

(03)

Wzrost ekspresji endoteliny-1 – nowy marker wczesnej diagnostyki AMD?

Increased expression of endothelin-1 – a novel diagnostic marker for early AMD detection?

Anna Machalińska^{1,2}, Katarzyna Mozolewska-Piotrowska², Edyta Paczkowska³, Wojciech Lubiński²

¹ Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Barbara Wiszniewska

² Klinika Okulistyki Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

Kierownik: dr hab. n. med. Wojciech Lubiński, prof. PUM, FEBO

³ Zakład Patologii Ogólnej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Bogusław Machaliński

Abstrakt:

Cel: ustalenie potencjalnej roli zaburzeń funkcji śródbłonka naczyniowego oraz ocena osoczonego stężenia i wewnątrzkomórkowej ekspresji ET-1 u chorych na zwyrodnienie plamki związane z wiekiem. Niedokrwienie nabłonka barwnikowego i siatkówki neurosensorycznej może być istotnym elementem w patogenezie zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem. Wydzielana przez komórki śródbłonka naczyń krwionośnych endotelina-1 (ET-1) należy do białek wykazujących wybitnie silne działanie naczyniokurczące.

Materiał i metody: badaniem objęto chorych na zwyrodnienie plamki związane z wiekiem – 31 chorych na postać suchą oraz 46 chorych na postać wysiękową. Grupę kontrolną stanowiło 46 zdrowych ochotników w tym samym przedziale wiekowym, u których nie stwierdzono zmian na dnie oka. Stężenie ET-1 we krwi obwodowej oznaczano metodą ELISA. Dodatkowo dokonano ilościowej oceny ekspresji ET-1 na poziomie mRNA w krążących komórkach krwi obwodowej metodą qRT-PCR.

Wyniki: u chorych na zwyrodnienie plamki związane z wiekiem – zarówno na postać suchą, jak i wysiękową – stwierdzono istotnie wyższy poziom ekspresji ET-1 niż u pacjentów z grupy kontrolnej. Szczegółowa analiza wewnątrzkomórkowej ekspresji ET-1 z wykorzystaniem technik immunofluorescencyjnych dowodzi, że białko to syntetyzowane jest głównie w komórkach śródbłonka naczyniowego.

Wnioski: w warunkach uszkodzenia komórki śródbłonka wydzielają czynniki o działaniu naczyniokurczącym, w tym ET-1. W konsekwencji może to prowadzić do zachwiania równowagi wewnątrznaczyniowej i skutkować przewlekłym skurczem naczyń. Powyższe wymienione zaburzenia mogą w dalszej kolejności prowadzić do miejscowego niedokrwienia siatkówki i rozwoju zmian degeneracyjnych na dnie oka.

Słowa kluczowe:

zwyrodnienie plamki związane z wiekiem, endotelina-1, komórki śródbłonka.

Abstract:

Aim: The relationship between ischemic vascular disease and age-related macular degeneration may indicate the role of vascular injury as the primary insult causing functional deficits in age-related macular degeneration. The vasoactive factors produced by endothelial cells include endothelin-1 (ET-1), which is one of the most potent vasoconstricting peptides. In this study we sought to explore the potential role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of age-related macular degeneration by measuring the concentration of ET-1 in peripheral blood of individuals diagnosed with age-related macular degeneration and evaluating its intracellular expression in peripheral blood cells, on mRNA level.

Material and methods: Peripheral blood samples from 31 patients with diagnosed dry age-related macular degeneration and 46 patients with neovascular age-related macular degeneration were collected. Forty six age- and sex-matched volunteers without age-related macular degeneration were enrolled as a control group. ET-1 plasma levels were analyzed by ELISA and intracellular expression of ET-1 in peripheral blood cells was studied by using qRT-PCR.

Results: The expression of intracellular ET-1 was significantly elevated in peripheral blood cells of both dry and wet age-related macular degeneration patients compared with the control subjects. Immunofluorescence staining revealed that ET-1 was specifically expressed in the circulating endothelial cells.

Conclusions: We assume that damaged endothelial cells may release a variety of vasoconstricting molecules, including ET-1, leading to derangement between the endothelium-derived relaxing and contracting factors. Local retinal ischemia consequently develops which may promote the development of retinal degeneration in patients with age-related macular degeneration.

