich, wurde aber bis heute nur vereinzelt untersucht [24].

Das Pferd besitzt, im Vergleich zu anderen Tierarten, eine auffallende Anfälligkeit für chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen. Diese sind die häufigste Ursache für Abgänge in der schweizerischen Pferdepopulation wegen innerer Krankheiten [6]. Eine eingehende klinische Differenzierung wurde vorgenommen [21]. Nur der Mensch weist ein ähnlich breites Spektrum von Krankheitssymptomen der Luftwege auf. In bezug auf das Lungenemphysem besteht ein auffallender tierartlicher Unterschied zwischen Pferd und Rind: Beim Pferd beobachtet man am häufigsten das alveoläre Emphysem, das beim Rind äusserst selten vorkommt. Ein Lungenemphysem des Rindes ist fast immer interstitiell.

Aufgrund dieses tierartlichen Unterschiedes haben wir uns entschlossen, vorerst die Lungen- und Serumtrypsininhibitoren von Pferd und Rind miteinander zu vergleichen, in der Hoffnung, mehr Einsicht in die Pathogenese des chronisch-alveolären Lungenemphysems zu erhalten.

Material und Methoden

Tiere

Pferd

Blut wurde von lungengesunden Patienten der chirurgischen und medizinischen Klinik erhalten. Lungengewebe stammte von Pferden, die im Tierspital geschlachtet wurden.

Rind

Blutproben wurden im Schlachthof am Tag vor der Schlachtung entnommen. Beim Lungengewebe handelte es sich um Schlachthofmaterial[1].

Chemikalien

Trypsin: Trypure®, kristallines Trypsin: Novo Industri, Kopenhagen. N-Benzoylarginin-p-nitroanilid (BAPNA): Serva, Heidelberg. Triäthanolamin-Hydrochlorid: Böhringer, Mannheim. Perchlorsäure, Kaliumcarbonat, Tris (hydroxymethyl)-aminomethan, Diäthylbarbitursäure, Calciumlactat, Natriumacid: Merck, Darmstadt. Agarose: Sea Kem*, mci biomedical, distributed by analytical systems division of Bausch and Lomb. Bovines Fibrinogen: Calbiochem, San Diego, Calif.

Apparate

Beckman-Model 24-Spektrophotometer mit W + W Schreiber. Sorvall-Kühlzentrifuge mit den Rotoren Hb-4 und SS 34. Elektrophoresegerät von LKB, Modell 2117 Multiphor. Densitometer Beckman. Virtis-Homogenisator.

Bestimmung der Proteaseinhibitoren

Die Proteaseinhibitoren wurden aufgrund der trypsininhibitorischen Kapazität (TIC) gemessen. Das Prinzip besteht darin, die katalytische Aktivität von reinem Trypsin gegenüber einem synthetischen Substrat – N-Benzoylarginin-p-nitroanilid (BAPNA) – zu hemmen [5]. Unter der Einwirkung von Trypsin wird p-Nitroanilin aus BAPNA freigesetzt. Dieser Vorgang kann im Photometer direkt als Extinktionszunahme bei 405 nm verfolgt und registriert werden, denn das Produkt, p-Nitroanilin, absorbiert Licht in diesem Wellenlängenbereich. Bei Zugabe von inhibitorhaltigem Material ist die Extinktionszunahme geringer als im Kontrollansatz.

---

[1] Herrn Dr. P. Engeli, Direktor des Schlachthofs Zürich, sei für die Überlassung des Materials und für die gute Zusammenarbeit herzlich gedankt.

Das von *Fritz, Trautschold* und *Werle* publizierte Verfahren wurde eingehalten [5]. Lösungen: 1) Triäthanolamin-Puffer, 0,2 M, pH 7,8, 20 mM $CaCl_2$ enthaltend (18,6 g Triäthanolamin und 1,47 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ in 450 ml Wasser lösen, mit 2 N NaOH auf pH 7,8 einstellen, dann mit Wasser auf 500 ml auffüllen). 2) Trypsin, 50 μg Protein/ml = 50 Millieinheiten/ml (500 μg Trypsin in 10 ml 0,001 N HCl lösen). 3) BAPNA, 2,2 mM (50 mg BAPNA in 50 ml Wasser durch Erwärmen in kochendem Wasserbad auflösen). *Testansatz:* Messstrahlung 405 nm, Schichtdicke 1 cm, Temperatur 25 °C, Testvolumen 3,0 ml. 0,2 ml Trypsinlösung und Inhibitor-haltige Lösung, deren Volumen je nach Aktivität zwischen 0,05 und 0,5 ml variieren kann, wurden gemischt, mit Puffer auf ein Volumen von 2,0 ml ergänzt und während 15 Minuten in einem Wasserbad bei 25 °C vorinkubiert. Dann wurde 1,0 ml BAPNA-Lösung dazugegeben und die Extinktionszunahme in einem registrierenden Photometer während 5 Minuten gemessen. *Kontrollansatz:* 0,2 ml Trypsinlösung wurden mit 1,8 ml Puffer gemischt. Nach einer Inkubationsdauer von 15 Minuten wurde 1,0 ml BAPNA-Lösung zugegeben und die Extinktionszunahme gemessen. *Berechnung der Inhibitoraktivität:* Angabe in Inhibitoreinheiten (IU). 1 IU hemmt 1 Einheit (U) Trypsin. Eine U entspricht einer Extinktionsänderung von E_{405} = 3,32 pro Minute im 3-ml-Ansatz [5]. Der Inhibitorgehalt einer Probe ist:

$$\frac{(\Delta E/\text{Min.})\ \text{Trypsin} - (\Delta E/\text{Min.})\ \text{Inhibitor}}{3{,}32} = \text{IU}$$

Durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor erhält man die Inhibitoraktivität der Testlösung. Sie wurde hier auf 1 ml Serum oder 1 g Frischgewicht Lungengewebe bezogen. Die Inhibitoraktivität ist bis zu einer 70%igen Hemmung zuverlässig bestimmbar. Bei höherer Inhibitoraktivität ist das Probevolumen zu verkleinern oder die inhibitorhaltige Lösung zu verdünnen.

