

(60)

Stres oksydacyjny jako czynnik patogenezy stożka rogówki

Oxidative stress in the pathogenesis of keratoconus

Katarzyna A. Wójcik¹, Janusz Błasiak¹, Anna K. Kurowska², Jerzy Szaflik^{2,3}, Jacek P. Szaflik^{2,3}

¹ Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego
Kierownik: dr hab. Katarzyna Woźniak, prof. nadzw. UŁ

² Samodzielny Publiczny Kliniczny Szpital Okulistyczny w Warszawie
Kierownik: prof. dr. hab. n. med. Jerzy Szaflik

³ Katedra i Klinika Okulistyki II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr. hab. n. med. Jerzy Szaflik

Streszczenie:

Stożek rogówki jest niezapalną chorobą rogówki, która powstaje na skutek postępującego ścieńczenia istoty właściwej. Patogeneza stożka rogówki pozostaje niejasna, lecz wyniki wielu badań wskazują, że jest to choroba wieloczynnikowa. Przypuszcza się, że zarówno uwarunkowania genetyczne, jak i z czynniki środowiskowe mają wpływ na rozwój stożka rogówki. Zwiększenie ilości toksycznych produktów peroksydacji lipidów i stężenia szkodliwych tlenków azotu, a także zmniejszenie ilości niektórych enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów w rogówce z klinicznie rozpoznany stożkiem rogówki wskazują na istotną rolę stresu oksydacyjnego w patogenezie tej choroby. Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu (ROS i RNS) ze składnikami komórkowymi, w tym kwasami nukleinowymi, lipidami błonowymi i białkami, może aktywować kaskadę reakcji prowadzącą do powstania stożka rogówki. W rogówkach, w których klinicznie rozpoznano stożek rogówki, wykryto zwiększony poziom uszkodzeń mitochondrialnego DNA (mtDNA). Nadmiar reaktywnych form tlenu i azotu może wywoływać uszkodzenia mtDNA, w efekcie tego dochodzi do zakłócenia procesów fosforylacji oksydacyjnej i dalszego powstawania reaktywnych form tlenu. Wolne rodniki mogą brać także udział w aktywacji proteinaz i uwalnianiu enzymów lizosomalnych, prowadząc do ścieńczenia rogówki.

Słowa kluczowe:

stożek rogówki, stres oksydacyjny, antyoksydanty, wolne rodniki.

Summary:

Keratoconus is a non-inflammatory corneal disease, which involves changes of the corneal shape, due to thinning of the corneal stroma. The pathogenesis of this disease has remained unclear, but results of many studies indicate that keratoconus is a multifactorial disease. It is hypothesized, that this disorder is associated with both genetic and environmental factors. An increase in toxic products of lipid peroxidation and nitric oxide pathways, as well as decreased levels of some enzymatic and non-enzymatic antioxidants seen in keratoconus, suggest an important role of oxidative stress in the pathogenesis of this disease. It seems that the interactions of reactive oxygen and nitric species with cellular components including nucleic acids, membrane lipids and proteins, may activate a series of events leading to keratoconus. The excess amount of reactive oxygen and nitric species may induce mitochondrial DNA (mtDNA) damage, the extent of which increases in corneas with keratoconus. This damage may disturb the mitochondrial process of oxidative phosphorylation, resulting in further increase in formation of reactive oxygen and nitric species. Furthermore, some elements of oxidative stress can be involved in the activation of certain proteinases and release of lysosomal enzymes, which may be important for corneal thinning in keratoconus.

Key words:

keratoconus, oxidative stress, antioxidants, free radicals.

