

Katedra i Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, Wydział Lekarski,  
Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr med. Jarosław Billewicz-Stankiewicz

Jarosław BILLEWICZ - STANKIEWICZ  
Andrzej KOSSOWSKI, Zenon SZCZEKAŁA

### Próba charakterystyki „adrenalinooksydazy” osocza krwi

### Попытка характеристики „адреналиноксидазы” плазмы крови

### Versuch von Charakterisierung der „Adrenalinoxydase” des Blutplasmas

W naszej pracowni zauważono w osoczu krwi i w surowicy obecność czynnika nazwanego przez nas „adrenalinooksydazą” (AdO), który utlenia adrenalinę do adrenochromu w obecności nadtlenu wodoru. Nastąpiło to w związku z opracowaniem metody (6, 10), której pierwotnym celem było mikrooznaczenie zdolności osocza utleniania adrenaliny. Obecna praca została podjęta celem dokładniejszego scharakteryzowania enzymów względnie enzymu, który w warunkach wspomnianej mikrometody powoduje powstawanie adrenochromu.

Z rozważań teoretycznych i danych piśmiennictwa można było przypuszczać, że substancją czynną jest ceruloplazmina, względnie inna polifenolooksydaza lub też ferrytyna aktywująca w obecności nadtlenu wodoru (11) utlenianie adrenaliny do adrenochromu w wyniku powstawania odczynnika Fentona. Zagadnienie to domagało się rozwiązania także z tego względu, że przy pomocy wymienionej metody zostało stwierdzone występowanie charakterystycznych zmian aktywności tego czynnika pod wpływem środków neurofarmakologicznych i racoamin biogennych (5), wysiłku fizycznego (6), stressu (4), hormonów (2) oraz w przebiegu okresu wzrostowego zwierząt (3).

### METODYKA

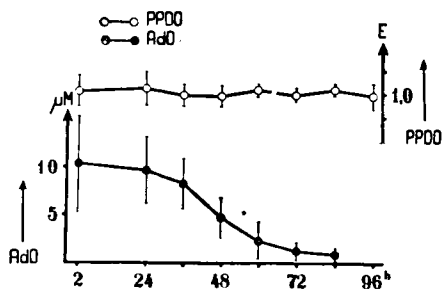
Posługiwaliśmy się świeżą (1—2 godz. po uboju) surowicą świńską. Aktywność AdO oznaczana była wg Jasińskiego i Tyburczyka (6, 10) w 10 ml surowicy rozcieńczonej w 2,7 ml buforu sodowo-fosforanowego pH 6,0 zawierającego (wszystkie stężenia podane w  $\mu\text{M}/1\text{ ml}$ )  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3,611, KCN 0,057, adrenalinę 0,101,  $\text{H}_2\text{O}_2$  32,66. Całość inkubowano przez 30 minut w  $37^\circ\text{C}$  z dostępem powietrza. Aktywność enzymatyczną wyrażano w  $\mu\text{M}$  utlenionej do adrenochromu adrenaliny/1 ml surowicy/1 godz. Ceruloplazmina (parafenyleno-

dwuaminooksydaza PPDO) oznaczana była metodą Ravina (12). Elektroforeza bibułowa jakościowa białek surowicy: 20 godz. przy 5,3 V/cm, 0,122 mA/cm, papier Whatman nr 1, 3,5 cm szerokości, bufor weronalowy pH 8,6. Wywoływanie przez kolejne natryskiwanie nasyconego roztworu adrenaliny w 5N HCl i 3% roztworu nadtlenu wodoru. Katalazę oznaczano wg metody Bonichsena, Chance'a i Theorella (7).

## WYNIKI

1) Z wykonanych pomiarów porównawczych w tych samych surowicach wynika, że aktywności ceruloplazminy i adrenalinooksydazy są zupełnie niezależne i nie ma między nimi korelacji ( $r = -0,320$ ,  $P < 0,02$ ,  $y = 9,9361 - 1,330x$ ,  $n = 60$ ).

2) W surowicach przechowywanych w 2—4°C inaktywacja AdO zachodzi w granicach 60—100 godz. W tym samym czasie aktywność ceruloplazminy ulega tylko nieznacznemu zmniejszeniu (ryc. 1).



