

## STRESZCZENIE

Jednym z poważniejszych powodów patofizjologii zaćmy jest zanieczyszczenie środowiska prowadzące do powstawania nadmiaru reaktywnych form tlenu i stresu oksydacyjnego. Blokowanie mechanizmów antyoksydacyjnych i akumulacja niektórych pierwiastków chemicznych działa toksycznie na komórki. Udowodniono, że przyspieszają one rozwój zaćmy. Wskazuje się również na istotne znaczenie zmian polimorficznych w niektórych genach, w tym m.in. w *GST*, *CRYAB* oraz *XRCCI*. Zarazem wykazano, że istnieją typy zaćmy, które są dziedziczne.

Głównym celem niniejszej rozprawy było przedstawienie pozyskanych doświadczalnie danych dotyczących etiologii zaćmy i jej diagnostyka oraz określenie wpływu zmian polimorficznych, stresorów środowiskowych i mechanizmów antyoksydacyjnych na kondycję oka. Przeprowadzone badania mogą pomóc w znalezieniu odpowiedzi na pytanie, jaki wpływ na zachorowanie na zaćmę mają w populacji polskiej takie czynniki jak: enzymy antyoksydacyjne, pierwiastki chemiczne, polimorfizmy genetyczne i bodźce wewnętrzne oraz jak środowisko i korelacje pomiędzy poszczególnymi czynnikami wpływa na patofizjologię powodującą zmętnienie soczewki.

W ramach badań sformułowano następujące cele szczegółowe:

1. ocena wpływu czynników wewnętrznych (WHO 2016) na rozwój zaćmy,
2. analiza możliwości obronnych organizmu w stanie zaćmy (SOD, CAT, GPx, GR, CP, lipoperoksydacja),
3. zbadanie wpływu pierwiastków chemicznych na zmiany patofizjologiczne w zaćmie (Mn, Fe, Zn, Cu, Se, Mo, Cr, V, Co, Ag, Ba, Tl, Sr, Al., Ni, Sn, Sb),
4. ocena wpływu zmian patofizjologicznych na zmiany w zaćmie (*GSTT*, *GSTM*, *CRYAB*, *XRCCIArg399Gln*).

Analizując zebrane dane dotyczące zmian polimorficznych oraz wpływu stresorów środowiskowych i mechanizmów antyoksydacyjnych w zaćmie, można wnioskować, że głównymi przyczynami biologicznej etiologii zaćmy są: nadmiar reaktywnych form tlenu, stres oksydacyjny, niektóre pierwiastki chemiczne oraz uwarunkowania genetyczne spowodowane zmianami polimorficznymi w genie *GST*. Ponadto stwierdzono występowanie istotnych różnic pomiędzy grupą chorych, a zdrowych w obszarach dotyczących:

1. Danych socjodemograficznych zawartych w ankiecie (styl życia, stan zdrowia badanych, obciążenia genetyczne).
2. Aktywności mechanizmów antyoksydacyjnych (SOD, CAT, GPx, GR).

3. Stężenia pierwiastków chemicznych z różnych grup fizjologicznego oddziaływania.
4. Korelacji pomiędzy czynnikami enzymatycznymi i nieenzymatycznymi a pierwiastkami chemicznymi.
5. Zmianami polimorficznymi w trzech genach: *GST*, *CRYAB*, *XRCC1*.