Aufarbeitung des Materials

Serum wurde zur TIC-Bestimmung 1:25 vorverdünnt. Das Probevolumen betrug meistens 0,1 ml. Zum Nachweis perchlorsäurelöslicher TIC-Aktivität wurde 1 T Serum mit 1 T Perchlorsäure 6% versetzt. Der gebildete Niederschlag wurde im HB-4-Rotor einer Sorvall-Zentrifuge bei 8000 rpm während 30 Minuten zentrifugiert. Zum Überstand wurden einige Tropfen einer 5 M K_2CO_3-Lösung gegeben, bis das pH einen Wert von etwa 7 erreichte (Indikatorpapier). Die Lösung wurde im Kühlschrank während mindestens einer Stunde stehengelassen. Während dieser Zeit wurde die Perchlorsäure als Kaliumperchlorat gefällt. Der kristalline Niederschlag wurde unter den schon angegebenen Bedingungen zentrifugiert. Im Überstand wurde die TIC-Aktivität gemessen. Das Probevolumen betrug meistens 0,4 ml.

Die meisten bis heute bekannten Trypsininhibitoren der Gewebe zeichnen sich durch ihre Stabilität in Perchlorsäure aus [5]. 1 g Lungengewebe wurde mit 1,0 ml destilliertem, eiskaltem Wasser in einem Virtis-Homogenisator während 3 Minuten homogenisiert. Dann wurden 2,0 ml 6%ige Perchlorsäure zugegeben. Das Gemisch wurde nochmals während einer Minute homogenisiert. Die Suspension wurde während 30 Minuten im HB-4-Rotor einer Sorvall-Zentrifuge bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen. Zum Überstand wurden einige Tropfen 5 M K_2CO_3-Lösung gegeben, bis das pH einen Wert von ungefähr 7 erreichte. Die Lösung wurde während einer Stunde im Kühlschrank stehengelassen, um die Perchloratfällung zu vervollständigen. Dann wurde das Perchlorat – wie schon beschrieben – zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die perchlorsäurelöslichen Trypsininhibitoren des Lungengewebes.

Zum elektrophoretischen Nachweis von Trypsininhibitoren in Lungengewebe, die nicht gegen Perchlorsäureeinwirkung resistent sind (siehe Diskussion), wurde 1 g Lungengewebe mit 3,0 ml eiskaltem, destilliertem Wasser homogenisiert und während 30 Minuten im SS-34-Rotor der Sorvall-Zentrifuge bei 20000 rpm (49000 × g) zentrifugiert. Der Überstand wurde in der Fibrinogenplattenelektrophorese untersucht.

Fibrinogenplattenelektrophorese der Trypsininhibitoren

Das Prinzip besteht darin, denaturiertes Fibrinogen in Agarose – als Elektrophoreseträger – einzubauen. Fibrinogen dient als Substrat für Trypsin. Inhibitor-haltiges Material – Serum, Überstände von Lungenhomogenaten – wird elektrophoretisch aufgetrennt. In einem zweiten Schritt wird die Elektrophoreseplatte mit einer Trypsinlösung bespült. Das Trypsin hydrolysiert das denaturierte

Fibrin mit Ausnahme der Stellen, wo sich Inhibitoren befinden. Die Stellen können durch Färben sichtbar gemacht werden.

Die ursprüngliche Methode von *Heimburger* und *Schwick* [9], modifiziert nach *Kueppers* [12], wurde von uns vereinfacht. *Lösungen:* 1) Tris-Barbituratpuffer, pH 8,6, 4fach konzentrierte Stammlösung: 22,4 g Diäthylbarbitursäure, 44,3 g Tris, 0,533 g Kalziumlaktat, 0,650 g Natriumacid werden in 1,0 l destilliertem Wasser aufgelöst. 2) Agaroselösung 1,5%: 1,5 g Agarose in 100 ml siedendem destilliertem Wasser lösen und bis zu weiterem Gebrauch in einem Wasserbad bei 55 ° C aufbewahren. 3) Fibrinogenlösung 0,27%: 27 mg Fibrinogen in 10 ml Tris-Barbituratpuffer-Stammlösung auflösen. 4) Trypsinlösung: 10 μg Trypsin/ml Triäthanolaminpuffer (siehe Bestimmung der TIC). *Anfertigen der Fibrinogenplatten:* Die Fibrinogenlösung wurde im Wasserbad bei 55 ° C vorgewärmt. Zu 9,0 ml Agaroselösung wurden 3,0 ml Fibrinogenlösung gegeben. 10 ml des Gemisches wurden auf eine horizontal gelagerte Glasplatte (8,4 × 9,4 cm) gegossen. Nach der Verfestigung wurde die Gelplatte während einer Stunde in einer feuchten Kammer bei 80 ° C (im Trockenofen) erhitzt. Die Platte wurde erst nach dem Abkühlen aus dem Ofen genommen und vor Gebrauch 24 Stunden in der feuchten Kammer aufbewahrt. *Elektrophorese:* Das aufgetragene Probevolumen betrug 4 μl, die Spannung 10 V/cm, die Laufzeit 30 Minuten. *Entwicklung der Trypsininhibitoren nach elektrophoretischer Auftrennung:* Die Elektrophoreseplatte wurde in einer Entwicklerschale mit etwa 50 ml Trypsinlösung während 15 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann wurde sie über Nacht in fliessendem Brunnenwasser gewaschen, getrocknet, und die Orte mit nicht verdautem, denaturiertem Fibrinogen (wo Trypsininhibitoren waren) konnten durch Färbung mit Amidoschwarz sichtbar gemacht werden.

Resultate

Trypsininhibitoren im Lungengewebe

Viele der heute bekannten Gewebsinhibitoren werden – im Gegensatz zu den Seruminhibitoren – durch Perchlorsäure nicht gefällt. Dies ist auch für den Inhibitor Trasylol® in der Rinderlunge der Fall. Wir haben deshalb seine Aktivität gemessen und mit derjenigen in der Pferdelunge verglichen.

