Die Belang van Lisosiem (Muramidase) in Hematologiese Studies*

J. G. STEYTLER, M.SC., M.B., CH.B. (KAAPSTAD), M.MED.(PATH.), M.D. (STELL.), *Hematologiese Eenheid, Departement Interne Geneeskunde, Karl Bremer-hospitaal en Universiteit van Stellenbosch, Bellville, K.P.*

SUMMARY

Markedly increased quantities of lysozyme (muramidase) are found in the serum of cases of monocytic, myelocytic and myelomonocytic leukaemia while reduced levels are found in lymphocytic leukaemia. Increased activity is also found in serum of patients with tuberculosis, pyelonephritis and sarcoidosis. The enzyme apparently is physicochemically identical to the lysozyme of normal tears, leucocytes and serum but structurally different from the lysozyme of hen's egg white. The lysoplate technique with M.lysodeikticus **suspended in buffered agar gel represents a simplified micro-method for assaying human lysozyme. Present evidence indicates that lysozyme is the principal, if not the sole product of proliferating monocytes in monomyelocytic leukaemia and that serial determinations should be a useful routine diagnostic procedure in leukaemia.**

S. Afr. Med. J., **45**, 1202 (1971).

HISTORIES

In 1922 deel Fleming[1] die Royal Society van Londen mee dat hy, in sy soektog na afweerprodukte van weefsel en menslike sekresies, 'n 'verbasende bakteriolitiese element' teenoor 'n sekere Gram-positiewe kokkus ontdek het. Hierdie substans noem hy *lisosiem* en die organisme wat besonder gevoelig is vir die ensiem se litiese werking, *Micrococcus lysodeikticus*. Vandag weet ons dat lisosiem 'n glikosidase is wat die β-(1-4)-gekoppelde liniêre polimere van N-asetielglukose-amine hidroliseer en dat *M.lysodeikticus* se selwande bestaan uit polisaggariedkettings van alternerende N-asetielglikose-amine en N-asetielmuramiensuur-residue, m.a.w. 'n mukopeptied N-asetielmuramielhidrolase of 'n muramidase.

VOORKOMS EN CHEMIESE AARD

Fleming het bevind dat lisosiem in die liggaam wyd versprei is en dat veral hoë konsentrasies aangetref word in hoender-eiwit, menslike traan, nasale sekresies, en speeksel. Hy wys verder daarop dat hoë aktiwiteit aangetref word in etter vanaf koue absesse (waarskynlik tuberkulose) en urine wat 'albumien en etterselle bevat'. In 'n verdere artikel[2] beklemtoon hy die verwantskap tussen lisosiem en leukosiete. In menslike weefsel word hoë konsentrasies aangetref in die spysverteringskanaal, nier, lewer, mangel en brein terwyl serebrospinale vog geen aktiwiteit besit nie en in trane die konsentrasie 100 - 150 keer hoër is as dié van serum. Fleming karakteriseer lisosiem as 'n nie-dialiseerbare, wateroplosbare ensiem, onoplosbaar in alkohol en eter en weerstandig teenoor dessikasie en hitte, m.a.w. stabiel oor lang periodes by kamertemperatuur.[1,2]

Geen verdere vordering is gemaak tot 1936 nie, toe Meyer *et al.*[3] 'n metode vind om lisosiem suiwer voor te berei uit asetoon-gedroogde eiwit deur presipitasie met flaviaansuur. Die ensiem so verkry, is geïdentifiseer as 'n 'basiese polipeptied met 'n N-inhoud van 15·3% en wat 'n aantal proteïenreaksies gee'. In 1945 slaag Alderton *et al.*[4] daarin om lisosiem op bentoniet te adsorbeer en daarna met 5% piridien by pH 5 te ekstraheer. Nou kon die iso-elektriese punt van 10·5 en die lae molekulêre gewig van 17 000 vasgestel word. 'n Konynantiserum is vervaardig teen die gesuiwerde lisosiem wat sy ensiematiese aktiwiteit kon inhibeer.