Wstęp

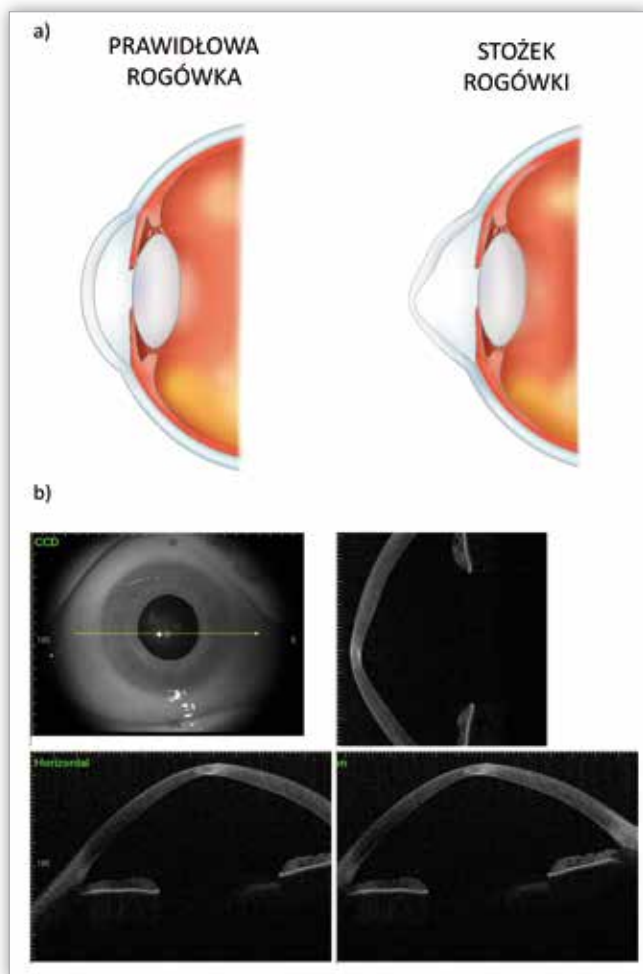
Stożek rogówki (keratoconus, KC) jest najczęstszą postacią ektazji rogówki, która występuje we wszystkich grupach etnicznych. Nazwa choroby pochodzi od charakterystycznego kształtu, jaki przyjmuje rogówka wtórnie do postępującego ścieńczenia istoty właściwej (ryc. 1.). Konsekwencją zmiany kształtu są postępujący nieregularny astygmatyzm i krótkowzroczność, prowadzące do spadku ostrości wzroku (1, 2).

Histologicznie, poza ścieńczeniem istoty właściwej, obserwuje się pęknięcia w warstwie Bowmana oraz akumulację związków żelaza w warstwie podstawnej nabłonka (pierścień Fleischera). Pęknięcia błony Descemeta skutkują nagłym wnikaniem cieczy wodnistej w miąższ rogówki i narastającym

obrzękiem (ostry stożek, *hydrops*), który wycofuje się po kilku tygodniach z pozostawieniem trwałej blizny.

W większości przypadków choroba dotyka oboje oczu, choć jej przebieg może być asymetryczny (1). Zwykle zmiany w drugim oku ujawniają się w odstępie kilku lat. Stożek rogówki pojawia się zwykle w wieku młodzieńczym, w czasie dojrzewania, i postępuje do 30.–40. roku życia. Rzadko choroba ujawnia się w starszym wieku.

Patogeneza stożka rogówki nie jest dokładnie znana. Przypuszcza się, że jest wynikiem kaskady zdarzeń, u podłoża których leżą zmiany genetyczne oraz czynniki środowiskowe. Rogówka znajduje się w przedniej części gałki ocznej, przez to jest narażona na działanie środowiska zewnętrznego. Szczegól-



Ryc. 1. Schemat prawidłowej rogówki oraz stożka rogówki (a). Zdjęcie z „swept-source” optycznej tomografii komputerowej rogówki chorego na KC (b).

Fig. 1. Diagram showing normal and KC (a). Swept-source optical coherence tomography image of KC (b).

nie podlega działaniu promieniowania UV, które odpowiedzialne jest za powstawanie wolnych rodników (3). Rogówka absorbuje większość tego promieniowania, ponadto ulega wysokiej ekspozycji na działanie tlenu atmosferycznego (3, 4). Poziom wolnych rodników może zwiększać się również na skutek pocierania oczu, alergii lub urazów mechanicznych. Tkanki oka ulegają powolnej regeneracji, dlatego istnieje wysokie ryzyko akumulacji wolnych rodników, w konsekwencji może to prowadzić do uszkodzenia rogówki (5).

Zmiany poziomu związków antyoksydacyjnych

Wskutek ekspozycji na promieniowania UV i jonizujące w organizmie wzrasta poziom wolnych rodników, których toksyczność związana jest z obecnością niesparowanych elektronów. Wykazują one wysoką aktywnością chemiczną i zdolność uszkodzenia składników komórkowych. Jednakże należy pamiętać, że w wyniku prawidłowego przebiegu procesów fizjologicznych oraz podczas reakcji obronnych układu immunologicznego dochodzi również do powstawania wolnych rodników. Odgrywają one istotną rolę w niektórych procesach komórkowych. Ze względu na powszechność tych związków wytworzone zostały liczne mechanizmy obronne, które pozwalają na ich eliminowanie.

W organizmie istnieją enzymy regulujące poziom wolnych rodników w celu utrzymania homeostazy procesów komórkowych (6). W grupie tej szczególną rolę odgrywa dysmutaza ponadtlenkowa (SOD). Enzym ten bierze udział w przekształcaniu anionorodnika ponadtlenkowego do tlenu cząsteczkowego oraz nadtlenu wodoru, który przekształcany jest w dalszych reakcjach. W organizmie człowieka zidentyfikowano trzy formy SOD: cynkowo-miedziową (CuZnSOD), manganową (MnSOD) i dysmutazę pozakomórkową (EC-SOD). W rogówce stwierdzono obecność wszystkich trzech izoenzymów SOD (3, 5, 7).

