

(33)

Mechanizmy oksydacyjne w patogenezie zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem

Role of oxidative mechanisms in the pathogenesis of age-related macular degeneration

Katarzyna Janik-Papis¹, Magdalena Ulińska², Anna Krzyżanowska¹, Ewelina Stoczyńska¹, Anna I. Borucka², Katarzyna Woźniak¹, Małgorzata Zaras², Jacek P. Szaflik², Janusz Błasiak¹

¹ Z Katedry Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego

Kierownik: prof. dr hab. Janusz Błasiak

² Z Katedry i Kliniki Okulistyki II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Z Samodzielnego Publicznego Klinicznego Szpitala Okulistycznego w Warszawie

Kierownik: prof. dr. hab. n. med. Jerzy Szaflik

Summary:

Oxidative stress is a major factor in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). Retinal pigment epithelial (RPE) cells are prone to reactive oxygen species (ROS) arising during the stress due to intense oxygen metabolism and a high oxygen pressure. Additionally, the cells can be exposed to ROS as a consequence of accumulation of iron ions in these cells, sunlight exposure and tobacco smoke. There are several defense systems against RTF in the cell, including antioxidant enzymes, low-molecular weight antioxidants and DNA repair pathways. RPE cells display phagocytic activity towards outer segments of photoreceptors and this activity can be associated with additional oxidative stress since the segments are rich in long chain, polyunsaturated fatty acids (PUFA). The oxidation of PUFA leads to the production of additional ROS. Moreover, oxidized PUFA are not correctly cleaved in the lysosomes of RPE and are accumulated in the form of lipofuscin, which is deposited in Bruch's membrane in the form of drusen and in this way it stimulates immune responses, including phagocytosis, associated with the recruiting of macrophages and dendritic cells. In this time, RPE cells are exposed to ROS, produced in oxygen burst associated with phagocytosis. Further studies, both clinical/epidemiological and in vitro, are needed to better understand relationship between AMD and oxidative stress.

Słowa kluczowe: zwyrodnienie plamki związane z wiekiem, AMD, stres oksydacyjny, antyoksydanty, naprawa DNA.

Key words: age-related macular degeneration, AMD, oxidative stress, antioxidants, DNA repair.

Wprowadzenie

Zwyrodnienie plamki żółtej związane z wiekiem (AMD) jest głównym powodem utraty wzroku u ludzi starszych. Schorzenie to występuje u 30% osób powyżej 75. roku życia (według statystyk niemieckich) i u 15% osób w wieku 80 lat (według danych amerykańskich). W Polsce nie ma opublikowanych dokładnych danych statystycznych na temat liczby osób dotkniętych tą chorobą. W związku ze starzeniem się społeczeństwa problem AMD narasta i szacuje się, że w ciągu najbliższych 25 lat liczba osób dotkniętych tą chorobą ulegnie podwojeniu.

AMD jest chorobą wieloczynnikową. Podstawowym i najbardziej poważnym czynnikiem ryzyka jest wiek. Coraz częściej podkreśla się rolę uwarunkowań genetycznych choroby (dodatkowo wywiad rodzinny w kierunku AMD). Do czynników ryzyka zalicza się palenie tytoniu, płęć żeńską, rasę białą, nadciśnienie tętnicze, schorzenia sercowo-naczyniowe (miażdżyca, przebyte zawał mięśnia sercowego czy udar mózgu), nadwzroczność, jasny kolor tętnic, wysiękową postać AMD w jednym oku, przewlekłą ekspozycję na światło, niską zawartość antyoksydantów w osoczu krwi i złe nawyki żywieniowe. Wyniki uzyskane w szeroko zakrojonych badaniach w ramach programu badawczego AREDS (Age-Related Eye Disease Study) sugeru-

ją, że mechanizmy oksydacyjne mogą odgrywać znaczącą rolę w patogenezie AMD (1).

AMD

Pierwszymi objawami AMD są zanik ostrości wzroku w centrum widzenia, kłopoty z czytaniem, rozpoznawaniem twarzy i różnieniem barw. Chorobie towarzyszą zmiany w błonie Brucha i komórkach nabłonka barwnikowego siatkówki (RPE), takie jak: formowanie się druzów (najpierw hialinowych, w późniejszym etapie złogów lipofuscynowych), hipo- lub hiperpigmentacja, atrofia fotoreceptorów, neowaskularyzacja naczyniówki, plamki żółtej i błony Brucha oraz zwłóknienia (blizny) wewnątrz siatkówki.

