

Literatur

- Karnovsky, M. J., Roots, L.: A direct coloring thiocholine method for cholinesterase. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 219 (1964).
- Usadel, K. H., Rockert, H., Obert, I., Schöffling, K.: Über die Entwicklung isolierter Zellsuspensionstransplantate aus embryonalen Darm- und Magenanlagen. *Z. exp. Med.* (im Druck).

Dr. K. H. Usadel
Zentrum für Innere Medizin
Abteilung für Endokrinologie
D-6000 Frankfurt a. M. 70
Ludwig-Rehn-Str. 14

Plasmaphosphatide und orale Ovulationshemmer *

P. JIPP

1. Medizinische Klinik der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. A. Bernsmeier)

Eingegangen am 3. August 1970

Ebenso wie andere Untersucher [28–30] haben wir [18–20] bei arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen eine signifikante Erhöhung der Plasmaphosphatidfraktion Colamin-Kephalin beobachtet. Da bislang keine Angaben über die Spezifität dieses Befundes vorliegen, sind hierzu systematische Untersuchungen aufgenommen worden. Im Rahmen dieser Arbeiten wurde unter anderem das Verhalten der Plasmaphosphatide nach Applikation oraler Ovulationshemmer näher untersucht, da oestrogen- und gestagenhaltige Antikonzeptiva Konzentrationsänderungen verschiedener Plasmalipide und Lipoproteide bewirken sollen [2, 5, 6, 14, 21, 45, 46].

Probanden und Methodik

Die Bestimmung der Plasmaphosphatide erfolgte bei 25 stoffwechsel- und kreislaufgesunden Frauen um den 20. Cyclustag, die über mindestens 3 Cyclen ein orales Antikonzeptivum (Eugynon) eingenommen hatten, sowie bei 25 gesunden, regelrecht menstruierenden Frauen um den 20. Cyclustag und an 25 gesunden jungen Männern. Es wurde in allen Fällen der Gesamtphosphatidgehalt sowie die Lysolecithin-, Sphingomyelin-, Lecithin- und Colamin-Kephalin-Konzentration im Plasma dünn-schichtchromatographisch bestimmt. Hinsichtlich der methodischen Einzelheiten wird auf frühere Darstellungen verwiesen [18, 20]. Die einander entsprechenden Mittelwerte sind anhand des *t*-Tests verglichen worden.

Ergebnisse

1. Alter

Das Durchschnittsalter der weiblichen und männlichen Kontrollpersonen beträgt 24 und 26 Jahre, das der Frauen, die ein orales Antikonzeptivum eingenommen hatten, 25 Jahre.

2. Plasmaphosphatide

a) *Ausbeute.* Die dünn-schichtchromatographische Auftrennung der Plasmaphosphatide ergibt das bekannte Verteilungsmuster [18–20]. Die Differenz der durch direkte Bestimmung aus den Gesamtlipidextrakten und der durch Addition der dünn-schichtchromatographisch getrennten Phosphatidfraktionen erhaltenen Gesamtphosphormengen beträgt bei den Kontrollgruppen im Mittel –1,32% (Frauen) und –0,16% (Männer). Bei den Frauen, die ein orales Antikonzeptivum eingenommen hatten, ergibt sich eine mittlere Differenz von –0,33%. Ein nennenswerter Substanzverlust während des Analyseanges ist also bei keiner der untersuchten Gruppen eingetreten. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen [18–20] konnten jetzt gelegentlich im Startgebiet der Dünn-schichtplatte Phosphatidspuren erfaßt werden. Der Phosphorgehalt dieser Areale macht im Mittel jedoch weniger als 0,5% der Gesamtphosphormenge aus.

b) *Phosphatidfraktionen.* Die Einzelwerte und die statistischen Beziehungen sind der Tabelle zu entnehmen. Die mittleren Gesamtphosphatidkonzentrationen zeigen keine Unterschiede in den drei untersuchten Kollektiven. Die

* Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Tabelle. Mittelwerte und Standardabweichung (*s*) in mg/100 ml für Gesamtphosphatide (GP), Lysolecithin (LL), Sphingomyelin (Sph), Lecithin (Le) und Colamin-Kephalin (CK) bei Männern (M), Frauen ohne Antikonzeptivum (F) und Frauen mit einem oralen Ovulationshemmer (O)

Die mit einem * gezeichneten Werte sind auf dem 0,5% Niveau, die mit ** versehenen Daten auf dem 0,1% Niveau signifikant verschieden (* = 0,005 > 2P > 0,001; ** = 2P < 0,001)

	GP	LL	Sph	Le	CK
M	129,98 <i>s</i> = 21,59	9,55 <i>s</i> = 1,45	26,54 <i>s</i> = 5,02	89,14* <i>s</i> = 18,13	4,75 <i>s</i> = 1,14
F	137,32 <i>s</i> = 15,72	10,22 <i>s</i> = 1,84	27,94 <i>s</i> = 3,07	94,89* <i>s</i> = 13,98	4,27** <i>s</i> = 1,37
O	144,13 <i>s</i> = 22,01	10,26 <i>s</i> = 2,52	29,40 <i>s</i> = 5,55	97,37 <i>s</i> = 16,87	7,10** <i>s</i> = 3,39

Mittelwerte für Lysolecithin, Sphingomyelin und Lecithin verhalten sich bei Frauen mit und ohne Ovulationshemmer gleich. Auffällig aber ist eine signifikante Steigerung der mittleren Colamin-Kephalin-Konzentration bei Frauen mit einem Antikonzeptivum gegenüber den nicht behandelten Probandinnen. Die mittleren Lecithinwerte von Männern und Frauen weisen eine formal signifikante Differenz auf, nicht dagegen die zugehörigen Mittelwerte der übrigen Phosphatidfraktionen.

Besprechung der Befunde

Seit Einführung der hormonellen Antikonzeption hat sich gezeigt, daß unter einer solchen Medikation die verschiedensten klinisch-chemischen Parameter verändert werden. Wilbert u. Mitarb. [44] haben hierüber zusammenfassend berichtet (s. auch [4, 7, 22–24, 31, 32, 41, 47]). Wenn es auch unwahrscheinlich ist, daß allen bisher erkannten Verschiebungen ein pathogenetischer Stellenwert zukommt, sollten die vorliegenden Beobachtungen doch dazu führen, Untersuchungen über Pathogenese und Folgen solcher „Nebenwirkungen“ aufzunehmen. Hier sollen nur die durch orale Antikonzeptiva ausgelösten Veränderungen im Fettstoffwechsel interessieren, die nach den bisherigen Mitteilungen sämtliche Fettfraktionen betreffen.

Nach Applikation eines oestrogen- und gestagenhaltigen Antikonzeptivums ist von der Mehrzahl der Untersucher [6, 14, 45, 46] eine Erhöhung der Triglyceridwerte im Blut gefunden worden, während Kaffarnik u. Mitarb. [21] keine Änderung des Triglyceridspiegels nachweisen konnten. Nach parenteraler Applikation eines synthetischen Depot-Gestagens kam es dagegen zu einer signifikanten Senkung des Triglyceridspiegels [11]. Hiernach sind also differente Wirkungen von Oestrogenen und Gestagenen auf den Lipidstoffwechsel anzunehmen. Dies gilt insbesondere für die verschiedenen Antikonzeptiva mit ihrem unterschiedlichen Gehalt an beiden Hormonfraktionen. Neben der Erhöhung des Triglyceridspiegels ist ein Anstieg des Serumcholesterinspiegels beobachtet worden [2, 45, 46]. Andere Untersucher sahen dagegen keine Verschiebung der Cholesterinkonzentration, fanden aber bei Verlaufsbeobachtungen einen passageren Anstieg der freien Fettsäuren [21]. Darüber hinaus ist, entsprechend der Triglycerid- und Cholesterinwerterhöhung, eine Zunahme der LDL-Fraktion aufgefunden [2, 45, 46] und eine Vermehrung der Gesamtphosphatide [2, 21]. Brody u. Mitarb. [5, 6] fanden bei fraktionierter Aufarbeitung der Plasmaphosphatide dann einen Anstieg der Lecithin- und Colamin-Kephalinfraktion sowie einen Abfall der Lysolecithin- und Sphingomyelin-Konzentration. Die eigenen Untersuchungen zeigen zwar auch eine geringe, jedoch keine signifikante Erhöhung des Gesamtphosphatidgehaltes nach hormoneller Antikonzeption. Auffallend aber ist bei der fraktionierten Aufarbeitung der Plasmaphosphatide eine signifikante Steigerung der Colamin-Kephalin-Fraktion, während die Fraktionen Lysolecithin, Lecithin und Sphingomyelin im Mittel durch das von uns verwendete Antikonzeptivum nicht beeinflußt werden. Es liegt hier also ein prinzipiell gleichartiges Phosphatidmuster vor wie bei Patienten mit einer manifesten Arteriosklerose [18–20]. Ein Vergleich mit den von Brody u. Mitarb. [6] vorgelegten Befunden ist nur bedingt möglich, da die von den genannten Autoren untersuchten Patientinnen Antikonzeptiva mit anderen Oestrogen- und Gestagenkonzentrationen benutzten als die Frauen unserer Studie. Gleiches gilt für die in der Literatur niedergelegten