Jollès[5] bewys dat lisosiem bestaan uit 'n enkele polipeptied-ketting met 129 aminosure en met lisien in die terminale N- en leusien in die terminale C-posisie. Daar is 3 disu'fied-brûe en 6 triptofaan-residue. Deur middel van X-straal kristallografiese studies[6] by 6 Angström resolusie kan aangedui word dat triptofaan-residue betrokke is by die bindingsareas of setel van aktiwiteit van die ensiem.

Cohn en Hirsch[7] toon aan dat lisosiem aanwesig is in geïsoleerde sitoplasmatiese granules van polimorfe konynleukosiete terwyl Jollès[8] daarop wys dat normale menslike leukosiete lisosiem bevat ekwivalent aan 10 mg eiereiwitlisosiem per gram. Weefsellisosiem is soortgelyk in baie opsigte: dit is 'n hoë kationiese proteïen met 'n molekulêre gewig van 15 000 en dit bevat 'n enkele polipeptiedketting gestabiliseer deur 'n aantal disulfiedbrûe. Die aminosuurvolgorde van lisosiem afkomstig uit verskillende bronne verskil aansienlik van mekaar. Oor die algemeen kan egter gesê word dat die meganisme van werking van lisosomale ensieme soortgelyk is soos bewys deur die knap stuk werk van Blake *et al.*[6]

Tussen menslike en eiereiwit-lisosiem bestaan verskille wat betref rangskikking en aminosuurinhoud. 'n Antiserum teen eiereiwit-lisosiem kan bv. nie die aktiwiteit van menslike lisosiem inhibeer nie. Dieselfde geld ook vir 'n antiserum teen rot-lisosiem wat nie die aktiwiteit van menslike of eiereiwit-lisosiem inhibeer nie, maar wat tog in staat is om sy eie homoloë ensiem te inhibeer. Menslike lisosiem besit ongeveer 3 keer die aktiwiteit van hoendereiwitlisosiem getoets teen 'n *M.lysodeikticus*-suspensie in fosfaatbuffer by pH 6·2.[9]

*Datum ontvang: 7 Mei 1971.

BEPALING

Lisosiem word bepaal deur die vermindering van turbiditeit of viskositeit wanneer die ensiem inwerk op *M. lysodeikticus*-suspensie wat deur hitte of ultraviolette lig gedood is. Hierdie metode is omslagtig en tydrowend met waardes wat na gelang van eksperimentele omstandighede wissel, maar is die afgelope twee dekades nog die beproefde standaardmetode.[10,11]

'n Nuwe tegniek[12] is die afgelope 5 jaar ontwikkel in die vorm van 'n diffusiemetode met agar-gel, waar diffusie van die ensiem in die gel plaasvind en die sone van liese dan bepaal word. Polimeervorming en interaksie van gehidroliseerde suurgroepe met die agar-matrix is nadele van hierdie metode.

Die substraat is eerste deur Meyer *et al.*[3] as 'n gepolimeriseerde mukopolisaggariede geïsoleer wat gedepolimeriseer word deur lisosiem deur hidroliese van glikosidebindings met die vrystelling van reduserende suiker en asetielheksose-amien. Salton[13] was die eerste om aan te toon dat selwande geïsoleer van sekere bakterieë vinnig deur eiereiwit-lisosiem verteer word. In *M. lysodeikticus* bestaan hierdie substraat uit 'n tetrasaggariede met 'n β-(1-4) N-asetielglukose-amien residue terwyl die ensiem 'n β-(1-4) muramidase werking het. In die gasheer werk lisosiem sinergisties met ander antibakteriële stowwe teen 'n wye reeks van mikro-organismes.[5,9,13]

VERBAND MET POLIMORFE MONOSIETE EN MAKROFAGE

Fleming[1,2] stel oorspronklik 'n verhouding tussen leukosiete en lisosiem voor. Lisosiem-waardes kan gekorreleer word met die totale witseltelling, maar nie met 'n spesifieke fraksie van die differensiële telling nie. Eksperimenteel toon Flanagan en Lionetti[14] aan dat lisosiem skynbaar afwesig is van limfosiete. Daarna volg verskeie studies om te probeer bewys dat lisosiem uitsluitlik vrygestel word deur beide polimorfe en monositêre leukosiete maar dit is onsuksesvol omdat dit moeilik is om suiwer selpopulasies vir die doel te kry en weens die feit dat die presiese verhouding tussen monosiete en polimorfe nog nie heeltemal duidelik is nie.

