

Tabela I  
Średnie wyniki stężenia fluoresceiny w cieczy wodnistej wraz z odchyleniem standardowym dla  $n=6$

T/min	Czas pobierania cieczy wodnistej									
	1	5	10	15	30	60	90	120	180	240
wartości jednostek absorbanacji	—	200	260	440	660	560	380	200	94	—
odchylenie standardowe dla $n=6$	—	0,9002	0,9880	0,9900	0,9880	0,9820	0,9780	0,9800	0,9890	—

fluoresceiny mierzonej jednostkami absorbanacji od czasu jaki upłynął od podania jej dożylnie przedstawiono na ryc. 2.

Uzyskane średnie wyniki wraz z odchyleniem standardowym dla  $n=6$  przedstawiono w tab. I.

Przedstawiona metoda oznaczania fluoresceiny w cieczy wodnistej charakteryzuje się bardzo dużą dokładnością. Przy jej pomocy można wykryć w badanej przez nas objętości 10  $\mu$ l fluoresceiny w ilości 20 nanogramów ( $20 \times 10^{-9}$  g). Poza dużą czułością jej zaletą jest powtarzalność widoczna w niewielkim odchyleniu standardowym (tab. I). Te dwie cechy umożliwiają w przyszłości wykonywanie niezbędnej ilości badań bez konieczności uwzględniania błędów mogącego pochodzić z techniki pomiaru.

Wielką zaletą tej metody jest również to, że dokonywane pomiary przenikania fluoresceiny będącej odzwierciedleniem stanu bariery naczyniowo-komorowej mogą być w stanach, gdy ośrodki optyczne są nieprzeźierne. Pomimo, iż należy ona do metod inwazyjnych, wydaje się, że stanowi cenne uzupełnienie obecnie stosowanych, szczególnie w warunkach doświadczalnych.

#### Piśmiennictwo

1. Dzido T. H., Soczewiński E.: Modification of a horizontal sandwich chamber for thin-layer chromatography. J. of Chromatography. 516: 461-466 (1990). — 2. Duke-Elder S.: System of Ophthalmology VII, 277-279 (Kimpton, London 1962). — 3. Gierek-Lapińska A., Formińska-Kapuścik M., Janiec S., Rzedkowska M.: Wpływ fotokoagulacji siatkówki laserem argonowym na wyniki pomiarów fluorometrycznych u chorych z retinopatią cukrzycową. Klin. Oczna 96: 263-264 (1994). — 4. Kraff M. C., Sanders D. R., McGuigan I.: Inhibition of blood-agueous humor barrier breakdown with diclofenac: A fluorometric study. Arch. Ophthal. 108: 380-383 (1990). — 5. Pecoldowa K., Bartkowska-Orłowska M.: Stan bariery naczyniowo-komorowej w odwarstwieniu siatkówki badany testem fluoresceinowym. Klin. Oczna 39: 209-217 (1969). — 6. Szymański A., Gierek-Lapińska A., Koziak M.: Wpływ sterydowych i niesterydowych leków przeciwzapalnych na pooperacyjną barierę krew-ciecz wodnista w pseudofakii. Klin. Oczna 95: 1445-1447 (1994). — 7. Zeimer R. C., Blair N. P., Cunha-Vaz J.: Vitreous Fluorophotometry for clinical research. Description and evaluation of a new fluorophotometer. Arch. Ophthal. 101: 1753-1756 (1983).

Praca wpłynęła: 14.04.1995 (287)

Małgorzata Wolańska, Zofia Galewska, Edward Bańkowski i Andrzej Stankiewicz

## Aktywność proteolityczna ciała szklстого

### Proteolytic activity of the vitreous

**Summary.** It was found that the human and bovine vitreous contains a proteolytic enzyme(s) which demonstrates characteristic features of cathepsin D. It acts in acidic pH with various activity, dependent on the condition of the eye and actively digests native and denatured protein substrates. It demonstrates a high susceptibility to the inhibitory action of pepstatin. The role of this enzyme in physiology and pathology of the eye is discussed.

