

Ocena aktywności enzymów proteolitycznych oraz CRP u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek (SNN) leczonych hemodializą (HD) z użyciem dwóch różnych błon dializacyjnych oraz leczonych hemodiafiltracją (HDF)

Mało poznany jest wpływ różnych błon dializacyjnych w czasie hemodializy (HD) oraz zabiegu hemodiafiltracji (HDF) na indukcję stresu oksydacyjnego u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek. Badaliśmy wpływ dwóch różnych błon dializacyjnych (regenerowanej celulozy i polisulfonowej) oraz zabiegu HDF na aktywność enzymów proteolitycznych (mieloperoksydaza, elastaza, kolagenaza, katepsyna B, katepsyna B i L) i CRP. Badaniem było objętych 31 pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek w trzech grupach: grupa 1 - pacjenci leczeni HD przy użyciu dializatora z regenerowanej celulozy (RC), grupa 2 - pacjenci leczeni HD przy użyciu dializatora polisulfonowego (PS) i grupa 3 - pacjenci leczeni hemodiafiltracją z użyciem dializatora polisulfonowego (HDF). Próbkę krwi były pobierane przed i bezpośrednio po zabiegach. Wyniki i wnioski: stężenia mieloperoksydazy i CRP w surowicy wzrastały w czasie hemodializy (HD) i hemodiafiltracji (HDF) i są dobrymi wskaźnikami biogodności błon dializacyjnych i zabiegu hemodializy niezależnie od techniki dializacyjnej. Poziomy elastazy, kolagenazy, katepsyny B, katepsyny B i L nie wzrastały w czasie HD i HDF i nie są dobrymi wskaźnikami biogodności.

(NEFROL. DIAL. POL. 2009, 13, 63-66)

Assessment of serum activity of proteolytic enzymes and CRP of patients with end-stage renal diseases undergoing hemodialysis (HD) using two different dialysis membranes and undergoing hemodiafiltration (HDF)

Little is known of how different hemodialysis (HD) membranes and haemodiafiltration (HDF) contribute to the oxidative stress induced by the dialysis procedure per se. We studied the influence of two different dialysis membranes (regenerated cellulose and polysulphone) and HDF procedure on the activity of the proteolytic enzymes (myeloperoxidase, elastase, collagenase, cathepsin B, cathepsin B and L) and CRP. The study was carried on 31 patients with end-stage renal failure in three groups: group 1 - patients received HD using regenerated cellulose (RC), group 2 - patients received HD using polysulphone (PS) and group 3 - patients received hemodiafiltration (HDF) using polysulfone membrane. Blood samples were taken before and just after dialysis in groups 1-3. Results and conclusions: plasma myeloperoxidase and CRP levels increased after hemodialysis (HD) and hemodiafiltration (HDF) and are good markers of dialysis membranes biocompatibility and HD procedures independently on dialysis technique. Plasma elastase, collagenase, cathepsin B, cathepsin B and L levels didn't increase during HD and HDF and are not the markers of biocompatibility.

(NEPHROL. DIAL. POL. 2009, 13, 63-66)

Wstęp

Biozgodność oznacza brak wywoływania istotnej klinicznie odpowiedzi organizmu na obecność obcego materiału, urządzenia

lub układu. Problem biogodności dotyczy zarówno błon dializacyjnych jak też wszystkich elementów dializacyjnego układu krążenia zewnątrz ustrojowego oraz płynów

Wiesław KLATKO¹

Stanisław NIEMCZYK²

Leszek PAŃCZEK³

Katarzyna SZAMOTULSKA⁴

Longin NIEMCZYK²

Ewa PAKLERSKA²

Katarzyna KUCHARSKA²

¹Oddział Nefrologii Specjalistycznego Szpitala Wojewódzkiego w Ciechanowie

²Katedra i Klinika Nefrologii, Dializoterapii i Chorób Wewnętrznych WUM

³Klinika Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Instytutu Transplantologii WUM

⁴Zakład Epidemiologii Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie

Słowa kluczowe:

- schyłkowa niewydolność nerek
- hemodializa
- hemodiafiltracja
- biogodność
- enzymy proteolityczne

Key words:

