

Streszczenie

Zwyrodnienie plamki żółtej (AMD) jest przewlekłą chorobą oczu, która kojarzona była z osobami po 50 r.ż. Niestety obecnie pojawia się u coraz młodszych osób. W populacji kaukaskiej choroba ta jest najczęstszą przyczyną ślepoty. W dalszym ciągu mechanizm rozwoju AMD nie jest dokładnie poznany, jednak istotnym czynnikiem rozwoju jest stres oksydacyjny, który uznawany jest za główny czynnik ryzyka. Na skutek działania czynników stresowych dochodzi do zmian w budowie plamki żółtej, następnie do podsiatkówkowych wycieków krwi, powstawania druz i niszczenia fotoreceptorów w plamce żółtej. Wyróżnia się dwie formy AMD: suchą, która jest łagodniejszym typem i wysiękową o gwałtowniejszym przebiegu. W niniejszej pracy skupiono się na analizie mokrej formy AMD. Rozwój AMD składa się z czterech etapów: lipofuscynogenezy, druzogenezy, miejscowego stanu zapalnego i neowaskularyzacji. W pierwszym z etapów w nabłonku barwnikowym siatkówki (RPE) jest wytwarzana lipofuscyna, następnie na skutek jej upośledzonego procesu fagocytozy dochodzi do odkładania się złogów i tworzenia się druz. W efekcie ciała obce generują rozwój miejscowego stanu zapalnego wskutek którego w ostatnim etapie dochodzi do tworzenia nowych naczyń krwionośnych pod siatkówką, w obrębie plamki żółtej i do degradacji RPE.

Celami niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie, jak na rozwój AMD wpływa płeć, wiek, dieta, miejsce zamieszkania, choroby współistniejące, nałogi i leki. Ponadto wskazanie, jak stężenia makroelementów (Ca, Mg, Na, K, P), mikroelementów (Mn, Fe, Zn, Cu, Se, Mo, Cr, Li, V, Co, Ag, Ba, Ti, Tl, Sr, Al, Ni, Sn, B, Sb) i pierwiastków toksycznych (Hg, Cd, Pb, As, Be), aktywności enzymatycznych (SOD, CAT, GR, GPx) i nieenzymatycznych (GSH, bilirubina, kwas moczowy, all-trans retinol, alfa-tokoferol) mechanizmów antyoksydacyjnych korelują z tą chorobą. Przeprowadzono też analizę stopnia peroksydacji lipidów (poprzez pomiar stężenia MDA) i poziomu stresu oksydacyjnego (za pomocą koncentracji CP). Zbadano też obecność polimorfizmów w genach: *GSTT1*, *GSTM1* i *IL-4* (wariant *C589T*) i stopień ich korelacji z rozwojem AMD. Innymi celami było przeanalizowanie wzajemnych powiązań pomiędzy badanymi parametrami i wpływem degradacji środowiska w miejscu zamieszkania, na zmiany zachodzące w organizmie i rozwój AMD.

W niniejszej rozprawie zbadano 83 osoby chore ze stwierdzonym wysiękowym AMD oraz 121 zdrowych ochotników. Wszyscy pochodzili z Województwa Lubuskiego. Od każdej z osób, po podpisaniu zgody na badanie, oświadczeń i ankiet, pobrano 2 ml krwi do próbówki zawierającej K₃EDTA do badań molekularnych i 12 ml do fiolek z heparyną litową do pozostałych analiz.

Stężenie pierwiastków chemicznych określono przy użyciu metody ICP-MS. Analizę SOD, CAT, GR, GPx wykonano za pomocą zestawów do oznaczeń kolorymetrycznych firmy Cayman Chemical Company. Stężenie GSH również przeprowadzono używając kompletów odczynników z tej firmy. Do wyznaczenia koncentracji bilirubiny i kwasu moczowego wykorzystano metodę kolorymetryczną, przy użyciu zestawów firmy Cormay. Z kolei metodę HPLC zastosowano do wyznaczenia stężenia all-trans retinolu i alfa-tokoferolu. Koncentracja CP została zbadana przy zastosowaniu testu ELISA firmy Wuhan EIALab Science Co. Do wyznaczenia stężenia MDA wykorzystano metodę tiobarbituranową w zestawie Cayman Chemical Company. Badanie polimorfizmu *Il-4* (wariant *C589T*) przeprowadzono wykorzystując metodę PCR RFLP. Z wyizolowanego z krwi pełnej DNA za pomocą reakcji PCR namnażano gen *Il-4*, a następnie wykorzystując enzym *AvaII*, trawiono go. Produkty rozdzielano na żelu agarozowym, allel *C* typu dzikiego wędrował dalej (bo miał długość 177 pz), niż zmutowany allel *T* (o długości 195 pz). Z kolei polimorfizmy *GSTT1* i *GSTM1* wykrywano przy użyciu metody multiplex PCR. W tej metodzie po izolacji DNA przeprowadzano reakcję PCR, w której stosowano zestaw starterów dla genów *GSTT1*, *GSTM1* i *albuminy* (która była kontrolą prawidłowo przeprowadzonej reakcji).