Die Häufigkeitsverteilung der TIC von 24 Rinderlungen ist in Abb. 1 wiedergegeben. Die mittlere Inhibitoraktivität betrug 0,65 IU/g Frischgewicht (± 0,29), die Extremwerte lagen zwischen 0,13 und 1,18 IU. Demgegenüber konnte in Pferdelungen keine TIC nachgewiesen werden.

Serumtrypsininhibitoren

Die TIC von Pferdeserum wurde mit derjenigen von Rinderserum verglichen (Abb. 2). Die mittlere Inhibitoraktivität von Pferdeserum betrug 1,53 IU/ml (± 0,26), diejenige von Rinderserum 1,80 (± 0,52) IU/ml. Der Aktivitätsunterschied war statistisch nicht signifikant. Auffallend waren beim Rind vereinzelte, hohe Werte.

Trypsininhibitoren im Serum, die durch Perchlorsäure nicht gefällt werden

Die auffallende Abwesenheit von trypsininhibitorischer Kapazität in der Pferdelunge führt zur Frage, ob perchlorsäurelösliche Trypsininhibitoren beim Pferd generell fehlen. Da anzunehmen ist, dass Gewebsinhibitoren – wenigstens in Spuren – auch im Serum vorhanden sind, fällten wir die Serumproteine mit Perchlorsäure (siehe Methoden) und bestimmten die TIC im resultierenden Überstand. Die Resultate sind in Abb. 3 wiedergegeben. Die mittlere Inhibitoraktivität betrug beim Pferd 0,027 (± 0,013) IU/ml, beim Rind 0,018 (± 0,010) IU/ml. Der etwas höhere Wert beim Pferd war statistisch schwach signifikant ($P < 0,05$). Die restliche Inhibitoraktivität im Serum nach der Fällung mit Perchlorsäure war gering und lag in der Grös-

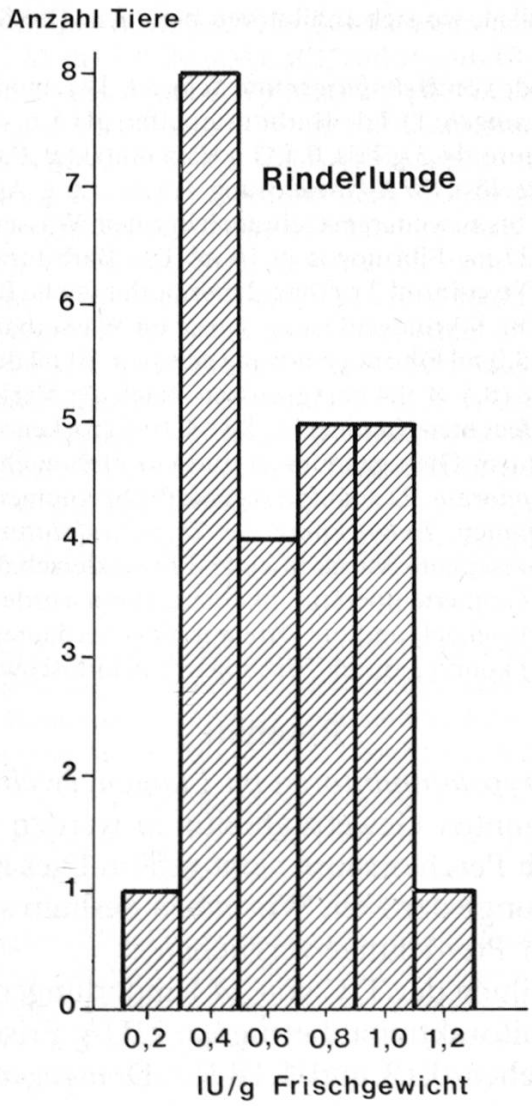

Abb. 1 Häufigkeitsverteilung der perchlorsäurelöslichen, trypsininhibitorischen Kapazität von 24 Rinderlungen.

senordnung von 1–2% der gesamten Serumaktivität. Sie war jedoch eindeutig nachweisbar. Die Resultate lassen den Schluss zu, dass auch das Pferd perchlorsäurelösliche Trypsininhibitoren besitzt.

Vergleichende elektrophoretische Analyse der Trypsininhibitoren von Pferd und Rind

Die Trypsininhibitoren in Lunge und Serum von Pferd und Rind wurden elektrophoretisch mit Hilfe der Fibrinogenplattentechnik miteinander verglichen, in der Hoffnung, beim Pferd mit dieser Methode lungenspezifische Inhibitoren erfassen zu können. Die Resultate sind in Abb. 4 dargestellt.

Unter den gewählten Bedingungen konnte man im Pferdeserum zwei trypsininhibitorische Hauptfraktionen unterscheiden, die gegen die Anode wanderten und deutlich voneinander getrennt waren. Ihre Position stimmte ungefähr mit den α_1- und α_2-Banden von Rinderserum überein (siehe weiter unten). Andere Fraktionen, die eine viel geringere inhibitorische Aktivität gegenüber Trypsin besassen, konnten