- end stage renal disease
- hemodialysis
- hemodiafiltration
- biocompatibility
- proteolytic enzymes

Adres do korespondencji:

Dr hab. n. med. Stanisław Niemczyk
Klinika Nefrologii, Dializoterapii i Chorób Wewnętrznych
02-097 Warszawa, ul. Banacha 1a
Tel.: 22 5992658
e-mail: sniemczyk@wum.edu.pl

dializacyjnych i reinfuzyjnych(wu). Wypadkowa biogodności wszystkich tych składowych warunkuje ogólną biogodność zabiegów dializy. Kontakt osocza oraz elementów morfotycznych krwi z błoną dializacyjną wykonaną z substancji biologicznie obcej jest szczególnie duży i powoduje szereg reakcji takich jak aktywacja układu dopełniacza, aktywacja układu bezpośredniego, aktywacja układu krzepnięcia, aktywacja układu cytokin [1,8,11,14,21]. U pacjentów leczonych hemodializą obserwuje się wzrost stresu oksydacyjnego. Nie do końca poznany, mimo licznych badań, jest wpływ różnych błon dializacyjnych na indukcję stresu oksydacyjnego u pacjenta w czasie zabiegu hemodializy i na różne wskaźniki ich biogodności [6,9,11,12,18,24].

W przedstawionym badaniu ocenie poddano aktywność enzymów proteolitycznych (mielo-peroksydaza, elastaza, kolagenaza, katepsyna B, katepsyna B i L) oraz CRP w hemodializie przy użyciu dwóch błon dializacyjnych (z regenerowanej celulozy i polisulfonowej) oraz przy zabiegu hemodiafiltracji. Celem pracy była ocena wpływu hemodializy przy zastosowaniu dwóch różnych błon dializacyjnych oraz zabiegu hemodiafiltracji z użyciem błony polisulfonowej na stężenie enzymów proteolitycznych i CRP oraz ustalenie odpowiedzi na pytanie czy enzymy proteolityczne oraz CRP są dobrymi markerami biogodności błon dializacyjnych i zabiegów HD i HDF.

Pacjenci i metody

Oznaczenia aktywności enzymów proteolitycznych (mielo-peroksydaza, kolagenaza, elastaza, katepsyna B, katepsyna B i L) oraz CRP wykonano przed i bezpośrednio po zabiegu dializy w trzech następujących grupach pacjentów:

Grupa 1 (n-11) leczoną hemodializami z użyciem błony dializacyjnej z regenerowanej celulozy.

Grupa 2 (n-10) leczoną hemodializami z użyciem błony dializacyjnej polisulfonowej low flux.

Grupa 3 (n-10) leczoną hemodiafiltracją z użyciem błony polisulfonowej.

Podstawowe dane kliniczne przedstawiono w tabeli I.

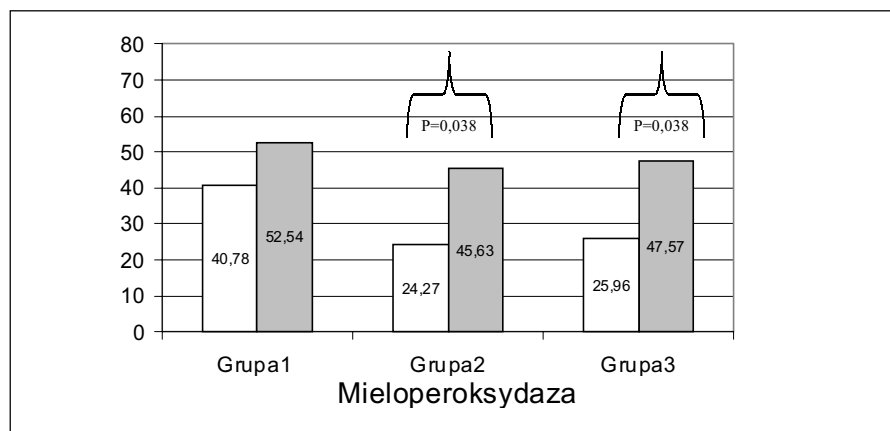
Wszyscy chorzy otrzymywali heparynę drobnocząsteczkową przed zabiegiem (40 mg enoksaparyny) i mieli ultrafiltrację w czasie zabiegu 1,5-2,0 litra.