Przeprowadzone dotychczas badania wskazują, że poziom SOD, jak i innych enzymów antyoksydacyjnych, może ulec zmianie w wyniku różnych patologii. W świetle dotychczasowej wiedzy wydaje się, że zaburzenia w poziomie związków antyoksydacyjnych występują również w rogówce z klinicznie rozpoznanym stożkiem (5, 8, 9–11).

Ze względu na duże znaczenie SOD w eliminacji rodników ze środowiska komórki zbadano zależność między genem *CuZnSOD* a KC. W tym celu poddano analizie sekwencję genu *CuZnSOD* członków siedmiu rodzin, u których stożek rogówki występował w co najmniej dwóch pokoleniach. Gen ten zbudowany jest z 5 eksonów rozdzielanych przez 4 introny. W dwóch rodzinach wykryto delecję 7 nukleotydów w intronie 2. genu *CuZnSOD*. Dodatkowo u jednej rodziny zaobserwowano alternatywne składowanie mRNA SOD z wyłączeniem eksonu 2. oraz z wyłączeniem eksonów 2. i 3. Tak istotne zmiany w transkrypcji mogą znacząco wpływać na budowę enzymu i jego centrum aktywne, a tym samym prowadzić do zmian w aktywności CuZnSOD (8). Rezultat tych badań pozwolił wysunąć hipotezę, że zmiany w aktywności CuZnSOD leżą u podstaw zaburzeń w poziomie wolnych rodników w przebiegu KC. Jednakże późniejsze badania przeprowadzone u chorych, u których KC był spontaniczny, nie potwierdziły tych wyników. Występowanie delecji w genie *CuZnSOD* zaobserwowano jedynie w 0,9% przypadków (12). Jest to wartość zdecydowanie za niska, aby można było uznać CuZnSOD za czynnik patogenezy KC. Również w badaniach przeprowadzonych przez inny zespół na członkach rodzin o dużej częstotliwości zachorowań na KC nie zaobserwowano delecji w obrębie genu *CuZnSOD* (2). W świetle uzyskanych badań wydaje się, że nie ma korelacji między KC a zaburzeniami CuZnSOD.

Zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa, w przeciwieństwie do CuZnSOD, może odgrywać ważną rolę w patogenezie KC. Przeprowadzone badania wskazały na znaczny spadek aktywności EC-SOD w tkankach rogówki osób ze zdiagnozowanym KC w stosunku do grupy kontrolnej (5). Jednakże spadek ten nie znalazł odzwierciedlenia w poziomie mRNA EC-SOD. To wskazuje, że zmiany w aktywności dysmutazy zewnątrzkomórkowej są efektem jej potranslacyjnych modyfikacji lub mutacji jej genu (13). Obecnie stan wiedzy na temat procesów regulacji EC-SOD w rogówce jest niewystarczający, aby można było określić przyczyny tych nieprawidłowości. Możliwe jest, że regulacja ta odbywa się poprzez cytokiny prozapalne i czynniki wzrostu. Badania na kulturach keratocytów bytujących u osób ze zdiagnozowanym KC wskazały na znaczny spadek syntezy EC-SOD pod wpływem IL-1 α . W komórkach rogówki osób, u których nie występowały objawy KC, obserwowano przeciwny efekt IL-1 (9). Można przypuszczać, że pod wpływem uszkodzeń rogówki z klinicznie rozpoznanym KC wzrasta poziom cyto-

kin, może to być powodem zmniejszenia aktywności EC-SOD. Jednakże dotychczasowe doniesienia nie są wystarczające, aby można było jednoznacznie potwierdzić tę hipotezę. Wymaga to dalszych badań. Wydaje się jednak, że zmiany w poziomie EC-SOD powodują utratę ochrony antyoksydacyjnej składników macierzy zewnątrzkomórkowej. W wyniku spadku potencjału antyoksydacyjnego kolagen i inne składniki rogówki stają się bardziej podatne na działanie wolnych rodników, może to stanowić przyczynę odkształceń rogówki w przebiegu KC (7).

Innym enzymem, który chroni rogówkę przed gromadzeniem się dużej ilości szkodliwych produktów wolnych rodników, jest dehydrogenaza aldehydowa (ALDH3). Jest ona jednym z głównych enzymów rogówki, który bezpośrednio absorbuje promieniowanie UV i usuwa cytotoksyczne aldehydy. Klasa dehydrogenazy aldehydu 3 (ALDH3A1) odgrywa istotną rolę w ochronie komórki przed stresem środowiskowym, głównie promieniowaniem UV. Do tej pory udało się ustalić, że ALDH3 występuje w komórkach nabłonka i istoty właściwej rogówki, lecz nie zidentyfikowano go w komórkach śródbłonka (14). Wyniki niektórych badań sugerują, że poziom ALDH3 jest zaburzony w rogówce z klinicznie rozpoznany stożkiem. Uważa się, że spadek ALDH3 może być przyczyną powstawania zaburzeń w procesie ochrony przed uszkodzeniami oksydacyjnymi, w efekcie których dochodzi do znacznego nagromadzenia związków powstających w wyniku działania reaktywnych form tlenu i azotu (4, 10, 15, 16).