Key words:

age-related macular degeneration, endothelin-1, endothelial cells.

Zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (age-related macular degeneration – AMD) jest jedną z najczęstszych przyczyn nieodwracalnego pogorszenia widzenia centralnego u osób po 50.

roku życia (1). Patogeneza AMD, pomimo istnienia wielu różnych hipotez, nie została do tej pory jednoznacznie określona. W licznych opublikowanych dotychczas doniesieniach wskazuje się,

że niedokrwienie nabłonka barwnikowego i siatkówki neurosensorycznej może być istotnym elementem przyczynowym rozwoju tego schorzenia. Niedostateczna podaż substancji odżywczych oraz akumulacja produktów przemiany materii mogą skutkować powstaniem wielu nieprawidłowości, które prowadzą do rozwoju patologicznych zmian na dnie oka.

Istotnym wykładnikiem naruszenia równowagi w obrębie układu krążenia jest uszkodzenie komórek śródbłonka naczyniowego. Przewlekła dysfunkcja śródbłonka przekłada się na zaburzenie homeostazy wewnątrznaczyniowej i jest wykładnikiem ciężkiej choroby naczyniowej w wymiarze ogólnoustrojowym.

Syntetyzowana przez komórki śródbłonka naczyń krwionośnych endotelina-1 (ET-1) należy do białek wykazujących wybitnie silne działanie naczyniokurczące. Czynnikiem ten odpowiada za utrzymanie prawidłowego napięcia ściany naczyń, a także reguluje procesy lokalnej proliferacji wewnątrznaczyniowej (2). Podwyższone stężenie ET-1 we krwi obserwowano u wielu chorych na schorzenia o podłożu naczyniowym, m.in. takie jak nadciśnienie tętnicze, niewydolność serca, choroba niedokrwienności serca, cukrzyca i choroba naczyń obwodowych (3). Szczególną uwagę zwraca to, że u chorych na AMD z reguły stwierdza się objawy niedokrwienne w obrębie innych narządów. W zakrojonych na szeroką skalę prospektywnych badaniach wykazano, że zmiany na dnie oka zarówno wczesne, jak i zaawansowane są istotnym, niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia udaru mózgu (4). Podobny związek wykazano w odniesieniu do zawału mięśnia sercowego (5). Stwierdzono także zależność odwrotną. U pacjentów cierpiących na chorobę niedokrwienności serca, po przebytych zawałach serca czy udarach mózgu, ryzyko rozwoju druz okazało się istotnie większe (6). Obserwacje epidemiologiczne wskazują zatem pośrednio na istnienie silnych wzajemnych powiązań w patofizjologii rozwoju AMD i schorzeń pochodzenia naczyniowego. W procesach tych istotną rolę może odgrywać endotelina-1.

Szczególną uwagę zwraca to, że wzrost stężenia ET-1 w osoczu może towarzyszyć również powszechnie występującym schorzeniom okulistycznym takim jak jaskra czy retinopatia cukrzycowa (7, 8). Dokładne zdefiniowanie roli ET-1 w rozwoju AMD zatem może przyczynić się do wyjaśnienia wielu elementów składających się na patogenezę choroby.

Material i metody

Badaniem objęto 77 pacjentów z rozpoznaniem zwyrodnieniem plamki związanym z wiekiem, których diagnozowano i leczono w Poradni Laserowej Kliniki Okulistyki Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Do badania zakwalifikowano pacjentów w wieku od 60 do 80 lat. U każdego pacjenta przeprowadzono szczegółowe badanie okulistyczne obejmujące ocenę ostrości wzroku, pomiar ciśnienia śródgałkowego, ocenę przedniego odcinka gałki ocznej z uwzględnieniem przezierności rogówki i soczewki oraz ocenę dna oka za pomocą trójlustra Goldmanna po uprzednim rozszerzeniu źrenicy 1% tropikamidem. Z badanej grupy chorych na AMD wyodrębniono 31 chorych na postać suchą oraz 46 chorych na postać wysiękową. Zarówno postać schorzenia, jak i stopień jego zaawansowania oceniano na podstawie badania angiografii fluoresceinowej (fluorescein angiography – FA) i optycznej koherentnej tomografii (optical coherence tomography – OCT). Czynna neowaskularyzacja naczyniówkowa lub odwarstwienie nabłonka