Badaniem objęto 31 chorych leczonych hemodializami przez okres przynajmniej 3 miesięcy. Z badania wykluczono pacjentów z jawnymi klinicznymi procesami zapalnymi, chorobami autoimmunologicznymi, nowotworami, niedożywieniem (BMI<18 kg/m²), zaburzeniami czynności tarczycy, ciężkim uszkodzeniem wątroby, zaburzeniami krzepnięcia oraz osoby otrzymujące doustne leki przeciwzakrzepowe, glikokortykoidy, hormony płciowe, kamitynę. Wszyscy chorzy wyrazili świadomą zgodę na badanie a projekt uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej w Warszawie z dnia 29 stycznia 2004 r.

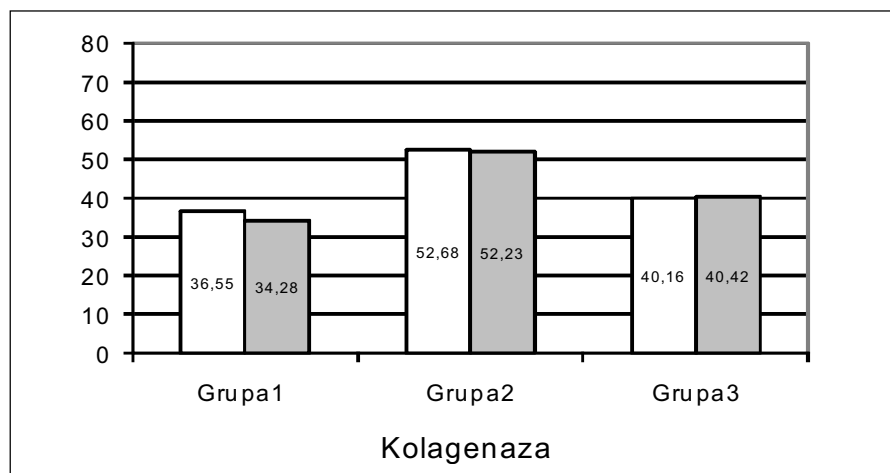
Stężenie mielo-peroksydazy granulocytów oznaczono z zastosowaniem testu BIOXYTECH MPO-EIA, opartym na metodzie immunoenzymatycznej ELISA. Antygen jest wychwytywany przez przeciwciała monoklonalne stanowiące fazę stałą mikroptytki. Następnie antygen wiązany jest

Tabela I
Charakterystyka pacjentów.
Characteristic of the patients.

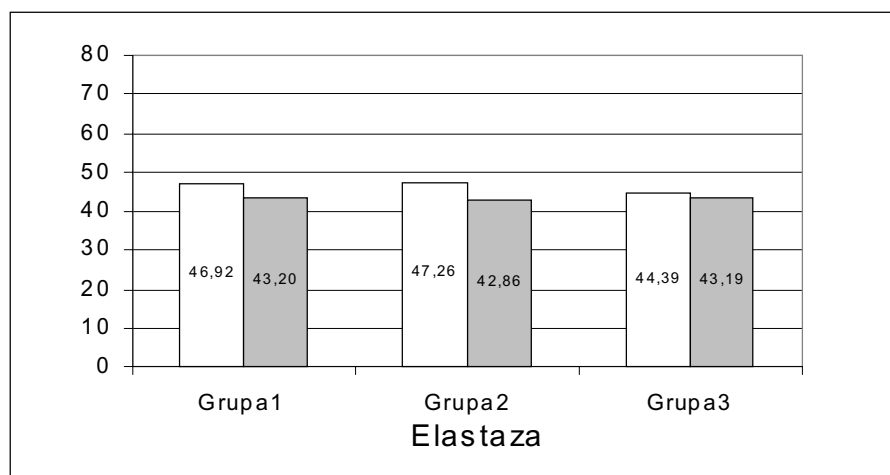
Grupa	Wiek	Kt/V	Okres dializoterapii	BMI
1	62,36 ± 17,54	1,12 ± 0,17	53,09 ± 38,07	25,82 ± 2,79
2	65,2 ± 9,5	1,05 ± 0,33	67,5 ± 47,8	26,8 ± 2,57
3	63,5 ± 13,84	1,24 ± 0,2	59,5 ± 31,93	27,4 ± 2,72



Rycina 1
Stężenia mielo-peroksydazy przed i po zabiegu w 3 grupach.
Myeloperoxidase concentrations before and after procedure in 3 groups.



