

Mit. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 7 (1985) 109—112

Abteilung für Experimentelle Chirurgie (Leiter: Prof. Dr. R. Gottlob), der I. Chirurgischen Univ. Klinik in Wien (Vorstand: Prof. Dr. A. Fritsch)

Abteilung für Parasitologie (Leiter: Prof. Dr. H. Aspöck), des Hygiene-Institutes der Univ. Wien (Vorstand: Prof. Dr. H. Flamm)

Veränderungen im Auftreten von freien und inhibierten Proteasen bei der Ratte nach Infektion mit *Trichinella spiralis*

Ali Tacettin Sogukoglu, Andreas Hassl, Rainer Gottlob und Horst Aspöck

Einleitung

Proteasen kommen in erster Linie im Verdauungstrakt vor, wo sie der Aufspaltung der mit der Nahrung aufgenommenen Proteine dienen. Weiters finden sich Proteasen vor allem in den Lysosomen verschiedenartiger Zellen. So verfügen Leukozyten über mehrere Proteasen, die der zellulären Verdauung von eingedrungenen oder aufgenommenen Fremdmaterial dienen. Der überwiegende Teil der Proteasen kommt in inhibierter oder inaktiver Form vor; er kann nur in Ausnahmefällen mit immunologischen Methoden nachgewiesen werden. Eine Aktivierung solcher Proteasen kann erfolgen, wenn es zu einer Reaktion mit kationischen Detergenzien oder mit kationischen Proteinen kommt (GOTTLOB und MATTAUSCH 1979). Es wird vermutet, daß die kationischen Verbindungen an den Bindungsstellen der anionischen Inhibitoren kompetieren (GOTTLOB et al. 1973). In vielen Zellen gibt es auch kationische Proteine als Desinhibitoren; sie sind aber in anderen Organellen lokalisiert als die Proteasen. Eine Aktivierung der inhibierten Proteasen wird erst möglich, wenn die Membranen der Organellen zugrunde gehen und ein Kontakt zwischen kationischen Proteinen und den inhibierten oder als Vorstufe vorliegenden Enzymen zustandekommt (GOTTLOB et al. 1973, GOTTLOB und MATTAUSCH 1979). In diesen Fällen kommt es dann zum Zelltod und zur Autolyse. Im zirkulierenden Blut findet sich ein großer Überschuß an Inhibitoren (GOTTLOB und MATTAUSCH 1979, KÜPERS 1974).

In früheren Arbeiten wurden Vorkommen und Konzentration freier und inhibierter Proteasen in den Organen der gesunden Ratte untersucht (SOGUKOGLU 1982). Nunmehr sollte geprüft werden, wieweit eine chronische Infektion Einfluß auf die Proteasen nimmt. Als Erreger der Infektion wurde *Trichinella spiralis* gewählt; dieser Parasit bietet den Vorteil, daß auch massive Infektionen über längere Zeiträume hinweg ertragen werden.

Material und Methode

Wir weisen Proteasen nach, indem wir eine standardisierte Menge der zu prüfenden Substanz auf Röhrchen auftropfen, in denen sich 1 ml erhitztes Fibrin befindet. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wird die Menge des verdauten Fibrins bestimmt. Es handelt sich um eine Modifikation der Fibrinplattenmethode nach LASSEN (1952); diese Hitzefibrinröhrchenmethode gibt eine bessere Quantifizierung (GOTTLOB und

MATTAUSCH 1979). Um die inhibierten Proteasen zu desinhibieren, fügen wir ein kationisches Detergenz, nämlich Cetavlon^R 10%, oder ein kationisches Protein, Protaminsulfat 8%, zu (SOGUKOGLU 1982). 36 weibliche SPF-Ratten (Stamm Hirn: OFA Sprague-Dawley) wurden oral mit je 500 Larven von *Trichinella spiralis* infiziert. Von nüchternen, gesunden und infizierten Ratten wurden Organe sowie Blut zu unterschiedlichen Zeiten nach der Infektion entnommen.

Die Organe wurden gewogen, dann wurde die doppelte Menge physiologischer Kochsalzlösung zugesetzt. Nach dem Homogenisieren wurden 200 µl zusammen mit 10 µl kationischer Verbindungen oder mit Kochsalzlösungen auf die Hitzefibrinröhrchen aufgetropft. Für die Bestimmung der Leukozytenproteasen wurden die Leukozyten auf 80.000 pro µl konzentriert, ultrabeschallt und mit und ohne kationische Detergenzien auf die Hitzefibrinröhrchen aufgetropft (GOTTLOB und MATTAUSCH 1979). Aufschwemmungen von Trichinellarven (500/ml) wurden ebenso homogenisiert und zur Bestimmung der Lysen aufgetropft.

