

Tysiące czytelników w Polsce i za granicą!



VOLUMED

Ryszard Kacała & Józef Kokoszka

Przedstawiamy czasopisma naukowe wydawane przez nasze wydawnictwo.

Mamy nadzieję, że jesteście Państwo lub będziecie ich stałymi czytelnikami.

Zapraszamy do prenumeraty.



POLSKI WYDAWCA KSIĄŻEK I CZASOPISM MEDYCZNYCH

Volumed s.c. Ryszard Kacała & Józef Kokoszka
51-423 Wrocław, ul. Olsztyńska 3, tel./fax (071) 325 42 01

Prace oryginalne

Klinika Oczna 1997, 99 (2): 83-85
ISSN 0023-2157 Indeks 362 646

Aktywność katepsyny A w płynie podsiatkówkowym w pierwotnym odwarstwieniu siatkówki

Cathepsin A activity in the subretinal fluid in the primary retinal detachment

Iwona Obuchowska, Andrzej Stankiewicz, Zofia Mariak, Ewa Proniewska-Skrętek

Purpose: To evaluate cathepsin A activity in the subretinal fluid in the primary retinal detachment.
Materials and methods: The studies were performed on subretinal fluids taken from 38 patients operated for the primary retinal detachment. Duration of the detachment was contained between 1 week and 6 months. Cathepsin A activity was determined by the ninhydrin method with synthetic substrate (N-Cbz-Phe-Ala) at its optimum pH 5.0.

Results: Cathepsin A activity was demonstrated in all investigated fluids. The highest activity was found at about the 4th week of the detachment and then it decreased. No differences of enzyme activity according to sex and refraction error were found.

Conclusion: The increasing proteolytic activity in the subretinal fluid could be an important factor in gradual degrading of the structure and function of the detached retina, because cathepsins are involved in digestion of outer segment proteins of rods and cones and degradation of mucopolysaccharide interphotoreceptor matrix. Retinal degradation during detachment is probably induced by both insufficient nutrition and the effect of increasing lysosomal enzymes.

Słowa kluczowe: płyn podsiatkówkowy, pierwotne odwarstwienie siatkówki, katepsyna A

Key words: subretinal fluid, primary retinal detachment, cathepsin A

Badania biochemiczne płynu podsiatkówkowego w pierwotnym odwarstwieniu siatkówki wskazują na jego wysoką aktywność biologiczną (1). Wykazuje on aktywność proteolityczną, charakterystyczną dla enzymów działających w kwaśnym zakresie pH-katepsyn (2, 8). Jedynym enzymem proteolitycznym stwierdzonym dotychczas w płynie podsiatkówkowym jest katepsyna D (8). Wykazuje ona bardzo wysoką aktywność w nabłonku barwnikowym siatkówki, gdzie jej rola polega na rozkładzie białka zewnętrznych segmentów fotoreceptorów i degradacji rodopsyny do glikoproteidów (3, 4, 5, 10). Enzym ten jest obecny również w innych tkankach oka (7, 9, 12), a w cieple szklistym uważany jest za główny enzym proteolityczny (6).

Aktywność proteolityczna płynu podsiatkówkowego w pierwotnym odwarstwieniu siatkówki wykazuje co najmniej dwa szczyty aktywności w kwaśnym zakresie pH, co wskazuje na obecność w płynie innych proteaz oprócz katepsyny D (2). Na podstawie naszych wcześniejszych badań nad aktywnością katepsyny A w tkankach oka stwierdziliśmy, że enzym ten, podobnie jak katepsyna D, jest obecny w cieple szklistym, siatkówce i naczyniówce i jak wszystkie katepsyny działa w kwaśnym pH (11).

Płyn podsiatkówkowy gromadzący się pomiędzy warstwą fotoreceptorów a nabłonkiem barwnikowym w pierwotnym odwarstwieniu siatkówki pochodzi przede wszystkim z ciała szklistego, a tylko w niewielkim stopniu z naczyń siatkówki i naczyniówki – i te właśnie tkanki są prawdopodobnie źródłem enzymów proteolitycznych.

Biorąc pod uwagę powyższe dane, postanowiliśmy sprawdzić, czy katepsyna A należy do enzymów odpowiedzialnych za wzrost aktywności proteolitycznej w płynie podsiatkówkowym w pierwotnym odwarstwieniu siatkówki.

