

Renata Gruszecka-Gerkowicz, Marek Gerkowicz i Anna Matysik

## Ilościowa ocena przepuszczalności bariery naczyniowo-komorowej metodą densytometryczną połączoną z wysokosprawną chromatografią cienkowarstwową

Quantitative assessment of blood-aqueous humor barrier permeability by means of the densitometric method combined with highly potent thin layer chromatography

**Summary.** The paper presents an original method of examining blood-aqueous humor permeability. The examinations were performed on grey rabbits that had been intravenously injected 10% fluorescein solution. Subsequently, at definite time intervals from the moment of the administration, fluid of the anterior chamber was taken in which the amount of aqueous fluorescein permeating to aqueous humor was measured. The measurements were performed using the method of high potency thin layer chromatography (HPTLC) in DS type chambers. Examination results were presented as densitograms, and the area of individual points was counted using a computer programme. This method yielded a diagram quantitatively presenting fluorescein permeation from the blood to the aqueous humor.

Hasła: fluoresceina, bariera naczyniowo-komorowa, chromatografia cienkowarstwową, densytometria  
Key words: fluoresceine, blood — aqueous barrier, thin layer chromatography, densitometry

Fluoresceina już od wielu lat jest stosowana w okulistyce do badania przepuszczalności bariery naczyniowo-komorowej. Po raz pierwszy *Erlisch* w 1881 roku zwrócił uwagę na zjawisko przechodzenia fluoresceiny podanej królikowi podskórnie, do cieczy wodnistej. Dopiero jednak od 1944 roku podjęto próby wykorzystania tego zjawiska w praktyce klinicznej. Obecność fluoresceiny w tkankach oka badano przy pomocy fluorometrów fotoelektrycznych, w świetle ultrafioletowym, porównywano ilość fluoresceiny w płynie komory przedniej z barwą fluoresceiny w rurek szklanych przy pomocy fluorometru Calmana<sup>2</sup>.

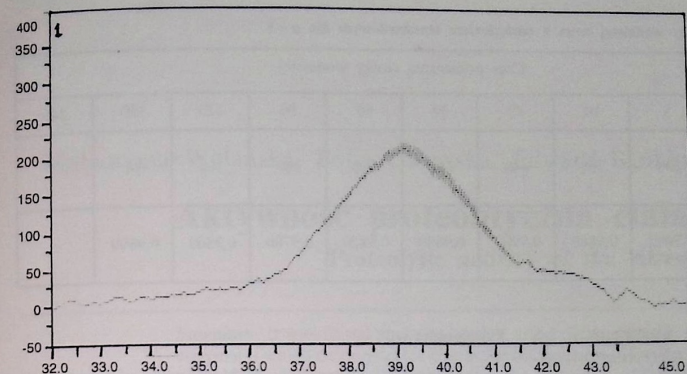
Opracowanie przez *Amslera* i *Huber* techniki pomiaru przenikania fluoresceiny do komory przedniej stworzyło nowe praktyczne możliwości badania przepuszczalności bariery naczyniowo-komorowej oka w warunkach fizjologicznych jak i w patologii narządu wzroku. Badanie polega na obserwacji fluoresceiny w komorze przedniej po dożylnym jej podaniu i oznaczeniu jej ilości według tzw. optycznej metody progowej<sup>3</sup>.

Dalszym rozwinięciem metod pomiaru było wprowadzenie fluorofotometrii<sup>7</sup>. Metoda ta obecnie

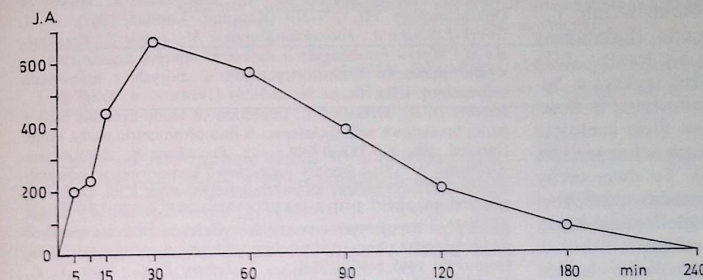
stosowana, jest unowocześniana w dalszym ciągu. Umożliwia ona znaczną obiektywizację wyników, które zazwyczaj zgadzają się ze stanem klinicznym<sup>3,4,6</sup>. Fluorofotometria wymaga jednak przejrzystych ośrodków optycznych i w warunkach badań doświadczalnych jest trudna do zastosowania. Dlatego też postanowiliśmy opracować nową metodę przydatną w badaniach doświadczalnych. W założeniach naszych powinna spełniać następujące warunki: powinna być precyzyjna, powtarzalna i umożliwiać przeprowadzenie badania w różnych stanach patologicznych, w tym przy nieprzeziernych ośrodkach optycznych.

