

Jaczewski Z., Zaniewski L. — **The action of Combelen on the stag (*Cervus elaphus* L.).**

The experiments were conducted on 5 stags and 1 doe of the Red deer. Combelen was administered intramuscularly in four and intravenously in five

cases. The table I shows the corresponding data. The data show that the optimal intravenous dose for stags is 20 ml of Combelen per 100 kg of body weight. The Red deer is considerably less susceptible to Combelen than the domestic animals.

ALEKSANDRA MALINOWSKA

## L-leucylo-aminopeptydaza (LAP) w diagnostyce klinicznej

Z Katedry Chemii Fizjologicznej Wydziału Wet. SGGW w Warszawie  
Kierownik: prof. dr STEFAN NYREK

W wielu pracowniach biochemicznych w ostatnich latach obserwować można znaczne zainteresowanie się enzymami tkankowymi oraz oznaczaniem aktywności enzymów dla potrzeb klinicznych. Enzymologia praktyczna urosła dzisiaj do jednego z zasadniczych kierunków nowoczesnej diagnostyki. W tej chwili trudno przewidzieć jakie korzyści praktyczne przyniesie rozwój badań enzymów tkankowych i płynów ustrojowych w różnego rodzaju stanach fizjologicznych i patologicznych.

W patologii weterynaryjnej zakres badań fermentów płynów tkankowych ostatnio również uległ rozszerzeniu. W znacznej mierze przyczyną tego zjawiska należy szukać w konieczności wytyczania nowych dróg wobec niedoskonałości wielu dotychczasowych metod rozpoznawczych.

Wiele metod oznaczania aktywności enzymatycznej zostało wprowadzonych jako próby diagnostyczne w rozpoznawaniu niektórych schorzeń u ludzi. Mają one duże znaczenie zwłaszcza w tych przypadkach, w których określenie schorzenia, lub rozległości zmian za pomocą innych metod natrafia na duże trudności. Wydaje się celowe zwrócenie większej niż dotychczas uwagi na badania enzymologiczne u zwierząt, mogą one bowiem dostarczyć wielu korzyści praktycznych.

Jednym z enzymów, który wzbudził w ostatnich latach szczególne zainteresowanie jest L-leucylo-aminopeptydaza (LAP).

### Ogólna charakterystyka chemiczna LAP

W 1929 r. *Linderström — Lang* (19) hydrolizując wyciągami ze śluzówki jelita świni dwupeptyd leucylo — glicynę wykazał, że błona śluzowa jelita zawiera nie znany dotąd bliżej ferment, który autor nazwał leucylo - peptydazą. Badania *Iringa, Frutona i Bergmana* (14) a także później *Lester — Smitha* (16) w znacznej mierze przyczyniły się do poznania charakteru i właściwości chemicznych leucylo - peptydazy. Okazało się, że enzym ten hydrolizuje tylko te peptydy, które posiadają na końcu cząsteczki wolną grupę alfa aminową, stąd też ferment ten otrzymał nazwę aminopeptydazy (*Lester — Smith* (17).

L — leucylo — aminopeptydaza jest fermentem, który katalizuje syntezę peptydów łącząc L — leucynę z innymi aminokwasami oraz odłącza ten aminokwas w przypadku, gdy leucyna znajduje się na koń-

cu łańcucha cząsteczki peptydu lub białka. Jest to więc typowa egzo-peptydaza.

Wg *Spackmanna* i współprac. (24) LAP odznacza się niską zawartością tyrozyny a wysoką zawartością leucyny, kwasu asparaginowego i glutaminowego. Ciężar cząstkowy wymienionego fermentu wynosi około 80.000 (*Dixon i Webb* (4)). Enzym jest czynny w granicy pH 5,5—8,5. Optimum działania przypada w pH 7,2. Aktywność fermentu jest ściśle uzależniona od wpływu jonów  $Mg^{++}$  oraz  $Mn^{++}$ . Witamina C oraz histydyna inaktywują częściowo aktywność LAP.

