Utjecaj aktivnosti enzimskih antioksidansa u eritrocitima na razvoj senilne makularne degeneracije

Pleština-Borjan, Ivna

Doctoral thesis / Disertacija

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:942465

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivna Pleština-Borjan

Utjecaj aktivnosti enzimskih antioksidansa u eritrocitima na razvoj senilne makularne degeneracije

Doktorska disertacija

Split, 2015.

Rad je izrađen u Klinici za očne bolesti Kliničkog bolničkog centra Split

Voditelj rada: prof. dr. sc. Damir Katušić

Od svih nesreća starosti, sljepoća je ona od koje najviše strepimo.

Robert N. Frank

ZAHVALE

Željela bih zahvaliti svima onima koji su pomogli u izradbi ovoga rada:

Zahvaljujem svomu mentoru prof. dr. sc. Damiru Katušiću koji me je vodio tijekom rada, pomažući mi mnogim sugestijama.

Velika hvala prof. dr. sc. Milanu Ivaniševiću, na susretljivosti, razumijevanju i svesrdnoj pomoći u ostvarenju rada.

Zahvaljujem dipl. ing. Ivani Dujmov, spec. med. biokemije, i doc. dr. sc. Ilzi Salamunić, spec. med. biokemije, na pomoći, suradnji, strpljenju, trudu i utrošenom vremenu tijekom izradbe laboratorijskoga dijela rada.

Hvala svim dragim ljudima i prijateljima iz Klinike za očne bolesti KBC-a Split koji su "velikim sitnicama" pridonijeli ostvarenju rada: hvala Slavice, Julka, Damirka, Darko, Josipa (oprostite mi oni koje nisam pojedinačno spomenula).

Hvala mojim dragim roditeljima, koji su me učili da neprestano težim biti bolja osoba, a k tomu da uvijek sanjam više, nastojim više i dosegnem cilj, posebno majci čiji me duh ljubavi i dalje podupire.

Hvala mojoj sestri i nećakinji što su uvijek vjerovale u mene.

Hvala mojoj obitelji suprugu i sinu, bez čije ljubavi, snaženja i potpore u trenutcima mojih sumnji i malodušnosti, ne bi ni bilo ovoga rada.

Hvala dragomu Bogu, što mi je dao snage da stignem do kraja započetoga puta, koji je bio obilježen mnogim osobnim olujama, ali i dobrim anđelom kojemu od srca zahvaljujem: hvala draga doktorice Marice Vrdoljak.

Rad posvećujem svomu sinu Ivanu, svojoj snazi i vječnomu nadahnuću.

Pripadam onima koji misle da je znanost čudesna. Znanstvenik u svom laboratoriju nije samo tehničar: on je pred prirodnim pojavama kao dijete očarano bajkama.

Marie Curie

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Senilna makularna degeneracija 1

1.1.1. Definicija i povijesni pregled 1
1.1.2. Učestalost 3
1.1.3. Socioekonomski i psihološki učinci SMD-a 5
1.1.4. Čimbenici rizika 6
1.1.4.1. Sociodemografski čimbenici 7
1.1.4.2. Očni čimbenici 9
1.1.4.3. Sustavne bolesti i senilna makularna degeneracija 11
1.1.4.4. Čimbenici okoliša 12
1.1.5. Etiopatogeneza senilne makularne degeneracije 14

1.2. Starenje makule 17

1.2.1. Starenje Bruchove membrane 17
1.2.2. Starenje koriokapilarisa 17
1.2.3. Starenje RPE stanica 18
1.2.4. Starenje fotoreceptora 18

1.3. Oksidacijski stres 18

1.3.1. Oksidacijski stres – poremećaj oksidacijsko-redukcijske ravnoteže 19
1.3.2. Reaktivne kisikove vrste 20
1.3.2.1. Slobodni radikali 23
1.3.2.2. Neradikalne reaktivne kisikove vrste 25
1.3.3. Toksični učinci reaktivnih kisikovih vrsta na biološke molekule 26
1.3.3.1. Oksidacijsko oštećenje lipida 26
1.3.3.2. Oksidacijsko oštećenje proteina 27
1.3.3.3. Oksidacijsko oštećenje DNK 27
1.3.4. Korisni učinci slobodnih radikala u organizmu 28

1.4. Antioksidacijska obrana organizama 28

1.4.1. Enzimski antioksidansi 30
1.4.1.1. Superoksidna dismutaza 30
1.4.1.2. Glutationska peroksidaza 32
1.4.1.3. Katalaza 34
1.4.2. Neenzimski antioksidansi 35

1.5. Uloga oksidacijskog stresa u patogenezi senilne makularne degeneracije 36

1.5.1. Građa i funkcija makule, rizik za oštećenje oksidacijskim stresom 37
1.5.1.1. Građa i funkcija fotoreceptora 38
1.5.1.2. Građa i funkcija retinalnog pigmentnog epitela 39
1.5.1.3. Građa i funkcija Bruchove membrane 41
1.5.1.4. Građa i funkcija koriokapilarisa 41
1.5.2. Osjetljivost mrežnice (makule) za oštećenje oksidacijskim stresom 41
1.5.2.1. Visoka potrošnja kisika 41

1.5.2.2. Cjeloživotna izloženost vidljivom svjetlu ... 42
1.5.2.3. Visoki sadržaj PUFA-a u membranskim diskovima vanjskih segmenata fotoreceptora ... 43
1.5.2.4. Brojni kromofori ... 44
1.5.2.5. Fagocitoza – oksidacijski stres ... 50
1.5.2.6. Visoki tlak kisika ... 50
1.5.3. Fotooksidacijski stres u senilnoj makularnoj degeneraciji ... 50
1.5.4. Oštećenje mitohondrija u SMD-u kao posljedica oksidacijskog stresa ... 55
1.5.5. Druze, bazalni laminarni i bazalni linearni depoziti kao posljedice oksidacijskog stresa ... 55
1.5.6. Hipoksija kao posljedica oksidacijskog stresa u senilnoj makularnoj degeneraciji ... 57
1.5.7. Promjene koriokapilarisa kao posljedica oksidacijskog stresa u senilnoj makularnoj degeneraciji ... 57
1.5.8. Upalni odgovor na oksidacijski stres u senilnoj makularnoj degeneraciji ... 58

1.6. Antioksidacijski zaštitni mehanizmi u mrežnici (makuli) ... 58

1.6.1. Makularni pigment ... 59
1.6.2. Antioksidansi u mrežnici ... 60
1.6.2.1. Enzimski antioksidansi u mrežnici ... 60
1.6.2.2. Neenzimski antioksidansi u mrežnici ... 63

1.7. Procjene razine oksidacijskog stresa ... 65

2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA ... 66

2.1. Hipoteze ... 66

2.2. Ciljevi istraživanja ... 66

3. ISPITANICI I POSTUPCI ... 68

3.1. Ustroj istraživanja ... 68

3.2. Ispitanici ... 68

3.2.1. Kriteriji isključenja ... 68
3.2.2. Veličina uzorka ... 69

3.3. Postupci ... 69

3.3.1. Oftalmološke pretrage ... 69
3.3.2. Klasifikacija SMD-a ... 70
3.3.3. Laboratorijske pretrage ... 80
3.3.3.1. Određivanje aktivnosti superoksidne dismutaze u eritrocitima ... 80
3.3.3.2. Određivanje aktivnosti glutatonske peroksidaze u eritrocitima ... 81
3.3.3.3. Određivanje aktivnosti katalaze u eritrocitima ... 81
3.3.3.4. Određivanje TAS-a u serumu ... 81

3.4. Statistički postupci ... 82

3.5. Etičnost postupaka ... 83

4. REZULTATI 84

4.1. Opis uzorka prema demografskim, vitalnim i kliničkim obilježjima 84

4.2. Razlike u vrijednostima neenzimskih antioksidansa (bilirubina, mokraćne kiseline, albumina) i drugih ispitivanih biokemijskih parametara između skupine bolesnika sa SMD-om i kontrolne skupine 86

4.3. Razlike u aktivnosti enzimskih antioksidansa (SOD-a, GPx-a i CAT-a) u eritrocitima i razine TAS-a u serumu između skupine bolesnika sa SMD-om i kontrolne skupine 87

4.4. Multivarijatna logistička regresijska analiza povezanosti aktivnosti GPx u eritrocitima i TAS-a u serumu sa SMD-om, nakon kontrole zbunjujućih varijabla 88

4.5. Razlika u aktivnosti enzimskih antioksidansa (SOD-a, GPx-a i CAT-a) i razine TAS-a u serumu između skupina ispitanika s ranim i kasnim oblikom SMD-a i kontrolne skupine 89

4.6. Interakcija aktivnosti SOD-a i GPx-a u predikciji SMD-a 90

4.7. Prediktivna vrijednost aktivnosti GPx-a u eritrocitima i TAS-a u serumu za SMD 91

4.7.1. Prediktivna vrijednost aktivnosti GPx-a za SMD 91
4.7.2. Prediktivna vrijednost TAS-a u serumu za SMD 93
4.7.3. Prediktivna vrijednost kombinacije GPx-a i TAS-a za SMD 94

5. RASPRAVA 97

6. ZAKLJUČCI 106

7. SAŽETAK 108

8. SUMMARY 109

9. POPIS LITERATURE 110

10. ŽIVOTOPIS 127

POPIS OZNAKA I KRATICA

AMD	s dobi povezana makularna degeneracija (engl. *Age-Related Macular Degeneration*)
AREDS	studija s dobi povezanih očnih bolesti (engl. *Age-Related Eye Disease Study*)
ARM	s dobi povezana makulopatija (engl. *Age-Related Maculopathy*)
ATP	adenozin trifosfata
A2E	piridin-bis-retinoid (*N-retinilidin-N-retiniletanolamin*)
BDES	Beaver Dam očna studija (engl. *Beaver Dam Eye Study*)
BF	komplement faktor B
BlamD	bazalni laminarni depoziti
BlinD	bazalni linearni depoziti
BM	Bruchova membrana
BMES	Blue Mountain očna studija (engl. *Blue Mountain Eye Study*)
BMI	indeks tjelesne mase (engl. *Body Mass Index*)
CAT	katalaza
CEP	karboksietilpirol (engl. *Carboxyethylpyrrole*)
CFH	komplement faktor H (engl. *Complement Factor H*)
CNKI	Bibliografska baza podataka Kineska nacionalna infrastruktura znanja (engl. *The China National Knowledge Infrastructure*)
CNV	korioidalna neovaskularizacija
CRP	C reaktivni protein
DHA	dokozaheksaenska kiselina
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
ECM	izvanstanični materijal (engl. *Extracellular Matrix*)
EPA	eikozapentaenska kiselina
EUREYE	Europska očna studija (engl. *The European Eye Study*)
FA	fluoresceinska angiografija

FAD	flavin adenin dinukleotid
FRAP	test sposobnosti plazme da reducira željezo (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power Assay*)
GA	geografska atrofija
GPx	glutationska peroksidaza
GSH	reducirani glutation
GSSG	oksidirani glutation
HLA	ljudski leukocitni antigen (engl. *Human Leukocyte Antigen*)
HDL	kolesterol visoke molekularne gustoće (engl. *High Desity lipoprotein)*
IOL	intraokularna leća
MDA	malondialdehid
MK	mokraćna kiselina
MP	makularni pigment
mtDNK	mitohondrijska deoksiribonukleinska kiselina
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NHANES	Istraživanje Nacionalnog instituta za zdravlje i prehranu (engl. *National Health and Nutrition Examination Survey)*
OCT	optička koherentna tomografija (engl. *Optical Coherence Tomography*)
ORAC	test kapaciteta apsorbcije kisikovih radikala (engl. *Oxygen Radical Absorbing Capacity)*
PDEF	od pigmentnog epitela izveden čimbenik (engl. *Pigment Epithelium Derived Fasctor*)
POLA	dobno vezane očne bolesti (franc. *Pathologies Oculaires Liées à l'Age*)
PP	papilarni promjer
PUFA	višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *Polyunsaturated Fatty Acids)*
ROC	karakteristika djelovanja primatelja (engl. *Receiver Operating Characteristic*)
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive Oxygen Species)*
RPE	retinalni pigmentni epitel
RS	Rotterdamska očna studija (engl. *Rotterdam Eye Study*)

SAD	Sjedinjene Američke Države
SMD	senilna makularna degeneracija
SOD	superoksidna dismutaza
SR	slobodni radikal
TAS	ukupni antioksidacijski statusu
UV	ultraljubičasto (engl. *Ultraviolet*)
VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*)
WoS	Bibliografska baza podataka - *Web of Science*

1. UVOD

1.1. Senilna makularna degeneracija

1.1.1. Definicija i povijesni pregled

Senilna makularna degeneracija (SMD) ili kako se u engleskom govornom području, da bi se izbjegao nepopularan izraz "senilna", učtivije i ljepše naziva "*Age-Related Maculopathy*" (ARM), odnosno "*Age-Related Macular Degeneration*" (AMD) za njezin uznapredovali stadij, vodeći je uzrok sljepoće u osoba starijih od 50 godina u razvijenim zemljama [1,2], a rezultat je progresivne degeneracije stanica retinalnoga pigmentnoga epitela (RPE) i fotoreceptora u makularnoj regiji, koja u konačnici uzrokuje potpun i nepovratan gubitak centralnoga vida [3].

Bolest uključuje: različite promjene u makuli starijih osoba: druze, hiperpigmentacije i/ili hipopigmentacije RPE-a, korioidalne neovaskularizacije (CNV), subretinalne ili sub RPE hemoragije, odignuće RPE-a i/ili neurosenzorne retine, geografsku atrofiju (GA) RPE-a, stvaranje fibrovaskularnoga ožiljka, a u odsutnosti drugih bolesti, koje su ih mogle uzrokovati [4].

Promjene u makuli sukladne SMD-u prvi je opisao Donders 1855. godine [5]. Hutchinson i Tay, 1874. godine opisuju takve promjene u makuli kao "simetričnu središnju žilnično-mrežničnu bolest koja se javlja u starijih osoba" [6]. Pagenstecher i Genth (1875) [7] opisali su disciformnu fazu SMD-a. Deset godina kasnije, 1885. godine, švicarski oftalmolog Otto Habb [8] prvi je upotrijebio naziv SMD da bi označio klinički entitet različitih promjena u makularnoj regiji starijih ljudi. Oeller 1905. godine spominje naziv disciformna degeneracija makule [9] Kuhnt i Junius 1926. [10] upotrebljavaju taj naziv da bi opisali lezije u obliku diska, koje se pojavljuju u makularnoj regiji starijih osoba (disciformna faza SMD-a dobila je poslije ime Kuhnt-Juniusova disciformna makularna degeneracija). Maumenace, 1965. [11] godine i Gass 1967. [12,13] ispravno su pretpostavili da su uzrok svih krvarenja neovaskularizacije iz korioideje, koje se mogu pojaviti kao odgovor na nakupljanje abnormalnih depozita između RPE i Bruchove membrane (BM).

Istinsko razumijevanje SMD-a započinje Gassovim radovima prije 50-ak godina [12,13]. Zahvaljujući razvoju fluoresceinske angiografije (FA), on je bio u mogućnosti objelodaniti svoju monumentalnu studiju patogeneze disciformne makularne degeneracije te je usporedbom kliničkih, fluoresceinsko-angiografskih i histopatoloških nalaza, postao začetnikom današnjih spoznaja o SMD-u [12,13].

Novo razdoblje za SMD nastaje posljednja dva desetljeća uvođenjem optičke koherentne tomografije (engl. *Optical Coherence Tomography* – OCT) [14] u dijagnostiku i inhibitora

čimbenika vaskularne endotelne proliferacije (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor* – VEGF) u njezino liječenje [15].

Unatoč opsežnim istraživanjima SMD-a diljem svijeta (prošlima i onima koja su u tijeku), trenutno nema opće prihvaćene definicije bolesti. Različite definicije ranoga i kasnoga oblika bolesti, korištene u mnogim studijama, prave velike poteškoće i čine nemogućim usporedbu rezultata. Daljnje poteškoće stvaraju raznolike i nestandardizirane metode korištene u različitim kliničkim i epidemiološkim studijama, kao i različito ograničena dob ispitanikâ uključenih u pojedine studije (od 1 – 98 godina) [4]. U ranijim studijama oslanjali su se samo na klinički pregled brojnih nezavisnih ispitivača s različitom razinom iskustva, bez standardizacije dijagnoze [4,16]. U novijim studijama, temeljenim na fotografijama fundusa, fotografije nisu standardizirane [4,17–21].

Uglavnom se rabe dvije klasifikacijske sheme: ranije, koje su uključivale i smanjenje centralne vidne oštrine kao jedan od dijagnostičkih kriterija, i novije koje na temelju morfoloških promjena na fundusu, temeljenih na fotografijama fundusa, bez implikacije vidne oštrine, procjenjuju i klasificiraju SMD.

U nastojanju da se standardiziraju definicija SMD-a i metodologije istraživanja, međunarnodna skupina znanstvenika (*International Age-related Maculopathy Epidemiological Study Group*) objavila je godine 1995. Međunarodnu klasifikaciju i sustav stupnjevanja SMD-a u nadi stvaranja zajedničkoga detekcijskoga i klasifikacijskoga sustava za buduće studije [4] kako bi se olakšala usporedba podataka između njih. Ta nova terminologija, na žalost, i dalje nije opće prihvaćena.

SMD su definirali kao degenerativnu bolest u osoba starijih od 50 godina, karakteriziranu prisutnošću sljedećih abnormalnosti u makularnoj regiji: mekih druza ≥ 63 μm, hiperpigmnentacija i/ili hipopigmentacija RPE-a, odignuća RPE-a i/ili senzorne retine, retinalnih hemoragija, GA RPE-a, retinalnoga fibroznoga ožiljka, bez pokazatelja da su one sekundarne zbog drugih retinalnih (ponajprije vaskularnih) bolesti koje su ih mogle prouzročiti.

Bolest su imenovali dvama nazivima: rani ARM, rane promjene (druze i retinalne pigmentne abnormalnosti) i kasni ARM (koji se često naziva i AMD), koji uključuje vlažni oblik – neovaskularne promjene (odignuće RPE-a i/ili odignuće neurosenzorne retine; neovaskularne membrane subretinalno ili sub-RPE; fibrozni ožiljak, subretinalne ili retinalne i vitrealne hemoragije) i suhi oblik – GA (oštro ograničene areje atrofije RPE-a, promjera većega od 175 μm kroz koji prosijavaju korioidalne krvne žile).

Rani ARM je podijeljen u tri stadija (obično bez gubitka vida ili s neznatnim gubitkom), a četvrti kasni stadij (s gubitkom vida) čini kasni ARM [4].

Za klasifikaciju i stupnjevanje SMD-a, prema Međunarodnoj klasifikaciji, rabe se fotografije fundusa u boji, dobivene fundus kamerom 30^0 i prozirne folije s otisnutom standardnom mrežicom za klasifikaciju s krugovima različitoga dijametara (1000, 3000 i 6000 μm). Centriranjem mrežice na makulu, procjenjuje se udaljenost lezije od foveole. Veličina samih lezija procjenjuje se standardnim krugovima za stupnjevanje promjena na fundusu veličine 63,

125, 175, 250 i 500 μm, odnosno 1/24, 1/12, 1/8,6, 1/6, i 1/3 dijametra diska. Unutarnju makulu čini krug s centrom na foveoli dijametra 3000 μm (odnosno otprilike dva papilarna promjera – PP, jedan PP na prosječnom fundusu iznosi 1500 μm), a vanjsku makulu krug dijametra 6000 μm (četiri PP) s centrom na foveoli. Povećanje koje daje fundus kamera 30^0 je takvo da 4,7 mm na mrežici korespondira s oko 1500 μm na prosječnom fundusu, što iznosi jedan papilarni promjer.

U ovoj definiciji vidna oštrina nije uključena kao kriterij prisutnosti ili odsutnosti SMD-a [4]. Dio novijih studija uključuje i naziv intermedijalni SMD, koji označava veće meke druze (≥ 125 μm) praćene pigmentnim promjenama, koje su rizične za razvoj uznapredovaloga kasnoga oblika bolesti [22,23]. U nekoliko novijih studija također su kasni stadiji SMD-a podijeljeni u dvije kategorije prema kliničkim manifestacijama (suhi i vlažni) [24]. U našoj smo studiji rabili nazive rani SMD za ARM (prva 3 stadija) i kasni SMD za AMD – kasni oblik bolesti (četvrti stadij).

1.1.2. Učestalost

SMD nije samo vodeći uzrok sljepoće u osoba starijih od 50 godina u razvijenim industrijaliziranim zemljama, nego također, prema svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization* – WHO), treći po učestalosti globalni uzrok gubitka vida (nakon katarakte i glaukoma) ako se uzmu u obzir svi dobni uzrasti i zemljopisne regije [25–27]. To je progresivni, binokularni poremećaj koji pogađa više od 20 % populacije između 65 i 75 godina te više od 35 % onih u dobi iznad 75 godina života [18,22,28,29]. Učestalost i težina SMD-a povećavaju se s godinama starenja. Prevalencija se razlikuje od istraživanja do istraživanja, različiti autori navode različite podatke, što je posljedica ograničenja navedenih u prethodnom poglavlju (različiti kriteriji za uključenje u studiju, razlika u dobi, definiranju bolesti, itd.), ali svi ukazuju na strogu povezanost prevalencije i incidencije SMD-a sa životnom dobi [2,16–18,20,30–32].

Prevalencija znatno varira ovisno o lokacijama, rasnim i etničkim skupinama diljem svijeta. Pojavnost SMD-a je znatno učestalija među bijelcima nego među crncima i ima mnogo teži tijek [19,29,33–36].

I među Hispanjolcima kasni oblik SMD-a mnogo je rjeđi nego među bijelcima [32]. Azijati imaju nižu stopu prevalencije i incidencije, ali s trendom povećanja sukladno starenju azijskoga stanovništva. Istraživnanje Beijing Eye Study pokazalo je i znatno povećanje prevalencije i incidencije SMD-a među Kinezima [37]. Inuiti na Grenlandu imaju visoku prevalenciju neovaskularnoga SMD-a. GA je mnogo češći u Kineza, Islanđana i Norvežana u usporedbi s drugim skupinama [38–41].

Procjenjuje se da je danas više od 30 milijuna ljudi diljem svijeta zahvaćeno kasnim oblikom SMD-a [38]. Očekuje se da bi se taj broj mogao udvostručiti do 2025. godine kao posljedica globalnoga progresivnoga starenja stanovništva [42].

Temeljem rezultata metaanalize svih populacijskih studija o SMD-u publiciranih do svibnja 2013. (uključene samo studije sa standardiziranim stupnjevanjem, 129 664 bolesnika, u dobi od 37 do 97 godina) smatra se da danas u svijetu ima oko 170 milijuna osoba s nekim oblikom SMD-a. Prevalencija SMD-a raste i na globalnoj razini kao posljedica starenja populacije. Predviđa se da će broj osoba s nekim od oblika SMD-a u 2020. godini biti 196 milijuna, s povećanjem na 288 milijuna do 2040. godine. Prevalencija ranoga SMD-a (u osoba u dobi 45–85 godina) na globalnoj razini iznosi 8,01 %, kasnoga 0,37 % i općenito 8,69 %. Prevalencija SMD-a (bez obzira na stadij) u Europi iznosi 18,3 %, u Sjevernoj Americi 14,3 % i u Aziji 6,9 %. Europa je treća najmnogoljudnija regija s najvišom prevalencijom SMD-a. Azija čini više od 60 % svjetskoga stanovništva i stoga će doživjeti najveći porast broja slučajeva SMD-a (trećinu slučajeva na globalnoj razini) te se očekuje da će se tijekom godina taj broj povećavati mnogo brže nego u ostalim regijama, unatoč tomu što trenutno ima najnižu procijenjenu prevalencijsku stopu [42].

Studija Američkoga Nacionalnoga centara za istraživanje zdravlja i prehrane (*The National Health and Nutrition Examination Survey* – NHANES) [16], Beaver Dam studija (*Beaver Dam Eye Study* – BDES) [18], Blue Mountain studija (*Blue Mountain Eye Study* – BMES) [20], studija prevalencije SMD iz 7 europskih zemalja – EUREYE (*The European Eye Study*) [32] i Rotterdamska studija (*Rotterdam Eye Study* – RS) [31] kao i njihovi udruženi rezultati [2,30] temeljne su studije za prevalenciju SMD-a.

Približno 15 – 20 milijuna Amerikanaca ima neki od oblika SMD-a [2]. Prema BDES prevalencija ranoga oblika SMD-a iznosila je od 8,4 % za dob 43 – 45 godina pa do 30 % za dob od 75 i više godina, dok je prevalencija kasnoga SMD-a iznosila od 0,1 % do 7,1 % za iste dobne skupine [2,18].

Prevalencija kasnoga SMD-a u stanovništvu Sjedinjenih Američkih Država (SAD) iznad 40 godina iznosi 1,47 %, što ukupno čini 1,75 milijuna sa 200 000 novih slučajeva godišnje, i prosječno 16 000 novih sljepoća godišnje. Oko 8 milijuna stanovnika SAD u riziku je da razvije kasni oblik tijekom idućih 5 godina. Do godine 2030. očekuje se da će se broj bolesnika s kasnim oblikom povećati za 50 %, što bi iznosilo oko 3 milijuna slučajeva [2].

Prevalencija kasnoga oblika u Europi prema multicentričnoj studiji EUREYE (Norveška, Estonija, UK, Francuska, Italija, Grčka i Španjolska, 5040 sudionika) za dob višu od 65 godina iznosi 3,3 %. Kada se to primijeni na stanovništvo od 65 i više godina u Europskoj uniji, procjenjuje se da 3,35 milijuna osoba ima kasni oblik SMD-a i više od 1,5 milijun ima teške poremećaje vida zbog obostranoga SMD-a [32].

U australskoj epidemiološkoj studiji BMES (3654 ispitanika u dobi višoj od 49 godina) prevalencija kasnoga stadija SMD-a bila je 1,9 % od 0 % u dobi manjoj od 50 godina do 18,5 % u dobi sa 80 i više godina [20].

Sve studije ukazuju da se i incidencija SMD-a povećava s dobi. Tako se u BMES navodi incidencija kasnoga stadija od 3,7 % (od 0,17 % za dob do 60 godina do 24,3 % za dob višu od 80 godina) za razdoblje od 10 godina. Prosječna incidencija za rani oblik u desetogdišnjem razdoblju bila je 14.1 % (za dob do 60 godina 4,2, a za dob iznad 80 godina 32,5 %) [20].

Incidencija da se CNV razvije na drugom oku, ako je jedno već imalo CNV u petogodišnjem praćenju iznosila je od 12 % do 26 % prema različitim studijama [43].

Petogodišnja incidencija progresije intermedijalnoga u kasni oblik SMD-a u RS studiji iznosila je za osobe starije od 80 godina 42 % [44]. AREDS 1 (*Age-Related Eye Disease Study)* pokazala je da je incidencija progresije ranoga oblika u kasni u petogodišnjem razdoblju iznosila 20,2 %, s godišnjom stopom povećanja od 4 % [45]. Slične rezultate godišnjega povećanja pokazale su i BMES (4,8 %) i RS (2,5 %). U bolesnika sa CNV-omu jednom oku, a GA u drugom, kumulativna incidencija CNV-a na drugom oku (sa GA) iznosila je 34 % u 4 godine praćenja [46].

SMD čini 8,7 % ukupnih sljepoća u svijetu (oko 3 milijuna, od ukupno 39 milijuna slijepih) od 0 u subsaharskoj Africi do više od 50 % u industrijaliziranim zemljama [47,48].

U SAD je SMD odgovoran za 54 % sljepoća u bjelačkoga stanovništva, a u UK je uzrok 42 % sljepoća u dobi 65 – 74 godine, 2/3 u dobi 75 – 85 i gotovo 3/4 u osoba starijih od 85 godina [22,45,49].

Američki nacionalni institut za starenje (engl. *National Institute of Aging*) smatra da će godine 2030. svaka peta osoba biti starija od 65 godina, a očekuje se da bi osobâ starijih od 75 godina moglo biti 27 milijuna, dok će istodobno broj osoba od 85 i više godina premašiti 10 milijuna [50]. S produljenjem životnoga vijeka sve se više povećava i incidencija sljepoće kao posljedica SMD-a i ubrzo bi mogla poprimiti razmjere epidemije u SAD i drugim razvijenim zemljama [51]. Ne čudi stoga da je Američki nacionalni institut za starenje istraživanje moguće uloge antioksidacijskih nutrienata u prevenciji SMD-a postavio kao cilj visokoga prioriteta [52].

1.1.3. Socioekonomski i psihološki učinci SMD-a

Senilna makularna degeneracija je progresivna, bilateralna bolest, prisutna u više od trećine osoba starijih od 75 godina. Ta će se populacija, prema procjenama, udvostručiti u idućih 25 godina [42,48,50,51] što upozorava na SMD kao golem društveni problem.

SMD postupno napreduje i u konačnici uzrokuje potpun i nepovratan gubitak centralnoga vida, posljedica čega je nemogućnost jasnoga viđenja detalja, prepoznavanja lica, čitanja, gledanja televizije, vožnje automobila, rukovanja novcem i dokumentima i dr. Učinak SMD-a na aktivnosti dnevnoga života, samoskrb, dobro poznate emocionalne i opće kvalitete života veliko je opterećenje za samoga bolesnika (mogućnost starijih da budu neovisni), ali i za društvo u cjelini [53].

Među oboljelima od SMD-a niska je stopa zaposlenosti, društveno su izolirani, stopa depresije u njih je veća za 3 puta, rizik padova povećan im je za 2 puta, oboljeli se češće koriste različitim uslugama i servisima te imaju puno raniju potrebu za kućnom njegom i pomoći [54,55]. SDM stvara društvu goleme troškove [56,57]. Australiju tako SDM godišnje košta 2,3 milijarde dolara, a do godine 2025. očekuje se povećanje godišnjih troškova do 6,5 milijarda dolara, što

čini iznos od oko 59 milijarda dolara u idućih 20 godina [56]. U SAD-u troškovi su dvadeseterostruko veći (s obzirom na broj stanovnika i cijene medicinskih usluga) [57,58].

Globalan porast prevalencije i incidencije SMD-a, zbog očekivanoga produljenja životnoga vijeka, smanjene stope nataliteta i posljedičnoga demografskoga skretanja u smjeru starije populacije, imat će znatne socio-ekonomske i javnozdravstvene posljedice [22,45,59].

Nove mogućnosti liječenja uzrokuju s jedne strane povećanje troškova liječenja, a s druge su strane društveni troškovi, zbog smanjene vidne sposobnosti bolesnika, također u porastu. Tako u Njemačkoj, koja ima približno 50 000 novih slučajeva eksudativnoga oblika SMD-a godišnje, samo troškovi za anti-VEGF terapiju iznose 1,1 – 2,9 milijarda eura godišnje [60].

Zaustavljanje razvoja uznapredovaloga SMD-a ima veliki učinak na kvalitetu života osobe. Važno je spriječiti uznapredovali SMD barem na jednom oku [45].

Iako je anti-VEGF terapija revolucionirala liječenje vlažnog oblika SMD-a, pokazala se korisnom samo u malom postotku bolesnika s vlažnim oblikom SMD-a s ograničenim učinkom (terapija je djelotvorna u samo 5 % ukupno oboljelih, od 10 % bolesnika s vlažnim oblikom SMD njih 45 % ne pokazuje odgovor na terapiju – engl. *non responders*) [61]. Za suhi oblik SMD-a koji čini 90 % svih slučajeva bolesti, danas nema dokazane terapije.

Provođenje terapije vlažnoga oblika SMD-a u smislu učestalosti, ponavljanja, kombinacije različitih terapija, metode davanja lijeka, intenzitet praćenja i preopterećenost retinalnih klinika ostaju problemi koji se moraju riješiti. Visoka cijena odobrenih lijekova (drugi su nelegalni iako se uspješno primjenjuju kao npr. bevacizumab – Avastin) multiplicirana dugim trajanjem tretmana daljnji je važan neriješeni problem vlažnoga SMD-a [62].

Rastući utjecaj SMD-a na društvenoj i ekonomskoj razini zajedno s njegovom nejasnom patogenezom i ograničim mogućnostima liječenja, potiču znanstvenike da pronađu čimbenike koji bi se mogli modificirati, kako bi se spriječila pojava SMD-a i/ili promijenio njegov prirodni tijek i prognoza [63,64].

1.1.4. Čimbenici rizika

Unatoč visokoj prevalenciji i javnozdravstvenoj važnosti SMD-a, njegova etiopatogeneza ostaje i dalje do kraja nerazjašnjena.

SMD je rezultat složenih međudjelovanja različitih čimbenika iz okoliša i nasljednih čimbenika rizika, među kojima su do danas utvrđeni: eksponencijalni porast učestalosti SMD-a sa starosnom dobi pacijenta, obiteljska i genetska komponenta i snažna povezanost s pušenjem [65] i s prekomjernom izloženošću sunčevom zračenju [66].

Provođene su brojne epidemiološke studije kako bi se otkrili mogući rizični čimbenici. Neke su bile dio velikih javnozdravstvenih studija, pa su uključivale golem broj varijabla (npr. studija Framingham sa 667 varijabla) tako da su neke pronađene povezanosti mogle biti posljedicom

slučajnosti [4] Analiza čimbenika rizika za SMD sama je po sebi teška jer su mnogi od njih međusobno usko povezani (npr. rasa, pigmentacija i izloženost sunčevu svjetlu). Također je i veliki izazov mjerenje nekih čimbenika rizika (npr. mjerenje kronične cjeloživotne izloženosti sunčevu svjetlu) [64].

Brojni čimbenici rizika, inkriminirani za nastanak SMD-a govore u prilog njegove multifaktorijalne etiologiji. Općenito se mogu podijeliti na: osobne čimbenike i čimbenike iz okoliša. Osobni se mogu dalje podijeliti na: sociodemografske, očne i sustavne. Čimbenike iz okoliša čine: pušenje, dugotrajna izloženost sunčevu svjetlu i određeni dietetski deficiti.

Mnogi od ovih rizičnih čimbenika koji se povezuju s razvojem SMD-a izgleda da dijele zajednički mehanizam kumulativnoga oštećenja makule svakodnevnim oksidacijskim stresom, potaknutoga cjeloživotnim fokusiranjem svjetla u tu kisikom i nezasićenim masnim kiselinama prebogatu regiju, o čem će se opširno raspravljati u idućim poglavljima, a što je i glavna tema ovoga istraživanja.

1.1.4.1. Sociodemografski čimbenici

Dob

Najdosljedniji čimbenik rizika za SMD u svim studijama jest dob. Bolest se rijetko pojavljuje prije 50-e godine života. Oko 20 % populacije u dobi 66 – 74 godine ima naznake SMD-a, a u dobi iznad 75 godina prevalencija raste do preko 30 %, sa 6 – 8 % kasnoga oblika SMD-a [38,62,65].

U svim dosadašnjim studijama ukazano je na snažnu povezanost dobi i nastanka SMD-a. Kao što je u prethodnom poglavlju pokazano prevalencija, incidencija i progresija svih oblika bolesti izrazito strmo rastu s godinama starosti [2,18,20,30–32,67] .

Danas se smatra da bi s dobi povezan povećani rizik od SMD-a mogao biti posredovan postupnim, kumulativnim oštećenjem makule svakodnevnim oksidacijskim stresom.

Spol

U literaturi se nailazi na oprječne podatke u vezi s povezanosti određenoga spola i SMD-a. BMES pokazao je veću učestalost retinalnih pigmentnih abnormalnosti u muškaraca [20]. Određene studije pokazale su veću učestalost SMD-a u žena (udruženi podatci iz BDES-a, BMES-a i RS-a) [30], pogotovo za dob nakon poslije 75. godine, s dvostruko većim rizikom za neovaskularni oblik SMD-a nego u muškaraca. Uzrok je tomu možda u činjenici što je u populaciji više starijih žena od muškaraca. S obzirom na to da žene žive dulje, a SMD je strogo povezan s dobi, nedovoljna prilagodba s dobi mogla bi objasniti ta zbivanja [65, 67]. Regresivan model, kad se dob uzela kao kontinuirana varijabla, a ne po dekadama, nije pokazao statistički značajnu povezanost SMD-a sa spolom [20].

Moguće objašnjenje za višu prevalenciju SMD-a u žena, ako ona postoji, može biti gubitak zaštitne uloge estrogena (koji čine antioksidacijsku zaštitu) u postmenopauzi [63,67]. U RS pronađen je viši rizik za SMD u žênâ u ranoj menopauzi zbog kirurškoga odstranjenja ovarija [67]. U BMES primijećeno je da je u žênâ s ranim SMD-om manji raspon godina od menarhe do menopauze [67]. Korisnu ulogu estrogena nije potvrdila studija BDES [67] kao ni Pathologies Oculaires Liées à l'Age (POLA) studija [63,68]**.** Zanimljivo je da se u RS-u otkrilo da je povećana izloženost endogenomu estrogenu (veći raspon godina od menarhe do menopauze) povezana s većom učestalošću GA [30,69].

Rasa

Dosadašnje studije, kao što je ranije navedeno, pokazale su da je SMD uglavnom bolest bijele rase, pogotovo njezin kasni oblik [2,16,19,29,33–36,45]. Sljepoća uzrokovana SMD-om rijetka je u crnačkoj populaciji [68]. Slično je i s Latinoamerikancima i Meksikancima [70,71]. U Eskimâ na Grenlandu visoka je učestalost SMD-a [72]. Prevalencija GA na Islandu, značajno viša nego u drugim europskim populacijama s prosječnom prevalencijom u osoba u dobi iznad 50 godina od 3,2 % [72]. Moguće je da ove znatne razlike u prevenciji odražavaju selekcijske sile, štetne ili zaštitne genetske čimbenike ili čimbenike životnoga stila (nutritivne i druge) povezane s rasama i narodima. Međutim i drugi čimbenici, poput razlike u količini korioidalnoga melanina, mogu imati važnu ulogu. Sadržaj melanina u RPE isti je u obiju rasa, ali crnci imaju značajno više koroidalnoga melanina [28], koji smanjuje štetan učinak (*second pass*) reflektiranih fotona, a time i oksidativne reakcije u RPE-u i BM.

Nasljeđe

Klinička iskustva pokazuju pozitivnu korelaciju između SMD-a i obiteljske anamneze, sugerirajući nasljeđe kao mogući važan čimbenik u etiologiji ove bolesti. Smatra se da genetska predispozicija uz odgovarajuće utjecaje čimbenika iz okoliša uzrokuje razvoj SMD-a.

U više je studija utvrđena pozitivna obiteljska anamneza u bolesnika sa SMD-om, kao i veća učestalost bolesti u braće i sestara, posebno u blizanaca, pogotovo monozigotnih [73,74]**.** Klever (RS) procjenjuje da braća i sestare osoba s kasnim oblikom SMD-a imaju pet puta veći rizik da dobiju srednje teški oblik SMD-a i dva puta veći rizik za dobivanje kasnoga oblika od osoba čija su braća i sestre zdravi [67]. Studije također pokazuju da je prosječna podudarnost SMD-a u monozigotnih blizanaca 37 % prema 19 % u dizigotnih blizanaca [63]. Ta opažanja o podudarnosti SMD-a u blizanaca potaknula su genetska istraživanja o upletenosti pojedinih gena u patogenezu SMD-a. Prema novijim studijama sama genetska predispozicija nedostatna je za razvoj bolesti bez utjecaja čimbenika iz okoliša, pa je za razumijevanje patogeneze i patofiziologije SMD-a ključno razumijevanje dinamike interakcije između tih dviju skupina čimbenika rizika.

Kompletiranje ljudskoga genomskoga projekta (kojim je u cijelosti izvršena identifikacija svih ljudskih gena i određen slijed svih 3 milijarde parova baza DNK) omogućilo je identifikaciju varijanata alela nekoliko gena za koje se pretpostavlja da bi mogli biti glavni rizični lokusi za nastanak i razvoj SMD-a, a to su: komplement faktor H (engl. *Complement Factor H – CFH),* komplement faktor B (BF) komplement komponenta 2 (C2*), PLEKHA 1*, *LOC387715* (*ARMS2*)

i *HTRA1* [76]. Gen za komplement faktora H (*CFH*), integralnu komponentu alternativnoga puta aktivacije komplemenata, lociran je na kromosomu 1q 25 – 31. Zamjena tirozina, histidinom na aminokiselini 402 (*Y402H*) *CFH* gena, poznata kao *Y402H* polimorfizam, smatra se da povisuje rizik za razvoj SMD-a. To je u skladu s onim što znamo o fiziološkoj ulozi *CFH*. On prevenira nekontroliranu aktivaciju komplemenata inflamacije, pa se smatra da je njegova mutacija uzrokom nereguliranoga upalnoga odgovora [77].

Tri druga važna gena s povećanim rizikom za nastanak SMD-a *PLEKHA*, *LOC387715* (*ARMS 2*) i *HTRA1* preklapaju se locirani na kromosomu 10q26. Iako je funkcija *LOC387715* (*ARMS 2*) nepoznata, pretpostavlja se da se odnosi na mitohondrijsku oksidaciju [63].

Gen *ARMS2* je lokaliziran u fotoreceptorima, uglavnom u mitohondrijima [78,79]. *HTRA1* se povezuje sa staničnim preživljavanjem putem proteaze i inhibicije imunološkoga odgovora, a *PLEKHA* je uključen u limfocitnu aktivnost [80]. Ostali geni koji se povezuju sa SMD jesu: apolipoprotein E, komplement faktor B (BF), komplement komponenta 3 (C3) i komplement komponenta 2 (C2) [67]. Mnogi drugi geni kandidati za SMD tek trebaju biti istraženi (*ABCA4*, *PONI*, *HEMICENTIN 1* (fibulin 6), *ELOVL 4*, *VLDLR* i *ACE* [63].

Istraživanje SMD-a kao genetske bolesti teško je zbog dobno vezane naravi bolesti. Pojavljuje se kasnije u životu te je zapravo samo jedna generacija dostupna za istraživanje, jer su roditelji već možda umrli, a djeca su premlada za ispoljavanje bolesti [63]. Najnoviji dokazi naglašavaju da je bolest, multifaktorijalna, oblikovana multiplim genima, jednako kao i utjecajima iz okoliša. Povećani rizik za razvoj SMD-a postoji kad je prisutna genetska predispozicija bolesti i određeni okolišni čimbenik (npr. pušenje). Rezultati RS-a pokazali su da pušenje može modificirati učinak bilo koje genetske predispozicije za razvoj SMD-a [81]. S druge strane zdravi stil života, uključujući povećanje antioksidacijske zaštite i smanjenje razine prooksidansa (izbjegavanje pušenja), mogu poništiti mnoge od genetskih predispozicija. Među nositeljima genetske varijante *CFH* i/ili *ARMS2* koji konzumiraju veliku količinu cinka, karotena, omega-3 masnih kiselina ili luteina, stopa SMD-a gotovo je jednaka onoj u pacijenata bez genetskoga rizičnoga čimbenika [81]. Tako prema Klaveru izgleda da osoba zapravo može "pojesti" svoj genetski rizik za nastanak i razvoj SMD-a [81].

Socioekonomski status

U NHANES1 pokazano je kako je učestalost SMD-a smanjena u osoba s višim stupnjem edukacije naobrazbe. Druge studije, uključujući i BDES, nisu pokazale razlike u učestalosti SMD-a među ispitanicima s različitim stupnjem naobrazbe [64]. Neke studije prije ukazuju na pozitivan odnos SMD-a i bruto dohotka nego na stupanj naobrazbe [64].

1.1.4.2. Očni čimbenici

Očni čimbenici kao što su svijetle šarenice, mrena, operacija mrene, i hipermetropija povezuju se sa SMD-om u nekim, ali ne u svim, studijama [29].

Boja šarenice

U nekim se studijama navode svijetle šarenice kao mogući čimbenik rizika za višu stopu SMD-a, zbog njihova smanjenoga sadržaja melanina [65].

Svijetle šarenice propuštaju 100 puta više svjetla od tamnih [82], a k tomu su svijetle šarenice povezane i sa smanjenom količinom makularnoga pigmenta (luteina i zeaksantina) i niskim korioidalnim melaninom, koji dodatno štite mrežnicu od oksidativnoga oštećenja sunčevim svjetlom i smanjuju rizik od SMD-a [65].

Od velikih populacijskih studija samo je BMES pokazao povišenu učestalost SMD-a u osoba s plavim očima [67]. BDES nije pokazao povezanost plavih očiju s incidencijom i prevalencijom SMD-a, ali je kasnije u petogodišnjem praćenju primijećena značajna povezanost smeđih šarenica s razvojem mekih druza [65]. U BDES-u primijećena je i jaka povezanost smeđe boje kose i šarenica sa smanjenom učestalosti ranoga SMD-a [65].

Katarakta i SMD

Epidemiološke studije daju proturječne podatke o povezanosti katarakte i SMD-a [63]. U Framingamskoj studiji (engl. *Framingham Eye Study*) nuklearna se skleroza negativno povezuje sa SMD-om, a kortikalna mrena pozitvno [83]. Prema NHNES 1 osobe i s jednim i s drugim oblikom mrene u povećanom su riziku za razvoj SMD-a [16]. U BDES-u nuklearna je skleroza povezana s povećanom prevalencijom ranoga, ali ne i kasnog SMD-a [84], a nije utvrđena bilo kakva povezanost s kortikalnom ili subkapsularnom mrenom.

Smatra se da operacija mrene može rezultatirati povećanjem rizika za nastanak i napredovanje SMD-a. Povećana učestalost SMD-a nakon operacije mrene primijećena je u više studija [63]. U BDES-u je u desetogodišnjem praćenju očiju s operiranim mrenama uočen četverostruko povećani rizik za razvoj neovaskularnog oblika SMD-a i trostruko povećana incidencija GA [85]. Slična su opažanja i u BMES-u [86]. Udruženi podatci iz studija BDES i BMES u petogodišnjem praćenju pokazali su da je incidencija za razvoj kasnoga SMD-a 6 puta veća u pseudofaknim i afaknim očima nego u fakičnim [87]. Često se nedugo nakon operacije katarakte primjećuje razvoj neovaskularnoga SMD-a. Objašnjenje te povezanosti moglo bi biti oštećenje svjetlom tijekom operacije mrene ili nakon nje ili pak upalni odgovor [67].

Katarakta može imati zaštitni učinak na razvoj SMD-a, apsorbirajući plavo svjetlo i tako smanjujući oksidativno oštećenje makule [88]. Taj se zaštitni učinak pripisuje određenom obliku mrene: nuklearnoj sklerozi i nuklearnoj mreni [63]. O odnosu između operacije mrene i SMD-a zadnjih se godina puno raspravljalo, a rezultiralo je naputkom o ugradnji filtera za plavi dio vidljivog spektra u IOL [88,89] što je još uvijek tema mnogih znanstvenih rasprava [63].

Hipermetropija

Maltzman [90] je prvi sugerirao povezanost refrakcijske anomalije i SMD-a, odnosno hiperopije s rizikom SMD-a. Poslije su to potvrdile i druge studije [63,67]. U BMES-u pronađena je slaba pozitivna povezanost umjerene hipermetropije i incidencije ranoga SMD-a [91]. U RS je u hipermetropa pronađen povišeni rizik incidencije i prevalencije neovaskularnog

oblika SMD-a, ali ne i ranog SMD-a [67]. Povećanjem hipermetropije za jednu dioptriju, povećavao se rizik za razvoj SMD-a za 5 %, što je pokazala i Beijing studija [92]. Taj patomehanizam nije potpuno jasan. Hipermetropne oči imaju kraću aksijalnu duljinu od emetropnih i miopskih očiju i tendiraju povećanju skleralne debljine, što može pridonijeti većemu rigiditetu sklere u hipermetropa, a time i povećanoj rezistenciji korioidalnom venskom otjecanju krvi (u skladu s vaskularnom pretpostavkom patogeneze SMD-a) [63]. Kraća aksijalna duljina i fokusiranje svjetla bliže mrežnici u skladu je s hipotezom o oštećenju makule svjetlom.

1.1.4.3. Sustavne bolesti i senilna makularna degeneracija

Najčešće se SMD povezuje s kardiovaskularnim čimbenicima rizika: hipertenzijom, razinom kolesterola u serumu, kolesterolom visoke molekularne gustoće (engl. *High Desity Lipoprotein* – HDL) ili s indeksom tjelesne mase (engl. *Body Mass Indeks* – BMI). Studije su pokazale nekonzistentne rezultate [63].

Debljina i SMD

Izgleda da bi debljina mogla biti važna odrednica za razvoj i progresiju SMD-a iako uvjerljivi dokazi nedostaju. Takve osobe imaju smanjeni dijetetski unos važnih mikronutrienata za zaštitu od SMD-a [63]. Povećane tjelesne masnoće mogu oštetiti antioksidacijske obrambene mehanizme retine zbog toga što se makularni pigmenti (lutein i zeaksantin, koji štite središnju retinu od oksidacijskoga stresa), dobro uskladištuju u masnom tkivu pa u makuli postoji njihov relativni nedostatak u adipoznih ljudi, čime se smanjuje makularna prirodna antioksidacijska obrana.

Istraživanja su pokazala da su osobe s visokim BMI-om u povećanom riziku za progresiju ranoga SMD-a u njegov kasni oblik [63]. POLA studija je pokazala da je u osoba s BMI većim od 30, rizik kasnoga SMD-a dva puta veći, a povećan je i rizik za rani SMD [93]. U BMES-u i visoki i niski BMI povezani su s povećanim rizikom za razvoja ranoga SMD-a. I udruženi podatci iz BDES-a, BMES-a i RS-a pokazali su povezanost između BMI-a i incidencije SMD-a [30,69]. U istraživanju Physicians' Health Study [94] putvrđeno je da i jako mršavi ljudi (BMI < 22) imaju također povećan rizik za nastanak i razvoj SMD-a.

Hipertenzija i SMD

Iako bi hipertenzija zbog svog utjecaja na smanjenje korioidalne cirkulacije mogla biti suspektan rizični čimbenik za razvoj SMD-a, podatci epidemioloških studija nisu konzistentni [29]. Podatci iz nekih case control studija pokazali su pozitivnu korelaciju između hipertenzije i SMD-a [63]. Međutim velike populacijske studije nisu pokazale značajnu povezanost [95]. BDES i RS pružaju dokaze o blagoj ili srednje jakoj povezanosti hipertenzije i SMD-a [96,97]. Rezultati BDES-a u petogodišnjem praćenju podupiru također ulogu povećanoga sistoličkoga tlaka u patogenezi neovaskularnoga forme oblika SMD-a. Nema uvjerljivih kliničkih niti

epidemioloških studija koje ukazuju na smanjenje rizika za razvoj SMD-a uz uzimanje antihipertenziva [63].

Plazma lipidi i SMD

Povećana konzumacija zasićenih masnoća i kolesterola pokazala je pozitivu korelaciju s rizikom SMD-a u nekim studijama [98,99]. U pojedinim studijama pokazana je protektivna uloga HDL kolesterola za nastanak SMD-a [100,101]. Epidemiološke studije nisu pokazale povezanost sredstava za sniženje kolesterola (statina) i incidencije ili progresije SMD-a [102,103].

1.1.4.4. Čimbenici okoliša

Pušenje

Pušenje je uz dob najdosljedniji čimbenik rizika za razvoj SMD-a. Pušenje povisuje rizik razvoja SMD-a 2 – 3 puta [94,104-111].