barwnikowego przynajmniej w jednym oku sygnalizowały postać wysiękową AMD. O zaawansowaniu postaci wysiękowej choroby świadczyła rozległość zmian wg oceny w badaniu FA. Zaawansowaną postać choroby rozpoznawano wówczas, kiedy wielkość zmian (przylegających krwotoków, obrzęku oraz zmian bliznowatych w jednym z oczu) przekraczała 3 średnice tarczy nerwu wzrokowego (n. II). W przypadku postaci suchej AMD za zmiany początkowe uznano pojedyncze, drobne druzy oraz odgraniczone, niepoddołkowe zaniki nabłonka barwnikowego siatkówki (retinal pigment epithelium – RPE) i siatkówki, a także towarzyszące im przegrupowania barwnika w plamce. Zlewne druzy lub rozległy zanik geograficzny, który obejmował dołek, świadczyły o zaawansowanej postaci choroby.

Od pacjentów zbierano dokładny wywiad pod kątem palenia papierosów, współwystępujących chorób nadciśnieniowej, niedokrwiennej serca bądź naczyń mózgowych. W wybranych przypadkach wykonywano badanie ultrasonograficzne (USG Doppler) tętnic szyjnych. Z badania wyłączono chorych na jaskrę oraz inne choroby siatkówki i n. II (przebyte lub istniejące), a także pacjentów operowanych z powodu zaćmy lub poddanych innym zabiegom chirurgicznym w obrębie gałki ocznej w okresie 3 miesięcy poprzedzających badanie. Za kryteria wykluczające z badania uznano ponadto chorobę nowotworową, a także przewlekłe choroby zapalne i ogólnoustrojowe takie jak cukrzyca, schorzenia wątroby czy nerek. Grupa kontrolna składała się z 46 zdrowych ochotników w tym samym przedziale wiekowym, u których nie wykryto zmian na dnie oka. Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej.

Krew żylną (~7,5 ml) pobierano do próbek zawierających antykoagulant (EDTA). Krew wirowano (2000 rpm, 4°C, 10 min), po czym komórki jądrzaste krwi obwodowej izolowano ze świeżo pobranych próbek krwi, usuwając erytrocyty w obecności buforu hipotonicznego (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Stężenie endoteliny-1 w osoczu oznaczano metodą ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) za pomocą komercyjnie dostępnego testu (Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Wien). Dodatkowo ekspresję endoteliny-1 na poziomie mRNA, w komórkach krwi obwodowej, oznaczano metodą qRT-PCR, czyli zgodnie z reakcją odwrotnej transkrypcji połączoną z łańcuchową reakcją polimerazy z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym. W celu potwierdzenia, że ET-1 ulega ekspresji w komórkach śródbłonka naczyniowego, komórki krwi sortowano przyzyciowo za pomocą wieloparametrycznego sortera komórkowego FACS Aria IIu (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), izolując populację komórek CD144+ oraz CD144-, inkubowano z przeciwciałem skierowanym przeciwko ET-1, a następnie rejestrowano obrazy fluorescencyjne za pomocą systemu BD Pathway 855, pracującego w trybie konfokalnym (BD Biosciences, Rockville, MD, USA).

W analizie statystycznej do oceny różnic wielkości mierzonych parametrów między trzema badanymi grupami zastosowano test ANOVA Kruskala-Wallis dla porównania trzech grup i następnie test U Manna-Whitney'a. Z uwagi na odbiegające od normy rozkłady badanych parametrów przedstawiono ich mediany, kwartyle oraz wartości minimalne i maksymalne. Różnice w wartościach zmiennych nominalnych między grupami analizowano testem χ^2 oraz dokładnym dwustronnym testem Fishera. Siłę korelacji zmiennych oceniano za pomocą