### Występowanie LAP

Dotychczasowe badania wykazały, że LAP występuje w tkankach ludzkich, a jej stopień aktywności związany jest najprawdopodobniej z resyntezą białka, ożywioną regeneracją tkankową.

Najwięcej danych o występowaniu LAP u ludzi dostarczyły prace *Rutenburga, Goldbarga i Pinedy* z r. 1958 (25), *Goldbarga, Pinedy i Rutenburga* z r. 1959 (10), *Arsta, Manninga i Delpa* z r. 1959 (1), *Göggela, Creutzfelda i Murukasa* z r. 1960 (8), *Haschena* z r. 1961 (13) oraz *Notarbartolla* z r. 1961 (21). Z prac polskich badaczy należy wymienić prace *Wilczoka i Stęplewskiego* (29) a także prace *Wilczoka i Vorbrodta* (30).

Aktywność LAP w surowicy krwi ludzi zdrowych waha się w granicach od 75 do 230 jednostek.

W krwinkach czerwonych aktywność LAP jest znacznie wyższa aniżeli w surowicy. Krew zhemolizowana wykazuje 3,5-krotnie wyższą aktywność LAP. Średnie wartości aktywności LAP u kobiet są nieco niższe aniżeli u mężczyzn. W czasie ciąży *Arst* i współprac. (1) wykazał zwiększenie aktywności LAP. W ostatnich 3 miesiącach ciąży oraz w okresie porodu aktywność LAP osiąga najwyższą wartość. W związku z tym *Bressler i Forsyth* (3) podjęli próbę wykorzystania metody oznaczania aktywności LAP w diagnostyce różnicowej ciąży. Także *Sciara i Burres* (23) próbowali na podstawie oznaczeń czynności LAP w surowicy krwi rozpoznawać ciążę bliźniaczą.

*Bastide* i współprac. (2) wykazali, że różnice aktywności LAP w krwi matki, łożyska oraz w krwi noworodka są stosunkowo nieznaczne. U zdrowych niemowląt nie stwierdza się także odchylen aktywności LAP w porównaniu z wartościami uzyskanymi w badaniu osób starszych (*Rutenburg* i współprac. (26)).

Interesujące wyniki badania aktywności LAP surowicy krwi ludzkiej uzyskali *Kowlessar* i wsp. (15) oraz *Dubbs* i wsp. (5). Posługując się metodą elektroforezy w żelu skrobiowym wymienieni autorzy wykazali, że najwyższa aktywność tego enzymu jest związana u osób zdrowych z frakcją beta - globulin oraz głównie z frakcją alfa<sub>2</sub> — globulinową.

W stanach patologicznych u ludzi aktywność LAP badano w surowicy krwi i moczu w przypadkach nowotworowych.

*Goldbarg, Pineda i Rutenburg* (10) badając czynność LAP w surowicy krwi, moczu, żółci i tkankach, wy-

kazali znaczne zwiększenie aktywności tego enzymu w stanach nowotworowych trzustki — jednego z narządów, odznaczającego się ożywioną syntezą białkową. W nowotworach, metodą histochemiczną aktywność LAP badali *Monis, Nachlas i Seligman* (20). Poza nowotworami u ludzi, zwiększoną aktywność LAP w surowicy krwi wykazano także w zakaźnej mononukleozie (*Goldberg, Pineda i Rutenburg* (9)), w wirusowym zapaleniu wątroby, w ostrym zapaleniu trzustki i w żółtacze mechanicznej (*Fleisher i wsp.* (6)).

W tkankach zwierząt badali aktywność LAP dotychczas jedynie *Spackman, Lester — Smith i Brown* (24). Badacze ci izolowali wymieniony enzym i oznaczali jego aktywność i inne właściwości. Ponadto *Talanti i Hopsu* (27) izolowali LAP z gruczołu mlecznego szczurów i krów, a *Pearse i Tremblay* (22) z tarczycy szczurów.

Obecność enzymu stwierdzono również w wielu roślinach oraz w mikroorganizmach.