unterschiedlichen Angaben über das Verhalten der anderen Fettfraktionen unter oralen Ovulationshemmern. Es erscheint deswegen notwendig, entsprechende Untersuchungsreihen für jedes der vorhandenen Antikonzeptiva aufzunehmen, da je nach Konzentration der Oestrogen- und Gestagenkomponente mit unterschiedlichen Auswirkungen auf den Fettstoffwechsel zu rechnen ist.

Über die Ursachen der hormonell bedingten Verschiebungen im Fettstoffwechsel bestehen noch keine gesicherten Vorstellungen. Dieser Problembereich erscheint jedoch ebenso abklärungsbedürftig wie die Frage nach den möglichen Folgen solcher Änderungen der Lipidkonzentrationen; dieses um so mehr, als es sich bei der erhöht gefundenen Phosphatidfraktion Colamin-Kephalin um eine gerinnungsaktive Substanz handelt [3, 8, 9, 15, 26, 35—40]. In diesem Zusammenhang erscheint dann auch die unter hormoneller Antikonzeption verschiedentlich beobachtete Verkürzung der Gerinnungszeit bei allerdings gleichzeitiger Aktivierung des fibrinolytischen Potentials [1, 13] und die derzeit noch umstrittene Frage nach dem Kausalzusammenhang zwischen Einnahme von Ovulationshemmern und Thrombosehäufigkeit [10, 12, 13, 16, 17, 24, 25, 27, 33, 42, 43] von besonderem Interesse. Andererseits ist die von uns gefundene Konzentrationssteigerung der Phosphatidfraktion Colamin-Kephalin nicht sehr erheblich. Auch unter Berücksichtigung ihrer gerinnungsfördernden Wirkung kann hierdurch allein noch keine Thrombosegefährdung gegeben sein. Diese könnte jedoch dann bestehen, wenn weitere prädisponierende Faktoren hinzutreten, wobei einem Gefäßwandfaktor und der ebenfalls durch Antikonzeptiva beeinflussbaren Plättchenklebrigkeit [34] eine besondere Bedeutung beizumessen ist.

Zusammenfassung. Bei 25 Frauen, die über mindestens 3 Monate ein Antikonzeptivum (Eugynon) eingenommen hatten, wurden die Plasmaphosphatide dünnstichtchromatographisch bestimmt. Dabei zeigte sich eine signifikante Steigerung der gerinnungsaktiven Fraktion Colamin-Kephalin. Dieser Befund wird im Hinblick auf den zur Zeit noch umstrittenen Kausalzusammenhang zwischen Einnahme von Ovulationshemmern und Thrombosehäufigkeit diskutiert.

Summary. Plasma phospholipid levels were measured by thin-layer chromatography in 25 women who had taken contraceptives (Eugynon) for at least 3 months. There was a significant increase of the active clotting colamin-kephalin fraction. This finding is discussed in view of the as yet controversial relation between the application of contraceptives and the incidence of thrombosis.