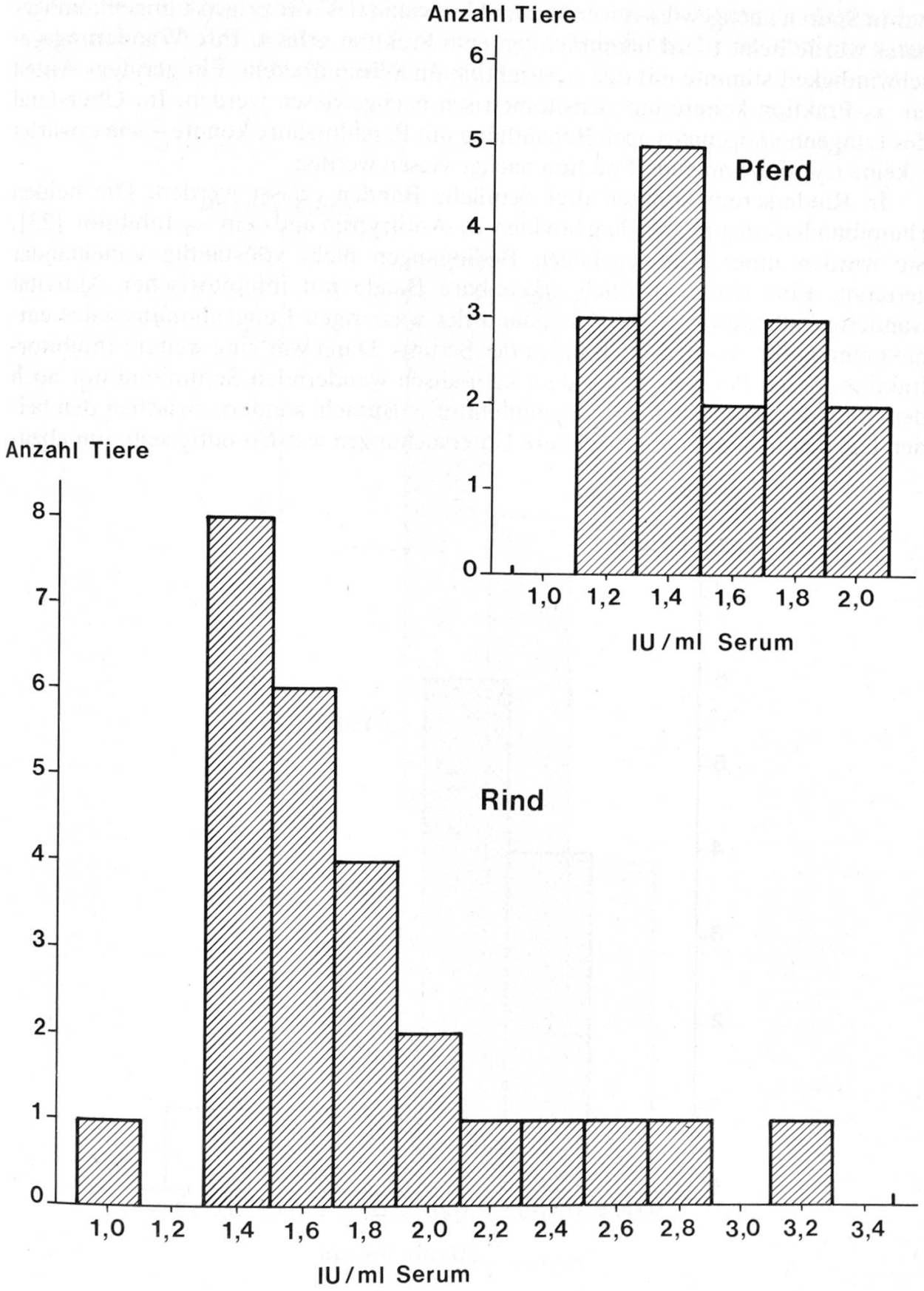

Abb. 2 Häufigkeitsverteilung der trypsininhibitorischen Kapazität von Serum. *Oben:* 15 Pferdeseren. *Unten:* 26 Rinderseren.

nur in Spuren nachgewiesen werden. Im Überstand des wässerigen Lungenhomogenates wurde beim Pferd hauptsächlich eine Fraktion erfasst. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit stimmte mit der α_1-Fraktion im Serum überein. Ein geringer Anteil an α_2-Fraktion konnte nur densitometrisch nachgewiesen werden. Im Überstand des Lungenhomogenates nach Behandlung mit Perchlorsäure konnte – wie erwartet – keine trypsinhemmende Fraktion nachgewiesen werden.

In Rinderserum konnten drei deutliche Banden erfasst werden. Die beiden Hauptbanden entsprachen dem bovinen α_1-Antitrypsin und dem α_2-Inhibitor [23]. Sie wurden unter den gegebenen Bedingungen nicht vollständig voneinander getrennt. Eine dritte, deutlich erkennbare Bande mit inhibitorischer Aktivität wanderte kathodewärts. Der Überstand des wässerigen Lungenhomogenates enthielt einmal die α_1- und α_2-Banden des Serums. Dann war eine weitere Inhibitorfraktion, deren Position weder dem kathodisch wandernden Seruminhibitor noch dem perchlorsäurelöslichen Lungeninhibitor entsprach, sondern zwischen den beiden lag, deutlich erkennbar. Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um abzu-

