

Received: 04.09.2019
Accepted: 05.03.2020
Published: 26.06.2020

Autofagia – nowe spojrzenie na etiopatogenezę i możliwości leczenia zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem*

Autophagy: A new insight into pathogenesis and treatment possibilities in age-related macular degeneration

Agnieszka Kubicka-Trzaska, Izabella Karska-Basta, Katarzyna Żuber-Łaskawiec

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Lekarski, Katedra Okulistyki, Klinika Okulistyki i Onkologii Okulistycznej Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie

Streszczenie

Zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (AMD – age-related macular degeneration) to obecnie istotny problem zdrowotny, bowiem w krajach rozwiniętych jest jedną z najczęstszych przyczyn utraty widzenia centralnego u osób powyżej 50. roku życia. Patogeneza AMD jest wieloczynnikowa i niedokładnie poznana. Wśród czynników odpowiedzialnych za rozwój choroby wymienia się, poza naturalnym procesem starzenia się siatkówki, nasilony stres oksydacyjny, nadmierną aktywację dopełniacza, tłące się przewlekłe zapalenie w przestrzeni podsiatkówkowej, uwarunkowania genetyczne i środowiskowe. W ostatnim czasie zwrócono uwagę na zaburzenia procesów autofagii jako wiodącej przyczyny rozwoju AMD. Autofagia jest mechanizmem komórkowym, polegającym na eliminowaniu zużytych lub uszkodzonych fragmentów i składników komórki, pozwalającym osiągnąć komórce dynamiczną równowagę między syntezą a rozkładem jej komponentów, umożliwiając zatem przeżycie komórki w warunkach stresowych. Zaburzenia tych mechanizmów w postaci ich nadmiernej aktywacji lub inhibicji prowadzą do rozwoju wielu patologii. Autofagia pełni zatem podwójną rolę, jest odpowiedzialna zarówno za ochronę, jak i za śmierć komórki.

W pracy przybliżono mechanizmy autofagii oraz jej znaczenie w fizjologicznym procesie starzenia się komórek siatkówki oraz omówiono istotny wpływ jej zaburzeń na rozwój zmian zwyrodnieniowych w plamce jakim jest AMD. Przedstawiono także potencjalny wpływ leczenia dośzklistkowymi iniekcjami czynników anty-VEGF na zjawiska autofagii w siatkówce oraz możliwe nowe terapie AMD oparte na modulowaniu zjawiska autofagii.

Słowa kluczowe: autofagia • stres oksydacyjny • lipofuscyna • siatkówka • zwyrodnienie plamki związane z wiekiem

Summary

Age-related macular degeneration (AMD) is a significant problem in healthcare, because it is a leading cause of central vision loss in individuals over 50 years old in well-developed countries. Pathogenesis of AMD is multifactorial and still not completely understood. Proven risk factors include the following: natural senescence of retina, oxidative stress, complement activation, chronic subretinal inflammatory reaction, genetic and environmental factors. Data

* Praca powstała w ramach projektu statutowego nr N41/DBS/000310

	<p>on links between autophagy and AMD development are being raised. Autophagy is a cellular process involving the degradation of long-lived proteins and damaged fragments and components of cells; it is responsible for the maintenance of dynamic intracellular homeostasis and it enables cell survival under stress conditions. Disturbances of autophagy mechanisms, i.e. its activation or inhibition, may lead to the development of many various pathologies. Thus, autophagy plays a dual role, as a mechanism responsible for protecting or killing cells.</p> <p>The paper describes autophagy mechanisms and their role in the natural process of retinal cells senescence and presents the autophagy impairment as a crucial cause of AMD development. We also describe the impact of intravitreal anti-VEGF therapy on retinal autophagy mechanisms and potential new therapeutic modalities for AMD based on autophagy modulation.</p>
Keywords:	autophagy • retina • oxidative stress • lipofuscin • age-related macular degeneration
GICID	01.3001.0014.2495
DOI:	10.5604/01.3001.0014.2495
Word count:	6639
Tables:	1
Figures:	1
References:	104

Adres autorki: dr hab. n. med. Agnieszka Kubicka-Trzaska, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Lekarski, Katedra Okulistyki, Klinika Okulistyki i Onkologii Okulistycznej Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, ul. Kopernika 38, 31-501 Kraków; e-mail: agnieszka.kubicka-trzaska@uj.edu.pl

Wykaz skrótów: **AMD** – zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (age-related macular degeneration); **ATG** – gen związany z autofagią (autophagy-related gene); **Atg8-PE** – fosfatydyloetanolanina (phosphatidylethanolamine), **AREDS 2** – badanie kliniczne nr 2 dotyczące suplementacji w zwyrodnieniu plamki związanym z wiekiem (age-related eye disease study 2); **ARPE-19** – linia ludzkich dojrzałych komórek nabłonka barwnikowego siatkówki – 19 (ARPE-19 – adult retinal pigment epithelial cell line-19); **A2E** – bis retinoid pirymidoniowy (pyridinium bis retinoid); **CEP** – karboksyetylopirol (carboxyethylpirol); **CNV** – neowaskularyzacja naczyniówkowa (choroidal neovascularization); **DHA** – kwas dokozaheksaenowy (docosahexaenoic acid); **EI-24** – białko indukowane etopozydem 2.4 (etoposide-induced protein 2.4); **FKPB-12** – białko wiążące tacrolimus-12 (tacrolimus binding protein-12); **HIF-1a** – czynnik indukowany hipoksją (hypoxia-inducible factor-1a); **Hsp70** – białko szoku termicznego 70 (heat-shock protein 70); **HspA8 – member 8** – białko szoku termicznego rodzina A (Hsp70) członek 8 (heat shock protein family A (Hsp70)); **KFERQ** – sekwencja aminokwasów lizyna, fenyloalanina, glutaminian, arginina, glutamina; **Lamp2a** – białko związane z błoną lizosomu typu 2a (lysosome-associated membrane protein type 2a); **MAP 1 LC3** – lekki łańcuch białka związanego z mikrotubulami (microtubule-associated protein 1 light chain 3); **mTOR** – ssaczy cel rapamycyny (mammalian target of rapamycin); **PEG** – glikol polietylenowy (polyethylene glycol); **PIGF** – łożyskowy czynnik wzrostu (placenta growth factor); **PI3K/Vps34** – kinaza trifosforanu fosfatydyloinozytolu (phosphoinositide 3-kinase/kinaza białkowa 34 (vacuolar protein sorting 34)); **RPE** – nabłonek barwnikowy siatkówki (retinal pigment epithelium); **SQSTM1/p62** – ubikwitynowane białko receptorowe (sequestosome 1/nucleoporin p62); **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (vascular endothelial growth factor); **VPM1** – białko błonowe wakuol 1 (vacuole membrane protein 1).

WPROWADZENIE

W ciągu ostatnich stuleci istotnie wzrosła długość życia osób w krajach rozwiniętych, a prognozy demograficzne przewidują jego dalszy wzrost. Wydłużenie życia pociąga za sobą wzrost liczby osób zagrożonych chorobami wieku podeszłego. Wśród schorzeń tych, poza chorobami nowotworowymi, sercowo-naczyniowymi, zwyrodnieniowymi układu kostno-stawowego, neuro-

degeneracyjnymi, cukrzycy, wymienia się także choroby narządu wzroku [39]. Zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (AMD) jest obecnie istotnym problemem zdrowotnym, ponieważ w krajach rozwiniętych jest jedną z najczęstszych przyczyn utraty widzenia centralnego, a więc ślepoty u osób powyżej 50. roku życia [41, 74, 95]. Występuje u 8,8% populacji, częściej u kobiet, a zapadalność wzrasta z wiekiem i po 75. roku życia dotyczy już prawie 28% ludzi [41, 74]. Obecnie na świecie na AMD

choruje około 200 milionów osób, w Polsce 1,5 mln [36, 95]. Szacuje się, że w 2040 r. liczba chorych na AMD na świecie wzrośnie do 300 mln [95].

Wyróżnia się dwie postaci AMD; najczęstszą jest postać „sucha”, nazywana także niewysiękową lub zanikową, stanowiąca 80–90% wszystkich przypadków, charakteryzująca się powolnym przebiegiem klinicznym i uważana za postać łagodniejszą [62]. W jej przebiegu początkowo rozwijające się druzy, będące depozytami białkowo-lipidowymi, ewoluując, prowadzą do rozwoju ognisk zaniku kompleksu choriokapilary – błona Brucha – RPE – fotoreceptory, co prowadzi do powolnego uszkodzenia płamki i upośledzenia widzenia centralnego [9, 60, 100]. W zaawansowanej postaci „suchego” AMD w plamce rozwija się tzw. zanik geograficzny. Postać wysiękowa lub inaczej „mokra” AMD stanowi 10–20% przypadków i jest związana z tworzeniem neowaskularyzacji naczyńwłokowej (CNV), czyli rozwojem patologicznych naczyń krwionośnych w przestrzeni podsiatkówkowej. Ma znacznie gorsze rokowanie aniżeli postać „sucha”, ponieważ charakteryzuje się gwałtownym przebiegiem i prowadzi do nagłej, głębokiej utraty widzenia centralnego w wyniku pojawienia się krwawienia w plamce [68].