Literatur

- Ambrus, J. L., Niswander, K. R., Courey, N. G., Wamsteker, E. F., Mink, I. B.: Progestational agents and blood coagulation II. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **103**, 994 (1969).
- Aurell, M., Cramér, K., Rybo, G.: Serum lipids and lipoproteins during long-term administration of an oral contraceptive. *Lancet* **1966**I, 291.
- Billimoria, J. D., Irani, V. J., Maclagan, N. F.: Phospholipid fractionation and blood clotting. *J. Atheroscler. Res.* **5**, 90 (1965).
- Bole, G. G., Friedlaender, M. H., Smith, C. K.: Rheumatic symptoms and serological abnormalities induced by oral contraceptives. *Lancet* **1969**I, 323.
- Brody, S., Högdahl, A.-M., Nilsson, L., Svanborg, A., Vikrot, O.: The effect of some ovulation inhibitors on the lipid metabolism. *Acta med. scand.* **179**, 501 (1966).
- Kersten, J., Nilsson, L., Svanborg, A.: The effects of some ovulation inhibitors on the different plasma lipid fractions. *Acta med. scand.* **183**, 1 (1968).
- Burke, C. W.: Biologically active cortisol in plasma of oestrogen-treated and normal subjects. *Brit. med. J.* **1969**II, 798.
- Chargaff, E., Bancroft, F. W., Stanley-Brown, M.: Studies on the chemistry of blood coagulation. *J. biol. Chem.* **116**, 237 (1936).
- Daemen, F. J. M., Arkel, C. van, Hart, H. Ch., Drift, C. van der, Deenen, L. L. M. van: Activity of synthetic phospholipids in blood coagulation. *Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.)* **13**, 194 (1965).
- Dalgaard, J. B., Gregersen, M.: Koronartrombose unter oral antikonzeption. *Nord. Med.* **81**, 273 (1969).
- Gilfrich, H. J., Nieschlag, E., Dudeck, J., Overzier, C.: Norethisteronönanth. *Dtsch. med. Wschr.* **94**, 2473 (1969).
- Grant, E. C. G.: Venous effects of oral contraceptives. *Brit. med. J.* **1969**, 4, 73.
- Halberstadt, E., Brehen, H., Wüst, L., Lüters, I., Kollmar, I.: Zur Frage eines erhöhten Thromboserisikos bei Kurz- und Langzeittherapie mit oralen Ovulationshemmern. *Med. Welt* **1968**, 806.
- Hazzard, W. R., Spiger, M. J., Bagdade, J. D., Biermann, E. L.: Studies on the mechanism of increased plasma triglyceride levels induced by oral contraceptives. *New Engl. J. Med.* **280**, 471 (1969).
- Howell, W. H.: The nature and action of the thromboplastic (zymoplastic) substance of the tissues. *Amer. J. Physiol.* **31**, 1 (1912).
- Inman, W. H. W., Vessey, M. P., Westerholm, B., Englund, A.: Thromboembolic disease and the steroidal content of oral contraceptives. A report to the committee on safety of drugs. *Brit. med. J.* **1970**(2), 203.
- Irey, N. S., Manion, W. C., Taylor, H. B.: Vascular lesions in women taking oral contraceptives. *Arch. Path.* **89**, 1 (1970).
- Jipp, P.: Plasmaphosphatide bei arteriosklerotischen Verschlüssen der Extremitätenarterien. *Dtsch. med. Wschr.* **94**, 530 (1969).
- Plasmaphosphatide und Arteriosklerose. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **75**, 896 (1969).
- Plasmaphosphatide bei Coronarinsuffizienz. *Klin. Wschr.* **48**, 231 (1970).
- Kaffarnik, H., Lehnert, H., Meyer-Bertenrath, I. G., Zöfel, P., Karsznia, R.: Untersuchungen der Plasmalipide vor und nach 6monatiger oraler Behandlung mit Ovulationshemmern. *Klin. Wschr.* **48**, 439 (1970).
- Käser, O.: Ikterus in der Schwangerschaft und unter Ovulationshemmern. *Schweiz. med. Wschr.* **100**, 209 (1970).
- Larsson-Cohn, U., Stenram, U.: Liver ultrastructure and function in icteric and non-icteric women using oral contraceptive agents. *Acta med. scand.* **181**, 257 (1967).
- Lewis, P. D., Harrison, M. J. G.: Involuntary movements in patients taking oral contraceptives. *Brit. med. J.* **1969**(4), 404.
- Ludwig, H.: Die Pille — Hämostase — Gefäßkomplikationen. *Fortschr. Med.* **88**, 41 (1970).
- Lüscher, E. F.: Kontaktaktivierung, biologisch gesehen. In: *Biochemie und Aktivierung des Prothrombins. Kontaktaktivierung, biologisch gesehen, Niereninsuffizienz und Hämostase*; hrsg. H. Schröer. Stuttgart: Schattauer 1968.
- Markush, R. E., Seigel, G. G.: Oral contraceptives and mortality trends from thromboembolism in the United States. *Amer. J. publ. Hlth* **59**, 418 (1969).
- Nothman, M. M., Proger, S.: Cephalins in the blood. *J. Amer. med. Ass.* **179**, 40 (1962).
- — Kephalein im Blut Gesunder und an Atherosklerose der Kranzarterien Erkrankter. *Med. Welt* **1964**, 190.
- — Plasma cephalins of patients with acute myocardial infarction. *Circulation* **32**, 287 (1966).
- Oldershausen, H. F. v.: Schwangerschaftsikerus und ovulationshemmende Steroide. *Dtsch. med. J.* **19**, 394 (1968).
- Eggstein, M., Dold, U., Knorr, K.: Ikterus bei intrahepatischer Cholestase nach Gaben von antikonzeptionellen Steroiden. *Dtsch. med. Wschr.* **90**, 1290 (1965).
- Oliver, M. F.: Oral contraceptives and myocardial infarction. *Brit. med. J.* **1970**(2), 210.
- Poller, L., Priest, C. M., Thomson, J. M.: Platelet aggregation during contraception. *Brit. med. J.* **1969**(4), 273.
- Poole, J. C. F.: Fats and blood coagulation. *Brit. med. Bull.* **14**, 253 (1958).
- Robinson, D. S.: A comparison of the effects of certain phosphatides and of chylomicra on plasma coagulation in the presence of Russel's viper venom. *Quart. J. exp. Physiol.* **41**, 31 (1956).
- — Further observations on the effects of ethanolamine phosphatide on plasma coagulation. *Quart. J. exp. Physiol.* **41**, 295 (1956).
- Rouser, G.: Phospholipids and blood coagulation. *Amer. J. Clin. Nutr.* **6**, 681 (1958).
- White, S. G., Schloredt, D.: Phospholipid structure and thromboplastic activity. I. The phosphatide fraction active in recalcified normal human plasma. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **28**, 71 (1958).
- Schloredt, D.: Phospholipid structure and thromboplastic activity. II. The fatty acid composition of the