Na podstawie badań ankietowych wykazano, że wskaźnik BMI jest nieco wyższy w grupie chorych ( $27.77 \pm 5.08 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ ) niż w grupie osób zdrowych ( $25.23 \pm 4.14 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ ). Test U Manna-Whitneya potwierdził występowanie statystycznie istotnej różnicy ( $p=0.002$ ) w zakresie analizowanego współczynnika. Dokonując analizy obciążenia w zakresie występowania narażenia na czynniki szkodliwe, ustalono, iż więcej osób narażonych na nie było w grupie zdrowych, bo aż 60.34%, zaś w grupie chorych to 37.93%. Jednocześnie wykazano istotną statystycznie różnicę (test  $\chi^2$  na poziomie  $p=0.016$ ). Okazało się jednak, że to wśród osób chorych więcej było narażonych na działanie czynników chemicznych (40.91 % chorzy, a tylko 17.14% zdrowi;  $p=0.002$ ). Porównawcze badanie wykazało istotne różnice dla: CAT ( $p<0.001$ ), SOD ( $p=0.002$ ), GR ( $p<0.001$ ), GSH ( $p<0.001$ ) oraz MDA ( $p<0.001$ ). Odnotowano wyższą aktywność czynników antyoksydacyjnych w przypadku osób chorujących na zaćmę przy: GR ( $\bar{x}=0.017$  w grupie osób zdrowych vs.  $\bar{x}=0.911$  w grupie osób chorych) oraz GSH (zdrowi  $\bar{x}=10.005$  vs. chorzy  $\bar{x}=16.963$ ).

Przeprowadzono analizę dotyczącą korelacji pomiędzy parametrami antyoksydacyjnymi. W grupie chorych na zaćmę zaobserwowano jedną istotną, wprost proporcjonalną korelację wyników dotyczącą GPx oraz SOD. Analogicznie przeprowadzono korelacje w grupie osób zdrowych, gdzie również zauważono jedną różnicę dotyczącą tych samych parametrów, tj. GPx i SOD. Niestety żadna z tych korelacji nie posiadała siły statystycznej ( $R<0.3$ ).

Porównawcza analiza stężenia pierwiastków chemicznych z grupy mikroelementów we krwi osób chorych i zdrowych wykazała znaczne różnice statystyczne w przypadku: Mn, Fe, Zn, Cu, Se, Mo, Cr, V, Co, Ag, Ba, Tl, Sr, Al, Ni, Sn ( $p<0.001$ ) oraz Sb ( $p=0.009$ ). Natomiast istotnej rozbieżności pomiędzy stężeniami pierwiastka chemicznego we krwi osób z obu grup nie stwierdzono w przypadku B. W odniesieniu do makroelementów we krwi badanych z obu grup wykazano istotne statystycznie różnice dla: Ca, Mg, Na, K i P ( $p<0.001$ ). Dowiedziono istnienia statycznie istotnych różnic stężenia we krwi następujących pierwiastków toksycznych: Hg, Cd, Pb i As ( $p<0.001$ ). W przypadku Cd i As stężenia tych pierwiastków chemicznych we krwi osób chorych były wyraźnie wyższe niż w przypadku osób z grupy osób zdrowych (dla As  $\bar{x}=0.002$  w grupie zdrowych ochotników vs.  $\bar{x}=0.704$  w grupie osób chorujących na zaćmę; dla Cd  $\bar{x}=0.000$  zdrowi vs.  $\bar{x}=0.001$  chorzy).

Zbadano występowanie związków pomiędzy stężeniami poszczególnych czynników o działaniu antyoksydacyjnym a stężeniami analizowanych pierwiastków chemicznych. Po dokonaniu analizy w grupie chorych ustalono trzy istotne korelacje dotyczące Ag i SOD, Se i MDA oraz Sb i MDA. To korelacje wprost proporcjonalne, ale o słabej sile. Zaś w grupie zdrowych zidentyfikowano cztery różne korelacje: Sn i GR – korelacja proporcjonalna, Cu i CAT oraz Pb i CAT – korelacje odwrotnie proporcjonalne.