Z Katedry i Kliniki Okulistyki AM w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. Andrzej Stankiewicz

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
Lek. med. Iwona Obuchowska
ul. Gruntowa 6c m. 19
15-706 Białystok

Tabela I: Aktywność katepsyny A w płynie podsiatkówkowym w pierwotnym odwarstwieniu siatkówki mierzona przyrostem azotu α -aminowego w pH 5,0 przy użyciu N-Cbz-Phe-Ala jako substratu

Table I: Cathepsin A activity in the subretinal fluid in the primary retinal detachment measured by the increase of α -amino nitrogen at pH 5.0 with N-Cbz-Phe-Ala as a substrate

Czas trwania odwarstwienia Duration of detachment	Liczba próbek płynu podsiatkówkowego No. of subretinal fluid samples	Aktywność katepsyny A w μ M/ml/24 h \pm SD Cathepsin A activity in μ M/ml/24 h \pm SD
1 tydzień 1 week	4	6,60 \pm 0,568
2 tygodnie 2 weeks	6	7,69 \pm 0,977
3 tygodnie 3 weeks	7	13,78 \pm 0,856
4 tygodnie 4 weeks	5	28,49 \pm 0,719
4,5 tygodnia 4,5 weeks	1	28,38
5 tygodni 5 weeks	1	26,03
6 tygodni 6 weeks	3	19,22 \pm 0,258
2 miesiące 2 months	3	17,84 \pm 0,702
3 miesiące 3 months	4	9,71 \pm 0,151
6 miesięcy 6 months	4	9,11 \pm 0,366

Materiały i metodyka

Do badań użyto próbki płynów podsiatkówkowych pochodzące od 38 chorych w wieku od 21 do 86 lat operowanych w Klinice Okulistyki AMB w latach 1994-1996 z powodu samoistnego odwarstwienia siatkówki. Wśród nich było 13 mężczyzn i 25 kobiet. U 10 chorych stwierdzono krótkowzroczność, u 1 – nadwzroczność, a u pozostałych normowzroczność. W 4 oczach występowała bezsoczewkowość. Do badań zakwalifikowano osoby, u których poza zmianami krótkowzrocznymi na dnie oka i niewielkimi zmętnieniami w soczewce nie obserwowano innych odchyliń od stanu prawidłowego w przednim i tylnym odcinku gałki ocznej.

Czas trwania odwarstwienia określano jako okres między pojawieniem się pierwszych dostrzegalnych przez chorego, objawów pogorszenia widzenia a pobraniem płynu. Wynosił on od tygodnia do 6 miesięcy.

Osoby te operowano w znieczuleniu ogólnym metodą Schepensa z użyciem gąbki sylikonowej lub wszczepu z silikonu twardego. W trakcie operacji aspirowano płyn podsiatkówkowy do strzykawki. Z badań eliminowano płyn zanieczyszczony krwią lub innymi tkankami.

Płyn podsiatkówkowy homogenizowano w homogenizatorze Pottera w temperaturze 4°C 3x15 s z dodatkiem 0,2% Tritonu X-100. Do badań posłużył płyn nadosadowy uzyskany po odwirowaniu homogenatu w temperaturze 4°C przy 1500xg przez 30 minut. Aktywność katepsyny A mierzono metodą ninhydrynową przy użyciu syntetycznego substratu: N-karbobenzoksy-L-feniloalanilo-L-alaniny (N-Cbz-Phe-Ala) w optimum pH 5,0. Mieszaninę złożoną z 0,25 ml substratu

i 0,25 ml homogenatu tkanki inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 h. Reakcję przerywano przez dodanie 1,25 ml 10% TCA (kwasu trójchlorooctowego). Próby kontrolne wytrącano kwasem w czasie zero. Po odwirowaniu próbek do 0,5 ml uzyskanego nadosadu dodawano 0,5 ml odczynnika ninhydrynowego i ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej przez 20 minut. Po oziębieniu i dodaniu 2 ml mieszaniny n-propanol + woda (1:1, v/v) mierzono absorpcję przy 570 nm. Ilość uwolnionego azotu α -aminowego, będącego miarą aktywności enzymu, odczytywano z wykresu kalibracyjnego sporządzonego przy użyciu wzorcowych roztworów leucyny. W identyczny sposób śledzono degradację własnych białek badanego materiału, zastępując substrat 0,1 M buforem octanowym. O stopniu aktywności katepsyny A wnoszono na podstawie różnicy przyrostu azotu α -aminowego w próbach inkubowanych z substratem i bez.

Wyniki

We wszystkich badanych próbkach płynów podsiatkówkowych stwierdzono aktywność katepsyny A. Przeanalizowano zależność aktywności enzymu od czasu trwania odwarstwienia (tab. I).

Stwierdzono, że aktywność katepsyny A wykazuje najwyższą wartość około 4. tygodnia trwania odwarstwienia, a następnie ulega ona obniżeniu, ale może się utrzymywać nawet po kilku miesiącach trwania odwarstwienia.

Nie wykazano zależności aktywności katepsyny A od wady refrakcji i płci.

