Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 210–213

Inaktivierung von α -L-Asparaginyll-Angiotensin II durch Erythrocyten bei Gesunden, bei verschiedenen Hochdruckformen und bei Lebererkrankungen

Von H. P. Nast, A. Distler, G. Schreiber und U. Walter

Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik (Direktor: Prof. Dr. H. P. Wolff) Mainz

(Eingegangen am 5. September/14. Dezember 1973)

Untersuchungen der Aktivität angiotensin-inaktivierender Enzyme (sog. „Angiotensinasen“) in den Erythrocyten bei Hypertonie und bei Lebererkrankungen liegen bisher nicht vor. Es wurde deshalb die Inaktivierung von α -L-Asparaginyll¹-Angiotensin II im Hämolyt und in den Erythrocytenmembranen bei 8 gesunden Personen, bei 9 Patienten mit essentieller und bei 9 Patienten mit renaler Hypertonie, bei 2 Fällen von primärem Aldosteronismus sowie bei 9 Patienten mit Lebererkrankungen untersucht. Zur Bestimmung der „Angiotensinase“-Aktivität wurde der NADH-abhängige optische Test mit Asparaginyll¹-Angiotensin II als Substrat benutzt.

In menschlichen Erythrocyten konnte nach Hämolyse sowohl bei renaler als auch bei essentieller Hypertonie sowie bei 2 Fällen mit primärem Aldosteronismus kein Unterschied in der Aminopeptidaseaktivität gegenüber Normalpersonen gefunden werden. Patienten mit akuter Hepatitis bzw. Lebercirrhose zeigten dagegen eine gegenüber Normalpersonen signifikant erhöhte „Angiotensinase“-Aktivität im Hämolyt und in den Erythrocytenmembranen.

Die intrazelluläre Aminopeptidaseaktivität war bei Normalpersonen und bei Patienten mit Lebererkrankungen nahezu gleich ($10,10 \pm 0,78$ bzw. $10,09 \pm 2,16$ U/l Erythrocyten). Die Aminopeptidaseaktivität der Erythrocytenmembranen bei Patienten mit Leberparenchymerkrankungen ($15,75 \pm 1,92$ U/l Erythrocyten) unterschied sich signifikant ($p < 0,01$) von der bei Normalpersonen ($8,97 \pm 0,97$ U/l Erythrocyten). Dies dürfte auf eine Adsorption von Plasmaaminopeptidasen an die äußere Erythrocytenmembran zurückzuführen sein. Eine Penetration von Plasmaaminopeptidasen in das Innere des Erythrocyten sowie eine Neusynthese scheinen nicht vorzuliegen.

Inactivation of α -L-asparaginyll-angiotensin II by erythrocytes from healthy persons, and from patients with various forms of hypertension, or liver diseases

The aminopeptidase activity of erythrocytes of 9 patients with essential hypertension, of 9 patients with renal hypertension, of 2 cases with primary aldosteronism, of 9 patients with liver diseases, and of 9 healthy control subjects was measured by a NADH-dependent optical test, using α -L-asparaginyll¹-angiotensin II as substrate. No difference was found in the asparaginyll¹-aminopeptidase activity of the hemolysate and of hemoglobin-free ghosts of erythrocytes between the various groups of hypertensives, or between the hypertensive groups and the normal subjects. A highly significant elevation in the enzyme activity of the hemolysate as well as of the membranes was observed only in the patients with liver diseases.

The intracellular aminopeptidase activity was about the same in normal persons and in patients with liver diseases ($10,10 \pm 0,78$ and $10,09 \pm 2,16$ U/l erythrocytes respectively), however the enzyme activity of the outer surface of the membranes of human erythrocytes was significantly higher in patients with liver diseases (control subjects: $8,97 \pm 0,97$ U/l erythrocytes – liver diseases $15,75 \pm 1,92$ U/l erythrocytes ($p < 0,01$)). This might be due to an adsorption of plasmaaminopeptidasen to the outer surface of the membranes of the erythrocytes. A penetration of plasmaaminopeptidasen into the interior of the erythrocytes, or a synthesis de novo, appear unlikely.