Ze względu na naturalną obecność tlenu oraz jego wytwarzanie w wyniku procesów metabolicznych w swoim otoczeniu komórki RPE są narażone na stres oksydacyjny zakłócający gospodarkę lipidową, remodelowanie zewnątrzkomórkowej macierzy i rekrutację makrofagów. W wyniku stresu może dojść do kumulacji najpierw druzów hialinowych (widocznych jako lekko żółte złogi), a następnie – druzów lipofuscynowych (ciemnożółte, brązowe złogi). Druzy te uszkadzają mechanicznie komórki RPE, są przyczyną procesów zapalnych, zakłócają transport składników odżywczych i tlenu z błony Brucha do fotorecepto-

arów, powodując z jednej strony atrofię tych komórek, a z drugiej – indukcję procesów neowaskularyzacyjnych. Powiększające się druzy powodują atrofię fotoreceptorów i miejscowe niedotlenienie komórek, które indukuje nadmierną ekspresję naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w celu wytworzenia dodatkowych naczyń krwionośnych. Procesy te są nieodwracalne, ponieważ odkładane kompleksy druzów hialinowych i lipofuscynowych powodują akumulację w tym miejscu składnika dopełniacza C5a i przeciwciał IgG, co z kolei zaburza rekrutację makrofagów niezbędnych do procesów fagocytozy zewnętrznych dyskoidów fotoreceptorów. Dodatkowo C5a i IgG stymulują naczyniówkę do wydzielania chemokiny Ccl2 (MCP-1). Ccl2 sprzyja dalszej akumulacji C5a i IgG, która stymuluje komórki RPE do ekspresji VEGF. Z kolei VEGF zapoczątkowuje procesy neowaskularyzacji w siatkówce prowadzące do AMD. Patologiczne procesy neowaskularyzacyjne w siatkówce, naczyniówce i błonie Brucha powodują przejście postaci suchej (druzy, atrofia fotoreceptorów) w postać wysiękową (mokrą) powodującą miejscowe wysięki, krwotoki, reakcje zapalne, zbliznowacenia i w rezultacie – utratę wzroku (2).

Postać sucha

Postać sucha występuje u 90% chorych na AMD i jest powodowana odkładaniem się druzów w centralnej części siatkówki. Druzy są to złogi zbudowane z produktów przemiany materii zewnętrznych segmentów fotoreceptorów i innych substancji odłożonych w błonie Brucha (składniki dopełniacza, fibrynogen, fibronektyna, białka ostrej fazy), które w prawidłowej siatkówce są fagocytowane i trawione przez komórki RPE. Druzy, które są odłożone w nadmiernej liczbie, uniemożliwiają wymianę składników odżywczych i produktów przemiany materii z naczyniami włosowatymi tkanki chorioidalnej (choriokapilarami). W rezultacie komórki RPE obumierają, co prowadzi dalej do obumierania fotoreceptorów pozbawionych składników odżywczych dostarczanych z tkanki chorioidalnej za pośrednictwem RPE.

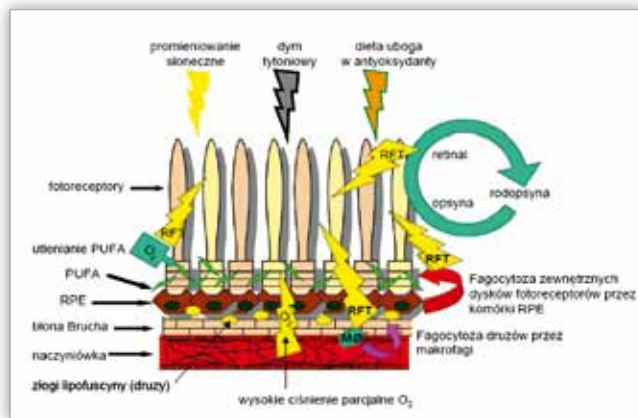
Postać wysiękowa (mokra)

Postać wysiękowa występuje jedynie u 10% chorych, ale to właśnie ona może prowadzić do nieodwracalnej utraty wzroku. Cechują ją odwarstwienie nabłonka barwnikowego siatkówki i neowaskularyzacja naczyniówki. Nadmiar naczyń krwionośnych, narastających w poprzek środkowej części siatkówki zwanej plamką żółtą, przesącza płyn, w konsekwencji powodując bliznowacenie tkanki, zniszczenie widzenia centralnego w czasie od 2 miesięcy do 3 lat.

Rola reaktywnych form tlenu w patogenezie AMD

Stres oksydacyjny należy do czynników o zasadniczym znaczeniu dla patogenezy AMD (3). W plamce żółtej występuje największe skupisko fotoreceptorów siatkówki, w których zachodzą ciągle reakcje utleniania i redukcji, a zwiększone ciśnienie krwi w tej części siatkówki dodatkowo potęguje fakt, że plamka żółta jest narażona na największe ciśnienie parcjale tlenu cząsteczkowego bardziej niż jakakolwiek inna tkanka w organizmie człowieka.

Położenie RPE między siatkówką a naczyniówką sprzyja ekspozycji komórek RPE na RFT ze względu na wysokie ciśnienie parcjale tlenu pochodzącego ze znajdujących się poniżej



Ryc. 1. Źródła stresu oksydacyjnego w siatkówce. PUFA – wielonienasycone, długocząsteczkowe kwasy tłuszczowe, RPE – nabłonek barwnikowy siatkówki, RFT – reaktywne formy tlenu, MØ – makrofagi.