### Materiał i metodyka

Badania przeprowadzono na 10 królikach szarych obu płci o wadze 3 kg. Wszystkim królikom podawano do żyły usznej jednorazowo 3 ml 10% roztworu soli sodowej fluoresceiny. Następnie po upływie 1, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180 i 240 minut od podania fluoresceiny pobierano u kolejnych królików z obu gałek ocznych ciecz wodnistą za pomocą strzykawki nakłuwając komorę przednią w rąbku rogówki. Tym sposobem wykonano trzy serie badań uzyskując 6 próbek cieczy wodnistej w każdym odstępnie czasowym. Następnie oznaczano poziom fluoresceiny w pobranej cieczy wodnistej metodą densytometryczną



Ryc. 1. Charakterystyczny densytogram z dobrze wykształconym „pikiem”



Ryc. 2. Krzywa przedstawiająca stężenie fluoresceiny w komorze przedniej w zależności od czasu jaki upłynął od podania jej dożylnie

połączoną z wysokosprawną chromatografią cienkowarstwową.

Wysokosprawną chromatografią cienkowarstwową HPTLC wykonywano na płytkach szklanych o rozmiarach 5 × 10 cm pokrytych żelą krzemionkowym Si 60 firmy Merck w teflonowych poziomych komorach DS firmy Chromdes-Lublin<sup>1</sup>. Próbkę cieczy wodnistej nanoszono bezpośrednio na chromatogramy w ilości 10 μl strzykawką Hamiltona bez wstępnego oczyszczenia.

Chromatogramy rozwijano w układzie gradientowym dwuetapowym. Pierwszy etap gradientu przeprowadzano na dystansie od 1 do 5 cm 70% roztworem octanu etylu w chloroformie. W drugim etapie chromatogramy rozwijano na dystansie od 5 do 9 cm przy pomocy 95% roztworu octanu etylu w chloroformie. Oznaczenia densytometryczne fluoresceiny wykonywano przy pomocy densytometru firmy Desage CD60 Heidelberg wspomaganego odpowiednio zaprogramowanym komputerem firmy Optimus SA (486-DX-50).

Powstałe na chromatogramach plamy fluoresceiny skanowano meandrem na szerokość 8 mm (2 × 4 mm), biorąc pod uwagę ich rozmycie przy rozmiarach szczyfeli 0,1 × 4 mm i przy długości fali λ = 465 nm. Do rozwijania chromatogramów dobrano układy rozpuszczalników na drodze doświadczalnej tak, aby substancje balastowe występujące

w próbkach cieczy wodnistej pozostawały na starcia lub wędrowały z czołem rozpuszczalnika. Dzięki temu uzyskiwano zwarte plamy fluoresceiny (bez tzw. ogonów) nadające się do ilościowego oznaczania.

Charakterystyczny densytogram z dobrze wykształconym „pikiem” przedstawiono na ryc. 1.

Na podstawie przeprowadzonych badań uzyskano krzywą obrazującą gromadzenie się fluoresceiny w cieczy wodnistej oka królika. Prezentowaną metodą chromatografii cienkowarstwową w próbkach cieczy wodnistej pobranych po 1 minucie od podania dożylnego fluoresceiny nie stwierdzono jej obecności w komorze przedniej. W następnych badaniach wykonanych po 5 minutach stężenie fluoresceiny w komorze przedniej gwałtownie wzrosło osiągając wartości ponad dwukrotnie większe po 15 minutach od podania. Maksymalne stężenie fluoresceiny w cieczy wodnistej obserwowaliśmy w próbkach pobranych 30 minut po jej dożylnym podaniu i wynosiło 660 jednostek absorbancji. Od tego momentu obserwowaliśmy stopniowy spadek stężenia fluoresceiny — na początku powolny, uzyskując poziom po 60 minutach 560 jednostek.

W następnych badanych okresach stężenie fluoresceiny ulegało zdecydowanie szybszemu spadkowi i w naszych badaniach po 180 minutach było niewielkie, zaś po 240 nieznaczalne. Uzyskane wartości w postaci krzywej przedstawiającej zależność stężenia



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 absorbancji	—	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 absorbancji 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 nieprzeźrzyste. 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 szklste, aktywność proteolityczna

Key words: vitreous, proteolytic activity

Ciało szklste 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 szklste nie wykazuje aktywności kolagenolitycznej wobec podstawowych typów kolagenu (typu I, II, III, IX i XI)<sup>9</sup>.

Postanowiono ocenić aktywność proteolityczną bydłeczego 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 szklste izolowano z około 40 bydłeczych 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 szklste 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) bydłecze ciało szklste — 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 szklste — 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