

■ PRACE KAZUISTYCZNE

- Obustronne odwarstwienie siatkówki w przebiegu EPH gestozy.* 209
Ewa Poppe, Marzena Sajkowska, Irena Bernacka
- Przypadek retinopatii po leczeniu interferonem.* 213
Piotr Sobolewski, Tadeusz Łapiński
- Jaskra wtórna w przebiegu przetoki tętniczo-jamistej – opis przypadku.* 217
Piotr Kawa, Jerzy Mackiewicz, Zbigniew Zagórski, Maciej Szajner

■ PRACE POGLĄDOWE

- Stosunek prędkości poruszania się obrazu prawdziwego do prędkości obrazu rzekomego w dwojeniu badanym metodą zegarową.* 221
Adam Maciejasz
- Badania funkcji receptorów NMDA w korze wzrokowej. Streszczenie pracy habilitacyjnej.* 225
Damian Czepita

- Sprawozdania 229
- Kronika 232
- Kalendarz zjazdowy 234

■ CASE REPORTS

- Bilateral retinal detachment in toxemia of pregnancy.* 209
Ewa Poppe, Marzena Sajkowska, Irena Bernacka
- A case report of interferon-associated retinopathy.* 213
Piotr Sobolewski, Tadeusz Łapiński
- Secondary glaucoma in the course of arteriocavernous fistula – case report.* 217
Piotr Kawa, Jerzy Mackiewicz, Zbigniew Zagórski, Maciej Szajner

■ REVIEW ARTICLES

- The mutual relationship between the velocities of the real and apparent image in diplopia examined by using the clock method.* 221
Adam Maciejasz
- Investigations on the function of the NMDA receptors in the visual cortex. Summary of the habilitation's thesis.* 225
Damian Czepita

- Reports 229
- Chronicle 232
- Congress calendar 234

Sprostowanie

Komitet Naukowy Zjazdu uprzejmie przeprasza za błędnie podany tytuł naukowy *Doc. dr. hab. n. med. Andrzeja W. Fryczkowskiego* w sprawozdaniu z XXXIX Zjazdu Okulistów Polskich zamieszczonym w „Klinice Ocznej” 1999, 101, 69-72.

Dr med. Krystyna Krukar-Baster
Dr med. Renata Urban
Dr med. Joanna Kobylarz

Prace doświadczalne

Klinika Oczna 1999, 101 (3): 161-163
ISSN 0023-2157 Indeks 362 646

Aktywność Katepsyny A w cieczy wodnistej u chorych z zaćmą, jaskrą dokonaną i guzami wewnątrzgałkowymi

Cathepsin A activity in the aqueous humor in patients with cataract, absolute glaucoma and intraocular tumors

Iwona Obuchowska¹, Edward Bańkowski², Andrzej Stankiewicz¹

Purpose: To evaluate cathepsin A activity in the aqueous humor of patients with cataract, absolute glaucoma and intraocular tumors. **Material and methods:** The studies were performed on human aqueous humor taken from anterior chamber of eye balls of patients operated because of cataract, absolute glaucoma and intraocular tumors. Cathepsin A activity was determined by the ninhydrin method with synthetic substrate (N-Cbz-Phe-Ala) at its optimum pH 5.0. **Results:** In the human aqueous humor of the eye with cataract cathepsin A activity was more than three times higher than in the eye with choroid tumors and absolute glaucoma. No differences of enzyme activity in aqueous humor between patients with glaucoma and intraocular tumors were found. **Conclusion:** The increasing proteolytic activity of cathepsin A in aqueous humor of patients with cataract suggests its importance in cataract pathogenesis. This implies that cathepsin A is involved in development of lens opacity and is found in the aqueous humor due to diffusion from cataractous lens in which the proteolytic process prevails.