Rezultati velikoga broja studija, uključujući i tri velike studije na tri kontinenta (BDES, BMES i RS) [105,106,109] kao i njihovi udruženi rezultati, snažno potvrđuju pušenje kao izravan rizični čimbenik u nastanku SMD-a. Iako nije poznat pravi mehanizam učinka, mogla bi biti riječ o oksidativnom učinku pušenja na makulu. Pušenje, naime, izrazito smanjuje antioksidacijski učinak preko smanjenja makularnoga pigmenta, smanjenja korioidalnoga protoka i smanjenja razine serumskih antioksidansa [29,65,82], a duhanski dim uzrokuje stvaranje ROS-a i povećanje lipidne peroksidacije [63,112].

Pušenje također može imati učinak na imunosni sustav [28]. Prestanak pušenja ne znači i smanjenje rizika za razvoj SMD-a [29,113].

Rezultati Nurses Health Study pokazali su da je SMD 2,4 puta češći u u žena pušačica i 2 puta češći u bivših pušačica nego u onih koje uopće nisu pušile [111]. Učestalost SMD-a povećava se s brojem cigareta i godinama pušenja. Physicians health studija je pokazala da su muškarci pušači (liječnici) [94] imali 2,57 puta veći rizik za SMD ako su pušili više od 20 cigareta na dan [100]. Pušači imaju 4 puta veći rizik za razvoj kasnoga oblika SMD-a od nepušača, a bivši pušači 3 puta [78,105,106,111].

U pokusu na miševima izloženima pušenju, ili s pušenjem povezanim moćnim antioksidansom hidrokvinonom, rezultiralo je stvaranjem sub-RPE-a depozita unutar BM [112]. U drugoj studiji nađeno je da nikotin povisuje broj i težinu CNV-a na mišjem modelu [114].

Izloženost sunčevu svjetlu

Smatra se da dugoročna kumulativna izloženost sunčevu svjetlu, pogotovo UV dijelu spektra i kraćim valnim duljinama vidljive svjetlosti, mogu biti važan etiološki čimbenik za razvoj SMD-a.

Potvrde za to nalaze se u brojnim eksperimentalnim i laboratorijskim ispitivanjima. Studije na životinjama i laboratorijske studije pokazale su da je retina (ponajprije RPE i fotoreceptori) ranjiva za oštećenje utjecajem svjetla, a oštećenje je funkcija valne duljine i snaga potrebna da nastane fotooksidativno oštećenje retine je više od 1000 puta niža za plavo svjetlo nego za infracrveno, ovisno o trajanju ekspozicije [63,115,116]. Temeljem toga može se pretpostaviti da je kumulativna izloženost vidljivomu svjetlu, posebno kratkim valnim duljinama (plavomu svjetlu), etiološki važna u patogenezi SMD-a. Ta je pretpostavka propitivana u brojnim epidemiološkim studijama. Tako iako ne nedostaje eksperimentalnih dokaza o povezanosti izloženosti sunčevu svjetlu i oštećenja makule, rezultati epidemioloških studija su nedosljedni.

U BDES-u navodi se povećana petogodišnja i desetogodišnja incidencija ranoga SMD-a u tridesetim godinama u ispitanika koji su veći dio slobodnoga vremena proveli na otvorenom, na ljetnom suncu u mladenačkoj dobi (kao tinejdžeri) [63]. Isto istraživanje nije pokazalo povezanost između prosječne godišnje ambijentalne izloženosti UV-B zračenju i progresije ili desetogodišnje incidencije SMD-a [116–118]. U Chespeak Bay Watermen Study utvrđena je povezanost između izloženosti suncu i kasnoga SMD-a, ali ne i ranoga [119,120]. Naše prethodno istraživanje pokazalo je veću učestalost svih oblika SMD-a u ispitanika koji su tijekom života, od ranoga djetinjstva, kad leća još nije razvila svoj prirodni filter UV zračenja, bili izloženi velikoj kumulativnoj dozi sunčeva svjetla (otok Šolta i boravak u izbjeglištvu u El Shatu) [121].

Suprotno tome u studiji POLA rizik za razvoj ranoga SMD-a [95] niži je u osoba izloženih visokoj ambijentalnoj solarnoj radijaciji. Ali utvrđena je manja učestalost mekih druza u ispitanika koji su nosili sunčane naočale [28].

Zaštitni učinak šešira i sunčanih naočala na desetogodišnju incidenciju ranoga SMD-a primijećen je i BDES-u, ali samo u ispitanika s najvećom izloženošću sunčevu svjetlu [116].

Studija EUREYE nije pokazala povezanost između izloženosti plavomu svjetlu i kasnoga ili ranoga oblika SMD-a, ali je pokazala značajnu negativnu povezanost između izloženosti plavomu svjetlu i osoba u najvišoj kvartili antioksidantne zaštite [122]. Na žalost, teško je točno izmjeriti kumulativnu, cjeloživotnu, izloženost mrežnice sunčevu svjetlu. Nulti ishod često može biti rezultatom netočne procjene izloženosti. To je najčešće posljedica slabo osjetljivih upitnika korištenih u epidemiološkim studijama. Veliki je problem metodologije upitnika taj što točnost dobivenih podataka ovisi o kvaliteti pitanja i sjećanju onih koji na njih odgovaraju.

S obzirom da su svi ljudi izloženi sunčevu svjetlu, čudno je da rezultati epidemioloških studija ne pokazuju snažniju povezanost sa SMD-om. To je potaknulo skupinu istraživača da naprave metaanalizu studija koje su istraživale povezanost izloženosti sunčevu zračenju s rizikom za nastanak SMD-a, kako bi razriješili tu kontroverzu [66]. Urađena je metaanaliza pregledanih radova sa PubMed-a, WoS-a (Web of Science) i CNKI-a (The China National Knowledge Infrastructure), objavljenih do 25. ožujka 2012. godine. Od ukupno 465 epidemioloških radova u konačnici je 14 studija klasificirano pogodnima za visoke kriterije metaanalize (među njima je i naša ranije citirana studija) [121]. Rezultati metaanalize podržavaju hipotezu da je izloženost sunčevu svjetlu rizični čimbenik za nastanak SMD-a.

Dijeta i SMD

U nekoliko velikih studija istraživani su učinak antioksidantnih suplemenata i dijetetskih pripravaka na nastanak i razvoj SMD-a. Nizak dijetetski unos ili niska koncentracija antioksidansa u plazmi mogu biti povezani s razvojem SMD-a [123]. Visoka doza antioksidansa (vitamina C i E, β-karotena, cinka i bakra), preporučena u AREDS 1, povezana je sa smanjenjem rizika progresije SMD-a u kasni eksudativni oblik [82]. Dijeta bogata nehidrogeniziranim nezasićenim masnim kiselinama, cjelozrnatim žitaticama, obiljem voća i povrća te orašastim plodovima, ribom i odgovarajućim omega-3 masnim kiselinama uz fizičku aktivnost, izbjegavanje pušenja i održavanje tjelesne težine također se smatra zaštitnom od razvoja SMD-a [23,45,123]. Ipak multicentrična prospektivna studija AREDS 2 (koju je, kao i AREDS 1, sponzorirao Američki Nacionalni institut za zdravlje – *National Institutes of Health,)* nije pokazala pozitivan učinak omega-3 masnih kiselina na progresiju SMD-a tijekom petogodišnjeg praćenja [124].

1.1.5. Etiopatogeneza senilne makularne degeneracije

Još od kraja 19. stoljeća, od vremena Habba [8], SMD je veliki izazov u pogledu etiologije, patogenetskih mehanizama i liječenja.

Kao i drugi biološki procesi i nastanak i razvoj SMD-a pod utjecajem su velikog broja različitih čimbenika, što je prikazano u prethodnom poglavlju. Danas se općenito smatra da je SMD multifaktorijalna bolest koja se razvija u složenom međuodnosu okolišnih čimbenika i genetski zadane baze [59].

Trenutno nema znanstveno utvrđene etiologije SMD-a koja bi mogla služiti kao uporište preventivnoj medicini i liječenju.

Iako je u novije vrijeme veliki napredak postignut na polju genetskih istraživanja, nedostaje saznanja o temeljnim patološkim mehanizmima pa patogeneza SMD-a, unatoč intenzivnim bazičnim i kliničkim istraživanjima, zbog svog multifaktorijalnog karaktera, što uključuje složene interakcije imunogenetskih, biokemijskih i okolišnih čimbenika, na žalost ostaje i dalje nerazjašnjena [21,63,77,100,125,126].

Najnovija istraživanja upućuju na ključnu ulogu oksidacijskog stresa u nastanku SMD-a, što je do sada nedovoljno istraženo [21,22,28,63,77,100,101,127–132].

Brojna su neslaganja i o primarno pogođenom makularnom tkivu bez sigurnih patogenetskih osnova.

Određene promjene u makuli pripisuju se makularnom starenju.

Prije se mislilo da je SMD posljedica skleroze i obliteracije koriokapilarisa u makularnoj regiji [133]. Promjene korioideje zaista se primjećuju u starijoj životnoj dobi, no prema brojnim istraživačima, atrofija koriokapilarisa je sekundarna, kao i iščeznuće fotoreceptora [133,134], a

javljaju tek kad je uništen RPE s kojim su funkcionalno povezani. Dokaz za to su laboratorijska istraživanja na zečevima, koja su pokazala da nakon injekcije natrijeva jodata, koji selektivno uništava RPE stanice, sekundarno atrofira i koriokapilaris [135,136].

Iako se glavne abnormalnosti zatječu u četirima funkcionalno povezanim tkivima (fotoreceptorima, RPE-u, Bruchovoj membrani i koriokapilarisu), oštećenje RPE stanica rani je i ključni događaj, na molekularnoj razini koji vodi prema klinički relevantnim SMD promjenama. RPE stanice progresivno degeneriraju, što rezultira progresivnom ireverzibilnom degeneracijom i s njima povezanih fotoreceptora i koriokapilarisa. Dakle, iako sljepoća uzrokovana SMD-om nastaje zbog degeneracije vidnih stanica, primarni je događaj uništenje RPE stanica.

Istraživanja Sarksa [133] i Younga [134] i mnogih drugih autora [22,38,53,77,125,137,138] daju također, bez dvojbe, primat RPR-u. Young [139] razvija svoj koncept biološke obnove, temeljen na odbacivanju vanjskih dijelova fotoreceptora koje fagocitiraju RPE stanice. U tijeku molekularne obnove RPE stanice neprestano razgrađuju golemu količinu membranskog materijala koji svakodnevno odbacuju štapići i čunjići, kao i svoje strukturne dijelove i čiste ih putem koriokapilarisa [38]. Životni je ciklus RPE stanica neprekinuti tijek zahvaljujući neprestanoj unutarstaničnoj biološkoj obnovi. Sve komponente stanica mogu se ponovo sintetizirati osim DNK i nekih histona povezanih s DNK [134,139].

Zašto RPE stanice bivaju progresivno oštećene?

Postoji pretpostavka o staničnoj nesavršenosti zbog nepotpune molekularne razgradnje temeljene na načelu molekularnog neprepoznavanja oštećenih molekula fotoreceptora od strane razgradnih lizosomalnih enzima RPE stanice [139]. U normalnim okolnostima degradacija fagocitiranog materijala provodi se tako da se okružen membranama u obliku vezikula spaja s lizosomima i lizosomni enzimi ga razgrađuju na male molekule koje mogu difundirati vani iz stanice ili se mogu ponovno koristiti u sintetskim putevima.

Oštećene molekule fotoreceptora ne mogu doseći aktivno mjesto na staničnim razgradnim enzimima i molekularna degradacija se ne može dogoditi, a nerazgrađeni materijal unutar digestivnih vakuola ostaje kao trajni nekoristan sastojak unutar lizosoma RPE stanica u obliku rezidualnih tjelešaca – lipofuscina, s progresivnim nakupljanjem, počevši od najranije dobi i nastavljajući tijekom čitavog životnog vijeka. Ta je degradacija u SMD-u nepotpuna zbog toga što su supstrati za lizosomne enzime (odbačeni membranski otpad vanjskih segmenata fotoreceptora) oštećeni štetnim učinkom svjetlosnog zračenja i kisika mehanizmom fotooksidacije. Molekularna se oštećenja tih membrana procesom fagocitoze prenose na RPE stanice.

Citoplazma RPE stanica progresivno se pretrpava tim nekorisnim otpadom. Kad ispunjenost citoplazme dosegne prag pri kojem normalni stanični metabolizam RPE stanica biva ugrožen, nastaje pražnjenje materijala kroz bazu stanice. Taj se membranski otpad zajedno s proizvodima vlastite autodigestije RPE stanica difuzno taloži na bazalnoj membrani RPE-a kao bazalni laminarni depoziti (BlamD), ili između bazalne lamine RPE stanica i unutarnjeg kolagenog sloja Bruchove membrane (BM) kao bazalni linearni depoziti (BlinD) [140]. Daljnje oštećenje

RPE-a povezano je s otpuštanjem membranskog otpada u obliku vezikula na površinu unutarnjeg kolagenog sloja BM-a, što se klinički očituje druzama, koje se smatraju početkom razvoja SMD-a i njezin su zaštitni znak (engl. *hallmark*) [28,53,77,113,134,135,137].

Poremećena izmjena tvari između RPE-a i korioidalne cirkulacije zbog nakupljanja staničnog otpada rezultira uništenjem RPE stanica i s njima funkcionalno povezanih fotoreceptora i koriokapilarisa. Tako nastaje suhi oblik SMD-a, GA.

Taj akumulirani membranski otpad, osim što interferira s normalnom metaboličkom aktivnošću RPE-a, rezultira stvaranjem lokalnog upalnog i imunološkog odgovora na staničnoj i molekularnoj razini i potiče migraciju proangiogenih mehanizama (neutrofila, makrofaga, mastocita, aktivatora mikroglije) [113] koji su svi, uz RPE, sposobni proizvoditi i otpuštati niz proangiogenih čimbenika, uključujući i vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF) [113,141,142], te su, uz prisutnu hipoksiju, stimulatori korioidalne neovaskularne invazije u sub-RPE i subretinalni prostor. Smatra se da je angiogeneza rezultat ravnoteže između stimulatora i inhibitora angiogeneze. U RPE-u je identificiran i moćni inhibitor angiogeneze izveden od RPE stanica (engl. *Pigment Epithelium Derived Factor* – PDEF) [113]. Seceniraju ga same RPE stanice, a smatra se ključnim čimbenikom za održavanje avaskularnom rožnice, vitreusa i vanjskih slojeva retine.

Neravnoteža između stimulatora endotelne proliferacije (VEGF-a) i inhibitora endotelne proliferacije (PEDF-a) u RPE stanicama uzrokovana ponajprije oksidacijskim stresom, može rezultirati disregulacijom endotelijalne stanične proliferacije i razvojem CNV [28,113,142,143]. Novostvorene krvne žile imaju sposobnost erodiranja puta kroz BM. Sklone su krvarenju i transudaciji. Tekućina se širi prema mjestu već otprije oslabljenog kontakta između RPE-a i BM-a. Integritet RPE stanica, čvrsti spojevi (engl. *tight junction*) i *zone okludens* između RPE stanica u normalnim okolnostima, sprječavaju daljnji prolaz transudata ispod senzorne retine. Zakazivanje ionskog crpnog mehanizma u degeneriranom RPE-u, u slučaju SMD-a, može biti uzrokom nakupljanja tekućine ispod RPE-a, što se klinički manifastira kao njegovo serozno odignuće [135]. Uz to progresivno nakupljanje lipida i lipoproteina na BM-u, čini ga hidrofobnim i onemogućava prolaz tekućina kroza nj, što rezultira dodatnim nakupljanjem tekućine između RPE-a i BM-a [135].

Serozni eksudat i krv mogu također proći kroz defekte u odlijepljenom RPE-u subretinalni prostor i uzrokovati serozno odignuće senzorne retine. Posljedica je toga naglo propadanje RPE-a i vidnih stanica (odnosno vlažni oblik SMD-a).

Novostvorene krvne žile i prateće vezivno tkivo i u fibroblaste metaplazirane RPE stanice, uz krvarenja i eksudaciju, u konačnici stvaraju između BM-a i RPE-a, a poslije između toga i preostalih unutarnjih slojeva mrežnice, disciformnu vezivnu tkivnu ploču. Vanjski slojevi mrežnice potpuno propadaju. Unutarnji slojevi cijele gliozno sa zadebljanom čahurom vezivnog tkiva. U tom slučaju vid je mnogo više oštećen nego u GA-u.

Fotoreceptori su, kao i RPE stanice, postmitotičke stanice [28] i jednom uništene ne mogu se nadomjestiti novim stanicama.

1.2. Starenje makule

Određene promjene u makuli pripisuju se makularnom starenju pa se SMD smatra uznapredovalim stadijem procesa starenja uz dodatne patološke promjene. Pigmentne promjene i sitne druze često se, ali u blažem obliku, opažaju u očima gotovo svih osoba starije dobi, ali samo u nekih one progrediraju do stadija stanične smrti i gubitka funkcije te prelaze u bolest. Normalno je starenje povezano s biološkim i histološkim promjenama u fotoreceptornim i RPE stanicama, BM-u i koriokapilarisu. Starenje i SMD dijelom se preklapaju.

U biokemijskim je studijama [28,128] pokazano da je 65 % proteina prisutnih u druzama u SMD-u isto kao u zdravih osoba iste dobi, a da ih se samo 35 % razlikuje, što upućuje na određenu vezu (kontinuitet) između procesa starenja i SMD-a, ali i određene razlike [28,144].

1.2.1. Starenje Bruchove membrane

Starenjem se mijenjaju i sastav i propusnost BM-a. Membranski otpad i vezikule akumuliraju se u njezinu unutarnjem kolagenom sloju. Zbog povećanog stvaranja i smanjene degradacije izvanstaničnoga materijala (engl. *Extracellular Matrix* – ECM) nastaje zadebljanje BM-a od prosječno 2 μm pri rođenju do 4 – 6 μm u 10-oj dekadi života [28,145]. Smanjuje se funkcionalna veličina pora u unutarnjem kolagenom sloju, što otežava difuziju molekula kroz BM [28]. Nastaje hijalinizacija, povišena bazofilija i promjena u sastavu proteina (s godinama se povećava križno vezanje proteina, engl. *cross-linking*) BM-a, a nakon 40-ih godina počinje i jača akumulacija lipida, što povećava hidrofobicitet BM-a i smanjuje njegovu hidrauličnu konduktivnost [28]. Elastinski sloj se s godinama stanjuje, postaje više porozan, kalcificira se i fragmentira [28]. Taj sloj normalno čini prepreku (barijeru) rastu krvnih žila između koroideje i sub-RPE prostora, pa te promjene mogu dopustiti rast CNV-a.

Smanjenje permeabilnosti i povećanja hidrofobiciteta s eksponencijalnom redukcijom hidraulične provodljivosti BM-a uzrokuje ometanje izmjene nutrijenata i otpadnih proizvoda između korioideje i RPE-a.

1.2.2. Starenje koriokapilarisa

S dobi se smanjuje gustoća koriokapilarisa i dijametar lumena kapilara, a povećava širina interkapilarnih pilara. Korioidalni protok krvi submakularno se smanjuje [146]. Progresivno se smanjuje i debljina korioideje od 200 μm pri rođenju do 80 μm u 90-im godinama života [145].

1.2.3. Starenje RPE stanica

S godinama se smanjuje gustoća RPE stanica, osobito u makuli i one gube svoj heksagonalni oblik [28,144].

U studijama je pokazano da se gustoća RPE stanica smanjuje prosječno 0.3 % sa svakom godinom života [147]. Starenjem se, kao što je prije rečeno, nakuplja neprobavljeni odbačeni membranski otpad vanjskih segmenata fotoreceptora u obliku lipofuscina u RPE stanicama. Lipofuscin čini 1 % volumena citoplazme RPE stanica u prvom desetljeću života i 19 % u 80-im godinama [28]. Redukcija u funkcionalnom citoplazmatskom volumenu može kompromitirati funkcije RPE stanica. Starenjem RPE stanice pokazuju lizosomnu destabilizaciju i ekstenzivan gubitak mitohondrijske aktivnosti [148]. Starenjem se također smanjuje količina melanina u RPE stanicama.

1.2.4. Starenje fotoreceptora

Vanjski segmenti fotoreceptora u starijih osoba često pokazuju presavijanja i iregularnost u slaganju diskova sa spiralnim uzorkom.

Najranjivijim retinalnim stanicama smatraju se štapići i plavo osjetljivi čunjići. Tijekom 90 godina životnog vijeka gubi se približno 30 % štapića unutar 4 mm od foveolarnog centra [82]. Najveći je gubitak štapića između 0.5 i 3 mm od foveolarnog centra [82]. U toj regiji nastaju i prve promjene povezane sa SMD-om [82].

Od tri tipa čunjića najviše se starenjem smanjuje broj za plavo osjetljivih čunjića (B-čunjića) [82], koji najviše stradaju zbog ponavljane izloženosti svjetlu. B-čunjića, kao i štapića, nema u samom centru foveole [82], ali su brojni uzduž nagiba foveolarne depresije. Pretpostavlja se da foveolarne čunjiće (crvene i zelene) od propadanja štiti žuti makularni pigment (MP) (koji apsorbira plavo svjetlo).

1.3. Oksidacijski stres

Što je uzrok makularnog starenja? Koji je od ovih procesa starenja upleten u patogenezu SMD-a ili u kojem stupnju postaje patogen? Što uzrokuje da prirodan proces starenja skrene u bolest? Zašto je uništenje RPE stanica mnogo brže u nekih osoba predisponiranih za ranu pojavu SMD-a, a u drugih osoba se ne javlja? Što uzrokuje molekularno oštećenje RPE stanica?

Odgovor na sva postavljena pitanja mogao bi se svesti na samo dvije riječi: **oksidacijski stres**.

Gubitak vida zbog SMD-a jest nesreća starenja, ali prirodni tijek bolesti počinje rano u životu. Sa svakom minulom godinom povećava se mogućnost da progresivno oštećenje interferira s gubitkom vida, signalizirajući da starenje prelazi u bolest.

Starenje je neizbježna posljedica temeljnih prirodnih zakona, međutim brzina kojom se događa nije. Smatra se da je starenje rezultat međuodnosa čimbenika koji potiču propadanje stanica i onih koji to suzbijaju. Glavni antisenescentni proces, koji djeluje na održavanje prirodne strukture molekula i obnavlja ih nakon oštećenja, jest biološka obnova. Danas se smatra da su kisik i svjetlo, dva temeljna entiteta svega života na Zemlji, mehanizmom oksidacijskog stresa glavni čimbenici koji imaju udjela i u procesu starenja i da su odgovorni za nastanak SMD-a.

Kisikove reaktivne vrste (engl. Reactive Oxygen Species – ROS), koje nastaju kao štetne nuspojave temeljnih životnih procesa, postupkom oksidacije mogu uništiti svaku biološku molekulu pa tako prouzročiti i oštećenje mrežnice. Sunčeva svjetlost, koja uzrokuje oštećenja u svim djelovima tijela koji su joj izloženi (koži i očima), pojačava oksidacijsko oštećenje dodatno stvarajući ROS kao okolišni sučimbenik u nastanku SMD-a.

Rezultati najnovijih studija [22,77,101,127,131,132] ukazuju da bi oksidacijski stres mogao biti uključen u patogenezu SMD-a i kao etiološki čimbenik i kao patogenetski mehanizam, što je do sada nedovoljno istraženo. S obzirom na to da oksidacijski stres uključuje gotovo sve pretpostavljane patogenetske mehanizme i gotovo sve poznate čimbenike rizika za SMD, mogao bi biti ključan za injiciranje bolesti i njenu progresiju. Oksidacijski stres najpotpuniji je pristup za objašnjenje patogeneze SMD-a, čak i za lokalizaciju u makuli. Prekomjerno stvaranje slobodnih radikala (SR) i drugih ROS-a i neravnoteža između njihova stvaranja i mogućnost njihove razgradnje obrambenim antioksidacijskim sustavom organizma čini se da su najodgovorniji za razvoj SMD-a.

1.3.1. Oksidacijski stres – poremećaj oksidacijsko-redukcijske ravnoteže

Oksidacijski je stres poremećaj u ravnoteži oksidacijsko-redukcijskih procesa u organizmu, pri čem je pomak ravnoteže usmjeren prema oksidaciji [101,132,149,150].

Oksidacijski procesi su dio bioloških staničnih funkcija [101,132,149,150]. Stanje biokemijske ravnoteže ovisi o delikatnoj ravnoteži između stvaranja SR kisika i drugih ROS-a i mogućnosti njihove razgradnje antioksidacijskim sustavom organizma. Ako se ravnoteža poremeti, reaktivne molekule kisika, bilo da potječu od endogenih (stvorene unutar staničnog sustava) ili egzogenih izvora mogu injicirati citotoksične reakcije u stanicama s devastirajućim rezultatima, mijenjajući strukturu i funkciju bioloških molekula (lipida, proteina i DNK) [149,150]. Prekomjerna oštećenja nastala nekontroliranom oksidacijom mogu prouzročiti apoptozu, programiranu smrti stanice, koju stanica sama započne kad je oštećenje nemoguće popraviti.

Danas se smatra da su i sam proces starenja, kao i brojna patološka stanja (kardiovaskularne bolesti, karcinomi, infektivne i reperfuzijske ozljede, neurodegenerativne bolesti, dijabetes i

autoimune bolesti, kao i mrena i SMD i dr.), povezani s oksidacijskim stresom i njegovim biokemijskim posljedicama [149,151,152].

Kako to da su organizmi nesavršeni?

Prije se može reći da u pitanju može biti manjkavost antioksidacijskog obrambenog sustava (npr. manjak antikosidacijskih enzima) ili povećani oksidacijski stres uzrokovan vanjskim čimbenicima. Ako je visoka izloženost egzogenim izvorima oksidansâ, obrambeni se antioksidansi ne će moći nositi s izazovom.

1.3.2. Reaktivne kisikove vrste

Glavni je razlog toksičnosti kisika njegovo svojstvo stvaranja reaktivnih vrsta – ROS-a. Kisikovi radikali mogu uzrokovati lipidnu peroksidaciju, oštećenje DNK i proteina te oksidirati gotovo svaku organsku molekulu [149]. S druge strane ROS imaju neprijepornu važnost u mnogobrojnim procesima, primjerice u unutarstaničnoj signalizaciji, proliferaciji, apoptozi te imunosnom odgovoru.

ROS je zajednički naziv za SR kisika i reaktivne neradikalne derivate kisika. U ljudskom se organizmu ROS stvaraju neprestano tijekom oksidacijske fosforilacije kao nusproizvodi normalnog unutarstaničnog metabolizma u mitohondrijima [101,132,149].

Sva aerobna živa bića (ljudi, životinje, biljke i aerobne bakterije) ne mogu opstati bez kisika, a on je, s druge strane, opasan za njihovo postojanje [153].

Aerobna živa bića trebaju kisik za djelotvornu proizvodnju energije u elektronskom prijenosnom lancu u mitohondrijima (poguban učinak inhibicije tog procesa cijanidima govori u prilog njegovoj važnosti), ali taj proces neminovno stvara ROS [149].

Prvi je Gershman 1954. godine svojom teorijom slobodnih radikala upozorio na "tamnu stranu" kisika [154]. Ona se odnosi na činjenicu da svaki atom kisika ima jedan nespareni elektron u svojoj vanjskoj valentnoj ljusci, a molekula kisika dva nesparena elektrona. Tako je atom kisika slobodni radikal, a molekula kisika slobodni biradikal [127,149,155].

Usklađenom četverovalentnom redukcijom kisik, u mitohondrijskom elektronskom prijenosnom lancu, prelazi u bezopasnu molekulu vode, a nepotpuna postupna jednovalentna ili dvovalentna redukcija kisika stvara potencijalno štetne reaktivne spojeve superoksidni anion ($O_2^{-\cdot}$) ili peroksidni ion (O_2^{2-}) [101,149,150]:

$$O_2 \xrightarrow{+e^-} O_2^{-\cdot} \xrightarrow{+e^-} O_2^{2-} \rightarrow \text{peroksidni ion}$$

$$\downarrow$$

superoksidni anion

Reakcija prijenosa elektrona ili vodika s reducirajuće supstancije na oksidirajuće sredstvo (npr. kisik), pri čem reducirajuća supstancija oksidira (gubi elektron), a kisik se reducira (prima elektron) naziva se oksidacija [101,149,150]. Oksidacijskom reakcijom stvaraju se novi SR. Oni mogu opet, zauzvrat, pokrenuti lančanu reakciju, koja, kad se jednom pokrene, može uzrokovati oštećenje i smrt stanice.

U živom organizmu ROS se stvaraju na nekoliko načina [132,149]:

1. u mitohondrijima, tijekom procesa staničnog disanja, zbog "bijega" pojedinih elektrona u prijenosnom elektronskom lancu i nepotpune redukcije kisika (proces oksidacijske fosforilacije)
2. sintezom u stanicama imunološkog sustava, neutrofilima i makrofazima, posredstvom enzima (respiracijski prasak) [101,149]
3. u peroksisomima
4. pojačanom aktivacijom citokromnog enzima P 450
5. tijekom fagocitoze
6. u reakcijama oksidoredukcije u prisutnosti metala s promjenljivim valencijama
7. u procesu lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina
8. u upalnim stanjima i procesu reperfuzije [156]
9. prilikom napornog vježbanja itd.

Veliki je broj vanjskih čimbenika koji također mogu uzrokovati stvaranje ROS-a:

1. fotokemijske reakcije (djelovanje visokoenergetskog UV zračenja i plavog svjetla)
2. pušenje
3. djelovanje ionizirajućeg zračenja na biološke molekule
4. onečišćivači iz okoliša
5. lijekovi (u prvom redu citostatici)
6. sjedilački način života, loše životne navike, psihički stresovi i dr.

Mehanizmi nastanka ROS-a u živim organizmima [149]:

1. apsorpcijom energije, dovoljne da ”obrne” spin jednomu od nesparenih elektrona
2. monovalentnom redukcijom (prijenosom jednog elektrona)
3. u prisutnosti iona prijelaznih metala (Fe, Cu, Mn)

Oksidacijska fosforilacija

Oksidacijska fosforilacija metabolički je put koji se odvija na unutarnjoj membrani mitohondrija, energetskih staničnih centrala, čija je najvažnija uloga stvaranje adenozin trifosfata (ATP) korištenjem energije oslobođene oksidacijom nutrienata [101,148,150,154,157]. Tijekom oksidacijske fosforilacije u elektronskom prijenosnom lanacu hranjive se tvari oksidiraju, gube elektrone, koje prihvaćaju nosači elektrona nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+) i flavin adenin dinuklaotid (FAD). Oni procesom oksidacije elektrone prenose na molekule kisika (idealanog akceptora elektrona, zahvaljujući njegovu vrlo

jakomu oksidacijskomu potencijalu) u nizu redoksnih reakcija, stvarajući veliku količinu ATP-a. U mitohondrijima se proizvodi 95 % ATP-a [149]. Elektronski prijenosni lanac čini 90 % ukupne potrošnje kisika [149].

Oksidacijska fosforilacija jedan je od najbitnijih dijelova metabolizma, jer se oksidacijom nutrienata proizvodi energija neophodna za život, ali ona nužno oslobađa i ROS (ponajprije superoksidni anion), koji kontinuirano istječu iz prijenosnog lanca elektrona. Posebno je osjetljiv korak readukcija koenzima Q kompleksa III, jer podrazumijeva stvaranje visokoreaktivnog slobodnog radikala ubisemikinona [150].

Procjenjuje se da gotovo 1 – 2 % [157], odnosno prema drugim autorima [150] 1 – 3 % od svih elektrona koji prođu kroz respiratorni lanac završe kao superoksidni anion. Čovjek dnevno konzumira više od 250 g kisika, a pretpostavlja se da od toga 1 – 5 % bude pretvoreno u ROS [100].

Tako su se mikroorganizmi koji su se prilagodili povišenoj razini kisika u atmosferi susreli s novim problemom, zvanim ROS, koji su nastali kao nusproizvodi normalnog metabolizma.

Neki od važnih ROS-a u živućim organizmima i mehanizmi njihova nastanka [127,132,149]:

Slobodni radikali (SR):

Hidroksilni radikal ($OH^{\cdot}$)

Superoksidni radikal ($O_2^{\cdot -}$)

Peroksilni radikal ($HOO^{\cdot}$)

Lipidni peroksilni radikal (LOO)

Neradikalne reaktivne kisikove vrste (ROS):

Vodikov peroksid (H_2O_2)

Singletni kisik ($^1O_2$)

Hipoklorna kiselina (HOCl)

Ozon (O_3)

$$O_2 \xrightarrow{+\,e^-} O_2^{\bullet -} \quad \text{(superoksidni anion)}$$

$$2\,O_2^{\bullet -} \xrightarrow{+\,2e^- + 2H^+} 2\,H_2O_2 \quad \text{(vodikov peroksid)}$$

$$H_2O_2 \xrightarrow{+ e^- + H^+} OH^\bullet + H_2O \quad \text{(hidroksilni radikal)}$$

$$xO_2 \xrightarrow{h\nu} {}^1O_2 \quad \text{(singletni kisik)}$$

1.3.2.1. Slobodni radikali

Gershman je, kao što smo ranije naveli, prvi upozorio da toksičnost kisika potječe od djelomično reduciranih oblika kisika [154], a Harman je 1956. godine ukazao na ulogu SR u procesu starenja [158].

SR svaka je kemijska vrsta sposobna za samostalan život, ma koliko on kratko trajao, koja u vanjskoj ljusci ima jedan ili više nesparenih elektrona [149]. Karakterizira ih iznimno visoka reaktivnost, kao rezultat njihova nastojanja da popune valentnu orbitalu, odnosno spare nespareni elektron i time postignu stabilnu elektronsku konfiguraciju. U živućim sustavima su najvažniji slobodni radikali kisika, iako postoje i drugi radikali u biološkim organizmima (dušikovi, ugljikovi, tiolni) [149].

Proces nastanka radikala u stanicama je neprekidan, "slučajan", vezan za normalne metaboličke reakcije (respiracijski lanac u mitohondrijima).

SR imaju kratak životni vijek [132,149]. Vrlo se lako vežu za sve strukture u svojoj neposrednoj okolini (kao što su npr. masti i proteini staničnih membrana), "kradući" im elektrone. Na taj način destabilizira se do tada stabilna molekula i ona postaje slobodni radikal, a reakcija može postati lančana.

Srednji radijus difuzije slobodnih radikala vrlo je malen (manji od 100 nm), a vrijeme trajanja poluživota u biološkim sustavima iznosi nekoliko mikrosekundi. Većinu SR u organizmu čine reaktivne vrste kisika: superoksidni anion ($O_2^{\bullet -}$), peroksilni radikal ($ROO^\bullet$) te hidroksilni radikal ($OH^\bullet$).

Radikali koji proizlaze iz kisika najvažnija su klasa radikalnih vrsta u živućim sustavima [150].

Slobodni radikali nastaju gubitkom jednog elektrona ili primanjem jednog elektrona od neradikala, cijepanjem kovalentnih veza ili apstrakcijom vodikova atoma. Ukoliko SR izgubi ili dobije jedan elektron, prestaje biti SR, kao i kada dva SR djeluju međusobno.

Utvrđeno je da SR uzrokuju brojne bolesti, uključujući i najraširenije bolesti razvijenih zemalja (aterosklerozu i rak), kao i čitav niz kroničnih degenerativnih bolesti, poput sive mrene, artritisa, autoimunosnih bolesti i preranog starenja [150,159].

Superoksidni anion

Nastaje u fiziološkim uvjetima uglavnom u mitohondrijima kako se kisik postupno reducira duž elektronskog prijenosnog lanca. Tijekom pretvorbe energije, ispušta se mali broj elektrona na kisik prerano, formirajući superoksidni radikal [149,150,157].

Može nastati i kao posljedica djelovanja imunosnog sustava organizma. Leukociti u okružju mikroorganizama ili nekih drugih patogena započinju stvaranje velikog broja superoksida. Aktivna fagocitoza leukocita povezana je sa superoksidnim radikalom. Kaže se da leukociti ubijaju fagocitiranu bakteriju "utapajući" je (imerzirajući je) u bazenu superoksidnog radikala i hidroksilnog radikala [149,150].

Vanjski su izvor tog štetnog radikala fotooksidacijski procesi i duhanski dim [149].

Superoksid je sam po sebitoksičan i može izravno oštetiti biološke molekule ili može reagirati s vodikovim peroksidom pri čem (u Haber – Weissovoj reakciji) nastaje vrlo toksičan hidroksilni radikal (151).

$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\bullet} + O_2 + OH^-$ (Haber – Weissova reakcija)

Hidroksilni radikal

Hidroksilni radikal ($OH^{\bullet}$) posebno je nestabilan i izrazito reaktivan, što ga čini vrlo opasnim radikalom s vrlo kratkim poluživotom *in vivo*, približno 10^{-9} s [150], koji brzo reagira s brojnim biološkim molekulama blizu svog mjesta nastanka. Nastaje od vodikova peroksida u prisutnosti željeznih iona u Fentonovoj reakciji (kao i u spomenutoj Haber – Weissovoj reakciji). U uvjetima oksidacijskog stresa višak superoksida otpušta "slobodno željezo" iz molekula koje ga sadržavaju. Otpušteno željezo Fe^{2+} može sudjelovati u Fentonovoj reakciji stvarajući iz vodikova peroksida visokoreaktivne hidroksilne radikale [101,148,149].

$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^- + OH^{\bullet} + Fe^{3+}$ (Fentonova reakcija)

Hidroksilni radikal najintrigantniji je kisikov radikal [149,153]. Ima nekoliko puta snažnije destruktivno djelovanje na stanice od superoksidnog radikala [149]. Izrazito je reaktivan i napada sve biološke molekule s kojima dođe u dodir (lipide, proteine, DNK).Taj slobodni radikal može trenutno pokrenuti lanac lipidne peroksidacije ili oksidirati DNK ili proteine. Oštećenjem DNK može prouzročiti mutacije ili karcinom, a oštećenjem proteina inhibiciju enzima, denaturaciju i degradaciju proteina [149].

Peroksilni radikal

Peroksilni radikal ($HOO^{\cdot}$) protonirani je oblik superoksidnog aniona ($O_2^{\cdot-}$) i obično se naziva hidroperoksilni radikal. Dokazano je da injicira peroksidaciju masnih kiselina [149].

1.3.2.2. Neradikalne reaktivne kisikove vrste

Neradikalni ROS sadržavaju puni broj elektrona ali u nestabilnom stanju, pa su zbog toga vrlo reaktivni.

Singletni kisik

Singletni kisik ($^1O_2$) ekscitirano je stanje kisika koje je mnogo reaktivnije od tripletnog stanja ($^3O_2$) u kojem se nalazi molekularni kisik u svom osnovnom stanju. Nastaje prijenosom apsorbirane energije s pobuđenog elektrona (pri njegovu povratku u osnovno stanje, u normalnu orbitalu) na molekulu kisika. Singletni kisik najčešće stvaraju fotosenzitivni pigmenti čiji elektroni apsorpcijom energije fotona prelaze u pobuđeno stanje. Vraćanjem u osnovno stanje otpuštaju višak energije sudarima (kolizijama), reradijacijom, ili prijenosom viška energije na molekulu kisika, podižući je iz osnovnog (tripletnog) stanja u više energetsko, visokoreaktivno singletno stanje obratom (inverzijom) spina. U singletnom stanju kisika u vanjskoj se ljusci nalaze dva elektrona antiparalelnih spinova. Opasan je za mnoge molekule jer je visokoreaktivan i ima relativno dugo poluvrijeme života, u usporedbi s drugim singletnim stanjima (do 72 sata). Singletni kisik po definiciji nije slobodni radikal (nema nespareni elektron), ali mu je skinuto spinsko ograničenje (restrikcija) koje smanjuje reaktivnost, tj. nastao je obrat spina i njegova je oksidirajuća sposobnost jako povećana [149,160]. Višak energije singletni kisik može trošiti "napadom" na organske molekule poglavito. molekule višestruko nezasićenih masnih kiselina (engl. *Polyunsaturated Fatty Acid* - PUFA) i pokrenuti lanac lipidne peroksidacije. Štetno djelovanje sunčeva svjetla (fotooksidacijom) najčešće se pripisuje učinku singletnog kisika.

Vodikov peroksid

Vodikov peroksid (H_2O_2) jak je i štetan oksidans [150]. Nastaje djelovanjem superoksidne dismutaze (SOD) koja katalizira dismutaciju superoksidnog radikala na molekulu kisika (oksidacija) i vodikov peroksid (redukcija). Iako nije slobodni radikal i ne sadržava nesparene elektrone (u Fentonovoj reakciji, kataliziranoj prijelaznim metalima – željeznim ili bakrenim ionima), može stvoriti mnogo štetniji, vrlo toksičan, hidroksilni radikal.

U Fentonovoj reakciji dvovalentni ion željeza (Fe2+) reagira s vodikovim peroksidom i prelazi u trovalentni ion željeza (Fe3+), a pri tom nastaje hidroksilni radikal i hidroksilni ion [149,150].

Vodikov peroksid topljiv je u mastima pa može djelovati na mjestima udaljenim od mjesta njegova stvaranja.

1.3.3. Toksični učinci reaktivnih kisikovih vrsta na biološke molekule

Prekomjerno stvaranje ROS-a rezultira oksidacijskim stresom koji može modificirati i oštetiti proteine i DNK te injicirati lančanu reakciju lipidne peroksidacije. Oksidacija DNK može imati za posljedicu nastanak mutacija i karcinogenezu. Osobito je izložena mitohondrijska DNK, u okruženju koje se smatra glavnim mjestom nastanka ROS-a. Lipidna peroksidacija, staničnih, jezgrinih i mitohondrijskih membrana oštećuje strukturalni i funkcionalni integritet stanice, uz to je izvor drugih citotoksičnih produkata (npr. malondialdehida – MDA i 4-hidroksi-2-nonenala, krajnjih produkata razgradnje lipida), koji dalje oštećuju membrane i enzime [149].

1.3.3.1. Oksidacijsko oštećenje lipida

Lipidna peroksidacija oštećenje je staničnih membrana toksičnim učinkom ROS-a. Cilj su peroksidacije PUFA, prisutne u fosfolipidima membrana. Zbog svojih mnogostrukih nezasićenih dvostrukih veza PUFA su izuzetno osjetljive na oštećenja uzrokovana ROS-om [161].

Lipidnu peroksidaciju najčešće pokreću hidroksilni radikal ($OH^{\bullet}$) ili singletni kisik, a superoksidni radikal je nedovoljno reaktivan za eliminaciju vodika iz PUFA [161]. Lipidnu peroksidaciju može aktivirati i fotooksidacija (preko singletnog kisika) [161]. Lipidna se peroksidacija odvija kroz tri faze: inicijaciju, propagaciju i terminaciju [161].

Injicijacija je pokretanje lančane reakcije oduzimanjem vodika s metilenske ($-CH_2-$) skupine PUFA-e djelovanjem SR-a (najčešće hidroksilnog). Pri tom nastaju slobodni lipidni radikali. Uzimanjem vodikovih atoma od PUFA-a nastali se radikali nastoje stabilizirati reorganizacijom molekula stvaranjem konjugiranih diena, koji spajanjem s molekularnim kisikom mogu stvarati peroksilne radikale ($LOO^{\bullet}$), koji mogu oduzimati vodik ($H^{\bullet}$) od druge molekule PUFA-e pri čem nastaju lipidni hidroperoksidi (LOOH) i novi lipidni slobodni radikal ($LO^{\bullet}$) koji kroz fazu propagacije nastavljaju i dalje šire reakciju lipidne peroksidacije (propagacijska faza). Na taj se način lipidna peroksidacija lančano širi i proces može imati 4 – 20 propagacija iz jedne injicijacije. U prisutnosti iona željeza lipidni hidroperoksidi (LOOH) disociraju na lipidne ($LO^{\bullet}$) i peroksilne ($LOO^{\bullet}$) radikale, koji uzrokuju reinicijaciju peroksidacije. Disocijacijom lipidnih hidroperoksida (LOOH) oslobađaju se krajnji razgradni proizvodi lipidne peroksidacije aldehidi (npr. MDA i dr.) Oni se vezuju za proteine i fosfolipide u membranama, što produbljuje oksidacijsko oštećenje biomolekula. Lančana se reakcija zaustavlja (terminacijska faza) kad se spoje dva radikala ili radikal s antioksidansom.

Stvarajući citotoksične kaskade lipidna peroksidacija troši vrijedne PUFA i producira oštećene molekule [149].

Posljedice su lipidne peroksidacije fragmentacija i povećanje rigidnosti lipidnih membrana, što smanjuje njihovu fluidnosti, uzrokuje opadanje vrijednosti membranskoga potencijala, povećanje permeabilnosti za vodikove i druge ione, gubitak funkcije kanala i unos velikih

količina Ca^{2+} u stanicu. Konačan rezultat je gubitak integriteta membrane s mogućnošću rupture stanice, otpuštanje njezina sadržaja i na kraju stanična smrt. Lipidna peroksidacija rezultira i inaktivacijom membranskih enzima, a može uzrokovati i oštećenje DNK [65,78,150].

Citotoksični krajnji razgradni proizvodi lipidnih peroksida aldehidi (npr. MDA), biološki vrlo aktivni, mogu uzrokovati stvaranje križnih veza (cross-linking) proteina i lipida što inaktivira mnoge dijelove stanice, uključujući membrane i enzime [149]. Serumski MDA može služiti i kao pouzdan biljeg oksidacijskog stresa.

1.3.3.2. Oksidacijsko oštećenje proteina

Utjecaj oksidacijskog stresa na proteine uzrokom je modifikacije i denaturacije proteina, agregacije, fragmentacija i križnog vezanja proteina, odcjepljenja polipeptidnih lanaca i pojačane osjetljivosti na proteolizu, nastanka karboksilnih skupina, gubitka katalitičke aktivnosti i inhibicije enzimske aktivnosti [101,128,149,150].

1.3.3.3. Oksidacijsko oštećenje DNK

Sve komponente DNK molekula mogu biti oštećene djelovanjem ROS-a: purinske i pirimidinske baze, kao i deoksiriboza [149]. Oksidacijsko oštećenje DNK može uzrokovati razgradnje baza, jednolančane lomove DNK i križno vezanje DNK i proteina. Stalno mijenjanje genetskog materijala kao rezultat oksidacijskog oštećenja za posljedicu može imati genetske mutacije, kromosomske aberacije, aktivaciju onkogena, deaktivaciju tumorskih supresivnih gena te ubrzanu stopu starenja. Pretpostavlja se da je proces starenja posljedica oksidacijske mutogeneze mitohondrijske DNK (mtDNK), kao i povećanog udjela skraćenja telomera DNK zbog oštećenja slobodnim radikalima [150,162,163]. Također se pretpostavlja da je i izdvajanja DNK u jezgri jedan od razloga izbjegavanja oksidacijskog oštećenja. Mitohondrijska DNK jače je osjetljiva na oštećenje djelovanjem ROS-a nego nuklearna DNK i njezina se oštećenja akumuliraju u stanicama s godinama starenja. Posebno je ranjiva na oksidacijsko oštećenje, prvenstveno zbog svoje blizine unutarnjim mitohondrijskim membranama (izvoru stvaranja ROS-a), nedostatka histona i slabih reparacijskih sposobnosti te je uz to cirkularna s visokom stopom transkripcije. Oštećenje mtDNK uzrokom je povećanja stvaranja ROS-a koji u začaranom krugu potiču daljnje oštećenje mitohondrija i mtDNK-a i ugrožavaju mitohondrijske funkcije [149,150,159]. Oštećenje mitohondija SR-om uzrokuje povećano stvaranje ROS-a i smanjenje metaboličke aktivnosti, što ometa optimalnu staničnu bioenergiju.

Oštećenje mtDNK posebno je pogubno za stanice koje se ne dijele, kao što su postmitotičke stanice, npr. stanice mozga, srca, fotoreceptori i RPE stanice. U njima se abnormalnosti mtDNK nakupljaju zbog nemogućnosti da se defekti replikacijom izgube [28].

1.3.4. Korisni učinci slobodnih radikala u organizmu

Slobodni radikali su poznati po dvostrukoj ulozi: kao štetne i korisne vrste [150]. Korisni učinci SR-a javljaju se u niskim koncentracijama.

Visoke razine ROS-a mogu biti štetne, uzrokujući staničnu smrt, ubrzavajući starenje i potičući razvitak dobno vezanih degenerativnih bolesti.

U malim količinama ROS imaju koristan učinak i neophodni su u mnogim biokemijskim procesima. Posreduju u stvaranju energije, fagocitozi, regulaciji staničnog rasta, indukciji staničnog starenja i apoptoze, indukciji mitogenog odgovora, sudjeluju u unutarstaničnoj i međustaničnoj signalizaciji (sekundarni su glasnici unutarstanične signalizacijske kaskade) te u obrani od mikroorganizama [149,150]. Uz to, što je izuzetno važno, pri povišenju razine ROS-a, stresnim signalima koji aktiviraju redoksno osjetljive signalne putove (metodom povratne sprege), uspostavljaju redoksnu ravnotežu.

Ta osjetljiva ravnoteža između korisnih i štetnih učinaka SR-a važan je aspekt aerobnog življenja i postiže se mehanizmom nazvanim redoksna regulacija [150]. Stoga život na zemlji ne bi mogao postojati bez sprege s antioksidacijskim obrambenim sustavom, koji prevenira nastanak oksidacijskog stresa te zamjenjuje i uklanja posljedice oksidacijskog stresa u stanicama [149,164].

1.4. Antioksidacijska obrana organizama

Kako preživjeti u tako "neprijateljskom" okruženju kisika?

Kad se kisik pojavio u dovoljnoj količini u atmosferi prije oko dvije i pol milijarde godina u prekambriju, zahvaljujući sposobnosti fotosinteze modrozelenih alga (cijanobakterija), mnogi su tadašnji anaerobni organizmi zbog oksidacije njihovih esencijalnih staničnih komponenti izumrli ili opstali ograničavajući se na okoliš koji ne dopušta penetraciju kisika [165]. Drugi su započeli evolucijski proces prilagodbe, razvijajući brojne antioksidacijske obrambene sustave zaštite od toksičnosti kisika i koristeći dobrobit aerobnog života (više energije po jedinici hrane) [165].

Život u oksigeniziranom okolišu zahtijeva djelotvorne stanične strategije otkrivanja i detoksifikacije štetnih metabolita kisika. Ne iznenađuje stoga da je priroda razvila brojne zaštitne antioksidacijske sustave.

Antioksidansi su raznolika skupina molekula koje su prisutne u niskim koncentracijama, u usporedbi s koncentracijama oksidacijskog supstrata, koje kontroliraju odnos između stanja redukcije i oksidacije u biološkim sustavima [149,164].

Antioksidansi neutraliziraju slobodne radikale, donirajući im svoj elektron, prekidajući na taj način lančanu reakciju "krađe" elektrona drugim molekulama. Donirajući svoj elektron antioksidansi ne postaju nestabilni, ne postaju SR.

Obrambeni mehanizam od toksičnosti učinka oksidacijskog stresa uključuju: staničnu kompartmentalizaciju (sektorizaciju), prevenciju stvaranja SR-a i uklanjanje (čišćenje) već nastalih SR-a te popravljanje oštećenja nastalih djelovanjem SR-a i drugih štetnih reaktivnih vrsta [101,149].

Organizmi su u uz to u mogućnosti prilagoditi se promjenama razine oksidacijskog stresa sintezom antioksidacijskih enzima i enzima za reparaciju.