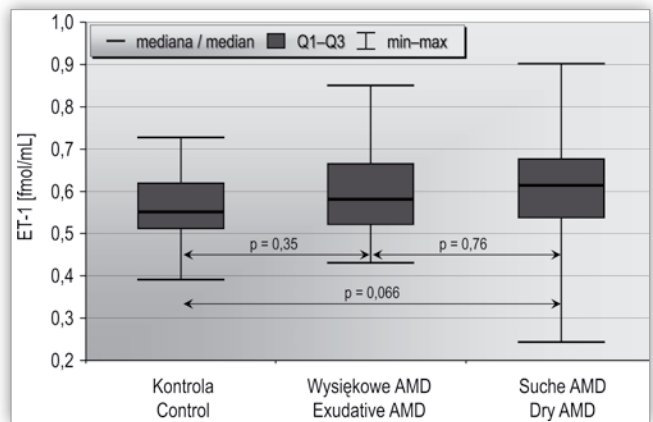
współczynnika korelacji rang Spearmana (Rs). Jako próg istotności statystycznej przyjęto $p \leq 0,05$.

Wyniki

Charakterystykę kliniczną pacjentów z badanych grup zestawiono w tabeli I. Grupy nie różniły się istotnie między sobą w zakresie rozkładu płci i wieku. W badanych populacjach nie odnotowano również znamiennych różnic w zakresie występowania nadciśnienia, choroby niedokrwiennej serca czy naczyń mózgowych. Zaobserwowano, że chorzy na AMD, zarówno na postać suchą, jak i wysiękową, w przeszłości istotnie częściej palili papierosy w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej ($p = 0,03$). Asocjacja ta nie odnosiła się jednak do częstości palenia obecnie ($p = 0,12$). U chorych na wysiękową postać schorzenia rozległość chorobowych zmian obserwowanych na dnie oka, jak i ich obustronne występowanie korelowały z wiekiem. Pacjenci manifestujący zarówno obustronną neowaskularyzację naczyńwłokową (choroidal neovascularization – CNV), jak i bardziej rozległe zmiany w przebiegu AMD byli zatem starsi od pacjentów, u których zmiany były jednostronne (mediana: 78 vs 71 lat, $p = 0,01$), a stadia kliniczne AMD mniej zaawansowane (mediana: 76 vs 69 lat, $p = 0,01$).

Na rycinie 1. przedstawiono stężenia ET-1 w osoczu u pacjentów z poszczególnych grup. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w stężeniu tego białka u pacjentów z badanych grup, chociaż w osoczu u chorych na suchą postać AMD obserwowano większe stężenia ET-1 (mediana: 0,614) niż u pacjentów z grupy kontrolnej (mediana: 0,55). Różnica ta utrzymywała się na granicy istotności statystycznej ($p = 0,06$).

Na kolejnym etapie badań dokonano ilościowej oceny ekspresji ET-1 na poziomie mRNA w krążących jądrzastych komórkach krwi



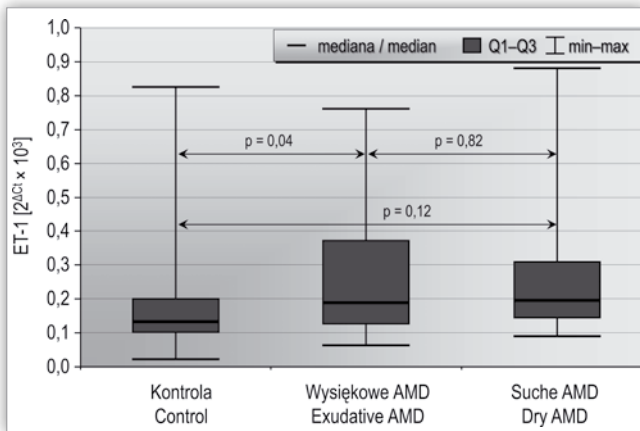
Ryc. 1. Stężenie endoteliny-1 w osoczu pacjentów z badanych grup. Wartości wyrażono w fmol/ml. Q1-Q3 – kwartyle górny i dolny.
Fig. 1. The plasma concentration of endothelin-1 in all study groups. The values are expressed in fmol/ml. Q1-Q3 – upper and lower quartiles.