Na podstawie analiz przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy można potwierdzić wpływ stresorów środowiskowych i mechanizmów antyoksydacyjnych oraz zmian polimorficznych na zachorowalność na zaćmę. Wnioskuje się, że:

1. Zanieczyszczenie środowiska ma negatywny wpływ na kondycję soczewki.
2. Utrzymanie aktywnego trybu życia i stosowanie diety może przyczynić się do spowolnienia procesów prowadzących do zaćmy.
3. Spadek aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i karalazy może prowadzić do powstania zmętnienia soczewki, ponieważ enzymy te nie występują na poziomie pozwalającym na niwelowanie nadmiaru reaktywnych form tlenu i zachowywanie równowagi oksydacyjnej.
4. Wnioskuje się, iż hamowanie rozwoju zaćmy jest możliwe dzięki glutationowi, który jest trzecią linią obrony antyoksydacyjnej, ponieważ występuje na wyższym poziomie w grupie chorych na zaćmę, utleniając nadmiary RFT.
5. Pierwiastki chemiczne z poszczególnych grup fizjologicznego oddziaływania, tj. makroelementy, mikroelementy i metale ciężkie mają wpływ na kondycję soczewki ludzkiego oka. Dzięki analizie interakcji pomiędzy pierwiastkami chemicznymi stwierdzono występowanie wielu korelacji (o różnej sile) pomiędzy pierwiastkami chemicznymi.
6. Zmiany polimorficzne w genie *GST* mają bezpośredni wpływ na kondycję wzroku oraz przyczyniają się do powstawania zaćmy w badanej populacji. W tym aspekcie wykazano istotne różnice.
7. Nie określono istotnego znaczenia w przypadku polimorfizmów genów *CRYAB* i *XRCCI*, a zachorowalnością na zaćmę.

Przeprowadzone badania umożliwią poznanie powiązań pomiędzy zachorowalnością na zaćmę a uwarunkowaniami środowiskowymi, wewnętrznymi i immunogenetycznymi, omówionymi w ramach tej pracy.

## SUMMARY

One of the major causes of cataract pathophysiology is environmental pollution leading to the formation of excess reactive oxygen species and oxidative stress. Blocking of antioxidant mechanisms and accumulation of certain chemical elements have toxic effects on cells. They have been proven to accelerate the development of cataract. Polymorphic changes in some genes, including *GST*, *CRYAB* and *XRCC1*, are also indicated to be important. At the same time it has been shown that there are types of cataract that are inherited.

The main purpose of this dissertation was to present experimentally acquired data on cataract etiology and its diagnostics, and to determine the influence of polymorphic changes, environmental stressors, and antioxidant mechanisms on eye condition. The research conducted may help to answer the question of how factors such as antioxidant enzymes, chemical elements, genetic polymorphisms and internal stimuli influence cataract incidence in the Polish population, and how the environment and correlations between individual factors affect the pathophysiology causing lens opacity.

Specific objectives have been formulated within the study including the following:

1. assessment of the influence of intrinsic factors (WHO 2016) on cataract development,
2. analysis of the body's defensive capabilities in the cataract state (SOD, CAT, GPx, GR, CP, lipoperoxidation),
3. examination of the effect of chemical elements on pathophysiological changes in cataract (Mn, Fe, Zn, Cu, Se, Mo, Cr, V, Co, Ag, Ba, Tl, Sr, Al., Ni, Sn, Sb),
4. assessing the impact of pathophysiological changes on cataract lesions (*GSTT*, *GSTM*, *CRYAB*, *XRCC1Arg399Gln*).

Analyzing the collected data on polymorphic changes and the influence of environmental stressors and antioxidant mechanisms in cataract, it can be concluded that the main causes of biological etiology of cataract are the following: the excess of reactive oxygen species, oxidative stress, some chemical elements and genetic conditions caused by polymorphic changes in the *GST* gene. Moreover, significant differences were found between the patient and control groups in the areas concerning:

1. Sociodemographic data included in the questionnaire (lifestyle, health status of subjects, genetic load).
2. Activities of antioxidant mechanisms (SOD, CAT, GPx, GR).
3. Concentrations of chemical elements from different groups of physiological effects.
4. Correlations between enzymatic and non-enzymatic factors and chemical elements.