Fig. 1. Oxidative stress sources in macula. PUFA – polyunsaturated fatty acids, RPE – retinal pigment epithelium, ROS – reactive oxygen species, MØ – macrophages.

choriokapilar naczyniówki. Komórki RPE wykazują aktywność fagocytarną w stosunku do zewnętrznych segmentów fotoreceptorów, która jest źródłem stresu oksydacyjnego, ponieważ zewnętrzne segmenty fotoreceptorów są bogate w wielonienasycone, długocząsteczkowe kwasy tłuszczowe (PUFA). Utlenione kwasy nie są prawidłowo trawione w lizosomach RPE i odkładają się w postaci lipofuscyny. Lipofuscyna odkłada się również w błonie Brucha w postaci druzów, stymulując reakcje immunologiczne i ściągając w miejsce reakcji zapalnej makrofagi i komórki dendrytyczne dla fagocytozy zebranych złogów. W tym czasie dochodzi również do ekspozycji komórek RPE na RFT, ponieważ fagocytozie może towarzyszyć wybuch tlenowy będący ich źródłem (ryc. 1).

Dodatkowo utlenianie kwasów tłuszczowych inicjuje wiele łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych prowadzących do powstania nadmiaru RFT. Produkty peroksydacji PUFA modyfikują właściwości fizyczne błon komórkowych fotoreceptorów. Peroksydacja zmniejsza różnicę potencjałów elektrycznych po obu stronach błon, zaburza asymetrię lipidową błon, hamuje aktywność enzymów błonowych i białek transportujących, co składa się na utratę funkcji i integralności błony komórkowej fotoreceptorów oraz śmierć komórek. Powstają duże ilości anionorodnika ponadtlenkowego, który w reakcji dysmutacji daje nadtlenek wodoru.

Komórki RPE zawierają duże ilości fotouczulaczy (chromoforów), które absorbując światło, indukują reakcje fotochemiczne, w których uczestniczą RFT. Absorpcja światła widzialnego oraz światła UV powoduje wzbudzenie fotouczulaczy, w następstwie czego dochodzi do uszkodzenia fotochemicznego siatkówki oraz komórek RPE. Do chromoforów siatkówki zalicza się rodopsynę, melaninę, lipofuscynę oraz enzym mitochondrialny – oksydazę cytochromową c.

Melanina może pełnić funkcje zarówno fotochronne, jak i fototoksyczne. Wyniki doświadczeń *in vitro* sugerują, że melanina zmniejsza akumulację lipofuscyny w komórkach RPE – prawdopodobnie poprzez oddziaływanie z metalami przejściowymi oraz zmiatanie wolnych rodników (4). Lipofuscyna (LF) jest głównym fotouczulaczem w RPE. Skład lipofuscyny RPE jest unikatowy,

heterogenny i nie jest do końca poznany. Gromadzeniu lipofuscyny w komórkach nabłonka barwnikowego sprzyja środowisko o dużej zawartości tlenu oraz ekspozycja na światło krótkofalowe. Natomiast do redukcji jej ilości przyczynia się nie tylko melanina, ale również inne antyoksydanty, w tym witamina E (4). Ilość lipofuscyny była skorelowana z ilością druzów oraz z utratą fotoreceptorów w siatkówce. U podstaw tego zjawiska mogą leżeć trzy mechanizmy. Po pierwsze – zmniejszenie przestrzeni funkcjonalnej cytoplazmy oraz zaburzenia struktury komórkowej na skutek odkładania się złogów lipofuscyny. Po drugie – lipofuscyna może indukować oksydacyjne uszkodzenia sąsiadujących tkanek, gdyż należy do fotouczulaczy i generuje RFT. Po trzecie – zdolność degradacyjna lizosomów RPE ulega inhibicji przez *N*-retinylideno-*N*-retinyletanolaminę (A2-E), co ogranicza zdolność komórek RPE do trawienia cząsteczek wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych. A2-E jest głównym hydrofobowym fluoroforem lipofuscyny, który blokując pompę protonową zależną od ATP, doprowadza do wzrostu pH w przestrzeni wewnątrz lizosomu oraz do hamowania enzymów lizosomalnych. Wysoki (krytyczny) poziom A2-E w komórce doprowadza do dezintegracji błon organelli komórkowych, a następnie ich rozerwania, co indukuje proces apoptozy (3). Lipofuscyna gromadzi się wraz z wiekiem, dlatego też jest nazywana „starczym barwnikiem” i jest uważana za marker starzenia się komórek. Jej obecność może więc być pozytywnie skorelowana z wieloma chorobami związanymi z wiekiem.

W odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny pośredniczy wiele czynników transkrypcyjnych aktywowanych przez zmiany potencjału redoks w komórce. Badania produktów genów, których transkrypcja podlega regulacji przez te czynniki, zasugerowały występowanie pierwszorzędowej i drugorzędowej odpowiedzi na stres oksydacyjny u pacjentów z AMD. W odpowiedzi pierwszorzędowej biorą udział enzymy antyoksydacyjne, które detoksyfikują wolne rodniki lub je eliminują. Jeżeli odpowiedź ta nie jest skuteczna, RFT mogą uszkadzać białka komórkowe, powodując ich błędne składanie, utratę funkcji oraz agregację. Obrona drugorzędowa chroni przed skutkami cytotoksycznymi ze strony RFT. Biorą w niej udział białka pomocnicze z rodziny białek szoku cieplnego (HSP), które pomagają w odtworzeniu prawidłowej struktury białek, oraz proteazy degradujące białka uszkodzone. Podczas działania czynników obrony pierwszo- i drugorzędowej ma miejsce również nadekspresja czynników przeżycia, dzięki którym komórka nie rozpoczyna procesu apoptozy.

Mechanizmy antyoksydacyjne w RPE

Plamka zawiera żółte pigmenty należące do rodziny karotenoidów, takie jak: luteina, zeaksantyna oraz likopen. Absorbują one najbardziej niebezpieczne dla RPE światło barwy niebieskiej i światło UV. Również skupiska melaniny w melanocytach chorioidalnych absorbują nadmiar padającego na siatkówkę światła. Melanina jest skutecznym antyoksydantem, niestety, jej poziom w komórkach RPE z upływem wieku obniża się. RPE chronią fotoreceptory również dzięki syntezie czynnika PEDF (pigment-epithelium-derived growth factor), który hamuje procesy neowaskularyzacyjne w siatkówce i naczyniówce (5). W komórkach znajduje się również szereg endogennych antyoksydantów, takich jak: witaminy, glutation, grupy sulfhydrylowe białek, kwasy tłuszczowe, koenzym Q, tioredoksyna, kwas moczowy, bilirubina, pochodne estronu i estradiolu. Jednak najważniejszy-

mi elementami obrony przed RFT są enzymy antyoksydacyjne, szczególnie katalaza, dysmutazy nadadtlenkowe, peroksydaza glutationowa, reduktaza glutationowa, które wykorzystują zdolność RFT do reakcji dysproporcjonowania (dysmutacji).

Antyoksydanty w obronie przed AMD

Wrażliwość siatkówki na tlen, promieniowanie, peroksydację lipidów i inne czynniki stresu oksydacyjnego wykazuje różnicowanie osobnicze. Niektórzy są mniej odporni na działanie stresu i kumulacja uszkodzeń oksydacyjnych może powodować u nich formowanie druzów w obszarze siatkówki, czyli wczesną postać AMD. Na zwiększenie tej odporności mogą mieć wpływ m.in. sprawne działanie systemów antyoksydacyjnych oraz dieta bogata w witaminy i mikroelementy neutralizujące wolne rodniki. Głównymi antyoksydantami w siatkówce i RPE są witamina C (kwas askorbinowy), glutation, katalaza, peroksydaza glutationowa, dysmutaza nadadtlenkowa, rozpuszczalne w wodzie oraz substancje rozpuszczalne w tłuszczach: witamina E (α -tokoferol), retinoidy – pochodne witaminy A, karotenoidy oraz melanina.

Witamina C ma największy potencjał antyoksydacyjny. Uważa się, że witamina ta jest niezbędna do ochrony przed wieloma procesami chorobowymi, również degeneracyjnymi, które są powodowane stresem oksydacyjnym. Witamina E jest głównym antyoksydantem błon komórkowych. Występuje w czterech formach: α -, β -, γ -, δ -tokoferolu; α -tokoferol jest zmiataczem wolnych rodników dominującym w siatkówce i osoczu człowieka. Witamina A (retinol) jest niezbędna dla prawidłowego widzenia i w postaci prekursora jest wymagana w siatkówce do regeneracji rodopsyny, poza tym bierze udział w naprawie komórek uszkodzonych na skutek reakcji oksydacyjnych. Ludzki barwnik plamki (MP) składa się z dwóch hydroksykarotenoidów (pochodne ksantofilowe niebędące prekursorami prowitaminy A) – luteiny i zeaksantyny z ich najwyższym stężeniem w dołku plamki. MP jest efektywnym filtrem szkodliwego światła niebieskiego, które powoduje fotooksydacyjne uszkodzenie siatkówki. Poza tym luteina i zeaksantyna są silnymi antyoksydantami dzięki zdolności do wygaszania wzbudzonego, trypletowego stanu fotouczulaczy oraz inaktywacji singletowego tlenu. Reagują również z wolnymi rodnikami oraz wstrzymują peroksydację fosfolipidów błon. Z tego powodu uważa się, że MP chroni przed AMD. Ponieważ luteina i zeaksantyna oraz ogólnie karotenoidy pochodzą całkowicie z diety, ważne jest spożywanie pokarmów bogatych w te elementy. Należy również pamiętać o roli pierwiastków śladowych, przede wszystkim cynku i seleniu, w obronie antyoksydacyjnej. W oku człowieka największe stężenie spośród mikroelementów ma cynk. Uważa się, że odgrywa on istotną rolę w obronie antyoksydacyjnej u ssaków, ponieważ jest kofaktorem CuZn-SOD oraz bierze udział w regulacji aktywności katalazy. Poza tym cynk indukuje syntezę metalotioneiny, zmiatacza rodników hydroksyloowych, oraz chroni lipidy błonowe przed utlenianiem. Korzystny wpływ cynku może być również związany z jego stymulującym wpływem na syntezę *de novo* glutationu, który z kolei chroni długołańcuchowe kwasy tłuszczowe fotoreceptorów przed peroksydacją. Natomiast selen jest ważnym pierwiastkiem ze względu na to, że wchodzi w skład centrum aktywnego peroksydazy glutationowej.