W komórkach rogówki, w których klinicznie rozpoznano KC, zauważono również zmiany aktywności katalazy. Katalaza jest głównym enzymem katalizującym rozpad nadtlenu wodoru do tlenu i wody. W rogówce, w której klinicznie rozpoznano KC, zaobserwowano przyrost mRNA tego enzymu, towarzyszył mu wzrost aktywności katalazy w stosunku do poziomu w rogówkach bez cech KC (13). Wyniki wielu badań wskazują, że H_2O_2 jest bodźcem stymulującym wzrost produkcji katalazy w różnych typach komórek. Istnieją liczne doniesienia o akumulacji reaktywnych form tlenu w rogówce, w której klinicznie rozpoznano KC, dlatego sądzi się, że wzrost aktywności tego enzymu związany jest ze stresem oksydacyjnym występującym w KC (13).

Funkcje antyoksydacyjne wykazują również niektóre związki nieenzymatyczne, czego najlepszym przykładem jest glutation. Ten tripeptyd odgrywa ważną rolę w procesach detoksykacji. Reakcje z udziałem glutationu mogą odbywać się na drodze nieenzymatycznej lub katalizowanej przez peroksydazę glutationową lub S-transferazę glutationową. Glutation uczestniczy m.in. w redukcji nadtlenu, w tym nadtlenu wodoru. W keratocytach rogówek, w których klinicznie rozpoznano stożek, wykryto spadek stężenia glutationu w stosunku do poziomu jego stężenia w rogówce bez tego schorzenia (10). Co więcej, zaobserwowano znaczący ubytek tego peptydu również we łzach osób, u których klinicznie rozpoznano KC, w porównaniu do jego wartości stwierdzanych u osób z grupy kontrolnej. Łzy stanowią ważną barierę w systemie ochrony oka, dlatego też przypuszczać można, że zaburzenia w ich składzie mogą wpływać na obniżenie potencjału ochronnego rogówki (6). Zmniejszony poziom glutationu może wynikać z wykorzystania tego związku w reakcjach z nadmiarem wolnych rodników (10).

Wyniki licznych badań sugerują, że w rogówkach pacjentów, u których zdiagnozowano stożek, dochodzi do znacznego

obniżenia potencjału oksydacyjnego (10). Jednakże obecny stan wiedzy nie pozwala jednoznacznie określić, jak zmiany w poziomie związków antyoksydacyjnych wpływają na patogenezę KC.

Akumulacja reaktywnych form tlenu i azotu w przebiegu stożka rogówki

Równowaga w procesach oksydacyjno-redukcyjnych jest niezbędna do zachowania homeostazy procesów zachodzących w organizmie. Wystąpienie zjawiska stresu oksydacyjnego prowadzi do akumulacji reaktywnych form tlenu i azotu (ROS/RNS). Chociaż ROS i RNS odgrywają istotną rolę jako cząsteczki sygnałowe w wielu procesach komórkowych, ich wysokie stężenie może prowadzić do stanów patologicznych w organizmie.

Liczne dotychczas przeprowadzone badania wskazują na znaczny wzrost poziomów ROS i RNS w rogówce, w której klinicznie rozpoznano KC, w porównaniu do ich poziomów u osób bez tego schorzenia. Jak już wcześniej wspomniano, tkanki rogówki ze względu na dużą ekspozycję na działanie promieni UV są szczególnie narażone na powstawanie ROS i RNS. Dodatkowo zaburzenia w funkcjonowaniu niektórych enzymów antyoksydacyjnych mogą determinować nieprawidłowe poziomy ROS i RNS.

Badania *in vitro* na fibroblastach ludzkiej rogówki wskazują na znaczny wzrost nadtlenu wodoru w komórkach pochodzących z rogówek z klinicznie rozpoznany KC. Nadtlenek wodoru, mimo że nie jest bardzo reaktywny, dzięki swojej stosunkowo wysokiej stabilności, może dyfundować przez błony komórkowe do odległych obszarów od miejsca swego powstania. W wyniku rozpadu H_2O_2 w obecności jonów metali grup przejściowych, m.in. jonów żelaza, dochodzi do powstania rodnika hydroksylowego, jednego z najbardziej reaktywnych utleniaczy (11).