- active phosphatidyl ethanolamines. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **28**, 81 (1958).
41. Sammour, M. B., Hilal, S. O.: Alkaline phosphatase activity of polymorphonuclear leucocytes in relation to oral contraceptives. Amer. J. Obstet. Gynec. **103**, 823 (1969).
 42. Schreiner, W.: Nebenwirkungen der medikamentösen Antikonzeption. Schweiz. med. Wschr. **100**, 778 (1970).
 43. Vessey, M. P., Doll, R.: Investigation of relation between use of oral contraceptives and thromboembolic disease. Brit. med. J. **1969** (2), 651.
 44. Wilbert, L., Hillmer, D., Honstein, W., Reisert, P., Kaboth, U., Creutzfeldt, W.: Einfluß oraler Ovulationshemmer auf klinisch-chemische Normalwerte. Dtsch. med. Wschr. **94**, 844 (1969).
 45. Wynn, V., Doar, J. W. H., Mills, G. L.: Some effects of oral contraceptives on serum-lipid and lipoprotein. Lancet **1966** II, 720.
 46. — — — Stokes, T.: Fasting serum triglyceride, cholesterol, and lipoprotein levels during oral-contraceptive therapy. Lancet **1969** II, 756.
 47. — — — Some effects of oral contraceptives on carbohydrate metabolism. Lancet **1969** II, 761.