Patogeneza AMD jest wieloczynnikowa i pozostaje wciąż niejasna. Prawdopodobnie na naturalny proces starzenia się siatkówki nakłada się kilka mechanizmów: nasilony stres oksydacyjny, nadmierna aktywacja białek dopełniacza i tłące się przewlekłe zapalenie w przestrzeni podsiatkówkowej, tzw. parainflammation lub inflam-maging [27, 46]. Na przebieg tych procesów mają wpływ czynniki genetyczne, zwłaszcza polimorfizmy genów kodujących regulatory i składowe układu dopełniacza, czynniki środowiskowe, takie jak dieta uboga w antyoksydanty czy palenie tytoniu [22, 29, 80, 90, 104]. Ponadto wiele schorzeń systemowych, takich jak: nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, hiperlipidemie, zaburzenia hormonalne (obniżenie stężenia estrogenów) jest również uważanych za ważne czynniki ryzyka rozwoju AMD [17, 18, 37, 86]. Pomimo złożonej etiopatogenezy AMD, to jednak stres oksydacyjny pełni główną rolę inicjatora zmian zachodzących na poziomie komórkowym w przebiegu tego schorzenia [4, 37]. Stresowi oksydacyjnemu na poziomie siatkówki sprzyjają intensywne metabolizm tlenowy, stała ekspozycja na światło, obecność fotouczulaczy i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WKT) [37]. Badania dowodzą, że szczególnie oksydacja jednego z WKT – kwasu dekozaheksaenowego (DHA) może odgrywać istotną rolę w inicjacji AMD [15]. Powstający w wyniku utleniania DHA karboksyetylopirol (CEP) łączy się z białkami, tworząc immunogenne addukty [3, 15]. Zmodyfikowane przez CEP białka siatkówki stymulują układ odpornościowy przez aktywację dopełniacza oraz wytwarzanie autoprzeciwciał, co powoduje zapalenie w przestrzeni podsiatkówkowej, odgrywającego ważną rolę w rozwoju zmian zwyrodnieniowych w plamce [3, 70].

W ostatnim czasie odkrycie i poznanie zjawiska autofagii, mechanizmu obronnego komórki, istotnego nie tylko dla przetrwania okresów niedoborów składników odżywczych,

ale także biorącego udział w usuwaniu uszkodzonych organelli i białek komórkowych, rzuciło nowe spojrzenie na etiopatogenezę AMD. Pomimo iż upłynęło prawie 10 lat od publikacji Kaarniranty zatytułowanej „Autofagia – gorący temat w AMD”, to nadal zjawisko to pozostaje w centrum zainteresowań badań doświadczalnych i klinicznych retinologów na całym świecie [42].

AUTOFAGIA I JEJ MECHANIZMY

Pojęcie autofagii, czyli „samozjadania się komórki” po raz pierwszy przedstawił w latach 60. XX w. belgijski naukowiec Christian de Duve [24]. Ponad pół wieku później w 2016 r. Japończyk Yoshinori Ohsumi za odkrycie molekularnych mechanizmów autofagii otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny [43, 55].

Autofagia jest mechanizmem komórkowym, polegającym na eliminowaniu zużytych lub uszkodzonych fragmentów i składników komórki, pozwalającym osiągnąć komórce dynamiczną równowagę pomiędzy syntezą a rozkładem jej komponentów, umożliwia ponowne ich wykorzystanie na zasadzie tzw. komórkowego „recyklingu” [28, 51, 76, 86]. Jednak, gdy intensywność lub czas trwania autofagii jest zbyt długi, proces ten może prowadzić do degradacji komórki. Wówczas zjawisko to określane jest mianem programowanej śmierci typu II lub autofagiczną śmiercią komórki [30, 33].

Autofagia jest zatem adaptacją do warunków stresowych i pozwala na zachowanie równowagi w komórkach między biosyntezą a rozkładem makrocząstek; może promować przeżycie, ale także wywoływać śmierć komórki w zależności od warunków i potrzeb organizmu [19]. Autofagia jest procesem złożonym, za regulację genetyczną którego w komórkach ssaków odpowiedzialne są geny autofagii ATG. W seriach badań scharakteryzowano 30 białek (Atg1 – Atg30) uruchamianych na zasadzie kaskadowej, z których każde kontroluje odrębny etap autofagii [77]. W procesie autofagii można wyróżnić następujące etapy:

- powstawania autofagosomu – z fazą indukcji, nukleacji, czyli tworzenia błony pęcherzyka autofagosomu i elongacji, polegającej na tworzeniu i wydłużaniu fagoforu;
- fuzji autofagosomu z lizosomem, w czasie której dochodzi do dojrzewania i powstania autofagolizosomu oraz
- degradacji obejmującej trawienie materiału w lizosomie, czego następstwem jest zwracanie do obiegu składników odżywczych i molekularnych elementów budulcowych komórki [77].

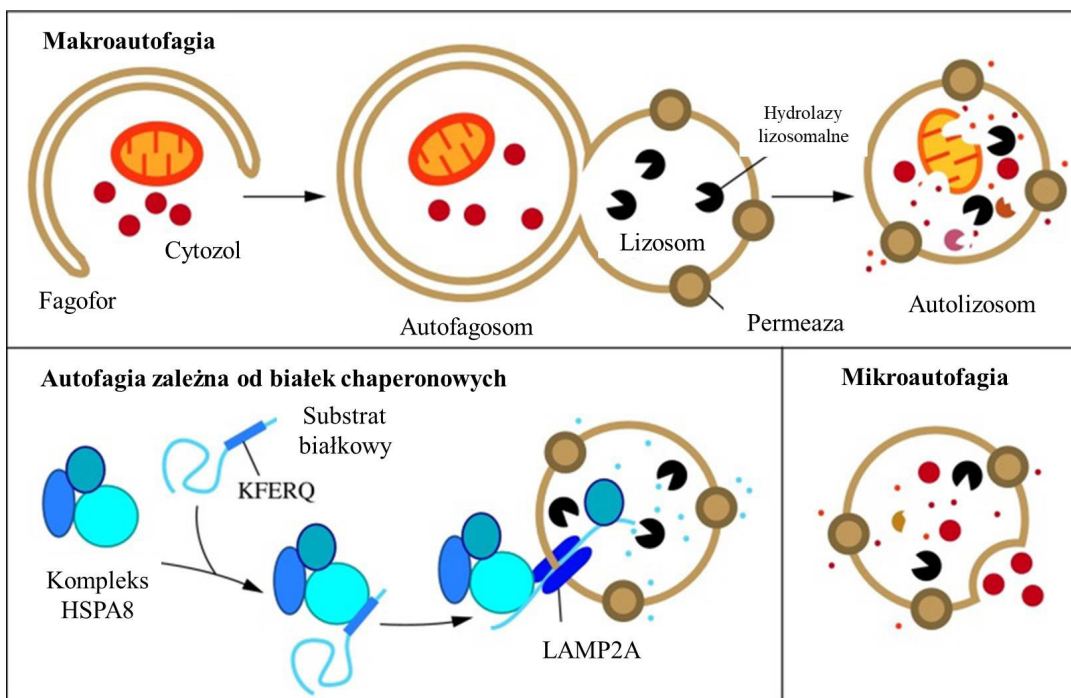
Występujące w komórkach i uczestniczące w autofagii białka Atg można zgrupować w cztery kompleksy [67, 77]. Pierwszy, składający się z białkowych kinaz serynowo-treoninowych Atg1/ULK1/2, regulowany aktywnością kinazy TOR (u ssaków – mTOR). Drugi kompleks, PI3K/Vps34 złożony z lipidowych kinaz i pośredniczący

w nukleacji pęcherzyków. Trzeci i czwarty kompleks tworzą dwa ubikwitynopodobne systemy koniugacyjne Atg12-Atg5 oraz Atg8-PE, które biorą udział we wzroście pęcherzyków. Ponadto w proces powstawania autofagosomów zaangażowane są dwa przezbłonowe białka autofagii Atg9/mAtg9 oraz białko błonowe wakuoli VMP1 [67, 75, 77]. To ostatnie białko jest białkiem występującym u ssaków i jest obecne w błonie komórkowej i wspólnie z białkiem Bekliną 1 i lekkim łańcuchem białka związanego z mikrotubulami - MAP 1 LC3 bierze udział w indukcji autofagii [83, 85]. Beklina 1, homolog drożdżowego białka Atg6, jest zaangażowana w transport substratów do wakuoli autofagicznych, natomiast ludzki homolog białka Atg8 – białko MAP1LC3 występuje na autofagosomach i błonach izolujących. W komórce białko MAP 1 LC3 występuje w trzech postaciach: pro-LC3, LC3-I i LC3-II [16, 85]. Gdy autofagia zostanie zainicjowana, postać LC3-I jest modyfikowana do postaci LC3-II. Białko LC3 II jest jedynym znanym białkiem swoiście związanym z błonami izolującymi, autofagosomami i autofagolizosomami [99]. Konwersja białka LC3 I do postaci LC3 II jest dowodem na tworzenie się autofagosomów w komórce, a tym samym na indukcję autofagii. Natomiast stężenie białka LC3 II jest bezpośrednio skorelowane z liczbą powstających autofagosomów i dlatego białko to jest obecnie uważane za najbardziej wiarygodny biomarker autofagii [83].