Na podstawie danych ankietowych wyciągnięto wiele cennych wniosków. Potwierdzono korelację płci żeńskiej z rozwojem AMD ($P=0,001$). 54,22% osób chorych stanowiły kobiety, przy czym wśród kontroli było to 76,03%. Nie stwierdzono korelacji miejsca zamieszkania z zachorowaniem na tę chorobę oczu ($P=0,304$). Jednakże zgodnie z danymi literaturowymi, zauważono, że wiek jest znaczącą statystycznie zmienną ($P<0,001$). Wśród cierpiących na AMD najczęściej było osób po 50. roku życia (97,59%), z kolei największy odsetek osób zdrowych był w przedziale wiekowym 31-40 lat (28,33%). Co ciekawe, wskazano nawet istotne statystycznie różnice, porównując stopień wykształcenia ($P<0,001$), ponieważ chorzy najczęściej deklarowali wykształcenie średnie (44,58%), a osoby zdrowe – ukończone studia (52,94%). Jednakże nie tyle wykształcenie ma wpływ na rozwój choroby, co rodzaj wykonywanej pracy i narażenie na czynniki, jakie tam występuje. Ponadto

potwierdzono istotną rolę czynnika BMI ($P < 0,001$). Chore osoby charakteryzowały się wyższą wartością tego czynnika, co wskazywało na nadwagę ($26,40 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$), a przeciętny wynik w grupie kontrolnej był w granicach normalnej wartości ($24,71 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$). Podobnie analiza diety wskazała istotne statystycznie różnice, ponieważ osoby chore częściej zgłaszały stosowanie specjalnego sposobu odżywiania ($21,69\%$), niż zdrowe (5%). Prawdopodobnie było tak dlatego, że cierpiący na AMD mieli inne choroby współistniejące, przez co mogli wymagać innego żywienia, co pośrednio mogło mieć wpływ na rozwój AMD. Tak, jak w wielu innych pracach, wskazano ważną rolę palenia papierosów, tak obecnego ($P = 0,016$) jak i w przeszłości ($P = 0,10$). Liczne szkodliwe składniki dymu tytoniowego niekorzystnie wpływają na wiele narządów, w tym na oczy, przez co promują rozwój AMD. Istotne statystycznie różnice zaobserwowano też przy analizie przyjmowanych leków i suplementów diety ($P = 0,003$). Tak, jak spodziewano się, osoby cierpiące na AMD przyjmowały więcej tego typu preparatów ($2,18 \pm 1,55$), niż zdrowe ($1,53 \pm 1,31$), co wynikało w dużej mierze z obecności innych chorób współistniejących. Co ciekawe, narażenie na czynniki szkodliwe także wykazywało istotne statystycznie różnice ($P < 0,001$), jednak to w grupie kontrolnej badani częściej uskarżali się, niż chorzy (czynniki biologiczne $33,33\%$). Lecz najczęściej były to czynniki, które nie są kojarzone z rozwojem AMD. Z kolei chorzy najczęściej zgłaszali narażenie na czynniki chemiczne ($30,77\%$). W zakresie chorób współistniejących wskazano istotne statystycznie różnice w obydwu grupach ($P < 0,001$). Zgodnie z przewidywaniami i doniesieniami literaturowymi, osoby cierpiące na AMD zgłaszały znacznie więcej patologicznych stanów (średnio $2,83$), niż osoby z grupy kontrolnej ($0,34$).

Analiza stężenia pierwiastków chemicznych w grupie osób chorych wykazała, że największy wpływ na gospodarkę pierwiastkową miały Mn i P. Z kolei u osób zdrowych najistotniejsze były Pb, Na, Cr, Mn i Ba. Wynika to z częstotliwości korelacji, w których pierwiastki analizowane uczestniczyły.