obwodowej, metodą qRT-PCR. Wyniki oznaczeń przedstawiono na rycinie 2. U chorych na wysiękową postać AMD stwierdzono istotnie wyższy poziom ekspresji badanego genu niż u pacjentów z grupy kontrolnej (mediana odpowiednio: 0,189 i 0,134, $p = 0,04$). Podobną zależność wykazano w odniesieniu do chorych na suchą postać schorzenia. U chorych na suchą postać AMD obserwowano znamienne większą ekspresję badanego genu niż u zdrowych ochotników w tym samym przedziale wiekowym (mediana: 0,195, $p = 0,01$). We wszystkich badanych grupach stwierdzono również większą wewnątrzkomórkową ekspresję ET-1 w komórkach krwi obwodowej u osób palących papierosy aktualnie lub w przeszłości. Obserwowany wzrost ekspresji badanego genu u osób palących w przeszłości okazał się istotny statystycznie w grupie kontrolnej

	AMD postać wysiękowa/ Exudative AMD	AMD postać sucha/ Dry AMD	Grupa kontrolna/ Control group	p*
Liczebność/ Number of subjects	46	31	46	
Płeć (mężczyźni/kobiety)/ Sex (male/female)	23 / 23	15 / 16	13 / 33	0,07
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	
Wiek pacjenta (lata)/ Patient's age (years)	71,98 ± 8,76	69,06 ± 8,5	72,7 ± 8,29	0,19
	%	%	%	
Obustronna CNV/ Bilateral CNV	30			
Zmiany zaawansowane/ Advanced stages	54	58		0,82
Palenie tytoniu/ Smoking status:				
– aktualnie/ current	11	19	4,5	0,13
– w przeszłości/ past	62	68	39	0,03
Nadciśnienie tętnicze/ Hypertension	51	61	64	0,41
Choroba niedokrwienna serca w wywiadzie/ History of ischemic heart disease	16	35	33	0,11
Udar mózgu w wywiadzie/ History of stroke	2	6	4	0,7

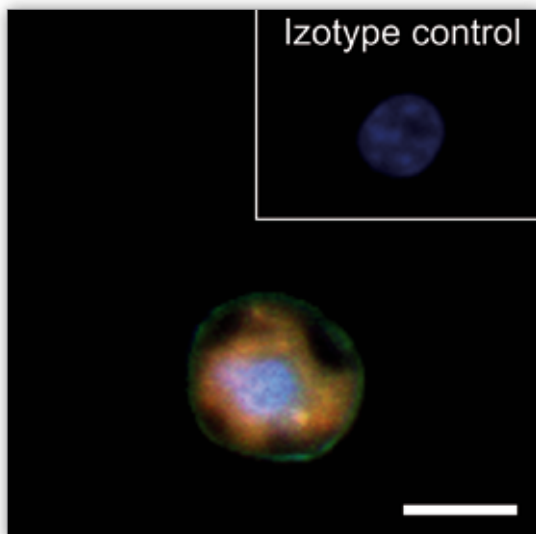
* test χ^2 dla zmiennych nominalnych i ANOVA Kruskala-Wallis dla zmiennych mierzalnych/ test χ^2 for qualitative variables and Kruskal-Wallis ANOVA for quantitative variables were used.

Tab. I. Charakterystyka kliniczna pacjentów z poszczególnych grup.
Tab. I. Clinical characteristics of the study groups.



Ryc. 2. Ekspresja ET-1 na poziomie mRNA w komórkach krwi obwodowej u pacjentów z poszczególnych grup. Względna wartość ekspresji mRNA normalizowana była w odniesieniu do wewnętrznej kontroli – genu $\beta 2$ -mikroglobuliny. Relatywną wartość ekspresji dla danego genu wyrażano w jednostkach względnych jako $2^{\Delta Ct}$, gdzie $\Delta Ct = Ct$ endogennej kontroli (genu $\beta 2$ -mikroglobuliny) – Ct analizowanego genu. Q_1 - Q_3 – kwartyle górny i dolny.

Fig. 2. Expression of ET-1 mRNAs in isolated PBNCs collected from patients enrolled in the study. The amount of transcript is expressed in arbitrary units relative to the control gene $\beta 2$ -microglobulin ($2^{\Delta Ct}$, where Ct represents the difference in threshold cycle between the control and target gene). Q_1 - Q_3 – upper and lower quartiles.