Met behulp van 'n histochemiese metode kon Speece[15] (1966) aantoon dat lisosiem-aktiwiteit aanwesig is in monosiete, polimorfe en die voorgangers van polimorfe. Geen lisosiem is gevind in limfosiete, plasmaselle, basofiele, masselle of RE-beenmurgselle nie. Uit hierdie studies lyk dit asof monosiete die hoogste konsentrasie lisosiem bevat.

Daar is heelwat bewyse in die literatuur dat monosiete die sirkulerende voorlopers van weefselmakrofage,[16] alveolêre makrofage,[17] epiteloïed- en reuseselle[18] van tuberkulosegranulomas is. Baie studies kan aangehaal word om hierdie beweringe te staaf, bv. migrasiestudies waar fagositêre selle gemerk is met koolstofpartikels. In meer onlangse tegnieke word ensiemmerkers gebruik, o.a. lisosiem, waar bewys gelewer is van die transformasie van monosiete in makrofage en die ander sellulêre bestanddele van granulomas.[19]

VERBAND MET TUBERKULOSE

Cunningham[15] beskryf in 1925 'n monositose in tuberkulose van konyne en in daaropvolgende studies[20] is 'n monositose in pasiënte met aktiewe tuberkulose bevestig. Eksperimentele mikobakteriële infeksies in proefdiere toon dat die gasheer se afweermeganismes te wyte is aan lisosiem. In 1951 toon Myrvik en Wieser[21] dat die serum van konyne geïmmuniseer met hitter-gedode tuberkulose-organismes in Freund se adjuvant sterk tuberkulostaties reageer teen 'n BCG-stam van *M.tuberculosis* en dat die aktiewe bestanddeel soortgelyk is aan dié van eiereiwit-lisosiem wat betref hittestabiliteit, adsorpsie-eienskappe en antibakteriële spektrum. Verder is aangetoon dat verhoging van alveolêre mikobakterieë, nl. *M.kansaii, M.fortuitum,* en *M.phlei.* geassosieer is met verhoogde mikobakteriostatiese aktiwiteit van longweefsel. De Wijs en Jollès[22] vind 'n lisosiempolisaggariede-substraat in die selwande van 3 atipiese mikobaterieë, nl. *M.kansaii, M.fortuitum,* en *M.phlei.* Hierdie stamme is baie gevoelig vir menslike lisosiem; soortgelyke toetse met *M.tuberculosis* was onsuksesvol vanweë die hoë lipiedinhoud van die selwande.

In tuberkulosepasiënte is bewys dat daar 'n toename in lisosiemaktiwiteit van plasma en leukosiete is, soortgelyk aan dié van konyne. Gibson[23] beskryf 'n merkwaardige geval van gedissemineerde tuberkulose geassosieer met 'n monositêre leukemoïede reaksie en monosiettellings van tot 36 000/mm^3. Postmortem ondersoek toon wydverspreide monositêre proliferasie in die tuberkulose-granulomas.

Boeck se sarkoïed is 'n granulomateuse infeksie waarskynlik verwant aan tuberkulose maar 'n monositose in assosiasie met die aktiewe siekte is nie gevind nie terwyl serum-lisosiemwaardes tog beduidenisvol verhoog is.[24]

VERBAND MET ANDER KRONIESE INFEKSIES

Verhoogde lisosiemaktiwiteit is gevind in die stoelgang van pasiënte met ulseratiewe kolitis en in die maagsap van pasiënte met peptiese ulkus.[25] Aanvanklik is lisosiem hier as 'n moontlik etiologiese faktor in die siekteprosesse beskou, maar later is aangetoon dat die gepaardgaande granulositêre reaksie die bron van die verhoogde lisosiemwaardes is.[26]

Fleming[1] wys oorspronklik daarop dat verhoogde lisosiemwaardes aangetref word in urine wat albumien en etterselle bevat en daaropvolgende studies staaf hierdie assosiasie. Wilson en Hadley[27] toon 'n verhoogde lisosiemaktiwiteit in die urine van kinders met nefrose aan en ander studies volg waar verhoogde vlakke in serum en urine aangetref word van gevalle met glomerulonefritis maar veral van piëlonefritis.

