

(47)

Ocena równowagi proantyoksydacyjnej u chorych na wysiękową postać zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem

Evaluation pro/antioxidant balance in patients with wet form of age-related macular degeneration

Małgorzata Mrowicka¹, Jerzy Mrowicki¹, Jacek P. Szaflik^{2,3}, Marta Szaflik^{4,5}, Magdalena Ulińska^{2,3}, Jerzy Szaflik³, Ireneusz Majsterek¹

¹ Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek

² Katedra i Klinika Okulistyki II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jacek P. Szaflik

³ Samodzielny Publiczny Kliniczny Szpital Okulistyczny w Warszawie

⁴ Centrum Okulistyczne Laser w Warszawie

⁵ Klinika Okulistyki I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Dariusz Kęćcik

Abstrakt:

Cel: ocena zdolności enzymatycznej bariery antyoksydacyjnej do obrony przed procesem peroksydacji u chorych na wysiękową postać zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem w porównaniu ze zdolnością u osób zdrowych.

Materiał i metody: w hemolizatach krwi u 25 chorych na wysiękową postać zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem i u 25 osób z grupy kontrolnej oznaczono aktywność dysmutazy ponadtlenkowej według metody Misry i Fridovicha, katalazy metodą Beersa i Sizer, peroksydazy glutationowej według metody Sedlaka i Lindsay'a w modyfikacji Little'a i O'Briena oraz stężenie dialdehydu malonowego (TBARS) metodą opisaną przez Placera.

Wyniki: zaobserwowano statystycznie istotne zmniejszenie aktywności badanych enzymów u chorych na wysiękową postać zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem w odniesieniu do osób zdrowych: SOD (2086,3 vs. 2348,5 U/gHb/100 ml; $p \leq 0,05$), CAT (6,9 vs. 7,6 BU/gHb; $p \leq 0,05$) i GPx (36,3 vs. 45,8 U/gHb; $p \leq 0,05$), oraz zwiększenie stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym w erytrocytach i osoczu krwi u chorych na wysiękową postać zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem w odniesieniu do tych samych parametrów u osób z grupy kontrolnej (0,119 vs. 0,286 $\mu\text{mol/gHb}$; $p \leq 0,001$).

Wnioski: wyniki badań wskazują na niewydolny enzymatyczny układ antyoksydacyjny oraz nasilony proces peroksydacyjny u chorych na wysiękową postać zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem.

Słowa kluczowe:

zwyrodnienie plamki związane z wiekiem, enzymy antyoksydacyjne, stres oksydacyjny.

Abstract:

Objective: The aim of study was to evaluate the ability of the enzymatic antioxidant barrier to protect against peroxidation in patients with wet age-related macular degeneration, as compared to healthy subjects.

Material and methods: Hemolysate blood samples collected from 25 patients with wet form age-related macular degeneration and 25 healthy controls were analysed to determine the activity of superoxide dismutase (using Misra and Fridovich method), catalase (using Beers and Sizer method), glutathione peroxidase (using Sedlak and Lindsay method modified by Little and O'Brien), and malondialdehyde concentration (using Placer method).

Results: We observed a statistically significant decrease in the activity of following enzymes in patients with wet age-related macular degeneration, as compared to controls: superoxide dismutase (2086.3 vs. 2348.5 U/gHb/100 ml; $p \leq .05$), catalase (6.9 vs. 7.6 BU/gHb, $p \leq .05$) and glutathione peroxidase (36.3 vs. 45.8 U/gHb; $p \leq .05$). At the same time, an increase in age-related macular degeneration thiobarbituric acid reactive substance concentration was demonstrated in patients with wet age-related macular degeneration, as compared to healthy subjects (.119 vs. .286 $\mu\text{mol/gHb}$; $p \leq .001$).

Conclusion: The obtained results indicate inefficient enzymatic antioxidant system which manifests as intense peroxidation in patients with age-related macular degeneration.