W komórkach rogówki z klinicznie rozpoznany KC zaobserwowano podwyższony poziom produktów peroksydacji lipidów w porównaniu do ich poziomu u osób z grupy kontrolnej. W następstwie utleniania lipidów (znajdujących się m.in. w błonach komórkowych) przez reaktywne formy tlenu dochodzi do powstania aldehydów, takich jak dialdehyd malonowy (MDA) czy 4-hydroksy-2, trans-3-nonenal (HNE). Są to związki, które oprócz reaktywności charakteryzują się dużą stabilnością, dzięki temu, podobnie jak H_2O_2 , mogą dyfundować wewnątrz komórki. Ze względu na dużą reaktywność są one niebezpieczne, gdyż mogą tworzyć wiązania kowalencyjne z innymi składnikami komórki, w tym z DNA oraz białkami. Powstanie adduktów aldehydów z innymi związkami może zakłócać transdukcję sygnałów, ekspresję genów i proliferację komórek. Ich reaktywny charakter może powodować zmiany w błonach lizosomów i uwolnienie enzymów proteolitycznych (4, 10).

W tkankach rogówki z klinicznie rozpoznany KC stwierdzono również podwyższony poziom związków azotowych. Tlenek azotu pełni ważną rolę jako przekaźnik sygnałów w wielu procesach komórkowych całej gałki ocznej, jednak wykazuje również właściwości cytotoksyczne. W wyniku reakcji tlenu azotu z anionorodnikiem nadtlenu dochodzi do utworzenia silniejszego utleniacza – nadtlenuazotynu (10, 17). Tlenek azotu powstaje w efekcie oksydacyjnej deaminacji L-argininy, w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenu azotu (NOS). Mimo że w organizmie występuje kilka typów NOS, w tkankach prawidłowej rogówki wykryto jedynie obecność śródbłonkowej NOS (eNOS) w nabłonku

ku i śródbłonku rogówki. W rogówce z klinicznie rozpoznany KC zaobserwowano dodatkowo eNOS w istocie właściwej w pobliżu fragmentacji warstwy Bowmana. W rogówce chorych na stożek wykryto również obecność indukowanej NOS (iNOS) we wszystkich warstwach tkanki. Przyrost ilości NOS sugeruje zwiększenie produkcji tlenu azotu, w rezultacie zwiększenia jego produkcji dochodzi do wzrostu stresu oksydacyjnego (3, 4).

Stwierdzono, że ROS i RNS uczestniczą w zaburzaniu przebiegu wielu procesów komórkowych. Uszkodzenia oksydacyjne mogą wpływać na proliferację komórek oraz stać się czynnikiem aktywującym kaskadę reakcji prowadzących do apoptozy. Jednakże do tej pory nie udało się określić, jaka jest rola wolnych rodników w patogenezie KC. Uważa się, że akumulacja tych związków odgrywa ważną rolę w dysfunkcji komórek oraz w ścięczeniu rogówki. Nie wiadomo jednak, czy akumulacja ROS i RNS następuje w wyniku choroby, czy też może na skutek nagromadzenia wolnych rodników dochodzi do wielu reakcji prowadzących do rozwoju KC. Wydaje się, że zmiany w poziomie niektórych enzymów antyoksydacyjnych sprzyjają akumulacji wolnych rodników i powstających aldehydów.

Uszkodzenia mitochondrialnego DNA w KC

Mitochondria są organellami komórkowymi organizmów eukariotycznych, w których przebiegają procesy tlenowe. To właśnie w nich odbywa się akumulacja energii w postaci ATP podczas fosforylacji oksydacyjnej. Zgromadzona energia pozwala komórkom na wzrost i proliferację oraz umożliwia odpowiedź na bodźce fizjologiczne i środowiskowe. Jednakże podczas fosforylacji oksydacyjnej dochodzi do utworzenia znacznej ilości wolnych rodników jako produktów ubocznych. Ze względu na ciągłość procesów metabolizmu tlenowego, w których wytwarzane są znaczne ilości ROS, w mitochondriach znajdują się mechanizmy eliminujące szkodliwe produkty uboczne. Niemniej zaburzenia w procesach oksydacyjnych na skutek reakcji fizjologicznych oraz w odpowiedzi na bodźce środowiskowe mogą prowadzić do patologii, w wyniku których dochodzi do akumulacji wolnych rodników i tlenków (18).

Unikalny charakter mitochondriów polega również na tym, że mają one własny genom. U ludzi mitochondrialny DNA (mtDNA) występuje w postaci zamkniętej cząsteczki. W genomie mitochondrialnym człowieka kodowane są niektóre geny białek łańcucha oddechowego i systemu fosforylacji oksydacyjnej, poza tym 22 rodzaje tRNA i 2 rRNA. Organizacja mtDNA znacznie różni się od jądrowego DNA (nDNA). W genomie mitochondrialnym znajduje się bardzo niewiele sekwencji niekodujących, a w genach brak jest intronów. Dlatego też mutacje mtDNA są najczęściej związane ze zmianami w genach. Dodatkowo częstość występowania zróżnicowania sekwencji w mtDNA jest znacznie wyższa niż w nDNA. Przypuszcza się, że tak znaczna różnica jest prawdopodobnie efektem mniejszej dokładności polimerazy γ . Dodatkowo mitochondrialny DNA – w przeciwieństwie do nDNA – ma znacznie uboższy system naprawy. Wszystkie te aspekty oraz bezpośrednie sąsiedztwo łańcucha oddechowego sprzyjają powstawaniu mutacji w mtDNA (18).