Omówienie

Uzyskane wyniki aktywności katepsyny A w płynie podsiatkówkowym w pierwotnym odwarstwieniu siatkówki wyraźnie wskazują na istnienie zależności pomiędzy czasem trwania odwarstwienia a aktywnością enzymu. W podobny sposób kształtuje się aktywność proteolityczna płynu podsiatkówkowego, w tym katepsyny D, mierzona innymi metodami (2, 8). Wyniki naszych badań sugerują, że katepsyna A może należeć do enzymów odpowiedzialnych za wzrost aktywności proteolitycznej w płynie, który wykazuje więcej niż jeden szczyt aktywności w pH charakterystycznym dla działania katepsyn.

U chorych z odwarstwieniem siatkówki często stwierdza się upłynnienie ciała szklistego, które jest prawdopodobnie wywołane działaniem katepsyn trawiących kolagen. Enzymy te mogą też przechodzić z upłynnionego ciała szklistego do przestrzeni podsiatkówkowej przez otwory w siatkówce. Stopniowy wzrost aktywności proteolitycznej w płynie podsiatkówkowym w przebiegu pierwotnego odwarstwienia siatkówki jest prawdopodobnie związany z uwalnianiem katepsyn również z uszkodzonego nabłonka barwnikowego siatkówki, który, jak wykazano we wcześniejszych badaniach, jest bogatym źródłem enzymów lizosomalnych, w tym katepsyn (4, 5, 10, 11).

Wzrost aktywności enzymów proteolitycznych w płynie podsiatkówkowym może być ważnym czynnikiem prowadzącym do stopniowej degradacji struktury i funkcji odwarstwionej siatkówki, katepsyny są bowiem odpowiedzialne za trawienie białek zewnętrznych segmentów czopków i pręcików oraz rozpad mukopolisacharydowej przestrzeni międzyfotoreceptorowej. Odgrywa ona bardzo istotną rolę w odżywianiu i prawidłowej adhezji siatkówki. Zwyródnienie siatkówki w trakcie trwania odwarstwienia jest prawdopodobnie związane zarówno z niedostatecznym jej odżywianiem, jak i rozpadem białek zewnętrznych segmentów fotoreceptorów, które z powodu niedostarczenia substancji odżywczych nie mogą być odnawiane. Długotrwałe odwarstwienie prowadzi do nieodwracalnych zmian w strukturze czopków i pręcików i jest przyczyną braku zadowalających efektów czynnościowych mimo anatomicznego przyłożenia siatkówki w trakcie zabiegu operacyjnego.

Piśmiennictwo

- Bakunowicz-Lazarczyk A.: *Aktywność biologiczna płynu podsiatkówkowego w mechanizmach pierwotnego odwarstwienia siatkówki*. Rozprawa habilitacyjna, Akademia Medyczna w Białymstoku, 1995.
- Bakunowicz-Lazarczyk A., Stankiewicz A., Wolańska M., Wróbel K.: *Aktywność proteolityczna płynu podsiatkówkowego*. Klin. Oczna, 1992, 94, 239-240.
- Berenstein G.H., Reichenbach A., Kirchke H., Wiederaenders B.: *Cell type specific distribution of cathepsin B and D immunoreactivity within rabbit retina*. Neurosc. Lett., 1989, 98, 135-138.
- Burke J.M., Twining S.S.: *Regional comparisons of cathepsin D activity in bovine retinal pigment epithelium*. Invest. Ophthalm. Vis. Sci., 1988, 29, 1789-1793.
- Cabral L., Unger W., Boulton M., Lightfoot R.: *Regional distribution of lysosomal enzymes in the canine retinal pigment epithelium*. Invest. Ophthalm. Vis. Sci., 1990, 31, 670-676.
- Galewska Z., Bańkowski E.: *Cathepsin D – a main proteolytic enzyme of the bovine vitreous*. Roczniki AM w Białymstoku, 1994, 39, 38-43.
- Hara S., Hayasaka S., Mizuno K.: *Lysosomal enzymes activities of the bovine corneal endothelium*. Albrecht von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalm., 1986, 224, 384-387.
- Hayasaka S., Hara S., Mizuno K.: *Lysosomal enzymes in subretinal fluid*. Albrecht von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalm., 1976, 200, 13-20.
- el-Hifnawi E.: *Localization of cathepsin D in rat ocular tissues. An immunohistochemical study*. Anat. Anz., 1995, 177, 11-17.
- el-Hifnawi E., Kuhnlel W., el-Hifnawi A., Laqua H.: *Localization of lysosomal enzymes in the retina and retinal pigment epithelium of RCS rats*. Anat. Anz., 1994, 176, 505-513.
- Obuchowska I., Stankiewicz A., Mariak Z.: *Cathepsin A activity in normal bovine ocular tissues and human pathological intraocular fluids*. Acta Bioch. Pol., 1996, 43, 687-692.
- Yamada T., Hara S., Tamai M.: *Immunohistochemical localization of cathepsin D in ocular tissues*. Invest. Ophthalm. Vis. Sci., 1990, 31, 1217-1223.

Praca wpłynęła do Redakcji 4 marca 1997 r. (541)