#### Mechanizm działania LAP

Mechanizm działania LAP w zasadzie polega na:

- katalizowaniu syntezy peptydów przez połączenie L — leucyny z innymi aminokwasami (teren komórkowy wielu narządów),
- hydrolizie peptydów i amidowych połączeń aminokwasowych, uwalniając z nich aminokwasy na potrzeby wewnątrzkomórkowe (teren komórek),
- na udziale w reakcjach transpeptydacji,
- na odłączaniu L — leucyny w przypadkach, gdy znajduje się ona na końcu łańcucha cząsteczki peptydu czy też białka. To ostatnie zjawisko zachodzi na terenie błony śluzowej jelita cienkiego.

#### Metody oznaczania aktywności LAP

Pierwsze pomiary ilościowe aktywności LAP polegały na oznaczaniu wolnych grup — COOH w leucylo-glicynie metodą miareczkową *Willstättera* (30). Ponieważ użyty w metodzie oznaczania tego enzymu substrat mógł być hydrolizowany również przez inne fermenty, *Smith* (17) zastosował specyficzny substrat w postaci amidu L — leucyny. Były to pierwsze próby podejścia do ilościowego oznaczania działania enzymu. Trzeba jednak przyznać, że już przed *Smithem i Spackmanem* (18), *Gomori* (11) dla potrzeb histochemicznych opracował metodę kolorymetrycznego oznaczania aktywności niektórych peptydaz „in situ” stosując jako substrat beta naftyloamid w połączeniu z odpowiednim aminokwasem. Wyzwolona na drodze hydrolizy beta naftyloamina w wyniku dalszych reakcji chemicznych dawała połączenia barwne, łatwe do ilościowego oznaczania.

*Green i wsp.* (12) do badań aktywności LAP użyli chlorowodoru L-leucylo-beta-naftyloamidu jako substratu, a dla wyjaśnienia specyficzności substratu D i DL izomerów wymienionego związku. Z uwagi na prace histochemiczne zastosowali odrębny substrat: L-leucylo-2-antranilamid. Podobnego substratu do ilościowych oznaczeń LAP w metodzie chromatograficznej użył *Folk* (7).

Dla potrzeb kliniki najbardziej prostą i dokładną metodą ilościowego oznaczania aktywności LAP okazała się metoda *Goldberga i Rutenburga* (9), oparta na kolorymetrycznym określaniu ilości beta naftyloaminy, uwolnionej z substratu. Opracowanie metody przyczyniło się do rozwoju badań aktywności LAP w tkankach i płynach ustrojowych.

#### Badania aktywności LAP jako test diagnostyczny w chorobach.

Niezwykle zainteresowanie się aktywnością LAP tkankowej i płynów ustrojowych w szeregu chorób wewnętrznych, zakaźnych, skóry i nowotworowych

należy tłumaczyć w ten sposób, że uważano, iż badania czynności wymienionego fermentu będą mogły przyczynić się do szybkiego rozpoznawania chorób. Szczególnie duże znaczenie pokładano w badaniu surowicy krwi u chorych z nowotworami. Wyniki prac obcych i polskich badaczy a mianowicie *Wilczoka i Stęplewskiego*, a także *Wilczoka i Vorbrodta* dowiodły, że zmiany aktywności w sprawach nowotworowych nie stwarzają zbyt dużych nadziei diagnostycznych. Wymienieni badacze ustalili, że zwiększenie aktywności enzymu nie zależy od działania samego nowotworu, lecz raczej związane jest wyłącznie ze zjawiskiem regeneracji tkankowej. Niemniej każdy proces chorobowy, któremu towarzyszy zjawisko rozpadania się tkanki i równoczesna dążność do resyntezy białka, związany być może z ożywioną aktywnością peptydaz a więc i LAP.

Należałoby ustalić charakterystyczny przedział wahań aktywności LAP. Być może, że inny przedział wahań występowałby w tego rodzaju chorobach, w których rozstęp komórkowy, ożywione nowotworzenie tkanek jest większe, a inny przedział wahań aktywności L-leucylo-aminopeptydazy w przypadkach chorób z ograniczoną reaktywnością tkankową.