Słowa kluczowe: katepsyna A, ludzka ciecz wodnista, zaćma, jaskra dokonana, guzy wewnątrzgałkowe

Key words: cathepsin A, human aqueous humor, cataract, absolute glaucoma, intraocular tumors

Katepsyna A, znana również jako lizosomalna karboksypeptydaza A, należy do grupy enzymów proteolitycznych rozszczepiających specyficzne wiązania karboksylowe w łańcuchu peptydowym (7). Współdziałając z innymi proteazami, uczestniczy w wielostopniowej degradacji białek i dużych łańcuchów polipeptydowych do mniejszych peptydów i reszt aminokwasowych (14). Dzięki różnym miejscom działania na łańcuch peptydowy enzymy te stanowią dobrze uzupełniającą się ca-

łość, która zapewnia sprawny rozkład białek zarówno w stanach fizjologii, jak i patologii. Podobne procesy zachodzą w wielu tkankach i narządach organizmu, w tym także i w oku.

Nasze wcześniejsze badania aktywności katepsyny A w prawidłowych bydłych gałkach ocznych wykazały obecność enzymu we wszystkich badanych tkankach, z wyjątkiem cieczy wodnistej (6). Ponieważ katepsyna A jest enzymem wewnątrzkomórkowym, jej brak w bezkomórkowej cieczy wodnistej wydaje się całkowicie uzasadniony. Skład płynu komorowego zmienia się jednak wraz z rozwojem procesów chorobowych, toczących się w otaczających tkankach i dotyczy to także enzymów proteolitycznych (2-4).

Biorąc pod uwagę powyższe dane, postanowiliśmy sprawdzić, jak zachowuje się aktywność katepsyny A w płynie komorowym u chorych z zaćmą, jaskrą dokonaną oraz guzami wewnątrzgałkowymi.

¹ Z Katedry i Kliniki Okulistyki AM w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. Andrzej Stankiewicz

² Z Zakładu Biochemii AM w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. Edward Bańkowski

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

Materiał i metodyka

Do badań użyto próbek cieczy wodnistej pochodzących z ludzkich galek ocznych operowanych z powodu zaćmy starczej i przedstarczej oraz usuniętych z powodu jaskry dokonanej i guzów wewnątrzgłokowych w Klinice Okulistyki AM w Białymstoku w latach 1994-1997. Materiał uzyskany w trakcie operacji zaćmy, w ilości od 0,1 do 0,2 ml łączono w większe grupy (po 4-5), w celu otrzymania odpowiedniej ilości cieczy wodnistej do badań. Badania objęły ogółem 120 chorych, nieobciążonych innymi chorobami oka, cukrzycą czy innymi schorzeniami ogólnymi.

Ciecz wodnistą uzyskaną bezpośrednio po enukleacji (w ilości 0,4-0,5 ml) przebadano łącznie w 30 oczach: 16 usuniętych z powodu jaskry dokonanej i 14 z powodu guzów wewnątrzgłokowych. Pacjenci ci nie byli obciążeni żadnymi dodatkowymi chorobami oka ani schorzeniami ogólnymi, z wyjątkiem jednego chorego, u którego stwierdzono pierwotny guz nowotworowy płuca oraz guz przerzutowy do naczyniówki. Wszystkie przedoperacyjne rozpoznanie kliniczne zostały potwierdzone badaniami histopatologicznymi. Z badań wyeliminowano płyny komorowe zanieczyszczone krwią i innymi tkankami.

Ciecz wodnistą 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-karbobenzoksyl-L-fenylalaninylo-L-alaniny (N-Cbz-Phe-Ala) w optimum pH 5,0. Mieszankę złożoną z 0,25 ml substratu i 0,25 ml homogenatu tkanki inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. 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 absorbpcję 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 białek własnych badanego materiału, zastępując substrat – 0,1 M buforem octanowym. O aktywności katepsyny A wnoszono na podstawie różnicy przyrostu azotu α -aminowego w próbach inkubowanych z substratem i bez.