Für die Inaktivierung von zirkulierendem Angiotensin II spielt quantitativ der Abbau in den Organen, besonders der Leber, die bedeutungsvollste Rolle (1,2). Von geringer Bedeutung ist demgegenüber der Abbau von Angiotensin durch Aminopeptidasen (sog. „Angiotensinasen“) im Plasma sowie in den Erythrocyten (1, 2).

Aktivitätsbestimmungen angiotensin-inaktivierender Enzyme im Plasma bei verschiedenen Formen der Hypertonie ergaben widersprüchliche Resultate (3–10). Die meisten Untersucher (5–10) fanden bei Hypertonikern keine Abweichung der Plasmaangiotensinaseaktivität von der Norm. Vereinzelt wurde jedoch über erhöhte (3) bzw. erniedrigte (4) Angiotensinaseaktivitäten bei verschiedenen Hypertonieformen berichtet.

Da der Angiotensinabbau in den Organen beim Menschen nicht oder nur sehr schwer einer Untersuchung

zugänglich ist, haben wir als Modell für den Angiotensinabbau den Erythrocyten gewählt.

Untersuchungen der Angiotensinaseaktivität in den Erythrocyten bei Hypertonie liegen bisher nicht vor. Es wurde die Angiotensinaseaktivität mit α -L-Asparaginyll¹-Angiotensin II als Substrat im Hämolyt und in den Erythrocytenmembranen bei verschiedenen Hypertonieformen untersucht. Die Untersuchung der Angiotensinaseaktivität der Erythrocyten erschien auch deshalb sinnvoll, weil Plasma- und Erythrocyten-Angiotensinasen z. T. unterschiedliche biochemische Eigenschaften aufweisen (15, 16, 17). Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit die Angiotensinaseaktivität in den Erythrocyten bei Patienten mit Lebererkrankungen untersucht, da bei Lebererkrankungen wiederholt erhöhte Plasmaangiotensinaseaktivitäten beschrieben wurden (8, 9, 11, 12, 14).

Probanden und Methoden

Probanden

Normalpersonen

Bei den 9 Gesunden handelte es sich um 7 Männer zwischen 23 und 62 Jahren und 2 Frauen im Alter von 25 und 59 Jahren. Der Blutdruck lag systolisch zwischen 110 und 130 mm Hg, diastolisch zwischen 75 und 90 mm Hg und betrug im Mittel $122 \pm 6,1/82 \pm 5,0$ mm Hg.

Patienten mit essentieller Hypertonie

Diese Gruppe bestand aus 9 Patienten, davon 7 Männer im Alter zwischen 28 und 61 Jahren und 2 Frauen im Alter von 39 und 32 Jahren. Die Blutdruckwerte lagen systolisch zwischen 150 und 220 mm Hg, diastolisch zwischen 100 und 140 mm Hg (Mittelwerte $184 \pm 23,1/116 \pm 11,7$ mm Hg). Sekundäre Hypertonieformen waren in allen Fällen vor der Untersuchung ausgeschlossen worden.

Patienten mit renaler Hypertonie

Diese Gruppe bestand aus 9 Patienten (1 Mann von 28 Jahren, 8 Frauen zwischen 23 und 43 Jahren) mit Hypertonie bei chronischer Glomerulonephritis ($n = 1$), chronischer Pyelonephritis ($n = 5$), Zystennierenerkrankung ($n = 1$), interstitieller Nephritis bei Phenacetinabusus ($n = 1$) bzw. Nierentuberkulose ($n = 1$). Die Blutdruckwerte lagen systolisch zwischen 140 und 190 mm Hg, diastolisch zwischen 100 und 130 mm Hg (Mittelwert $154 \pm 18,8/106 \pm 13,2$ mm Hg). Das Serumkreatinin betrug bei einem Patienten $1,33$ mmol/l, die Kreatininclearance lag bei 2 ml/min, bei den übrigen Patienten lag das Serumkreatinin im Normbereich.