Ryc. 3. Wizualizacja komórek śródbłonkowych pochodzących z krwi obwodowej. Obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawia zewnątrzkomórkową ekspresję antygenu powierzchniowego swoistego dla komórek śródbłonka – CD 144 – i ekspresję ET-1 w cytoplazmie ww. komórek. Kontrola izotypowa pokazuje brak nieswoistego wiązania przeciwciał. Jądra komórkowe uwidoczniono za pomocą barwnika 7-AAD. Każdemu antygenowi na fotografii nadano odpowiedni kolor umowny: czerwony dla ET-1, zielony dla CD144, niebieski dla jąder komórkowych. Skala = $10 \mu m$.

Fig. 3. Immunocytofluorescence of peripheral blood-derived endothelial cells. Confocal image depicts the expression of CD144 (extracellular) and ET-1 (intracellular) antigens in the endothelial cells. Nuclei are visualized with 7-AAD staining. The isotype control confirms that no unspecific binding of antibodies occurs. A pseudocolor is assigned to each staining as follows: anti-ET-1 – red, anti-CD144 – green, nuclei – blue. The scale bar shows $10 \mu m$. Representative data is shown.

(mediana: 0,23 w odniesieniu do palaczy vs 0,10 w odniesieniu do pacjentów niepalących; $p = 0,011$), u aktualnych palaczy natomiast zbliżył się do wartości znamiennej statystycznie u chorych na wysiękową postać AMD (mediana: 0,37 w odniesieniu do palaczy vs 0,17 w odniesieniu do pacjentów niepalących, $p = 0,08$).

W celu wykazania, że ET-1 syntetyzowana jest przede wszystkim w komórkach śródbłonka naczyń, na kolejnym etapie badań za pomocą mikroskopu konfokalnego dokonano wizualizacji białka ET-1 w obrębie krążących komórek śródbłonka. Komórki krwi obwodowej uzyskane od pacjentów rozdzielono zatem na podstawie obecności charakterystycznego markera śródbłonkowego CD144 (ve-cadherin) na dwie subpopulacje: CD144+ i CD144-. Na rycinie 3. przedstawiono reprezentatywne wyniki analizy mikroskopowej wysortowanych komórek. Zgodnie z przewidywaniami frakcja CD144 pozytywna, obejmująca komórki śródbłonka, w przeciwieństwie do populacji komórek CD144 negatywnych, wykazywała silną wewnątrzkomórkową ekspresję ET-1. Dodatkowo oceniono morfologię wyizolowanych komórek śródbłonka, a także poddano je analizie morfometrycznej w celu określenia ich wielkości. Średnia wielkość tych komórek wynosiła $11,9 \mu m$ ($SD \pm 2,1 \mu m$), nie odbiega to od wartości uzyskanych przez innych badaczy.

Omówienie

Komórki śródbłonka naczyniowego stanowią nie tylko barierę oddzielającą światło naczynia od mikrośrodowiska tkankowego, lecz także ważny organ wydzielniczy, który uwalnia wiele cytokin i czynników wzrostu.

Endotelina-1, białko o działaniu wybitnie naczyniokurczącym, jest jednym z najważniejszych czynników wydzielanych przez komórki śródbłonka naczyniowego (3). W badaniach wykazano wzrost wewnątrzkomórkowej ekspresji ET w komórkach krwi obwodowej u kilkudziesięciu chorych zarówno na wysiękową, jak i suchą postać AMD. Szczegółowa analiza wewnątrzkomórkowej syntezy ET-1 z wykorzystaniem technik immunofluorescencyjnych dowodzi, że białko to syntetyzowane jest głównie w komórkach śródbłonka naczyniowego. Komórki śródbłonkowe obecne we krwi stanowią populację komórek złuszczonej i oddzielonej od warstwy śródbłonka w następstwie uszkodzenia ściany naczynia. Ich obecność we krwi obwodowej może być zatem wyznacznikiem zaburzeń funkcji śródbłonka i pośrednio może świadczyć o skali uszkodzenia tkankowego (9). Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować zatem, że w warunkach uszkodzenia komórki śródbłonka wydzielają czynniki o działaniu prozapalnym i naczyniokurczącym, w tym ET-1, w konsekwencji może to prowadzić do zachwiania równowagi wewnątrznaczyniowej i skutkować przewlekłym skurczem naczynia. Powyżej wymienione zaburzenia mogą w dalszej kolejności prowadzić do miejscowego niedokrwienia siatkówki i rozwoju zmian degeneracyjnych na dnie oka.