Wyniki

Aktywność katepsyny A stwierdzono we wszystkich badanych płynach komorowych. Najwyższa aktywność występowała w cieczy wodnistej uzyskanej od chorych operowanych z powodu zaćmy starczej i przedstarczej. Jest ona ponad 3 razy wyższa niż aktywność katepsyny A w cieczy wodnistej w przebiegu guzów naczyniówki i 2,9 razy przewyższa aktywność enzymu w przebiegu jaskry dokonanej. Różnice te są istotne statystycznie ($p < 0,02$).

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

Table I: Cathepsin A activity in the human aqueous humor measured by the increase of α -amino nitrogen at pH 5,0 with N-Cbz-Phe-Ala as a substrate

Ciecz wodnista Aqueous humor	Liczba próbek cieczy wodnistej No. of aqueous humor samples	Katepsyna A ($\mu\text{mol/ml}(24 \text{ h}) \pm \text{SD}$ Cathepsin A ($\mu\text{mol/ml}(24 \text{ h}) \pm \text{SD}$)
Zaćma Cataract	120	0,583 \pm 0,093
Jaskra dokonana Absolute glaucoma	16	0,201 \pm 0,073
Czerńiak naczyniówki Choroidal melanoma	13	0,189 \pm 0,0765
Guz przerzutowy do naczyniówki Metastatic tumor of choroid	1	0,132

SD – odchylenie standardowe / standard deviation

Wartości aktywności katepsyny A w płynie komorowym u pacjentów z jaskrą dokonaną i czerńniakiem naczyniówki nie wykazują znamiennych różnic statystycznych. W tabeli I przedstawiono aktywność katepsyny A w płynie komorowym w poszczególnych jednostkach chorobowych.

Omówienie

Mimo że w prawidłowej bydłczej cieczy wodnistej nie stwierdza się aktywności katepsyny A (6), to we wszystkich badanych przez nas tkankach aktywność ta jest oznaczalna. Choć na podstawie przeprowadzonych badań trudno jest wypowiadać się o aktywności katepsyny A w cieczy wodnistej w przebiegu jaskry i guzów naczyniówki, to wyraźnie widać, że w zaćmie poziom enzymu jest podwyższony. Ciecz wodnista, ze względu na brak w niej lizosomów, nie jest prawdopodobnie źródłem katepsyny A, a enzym ten jest uwalniany do komory przedniej z otaczających tkanek. U chorych z zaćmą najbardziej prawdopodobnym źródłem aktywności enzymu jest soczewka oraz związany z rozwojem zaćmy wzrost przepuszczalności jej torebki.

Od dawna wiadomo, że w metabolizmie soczewki bierze udział wiele enzymów proteolitycznych z grupy egzopeptydaz, takich jak aminopeptydaza leucynowa i alaninowa, dipeptydylowe peptydazy (DPP): DPP I, DPP II i DPP III (5, 8, 10). Enzymy te odszczepiają specyficzne N-końcowe reszty aminokwasowe w łańcuchu polipeptydowym. Stwierdzono, że aktywność rośnie wraz z wiekiem, a w ludzkiej zmętniałej soczewce jest ona 3 razy większa niż w soczewce prawidłowej (9, 11-13). U pacjentów z zaćmą obserwuje się znaczny wzrost aktywności proteolitycznej tych enzymów w płynie komorowym. Przypuszcza się, że odgrywają one podstawową rolę w metabolizmie starczej soczewki i rozwoju zaćmy. Na skutek działania na soczewkę różnych czynników chemicznych i fizycznych (np. promieniowanie, wstrząs mechaniczny czy uboczne produkty metabolizmu tkanek oka) dochodzi do uszkodzenia i pęknięcia błon lizosomalnych i wzrostu

wewnątrzkomórkowego trawienia organicznych składowych soczewki przez zawarte w lizosomach enzymy. Nasiloną proteolizę prowadzi do spadku całkowitej ilości białka, powstawania wodniczek i zmętnień, tworzenia się agregatów z uszkodzonych i zakumulowanych białek soczewki (1). W miarę postępowania zmian, w pewnych typach zaćmy starczej dochodzi do pęcznienia soczewki. Mechanizm ten tłumaczy się wzrostem wewnątrzłobekowego ciśnienia osmotycznego po proteolizie. Obserwowane w trakcie rozwoju zaćmy starczej zmiany, polegające na upłynięciu zawartości soczewki i rozpuszczeniu kory (zaćmy przejrzale), świadczą o aktywnej roli enzymów proteolitycznych, odpowiedzialnych za te procesy.