Rycina 2
Stężenia kolageny przed i po zabiegu w 3 grupach.
Colagenase concentrations before and after procedure in 3 groups.



Rycina 3
Stężenia elastazy przed i po zabiegu w 3 grupach.
Elastase concentrations before and after procedure in 3 groups.

przeciwciałami poliklonalnymi anti-MPO sprzężonymi z biotyną, po czym biotylna wiązana jest z awidyną sprzężoną z fosfatazą alkaliczną. Po dodaniu substratu pNPP (fosforan p-nitrofenolu) fosfatazy alkalicznej absorbancja odczytywana jest na czytniku typu ELISA przy długości fali 405 nm. Stężenie MPO uzyskiwane jest z krzywej standardowej. Standart stanowi liofilizowana mieloperoksydaza granulocytowa.

Aktywność katepsyny B w surowicy mierzona była fluorymetrycznie z zastosowaniem Z-Arg-AMC (Z=N-CO₂-benzyloxycarbonyl, N-CO₂-Larginylo-arginina-7-amido-4-metylokumaranem) jako substratu. Enzym odcina C- koniec argininy i uwalnia grupę wysoko fluoryzującą 7-amino-4-metylokumaran(AMC).

Aktywność katepsyny Bi L łącznie mierzona była fluorymetrycznie z zastosowaniem Z-phenylanyl-arginine-7-amino-4-metylokumaranem jako substratu. Enzym odcina C-koniec argininy i uwalnia grupę wysoko fluoryzującą AMC.

Aktywność kolagenazy oznaczono fluorymetrycznie z zastosowaniem syntetycznego substratu sukcylo-Gly-Pro-Leu-gly-Pro-AMC. Substrat pod wpływem kolagenaz ulega hydrolizie w miejscu wiązania Leu-Gly. Uwalniany Gly=Pro-AMC pod wpływem obecnej w badanym materiale nadmiarze X-propylo dipeptylo-aminopeptydazy (X-Pro DAP), ulega następnie hydrolizie do Gly-Pro i do wolnej grupy AMC. Ilość uwolnionego amidometylokumaranu jest proporcjonalna do aktywności enzymu proteolitycznego w badanym materiale.

Aktywność elastazy oznaczana była metodą fluorymetryczną z zastosowaniem syntetycznego substratu Ac-Ala-Ala-Pro-Ala-AMC. Enzym odcina substrat przy C-końcu alaniny i uwalnia AMC, grupę o wysokiej fluorescencji.

Aktywność enzymatyczna katepsyny B, katepsyny Bi L, kolagenazy, elastazy zostały przedstawione w IU/ml.

W pracy zastosowano statystyki opisowe oraz test nieparametryczny *Wilcoxon* dla porównania wartości przed i po dializie. Przyjęto poziom istotności $p=0,05$. Obliczenia wykonano w programie SPSS v.12