Wyniki przeprowadzonego w USA ogólnokrajowego sondażu dotyczącego zdrowia i odżywiania się (NHANES) sugerują,

że dieta bogata w witaminy C i A zmniejsza ryzyko zachorowania na AMD. Takiego rodzaju badania mają jednak ograniczoną wartość, ponieważ mogą świadczyć również o tym, że ludzie dbający o swoją dietę generalnie dbają o swoje zdrowie na różnych płaszczynach życia. Kolejne wyniki badań również sugerowały związek między przyjmowaniem doustnie witaminy C a mniejszym ryzykiem AMD. Natomiast wyniki badań związku między dietą bogatą w antyoksydanty i cynk a występowaniem wczesnych objawów AMD wykazały odwrotną proporcję między przyjmowaniem prowitaminy A (karotenoidów) oraz stosowaniem diety bogatej w witaminę E a występowaniem druzów o dużych rozmiarach. Ta sama zależność została zaobserwowana w przypadku zwiększenia suplementacji cynkiem a występowaniem nieprawidłowości w pigmentacji na obszarze siatkówki. Nie stwierdzono związku między ryzykiem występowania dużych druzów a ilością spożywanych likopenu, luteiny, zeaksantyny, witaminy C oraz cynku. Czteroletnie badania wpływu przyjmowania witaminy E na rozwój i postęp wczesnej formy AMD doprowadziły do stwierdzenia braku protekcyjnego lub szkodliwego wpływu suplementacji w dawce 500 IU na tę chorobę (6). Wyniki badań Alpha-Tocopherol Beta-Carotene (ATBC) oraz badań przeprowadzonych wśród lekarzy (7) wykazały, że długoterminowa suplementacja β -karotenem w dawkach odpowiednio 20 mg/ dzień i 50 mg/ dzień nie ma wpływu na rozwój wczesnej formy AMD. Jedne z badań klinicznych programu AREDS miały na celu obserwację, czy codzienne przyjmowanie cynku oraz antyoksydantów w dawkach β -karoten – 15 mg, witamina C – 500 mg i witamina E – 400 IU opóźnia progresję do mokrej postaci AMD. U pacjentów przyjmujących cynk oraz antyoksydanty wykazano statystycznie istotne (25%) zmniejszenie ryzyka zaawansowanej postaci AMD (w porównaniu z osobami w grupie kontrolnej). U pacjentów przyjmujących same witaminy i karoten stwierdzono statystycznie nieistotne zmniejszenie ryzyka (1). W przypadku badania stężeń witamin A, C i E, karotenoidów, cynku, selenu oraz czynnika wzrostu fibroblastów w osoczu krwi pacjentów z AMD wyniki sugerują, że u tych, którzy mieli niższy ich poziom, występuje większe ryzyko dalszego rozwoju choroby (8,9).

W organizmie człowieka występuje również kilka enzymów o właściwościach antyoksydacyjnych utrzymujących odpowiednią proporcję między procesami utleniania a procesami redukcji. Zalicza się do nich dysmutazę nadadtlenkową, katalazę oraz peroksydazę glutationową. W organizmach ssaków występują 3 rodzaje dysmutaz nadadtlenkowych. W cytoplazmie znajduje się enzym zawierający miedź i cynk (CuSOD, ZnSOD; SOD-1). W macierzy mitochondrialnej jest obecna dysmutaza nadadtlenkowa zawierająca mangan (MnSOD; SOD-2), a na zewnątrz komórek, przede wszystkim związana z wielocukrowcami powierzchni komórek, znajduje się pozakomórkowa dysmutaza nadadtlenkowa (EC-SOD). Z trzech izoform to właśnie MnSOD preferencyjnie ulega ekspresji w siatkówce oka. Zbadano związek między polimorfizmem genu *MnSOD* a mokrą postacią AMD. Wykazano, że podstawienie T(-9)C, prowadzące do zamiany waliny na alaninę, ma miejsce u osób chorych na mokrą postać AMD (10). Aminokwasy te znajdują się w sekwencji sygnałowej kierującej dysmutazę do mitochondriów. Genotyp Ala/Ala wykazuje najbardziej efektywny transport MnSOD do mitochondriów, a jego częstość występowania jest istotnie wyższa u osób