Przypuszcza się, że uszkodzenia mtDNA są jednym z czynników chorobotwórczych stożka rogówki. W pracach nad uszkodzeniami mitochondrialnego DNA w komórkach rogówki z klinicznie rozpoznany KC ustalono znaczny wzrost poziomu

mutacji i delecji w sekwencji mtDNA w odniesieniu do grupy kontrolnej (19). W rogówce ze stożkiem zaobserwowano również spadek poziomu mtDNA w stosunku do nDNA. Zmniejszenie ilości mtDNA względem nDNA stanowi wskaźnik spadku liczby kopii mtDNA w komórkach rogówki. Jednakże poziom DNA mierzony był w całej rogówce, a nie w poszczególnych jej warstwach, dlatego nie było można stwierdzić, których elementów rogówki dotyczą opisywane zmiany. Za pomocą technik immunologicznych przeprowadzono badania zawartości podjednostki 1. oksydazy cytochromu c (CO I) w tkankach rogówki z klinicznie rozpoznany KC i bez niego, w wyniku których zaobserwowano znaczne zmniejszenie poziomu CO I w komórkach nabłonka zewnętrznego rogówki z klinicznie rozpoznany KC w porównaniu do jej wartości u osób z grupy kontrolnej. CO I jest ważną podjednostką kompleksu IV fosforylacji oksydacyjnej kodowaną w mtDNA. Zmiany w CO I występowały jedynie we fragmentach rogówki, które uległy zniekształceniu podczas choroby, to jest w miejscu zanikania warstwy Bowmana. Warto podkreślić, że średnia wieku grupy kontrolnej była nieznacznie wyższa niż średnia wieku chorych na KC. Liczne badania wskazują na wzrost uszkodzeń mtDNA wraz z wiekiem, dlatego też można przypuszczać, że wykryte zmiany w obrębie mtDNA są wynikiem nieprawidłowości zachodzących w keratocytach rogówek z klinicznie rozpoznany KC (19). Badania na fibroblastach pochodzących z rogówek z klinicznie rozpoznany KC w warunkach stresu oksydacyjnego wykazywały dodatkowo wzrost mRNA podjednostki 2. oksydazy cytochromu c (CO II). CO II jest również podjednostką kompleksu IV fosforylacji oksydacyjnej (16). Modyfikacje w obszarze mitochondrialnego DNA mogą doprowadzić do zaburzeń podczas fosforylacji oksydacyjnej, a tym samym powodować wzrost poziomów ROS i RNS. Powstające ROS mogą wywoływać dalsze uszkodzenia oksydacyjne, powodując „błędne koło” stresu oksydacyjnego (11, 19).

Zmiany w funkcjonowaniu proteinaz w KC

Szkodliwy charakter ROS i RNS wynika z reaktywności tych cząsteczek. Niekorzystne działanie rodników może dotknąć praktycznie wszystkie składniki komórki, wywołując ich uszkodzenia. Problem ten dotyczy również tkanek rogówki. Przypuszcza się, że na skutek gromadzenia się ROS i RNS może dochodzić do zmian w funkcjonowaniu niektórych proteinaz (15).

Badania *in vitro* na fibroblastach prawidłowej rogówki oraz rogówki z klinicznie rozpoznany KC wskazały na wpływ niektórych RNS na degradację tkankowego inhibitora metaloproteinaz 1 (TIMP-1). Jedną z głównych funkcji TIMP-1 jest hamowanie aktywności niektórych metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP). Poza tym uczestniczy on w regulacji wielu procesów komórkowych, w tym w hamowaniu apoptozy (17). W komórkach rogówki z klinicznie rozpoznany KC zaobserwowano spadek stężenia TIMP-1 oraz mRNA tego inhibitora. Degradacja TIMP-1 może powodować wzrost aktywności MMP-2 – żelatynazy (13). Badania *in vitro* sugerują również, że MMP-2 w komórkach rogówki z klinicznie rozpoznany KC są łatwiej aktywowane aniżeli ten sam enzym w komórkach prawidłowej rogówki. Doniesienia te pozwalają przypuszczać, że wzrost aktywności MMP-2 zaobserwowany w komórkach rogówki z klinicznie rozpoznany KC może wynikać z degradacji TIMP-1. Z tego względu nie obserwuje się korelacji między aktywnością MMP a poziomem RNA