Wyróżnia się trzy typy autofagii: mikroautofagię, makroautofagię i autofagię zależną od białek opiekuńczych chaperonów (ryc. 1) [51, 69, 73].

W procesie mikroautofagii materiał komórkowy jest dostarczany bezpośrednio do lizosomów przez wpuklenie ich błony, czyli endocytozę [51, 65, 73]. W mechanizmie makroautofagii składniki cytoplazmy, które mają ulec degradacji, zostają otoczone błoną, a to powoduje powstanie autofagosomów. Ulegają one następnie fuzji z lizosomami, tworząc autofagolizosomy, w których zachodzi ostateczny proces niszczenia ich zawartości z użyciem enzymów hydrolaz lizosomalnych [51, 63, 73]. Następnie permeazy, czyli błonowe białka transportowe, przenoszące jony i metabolity przez błony komórkowe, w wyniku aktywnego transportu, biorą udział w odzyskiwaniu aminokwasów. Funkcją taką pełni m.in. białko Atg22, które odpowiada za wypływ na zewnątrz poprzez błonę autolizosomu aminokwasów [51, 98]. Natomiast autofagia zależna od białek opiekuńczych – chaperonów – polega na selektywnym trawieniu białek mających określoną sekwencję aminokwasową KFERQ (lizyna, fenyloalanina, glutaminian, arginina, glutamina). Chaperon rozpoznaje tę sekwencję, łączy się z receptorem Lamp2a, znajdującym się w błonie lizosomu, powodując dostanie się substratu do wnętrza lizosomu, gdzie ulega hydrolizie [20, 51, 73]. W porównaniu z mikroautofagią i autofagią zależną od chaperonów, makroautofagia jest najpowszechniej występującą postacią autofagii i dlatego w publikacjach termin autofagia jest powszechnie używany na określenie makroautofagii [73, 77].

Autofagia jest nie tylko ważnym mechanizmem obronnym komórki, ale także zapobiega skutkom starzenia, a zaburzenie tego procesu przyczynia się do rozwoju



Ryc. 1. Mechanizmy makroautofagii, mikroautofagii i autofagii zależnej od białek chaperonowych. Dzięki uprzejmości prof. Daniela J. Klionsky'ego, University of Michigan, Ann Arbor, USA

wielu chorób [40, 56, 78, 94, 96]. Obecnie wiadomo, że autofagia jest zaangażowana w rozwój schorzeń neurodegeneracyjnych (choroba Parkinsona, Alzheimer), miopatii, chorób autoimmunologicznych, chorób nerek, chorób sercowo-naczyniowych, nowotworów, cukrzycy typu 2 [12, 75, 88, 93, 94, 98]. Zjawisko to uczestniczy także w rozwoju wielu schorzeń narządu wzroku, tj. oftalmopatia tarczycowa, zaćma, jaskra, retinopatia cukrzycowa, nowotwory wewnątrzgałkowe, zapalenia błony naczyniowej oraz dystrofia i zwyrodnienia siatkówki [7, 8, 13, 43, 44, 58]. W przebiegu tych schorzeń w wyniku przełamania zdolności kompensacyjnych i obronnych komórki, dochodzi do załamania się mechanizmów odpowiedzialnych za zachowanie wewnątrzkomórkowej homeostazy, co w konsekwencji prowadzi do rozwoju patologii.

ZJAWISKA AUTOFAGII W SIATKÓWCE

Zjawiska autofagii w siatkówce po raz pierwszy zostały opisane w 1977 r. przez Cecylię Reme [79]. Badania immunohistochemiczne przeprowadzone na oczach myszy wykazały, iż komórki zwojowe, komórki warstwy jądrazstej wewnętrznej i zewnętrznej siatkówki oraz komórki RPE w warunkach fizjologii wykazują silną ekspresję białek autofagii Atg9 oraz LC3 [66]. Wszystkie te komórki charakteryzuje wysoki współczynnik metaboliczny i indeks zużycia tlenu oraz duża skłonność do występowania uszkodzeń mitochondrialnych [38]. Uważa się, że komórki RPE odgrywają najistotniejszą rolę w mechanizmach autofagii i zachowaniu homeostazy siatkówki, a aktywność ta jest zależna od rytmu dobowego [76]. Wykazano także, że śmierć komórki zależna od autofagii występuje w komórkach siatkówki poddanych nie tylko działaniu stresu oksydacyjnego, ale może być także indukowana hipoksją [53, 57]. Nie wiadomo jednak czy mechanizmy autofagiczne uruchamiane w wyniku niedotlenienia pełnią funkcję ochronną, czy uszkadzającą komórek siatkówki. Wiadomo natomiast, że autofagia odgrywa istotną rolę w zachowaniu dynamicznej homeostazy złożonej i skomplikowanej pod względem budowy i czynności części oka, jaką jest siatkówka, i że jej mechanizmy wraz ze starzeniem się komórek siatkówki stają się niewydolne [34].

W siatkówce oka ludzkiego komórki RPE odgrywają główną rolę w utrzymaniu równowagi wewnątrzkomórkowej fotoreceptorów. Każdego dnia komórki RPE fagocytują 3–5% dystalnych części fotoreceptorów, rozkładają je i uwalniają potrzebne do ich odbudowy składniki [10]. Komórki RPE są postmitotycznymi komórkami, dzielącymi się jedynie w życiu płodowym, w życiu postnatalnym komórki te nie proliferują i dlatego autofagia „zużytych” wewnątrzkomórkowych składników jest tak istotna w prawidłowym ich funkcjonowaniu. Utrzymanie wysokiego podstawowego poziomu aktywności autofagii w komórkach RPE jest ważne do zachowania wewnątrzkomórkowej homeostazy i prawidłowo przebiegającego procesu widzenia [84, 92]. Jednak wraz z wiekiem aktywność autofagii słabnie. W cytoplazmie komórek RPE odkłada się lipofuscyna, autofluorescencyjny barwnik

uważany za marker starzenia się komórki, który zawiera białkowo-lipidowe agregaty, powstające w wyniku fagocytozy zużytych zewnętrznych członów komórek fotoreceptorowych i ich niecałkowitej, lizosomalnej degradacji [35]. Fotocytotoksyczne komponenty lipofuscyny, np. bis-retinoid pirymidoniowy (A2E), są efektywnymi generatorami reaktywnych form tlenu, które uszkadzają strukturę białek, lipidów i DNA komórek RPE [7]. Autofagia w starzejącej się siatkówce jest aktywowana nie tylko przez stres oksydacyjny czy hipoksję, ale również tłęcy się, przewlekły stan zapalny jako tkankowej odpowiedzi adaptacyjnej na czynniki stresowe lub funkcjonalne dysfunkcje, które mogą być przyczyną rozwoju zmian zwyrodnieniowych w plamce [46, 92, 101].