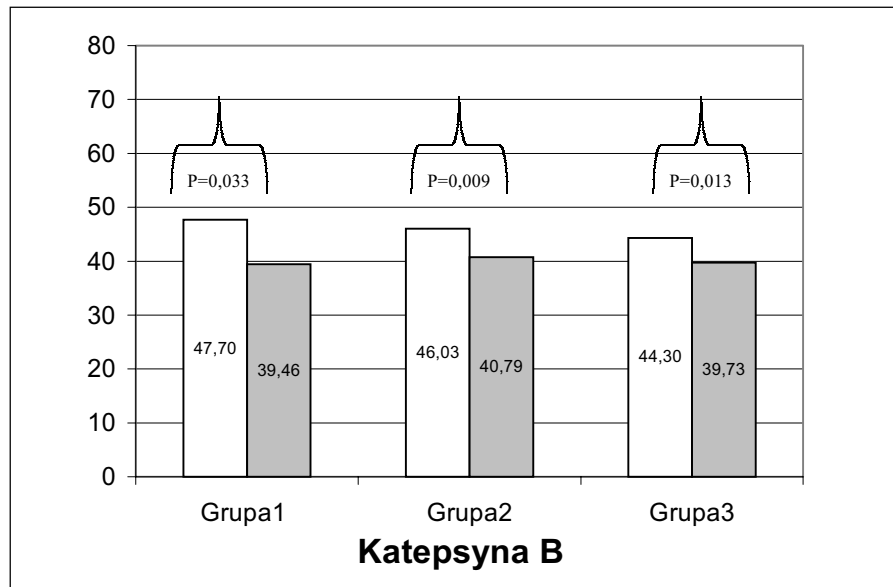
Wyniki

Stężenia enzymów proteolitycznych i CRP przed i po hemodializie oraz hemodiafiltracji w trzech grupach zostały przedstawione na rycinach od 1-6.

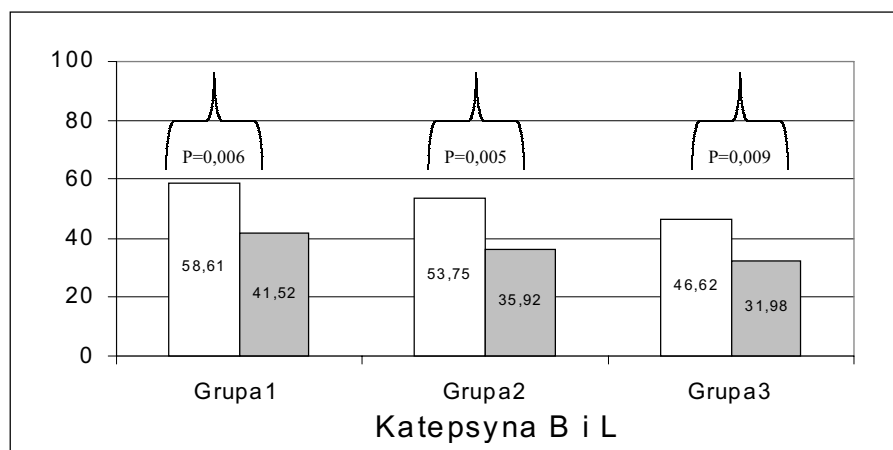
Stwierdziliśmy wzrost stężeń mieloperoksydazy (MPO) oraz CRP zarówno po zabiegu hemodializy przy użyciu obydwu badanych błon dializacyjnych jak i po zabiegu hemodiafiltracji (HDF). W grupie 2 i 3 nastąpił znamieny statystycznie wzrost stężeń dla mieloperoksydazy (MPO) $p=0,038$ i $p=0,038$ i dla CRP $p=0,028$ i $p=0,005$.

W grupie 1 stwierdzono wzrostową tendencję dla stężeń mieloperoksydazy oraz CRP nie uzyskano istotności statystycznej. Powyższy fakt tłumaczymy dużą zmiennością uzyskiwanych wyników mieloperoksydazy i CRP.

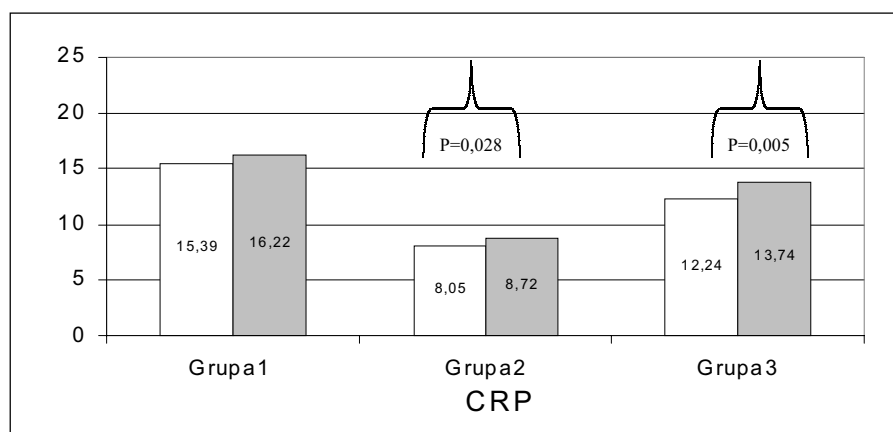
W przypadku pozostałych enzymów (kolagenoza, elastaza, katepsyna B, katepsyna Bi L) nie obserwowaliśmy wzrostu stężeń po zabiegach hemodializy i hemodiafiltracji.