W świetle ostatnich doniesień mechanizm działania ET-1 nie ogranicza się do stymulacji skurczu naczyń tętniczych, lecz obejmuje również regulację ich wzrostu (10). Dowiedziono, że ET-1 jest ważnym elementem indukującym proliferację komórek przydanki naczyniowej (11). W tym kontekście szczególną uwagę zwraca fakt, że receptory dla ET-1 są obecne w wielu strukturach siatkówki, m.in. w nabłonku barwnikowym, w warstwie spłotwatej zewnętrznej, w komórkach zwojowych, astrocytach oraz komórkach śródbłonka (12). W warunkach wywołanej światłem

laserowym jatrogennej degeneracji siatkówki liczba ww. receptorów ulega istotnemu zwiększeniu w obrębie astrocytów (13). Zjawisko to może pośrednio sugerować, że ET-1 pełni ważną rolę w regulacji odczynowej proliferacji komórek glejowych w sytuacji ostrego uszkodzenia siatkówki oka. Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje, nie można wykluczyć, że ET-1 uwalniana w ogniskach naruszenia ściany naczyniowej przyczynia się w konsekwencji do rozwoju CNV i progresji tworzącej się blizny włóknistej. Choć z oczywistych przyczyn nie można dokonać przyżyciowej oceny wydzielania ET-1 w uszkodzonej siatkówce, istnieją jednak logiczne przesłanki sugerujące, że wzrost poziomu ET-1 w komórkach śródbłonna naczyniowego u chorych na AMD może przekładać się na jej wzmożoną lokalną syntezę w kapilarach siatkówki i naczyńki. Hipotezę tę potwierdzają doniesienia, w których wykazano wzrost miejscowego stężenia ET-1 w ciele szklistym u chorych na retinopatię cukrzycową i witreoretinopatię proliferacyjną (14, 15). Obserwowany ponadto w badaniach własnych wzrost ekspresji ET-1 u osób palących znajduje potwierdzenie w wynikach innych badaczy (16). Przewlekła ekspozycja na nikotynę oraz zawarte w dymie tytoniowym egzotoksyny mogą skutkować skurczem naczyń i prowadzić do jego uszkodzenia.

Warto podkreślić, że zmianom w ekspresji ET-1 w komórkach śródbłonna nie towarzyszyły znamienne statystycznie zmiany stężenia ET-1 w osoczu oceniane metodą ELISA, a wzrost poziomu ET-1 w osoczu u chorych na suchą postać AMD pozostawał na granicy istotności statystycznej. Wynik taki przemawia za tym, że ET-1 uwalniana jest miejscowo przez komórki śródbłonna, a lokalne zaburzenia w jej wydzielaniu nie znajdują przełożenia w systemowych wahaniach stężenia ET-1 we krwi obwodowej. Racjonalnym wytłumaczeniem tego zjawiska wydaje się niezwykle krótki okres półtrwania ET-1 we krwi, stąd stężenie ET-1 w osoczu nie jest wykładnikiem wymiernej oceny jej nadmiernej produkcji (9).

Podsumowując, podwyższony poziom ET-1 w komórkach śródbłonna naczyniowego przemawia za istnieniem poważnych zaburzeń hemodynamicznych w przebiegu choroby, które ściśle powiązane są z uszkodzeniem ścian naczyń krwionośnych i następczą miejscową odpowiedzią tkankową. Całokształt opisanych zjawisk wskazuje, że pierwotne zaburzenia naczyniowe mogą być istotnym elementem w patogenezie AMD. Uszkodzenie śródbłonna naczyniowego wraz z następczym uwolnieniem endoteliny-1 odgrywają kluczową rolę w regulacji napięcia naczyń tętniczych w tkankach i mogą wpływać na uruchomienie kaskady patofizjologicznych zdarzeń odpowiedzialnych za lokalne zaburzenia homeostazy naczyniowej. Istnieją zatem podstawy, żeby rozwój AMD traktować jako lokalną manifestację układowej niedomogi pochodzenia naczyniowo-śródbłonkowego. Można również mieć nadzieję, że przedstawione w tej pracy wyniki badań przyczynią się do pełnego poznania patogenyzy AMD oraz wyznaczenia nowych strategii prewencji i leczenia.