Priv.-Doz. Dr. med. P. Jipp
I. Medizinische Klinik der Universität Kiel
D-2300 Kiel 1, Schittenhelmstraße 12

**Nachweis einer Peptidyl-Peptid-Hydrolase (Kollagenase?)*
in der Aortenwand des Schweins**

DIETER PLATT

Medizinische Kliniken und Polikliniken der Justus Liebig-Universität Gießen (Direktorium: Prof. Dr. H. J. Dengler und Prof. Dr. H. G. Lasch)

Eingegangen am 9. August 1970

Durch die Arbeiten von Buddecke, Kirk, Platt u.a. wurde die Existenz zahlreicher Enzyme in der Aortenwand von Mensch und Tier nachgewiesen [4—6, 8]. So konnte vor allem durch die Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Buddecke [5, 6] der Nachweis der am Abbau von Mucopolysaccharid-Proteinkomplexen beteiligten Enzyme in der Aortenwand des Rindes erbracht werden. Nur wenige Ergebnisse liegen bisher über den Proteinstoffwechsel in Gefäßwänden vor. Intracelluläre proteolytische Enzyme (Peptidyl-Peptid-Hydrolasen), sog. Kathepsine, konnten bisher von Bavina und Kritsman [1] in Gefäßwänden von Kaninchen, von Kirk [4] in menschlichen Aorten und Coronararterien und von Buddecke und Reich [3] in der Aortenwand des Rindes nachgewiesen werden. Aktivitätsmessungen kollagenolytischer Enzyme in der Aortenwand liegen bisher nicht vor. In den vorliegenden Untersuchungen sollte daher versucht werden, mit Hilfe einer von Strauch u. Mitarb. [9—11] entwickelten Methode den Aktivitätsnachweis eines kollagenolytischen Enzyms in der Aortenwand des Schweins zu erbringen.

Methodik

Die Aorten wurden frisch vom Schlachthof geholt, von anhängendem Fettgewebe befreit und zur Ermittlung eines optimalen Extraktionsmittels zunächst mit verschiedenen Lösungen (Aq. dest., physiol. NaCl-Lösung, Citrat-Phosphat-Puffer u. a.) homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend einer Citrat- und fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterworfen.

Als weiterer Reinigungsschritt folgte eine Säulenchromatographie an Sephadex G 100. Als Substrat für die Aktivitätsbestimmung der Peptidyl-Peptid-Hydrolase diente das Hexapeptid 4-Phenylazobenzyl-oxycarbonyl-L-Prolyl-L-Leucyl-Glycyl-L-Prolyl-D-Arginin-OH, das — wie aus früheren Untersuchungen hervorgeht [7] — durch Pepsin, Papain und Trypsin sowie Kathepsin nicht gespalten wird. Als Eichsubstanz wurde das Tripeptid 4-Phenylazobenzyl-oxycarbonyl-L-Prolyl-L-Leucin verwendet. Die Spaltung des Hexapeptids erfolgt zwischen den beiden Aminosäuren Leucin und Glycin.

* In der Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam, 2nd Ed., 1965, ist der systematische Name nicht verzeichnet.