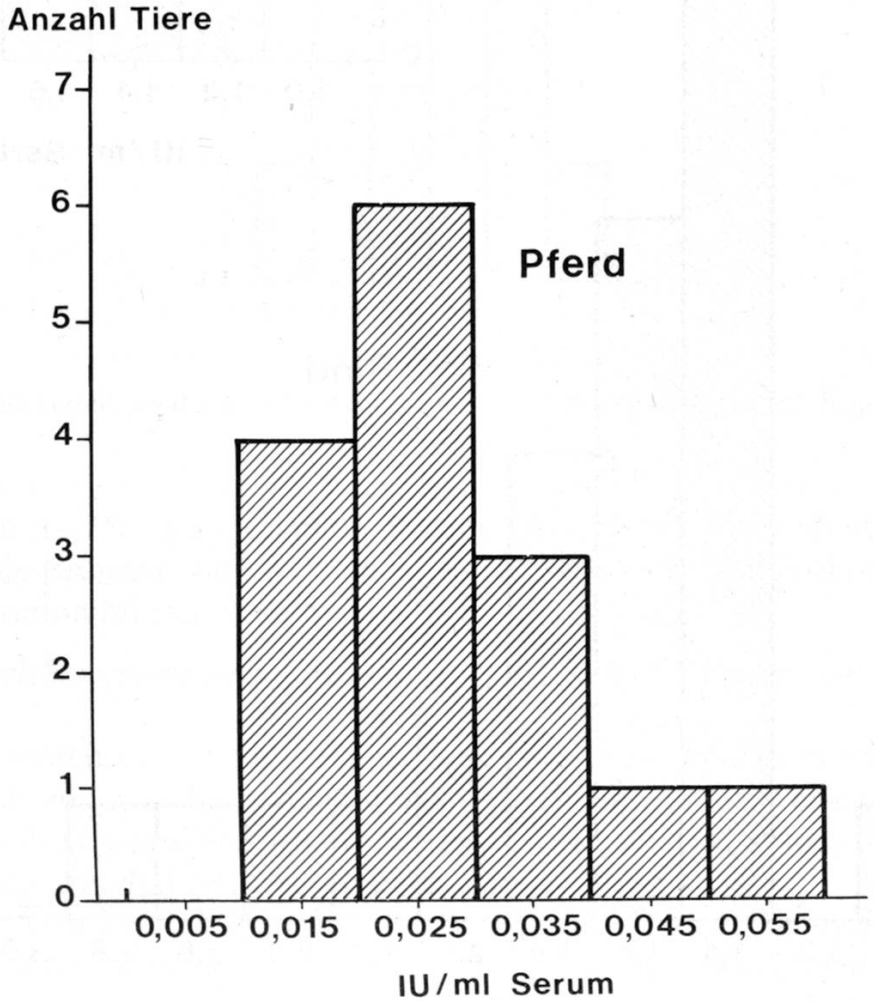

Abb. 3a Häufigkeitsverteilung der trypsininhibitorischen Kapazität von 15 Pferdeseren nach Fällung der Eiweisse mit Perchlorsäure.

klären, ob es sich um einen Gewebsinhibitor handelt. Im Überstand des Lungenhomogenates nach Behandlung mit Perchlorsäure verblieb nur der bekannte basische Inhibitor Trasylol® als starke, einheitliche Bande.

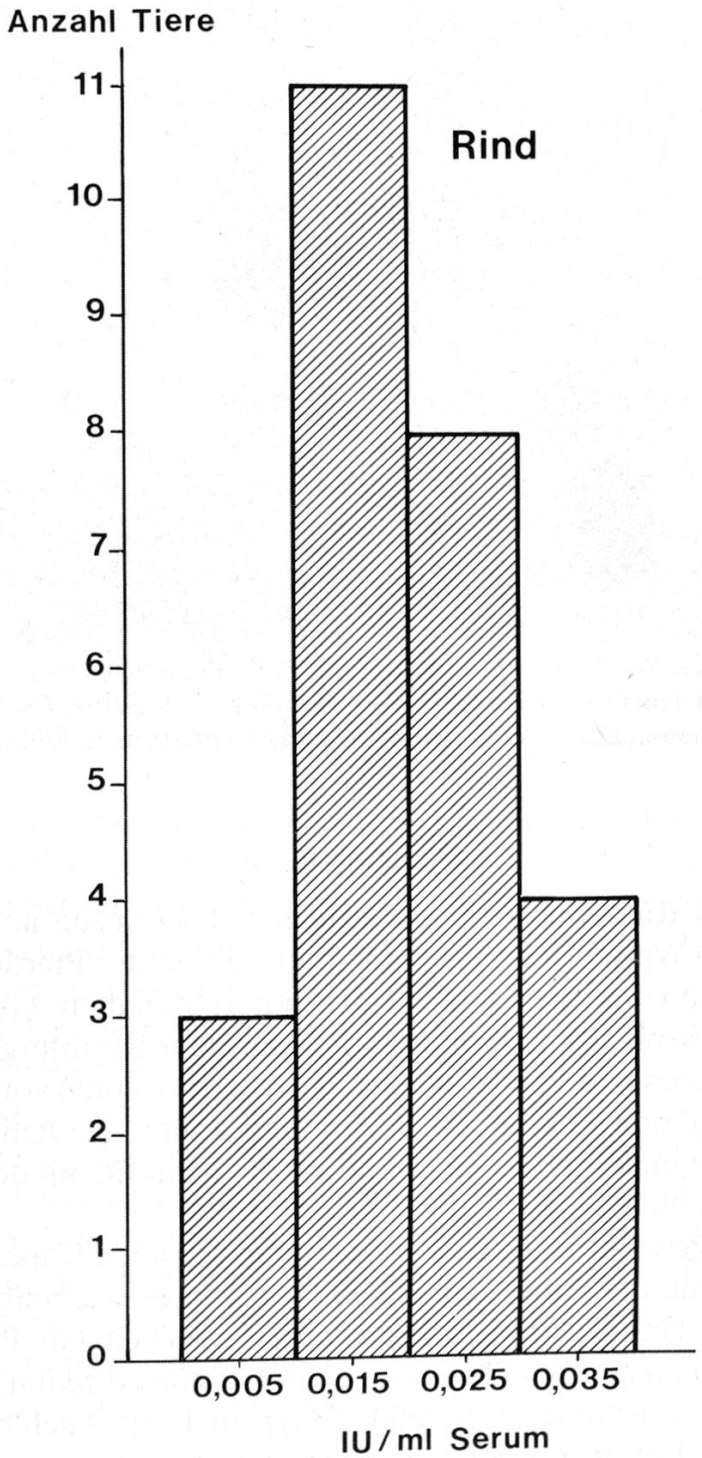

Abb. 3b Häufigkeitsverteilung der trypsininhibitorischen Kapazität von 26 Rinderseren nach Fällung der Eiweisse mit Perchlorsäure.