Die Lysen wurden in 1/100 ml angegeben. Die unter „Ergebnisse“ angeführten Unterschiede sind mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit zwischen 0,1 - 0,005 % zum Teil hochsignifikant (Wilcoxon und Kruskal-Wallis-Test).

Ergebnisse

Tabelle 1 gibt die Durchschnittswerte der Lysen bei unbehandelten Tieren sowie bei infizierten Tieren 6, 8, 53 und 112 Tage p.i. an. Beim Pankreas zeigte sich, daß die Proteasen zu allen Zeiten nach Infektion deutlich herabgesetzt waren.

Tabelle 1 Lytische Aktivitäten bei Kontrolltieren und bei infizierten Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. (Mittelwerte)

	Kontrolltiere			6 Tage p.i.			8 Tage p.i.			53 Tage p.i.			112 Tage p.i.		
	NaCl	Ceta	Prot	NaCl	Ceta	Prot	NaCl	Ceta	Prot	NaCl	Ceta	Prot	NaCl	Ceta	Prot
Speicheldrüse	27	39	33	22	31	23	17	29	20	24	33	25	23	35	25
Pankreas	74	81	78	57	78	73	44	55	53	32	37	33	40	51	49
Duodenum	39	52	45	32	45	41	40	43	39	39	47	44	40	48	40
Jejunum	27	41	32	10	18	14	17	23	20	23	28	25	25	29	25
Thymus	0	7	4	4.5	11	8	3	14	8	6	16	8	0	11	5
Milz	0	2.6	0	1	3.6	2.5	4	7	4.6	0	3.3	1.5	0	3.2	0
Diaphragma	0	20	0	0	21	0	0	24	0	2	24	2.3	3	22	5
Leukozyten	—	14	—	3	21	—	3	32	—	—	16	—	—	18	3
	Kontrolltiere			6 Tage			8 Tage			53 Tage			112 Tage		

In den Speicheldrüsen war die Proteasenaktivität nach 8 Tagen deutlich ver-

mindert. Im Duodenum waren die Proteasen nur am 6. und B. Tag und im Jejunum vom 6. bis zum 53. Tag deutlich herabgesetzt.

Anders verhielt es sich bei Thymus und Milz. Im Thymus fand sich am 6. bis zum 53. Tag eine deutliche Steigerung, in der Milz zeigte sich diese deutliche Steigerung nur am B. Tag. Konform mit Thymus und Milz waren auch die Aktivitäten der Leukozyten vom 6. bis zum 53. Tag vermehrt. Wegen der geringen zur Verfügung stehenden Mengen an Leukozyten konnte hier auf Signifikanz nicht geprüft werden. Im Zwerchfell wurden Lysen stets bei Zugabe von Cetavlon^R beobachtet. Bei Kochsalz- oder Protamin-Zusatz waren Lysen nur am 53. und 112. Tag zu sehen. Die Trichinen zeigten nur mit Kochsalz oder mit Protamin, nicht aber mit Cetavlon^R deutliche Lysen. Die Werte betragen mit NaCl 5,4/100 ml, mit Protamin 6,1/100 ml.

Diskussion

Es konnte mit der Methode der Fibrinolyse gezeigt werden, daß die Proteasen des Verdauungstraktes von Ratten nach Infektion mit *Trichinella spiralis* vermindert sind. Bei den infizierten Tieren zeigten alle 4 untersuchten Verdauungsorgane geringere Aktivitäten als bei den Kontrolltieren. Es scheint so zu sein, daß durch die Infektion eine allgemeine Beeinträchtigung im Wohlbefinden des Tieres eintritt und daß in diesen Fällen die Proteasen in den Verdauungsdrüsen nicht in dem Ausmaß wie unter physiologischen Bedingungen gebildet werden. Es handelt sich also wohl um eine Streß-Reaktion. Deutliche und zwar zum Teil hochsignifikante Zunahmen waren hingegen im Thymus und in der Milz zu beobachten, vermutlich als Zeichen einer durch die Infektion induzierten Abwehrreaktion. Diese Zunahme der Proteasen wurde durchwegs festgestellt, gleichgültig ob den Organhomogenaten Kochsalz, Cetavlon^R oder Protamin zugesetzt wurde. Auch die vermehrten Aktivitäten der Leukozyten infizierter Tiere können im Sinne einer Abwehrreaktion interpretiert werden. Dagegen ergab sich nach Zugabe von Cetavlon^R bei den Proteasen der Trichinellarven eine deutliche Hemmung. Im Zwerchfall der Kontrolltiere ebenso wie der infizierten Tiere fanden wir nach Zugabe von Cetavlon^R stets deutliche, weitgehend gleichbleibende Lysen. Wir wissen nicht, worauf diese Lysen zurückzuführen sind.