Hasła: ciało szkliste, aktywność proteolityczna

Key words: vitreous, proteolytic activity

Ciało szkliste zajmuje około 90% objętości gałki ocznej i stanowi jeden z najważniejszych elementów jej struktury. Charakteryzuje się ono budową żelową i zawiera 99% wody, kwas hialuronowy i białka o łącznym stężeniu około 1,5 mg/ml. Wśród nich występuje kolagen oraz rozpuszczalne białka niekolagenowe. Prawidłowa czynność ciała szklстого zależy między innymi od wzajemnych oddziaływań pomiędzy białkami kolagenowymi a kwasem hialuronowym<sup>1,8</sup>.

Wiadomo, że kolagen jest degradowany w sposób odmienny od białek niekolagenowych. W fizjologicznym przedziale pH i temperatury jest on odporny na działanie większości enzymów proteolitycznych, ulega natomiast działaniu specyficznych enzymów m.in. kolagenaz tkankowych oraz katepsyn kolagenolitycznych. Stwierdzono, że ciało szkliste nie wykazuje aktywności kolagenolitycznej wobec podstawowych typów kolagenu (typu I, II, III, IX i XI)<sup>9</sup>.

Postanowiono ocenić aktywność proteolityczną bydlęcego ciała szklстого wobec hemoglobiny, kazeiny, albuminy i fibrynogeny oraz określić lokalizację enzymów proteolitycznych. Dodatkowo postanowiono sprawdzić aktywność proteolityczną ludzkiego ciała szklстого wobec hemoglobiny w przebiegu niektórych schorzeń gałki ocznej. Ograniczona dostępność ludzkiego ciała szklстого sprawiła, iż badania te wykonano tylko na jednym substracie.

#### Material i metodyka

Ciało szkliste izolowano z około 40 bydlęcych gałek ocznych, pobranych w 1-2 godz. po uboju oraz z ludzkich gałek ocznych, usuniętych z powodu następujących chorób: zapalenia wnętrza gałki ocznej (4 przypadki), nowotworów gałki — czerniak i rak płaskonabłonkowy (5), zaćmy wikłającej (7) oraz jaskry (3 przypadki). Materiał kontrolny stanowiło prawidłowe ciało szkliste otrzymane z gałki ocznej usuniętej z powodu rozległego urazu. Zwracano szczególną uwagę na wyeliminowanie tych próbek, w których mogłyby się znajdować ślady krwi. Mierzono aktywność proteolityczną wobec następujących substratów: hemoglobiny i kazeiny (natywnej i zdenaturowanej 6M mocznikiem), albuminy i fibrynogeny. 4% roztwory wymienionych substratów rozcieńczano buforem uniwersalnym Brittona-Robinsona, o odpowiednim pH, w stosunku 1:1. Badania wykonano w przedziale pH 2,5-8,0. Różnice między kolejnymi próbami wynosiły 0,5 jednostki. Oznaczenie wykonano w następującym układzie: a) bydlęce ciało szkliste — 0,5 ml ciała szklстого i 0,5 ml substratu (oba o jednakowym pH). W niektórych przypadkach inkubowana mieszanina zawierała dodatkowe pepstatyny do końcowego stężenia 10  $\mu$ g/ml. b) ludzkie ciało szkliste — 0,2 ml ciała szklстого i 0,8 ml substratu (oba o jednakowym pH). Próby inkubowano 4 godziny w temperaturze 37°C. W obu przypadkach inkubację przerywano dodając 2,5 ml 5% kwasu trójchlorooctowego. Próby kontrolne wykonywano w takim samym układzie, jak próby właściwe. Prób tych nie inkubowano. Zarówno próby badane jak i kontrolne sączono. W przesączu oznaczano zawartość kwasorozpuszczalnej tyrozyny metodą Folina-Ciocalteu<sup>4</sup>. Aktywność proteolitycz-

Z Zakładu Biochemii AM w Białymstoku  
Kierownik: prof. dr hab. Edward Bańkowski  
Z Kliniki Okulistycznej AM w Białymstoku  
Kierownik: prof. dr hab. Andrzej Stankiewicz  
Reprint requests to:  
Dr med. Małgorzata Wolańska  
ul. Mickiewicza 2, 15-230 Białystok

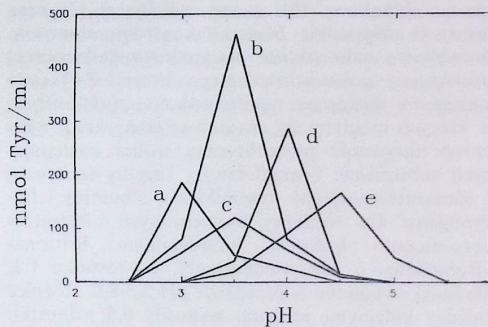


na ciała szkliste wyrażano w nmolach tyrozyny uwolnionej przez proteazy zawarte w 1 ml ciała szklistego.