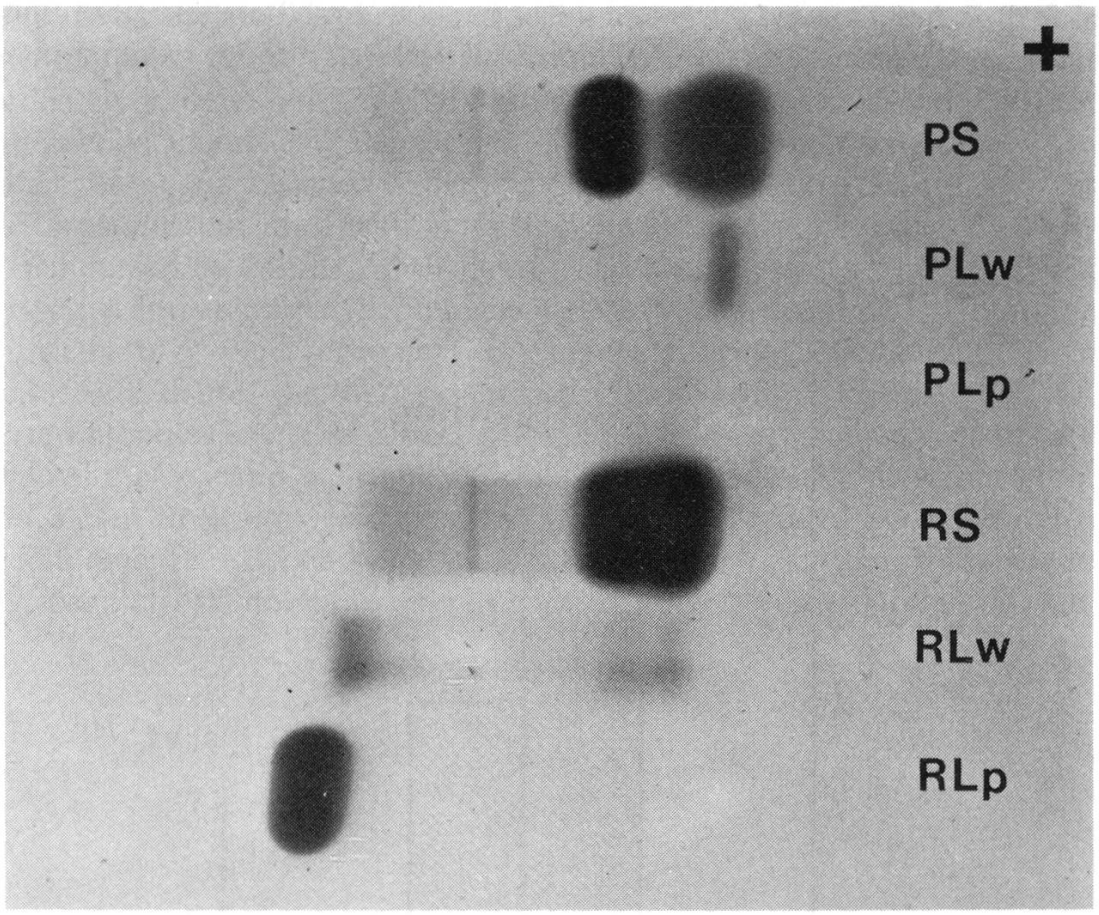

Abb. 4 Fibrinplattenelektrophorese. *PS:* Pferdeserum. *PLw:* Pferd, wässeriges Lungenhomogenat. *PLp:* Pferd, Lungenhomogenat nach Fällung der Eiweisse mit Perchlorsäure. *Rs:* Rinderserum. *RLw:* Rind, wässeriges Lungenhomogenat. *RLp:* Rind, Lungenhomogenat nach Fällung der Eiweisse mit Perchlorsäure.

Diskussion

Die Pferde- und Rinderlunge unterscheiden sich in bezug auf Gewebsinhibitoren in auffallender Weise. Der einzige Inhibitor, der in der Pferdelunge eindeutig nachgewiesen werden konnte, entsprach elektrophoretisch dem α_1-Seruminhibitor. Inwieweit die Anwesenheit des Inhibitors nur auf dem Restblutgehalt des untersuchten Lungengewebes beruht oder ob er auch in den Alveolen vorkommt, um dort eine protektive Funktion auszuüben, bleibt unbekannt. Zudem wird man mit biochemischen und immunologischen Methoden die Identität mit dem Seruminhibitor noch nachweisen müssen.

Das Fehlen von gewebsspezifischer trypsininhibitorischer Kapazität in der Pferdelunge kann nicht mit der Abwesenheit von Gewebsproteaseinhibitoren gleichgesetzt werden. Beim Hund wurde in Lungenspülflüssigkeit ein Proteaseinhibitor gefunden, der wohl pankreatische Elastase, elastolytische Aktivität von Granulozyten und Chymotrypsin hemmte, nicht jedoch Trypsin [24]. Auch beim Pferd muss diese Möglichkeit in Betracht gezogen werden und bildet Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Zudem ist es möglich, dass Lungeninhibitoren wohl Pferdetrypsin, nicht jedoch Rinder- und Schweinetrypsin hemmen.

Die Lunge des Rindes scheint besser mit Trypsininhibitoren ausgerüstet zu sein als diejenige des Pferdes. Der in Perchlorsäure lösliche Gewebsinhibitor (Trasylol®) konnte nicht mit Wasser extrahiert werden. Er scheint in komplexer Form im Lungengewebe vorzuliegen und wurde erst frei, als die Lungenproteine mit Perchlorsäure gefällt wurden. An welche Strkturen er gebunden ist, bleibt eine offene Frage, ebenso die damit verbundene Frage nach der physiologischen Funktion des Inhibitors in der Lunge. Immerhin ist die Beobachtung interessant, dass eine Vorbehandlung von Ratten mit Trasylol® die Degranulation von Mastzellen in vivo verhindern konnte. Die Degranulation war in den Kontrollen eine der Reaktionen auf hyperbare Sauerstoffexposition der Versuchstiere [3].

Im wässerigen Lungenhomogenat des Rindes befand sich – neben den α_1- und α_2-Seruminhibitoren – ein weiterer, gut sichtbarer Inhibitor, dessen elektrophoretische Beweglichkeit weder mit Trasylol® noch mit dem «kathodischen» Seruminhibitor übereinstimmte. Ob es sich um einen gewebsspezifischen Inhibitor handelt, der durch Perchlorsäure gefällt wird, kann aufgrund nur dieses Befundes nicht gesagt werden.