Key words:

age-related macular degeneration, antioxidant enzymes, oxidative stress.

Wstęp

Patogeneza zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (Age-related Macular Degeneration – AMD) do dzisiaj nie została wyjaśniona i prawdopodobnie ma podłoże wieloczynnikowe. Dane z literatury medycznej wskazują, że stres oksydacyjny jest

jednym z najistotniejszych czynników przyspieszających proces starzenia się organizmu, odgrywa zatem istotną rolę w rozwoju AMD, albowiem w przypadku tej choroby wiek jest kluczowym czynnikiem ryzyka. Zwyrodnienie plamki związane z wiekiem dotyka już 50-latków i jest trzecią w kolejności, tuż po jaskrze

i zaćmie, przyczyną ślepoty w tej populacji oraz pierwszą nieodwracalną przyczyną utraty wzroku w populacji osób starszych. Według danych szacunkowych na AMD choruje 30% osób, które przekroczyły 70. rok życia, najczęściej chorują kobiety, u nich po 75. roku życia dwa razy częściej niż u mężczyzn w tym samym wieku występują zmiany początkowe choroby i aż siedem razy częściej zmiany zaawansowane (1). Poza wiekiem i płcią coraz częściej podkreśla się znaczenie dyspozycji genetycznej, dodatni wywiad rodzinny w kierunku AMD oraz 100-procentowe współwystępowanie tego schorzenia u bliźniąt homozygotycznych. Rolę w rozwoju schorzenia mogą odgrywać mutacje w obrębie genu kodującego czynnik H dopełniacza i genu kodującego czynnik I oraz B i składowe dopełniacza C3 i C2 (2). Do czynników zachorowalności na AMD zalicza się również palenie papierosów, które podwaja ryzyko, jasny kolor tęczówki oka, nadwzroczność, wysoki wskaźnik BMI i schorzenia sercowo-naczyniowe. Wpływ na rozwój AMD ma także niedobór luteiny oraz zeaksantyny – karotenoidów chroniących siatkówkę oka przed procesami wolnorodnikowymi (3). Zwrodnienie siatkówki związane z wiekiem jest chorobą zewnętrznych warstw siatkówki tj. nabłonka barwnikowego siatkówki (Retinal Pigment Epithelium – RPE) i fotoreceptorów oraz struktur funkcjonalnie z nią powiązanych takich jak błona Brucha i choriokapilary, ograniczoną do jej centralnego obszaru – plamki. Niezdrowy tryb życia, złe nawyki żywieniowe i związana z tym niska zawartość przeciwutleniaczy takich jak witaminy E i C, beta-karoten, selen oraz cynk osłabiają wydolność bariery antyoksydacyjnej i wpływają na niską aktywność białek enzymatycznych chroniących komórki RPE oraz błony komórkowe fotoreceptorów oka przed reaktywnymi formami tlenu (RFT, Reactive Oxygen Species – ROS).

Nadmierna produkcja i aktywność RFT wynikają z niedostatecznej skuteczności antyoksydacyjnych mechanizmów obronnych w siatkówce – enzymatycznych i/lub nieenzymatycznych, które w warunkach fizjologii skutecznie neutralizują skutki stresu oksydacyjnego. Układ enzymatyczny w siatkówce składa się z enzymów antyoksydacyjnych takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) i peroksydaza glutationowa (GPx), których aktywność jest zależna od elementów egzogennych – są nimi jony metali: cynku, miedzi, manganu i selenu. Część nieenzymatyczną systemu antyoksydacyjnego w oku stanowią karotenoidy: luteina i zeaksantyna, witaminy C i E, glutation, koenzym Q i inne, których ilość w tkankach oka ulega zmniejszeniu wraz z wiekiem, stwarzając zagrożenie rozwoju zwrodnienia siatkówki związane z wiekiem.