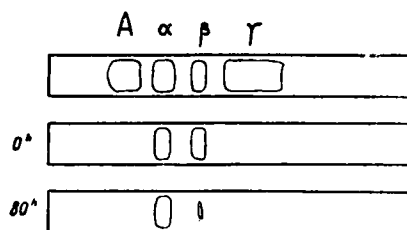
Ryc. 1

Linia górna: aktywność ceruloplazminy (PPDO), linia dolna: aktywność AdO  
Obere Linie: Coeruloplasmin (PPDO)-Aktivität, untere Linie: AdO-Aktivität

3) Po dokonanych rozdziale elektroforetycznym białek świeżej surowicy utlenianie adrenaliny do adrenochromu zachodzi we frakcjach  $\alpha$ - i  $\beta$ -globulin. W surowicach przechowywanych 60—100 godz. w 2—3°C utlenianie adrenaliny w  $\alpha$ -globulinach jest prawie nie zmienione, natomiast w  $\beta$ -globulinach pozostaje tylko ślad aktywności (ryc. 2). Jak wiadomo, ceruloplazmina znajduje się w  $\alpha$ -globulinach.

4) Utrzymywanie surowicy w czystej atmosferze tlenu węgla w temp. 19—22°C przez 2,5 godziny powoduje, praktycznie rzecz biorąc, całkowitą inaktywację AdO (tab. 1). Inaktywacja ta przebiega w sposób podobny przy działaniu promieni świetlnych i w ciemności.

5) Porównawcze oznaczanie rozkładu parafenylenodwuaminy i adrenaliny przez skoncentrowany preparat ceruloplazminy oraz świeżą surowicę wykazały, że ceruloplazmina surowicy w warunkach rozpatrywanej metody nie utlenia adrenaliny (tab. 2).



Ryc. 2

Góra: elektroforogram białek świeżej surowicy świńskiej (barwienie bromofenolem);  
 środek: powstawanie adrenochromu w rozdzielonych elektroforetycznie frakcjach  
 świeżej surowicy świńskiej; dół: to samo w surowicy która przez 80 godz. była  
 przechowywana w temp. 3°C

Oben: Papierelektrophoretisch getrennte Proteine des frischen Schweineserums  
 (Bromphenolblaufärbung); Mitte: Adrenochrombildung nach papierelektrophore-  
 tischen Trennung des frischen Schweineserums; Unten: Dasselbe in Serum,  
 welches 80 Std bei 3°C gelagert wurde

Tab. 1. Wpływ CO na aktywność AdO  
 Beeinflussung der AdO-Aktivität durch CO

Przed zatruciem	Po zatruciu
7,5	0,8
7,5	0,5
7,2	0,5
9,3	1,0
9,2	0,2
9,5	0,3
8,5	0,5
8,1	0,1
8,0	0,4

Tab. 2. Porównanie aktywności ceruloplazminy (PPDO) i AdO w preparacie  
 ceruloplazminy i w surowicy

Vergleich der Coeruloplasmin- und AdO-Aktivität des Coeruloplasminpräparates  
 und des Blutplasmas

	Utlenianie PPD w jedn. Ravina	Aktywność „adre- nalinooksydazowa”
Prep. ceruloplazminy (20 µl)	1,50	0,00
Prep. ceruloplazminy (20 µl) + surowica (100 µl)	1,94	—
Prep. ceruloplazminy (20 µl) + surowica (10 µl)	—	4,74
Surowica (100 µl)	0,50	—
Surowica (10 µl)	—	4,70

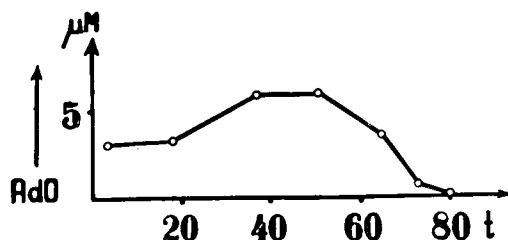
6) Przy założeniu, że całe żelazo w osoczu znajduje się w postaci ferrytyny, jej koncentracja w osoczu wynosiłaby około 500  $\mu\text{g}\%$ . Jak wynika z naszych pomiarów, ferrytyna (10  $\mu\text{l}$  roztworu 500  $\mu\text{g}\%$  = =0,05  $\mu\text{g}$ ) w obecności nadtlenu wodoru nie utlenia adrenaliny (tab. 3).