Kompartmentalizacija

Kompartmentalizacija je odvajanje ROS-a od staničnih komponenti koje su osjetljive za oksidacijsko oštećenje [101]. Tako se npr. enzimi koji su uključeni u stvaranje vodikova peroksida (H_2O_2) nalaze u peroksisomima koji imaju visok sadržaj antioksidacijskih enzima i koji rabe H_2O_2 za druge oksidacijske reakcije unutar iste organele, onemogućavajući njegovo štetno djelovanje.

Prevencija stvaranja i uklanjanje slobodnih radikala

Živi organizmi sintetiziraju niz antioksidacijskih enzima: superoksidnu dismutazu (SOD), glutationsku peroksidazu (GPx) i katalazu (CAT), koji čine prvu crtu antioksidacijske obrane organizma. Neenzimsku obranu čini veliki broj endogenih spojeva niske molekularne mase (glutation, proteini, transferini i feritini, celuloplazmini i mioglobini, melatonin, urati, bilirubin, reducirani CoQ_{10} i tioli), kao i različiti antioksidacijski mikronutrijenti koji se u organizam unose hranom (β-karoteni, tokoferol, askorbinska kiselina, karotenoidi, polifenoli, fenoli, flavonoidi, tiamini i lignini) [149]. Uloga je navedenih antioksidansa onemogućiti stvaranje novih ROS-a ili presresti i onesposobiti već stvorene.

Popravak oštećenja nastalih djelovanjem SR-a

Kako unatoč svemu ipak nastane oksidacijsko oštećenje, organizam posjeduje niz reparacijskih enzima (proteaza, lipaza, transferaza te enzima za popravak DNK), koji popravljaju i uklanjaju oštećenja biomolekula (proteina i lipida i DNK) [149].

Popravak DNK uključuje, na primjer, zamjenu distorziranih dijelova spirala (heliksa) djelovanjem DNK polimeraza i popravak oštećenja baza pomoću DNK glikozilaza. Oksidirane aminokiseline popravljaju se proteinskom razgradnjom i resintezom novih proteina, a postoji i mehanizam za uklanjanje oksidiranih masnih kiselina iz membranskih lipida [149].

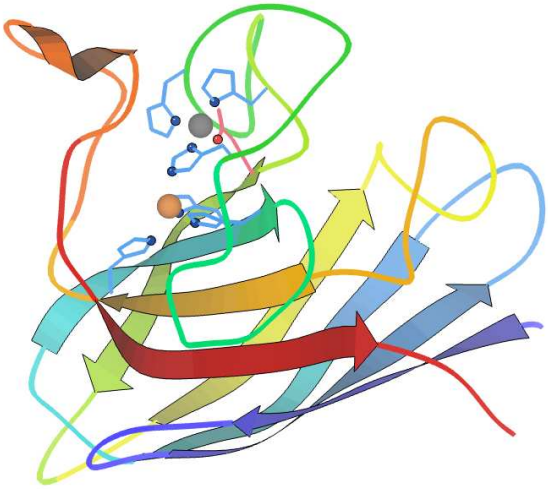
Različiti su antioksidacijski sustavi komplementarni jedni drugima, jer različitim mehanizmima djeluju na različite oksidanse i u različitim dijelovima stanica [100,149].

1.4.1. Enzimski antioksidansi

Tri ključna enzima koji uklanjanju ROS iz stanica svih aerobnih organizama su superoksidna dismutaza (SOD), glutationska peroksidaza (GPx) i katalaza (CAT). Oni čine prvu crtu antioksidacijske obrane, u kojoj je vrlo teško razdvojiti njihovo međusobno djelovanje [149,150,165].

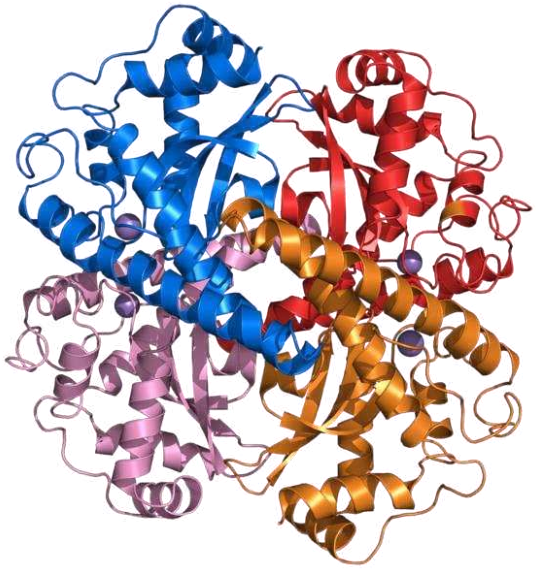
1.4.1.1. Superoksidna dismutaza

Enzim SOD otkrili su 1969. godine Mc Cord i Fridovich [166,167]. On katalizira razgradnju superoksidnog aniona (oduzimajući mu ekstra elektron, kao da skida bombi detonator) na vodikov peroksid i molekularni kisik, ubrzavajući tu detoksikacijsku reakciju otprilike 10 000 puta [168]. SOD se nalazi u gotovo svim aerobnim stanicama i izvanstaničnim tekućinama. U sisavaca se pojavljuje u trima izoformama koje se međusobno razlikuju prema smještaju u stanici i vrsti metalnog kofaktora, koji se nalazi u njegovu aktivnom središtu [149]. Izoenzim SOD1 (CuZnSOD) nalazi se u citosolu (peroksisomima), a u središtu sadržava ione bakra (Cu) i cinka (Zn) (slika 1).

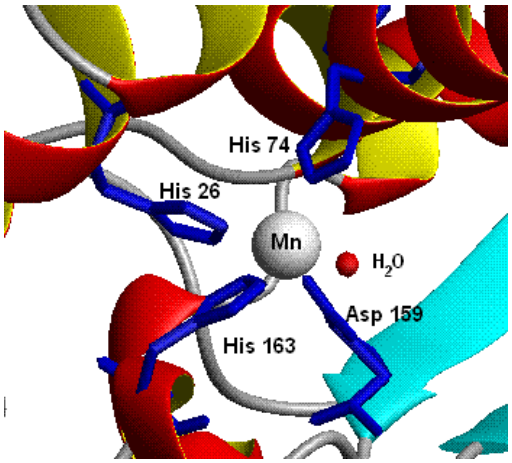


Slika 1. Shematski prikaz strukture ljudske superoksidne dismutaze – CuZnSOD (SOD1). Preuzeto iz Wikipedije, autor: Dcrjsr, CC BY 4.0.
http://en.wikipedia.org/wiki/File:2c9v_CuZn_rib_n_site.png

SOD2 (MnSOD) (slike 2 i 3) se nalazi u matriksu mitohondrija, a svaka od četiriju podjedinica tetramera sadržava po jedan atom mangana (Mn).

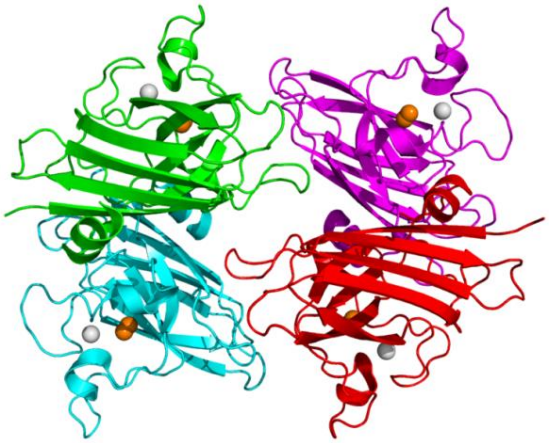


Slika 2. Shematski prikaz strukture tetramera ljudske mitohondrijske superoksidne dismutaze –MnSOD (SOD2), manganovi ioni prikazani su ljubičastim kuglicama. Preuzeto iz Wikipedije, autor: Fvasconcellos (*public domain*).
https://en.wikipedia.org/wiki/File:Superoxide_dismutase_2_PDB_1VAR.png



Slika 3. Aktivno mjesto ljudske mitohondrijske superoksidne dismutaze MnSOD (SOD2). Preuzeto iz Wikipedije, autor : Federico Cisnetti (*public domain*).
http://en.wikipedia.org/wiki/File:SODsite.gif

Izoenzim SOD3 (ECSOD) (slika 4) izvanstanični je SOD, koji štiti izvanstanični prostor od štetnog učinka superoksidnog radikala, a kao kofaktore također sadržava ione bakra i cinka.



Slika 4. Kristalografska struktura izvanstanične superoksidne dismutaze (SOD3), narančaste kuglice predstavljaju bakrene, a sive cinkove katione. Preuzeto iz Wikipedije, autor: Boghog (*public domain*). https://en.wikipedia.org/wiki/File:SOD3_2JLP.png

Čini se da je mitohondrijski SOD2 najvažniji od svih. Miševi kojima od rođenja nedostaje taj izoenzim ugibaju ubrzo nakon rođenja zbog izuzetno jakog oksidacijskog stresa [148,157,169]. Miševi koji nemaju SOD1 preživljavaju [170], ali s brojnim oboljenjima (rak jetre, neurološke bolesti i dr.) i smanjenjem životnog vijeka te razviju promjene fenotipski slične SMD-u (druze, CNV), dok miševi bez izvanstaničnoga SOD-a (SOD3) imaju minimalne defekte (osjetljivost na hiperoksiju).

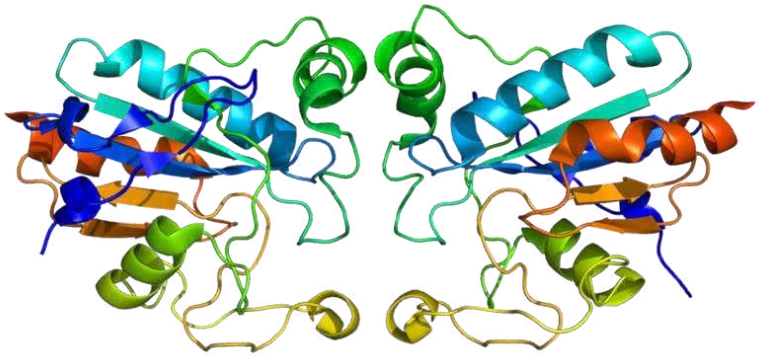
Gen koji kodira CuZn-SOD smješten je na kromosomu 21, a gen za MnSOD (SOD2) nalazi se na kromosomu 6. Trisomija 21, Downov sindrom, povezana je s povećanjem CuZnSOD-a [149].

Razgradnjom superoksidnoga radikala djelovanjem SOD-a nastali vodikov peroksid, koji je jak i sam po sebi štetan oksidans, u Fentonovoj reakciji [149,150], može stvoriti drugu, mnogo štetniju vrstu – hidroksilni radikal, danas najmoćniji oksidans.

Zbog toga SOD djeluje u suradnji s drugim dvama enzimima GPx-om i CAT-om, koji razgrađuju vodikov peroksid na vodu i molekularni kisik.

1.4.1.2. Glutationska peroksidaza

Taj se enzim nalazi u svim eukariotskim stanicama. Djeluje u citosolu, ali i u mitohondrijima (do 40 % ukupne enzimske aktivnosti). Postoji više izoenzima GPx-a koji se razlikuju po smještaju unutar stanice (ili izvan nje) te afinitetu prema specifičnom supstratu (slike 5 i 6). GPx u svom aktivnom središtu sadržava atom selena (Se) [65,149].



Slika 5. Prikaz strukture glutationske peroksidaze (GPx1 izomer kojeg nalazimo u citoplazmi stanica i mitohondrijima). Preuzeto iz Wikipedije, autor: Emw, CC BY- SA 3.0. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Protein_GPX1_PDB_2f8a.png



Slika 6. Struktura glutationske peroksidaze (GPx4 izomer s posebnim afinitetom za lipidne hidroperokside). Preuzeto iz Wikipedije, autor: Emw, CC BY- SA 3.0. https://en.wikipedia.org/wiki/File:Protein_GPX4_PDB_2gs3.png

Nedostatak GPx-a u miševa je uzrokom skraćenja životnog vijeka i hemolitičke anemije.

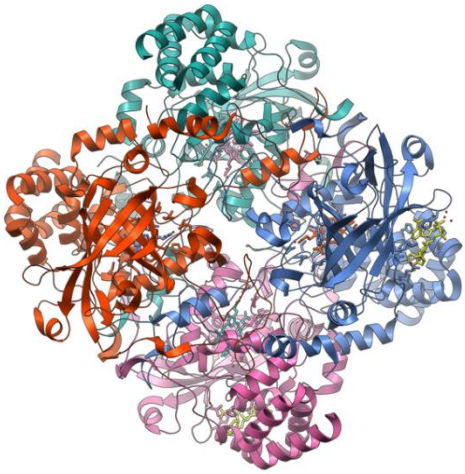
GPx katalizira reakciju redukcije vodikova peroksida nastalog djelovanjem SOD-a, razgrađujući ga na vodu i molekularni kisik u prisutnosti reduciranog oblika glutationa (GSH), koji služi kao *donor* vodika, tj. *donor* elektrona [101]. Odgovorna je za razgradnju najvećeg dijela H_2O_2 u stanicama. Tako završava detoksikacijsku reakciju koju je pokrenuo SOD. Također uklanja toksične lipidne perokside (reducira ih na hidroksilnu kiselinu) i citotoksične aldehide krajnje produkte lipidne peroksidacije, reducirajući ih na odgovarajuće alkohole [149,171].

$$H_2O_2 + 2GSH \text{ (reducirani glutation)} \xrightarrow{GPx} 2H_2O + GSSG \text{ (oksidirani glutation)}$$

$$LOOH + 2GSH \xrightarrow{GPx} LOH + H_2O + GSSG$$

1.4.1.3. Katalaza

Katalaza također katalizira konverziju vodikova peroksida na vodu i kisik, koristeći kao kofaktor željezo (Fe) ili mangan (Mn) (slika 7). Taj je enzim lokaliziran u peroksisomima u većini eukariotskih stanica [65,149,150].



Slika 7. Struktura enzima katalaze. Preuzeto iz Wikipedije, autor: Emw, CC BY- SA 3.0. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Catalase_Structure.png

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{CAT} O_2 + H_2O$$

Jedan je od najrasprostranjenijih enzima u prirodi, nalazi se u svim živim organizmima. Odgovorna je za razgradnju peroksida isključivo u uvjetima oksidacijskog stresa. U mitohondrijima se nalazi u zanemarivoj količini. Osobito je aktivna u hepatocitima i eritrocitima, a malo u mozgu i srcu. Građena je od četiriju podjedinica, od kojih svaka u aktivnom središtu ima hem skupinu. Gen za katalazu nalazi se na kromosomu 11 [149].

Usprkos njezinoj vidljivoj važnosti u otklanjanju vodikova peroksida, ljudi s genetskim nedostatkom katalaze (akatalazemija) ili miševi iz genetskog inženjeringa s potpunim nedostatkom katalaze ne pokazuju znatnije patogenetske promjene [149].

1.4.2. Neenzimski antioksidansi

Drugu crtu antioksidacijske obrane čine molekule niske molekularne mase. One pomažu djelovanje enzimskih antioksidansa. Tu se ubrajaju ranije spomenuti proizvodi normalnog metabolizma (glutation, ubikvinol, mokraćna kiselina, bilirubin, albumini i dr., vidi prije) kao i niskomolekularni antioksidacijski mikronutrienti (vitamini E i C, karotenoidi, fenoli, polifenoli i dr.) [149].

Zanimljivo je da mnogi od tih antioksidansa mogu u određenim okolnostima funkcionirati kao prooksidansi (C vitamin, mokraćna kiselina) [172].

Ukratko ćemo se osvrnuti na djelovanje nekih od neenzimskih antioksidansa. Pojedini od njih djeluju putem više mehanizama, koji se međusobno dopunjuju. Mnoge od tih interakcija još nisu u potpunosti razjašnjene.

Glutation

Glutation je tripeptid sastavljen od triju aminokiselina: glicina, glutamata i cisteina. Zbog vrlo reaktivne sulfihidrilne skupine (-SH) važan je unutarstanični antioksidans. Najveća količina glutationa intracelularno je u reduciranom stanju (GSH). Djelotvoran je u uklanjanju H_2O_2 i hidroksilnog radikala te štiti od inhibitornog učinka H_2O_2 na membransku kloridnu provodljivost [173]. Uz to je upleten u modulaciju aktivnosti nekoliko enzima. Kofaktor je glutation peroksidaze.

Osim navedenoga, brojne male molekule funkcioniraju kao endogeni antioksidansi, među kojima se izdvaja mokraćna kiselina, koja ima najveći udio u ukupnom antioksidacijskom statusu (TAS) u ljudskom serumu ili plazmi.

Mokraćna kiselina

Unatoč tomu što je glavni antioksidans u ljudskoj plazmi, mokraćna kiselina (MK) također korelira s razvojem debljine, hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti, stanja koja su povezana s oksidacijskim stresom [174]. Ona je krajnji proizvod razgradnje purinskih baza u ljudi i velikih majmuna, kod kojih je tijekom evolucije izgubljen gen za enzim uratnu oksidazu (urikaza), koji u drugih sisavaca katalizira konverziju MK-a u alantoin koji se izlučuje urinom. Posljedica je toga da se u ljudi nalazi povećana razina MK-a u krvi. To je s jedne strane pružilo evolucijsku prednost predcima homosapiensa (MK je snažan čistač SR-a, zaštita od oksidacijskog oštećenja stanica, produljenje životnog vijeka, zaštita od karcinoma). S druge strane pri visokim vrijednostima MK-a s oksidansima može stvarati druge radikale koji mogu stvarati lančane reakcije i oksidacijsko oštećenje stanice. Uz to MK-a može sudjelovati kao biološki aktivan proinflamatorni čimbenik i na taj način povećati unutarstanično stvaranje oksidansa. Mokraćna

je kiselina antioksidans samo u hidrofilnom okolišu, što je najveće ograničenje njezine antioksidacijske funkcije.

Vitamin E (α-tokoferol)

Vitamin E (α-tokoferol) je u mastima topljiv antioksidans koji štiti nezasićene membranske lipide od oksidacije [149].

Askorbinska kiselina (vitamin C)

Askorbinska je kiselina (vitamin C) u vodi topiv antioksidans, koji može reducirati SR-e iz različitih izvora. Uz navedena antioksidacijska svojstva C vitamin ima ulogu i u procesu obnove vitamina E, u njegovu prevođenju iz oksidiranog u reducirani oblik. Zanimljivo je da i C vitamin pod određenim okolnostima funkcionira kao prooksidans [149,172].

U savršenom svijetu priča ovdje završava. Stvarnost je, na žalost, kao što smo prije opisali, drugačija. Unatoč sofisticiranim antioksidacijskim i reparacijskim mehanizama, oksidacijsko je oštećenje, dijelom pogoršano ili čak injicirano okolišnim čimbenicima, neizbježan ishod aerobnog postojanja [132].

1.5. Uloga oksidacijskog stresa u patogenezi senilne makularne degeneracije

Najnovija istraživanja temeljena na laboratorijskim pokusima i istraživanjima na životinjama sugeriraju da bi oksidacijski stres mogao biti glavni čimbenik i glavni patogenetski mehanizam u nastanku SMD-a [21,22,77,101,127–132).

U retini postoje brojni mehanizmi prevencije i sprječavanja oksidacijskog inzulta, međutim u srednjoj životnoj dobi mnogi od tih antioksidacijskih mehanizama počinju otkazivati, što povisuje osjetljivost retine za akumulaciju oksidacijskih oštećenja s godinama starenja [175].

Smatra se da je SMD rezultat oštećenja uzrokovanog fotokemijskim i nefotokemijskim oksidacijskim stresom.

Općenito nakon srednje životne dobi smanjuje stvaranje antioksidacijskih enzima starenja [175] ali su pri tom uočene znatne individualne razlike [65,176]. Istodobno se mijenja zaštitni pigment melanin od antioksidansa u prooksidans, a lipofuscin se akumulira do koncentracija dovoljno visokih za stvaranje ROS-a.

Prekomjerno stvaranje SR-a i drugih ROS-a te narušena ravnoteža između njihova stvaranja i mogućnosti razgradnje antioksidacijskim sustavom organizma mogli bi biti najodgovorniji za razvoj SMD-a [130,149]. ROS se, kao što je prije prikazano, neprestano stvaraju kao nusproizvodi normalnog aerobnog metabolizma [132,149,165,177], a u mrežnici uz to i kao proizvodi fotooksidacijske reakcije međudjelovanja svjetla i kisika. Mrežnica je (osobito makula) neprestalno izložena svjetlu i visokoj koncentraciji kisika, što pridonosi njenu svjetlom

induciranomu oksidacijskomu stresu s posljedičnim oksidacijskim oštećenjem biomolekula u njenim stanicama.

Uz mrežnicu je vezan paradoks: s jedne su strane svjetlo i kisik esencijalni su za njezinu funkciju (vid), a s druge strane pogoduju stvaranju ROS-a, koji uzrokuju oštećenja njezinih stanica.

Mehanizam nastanka SMD-a oksidacijskim stresom podrazumijeva da bi velika količina slobodnih radikala, desetljećima dugog supkliničkog oštećenja fotoreceptora svjetlom, mogla imati za posljedicu pojačanu razgradnju vanjskih dijelova fotoreceptora i nemogućnost lizosomnog uklanjanjanja njihova detritusa preko RPE stanica [171]. Otpadni materijal (detritus) nakuplja se u obliku lipofuscina u citoplazmi RPE stanica te uzrokuje njihovu dekompenzaciju i propadanje, a s njima i propadanje funkcionalno povezanih fotoreceptora i koriokapilarisa. Masa nataloženog otpadnog materijala na Bruchovoj membrani poticaj je za fibrovaskularni odgovor žilnice. Lipofuscin i sam djeluje kao fotosenzibilizator (engl. *Photosensitizer*), ima sposobnost apsorpcije svjetla i stvaranja SR-a [125,171].

Zašto je najviše ugrožena makula?

Laboratorijska su istraživanja pokazala da kad se eksperimentalna životinja izloži svjetlu dovoljne jačine da prouzroči oštećenje mrežnice, oštećenje je i u životinja koje nemanju anatomski definiranu makulu, najozbiljnije u vanjskim slojevima središnje mrežnice, što se podudara i s patološkim zbivanjima u SMD-u [171]. Primarna je odlika SMD-a njegova središnja lokacija. Podudarnost nije slučajna. Fotoreceptori i RPE stanice osobito su osjetljivi na oksidacijska oštećenja, jer su izloženi visokoj razini kisika i svjetlosne energije, a koncentracija im je najveća u makuli [178].

Zbog visokog stupnja svoje metaboličke aktivnosti makula je izložena sukladno visokim razinama ROS-a. S godinama je ravnoteža između stvaranja ROS-a i razine antioksidansâ poremećena i nastaje oštećenje.

1.5.1. Građa i funkcija makule, rizik za oštećenje oksidacijskim stresom

Da bi se pojasnila uloga fotooksidacijskog stresa u SMD-u, valja se ukratko prisjetiti građe i funkcije makule.

Makula je središnji dio mrežnice, optički centar pozadine oka, promjera 5 – 6 mm. Središnji dio makule je fovea (promjera 1,5 mm), sa središnjom foveoleom (promjera 0,35 mm). Makula sadržava samo fotoreceptore i njihove jezgre, avaskularna je (nema vlastitih krvnih žila) i isključivo ovisi o opskrbi krvlju iz korioideje. U makuli su unutarnji slojevi retine razmaknuti tako da svjetlo može nesmetano padati na fotoreceptore.

U makuli je najveća gustoća fotoreceptora, koja se smanjuje prema periferiji. U foveoli se nalaze isključivo crveni i zeleni čunjići u centralnih 100 μm [65]. Plavi su čunjići najgušći između 100 i 300 μm od središta foveje. Gustoća se štapića rapidno povećava inverzno od gustoće čunjića, tako da vrh retinalne gustoće štapića leži u prstenu upravo izvan granice makule. Već 0,5 mm od foveolarnog središta čunjići su i štapići zastupljeni gotovo u jednakom broju [65].

U blizini foveolarne kreste, malo ekscentrično, mrežnica je posebno ranjiva za razvoj SMD-a [82]. To je područje u kojem se i starenjem izgubi najveći postotak štapića i mjesto gdje se javlja lokalni maksimum lipofuscina u RPE stanicama. Razlog toj lokalnoj ranjivosti nije u potpunosti jasan. Prema nekim istraživačima foveolarna kresta ima niži antioksidacijski potencijal. I MP tu je u svom lokalnom minimumu, mnogo niži nego u foveolarnom središtu [82].

1.5.1.1. Građa i funkcija fotoreceptora

Ljudska mrežnica sadržava oko 115 milijuna štapića i oko 6,5 milijuna čunjića. Štapići su odgovorni za osjet kontrasta, svjetline i pokreta, a čunjići za boje i finu prostornu rezoluciju. Distribucija štapića i čunjića u mrežnici nije jednolična. Na periferiji mrežnice prevladavaju štapići. U makuli su prevladavajući čunjići, a u foveji se nalaze isključivo čunjići.

Fotoreceptori su građeni od unutarnjih i vanjskih segmenata povezanih modificiranom cilijom. Unutarnji segmenti sadržavaju jezgre fotoreceptora, mitohondrije, Golgijev aparat i druge organele. Vanjski segmenti sadržavaju stogove s nekoliko stotina do nekoliko tisuća diskova ograđenih plazmatskim membranama u kojima je pakiran vidni pigment rodopsin, ključan za apsorpciju svjetla u štapićima, s vrhom apsorpcije na 500 nm. Tri vrste čunjića sadržavaju crveni, zeleni i plavi jodopsin s apsorpcijskim maksimumom na 564, 533 i 437 nm redom [65]. Diskovi se kontinuirano obnavljaju sintezom (invaginacijom) na cilijarnom spoju unutarnjih i vanjskih segmenata i odbacivanjem starih na vrhu vanjskih segmenata. Odbačene vrhove vanjskih segmenata neprestano fagocitiraju i razgrađuju RPE stanice u svojim lizosomoma te čiste putem koriokapilaris, tako da se svaki dan nadomjesti 10 % diskova štapića. Na taj način štapići obnove čitavih svojih 22 – 37 μm vanjskog segmenta svakih 9 – 12 dana [65,139]. Čunjići također odbaciju svoje diskove, ali na manje sinkroniziran način i nešto sporije. Oksidacija membranskih diskova smatra se ključanim čimbenikom koji može povećati količinu odbačenih diskova i modulirati tijek membranskog materijala.

Fotoreceptorne membrane štapića i čunjića građene su od lipidnih dvoslojeva. Višestruko nezasićene masne kiseline čine oko 50 % lipidnog membranskog dvosloja vanjskih segmenata štapića, a proteini čine preostalih 50 %. Dokozaheksaenska kiselina (DHA) prevladavajući je fosfolipid štapića (čini oko 50 %) [179].

Vanjski segmenti fotoreceptora žive u potencijalno toksičnom okolišu, što uključuje visoki sadržaj kisika i visoki protok fotona. Ti su uvjeti pogodni za fotooksidacijsko oštećenje.

Svjetlo se apsorbira u vanjskim segmentima fotoreceptora i oni su mjesto gdje nastaje fotooksidacijsko oštećenje.

Molekularna biološka obnova (engl. *Molecular Renewal*) membranskih diskova važan je mehanizam kojim se fotoreceptori nastoje zaštititi od visokog stupnja fotooksidacijskog oštećenja kojemu su izloženi [139,180,181].

Svjetlo se apsorbira vidnim pigmentom u fotoreceptorima i konvertira u živčane impulse. Dio apsorbirane energije troši se prijenosom energije ili elektrona na molekulu kisika, pri čem se stvaraju ROS (singletni kisik, superoksidni radikal, vodikov peroksid, hidroksilni radikal), koji uzimanjem elektrona od okolnih molekula (najčešće PUFA-a, kojima obiluju lipidne membrane diskova fotoreceptora) započinju lipidnu peroksidacijsku kaskadu [65] kroz vanjske segmente fotoreceptora. Nastaju oštećenja membrana, koje se odbacuju i bivaju fagocitirane RPE stanicama, a pri bazi vanjskih segmenata stvara se novi disk.

U normalnim okolnostima RPE stanice fagocitiraju, probave i recikliraju odbačeni materijal. Kada su te molekule oksidacijski modificirane, ne mogu se lako probaviti lizosomnim enzimima. Rezultat toga je stvaranje naslaga nedigestibilnih molekula u RPE stanicama u obliku lipofuscinskih zrnaca.

1.5.1.2. Građa i funkcija retinalnog pigmentnog epitela

Fotoreceptori, kao jedne od metabolički najaktivnijih stanica, zahtijevaju funkcionalnu potporu RPE stanica za izmjenu metabolita i osiguranje energije za njihovu funkciju (pretvaranje svjetlosne enrgije u živčane impulse), kao i za regeneraciju vidnog pigmenta. Svakodnevna fagocitoza i digestija tisuća diskova vanjskih segmenata tijekom života čini RPE stanice najaktivnijim fagocitima u tijelu. Funkcija fotoreceptora izravno ovisi o djelotvornosti fagocitoze vanjskih segmenata RPE stanicama.

RPE je monosloj plitkih poligonalnih postmitotičkih stanica koje sadržavaju melanin (crni pigment) [65]. Smještene su između fotoreceptora i koriokapilarisa te čine integralni dio krvno retinalne barijere [144]. Bazalna strana RPE stanica u dodiru je s BM-om, a apikalna se sučeljava s vanjskim segmentima fotoreceptornih stanica. RPE stanice pripadaju među metabolički najaktivnije stanice u tijelu. One su posrednci u izmjeni metabolita između fotoreceptora i korioideje. Glavna je funkcija RPE stanica održavanje života i normalnih funkcija fotoreceptora: prijenos kisika i nutrijenata iz koriokapilarisa u avaskularni vanjski sloj mrežnice te prijenos otpadnih proizvoda u obrnutom smjeru. Svaka RPE stanica u ljudskom oku uslužuje oko 30 – 45 fotoreceptora [28]. RPE stanice su za fotoreceptore čuvari kuće (engl. *housekeepers*), kako ih nazivaju pojedini autori [182]. One sudjeluju u vidnom ciklusu: pohranjuju i regeneriraju izbijeljene kromofore vidnog pigmenta i rekonfiguriraju *trans* konfiguraciju molekule retinala u *cis* oblik i vraćaju ga natrag u vanjske segmente za korištenje u resintezi aktivnog vidnog pigmenta [113]. Održavaju krvnoretinalnu barijeru. Među ključnim je ulogama RPE stanica regulacija volumena i sustava elektrolita subretinalnog prostora, što se postiže regulacijom transepitelnog prijenosa klorida iz subretinalnog prostora u korioideju s

obveznim kretanjem vode [144]. Prekid klornog prijenosa RPE stanicama može rezultirati u akumulaciji tekućine u subretinalni prostor i posljedičnoj retinalnoj ablaciji [28,182]. RPE stanice odgovorne su i za održavanje integriteta koriokapilarisa. Kada se RPE kirurški ukloni ili farmakološki ošteti intravitrealnom injekcijom ornitina ili natrijeva jodata nastaje sekundarna atrofija koriokapilarisa [28]. Melanin u RPE stanicama apsorbira zalutale svjetlosne zrake i štiti retinu od svjetlosnog raspršenja.

Kao odgovor na metaboličku patnju, RPE stanice stvaraju supstancije koje potiču rast CNV-a, tj. VEGF i bazalni fibroblastni čimbenik rasta [28]. RPE stanice također stvaraju i PEDF [28,113], koji uz neuroprotektivni učinak ima i ulogu inhibicije angiogeneze [28]. RPE stanice stvaraju mnoge od 30 i više proteina koji grade sustav komplemenata, a genetske su studije pokazale da je komplementni sustav uključen u razvoj SMD-a.

RPE stanice su podložne riziku za oksidacijsko oštećenje zbog njihove lokacije u visokooksigeniziranom okolišu vanjske retine i njihovoj izloženosti svjetlu (posebno plavomu dijelu spektra). Povećanje oksidacijskog stresa povezano je s fagocitozom i degradacijom vanjskih segmenata. Oksidacijski stres u RPE stanicama pridonosi gubitku melanosoma i njihove funkcije, kao i ekstenzivnomu gubitku mitohondrijske aktivnosti i lizosomne stabilnosti RPE stanica.

Oksidacijski stres aktiviran u RPE stanicama može inducirati upalni odgovor, što potiče dodatno stvaranje ROS-a. Odgovor imunološkog sustava na inflamaciju jest aktivacija komplamentnog sustava, što je povezano s povećanom ekspresijeom interleukina IL-8, važnog upalnog citokina [137].

U studijama rađenim na kulturi stanica pokazano je da je lipofuscin u RPE stanicama moćan generator ROS-a, uključujući i superoksidni anion, singletni kisik i lipidne hidroperokside koji "istječu" iz lizosoma i modificiraju druge stanične dijelove, kao i nuklearnu i mitohondrijsku DNK i membrane staničnih organela [3,28,113].

RPE stanice imaju brojne funkcije a minimalne mogućnosti obnove pa se može pretpostaviti da njihove funkcije s godinama oslabe. Zbog svog ekscesivnog metabolizma i okoliša visoko rizičnog za oksidacijsko oštećenje, zbog izloženosti svjetlu kratkih valnih duljina, kontinuiranoj golemoj količini peroksidiranih lipida iz odbačenih vanjskih segmenata fotoreceptora i vrlo visokim tlakom kisika iz koriokapilarisa, RPE stanice jako su ovisne o zaštitnom antioksidacijskom sustavu.

Valja ponoviti da su posljedice oksidacijskog oštećenja RPE stanica i stanica fotoreceptora ozbiljne, jer su obje vrste tih stanica postmitotičke i ne repliciraju se nakon rođenja te moraju cijeli život odgovarati na oksidacijski inzult koji uključuje svjetlom inducirani oksidcijski stres [28,183].

Iako RPE stanice raspolažu brojnim mehanizmima za prevenciju oksidacijskog oštećenja, već od srednje životne dobi oni počinju propadati, što može povećati osjetljivost RPE stanica za akumulaciju oštećenja i u konačnici prouzročiti njihovu smrt.

1.5.1.3. Građa i funkcija Bruchove membrane

Bruchova je membrana sastavljena od pet slojeva: bazalne membrane RPE-a, unutarnjeg kolagenog sloja, središnjeg elastinskog sloja, vanjskog kolagenog sloja i bazalne membrane koriokapilarisa. Ona razdvaja RPE i koriokapilaris te služi kao sito [184], pasivno dopuštajući prolaz odabranim molekulama između RPE stanica i koriokapilarisa [28]. U makuli je BM 3 – 6 puta tanja i 2 – 5 puta manje gustoće nego na srednjoj periferiji.

Promjene BM-a povezane sa SMD-om uključuju fragmentaciju, ili frakturiranje povezano s kalcifikacijom, progresivno zadebljanje dvaju kolagenih slojeva te modifikaciju i degeneraciju kolagena i elastina, kao i povećanu razinu krajnjih produkata degeneracije proteina i lipida [185]. Progresivno taloženje izvanstaničnog otpada u BM-u i na njem uzrokuje povećanje hidrofobiciteta, redukciju u hidrauličkoj konduktivnosti, smanjenje permeabiliteta i izmjene nutrijenata između korioideje i RPE stanica. Destrukcija elastinskog sloja u makuli, kao što smo prije opisali, može također imati važnu ulogu u nastanku SMD-a [185].

S obzirom na to da su komponente BM-a sintetizirane ili od endotela koriokapilarisa ili od RPE stanica, logično je zaključiti da patogeneza SMD-a mora započeti ili u RPE stanicama ili u koriokapilarisu, a ne u samom BM-u.

1.5.1.4. Građa i funkcija koriokapilarisa

Korioideja i koriokapilaris sastoje se od kompleksne mreže krvnih žila ugrađenih u vezivno tkivo debljine u rasponu od oko 0,1 do 0,3 mm koje opskrbljuju krvlju vanjske slojeve retine (fotoreceptore) i RPE stanica koji nemaju retinalnog dotoka krvi.

1.5.2. Osjetljivost mrežnice (makule) za oštećenje oksidacijskim stresom

Mrežnica, ponajprije makula, idealno je okruženje za stvaranje ROS-a iz više razloga:

1.5.2.1. Visoka potrošnja kisika

Mrežnica (pogotovo makula) najveći je potrošač kisika među svim tjelesnim tkivima [186, 187] zbog svoje visoke metaboličke aktivnosti. Makula, koja ima najveću gustoću fotoreceptora, rabi mnogo više kisika od bilo kojeg drugog tkiva u organizmu zbog visokih metaboličkih potreba kompleksa fotoreceptora i RPE stanica. Za usporedbu potrošnja kisika mnogo je viša od one potrebne za metaboličke potrebe mozga po gramu tkiva. Primjerice, protok krvi u mozgu iznosi 700 ml/min/100 g tkiva, u bubrezima 1100 ml/min/100 g tkiva [78,186,188,189] a korioideja,

koja u cijelosti krvlju opskrbljuje vanjske slojeve mrežnice, ima protok krvi od 1200 ml/min/100 g tkiva [190].

Gradijent se kisika u retini postupno smanjuje od korioideje prema unutarnjoj retini. Visoki korioidalni protok krvi i nizak arterio-venski gradijent kisika (razlika kisika) služi kao izvor kisika za vanjsku retinu. Kompleks fotoreceptori–RPE stanice troše više od 2/3 ukupne retinalne potrošnje kisika [191]. S obzirom na to da su fotoreceptori i RPE stanice izloženi ekstremno visokoj koncentraciji kisika, visoko su rizični za oksidacijsko oštećenje.

Unutarnja retina nema tako velike oscilacije u potrošnji kisika u normalnim uvjetima. Autoregulacija pomaže održanju unutarnje retinalne cirkulacije konstantnom [191].

1.5.2.2. Cjeloživotna izloženost vidljivom svjetlu

Fotoreceptori i RPE stanice (posebno u makuli) cijelog su života izloženi visokoj razini fokusiranog svjetlosnog zračenja [171,192].

U brojnim je laboratorijskim studijama pokazano da izloženost vidljivomu svjetlu rezultira oštećenjem retine i da oksidacijski stres ima ulogu u tom procesu [63,101].

U pojedinim je epidemiološkim studijama utvrđena pozitivna korelacija između incidencije SMD-a i akumulirane izloženosti kraćim valnim duljinama vidljive komponente solarnog zračenja, tijekom prethodnih 20 godina [3,117,119,121]. Na žalost, teško je precizno izmjeriti kumulativnu cjeloživotnu izloženost vidljivomu svjetlu. Metaanaliza epidemioloških studija koje su istraživale povezanost SMD-a i izloženosti svjetlosnomu zračenju tek je nedavno pozitivno odgovorila na to pitanje [66].

Cjeloživotnu izloženost svjetlu teško je kvantificitati, posebno u djetinjstvu, kad je mrežnica izložena višemu intenzitetu kratkovalnog svjetla, uključujući i UV, u usporedbi s odraslim osobama (u djece leća još nije razvila svoju zaštitnu ulogu) [3,191].

Brojni su eksperimentalni i laboratorijski dokazi koji podupiru pretpostavku da se svjetlosno zračenje, djelujući zajedno s kisikom, može se smatrati odgovornim za sva glavna obilježja SMD-a, čak i za lokaciju retinalnog oštećenja u makuli i da je oštećenje povezano s valnom duljinom. Što je valna duljina kraća, veća je energija zračenja i sukladno tomu veće oštećenje [3].

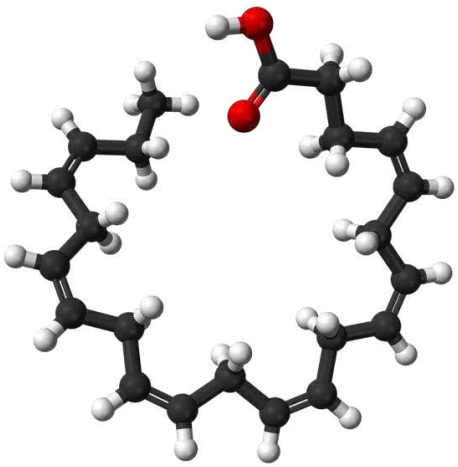
Retinu od oštećenja ozračenjem kraćim valnim duljinama svjetla štite rožnica (apsorbira valne duljine kraće od 300 nm) i leća (apsorbira valne duljine kraće od 400 nm). Tako do mrežnice odraslog zdravog oka dolazi uglavnom zračenje iz dijela vidljivog spektra od kojeg je plavi visokoenergetski dio spektra valnih duljina 400 – 500 nm najveći rizik za fotokosidativno oštećenje – hazard plavog svjetla (*engl. blue light hazard)*. Pokusi na rezus majmunima izloženim plavomu svjetlu (441 nm tijekom 1000 s) pokazali su gubitak PUFA-a i povećanje vezanih, konjugiranih diena u vanjskim segmentima fotoreceprora te atrofične promjene u RPE stanicama, što je dokazom da lipidna peroksidacija ima ulogu u oštećenju mrežnice svjetlom

[78]. Snaga potrebna za fotičko oštećenje bila je 70 – 1000 puta manja za plavo svjetlo (441) nego za infracrveno (1064 nm), ovisno o duljini izlaganja [78,115,193].

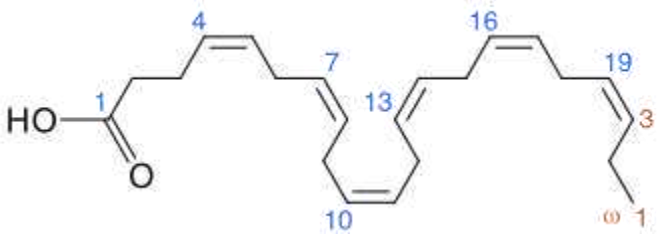
1.5.2.3. Visoki sadržaj PUFA-a u membranskim diskovima vanjskih segmenata fotoreceptora

Membrane vanjskih segmenata fotoreceptora bogate su PUFA-om koji lako oksidiraju i mogu pokrenuti nekontroliranu citotoksičnu lančanu reakciju lipidne peroksidacije [101,125,137,149,194]. PUFA-a čine oko 50 % lipidnog dvosloja membrana vanjskih segmenata štapića, a proteini preostalih 50 % [63,78,101,125,137,161,194].

DHA čini više od 50 % fosfolipida u vanjskim segmentima štapića kralježnjaka [78,101]. Vrlo je nestabilna masna kiselina i može se lako oksidacijski fragmentirati zbog svojih 6 dvostrukih veza (slike 8 i 9). Osjetljivost PUFA-a za oksidaciju korelira izravno s brojem dvostrukih vezova, pa su one prirodno osjetljive za pokretanje citotoksične lančane reakcije lipidne peroksidacije, koja rezultira gubitkom strukturnog integriteta i membranske funkcije.



Slika 8. 3D prikaz modela dokozaheksaenske kiseline (DHA). Preuzeto iz Wikipedije, autor Ben Mills (*public domain*). https://en.wikipedia.org/wiki/File:Docosahexaenoic-acid-3D-balls.png



Slika 9. Strukturna formula dokozaheksaenske kiseline (DHA). Preuzeto iz Wikipedije, autor Timlev37 (*public domain*).http://en.wikipedia.org/wiki/File:DHA_numbers.svg

Izložen kisiku i svjetlu DHA je nestabilan te lako oksidira i stvara reaktivne karboksilne proizvode, koji reagiraju s proteinima tvoreći biološki aktivan spoj karboksietilpirol (CEP) (engl. *Carboxyethylpyrrole* – CEP) [53,128,186].

DHA i njezin prekursor esencijalna masna kiselina α-linolna kiselina u cijelosti su prehrambenog podrijetla. Zbog njihove osjetljivosti na lipidnu peroksidaciju dietetski unos masnih kiselina može biti povezan sa SMD-om, povećavajući ranjivost membrana vanjskih segmenata fotoreceptora za oksidacijsko oštećenje [63]. S druge strane, studije na životinjama pokazale su da određene masne kiseline, posebno DHA, mogu zapravo dati otpornost na retinalnu oksidaciju, vjerojatno zato što nadopunjuju nedostatak PUFA-a u membranama fotoreceptora nakon gubitka uzrokovanoga oštećenjem SR-om [63,78]. Ipak u AREDS2 nije utvrđen pozitivan učinak DHA-a, niti eikozapentaenske kiseline (EPA) na usporavanje progresije SMD-a [125].

De La Paz i sur. [194] su pronašli da je u makularnoj regiji u usporedbi s periferijom smanjena razina DHA-a, sugerirajući da je makula suočena s većim oksidacijskim izazovom od periferije. Bush i sur. hranili su štakore dijetnim pripravcima siromašnim DHA-om i α-linolnom kiselinom. U tih životinja razina retinalne DHA-a bila je 65 – 75 % niža nego u kontrolnoj skupini [101]. Životinje su pokazale značajno manju disrupciju membrana vanjskih segmenata štapića i svjetlošću uzrokovano odbacivanje diskova u usporedbi s kontrolnom skupinom.

1.5.2.4. Brojni kromofori

Fotoreceptori i RPE stanice sadržavaju obilje fotosenzibilizatora (rodopsin, lipofuscin, melanin, mitohondrijske respiratorne enzime, kao što je citokrom c oksidaza i dr.) koji povećavaju fotokemijsko stvaranje ROS-a [65,78,101,195,196]**.** Uz to koriokapilaris sadržava u krvi nastale fotosenzibilizatore (protoporfirine).

Kromofori ili fotosenzibilizatori su molekule koje apsorbirajući svjetlo stvaraju kemijske reakcije koje ne nastaju bez njihove prisutnosti [3,78]. Oštećenje djelovanjem fotosenzibilizatora posredovano je kisikom. Apsorbirajući svjetlo oni tvore ROS [3].

Fotokemijsko oštećenje može se definirati kao oštećenje koje nastaje apsorpcijom visokoenergetskog svjetla od strane kromofora, što rezultira pobuđivanjem njihovih elektrona (prijelazom elektrona u vanjskoj ljusci u višu orbitalu) odnosno prijelazom kromofora u pobuđeno stanje, koji vraćanjem u osnovno stanje predaje višak energije ili elektron kisiku [78].

Rodopsin

Osnovna je funkcija retine pretvaranje apsorbiranih fotona svjetlosne energije u živčane impulse i njihovo odašiljanje u koru velikog mozga u okcipitalnoj regiji. Međutim, apsorpcija svjetla u kisikom bogatom okruženju u vidnim pigmentima u membranskim diskovima vanjskih segmenata fotoreceptora neminovno dovodi i do stvaranja ROS-a i njihova oštećenja. Tako su

fotoreceptori zapravo zagonentan fenomen: mogu biti oštećeni ili čak uništeni svjetlom za čije su otkrivanje prirodno predodređeni [197].

Rodopsin je vidni pigment štapića smješten u membranskim diskovima njihovih vanjskih segmenata. Molekula vidnog pigmenta sastoji od kromofora aldehida *11-cis-retinala*, kovalentno vezanog za G-protein opsin (skotopsin u štapićima i crveni, zeleni i plavi opsin u čunjićima) [171,198]. Opsin je signalizirajuća komponenta vidnog pigmenta, koja konvertira svjetlo u živčani impuls, a *11-cis-retinal* je za svjetlo osjetljiva komponenta i samo on može apsorbirati svjetlo.

Kada se svjetlo apsorbira u rodopsinu, retinal mijenja svoju izoformu i iz cis oblika prelazi u trans oblik i odvaja se od opsina. Rodopsin pri tome gubi svoju boju, izbjeljuje se. Kako se samo cis konfiguracija može ponovno kombinirati s opsinom u vidni pigment da bi on ponovno bio sposoban apsorbirati svjetlo, nužno je da se *all-trans-retinal* konvertira u *11-cis-retinal* konfiguraciju. To se zbiva u dugačkom metaboličkom procesu zvanom vidni ciklus [199]. Riječ je o lancu biokemijskih reakcija koje obnavljaju vidni pigment nakon izlaganja svjetlu. Vidni ciklus započinje u vanjskim segmentima štapića, a nastavlja se enzimskim putem i u RPE-u. U ljudi potpuna regeneracija vidnog pigmenta traje oko 40 minuta [3].Vidni ciklus započinje apsorpcijom fotona od strane kromofora *11-cis retinala* u molekuli vidnog pigmenta i njegovom izomerizacijom u *all-trans retinal.* Slijedi separacija *all-trans retinala* od opsina i njegova redukcija u *all-trans retinol*. Sve se to odvija u vanjskim segmentima fotoreceptora. Od te se točke vidni ciklus štapića i čunjića razlikuje [199]. Trans retinol iz štapića ulazi izvanstaničnim matriksom u RPE stanice gdje prolazi kroz niz enzimski potpomognutih konverzija i izomerizira se u *11-cis retinol*, koji se zatim oksidira u *11-cis retinala*. Tako obnovljen *11-cis retinal* ponovno se prebacuje u vanjske segmente fotoreceptora, gdje se spaja s opsinom i obnovljeni vidni pigment (rodopsin) ponovno je spreman za apsorpciju svjetla. Time je vidni ciklus završen. *11-cis retinol* (vitamin A) pohranjuje se u RPE stanicama, gdje mu se pridodaje i *11-cis retinol* iz cirkulacije.

Vidni ciklus čunjića razlikuje se od onog u štapićima. U čunjićima se *all-trans retinol* prebacuje u unutarnje segmente u Milerove stanice gdje se, bez pomoći RPE-a, enzimski izomerizira u *11-cis retinol*, a zatim prebacuje u vanjske segmente, gdje oksidacijom retinol prelazi u retinal i veže se s opsinom [199].

Toksični nusproizvodi vidnog ciklusa formirani iz *all-trans retinala* povezani su s depozitom lipofuscina u RPE stanicama i njhovim oštećenjem. Predpostavlja se da se *all-trans-retinal* otpušten od opsina na unutarnju stranu membranskih diskova spaja s fosfatidiletanolaminom rezultirajući stvaranjem toksičnog piridin-bis-retinoida, A2E (*N-retinilidin-N-retiniletanolamin*) čija se sinteza završava u lizosomima RPE stanica [65].

Brza stopa regeneracije rodopsina povisuje osjetljivost za fotooksidacijsko oštećenje.

Povećanjem apsorpcije svjetla povećava se disrupcija membranskih diskova. Oštećenja ograničena na vanjske segmente fotoreceptora uklanjaju se u tijeku njihove biološke molekularne obnove, koja do određene granice smanjuje posljedice štetnog učinka oksidacije i stoga se mogu smatrati reverzibilnima. Odbacivanje oštećenih membrana, noseći oksigenirane

proteine i lipide, nameće, međutim, metabolički teret digestivnom aparatu RPE stanica, i rizik njihova ireverzibilnog oksidacijskog oštećenja koji se povećava neprestanim obnavljanjem fotoreceptora [197].

Brza obnova rodopsina djelovanjem plavog svjetla – photoreversal – značajno povećava hazard plavog svjetla

Kad vidni pigment rodopsin u štapićima apsorbira plavo svjetlo, proces *photoreversal* uzrokuje njegovo brzo izbjeljivanje preko međuspojeva i on ponovno biva sposoban za apsorpciju svjetla [3]. Ekscitirane molekule rodopsina apsorpcijom svjetlosnih fotona brzo se izbjeljuju na niz međuproizvoda koji svi sadržavaju *all trans retinal* vezan za opsin. Metarodopsin II je ključan u ovom nizu jer aktivira G protein transducin odgovoran za prijenos električnih signala (nastalih zatvaranjem natrijevih kanala i hiperpolarizacijom stanica fotoreceptora) do centra u mozgu, nakon čega se brzo deaktivira razlažući se na opsin i *all-trans retinal* koji se u vidnom ciklusu ponovo izomerizira u cis oblik da bi se rodopsni mogao regenerirati. Međutim, visokoenergetsko plavo svjetlo može se apsorbirati u metarodopsinu II, što dovodi do brze izomerizacije all-trans retinala u *11-cis retinal* kromofor, koji se zatim veže s opsinom u rodopsin. Tim procesom rodopsin se obnavlja brzom fotokemijskom reakcijom, mnogo puta brže nego metaboličkim putem u dugom vidnom ciklusu. U visokom protoku fotona plavog svjetla jedna molekula rodopsina može se obrnuti više od 50 puta u 30 minuta [200]. To povisuje apsorpciju svjetla za nekoliko redova veličine. Kako stupanj fotičkog oštećenja u fotoreceptorima korelira s količinom apsorbiranog svjetla, to znatno povisuje količinu oksidacijskog stresa u fotoreceptorima i njihovo oštećenje plavim svjetlom. Normalni metabolički put kroz vidni ciklus preko RPE stanica pruža mogućnost obnove diskova vanjskih segmenata štapića, za razliku od *photoreversal* procesa [200].