Piśmiennictwo:

1. Buch H, Vinding T, La Cour M, Appleyard M, Jensen GB, Nielsen NV: *Prevalence and causes of visual impairment and blindness among 9980 Scandinavian adults: The Copenhagen City Eye Study*. Ophthalmology. 2004; 111: 53–61.
2. Shah R: *Endothelins in health and disease*. Eur J Intern Med. 2007; 18: 272–282.

3. Thorin E, Webb DJ: *Endothelium-derived endothelin-1*. Pflugers Arch. 2010; 459: 951–958.
4. Wong TY, Klein R, Sun C, Mitchell P, Couper DJ, Lai H, et al.: *Atherosclerosis Risk in Communities Study. Age-related macular degeneration and risk for stroke*. Ann Intern Med. 2006; 18: 98–106.
5. Duan Y, Mo J, Klein R, Scott IU, Lin HM, Caulfield J, et al.: *Age-related macular degeneration is associated with incident myocardial infarction among elderly Americans*. Ophthalmology. 2007; 114: 732–737.
6. Tan JS, Mitchell P, Smith W, Wang JJ: *Cardiovascular risk factors and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study*. Ophthalmology. 2007; 114: 1143–1150.
7. Emre M, Orgül S, Haufschild T, Shaw SG, Flammer J: *Increased plasma endothelin-1 levels in patients with progressive open angle glaucoma*. Br J Ophthalmol. 2005; 89: 60–63.
8. Zhu H, Shi CH: *Analysis of the diagnostic value of plasma endothelin for diabetic retinopathy using the receiver operating characteristic curve*. Ophthalmic Res. 2007; 39: 289–293.
9. Machalinska A, Safranow K, Dziedzicko V, Mozolewska-Piotrowska K, Paczkowska E, Klos P, et al.: *Different populations of circulating endothelial cells in patients with the exudative form of age-related macular degeneration: A novel insight into pathogenesis*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011; 52: 93–100.
10. Pang IH, Yorio T: *Ocular actions of endothelins*. Proc Soc Exp Biol Med. 1997; 215: 21–34.
11. Yamagishi S, Hsu CC, Kobayashi K, Yamamoto H: *Endothelin 1 mediates endothelial cell-dependent proliferation of vascular pericytes*. Biochem Biophys Res Commun. 1993; 191: 840–846.
12. Torbidoni V, Iribarne M, Ogawa L, Prasanna G, Suburo AM: *Endothelin-1 and endothelin receptors in light-induced retinal degeneration*. Exp Eye Res. 2005; 81: 265–275.
13. Torbidoni V, Iribarne M, Suburo AM: *Endothelin receptors in light-induced retinal degeneration*. Exp Biol Med. 2006; 231: 1095–1100.
14. Adamiec-Mroczek J, Oficjalska-Młyńczak J, Misiuk-Hojto M: *Roles of endothelin-1 and selected proinflammatory cytokines in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy: Analysis of vitreous samples*. Cytokine. 2010; 49: 269–274.
15. Roldán-Pallarés M, Rollín R, Mediero A, Martínez-Montero JC, Fernández-Cruz A, Bravo-Llata C, et al.: *Immunoreactive ET-1 in the vitreous humor and epiretinal membranes of patients with proliferative vitreoretinopathy*. Mol Vis. 2005; 11: 461–471.
16. Rodella LF, Favero G, Rossini C, Foglio E, Reiter RJ, Rezzani R: *Endothelin-1 as a potential marker of melatonin's therapeutic effects in smoking-induced vasculopathy*. Life Sci. 2010; 23: 558–564.

Praca wpłynęła do Redakcji 19.03.2013 r. (1454)
Zakwalifikowano do druku 24.01.2014 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
dr hab. n. med. Anna Machalińska
Klinika Okulistyki SPSK-2
al. Powstańców Wilk. 72
70-111 Szczecin
e-mail: annam@pum.edu.pl