Cel

Celem pracy jest ocena poziomu procesu wolnorodnikowego poprzez pomiar związków tiobarbiturozależnych (Thiobarbituric Acid Reactive Substances – TBARS), których przedstawicielem jest dialdehyd malonowy we krwi, oraz ocena wydolności enzymatycznej bariery antyoksydacyjnej poprzez określenie aktywności SOD, CAT i GPx w krwinkach czerwonych u chorych na AMD oraz osób zdrowych.

Materiał i metody

Badaniami objęto grupę 25 pacjentów (8 mężczyzn i 17 kobiet) w wieku od 64 do 87 lat (średnia $75,5 \pm 11,5$), diagnozowanych w Klinice Okulistyki II Wydziału Lekarskiego War-

szawskiego Uniwersytetu Medycznego z powodu podejrzenia zmian zwyrodnienia siatkówki związane z wiekiem. Wszystkich pacjentów poddano badaniu okulistycznemu obejmującemu: ocenę ostrości wzroku i poczucia kontrastu, pomiar ciśnienia wewnątrzgałkowego (Intraocular Pressure – IOP) oraz badanie dna oka w obrazie stereoskopowym. Rozpoznanie wysiękowej postaci AMD potwierdzano za pomocą optycznej koherentnej tomografii (Optical Coherence Tomography – OCT) oraz angiografii fluoresceinowej (Fluorescein Angiography – FA) i indocyjaninowej (Indocyanine Green Angiography – ICG).

Grupę odniesienia stanowiło 25 osób zdrowych (9 mężczyzn i 13 kobiet) w wieku od 51 do 78 lat (średnia $64,5 \pm 13,7$), u których podczas rutynowego badania przeprowadzanego w Klinice Okulistyki II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego AMD i inne choroby siatkówki zostały wykluczone.

Materiał badawczy stanowiła krew pobrana z żyły odłokciowej – pobierano ją od uczestników badania po uprzednim wyrażeniu przez nich świadomej zgody.

Przygotowanie hemolizatu krwi do oznaczeń polegało na odwirowaniu, usunięciu osocza i przemyciu masy erytrocytarnej 0,9-procentowym NaCl. Tak przygotowane erytrocyty hemolizowano, mieszając je z wodą redestylowaną, i zamrażano w temperaturze -18°C . W hemolizacie oznaczono stężenie związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) metodą opisaną przez Placera (4). Większość związków chemicznych reagujących z kwasem tiobarbiturowym to dialdehyd malonowy (Malondialdehyde – MDA), którego stężenie wyrażono w $\mu\text{mol MDA} \times \text{g}^{-1} \text{Hb}$.

Metoda, według Misry i Fridovicha (5), oznaczania aktywności SOD polegała na hamowaniu przez enzym reakcji samoutleniania adrenaliny do adrenochromu w środowisku alkalicznym.

W oparciu o metodę Beersa i Sizera (6) oznaczono aktywność CAT. Mierzono zmniejszenie absorbancji nadtlenu wodoru rozkładanego przez enzym.

Pomiar aktywności GPx został wykonany w hemolizatach krwi według metody Sedlaka i Lindsay'a w modyfikacji Little'a i O'Briena (7). W pomiarze wykorzystano różnicę w szybkości reakcji enzymu z glutationem i kumenem w próbie badanej i próbie kontrolnej.

Parametr – stężenie hemoglobiny w hemolizacie krwi – konieczny do wyliczeń aktywności badanych enzymów oznaczono standardową metodą Drabkina (8). Pomiarów dokonano za pomocą gotowych odczynników firmy Aqua-Med (ZPAM-Kolasa sp.j. catalogue no 1010.2).

Wszystkich oznaczeń analizowanych parametrów dokonano na spektrofotometrze Bodenseewerk Perkin-Elmer GmbH, Überlingen, Germany.

