

Streszczenie

Stres oksydacyjny, w tym również stres świetlny, może przyczyniać się do patogenezы starczego zwyrodnienia żółtej plamki (ARMD), które jest główną przyczyną utraty wzroku u ludzi w wieku powyżej 60-ciu lat w rozwiniętych krajach Zachodu. Postuluje się, iż potencjalnym miejscem gromadzenia się pierwotnych uszkodzeń siatkówki prowadzących do rozwoju choroby jest nabłonek upigmentowany (RPE) – tkanka, która zapewnia wsparcie metaboliczne dla całej siatkówki oraz zaangażowana jest w biologicznej odnowie błon zewnętrznych segmentów fotoreceptorów (POS). Wykazano, iż sprawna fagocytoza dysków POS przez komórki RPE jest niezbędna dla właściwego funkcjonowania całej siatkówki. Błony dysków bowiem zawierają duże stężenie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz potencjalny fotosensybilizator (całkowicie trans retinal – produkt rozpadu białka fotoreceptorowego – rodopsyny) przez co mogą generować tzw. reaktywne formy tlenu (ROS) zdolne do uszkodzania ważnych składników komórki. Pomimo wieloletnich badań wiedza o etiologii i patogenezie ARMD jest wysoce niekompletna.

Naczelnym celem pracy było zbadanie wpływu stresu oksydacyjnego na aktywność fagocytarną komórek RPE oraz analiza modulującego działania zeaksantyny i witaminy E w ewentualnej ochronie komórek RPE przed stresem oksydacyjnym.

W badaniach opisanych w niniejszej pracy komórki ARPE-19 eksponowano na przyżyciowe dawki stresu oksydacyjnego generowanego reakcjami fotosensybilizowanymi przy pomocy merocyjaniny-540 (MC-540) lub różu Bengalskiego (RB). Przyżyciowy charakter indukowanego w komórkach stresu oksydacyjnego potwierdzano przy pomocy testu MTT oraz barwieniem błękitem trypanu i jodkiem propidyny. Do analizy rozmieszczenia N-kadheryny, ZO-1 oraz F-aktyny wykorzystano mikroskopię fluorescencyjną. Pomiarы specyficznej aktywności fagocytarnej wyznakowanych fluorescencyjnie POS wyizolowanych z oczu wołich oraz niespecyficznej fagocytozy kuleczek polistyrenowych wykonano przy pomocy cytometrii przepływowej. Mikroskopię konfokalną zastosowano do określenia wewnątrzkomórkowej lokalizacji użytych barwników fotosensybilizujących. Detekcję i identyfikację ROS, generowanych podczas stresu fotodynamicznego w komórkach, przeprowadzono poprzez pomiar specyficznych wodoronadtlenków cholesterolu przy pomocy HPLC-EC (Hg), wykorzystując cholesterol jako endogenną mechanistyczną sondę komórkową. Poziom białek podjednostki α v oraz podjednostki β 5 receptora integrynowego, receptora MerTK a także aktyny, katalazy i dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego (GAPDH) był analizowany przy użyciu metody

Western blot. Natomiast poziom całego heterodimeru $\alpha v\beta 5$ receptora integrynowego analizowano stosując metodę Western blot poprzedzoną immunoprecypitacją w obecności specyficznych przeciwciał anti- $\alpha v\beta 5$.

Wykazano, iż jedna z podstawowych biologicznych funkcji komórek RPE - specyficzna fagocytoza, może być hamowana w wyniku przyżyciowych dawek stresu oksydacyjnego generowanego przy pomocy obu fotosensybilizatorów. Natomiast niespecyficzna fagocytoza była hamowana jedynie przez stres fotodynamiczny indukowany MC-540. W obu przypadkach obserwowane zahamowanie fagocytozy było zjawiskiem odwracalnym i po 24 godzinach fotodynamicznie traktowane komórki wykazywały aktywność fagocytarną na poziomie zbliżonym do komórek nietraktowanych. Stwierdzono, iż stopień zahamowania specyficznej aktywności fagocytarnej korelował ze stopniem fotosensybilizowanego utleniania lipidów, a zwłaszcza z ilością specficznego produktu reakcji cholesterolu z tlenem singletowym- 5α -OOH. Przyżyciowy stres oksydacyjny generowany przy pomocy obu fotosensybilizatorów indukował przejściowe, odwracalne obniżenie ekspresji białka receptora MerTK. W przypadku podjednostek αv oraz $\beta 5$ receptora integrynowego również obserwowano spadek poziomu białka, jednak ta zmiana była tylko częściowo odwracalna. Wyniki pokazują, że funkcjonalny heterodimer $\alpha v\beta 5$ był w pełni odbudowywany. Działanie fotodynamiczne przy udziale MC-540 indukowało spadek ekspresji białka aktyny, zaangażowanej w procesy zarówno specyficznej jak i niespecyficznej fagocytozy. Wzbogacanie w zeaksantynę i witaminę E wpływało ochronnie na przeżywalność komórek tylko w przypadku najwyższych zastosowanych stężeń obu fotosensybilizatorów. Poprzedzająca indukcję stresu oksydacyjnego ekspozycja komórek na przeciwutleniacze zmniejszała zahamowanie aktywności fagocytarnej komórek ARPE-19. Obserwowano też znaczny spadek akumulacji wodoronadtlenków cholesterolu 5α -OOH i $7\alpha/\beta$ -OOH po zastosowaniu obu przeciwutleniaczy. Ponadto wykazano, iż wzbogacanie w zeaksantynę i witaminę E wpływa ochronnie na białko receptora MerTK oraz białka obu podjednostek receptora integrynowego αv oraz $\beta 5$.

Uzyskane wyniki wspierają hipotezę, iż chroniczny stres świetlny w komórkach RPE *in situ* może redukować wydajność fagocytozy a w konsekwencji powodować degenerację i utratę fotoreceptorów. Wydaje się, iż naturalne przeciwutleniacze zeaksantyna i witamina E mogą efektywnie chronić ludzką siatkówkę przed chronicznym stresem oksydacyjnym zabezpieczając błony komórkowe i elementy układu fagocytarnego przed krytycznymi modyfikacjami oksydacyjnymi.

Magdalena Olchawa