Wzrastająca z wiekiem ilość złogów lipofuscyny nasila stres oksydacyjny *per se*, powodując zachwianie równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej, co propaguje rozwój nieodwracalnych zmian w komórkach RPE i obumieranie funkcjonalnie zależnych od nich fotoreceptorów [11]. Jednocześnie lipofuscyna stymuluje aktywację mechanizmów naprawczych, m.in. przez uruchomienie reakcji zapalnych, zmierzających do przywrócenia homeostazy [27, 46]. Ponadto gromadzące się i zalegające złogi lipofuscyny w komórkach RPE zmniejszają przestrzeń funkcjonalną cytoplazmy, mechanicznie uciskają struktury wewnątrzkomórkowe, osłabiają funkcje trawienne lizosomów i obniżają aktywność proteasomów – białkowych wielkocząsteczkowych agregatów enzymatycznych utworzonych z kilku rodzajów proteaz [54]. Obniżenie aktywności lizosomalnej w komórkach RPE łączy się z zaburzeniem aktywności autofagii [11, 54]. Dochodzi bowiem do zaburzenia fuzji autofagosomów zawierających zużyte elementy komórkowe z wakuolami lizosomalnymi, w których znajdują się enzymy proteolityczne, mające na celu strawienie niepotrzebnych i zużytych elementów komórkowych i odzyskanie tych, które komórka ponownie wykorzysta jako materiał budulcowy. Ponadto same produkty peroksydacji lipidów obniżają aktywność autofagii, powodując wzrost gromadzenia lipofuscyny w komórkach RPE [11, 14]. Lipofuscyna natomiast nasila stres oksydacyjny i sprzyja zjawisku peroksydacji lipidów [14, 104]; rozwija się tzw. „błędne koło”.

Narażenie komórek RPE na przewlekłe działanie czynników uszkadzających prowadzi zatem do lokalnego gromadzenia starzejących się komórek, a to przyspiesza rozwój zmian inwolucyjnych siatkówki [84, 92, 101]. W starzejących się komórkach RPE aktywacja inflammasomów jest przyczyną uwalniania wielu czynników prozapalnych, takich jak: chemokin i cytokin, proteaz, czynników wzrostu, z których VEGF jest najsilniejszym stymulatorem rozwoju CNV, charakterystycznego objawu wysiękowej postaci AMD [59, 89].

Autofagia uczestniczy także w wielu procesach zachodzących w samych komórkach fotoreceptorych siatkówki; reguluje ultrastrukturę i funkcjonowanie czopków i pręcików, wpływa na ich przeżycie i śmierć,

moduluje ekspresję rodopsyny, wpływa na mechanizmy kontrolujące cykl wzrokowy, przy czym aktywność tego zjawiska jest ściśle uzależniona od światła [58]. Wang i wsp. wykazali, że autofagia w sposób istotny hamuje śmierć fotoreceptorów indukowaną światłem oraz hamuje ich degenerację przez przemiany toksycznej rodopsyny [92]. Podobne spostrzeżenia opisali Chen i wsp., którzy wykazali zwiększoną ekspresję markera autofagosomów LC3B-II w odpowiedzi na światło u dzikich myszy, natomiast u myszy niezdolnych do indukcji zjawiska autofagii (autophagy-deficient mice) nie obserwowano zwiększonej aktywności tego markera, a w siatkówce zwierząt stwierdzono pojawienie się zmian zwyrodnieniowych [14]. W innych badaniach przeprowadzonych na muszkach *Drosophila* opisano, że zależne od światła zwyrodnienie siatkówki było wynikiem uszkodzenia lub mutacji podstawowych genów autofagii *Atg 7* i *Atg 8* oraz genów kontrolujących tworzenie autofagosomów [92]. Podobnie Zhou i wsp. stwierdzili, że brak autofagii, będący wynikiem delekcji genu *Atg 5* w pręcikach, był przyczyną rozwoju retinopatii u myszy rozwijających się i żyjących bez ekspozycji na światło dzienne. U zwierząt tych stwierdzono jednocześnie obniżoną funkcję fotoreceptorów czopkowych przy zachowaniu ich prawidłowej strukturze [103]. Powyższe obserwacje wskazują, że autofagia odgrywa istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu zarówno komórek RPE, jak i komórek fotoreceptorowych siatkówki.

AUTOFAGIA W PRZEBIEGU AMD

Autofagia z całą pewnością pełni funkcję ochronną przed rozwojem wielu chorób siatkówki i RPE [66]. Wiele zmian zachodzących w komórkach RPE w przebiegu AMD, takich jak gromadzenie ziaren lipofuscyny, zwiększona wrażliwość na stres oksydacyjny, uszkodzenia mitochondrialne, dysfunkcja lizosomalna, także wskazują na powiązania z autofagią, zarówno z jej obniżoną, jak i wzmożoną ekspresją [13, 31, 54, 66, 101]. Wyniki badań doświadczalnych sugerują, iż we wczesnych stadiach AMD dochodzi do wzrostu aktywności autofagii, natomiast w zaawansowanych postaciach choroby, mechanizmy autofagii stają się niewydolne, co wiąże się z dalszą progresją zmian zwyrodnieniowych w płamce [13, 54, 101]. We wczesnym stadium AMD aktywność autofagii kompensuje wczesne uszkodzenia komórek wywołane stresem oksydacyjnym. W miarę upływu czasu i nasilania się zmian zwyrodnieniowych RPE i fotoreceptorów te mechanizmy kompensacyjne słabną, autofagia staje się niewydolna i choroba rozwija się dalej [31, 48]. Nie wiadomo jednak, czy zaburzenia mechanizmów autofagicznych w przebiegu AMD są przyczyną czy następstwem choroby oraz, czy zaburzenia autofagii są odzwierciedleniem nieprawidłowości związanych z tworzeniem się i eliminacją autofagosomów [5, 48, 66].

Badania histochemiczne przeprowadzone na hodowlach ludzkich komórek RPE (ARPE-19) oraz na siatkówkach pochodzących z usuniętych gałek ocznych osób chorujących na AMD wykazały, że we wczesnym sta-

dium choroby w komórkach RPE obserwuje się zwiększoną ekspresję markerów autofagii (LC3, Atg9, Atg7), podczas gdy w oczach z zaawansowaną postacią AMD aktywność tych biomarkerów autofagii jest istotnie obniżona [48, 66]. Ponadto druzo, będące zewnątrzkomórkowymi depozytami lipidów, białek, proteoglikanów, gromadzącymi się wzdłuż błony podstawnej komórek RPE, tj. błony Brucha, także wykazują wzrost ekspresji markerów autofagii. Stwierdzono w nich zwiększoną ekspresję białek Atg12-Atg5 oraz LC3B, której towarzyszyła zmniejszona aktywność lizosomalna i uszkodzenie mitochondriów [91, 92]. Podejrzewa się, że aktywacja autofagii i uwalnianie międzykomórkowych białek przez egzozomy w starzejących się komórkach RPE mogą być zaangażowane w proces druzogenezę [91]. Innym patologicznym objawem AMD jest gromadzenie się lipofuscyny w lizosomach komórek RPE [91, 92]. Lipofuscyna, która jest heterogenną mieszaniną lipoprotein, uczuła komórki RPE na światło i indukuje stres oksydacyjny. We wczesnym stadium AMD jej fototoksyczny komponent A2E pobudza autofagię w komórkach RPE i chroni je przez zahamowanie wydzielania prozapalnych cytokin i czynnika VEGF. Jednak dalsze gromadzenie się lipofuscyny i wypełnienie jej ładunkiem całej objętości lizosomu zaburza fuzję autofagosomu z lizosomem [91, 101]. Niewydolność aktywności lizosomalnej jest główną przyczyną lipofuscynogenezy – zjawiska bardzo silnie związanego z patogenezą AMD [48, 101]. Obniżenie aktywności autofagii powoduje wzrost wrażliwości komórek RPE na apoptozę indukowaną fotooksydacyjnym uszkodzeniem mitochondrialnym oraz jest powodem braku oczyszczania komórki z toksycznych komponentów i nieprawidłowo uformowanych białek [101]. Składowa lipofuscyny – A2E – przez hamowanie lizosomalnej pompy protonowej zależnej od ATP jest odpowiedzialna za wzrost lizosomalnego pH, co również zaburza proces tworzenia autofagolizosomu i biodegradacji lipofuscyny [5, 48]. Gromadzące się produkty peroksydacji lipidów zmniejszają aktywność autofagii, a to sprzyja odkładaniu się lipofuscyny w komórkach RPE i nasileniu objawów biodegradacji komórki [35, 100]. Komórkowa proteostaza jest regulowana przez białka chaperonowe, m.in. przez białko szoku termicznego Hsp70 i proteasomalny i autofagiczny system „oczyszczania” komórki [25]. W niedawnych badaniach wykazano, że ubikwitynowane białko receptorowe SQSTM1/p62, tworząc nieodwracalne wiązania z okołojądrowymi agregatami białkowymi podlega autofagicznej eliminacji w hodowlach ludzkich komórek ARPE-19, w których stwierdzono niewielkie stężenie tego białka. Natomiast u chorych na AMD wykazano w siatkówce okolicy plamkowej duże stężenie białka SQSTM1/p62, co wskazuje na obniżenie aktywności mechanizmów autofagii w przebiegu tego schorzenia [48]. Białko Hsp70, wiążąc się w sposób odwracalny z okołojądrowymi agregatami białkowymi w wyniku zahamowania aktywności proteasomów, nie ulega autofagii degradacji w komórkach ARPE-19, pełniąc ważną rolę w zachowaniu homeostazy komórek RPE [81].