W celu ustalenia lokalizacji enzymów proteolitycznych bydłowego ciała szklistego (część płynna lub komórki ciała szklistego) badany materiał wirowano przy  $10000 \times g$  przez 30 minut. Osad zawieszono w buforze Brittona-Robinsona, a następnie poddano działaniu ultradźwięków o częstotliwości 20 kHz, 4 razy po 15 sekund, w temp.  $4^{\circ}C$  w celu rozbicia zawartych w osadzie komórek. Porównano aktywność proteolityczną supernatantu i osadu (w szerokim zakresie pH) z aktywnością pełnego ciała szklistego.

## Wyniki

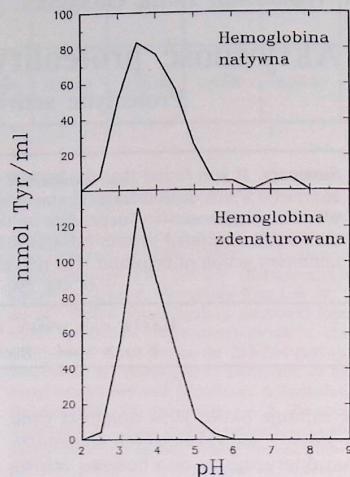
Stwierdzono, że ludzkie ciało szkliste trawi zdenaturowaną hemoglobinę jedynie w kwaśnym przedziale pH (3,0-4,5), z różną aktywnością zależną od stanu gałki ocznej (ryc. 1). Aktywność ta wzrasta wyraźnie w stanach zapalnych wnętrza gałki ocznej w porównaniu z aktywnością proteolityczną prawidłowego ciała szklistego, jak również przy jaskrze oraz nowotworach gałki ocznej. W przypadku zaćmy zaobserwowano niewielki spadek aktywności proteolitycznej w porównaniu z aktywnością prawidłowego ciała szklistego.



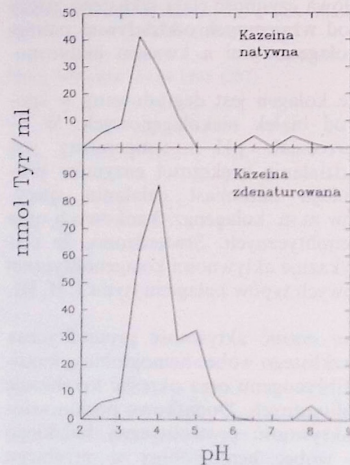
Ryc. 1. Aktywność proteolityczna ludzkiego ciała szklistego w przebiegu niektórych chorób gałki ocznej w porównaniu z aktywnością prawidłowego ciała szklistego: a — nowotwory, b — stany zapalne wnętrza oka, c — zaćma wklajająca, d — jaskra, e — prawidłowe ciało szkliste

Proteazy zawarte w bydłym cieple szklistym trawia zarówno hemoglobinę (ryc. 2), jak i kazeinę (ryc. 3) w kwaśnym przedziale pH (3,5-4,0). W pH wyższym i niższym od optymalnego aktywność proteolityczna gwałtownie maleje. Podobne wyniki uzyskano przy zastosowaniu jako substratów fibrynogenu i albuminy. Denaturacja substratów (hemoglobiny i kazeiny) zwiększa ich podatność na działanie en-

zymów proteolitycznych ciała szklistego. Prawie cała aktywność proteolityczna bydłowego ciała szklistego jest zlokalizowana w jego części płynnej, komórki zawierają jedynie znikomą aktywność (ryc. 4). Aktywność proteaz ciała szklistego jest około 97% hamowana przez pepstatynę — swoisty inhibitor katepsyn (ryc. 5).