Analizy statystycznej dokonano z użyciem pakietu Statistica 6.0. W pracy obliczono średnie arytmetyczne (\bar{x}) z odchyleniem standardowym (Standard Deviation – SD). W obliczeniach do oceny istotności statystycznej różnic między średnimi przyjęto poziom istotności $p \leq 0,05$ jako znamienne statystycznie. W badaniach zastosowano nieparametryczne odpowiedniki testu t-Studenta, a dla zmiennych niepowiązanych – test U Manna-Whitneya.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Warszawie nr KB/107/2008.

Wyniki

W tabeli I oraz na rycinach 1.–4. przedstawiono wyniki – średnie arytmetyczne ± odchylenie standardowe ($x \pm SD$) aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz stężenia dialdehydu malonowego we krwi u chorych na AMD oraz u osób zdrowych.

Średnia aktywność SOD w erytrocytach u chorych na AMD była istotnie niższa w porównaniu do jej parametrów u osób z grupy kontrolnej (2086,3 vs. 2348,5 U/gHb/100ml; $p \leq 0,05$).

Dla CAT wykazano różnice w aktywności istotne statystycznie – mniejsze wartości u osób z grupy chorych na AMD w odniesieniu do osób zdrowych (6,9 vs. 7,6 BU/gHb; $p \leq 0,05$).

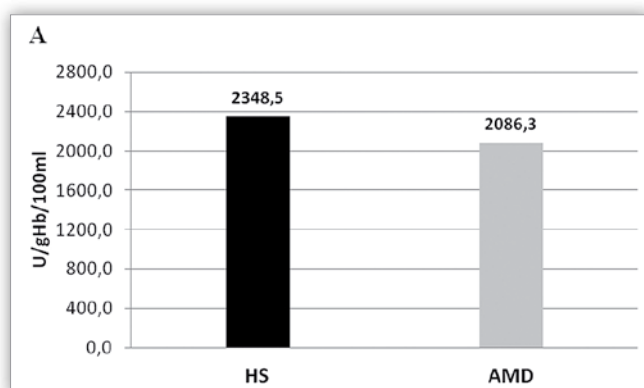
Wartości średniej aktywności GPx we krwi u osób z grupy chorych na AMD różniły się istotnie od tych wartości u osób z grupy kontrolnej (36,3 vs. 45,8 U/gHb; $p \leq 0,05$).

Porównanie wykazało, że oznaczenia stężeń TBARS we krwi istotnie statystycznie ($p \leq 0,001$) różniły się u chorych na AMD i u osób z grupy kontrolnej (0,119 vs. 0,286 $\mu\text{mol/gHb}$; $p \leq 0,001$).

Badane parametry/ Studied parameters	Grupa odniesienia/ Reference group $x \pm SD$ n = 25	Chorzy na AMD/ Patients with AMD $x \pm SD$ n = 25	Istotność statystyczna/ Statistical significance
SOD (U/gHb/100 ml)	2348,5 ± 564,6	2086,3 ± 125,3	$p \leq 0,05$
CAT (BU/gHb)	7,6 ± 1,2	6,9 ± 0,7	$p \leq 0,05$
GPx (U/gHb)	45,8 ± 10,7	36,3 ± 8,96	$p \leq 0,05$
TBARS ($\mu\text{mol/gHb}$)	0,119 ± 0,006	0,286 ± 0,08	$p \leq 0,001$

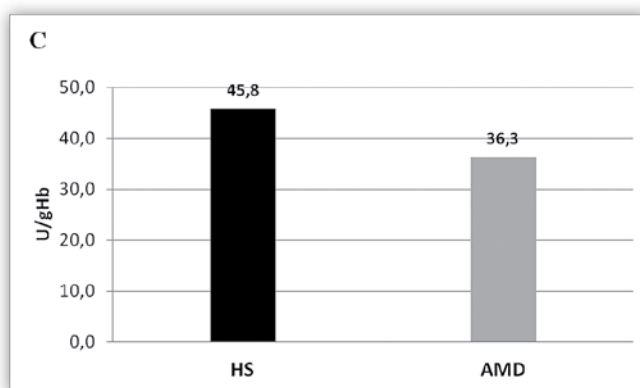
Tab. I. Poziom aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT), peroksydazy glutationowej (GPx) we krwi u chorych na AMD i u osób z grupy odniesienia.