Perri *et al.*[28] vind 'n aansienlike verhoging van urinelisosiem in rotte met Jensen se sarkoom, 'n muistumor wat deur transplantasie oorgedra kan word. Aanvanklik is gemeen dat hierdie hoë waardes eie is aan Jensen se tumor maar later is dit in ander gevalle van getransplanteerde neoplasmas ook gevind. Daar word dus gemeen dat lisosiem verband hou met die makrofaagreaksie weens aanwesigheid van die tumor en nie weens die tumor self nie.

VERBAND MET LEUKEMIEË

Dit moet erken word dat dit somtyds morfologies moeilik, indien nie onmoontlik nie, is om monositêre van onvolwasse granulositêre vorms te onderskei. Inderdaad is die verhouding tussen hierdie selle nog onduidelik.

Jollès *et al.*[29] vind verhoogde muramidasevlakke in gevalle van miëlositêre en monositêre leukemieë, terwyl verlaagde vlakke in limfatiese leukemie, aangetref word. Hierdie bevindinge is deur verskeie ander werkers[12,30] bevestig en oor die algemeen kan gesê word dat in pasiënte met 'n monositêre leukemie die hoogste serum-muramidasevlakke gevind word met 'n geassosieerde muramidasurie.

Muramidase wat in die urine uitgeskei word in pasiënte met 'n monositêre leukemie is antigenies en elektroforeties identies met normale menslike muramidase[12] en kan derhalwe nie beskou word as 'n unieke produk van die maligne sel nie. Muramidase word geproduseer deur die normale granulosiete en monositêre witselle sowel as deur monoblaste. Geen muramidase-aktiwiteit is gevind in rooi selle, limfosiete, eosinofiele, basofiele, plaatjies, megakariosiete of miëloblaste nie.[31] Diereksperimente toon aan dat serum-muramidase-aktiwiteit afkomstig is van die degradasie van volwasse granulosiete.[32] Verhoogde waardes is gevind in tuberkulose[33] en sarkoïedose[12] wat beide dikwels geassosieer word met 'n monositose.

Muramidase word primêr vrygestel wanneer granulosiete en monosiete disintegreer. Op die oomblik is dit nog nie bekend of enige ensiem vrygestel word van intakte selle nie en of abnormale monosiete verskil van normale monosiete in kwantiteit en wyse waarop die ensiem vrygestel word nie. Ander faktore betrokke by 'n vrystelling van muramidase is bv. weefselbinding en nieropruiming. 'n Mikrometode om muramidase te kwantiteer behoort die faktore wat 'n moontlike rol speel, beter te evalueer.

Belangrik is die feit dat lisosiem die enigste ensiem is wat in oormaat gevind word terwyl geeneen van die ander hidrolases, bv. suurfosfatase, e.s.m., aangetref word nie. Dit wil dus voorkom asof 'n proliferasie van 'n sekere populasie selle plaasvind wat die vermoë het om lisosiem as enigste produk te vervaardig.

Reekse serum-muramidasebepalings in pasiënte met leukemieë is gevind waardevol te wees om die siekte-aktiwiteit in die beenmurg aan te dui.[30] In akute miëlomositêre leukemie en akute monositêre leukemie is 'n verlaging van serum-muramidase na normale vlakke gedurende 'n beenmurgremissie te wyte aan die verdwyning van muramidase-produserende leukemiese selle en die terugkeer na 'n normosellulêre beenmurg. In sulke gevalle is die serum-muramidase subnormaal net voordat 'n volledige remissie plaasvind, en word geassosieer met 'n chemoterapeutiese geïnduseerde hiposellulêre beenmurg.

In akute limfatiese leukemie is die lae muramidasevlakke te wyte aan die afwesigheid van muramidaseproduserende granulosiete in 'n leukemiese beenmurg wat geïnfiltreer is deur nie-muramidaseproduserende limfoblaste.