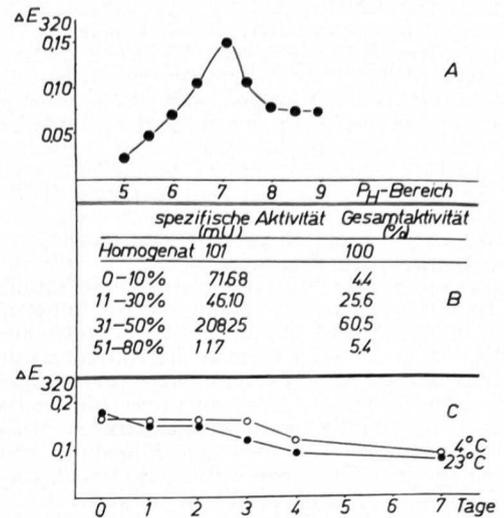


Abb. 1. pH-Optimum (A) fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (B) und Lagerungsversuch (Homogenat) (C) der Peptidyl-Peptid-Hydrolase der Schweineorta

Das entstandene Tripeptid wird nach Extraktion mit Äthylacetat bei 320 nm spektrophotometrisch bestimmt. Als Enzymaktivitätseinheit (IU) ist die Enzymmenge definiert, die die Umsetzung von 1 µMol pro Minute mg Protein bei 37°C katalysiert.

Ergebnisse

Von den eingesetzten Extraktionsmedien: Aq. dest., physiol. NaCl-Lösung und Ca-Acetatpuffer, pH 7,2, wurden nach Homogenisierung mit 0,01 mol Ca-Acetatpuffer, pH 7,2, die höchsten spezifischen Aktivitäten gemessen. Das pH-Optimum liegt — in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen [7] — zwischen 7 und 8 (Abb. 1). Eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (Gew./Vol.-%) ergab die höchste spezifische Peptidyl-Peptid-Hydrolase-Aktivität in der Fraktion 30—50% (Abb. 1). Die Anreicherung ist bei diesem Schritt sehr gering. Ebenso bringt eine säulenchromatographische Reinigung an Sephadex G 100 nur dann eine Anreicherung der spezifischen Enzymaktivität, wenn der Chromatographie-schritt nicht länger als 4—6 Std dauert. Das Ergebnis des Lagerungsversuchs der Schweineorta geht aus Abb. 1 hervor. Eine Lagerung des Homogenats bei -25°C läßt während eines Zeitraums von 1/2 Jahr keinen signifikanten Aktivitätsabfall erkennen, wenn Ca-Acetatpuffer (0,01 mol, pH 7,2) als Extraktionsmittel verwandt wird. Einfrier-/Auftauschritte (bis zu 3x) ergeben gegenüber Direktbestimmungen keine höheren spezifischen Aktivitäten. Die Ergebnisse zeigen die Bedeutung der Ca⁺⁺-Ionen für die Stabilisierung des Enzyms.

Diskussion

Die Existenz von intercellulär gelegenen Proteoglycanen und Skleroproteiden erfordert spezifische Enzyme, die den Abbau der einzelnen Substrate — Hyaluronsäure, Chondroitinsulfate, Kollagen und Elastin — katalysieren. In zahlreichen Arbeiten wurde der Nachweis der am Abbau von Mucopolysaccharid-Proteinkomplexen beteiligten Enzyme in der Aortenwand erbracht [3—6, 8]. Untersuchungen zum Kollagenstoffwechsel der Aortenwand beschränkten sich bisher auf Konzentrationsbestimmungen des Skleroproteids in Abhängigkeit von der Lokalisation (Aorta thoracica, Aorta abdominalis), vom Alter und von arteriosklerotischen Umbauvorgängen der Gefäßwand [2]. Zur Aufrechterhaltung der Gefäßwandstruktur ist ein „steady state“ erforderlich, d.h., daß Kollagen-Synthese und -Abbau im Gleichgewicht stehen. Messungen der Inkorporationsraten von ¹⁴C-Prolin und ¹⁴C-Glycin lassen gewisse Rückschlüsse auf die Kollagen-Synthese zu. Aktivitätsmessungen kollagenolytischer Enzyme wurden vor allem durch die Arbeitsgruppe um Strauch und Gries [9] durchgeführt. Als Substrat für die „Kollagenase“-Aktivitätsbestimmungen diente das Hexapeptid PZ-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg-OH. Dieses Substrat weist die im Kollagenmolekül enthaltene Sequenz — Pro-Leu-Gly — auf und scheint damit geeignet, Aussagen über die Spaltung bestimmter Abschnitte des Kollagenmoleküls