Jak podają autorzy niedawnych doniesień, w komórkach RPE w degradacji białek komórkowych i w regulacji wielkości procesów ważnych dla zachowania równowagi funkcjonowania tych komórek bierze udział nie tylko autofagia, ale w procesy te jest także zaangażowany komplementarnie działający system ubikwityna-proteasom. Obydwa mechanizmy współdziałają ze sobą, a szczególną rolę w aktywności obu tych systemów odgrywa ubikwitynowa ligaza E124. Starzenie się i stres oksydacyjny, dwa główne czynniki ryzyka AMD, obniżają aktywność nie tylko autofagii, ale także i systemu ubikwityna-proteasom [6].

Powyższe obserwacje wskazują, iż autofagia odgrywa istotną rolę w „oczyszczaniu” siatkówki, a jej efektywność maleje wraz ze starzeniem się komórki oraz w zaawansowanych stadiach AMD [6, 25, 48]. W złożonych mechanizmach autofagii uczestniczą również mechanizmy zależne od fagocytozy, czynności lizosomów oraz proteosomów, których aktywność także jest obniżona w starzejącej się siatkówce oraz w przebiegu AMD.

AUTOFAGIA I POTENCJALNE NOWE TERAPIE DLA AMD

Obecnie nie ma jeszcze skutecznego leczenia „suchej” postaci AMD. W zanikowym AMD, w celu spowolnienia postępu choroby, jak również osobom obciążonym czynnikami ryzyka rozwoju AMD, zaleca się stosowanie doustnych preparatów zawierających antyoksydanty, tj. karotenoidy: luteinę i zeaksantynę, wielonienasycone kwasy tłuszczowe oraz cynk, miedź i witaminy C i E zgodnie z regułą AREDS 2 – Age-Related Eye Disease Study 2 [32]. Obecnie „złotym standardem” postępowania u chorych na wysiękową postać AMD jest terapia doszkliskowymi iniekcjami inhibitorów czynnika VEGF: ranibizumabem, afliberceptem i stosowanym „off-label” – bewacizumabem [47]. Nie jest to jednak terapia najskuteczniejsza, gdyż prawie 10–25% chorych nie reaguje pozytywnie na to leczenie, co prowadzi do dalszego postępu choroby i nieodwracalnego uszkodzenia widzenia centralnego [47, 49]. Te trzy inhibitory cząsteczki VEGF różnią się między sobą budową, wielkością, farmakokinetyką, a to wiąże się z pojawieniem się różnych zmian na poziomie komórkowym [49]. Badania przeprowadzone *in vitro* wykazały, iż w standardowo stosowanych dawkach ranibizumab i aflibercept nie wykazują toksyczności w stosunku do komórek siatkówki oraz komórek śródbłonna naczyń krwionośnych [61, 64, 82]. De Cilia i wsp. wykazali ponadto, że ranibizumab i aflibercept działają ochronnie na komórki RPE przez modulowanie uwalniania tlenu azotu, apoptozę oraz autofagię [23].

Bewacizumab natomiast zmniejsza aktywność mitochondrialną, zarówno proliferujących, jak i nieproliferujących komórek śródbłonna naczyń krwionośnych [64]. Odnotowano, iż bewacizumab, kumulując się w komórkach RPE, może zmniejszać aktywność autofagii i nasilać włóknienie w komórkach RPE [44, 50]. Przeprowadzone badania przez Kivinen nie potwierdziły jednak tego spostrzeżenia i nie wykazały negatywnego wpływu bewacizumabu na regulację mechanizmów autofagii [48].

Najnowsze badania wskazują, iż regulacja mechanizmów autofagii może mieć istotne znaczenie w projekcji komórek RPE i tym samym może stanowić nowe potencjalne narzędzie w terapii AMD [44]. Duże nadzieje wiąże się z białkiem Hsp70, którego zwiększenie ekspresji może być wykorzystane jako nowa metoda postępowania, zarówno w profilaktyce, jak i w leczeniu chorych z AMD [26, 44]. Wiadomo, że w oczach z AMD komórki RPE charakteryzuje obniżona aktywność lizosomalna, co prowadzi do gromadzenia lipofuscyny w tych komórkach, której akumulacja jest odzwierciedleniem nasilenia objawów choroby [52]. Sugeruje się, że białko Hsp70 utrzymuje aktywność enzymów lizosomalnych i hamuje proces gromadzenia się lipofuscyny w komórkach RPE, spowalniając tym samym rozwój i progresję AMD [45]. Białko to wykazuje także bardzo dobre właściwości przeciwzapalne, hamując na poziomie RPE reakcje zapalne, które odgrywają główną rolę w patogenezie AMD [71].

Duże nadzieje wiąże się także z inhibitorami czynnika mTOR. Poprzez aktywację kinazy tyrozynowej, mTOR stymuluje wytwarzanie czynnika indukowanego hipoksją-1a, który zwiększa ekspresję cząsteczki VEGF, proliferację komórek śródbłonna naczyniowego i angiogenezę [102]. Wyniki badań doświadczalnych przeprowadzonych na zwierzęcym modelu proliferacyjnej retinopatii niedokrwiennej wykazały skuteczność dwóch inhibitorów mTOR: everolimusu i rapamycyny w zmniejszeniu neowaskularyzacji siatkówki oraz redukcji aktywności fosforylowanego białka rybosomalnego pS6, będącego wskaźnikiem aktywności mTOR [97]. Czynniki te zmniejszają ekspresję czynnika VEGF na komórkach RPE i są zdolne do zahamowania różnych postaci angiogenezy w oku: neowaskularyzacji w siatkówce, rogówce oraz neowaskularyzacji naczyńówkowej (CNV) [2, 102]. Obecnie w II fazie badań klinicznych, obejmujących chorych na wysiękową postać AMD, znajduje się everolimus stosowany w postaci doustnej (NCT00857259, Novartis) w monoterapii lub w połączeniu z doszkliskowymi iniekcjami ranibizumabu. Kilka badań klinicznych II fazy ocenia skuteczność podspojówkowo podawanej rapamycyny w terapii złożonej wraz z doszkliskowymi iniekcjami ranibizumabu (NCT00766337, Macu-Sight) u chorych na wysiękową postać AMD oraz zaniku geograficznego w przebiegu suchej postaci AMD (NCT00766649; National Eye Institute) [2]. Inny inhibitor czynnika mTOR, palomid 529, podawany podspojówkowo, hamujący rozwój CNV oraz zmniejszający przepuszczalność naczyń krwionośnych zależną od czynnika VEGF, w badaniu klinicznym I fazy również skutecznie zmniejszał objawy wysiękowej postaci AMD u chorych niereagujących na doszkliskowe iniekcje czynnika anty-VEGF (NCT01271270) [21].

W tabeli 1 przedstawiono prowadzone na świecie badania kliniczne nowych leków, mających potencjalny wpływ na patomechanizm AMD, w tym autofagię.

Należy także podkreślić, iż nie tylko drogie i skomplikowane terapie mogą modyfikować zjawisko autofagii. Najnowsze doniesienia wskazują, że zalecany chorym

Tabela 1. Badanie kliniczne nowych leków mających potencjalny wpływ na patomechanizmy zwyrodnienia płamki związanego z wiekiem