In alle gevalle met 'n akute monositêre leukemie is 'n muramidasurie gevind, wat òf te wyte kan wees aan 'n geassosieerde verlaagde nierdrempelwaarde, renale tubulêre skade òf 'n tot nog toe onbekende meganisme.[34]

Reeksondersoeke van serum-muramidasevlakke in akute leukemieë toon dus aan dat dit ten minste net soveel informasie as beenmurgondersoeke verskaf. In sommige gevalle kan 'n relaps 'n week of so voor die tyd aangedui word. Gedurende 'n remissie keer die muramidasevlakke van pasiënte met leukemie tot normaal terug. Die aanvanklike serum-muramidase vlakke in akute miëlogene leukemie kan van prognostiese waarde wees: lae vlakke het 'n beter prognose. Die aanwesigheid van Auer-liggaampies[35] afkomstig van lisosome dui ook 'n beter prognose in akute miëloïede leukemie aan.[36] Pasiënte met akute monositêre leukemie het die slegste prognose.

VERHOUDING TUSSEN MONOSITÊRE LEUKEMIE EN PLASMASELDISKRASIEË

Hipergammaglobinemie is gevind in gevalle met monositêre leukemieë.[37] In sekere opsigte is daar 'n vergelyking te tref tussen die groot hoeveelhede muramidase van prolifererende monosiete en die vervaardiging van gammaglobulien-subeenhede in gevalle van verspreide miëloom. 'n Belangrike verskil is egter die skynbare identiteit van die leukemiese muramidase met die normale ensiem in teenstelling met die heterogeniteit van immunoglobulien-produkte van plasmaselle.[38] Verdere punte van ooreenkoms is dat 'n muramidasurie en proteïnurie op renale tubulêre disfunksie kan dui, en dat 'n verhoogde gammaglobulien, veral van die gamma A, aangetref word. In een geval was selfs 'n M-tipe gammapiek in die serum aanwesig. Kroniese infeksies, bv. urinêre infeksie, kan skynbaar ook 'n rol speel in die patogenese van sekere plasmaseldiskrasieë.[39] Osserman *et al.*[40] haal 'n verdere geval aan om 'n moontlike assosiasie met plasmaselleukemieë te demonstreer: 'n goed gedokumenteerde geval van plasmaselmiëloma met Bence-Jones-proteïnurie en amiloïdose het na verloop van 4 jaar 'n terminale monomiëlogene leukemie ontwikkel. Die pasiënt se urine-proteïnes is die laaste 18 maande van die siekte bestudeer ten einde die effek van die chemoterapie te evalueer. Tesame met die Bence-Jones-proteïnurie het die pasiënt gedurende die terminale episode ook 'n kationiese proteïen, geïdentifiseer as muramidase, in die urine uitgeskei.

Melphalan (fenielalanien N-mostert) is 'n alkilerende agent wat sedert 1963 algemeen gebruik is vir die behandeling van miëloom; in sommige gevalle vir so lank soos 3 - 6 jaar. Uit sowat 17 gevalle wat reeds gedokumenteer is, skyn dit egter asof 'n iatrogeniese akute miëlomonositêre leukemie waarskynlik 'n laat ongunstige effek van die middel is.[41] Die meganisme van werking kan moontlik gesien word in die feit dat melphalan DNS beskadig net soos in die geval van bestraling en dat dit op hierdie basis kan bydra tot die induksie van 'n leukemie. Die leukemogenese van miëloomgevalle op behandeling kan dus moontlik te wyte wees aan die onvermoë van immuun meganismes om 'n leukemiese klonus of moontlike virus te elimineer, of te wyte aan die herhaalde episodes van beenmurghipoplasie. 'n Verhoogde serum-muramidase in gevalle van miëloom behandel met melphalan dui dus op proliferasie van monomiëlogene oorsprong in die beenmurg wat die aanvang van 'n terminale akute leukemie inlui.

Huidige studies dui daarop dat muramidase die hoofsaaklike, indien nie die enigste, produk van prolifererende monosiete in monositêre en monomiëlositêre leukemieë is.

Die kwantitering en karakterisering van serum- en urine-muramidase behoort 'n belangrike diagnostiese hulpmiddel in die evaluasie en behandeling van leukemie- en miëloom-gevalle te wees.