Primärer Aldosteronismus

Es handelte sich um 2 Patienten (ein 47-jähriger Mann und eine 30-jährige Frau) mit primärem Aldosteronismus bei operativ gesichertem solitärem Nebennierenrindenadenom. Die Blutdruckwerte betrugen $210/140$ bzw. $240/140$ mm Hg.

Lebererkrankungen

Bei den Patienten mit Lebererkrankungen handelte es sich um 4 Männer im Alter zwischen 16 und 38 Jahren und um 5 Frauen zwischen 17 und 57 Jahren. 7 Personen waren an einer akuten Hepatitis erkrankt, 2 hatten einen akuten Schub bei chronisch-agressiver Hepatitis. 1 Patient mit akuter Hepatitis hatte bei bekannter essentieller Hypertonie einen Blutdruckwert von $180/90$ mm Hg. Die Blutdruckwerte der übrigen Personen lagen systolisch zwischen 115 und 130 mm Hg, diastolisch zwischen 60 und 90 mm Hg und betrugen im Mittel $121 \pm 4,4/77 \pm 9,6$ mm Hg. Die Blutentnahmen erfolgten im Stadium der höchsten Transaminaseaktivität.

Methoden

Präparation des Hämolysats und der Erythrocytenmembranen

Peripheres venöses Blut wurde in vorgekühlte Röhrchen entnommen, die unmittelbar nach Blutentnahme in Eis gestellt und bei $1900 \text{ g } 20 \text{ min}$ lang bei 4°C zentrifugiert wurden. Nach Abtrennen des Plasmas wurde das Erythrocytenkonzentrat dreimal mit einer NaCl-Lösung in einer Konzentration von $0,15 \text{ mol/l}$ gewaschen und durch Zugabe eines gleichen Volumens bidest. Wasser hämolysiert. Das Hämolysat wurde dann bei $20000 \text{ g } 10 \text{ min}$ lang zentrifugiert, der dunkle, transparente Überstand dekantiert und lyophilisiert. Die im Niederschlag befindlichen Erythrocytenmembranen wurden etwa zehnmal mit einer $0,034 \text{ mol/l}$ NaCl-Lösung gewaschen, bis das Waschwasser farblos war; anschließend wurden die Membranen lyophilisiert.

Messung der Asparagin-Abspaltung aus α -L-Asparaginyll-Angiotensin II (Aminopeptidaseaktivität) nach Oelkers und v. Goldacker (18)

Die Enzymaktivitätsbestimmung des lyophilisierten Hämolysats sowie der Erythrocytenmembranen erfolgte mit Hilfe des NADH-abhängigen optischen Tests mit α -L-Asparaginyll-Angio-

tensin II als Substrat, wobei als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der enzymatischen Inaktivierung von α -L-Asparaginyll-Angiotensin II die Hydrolyse der N-terminalen Peptidbindung gemessen wurde. 30 mg des Lyophilisats von Membranen bzw. Hämolysat wurden mit einem Substratüberschuß ($1,8 \text{ mmol/l } \alpha$ -L-Asparaginyll-Val⁵-Angiotensin II, Hypertensin CIBA, Basel) inkubiert, wobei unter Modifizierung der von Oelkers et al (18) angegebenen Methode 200 U käufliche Asparaginase (Crasnitin Bayer, Leverkusen) dem Inkubationsgemisch zugesetzt wurden. Die Asparaginsäure wurde dann mit Hilfe des NADH-abhängigen optischen Tests unter Verwendung der Hilfsenzyme Aspartat-Aminotransferase und Malatdehydrogenase bestimmt.