Nazwa badania i/ lub identyfikator badania klinicznego wg ClinicalTrials.gov	Postać zwyrodnienia płamki związanego z wiekiem	Symbol/nazwa leku	Mechanizm działania leku	Droga podania leku	Faza badania klinicznego	Liczba uczestników
LUCERNE NCT03823300	wysiękowa	RO 6867461 Faricimab	Humanizowane monoklonalne przeciwciała blokujące czynnik VEGF-A oraz angiopoetynę-2	doszkliskowa	III faza	640
TENAYA (NCT03823287)	wysiękowa	RO 6867461 Faricimab	Humanizowane monoklonalne przeciwciała blokujące czynnik VEGF-A oraz angiopoetynę-2	doszkliskowa	III faza	640
PANDA-1 NCT03577899	wysiękowa	KH902 Conbercept	Rekombinowane białko fuzyjne o wysokim powinowactwie do wszystkich izoform czynnika VEGF oraz PlGF	doszkliskowa	III faza	1140
NCT03777332	zanikowa	APL-2	Syntetyczny cykliczny peptyd skoniugowany z polimerem glikolu polietylenowego (PEG) hamujący aktywność białek układu dopełniacza C3 i C3b.	doszkliskowa	I faza	12
NCT03465709	wysiękowa	APL-2	Syntetyczny cykliczny peptyd skoniugowany z polimerem glikolu polietylenowego (PEG) hamujący aktywność białek układu dopełniacza C3 i C3b.	doszkliskowa	II faza	17
NCT02452385	wysiękowa	CM082 lub X-82 Vorolanib	Selektywny inhibitor wszystkich izoform receptora VEGF oraz PDGF, działa silnie antyangiogenicznie	doustna	I faza	38
NCT03626636	zanikowa	Risuteganib (Luminate)	Syntetyczny peptyd, inhibitor integryn, hamuje reakcje związane ze stresem oksydacyjnym i reguluje homeostazę w komórkach siatkówki	doszkliskowa	II faza	40
TOGA NCT01782989	zanikowa	Doxycyklina (Oracea)	Działanie przeciwzapalne, hamuje progresję zaniku geograficznego	doustna	II/III faza	286
NCT02686658	zanikowa	Avacincaptad pegol (Zimura)	Aptamer, inhibitor białka C5 układu dopełniacza	doszkliskowa	II b faza	200
NCT00857259	wysiękowa	RAD001 Everolimus w monoterapii lub w terapii złożonej z ranibizumabem	Pochodna rapamycyny, inhibitor czynnika mTOR	doustna	II faza	16
EMERALD NCT00766337	wysiękowa	Sirolimus (Rapamycyna) w terapii łączonej z ranibizumabem	Antybiotyk makrolidowy tworząc kompleks z białkiem cytozolowym FKPB-12 hamuje aktywację mTOR	podspójkowa	II faza	62
SIRGA NCT00766649	zanikowa	Sirolimus (Rapamycyna)	Hamuje aktywację mTOR	podspójkowa	II faza	11
NCT01271270	wysiękowa	Palomid 529	Inhibitor czynnika mTOR	podspójkowa	I faza	7

na AMD suplement diety resweratrol, silny przeciwutleniacz, czynnik o działaniu przeciwzapalnym, neuroprotekcijnym i hamującym procesy starzenia, występujący naturalnie m.in. w skórce czerwonych winogron, indukował w komórkach ARPE-19 zjawisko autofagii przez zahamowanie aktywności kinazy białkowej treoninowo-serynowej mTOR, która pełni istotną funkcję w procesach proliferacji, wzrostu i różnicowania komórek [72]. W latach 80. ub. w. narodziło się pojęcie tzw. „francuskiego paradoksu”, polegającego na występowaniu wśród Francuzów niskiej zapadalności i śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych, mimo stosowania tłustej diety i picia dużej ilości alkoholu. Alkohol ten jest jednak spożywany głównie w postaci czerwonego wina, w którym występuje wysokie stężenie resweratrolu [1]. Obecnie wiadomo, iż u chorych na AMD, których dieta jest

bogata w resweratrol, obserwuje się zahamowanie progresji zmian zwyrodnieniowych w plamce.

Nieustannie na całym świecie prowadzone są wieloosrodkowe badania nad poszukiwaniem nowych terapii, które skutecznie hamowałyby dalszy rozwój zmian zwyrodnieniowych w plamce, zarówno w przebiegu wysiękowej, jak i suchej postaci AMD. Wielkie nadzieje wiąże się z wykorzystaniem cząsteczek, które potencjalnie mogą modulować autofagię – zjawiska zaangażowanego w rozwój i progresję AMD. Poznanie i zrozumienie skomplikowanych mechanizmów autofagii w tak złożonej strukturze oka, jaką jest siatkówka, jest konieczne do opracowania nowych i skutecznych sposobów leczenia, prowadzących do zahamowania rozwoju tego schorzenia, które w ostatnich latach zostało uznane za największą epidemię ślepoty XXI wieku.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abu-Amero K.K., Kondkar A.A., Chalam K.V.: Resveratrol and ophthalmic diseases. *Nutrients*, 2016; 8: 200
- [2] Agarwal A., Rhoades W.R., Hanout M., Soliman M.K., Sarwar S., Sadiq M.A., Sepah Y.J., Do D.V., Nguyen Q.D.: Management of neovascular age-related macular degeneration: Current state-of-the-art care for optimizing visual outcomes and therapies in development. *Clin. Ophthalmol.*, 2015; 9: 1001–1015
- [3] Ardeljan D., Tuo J., Chan C.C.: Carboxyethylpyrrole plasma biomarkers in age-related macular degeneration. *Drugs Future*, 2011; 36: 712–718
- [4] Bellezza I.: Oxidative stress in age-related macular degeneration: Nrf2 as therapeutic target. *Front. Pharmacol.*, 2018; 9: 1280
- [5] Bergmann M., Schütt F., Holz F.G., Kopitz J.: Inhibition of the ATP-driven proton pump in RPE lysosomes by the major lipofuscin fluorophore A2-E may contribute to the pathogenesis of age-related macular degeneration. *FASEB J.*, 2004; 18: 562–564
- [6] Blasiak J., Pawłowska E., Szczepanska J., Kaarniranta K.: Interplay between autophagy and the ubiquitin-proteasome system and its role in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019; 20: 210
- [7] Blasiak J., Petrovski G., Veréb Z., Facsó A., Kaarniranta K.: Oxidative stress, hypoxia, and autophagy in the neovascular processes of age-related macular degeneration. *Biomed. Res. Int.*, 2014; 2014: 768026
- [8] Blasiak J., Piechota M., Pawłowska E., Szatkowska M., Sikora E., Kaarniranta K.: Cellular senescence in age-related macular degeneration: Can autophagy and DNA damage response play a role? *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2017; 2017: 5293258
- [9] Bowes Rickman C., Farsiu S., Toth C.A., Klingeborn M.: Dry age-related macular degeneration: Mechanisms, therapeutic targets, and imaging. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2013; 54: ORSF68–ORSF80
- [10] Boya P., Esteban-Martínez L., Serrano-Puebla A., Gómez-Sintes R., Villarejo-Zori B.: Autophagy in the eye: Development, degeneration, and aging. *Prog. Retin. Eye Res.*, 2016; 55: 206–245
- [11] Cai J., Zhang H., Zhang Y.F., Zhou Z., Wu S.: MicroRNA-29 enhances autophagy and cleanses exogenous mutant α B-crystallin in retinal pigment epithelial cells. *Exp. Cell Res.*, 2019; 374: 231–248
- [12] Cerri S., Blandini F.: Role of autophagy in Parkinson's disease. *Curr. Med. Chem.*, 2019; 26: 3702–3718
- [13] Chai P., Ni H., Zhang H., Fan X.: The evolving functions of autophagy in ocular health: A double-edged sword. *Int. J. Biol. Sci.*, 2016; 12: 1332–1340
- [14] Chen Y., Perusek L., Maeda A.: Autophagy in light-induced retinal damage. *Exp. Eye Res.*, 2016; 144: 64–72
- [15] Cheng Y.S., Linetsky M., Gu X., Ayyash N., Gardella A., Salomon R.G.: Light-induced generation and toxicity of docosahexaenoate-derived oxidation products in retinal pigmented epithelial cells. *Exp. Eye Res.*, 2019; 181: 325–345
- [16] Cherra S.J. 3rd, Kulich S.M., Uechi G., Balasubramani M., Mountzouris J., Day B.W., Chu C.T.: Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *J. Cell Biol.*, 2010; 190: 533–539
- [17] Cheung C.M., Tai E.S., Kawasaki R., Tay W.T., Lee J.L., Hamzah H., Wong T.Y.: Prevalence of and risk factors for age-related macular degeneration in a multiethnic Asian cohort. *Arch. Ophthalmol.* 2012; 130: 480–486
- [18] Cheung C.M., Wong T.Y.: Is age-related macular degeneration a manifestation of systemic disease? New prospects for early intervention and treatment. *J. Intern. Med.*, 2014; 276: 140–153
- [19] Codogno P., Meijer A.J.: Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ.*, 2005; 12: 1509–1518
- [20] Cuervo A.M.: Chaperone-mediated autophagy: Selectivity pays off. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2010; 21: 142–150
- [21] Dalal M., Jacobs-El N., Nicholson B., Tuo J., Chew E., Chan C.C., Nussenblatt R., Ferris F., Meyerle C.: Subconjunctival Palomid 529 in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2013; 251: 2705–2709
- [22] DeAngelis M.M., Owen L.A., Morrison M.A., Morgan D.J., Li M., Shakoob A., Vitale A., Iyengar S., Stambolian D., Kim I.K., Farrer L.A.: Genetics of age-related macular degeneration (AMD). *Hum. Mol. Genet.*, 2017; 26: R45–R50
- [23] De Cilla S., Farruggio S., Vujosevic S., Raina G., Filippini D., Gatti V., Clemente N., Mary D., Vezzola D., Casini G., Rossetti L., Grossini E.: Anti-vascular endothelial growth factors protect retinal pigment epithelium cells against oxidation by modulating nitric oxide release and autophagy. *Cell Physiol. Biochem.*, 2017; 42: 1725–1738
- [24] De Duve S., Wattiaux R.: Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.*, 1966; 28: 435–492
- [25] Dokladny K., Myers O.B., Moseley P.L.: Heat shock response and autophagy – cooperation and control. *Autophagy*, 2015; 11: 200–213
- [26] Dokladny K., Zuhl M.N., Mandell M., Bhattacharya D., Schneider S., Dretic V., Moseley P.L.: Regulatory coordination between two major intracellular homeostatic systems: Heat shock response and autophagy. *J. Biol. Chem.*, 2013; 288: 14959–14972