## 5. Polymorphic changes in three genes: *GST*, *CRYAB*, *XRCC1*.

The questionnaire analysis showed that BMI was slightly higher in the group of patients ( $27.77 \pm 5.08 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ ) than in the group of healthy subjects ( $25.23 \pm 4.14 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ ). Mann-Whitney U test confirmed statistically significant difference ( $p=0.002$ ) in the analyzed coefficient. Analysis of the burden of exposure to harmful factors showed that more people were exposed to harmful factors in the healthy group (60.34%) and 37.93% in the sick group. At the same time, a statistically significant difference was shown (chi2 test at  $p=0.016$ ). However, it turned out that it was among sick people that more were exposed to chemical agents (40.91% sick and only 17.14% healthy;  $p=0.002$ ). A comparative study showed significant differences for: CAT ( $p<0.001$ ), SOD ( $p=0.002$ ), GR ( $p<0.001$ ), GSH ( $p<0.001$ ) and MDA ( $p<0.001$ ). Higher activity of antioxidant factors was noted in cataract patients at: GR ( $\bar{x}=0.017$  in the group of healthy subjects vs.  $\bar{x}=0.911$  in the group of sick subjects) and GSH (healthy  $\bar{x}=10.005$  vs. sick  $\bar{x}=16.963$ ).

An analysis was performed on the correlation between antioxidant parameters. In the group of sick subjects, one significant, directly proportional correlation of GPx and SOD results was observed. Similarly, correlations were performed in the group of healthy subjects, where one difference was also observed concerning the same parameters, i.e. GPx and SOD. Unfortunately, none of these correlations had statistical power ( $R<0.3$ ).

Comparative analysis of micronutrient concentrations in blood of sick and healthy subjects showed significant statistical differences for: Mn, Fe, Zn, Cu, Se, Mo, Cr, V, Co, Ag, Ba, Tl, Sr, Al, Ni, Sn ( $p<0.001$ ) and Sb ( $p=0.009$ ). However, no significant difference between the concentrations of the element in the blood of subjects from both groups was found in case of B. With regard to macronutrients in the blood of subjects from both groups, statistically significant differences were found for: Ca, Mg, Na, K and P ( $p<0.001$ ). Statistically significant differences in blood concentrations of the following toxic elements were proved: Hg, Cd, Pb and As ( $p<0.001$ ). In case of Cd and As, blood concentrations of these elements were significantly higher in the sick subjects than in control subjects (for As  $\bar{x}=0.002$  in the group of healthy volunteers vs.  $\bar{x}=0.704$  in sick subjects; for Cd  $\bar{x}=0.000$  healthy vs.  $\bar{x}=0.001$  sick).

The relationships between the concentrations of individual antioxidant factors and the concentrations of the analysed elements were investigated.

Three significant correlations were found between Ag and SOD, Se and MDA, and Sb and MDA. These are directly proportional correlations, but of weak strength. In contrast, four

different correlations were identified in the healthy group: Sn and GR-a proportional correlation, Cu and CAT, and Pb and CAT-inversely proportional correlations.

Based on the analyses performed in this dissertation, the influence of environmental stressors and antioxidant mechanisms and polymorphic changes can be confirmed. They show that:

1. Environmental pollution has a negative effect on the condition of the lens.
2. Maintaining an active lifestyle and following a diet can help slow down the processes that lead to cataracts.
3. A decrease in superoxide dismutase and catalase activity can lead to lens opacity because these enzymes are not present at levels that allow them to nullify excess reactive oxygen species and maintain oxidative balance.
4. It is concluded that inhibition of cataract development is possible due to glutathione, which is the third line of antioxidant defense, as it is present at higher levels in cataract patients, oxidizing excess RFTs.
5. Chemical elements from different groups of physiological influence, i.e. macroelements, microelements and heavy metals influence the condition of the human eye lens. Thanks to the analysis of interactions between chemical elements, many correlations (of different strength) between elements were found.
6. Polymorphic changes in the *GST* gene have a direct impact on visual condition and contribute to cataract formation in the study population. Significant differences were demonstrated in this aspect.
7. *CRYAB* and *XRCCI* gene polymorphisms are not significant for cataract incidence in the population under the examination.

This study will provide insight into the association between cataract incidence and the environmental, intrinsic and immunogenetic determinants discussed within this dissertation.