Untersuchungen zur Lokalisation der Erythrocyten-Aminopeptidase

Bei Normalpersonen und Personen mit akuter Hepatitis wurden $1,0 \text{ ml}$ intakte Erythrocyten nach dreimaliger Waschung mit isotoner NaCl-Lösung in $2,0 \text{ ml } 0,15 \text{ mol/l}$ NaCl-Lösung suspendiert, und deren enzymatische Aminopeptidaseaktivität gemessen. In einem zweiten Versuchsansatz wurden jeweils $1,0 \text{ ml}$ mit isotoner NaCl-Lösung gewaschene Erythrocyten von Normalpersonen und Patienten mit akuter Hepatitis in $1,0 \text{ ml}$ bidest. Wasser hämolysiert und anschließend mit $1,0 \text{ ml } 0,3 \text{ mol/l}$ NaCl-Lösung versetzt, wodurch sich gleiche Volumina und NaCl-Konzentrationen in beiden Versuchsansätzen ergaben.

Ergebnisse

Aktivitätsbestimmungen bei den verschiedenen Personengruppen

Normalpersonen

Bei neun gesunden Personen betrug die Aminopeptidaseaktivität des Hämolysats im Mittel $91,7 \pm 20,0 \mu\text{U/mg}$ Protein (minimal $46,1 \mu\text{U/mg}$ Protein, maximal $113,7 \mu\text{U/mg}$ Protein), die Enzymaktivität der Membranen ergab einen Mittelwert von $112,2 \pm 15,8 \mu\text{U/mg}$ Protein (minimal $86,0 \mu\text{U/mg}$ Prot., maximal $109,2 \mu\text{U/mg}$ Protein). Eine weibliche Person zeigte eine auffallend niedrige Aminopeptidaseaktivität mit $46,1 \mu\text{U/mg}$ Protein im Hämolysat, während die in den Membranen bestimmte Enzymaktivität im Bereich derjenigen der übrigen Fälle lag (s. Abb. 1 und 2).

Patienten mit essentieller Hypertonie

Bei allen Patienten mit essentieller Hypertonie lagen die Werte der Enzymaktivität des Hämolysats und der Membranen im Normbereich. Der Mittelwert für das Hämolysat betrug $89,1 \pm 17,9 \mu\text{U/mg}$ Protein (minimal $67,6 \mu\text{U/mg}$ Protein, maximal $119,8 \mu\text{U/mg}$ Protein) für die Membranen $122,6 \pm 32,0 \mu\text{U/mg}$ Protein (minimal $76,8 \mu\text{U/mg}$ Protein, maximal $186,6 \mu\text{U/mg}$ Protein) (s. Abb. 1 und 2).

Patienten mit renaler Hypertonie

Die Gruppe der renalen Hypertoniker zeigte ebenfalls innerhalb des Normbereichs liegende Aminopeptidaseaktivitäten einschließlich des Patienten mit eingeschränkter Kreatininclearance ($2,0 \text{ ml/min}$). Der Mittelwert für das Hämolysat betrug $82,0 \pm 14,6 \mu\text{U/mg}$ Protein (minimal $55,9 \mu\text{U/mg}$ Protein, maximal $102,9 \mu\text{U/mg}$ Protein, für die Membranen $109,6 \pm 27,7 \mu\text{U/mg}$ Protein

Abb. 1. Aminopeptidaseaktivität in den Erythrocytenmembranen von Normalpersonen, Patienten mit Hypertonie und Leberparenchymschäden. Der Mittelwert der Normalpersonen ist durch die horizontale Linie, die Standardabweichung durch den schraffierten Bereich gekennzeichnet.

Abb. 2. Aminopeptidaseaktivität im Hämolsat von Normalpersonen, Patienten mit Hypertonie und Leberparenchymschäden. Der Mittelwert der Normalpersonen ist durch die horizontale Linie, die Standardabweichung durch den schraffierten Bereich gekennzeichnet.

(minimal 73,7 μ U/mg Protein, maximal 152,1 μ U/mg Protein) (s. Abb. 1 und 2).