7) Katalaza surowicy, jak przekonaliśmy się, jest w badanej metodzie w obecności cyjanku potasu całkowicie inaktywowana.

Tab. 3. Porównanie aktywności „adrenalinooksydazowej” ferrytyny i surowicy  
Vergleich der „Adrenalin-Oxydasen”—Aktivität von Ferritin und Blutplasma

	Aktywność „adrenalinooksydazowa”
Ferrytyna (0,05 $\mu\text{g}$ )	0,00
Ferrytyna (0,05 $\mu\text{g}$ ) + surowica (10 $\mu\text{l}$ )	4,42
Surowica (10 $\mu\text{l}$ )	4,70

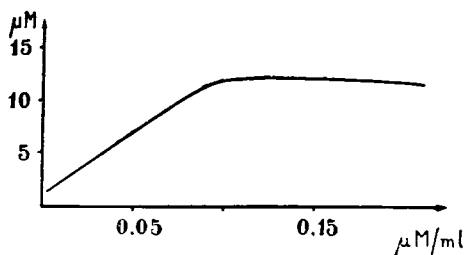
8) W granicach od 3°—36°C aktywność AdO stopniowo wzrasta, między 36°—51°C utrzymuje się na maksymalnym poziomie, przy dalszym zwiększaniu ciepłoty stopniowo obniża się, przy czym przy 80°C zachodzi zupełne unieczynnienie (ryc. 3).



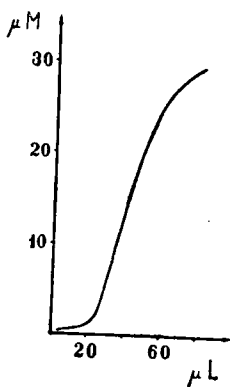
Ryc. 3. Wpływ temperatury na aktywność AdO  
Beeinflussung der AdO-Aktivität durch Temperatur

9) Szybkość utleniania adrenaliny do adrenochromu przy użyciu stałej koncentracji enzymu, a zwiększającym się stężeniu podłoża (adrenaliny) wzrasta, osiągając maksimum przy stężeniu podłoża około 0,1  $\mu\text{M}/\text{ml}$  (ryc. 4). Stała Michaelisa adrenaliny dla AdO oznaczana sposobem Lineveawera-Burka  $K_M=13,7 \cdot 10^{-6}$  M/l.

10) Zależność szybkości utleniania adrenaliny od stężenia surowicy (enzymu) przy stałej koncentracji podłoża uwidoczniła jest na ryc. 5.



Ryc. 4. Aktywność AdO przy wzrastających stężeniach substratu; odcięte: stężenie adrenaliny, rzędne: aktywność AdO  
AdO-Aktivität bei wachsender Substratkonzentration; Abszisse: Adrenalinkonzentration, Ordinate: AdO-Aktivität



Ryc. 5. Aktywność AdO przy wzrastającej koncentracji enzymu (surowicy) i stałym stężeniu substratu; odcięte:  $\mu\text{l}$  surowicy, rzędne: aktywność enzymatyczna  
AdO-Aktivität bei wachsender Serum (Enzym) — und konstanter Substratkonzentration; Abszisse:  $\mu\text{l}$  Serum, ordinate: Enzymaktivität

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Z przedstawionych wyników można wnioskować, że w metodzie będącej przedmiotem naszej uwagi oznacza się aktywność substancji, która znajduje się w  $\beta$ -globulinach osocza i surowicy, przy czym nie jest ona identyczna z ceruloplazminą, ferrytyną i katalazą. Jest ona hamowana przez CO, przy czym promienie świetlne nie mają wpływu na proces hamowania, co przemawia za tym, że nie należy ona do hemoprotein (8\*\*). Jak wynika z badań Holmberga i Laurella (9), w osoczu nie ma czynnej peroksydazy. Stwierdzono także (1, 13), że osocze nie zawiera cytochromu C. W piśmiennictwie brak danych co do obecności oksydazy cytochromu (8\*). Należy przypuszczać, że gdyby nawet oksydaza była obecna, zostałaby unieczynniona przez cyjanek potasu. Krzywe zależności aktywności AdO od temperatury i od stężenia substratu wskazują na to, że substancja aktywna jest enzy-

mem, a gładki przebieg krzywych przemawia za istnieniem raczej jednego niż kilku fermentów. Wielkość stałej Michaelisa świadczy o tym, że AdO najprawdopodobniej, jako posiadająca znaczne powinowactwo do adrenaliny, może być czynnikiem operatywnym w katabolizmie katecholamin w ustroju.