Quergestreifte Skelettmuskeln und Herzmuskeln haben bei früheren Untersuchungen niemals Lysen mit Cetavlon^R gezeigt. Die im Zwerchfell mit Cetavlon^R beobachtbaren Lysen können nicht auf Enzyme der Trichinellarven zurückführen sein, da diese Enzyme mit Cetavlon^R vollständig gehemmt werden.

Dagegen können die am 53. und am 112. Tag beobachteten Lysen mit NaCl und mit Protamin von den im Zwerchfell angereicherten Trichinellarven verursacht sein.

Zusammenfassung

Bei gesunden Kontrolltieren und bei Ratten, die 6—112 Tage vorher mit *Trichinella spiralis* infiziert worden waren, wurde der Proteasengehalt verschiede-

ner Organe bestimmt. Zu diesem Zweck wurden Organhomogenate auf Röhrrchen aufgetropft, die erhitztes Fibrin enthielten; das Ausmaß der lytischen Aktivität wurde nach 24 Stunden bei 37° C Inkubation gemessen. Inhibierte Proteasen wurden durch Zusatz einer Protaminlösung oder einer Lösung des kationischen Detergenz Cetavlon^R aktiviert und dann ebenfalls auf Fibrinröhrrchen bestimmt. Im Pankreas, in den Speicheldrüsen, im Duodenum und im Jejunum der infizierten Tiere fand sich eine deutlich herabgesetzte Aktivität der freien und inhibierten Proteasen, vermutlich als Folge einer Streß-Reaktion. Im Thymus, in der Milz und in Leukozyten der infizierten Tiere waren dagegen vermehrt Proteasen zu finden, besonders deutlich am B. Tag, und zwar mit und ohne Zusatz der kationischen Verbindungen, die in den meisten Fällen die Aktivitäten vermehrten. Diese Befunde sprechen für eine Vermehrung der Proteasen bei Aktivierung des retikuloendothelialen Systems. Bei einer Prüfung einer Aufschwemmung von Trichinellarven fanden sich dagegen zwar Aktivitäten nach NaCl- oder Protaminzusatz, aber eine Inhibierung nach Cetavlon^R. Diese Befunde ermöglichen es, die in den Trichinen enthaltenen Proteasen von jenen der Wirttiere zu differenzieren.

Summary

Changed activities of free and inhibited proteases in various organs of rats after infection with *Trichinella spiralis*.

Active and inhibited proteases contained in various organs of rats were assessed by application of homogenates of the organs to tubes filled with heated fibrin. The amount of lysed fibrin was measured after an incubation at 37° C for 24 hours. Organs of healthy controls were compared with organs of infected rats 6—112 days p.i. In the pancreas, the salivary glands, the duodenum and the jejunum of the infected animals a significant reduction of the proteases was observed. An increased protease content, however, was found in the thymus, the spleen and the leucocytes of the same animals. Organ homogenates were also dispersed in solutions of the cationic compound Cetavlon^R. In all instances this cationic agent led to an increase of the fibrinolytic activities, presumably due to activation of inhibited proteases. When, however, dispersions containing 500 homogenized trichinellae/ml were tested, a free fibrinolytic activity was abolished by the addition of Cetavlon^A.

We explain these findings by the reduction of proteases in the digestive system in a state of chronic stress and by an activation of proteases in the reticuloendothelium due to the immune response to the infection. The proteases, contained in the trichinellae can be differentiated from the proteases of the host by their inhibition after reaction with Cetavlon^R.

Literatur

GOTTLOB R., I. KLOS, G. HINGER, B. EL NASHEF (1973): The role of leucocytes in streptokinase induced lysis of clots and thrombi of various age. *Fol. Angiol.* 21, 138—143.

GOTTLOB R., M. MATTAUSCH: Cationic detergents and cationic protein-interac-

tionswith the serum inhibition of plasmin, trypsin and the neutral leucocyte protease. In: Davidson J. F., V. Cepelak, M. M. Samama, P. C. Desnoyers: Progress in clinical fibrinolysis and thrombolysis, Vol. IV., Churchill Livingstone, Edinburgh — London — New York 1979.

KÜPPERS F. (1974): Humand,-antitrypsin phenotypes. In Bayer-Symposium V. "Proteinase Inhibitors" Springer, Berlin — Heidelberg — New York, 40—46.

LASSEN M. (1952): Heat denaturation of plasminogen in the Fibrin plate method. Acta Physiol. Scand. 27, 371—375.

SOGUKOGLU A. T. (1982): Aktive und inhibierte Proteasen in verschiedenen Organen bei Menschen und im Tierreich. Inaug. Diss. Univ. Wien.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. Ali Tacettin Sogukoglu
1. Chirurgische Univ. Klinik, Abt. f. Experimentelle Chirurgie,
Alser Straße 4, A-1090 Wien, Österreich.