Dokazano je da akcijski spektar retinalnog oštećenja u štakora ne samo da se poklapa s apsorpcijskim spektrom rodopsina, nego također stupanj retinalnog fotooštećenja pozitivno korelira sa sadržajem rodopsina u retini prije izlaganja svjetlu [3,201]. Oksidacijsku prirodu rodopsinom posredovanog svjetlosnog oštećenja poduprla su i otkrića Organisciaka, da povećanje retinalne antikoksidacijske obrane, djelovanjem dimetiltiourje (čistač vodikova peroksida i hidroksilnog radikala) može poboljšati očuvanje rodopsina prilikom izlaganja vidljivomu svjetlu [196]. Zaštitni učinak protiv fotooksidacijskog oštećenja primijećen je i usporavanjem regeneracija rodopsina mutacijom ili potpunim nedostatkom RPE proteina Rpe 65, jednog od enzima koji je uključen u regeneraciju *11-cis-retinala* [3].

Rapp i sur. [202] sugeriraju da je oštećenje kratkim i dugim valnim duljinam svjetla potaknuto apsorpcijom od istih kromofora i da se pojavljuje u istoj areji retine, vanjskim segmentima štapića, samo što su kratke valne duljine 50 – 80 puta djelotvornije u stvaranju oštećenja. Njihovo je istraživanje pokazalo da je izlaganje štakora niskomu intenzitetu plavog svjetla (3.1 mW/cm^2, 403 nm) u trajanju od 30 minuta prouzročilo vezikulaciju vanjskih segmenata štapića, izlaganje u trajanju od 10 minuta visokointenzivnomu plavomu svjetlu (33 mW/cm^2, 403 nm) prouzročilo teško oštećenje retine, a zeleno svjetlo ni pri gotovo dvostruko većem intenzitetu svjetla (visoka energija 47 mW/cm^2) nije aficiralo ni jedan tip retinalnih stanica. Iradijacija zelenim svjetlom rezultira fotoizbjeljivanjem svih molekula rodopsina, nakon čega nema više

kromofora koji se mogu pobuditi, za razliku od plavog svjetla, koje *photoreversal* mehanizmom uzrokuje brzu fotoizomerizaciju *all-trans-retinala* u cis oblik i brzu obnovu rodopsina. Daljnji dokaz da je za fotooštećenje važan *photoreversal* rodopsina jest izlaganje štakora i miševa halotanskoj anesteziji. Halotan inhibira obnovu rodopsina zbog kompeticije s retinalom za opsin štiteći tako makulu od oksidacijskog oštećenja induciranog plavim svjetlom [203].

Ipak nema dokaza da je rodopsin izravno odgovoran za retinalno fotooštećenje. Čini se vjerojatnijim da su za citotoksičnost odgovorni međuproizvodi fotoizbjeljivanja rodopsina, ponajprije *all-trans-retinal,* koji izbjeljivanjem vidnog pigmenta nastaje u velikim količinama. Njegova je akumulacija u membranskim diskovima vanjskih segmenata fotoreceptora rizik za fotooštećenja inducirana plavim svjetlom.

Retinal je dobro poznat fotosenzibilizator i nakon fotoekscitacije plavim svjetlom on prelazi u tripletno stanje. Energija njegova tripletnog stanja dovoljno je visoka i dovoljnog trajanja da omogući djelotvoran prijenos energije na molekularni kisik (koji je u izobilju otopljen u lipidima membranskih diskova fotoreceptora) tvoreći singletni kisik. Prijenosom elektrona na molekulu kisika fotoekscitirani retinal može stvoriti i superoksidni anion. Oni mogu inducirati oksidacijsko oštećenje staničnih komponenti osobito fosfolipidnih membrana, pogotovo kad opseg peroksidacije prelazi njihov antioksidacijski kapacitet [161]. Superoksidni anion (sam nedovoljno reaktivan da pokrene lipidnu peroksidaciju) može dismutirati u vodikov peroksid, koji u Fentonovoj reakciji formira visokooksidirajući hidroksilni radikal ($OH^{\cdot}$), koji, kao i singletni kisik, može odmah pokrenuti lanac peroksidacije [161] i oštetiti fosfolipidne membrane, koje tako oštećene ne mogu biti probavljene u lizosomima RPE stanica pa se akumuliraju u obliku lipofuscina.

Lipofuscin

Razina oksidacijskog stresa u RPE stanicama usko je povezana s dvama pigmentima: melaninom i lipofuscinom. S godinama se gube melanosomi i smanjuje količina melanina, a povećava se količina lipofuscina.

Lipofuscin, koji je rezultat oksidacijskog oštećenja vanjskih fotoreceptora i sam je fotoreaktivna supstancija (stvara velike količine toksičnih ROS-a kada je osvijetljeni plavim svjetlom) [204–206].

Lipofuscin u RPE stanicama, poznat i kao pigment starenja, agregat je visokooksigeniziranih križno vezanih proteina i lipida koji su primarno sastavljeni od materijala koji potječe od fagocitiranih vanjskih segmenata fotoreceptora [134], a samo je manjim dijelom rezultat autofagne razgradnje unutarstaničnih organela RPE stanica. Retinalni lipofuscin počinje se akumulirati u RPE stanicama pri rođenju i povećava se s godinama, tako da u 80-im godinama zauzima 19 % volumena citoplazme [3]. Najveća mu je akumulacija na stražnjem polu u makuli zbog najveće gustoće fotoreceptorskih stanica s najvećim kapacitetom za apsorpciju fotona i najvećom količinom *all-trans-retinala* raspoloživog za formiranje A2E.

U samoj foveoli postoji fokalno sniženje koncentracija lipofuscina, vjerojatno zbog zaštitnog učinka MP-a. Lipofuscin je moćan fotosenzibilizator. *In vivo* su lipofuscinska zrnca

kontinuirano izložena vidljivomu svjetlu i visokomu tlaku kisika (oko 70 mmHg) [82], što je idealno stanje za formiranje ROS-a, s mogućnošću oštećenja staničnih proteina, lipidnih membrana i DNK, osobito mtDNK, s funkcionalnim oštećenjem i smrću stanica. Tako lipofuscin koji je produkt lipidne peroksidacije istodobno i sam postaje izvor oštećenja lipidnom peroksidacijom. Stvaranje ROS-a od strane lipofuscina povećava se s povećanjem energije fotona. Stvaranje ROS-a je najveće pri izloženosti plavomu svjetlu. Nakon apsorpcije fotona blizu UV valnih duljina, lipofuscin reemitira radijaciju (fluorescira) žutonarančastim valnim duljinama [134]. Akumulacija lipofuscina unutar sekundarnih lizosoma u RPE stanicama rezultira fotooksidacijskim oštećenjem lizosomnih membrana, otpuštanjem lizosomnog sadržaja u citosol i posljedičnom degeneracijom RPE-a apoptotičkog tipa. Lipofuscin je fotoinducibilan generator superoksidnih aniona, vodikovog peroksida i lipidnih hidroperoksid koji mogu pokrenuti lipidnu peroksidaciju, izazvati enzimatsku inaktivaciju, smanjiti kapacitet fagocitoze i u konačnici rezultirati smrću RPE stanica [28]. Svježe izolirana zrnca lipofuscina inkubirana s vidljivim svjetlom induciraju 30 % povećanje u lipidnoj peroksidaciji u odnosu na kontrolu, a inkubacija zrnaca s CAT-om i lizosomalnim enzimima (kisela fosfataza), smanjuju lipidnu peroksidaciju za 30 – 50 %. Kultura ljudskih RPE stanica hranjena izoliranim lipofuscinskim granulama izlagana je plavomu (400 – 500 nm) ili žutomu svjetlu (boje jantara) (550 – 800 nm) iradijacije od 0,1 – 2,8 mW/cm^2 na 37 ^0C tijekom 14 dana. Stanice su tada testirane na promjenu morfologije, na staničnu opstojnost, na lizosomnu stabilnost i lipidnu peroksidaciju. One izložene plavomu svjetlu pokazale su gubitak RPE stanica s promjenama u morfologiji preostalih stanica, povišenu vakuolizaciju staničnih membrana i gubitak lizosomne stabilnosti, a sposobnost za život smanjena im je, ovisno o vremenu izloženosti, za 1,5 do 2,5 puta. Te promjene bile su povezane s dvostrukim povećanjem krajnjeg produkta lipidne peroksidacije MDA. Stanice izložene žutomu svjetlu ostale su nepromjenjene za vrijeme trajanja pokusa, naglašavajući da je fototoksični učinak ovisan o valnoj duljini [3].

Lipofuscin, osvijetljen plavim svjetlom, kao i rodopsin, prelazi u tripletno stanje stvarajući znatne količine singletnog kisika i povećavajući razinu oksidacijskog stresa. Brzi rast lipofuscina prvih 20 godina života može se tumačiti porastom izloženosti retine UV zračenju prije nego se pojavi zaštitni žuti pigment u leći (nakon 20-e godine) [191].

Sadržaj lipofuscina nekoliko je puta veći u RPE stanicama u SMD-u nego u zdravim očima iste dobi. Tri su glavna mehanizma kojima lipofuscin može narušiti aktivnosti RPE stanica [101]:

1. Metabolički procesi mogu biti poremećeni jednostavno zbog funkcionalnog smanjenja prostora citoplazme nakupljanjem unutarstaničnog lipofuscina.
2. Lipofuscin može prouzročiti oštećenje RPE stanica djelujući kao fotosenzibilizator stvaranjem ROS-a.
3. Glavni sastojak lipofuscina piridin-bis-retinoid, A2E je fototoksična neprobavljiva, nerazgradiva molekula nastala u lizosomima RPE stanica, čije stvaranje počinje u vanjskim segmentima fotoreceptora kondenzacijom dviju molekula *all-trans-retinala* s molekulom fosfatidiletanolamina. Izložen plavomu svjetlu inhibira aktivnost proteosoma 40 – 60 %, smanjujući sposobnost RPE stanica da razgrade otpadni materijal. Osim što djeluje kao fotosenzibilizator, A2E je lizosomotrofičan. Inhibira degradivne funkcije i ugrožava integritet i stabilnost lizosoma RPE stanica,

ograničavajući njihovu sposobnost da probave nakupljeni detritivni materijal. Također izravno oštećuje DNK RPE stanica stvaranjem epoksida i uzrokuju smrti stanice [207]. Određena istraživanja sugeriraju da akumulacija A2E inducira i povećanje VEGF ekspresije, sugerirajući ulogu A2E u progresiji eksudativnoga SMD-a [208].

Melanin

Crnomu pigmentu melaninu (proizvodu enzimske oksidacije tirozina) smještenomu u melanosomima RPE stanica pripisuju se i fotozaštitna i fototoksična uloga. Melanin je dominirajući pigment u mladim RPE stanicama. Javlja se rano u fetalnom razvoju i za prvih postnatalnih godina (do druge godine života). Melanociti u RPE stanicama razvijaju se iz neuralnog ektoderma, kao i melanociti cilijarnog epitela i epitela irisa. Korioidalni melanociti i melanociti strome irisa (kao i oni kože i kose) nastaju iz neuralne kreste. Za razliku od korioideje i šarenice, nema razlike u sadržaju melanina u RPE stanicama u crne i bijele rase [3,191]. Koncentracija melanosoma najviša je u centru makule i gradacijski se smanjuje prema ekvatoru, gdje je najmanja, i zatim se povisuje prema periferiji mrežnice [3]. Općenito se smatra da mu je glavna funkcija zaštititi fotoreceptore od raspršene svjetlosti i konverzija apsorbiranih fotona u toplinu.

Melanosomi apsorpcijom svjetla smanjuju količinu svjetla koje bi u protivnom reflektirano od BM-a moglo ponovo dosegnuti fotoreceptore i ponovo proći kroz njih (engl. *second pass*) [191]. To se češće javlja u bijelaca zbog slabije apsorpcije u njihovim manje pigmentiranim korioidejama (refleksija u bijelaca 5 %, a u crnaca 1 %). Iako melanin općenito ima zaštitnu antioksidacijsku ulogu (prevenirajući ionima željeza induciranu oksidaciju u RPE stanicama), fotoekscitacija melanina pod aerobnim uvjetima rezultira stvaranjem superoksidnih aniona i vodikovih peroksida. Sadržaj se melanina u RPE stanicama smanjuje s godinama života, melanosomi podliježu foto izbjeljivanju. Razgradivi su plavim svjetlom. Razgrađeni melanosomi gube antioksidacijska svojstva i postaju prooksidansima. Prooksidacijski učinak fotoekscitiranog melanina strogo je određen valnom duljinom svjetla i najveći je za valne duljine od 340 nm, i zatim se smanjuje, ali se još može detektirati čak i na 600 nm. Stari melanosomi mogu postati obloženi lipofuscinom (tzv. melanolipofuscin) [198] sudjelujući u povećanju razine oksidacijskog oštećenja u RPE stanicama i susjednim fotoreceptrorima. U 90-im godinama melanolipofuscin čini gotovo sva pigmentna zrnca u RPE stanicama. Postoji inverzan odnos između koncentracije lipofuscina i melanina u RPE stanicama s godinama i topografski od periferije prema centru [185]. U RPE stanicama starijih osoba količina lipofuscina može prijeći onu od melanina za 5 – 10 puta [171].

Citokrom c oksidaza

To je važan mitohondrijski enzim uključen u oksidacijsku fosforilaciju. Njegova apsorpcija varira ovisno o njegovu redoksnu statusu s maksimumom na 440 nm u reduciranom stanju [101]. Smatra se da je oštećenje retine djelovanjem plavog svjetla posredovano i mitohondrijskim respitatornim enzimima. Tu pretpostavku podupire opažanje da se sadržaj citokrom c oksidaze smanjuje u RPE stanicama nakon izlaganja plavomu svjetlu.

Fotosenzibilizatori koji se prenose krvlju

Protoporfirin IX, prekursor hemoglobina, stvara singletni kisik i superoksidni anion kad je izložen plavomu svjetlu [101]. Nalazi se u eritrocitima i plazmi. Neki istraživači povezuju SMD s mogućim oštećenjem ROS-om stvorenim od tih fotosenzibilizatora u jako vaskulariziranom koriokapilarisu.

Egzogeni fotosenzibilizatori

Neki fotosenzibilizatori mogu biti uneseni u tijelo hranom ili kao lijekovi. Oni dodatno oštećuju mrežnicu ako prelaze krvno-okularnu barijeru. Tu se ubrajaju derivati hematoporfirina, psolareni, neki antimalarici, fenotiazin, klorprimazin, kinin, klorokvin, alopurinol i antibiotici: nalidiksična kiselina, tetraciklini itd. [209].

1.5.2.5. Fagocitoza – oksidacijski stres

Proces fagocitoze vanjskih segmenta fotoreceptora od strane RPE stanica sam je po sebi oksidacijski stres (respiratorni prasak) i rezultatira stvaranjem ROS-a [149,210,211]. Funkcionalni integritet retine ovisi o održanju aktivnosti RPE stanica. One svakodnevno razgrađuju veliku količinu vanjskih segmenata fotoreceptora u procesu fagocitoze. Međutim tijekom samog procesa fagocitoze utvrđen je nastanak superoksidnog aniona, kao i deveterostruko povećanje proizvodnje vodikova peroksida [28,101,210,212].

1.5.2.6. Visoki tlak kisika

RPE stanice i vanjski segmenti fotoreceptora (posebno u makuli, koja nema retinalne opskrbe kisikom) [82] izloženi su visokomu tlaku kisika od gotovo 70 mmHg (preko korioideje) [28,101]. On se postupno smanjuje prema unutarnjim slojevima retine pa već na razini unutarnjih segmenata fotoreceptora iznosi samo 7 mmHg [82]. To govori u prilog visokoj potrošnji kisika u sprezi RPE stanica i fotoreceptora, ali i o zaštiti samog organizma od oksidacijski uzrokovanog oštećenja sniženjem tlaka kisika prema unutarnjim segmentima fotoreceptora (budući da su u unutarnjim segmentima fotoreceptora koncentrirane velike količine mitohondrija).

1.5.3. Fotooksidacijski stres u senilnoj makularnoj degeneraciji

Patogeneza SMD-a vrlo je složena (zbog svoje multifaktorijalnosti), kako je prikazano u prethodnim poglavljima i nije u cijelosti razjašnjena. Moguće je ustvrditi da kumulativna životna izloženost svjetlu (osobito visokoenergetskomu UV i plavomu dijelu vidljivog spektra) znatno pridonosi povećanju razine oksidacijskog stresa sudjelujući u razvoju SMD-a. Stoga se može reći da je SMD posljedica oštećenja oksidacijskim stresom uzrokovanim ponajprije neravnotežom između svjetlom induciranog ROS-a i retinalne antioksidacijske obrane.

Makula je jedinstvena anatomska regija gdje su u interakciji visoki protok fokusiranih fotona i visokooksigenirano delikatno tkivo bogato PUFA-om [178] što je čini pogodnom za fotooksidacijsko oštećenje.

Količina oksidacijskog oštećenja stvorena u fotoreceptorima proporcionalna je količini apsorbiranih fotona. Apsorpcija plavog svjetla može skratiti duljinu metaboličkog vidnog ciklusa u procesu koji se naziva *photoreversal*, kao što smo prije prikazali i znatno povećati količinu oksidacijskog stresa u fotoreceptorima.

Dobro je poznato da intenzivna kratkotrajna izloženost mrežnice sunčevu svjetlu dovodi do solarne retinopatije (pomrčinskog sljepila). Tako je u Njemačkoj 1912. godine kao rezultat promatranja pomrčine samo u jednom danu oštećenje makule zadobilo 3500 osoba [171,198]. Malo se međutim zna o dugotrajnoj, kroničnoj (cjeloživotnoj) izloženosti sunčevu svjetlu i oštećenju mrežnice, ponajprije makule.

Sunčevo svjetlo je čista energija zračenja. Ona je rezultat milijarda malih nuklearnih fuzijskih reakcija u kojima četiri vodikove jezgre grade jedan atom helija. Unutar Sunca oko 564 000 000 tona vodika svake se sekunde pretvara u 560 000 000 tona helija, a razlika od 4 000 000 tona materijala pretvara se u energiju zračenja. Sunčevo svjetlo je neshvatljivo velika kolekcija energetskih čestica zvanih fotoni, koji svi putuju istom brzinom, ali se razlikuju u sadržaju energije. Štetan učinak sunčeve svjetlosti na oko usko je povezana s energetskim sadržajem fotona.

Svjetlosno zračenje može uzrokovati oštećenje mrežnice na tri načina: mehanički ili ionizacijski, toplinskom fotokoagulacijom i fotokemijski [3,198]. Mehaničko oštećenje rezultat je visoke razine zračenja apsorbirane u kratkom vremenu (nano i piko sekundama), što stvara kratkotrajne šok valove, koji mehanički probijaju tkivo (princip rada Nd YAG lasera) [3,192,198]. Toplinsko oštećenje nastaje kada je energija apsorbirana u RPE i okolnim strukturama (u mikrosekundama) u količini dovoljnoj da izazove porast temperature od 10 do 20 ^{0}C ili više i izazove koagulaciju bjelančevina, odnosno oštećenje mrežnice (argon laser, kripton laser i diodni laser) [198]. Fotokemijsko oštećenje je rezultat ponavljane, produljene izloženosti svjetlu kraćih valnih duljina i visoke energije. To je oštećenje kumulativno. Jedino ovaj mehanizam može izazvati oštećenje mrežnice u ambijentalnim okolnostima [198].

Svjetlo može izravno oštetiti biološke sustave, ali učinak je zanemariv u usporedbi s oštećenjima kojima posreduje kisik.Vidne stanice proporcionalno degeneriraju s povećanjem koncentracije kisika. U studijama *in vitro* također je pokazano da se fotokemijsko oštećenje retine može pripisati oksidacijskomu stresu i da antioksidacijski enzimi štite od te vrste ozljede [101]. Povišenjem tlaka kisika povećava se svjetlosno oštećenje vidnih stanica i RPE-a u očima štakora i primata [115], povisujući retinalnu fotoosjetljivost, snizujući prag oštećenja i povećavajući težinu oštećenja pri zadanoj duljini izlaganja zračenju [171].

Ham [115,193] je prvi uočio da dugoročna izloženost mrežnice svjetlu može rezultirati oštećenjem i da ono ovisi o kisiku. Također je u nizu eksperimenata pokazao da je potrebno trostruko smanjenje vremena izloženosti svjetlu da se prouzroči oštećenje kad se tlak kisika poveća na 217 mmHg [65]. Dokazano je također da se povećanjem razine kisika povećava

učinak oštećenja vidljive radijacije na kulturi goveđih RPE stanica [171]. Toksičnost plavog svjetla na kulturi RPE stanica bila je 10 puta veća pri koncentraciji kisika od 95 % u odnosu na 20 %-tnu koncentraciju dok svjetlosno ozračenje RPE stanica pod anaerobnim uvjetima nije rezultiralo toksičnošću niti kad se jačina svjetla udvostručila [3].

Ham je također prvi primijetio (u istraživanju na rezus majmunima) odnos između radijacijskog spektra i oštećenja retine te utvrdio da različite komponente solarnog zračenja nisu jednako štetne za retinu [193]. Kratke valne duljine blizu UV dijela spektra mnogo su štetnije. Utvrdio je da je 3000 puta više energije potrebno svjetlu valne duljine 1064 nm nego onomu od 350 nm da proizvede jednako teško oštećenje mrežnice [193]. Unutar vidljivog spektra (400 – 700 nm) štetni učinak zračenja također se progresivno povećava kako se povećava energija fotona odnosno smanjuje valna duljina. Kada energija fotona dosegne približno 2.43eV (odnosno 510 nm), oštećenje retine naglo se povećava. Svjetlo bilo koje valne duljine dovoljne jačine i trajanja izlaganja može prouzročiti oštećenje mrežnice primata u regiji koja degenerira i u SMD-u, ali je oštećenje ponajprije povezano s valnom duljinom [171]. Visokoenergetskomu dijelu solarnog spektra (UV-u i plavomu svjetlu) potrebno je mnogo kraće izlaganje da bi proizvelo jednako teško mrežnično oštećenje kao i svjetlo većih valnih duljina.

Mrežnica je osjetljiva na oštećenje fotonima najviše energije koji je dosežu. To je ljubičasto-plavi dio spektra. Ti opasni fotoni sadržavaju energiju u rasponu između 2.5 i 3.1 eV za valne duljine između 400 i 500 nm [3,213]. U dječjem oku više kratkovalnog zračenja doseže retinu. U djece do 5. godine života leća propušta oko 8 % svjetlosnog zračenja valne duljine 320 nm. Efikasna UV apsorpcija je moguća tek nakon 22. godine života kada se u leći akumuliraju UV apsorbirajuće kromofore dostatno da blokiraju gotovo sve UV zračenje (i samo 0.1 – 1.0 % blizu UV radijacije doseže mrežnicu odraslih osoba), ali ne i plavo svjetlo [191].

Kao što je prikazano u prethodnom poglavlju, apsorpcija kratkovalnog dijela vidljivog spektra (plavog svjetla) fotoosjetljivim pigmenatima povezana je s povećanjem razine oksidacijskog stresa u vanjskim segmentima fotoreceptora ponajprije zbog skraćenja duljine metaboličkog vidnog ciklusa putem procesa *photoreversal* i povećane količine apsorbiranih fotona. Samo apsorbirano svjetlo može pokrenuti fotooksidacijsku reakciju. Da bi pokrenule fotooksidacijsku reakciju valne duljine svjetla moraju biti incidentne na kromofore (moraju biti valne duljine koju je dotični kromofor sposoban apsorbirati). Foton energije zračenja može biti apsorbiran samo ako je njegova energija jednaka razlici energije između trenutne razine i dopuštene više energetske razine molekule koja ga apsorbira.

Tijekom života milijarde se svjetlosnih fotona apsorbira u molekulama vidnog pigmenta u vanjskim segmentima fotoreceptora.

Kada se elektroni u molekulama vidnog pigmenta apsorpcijom fotona pobude, odnosno prijeđu iz osnovnog u više energetsko stanje, višak energije pri povratku u osnovno energetsko stanje najčešće brzo troše sudarima (kolizijama) ili reradijacijom (npr. fluorescencija lipofuscina) i ne izazivaju oštećenja. Štetan učinak nastaje trošenjem viška energije prijenosom energije ili samog elektrona na drugu molekulu, a najpogubnije je kada je primatelj elektrona ili energije molekula kisika (pri čem nastaju superoksidni radikali, odnosno singletni kisik). Laboratorijski su pokusi pokazali da osvjetljenjem *all-trans retinala* u tekućini koja sadržava kisik dolazi do

stvaranja singletnog kisika. Formacije singletnog kisika otkrivene su u svjetlom ozračenoj retini, gdje se smatra da imaju peroksidacijski učinak [209]. Singletni kisik višak energije može trošiti adicijom kisikove molekule na PUFA, kojima obiluju membrane vanjskih segmenata fotoreceptora, injicirajući lance lipidne peroksidacije. Kako raste broj dvostrukih veza PUFA-a tako raste osjetljivost za napad SR-a i drugih ROS-a, jer se vodikov atom u susjedstvu svakog dvostrukog veza lako otrgne njihovim djelovanjem [171]. Nastali lipidni peroksilni slobodni radikal otima drugi vodikov atom, na taj način dolazi do širenje lančane reakcije u kojoj se stvara novi SR kako se jedan ugasi, kako je prije opisano. Taj lanac proliferira beskonačno dugo prije nego bude uništen kombinacijom dvaju SR-a ili interakcijom s antioksidacijskom molekulom, koja može dati vodikov atom, a da ne postane SR. Lipidni peroksidi se u protivnom na kraju lanca razlažu na aldehide (npr. MDA) koji križno vežu lipide s proteinima i drugim molekulama, stvarajući abnormalne molekularne agregate. Te abnormalne molekule ne mogu biti probavljene lizosomnim enzimima RPE stanica jer se ne podudaraju s aktivnim mjestima na prirodno razgradnim enzimima u lizosomima RPE-a. Stoga se postupno akumuliraju s dobi u obliku rezidualnih tjelešaca – lipofuscina [171].

Brojni su eksperimentalni dokazi za lipidnu peroksidaciju potaknutu fotooksidacijskim stresom. U štakora izloženih svjetlu znatno se povisuje sadržaj lipidnih hidroperoksida i povećava potrošnja PUFA-a u membranama vanjskih segmenata fotoreceptora [171]. Antioksidansi smanjuju stvaranje lipidnih hidroperoksida u kulturama stanica vanjskih segmenata fotoreceptora žabe i goveda [171] kao i količinu vodikova peroksida i učinak vidljive radijacije u retini štakora izloženih žarkomu suncu [171]. U albino štakora izloženih kontinuiranomu svjetlu, otkriveno je smanjenje dugih lanaca PUFA-a i povećanje razine lipidnih konjugiranih diena u fotoreceptorima, što je uvjerljiv dokaz da lipidna peroksidacija ima ulogu u oštećenju mrežnice svjetlom [101].

U vanjskom sloju retine uvjeti za fotoksidacijski učinak su optimalni. Noell je prvi uočio da su RPE i fotoreceptori (istodobno) primarno mjesto fotooksidacijskog oštećenja (koje se prema njemu naziva Noellov sindrom) [209,214]. Ukratko se za fotooksidacijsko oštećenje makule može reći: Vanjski segmenti štapića i čunjića sastoje se od gustih stogova od oko 2000 slojeva fosfolipida. Masne kiseline u tim fosfolipidima imaju izuzetno visoku koncentraciju dvostrukih veza. Kisik je koncentriran u slojevima masnih kiselina u kojima je vrlo dobro topiv [171]. Optički sustav oka fokusira svjetlosnu energiju zračenja upravo u tu regiju. Zbog svega navedenog membrane vanjskih segmenata fotoreceptora su u jedinstvenom riziku od fotooksidacijskog oštećenja (posebno u makuli gdje je njihova koncentracija najveća). U tim gusto pakiranim slojevima visokooksigeniranih PUFA koncentrirane su molekule vidnog pigmenta. Njihov je elektronski sustav podešen za apsorpciju fotona što ih podiže u pobuđeno stanje. Fotooksidacijsko oštećenje vanjskih segmenata prenosi se fagocitozom toga oksidacijski promijenjenog membranskog otpada na RPE stanice, gdje se akumulira kao lipofuscin. RPE stanice bivaju pretrpane neprobavljenim oksidacijskim otpadom u obliku lipofuscina (koji je i sam podložan fotooksidaciji), a nemaju mogućnosti biološke obnove kao fotoreceptori.

Koje su molekule u retinalnim stanicama osjetljive za fotokemijsku ekscitaciju? Retina sadržava, kako smo u prethodnom poglavlju pokazali, brojne kromofore, među kojima je najočitiji vidni pigment. Kromofor vidnog pigmenta *11-cis retinal* (sadržava 6 konjugiranih

dvostrukih veza) apsorbira vidljivu radijaciju kroz cijeli vidni spektar, a posebno u visokoenergetskoj (plavo-ljubičasto) regiji, s maksimumom od 3,10 eV, na granici s UV zračenjem [3]. *All-trans retinal* i *all-trans retinol*, proizvodi izbjeljivanja fotopigmenta apsorbiraju plavo svjetlo sadržaja energije iznad 2,75 eV. Međuproizvodi izbjeljivanja vidnog pigmenta (metarodopsin I i II i dr.) također apsorbiraju vidljivo zračenje najviše energije (2,26 – 3,10 eV) [171].

Snažni dokazi da plavo svjetlo sudjeluje u razvoju SMD-a nađeni su i u odnosu između gustoće žutog MP-a koji apsorbira plavo svjetlo i razvoja SMD-a. Gustoća makularnog pigmenta obrnuto je proporcionalna s osjetljivošću za SMD. Zaštitna uloga MP-a odnosi se na mogućnost ograničenja količine plavog svjetla koje dospijeva do fotoreceptora i RPE stanica u makuli.

Retina sadržava, kao što smo prije kazali, i brojne druge kromofore. Oni uključuju: širokopojasne apsorbere melanin i lipofuscin, apsorpcija kojih također raste sa smanjenjem valne duljine.

Plavo svjetlo, fotooksidacijskim učinkom oštećuje i melanin u RPE stanicama. Degradirani melanosomi i sami postaju prooksidansima [215].

Lipofuscin i njegov glavni sastojak A2E apsorbiraju strogo u plavom dijelu spektra. Osvijetljen plavim svjetlom lipofuscin, kao i rodopsin, prelazi u tripletno stanje i može donirati elektron ili energiju molekuli kisika i tako stvarati znatne količine različitih ROS-a u izuzetno oksigeniranom lipofilnom okruženju.

Halotanska anestezija miševa koji su izloženi zelenomu ili bijelomu svjetlu ne pokazuje retinalne lezije jer se halotan natječe za mjesto na kojem se veže 11-cis-retinal na opsinu u rodopsin i blokira stvaranje rodopsina [203]. Međutim, miševi su bili oštećeni plavim svjetlom, što znači da je oštećenje plavim svjetlom bilo potaknuto drugim mehanizmom odvojenim od rodopsina [203]. Oštećenje je posljedica fotooksidacije lipofuscina, koji također apsorbira u plavom dijelu spektra stvarajući SR.

Zrnca melanina, lipofuscina i melanolipofuscina izolirana iz goveđih i ljudskih očiju oksidiraju polinezasićene masne kiseline kad se ozrače kratkim valnim duljinama vidljivog spektra (< 550 nm) [216].

Unatoč brojnim dokazima temeljenim na laboratorijskim pokusima i ispitivanjima na životinjama, povezanost između retinalne fotooksidacije i SMD patologije ostaje kontroverzna jer nije još egzaktno potvrđena u kliničko-epidemiološkim istraživanjima. Klinički dokaz fotooksidacijskog oštećenja mrežnice (makule) zabilježen je u mladih vojnika svijetle kože i plavih očiju, koji su za vrijeme Drugog svjetskog rata dulje vrijeme bili zarobljenici u kampu na tropskom otoku u jugoistočnoj Aziji. Loše hranjeni, radeći na otvorenom, na jakom tropskom suncu razvili su promjene u makuli sukladne onima u ranom SMD-u. Bolest su nazvali *camp-eyes* i *blue eye white man's disease*. Odnos oboljelih s obzirom na boju očiju bio je 4:1, za plave u odnosu na smeđe oči [171]. Također je još 1918. godine Van der Hoeve primijetio u seriji od 1336 bolesnika da opacitati leće djelomično štite od SMD-a. Žuti pigment, koji se nakuplja u

sklerozi nukleusu apsorbira visokoenergetski dio vidljivog spektra (plavi i ljubičasti) koji posebno oštećuje retinu [171].

I u nekoliko epidemioloških studija [116,117,119,121,217] utvrđen je suodnos između izloženosti suncu u ranoj mladosti i razvoja SMD-a u starijoj dobi, sugerirajući potrebu zaštite makule od štetnog kratkovalnog svjetla od ranog djetinjstva. Trebalo bi što više blokirati plavo svjetlo kraćih valnih duljina (posebno valne duljine 441 nm, jer maksimalno pobuđuje A2E), a dopustiti transmisiju onom oko 500 nm, koje je kritično za funkciju štapića i noćni vid. Ako se ono potpuno blokira, mogu nastati jaki poremećaji noćnog vida.

1.5.4. Oštećenje mitohondrija u SMD-u kao posljedica oksidacijskog stresa

Važan je razlog oštećenju fotoreceptora i RPE stanica mehanizmom oksidacijskog stresa i u njihovoj izuzetnoj metaboličkoj aktivnosti jer pripadaju, kao što smo prije naveli, među metabolički najaktivnije stanice u tijelu. Sukladno tomu te stanice imaju velik broj mitohondrija – staničnih "izvora snage" (engl. *power sources*). Oštećeni mitohondriji stvaraju visoku razinu ROS-a koji mogu sudjelovati u oksidacijskom oštećenju stanica. Mitohondriji su također sami osjetljivi na oštećenje ROS-om. Tako nastali ROS sudjeluju u daljnjem oštećenju mitohondrija, koji pak sudjeluju u daljnjem stvaranju ROS-a u začaranom krugu (*circulus vitiosus*). Uz to mitohondriji sadržavaju kromofore koji stvaraju ROS kad apsorbiraju plavo svjetlo [218]. Apsorpcija plavog svjetla i ROS također oštećuju mtDNK, uzrokujući dodatno produkciju ROS-a i povećanje razine oksidacijskog stresa u RPE stanicama te smanjenje stvaranja energije (ATP-a) za visoke metaboličke potrebe RPE-a i fotoreceptora, uzrokujući njihovu smrt.

1.5.5. Druze, bazalni laminarni i bazalni linearni depoziti kao posljedice oksidacijskog stresa

Povećanje fotooksidacijskog stresa i rezultirajuća akumulacija lipofuscina povezano je s povećanim odlaganjem ECM-a na bazalnoj membrani RPE-a ili na BM-u. Formacije druza između RPE-a i BM-a u makularnoj regiji smatraju se zaštitnim znakom SMD-a. Ti su depoziti prepreka koja ometa odvijanje normalnog metabolizma u makularnoj regiji, što pridonosi poremećaju funkcije i smrti RPE stanica, a rezultira smrću susjednih fotoreceptora vodeći u sljepoću poznatu kao GA, ili suhi oblik SMD-a.

Prekomjerna akumulacija lipofuscina i povećani oksidacijski stres unutar RPE stanica u makularnoj regiji te posljedično formiranje druza također je povezano s poticanjem rasta CNV-a u području ispod RPE zone i subretinalnog prostora, vodeći u vlažni oblik SMD-a, što je prije detaljno opisano.

Druze je prvi opisao Donders 1954 [5]. Nastaju nakupljanjem membranskog otpada na BM-u izbačenog iz RPE-a, a posljedica su njegove lokalne disfunkcije.

Tvrde se druze mogu manifestirati dvojako: ekscesivnom lipidnom akumulacijom unutar RPE stanica, kao i izbacivanjem tog materijala na BM.

Meke su druze veće, često neoštro ograničene, konfluirajuće, i znak su opsežnije, difuzne disfunkcije RPE stanica. Velike meke druze klinički se očituju seroznim odignućem RPE-a i teško ih je od njega razlučiti.

Kad su praćene pigmentnim promjenama, makularne se druze smatraju, kako je utvrđeno u AREDS1 [23], glavnim rizičnim faktorom za razvoj uznapredovanog oblika SMD-a. Smatra se da njihov negativni učinak na RPE stanice nije samo posljedica fizičkog odvajanja RPE područja od BM-a i koriokapilarisa, nego i lokalne upalne reakcije i aktivacije imunološkog sustava [113].

Druze su manifestacije kronične, lokalne upale (prouzročene naslagama ECM-a na razini BM-a), koja je, kao sekundarna posljedica oksidacijskog stresa, uključena u patogenezu SMD-a i sama pridonoseći oksidacijskomu stresu. Druze stoga sadržavaju brojne proteine povezane s komplementnom kaskadom i njihovom regulacijom.

Molekularni i stanični sastav druza ekstenzivno su analizirani [128,219,220]. Stanične komponente druza čine membranski otpad, vezikule, abnormalni kolagen, uz lipofuscinska i melanolipofuscinska zrnca, neprobavljeni fotoreceptorni fagosomi i fragmenti mitohondrija [77]. Sve govori u prilog njihovoj ekstruzivnoj prirodi iz RPE stanica. U njima se nalaze i korioidalne dendritičke stanice aktivirane oksidacijskim oštećenjem RPE stanica monocitnim kemotaktičkim proteinima, kao i oksidacijom proteina i lipida BM-a.

Crabb je pružio važan prinos hipotezi uloge oksidacijskog stresa u SMD-u, pronašavši karboksietil pirol proteinski adukt (CEP), proizvod oksidacije DHA-a, u mnogo većoj količini u BM-u i druzama u bolesnika sa SMD-om nego u zdravih osoba [128]. Hageman [219] je dokazao da su mnogi proteini, identificirani u druzama, podrijetlom iz RPE stanica. U druzama je znatan broj citosolnih proteina, ali i drugih koji uključuju komponente komplementne kaskade ili druge aspekte imunosnog odgovora (imunoglobuline, komponente imunosnih kompleksa C3, C5 i C9), kao i proteina koji moduliraju imunosne reakcije (vitronektin, fibrinogen, klusteri, apolipoporiteini B i E, komplementni receptor 1, kompleks klase II antigena i HLA – DR kao i klusterske diferencijacijske antigene), ili pak imaju svojstva membranskih proteina [77,113].

U SMD-u se membranski otpad taloži i difuzno između plazmaleme RPE-a i bazalne membrane RPE-a u obliku bazalnih laminarnih depozita (BlamD) ili između bazalne membrane RPE-a i unutarnjeg kolagenog sloja BM-a kao bazalni linearnih depoziti (BlinD). BlinD su više specifični za SMD.

Sarks [140] smatra da je prisustnost BlamD i BlinD početak (histološki prag) ranoga SMD-a, iako je klinički (oftalmološki) nalaz još uredan. Pretpostavlja se da dva puta vode k razvoju kasnog oblika SMD-a [140]: jedan preko velike količine membranskog debrisa u obliku velikih druza, koji se češće razvija u vlažni SMD, i drugi, sporijega tijeka, koji vodi preko formacija kontinuiranih BlamD i BlinD i pigmentnih promjena k suhomu SMD-u.

1.5.6. Hipoksija kao posljedica oksidacijskog stresa u senilnoj makularnoj degeneraciji

Još jedan apsurd obilježuje SMD. Kako mogu i oksidacijsko oštećenje i hipoksija igrati ulogu u patogenezi SMD-a? Pretpostavlja se da oksidacijsko oštećenje inicijalno uzrokuje prekomjerno stvaranje abnormalnog ECM-a i zadebljanje BM-a, što može stvarati hipoksični okoliš. I male promjene u difuzijskoj sposobnosti BM-a ili korioidalnog optoka mogu imati znatan učinak na RPE stanice i fotoreceptore, s obzirom da fotoreceptori konzumiraju 90 – 100 % kisika dostavljenog iz korioideje [28]. Istraživanja na primatima pokazala su da tlak kisika na razini unutarnjih segmenata fotoreceptora iznosi prosječno 7 mmHg, nasuprot 70 mmHg u korioideji. Hipoksija RPE stanica može rezultirati njihovom smrću i GA ili u stimulaciji rasta CNV-a. Abnormalnosti RPE-a i ECM mogu poticati rast CNV-a. Rizik nastanka CNV-a u SMD-u povećava se s veličinom, brojem i konfluencijom druza, odnosno količinom ECM-a. Uz to peroksidacija lipida koji se akumuliraju u BM-u, ne mijenja samo hidrauličnu provodljivost BM-a, nego također i promovira neovaskularizaciju. ECM može također stimulirati ili inhibirati angiogenezu vežući integrine ili mijenjajući ekspresiju integrina na endotelne stanice [28,221].

1.5.7. Promjene koriokapilarisa kao posljedica oksidacijskog stresa u senilnoj makularnoj degeneraciji

Gustoća se koriokapilarisa, kao što smo prije kazali, smanjuje s godinama. Prosječan protok kroz korioideju još je niži u SMD bolesnika. U njih je uobičajeni sinusoidalni raspored kapilarnih lobula (gdje centralna arteriola hrani sinusoid koji se drenira u periferne venule) zamijenjen tubularnom kapilarnom mrežom, koja ima niži odnos površine i volumena [28]. Koriokapilarna atrofija može biti posljedicom primarnog oštećenja koriokapilarnog endotela oksidacijskim stresom posredovanim porfirinima, potom sekundarna, zbog oštećenje RPE stanica oksidacijskim stresom s pratećim gubitkom VEGF-a i drugih trofičkih čimbemika [28] ili pak kombinacija tih procesa. Gubitak VEGF-a, uzrokovan oštećenjem RPE stanica, može rezultirati koriokapilarnom atrofijom kakva se zatječe u GA [28]. GA ima tendenciju da se razvija u blizini foveje, ali čuva foveolarni centar do kasnog stadija bolesti [28]. Subfoveolarni RPE najdulje je sačuvan od atrofije možda zbog makularnog pigmenta [28] koji filtrira plavo svjetlo. Objašnjenje za to, prema našem mišljenju, može biti i najveći oksidacijski stres u štapićima, koji su, lokalizirani izvan foveje (u foveji su sami čunjići), što je paralelno s distribucijom lipofuscina u RPE stanicama u SMD-u. U foveoli su smješteni isključivo crveni i zeleni čunjići, koji su, smatramo, manje podložni oštećenju fotooksidacijskim stresom zbog svog apsorpcijskog spektra i nisu podložni hazardu plavog svjetla. Zašto su CNV često pod samom foveolom? Možda je subfoveolarni RPE najdulje živući izvor neovaskularnih signala u toj metabolički stresnoj regiji. Očuvane RPE stanice luče VEGF. Čini se da se CNV ne javlja unutar areje GA, nego ispod areja u kojima su RPE stanice i fotoreceptori još relativno očuvani [28]. Sve navedeno govori u prilog oksidacijskomu stresu kao glavnomu patogenetskom mehanizmu za razvoj SMD-a i primarnoj pogođenosti RPE stanica.

1.5.8. Upalni odgovor na oksidacijski stres u senilnoj makularnoj degeneraciji

Visoka razina oksidacijskog stresa u RPE stanicama inducira i upalni odgovor, koji može povećati stvaranje ROS-a. Iako se SMD ne smatra tipičnom upalnom bolešću, a retina se ubraja u imunosno povlaštena tkiva [128], patološka uloga upale i imunosno posredovanih reakcija kao posljedica oksidacijskog stresa prisutne su u patogenezi SMD-a. Tako SMD lezije i druze sadržavaju imunokompetentne stanice, makrofage i limfocite, pokazujći znakove kroničnog upalnog oštećenja, nakupljanje mikroglije i prisutnost upalnih komponenti, poput komplementnih čimbenika i proupalnih citokina – kemokina [77]. Također se u cirkulaciji bolesnika sa SMD-om nalaze i protutijela na CEP proteinski adukt u količini mnogo većoj od one u kontrolnoj skupini [128]. Imunosni sustavni odgovor na inflamaciju jest aktivacija komplementnog sustava. RPE stanice stvaraju mnoge od 30 i više proteina koji čine sustav komplemenata. U genetskim je studijama potvrđeno da je aktivacija sustava komplemenata upletena u razvoj SMD-a [222]. Najnovija su genetska istraživanja pokazala da polimorfizam u genu za komplementni čimbenik H, koji inhibira aktivnost komplementnog sustava djelujući snažno antiinflamacijski, kao i polimorfizam drugih članova komplementnog sustava, uključujući komplementne komponente C1, C2, C3 i C7 i komplementni čimbenik B, mijenjaju osjetljivost za razvoj SMD-a.

Upalni proces, kao i imunosni odgovor, smatraju se sekundarnom posljedicom oksidacijskog oštećenja retine. Smatra se da su aktivacija komplementa i pridruženi upalni događaj u SMD-u rezultat nepotpune stanične degeneracije oksidacijskog otpada i akumulacije abnormalnih tkivnih depozita (kao npr. u aterosklerozi i Alzheimerovoj bolesti) [28], stoga se može očekivati da će mijenjanje razine oksidacijskog oštećenja utjecati i na upalni odgovor.

1.6. Antioksidacijski zaštitni mehanizmi u mrežnici (makuli)

Iako bi, kao što je iz svega dosad prikazanog vidljivo, oksidacijski stres mogao bez sumnje biti ključni čimbenik u patogenezi SMD-a, još je uvijek mnogo pitanja bez odgovora, primjerice: *Zašto je uništenje RPE stanica mnogo brže u nekih osoba, a u drugih se uopće ne pojavljuje? Kako to da je u pojedinih osoba makula sposobna dobro funkcionirati i u dobi iznad 80 godina, a u drugih rano propada (već sa 50 godina)?*

Odgovor bi mogao biti: za to su odgovorne razlike u njihovu **antioksidacijskom obrambenom sustavu.**

Fotoreceptori i RPE stanice posjeduju cijeli niz antioksidacijskih zaštitnih mehanizama. Kontrola štetne razine svjetla i valnih duljina obavlja se filterima unutar oka: rožnica zadržava sve zračenje manje od 300 nm, a leća ono manje od 400 nm (osim juvenilne, koja dopušta prolaz visokomu postotku svjetla između 300 i 400 nm). Unutar retine žuti makularni pigment blokira plavi dio spektra [191]. Melanin u RPE stanicama apsorbira svjetlo koje je već prošlo fotoreceptore i sprječava njegovo raspršenje i refleksiju. Fotoreceptori mogu potpuno obnoviti svoje vanjske djelove [191]. Oni, kao i RPE stanice, posjeduju izobilje čistača slobodnih

radikala i drugih reaktivnih kisikovih spojeva: antioksidacijske enzime (SOD, GPx i CAT) i neenzimske antioksidanse (male molekule endogenih antioksidansa, kao i neendogene mikronutrijente – vitamine i minerale) [191]. Korioidalna cirkulacija s najvišim protokom krvi u organizmu programirana je za uklanjanje viška topline (toplina pojačava učinak fotooksidacijske reakcije i SR-a). Tlak se kisika u oku smanjuje od BM-a prema unutarnjim slojevima retine, što bi također moglo djelovati zaštitno protiv fotooksidacijskog oštećenja [191].

1.6.1. Makularni pigment

Makularni pigment čine lutein, zeaksantin i mezozeaksantin, koji su ksantofilnog podrijetla. Zbog svoje žute boje i anteriorne pozicije u odnosu na vanjske segmente fototreceptora štiti njih i RPE od fotooksidacijskog oštećenja apsorpcijom velike količine plavog svjetla [101,129,123]. On smanjuje propuštanje plavog svjetla prije nego dosegne mrežnicu za više od 40 % [224] (prema nekim autorima čak do 80 %) [3], a djeluje i kao hvatač slobodnih radikala Neizravna je zaštita od oksidacijskog stresa suzbijajući hazard plavog svjetla, apsorbirajući visokoenergetske fotone (2,39 – 3,10eV) s apsorpcijskim maksimum na valnoj duljini od 460 nm (plavo svjetlo) [171,191]. Druga mu je uloga, prema nekima autorima – osnovna – da smanjuje kromatsku aberaciju i tako povećava vidnu oštrinu [191]. Lutein i zeaksantin ne mogu se sintetizirati i moraju se u organizam unositi hranom (zeleno lisnato povrće, narančasto voće i povrće) [65,225].

Eksperimentalno je dokazano da lutein može štititi oči primata od oštećenja svjetlom [170]. Naime, majmuni na dijeti bez luteina razvili su abnormalnosti RPE stanica u makuli nalik onima u ranom SMD-u [171]. Smanjenje tih karotenoida u makuli u osoba sa SMD-om primijećeno je i u očima kadavera, u odnosu na kontrolnu skupinu iste dobi [65].

Lutein i zeaksantin mogu se naći u serumu i u nekoliko drugih tkiva, a mezozeaksantin samo u makuli, gdje se stvara biokemijskom konverzijom luteina. To je dokazano u istraživanju na majmunima, koji su nakon dugotrajne deprivacijske dijete makularnim karotenoidima nakon suplementacije luteinom ili zeaksantinom pokazali njihovu akumulaciju u makuli [65]. Oni koji su dobivali čisti zeaksantin, imali su samo taj karotenoid u retini, a u onih hranjenih luteinom u retini je pronađen i lutein i mezozeaksantin. Time se podupire pretpostavka da je u retini mezozeaksantin deriviran iz luteina. On se ne nalazi u regularnoj dijeti. Nađen je u nekim školjkašima, škampima i rakovima, u ribi (pastrvi i lososu) i kornjačama [226].

Od svih triju makularnih pigmenata mezozeaksantin pruža makuli najveću zaštitu. Središnja retina akumulira više zeaksantin u odnosu na lutein, a čini se da je on i bolji protektor od produljenog izlaganja svjetlu kraćih valnih duljina i po tom važniji od luteina [63].

Očuvanje središnje makule u SMD-u od fotooštećenja korespondira s najvećom optičkom gustoćom MP-a. Najveća je koncentracija MP-a u sloju aksona i u unutarnjem pleksiformnom sloju u foveoli i već se 5^0 od nje ekcentrično, izrazito smanjuje [144]. Općenito je koncentracija MP-a 100 puta veća u makuli nego na periferiji retine i više od 1000 puta nego u serumu i

drugim tjelesnim tkivima [65]. Iako su normativne vrijednosti serumskih koncentracija i dietetskog unosa karotenoida utvrđene, još uvijek postoji problem učinkovitog mjerenja MP-a u kliničkim istraživanjima. Unatoč proturječnostima u pojedinim studijama glede zaštitnog djelovanja MP-a, sve kategorije osoba u višem riziku za razvoj SMD-a (npr. žene, pušači, osobe svijetlih šarenica) skloni su nižoj gustoći MP-a [223]. Primijećene su i znatne individualne razlike u njegovoj gustoći.