Dziękujemy prof. dr V. Laufbergerowi (Praha) i dr Kleinwächterowi (Brno) za udostępnienie nam ferrytyny, zaś mgr Prasałowi (Lublin) za odstąpienie preparatu ceruloplazminy.

#### PIŚMIENICTWO

1. Abderhalden R.: *Klinische Enzymologie*, G. Thieme, Stuttgart 1958, s. 274.
2. Billewicz-Stankiewicz J., Ambroziak T.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D*, **19**, 365—370, 1964.
3. Billewicz-Stankiewicz J., Gołabek W., Planda A.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D*, **19**, 45—52, 1964.
4. Billewicz-Stankiewicz J., Szczekala Z.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D*, **19**, 413—418, 1964.
5. Billewicz-Stankiewicz J., Szczekala Z., Tyburczyk W.: *Experientia* **20**, 85—86, 1964.
6. Billewicz-Stankiewicz J., Tyburczyk W.: *Int. Z. angew. Physiol. einschl. Arbeitsphysiol.* **20**, 62—74, 1963.
7. Bonnichsen R. K., Chance B., Theorell H.: *Acta Chem. Scand.* **1**, 685—708, 1947.
8. Dixon M., Webb E. S. *Enzymes*, Longmans, London 1960, ss. 421, 645.
9. Holmberg C. C., Laurell C. B.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **3**, 103—107, 1951.
10. Jasiński A., Tyburczyk W.: *Acta Physiol. Polon.* **12**, 887—900, 1961.
11. Mazur A., Green S., Shorr E.: *J. Biol. Chem.* **220**, 227—235, 1956.
12. Ravin H. A.: *Lancet* **270**, 726—727, 1956.
13. Richterich R.: *Enzymopathologie*, J. Springer, Berlin — Göttingen — Heidelberg 1958, s. 114.

#### РЕЗЮМЕ

Фактор плазмы и сыворотки крови активирующий в присутствии перекиси водорода окисление адреналина в адренохром т.наз. „адреналинооксидаза” (AdO) есть энзимом, находящимся в  $\beta$ -глобулинах, отличный от церулоплазмينا, ферритина и каталазы. Вероятно, этот энзим не является идентичным с пероксидазой, цитохромом С и цитохромоксидазой.

Табл. 1. Влияние СО на активность AdO („адреналинооксидазы”).

Табл. 2. Сравнение активности церулоплазмينا (PPDO, парафенилендиаминоксидазы) и AdO (адреналинооксидазы) в препарате церулоплазмينا и в сыворотке крови.

Табл. 3. Сравнение „адреналиноксидазовой“ активности ферритина и сыворотки крови.

Рис. 1. Верхняя линия: активность церулоплазмينا (PFDO), нижняя: активность AdO.

Рис. 2. Верх: Электрофорограмм белков свежей сыворотки крови свиньи (окраска бромфенолом). Середина: Образование адренохрома в разделенных электрофоретически фракциях свежей сыворотки. Низ: То же самое в сыворотке, сохраненной в темп. 3°C в течение 80 час.

Рис. 3. Влияние температуры на активность AdO

Рис. 4. Активность AdO в зависимости от концентрации субстрата. Абсциссы: концентрация адреналина. Ординаты: активность

Рис. 5. Активность AdO в зависимости от концентрации энзима (сыворотки) при постоянной концентрации субстрата.

---

## ZUSAMMENFASSUNG

Die sich im Blutplasma und Serum befindende Substanz („Adrenalin oxydase“ (AdO), die das Adrenalin zu Adrenochrom in Anwesenheit von Wasserstoffperoxyd oxydiert ist ein Enzym, der mit Coeruloplasmin, Ferritin, Katalase und wahrscheinlich mit Peroxydase, Cytochrom C und Cytochromoxydase nicht identisch ist. Die „Adrenalin oxydase“ ist mit  $\beta$ -Globuline verbunden.

Pracę otrzymano 10 V 1964.