tego enzymu (13). Możliwe jest także, że w warunkach podwyższonego stężenia RNS dochodzi do aktywacji MMP bez udziału TIMP-1 (17). Mimo licznych badań do tej pory nie powiodły się próby jednoznacznie potwierdzające zależność między MMP a stężeniem rogówki. Jednakże sądzi się, że obniżony poziom TIMP-1 może przyczyniać się do zwiększenia aktywności zelatyny w rogówce z klinicznie rozpoznany KC. Degradacja TIMP-1 może również prowadzić do aktywowania szlaków apoptotycznych, w następstwie tego spada liczba komórek. Przypuszcza się, że zaburzenia poziomu TIMP mogą być przyczyną zmniejszenia się poziomu kolagenu, ścięczenia rogówki i pojawiania się pęknięć w warstwie Bowmana (13, 15, 17).

W wyniku inwazyjnej działalności aldehydów może dojść do dezintegracji błon lizosomalnych, w następstwie tego dochodzi do uwolnienia enzymów proteolitycznych, w tym katepsyn (ryc. 2.) (10). W tkance rogówkowej, którą pobrano od chorych na stożek, zaobserwowano zmianę poziomu katepsyny B, G i V/L2 oraz translokacje tych enzymów w obrębie tkanki. Katepsyny należą do grupy proteinaz lizosomalnych, które odgrywają ważną rolę w wielu procesach fizjologicznych, w tym w degradacji kolagenu i proteoglikanów, dwóch głównych składników macierzy zewnątrzkomórkowej w rogówce. Z tego względu sądzi się, że zaobserwowany wzrost poziomu tych enzymów może stanowić źródło zaburzeń w strukturze rogówki dotkniętej stożkiem. Przypuszcza się, że zaburzenia aktywności katepsyn są

powodem odkształceń rogówki i powstawania blizn. Ponadto katepsyny, które są pobudzone w rogówce, mogą przyczynić się do wzrostu poziomu H_2O_2 , a tym samym zwiększenia stresu oksydacyjnego (11, 13, 20).

Podsumowanie

Patogeneza stożka rogówki nie została do tej pory szczegółowo poznana. Obecny stan wiedzy pozwala przypuszczać, że KC jest uwarunkowany wieloczynnikowo. Liczne badania sugerują, że zaburzenia genetyczne odgrywają znaczącą rolę w rozwoju tego schorzenia. Jednakże zmiany w obrębie rogówki wywołane przez stres oksydacyjny mogą mieć również istotne znaczenie w rozwoju KC. Chociaż dotychczasowe badania wskazują na znaczną akumulację wolnych rodników i produktów ich aktywności w rogówce z klinicznie rozpoznany KC, do tej pory nie udało się ustalić, czy te nieprawidłowości są jedynie efektem choroby, czy może stanowią czynnik zapoczątkowujący kaskadę zdarzeń, których efektem jest ektazja rogówki. Dlatego też niezbędne są dalsze prace nad patogenezą tej choroby. Wydaje się, że podejmowane w przyszłości badania powinny koncentrować się na poznaniu przyczyn zmian zachodzących w funkcjonowaniu czynników antyoksydacyjnych oraz podwyższonej produkcji wolnych rodników. To może pozwolić na określenie, czy powstające zmiany są uwarunkowane genetycznie, czy może są efektem zmian biochemicznych wywołanych przez stres oksydacyjny. Dokładne poznanie mechanizmów patogenezy może przyczynić się do opracowania terapii, która umożliwiłaby blokowanie kaskady molekularnych zjawisk, które występują w przebiegu tej choroby.

Praca wykonana w ramach grantu
MNiSzW N N402 591940.

Piśmiennictwo:

1. Rabinowitz Y.S.: *Keratoconus*. Surv. Ophthalmol. 1998; 42: 297–319.
2. Gajęcka M., Radhakrishna U., Winters D., Nath S.K., Rydzanicz M., Ratnamala U., et al.: *Localization of a Gene for Keratoconus to a 5.6-Mb Interval on 13q32 Investigative*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2009; 50: 1531–1539.
3. Shoham A., Hadziahmetovic M., Dunaief J.L., Mydlarski M.B., Schipper H.M.: *Oxidative stress in diseases of the human cornea*. Free Radical Biology & Medicine 2008; 45: 1047–1055.
4. Buddi R., Lin B., Atilano S.R., Zorapapel N.C., Kenney M.C., Brown D.J.: *Evidence of oxidative stress in human corneal diseases*. J. Histochem. Cytochem. 2002; 50: 341–351.
5. Behndig A., Karlsson K., Johansson B.O., Brännström T., Marklund S.L.: *Superoxide Dismutase Isoenzymes in the Normal and Diseased Human Cornea*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2001; 42: 2293–2296.
6. Saijyothei A.V., Fowjiana J., Madhumathi S., Rajeshwari M., Thennarasu M., Prema P., et al.: *Tear fluid small molecular antioxidants profiling shows lowered glutathione in keratoconus*. Exp. Eye Res. 2012; 103: 41–46.
7. Petersen S.V., Oury T.D., Ostergaard L., Valnickova Z., Wegryzn J., Thøgersen I.B., et al.: *Extracellular Superoxide Dismutase (EC-SOD) Binds to Type I Collagen and Protects Against Oxidative Fragmentation*. J. Biol. Chem. 2004; 279: 1370–13710.