#### PISMIENNICTWO

- Arst H. E., Manning R. T., Delp M.: Am. J. Med. Sci. 238; 120—131 (1959).
- Bastide P., Baudon J., Meunier S., Dastugue G.: Ann. Biol. Clin. 19: 459—62 (1961).
- Bressler R., Forsyth B., Klatskin G.: J. Lab. Clin. Med. 56: 417—30 (1960).
- Dixon M., Webb E. C.: Fermenty. Izdatelstwo Inostrannoj Literatury, Moskwa 1961.
- Dubbs C. A., Vivonia Ch., Hilburn J. M.: Nature 191: 1203—4 (1961).
- Fleisher G. A., Butt H. R., Huizenga K. A.: Proc. Staff. Meet. Mayo Clin. 32: 410—424 (1957).
- Folk J. E., Gladner J. A., Viswanatha T.: Biochim. Biophys. Acta 36: 256—7 (1959).
- Göggel K. H., Creutzfeld W., Murukas J.: Deutsch. Med. Wschr. 85: 1756—62 (1960).
- Goldberg J. A., Rutenburg A. M.: Cancer 11: 283 (1958).
- Goldberg J. A., Pineda E. P., Rutenburg A. M.: Am. J. Clin. Path. 32: 571—5 (1959).
- Gomori G.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 87: 559—61 (1954).
- Green M. N., Tsou K., Bressler R., Seligman A. M.: Arch. Biochem. Biophys. 57: 458 (1955).
- Haschen R. J.: Clin. Chim. Acta 6: 322—5 (1961).
- Irving G. W., Fruton J. S., Bergman M.: J. Biol. Chem. 138: 231 (1941).
- Kowlessar O. D., Haefner L. J., Sleisenger M. H.: J. Clin. Invest. 39: 671—75 (1960).
- Lester — Smith E.: Proteolytic enzymes. In Sumner J. and Myrbärck. The enzymes, chemistry and mechanism of action. Vol. 1, pt. 2, pp. 810—814, N. Y. Ac. Press, Inc. 1951.
- Lester — Smith E.: Aminopeptidases. In Colowick S. P., Kaplan N. O. Eds. Methods in Enzymology. N. Y. Ac. Press, Inc. Vol. 2, pp. 88—93, 1955.
- Lester — Smith E., Spackman D. H.: J. Biol. Chem. 212: 271 (1955).
- Linderström-Lang K. cyt. wg poz. 15.
- Monis B., Nachlas M. N., Seligman A. M.: Cancer 1: 601 (1959).
- Notarbartolli A.: Boll. Soc. It. Biol. Sper. 37: 12—5 (1961).
- Pearse A. G. E., Tremblay G.: Nature 181: 1532—3 (1958).
- Sciara J. J., Burres D. A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104: 712—3 (1960).
- Spackman D. H., Smith E. L., Brown D. M.: J. Biol. Chem. 212: 255 (1956).
- Rutenburg A. M., Goldberg J. A., Pineda E. P.: New Engl. J. Med. 259: 469 (1958).
- Rutenburg A. M., Pineda E. P., Goldberg J. A., Levitan R., Gellis S., Silverberg M.: Am. J. Dis. Child. 103: 47—54 (1962).
- Talanti S., Hopsu V. K.: Nature 191: 86—7 (1961).
- Wilczok T., Vorbrodt A.: Bull. de L'acad. Pol. Sci. 8: 545 (1960).
- Wilczok T., Stęplewski Z.: Bull. de L'acad. Pol. Sci. 8: 549 (1960).
- Willstätter R., Waldschmidt-Leitz E.: Alkalimetrische Bestimmungen von Aminosäuren und Peptiden. Ber. Chem. Ges. 54: 2988 (1921).

Adres autorki: Aleksandra Malinowska — Warszawa, ul. Grochowska 272.