Istraživanje na prepelicama pokazalo je da je broj svjetlom oštećenih fotoreceptora nakon suplementacija karotenoidima (nakon prethodne šestomjesečne deprivacijske dijete karotenoidima), obrnuto kolerirao s koncentracijom zeaksantina i luteina u retini, ali ne i u serumu [227].

U BDES-u nije dokazana povezanost između uzimanja karotenoida i prevalencije ranoga ili kasnoga SMD-a [63].

U NHANES 3 utvrđeno je da je u mlađoj dobnoj skupini visoka razina luteina i zeaksantina u dijeti povezana s nižim rizikom abnormalnosti RPE stanica [63], ali nije utvrđena povezanost između serumskog luteina ili zeaksantina i bilo kojega oblika SMD-a [63]. U POLA studiji utvrđeno je da je visoka razina zeaksantina u plazmi povezana sa znatnim smanjenjem rizika za razvoj SMD-a [228]. U Rotterdamskoj studiji nije utvrđena povezanost luteina ili zeaksantina sa SMD-om [63].

U AREDS 2 [229] utvrđeno je da suplementacija 10 mg luteina, 2 mg zeaksantina, uz osnovnu formulu iz AREDS 1, smanjuje za 20 % progresiju u kasni uznapredovali oblik SMD-a u odnosu na kontrolnu skupinu u petogodišnjem praćenju.

1.6.2. Antioksidansi u mrežnici

Mrežnica posjeduje znatan broj antioksidansa u fotoreceptorima i RPE stanicama (posebno u makularnoj regiji). Antioksidacijaska obrana uključuje enzime (SOD, GPx i CAT) i neenzimske antioksidanse, koji se dijele na endogene neenzimske antioksidanse (npr. glutation, mokraćnu kiselinu, bilirubin, albumine i dr.) i antioksidacijske mikronutriente (vitamin E, vitamin C i β-karoten).

1.6.2.1. Enzimski antioksidansi u mrežnici

Antioksidacijski enzimi SOD, GPx i CAT čine dio kompleksnog sustava koji štiti od ROS-a. Oni katalitički detoksificiraju ROS i sva tri su nađeni u fotoreceptorima i RPE stanicama u visokim koncentracijama [101,132]. Relevantne kofaktore za navedene enzime čine cink, bakar i mangan za SOD, željezo i mangan za CAT i selen za GPx [132,149].

Antioksidacijski enzimi endogenog su podrijetla i imaju ključnu ulogu u održavanju antioksidacijske ravnoteže u retinalnom tkivu, prvenstveno makule, čineći prvu obrambenu crtu, za razliku od antioksidacijskih niskomolekularnih dijetetskih komponenti, koje im, čini se, samo pružaju potporu u njihovu antioksidacijskom djelovanju. Antioksidacijski enzimi znatno su moćniji čistači ROS-a u usporedbi s antioksidansima niske molekularne mase.

U srednjoj se životnoj dobi počinje progresivno smanjivati stvaranje pojedinih antioksidacijskih enzima i u makuli i na periferiji mrežnice. S druge strane, što je izuzetno važno, pokazalo se da su individualne razlike tih enzima velike i neovisne o dobi [230]. Prema nekim istraživanjima, čini se da je povezivanje ekspresije pojedinih enzima i fotičkog oštećenja pouzdanije nego njihovo povezivanje sa starenjem. Tako npr. MnSOD, prirodni enzim mrežnice, može biti induciran izlaganjem jakomu svjetlu, a s druge strane može se deaktivirati fototoksičnim učinkom svjetla [65].

Optimalne vrijednosti razine i aktivnosti antioksidacijskih enzima u retinalnim tkivima još nisu utvrđene i kvantificirane.

Superoksidna dismutaza

Enzim SOD koncentriran je u membranama vanjskih segmenata fotoreceptora [171]. On katalizira dismutaciju superoksidnog radikala na vodikov peroksidi molekularni kisik [101,132]. U organizmu se nalazi u trima izooblicima: CuZnSOD-u (SOD1) u citosolu, MnSOD-u (SOD2) u mitohondrijskom matriksu i izvanstanični SOD (SOD 3) u tkivnom intersticijumu [170].

Tri izoenzima SOD-a čine jedan od glavnih antioksidacijskih sustava u retini. U mladih miševa kojima je nedostajao SOD1 induciran je nastanak druza stalnim izlaganjem bijelomu svjetlu od 10 000 luksa tijekom 24 sata. Miševi s nedostajućim izoenzimom SOD1 ($SOD1^{-/-}$) pokazali su se znatno osjetljivijim za oštećenje retine svjetlom [3]. U njihovim RPE stanicama povišena je citoplazmatska razina β-kantenina, sugerirajući time da oksidacijsko oštećenje RPE stanica može promijeniti lokaciju β-kantenina iz stanične stijenke u citoplazmu, što uzrokuje destrukciju čvrstih (*tight junctions)* veza koje održavaju stanice [3].

Izoenzim SOD1 u velikoj je količini prisutan u citosolu, nukleusu, peroksizomima i mitohondrijalnim intermembranskim prostorima.

MnSOD (SOD2), lokaliziran u mitohondrijima, ključni je enzim u zaštiti stanice od oksidacijskog stresa. U nekoliko je studija pokazano da je njegov nedostatak izravno povezan s apoptotičkom smrću stanice. Iako miševi kojima nedostaje SOD2 ugibaju brzo nakon rođenja i nisu prikladni za studije dugoročnih dobno povezanih retinalnih promjena [170] genetski polimorfizam SOD2 gena povezan je sa SMD-om. Rezultati istraživanja oksidacijski inducirane apoptoze RPE stanica na miševima s različitim razinama SOD2 (SOD2 hemi zigotima $^{+/0}$ ili heterozigotima $^{+/-}$, ili onima s prekomjernom ekspresijom SOD2 gena), na miševima kojima nedostaje SOD2 gen (engl. *knockout*) i na divljoj vrsti ($SOD2^{+/+}$) pokazali su važnu ulogu SOD2 u zaštiti od oksidacijskog stresa induciranog u RPE stanicama [211]. Miševi s prekomjernom ekspresijom SOD2 pokazivali su veću otpornost na učinak

oksidacijskog stresa. RPE stanice uzete od SOD2 *knockout* miševa pokazale su veću apoptotičku smrt RPE stanica od divlje kontrolne skupine [211]. Antioksidacijski enzimi SOD2 i GPx, štite mitohondrije od oksidacijskog inzulta regulirajući stvaranje ROS-a u mitohondrijima. SOD2 je lokaliziran u mitohondrijskom matriksu i katalizira dismutaciju superoksidnog radikala na vodikov peroksid i kisik, a GPx katalizira daljnju razgradnju vodikova peroksida na vodu i molekularni kisik [211].

Odnos između SOD-a i SMD-a proučavan je i u ljudi. Uloga SOD-a u razvoju SMD-a tema je brojnih rasprava. Prema nekim studijama SOD bi mogao biti važan enzim u patogenezi SMD-a. Rezultati su pojedinih studija nekonzistentni [170]. Iako se u prijašnjim studijama sugerira da je aktivnost SOD-a u plazmi i eritrocitima manja u SMD bolesnika [231,232], druge su studije pokazale povećane vrijednosti. Pronađene visoke vrijednost SOD-a u nekim studijama protumačili su kompezatornom reakcijom, odnosno odgovorom na povećani oksidacijski stres.

Vodikov peroksid, nastao dismutacijom superoksidnog aniona, uz pomoć SOD-a, u Fentonovoj reakciji može prijeći u izuzetno štetan hidroksilni radikal. Zbog toga SOD djeluje u suradnji s drugim dvama enzimima GPx-om i CAT-om, koji oba konvertiraju vodikov peroksid u netoksične proizvode vodu i molekularni kisik. Kombinirano djelovanje tih triju enzima čini jedan metabolički put u zaštiti protiv oksidacijskog napada [212]. Antioksidacijski enzimi SOD, CAT i GPx tako imaju integralnu ulogu i u kontroli ROS-a koji mogu oštetiti RPE stanice.

Glutationska peroksidaza

Glutationska peroksidaza razgrađuje vodikov peroksid reducirajući ga na vodu i molekularni kisik te također razgrađuje organske hidroperokside i krajnje proizvode lipidne peroksidacije aldehide na korespodentne alkohole [101,161]. Za provođenje redukcije rabi glutation kao darivatelja elektrona. Ovisna je o selenu kao kofaktoru. GPx se nalazi u cilijarnom epitelu i sobnoj vodici, ali i u mrežnice u fotoreceptorima, te posebno u RPE stanicama, štiteći ih od vodikova peroksida ili lipidnih hidroperoksida [3,171]. GPx djeluje i u mitohondrijima.

U prethodnim studijama utvrđene su niže vrijednost GPx-a u plazmi i eritrocitima u SMD bolesnika [231,232).

Katalaza

Aktivnost katalaze usko je povezana s mehanizmom degradacije vanjskih segmenata fotoreceptora. Ona je također prisutna unutar peroksisoma u RPE stanicama [212], a nakon spajanja peroksisoma s fagosomima prisutna je i unutar sekundarnih lizosoma koji sadržavaju vanjske segmente fotoreceptora u različitim stadijima degradacije. Fagocitoza vanjskih segmenata fotoreceptora uzrokuje mobilizaciju peroksisoma *in vivo* (u žaba) i povećava aktivnost CAT-a u kulturi RPE stanica [212].

U RPE stanicama dokazana je 6 puta veća aktivnost CAT-a nego u drugim očnim tkivima. Pojedine su studije pokazale da se aktivnost CAT-a u RPE stanicama smanjuje i s dobi i u SMD-u u makularnom području i na perifernoj retini, ali je primijećeno 1,5 puta veće smanjenje u makularnom RPE-u nego na periferiji retine [212]. Druga su istraživanja pokazala da aktivnost

CAT-a ostaje nepromijenjena s godinama života, za razliku od aktivnosti SOD-a i GPx-a [231,232].

Čini se da je najvažnija uloga CAT-a u RPE stanicama otklanjanje H_2O_2 iz fagosoma.

1.6.2.2. Neenzimski antioksidansi u mrežnici

Vitamini i minerali

U ocjeni djelotvornosti antioksidacijskih vitamina u zaštiti od SMD-a rezultati se u studijama razlikuju. Njihova koncentracija je jako podložna promjenama ovisno o unosu, osobito zadnjemu, kao i apsorpcijskim mogućnostima i prijenosu do samih tkiva gdje djeluju, pa daju manje objektivnu sliku dugotrajnijeg stanja obrane od oksidacijskog stresa, a posebno je teško istražiti koncentraciju vitamina topljivih u mastima.

Kako su vitamin i minerali s antioksidacijskim učinkom lako dostupni, a primijenjeni u velikim dozama koje nisu bez štetnih posljedica, potrebno je njihovo razumno korištenje. U određenim studijama primijećena je učestalija pojava karcinma pluća i smrtnost u pušača koji su koristili suplementaciju β-karotenima, javljanje Alzheimerove bolesti, povećanje urinalnih infekcija, hiperplazije prostate, stres inkontinencija u onih koji su koristili velike doze cinka, kao i povećani rizik kardiovaskularnog morbiditeta i smrtnost uzrokovana hemoragijskim inzultom, pri uzimanju doza vitamina E većih od 400 IU [82,123,130]. Iako u AREDS1 istraživanju [233] nisu primijećene štetne nuspojave učinka AREDS1 formule na ispitanike, u AREDS 2 je ipak, iz preventivnih razloga, u formuli smanjena količina cinka, a ispitivana je i kombinacija antioksidansa s izostavljenim β-karotenom, a u ispitanika su prije uključenja u studiju testirane kognitivne sposobnosti zbog mogućeg štetnog djelovanja višestruko nezasićenih masnih kiselina [229].

Vitamin C se smatra važnim u zaštiti od bolesti uzrokovanih oksidacijskim stresom. To je najdjelotvorniji u vodi topljivi antioksidans u ljudskoj krvi. U većini studija nije pokazana jasna povezanost između uzimanja C-vitamina i njegove razine u serumu u SMD-u, iako vitamini C i E čine "zlatni standard" antioksidacijskih vitamina i važni su u održavanju prooksidacijske i antioksidacijske homeostaze u biološkim sustavima [65]. U vodi topiv C-vitamin predominantan je u neuralnoj retini, daleko od fotoreceptora.

Istraživanje NHANES-a pokazalo je da je konzumacija vitamina C negativno povezana s prevalencijom SMD-a, iako se ta povezanost gubi nakon usklađivanja demografskih i medicinskih čimbenika [63]. I u BDES-u primijećena je negativna povezanost C-vitamin sa SMD-om (rani oblik), ali statistički neznačajna [63]. U BMES-u nije potvrđena povezanost C-vitamina i prevalencije SMD-a [63]. U Rotterdamskoj studiji utvrđena je u 35 % slučajeva redukcija incidencije SMD-a uz uzimanje kombinacije vitamina C i E, β-karotena i Zn, ali ne i samog C-vitamina, što upućuje na njihovo sinergijsko djelovanje [63]. U AREDS1 istraživanju pokazano je da visoke dnevne doze C i E vitamina i β-karotena uz Zn za 25 % smanjuju rizik progresije relativno uznapredovalog ranog stadija SMD-a u kasni stadij bolesti [233]. U toj

studiji nije izdvojeno ispitivan C-vitamin niti je odgovoreno na pitanje primarne prevencije u osoba bez znakova SMD-a.

Vitamin E glavni je neenzimski antioksidans staničnih membrana. Postoji u četirima najčešćim oblicima (tokoferol α, β, γ i δ). U ljudskoj retini predominantan je α-tokoferol. Nalazi se u vanjskim segmentima štapića i RPE stanicama (lipofiličnim strukturama), a koncentracija mu ovisi o dijetetskom unosu [63,65]. Na životinjskim modelima dokazano je da E-vitamin pruža zaštitu fotoreceptora od fotooksidacijskog oštećenja. U visokoj koncentraciji nalazi se u foveji, a u području perifoveje, gdje često počinje SMD, zatječe se minimalno [65]. Nedostaju čvrsti dokazi za izdvojenu zaštitnu ulogu suplementacije E-vitaminom na razvoj i progresiju SMD-a [63].

Rezultati epidemioloških studija o vitaminu E kao zaštitnom čimbeniku za nastanak SMD-a proturječni su kao i za vitamin C. U BDES-u potvrđeno je da je visoki unos E-vitamina povezan sa smanjenjenom incidencijom velikih druza, ali da ipak nije zaštitan za rani SMD [63]. U POLA studiji [234] pronađeno je da razina tokoferola u plazmi pokazuje slabu negativnu povezanost s prevalencijom kasnoga SMD-a.

Vitamin A važan je za regeneraciju rodopsina i time ključan za vid, uz to mu se pridodaje antioksidacijska aktivnosti u fotoreceptorima [63]. U NHANES1 pruženi su dokazi da je uzimanje hrane bogate vitaminom A negativno povezano s prevalencijom SMD-a [63]. U studiji BMES, kao i u POLA studiji [63,243] nije otkrivena povezanost između uzimanja vitamina A i SMD-a.

Cink (Zn) je u oku najzastupljeniji element u tragovima. Ključan je kofaktor u CuZnSOD-u i sudjeluje u regulaciji aktivnosti CAT-a te stabilizira lipidne membrane štiteći ih od oksidacije [63]. Nedostatak cinka uzrokuje povišenja oksidacijskog stresa u eksperimentalnih životinja. Cink je, a ne bakar, taj koji ograničuje aktivnost CuZnSOD-a [65]. Iako postoji uvjerljiv razlog zbog kojega cink štiti od SMD-a, rezultati kliničkih i epidemioloških studija su proturiječni. U BDES nije otkriven značajan odnos između serumske razine cinka i SMD-a, iako je njezina retrospektivna grana poslije pronašla slabi zaštitni učinak u najvišoj kvintili dietetskog unosa cinka u odnosu na najnižu kvintilu [101]. U BMES nije pronađen značajan odnos uzimanja Zn i prevalencije i incidencije SMD-a. U istraživanju AREDS 1 [233] pokazano je da sam cink štiti bolje od progresije intermedijalnog u kasni stadij SMD-a nego sami antioksidacijski vitamini uzimani bez cinka.

Melanin

O zaštitnoj antioksidacijskoj ulozi melanina govorili smo detaljno u poglavlju o podložnosti makule oštećenju oksidacijskim stresom.

Glutation

Glutation je u vodi topiv tripeptid, endogen u vanjskim segmentima fotoreceptora sisavaca, koji djeluje kao čistač SR-a i drugih ROS-a. Uz to je kofaktor za GPx (donor elektrona) i sudjeluje u razgradnji vodikova peroksida koju katalizira GPx. Istraživanja su pokazala da se s godinama života smanjuje reducirani glutation (GSH) u plazmi i povećava oksidirani (GSSG) [130].

Nađen je u goveđoj mrežnici, gdje se pretpostavlja da štiti fotoreceprorne PUFA-e od oksidacije. Tretiranje RPE stanica α-kristalinima pridonosi njihovoj zaštiti od oksidacijskog stresa što korelira s dvostrukim povećanjem koncentracije reduciranog glutationa (GSH). Povećanje koncentracije GSH-a može biti posljedicom njegove pojačane biosinteze ili veće konverzije GSSG-a u GSH-u djelovanjem glutationske reduktaze, za koju je primijećeno da je snižena u SMD bolesnika. U POLA studiji nije se uspjela otkriti značajna povezanost između glutationa u eritrocitima i SMD-a [234].

1.7. Procjene razine oksidacijskog stresa

Hipoteza nastanka SMD-a uslijed oksidacijskog stresa, kao što je prikazano, ima potporu u brojnim ispitivanjima na životinjama, na kulturi stanica ili pak na donorskim (post mortem) mrežnicama, ali ne i u kliničko-epidemiološkim istraživanjima, koja su znatno rjeđa i često kontradiktorna [21,122,235,236].

U procjeni razine oksidativnog stresa moguća su tri pristupa: izravno određivanjem slobodnih radikala (koje je otežano samom njihovom prirodom: labilnošću i kratkim životnim vijekom) putem elektronske paramagnetne rezonancije, neizravno određivanjem krajnjih produkata nastalih razgradnjom bioloških molekula kao posljedice oštećenja slobodnim radikalima (npr. malondialdehida) ili mjerenjem razine različitih antioksidansa u krvi ili tkivima [149].

Razina antioksidacijskih mikronutrijenata ovisi o trenutnom unosu i ne daje pravu sliku dugotrajnijeg stanja obrane od oksidacijskog stresa [223]. Međutim, oksidacijski stres se može mnogo objektivnije procijeniti mjerenjem aktivnosti enzimskih antioksidansa, koji čine prvu crtu antioksidacijske obrane i pružaju mnogo objektivniju sliku razine oksidacijskog stresa određenog tkiva ili organizma u cijelosti [132,149].

Kako procjena antioksidacijskih enzima u retinalnim stanicama in vivo nije moguća, najveći bi izazov za SMD bio razvoj krvnih testova koji bi identificirali osobe pod povećanim rizikom za SMD prije pojave bilo kojeg znaka bolesti. Naše je istraživanje pokušalo odgovoriti tom izazovu i koristeći aktivnost antioksidcijskih enzima (SOD-a, GPx-a i CAT-a) u eritrocitima i vrijednosti TAS-a u serumu, kao pokazatelje razine oksidacijskog stresa, ispitati povezanost oksidacijskog stresa i SMD-a.

2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Hipoteze

1. Temeljna je znanstvena pretpostavka ovomu istraživanju da su niske vrijednosti aktivnosti enzimskih antioksidansa (SOD-a; GPx-a i CAT-a) u eritrocitima i ukupnog antioksidacijskog statusa (TAS-a) u serumu, mehanizmom povišenog oksidacijskog stresa, povezani s nastankom SMD-a.
2. Interakcije između aktivnosti enzimskih antioksidansa (SOD i GPx i / ili SOD i CAT) mogu biti jednakog (ili čak i većeg) značenja za nastanak SMD-a kao i same niske vrijednosti aktivnosti enzima.
3. Razina aktivnosti enzimskih antioksidansa u eritrocitima niža je u kasnom stadiju SMD-a u odnosu na rani.
4. Aktivnosti enzimskih antioksidansa u eritrocitima i vrijednost TAS-a u serumu mogli bi se rabiti kao ulazna varijabla u dijagnostičkom testu za utvrđivanje SMD-a, što bi bilo posebno važno za rano dijagnosticiranje bolesti i identifikaciju osoba rizičnih za SMD.

2.2. Ciljevi istraživanja

Osnovni cilj:

Osnovni je cilj ovog istraživanja bio utvrditi je su li, i u kolikoj mjeri, aktivnost enzimskih antioksidansa u eritrocitima i razina TAS-a u serumu povezani s nastankom i težinom SMD-a.

Specifični su ciljevi:

1. Odrediti aktivnost enzimskih antioksidansa, SOD-a, GPx-a i CAT-a, u eritrocitima kao i ukupni antioksidacijski status (TAS) u serumu u trima skupinama ispitanika: u skupini ispitanika s ranim stadijem SMD-a, s kasnim stadijem SMD-a te u ispitanika koji ne boluju od SMD-a (kontrolna skupina), pri čem se skupine ispitanika sa SMD-om usklađuju s kontrolnom skupinom s obzirom na dob i spol i izloženost svjetlosnom zračenju.

2. Usporediti dobivene vrijednosti aktivnosti enzimskih antioksidansa (SOD-a, GPx-a CAT-a u U/g Hb) u eritrocitima te TAS-a (u mmol/L) u serumu između pojedinih

skupina ispitanika, te utvrditi postoji li među njima statistički značajna razlika u aktivnosti pojedinog enzima i/ili vrijednosti TAS-a.

3. Ako se utvrdi razlika između skupina u aktivnosti pojedinog enzima i/ili TAS-a, istražiti detaljnije izvore te razlike tako da se ispita postoji li statistički značajna razlika u testiranoj varijabli između pojedinih parova skupina, te istražiti povezanost testiranih varijabli s nastankom SMD-a.

4. Istražiti postoji li povezanost (interakcija) među pojedinim enzimima (SOD-a i GPx-a, SOD-a i CAT-a te GPx-a i CAT-a) te ako se utvrdi da postoji, istražiti kako utječe na nastanak SMD-a.

5. Utvrditi postoji li povezanost između ranog i kasnog stadija SMD-a i aktivnosti pojedinog enzima i/ili razine TAS-a, te ako postoji utvrditi jačinu te povezanosti.

6. Ako se razlika između skupina utvrdi za jednu ili više testiranih varijabla (enzim i/ili TAS), iskoristiti vrijednosti tih varijabla kao prediktore nastanka SMD-a, uz izračun pokazatelja dijagnostičke točnosti takvog testa.

Sekundarnji cilj:

Utvrditi je li pojavnost SMD-a povezana s obiteljskom anamnezom te u tu svrhu ispitati učestalost pozitivne obiteljske anamneze u skupini bolesnika sa SMD-om i u kontrolnoj skupini i dobivene vrijednosti usporediti.

3. ISPITANICI I POSTUPCI

3.1. Ustroj istraživanja

Istraživanje je s obzirom na pristup eksperimentalno, a s obzirom na namjenu primijenjeno. Glede načina dobivanja podataka riječ je o opservacijskom, a vremenska orijentacija je retrospektivna. Specifičan ustroj koji smo koristili bio je ugniježđeno istraživanje parova (engl. *nested case-control study*).

U istraživanju je mjerena aktivnost enzimskih antioksidansa (SOD-a, GPx-a i CAT-a) u eritrocitima i ukupnog antioksidacijskog statusa (engl. *Total Antioxidant Status* – TAS) u serumu u tri skupine ispitanika: dvije skupine ispitanika sa SMD-om, skupini s ranim oblikom SMD-a, i skupini s kasnim (suhim i eksudativnim) oblikom SMD-a te u kontrolnoj skupini ispitanika bez SMD-a. Skupine ispitanika sa SMD-om uskladili smo s kontrolnom skupinom prema dobi i spolu i izloženosti sunčevu zračenju.

3.2. Ispitanici

Istraživanjem je obuhvaćeno ukupno 107 ispitanika obaju spolova, u dobi od 60 i više godina, od toga 57 bolesnika sa SMD-om (25 s kasnim i 32 s ranim oblikom bolesti) te 50 ispitanika kontrolne skupine, komplementarnih eksperimentalnoj skupini po dobi, spolu i kumulativnoj, cjeloživotnoj, izloženosti sunčevu svjetlu, ali bez promjena na očnoj pozadini u smislu SMD-a. Bolesnici sa SMD-om odabrani su prema strogim kriterijima uključenja, među redovitim bolesnicima retinalne ambulante Klinike za očne bolesti KBC-a Split u vremenu od studenog 2012. do siječnja 2014. godine. Ispitanici kontrolne skupine odabrani su među redovitim bolesnicima općih očnih ambulanti i među odjelnim bolesnicima Klinike za očne bolesti KBC-a Split.

3.2.1. Kriteriji isključenja

Iz studije su isključeni svi ispitanici u kojih bi prateće bolesti ili loše životne navike mogle rezultirati mijenjanjem oksidacijskog statusa. Tako su isključene osobe s dijabetesom, utvrđenim kardiovaskularnim bolestima, malignim bolestima, imunološkim bolestima i drugim teškim kroničnim upalnim bolestima te osobe s nekom težom i većom traumom unutar zadnja tri mjeseca. Isključeni su također i pušači, alkoholičari ili oni koji su uzimali lijekove koji mogu mijenjati aktivnost antioksidacijskih enzima (npr. velike doze paracetamola, neki citostatici i dr.). Isključeni su također i bolesnici s uznapredovalom mrenom ili drugim smetnjama na

prednjem očnom segmentu, koje onemogućuju detaljan pregled očne pozadine, kao i bolesnici s glaukomom. Bolesnici koji su uzimali vitamine s antioksidacijskim učinkom zamoljeni su da ih dva mjeseca prestanu uzimati te su nakon toga, ako su zadovoljavali kriterije, uključeni u studiju. Iz istraživanja su također isključeni svi bolesnici sa SMD-om koji su prije bili liječeni ili je bilo u tijeku njihovo liječenje anti-VEGF lijekovima.

3.2.2. Veličina uzorka

Broj je ispitanika veći nego što je zadano izračunatom veličinom uzorka uz statističku snagu istraživanja od 80 % i razinu statističke značajnosti od 0,05, s klinički značajnom razlikom od 20 % u vrijednostima aktivnosti antioksidacijskih enzima u eritrocitima i TAS-a u serumu između bolesnika s ranim oblikom SMD-a i kontrolne skupine, i razlikom od 30 % u vrijednostima navedenih parametara između bolesnika s kasnim oblikom SMD-a i kontrolne skupine. U procjeni vrijednosti i razlika parametara služili smo se rezultatima iz literature [237,238]. Uz te uvjete ukupan potreban broj ispitanika iznosio je 88: za rani SMD 30 ispitanika, za kasni 14 i za kontrolu 44 (ugniježđeno istraživanje parova).

3.3. Postupci

3.3.1. Oftalmološke pretrage

U svih ispitanika uzeta je detaljna obiteljska i osobna anamneza temeljem ranije izrađenog ispitnog listića (upitnika) s obzirom na sve relevantne rizične čimbenike za SMD, s posebnim osvrtom na obiteljsku anamnezu u svezi sa SMD-om, ukupnu izloženost sunčevu zračenju tijekom života (od najranijeg djetinjstva), jednako profesionalnu kao i u slobodnom vremenu, te na uporabu zaštitnih sredstava (šešir, naočale).

Svim je ispitanicima određena najbolje korigirana vidna oštrina (iako nije uključena u stupnjevanje bolesti) prema međunarodnim optotipima i obavljen detaljan opći oftalmološki pregled (pregled prednjeg očnog segmenta na biomikroskopu s procijepnom svjetiljkom, mjerenje očnog tlaka).

Dijagnoza SMD-a postavljana je temeljem pregleda fundusa biomikroskopom kontaktnom metodom Maistnerovim WF panfundoskopom u midrijazi.

Svim ispitanicima iz eksperimentalne skupine (bolesnici sa SMD-om) urađena je fotografija fundusa u boji i fluoresceinska angiografija (FA) na digitalnoj fundus kameri tvrtke Zeiss, FF 450 plus IR. Kontrolnoj skupini ispitanika nije rađena FA, njima je samo urađena snimka fundusa u boji, kao i bolesnicima sa SMD-om kojima je u anamnezi utvrđena sklonost

alergijama, a bolest stupnjevana samo temeljem fotografija fundusa. Pri obostranom nalazu SMD-a kategorizacija se obavila prema nalazu na jače zahvaćenom oku.

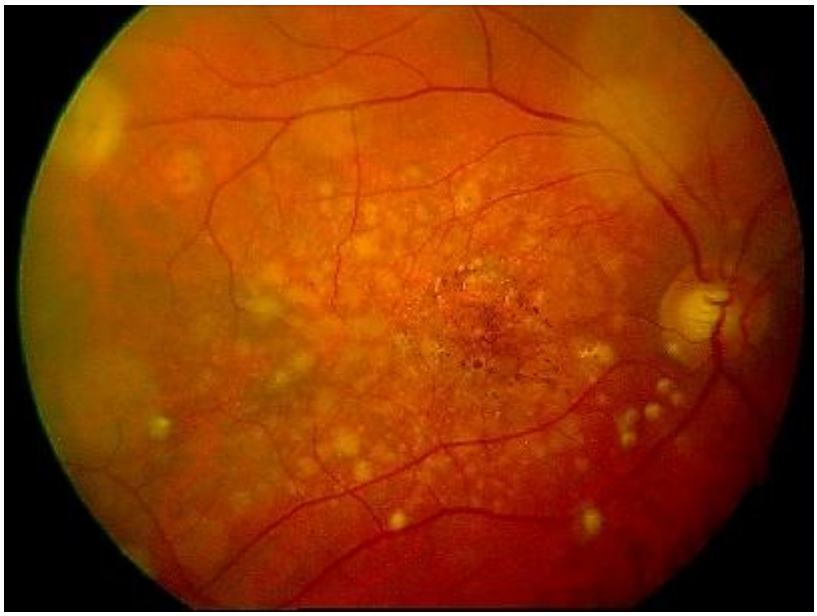
Velikomu dijelu bolesnika sa SMD-om urađena je i optička koherentna tomografija (OCT) na uređaju Cirrus HD-OCT Model 400, Carl Zeiss Meditec, uglavnom onima s kasnim vlažnim oblikom. Na žalost, nije urađena svima jer u vrijeme provođenja istraživanja Klinika za očne bolesti KBC-a Split još nije imala vlastiti OCT pa su bolesnici uglavnom sami snosili troškove pretrage. Zbog toga je pretraga, iako neinvazivna, rađena samo u onih bolesnika koji su imali medicinsku indikaciju za njezino provođenje (kasni vlažni oblik, radi uključivanja anti-VEGF terapije, odmah nakon što bi im bio uzet uzorak krvi za analizu za potrebe istraživanja).

3.3.2. Klasifikacija SMD-a

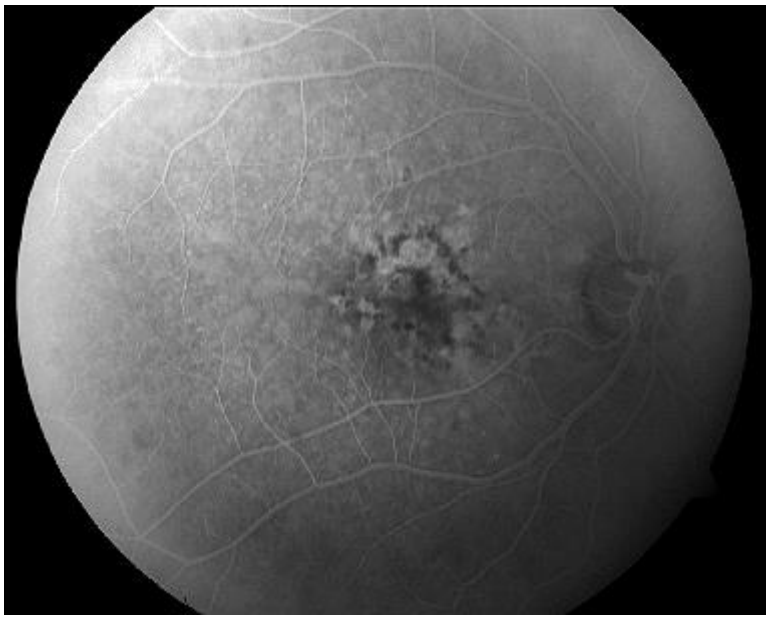
Klasifikacija promjena i određivanje težine bolesti obavljeno je temeljem fundus fotografija i fluoresceinskih angiograma, a u skladu s Međunarodnim klasifikacijskim sustavom [4]. Veličinu lezija i njihovu udaljenost od foveole procjenjivali smo prema veličini promjera papilarnog diska – PP (oko 1500 μm na prosječnom fundusu). Unutarnju makulu čini krug sa središtem na foveoli promjera 3000 μm (odnosno otprilike 2 PP), a vanjsku makulu krug promjera 6000 μm (4 PP) sa središtem na foveoli. Veličina samih lezija procjenjivana je temeljem 1/24, 1/12, 1/8,6, 1/6, i 1/3 PP što odgovara veličini lezije od 63, 125, 175, 250 i 500 μm.

U rani oblik SMD-a (slike 10A, 10B, 10C i 10D) svrstali smo sve promjene koje su uključivale manje i veće meke druze (≥63 μm), konfluirajuće druze i/ili zone hiperpigmentacije i hipopigmentacije bez vidljivih korioidalnih krvnih žila unutar 3000 μm od foveole (stupnjeve od prvog do trećeg, prema Međunarodnom klasifikacijskom sustavu).

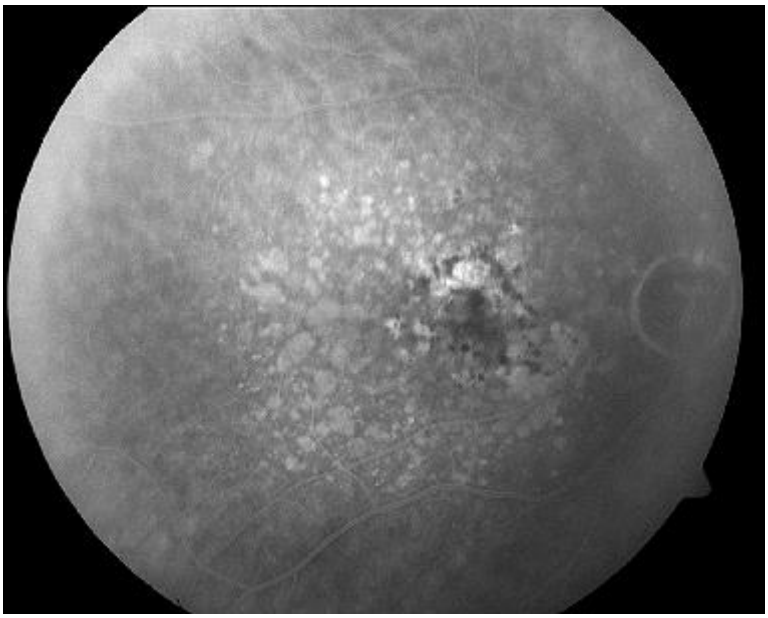
Kasni oblik SMD-a uključivao je vlažni (neovaskularni) (slike 11A, 11B, 11C, 11D, 11E i slike 12A, 12B, 12C, 12D, 12E) te suhi oblik (geografsku atrofiju) (slike 13A, 13B, 13C, 13D i 13E) u zoni unutar 3000 μm od foveole (što odgovara 4. stupnju prema Međunarodnom klasifikacijskom sustavu) [4]. Vlažni (neovaskularni) oblik uključivao je hemoragije i eksudat, prisutnost seroznog ili hemoragijskog odignuća RPE-a ili senzorne mrežnice, subretinalne ili subepitelne neovaskularizacije i fibrovaskularni ožiljak unutar 3000 μm od foveole. Geografska atrofija podrazumijevala je zonu oštro ograničenu depigmentacije, veće od 175 μm (za usporedbu, toliko iznosi i prosječan promjer vena na papilarnom disku) s rubnom hiperpigmentacijom i vidljivom korioidalnom vaskularizacijom.



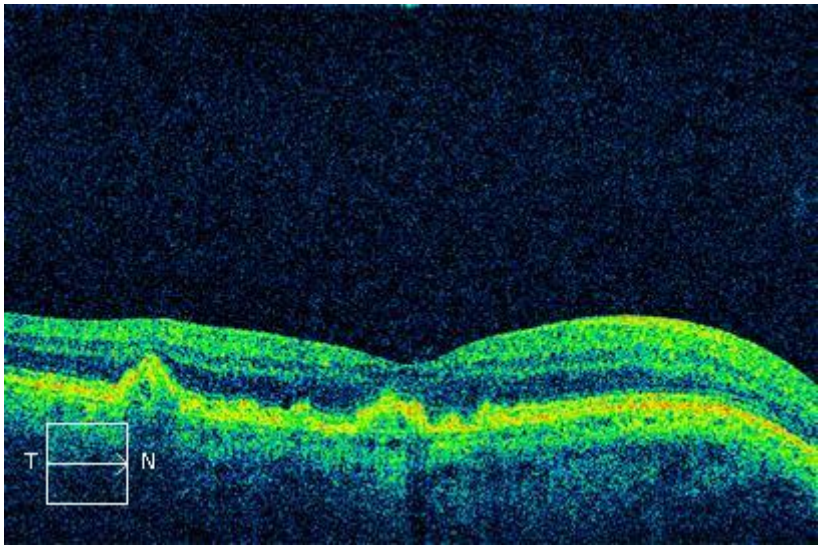
Slika 10A. Mnogobrojne meke, dijelom konfluirajuće, druze u širem području makule s centralnim hiperpigmentacijama i hipopigmentacijama RPE, rani oblik senilne makularne degeneracije (SMD-a), fotografija fundusa u boji.



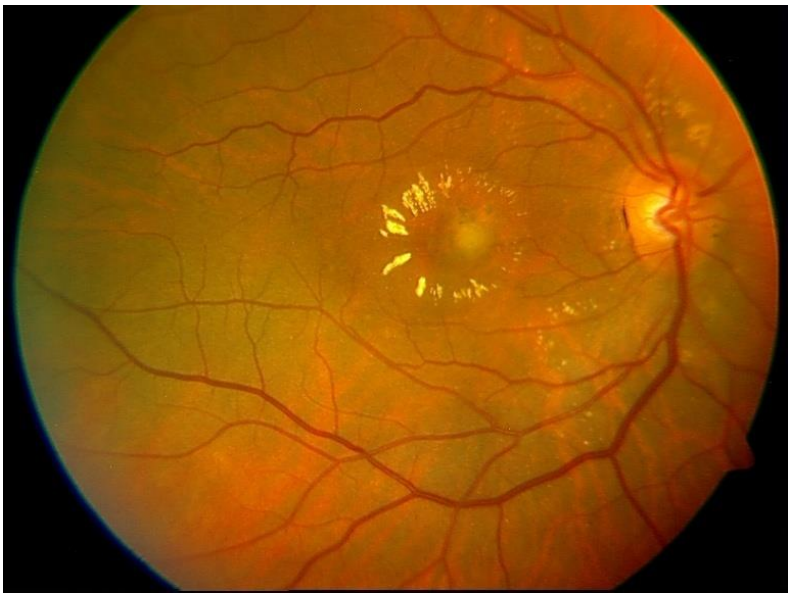
Slika 10B. Fluoresceinografski prikaz fundusa istog bolesnika: diskretne hiperfluorescencije u području mekih druza te blokada fluorescencije u području aglomeracije RPE-a te zone hipopigmentacije s prosijavanjem korioidalne fluorescencije u području atrofije RPE-a u ranoj fazi fluoresceinske angiogragije.



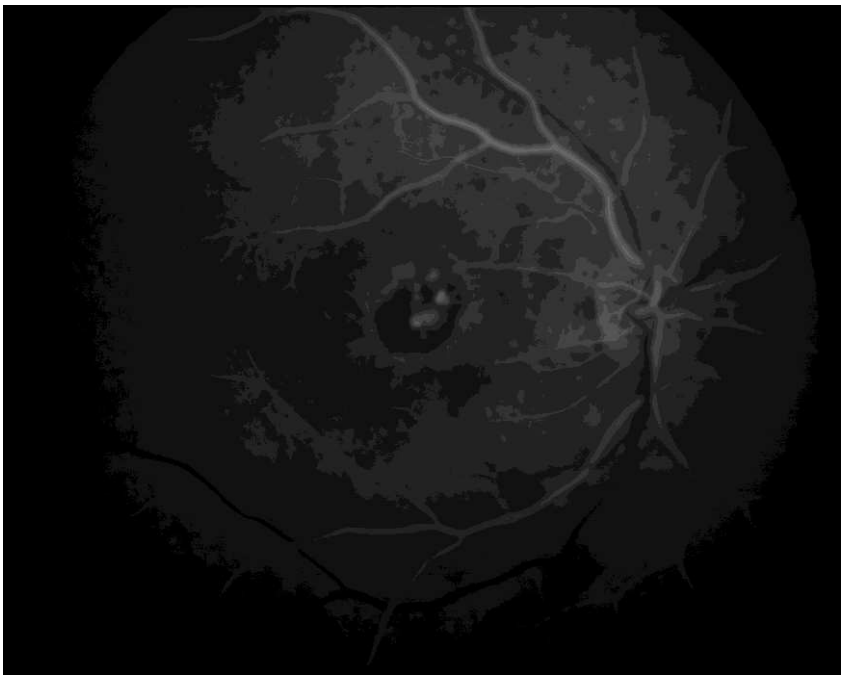
Slika 10C. Hiperfluorescencija mekih druza u kasnoj fazi angiografije zbog zadržavanja akumuliranog fluoresceina.



Slika 10D. OCT istog bolesnika: valoviti izgled RPE sloja, hiperreflektivne strukture druza ispod RPE-a, mjestimično isprekidan iako održan sloj fotoreceptora. Nepravilna hiperpigmentacija RPE-a uz mjestimičnu elevaciju slojeva RPE-a i fotoreceptora.



Slika 11A. Fotografija fundusa u boji: vlažni (kasni) oblik senilne makularne degeneracije (SMD-a), žućkastosivkasta lezija u makuli s rubnim krvarenjima, klasičn oblik CNV-a.



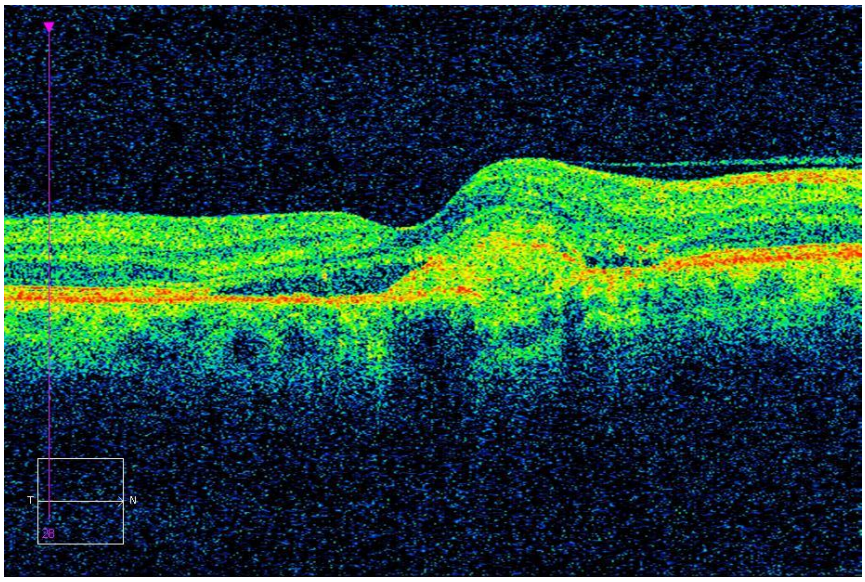
Slika 11B. Floresceinografski prikaz fundusa istog bolesnika: u ranoj fazi fluoresceinske angiografije pokazuju se centralno smještene klasične CNV kao jasno ograničene, točkaste blaže izražene hiperfluorescencije u unutrašnjosti lezije. Rubna blokada fluorescencije odgovara hemoragijama.



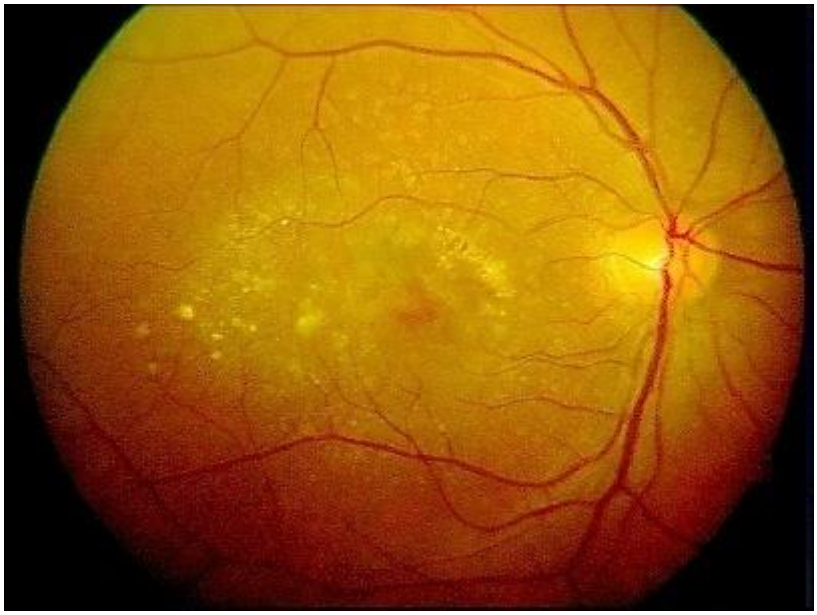
Slika 11C. Postupno intenziviranje fluorescencije CNV lezija u daljnim fazama fluoresceinske angiografije.



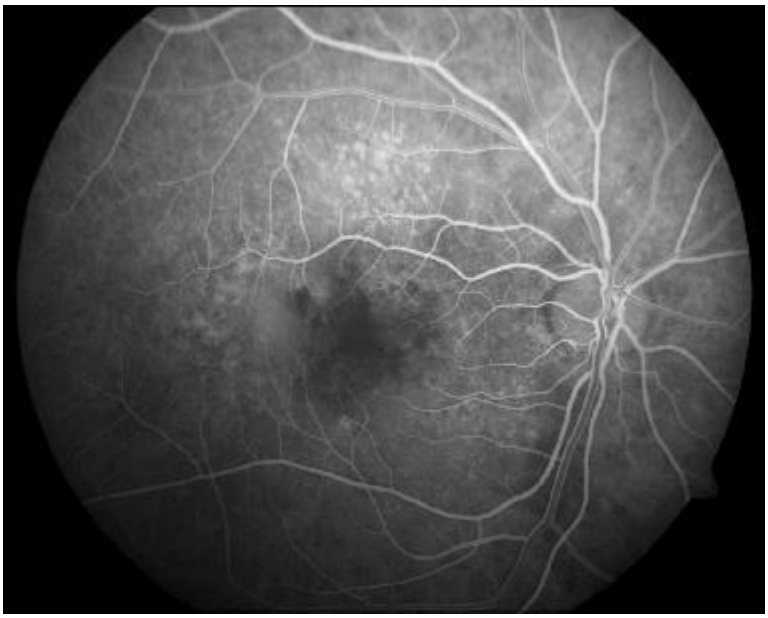
Slika 11D. U kasnoj fazi fluoresceinske angiografije vidljiva intenzivna fluorescencija, akumulacija i propuštanje fluoresceina s rubnim zamagljenjem u području CNV lezija



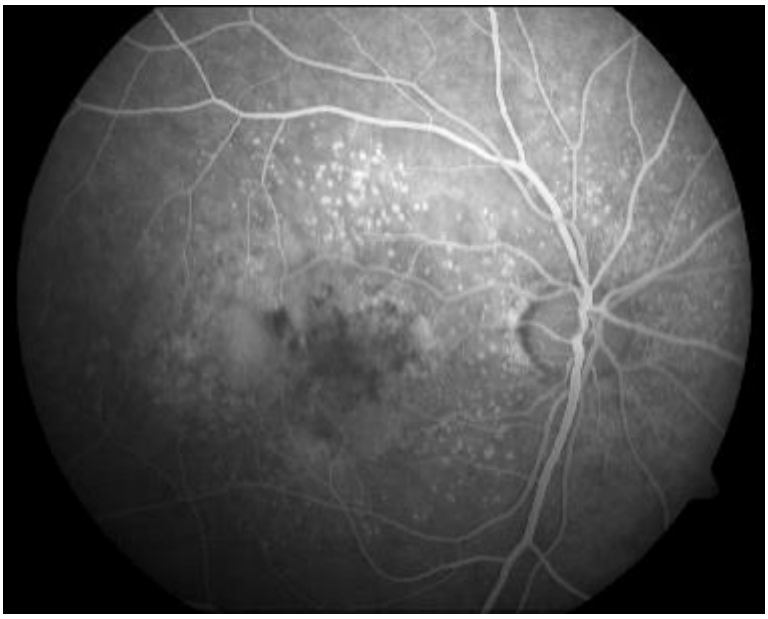
Slika 11E. OCT istog bolesnika, klasični oblik CNV u vlažnoj formi SMD-a: kupolasta hiperreflektivna subretinalna tvorba iznad signala RPE-a, odgovara klasičnoj neovaskularnoj membrani, hiporefleksivna zona u subretinalnom prostoru s hiperrefleksivnim točkastim odjecma odgovara subretinalnim hemoragijama.



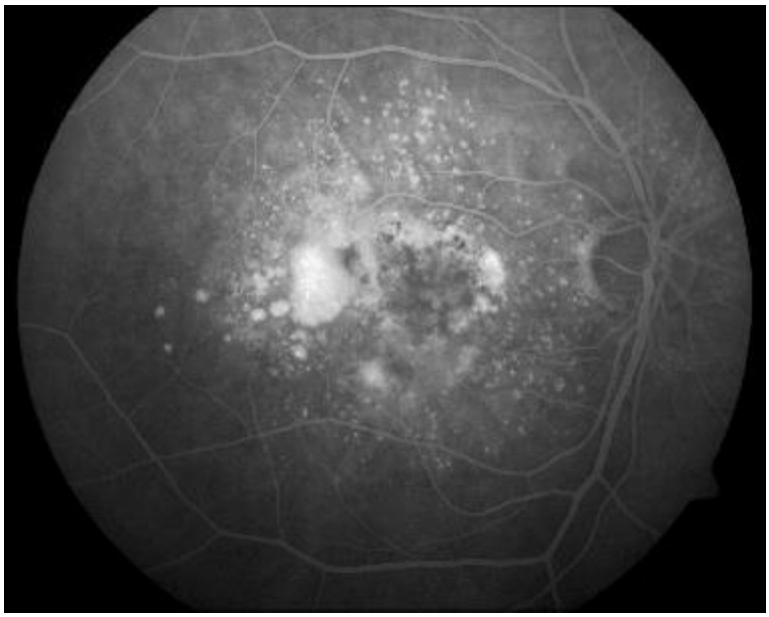
Slika 12A. Fotografija fundusa u boji: blijedožućkasto odignuće u širem makularnom području, rarifikacija RPE-a s centralmon hemoragijom, kasni vlažni oblik senilne makularne degeneracije, okultni oblik CNV.