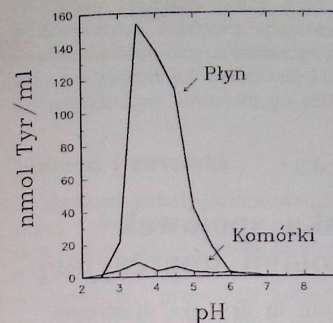
Ryc. 2. Podatność natywnej i zdenaturowanej hemoglobiny na proteolityczne działanie bydłowego ciała szklistego



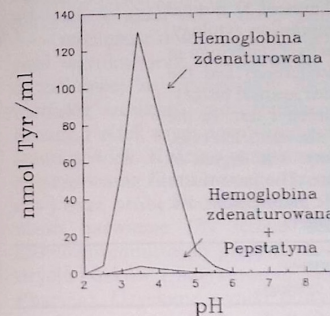
Ryc. 3. Podatność natywnej i zdenaturowanej kazeiny na proteolityczne działanie bydłowego ciała szklistego

## Omówienie

Z przedstawionych danych wynika, że ciało szkliste wykazuje wysoką aktywność proteolityczną wobec różnych substratów białkowych w kwaśnym



Ryc. 4. Porównanie aktywności proteolitycznej części płynnej i homogenatu komórek bydłowego ciała szklistego wobec zdenaturowanej hemoglobiny



Ryc. 5. Hamujący wpływ pepstatyny na aktywność proteolityczną bydłowego ciała szklistego wobec zdenaturowanej hemoglobiny

przedziale pH. Proteazy ciała szklistego są zlokalizowane w jego części płynnej. Homogenat komórek występujących w cieple szklistym wykazuje śladową aktywność proteolityczną. Prawdopodobnie głównym źródłem tej aktywności zarówno w ludzkim, jak i bydłym cieple szklistym jest katepsyna D. Wiado-

mo, że proteaza ta działa w kwaśnym przedziale pH, bardzo aktywnie trawi zdenaturowaną hemoglobinę<sup>3</sup> i jest hamowana przez pepstatynę — swoisty inhibitor katepsyn<sup>7</sup>.

Katepsyna D [EC 3.4.23.5] jest główną proteazą lizosomalną i wydaje się odgrywać ważną rolę w katabolizmie białek w różnych tkankach<sup>3,5</sup>. Z wcześniejszych publikacji wynika, że tkanki oczne, takie jak ciało rzęskowe, tęczówka, nablonek rogówki, wykazują wysoką aktywność katepsyny D<sup>6,10</sup>. Mimo, iż jest ona enzymem wewnątrzkomórkowym, w niektórych przypadkach może uwolnić się do przestrzeni międzykomórkowej. Ostatnio wykazano, że enzym ten jest obecny w płynie podsiatkówkowym pacjentów z odwarstwieniem siatkówki<sup>2</sup>. Można przypuszczać, że katepsyna D jest główną proteazą ludzkiego i bydłowego ciała szklistego.

## Piśmiennictwo

1. Ayad S., Weiss J.B.: A new look at vitreous humour collagen. *Biochem. J.* 218: 835-840 (1984).
2. Bakunowicz-Lazarczyk A., Stankiewicz A., Wolańska M., Wróbel K.: Aktywność proteolityczna płynu podsiatkówkowego. *Klin. Oczna* 94: 239-240 (1992).
3. Barret A. J., McDonald J. K.: Mammalian proteases. A glossary and bibliography. *Endopeptidases*. Academic Press, Inc. London 1980.
4. Folin O., Ciocalteu V.: Tyrosine and tryptofan determination in proteines. *J. Biol. Chem.* 73: 627-631 (1927).
5. Galewska Z., Bałkowski E.: Cathepsin D-A main proteolytic enzyme of the bovine vitreous. *Rocz. Akad. Med.* 39: 38-43 (1994).
6. Hara S., Hayasaka S., Mizuno K.: Lysosomal enzyme activities of bovine corneal endothelium. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalm.* 224: 384-387 (1986).
7. Knight C. G., Barret A. J.: Interaction of human cathepsin D with the inhibitor pepstatin. *Biochem. J.* 155: 117-125 (1976).
8. Wolańska M., Bałkowski E.: Soluble non-collagen proteins of bovine vitreous humour. *Acta Biochim. Polon.* 36: 37-45 (1989).
9. Wolańska M., Bakunowicz-Lazarczyk A.: Aktywność proteolityczna i kolagenolityczna bydłowego ciała szklistego. *Klin. Oczna* 94: 8-10 (1992).
10. Yamada T., Hara S., Tami M.: Immunohistochemical localization of cathepsin D in ocular tissues. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31: 1217-1223 (1990).

Praca wpłynęła: 14.04.1995 (289)