Die Gesamt-TIC von Pferde- und Rinderserum waren statistisch nicht signifikant verschieden. Neben den Inhibitoren im α-Bereich besass das Rinderserum jedoch noch zusätzlich einen Inhibitor im kathodischen Bereich. Dieser lag in genügender Konzentration vor, um in der Fibrinogenplattenelektrophorese als gut sichtbare Bande zu erscheinen. Er war in Pferdeserum höchstens in Spuren vorhanden. Bemerkenswert ist auch, dass mit Hilfe einer sehr ähnlichen Technik beim Menschen kein kathodisch wandernder Inhibitor nachgewiesen wurde [9]. Das Hemmspektrum gegenüber verschiedenen Proteasen und damit Hinweise auf eine mögliche spezifische Funktion dieses Seruminhibitors müssen noch ermittelt werden.

Nach der Präzipitation der Serumeiweisse mit Perchlorsäure verblieb eine Restaktivität von 1–2% perchlorsäurelöslicher TIC im Serum. Diese war beim Pferd – wenn statistisch auch nur schwach gesichert – höher als beim Rind. Der Befund zeigt, dass das Pferd grundsätzlich perchlorsäurelösliche Inhibitoren besitzt. Man kann annehmen, dass die Restaktivität auf Gewebsinhibitoren zurückzuführen ist, die aufgrund der Zellmauserung ins Serum gelangen. Das Fehlen säurelöslicher Inhibitoren in der Pferdelunge ist deshalb auffallend.

Aufgrund dieser ersten, vorläufigen Ergebnisse ist es sicher verfrüht, einen Mangel an Lungentrypsininhibitoren beim Pferd mit der Anfälligkeit für chronische Bronchiolitis und alveoläres Lungenemphysem in Zusammenhang zu bringen. Sollten weitere Untersuchungen zeigen, dass dem Pferd Lungenproteaseinhibitoren tatsächlich fehlen, so müssten Serumproteaseinhibitoren allein die Lunge vor Proteaseneinwirkung schützen. Ein Mangel an Seruminhibitoren könnte dann an der Pathogenese des Lungenemphysems beteiligt sein. Ob dies tatsächlich der Fall ist, wird nur eine klinische Studie zeigen können.

Zusammenfassung

Die Trypsininhibitoren in Lunge und Serum von Pferd und Rind wurden vergleichend analysiert mit dem Ziel, Einblick in die Pathogenese chronisch-obstruktiver Lungenerkrankungen zu erhalten. Das Pferd erkrankt sehr häufig an chronischer Bronchiolitis und alveolärem Lungenemphysem. Das alveoläre Lungenemphysem ist jedoch beim Rind äusserst selten. Die Rinderlunge enthielt den bekannten, perchlorsäurelöslichen Gewebsinhibitor Trasylol® und einen weiteren, möglicherweise gewebsspezifischen Trypsininhibitor, der nicht säurelöslich war. In der Pferdelunge waren keine gewebsspezifischen Trypsininhibitoren nachweisbar. Die trypsininhibitorische Kapazität im Serum war bei beiden Tierarten statistisch nicht signifikant verschieden.

Summary

Trypsin inhibitors of lung tissue and serum were comparatively analyzed in the horse and cattle. The purpose was to get insight into the pathogenesis of chronic-obstructive lung diesease. The incidence of chronic-alveolar emphysema and bronchiolitis is very high in the horse, but virtually absent in cattle. The lung tissue of cattle contained the known tissue inhibitor Trasylol®, which is soluble in perchloric acid. A second, acid-labile inhibitor which may be tissue specific was also detected. The lung of the horse lacked any tissue-specific trypsin inhibitors. The trypsin inhibitory capacity of serum was statistically not significantly different in both species.

Résumé

Les inhibiteurs de la trypsine dans les poumons et le sérum de chevaux et de bovins ont été soumis à une analyse comparative dans le but d'obtenir une meilleure vision de la pathologie des affections chroniques et obstructives des poumons. Le cheval souffre très souvent d'une bronchiolite chronique et d'un emphysème alvéolaire des poumons, ce dernier étant cependant très rare chez le bovin. Le poumon du bovin contenait du Trasylol®, un inhibiteur des tissus bien connu qui est soluble dans l'acide perchlorhydrique. Le poumon contenait aussi un autre inhibiteur de la trypsine, probablement spécifique des tissus, qui n'était pas soluble dans un acide. Dans le poumon du cheval il n'a pas été possible de déceler la présence d'un inhibiteur de la trypsine spécifique des tissus. Le pouvoir inhibiteur de la trypsine dans le sérum ne présentait statistiquement pas de différence notable entre les deux espèces animales.

Riassunto

Sono stati studiati comparativamente gli inibitori della tripsina nei polmoni e nel siero di cavalli e bovini allo scopo di dare un contributo alla conoscenza della patologia polmonare ostruttiva cronica. Il cavallo si ammala frequentemente di bronchiolite cronica e di enfisema alveolare. Al contrario l'enfisema alveolare è rarissimo nel bovino. Il polmone di bovino contiene:

- il noto inibitore tissutale Trasylol® che è solubile in acido perclorico,
- un altro inibitore della tripsina, probabilmente tessuto-specifico, che non è acido-solubile.

Nel polmone di equino non è stato possibile isolare alcun inibitore della tripsina che sia tessuto-specifico. La differenza tra le capacità tripsino-inibitrici del siero delle due specie animali è risultata statisticamente non significativa.