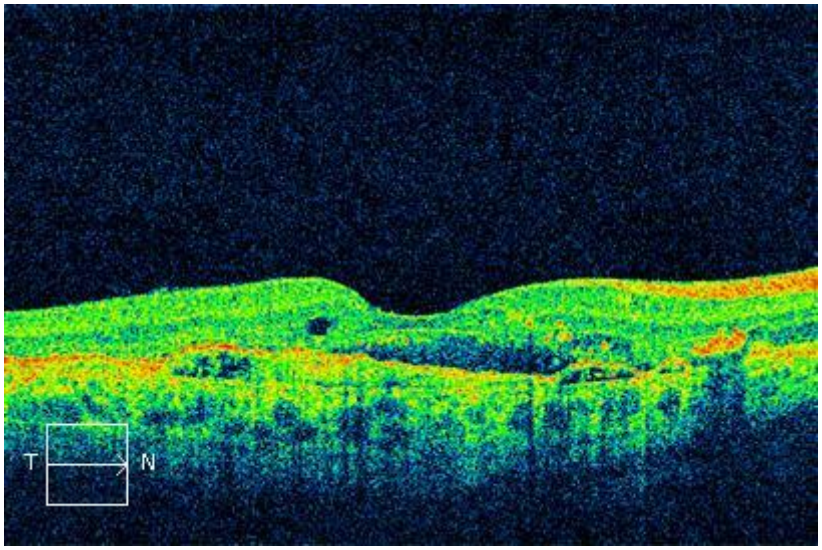
Slika 12B. Floresceinografski prikaz fundusa istog bolesnika. U ranoj fazi fluoresceinske angiografije uz centralnu blokadu fluoresceina (hemoragije) naznačene su nejednolike i nepravilne rubne hiperfluorescencije (okultne CNV).



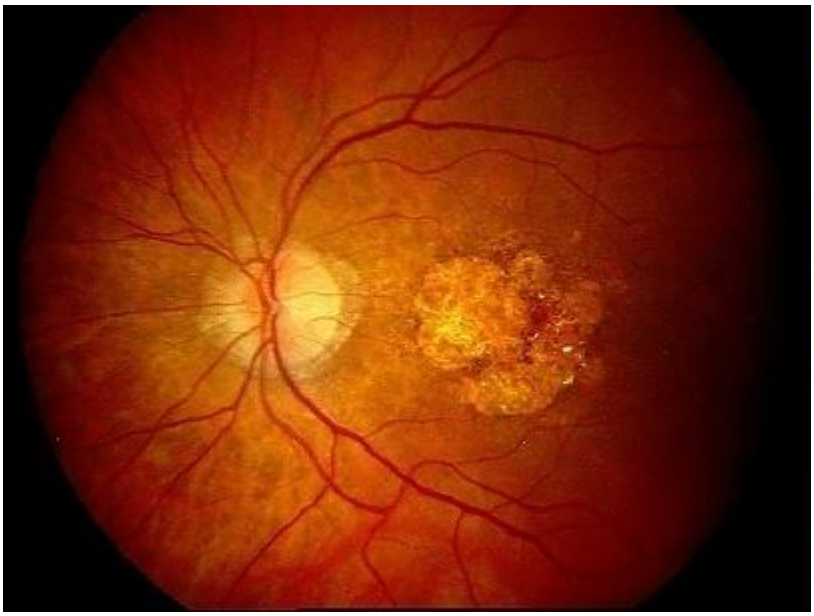
Slika 12C. U daljnjim fazama angiografije rubne se hiperfluorescence intenziviraju i homogeniziraju.



Slika 12D. U kasnoj fazi fluoresceinske angiografije dolazi do akumulacije fluoresceina ispod RPE i pojačane fluorescencije u području okultnih CNV.



Slika 12E. OCT istog bolesnika: hiperrefleksivne strukture, koje odižu sloj RPE-a i slojeve mrežnice (okultna neovaskularna membrana) s akumulacijom tekućine subretinalno i prisutstvo subretinalnih hemoragija. Sloj fotoreceptora i RPE-a nehomogene je debljine uz prekid kontinuiteta fotoreceptorskog i RPE-e sloja fibroznim hiperrefleksivnim tkivom.



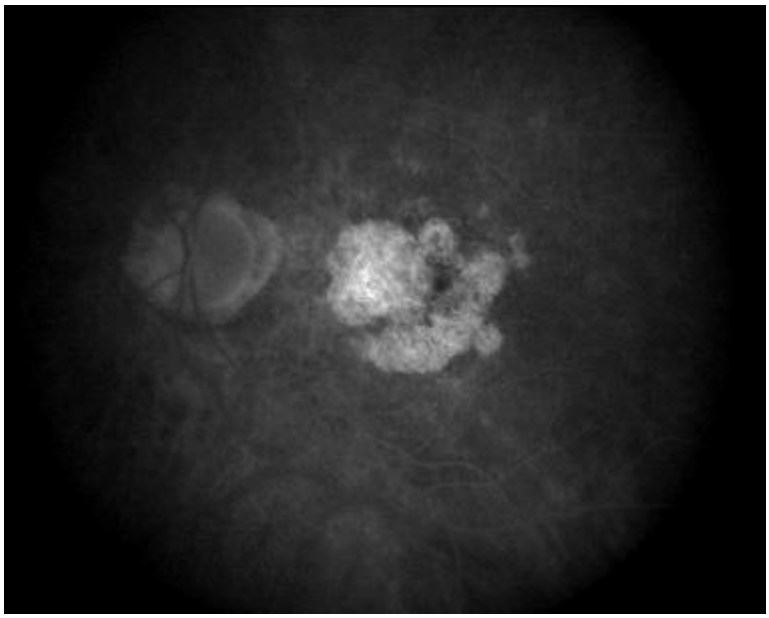
Slika 13A. Fotografija fundusa u boji: suhi, kasni oblik senilne makularne degeneracije – geografska atrofija (GA), velika zona atrofije RPE-a u makularnom području s prosijavanjem korioidalne vaskulature.



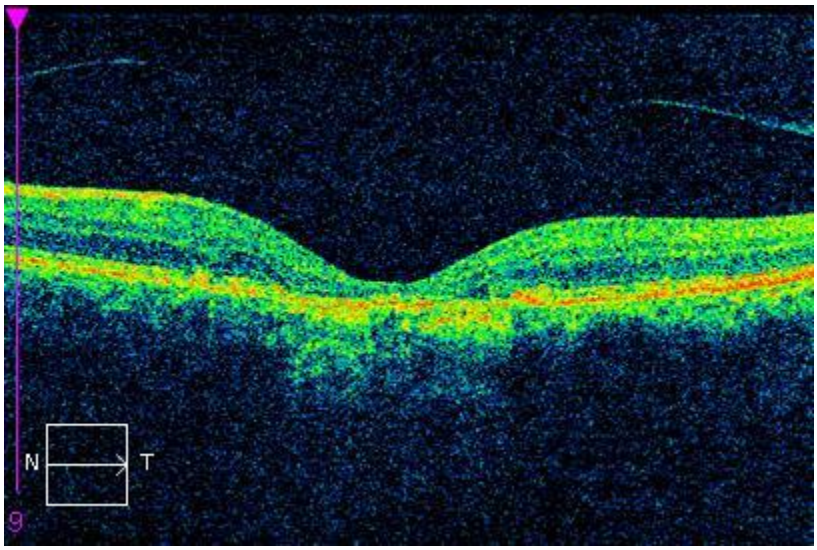
Slika 13B. Fluorosceinografski prikaz fundusa u istog bolesnika: tijekom rane arterijske faze angiografije u području geografske atrofije vidljiva je fluorescencija korioidalnih krvnih žila uz prosijavanje korioidalne fluorescencije.



Slika 13C. Intenzivnija hiperfluorescencija u dobro ograničenoj zoni geografske atrofije, bez znakova propuštanja fluoresceina u arterijsko-venskoj fazi angiografije.



Slika 13D. Dobro ograničene hiperfluorescencije u zoni geografske atrofije, bez znakova propuštanja fluoresceina u kasnoj fazi angiografije.



Slika 13E. OCT istog bolesnika: stanjenje retine u području makule uz djelomičnu destrukciju sloja RPE-a i sloja fotoreceptora.

3.3.3. Laboratorijske pretrage

Svim je ispitanicima (i u eksperimentalnoj i u kontrolnoj skupini) za određivanje enzimskih antioksidanata (SOD-a, GPx-a, i CAT-a), TAS-a, i drugih biokemijskih parametara (mokraćne kiseline, bilirubina, albumina) s antioksidacijskim učinkom te biokemijskih parametara koji se povezuju sa SMD-om (kolesterola, triglicerida i CRP-a), jednokratno natašte uzet uzorak venske krvi (10 ml) između 8 – 9 sati ujutro nakon 12 – 14 sati posta tijekom noći. Analiza je rađena na Odjelu za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split.

Uzorak krvi za određivanja aktivnosti enzima SOD-a i CAT-a uzet je u epruvete s podtlakom (Becton Dickinson) uz dodatak etilen diamin tetra-acetata (K3-EDTA) kao antikoagulansa. Za uzork krvi za određivanje aktivnosti GPx-a korištene su također epruvete s podtlakom (Becton Dickinson), ali s dodatkom litium heparina. Unutar jednog sata od prikupljanja iz uzorka krvi pripremljen je lizat eritrocita u kojem je spektrofotometrijski pri temperaturi od 37 ^{0}C mjerena aktivnost enzima: SOD-a na 505 nm, GPx-a na 340 nm i CAT-a na 520 nm. Do obrade su uzorci krvi bili pohranjeni na suhom ledu.

Za određivanje TAS-a krv se uzimala u silikonizirane epruvete s podtlakom (Becton Dickinson) bez antikoagulansa.

3.3.3.1. Određivanje aktivnosti superoksidne dismutaze u eritrocitima

Za određivanje aktivnosti SOD-a korišten je komercijalni test RANSOD tvrtke Randox Laboratories, Crumlin, UK. Eritrociti su izolirani iz pune krvi i lizirani slijedeći naputak proizvođača, postupkom koji je primijenjen u radu Winterborna i suradnika s manjim

preinakama [239]. Uzorak pune svježe krvi s antikoagulansom centrifugiran je na 3000 okretaja/min tijekom 10 minuta, nakon čega se plazma s leukocitima i trombocitima pažljivo odstranjivala, a eritrociti 4 puta ispirali sa 0,9 %-tnom otopinom NaCl i nakon svakog ispiranja centrifugirali 10 minuta na 3000 okretaja/min. Isprani i centrifugirani eritrociti lizirali su se dodatkom hladne destilirane vode i ostavljali tijekom 15 min na temperaturi od 4 ^{0}C da se proces hemolize dovrši. Lizat se zatim razrjeđivao sa 0,01 mol/l fosfatnog pufera, pH 7,0 (0,05 ml lizata + 1200 ml fosfatnofg pufera ili 50 µl lizata sa 1,2 ml fosfatnog pufera) i u razrijeđenom lizatu spektrofotometrijski na valnoj duljini od 505 nm pri temperaturi od 37 ^{0}C određivala se aktivnost SOD-a izražena u U/gHb.

Hemoglobin je mjeren u uzorku pune krvi standardnim laboratorijskim metodama.

3.3.3.2. Određivanje aktivnosti glutatonske peroksidaze u eritrocitima

Aktivnost GPx-a mjerena je u hemolizatu pune krvi komercijalnim testom RANSEL (Randox Laboratories, Crumlin, UK), metodom prema Paglia i Valentinu [240] slijedeći naputak proizvođača. Heparinizirana krv (0,05 ml) razrijeđena je dodavanjem razrjeđivača R3 (isporučenog uz test) i inkubirana tijekom 5 minuta. Zatim je dodan 1 ml Drabkinova reagensa kako bi se proizveo stabilni cijanmethemoglobin i spriječila oksidacija NADH-a. Unutar 20 minuta od dodavanja Drabkinova reagensa određivana je aktivnost GPx-a spektrofotometrijski na 340 nm pri temperaturi od 37 ^{0}C izražena kao U/gHb.

Mjerenje SOD-a i GPx-a obavljano je na automatskom analizatoru Architect C8000 (Abbott Diagnostics, USA).

3.3.3.3. Određivanje aktivnosti katalaze u eritrocitima

Aktivnost katalaze određivala se u lizatu eritrocita korištenjem testa OxiSelect catalase activity (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA), prema uputama proizvođača. Katalaza razgrađuje H_2O_2 pri čemu nastaje voda i molekularni kisik, a količina razgrađenog H_2O_2 proporcionalna je aktivnosti enzima. Promjena boje reakcijske smjese (proporcionalna aktivnosti katalaze) mjerena je spektrofotometrijski na 520 nm, na uređaju BioTek (MTX Lab Systems, INC. Virginia, USA). Aktivnost katalaze izražena je u U/gHb.

3.3.3.4. Određivanje TAS-a u serumu

TAS je određivan u serumu pri čem je korišten komercijalni TAS kit (Randox, Crumlin, UK) po uputi proizvođača, metodom prema Milleru i sur. [241] na analizatoru Architect C8000). Boja 2, 2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) je u reagensu inkubirana s peroksidazom (metmioglobinom) i H_2O_2. Boja ABTS u prisutnosti peroksidaze reagira sa H_2O_2

stvarajući kationski radikal $ABTS^{\cdot+}$ koji je zelene boje (mjeri se na 600 nm). Dodatkom antioksidansa prisutnog u uzorku seruma suprimira se nastanak ABTS radikala (suprimira se razvijanje boje), a koncentracija antioksidansa je obrnuto proporcionalna razvoju boje (ABTS radikala). Vrijednosti TAS-a izražene su u mmol/l.

Ostali neenzimski parametri određivani su standardnim laboratorijskim metodama.

3.4. Statistički postupci

Razina statističke značajnosti određena je na $P<0,05$ i svi intervali pouzdanosti dani su na 95%-tnoj razini. U svim slučajevima upotrijebili smo dvosmjerne (engl. two-tail) testove statističke značajnosti. Univarijatna analiza razlika medijana vrijednosti TAS-a, SOD-a GPx-a i CAT-a između SMD-a i kontrolne skupine napravljena je Mann – Whitney U testom s Monte Carlo dvosmjernim izračunom statističke značajnosti, utemeljenim na uzorku od 10.000 tablica. Raspodjele rezultata opisane su medijanima i interkvartilnim rasponima. Prikazane su apsolutne i relativne razlike medijana vrijednosti između SMD-a i kontrolne skupine. Intervali pouzdanosti razlika između dva medijana izračunati su pomoću metode koju su preporučili Bonett i Price (2002.) [242]. Procjena enzimske aktivnosti i interakcije aktivnosti GPx-a i SOD-a kao neovisnih prediktora SMD-a napravljena je multivarijatnom, binarnom logističkom regresijom. Kontrola mogućih demografskih, vitalnih, kliničkih i biokemijskih zbunjujućih varijabli odnosno prilagodba povezanosti aktivnosti GPx i TAS za učinak tih varijabli napravljena je multivarijatnom, binarnom logističkom regresijom. U prvom koraku analizirane su univarijatne povezanosti svih varijabli sa SMD. Prema kriteriju koji su predložili Hosmer i Lemeshow 2000, u multivarijatnu analizu uključene su one varijable koje su se univarijatno pokazale povezanima sa SMD na razini statističke značajnosti $P<0,25$ [243,244]. Prije analize svi su markeri standarizirani. Standardizacija je napravljena tako što su od svih podataka oduzete aritmetičke sredine, a zatim je ta razlika podijeljena standardnim devijacijama svakog markera. Moderatorski utjecaj SOD-a na povezanost aktivnosti GPx-a i SMD-a analiziran je u programu Process, verzija 2.12., Andrewa F. Hayesa, The Ohio State University, 2014. Vrijednosti SOD-a, pri kojima je povezanost GPx-a i SMD-a bila statistički značajna određene su Johnson-Neymanovom tehnikom kako je implementirana u programu Process. Vjerojatnosti SMD-a izračunate su temeljem omjera izgleda kao: vjerojatnost = omjer izgleda/(1+omjer izgleda). Optimalne granične vrijednosti TAS-a i GPx-a za predikciju SMD-a određene su pomoću *Receiver Operating Characteristic* (ROC) analize i Youdenova indeksa J. Ta dva markera su dihotomizirana i kombinirana u kompozitni prediktor s dvjema vrijednostima: 1) barem jedan od dvaju markera na ili ispod granične vrijednosti, 2) oba markera, i TAS i GPx, iznad granične vrijednosti. Prediktivna vrijednost dihotomiziranih i kombiniranih markera određena je pomoću površine ispod ROC krivulje, osjetljivosti, specifičnosti, pozitivnih i negativnih prediktivnih vrijednosti i omjera vjerojatnosti (engl. *likelihood ratios*). Statistička analiza podataka napravljena je pomoću programa R Development Core Team (2008) (R: A language and environment for statistical computing), R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org/. Analiza ROC krivulja

napravljena je pomoću statističkog programa MedCalc verzija 13.3 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; http://www.medcalc.org/; 2014).

3.5. Etičnost postupaka

Ovo je istraživanje pregledalo i odobrilo Etičko povjerenstvo KBC-a Split.

U istraživanju su se poštivala temeljna etička i bioetička načela – osobni integritet (autonomnost), pravednost, dobročinstvo i neškodljivost – u skladu s Nürnberškim kodeksom i Helsinškom deklaracijom [245].

Medicinski podatci prikupljeni su u skladu s etičkim i bioetičkim načelima. Osigurana je privatnost (medicinska tajna) ispitanika uključenih u istraživanje, kao i zaštita tajnosti podataka.

Svi su ispitanici dobili na potpis obrasce Obavijest za ispitanike i Suglasnost za sudjelovanje u istraživanju, koje je odobrilo Etičko povjerenstvo KBC-a Split.

4. REZULTATI

4.1. Opis uzorka prema demografskim, vitalnim i kliničkim obilježjima

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 107 ispitanika: 57 sa SMD-om (32 s ranim i 25 s kasnim oblikom bolesti) i 50 zdravih (u smislu SMD-a) ispitanika u kontrolnoj skupini (tablica 1). Skupine su inicijalno bile izjednačene prema dobi, spolu i cjeloživotnoj izloženosti sunčevu zračenju. U skupini bolesnika sa SMD-om bilo je 36 žena (61,4 %) i 21 muškarac (38,6 %). U kontrolnoj skupini bila je 31 žena (62,0 %) i 19 muškaraca (38,0 %) (tablica 1). S ranim oblikom SMD-a bilo je 11 muškaraca (34,4 %) i 21 žena (65,6 %), a s kasnim SMD-om 10 muškaraca (40,0 %) i 15 žena (60,0 %). U skupini bolesnika skupni medijan (interkvartilni raspon) životne dobi iznosio je 77 (71 – 81) godina, a u kontrolnoj skupini 78 (73 – 81) godina (tablica 1).

Skupina bolesnika sa SMD-om statistički se značajno razlikovala od kontrolne skupine samo u pogledu zaštite očiju od sunca nošenjem sunčanih naočala ili šešira (P<0,001) (tablica 1).

Osim mogućeg "zbunjujećg" utjecaja te varijable na odnos enzimskih antioksidansa i TAS-a sa SMD-om, odlučili smo multivarijatnim statističkim metodama kontrolirati i eventualni zbunjujući utjecaj te i svih drugih varijabla koje su univarijatno bile statistički značajno različite između skupine bolesnika sa SMD-om i kontrolne skupine na razini statističke značajnosti P<0,25 [243,244].To su bile boja očiju (P=0,137) i povišeni krvni tlak (P=0,128) (tablica 1).

Tablica 1. Demografska, vitalna i klinička obilježja ispitanika (SMD bolesnika i zdravih ispitanika)

	Skupina sa SMD-om (n=57)		Kontrolna skupina (n=50)		*P*
Dob, medijan (IQR)	77	(71–82)	78	(73–81)	0.474*
Spol					
Muškarci	21	(36.8)	19	(38.0)	0.902
Žene	36	(63.2)	31	(62.0)	
Pozitivna obiteljska anamneza za SMD	3	(5.3)	4	(8.0)	0.568
Cjeloživotna izloženost suncu †					
Niska	0	(0.0)	0	(0.0)	0.792
Srednja	7	(12.3)	7	(14.0)	
Visoka	50	(87.7)	43	(86.0)	
Zaštita očiju od sunca‡	2	(3.5)	15	(30.0)	<0.001
Izloženost suncu u djetinjstvu§	55	(96.5)	48	(96.0)	0.894
Boja očiju					
Svijetla	27	(47.4)	16	(32.0)	0.137
Srednje tamna	27	(47.4)	27	(54.0)	
Tamna	3	(5.3)	7	(14.0)	
Boja kose					
Svijetla	20	(35.1)	13	(26.0)	0.392
Srednje tamna	32	(56.1)	29	(58.0)	
Tamna	5	(8.8)	8	(16.0)	
Mrena					
Ne	3	(5.3)	5	(10.0)	0.615
Da	40	(70.0)	32	(67.0)	
Pseudofakija	14	(24.5)	13	(26.0)	
Povišen krvni tlak ‖	33	(57.9)	36	(72.0)	0.128

Podatci su prikazani kao n (%) osim ako nije drukčije označeno.
KRATICE: SMD= senilna makularna degeneracija; IQR = interkvartilni raspon;
P= χ^2 test; statistička značajnost rezultata;
*Mann – Whitney U-test;
†Niska zaštita od sunca = prosječna životna izloženost suncu < 4 sata dnevno; srednja izloženost 4 – 7 sati dnevno i visoka izlošenost ≥ 7 sati dnevno;
‡Nošenje naočala i/ili šešira;
§ Jesu li ispitanici više vremena provodili kao djeca na suncu;
‖ Je li u ispitanika dijagnosticiran povišeni krvni tlak.

4.2. Razlike u vrijednostima neenzimskih antioksidansa (bilirubina, mokraćne kiseline, albumina) i drugih ispitivanih biokemijskih parametara između skupine bolesnika sa SMD-om i kontrolne skupine

Mann – Whitney U testom ispitali smo statističku značajnost razlika u vrijednostima određenih neenzimskih antioksidansa (bilirubina, mokraćne kiseline, albumina), kao i biokemijskih parametara (kolesterola, HDL i LDL kolesterola, triglicerida i CRP-a) koji se povezuju s nastankom SMD-a, kao i vrijednosti Hb (koji je korišten za izračun aktivnosti enzimskih antioksidansa) između bolesnika sa SMD-om i ispitanika kontrolne skupine (tablica 2). Jedina statistički značajna razlika između promatranih skupina dobivena je za vrijednosti albumina (P=0,039). Albumini su u skupini bolesnika sa SMD-om bili statistički značajno niži nego u kontrolnoj skupini. U drugim praćenim biokemijskim parametrima nismo dobili statistički značajne razlike između ispitivanih skupna (tablica 2). Multivarijatnim statističkim metodama u nastavku smo kontrolirali doprinos albumina i triglicerida (jer su se trigliceridi univarijatno statistički značajno razlikovali između skupine bolesnika sa SMD-om i kontrolne skupine na razini značajnosti P<0,25), kao mogućih "zbunjujućih" varijabli za odnos enzimskih antioksidansa i TAS-a i SMD-a.

Tablica 2. Razlike u vrijednostima određenih neenzimskih antioksidansa, biokemijskih parametara koji se povezuju s nastankom SMD-ate vrijednosti Hb između skupine bolesnika sa SMD-om i kontrolne skupine ispitanika

	Skupina sa SMD-om (n=57)		Kontrolna skupina (n=50)		*P*
Bilirubin ukupni µmol/l	9.9	(7.5−13.4)	10.8	(7.3−15.5)	0.774
Bilirubin direktni µmol/l	2.9	(1.8−4.1)	3.1	(2.2−4.5)	0.765
Bilirubinin direktni µmol/l	7.5	(5.3−11.5)	7.9	(5.3−11.9)	0.789
Albumini g/l	41.0	(40.0−43.0)	43.0	(40.0−45.0)	0.039
Mokraćna kiselina µmol/l	300	(264−361)	318	(256−396)	0.939
Kolesterol mmol/l	5.7	(4.7−6.7)	5.9	(5.0−6.8)	0.500
HDL mmol/l	1.5	(1.2−1.8)	1.6	(1.4−1.9)	0.395
LDL mmol/l	3.4	(2.8−4.6)	3.8	(3.0−4.4)	0.844
Trigliceridi mmol/l	1.2	(1.0−1.7)	1.5	(1.1−1.9)	0.183
CRP mg/l	1.9	(1.1−4.5)	2.3	(1.3–3.9)	0.908
Hb g/l	136	(131−145)	139	(130−148)	0.508

Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)
P = Mann−Whitney U test, statistička značajnost rezultata;
SMD = Senilna makularna degeneracija.

4.3. Razlike u aktivnosti enzimskih antioksidansa (SOD-a, GPx-a i CAT-a) u eritrocitima i razine TAS-a u serumu između skupine bolesnika sa SMD-om i kontrolne skupine

Mann − Whitneyevim U testom s Monte Carlo dvosmjernim izračunom statističke značajnosti temeljenim na uzorku od 10.000 tablica istražili smo postoji li statistički značajna razlika u aktivnosti pojedinih enzimskih antioksidansa u eritrocitima i vrijednosti TAS-a u serumu između bolesnika sa SMD-om i ispitanika kontrolne skupine (tablica 3). Aktivnost GPx-a u eritrocitima bila je statistički značajno niža u skupini bolesnika sa SMD-om nego u kontrolnoj skupini. Razlika je iznosila 15 U/gHb (28 %) (P<0,001). Medijan TAS-a bio je 0,17 mmol/l (10 %) niži u skupini bolesnika sa SMD-om, indicirajući statistički značajnu razliku između dviju skupina (P=0,015). Nakon prilagodbe za učinak vrijednosti svih četiriju parametara, niže vrijednosti GPx-a i TAS-a bile su statistički značajno povezane sa SMD-om. Sniženje aktivnosti GPx-a za jednu standardnu devijaciju povećavalo je vjerojatnost izgleda za nastanak SMD-a 4,10 puta. Sniženje vrijednosti TAS-a za jednu standardnu devijaciju povećavalo je izgled za nastanak SMD-a 2,34 puta.

Između skupine sa SMD-om i kontrolne skupine nismo uočili statistički značajne razlike u aktivnosti SOD-a (P=0,984) i CAT-a (P=0,426) u eritrocitima (tablica 3).

Tablica 3. Razlike u medijanima aktivnosti SOD-a, GPx-a i CAT-a u eritrocitima te razine TAS-a u serumu između bolesnika sa SMD-om i zdrave kontrolne skupine; povezanost smanjenja vrijednosti pojedinih biljega i SMD-a

	Skupina sa SMD-om (n=57)	Kontrolna skupina (n=50)	d_{abs} (95 % CI)	d_{rel}	P	Multivarijatna analiza*	
						OR (95 % CI)	P
SOD U/gHb	1389 (1185−1601)	1413 (1221−1575)	−25 (−166−116)	2%	0.984	1.10 (0.68−1.79)	0.701
GPx U/gHb	39 (33−48)	54 (43−62)	−15 (−21−−9)	28%	<0.001	4.10 (2.19−7.70)	<0.001
CAT U/gHb	52 (48−58)	54 (47−60)	−2 (−6−2)	4%	0.426	0.70 (0.41−1.20)	0.191
TAS mmol/l	1.47 (1.33−1.71)	1.64 (1.47−1.77)	−0.17 (−0.28−−0.05)	10%	0.015	2.34 (1.42−3.86)	0.001

Vrijednosti su prikazane kao medijan (interkvartilni raspon)
KRATICE: SMD = senilna makularna degeneracija; SOD = superoksidna dismutaza; GPx = glutationska peroksidaza; CAT = katalaza; TAS = ukupni antioksidacijski status;
P = Mann-Whitney U test s Monte Carlo dvosmjernom statističkom značajnošću temeljem uzorka od 10.000 tablica; d_{abs} = apsolutna razlika između medijana; d_{rel} = relativna razlika između medijana; 95 % CI = 95 % interval pouzdanosti razlika između medijana; OR = omjer izgleda za SMD pri jediničnoj promjeni aktivnosti biljega, multivarijatna binarna logistička regresija;
*Vrijednosti SOD-a, GPx-a, CAT-a i TAS-a bile su standardizirane prije uključivanja u multivarijatnu logističku regresiju; od svakog rezultata je oduzeta aritmetička sredina svih rezultata te je ta razlika podijeljena standardnom devijacijom svih rezultata.

4.4. Multivarijatna logistička regresijska analiza povezanosti aktivnosti GPx u eritrocitima i TAS-a u serumu sa SMD-om, nakon kontrole zbunjujućih varijabla

Nakon što smo multivarijatnom binarnom logističkom regresijom napravili prilagodbu za učinke za sve proučavane varijable koje su se univarijatno pokazale statistički značajno različitima između skupine bolesnika sa SMD-om i kontrolne skupine na razini statističke značajnosti $P<0,25$ (zaštita očiju od sunca, boja očiju, povišeni krvni tlak, albumini u serumu te trigliceridi), snižavanje TAS-a za jednu standardnu devijaciju statistički je značajno povećavalo izglede za SMD (OR=2,11; 95 % CI 1,18-3,76; $P=0,012$), kao i snižavanje GPx-a za jednu standardnu devijaciju (OR=4,1; 95 % CI 2,1 – 7,96; $P<0,001$) (tablica 4). Snižene vrijednosti TAS-a i aktivnosti GPx-a pokazali su se neovisnim prediktorima SMD-a. Osim vrijednosti aktivnosti GPx-a u eritrocitima i razine TAS-a u serumu, zaštita očiju od sunca i albumini u serumu bili su statistički značajno različiti između skupine bolesnika sa SMD-om i kontrolne skupine.

Tablica 4. Analiza povezanosti aktivnosti GPx-a u eritrocitima i TAS-a u serumu sa SMD-om, nakon kontrole zbunjujućih varijabla

	Skupina sa SMD-om (n=57)	Kontrolna skupina (n=50)	Multivarijatna analiza*	
			OR (95 % CI)	*P*
GPx U/gHb	39 (33−48)	54 (43−62)	4.10 (2.11−7.96)	<0.001
TAS mmol/l	1.47 (1.33−1.71)	1.64 (1.47−1.77)	2.11 (1.18−3.6)	0.012
Zaštita očiju od sunca †	2 (3.5)	15 (30.0)	0.09 (0.01−0.75)	0.026
Boja očiju				
Svijetla	27 (47.4)	16 (32.0)	1	
Srednje tamna	27 (47.4)	27 (54.0)	0.53 (0.17−1.7)	0.283
Tamna	3 (5.3)	7 (14.0)	0.14 (0.02−1.01)	0.051
Povišen krvni tlak ‡	33 (57.9)	36 (72.0)	0.55 (0.18−1.69)	0.297
Albumini g/l	41.0 (40.0−43.0)	43.0 (40.0−45.0)	0.79 (0.65−0.96)	0.019
Trigliceridi mmol/l	1.2 (1.0−1.7)	1.5 (1.1−1.9)	1.21 (0.5−2.9)	0.675

KRATICE: SMD = senilna makularna degeneracija; TAS = ukupni antioksidacijski status; GPx = glutationska peroksidaza; OR = omjer izgleda za SMD pri jediničnoj promjeni aktivnosti biljega, multivarijatna binarna logistička regresija;
*Vrijednosti TAS-a, GPx-a bile su standardizirane prije uključivanja u multivarijatnu logističku regresiju; od svakog rezultata je oduzeta aritmetička sredina svih rezultata te je ta razlika podijeljena standardnom devijacijom svih rezultata;
† Nošenje naočala i/ili šešira;
‡ Je li u ispitanika dijagnosticiran povišeni krvni tlak.

4.5. Razlika u aktivnosti enzimskih antioksidansa (SOD-a, GPx-a i CAT-a) i razine TAS-a u serumu između skupina ispitanika s ranim i kasnim oblikom SMD-a i kontrolne skupine

Nakon što smo skupinu bolesnika sa SMD-om podijelili u dvije kategorije – na one s ranim i one s kasnim stadijem – uspoređivali smo ih međusobno i s kontrolnom skupinom radi utvrđivanja postojanja povezanosti ispitivanih varijabla s težinom SMD-a (tablica 5). Jonckheere-Terpstra test nije indicirao statistički značajne razlike u aktivnostima SOD-a i CAT-a između triju promatranih skupina. Razlike u vrijednostima aktivnosti GPx-a i razine TAS-a bile su statistički značajne između promatranih skupina. Između skupina bolesnika s ranim SMD-om i kasnim SMD-om vrijednost TAS-a nije se statistički značajno razlikovala (Mann – Whitney U test; z=0,306; *P*=0,759). Aktivnost GPx-a također se nije statistički značajno razlikovala između skupine bolesnika s ranim i kasnim SMD-om (Mann – Whitney U test; z= 0,321; *P*=0,748).

Iako se aktivnost GPx-a nije statistički značajno razlikovala između bolesnika s ranim i kasnim SMD-om, aktivnost GPx-a bila je statistički značajno niža i u bolesnika s ranim (z=3,63; *P*<0,001) i u bolesnika s kasnim (z=3,6; *P*<0,001) SMD-om u odnosu na kontrolnu skupinu. Isto tako vrijednosti TAS-a bile su statistički značajno niže u skupini bolesnika s kasnim SMD-om (z=2,3; *P*=0,023) u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika, a vrijednosti TAS-a u skupini bolesanika s ranim SMD-om bile su niže od vrijednosti TAS-a u ispitanika kontrolne skupine na razini značajnosti od 92 % (a ne na zadanih 95 %) (z=1,73; *P*=0,084).

Tablica 5. Razlika u aktivnosti enzimskih antioksidansa (SOD-a, GPx-a i CAT-a) i razine TAS-a u serumu između skupina ispitanika s ranim i kasnim SMD-om i kontrolne skupine

	Skupina sa SMD-om		Kontrolna skupina (n=50)	*P*	η^2
	Rani SMD (n=32)	Kasni SMD (n=25)			
SOD U/gHb	1430 (1089−1713)	1378 (1227−1577)	1413 (1221−1575)	0.961	0.00
GPx U/gHb	39 (35−47)	38 (30−51)	54 (43−62)	<0,001	0.18
CAT U7gHb	53 (48−57)	52 (44−62)	54 (47−60)	0.514	0.01
TAS mmol/l	1.45 (1.29−1.75)	1.48 (1.35−1.68)	1.64 (1.47−1.77)	0.022	0.06

Vrijednosti su prikazane kao medijan (interkvartilni raspon)
KRATICE: SMD = senilna makularna degeneracija; SOD = superoksidna dismutaza; GPx = glutationska peroksidaza; CAT = katalaza; TAS = ukupni antioksidacijski statusa; *P*= Jonckheere-Terpstra test s Monte Carlo dvosmjernom statističkom značajanošću temeljem uzorka od 10.000 tablica; η^2= standardizirana mjera veličine učinka izračunata kao [χ^2/(n-1)].

4.6. Interakcija aktivnosti SOD-a i GPx-a u predikciji SMD-a

Iako aktivnost SOD-a nije bila statistički značajno povezana sa SMD-om, imala je statistički značajan moderatorski utjecaj na povezanosti GPx-a i SMD-a (P=0,003). Pri aktivnosti SOD-a nižoj od prvog kvartila, odnosno nižoj od −0,73 standardne devijacije (što je odgovaralo vrijednosti aktivnosti SOD-a nižoj od 1209 U/gHb), razlike u aktivnosti GPx-a nisu bile statistički značajno povezane sa SMD-om (tablica 6). Iznad 75-og percentila vrijednosti aktivnosti SOD-a, što je iznosilo više od 0,59 standardnih devijacija (što je odgovaralo aktivnosti SOD-a ≥1581 U/gHb), jedna standardna devijacija smanjenja GPx-a povećavala je izglede za SMD za više od šest puta (OR = 6,22; P<0,001).

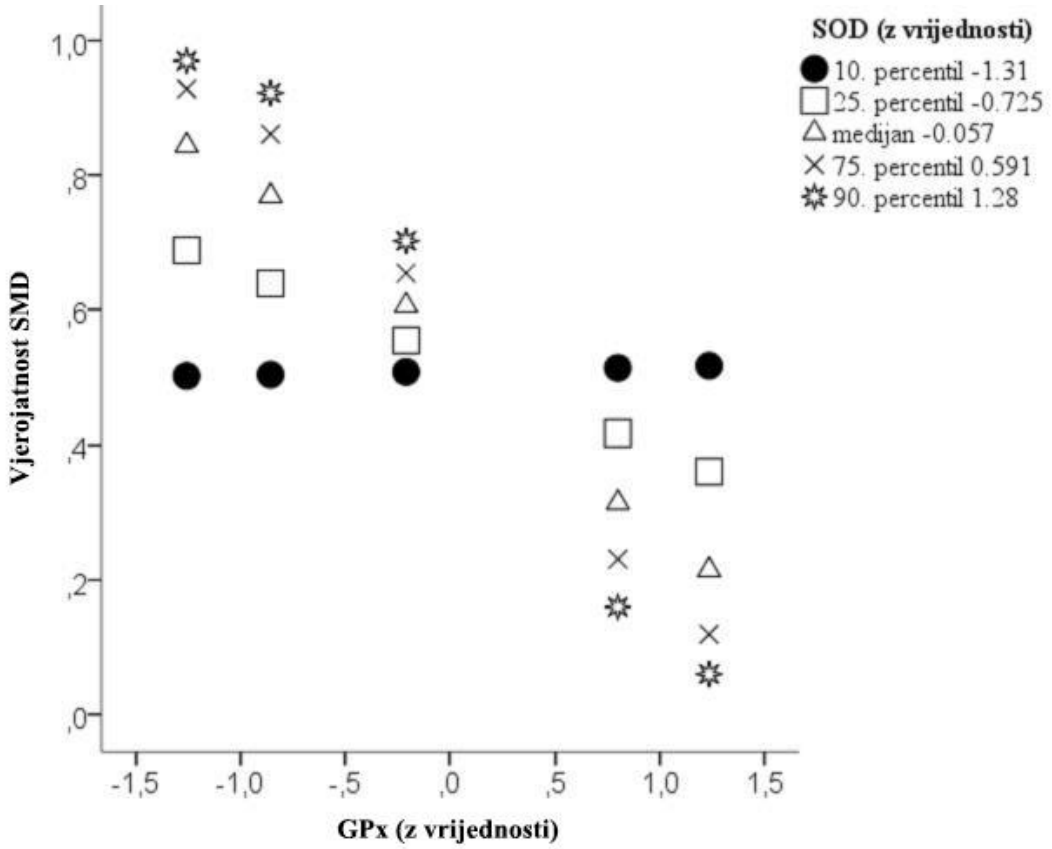
Što je aktivnost SOD-a bila viša, to je bila veća povezanost smanjenja aktivnosti GPx-a i SMD-a (slika 14).

Interakcije SOD-a i CAT-a (P=0,810) te GPx-a i CAT-a (P=0,679) nisu bile statistički značajne.

Tablica 6. Povezanost aktivnosti GPx-a sa SMD-om pri različitim razinama aktivnosti SOD-a

SOD* (z vrijednosti)	Učinak smanjenja aktivnosti GPx-a			
	OR	(95 % CI)	*P*	Vjerojatnost SMD-a
10. percentil (−1.31)	0.98	(0.45−1.08)	0.953	0.49
25. percentil (−0.73)	1.73	(1.00−2.97)	0.049	0.63
50. percentil (−0.06)	3.31	(1.88−5.81)	<0.001	0.77
75. percentil (0.59)	6.22	(2.66−14.44)	<0.001	0.86
90. percentil (1.28)	12.16	(3.56−41.68)	<0.001	0.92

KRATICE: GPx = glutationska peroksidaza; SOD = superoksidna dismutaza; OR = omjer izgleda za SMD pri jediničnom smanjenju standardizirane vrijednosti GPx-a; 95 % CI = 95 % interval pouzdanosti; *P* = razina statističke značajnosti; Vjerojatnost = vjerojatnost SMD-a predviđena logističkom regresijom temeljem smanjenja GPx z vrijednosti;
*Vrijednosti GPx-a, SOD-a i CAT-a bile su standardizirane prije uključivanja u multivarijatnu logističku regresiju; od svakog rezultata je oduzeta aritmetička sredina svih rezultata te je ta razlika podijeljena standardnom devijacijom svih rezultata.



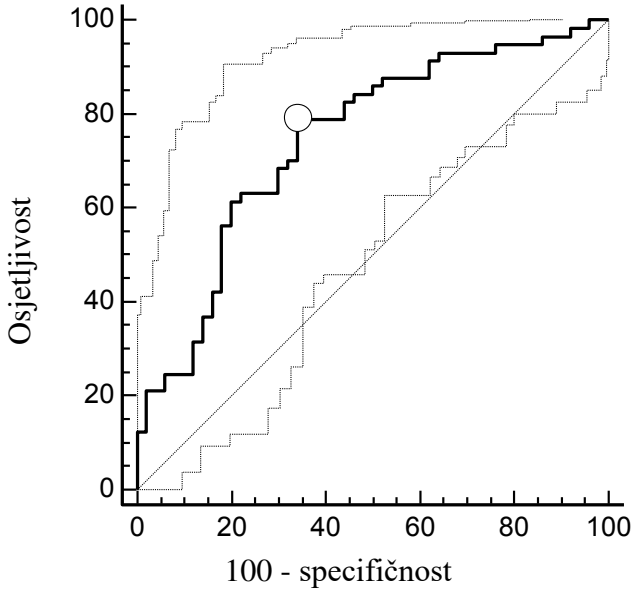
Slika 14. Vjerojatnost SMD-a prema aktivnosti GPx-a pri različitim razinama aktivnosti SOD-a; sve vrijednosti su standardizirane (z) vrijednosti

4.7. Prediktivna vrijednost aktivnosti GPx-a u eritrocitima i TAS-a u serumu za SMD

4.7.1. Prediktivna vrijednost aktivnosti GPx-a za SMD

Vrijednost aktivnosti GPx-a u eritrocitima kao potencijalno klinički upotrebljivog instrumenta za predikciju statusa SMD-a ispitali smo analizom ROC krivulja. Vjerojatnost SMD-a prije testa, odnosno očekivana prevalencija procijenjena je na 25 % temeljem prevalencije u populaciji životne dobi ≥ 65 godina [22,27]. Optimalna granična vrijednost (engl. *Cut-off values*) aktivnosti GPx-a, utvrđena temeljem Youdenova indeksa J iznosila je 48,97 U/gHb (slika 15). Ukupna točnost razlikovanja bolesnika sa SMD-om i zdrave kontrolne skupine, izračunata kao površina ispod krivulje, iznosila je AUC = 73 % (95 % CI 63 − 81 %; P<0,001), s osjetljivošću od 79 % i specifičnošću od 66 % (tablica 7). Pozitivni omjer vjerojatnosti (engl. likelihood ratio) za SMD iznosio je 2,32 (95 % CI 1,56 − 3,43). Negativni omjer vjerojatnosti iznosio je 0,32 (95 % CI 0,18 − 0,55). Broj koji je potrebno dijagnosticirati da bi se prepoznao jedan slučaj SMD-a (engl. number needed to diagnose) iznosio je 2,2 (95 % CI 1,63 − 4,02).

Uz prevalenciju odnosno vjerojatnost za bolest, prije testa vrijednosti aktivnosti GPx-a od 25 %, apsolutno povećanje vjerojatnosti za bolest pri pozitivnom testu iznosi 18 %, a relativno povećanje 76 %. Pri negativnom testu aposlutno povećanje vjerojatnosti za odsustvo bolesti iznosi 15 %, a relativno 60 %.



Slika 15. ROC krivulja osjetljivosti i 100 – specifičnosti aktivnosti GPx-a za SMD. Površina ispod krivulje (AUC) = 0,73; 95 % CI 0,63 do 0,81; *P*=0,001. Bijelim kružićem označen je Youdenov indeks J=48,97 U/gHb; isprekidana crta označava 95 %-tni interval pouzdanosti

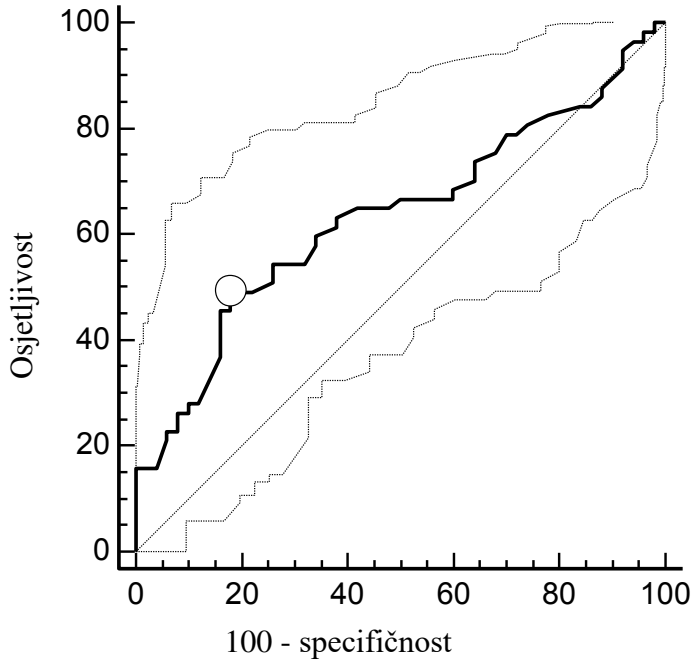
Tablica 7. Predikcija SMD-a temeljem aktivnosti GPx-a u eritrocitima

Aktivnost GPx-a	Skupina sa SMD-om (n=57)	Kontrolna skupina (n=50)	Prediktivna vrijednost
≤ 48.97 U/gHb*	45 (78.9)	17 (34.0)	Pozitivna 0.73 (0.64−0.80)
> 48.97 U/gHb	12 (21.1)	33 (66.0)	Negativna 0.73 (0.62−0.83)
Ukupno	57 (100.0)	50 (100.0)	
	Osjetljivost 0.79 (0.70−0.87)	Specifičnost 0.66 (0.55−0.75)	AUC = 73 % (95 % CI 63−81 %)

Vrijednosti su prikazane kao n (%)
KRATICE: SMD = senilna makularna degeneracija; GPx = glutationska peroksidaza; AUC = površina ispod krivulje;
*Optimalna granična vrijednost, utvrđene temeljem Youdenova indeksa J.

4.7.2. Prediktivna vrijednost TAS-a u serumu za SMD

Vrijednost razine TAS-a u serumu kao potencijalno klinički upotrebljivog instrumenta za predikciju statusa SMD ispitali smo također analizom ROC krivulja. Vjerojatnost SMD-a prije testa, odnosno očekivana prevalencija, procijenjena je na 25 % temeljem prevalencije u populaciji životne dobi ≥ 65 godina [22,27]. Optimalna granična vrijednost TAS-a, utvrđena temeljem Youdenova indeksa J iznosila je 1,44 mmol/l (slika 16). Ukupna točnost razlikovanja bolesnika sa SMD-om i zdrave kontrolne skupine, izračunata kao površina ispod krivulje, iznosila je AUC = 65 % (95 % CI 55 – 72 %; *P*=0,001), s osjetljivošću od 49 % i specifičnošću od 82 % (tablica 8). Pozitivni omjer vjerojatnosti za SMD iznosio je 2,73 (95 % CI 1,4 − 5,74). Negativni omjer vjerojatnosti iznosio je 0,62 (95 % CI 0,48 − 0,84). Broj koji je potrebno dijagnosticirati da bi se prepoznao jedan slučaj SMD-a iznosio je 3,2 (95 % CI 2,15 − 8,72). Uz prevalenciju odnosno vjerojatnost za bolest, prije testa temeljenog na razini TAS-a u serumu, od 25 %, apsolutno povećanje vjerojatnosti za bolest pri pozitivnom testu iznosi 22 %, a relativno povećanje 88 %. Pri negativnom testu apsolutno povećanje vjerojatnosti za odsutnost bolesti iznosi 8 %, a relativno povećanje 32 %.



Slika 16. ROC krivulja osjetljivosti i 100 – specifičnosti razine TAS-a za SMD. Površina ispod krivulje (AUC) = 0,65; 95 % CI: 0,55 do 0,72; *P*=0,001. Bijelim kružićem označen je Youdenov indeks J=1,44 mmol/l; isprekidana crta označava 95 %-tni interval pouzdanosti

Tablica 8. Predikcija SMD-a temeljem razine TAS-a u serumu

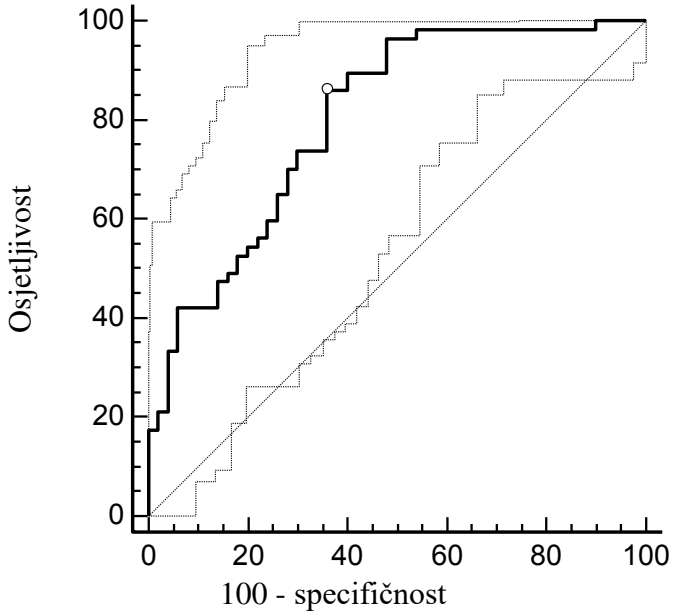
TAS	Skupina sa SMD-om (n=57)	Kontrolna skupina (n=50)	Prediktivna vrijednost
≤ 1.44 mmol/l*	28 (49.0)	9 (18.0)	Pozitivna 0.76 (0.62−0.87)
> 1.44 mmol/l	29 (51.0)	41 (82.0)	Negativna 0.59 (0.51−0.64)
Ukupno	57 (100.0)	50 (100,0)	
	Osjetljivost 0,49 (0.40−0.56)	Specifičnost 0,82 (0.72−0.90)	AUC = 65 % (95 % CI 55−72 %)

Vrijednosti su prikazane kao n (%)
KRATICE: SMD = senilna makularna degeneracija; TAS = ukupni antioksidacijski status; AUC = površina ispod krivulje;
*Optimalna granična vrijednost, utvrđena temeljem Youdenova indeksa J.