Tab. I. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) activity levels in the blood of patients with AMD and a reference group.



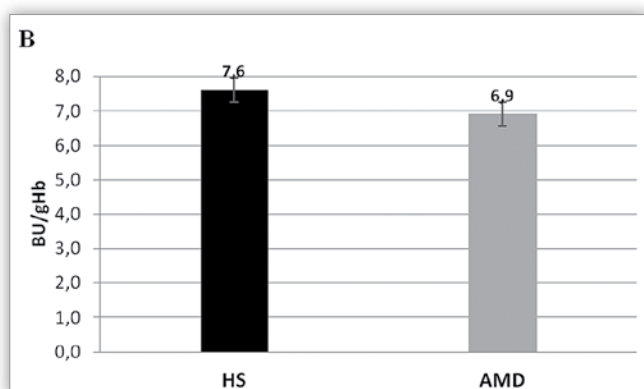
Ryc. 1. Poziom aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) we krwi u chorych na AMD i u osób zdrowych.

Fig. 1. Superoxide dismutase (SOD) activity in the blood of patients with AMD and healthy controls.



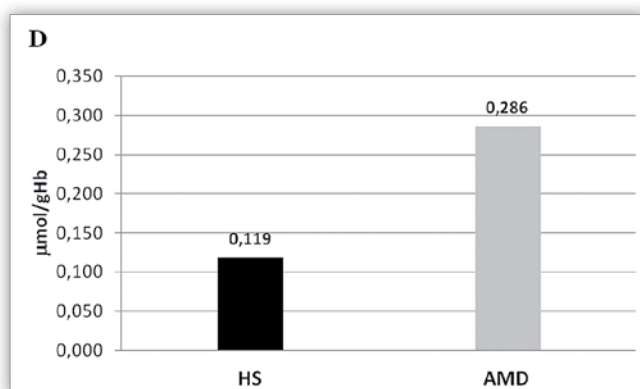
Ryc. 3. Poziom aktywności peroksydazy glutationowej (GPx) we krwi u chorych na AMD i u osób zdrowych.

Fig. 3. Glutathione peroxidase (GPx) activity in the blood of patients with AMD and healthy controls.



Ryc. 2. Poziom aktywności katalazy (CAT) we krwi u chorych na AMD i u osób zdrowych.

Fig. 2. Catalase (CAT) activity in the blood of patients with AMD and healthy controls.



Ryc. 4. Stężenie TBARS we krwi u chorych na AMD i u osób zdrowych.

Fig. 4. TBARS concentration in the blood of patients with AMD and healthy controls.

Omówienie

Procesy prooksydacyjne, przeważające nad antyoksydacyjnymi, przebiegające z udziałem wolnych rodników prowadzą do stresu oksydacyjnego i związanych z nim zaburzeń komórkowych. Mechanizm powstawania procesów wolnorodnikowych w obrębie zewnętrznych warstw siatkówki okolicy plamki oka jest wieloczynnikowy. Jednym z ważniejszych czynników jest wysokie ciśnienie parcjalne tlenu w naczyńniówce oraz naczyniach siatkówkowych, które przyczynia się do zwiększenia stężenia substratu dla reaktywnych form tlenu. Ponadto oko jest narażone na ciągłe działanie światła widzialnego, a szczególnie niebezpiecznego wysokoenergetycznego promieniowania krótkofalowego, które prowadzi do powstawania wielu form reaktywnych tlenu, m.in. anionorodnika nadtlenkowego, nadtlenku wodoru i bardzo toksycznego rodnika hydroksylowego (9).

Ocena stężenia TBARS w badanych hemolizatach krwi u chorych na AMD wykazała jego statystycznie istotne podwyższenie (140%) w porównaniu do wartości u osób z grupy kontrolnej.