- [27] Franceschi C., Bonafè M., Valensin S., Olivieri F., De Luca M., Ottaviani E., De Benedictis G.: Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2000; 908: 244–254
- [28] Frost L.S., Mitchell C.H., Boesze-Battaglia K.: Autophagy in the eye: Implications for ocular cell health. *Exp. Eye Res.*, 2014; 124: 56–66
- [29] Geerlings M.J., de Jong E.K., den Hollander A.I.: The complement system in age-related macular degeneration: A review of rare genetic variants and implications for personalized treatment. *Mol. Immunol.*, 2017; 84: 65–76
- [30] Glick D., Barth S., Macleod K.F.: Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.*, 2010; 221: 3–12
- [31] Golestaneh N., Chu Y., Xiao Y.Y., Stoleru G.L., Theos A.C.: Dysfunctional autophagy in RPE, a contributing factor in age-related macular degeneration. *Cell Death Dis.* 2017; 8: e2537
- [32] Gorusupudi A., Nelson K., Bernstein P.S.: The age-related eye disease 2 study: Micronutrients in the treatment of macular degeneration. *Adv. Nutr.*, 2017; 8: 40–53
- [33] Gozuacik D., Kimchi A.: Autophagy and cell death. *Curr. Topics Dev. Biol.*, 2007; 78: 217–245
- [34] Hyttinen J.M., Błasiak J., Niittykoski M., Kinnunen K., Kauppinen A., Salminen A., Kaarniranta K.: DNA damage response and autophagy in the degeneration of retinal pigment epithelial cells-implications for age-related macular degeneration (AMD). *Ageing Res. Rev.*, 2017; 36: 64–77
- [35] Iwasaki M., Inomata H.: Lipofuscin granules in human photoreceptor cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1988; 29: 671–679
- [36] Jankowska-Lech I., Grabska-Liberek I., Krzyżewska-Niedziałek A., Pietruszyńska M.: Zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (AMD) – choroba starzejących się społeczeństw. *Post. Nauk Med.*, 2013; 26: 868–873
- [37] Jarrett S.G., Boulton M.E.: Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Mol. Aspects Med.*, 2012; 33: 399–417
- [38] Jarrett S.G., Lewin A.S., Boulton M.E.: The importance of mitochondria in age-related and inherited eye disorders. *Ophthalmic Res.*, 2010; 44: 179–190
- [39] Jaul E., Barron J.: Age-related diseases and clinical and public health implications for the 85 years old and over population. *Front. Public Health*, 2017; 5: 335
- [40] Jiang P., Mizushima N.: Autophagy and human diseases. *Cell Res.*, 2014; 24: 69–79
- [41] Jonas J.B., Cheung C.M., Panda-Jonas S.: Updates on the epidemiology of age-related macular degeneration. *Asia Pac. J. Ophthalmol.*, 2017; 6: 493–497
- [42] Kaarniranta A.: Autophagy a hot topic in AMD. *Acta Ophthalmol.*, 2010; 88: 387–388
- [43] Kaarniranta K., Petrovski G., Kauppinen A.: The Nobel Prized cellular target autophagy in eye diseases. *Acta Ophthalmol.*, 2017; 95: 335–336
- [44] Kaarniranta K., Sinha D., Błasiak J., Kauppinen A., Veréb Z., Salminen A., Boulton M.E., Petrovski G.: Autophagy and heterophagy dysregulation leads to retinal pigment epithelium dysfunction and development of age-related macular degeneration. *Autophagy*, 2013; 9: 973–984
- [45] Karlsson M., Frennesson C., Gustafsson T., Brunk U.T., Nilsson S.E., Kurz T.: Autophagy of iron-binding proteins may contribute to the oxidative stress resistance of ARPE-19 cells. *Exp. Eye Res.*, 2013; 116: 359–365
- [46] Kauppinen A., Paterno J.J., Błasiak J., Salminen A., Kaarniranta K.: Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cell Mol. Life Sci.*, 2016; 73: 1765–1786
- [47] Khan M., Agarwal K., Loutfi M., Kamal A.: Present and possible therapies for age-related macular degeneration. *ISRN Ophthalmol.*, 2014; 2014: 608390
- [48] Kivinen N.: The role of autophagy in age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.*, 2018; 96 (Suppl. A110): 1–50
- [49] Klettner A.K.: VEGF-A and its inhibitors in age-related macular degeneration – pharmacokinetic differences and their retinal and systemic implications. *J. Biochem. Pharmacol. Res.*, 2014; 2: 8–20
- [50] Klettner A., Möhle F., Roeder J.: Intracellular bevacizumab reduces phagocytotic uptake in RPE cell. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2010; 248: 819–824
- [51] Klionsky D.J.: The molecular machinery of autophagy: Unanswered questions. *J. Cell Sci.*, 2005; 118: 7–18
- [52] Krohne T.U., Kaemmerer E., Holz F.G., 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
- [53] Kunchithapatham K., Rohrer B.: Apoptosis and autophagy in photoreceptors exposed to oxidative stress. *Autophagy*, 2007; 3: 433–441
- [54] Lei L., Tzekov R., Li H., McDowell J.H., Gao G., Smith W.C., Tang S., Kaushal S.: Inhibition or stimulation of autophagy affects early formation of lipofuscin-like autofluorescence in the retinal pigment epithelium cell. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017; 18: 728
- [55] Levine B., Klionsky D.J.: Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2016; 114: 201–205
- [56] Levine B., Kroemer G.: Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 2008; 132: 27–42
- [57] Li R., Wang L.Z., Du J.H., Zhao L., Yao Y.: Autophagy activation and the mechanism of retinal microvascular endothelial cells in hypoxia. *Int. J. Ophthalmol.*, 2018; 11: 567–574
- [58] Lin W., Xu G.: Autophagy: A role in the apoptosis, survival, inflammation, and development of the retina. *Ophthalmic Res.*, 2019; 61: 65–72
- [59] Liu J., Copland D.A., Theodoropoulou S., Chiu H.A., Barba M.D., Mak K.W., Mack M., Nicholson L.B., Dick A.D.: Impairing autophagy in retinal pigment epithelium leads to inflammasome activation and enhanced macrophage-mediated angiogenesis. *Sci. Rep.*, 2016; 6: 20639
- [60] Luthert P.J.: Pathogenesis of age-related macular degeneration. *Diagn. Histopathol.*, 2011; 17: 10–16
- [61] Luthra S., Sharma A., Dong J., Neekhra A., Gramajo A.L., Seigel G.M., Kenney M.C., Kuppermann B.D.: Effect of bevacizumab (Avastin™) on mitochondrial function of *in vitro* retinal pigment epithelial, neurosensory retinal and microvascular endothelial cells. *Indian J. Ophthalmol.*, 2013; 61: 705–710
- [62] Mathenge W.: Age-related macular degeneration. *Community Eye Health*. 2014; 27: 49–50
- [63] Mehrpour M., Esclatine A., Beau I., Codogno P.: Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res.*, 2010; 20: 748–762
- [64] Miguel N.C., Matsuda M., Portes A.L., Allodi S., Mendez-Otero R., Puntar T., Sholl-Franco A., Krempel P.G., Monteiro M.L.: In vitro effects of bevacizumab treatment on newborn rat retinal cell proliferation, death, and differentiation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012; 53: 7904–7911
- [65] Mijaljica D., Prescott M., Devenish R.J.: Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, 2011; 7: 673–682
- [66] Mitter S.K., Rao H.V., Qi X., Cai J., Sugrue A., Dunn W.A. Jr, Grant M.B., Boulton M.E.: Autophagy in the retina: A potential role in age-related macular degeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2012; 723: 83–90
- [67] Mizushima N.: The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2010; 22: 132–139
- [68] Mizushima N., Komatsu M.: Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell*, 2011; 147: 728–741
- [69] Moschos M.M., Nitoda E., Chatziralli I.P., Demopoulos C.A.: Age-related macular degeneration: Pathogenesis, genetic background, and the role of nutritional supplements. *J. Chemistry.*, 2014; 2014: 317536