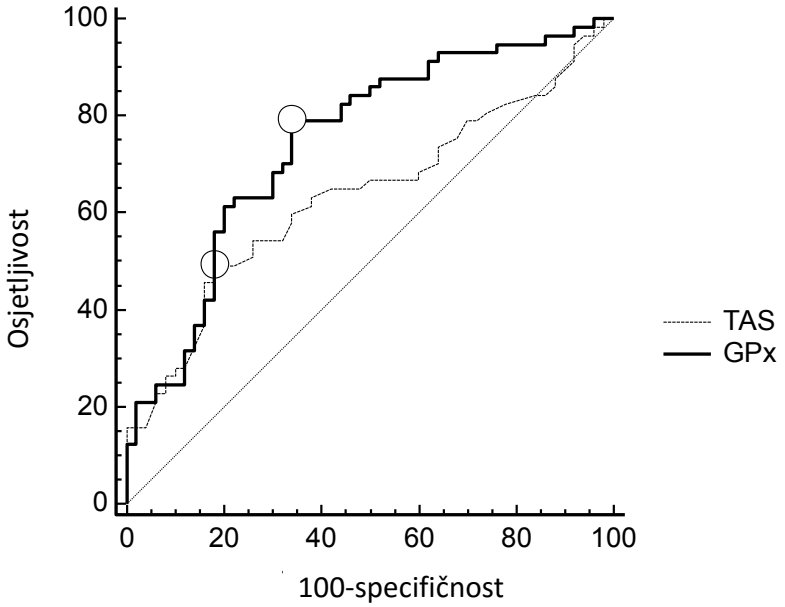
4.7.3. Prediktivna vrijednost kombinacije GPx-a i TAS-a za SMD

Istražili smo vrijednost kombinacije aktivnosti GPx-a u eritrocitima i razine TAS-a u serumu, kao potencijalno klinički upotrebljivog instrumenta (dijagnostičkog testa) za predikciju statusa SMD-a, analizom ROC krivulje (slika 17). Istom metodom određene su i granične vrijednosti GPx-a i TAS-a pri kojima je razlikovanje između bolesnika sa SMD-om i zdravih osoba bilo najveće. Vjerojatnost SMD-a prije testa, odnosno očekivana prevalencija, procijenjena je na 25 % temeljem prevalencije u populaciji životne dobi ≥ 65 godina [22,27]. Optimalna granična vrijednost, utvrđena temeljem Youdenova indeksa J, iznosila je 1,44 mmol/l za TAS i 48.97 U/gHb za GPx (slika 18). Ta dva parametra su dihotomizirana oko tako utvrđenih graničnih vrijednosti te kombinirana u kompozitni prediktor s dvjema vrijednostima: 1) barem jedan od dvaju parametara ispod ili na graničnoj vrijednosti, 2) oba parametra, i TAS i GPx, iznad granične vrijednosti. Ukupna točnost razlikovanja bolesnika sa SMD-om i zdrave kontrolne skupine, izračunata kao površina ispod krivulje, iznosila je AUC = 75 % (95 % CI 66 – 79 %; $P<0.001$), s osjetljivošću od 95 % i specifičnošću od 52 % (tablica 9). Pozitivni omjer vjerojatnosti za SMD iznosio je 1,97 (95 % CI 1,52 – 2,26). Negativni omjer vjerojatnosti iznosio je 0,10 (95 % CI 0,03 – 0,31). Broj koji je potrebno dijagnosticirati da bi se prepoznao jedan slučaj SMD-a iznosio je 2,1 (95 % CI = 1,82− 3,37). Uz prevalenciju, odnosno vjerojatnost za bolest prije testa kombiniranim vrijednostima TAS-a i GPx-a od 25 %, apsolutno povećanje vjerojatnost za bolest pri pozitivnom testu iznosi 14 %, a relativno povećanje 56 %. Pri negativnom testu apsolutno povećanje vjerojatnosti za odsutnost bolesti iznosi 22 %, a relativno povećanje 88 %. Na ciljanoj populaciji od 1000 osoba, temeljem prevalencije SMD od 25 % za populacijsku dobnu skupinu ≥ 65 godina, za očekivati je da će njih 250 razviti SMD, a 750 će ostati zdravo. Uz opisani test kombinacijom vrijednosti aktivnosti GPx-a u eritrocitima i razine TAS-a u serumu u 237 bolesnika SMD će biti pravilno prepoznat; a njih 13 sa SMD-om biti će pogrešno isključeno (neće biti prepoznati kao bolesnici); u 360 zdravih SMD

će bit pogrešno prepoznat (bit će proglašeni bolesnima), a u njih 390 SMD će biti pravilno isključen (dakle, bit će ispravno prepoznati kao zdravi).



Slika 17. ROC krivulja osjetljivostii 100 – specifičnosti kombinacije aktivnosti GPx-a i TAS-a. Površina ispod krivulje (AUC) = 0,80; 95 % CI: 0,71 do 0,87; *P*<0.001. Bijelim kružićem označen je Youdenov indeks J; isprekidana crta označava 95 %-tni interval pouzdanosti.



Slika 18. ROC krivulja osjetljivosti i 100 – specifičnosti vrijednosti aktivnosti GPx-a (krivulja pune crte) i razine TAS-a (krivulja isprekidane crte) za SMD. Površina ispod krivulje za TAS (AUC) = 0,65; 95 % CI: 0,55 do 0,72; *P*=0,001; Površina ispod krivulje GPx (AUC) = 0,73; 95 % CI: 0,63 do 0,81; *P*=0,001. Bijelim kružićima označeni su Youdenovi indeksi J = 48,97 U/gHb za GPx i J = 1,44 mmol/l za TAS; isprekidana crta označava 95 %-tni interval pouzdanosti.

Tablica 9. Predikcija SMD-a temeljem dihotomiziranih, kombiniranih vrijednosti aktivnosti GPx-a u eritrocitima i razine TAS-a u serumu

	Skupina sa SMD-om (n=57)	Kontrolna (n=50)	Prediktivne vrijednosti
Barem jedan parametar (GPx ili TAS) ispod ili na graničnoj vrijednosti*	54 (94.7)	24 (48.0)	Pozitivna 0.69 (0.63−0.72)
Oba parametra i GPx i TAS iznad graničnih vrijednosti	3 (5.3)	26 (52.0)	Negativna 0.90 (0.74−0.97)
Ukupno	57 (100.0)	50 (100.0)	
	Osjetljivost 0.95 (0.87−0.99)	Specifičnost 0.52 (0.43−0.56)	AUC= 75 % (95 % CI 66–79 %)

Vrijednosti su prikazane kao n (%)
KRATICE: SMD = senilna makularna degeneracija; TAS = ukupni antioksidacijski status; GPx = glutationska peroksidaza; AUC = površina ispod krivulje
*Optimalna granična vrijednost, utvrđena temeljem Youdenova indeksa J, iznosila je 1,44 mmol/l za TAS i 48,97 U/gHb za GPx.

5. Rasprava

Poboljšanjem u javnom zdravstvu suzbijanjem infekcija i preveniranjem dijetetskih deficita znatno je produljen prosječni životni vijek, prije svega u razvijenim zemljama Zapada. Očekuje se da bi se broj osoba u dobnoj skupini od 80 i više godina do 2050. godine globalno mogao povećati na 379 milijuna, za oko 5,5 puta u odnosu na 2000. godinu, kad je iznosio 69 milijuna [42]. Na žalost, mogućnosti preveniranja i liječenja brojnih poremećaja i bolesti povezanih sa starijom životnom dobi nisu se razmjerno poboljšale [134]. Kao rezultat toga, bolesti povezane sa starenjem progresivno dobivaju na značenju. Očne bolesti nisu izuzetak. Vodeći je uzrok sljepoće u osoba u dobi višoj od 50 godina starosti u razvijenim zemljama Zapada SMD [25–27]. On je i treći globalni uzrok sljepoće, neovisno o dobi i zemljopisnoj regiji i koji se danas ne može prevenirati, a sadašnja terapijska strategija ima brojne nedostatke i znatan je financijski problem zdravstvenim sustavima [25–27,56,57,60,62]. Vid milijuna osoba već je teško oštećen zbog te bolesti, a mnogim milijunima oštećenje prijeti, ako prevalencija SMD-a nastavi ovako rasti [2,26,27,42,67]. Nemogućnost prevencije razvoja SMD-a i nedostatak odgovarajućeg liječenja uzrokovani su multifaktorijalnošću i nepotpunim poznavanjem temljnih patogenetskih mehanizama bolesti na staničnoj i biokemijskoj razini.

Najnovija istraživanja (temeljena poglavito na životinjskim i tkivnim modelima i kulturama stanica [169,194,218,235,246–253], a znatno manje na kliničkim i epidemiološkim istraživanjima u ljudi) [234,254–256], upućuju da bi kumulativni oksidacijski stres, odgovoran za proces starenja, mogao imati i ključnu ulogu u patogenezi SMD-a [22,77,101,127,128,130–132,234].

Uloga oksidacijskog stresa u SMD-u biološki je vrlo uvjerljiva (zbog izloženosti makule velikoj količini kisika i svjetla), ali još uvijek nedokazana. Nedostaju čvrsti dokazi o uzročno-posljedičnoj povezanosti.

Istraživači su dosad uglavnom bili usredotočeni na ispitivanje povezanosti oksidacijskog stresa i SMD-a temeljem procjene serumske razine mikronutrijenata (vitamina i minerala) s antioksidacijskim učinkom [82,122,123,130,228,233,254]. Na takvom pristupu utemeljene studije ne pružaju dosljedne i pouzdane podatke, a i podložne su mnogim ograničenjima: od toga da vrijednosti u serumu odražavaju posljednji unos, a ne dugoročno stanje, da su niske i visoke razine mikronutrijenata različito definirane pa do toga da se nisu uzimale u obzir razlike u apsorpciji nutrijenata u određenom tkivu (E-vitamin i karoteni topivi u mastima bolje se apsorbiraju u masnom tkivu), kao i međusobno djelovanje među nekima od njih (npr. vitamin C omogućuje ponovnu redukciju E-vitamina) [130,149,223].

Ovo je istraživanje poduzeto kako bi se pokušala rasvijetliti uloga oksidacijskog stresa u nastanku SMD-a. Kao biološke pokazatelje (biljege) razine stresa koristili smo aktivnost antioksidacijskih enzima u eritrocitima i razinu TAS-a u serumu. Analiza enzimskih antioksidansa smatra se najboljom metodom procjene oksidacijskog stresa u živim organizmima.

Osnovni cilj istraživanja bio je provjeriti hipotezu da je nastanak SMD-a povezan s niskim aktivnostima enzimskih antioksidansa (SOD-a, GPx-a i CAT-a) u eritrocitima i razinom TAS-a u serumu te dokazati da su za nastanak bolesti jednako važne (čak i važnije) i interakcije među pojedinim enzimima (SOD-a i GPx-a te SOD-a i CAT-a) od njihovih niskih vrijednosti.

Kako je dob jedan od najdosljednijih čimbenika koji se povezuju sa SMD-om, a također se smatra da antioksidacijska obrana organizma slabi s godinama (smanjeno stvaranje enzimskih antioksidansa), skupine bolesnika sa SMD-om i kontrolnu zdravu skupinu ispitanika inicijalno smo izjednačili po dobi. Kako određene studije pokazuju veću prevalenciju SMD-a u žena, a to povezuju sa smanjenjem antioksidacijske obrane nakon menopauze [63,67], da bismo izbjegli "zbunjujući" utjecaj spola na aktivnost antioksidacijskih enzima, inicijalno smo skupine izjednačili i po spolu. Skupine su također injicijalno usklađene i po cjeloživotnoj izloženosti suncu, respektirajući veliki prinos svjetlosnog zračenja ukupnomu oksidacijskomu stresu u SMD-u.

Istraživanje nije pokazalo statistički značajnu razliku u aktivnosti SOD-a i CAT-a u eritrocitima između bolesnika sa SMD-om i zdravih ispitanika kontrolne skupine, dok su aktivnost GPx-a u eritrocitima i vrijednosti TAS-a u serumu bile statistički značajno niže u bolesnika sa SMD-om u usporedbi sa zdravom kontrolnom skupinom.

Nakon prilagodbe za učinak aktivnosti svih četiriju parametara (SOD-a, GPx-a, CAT-a i TAS-a), niže vrijednosti aktivnosti GPx-a i niža vrijednost TAS-a pokazale su su statistički značajno povezane sa SMD-om. Snižene vrijednosti aktivnosti GPx-a i razine TAS-a pokazali su se neovisnim prediktorima SMD-a, nakon što smo multivarijatnom logističkom regresijom napravili prilagodbu za mogući "zbunjujući" učinak svih promatranih varijabli koje su se univarijatno pokazale statistički značajno različitim između promatranih skupina na razini značajnosti $P<0,25$ [243,244] (zaštita očiju od sunca, boja očiju, povišeni krvni tlak, albumini u serumu i trigliceridi).

Iako aktivnost SOD-a nije bila statistički značajno povezana sa SMD-om, otkrivena je značajna interakcija između aktivnosti GPx-a i SOD-a. SOD je imao značajan moderatorski učinak na povezanost GPx-a i SMD-a. Pri niskim vrijednostima aktivnosti SOD-a, što odgovara vijednostima aktivnosti nižim od 1209 U/gHb, razlike u aktivnosti GPx-a nisu bile statistički značajno povezane sa SMD-om. Ali pri visokim vrijednostima aktivnosti SOD-a (jednakim ili višim od 1581 U/gHb), smanjenje aktivnosti GPx-a za samo jednu standardnu devijaciju značajno je povećavalo (za više od 6 puta) izgled za nastanak SMD-a. Što je bila viša aktivnost SOD-a, veća je bila povezanost smanjenja GPx-a i SDM-a, odnosno bila je veća vjerojatnost za nastanak SDM-a smanjenjem vrijednosti GPx-a.

Istraživanje je pokazalo da povećana aktivnost SOD-a pri niskoj aktivnosti GPx-a, uz nedostatak interakcije između SOD-a i CAT-a, značajno povećava vjerojatnost za nastanak SMD-a. Prema našem mišljenju ovaj je nalaz ključno objašnjenje učinka aktivnosti antioksidacijskih enzima na nastanak SMD-a, ističući učinak lipidne peroksidacije.

Naši rezultati razlikuju se od onih koji se navode u literaturi. Ranija istraživanja, uglavnom temeljena na mjerenjima razine ili aktivnosti antioksidacijskih enzima na donorskom tkivu

mrežnice [212], tkivnim kulturama [250] ili na životinjskim modelima [169,247], kao i rezultati rijetkih kliničkih studija [21,231,255,256], uglavnom su proturiječni. Ne čudi nimalo nekonzistentnost rezultata pojedinih istraživanja. Različiti istraživači rabili su različite uzorke (tkivo, kulture stanica, životinjske modele, serum, plazmu, eritrocite) i različite metode u određivanju različitih biokemijskih parametara da bi utvrdili povezanost enzimskih antioksidansa sa SMD-om, a njihove su vrijednosti izražavali u različitim mjernim jedinicama. To je uzrokom velikih poteškoća u pokušaju usporedbe rezultata.

Općenito se smatra se da su vrijednosti enzimskih antioksidansa niže u bolesnika sa SMD-om i da to pridonosi razvoju bolesti zbog povećanja oksidacijskog stresa. Mi smatramo da i visoke vrijednosti aktivnosti SOD-a, praćene smanjenom aktivnošću GPx-a i smanjenom ili nepromijenjenom aktivnošću CAT-a (kao što je slučaj u našem istraživanju) značajno pridonose formiranju toksične razine vodikova peroksida (H_2O_2) i povećanju oksidacijskog oštećenja. Uklanjanje viška superoksidnog aniona djelovanjem SOD-a važan je antioksidacijski obrambeni mehanizam, ali visoka aktivnost SOD-a u odnosu na aktivnosti antioksidacijskih enzima GPx-a i CAT-a (koji uklanjaju H_2O_2) može biti vrlo štetna.

Vodikov peroksid, sam po sebi, vrlo je reaktivan i štetan ROS. Dokazano je da izravno uzrokuje značajno oštećenje mtDNK u ljudskim RPE stanicama [257,258]. U stanicama koje se dijele, abnormalnosti mtDNK mogu se izgubiti replikacijama, za razliku od postmitotičkih stanica (kao što su fotoreceptori i RPE) [28, 183], u kojima se abnormalnosti nakupljaju. Posljedica toga je povećano stvaranje ROS-a, daljnje oštećenje mitohondrija i smanjenje stvaranja energije u obliku ATP-a. Smanjena razina energije uzrokuje disfunkciju i apoptozu RPE stanica i moguć je rani patološki događaj u SMD-u.

Vodikov peroksid također aktivno napada i telomere DNK uzrokujući njihovo ubrzano skraćivanje [162] te starenje i smrt RPE stanica. On također inhibira membransku kloridnu provodljivost, slabeći funkciju membrana RPE stanica i omogućavajući eksudaciju u subretinalni prostor [173]. Nadalje izravno oštećuje proteine, oksidirajući tiolnu skupinu [259].

Osim toga, H_2O_2 može u Fentonovoj reakciji konvertirati u puno reaktivniji i štetniji hidroksilni radikal ($OH\cdot$), koji lako i brzo pokreće lančanu reakciju lipidne peroksidacije, kao i singletni kisik, nastao u procesu fotooksidacije djelovanjem sunčevog svjetla. Sam superoksidni radikal nije dovoljno reaktivan za eliminaciju vodika [161] i pokretanje lipidne peroksidacije, koja je, prema našem mišljenju, glavni mehanizam oksidacijskog oštećenja lipidnih membrana (bogatih PUFA-om) vanjskih segmenata fotoreceptora, staničnih membrana RPE stanica, kao i membrana staničnih organela, osobito mitohondrijskih [3,149], što uzrokuje smrt stanica i razvoj SMD-a.

Zbog toga SOD djeluje u suradnji s GPx-om i CAT-om, koji razgrađaju H_2O_2 na netoksične proizvode vodu i molekularni kisik [149] štiteći fotoreceptore i RPE stanice od oksidacijskog oštećenja. GPx je djelotvorniji od CAT-a u detoksifikaciji H_2O_2 zbog svojih kinetičkih svojstava [260]. Osim na H_2O_2, GPx djeluje i na lipidne hidroperokside kao i na toksične aldehide (krajnje produkte razgradnje lipida), reducirajući ih na odgovarajuće alkohole [149]. GPx je jedini poznati enzim koji djelotvorno smanjuje lipidne hidroperokside, unutar bioloških membrana. Ti organski peroksidi smatraju se primarnim fiziološkim supstratom za GPx

[149,260]. Kao što je spomenuto, za razliku od CAT-a, GPx se također nalazi i u mitohondrijima, u kojima se odvija 40 % njegove aktivnosti, a odgovoran je i za maturaciju i preživljavanje fotoreceptornih stanica [252].

Naši rezultati o izravnoj povezanosti niskih vrijednosti GPx-a s nastankom SMD-a imaju potvrdu u mnogim eksperimentalnim studijama. Nicolas i sur. ukazali su da niske vrijednosti GPx-a mogu pridonijeti razvoju SMD-a. Primijetili su 60 % sniženje GPx-a i CAT-a u cinomolgus majmuna s ranim SMD-om [247]. Lu i sur. dokazali su da hiperekspresija GPx-a, za razliku od hiperekspresije SOD-a, smanjuje u transgeničnih miševa razinu oksidacijskog stresa [251]. De La Paz i sur. primijetili su smanjenu aktivnost GPx-a u retinalnom homogenatu cinomolgus majmuna s ranim pojavljivanjem SMD-a [194]. Dokazano je da miševi s nedostatkom gena za GPx (GPx knock out miševi) već u ranoj životnoj dobi razvijaju mrenu, a mogu i uginuti ranoj životnoj dobi [261].

Niže vrijednosti GPx-a u plazmi ili serumu ili u eritrocitima u povezanosti sa SMD-om u ljudi navodi nekoliko istraživača (Yildirim, Cohen, Everekliogluu i dr.) [231,232,260,262]. Primijećeno je također da stanice u progerijskih bolesnika imaju nisku razinu GPx-a. Čini se da je to razlog oksidacijskomu oštećenju, fragilnosti telomera, jednostrukim lomovima DNK i drugim poremećajim u tih bolesnika s preranim starenjem [148].

Suprotno našim rezultatima, u POLA studiji [234] pokazano je da je visoka razina GPx-a u plazmi povezana sa 9-ostrukim povećanjem učestalosti kasnoga SMD-a, upućujući na iznimnu važnost GPx-a u patogenezi SMD-a.

U POLA studiji, za razliku od naše studije, određivana je razina GPx-a u plazmi, a ne njegova aktivnost [234]. Mjerenje razine enzimskih antioksidansa manje je pouzdano od određivanja njihovih aktivnosti. Viša razina ne znači uvijek i veću aktivnost, zbog genetski baziranih stvaranja neaktivnih enzimskih kompleksa [149], ili inaktivacije enzima oksidacijskim oštećenjem [263]. Također u POLA studiji nema podataka o interakciji između GPx-a i drugih enzimskih antioksidansa. Uz to u njoj je određivan GPx u plazmi, a ne u stanicama, a zna se da baš stanične izoforme GPx-a (GPx 1 i GPx 4) posebno štite fosfolipidne membrane od štetnog učinka vodikova peroksida i lipidnih hidroperoksida. Autori pretpostavljaju da je povećani oksidacijski stres rezultirao pojačanom regulacijom (engl. *upregulation*) razine GPx-a u plazmi. S obzirom na to da u plazmi GPx (izoenzim GPx3) čini izvanstanični oblik enzima, značenje nalaza u POLA studiji tek treba odgonetnuti [234].

Inaktivacija ili smanjenje aktivnosti GPx-a mogu biti sekundarni, tj. rezultat povećane potrošnje aktivnosti enzima za redukciju velikih količina ROS-a (zbog visoke razine oksidacijskog stresa) ili nedostatka ili nemogućnosti korištenja esencijalnih metalnih kofaktora (selena). S druge strane, inaktivacija može biti primarna, tj. posljedica nedostatka ili smanjenja ekspresije gena koji reguliraju stvaranje enzima ili zbog stvaranja neaktivnih enzimskih kompleksa (zbog genetskih varijanti enzima s različitom aktivnošću) [149,260]. Ireverzibilna inaktivacija GPx-a može nastati i djelovanjem samog vodikova peroksida (supstratom, za čije je odstranjenje programiran), kad je prisutan u većim količinama [263]. Uz to GPx zahtijeva reducirani glutation (GSH) za svoje djelovanje, a i sam GSH, kao i glutationska reduktaza (neophodna za

redukciju oksidiranog glutationa), izuzetno su osjetljivi na inaktivaciju djelovanjem H_2O_2 [263].

Manje aktivni i neaktivni oblici antioksidacijskih enzima, koji ne mogu u potpunosti obavljati svoju funkciju, mogu prouzročiti povećani učinak oksidacijskog stresa u određenim tkivima, uključujući i retinu (RPE stanice i fotoreceptori), i oštećenje njihove funkcije te razvoj bolesti (SMD-a). Čak i kad bi CAT mogla u cijelosti otkloniti višak nastalog H_2O_2, još uvijek ostaje problem organskih peroksida koje CAT ne može ukloniti [263].

Kako je naša studija prva (temeljem pregleda dostupne literature) u kojoj je istraživana interakciju između aktivnosti pojedinih enzimskih antioksidansa u bolesnika sa SMD-om u usporedbi sa zdravom kontrolnom skupinom ispitanika, nismo imali mogućnost usporedbe naših rezultata s rezultatima drugih istraživača. Naši rezultati naglašavaju izuzetnu važnost međusobne usklađenosti aktivnosti SOD-a i GPx-a.

Znatnu potporu našim rezultatima nalazimo u nekoliko istraživanja na životinjskim modelima [149,253]. Tako su istraživanja na transgeničnim miševima i na transgeničnoj vinskoj muhi (*Drosophila melanogaster*) s prekomjernom ekspresijom gena za CuZnSOD-a (SOD1) [100,149,251–253,264,265] obeshrabrujuća. Nisu urodili očekivanim smanjenjem oksidacijskog stresa u retini miševa, niti očekivanim produljenjem života vinske muhe [157] iako su miševi s nedostatkom enzima SOD1 pokazali promjene konzistentene onima u SMD-u (druze, zadebljanja BM-a, CNV, premještanje β-katenina iz membrana RPE stanica u citoplazmu i narušavanje staničnog integriteta) i imaju kratak životni vijek [170], a miševi s nedostaktom gena za MnSOD (SOD2) (SOD2 *knockout* miševi) ugibaju prije ili ubrzo nakon rođenja [149].

Povišenje SOD-a istodobno djelotvorno katalizira uklanjanje superoksida, a s druge strane uzrokuje mnogo bržu sintezu vodikova peroksida, pa je produljenje životnog vijeka vinske muhe za 40 % [157] nastalo tek kad je povećana ekspresija SOD-a bila praćena povećanom ekspresijom GPx-a (ili CAT-a), koji uklanja vodikov peroksid. Također se u transgeničnih miševa znatno smanjio oksidativni stres uzrokovan prekomjernom ekspresijom SOD-a tek nakon povećane ekspresije gena za GPx.

Bolesnici sa Downovim sindromom, [266], koji imaju trisomiju 21. kromosoma, na kojem se nalazi i gen za CuZnSOD (SOD1), imaju 1/3 više SOD1, ali ne i GPx-a, te pokazuju znakove povišene lipidne peroksidacije u mozgu kao posljedice povišenog oksidacijskog stresa s posljedičnim nenormalnim neuromuskularnim vezama [266].

Andersen i sur. [267], u skladu s našim rezultatima, nalaze niže vrijednosti SOD-a i visoke vrijednosti glutationske reduktaze i GPx-a u stogodišnjaka, u odnosu na osobe u životnoj dobi između 60 i 70 godina. Niske vrijednosti aktivnosti SOD-a tumače posljedicama niske stope metabolizma i smanjene potrošnje kisika, smatrajući to prirodnom selekcijom preživljavanja i razlogom dugovječnosti stogodišnjaka, pogotovo što su niske vrijednosti SOD-a praćene višim vrijednostima GPx-a i glutationske reduktaze [267]. Djelovanje glutationske reduktaze također je povezano s vrijednostima GPx-a preko redukcije oksidiranog glutationa (koji je donator elektrona za GPx).

Ranije objavljeni podatci koji se odnose na povezanost SMD-a i SOD-a nedosljedni su. Mora se naglasiti da je SOD važan i neophodan enzim za smanjenje oksidacijskog oštećenja RPE stanica. Rezultati istraživanja na miševima sa smanjenom genskom ekspresijom SOD2 (SOD2 *knockdown* miševima) pokazali su važnost SOD2 u zaštiti od oksidacijskog stresa induciranog u RPE stanicama [211]. Međutim, povećana proizvodnja vodikova peroksida u citosolu i naknadno stvaranje $OH\cdot$ odgovorni su što su transgenični miševi s prekomjernom ekspresijom gena za SOD1 više osjetljivi na zračenja, podložni karcinogenezi i infekcijama [149].

U POLA studiji nije otkrivena povezanost SMD-a s aktivnosti SOD-a [21]. De La Paz je određivao aktivnost SOD-a u središnjoj i perifernoj neurosenzornoj retini na zdravim očima donora u životnoj dobi u rasponu 7 – 87 godina i nije pronašao dobno smanjenje aktivnosti enzima u makuli [194]. Frank i sur. mjerili su imunoreaktivnost SOD-a u makuli 19 zdravih donorskih očiju pomoću poliklonalnih antitijela na goveđe eritrocite i na istom broju očiju sa CNV-om [235]. Pozitivni odnos između dobi i citoplazmatske i lizosomne imunoreaktivnosti SOD-a utvrđen je u objema skupinama, ali ne i u povezanosti s CNV-om. Liles je dokazao da je ukupna aktivnost SOD-a u RPE stanica statistički usporediva u očima sa SMD-om i bez njega, ali je povezana s dobi [212]. Prema navedenim studijama izgleda da retinalni SOD nema važnu ulogu u zaštiti od SMD-a izvan svoga doprinosa ukupnomu lokalnomu antioksidacijskomu obrambenomu sustavu.

Međutim, s druge strane, Yildirim [231] i Prashar [262] nalaze nisku razinu SOD-a u serumu bolesnika sa SMD-om, a više autora [255,256,268] navodi značajno povišene vrijednosti SOD-a u serumu povezane sa SDM-om [255,256,268]. Povećana razina SOD-a čini drozofilu preosjetljivom za oštećenje oksidacijskim stresom [265]. Povišene vrijednosti aktivnosti SOD-a u eritrocitima ili moždanom tkivu nađene su i u Alzheimerovoj i Parkinsonovoj bolesti [267]. Mi smatramo da je pojačana ekspresija gena za SOD problematična kao i smanjena, ukoliko nije praćena odgovarajućom aktivnošću GPx-a.

U našem istraživanju aktivnost CAT-a nije se statistički značajno razlikovala u bolesnika sa SMD-om u odnosu na zdrave ispitanike. Podatci iz literature i glede povezanosti SMD-a s aktivnošću CAT-a također su proturječni. De La Paz i sur. [194] nisu pronašli povezanost između SMD-a i CAT-a. Suprotno tomu Nicolas i sur [247] nalaze na retinalnom homogenatu cinomolgusa majmuna s ranim SMD-om 60 %-tno sniženje aktivnosti GPx-a i CAT-a. Tate je primijetio dvostruko povećanje aktivnosti CAT-a u RPE stanicama kao odgovor na egzogeni H_2O_2 ili fagocitozu vanjskih segmenata fotoreceptora [210]. Frank i sur. su primijetili inverzni odnos dobi i CAT-a u RPE stanicama [235]. Povećanje razine CAT-a do 80 % ne produljuje životni vijek drozofile niti poboljšava oporavak od oksidacijskog stresa induciranog s H_2O_2 ili parakvatom [264]. Liles i sur. [212] pronašli su na humanim donorskim ljudskim očima smanjenje aktivnosti CAT-a u perifernoj i središnjoj retini sa starenjem, ali nije bilo razlike u aktivnosti u osoba sa SMD-om u odnosu na zdrave osobe. Frank i sur. [235] potvrdili su inverzni odnos između dobi i aktivnosti CAT-a u RPE stanicama, ali nisu pronašli razliku u RPE sadržaju tog enzima u očima sa SMD-om i bez njega. Također nisu primijetili razliku u aktivnosti CAT-a između središnje i periferne neurosenzorne retine. Zaključili su da vjerojatno nije povezan s patogenezom SMD-a. Također nema dokazane patologije povezane s homozigotnim deficitom CAT-a [149].

Mi također smatramo, naglašavajući ulogu lipidne peroksidacije, da je uloga CAT-a u patogenezi SMD-a sporedna ili barem neusporedivo manja u odnosu na ulogu GPx-a, s obzirom na ranije spomenute uloge GPx-a u redukciji lipidnih hidroperoksida i toksičnih aldehida te mitohondrijsku lokalizaciju.

Antioksidacijska obrana djeluje kao uravnotežen i usklađen sustav. Prethodne kliničke studije o utjecaju antioksidacijskih enzima na nastanak SMD-a nisu bile koncipirane kao naša studija i nisu uzimale u obzir tu važnu kariku antioksidacijske obrane pa nisu istraživale međusobno djelovanje pojedinih enzima [21,231,255]. U nekima je istraživana razina antioksidacijskih enzima u serumu ili eritrocitima, a ne aktivnost [21,255]. U drugima su određivane vrijednosti samo pojedinih antioksidacijskih enzima a ne svih triju, s mjerenjem razine TAS-a [256,269] ili bez njegova mjerenja [231,255,260].

Naše je istraživanje pokazalo značajno niže vrijednosti razine TAS-a (predstavlja i neenzimske antioksidanse u serumu) u serumu bolesnika sa SMD-om u usporedbi s kontrolnom skupinom. Rezultati su u skladu s rezultatima drugih istraživanja [256,269] u kojima se također ističe da niske vrijednosti TAS-a u serumu upućuju na povećani rizik za nastanak SMD-a.

Uključili smo TAS u serumu u naše istraživanje zbog međusobnog sinergističkog i kompenzacijskog djelovanja između unutarstaničnih enzimskih antioksidansa (u eritrocitima) i izvanstaničnih (serumskih) neenzimskih antioksidansa na smanjenje oksidacijskog oštećenja [149].

Antikosidacijska obrana djeluje kao usklađeni sustav: ako postoji deficit u jednoj komponenti, to se može odraziti na djelotvornost ostalih. Enzimski antioksidansi imaju ključnu ulogu, a ostali im antioksidansi pružaju potporu. Procjenjivanje oksidacijskog statusa jedne osobe pojedinačnim mjerenjem samo jednog antioksidacijskog parametra nedostatno je i neobjektivno zbog moguće interakcije *in vivo* pojedinih komponenti. Stoga je nužno određivanje cijelog niza antioksidacijskih biomarkera.

Iz tih smo razloga uz enzimske antioksidanse u naše istraživanje uključili i određivanje TAS-a. Antioksidacijsku obranu ne čine samo pojedine komponente nego u živom organizmu postoji cijela mreža biokemijskih i enzimskih mehanizama njihova međudjelovanja. Putem TAS-a smo u naše istraživanje uključili i neenzimske antioksidanse.

Antioksidacijsku ulogu nekih od endogenih komponenti TAS-a (mokraćne kiseline, bilirubina, albuminia) smo i pojedinačno istražili. Primijećene su statistički značajno niže vrijednosti albumina u skupini bolesnika sa SMD-om u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika. Ovaj rezultat sukladan je niskim vrijednostima TAS-a u bolesnika sa SMD-om. Naime, ljudski serumski albumini čine najveću količinu cirkulirajućih proteina djelujući kao važna izvanstanična antioksidacijska obrana. Njihova antioksidacijska svojstva mogu se pripisati njihovoj jedinstvenoj biokemijskoj strukturi. Zbog njihove tiolne skupine (–SH skupine) djeluju kao čistaći SR-a, vežući čvrsto bakar, nešto slabije željezo. Mogu smanjiti dostupnost pro-oksidansa i mogu se oksidirati za zaštitu drugih makromolekula [259, 270]. Sniženje albumina u serumu, koje je uzrok slabije antioksidacijske zaštite, i samo može biti posljedica oksidacijskog oštećenja (posljedica oksidacijske modifikacije proteina). Rezultati upućuju na

to da su promjena u redoks učinku albumina posljedica oksidacije više aminokiselinskih ostataka djelovanjem različitih oksidansa (prvenstveno hidroksilnog radikala, ali i vodikova peroksida) [271].

Rezultati naše studije upućuju na izostanak kompenzacijskog učinka TAS-a na povećani oksidacijski stres zbog sniženih vrijednosti aktivnosti GPx-a (oba su pokazivala snižene vrijednosti) u bolesnika sa SMD-om.

Metoda određivanja vrijednosti TAS-a u serumu komercijalnim TAS kitom tvrtke Randox (kao i druge metode mjerenja ukupnog antioksidacijskog statusa seruma, primjerice *Ferric reducing antioxidant power assay* – FRAP, *Oxygen radical absorbing capacity* – ORAC itd.) [149,151] ima određena ograničenja. Jedan je od glavnih nedostataka te metode što razrjeđivanje uzorka u postupku pripreme može rezultirati lažno pozitivnim vrijednostima TAS-a. U našem je istraživanju to ograničenje izbjegnuto samom činjenicom što razrjeđivanje uzorka nije niti bilo potrebno, jer ni u jednom uzorku vrijednosti TAS-a nisu bile veće od 2,5 mmol/l, a u tom slučaju razrjeđivanje se ne obavlja [272]. Osim toga, kontrola seruma na procjenu analitičke nepreciznosti ponavljana je za svaku seriju uzoraka.

Naše istraživanje nije pokazalo statistički značajnu razliku u aktivnosti antioksidacijskih enzima i vrijednosti TAS-a između bolesnika s ranim oblikom SDM-a i onih kasnim oblikom pa se određivanjem ovih biljega ne može utvrditi težina i stupanj bolesti, iako su i bolesnici s kasni oblikom i oni s ranim oblikom SMD-a imali značajno niže vrijednosti GPx-a i TAS-a u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika, što pruža mogućnost korištenja istih za rano otkrivanje bolesti. Neke su studije pokazale sniženje pojedinih antioksidacijskih enzima u kasnom obliku SMD-a u odnosu na rani [273]. Moguće da bi te razlike bile značajne i u našem ispitivanju na većem uzorku jer su vrijednosti aktivnosti svih enzimskih antioksidansa pokazivale naznačen trend nižih vrijednosti u kasnom stadiju SMD-a u odnosu na rani, ali bez statističke značajnosti.

U studiji smo istražili vrijednost pojedinačnih i kombiniranih optimalnih graničnih vrijednosti aktivnosti GPx-a u eritrocitima i razine TAS-a u serumu (za razgraničenje zdravih osoba od bolesnika sa SDM-om), dobivenih analizom ROC krivulja, kao potencijalno klinički upotrebljivog dijagnostičkog testa za predikciju statusa SMD-a. Pri odabiru graničnih vrijednosti vodili smo se potrebom što veće osjetljivosti testa za razdvajanje bolesnika sa SMD-om od zdravih osoba, računajući na mogućnost korištenja testa za probir za SMD rizičnih osoba ili otkrivanje bolesnika u što ranijem stadiju bolesti, kako bi smo cijelim nizom detaljnih oftalmoloških pretraga omogućili daljnje praćenje i pokušali spriječili progresiju bolesti u kasni stadij s najćešće potpunim gubitkom centralnog vida. Rezultati su pokazali da bi kombinacija navedenih biljega (aktivnosti GPx-a u eritrocitima i vrijednosti TAS-a u serumu) mogla biti obećavajući model za predviđanje SDM-a (AUC = 75 % i osjetljivost testa 95 %). Uz prevalenciju, odnosno vjerojatnost za bolest (injicijalno) prije testa kombiniranim vrijednostima GPx-a i TAS-a od 25 % (za dobnu skupinu od 65 i više godina), aspolutno povećanje vjerojatnosti za bolest nakon pozitivnog testa iznosilo je 14 %, a relativno 56 %.

To bi u praksi značilo da vjerojatnost da osoba u dobi iznad 65 godina (koja je prije testa imala vjerojatnost da razvije SMD-a od 25 %, s obzirom na prevalenciju SMD-a u toj dobnoj skupini), s pozitivnim ishodom testa (vrijednostima aktivnosti GPx-a u eritrocitima jednakim ili nižim

od 48,97 U/gHb i/ili vrijednostima TAS-a u serumu jednakim ili nižim od 1,44 mmol/l) boluje od SMD-a sada iznosi 39 % (mogućnosti predviđanja bolesti raste za 56 %).

Kod negativnog ishoda testa apsolutno povećanje vjerojatnosti odsutstnosti bolesti iznosilo je 22 %, a relativno 88 %. U praksi to znači da će vjerojatnost da je osoba s negativnim ishodom testa (odnosno vrijednostima aktivnosti GPx-a višim od 48,97 U/gHb i vrijednostima TAS-a višim od 1,44 mmol/l) zdrava sada iznositi 97 %, umjesto ranijih 75 %.

Ovo je, prema našim saznanjima, prvi prediktivni model za procjenu statusa SDM-a temeljem određivanja aktivnosti antioksidacijskih enzima i razine TAS-a u perifernoj krvi. S obzirom da je naše istraživanje presječno (engl. *cross sectional*) na temelju njega nije bilo moguće u potpunosti oblikovati i validirati prediktivni model SMD-a. Naša analiza predstavlja prvi korak u izradi konačnog prediktivnog modela. U budućnosti planiramo formirati derivacijsku i nezavisnu validacijsku kohortu na temelju kojih ćemo provjeriti prediktivnu valjanosti kombinacije aktivnosti GPx-a i TAS-a kao dijagnostičkog testa za SMD.

Iako smo brojem ispitanika uključenih u studiju prešli veličinu statistički zadanog uzorka, glavno je ograničenje ovog istraživanja relativno malen broj ispitanika, ali mislimo da to ograničenje ne utječe značajno na vrijednost naših rezultata.

U zaključku rasprave možemo reći da naši rezultati, koji su pokazali da niska aktivnost GPx-a u eritrocitima, pojačana moderatorskim učinkom aktivnosti SOD-a i niskim vrijednostima TAS-a u serumu, upućuju na manjkavu učinkovitost antioksidacijskog obrambenog sustava u bolesnika sa SMD-om i potvrđuju ulogu oksidacijskog stresa u patogenezi SMD-a.

Procjena enzimskih antioksidansa u eritrocitima i njihove interakcije u kombinaciji s mjerenjem vrijednosti TAS-a u serumu mogli bi biti obećavajući prediktori statusa SMD-a.

Antioksidacijski mehanizam nije posve jasan. Postoji još mnogo otvorenih pitanja na koja treba odgovoriti, kao što su: može li se prekomjerna ekspresija antioksidacijskih enzima, koja općenito štiti od oksidacijskog stresa na staničnom modelu, primijeniti i na organizam u cijelosti, odnosno do koje granice prekomjerna ekspresija antioksidacijskih enzima pruža zaštitu, ili kako uspostaviti ravnotežu između aktivnosti pojedinih enzima? Kako odrediti genske varijacije pojedinih antioksidacijskih enzima koje utječu na njihovu aktivnost, odnosno uzrokuju stvaranja manje aktivnih ili neaktivnih oblika enzima?

Naši rezultati otvaraju put (i pokazuju potrebu za) budućim genetskim, biokemijskim i biomolekularnim istraživanjima na polju uloge antioksidacijskih enzima u patogenezi SMD-a, koji će iznaći metode kako povećati antioksidacijski kapacitet, uskladiti aktivnost pojedinih enzima i smanjiti štetno stvaranje ROS-a u fotoreceptorima i RPE stanicama i tako spriječiti nastanak bolesti. Pri tom ne smijemo zaboraviti da je minimalni oksidacijski stres nužan za održavanje integriteta bioloških sustava [149]. To objašnjava zašto visoke suplementacije antioksidansima nisu uspjele poboljšati zdravlje i nisu preporučene [151], a mogu biti štetne, kao što je ranije prikazano.

6. ZAKLJUČCI

Zaključci o glavnom cilju istraživanja

1. Značajno niže vrijednosti aktivnosti GPx-a u eritrocitima i razine TAS-a u serumu u bolesnika sa SMD-om u usporedbi sa zdravom kontrolnom skupinom ispitanika ukazuju na povišeni oksidacijski stres u bolesnika sa SMD-om.

2. Niske vrijednostima aktivnosti GPx-a u eritrocitima i TAS-a u serumu značajno su povezane sa SMD-om (GPx i TAS su neovisni prediktori SMD-a), što na neizravan način ukazuje na značajnu ulogu oksidacijskog stresa u patogenezi SMD-a.

3. Visoke vrijednosti aktivnosti SOD-a značajno moduliraju povezanost niskih vrijednosti aktivnosti GPx-a i SMD-a, na način da je vjerojatnost za nastanak SMD-a zbog sniženja aktivnosti GPx-a veća što su više vrijednosti aktivnosti SOD-a, što ukazuje na važnost međusobnog djelovanja ovih enzima u antioksidacijskoj zaštiti od SMD-a, a što neizravno upućuje na važnost lipidne peroksidacije za nastanak SMD-a (više vodikova peroksida, više hidroksilnih radikala, pojačana lipidna peroksidacija).

4. Izostanak značajne razlike u aktivnosti pojedinih enzima (SOD-a, GPx-a i CAT-a) u eritrocitima i TAS-a u serumu između bolesnika u ranoj i kasnoj fazi SMD-a, ukazuje na to da određivanjem tih biljega nije moguće odrediti težinu bolesti. Međutim s obzirom da su vrijednosti aktivnosti GPx-a i razine TAS-a niže i u skupini bolesnika s ranim SMD-om kao i onih s kasnim SMD-om u odnosu na kontrolnu skupinu, temeljem mjerenja tih parametara moguće je rano otkrivanje i predviđanje bolesti.

5. Temeljem analize kombiniranih optimalnih graničnih vrijednosti aktivnost GPx-a u eritrocitima i vrijednosti TAS-a u serumu, kao klinički korisnog dijagnostičkog testa za predviđanje SMD-a, zaključujemo da bi ti biološki biljezi u perifernoj krvi mogli biti obećavajući prediktori SMD-a. Određivanje tih parametara moglo bi pomoći u identifikaciji osoba rizičnih za SMD, kao i otkrivanju bolesnika u ranom stadiju bolesti, što smatramo izuzetno značajnim s obzirom da bolest predstavlja veliki javnozdravstveni problem i da je njen krajnji ishod obostrani gubitak centralnog vida. Otkrivanjem rizičnih osoba i/ili bolesnika u ranoj fazi bolesti doprinijet će njihovu pomnomu oftalmološkomu praćenju, nastojanju smanjenja modifibilnih čimbenika rizika koji povećavaju oksidacijski stres (visoka izloženost svjetlosnom zračenju, pušenje) a nadamo se u budućnosti i novim mogućnostima liječenja. Stoga ovaj prediktivni model planiramo do kraja oblikovati i provjeriti njegovu prediktivnu valjanosti na nezavisnoj kohorti.

Zaključak o sekundarnom cilju istraživanja

Nismo dokazali povezanost SMD-a s pozitivnom obiteljskom anamnezom.

Izostanak razlike u učestalosti pozitivne anamneze za SMD između promatranih skupina ispitanika (bolesnika sa SMD-om i kontrolne zdrave skupine) rezultat je nepoznavanja pravog razloga slabosti vida u njihovih predaka (roditelja, baka i djedova) u njihovoj starijoj dobi, zbog slabe razine zdravstvene zaštite u to vijeme. S druge strane djeca ispitanika još nisu u dobi da razviju bolest, tako da se podatci o pozitivnoj anamnezi odnose isključivo na braću i sestre ispitanika, pa se ovi rezultati moraju promatrati u svjetlu navedenog ograničenja.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Istražiti povezanost oksidacijskog stresa s nastankom senilne makularne degeneracije (SMD) koristeći aktivnost antioksidacijskih enzima: superoksidne dismutaze (SOD), glutationske peroksidaze (GPx) i katalaze (CAT) u eritrocitima i ukupni antioksidacijski status (TAS) u serumu kao pokazatelje razine oksidacijskog stresa. Procijeniti dijagnostičke vrijednosti pojedinih varijabla kao i njihovih kombinacija u predviđanju nastanka SMD-a.

Metode i ispitanici: Istraživanjem je obuhvaćeno ukupno 107 ispitanika: 57 bolesnika sa SMD-om (32 s ranim, a 25 s kasnim oblikom SMD-a) i 50 zdravih ispitanika kontrolne skupine, komplementarnih eksperimentalnoj skupini po dobi, spolu i kumulativnoj životnoj izloženosti sunčevu zračenju.

Mjerena je aktivnost SOD-a, GPx-a i CAT-a u eritrocitima i vrijednosti TAS-a u serumu te procjenjivana njihova povezanost sa SMD-om. Za utvrđivanje razlike istraživanih varijabla između ispitivanih skupina korišten je Mann – Whitneyev U test s Monte Carlo dvosmjernim izračunom statističke značajnosti. Analizirana je interakcija između pojedinih antioksidacijskih enzima. U procjeni dijagnostičke vrijednosti ispitivanih varijabla kao nezavisnih prediktora u predviđanju nastanka SMD-a korištene su Receiver Operating Characteristic (ROC) analiza i multivarijatna logistička regresija.

Rezultati: Aktivnost GPx-a u eritrocitima (P<0,001) i vrijednosti TAS-a u serumu (P=0,015) bile su značajno niže u skupini bolesnika sa SMD-om u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nije bilo statistički značajne razlike u aktivnosti SOD-a (P=0,984) i CAT-a (P=0,426) između promatranih skupina ispitanika. Utvrđena je značajna interakcija između GPx-a i SOD-a (P=0,003). Pri visokim vrijednostima aktivnosti SOD-a (iznad 75. percentila) smanjenje aktivnosti GPx-a za jednu standardnu devijaciju povećava omjer izgleda za nastanak SMD-a za više od 6 puta (OR=6,22; P<0,001).

ROC analiza pokazala je da su kombinirane vrijednosti aktivnosti GPx-a i razine TAS-a značajne odrednice SMD statusa. Ukupna točnost, osjetljivost, specifičnost, pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti ovog testa bili su redom: 75 %, 95 %, 52 %, 69 % i 90 %. Pozitivan omjer vjerojatnosti za SMD iznosio je 1,97, a negativni 0,10.

Zaključak: Istraživanje je pokazalo da su niske vrijednost aktivnosti GPx-a u eritrocitima i TAS-a u serumu povezane s nastankom SMD-a. SOD modulira povezanost GPx-a i SMD-a. Rezultati upućuju na to da bi antioksidacijski enzimi u eritrocitima i TAS u serumu mogli biti obećavajući prediktori u predviđanju nastanka SMD-a.

8. SUMMARY

The role of erythrocyte antioxidant enzymes activity in the occurrence of age-related macular degeneration

Objective: The aim of the research was to estimate association of the oxidative stress with the occurrence of age-related macular degeneration (AMD). The activities of erythrocyte antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) and serum total antioxidant status (TAS) were used as indicators of the oxidative stress level. Furthermore, diagnostic value of individual and combined markers in determining AMD status was assessed.

Participants: 57 AMD patients (32 with early and 25 with late form of AMD) and 50 healthy, age, gender and sunlight exposure matched controls were included.

Methods: Erythrocyte SOD, GPx and CAT activity and serum TAS level were measured and their association with AMD was assessed. Mann-Whitney U test with Monte Carlo two-tailed statistical significance was used to compare marker values between the studied groups. Analysis of interaction between each antioxidant enzymes was done. Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis and multiple logistic regression model were used to estimate the diagnostic value of markers and their independent associations with AMD.

Results: Erythrocyte GPx activity (P<0.001) and serum TAS (P=0.015) were significantly lower in AMD patients than in controls. The difference was not significant for SOD (P=0.984) or CAT activities (P=0.426). Significant interaction between GPx and SOD was detected (P=0.003). At high levels of SOD activity (over 75th percentile) one standard deviation decrease in GPx increases the odds for AMD for six times (OR=6.22; P<0.001). ROC analysis revealed that combined values of GPx activity and TAS were significant determinants of AMD status. Total accuracy, sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of this test were: 75 %, 95 %, 52 %, 69 %, and 90 %, respectively. Positive likelihood ratio for AMD was 1.97, and negative likelihood ratio was 0.10.

Conclusion: The study showed that low GPx activity and TAS are associated with AMD. SOD modulates the association of GPx and AMD. The obtained results suggest that erythrocyte antioxidant enzymes activity and serum TAS could be promising markers for the prediction of AMD occurrence.

9. POPIS LITERATURE

1. Codgon N, O'Colmain B, Klaver CC, Klein R, Munoz B, Fridman DS i sur. The Eye Diseases Prevalence Research Group. Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. Arch Ophthalmol 2004;122:477–85.
2. Friedman DS, O'Colmain B, Munoz B, Tomany SC, McCarty C, de Jong PT i sur. The Eye Diseases Prevalence Research Group. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. Arch Ophthalmol 2004;122:564–72.
3. Boulton M, Rozanowska M, Rozanowski B. Retinal photodamage. J Photochem Photobiol B 2001;64:144–61.
4. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD i sur. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. Surv Ophthalmol 1995;39:3677–4.
5. Donders FC. Beiträge zur pathologischen Anatomie des Auges. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1885;2:106–18.
6. Hutchinson J, Tay W. Symmetrical central choroidoretinal disease occurring in senile persons. Roy London Ophthal Hosp Rep 1875;8:231–4.
7. Pagenstecher H, Genth C. Atlas der pathologischen Anatomie des Augapfels.Wiesbaden: Kreidel CW; 1875.
8. Haab O.Erkrankungen der Macula Lutea. Centralblatt fur praktische Augenheilkunde 1885;9:384–91.
9. Oeller J. Atlas seltener ophthalmoskopischer Befunde. Wiesbaden: Bergmann; 1903.
10. Junius P, Kuhnt H. Die scheibenformige Entartung der Netzhautmitte (Degeneratio maculae luteae disciformis). Berlin: Karger; 1926.
11. Maumenee AE. Symposium macular disease. Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol 1965;69:691–99.
12. Gass JDM. Pathogenesis of disciform detachment of the neuroepithelium: III: a senile disciform macular degeneration. Am J Ophthalmol 1967;63:617–45.
13. Gass JDM. Pathogenesis of disciform detachment of the neuroepithelium: IV: fluorescein angiographic study of senile disciform macular degeneration. Am J Ophthalmol 1967;63:645–59.
14. Drexler W, Morgner U, Ghanta RK, Kartner FX, Schuman JS, Fujimoto JG. Ultrahigh-resolution ophthalmic optical coherence tomography. Nat Med 2001;7:502–7.
15. Solomon SD, Lindsley K, Vedula SS, Krzystolik MG, Hawkins BS. Anti-vascular endothelial growth factor for neovascular age-related macular degeneration. Cochrane Database Syst Rev 2014;8:CD005139.
16. Goldberg J, Flowerdew G, Smith E, Brody JA, Tso MO. Factors associated with age-related macular degeneration. An analysis of data from the first National Health and Nutrition Examination Survey. Am J Epidemiol 1988;128:700–10.