z AMD. Prawdopodobnie ta zwiększona ilość MnSOD wiąże się również z występowaniem nadmiaru nadtlenku wodoru, który reaguje z jonami żelaza, tworząc cytotoksyczne rodniki hydroksylowe. Rodniki te mogą atakować mitochondria i promować rozwój mokrej postaci AMD. Katalaza zawiera hem i katalizuje reakcję dysmutacji nadtlenku wodoru oraz wykazuje aktywność peroksydazową. Wyniki badań enzymów antyoksydacyjnych w RPE ludzi z mokrą postacią AMD sugerują, że wraz z wiekiem zwiększa się ilość Cu-ZnSOD, natomiast spada ilość katalazy. Liniowy wzrost Cu-ZnSOD, MnSOD i katalazy wraz z progresją choroby został odnotowany stosunkowo niedawno (11). Peroksydaza glutationowa (GSH-Px) jest enzymem wykorzystującym glutation (GSH) jako donor elektronu do redukcji nadtlenków organicznych, bądź nadtlenku wodoru, w wyniku czego powstaje utleniona postać glutationu (GSSG). Glutation i jego prekursorzy aminokwasowe mogą także chronić komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi poprzez ochronę powierzchni zewnątrzkomórkowych przed oksydantami.

Wiele zagadnień dotyczących zapobiegania AMD jest niewyjaśnionych. Hipoteza mówiąca, że antyoksydanty zawarte w diecie mogą chronić przed AMD, jest właściwa oczywiście wobec założenia, że to właśnie stres oksydacyjny jest najważniejszym mechanizmem w patogenezie tego schorzenia. Jeżeli zwyrodnienie plamki związane z wiekiem jest chorobą z jedną, wspólną dla wszystkich przypadków sekwencją zmian patofizjologicznych, wówczas niespójności wynikające z badań nad rolą antyoksydantów mogą sugerować ich niewielki wpływ na patogenezę choroby. Jeżeli jednak istnieje kilka ścieżek rozwoju AMD, wówczas składniki diety mogą brać udział w jednym z wielu procesów patofizjologicznych, który prowadzi do rozwoju schorzenia.

Prooksydanty i AMD

Do najważniejszych czynników ryzyka AMD należą wiek i palenie papierosów. Jak wspomniano proces starzenia się organizmów jest wynikiem kumulacji w ich komórkach uszkodzeń wywołanych przez RFT. Procesy oksydacyjne przyspieszają starzenie się organizmu oraz odgrywają istotną rolę w patogenezie wielu chorób, w tym także chorób oczu.

Fakt, że stres oksydacyjny jest jednym z najważniejszych mechanizmów prowadzących do AMD, znajduje potwierdzenie m.in. w badaniach wskazujących, że palenie tytoniu jest silnym czynnikiem ryzyka w tej chorobie. Stres oksydacyjny wywołany paleniem tytoniu jest spowodowany – z jednej strony tym, że w dymie tytoniowym występuje wiele substancji, które wnikać do organizmu, generują RFT, a – z drugiej strony tym, że palenie obniża poziom antyoksydantów we krwi. Badania wskazują, że u osób palących występuje prawie 2-krotnie większe ryzyko zachorowania na AMD – w porównaniu z osobami, które nigdy nie paliły (12). Natomiast u osób, które paliły w przeszłości, występuje 1,7-raza zwiększone ryzyko zachorowania na AMD. Palenie tytoniu powoduje nie tylko stres oksydacyjny, ale wzmaga także stany zapalne, których wyznacznikiem może być białko C-reaktywne, zwane także białkiem fazy ostrej (CRP). Najnowsze badania wskazują, że u osób z AMD białko to występuje w większym stężeniu niż u osób zdrowych (13).

Wraz z wiekiem w organizmie człowieka gromadzą się metale, takie jak: ołów, kadm czy rtęć, które mogą indukować stres oksydacyjny i rozwijać go. Wykazano, że wyższy poziom kadmu

w moczu osób palących jest związany z występowaniem AMD (14). Inny metal, a mianowicie żelazo, które łatwo ulega przemianom prowadzącym do wolnych rodników tlenowych, jest również związany z patogenezą AMD. Badania histopatologiczne oczu osób dotkniętych AMD wykazały wyższy poziom tego metalu w komórkach nabłonka barwnikowego i błony Brucha oraz w druzach, które ulegały chelatowaniu z deferoxymyminą (15).