W analizie enzymatycznych parametrów antyoksydacyjnych istotne statystycznie różnice wykazano dla SOD ($P < 0,001$), CAT ($P < 0,001$) i GPx ($P < 0,001$). Parametry te znamienne różniły się pomiędzy analizowanymi grupami. Dysmutaza osiągnęła wyższe stężenie wśród osób zdrowych ($Me = 5,716 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), a u osób chorych ($Me = 0,537 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$). Z kolei katalaza u chorych miała wyższą aktywność ($Me = 54,33 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$), niż u osób zdrowych ($Me = 11,50 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$). Podobnie peroksydaza glutationowa u cierpiących

na AMD osiągnęła wyższą aktywność ($Me=123,9 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$), niż u zdrowych ($Me=11,46 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Dialdehyd malonowy (MDA) również wykazywał istotne różnice ($P=0,003$). MDA osiągnął wyższe stężenie u osób zdrowych ($Me=5,320 \mu\text{M}$), niż u chorych na AMD ($Me=3,832 \mu\text{M}$).

W obrębie nieenzymatycznych parametrów antyoksydacyjnych istotne statystycznie różnice zaobserwowano dla bilirubiny ($P<0,001$), kwasu moczowego ($P=0,018$), all-trans retinolu ($P<0,001$) i alfa-tokoferolu ($P<0,001$). Wśród osób chorych wyższe stężenie miały bilirubina ($Me=1,147 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$), a u osób zdrowych ($Me=0,126 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$), alfa-tokoferol ($Me=16,960 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), a u zdrowych ($Me=12,489 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Kwas moczowy również miał wyższe stężenie u chorych osób ($Me=9,393 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$), w porównaniu ze zdrowymi ($Me=7,515 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$). Z kolei w grupie kontrolnej wyższa była koncentracja all-trans retinolu ($Me=0,184 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) niż u chorych $Me=0,149 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Białko ostrej fazy CP także wykazywało istotne statystycznie różnice w obydwu badanych grupach ($P<0,001$); stężenie tego parametru było wyższe wśród osób zdrowych ($Me=8,266 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), niż wśród chorych na AMD $Me=3,731 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

W grupie osób chorych wykazano wiele korelacji pomiędzy aktywnością GPx i SOD ($r=0,301$), aktywnością GSH i stężeniem CP ($r=0,303$), stężeniem alfa-tokoferolu i all-trans retinolu ($r=0,365$), GSH i bilirubiny ($r=0,317$). Wykazano też odwrotnie proporcjonalną zależność pomiędzy stężeniem bilirubiny i aktywnością SOD ($r=-0,300$). Wzajemne powiązania mechanizmów antyoksydacyjnych wynika z pełnionej przez nie funkcji. Poza tym porównanie pierwiastków z parametrami antyoksydacyjnymi wskazało w grupie chorych na AMD na kilka ważnych zależności, głównie pomiędzy stężeniem i aktywnością Fe i CAT ($r=0,324$), stężeniem P i alfa-tokoferolu ($R=0,359$), Na i GSH ($r=0,343$), Li i GSH ($r=0,328$) oraz Ca i GSH ($r=0,318$), a także odwrotnie proporcjonalną pomiędzy Al i alfa-tokoferolem ($r=-0,329$). Wśród zdrowych osób było ich znacznie mniej, jednak najsilniejszą zależność stwierdzono pomiędzy stężeniem GSH i aktywnością SOD ($r=0,704$), a także koncentracją GSH i aktywnością CAT ($r=0,460$). Poza tym odwrotnie proporcjonalną korelację wykazano pomiędzy stężeniem CP i bilirubiny ($r=-0,311$). Z kolei znacznie więcej korelacji zaobserwowano, porównując stężenie pierwiastków chemicznych; wśród osób zdrowych

zauważono zależności o słabej sile ($0,5 > r > 0,3$), które wskazały, jaki wpływ na organizm mają pierwiastki czerpane z pokarmu i środowiska na obronę antyoksydacyjną organizmu.

Wykazano także podłoże genetyczne badanej choroby. Zmiany w genie *Il-4* wykazały istotne statystycznie różnice ($P=0,002$) w obrębie badanych osób. Zmieniony allel częściej manifestował się u osób chorych i korelował ze zwiększonym stresem oksydacyjnym. Zauważono także statystycznie istotne różnice pomiędzy osobami o genotypach *CC*, *TT* i *CT*, a stężeniem Sr. Pierwiastek ten osiągnął najwyższe stężenie u osób posiadających dwa zmienione allele *T* ($Me=0,03125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Z kolei u osób mających niezmieniony genotyp *CC* stężenie Sr było najniższe ($Me=0,01815 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), a u badanych o genotypie *CT* wynik ten był pośredni ($Me=0,02381 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Analiza korelacji pomiędzy badanymi parametrami wskazała zależności dla osób o genotypie *TT* pomiędzy: Cu i Co ($r=0,705$), Cd i Mn ($r=0,873$), Be i kwasem moczowym ($r=-0,810$), Cr i CP ($r=0,794$). U homozygot zaś zależności w genotypie *CC* stwierdzono pomiędzy Ni i Co ($r=0,719$) oraz Co i Mn ($r=0,977$). A dla osób o genotypie *CT* pomiędzy Co i Mn ($r=0,897$), As i Be ($r=1,000$) oraz P i alfa-tokoferolem ($r=0,840$).