17. Bressler NM, Bressler SB, West SK, Fine SL, Taylor HR. The grading and prevalence of macular degeneration in Chesapeake Bay watermen. Arch Ophthalmol 1989;107:847–52.
18. Klein R, Klein BE, Linton KL. Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. Ophthalmology 1992;99:933–43.
19. Schachat AP, Hyman L, Leske MC, Connell AM, Wu SY. Features of age-related macular degeneration in a black population. The Barbados Eye Study Group. Arch Ophthalmol 1995;113:728–35.
20. Mitchell P, Smith W, Attebo K, Wang JJ. Prevalence of age-related maculopathy in Australia. The Blue Mountains Eye Study. Ophthalmology 1995;102:1450–60.
21. Delcourt C, Cristol JP, Tessier F, Leger CL, Descomps B, Papoz L. Age-related macular degeneration and antioxidant status in the POLA study. POLA Study Group. Pathologies Oculaires Liées à l'Age. Arch Ophthalmol 1999;117:1384–90.
22. Coleman HR, Chan CC, Ferris FL, Chew EY. Age-related macular degeneration. Lancet 2008;372:1835–45.
23. The Age-Related Eye Disease Study 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. Arch Ophthalmol 2001;119:1417–36.
24. Smith W, Mitchell P, Leeder SR, Wang JJ. Plasma fibrinogen levels, other cardiovascular risk factors, and age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. Arch Ophthalmol 1998;116:583–7.
25. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP i sur. Global data on visual impairment in the year 2002. Bull World Health Organ 2004;82:844–51.
26. World Health Organization. Vision 2020. The right to sight. Global initiative for the elimination of avoidable blindness. Magnitude and causes of visual impairment. Dostupno na: http://whqlibdoc.who.int/fact_sheet/2004/FS_282.pdf. Pristupljeno: 01.12.2014.
27. World Health Organization. Vision 2020. The right to sight. Global initiative for the elimination of avoidable blindness. Actions Plan 2006-2011, World Health Organization, 2013. Dostupno na: http://www.who.int/blindness/Vision2020_report.pdf. Pristupljeno: 06.12.2014.
28. Zarbin MA. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. Arch Ophthalmol 2004;122:598–614.
29. Klein R, Peto T, Bird A, Vannewkirk MR. The epidemiology of age-related macular degeneration. Am J Ophthalmol 2004;137:486–95.
30. Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klacer CC, Klein BE i sur. Risk factors for age-related macular degeneration: pooled findings from three continents. Ophthalmology 2001;108:697–704.
31. Vingerling JR, Dielemans I, Hofman A, Grobbee DE, Hijmering M, Kramer CF i sur. The prevalence of age-related maculopathy in the Rotterdam Study. Ophthalmology 1995;102:205–10.

32. Augood CA, Vingerling JR, de Jong PT, Chakravarthy U, Seland J, Soubrane G i sur. Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye Study (EUREYE). Arch Ophthalmol 2006;124:529–35.
33. Klein R, Klein BE, Cruickshanks KJ. The prevalence of age-related maculopathy by geographic region and ethnicity. Prog Retin Eye Res 1999;18:371–89.
34. Frank RN, Puklin JE, Stock C, Canter LA. Race, iris color, and age-related macular degeneration. Trans Am Ophthalmol Soc 2000;98:109-15;diskusija 115–7.
35. West SK, Munoz B, Rubin GS, Schein OD, Bandeen-Roche K, Zeger S i sur. Function and visual impairment in a population-based study of older adults. The SEE project. Salisbury Eye Evaluation. Invest Ophthalmol Vis Sci 1997;38:72–82.
36. Friedman DS, Katz J, Bressler NM, Rahmani B, Tielsch JM. Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Baltimore Eye Survey. Ophthalmology 1999;106:1049–55.
37. Xu L, Wang Y, Li Y, Wang Y, Cui T, Li J i sur. Causes of blindness and visual impairment in urban and rural areas in Beijing: the Beijing Eye Study. Ophthalmology 2006;113:1134.e1–11.
38. Montezuma SR, Sobrin L, Seddon JM. Review of genetics in age related macular degeneration. Semin Ophthalmol 2007;22:229–40.
39. Li Y. Xu L, Wang YX, You QS, Yang H, Jonas JB. Prevalence of age-related maculopathy in the adult population in China: the Beijing Eye Study. Am J Ophthalmol 2008;146:329.
40. Jonasson F, Arnarsson A, Peto T, Sasaki H, Sasaki K, Bird AC. 5-year incidence of age-related maculopathy in the Reykjavik Eye Study. Ophthalmology 2005;112:132–8.
41. Jonasson F, Arnarsson A, Sasaki H, Peto T, Sasaki K, Bird AC. The prevalence of age-related maculopathy in iceland: Reykjavik Eye Study. Arch Ophthalmol 2003;121:379–85.
42. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CM, Klein R, Ching-Yu i sur. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. Lancet Glob Health 2014;2:e106–16.
43. Wang JJ, Rochtchina E, Lee AJ, Chia EM, Smith W, Cumming RG i sur. Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: the blue Mountains Eye Study. Ophthalmology 2007;114:92–8.
44. van Leeuwen R, Klaver CC, Vingerling JR, Hofman A, de Jong PT. The risk and natural course of age-related maculopathy: follow-up at 6 1/2 years in the Rotterdam study. Arch Ophthalmol 2003;121:519–26.
45. Bressler NM, Bressler SB, Congdon NG, Ferris FL 3., Friedman DS, Klein R i sur. Age-Related Eye Disease Study Research Group. Potential public health impact of Age-Related Eye Disease Study results: AREDS report no. 11. Arch Ophthalmol 2003;121:1621–4.
46. Sunness JS, Gonzalez-Baron J, Bressler NM, Hawkins B, Applegate CA. The development of choroidal neovascularization in eyes with the geographic atrophy form of age-related macular degeneration. Ophthalmology 1999;106:910–9.

47. Stevens GA, White RA, Flaxman SR, Price H, Jonas JB, Keeffe J i sur.; Vision Loss Expert Group. Global prevalence of vision impairment and blindness: magnitude and temporal trends, 1990-2010. Ophthalmology 2013;120:2377–84.
48. Pascolini D, Marotti SR. Global estimates of visual impairment: 2010. Br J Ophthalmol 2012;96:614–8.
49. Bunce C, Wormald R. Causes of blind certifi cations in England and Wales: April 1999–March 2000. Eye 2008;22:905–11.
50. Howden LM, Meyer A. Age and Sex Composition: 2010. 2010 Census Briefs 2011. Dostupno na: http://www.census.gov/prod/cen2010/briefs/c2010br-03.pdf
51. Transgenerational Design Matters. The Demographics of Aging. Dostupno na: http://www.transgenerational.org/aging/demographics.htm
52. Bok D. New insights and new approaches toward the study of age-related macular degeneration. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:14619–21.
53. Luthert PJ. Pathogenesis of age-related macular degeneration. Diagn Histopathol 2011;17:10–6.
54. Berman K, Brodaty H. Psychosocial effects of age-related macular degeneration. Int Psychogeriatr 2006;18:415–28.
55. Rovner BW, Casten RJ, Tasman WS. Effect of depression on vision function in age-related macular degeneration. Arch Ophthalmol 2002;120:1041–4.
56. Taylor HR, Pezzullo ML, Keeffe JE. The economic impact and cost of visual impairment in Australia. Br J Ophthalmol 2006;90:272–5.
57. Frick KD, Gower EW, Kempen JH, Wolff JL. Economic impact of visual impairment and blindness in the United States. Arch Ophthalmol 2007;125:544–50.
58. Smiddy WE. Relative cost of a line of vision in age-related macular degeneration. Ophthalmology 2007;114:847–54.
59. Velez-Montoya R, Oliver SC, Olson JL, Fine SL, Quiroy-Mercado H, Mandava N. Current knowledge and trends in age-related macular degeneration: genetics, epidemiology, and prevention. Retina 2014;34:423–41.
60. Schrader WF. Age-related macular degeneration: a socioeconomic time bomb in our aging society. Ophthalmologe 2006;103:742–8.
61. Lux A, Llacer H, Heussen FM, Joussen AM. Non-responders to bevacizumab (Avastin) therapy of choroidal neovascular lesions. Br J Ophthalmol 2007;91:1318–22.
62. Beutel J, Rudolf M, Grisanti S. Current and future therapies for age-related macular degeneration. Expert Opin Emerg Drugs 2009;14:341–62.
63. Connell PP, Keane PA, O'Neill EC, Altaie RW, Loane E, Nolan JM i sur. Risk factor for age-related maculopathy. J Ophthalmol 2009; doi: 10.1155/360764. Objavljeno 6. rujna 2009.
64. Eong KG, Maheshwar B, Beatty S, Haller JA. Risk Factors for Age-related Macular Degeneration and Chorioidal Neovascularisation. U: Lim JI, ur. Age-related Macular Degeneration. 2. izd. New York: Informa Healthcare; 2008. str. 47–87.
65. Bernstein PB, Katz NB. The Role of Ocular Free Radicals in Age-related Macular Degeneration. J Toxicol Cutaneous Ocul Toxicol 2001;20:141–81.

66. Sui GY, Liu GC, Liu GY, Gao YY, Deng Y, Wang WY i sur. Is sunlight exposure a risk factor for age-related macular degeneration? A systematic review and meta-analysis. Br J Ophthalmol 2013;97:389–94.
67. van Leeuwen R, Klaver CC, Vingerling JR, Hofman A, de Jong PT. Epidemiology of age-related maculopathy: a review. Eur J Epidemiol 2003;18:845–54.
68. Defay R, Pinchinat S, Lumbroso S, Sutan C, Delcourt C; Pola Study Group. Sex steroids and age-related macular degeneration in older French women: the POLA study. Ann Epidemiol 2004;14:202–8.
69. Tomany SC, Wang JJ, van Leeuwen R, Klein R, Mitchell P, Vingerling JR i sur. Risk factors for incident age-related macular degeneration: pooled findings from 3 continents. Ophthalmology 2004;111:1280–7.
70. Cruickshanks KJ, Hamman RF, Klein R, Nondahl DM, Shetterly SM. The prevalence of age-related maculopathy by geographic region and ethnicity. The Colorado-Wisconsin Study of Age-Related Maculopathy. Arch Ophthalmol 1997;115:242–50.
71. Klein R, Klein BE, Jensen SC, Mares-Perlman JA, Cruickshanks KJ, Palta M. Age-related maculopathy in a multiracial United States population: the National Health and Nutrition Examination Survey III. Ophthalmology 1999;106:1056–65.
72. Andersen MV, Rosenberg T, la Cour M, Kiilgaard JF, Alsbirk PH, Borch-Johnsen K i sur. Prevalence of age-related maculopathy and age-related macular degeneration among the inuit in Greenland. The Greenland Inuit Eye Study. Ophthalmology 2008;115:700–7.
73. Smith W, Mitchell P. Family history and age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. Aust N Z J Ophthalmol 1998;26:203–6.
74. Seddon JM, Ajani UA, Mitchell BD. Familial aggregation of age-related maculopathy. Am J Ophthalmol 1997;123:199–206.
75. Klever C, Wolfs RC, Assink JJ, van Duijn CM, Hofman A, de Jong PT. Genetic risk of age-related maculopathy. Population-based familial aggregation study. Arch Ophthalmol 1998;116:1646–51.
76. Chao JR, Fawzi AA, Lim JI. Genetics of Age-Rlated Macular Degeneration. U: Lim JI, ur. Age-Related Macular Degeneration. 2. izd. New York: Informa Healthcare; 2008. str. 35–47.
77. Ding X, Patel M, Chan CC. Molecular pathology of age-related macular degeneration. Prog Retin Eye Res 2009;28:1-18.
78. Imamura Y, Susuma I, Tsubota K. Current concept of the pathogenesis of the age-related macular degeneration: the role of oxidative stress and inflamation. Inflammation Regeneration 2006;26:492–500.
79. Kanda A, Chen W, Othman M, Branham KE, Brooks M, Khanna R i sur. A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:16227–32.
80. Clausen T, Southan C, Ehrmann M. The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. Mol Cell 2002;10:443–55.
81. O'hEineachain R. Effects of AMD causing genes worst in smokers and those with poor diets. Eurotimes 2012;7:28.

82. Snodderly DM. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. Am J Clin Nutr 1995;62(Suppl):S1448–61.
83. Kahn HA, Leibowitz HM, Ganley JP, Kini MM, Colton T, Nickerson RS i sur. The Framingham Eye Study. I. Outline and major prevalence findings. Am J Epidemiol 1977;106:17–32.
84. Klein R, Klein BE, Wang Q, Moss SE. Is age-related maculopathy associated with cataracts? Arch Ophthalmol 1994;112:191–6.
85. Klein R, Klein BE, Wang TY, Tomany SC, Cruickahanks KJ. The association of cataract and cataract surgery with the long-term incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. Arch Ophthalmol 2002;120:1551–8.
86. Cugati S, Mitchell P, Rochtchina E, Tan AG, Smith W, Wang JJ. Cataract surgery and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. Ophthalmology 2006;113:2020–5.
87. Wang JJ, Klein R, Smith W, Klein BE, Tomany S, Michell P. Cataract surgery and the 5-year incidence of late-stage age-related maculopathy: pooled findings from the Beaver Dam and Blue Mountains Eye Studies. Ophthalmology 2003;110:1960–7.
88. Braunstein RE, Sparrow JR. A blue-blocking intraocular lens should be used in cataract surgery. Arch Ophthalmol 2005;123:547–9.
89. Mainster MA. Intraocular lenses should block UV radiation and violet but not blue light. Arch Ophthalmol 2005;123:550–5.
90. Maltzman BA, Mulvihill MN, Greenbaum A. Senile macular degeneration and risk factors: a case-control study. Ann Ophthalmol 1979;11:1197–201.
91. Klein R, Klein BE, Jensen SC, Cruickshanks KJ. The relationship of ocular factors to the incidence and progression of age-related maculopathy. Arch Ophthalmol 1998;116:506–13.
92. Xu L, Li Y, Zheng Y, Jonas JB. Associated factors for age related maculopathy in the adult population in China: the Beijing Eye Study. Br J Ophthalmol 2006;90:1087–90.
93. Defay R, Delcourt C, Ranvier M, Lacroux A, Papoz L. Relationships between physical activity, obesity and diabetes mellitus in a French elderly population: the POLA study. Liées à l'Age. Int J Obes Relat Metab Disord 2001;25:512–8.
94. Christen WG, Glynn RJ, Manson JE, Ajani UA, Buring JE. A prospective study of cigarette smoking and risk of age-related macular degeneration in men. JAMA 1996;276:1147–51.
95. Delcourt C, Michel F, Colvez A, Lacroux A, Delage M, Vernet MH; POLA Study Group. Associations of cardiovascular disease and its risk factors with age-related macular degeneration: the POLA study. Ophthalmic Epidemiol 2001;8:234–49.
96. Klein R, Klein BE, Tomany SC, Cruickshanks KJ. The association of cardiovascular disease with the long-term incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. Ophthalmology 2003;110:636–43.
97. Vingerling JR, Dielemans I, Bots ML, Hofman A, Grobbee DE, de Jong PT. Age-related macular degeneration is associated with atherosclerosis. The Rotterdam Study. Am J Epidemiol 1995;142:404–9.
98. Mares-Perlman JA, Brady WE, Klein R, VandenLangenberg GM, Klein BE, Palta M. Dietary fat and age-related maculopathy. Arch Ophthalmol 1995;113:743–8.

99. The Eye Disease Case-Control Study Group. Risk factors for neovascular age-related macular degeneration. Arch Ophthalmol 1992;110:1701–8.
100. Cai J, Nelson KC, Wu M, Strnberg P Jr, Jones DP. Oxidative damage and protection of the RPE. Prog Retin Eye Res 2000;19:205–21.
101. 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;45:115–34.
102. Tan JS, Mitchell P, Rochtchina E, Wang JJ. Statins and the long-term risk of incident age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. Am J Ophthalmol 2007;143:685–7.
103. Klein R, Klein BE, Tomany SC, Danforth LG, Cruickshanks KJ. Relation of statin use to the 5-year incidence and progression of age-related maculopathy. Arch Ophthalmol 2003;121:1151–5.
104. Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Yates JR, Bradley M i sur.; Genetic Factors in AMD Study. Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. Br J Ophthalmol 2006;90:75–80.
105. Klein R, Klein BE, Linton KL, DeMets DL. The Beaver Dam Eye Study: the relation of age-related maculopathy to smoking. Am J Epidemiol 1993;137:190–200.
106. Mitchell P, Wang JJ, Smith W, Leeder SR. Smoking and the 5-year incidence of age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. Arch Ophthalmol 2002;120:1357–63.
107. Delcourt C, Diaz JL, Ponton-Sanchez A, Papoz L. Smoking and age-related macular degeneration. The POLA Study. Pathologies Oculaires Liées à l'Age. Arch Ophthalmol 1998;116:1031–5.
108. Thornton J, Edvards R, Mitchell P, Harrison RA, Buchan I, Kelly SP. Smoking and age-related macular degeneration: a review of association. Eye (Lond) 2005;19:935–44.
109. Vingerling JR, Hofman A, Grobbee DE, de Jong PT. Age-related macular degeneration and smoking. The Rotterdam Study. Arch Ophthalmol 1996;114:1193–6.
110. Bernhard D, Wang XL. Smoking, oxidative stress and cardiovascular diseases--do anti-oxidative therapies fail? Curr Med Chem 2007;14:1703–12.
111. Seddon JM, Willett WC, Speizer FE, Hankinson SE. A prospective study of cigarette smoking and age-related macular degeneration in women. JAMA 1996;276:1141–6.
112. Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Catanuto P, Hernandez EP, Marin-Castano ME, Cousins SW. Cigarette smoke-related oxidants and the development of sub-RPE deposits in an experimental animal model of dry AMD. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;47:729–37.
113. Nowak JZ. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. Pharmacol Rep 2006;58:353–63.
114. Suner IJ, Espinosa-Heidmann DG, Marin-Castano ME, Hernandez EP, Pereira-Simon S, Cousins SW. Nicotine increases size and severity of experimental choroidal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004;45:311–7.
115. Ham WT Jr, Ruffolo JJ Jr, Mueller HA, Clarke AM, Moon ME. Histologic analysis of photochemical lesions produced in rhesus retina by short-wave-length light. Invest Ophthalmol Vis Sci 1978;17:1029–35.

116. Tomany SC, Cruickshanks KJ, Klein R, Klein B, Knudtson MD. Sunlight and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. Arch Ophthalmol 2004;122:750–7.
117. Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BE. Sunlight and age-related macular degeneration. The Beaver Dam Eye Study. Arch Ophthalmol 1993;111:514–8.
118. Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BE, Nondahl DM. Sunlight and the 5-year incidence of early age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. Arch Ophthalmol 2001;119:246-50.
119. West SK, Rosenthal FS, Bressler SB, Munoz B, Fine SL, Taylor HR. Exposure to sunlight and other risk factors for age-related macular degeneration. Arch Ophthalmol 1989;107:875–9.
120. Taylor HR, West S, Munoz B, Rosenthal FS, Bressler SB, Bressler NM. The Long Term Effects of Visible Light on the Eye. Arch Ophthalmol 1992;110:99–104.
121. Pleština-Borjan I, Klinger-Lasić M. Long-term exposure to solar ultraviolet radiation as a risk factor for age-related macular degeneration. Coll Antropol 2007;31(Suppl 1):33–8.
122. Fletcher AE, Bentham CG, Agnew M, Young IS, Augood C, Chakravarthy U i sur. Sunlight exposure, antioxidants, and age-related macular degeneration. Arch Ophthalmol 2008;126:1396–403.
123. Hogg R, Chakravarthy U. AMD and micronutrient antioxidants. Curr Eye Res 2004;29:387–401.
124. Age-Related Eye Disease Study 2 Research Group. Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. JAMA 2013;309:2005–15.
125. De Jong PT. Age-related macular degeneration. N Engl J Med 2006;355:1474–85.
126. Michalska-Małecka K, Kabiesz A, Nowak M, Spiewak D. Age related macular degeneration – challenge for future: Pathogenesis and new perspectives for the treatment. Eur Geriatr Med 2015;6:69-75.
127. Winkler BS, Boulton ME, Gottsch JD, Sternberg P. Oxidative damage and age-related macular degeneration. Mol Vis 1999;5:32.
128. Crabb JW, Miyagi M, Gu X, Shadrach K, West KA, Sakaguchi H i sur. Drusen proteome analysis: An approach to the etiology of age-related macular degeneration. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:14682–7.
129. Drobek-Slowik M, Karczewicz D, Safranow K. The potential role of oxidative stress in the pathogenesis of the age-related macular degeneration (AMD). Postepy Hig Med Dosw (Online) 2007;61:28–37.
130. Tokarz P, Kaarniranta K, Blasiak J. Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). Biogerontology 2013;14:461–82.
131. Brantley MA Jr, Osborn MP, Sanders BJ, Rezaei KA, LU P, LI C i sur. Plasma biomarkers of oxidative stress and genetic variants in age-related macular degeneration. Am J Ophthalmol 2012;153:460–7.

132. Khandhadia S, Cree A, Lotery A. Oxidative damage and macular degeneration. U: Lather I, ur. Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants. 1. izd. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2014. str. 3625–53.
133. Sarks SH. Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study. Br J Ophthalmol 1976;60:324–41.
134. Young RW. Pathophysiology of age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol 1987;31:291–306.
135. Bressler NM, Bressler SB, Fine SL. Age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol 1988;32:375–413.
136. Korte GE, Reppucci V, Henkind P. RPE destruction causes choriocapillary atrophy. Invest Ophthalmol Vsi Sci 1984;25:1135–45.
137. Tezel TH, Bora NS, Kaplan HJ. Pathogenesis of age-related macular degeneration. Trends Mol Med 2004;10:417–20.
138. Ehrlich R, Harris A, Kheradiya NS, Winston DM, Ciulla TA, Wirostko B. Age-related macular degeneration and the aging eye. Clin Interv Aging 2008;3:473–82.
139. Young RW. The renewal of photoreceptor cell outer segments. J Cell Biol 1967;33:61–72.
140. Sarks S, Cherepanoff S, Killingsworth M, Sarks J. Relationship of Basal laminar deposit and membranous debris to the clinical presentation of early age-related macular degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007;48:968–77.
141. Kijlstra A, La Heij E, Hendrikse F. Immunological factors in the pathogenesis and treatment of age-related macular degeneration. Ocul Immunol Inflamm 2005;13:3–11.
142. Das A, McGuire PG. Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. Prog Retin Eye Res 2003;22:721–48.
143. Bhutto IA, Mcleod DS, Hasegawa T, Kim SY, Merges C, Tong P, Lutty GA. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. Exp Eye Res 2006;82:99–110.
144. Boulton M, Dayhaw-Barker P. The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. Eye (Lond) 2001;15:384–9.
145. Ramrattan RS, van der Schaft TL, Mooy CM, de Bruijn WC, Mulder PG, de Jong PT. Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:2857–64.
146. Grunwald JE, Hariprasad SM, DuPont J. Effect of aging on foveolar choroidal circulation. Arch Ophthalmol 1998;116:150–4.
147. Panda-Jonas S, Jonas JB, Jakobczyk-Zmija M. Retinal pigment epithelial cell count, distribution, and correlations in normal human eyes. Am J Ophthalmol 1996;121:181–9.
148. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. Trenda Biochem Sci 2000;25:502–8.
149. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine.New York: Oxford University Press Inc;1999.

150. Valko M, Leibfritz D, Monocol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007;39:44–84.
151. Kusano C, Ferrari B.Total Antioxidant Capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. Cell Mol Biol 2008;7:1–15.
152. Kusano C, Ferrari B. Free radicals, lipid peroxidation and antioxidants in apoptosis: implications in cancer, cardiovascular and neurological diseases. Biologia 2000;55:581–90.
153. Davies JK. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. Biochem Soc Symp 1995;61:1–31.
154. Gerchman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenno WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. Science 1954;7:623–6.
155. Knight JA. Free radicals: their hystory and current status in aging and disease. Ann Clin Lab Sci 1998;28:331–46.
156. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. J Pathol 2000;190:255–66.
157. Raha S, McEachern GE, Myint AT, Robinson BH. Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase. Free Radic Biol Med 2000;29:170–80.
158. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol 1956;11:298–300.
159. Ashok BT, Ali R. The aging paradox: free radical theory of aging. Exp Gerontol 1999;34:293–303.
160. Wilkinson F, Helman WP, Ross AB. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. J Phys Chem Ref Data 1995;24:663–77.
161. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am J Clin Nutr 1993;57(Suppl 5):S715–24.
162. von Zglinicki T, Pilger R, Sitte N. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. Free Radic Biol Med 2000;28:64–74.
163. von Zglinicki T, Burkle A, Kirkwood TB. Stress, DNA damage and ageing -- an integrative approach. Exp Gerontol 2001;36:1049–62.
164. Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. Biofactors 1997;6:391–7.
165. Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. Curr Pharm Des 2004;10:1677–94.
166. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem 1969; 244:6049–55.
167. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). Free Radic Biol Med 1988;5:363–9.
168. Decker H, van Holde KE. Oxygen and the Evolution of Life. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 2011. str. 49.
169. Justilien V, Pang JJ, Renganathan K, Zhan X, Crabb JW, Kim SR i sur. SOD2 knockdown mouse model of early AMD. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007;48:4407–20.

170. Imamura Y, Noda S, Hashizume K, Shinoda K, Yamaguchi M, Uchiyama S i sur. Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: A model of age-related macular degeneration. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:11282–7.
171. Young RW. Solar radiation and age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol 1988;32:252–69.
172. Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? FASEB J 1999;13:1007–24.
173. Weng TX, Godley BF, Jin GF, Mangini NJ, Kennedy BG, Yu AS i sur. Oxidant and antioxidant modulation of chloride channels expressed in human retinal pigment epithelium. Am J Physiol Cell Physiol 2002;283:C839–49.
174. Sautin YY, Johnson RJ. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 2008;27:608–19.
175. Roberts JE. Ocular phototoxicity. J Photochem Photobiol B 2001;64:136–43.
176. Ohrloff C, Hockwin O, Olson R, Dickman S. Glutathione peroxidase, glutathione reductase and superoxide dismutase in the aging lens. Curr Eye Res 1984;3:109–15.
177. Kakkar P, Singh BK. Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control. Mol Cell Biochem 2007;305:235–53.
178. Gottsch JD, Sovirj P, Bynoe LA, Rosen GM. Hematogenous photosensitization: a mechanism for the development of age –related macular degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 1990;31:1674–82.
179. Bernstein PS, Katz NB. The role of ocular free radicals in age-related macular degeneration. U: Fuchs J, Packer L, ur. Environmental Stressors in Health and Disease. New York: Marcel Dekker; 2001. str. 423–56.
180. Young RW. Shedding of discs from rod outer segments in the rhesus monky. J Ultrastruct Res 1971;34:190–203.
181. Winkler BS. An hypothesis to account for the renewal of outer segments in rod and cone photoreceptor cells: renewal as a surrogate antioxidant. Invest Ophthalmol Vis Sci 2008;49:3259–61.
182. Zhao L, Wang Z, Liu Y, Song Y, Li Y, Laties AM i sur. Translocation of the retinal pigment epithelium and formation of sub-retinal pigment epithelium deposit induced by subretinal deposit. Mol Vis 2007;13:873–80.
183. Warburton S, Davis WE, Southwick K, Xin H, Woolley AT, Burton GF i sur. Proteomic and phototoxic characterization of melanolipofuscin: correlation to disease and model for its origin. Mol Vis 2007;13:318–29.
184. Sun K, Cai H, Tezel TH, Paik D, Gaillard ER, Del Priore LV. Bruch's membrane aging decreases phagocytosis of outer segments by retinal pigment epithelium. Mol Vis 2007;13:2310–9.
185. Chong NH, Keonin J, Luther PJ, Frennesson CI, Weingeist DM, Wolf RL i sur. Decreased thickness and integrity of the macular elastic layer of Bruch's membrane correspond to the distribution of lesions associated with age-related macular degeneration. Am J Pathol 2005;166:241–51.
186. Rattner A, Nathans J. Macular degeneration: recent advances and therapeutic opportunities. Nat Rev Neurosci 2006;7:860–72.

187. Yu DY, Cringle SJ. Oxygen distribution and consumption within the retina in vascularised and avascular retinas and in animal models of retinal disease. Prog Retin Eye Res 2001;20:175–208.
188. Picaud S. Retinal biochemistry. U: Kaufman PL, Alm A, ur. Adler's Physiology of the Eye. St. Louis: Mosby; 2003. str. 382–408.
189. Guyton C, Hall JE. Medicinska fiziologija. 12. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2012. str. 192.
190. Torczynskin E, Tso MO. The architecture of the choriocapillaris at the posterior pole. Am J Ophthalmol 1975;81:428–40.
191. Miller D. Clinical light damage to the eye. New York: Springer Verlang; 1987. str. 184–215.
192. Youssef PN, Sheibani N, Albert DM. Retinal light toxicity. Eye 2011;25:1–14.
193. Ham WT Jr, Mueller HA, Ruffoli JJ Jr, Guerry D 3., Guerry RK. Action spectrum for retinal injury from near-ultraviolet radiation in the aphakic monkey. Am J Ophthalmol 1982;93:299–306.
194. De La Paz M, Anderson RE. Region and age-dependent variation in susceptibility of the human retina to lipid peroxidation. Invest Ophthalmol Vis Sci 1992;33:3497–9.
195. Hunter JJ, Morgan JI, Merigan WH, Sliney DH, Sparrow JR, Williams DR. The susceptibility of the retina to photochemical damage from visible light. Prog Retin Eye Res 2012;31:28–42.
196. Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou L, Darrow RA, Kutty RK, Kutty G. Light history and age-related changes inretinal light damage. Invest Ophthalmol Vis Sci 1998;39:1107–16.
197. Reme CE. The dark side of light: rhodopsin and the silent death of vision. The proctor lecture. Invest Ophthalmol Vis Sci 2005;46:2672–82.
198. Wu J, Seregard S, Algvere PV. Photochemical damage of the retina. Surv Ophthalmol 2006;51:461-81.
199. Ala-Laurila P, Kolesnikov AV, Crouch RK, Tsina E, Shukolyukov SA, Govardovskii VI i sur. Visual cycle: Dependence of retinol production and removal on photoproduct decay and cell morphology. J Gen Physiol 2006;128:153–69.
200. Grimm C, Wenzel A, Williams T, Rol P, Hafezi F, Reme C. Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: effect of photoreversal of bleaching. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42:497–505.
201. Noell WK, Albrecht R. Irreversible effects on visible light on the retina: role of vitamin A. Science 1971;172:76–9.
202. Rapp LM, Smith SC. Morphologic comparisons between rhodopsin-mediated and short-wavelength classes of retinal light damage. Invest Ophthalmol Vis Sci 1992; 33:3367–77.
203. Keller C, Grimm C, Wenzel A, Hafezi F, Reme C. Protective effect of halothane anesthesia on retinal light damage: inhibition of metabolic rhodopsin regeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42:476–80.
204. Rozanowska M, Jarvis-Evans J, Korytowski W, Boulton ME, Burke JM, Sarna T. Blue light induced reactivity of retinal age pigment. In vitro generation of oxygen-reactive species. J Biol Chem 1995;270:18825–30.

205. Jung T, Bader N, Grune T. Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences. Ann N Y Acad Sci 2007;1119:97–111.
206. Sparrow JR, Gregory-Roberts E, Yamamoto K, Blonska A, Ghosh, SK, Ueda K i sur. The bisretinoids of retinal pigment epithelium. Prog Retin Eye Res 2012; 31:121–35.
207. Hammer M, Richter S, Guehrs KH, Schweitzer D. Retinal pigment epithelium cell damage by A2-E and its photo-derivatives. Mol Vis 2006;12:1348–54.
208. Iriyama A, Fujiki R, Inoue Y, Takahashi H, Tamaki Y, Takezawa S i sur. A2E, a pigment of the lipofuscin of retinal pigment epithelial cells, is an endogenous ligand for retinoic acid receptor. J Biol Chem 2008;283:11947–53.
209. Dayhaw-Barker P, Barker FM. Photoeffects on the Eye. J Toxicol Cutaneous Ocul Toxicol 1985;4:269–99.
210. Tate DJ Jr, Miceli MV, Newsome DA. Phagocytosis and H2O2 induce catalase and metallothione in gene expression in human retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 1995;36:1271–9.
211. Kasahara E, Lin LR, Ho YS, Reddy VN. SOD2 protects against oxidation-induced apoptosis in mouse retinal pigment epithelium: implications for age-related macular degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 2005;46:3426–34.
212. Liles MR, Newsome DA, Oliver PD. Antioxidant enzymes in the aging human retinal pigment epithelium. Arch Ophthalmol 1991;109:1285–8.
213. Young RW. Sunlight and age-related eye disease. J Natl Med Assoc 1992;84:353–8.
214. Noell WK. Possible mechanisms of photoreceptor damage by light in mammalian eyes.Vision Res 1980;20:1163–71.
215. Hong L, Gargulio J, Anzaldi L, Edwards GS, Nemanich RJ, Simon JD. Age-dependent photoionization thresholds of melanosomes and lipofuscin isolated from human retinal pigment epithelium cells. Photochem Photobiol 2006;82:1475–81.
216. Dontsov AE, Glickman RD, Ostrovsky MA. Retinal pigment epithelium pigment granules stimulate the photo-oxidation of unsaturated fatty acids. Free Radic Biol Med 1999;26:1436–46.
217. Delcourt C, Carriere I, Ponton-Sanchez A, Fourrey S, Lacroux A, Papoz L; POLA study Group. Light exposure and the risk of age-related macular degeneration: the Pathologies Oculaires Liées à l'Age (POLA) study. Arch Ophthalmol 2001;119:1463–8.
218. Jerrett SG, Lin H, Godley BF, Boulton ME. Mitochondrial DNA damage and its potential role in retinal degeneration. Prog Retin Eye Res 2008;27:596–607.
219. Hageman GS, Mullins RF, Russell SR, Johnson LV, Anderson DH. Vitronectin is a constituent of ocular drusen and the vitronectin gene is expressed in human retinal pigmented epithelial cells. FASEB J 1999;13:477–84.
220. Anderson DH, Talaga KC, Rivest AJ, Barron E, Hageman GS, Johnson LV. Characterization of beta amyloid assemblies in drusen: the deposits associated with aging and age-related macular degeneration. Exp Eye Res 2004;78:243–56.
221. Feigl B. Age-related maculopathy - linking aetiology and pathophysiological changes to the ischaemia hypothesis. Prog Retin Eye Res 2009;28:63–8.
222. Fernandes AF, Zhou J, Zhang X, Bian Q, Sparrow JR, Taylor A i sur. Oxidative inactivation of the proteasome in retinal pigment epithelial cells: A potential link

between oxidative stress and up-regulation of interleukin-8. J Biol Chem 2008;283:20745–53.
223. Curran-Celentano J, Hammond BR, Ciulla TA, Cooper DA, Pratt LM, Danis RB. Relation between dietary intake, serum concentrations, and retinal concentrations of lutein and zeaxanthin in adults in a Midwest population. Am J Clin Nutr 2001;74:796–802.
224. Loane E, Nolan JM, O'Donovan O, Bhosale P, Bernstein PS, Beatty S. Transport and retinal capture of lutein and zeaxanthin with reference to age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol 2008;53:68–81.
225. O'Connell ED, Nolan JM, Stack J, Greenberg D, Kyle J, Maddock L i sur. Diet and risk factors for age-related maculopathy. Am J Clin Nutr 2008;87:712–22.
226. Maoka T, Arai A, Shimizu M, Matsuno T. The first isolation of enantiomeric and meso-zeaxanthin in nature. Comp Biochem Physiol B 1986;83:121–4.
227. Tomson LR, Toyoda Y, Langner A, Delori FC, Garnett Km, Craft N i sur. Elevated retinal zeaxanthin and prevention of light-induced photoreceptor cell death in quail. Invest Ophthalmol Vis Sci 2002;43:3538–49.
228. Delcourt C, Carriere I, Delage M, Barberger-Gateau P, Schalch W. Plasma lutein and zeaxanthin and other carotenoids as modifiable risk factors for age-related maculopathy and cataract: the POLA study. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;47:2329–35.
229. Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) Research Group. Secondary analyses of the effects of lutein/zeaxanthin on age-related macular degeneration progression: AREDS2 report No. 3. JAMA Ophthalmol 2014;132:142–9.
230. De La Paz MA, Zhang J, Fridovich I. Antioxidant enzymes of the human retina: effect of age on enzyme activity of macula and periphery. Curr Eye Res 1996;15:273–8.
231. Yildirim Z, Ucgun NI, Yildirim F. The role of oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration. Clinics (Sao Paulo) 2011;66:743–6.
232. Evereklioglu C, Er H, Doganay S, Cekmen M, Turkoz Y, Otlu B, Ozerol E. Nitric oxide and lipid peroxidation are increased and associated with decreased antioxidant enzyme activities in patients with age-related macular degeneration. Doc Ophthalmol 2003;106:129–36.
233. Age-Related Eye Disese Study Research Group; SanGiovanni JP, Chew EY, Clemons TE, Ferris FL 3., Gensler G, Lindblad AS i sur. The relationship of dietary carotenoid and vitamin A, E, and C intake with age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS Report No. 22. Arch Ophthalmol 2007;125:1225–32.
234. Delcourt C, Cristol JP, Leger CL, Descomps B, Papoz L. Associations of antioxidant enzymes with cataract and age-related macular degeneration. The POLA study. Pathologies Oculaires Liees a l'Age. Ophthalmology 1999;106:215–22.
235. Frank RN, Amin RH, Puklin JE. Antioxidant enzymes in macular retinal pigment epithelium of eyes with neovascular age-related macular degeneration. Am J Ophthalmol 1999;127:694–709.
236. De La Paz MA, Zhang J, Fridovich I. Red blood cell antioxidant enzymes in age-related macular degeneration. Br J Ophthalmol 1996;80:445–50.
237. Chandrasena LG, Chackrewarthy S, Perera PMJ, De Silva D. Erythrocyte antioxidant enzymes in patients with cataract. Ann Clin Lab Sci 2006;36:201–4.

238. Nourmohammadi I, Gohari L, Moddares M. Evaulation of erythrocyte glutathione peroxidase, superoxide dismutase and total antioxidants in cataract patients. Arch Iran Med 2001;4:123–6.
239. Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. J Lab Clin Med 1975;85:337–41.
240. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erytrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967;70:158–69.
241. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin Sci (Lond) 1993;84:407-12.
242. Bonett DG, Price RM. Statistical inference for a linear function of medians: Confidence intervals, hypothesis testing and sample size requirements. Psychol Methods 2002;7:370-83.
243. Hosmer DW, Lemeshow S, Sturdivant RX. Applied logistic regression. 2. izd. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2000.
244. Bursac Z, Gauss CH, Williams DK, Hosmer DW. Purposeful selection of variables in logistic regression. Source Code Biol Med 2008;3:17.
245. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. JAMA 2013;310:2191–4.
246. Kaemmerer E, Schutt F, Krohne TU, Holz FG, Kopitz J. Effects of lipid peroxidation-related protein modifications on RPE lysosomal functions and POS phagocytosis. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007;48:1342–7.
247. Nicolas MG, Fujiki K, Murayama K, Suzuki MT, Shido N, Hotta Y i sur. Studies on the mechanism of early onset macular degeneration in cynomolgus monkeys. II. Suppression of metallothionein synthesis in the retina in oxidative stress. Exp Eye Res 1996;62:399–408.
248. Behndig A, Svensson B, Marklund SL, Karlsson K. Superoxide dismutase isoenzymes in the human eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 1998;39:471–5.
249. Suzuki M, Kamei M, Itabe H, Yoneda K, Bando H, Kume N i sur. Oxidized phospholipids in the macula increase with age and in eyes with age-related macular degeneration. Mol Vis 2007;13:772–8.
250. Liu Z, Sun L, Zhu L, Jia X, Li X, Jia H i sur. Hydroxytyrosol protects retinal pigment epithelial cells from acrolein-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction. J Neurochem 2007;103:2690–700.
251. Lu L, Oveson BC, Jo YJ, Lauer TW, Usui S, Komeima K i sur. Increased expression of glutathione peroxidase 4 strongly protects retina from oxidative damage. Antioxid Redox Signal 2009;11:715–24.
252. Ueta T, Inoue T, Furukawa T, Tamaki Y, Nakagawa Y, Imai H i sur. Glutathione peroxidase 4 is required for maturation of photoreceptor cells. J Biol Chem 2012;287:7675–82.
253. Usui S, Oveson BC, Iwase T, Lu L, Lee SY, Jo YJ.Overexpression of SOD in retina: need for increase in H_2O_2-detoxifyng enzyme in same cellular compartment.Free Radic BiolMed 2011;51:1347–54.

254. Fletcher AE. Free radicals, antioxidants and eye diseases: evidence from epidemiological studies on cataract and age-related macula degeneration. Ophthalmic Res 2010;44:191–8.
255. Anand A, Sharma NK, Gupta A, Prabhakar S, Sharma SK, Singh R. Superoxide dismutase 1 levels in North Indian population with age-related macular degeneration. Oxid Med Cell Longev 2013;2013:365046.doi:10.1155/2013/365046.
256. Shen XL, Jia JH, Zhao P, Fan R, Pan XY, Yang HM i sur. Changes in blood oxidative and antioxidant parameters in a group of Chinese patients with age-related macular degeneration. J Nutr Health Aging 2012;16:201–4.
257. Lin H, Xu H, Liang FQ, Liang H, Gupta P, Havey AN i sur. Mitochondrial DNA damage and repair in RPE associated with aging and age-related macular degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011:52:3521–9.
258. Wang AL, Lukas TJ, Yuan M, Neufeld AH. Increased mitochondrial DNA damage and down-regulation of DNA repair enzymes in aged rodent retinal pigment epithelium and choroid. Mol Vis 2008;14:644–51.
259. Sitar ME, Aydin S, Cakatay U. Human serum albumin and its relation with oxidative stress. Clin Lab 2013;59:945–52.
260. Cohen MS, Olin KL, Feuer WJ, Hjelmeland L, Keen CL, Morse LS. Low glutathione reductase and peroxidase activity in age-related macular degeneration. Br J Ophthalmol 1994;78:791–4.
261. Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. Free Radic Biol Med 2007;43:477–503.
262. Prashar S, Pandav SS, Gupta A, Nath R. Antioxidant enzymes in RBCs as a biological index of age related macular degeneration. Acta Ophthalmol (Copenh) 1993;71:214–8.
263. Cho CS, Lee S, Lee HA, Woo HA, Choi EJ, Rhee SG. Irreversible inactivation of glutathione peroxidase 1 and reversible inactivation of peroxiredoxin II by H2O2 in red blood cells. Antioxid Redox Signal 2010;12:1235–46.
264. Orr WC, Sohal RS. The effects of catalase gene overexpression on life span and resistance to oxidative stress in transgenic Drosophila melanogaster. Arch Biochem Biophys 1992;297:35–41.
265. Reveillaud I, Niedywiecki A, Bensch KG, Fleming JE. Expression of bovine superoxide dismutase in Drosophila melanogaster augments resistance of oxidative stress. Mol Cell Biol 1991;11:632–40.
266. Omar BA, Flores SC, McCord JM. Superoxide dismutase: pharmacological developments and applications. Adv Pharmacol 1992;23:109–61.
267. Andersen HR, Jeune B, Nybo H, Nielsen JB, Andersen-Ranberg K, Grandjean P. Low activity of superoxide dismutase and high activity of glutathione reductase in erythrocytes from centenarians. Age Ageing 1998;27:643–8.
268. Jia L, Dong Y, Yang H, Pan X, Fan R, Zhai L. Serum superoxide dismutase and malondialdehyde levels in a group of Chinese patients with age-related macular degeneration. Aging Clin Exp Res 2011;23:264–7.
269. Totan Y, Yagci R, Bardak Y, Ozyurt H, Kendir F, Yilmaz G i sur. Oxidative macromolecular damage in age-related macular degeneration. Curr Eye Res 2007;34:1089–93.

270. Anraku M, Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M. Redox properties of serum albumin. Biochim Biophys Acta 2013;1830:5465–72.
271. Anraku M. Elucidation of the mechanism responsible for the oxidation of serum albumin and its application in treating oxidative stress-related diseases. [Sažetak] Yakugaku Zasshi 2014;134:973–9.
272. Lamont J, Campbell J, FitzGerald P. Measurement of individual vs total antioxidants. Clin Chem 1997;43:852–4.
273. Zafrilla P, Losada M, Perez A, Caravaca G, Mulero J. Biomarkers of oxidative stress in patients with wet age related macular degeneration. J Nutr Health Aging 2013;17:219–22.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ivna Pleština-Borjan

Adresa: Klinika za očne bolesti, KBC Split, Spinčićeva 1, 2100 Split

Telefon/mobitel: +385 21 556 402; +385 91 790 5709

e-pošta: ivna.plestina@gmail.com

Datum i mjesto rođenja: 18. 07. 1955., Split, Hrvatska

Matični broj iz Upisnika znanstvenika:175504

Bračno stanje: Udana, majka jednog djeteta

Obrazovanje

1995. obranila magisterij znanosti na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod naslovom "Kronična izloženost sunčevu ultraljubičastom zračenju kao faktor rizika u nastanku senilne degenerativne makulopatije"

1987. – 1990. znanstveni poslijediplomski studij iz oftalmologije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

1989. položila specijalistički ispit iz oftalmologije u Klinici za očne bolesti Rebro Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

1982. diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Radno iskustvo

1990. – danas zaposlenica Klinike za očne bolesti KBC-a u Splitu

1989. – 1990. zaposlenica Klinike za očne bolesti KBC-a Rebro Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

1986. – 1989. specijalizantica oftalmologije u Vojnoj bolnici u Splitu

1982. – 1986. zaposlenica u različitim jedinicama Doma zdravlja u Splitu

OPIS STRUČNOG I ZNANSTVENOG RADA

Završila Klasičnu gimnaziju u Splitu. Diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u ožujku 1982.

Specijalistički ispit iz oftalmologije položila u veljači 1989. u Klinici za očne bolesti KBC-a Rebro Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Znanstveni poslijediplomski studij iz područja biomedicine i zdravstva (Kliničke medicinske znanosti – oftalmologija) završila na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Magistarski rad pod naslovom "Kronična izloženost sunčevu ultraljubičastom zračenju kao faktor rizika u nastanku senilne degenerativne makulopatije" obranila 1995.

U listopadu 1990. izabrana u znanstveno istraživačko zvanje istraživač suradnik za znanstveno područje medicine (mat. br. 175504).

Po završenoj specijalizaciji radila određeno vrijeme u Klinici za očne bolesti KBC-a Rebro u Zagrebu. Od travnja 1990. zaposlenica u Klinici za očne bolesti KBC-a Split.

1992. završila poslijediplomski tečaj “Primjena ultrazvuka u oftalmologiji“ u organizaciji Medicinskoga fakulteta u Zagrebu, HLZ-a i Zavoda za oftalmologiju Opće bolnice Sv. Duh.

Odobrenjem Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske 1. ožujka 2011. priznat joj je naziv primarijus.

Odobrenjem Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske od 20. rujna 2011. priznat joj je status specijalista iz uže specijalnosti za stražnji segment oka.

Uže joj je područje djelovanja dijagnostika i liječenje bolesti stražnjeg segmenta oka (uključujući vitreoretinalnu kirurgiju, lasersko liječenje, fluoresceinsku angiografiju i optičku koherentnu tomografiju), kao i kirurško zbrinjavanje prednjeg segmenta oka te ultrazvuk u oftalmologiji, što su i najčešće teme njezinih objavljenih radova. Posebno je angažirana na problemu senilne degeneracije makule i retinopatije nedonoščadi. Pokretač je i članica radne skupine HOD-a koja je donijela Nacionalne smjernice i program probira i liječenja retinopatije nedonoščadi.

Predavač je u poslijediplomskoj nastavi "Ultrazvuk oka" Medicinskoga fakulteta u Splitu i Klinike za očne bolesti 2005. i 2006. te mentor polaznicima individualnog tečaja "Ultrazvučna dijagnostika oka i orbite" od siječnja do travnja 2009.

Sudjelovala je kao istraživač u nekoliko znanstvenoistraživačkih projekata:

- Ultraljubičasto zračenje kao faktor rizika u nastanku očnih bolesti (3-01-373), glavni istraživač prof. dr. sc. Mery Klinger-Lasić
- Istraživanje nasljedne nedostatne aktivnosti glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G-6-PD) (0216010), glavni istraživač: prof. dr. sc. Vjekoslav Krželj
- Genetske, kliničke i populacijske osobitosti deficita G-6-PD u Hrvatskoj (216-0000000-3464), glavni istraživač: prof.. dr. sc. V. Krželj

Stručno se usavršavala u zemlji i inozemstvu.

Aktivno je sudjelovala na više od 40 znanstvenih i stručnih skupova, tečajeva i kongresa u zemlji i inozemstvu, a njezin rad "Wartime open-globe eye injuries", prikazan na 7. Međunarodnom simpoziju očne traume (ISOT) u Rimu 2006. nagrađen je prestižnom nagradom Zaklade Helen Keller.

Autorica je i suautorica više od 20 znanstvenih i stručnih radova objavljenih u domaćim i stranim časopisima, od toga 5 objavljenih u časopisima indeksiranim u CC-u.

Izdvaja se znanstveni rad: Plestina-Borjan I, Klinger-Lasic M. Long-term exposure to solar ultraviolet radiation as risk factor for age-related macular degeneration. Coll Antropol 2007; 31(Suppl. 1):33–8. Rad je uključen u metaanalizu: Sui GY, Liu GC, Liu GY i sur. Is sunlight exposure a risk factor for age-related macular degeneration? A systematic review and meta-analysis, Br J Ophthalmol 2013;97:389–94. kao jedna od četiriju europskih studija između 14 studija (odabranih od ukupno 465 pregledanih radova) u kojima je istraživan utjecaj sunčeva zračenja na oštećenje mrežnice, te su po strogim kriterijima klasificirane pogodnim za metaanalizu.

Suautorica je poglavlja Ultrazvuk oka. U: Hozo I, Karelović D, ur. Ultrazvuk u kliničkoj praksi. Split: Hrvatsko gastroenterološko društvo, Ogranak Split; 2004. str. 49–73.

Aktivno se služi engleskim i njemačkim jezikom.

Članica je brojnih stručnih i društvenih organizacija u zemlji i inozemstvu: Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog oftalmološkog društva (HOD), Udruženja retinologa, Udruženja oftalmologa ultrasoničara, Perdijatrijske oftalmološke sekcije pri HOD-u, European society of Cataract and Refractive Surgeons (ESCRS), Udruženja kontaktologa Hrvatske, European Contact Lens Society of Ophthalmology (ECLSO), Europskog udruženja oftalmologa (SOE), Hrvatskog društva za pomorsku, podvodnu i hiperbaričnu medicinu, Katoličkog udruženja liječnika Hrvatske i dr.