Rycina 4
Stężenia katepsyny B przed i po zabiegu w 3 grupach.
Cathepsin B concentrations before and after procedure in 3 groups.



Rycina 5
Stężenia katepsyny Bi L przed i po zabiegu w 3 grupach.
Cathepsin B i L concentrations before and after procedure in 3 groups.



Rycina 6
Stężenia CRP przed i po zabiegu w 3 grupach.
CRP concentrations before and after procedure in 3 groups.

Dyskusja

U chorych z przewlekłą niewydolnością nerek (PNN) leczonych hemodializami dochodzi do przewlekłych powikłań, które

mogą prowadzić do wyniszczenia i rozwoju powikłań zarówno sercowo-naczyniowych jak i amyloidozy [8,9,15]. Poznanie patogenez tych powikłań jest podstawą do popra-

wy jakości zabiegów hemodializy(HD). Rozwijający się często przewlekły stan zapalny, indukcja produkcji B2-mikroglobuliny, cytokin, aktywacja układu dopełniacza i inne są istotną przyczyną rozwoju powikłań przede wszystkim przyspieszonej miażdżycy i wyniszczenia [5,8,22]. Uwalnianie i produkcja enzymów proteolitycznych biorących udział w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych jest wynikiem tzw. stresu oksydacyjnego i może być parametrem biogodności dializy. Ocena ich aktywności pozwala określić rolę enzymów w progresji powikłań u pacjentów leczonych hemodializami jak też biogodności zabiegu [7,8,17,21,22].

Mieloperoksydaza od kilku lat jest przedmiotem badań oceniających biogodność zabiegów hemodializy oraz generacji stresu oksydacyjnego. Mieloperoksydaza jest głównym białkiem ziarnistości azurofilnych ludzkich leukocytów wielojądrowych o ciężarze cząsteczkowym 150 000. Katalizuje utlenowanie anionu chlorkowego do powstania kwasu podchlornego w obecności nadtlenu wodoru produkowanego podczas aktywacji granulocyta. Odgrywa kluczową rolę w obronie komórki gospodarza przed patogennymi mikroorganizmami [14,19,21,25].

Autorzy zajmujący się mieloperoksydazą są zgodni co do wzrostu stężenia tego enzymu w czasie zabiegu hemodializy. Różnice w stężeniach mieloperoksydazy wynikają: z czasu pobrania próbki krwi w czasie hemodializy, miejsca pobrania (przed lub za dializatorem), krwi żyłnej lub tętniczej [17,25]. Autorzy zwracają uwagę na inne czynniki mogące zwiększać stres oksydacyjny w czasie hemodializy takie jak: wielkość ultrafiltracji, rodzaju koncentratu, pompa krwi [17,25].

W badaniu *Krietera* wzrost stężenia MPO obserwowano po 5 minutach, szczyt stężenia MPO osiągnięto w 30 minucie zabiegu hemodializy, następnie obserwowano obniżanie się poziomu enzymu nie osiagając poziomu wyjściowego mimo trwania zabiegu w tym ekspozycji na błonę. W badaniu tym obserwowano różnice stężenia MPO we krwi tętniczej i żyłnej [17]. W badaniu *Wu C.C.* nie obserwowano szczytu stężenia MPO w 30 min. [25]. *Krieter* w cytowanym badaniu stosował błonę heliksonową oraz tzw. ultraczysty płyn. Tym może być tłumaczony mniejsze stężenie mieloperoksydazy. Wzrosty na początku zabiegu, jak też różnice uzyskiwane w krwi żyłnej i tętniczej tłumaczył innymi czynnikami niż kontakt z błoną dializacyjną a raczej wynikiem działania np. pompy krwi. Jednak różnica przy użyciu różnych błon w pracy *Wu* i wsp. przemawia za tym, że rola błony dializacyjnej w procesie biogodności ma jednak zasadnicze znaczenie [17,25]. W naszej pracy nie wykazano różnicy między błonami, jednak cała metodologia pracy była inna a oznaczanie po zabiegu (nie w jego trakcie) w założeniu miał wykazać wpływ błony dializacyjnej chociaż nie można wykluczyć dializy jako całosci. Fakt, że zarówno stwierdzano wzrost w HD jak i HDF (zupełnie różnymi technikami dializacyjnymi) przemawia za głównym wpływem błony dializacyjnej. Warunki wykonania zabiegów hemodializy