Literatur

[1] *Ballarini G., Corbella E., Ottonello S.* e *Rossi G.L.:* Osservazioni preliminari sui livelli ematici di antiproteasi in rapporto alle sindromi respiratorie del cavallo. Atti 1. Congresso Nazionale S.I.D.I., 179–180 (1975). – [2] *Berthelier G., Got R.* et *Bertagnolio G.:* Biochimie de l' α_2 Macroglobuline de Lapin. IV. Effet sur l'Activité estériasique de la Trypsine et de la Chymotrypsine. Biochem. Biophys. Acta *170,* 140–151 (1968). – [3] *Buckingham S., Sommers Sh.C.* and *McNary W.F.:* Experimental Respiratory Distress Syndrome. I. Central Autonomic and Humoral Pathogenetic Factors in Pulmonary Injury of Rats Induced with Hyperbaric Oxygen and the Protective Effects of Barbiturates and

Trasylol®. Biol. Neonat. *12,* 261–281 (1968). – [4] *Fritz H. Trautschold I.* und *Werle E.:* Bestimmung der Molekulargewichte von neuen Trypsininhibitoren mit Hilfe der Sephadex-Gelfiltration. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. *342,* 253–263 (1965). – [5] *Fritz H., Trautschold I.* und *Werle E.:* Protease-Inhibitoren. In Methoden der enzymatischen Analyse. Hsg. *Bergmeyer U.,* Verlag Chemie, Bd. 1, 1105–1122, 3. Aufl. (1974). – [6] *Gerber H.:* Klinik und Therapie chronischer Lungenleiden des Pferdes. Dtsch. Tierärztl. Wschr. *76,* 234–239 (1969). – [7] *Grob P.J.:* Alpha-1-Antitrypsin. Erg. Innere Med. u. Khlk. *38,* 95–199 (1976). – [8] *Haendle H., Ingrisch H.* und *Werle E.:* Über einen neuen Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor im Cervixsekret der Frau. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. *351,* 545–546 (1970). [9] *Heimburger H.* und *Schwick G.:* Fibrinagar-Elektrophorese. I. Mitteilung: Beschreibung der Methode. Thromb. Diath. Hämorr. *7,* 432–443 (1962). – [10] *Heinemann H.O.* and *Fishman A.P.:* Nonrespiratory Functions of Mammalian Lung. Physiol. Rev. *49,* 1–47 (1969). – [11] *Hochstrasser K., Reichert R., Schwarz S.* und *Werle E.:* Isolierung und Charakterisierung eines Proteaseinhibitors aus menschlichem Bronchialsekret. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. *353,* 221–226 (1972). – [12] *Kueppers F.:* Proteinase Inhibitor in Human Tears. Biochem. Biophys. Acta *229,* 845–849 (1971). – [13] *Kueppers F.:* The Major Proteinase Inhibitor in Rabbit Serum. In Pulmonary Emphysema and Proteolysis, ed. *Mittman Ch.,* Academic Press, 355–360 (1972). – [14] *Laurell C.B.* and *Eriksson S.:* The electrophoretic α_1-globulin pattern of serum in α_1-antitrypsin deficiency. Scand. J. clin. Lab. Invest. *15,* 132–140 (1963). – [15] *Laurell C.B.* und *Eriksson S.:* Hypo-α_1-Antitrypsinämie. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. *70,* 537–539 (1964). – [16] *Mittman Ch.,* ed.: Pulmonary Emphysema and Proteolysis. Academic Press (1972). – [17] *Ohlsson K.:* Comparison of Affinity of Trypsin for two α-Macroglobulin Fractions and for α_1-Antitrypsin in Dog Serum. Clin. Chim. Acta *32,* 215–230 (1971). – [18] *Piccard J.J.* and *Heremans J.F.:* Studies on α_2 Macroglobulin. I. A Method for the Isolation of Rabbit α_2 Macroglobulin. Biochim. Biophys. Acta *71,* 554–561 (1963). – [19] *Prokosch G.J.* and *Routh J.I.:* The Purification of the Trypsin Inhibitor from human Pregnancy Urine. J. Lab. clin. Med. *79,* 491–499 (1972). – [20] *Reichert R.* und *Hochstrasser K.:* Zur Biochemie und Physiologie von Proteaseinhibitoren im Bereich des Respirationstraktes. Arch. Ohren-, Nasen- und Kehlkopfhk. *202,* 376–379 (1972). – [21] *Schatzmann U.* und *Gerber H.:* Untersuchungen zur Ätiologie chronischer Lungenkrankheiten des Pferdes. Zbl. Vet. Med., A, *19,* 89–101 (1972). – [22] *Starkey P.M.:* Elastase and cathepsin G; the serin proteinases of human neutrophil leucocytes and spleen. In proteinases in mammalian cells and tissues, ed. *Barret A.J.,* North Holland, 57–89 (1977). – [23] *Tan B.H.* and *Gans H.:* The Isolation and Purification of Bovine Alpha$_1$-Antitrypsin. In Pulmonary Emphysema and Proteolysis, ed. *Mittman Ch.,* Academic Press, 361–377 (1972). – [24] *Weinbaum G., Takamoto M., Sloan B.* and *Kimbel P.:* Lung Antiproteinase: A potential defense against emphysema development. Am. Rev. Resp. Dis. *113,* 245–248 (1976). – [25] *Werle E., Marx R., Trautschold I.* und *Reichenbach-Klinke K.E.:* Vergleich der Proteinaseinhibitoren aus Lunge und Leber vom Rind mit besonderer Berücksichtigung ihres Einflusses auf Fibrinolyse und Gerinnung. Blut *14,* 206–211 (1967). – [26] *Werle E.:* The Plasma Kallikrein-Kinin System and its Inhibitors: Physiological and Pathological Considerations. In Pulmonary Emphysema and Proteolysis, ed. *Mittman Ch.,* Academic Press, 295–304 (1972).

PERSONELLES

Ehrendoktorat für Prof. R. Fankhauser

Anlässlich ihrer 200-Jahr-Feier verlieh am 27. Juni letzthin die Tierärztliche Hochschule Hannover die Würde eines Doktors der Veterinärmedizin ehrenhalber an Herrn Fankhauser, ordentl. Professor für vergleichende Neurologie an der veterinär-medizinischen Fakultät der Universität Bern.

Damit wurde nicht nur die persönliche Leistung des Geehrten, sondern auch die Tatsache anerkannt, dass an unserer Fakultät seit Jahrzehnten ein Arbeitsgebiet gepflegt wird, dessen Bedeutung in neuerer Zeit immer deutlicher in Erscheinung tritt.

Prof. H. Luginbühl, Dekan