

Streszczenie

Zależna od wieku degeneracja żółtej plamki (z ang. age related macular degeneration-AMD) jest główną przyczyną utraty wzroku u ludzi powyżej 60 lat w wielu rozwiniętych krajach Europy i Ameryki. Utrata wzroku w AMD jest wynikiem degeneracji komórek fotoreceptorowych w części środkowej siatkówki, jednakże początek choroby ma miejsce w nabłonku upigmentowanym siatkówki (RPE). Pomimo, że etiologia tego schorzenia jest wieloskładnikowa, w której istotną rolę odgrywają czynniki genetyczne jak i środowiskowe, coraz większe znaczenie w rozwoju tej choroby przypisuje się stresowi oksydacyjnemu w siatkówce. Efektywną ochronę komórek przed stresem oksydacyjnym zapewnia złożony układ niskocząsteczkowych i enzymatycznych przeciwutleniaczy oraz obecność melaniny.

Naczelnym celem pracy było zbadanie modulującego wpływu melanosomów na ekspresję wybranych enzymów przeciwutleniających, w szczególności oksygenazy hemowej-1 (HO-1), w układzie *in vitro* w komórkach nabłonka upigmentowanego siatkówki, w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego poprzez nadtlenek wodoru, intensywne światło niebieskie oraz reakcje fotouczulanego utleniania.

Komórki nabłonka ARPE-19 eksperymentalnie upigmentowano poprzez wprowadzenie na drodze fagocytozy oczyszczonych melanosomów izolowanych z wolich RPE i kontrolnych czarnych kuleczek lateksowych. Komórki zawierające ziarnistości poddawano działaniu przyżyciowego stresu oksydacyjnego indukowanego nadtlenkiem wodoru lub światłem. Nadtlenek wodoru wprowadzany był do hodowli komórkowej w postaci pojedynczej dawki lub generowany ciągle przy użyciu układu glukoza/oksydaza glukozy (GOx). Natomiast stres świetlny indukowano naświetlaniem intensywnym promieniowaniem niebieskim lub działaniem fotodynamicznym przy użyciu różu Bengalskiego (rB) jako fotosensybilizatora. Przeżywalność komórek oceniano poprzez test MTT i wysoce czułą metodę oznaczania fluorescencji jodku propidyny w czasie rzeczywistym. Poziom białek HO-1, HO-2, peroksydazy glutationowej (GPx), katalazy oraz ferrytyny był analizowany przy użyciu metody Western blot. Związane z wiekiem fizykochemiczne zmiany melanosomów RPE od dawców były oznaczane poprzez analizę specyficznych produktów degradacji melaniny oraz pomiar sygnałów elektronegatywnego rezonansu paramagnetycznego (EPR) w paśmie W.

Fagocytozie melanosomów oraz czarnych kuleczek lateksowych towarzyszył przejściowy wzrost ekspresji białek HO-1 i GPx, zależny od rodzaju pochłoniętych ziarnistości. Pojedyncze dawki nadtlenu wodoru również indukowały wzrost ekspresji białka HO-1 w komórkach zawierających ziarnistości. Sfagocytowane melanosomy chroniły komórki ARPE-19 przed stresem oksydacyjnym indukowanym pojedynczymi dawkami nadtlenu wodoru. Komórki ze sfagocytowanymi melanosomami, wykazujące wyższą przeżywalność po dodaniu nadtlenu wodoru aniżeli komórki ze sfagocytowanymi kuleczkami lateksowymi, utrzymywały zwiększoną ekspresję HO-1. W warunkach ciągłego generowania nadtlenu wodoru poprzez GOx obserwowano obniżenie ekspresji białek HO-1 i GPx, przy czym spadek poziomu białek był bardziej widoczny w grupie zawierającej sfagocytowane melanosomy. Ekspozycja komórek ARPE-19 na przyżyciowe dawki światła niebieskiego indukowała wzrost poziomu białek HO-1 i GPx, który był hamowany w komórkach

zawierających sfagocytowane ziarnistości a efekt zahamowania indukcji był największy dla komórek zawierających sfagocytowane melanosomy. Działanie fotodynamiczne przy udziale rózu Bengalskiego indukowało wzrost białka HO-1 niezależnie od sfagocytowanych ziarnistości. Niskocząsteczkowe kompleksy żelaza wywoływały wzrost ekspresji białek HO-1 i ferrytyny. Melanosomy wzbogacone w żelazo a następnie wprowadzone na drodze fagocytozy do komórek ARPE-19 indukowały wzrost ekspresji HO-1 i ferrytyny. Fizykochemiczna analiza melanosomów w próbkach RPE od dawców w różnym wieku sugeruje, że obserwowane zmiany są następstwem zależnego od wieku degradacyjnego utleniania melaniny. Charakterystyczne zmiany w paramagnetycznych właściwościach melaniny RPE obserwowane w próbkach pochodzących od stosunkowo młodych dawców, przy zastosowaniu spektroskopii EPR w paśmie W, stwarzają nadzieję na zastosowanie tej metody jako dogodnego narzędzia do analizy zmian zachodzących z wiekiem.

Uzyskane wyniki pokazują, że wpływ melanosomów na ekspresję białek jest zróżnicowany; melanosomy mogą zarówno nasilać jak i osłabiać ekspresję białka HO-1 w zależności od rodzaju stresu, któremu poddane są komórki zawierające melanosomy. Melanosomy mogą być zaangażowane w homeostazie jonów metali przejściowych, szczególnie żelaza, w komórkach RPE, przy czym ich działanie może być bezpośrednie poprzez ich jonowymienne właściwości jak i pośrednie poprzez modulację ekspresji białek HO-1 i ferrytyny. Oczekuje się, że wpływ ten będzie zależał od wieku ponieważ melanina w RPE dawców w starszym wieku wykazuje znaczące modyfikacje oksydacyjne, które mogą zmniejszać jej zdolność jonowymienną.

Zaobserwowane zmiany w ekspresji białek antyoksydacyjnych, w szczególności HO-1, w komórkach ARPE-19 zawierających sfagocytowane melanosomy, poddane działaniu nadtlenu wodoru, intensywnemu światłu niebieskiemu oraz fotodynamicznemu traktowaniu, sugerują istotną rolę tego enzymu oraz melaniny w ochronie siatkówki przed stresem oksydacyjnym.

Anna Piwet