były podobne pod względem dawek enoksaparyny i ultrafiltracji.

Borawski J. badał rolę stosowania heparyn dla uwalniania MPO. Stwierdził uwalnianie MPO ze ścian naczyń tłumacząc tym częściowo wzrost jego stężeń po podaniu heparyny i w tym mechanizmie ochronne, przeciwmiażdżycowe działanie heparyny na naczynia. Problem i wyniki bardzo interesujące wymagające dalszych badań. W naszej pracy wszyscy chorzy otrzymywali enoksaparynę w podobnej dawce [4].

Badanie powierzchniowych produktów degranulacji granulocytów nie wykazało przydatności dla oceny wpływu dializy na degranulację granulocytów [9]. W odróżnieniu od *Inose K.* i wsp. nie stwierdziliśmy w naszym badaniu wpływu zabiegu dializy na stężenia elastazy [1,11,13,14]. Można więc stwierdzić że jest to mało czuły marker biogodności.

Inne enzymy proteolityczne badane w pracy (katepsyny B i katepsyny B i L) nie zmieniały się istotnie co sugeruje ich małą przydatność w ocenie biogodności. Inni autorzy nie badali zachowań tych enzymów [2,3,23].

Potwierdza się w naszej pracy zachowanie metaloproteinaz (kolagenaza), których stężenie nie wzrastało podobnie jak w pracy *Chou F.P.* i wsp. [7,15,20]. W pracy tej stwierdzono wzrost inhibitorów proteinaz [7]. Istotnym stwierdzeniem naszej pracy jest potwierdzenie przydatności oznaczania CRP jako markera biogodności [5]. Badanie to ze względu na swą dostępność i prostotę może mieć duże znaczenie praktyczne w ocenie biogodności błony dializacyjnej i zabiegu hemodializy.

Wnioski

Wzrost aktywności mieloperoksydazy i CRP bezpośrednio po dializie jest dobrym wyznacznikiem biogodności różnych błon dializacyjnych i zabiegu hemodializy, niezależnie od techniki dializacyjnej.

Stężenia katepsyny B, katepsyny B i L, elastazy, kolagenazy nie wzrastają po zabiegu hemodializy i hemodiafiltracji i nie są dobrymi wyznacznikami biogodności.

Piśmiennictwo

1. *Aljama P., Bird D., Ward M.K. et al.*: Hemodialysis-induced leucopenia and activation of complement: effect of different membranes. *Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc.* 1978, 15, 144.
2. *Barre A.J., Kirschke H.*: Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L. *Meth. Enzymol.* 1981, 80, 525.
3. *Barret A.J.*: Fluometric assay for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. *Biochem. J.* 1980, 187, 909.
4. *Borawski J.*: Myeloperoxidase as a marker of hemodialysis biocompatibility and oxidative stress. The underestimated modifying effects of heparin. *Am. J. Kidney Dis.* 2006, 47, 37.
5. *Borazan A., Ustung H., Ustundag Y. et al.*: The effects of peritoneal dialysis and hemodialysis on serum tumor necrosis factor- α , interleukin-6, interleukin-10 and C-reactive protein levels. *Mediat. Inflamm.* 2004, 13, 201.
6. *Chenoweth D.E.*: Complement activation during hemodialysis: clinical observations, proposed mechanisms and theoretical implications. *Artif. Organs* 1984, 8, 281.
7. *Chou F.P., Chu S.C., Cheng S.F. et al.*: Effect of hemodialysis on plasma level of type IV collagenases

and their inhibitors. *Clin. Biochem.* 2002, 35, 383.