- [70] Nita M., Grzybowski A., Ascaso F.J., Huerva V.: Age-related macular degeneration in the aspect of chronic low-grade inflammation (pathophysiological parainflammation). *Mediators Inflamm.*, 2014; 2014: 930671
- [71] Paimela T., Hyttinen J.M., Viiri J., Ryhänen T., Karjalainen R.O., Salminen A., Kaarniranta K.: Celastrol regulates innate immunity response via NF- κ B and Hsp70 in human retinal pigment epithelial cells. *Pharmacol. Res.*, 2011; 64: 501–508
- [72] Park D., Jeong H., Lee M.N., Koh A., Kwon O., Yang Y.R., Noh J., Suh P.G., Park H., Ryu S.H.: Resveratrol induces autophagy by directly inhibiting mTOR through ATP competition. *Sci. Rep.*, 2016; 6: 21772
- [73] Parzych K.R., Klionsky D.J.: An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid. Redox Signal.*, 2014; 20: 460–473
- [74] Pennington K.L., DeAngelis M.M.: Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD): Associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors. *Eye Vis.*, 2016; 3: 34
- [75] Perl A.: mTOR activation is a biomarker and a central pathway to autoimmune disorders, cancer, obesity, and aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2015; 1346: 33–44
- [76] Perusek L., Sahu B., Parmar T., Maeno H., Arai E., Le Y.Z., Subauste C.S., Chen Y., Palczewski K., Maeda A.: Di-retinoid-pyridinium-ethanolamine (A2E) accumulation and the maintenance of the visual cycle are independent of Atg7-mediated autophagy in the retinal pigmented epithelium. *J. Biol. Chem.*, 2015; 290: 29035–29044
- [77] Polewska J.: Autofagia – mechanizm molekularny, apoptoza i nowotwory. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2012; 66: 921–936
- [78] Ravikumar B., Sarkar S., Davies J.E., Futter M., Garcia-Arencibia M., Green-Thompson Z.W., Jimenez-Sanchez M., Korolchuk V.I., Lichtenberg M., Luo S., Massey D.C., Menzies F.M., Moreau K., Narayanan U., Renna M. i wsp.: Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 2010; 90:1383–1435
- [79] Remé C.E.: Autophagy in visual cells and pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1977; 16: 807–814
- [80] Rinninella E., Mele M.C., Merendino N., Cintoni M., Anselmi G., Caporossi A., Gasbarrini A., Minnella A.M.: The role of diet, micronutrients and the gut microbiota in age-related macular degeneration: New perspectives from the gut-retina axis. *Nutrients*, 2018; 10: 1677
- [81] Ryhänen T., Hyttinen J.M., Kopitz J., Rilla K., Kuusisto E., Manermaa E., Viiri J., Holmberg C.I., Immonen I., Meri S., Parkkinen J., Eskelinen E.L., Uusitalo H., Salminen A., Kaarniranta K.: Crosstalk between Hsp70 molecular chaperone, lysosomes and proteasomes in autophagy-mediated proteolysis in human retinal pigment epithelial cells. *J. Cell Mol. Med.*, 2009; 13: 3616–3631
- [82] Schnichels S., Hagemann U., Januschowski K., Hofmann J., Bartz-Schmidt K.U., Szurman P., Spitzer M.S., Aisenbrey S.: Comparative toxicity and proliferation testing of aflibercept, bevacizumab and ranibizumab on different ocular cells. *Br. J. Ophthalmol.*, 2013; 97: 917–923
- [83] Sharifi M.N., Mowers E.E., Drake L.E., Macleod K.F.: Measuring autophagy in stressed cells. *Methods Mol. Biol.*, 2015; 1292:129–150
- [84] Szatmári-Tóth M., Kristóf E., Veréb Z., Akhtar S., Facskó A., Fésüs L., Kauppinen A., Kaarniranta K., Petrovski G.: Clearance of autophagy-associated dying retinal pigment epithelial cells – a possible source for inflammation in age-related macular degeneration. *Cell Death Dis.*, 2016; 7: e2367
- [85] Tanida I., Ueno T., Kominami E.: LC3 and autophagy. *Methods Mol. Biol.*, 2008; 445: 77–88
- [86] Thapa R., Bajimaya S., Paudyal G., Khanal S., Tan S., Thapa S.S., van Rens G.: Prevalence of and risk factors for age-related macular degeneration in Nepal: The Bhaktapur Retina Study. *Clin. Ophthalmol.*, 2017; 11: 963–972
- [87] Tomasiak M., Cichacz B., Pedrycz A.: Autofagia – adaptacyjne mechanizmy molekularne w warunkach głodu. *Pol. Hyp. Res.*, 2015; 52: 71–75
- [88] Uddin M.S., Stachowiak A., Mamun A.A., Tzvetkov N.T., Takeda S., Atanasov A.G., Bergantin L.B., Abdel-Daim M.M., Stankiewicz A.M.: Autophagy and Alzheimer’s disease: From molecular mechanisms to therapeutic implications. *Front. Aging Neurosci.*, 2018; 10: 04
- [89] van Deursen J.M.: The role of senescent cells in aging. *Nature*, 2014; 509: 439–446
- [90] Velilla S., García-Medina J.J., García-Layana A., Dolz-Marco R., Pons-Vázquez S., Pinazo-Durán M.D., Gómez-Ulla F., Arévalo J.F., Díaz-Llopis M., Gallego-Pinazo R.: Smoking and age-related macular degeneration: Review and update. *J. Ophthalmol.*, 2013; 2013: 895147
- [91] Wang A.L., Lukas T.J., Yuan M., Du N., Tso M.O., Neufeld A.H.: Autophagy, exosomes and drusen formation in age-related macular degeneration. *Autophagy*, 2009; 5: 563–564
- [92] Wang S., Wang X., Cheng Y., Ouyang W., Sang X., Liu J., Su Y., Liu Y., Li C., Yang L., Jin L., Wang Z.: Autophagy dysfunction, cellular senescence, and abnormal immune-inflammatory responses in AMD: From mechanisms to therapeutic potential. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2019; 2019: 3632169
- [93] Wang Z.V., Rothermel B.A., Hill J.A.: Autophagy in hypertensive heart disease. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 8509–8514
- [94] Wirawan E., Vanden Berghe T., Lippens S., Agostinis P., Vandenaebelle P.: Autophagy: For better or for worse. *Cell Res.*, 2012; 22: 43–61
- [95] Wong W.L., Su X., Li X., Cheung C.M., Klein R., Cheng C.Y., Wong T.Y.: 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–e116
- [96] Xie W., Zhou J.: Aberrant regulation of autophagy in mammalian diseases. *Biol. Lett.*, 2018; 14: 20170540
- [97] Yagasaki R., Nakahara T., Ushikubo H., Mori A., Sakamoto K., Ishii K.: Anti-angiogenic effects of mammalian target of rapamycin inhibitors in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Biol. Pharm. Bull.*, 2014; 37: 1838–1842
- [98] Yang J.S., Lu C.C., Kuo S.C., Hsu Y.M., Tsai S.C., Chen S.Y., Chen Y.T., Lin Y.J., Huang Y.C., Chen C.J., Lin W.D., Liao W.L., Lin W.Y., Liu Y.H., Sheu J.C., Tsai F.J.: Autophagy and its link to type II diabetes mellitus. *Biomedicine*, 2017; 7: 8
- [99] Yang Y.P., Liang Z.Q., Gu Z.L., Qin Z.H.: Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2005; 26: 1421–1434
- [100] Zarbin M.A.: Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.*, 2004; 122: 598–614
- [101] Zhang J., Bai Y., Huang L., Qi Y., Zhang Q., Li S., Wu Y., Li X.: Protective effect of autophagy on human retinal pigment epithelial cells against lipofuscin fluorophore A2E: Implications for age-related macular degeneration. *Cell Death Dis.*, 2015; 6: e1972
- [102] Zhang K., Zhang L., Weinreb R.N.: Ophthalmic drug discovery: Novel targets and mechanisms for retinal diseases and glaucoma. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2012; 11: 541–559
- [103] Zhou H., Zhang H., Yu A., Xie J.: Association between sunlight exposure and risk of age-related macular degeneration: A meta-analysis. *BMC Ophthalmol.*, 2018; 18: 331
- [104] Zhou Z., Doggett T.A., Sene A., Apte R.S., Ferguson T.A.: Autophagy supports survival and phototransduction protein levels in rod photoreceptors. *Cell Death Differ.*, 2015; 22: 488–498

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.