Inicjowaniu łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych w oku sprzyja duża ilość PUFA, szczególnie kwasu dokozaheksaenowego (DHA), stanowiącego 50% wszystkich PUFA zawartych w segmentach zewnętrznych fotoreceptorów. Następstwem peroksydacji tych lipidów są utrata funkcji i integralności błony komórkowej fotoreceptorów i śmierć komórki. Doniesienia na temat roli kwasów tłuszczowych zawartych w diecie na rozwój AMD są jednak niejednoznaczne. Najnowsze analizy dostarczają dowodów na zmniejszenie ryzyka AMD u osób spożywających duże ilości ryb i kwasów tłuszczowych omega-3 (12,16). Jednakże w innych badaniach nie wykazano żadnego związku między progresją AMD a spożyciem różnych typów tłuszczów (17). Duże znaczenie ochronne dla rozwoju AMD ma prawdopodobnie odpowiednia zawartość w diecie kwasów tłuszczowych omega-3 i omega-6. Idealny stosunek zawartości kwasów tłuszczowych omega-6/omega-3 wynosi od 3,1 do 4,1.

Obecność chromoforów (fotoutleniaczy) w siatkówce oraz w nabłonku barwnikowym (RPE) indukuje reakcje fotochemiczne, w których pośredniczą RFT. Następstwem tych reakcji jest uszkodzenie komórek nabłonka barwnikowego i siatkówki. Jak już wspomniano, głównym fotouczulaczem na poziomie nabłonka barwnikowego jest lipofuscyna. Jest to produkt niekompletnej degradacji segmentów zewnętrznych fotoreceptorów pochodzących z fagocytarnej aktywności komórek RPE. Składnikami lipofuscyny są głównie lipidy (około 50%) i białka (około 44%). Cząsteczki te ulegają procesom oksydacyjnym wskutek ekspozycji na światło widzialne i światło UVA oraz wskutek dużego stężenia tlenu w tkankach ocznych (18). Składnikiem lipofuscyny o udowodnionej cytotoxycywności jest *bis*-retinoid pirymidynowy powstający z dwóch cząsteczek witaminy A oraz z etanoloaminy. Związek ten jest silnym induktorem anionorodnika ponadtlenkowego.

Generowaniu RFT w oku sprzyja fakt, że siatkówka należy do tkanek o najbardziej intensywnym metabolizmie tlenowym w organizmie człowieka. Liczne mitochondria umiejscowione w wewnętrznych segmentach fotoreceptorów są źródłem RFT powstających jako produkty uboczne w procesie oddychania komórkowego. Wyniki niektórych doświadczeń sugerują, że najwyższe stężenie tlenu występuje na poziomie naczyńki oraz w zewnętrznych częściach siatkówki. Siatkówka jest poddawana ciągłemu działaniu światła widzialnego zawierającego m.in. wysokoenergetyczne, krótkofalowe widmo niebieskie, które indukuje powstawanie RFT (anionorodnika ponadtlenkowego, nadtlenku wodoru i rodnika hydroksylowego). Wyniki badań epidemiologicznych sugerują, że długotrwała ekspozycja na światło słoneczne jest czynnikiem ryzyka rozwoju AMD (19).

Duża aktywność fagocytarna komórek nabłonka barwnikowego siatkówki (RPE) w stosunku do zewnętrznych segmentów fotoreceptorów jest również źródłem stresu oksydacyjnego – tzw. wybuchu oddechowego. Pobudzone komórki RPE wydzielają do przestrzeni zewnątrzkomórkowej duże ilości anionorodnika

ponadtlenkowego, który w reakcji dysmutacji daje nadtlenek wodoru. Zasadniczą rolę stresu oksydacyjnego w patogenezie AMD potwierdzają badania wykazujące u pacjentów obecność końcowych produktów procesów oksydacyjnych, kwasu barbiturowego czy też N-karboksymetylolizyny (CML) (3,20).

Podsumowanie

Wyniki wielu badań doświadczalnych i klinicznych, a także rozważań teoretycznych sugerują, że stres oksydacyjny i jego następstwa mogą odgrywać znaczącą rolę w patogenezie AMD, jednakże określenie AMD jako choroby wywoływanej stresem oksydacyjnym nie jest w pełni uzasadnione. Jest to raczej działanie stresu połączone z innymi czynnikami, włączając w to elementy fizjologicznego starzenia się i podatność na czynniki stresu zdeterminowaną konstytucją genetyczną. Dotychczas uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują na występowanie uszkodzeń oksydacyjnych w siatkówce i RPE, lecz ich połączenie z indukcją i/ lub progresją AMD jest wciąż przedmiotem badań. Wyniki niektórych badań wskazują, jak się zdaje, że antyoksydanty, także te, które mogą być łatwo przyjmowane z dietą, takie jak witaminy A i E, selen, mogą obniżyć ryzyko AMD i związanych z tą chorobą komplikacji. Istnieje wprawdzie znaczna liczba doniesień, w których brak wniosku o korzystnym wpływie antyoksydantów na AMD, jednak należy wziąć pod uwagę fakt, że działanie zarówno oksydantów, jak i antyoksydantów zależy także od środowiska zewnętrznego oraz osobniczej wrażliwości na nie. Innymi słowy, brak korzystnego efektu wynikającego z suplementacji antyoksydantami nie wyklucza roli udziału stresu oksydacyjnego w patogenezie AMD. Wydaje się, że niezależnie od badań o charakterze klinicznym i epidemiologicznym, należy dążyć do stworzenia modelu *in vitro*, który pozwoli na jednoznaczne określenie konsekwencji stresu oksydacyjnego i mechanizmu zmian przez niego powodowanych.