8. *Gastaldello K., Husson C., Wens R. et al.*: Role of complement and platelet-activating factor in stimulation of phagocytosis and reactive oxygen species production during hemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000, 15, 1638.
9. *Grooteman M.P., van Telligen A., van Houte A.J.*: Hemodialysis-induced degranulation of polymorphonuclear cells: no correlation between membrane markers and degranulation products. *Nephron* 2000, 85, 267.
10. *Hori W.H., Feinstein E.I., Wanner C. et al.*: Plasma level of main granulocyte components during hemodialysis. *Am. J. Nephrol.* 1990, 10, 53.
11. *Hori W., Jochum M., Heiland A.*: Release of granulocyte proteinases during hemodialysis. *Am. J. Nephrol.* 1983, 3, 213.
12. *Hori W.H., Schaeffer R.M., Heiland A.*: Effect of different dialyzer on proteinase and proteinase inhibitors during hemodialysis. *Am. J. Nephrol.* 1985, 5, 320.
13. *Hori W.H., Steihauer H.B., Schollmeyer P.*: Plasma level of granulocyte elastase during hemodialysis: effect of different dialyzer membranes. *Kidney Int.* 1985, 28, 791.
14. *Inose K., Kumeo O., Yasuhiro O. et al.*: The elevation of plasma levels of myeloperoxidase and polymorphonuclear leukocyte elastase as an index of biocompatibility of the column during hemodialysis using with a beta 2-microglobulin-selective adsorbent column. *Clin. Exp. Nephrol.* 2000, 4, 52.
15. *Kijoma K., Kinishita H., Kato T. et al.*: A new and highly sensitive fluorescence assay for collagenase-like peptidase activity. *Anal. Biochem.* 1979, 100, 43.
16. *Kosch M., Lewers A., Fobker M. et al.*: Dialysis filter type determines the acute effect of haemodialysis on endothelial function and oxidative stress. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003, 18, 1730.
17. *Krieter D.H., Lemke H.D., Wanner C. et al.*: Myeloperoxidase serves as a marker of oxidative stress during single haemodialysis session using two different biocompatible dialysis membranes. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006, 21, 546 (letter and reply).
18. *Lin Y.F., Chang D.M., Shaio M.F. et al.*: Cytokine production during haemodialysis: effects of dialytic membranes and complement activation. *Am. J. Nephrol.* 1996, 16, 293.
19. *Malle E., Buch T., Grone H.J.*: Myeloperoxidase in kidney disease. *Kidney Int.* 2003, 64, 1956.
20. *Ohashi K., Kawai R., Hara M. et al.*: Increased matrix metalloproteinases as possible cause of osseointegration tissue destruction in long term haemodialysis and beta 2-microglobulin amyloidosis. *Virchows Arch.* 1996, 428, 37.
21. *Pawlak K., Pawlak D., Mysliwiec M.*: Circulating B-hemokines and matrix metalloproteinase-9 tissue inhibitor of metalloproteinase-1 system in hemodialyzed patients - role of oxidative stress. *Cytokine* 2005, 31, 18.
22. *Ono K., Ueki K., Inose K. et al.*: Plasma levels of myeloperoxidase and elastase are differentially regulated by hemodialysis membranes and anticoagulants. *Res Commun. Pathol. Pharmacol.* 2000, 108, 341.
23. *Smith R.E., Bissel E.R., Mitchell A.R. et al.*: Direct photometric and fluorometric assay of proteinase using substrates containing 7 - amido - 4 - trifluoromethylcoumarin. *Thromb. Res.* 1980, 17, 393.
24. *Ward R.A., McLeish K.R.*: Oxidant stress in hemodialysis patients: what are the determining factors? *Artif. Organs* 2003, 27, 230.
25. *Wu C.C., Chen J.S., Wu W.M. et al.*: Myeloperoxidase serves as a marker of oxidative stress during single haemodialysis session using two different biocompatible dialysis membranes. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005, 20, 1134.
26. *Zimmerman M., Ashe B., Yurewicz E.C., Patel G.*: Sensitive assay for trypsin, elastase and chymotrypsin using new fluorogenic substrates. *Anal. Biochem.* 1977, 78, 47.