Nie wskazano istotnych różnic pomiędzy badanymi w tym zakresie polimorfizmami w genach *GSTT1* i *GSTM1* ($P=0,076$), przez co ten czynnik nie mógł być łączony z rozwojem AMD. Analiza stężenia pierwiastków, nieenzymatycznych antyoksydantów, aktywności enzymów, koncentracji MDA i CP wskazała istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami o różnych genotypach *GST* dla all-trans retinolu ($P=0,025$). Grupa o pierwotnym genotypie *GSTT1(+)/GSTM1(+)* miała medianę stężenia na poziomie $0,141 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Badani o obydwu zmutowanych genach: *GSTT1(-)/GSTM1(-)* mieli niewiele niższą medianę ($Me=0,129 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Z kolei najwyższe i najniższe stężenie było u heterozygot i ich mediana wynosiła $0,162 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dla *GSTT1(+)/GSTM1(-)* oraz $0,097 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ u osób o genotypie *GSTT1(-)/GSTM1(+)*. Analiza korelacji pomiędzy badanymi parametrami u osób o genotypie *GSTT1(+)/GSTM1(-)* pokazała najistotniejsze pomiędzy stężeniem i aktywnością parametrów: Mg i Na ($r=0,858$), Fe i GR ($r=-0,733$), Cu i GR ($r=0,748$), Zn i SOD ($r=0,804$), Zn i MDA ($r=0,731$), Cd i SOD ($r=0,807$). U osób o układzie genetycznym *GSTT1(+)/GSTM1(+)* stwierdzono najważniejsze zależności pomiędzy Ni i Mn ($r=0,939$) oraz Ca i GSH ($r=0,710$). Z kolei analiza dla badanych o genotypach *GSTT1(-)/GSTM1(+)* i *GSTT1(-)/GSTM1(-)* nie dała jednoznacznych wyników, z uwagi na niewielkie grupy osób

posiadających takie układy genetyczne. W efekcie wskazano bardzo dużo zależności, jednakże nie pozwoliło to na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków.

Podsumowując, wykazano, jak istotny jest wpływ zanieczyszczenia środowiska na związek z AMD, co stwierdzono na podstawie obserwacji narażenia na czynniki szkodliwe w pracy ($P < 0,001$) oraz palenie papierosów ($P = 0,010$). Istotnym faktem była nieprawidłowa dieta i nadwaga ($P < 0,001$), które sprzyjały kumulowaniu się lipofilnych substancji toksycznych oraz fakt, że rozwojowi AMD sprzyjał starszy wiek ($P < 0,001$). Porównawcza analiza osób zdrowych i chorych potwierdziła istotny udział gospodarki pierwiastkowej na rozwój AMD. Najistotniejszym z makroelementów był P, który osiągnął wyższe stężenie u osób zdrowych, jednak jego rola w rozwoju AMD wymaga dalszych analiz. Z kolei z mikroelementów to Mn był najważniejszy i jego niskie stężenie u chorych wiązało się z osłabioną ochroną antyoksydacyjną. Spośród pierwiastków toksycznych najważniejszymi były Pb i As, które u zdrowych osiągały wyższe stężenie, wynikające prawdopodobnie z faktu skumulowania w narządach u chorych na AMD, wskutek czego były one niewykrywalne w osoczu. Z kolei wśród enzymatycznych parametrów antyoksydacyjnych najważniejsze znaczenie miały SOD ($P < 0,001$), CAT ($P < 0,001$), GPx ($P < 0,001$). Chorzy charakteryzowali się wyższą ich aktywnością, potwierdzając podwyższony poziom stresu oksydacyjnego. Spośród czynników nieenzymatycznych nie można jednoznacznie określić potencjalnej roli tych czynników w monitorowaniu rozwoju AMD, z uwagi na ich niską specyficzność i wzrost ich stężenia przy wielu chorobach. MDA ($P = 0,003$) i CP ($P < 0,001$) były istotnymi parametrami, jednak to u osób zdrowych ich stężenie były wyższe. Prawdopodobnie wynikało to z działania innych stresorów, przez co i te parametry nie mogły być powiązane z AMD.