Praca wykonana w ramach projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 3C68.

Piśmiennictwo:

1. Age-Related Eye Disease Research Group: *A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS Report No. 8 Arch. Ophthalmol* 2001, 119, 1417-1436.
2. Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, Ianchulev S, Adamis AP: *Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. Surv Ophthalmol* 2003, 48, 257-293.
3. Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M: *The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol* 2000, 45, 115-134.
4. Sundelin SP, Nilsson SE: *Lipofuscin – formation in retinal pigment epithelial cells is reduced by antioxidants. Free Radic Biol Med* 2001, 31, 217-225.
5. Mori K, Duh E, Gehlbach P, Ando A, Takahashi K, Pearlman J, Mori K, Yang HS, Zack DJ, Etyreddy D, Brough DE, Wei LL, Campochiaro PA: *Pigment epithelium-derived growth factor inhibits retinal and choroidal neovascularization. J Cell Physiol* 2001, 188, 253-263.

6. Taylor HR, Tikellis G, Robman LD, McCarty CA, McNeil JJ: *Vitamin E supplementation and macular degeneration: randomised controlled trial*. *BMJ* 2002, 325, 11-14.
7. Christen WG, Manson JE, Glynn RJ, Gaziano JM, Chew EY, Buring JE, Hennekens CH: *Beta carotene supplementation and age-related maculopathy in a randomized trial of U.S. physicians*. *Arch Ophthalmol* 2007, 125, 333-339.
8. Hogg R, Chakravarthy U: *Age related macular degeneration and micronutrient antioxidants*. *Curr Eye Res* 2004, 29, 387-401.
9. Richer S, Stiles W, Statkute L: *Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration: the Veterans LAST study (Lutein Antioxidant Supplementation Trial)*. *Optometry* 2004, 75, 216-230.
10. Kimura K, Isashiki Y, Sonoda S, Kakiuchi-Matsumoto T, Ohba N: *Genetic association of manganese superoxide dismutase with exudative age-related macular degeneration*. *Am J Ophthalmol* 2000, 130, 769-773.
11. Decanini A, Nordgaard CL, Feng X, Ferringto DA, Olsen TW: *Changes in select redox proteins of the retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration*. *Am J Ophthalmol* 2007, 143, 607-615.
12. Seddon JM, George S, Rosner B: *Cigarette smoking, fish consumption, omega-3 fatty acid intake and associations with age-related macular degeneration. The US twin study of age-related macular degeneration*. *Arch Ophthalmol* 2006, 124, 995-1001.
13. Kikuchi M, Nakamura M, Ishikawa K, Suzuki T, Nishihara H, Yamakoshi T, Nishio K, Taki K, Niwa T, Hamajima N, Terasaki H: *Elevated C-reactive protein levels in patients with polypoidal choroidal vasculopathy and patients with neovascular age-related macular degeneration*. *Ophthalmology* 2007, 114, 1722-1727.
14. Erie JC, Good JA, Butz JA, Hodge DO, Pulido JS: *Urinary cadmium and age-related macular degeneration*. *Am J Ophthalmol* 2007, 144, 414-418.
15. Wong RW, Richa DC, Hahn P, Green WR, Dunaief JL: *Iron toxicity as a potential factor in AMD*. *Retina* 2007, 27, 997-1003.
16. SanGiovanni JP, Chew EY, Clemons TE, Davis MD, Ferris FL 3rd, Gensler GR, Kurinij N, Lindblad AS, Milton RC, Seddon JM, Sperduto RD: *The relationship of dietary lipid intake and age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS Report No. 20*. *Arch Ophthalmol* 2007, 125, 671-679.
17. Robman L, Vu H, Hodge A, Tikellis G, Dimitrov P, McCarty C, Guymer R: *Dietary lutein, zeaxanthin, and fats and the progression of age-related macular degeneration*. *Can J Ophthalmol* 2007, 42, 720-726.
18. Sparrow JR, Boulton M: *RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology*. *Exp Eye Res* 2005, 80, 595-606.
19. Plestina-Borjan I, Klinger-Lasic M: *Long-term exposure to solar ultraviolet radiation as a risk factor for age-related macular degeneration*. *Coll Antropol* 2007, 31, 33-38.
20. Yamada Y, Ishibashi K, Bhutto IA, Tian J, Luttly GA, Handa JT: *The expression of advanced glycation endproduct receptors in RPE cells associated with basal deposits in human maculas*. *Exp Eye Res* 2006, 82, 840-848.

Praca wpłynęła do Redakcji 16.05.2008 r. (1047)
Zakwalifikowano do druku 20.04.2009 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):

prof. dr hab. Janusz Błasiak
Uniwersytet Łódzki
Katedra Genetyki Molekularnej
ul. Banacha 12/16
90-237 Łódź
januszb@biol.uni.lodz.pl