VERWYSINGS

1. Fleming, A. (1922): Proc. Roy Soc. B, **93**, 306.
2. Fleming, A. en Allison, V. D. (1922): Brit. J. Exp. Path., **13**, 252.
3. Meyer, K., Thompson, R., Palmer, J. W. en Khorazo, D. (1936): J. Biol. Chem., **113**, 303.
4. Alderton, G., Ward, L. H. en Fevold, H. L. (1945): *Ibid.*, **157**, 43.
5. Jollès, P. (1960): *The Enzymes*, pp. 431 - 445. New York: Academic Press.
6. Blake, C. C. F., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C. T., Phillips, D. C. en Sarma, V. R. (1965): Nature (Lond.), **206**, 757.
7. Cohn, Z. A. en Hirsch, J. G. (1960): J. Exp. Med., **112**, 983.
8. Jollès, P. (1967): Proc. Roy. Soc B, **167**, 350.
9. *Idem* (1964): Angew. Chem. (Engl.), **3**, 28.
10. Smolelis, A. N. en Hartsell, S. E. (1949): J. Bact., **58**, 731.
11. Litwack, G. (1955): Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), **89**, 401.
12. Osserman, E. F. en Lawlor, D. P. (1966): J. Exp. Med., **124**, 921.
13. Salton, M. R. J. (1957): Bact. Rev., **21**, 82.
14. Flanagan, P. en Lionetti, F. (1955): Blood, **10**, 497.
15. Speece, A. J. (1964): J. Histochem. Cytochem., **12**, 384.
16. Volkman, A. en Gowans, J. L. (1965): Brit. J. Exp. Path., **46**, 50.
17. Moore, R. D. en Schoenberg, M. D. (1964): Amer. J. Clin. Path., **45**, 991.
18. Cunningham, R. S., Sabin, F. R., Sugiyama, S. en Kindwall, J. A. (1925): Johns Hopk. Hosp. Bull., **37**, 231.
19. Myrvik, Q. N., Leake, E. S. en Oshima, S. (1962): J. Immunol., **89**, 745.
20. Medlar, E. M. (1929): Amer. Rev. Tuberc., **20**, 312.
21. Myrvik, Q. en Weiser, R. S. (1951): *Ibid.*, **64**, 669.
22. De Wijs, H. en Jollès, P. (1964): Biochim biophys. Acta (Amst.), **83**, 326.
23. Gibson, A. (1946): J. Path. Bact., **58**, 469.
24. Maldonado, J. E. en Hanlon, D. G. (1965): Mayo Clin. Proc., **40**, 248.
25. Prudden, J. F., Lane, N. en Levison, J. (1949): Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), **72**, 220.
26. Hiatt, R. B., Engle, C., Flood, C. en Karush, A. (1952): J. Clin. Invest., **31**, 721.
27. Wilson, A. T. en Hadley, W. P. (1950): J. Pediat., **36**, 199.
28. Perri, G. C., Faulk, M., Mellors, J. en Stock, C. C. (1962): Nature (Lond.), **193**, 649.
29. Jollès, P., Sternberg, M. en Mathé, G. (1965): Israel J. Med. Sci., **1**, 445.
30. Wiernik, P. H. en Serpick, A. A. (1969): Amer. J. Med., **46**, 330.
31. Briggs, R. S., Perillie, P. E. en Finch, S. C. (1966): J. Histochem. Cytochem., **14**, 167.
32. Fink, M. E. en Finch, S. C. (1966): Clin. Res., **14**, 316.
33. Inai, S., Hirao, F., Kishimoto, S. en Takahaski, H. (1958): Med. J. Osaka Univ., **9**, 33.
34. Prockop, D. J. en Davidson, W. D. (1964): New Engl. J. Med., **270**, 269.
35. Freeman, J. A. (1966): Blood, **27**, 499.
36. Freireich, E. J. (1967): Canad. Med. Assoc. J., **96**, 1605.
37. Ryder, R. J. W. (1966): Blut, **14**, 47.
38. Osserman, E. F. en Takatskuki, K. (1963): Medicine (Baltimore), **42**, 357.
39. *Idem* (1965): Scand. J. Haemat. Suppl., Series Haemat., **4**, 28.
40. Osserman, E. F., Takatsuki, K. en Talal, N. (1964): Semin. Hematol., **1**, 3.
41. Holland, J. F. (1970): New Engl. J. Med., **283**, 1165.