Należy przypuszczać, że katepsyna A może, wspólnie z opisanymi już egzopeptydazami, uczestniczyć w procesach toczących się w zmętniałej soczewce, czego efektem jest wzrost jej aktywności w cieczy wodnistej. Jako karboksypeptydaza hydrolizuje specyficznie dla siebie wiązania w końcu karboksylowym łańcucha polipeptydowego, przez co uzupełnia działanie innych enzymów, o innym punkcie uchwytu w łańcuchu polipeptydowym. Katepsyna A jest dotychczas jedynym enzymem o aktywności karboksypeptydazowej opisanym w tkankach oka, jedynym któremu możemy przypisać rolę hydrolizy wiązań karboksylowych obecnych we wszystkich rodzajach białek.

Piśmiennictwo

- Blow A.M.J.: *Proteinases in mammalian cells and tissues*. [w:] *Proteolysis in the lens*. red. A.J. Barret. North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1977, 501-514.
- DiGirolamo N., Verma M.J., McCluskey P.J., Lloyd A., Wakefield D.: *Increased matrix metalloproteinases in the aqueous humor of patients and experimental animals with uveitis*. *Curr. Eye Res.*, 1996, 15, 1060-1069.
- Hayasaka S., Hayasaka I.: *Cathepsin B and collagenolytic cathepsin in the aqueous humor of patients with Behcet's disease*. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 1979, 210, 103-107.

- Huang S.H., Adamis A.P., Wiederschain D.G., Shima D.T., Shing Y., Moses M.A.: *Matrix metalloproteinases and their inhibitors in aqueous humor*. *Exp. Eye Res.*, 1996, 62, 481-490.
- Kim H.R.C., Lipscomb W.N.: *Structure and mechanism of bovine lens leucine aminopeptidase*. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 1994, 68, 153-213.
- Obuchowska I., Stankiewicz A., Mariak Z.: *Cathepsin A activity of normal bovine ocular tissues and pathological human intraocular fluids*. *Acta Bioch. Pol.*, 1996, 43, 687-692.
- Ostrowska H.: *Karboksypeptydazy komórkowe i osoczowe*. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 1991, 45, 1289-1294.
- Sharma K.K., Kester K.: *Peptide hydrolysis in lens: role of leucine aminopeptidase, aminopeptidase III, polyoligopeptidase and acylololigopeptidase*. *Curr. Eye Res.*, 1996, 15, 363-371.
- Sharma K.K., Ortwerth B.J.: *Aminopeptidase III activity in normal and cataractous lenses*. *Curr. Eye Res.*, 1986, 5, 378-390.
- Sulochoma K.N., Ramakrishnan S., Arunagiri K.: *Purification and characterization of a new enzyme dipeptidase from human lens*. *Exp. Eye Res.*, 1996, 62, 221-239.
- Swanson A.A., Davis R.M., McDonald J.K.: *Dipeptidyl peptidase III of human cataractous lenses. Partial purification*. *Curr. Eye Res.*, 1984, 3, 287-291.
- Swanson A.A., Nichols J.T.: *Human senile cataractous lens proteinase. Isolation and some chemical characteristics*. *Biochem. J.*, 1971, 125, 575-584.
- Taylor A., Daims M.A., Lee J., Surgenor T.: *Identification and quantification of leucine aminopeptidase in aged normal and cataractous human lenses and ability of bovine lens LAP to cleave bovine crystallins*. *Curr. Eye Res.*, 1983, 2, 47-56.
- Worowski K.: *Mechanizm działania enzymów proteolitycznych*. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 1978, 32, 467-491.

Praca wpłynęła do Redakcji 12 marca 1998 r. (656)