Powstawanie nadtlenków lipidów w procesie peroksydacji jest nasilone w błonach komórkowych fotoreceptorów bogatych w wielonienasycone długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, a szczególnie kwasu dokozaheksaenowego (DHA). Ponadto siatkówka oka jest bogata w kwasy tłuszczowe takie jak palmitynowy, stearynowy, oleinowy i arachidonowy. Osłabiona obrona przed wolnymi rodnikami zwiększa podatność ww. kwasów tłuszczowych na proces peroksydacji (10). Stres oksydacyjny jest generowany również przez gromadzącą się wraz z wiekiem lipofuscyne, marker starzenia się komórki. Wydaje się, że istotną rolę w rozwoju AMD odgrywa karboksyetylopirol (CEP) – kolejny produkt utleniania DHA. Karboksyetylopirol w wyniku łączenia się z białkami modyfikuje je, prowadząc do powstania immunogennych adduktów, które pobudzają układ dopełniacza i nasilają reakcję zapalną w siatkówce oka, nabłonku barwnikowym siatkówki i błonie Brucha (11).

Autorzy prac poświęconych ocenie parametrów określających przebieg procesów prooksydacyjnych u chorych na AMD dowodzą przewagi reakcji prooksydacyjnych, uszkadzających struktury komórek oka, nad reakcjami antyoksydacyjnymi (12, 13). W dostępnej literaturze medycznej w pracach doświadczalnych *in vitro* (14–16) przedstawiono interesujące wyniki hamującego wpływu produktów peroksydacji lipidów, takich jak HNE (4-hydroksy2-nonenal) i MDA (dialdehydu malonowego), na aktywność proteazy lizosomalnej RPE. Autorzy tych prac wykazali, że zdolność degradacyjna lizosomów komórek RPE ulega inhibicji, a tym samym dochodzi do dysfunkcji autofagocytozy.

Procesy lipofuscynogenezy i druzogenezy nasilają zanik fotoreceptorów, proces zapalny oraz postępujące niedotlenienie komórek i w konsekwencji prowadzą do nadmiernej ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF), a to indukuje neowaskularyzację i postępujące zwyrodnienie plamki.

Antyoksydacyjny system ochronny przed reaktywnymi formami tlenu i azotu oraz procesami prooksydacyjnymi w komórkach siatkówki oka tworzą związki enzymatyczne i nieenzymatyczne. W komórkach RPE oraz fotoreceptorach wykazano obecność enzymów: dysmutazy nadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej, które usuwają wolne rodniki (10).

Dysmutaza ponadtlenkowa (CuZn-SOD; SOD-1) to cytoplazmatyczny enzym zależny od miedzi i cynku, katalizujący reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenku wodoru i tlenu. Katalaza zawiera hem i redukuje nadtlenek wodoru. Selenozależna peroksydaza glutationowa z udziałem glutationu katalizuje reakcję redukcji nadtlenków zarówno organicznych, jak i nieorganicznych.

Autorzy tej pracy w badaniach własnych zaobserwowali istotne statystycznie zmniejszenie aktywności enzymów SOD (11,2%), CAT (9,2%) i GPx (20,7%) u chorych na AMD w porównaniu z wartościami tych parametrów u osób zdrowych.

Zmniejszoną aktywność enzymów antyoksydacyjnych w erytrocytach u chorych na AMD w odniesieniu do ich aktywności u osób z grupy kontrolnej potwierdzają również wyniki innych badań opublikowane w literaturze medycznej.