Primärer Aldosteronismus

Die Aminopeptidaseaktivität bei zwei Fällen mit Conn-Syndrom ergab für das Hämolsat 79,8 bzw. 81,4 μ U/mg Protein, für die Membranen 161,2 bzw. 102,9 μ U/mg Protein.

Leberparenchymerkrankungen

Bei der Gruppe der hepatobiliären Erkrankungen war eine deutliche Aktivitätssteigerung der angiotensin-inaktivierenden Enzyme meßbar. Die Aminopeptidaseaktivität war bis auf das Zweifache der durchschnittlichen Norm erhöht und betrug im Mittel für das Hämolsat $182,1 \pm 31,1$ μ U/mg Protein (minimal 139,8 μ U/mg Protein, maximal 248,8 μ U/mg Protein), für die Membranen $187,5 \pm 30,1$ μ U/mg Protein (minimal 132,1 μ U/mg Protein, maximal 224,3 μ U/mg Protein) (s. Abb. 1 und 2).

Die Aminopeptidaseaktivitäten des Hämolsats sowie die der Membranen von Patienten mit Lebererkrankungen unterschieden sich im t-Test signifikant von denjenigen der untersuchten Normalpersonen ($p < 0,01$). Die Patienten mit renaler und essentieller Hypertonie unterschieden sich offensichtlich nicht von den Normalpersonen.

Lokalisation der Erythrocyten-Aminopeptidaseaktivität

Bei Normalpersonen betrug die Aminopeptidaseaktivität in intakten Erythrocyten $8,97 \pm 0,97$ U/l Erythrocyten ($n = 5$), nach Hämolyse $19,07 \pm 0,78$ U/l Erythrocyten ($n = 5$). Die Differenz zwischen beiden Aktivitätsmessungen ergab $10,10 \pm 0,78$ U/l Erythrocyten. Bei Patienten mit akuter Hepatitis wurde bei intakten Erythrocyten eine Aminopeptidaseaktivität von $15,75 \pm 1,92$ U/l Erythrocyten ($n = 5$), nach Hämolyse von $25,84 \pm 1,51$ U/l Erythrocyten ($n = 5$) gemessen. Die Differenz zwischen beiden Aktivitätsbestimmungen betrug $10,09 \pm 2,16$ U/l Erythrocyten.

Diskussion

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten eine normale Aminopeptidaseaktivität gegen α -L-Asparaginy¹-Angiotensin II im Hämolsat wie in den Erythrocytenmembranen bei verschiedenen Hochdruckformen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Angiotensin-Inaktivierung zwischen den untersuchten Hypertonieformen. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen verschiedener Untersucher (5–10) überein, wonach auch die Angiotensin-Inaktivierung im Plasma von Hochdruckkranken normal ist. Wood et al (4) kamen dagegen mit einer u. E. unzureichenden Methodik (Ermittlung der pressorischen Reaktion auf Blut, welches mit Angiotensin inkubiert war, ohne vorherige

Prüfung der Ansprechbarkeit auf Angiotensin allein) zu dem Ergebnis einer verminderten Angiotensin-Inaktivierung bei Patienten mit essentieller Hypertonie. Eine erhöhte Angiotensinaseaktivität im Plasma von Hochdruckkranken wurde lediglich von Hickler et al (3) beschrieben. Arai et al (19) beobachteten bei 4 Patienten mit primärem Aldosteronismus eine verminderte Plasmaangiotensinaseaktivität im Vergleich zu Normalpersonen. Im Hämolysat konnten dagegen in den eigenen Untersuchungen bei zwei Fällen von primärem Aldosteronismus keine Unterschiede in der Amino-peptidaseaktivität im Vergleich zu Normalpersonen festgestellt werden.