Ryc. 2. Schemat przedstawiający wpływ reaktywnych form tlenu (ROS) i azotu (RNS) na rozwój stożka rogówki. Zaburzenie równowagi między produkcją ROS i RNS oraz ich usuwaniem może prowadzić do zwiększenia aktywności enzymów proteolitycznych, takich jak: metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej i katepsyny, powodując degradację macierzy istoty właściwej rogówki, w następstwie tego dochodzi do ścięczenia rogówki.

Fig. 2. Diagram showing the effect of reactive oxygen (ROS) and nitric (RNS) species on the development of keratoconus. The imbalance between formation and elimination of ROS and RNS may lead to the increased activity of proteolytic enzymes, including matrix metalloproteinases and cathepsins, which trigger the degradation of stromal matrix and – in turn – corneal thinning.

8. Udar N., Atilano S.R., Brown D.J., Holguin B., Small K., Nesburn A.B., et al.: *SOD1: A Candidate Gene for Keratoconus*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2006; 47: 3345–3351.
9. Olofsson E.M., Marklund S.L., Pedrosa-Domellöf F., Behndig A.: *Interleukin-1 α downregulates extracellular-superoxide dismutase in human corneal keratoconus stromal cells*. Mol. Vis. 2007; 13: 1285–1290.
10. Arnal E., Peris-Martínez C., Menezo J.L., Johnsen-Soriano S., Romero F.J.: *Oxidative Stress in Keratoconus?* Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2011; 52: 8592–8597.
11. Chwa M., Atilano S.R., Reddy V., Jordan N., Kim D.W., Kenney M.C.: *Increased stress-induced generation of reactive oxygen species and apoptosis in human keratoconus fibroblasts*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2006; 47: 1902–1910.
12. Bonis P.D., Laborante A., Pizzicoli C., Stallone R., Barbano R., Longo C., et al.: *Mutational screening of VSX1, SPARC, SOD1, LOX, and TIMP3 in keratoconus*. Mol. Vis. 2011; 17: 2482–2494.
13. Kenney M.C., Chwa M., Atilano S.R., Tran A., Carballo M., Saghizadeh M., et al.: *Increased levels of catalase and cathepsin V/L2 but decreased TIMP-1 in keratoconus corneas: evidence that oxidative stress plays a role in this disorder*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2005; 46: 823–832.
14. Pappa A., Estey T., Manzer R., Brown D., Vasiliou V.: *Human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1): biochemical characterization and immunohistochemical localization in the cornea*. Biochem. J. 2003; 376: 615–623.
15. Kenney M.C., Brown D.J.: *The Cascade Hypothesis of Keratoconus*. Cont. Lens. Anterior Eye 2003; 26: 139–146.
16. Chwa M., Atilano S.R., Hertzog D., Zheng H., Langberg J., Kim D.W., et al.: *Hypersensitive response to oxidative stress in keratoconus corneal fibroblasts*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2008; 49: 4361–4369.
17. Brown D.J., Lin B., Chwa M., Atilano S.R., Kim D.W., Kenney M.C.: *Elements of the nitric oxide pathway can degrade TIMP-1 and increase gelatinase activity*. Mol. Vis. 2004; 16: 281–288.
18. Piętko G., Kukwa W., Bartnik E., Ścińska A., Czarnecka A.M.: *Mutacje mitochondrialnego DNA w rozwoju nowotworów głowy i szyi*. Otolaryngologia Polska 2008; 62: 158–164.
19. Atilano S.R., Coskun P., Chwa M., Jordan N., Reddy V., Le K., et al.: *Accumulation of Mitochondrial DNA Damage in Keratoconus Corneas*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2005; 46: 1256–1263.
20. Zhou L., Sawaguchi S., Twining S.S., Sugar J., Feder R.S., Yue B.Y.: *Expression of Degradative Enzymes and Protease Inhibitors in Corneas with Keratoconus*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1998; 39: 1117–1124.

Praca wpłynęła do Redakcji 11.12.2012 r. (1427)
Zakwalifikowano do druku 23.09.2013 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
prof. dr hab. n. med. Jacek P. Szaflik
Katedra Okulistyki, Warszawski Uniwersytet Medyczny
i Samodzielny Publiczny Kliniczny Szpital Okulistyczny
ul. Sierakowskiego 13
03-710 Warszawa
e-mail: szaflik@ophthalmology.pl