Zafrilla i wsp. (17) wykazali przewagę reakcji prooksydacyjnych nad antyoksydacyjnymi u chorych na wysiękową postać AMD. Poprzez ocenę aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy i reduktazy glutationowej oraz całkowitej aktywności antyoksydacyjnej dowiedli oni, że u tych chorych bariera obronna przed wolnymi rodnikami jest osłabiona, a stężenie białkowych grup karbonylowych – markera stopnia oksydacji białek, zwiększone. Plestina-Borjan i wsp. (18) też opisali zachwianie równowagi proantyoksydacyjnej – w badaniach własnych oznaczali obniżenie aktywności erytrocytarnej SOD, CAT i GPx oraz obniżenie całkowitego poziomu statusu antyoksydacyjnego (Total Antioxidant Status – TAS) u chorych na AMD w porównaniu do odnośnych parametrów u osób z grupy kontrolnej. Interesujące wyniki badań porównujące aktywność SOD, stężenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (Total Antioxidant Capability – TAC) i witaminy C z poziomem MDA u Azjatów chorych na AMD przedstawili Shen i wsp. Autorzy wykazali istotnie podwyższoną aktywność dysmutazy ponadtlenkowej wobec nasilonego procesu peroksydacji (zwiększoną wartość markera MDA) oraz obniżony poziom TAC i zmniejszone stężenie witaminy C u chorych na AMD w odniesieniu do tych parametrów u osób zdrowych. Podobny rezultat oznaczeń parametrów równowagi pro-antyoksydacyjnej w populacji azjatyckiej wyrażony podwyższoną aktywnością SOD i nasilonymi reakcjami oksydacyjnymi kwasów tłuszczowych (marker MDA) otrzymał zespół badawczy Jia i wsp. (20). Wyniki badań prowadzonych przez Delacourta i wsp. 1999 (21) – POLA Study – natomiast nie wykazały zależności między aktywnością SOD we krwi a występowaniem AMD. Badacze z tego samego zespołu uzyskali wyniki wskazujące na mniejsze stężenie glutationu w erytrocytach u chorych na AMD wobec ujemnej korelacji między aktywnością GPx a występowaniem zaawansowanej postaci AMD.

Podsumowanie

Wyniki naszych badań dowodzą, że zdolność antyoksydacyjna układu enzymatycznego do obrony przed prawdopodobnie nasilonym procesem peroksydacji u chorych na AMD jest obniżona w porównaniu z tą zdolnością u zdrowych osób. Patogeneza AMD, pomimo licznych badań biochemicznych i klinicznych, wciąż pozostaje słabo poznana. Na podstawie dostępnych w piśmiennictwie wyników wielu przeprowadzonych do tej pory eksperymentów jednak przyjmuje się obecnie, że stres oksydacyjny jest jednym spośród wielu czynników biorących udział w patomechanizmie AMD.

Do potwierdzenia wyników oceny aktywności enzymatycznej SOD, CAT i GPx konieczne wydają się eksploracja na poziomie genetycznym i poszerzenie badań o obserwacje relacji między zmianami polimorficznymi w genach obrony antyoksydacyjnej a predyspozycją do rozwoju AMD, a także ocena poziomu uszkodzeń oksydacyjnych DNA oraz zdolności do ich naprawy.

Podziękowania

Praca finansowana ze środków Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr 503/5-108-05/503-51-001.

Piśmiennictwo:

1. Stankiewicz A: Zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (AMD) w Polsce. Raport Fundacji na rzecz Zdrowego Starzenia się pt. Okulistyka i choroby siatkówki w aspekcie zdrowego i aktywnego starzenia się. Fundacja na rzecz Zdrowego Starzenia się, Warszawa 2015; 25–28.
2. Horie-Inoue K, Inoue S: Genomic aspects of age-related macular degeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 452(2): 263–275 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.013.
3. Bian Q, Gao S, Zhou J, Qin J, Taylor A, Johnson EJ, et al.: Lutein and zeaxanthin supplementation reduces photooxidative damage and modulates the expression of inflammation-related genes in retinal pigment epithelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2012; 23: 1298–1307.
4. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC: Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical system. *Anal Biochem.* 1966; 16: 359–364.
5. Misra HP, Fridovich J: The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for the superoxide dismutases. *J Biol Chem.* 1972; 247: 3170–3175.
6. Beers RF, Sizer JW: A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 1952; 195: 133–140.
7. Little C, O'Brien PJ: An intracellular GSH-peroxidase with a lipid peroxidase substrate. *Biochem Biophys Res Commun.* 1968; 31: 145–150.
8. Van Kampen E, Zijlstra WG: Standardization of hemoglobinometry. II. The hemoglobincyanide method. *Clin Chim Acta.* 1961; 6: 538–544.
9. Funk RHW, Schumann U, Engelmann K, Becker KA, Roehlecke C: Blue light induced retinal oxidative stress: Implications for macular degeneration. *World J Ophthalmol.* 2014; 4(3): 29–34 doi: 10.5318/wjo.v4.i3.29
10. Khandhadia S, Lotery A: Oxidation and age-related macular degeneration: insights from molecular biology. *Expert Rev Mol Med.* 2010; 12:e34. doi: 10.1017/S146239941000164X.
11. Crabb JW, Miyagi M, Gu X, Shadrach K, West KA, Sakaguchi H, et al.: Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(23): 14682–14687.
12. Venza I, Visalli M, Cucinotta M, Teti D, Venza M: Association between oxidative stress and macromolecular damage in elderly patients with age-related macular degeneration. *Aging Clin Exp Res.* 2012; 24(1): 21–27 doi: 10.3275/7659.
13. Ates O, Azizi S, Alp HH, Kiziltunc A, Beydemir S, Cinici E, et al.: Decreased serum paraoxonase 1 activity and increased serum homocysteine and malondialdehyde levels in age-related macular degeneration. *Tohoku J Exp Med.* 2009; 217(1): 17–22.
14. Krohne TU, Kaemmerer E, Holz FG, Kopitz J: Lipid peroxidation products reduce lysosomal protease activities in human retinal pigment epithelial cells via two different mechanisms of action. *Exp Eye Res.* 2010; 90: 261–266 doi: 10.1016/j.exer.2009.10.014.
15. Krohne TU, Stratmann NK, Kopitz J, Holz FG: Effects of lipid peroxidation products on lipofuscinogenesis and autophagy in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2010; 90(3): 465–471 doi: 10.1016/j.exer.2009.12.011.
16. Ye F, Kaneko H, Hayashi Y, Takayama K, Hwang SJ, Nishizawa Y, et al.: Malondialdehyde induces autophagy dysfunction and VEGF secretion in the retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Free Radic Biol Med.* 2016; 94:121–134 doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.027.
17. Zafrilla P, Losada M, Perez M, Caravaca G, Mulero J: Biomarkers of oxidative stress in patients with wet age related macular degeneration. *J Nutr Health Aging.* 2013; 17: 219–222.
18. Plestina-Borjan I, Katicic D, Medvidovic-Grubisic M, Supic-Domic D, Bucan K, Tandara L, et al.: Association of age-related macular degeneration with erythrocyte antioxidant enzymes activity and serum total antioxidant status. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015: 804054–804061 doi: 10.1155/2015/804054.
19. Shen XL, Jia JH, Zhao P, Fan R, Pan XY, Yang HM, et al.: Changes in blood oxidative and antioxidant parameters in a group of Chinese patients with age-related macular degeneration. *J Nutr Health Aging.* 2012; 16: 201–204.
20. 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. *Anging Clin Exp Res.* 2011; 23: 264–267.
21. Delcourt C, Cristol JP, Léger CL, Descomps B, Papoz L: Associations of antioxidant enzymes with cataract and age-related macular degeneration. *The POLA Study. Pathologies Oculaires Liées à l'Age.* *Ophthalmology.* 1999; 106(2): 215–222.

Praca wpłynęła do Redakcji 17.05.2016 r. (KO-00075-2016)
Zakwalifikowano do druku 30.12.2016 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
dr n. med. Małgorzata Mrowicka
Zakład Chemii i Biochemii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Pl. Hallera 1, 90-647 Łódź
e-mail: malgorzata.mrowicka@umed.lodz.pl