Im Gegensatz zu den bei Hochdruckformen erhobenen Befunden fand sich in dem Hämolysat von Patienten mit Lebererkrankungen eine signifikant erhöhte angiotensin-inaktivierende Enzymaktivität. Auch im Plasma von Leberkranken konnte eine erhöhte Angiotensinaseaktivität festgestellt werden, die offenbar durch eine gesteigerte Freisetzung von Amino-peptidasen aus der Leber bedingt ist (8, 9, 11, 12, 13, 20). Es stellte

sich damit die Frage, ob die erhöhte Angiotensinaseaktivität der Erythrocyten bei Lebererkrankungen auf einer Adsorption von Amino-peptidasen aus dem Plasma beruht oder ob eine gesteigerte Neusynthese von Amino-peptidasen in den Erythrocyten vorliegt. Durch unsere Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß eine erhöhte Amino-peptidaseaktivität bei Lebererkrankungen ausschließlich an der Außenfläche der Erythrocyten nachweisbar ist. Eine gesteigerte Neusynthese oder eine Penetration von Amino-peptidasen in das Zellinnere konnte somit ausgeschlossen werden. Offensichtlich ist demnach die erhöhte Amino-peptidaseaktivität der Erythrocyten bei Leberparenchymerkrankungen durch eine Adsorption von Plasmaamino-peptidasen an der Außenfläche der Erythrocytenmembranen bedingt und spiegelt damit eine erhöhte Enzymaktivität der Plasmaamino-peptidasen wider.

Danksagung

Diese Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literaturverzeichnis

1. Hodge, R. L., Ng, K. K. T., Vane, J. R. (1967), *Nature* 215, 138–141.
2. Bakhle, Y. S., Reynard, A. M., Vane, J. R. (1969), *Nature* 222, 956–959.
3. Hickler, R. B., Lauer, D. P., Thorne, G. W. (1963), *J. Clin. Invest.* 42, 635–648.
4. Wood, J. W. (1962), *Circulation* 25, 225–229.
5. Nagatsu, I., Gillespie, L., Folk, J. E., Glenner, G. G. (1965), *Biochem. Pharmacol.* 14, 721–728.
6. Nagatsu, I., Gillespie, L., George, J. M., Folk, J. E., Glenner, G. G. (1965), *Biochem. Pharmacol.* 14, 853–861.
7. Itskowitz, H. D., Dudrick, S. J., Dyrda, I., Murphy, J. J. (1967), *Arch. Intern. Med.* 119, 241–246.
8. Klaus, D. (1962), *Klin. Wochenschr.* 40, 701–702.
9. Klaus, D., Kaffarnik, H., Pfeil, H. (1963), *Klin. Wochenschr.* 41, 379–384.
10. Lubash, G. D., Hammel, E. C., Mearles, R. J. (1967), *Clin. Chim. Acta* 18, 439–445.
11. Kokubu, T., Ueda, E., Fujimoto, S., Hiwada, K., Sanga, H., Yamamura, Y. (1965), *Clin. Chim. Acta* 12, 484–488.
12. v. Goldacker, I. U., Oelkers, W. (1969), *diese Z.* 7, 250–252.
13. Biron, P., Baldus, W. P., Summerskill, W. H. (1964), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 116, 1074–1076.
14. Kokubu, T., Ueda, E., Fujimoto, S., Hiwada, K., Sanga, H., Yamamura, Y. (1966), *Clin. Chim. Acta* 13, 13–18.
15. Behal, F. J., Hamilton, R. D., Kanavage, C. B., Kelly, E. C. (1963), *Arch. Biochem. Biophys.* 100, 308–312.
16. Dahlheim, H., Petschauer, K., Thureau, K. (1969), *Pflügers Arch.* 305, 105–117.
17. Itskowitz, H. D., Miller, L. (1966), *Circ. Res.* 19, 507–509.
18. Oelkers, W., v. Goldacker, I. U. (1967), *Klin. Wochenschr.* 45, 649–653.
19. Arai, J. (1967), *Jap. Circ. J.* 31, 911–921.
20. Yamamura, Y. (1966), *Jap. Circ. J.* 30, 186–188.

Dr. med. H. P. Nast
I. Medizinische Universitätsklinik
6500 Mainz
Langenbeckstraße 1