



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανίχνευση και αξιολόγηση προγνωστικής αξίας DNA
πολυμορφισμού στο αίμα ασθενών με ηλικιακή εκφύλιση
ωχράς κηλίδας**

POST GRADUATE THESIS

**Detection and evaluation of the prognostic value of a DNA
polymorphism in patients with age-related macular degeneration**



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Λευθεριώτου Τατιανή/ Leftheriotou Tatiani

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF SUPERVISOR

Καρκαλούσος Πέτρος/Karkalousos Petros

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Postgraduate program:
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

Detection and evaluation of the prognostic value of a DNA polymorphism

in patients with age-related macular degeneration

Leftheriotou Tatiani

AM: Dml 18007

Email: tleftheriotou@gmail.com

FIRST SUPERVISOR:

Petros Karkalousos

SECOND SUPERVISOR:

Christos Kroupis

THIRD SUPERVISOR:

Eirini Chatziralli

AIGALEO 2022

Δήλωση περί λογοκλοπής

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Τατιανή Λευθεριώτου του Ευσταθίου με αριθμό μητρώου 18007 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση» του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι 12 μήνες και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.

Η Δηλούσα

Τατιανή Λευθεριώτου

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κ. Καρκαλούσο Π., Επίκουρο καθηγητή Βιολογίας- Κλινικής Χημείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής(Π.Α.Δ.Α), τον κ. Κρούπη Χ., Αναπληρωτή Καθηγητή της Ιατρικής σχολής Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.)- Κλινικής Βιοχημείας και Μοριακής Διαγνωστικής του Αττικού νοσοκομείου και την κα. Χατζηράλλη Ε., Επίκουρη Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας, Ιατρική Σχολή Αθηνών, Β' Πανεπιστημιακή Οφθαλμολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, ΠΓΝ «Αττικόν» για την εμπιστοσύνη και την προσοχή που έδειξαν, όσον αφορά τη διεκπεραίωση αυτής της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας.

Αφιέρωσεις

Στο σύζυγο και τα παιδιά μου. Η στήριξη, η υπομονή και η ενθάρρυνσή τους ήταν πολύτιμοι σύμμαχοι κατά τη διάρκεια αυτής της απαιτητικής και ιδιαίτερης περιόδου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας (HEΩ) αποτελεί μία πολυπαραγοντική και εκφυλιστική νόσο του οφθαλμού που αφορά ασθενείς άνω των 50 ετών και μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική απώλεια της κεντρικής όρασης. Αν και η αιτιολογία της πάθησης δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί, πλήθος γονιδίων έχουν ενοχοποιηθεί για τη συσχέτισή τους με την HEΩ, ενώ πρόσφατα δεδομένα αλληλούχισης αποκάλυψαν την συμμετοχή πολλών χρωμοσωμικών τόπων στην HEΩ. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την HEΩ παρουσιάζει ο τόπος όπου εντοπίζονται τα γονίδια *TIMP3/SYN3*. Στον συγκεκριμένο γενετικό τόπο έχουν ανιχνευτεί αρκετοί σημειακοί πολυμορφισμοί (SNPs) κάποιοι από τους οποίους σχετίζονται με την εμφάνιση της HEΩ. Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της κατανομής των διαφόρων γονοτύπων του μη κωδικοποιητικού πολυμορφισμού rs5754227, chr22:32709831 (GRCh38.p13) στους ασθενείς με HEΩ και η συσχέτιση της κατανομής αυτής με τη μορφή της νόσου ανά φύλο και ηλικία των ασθενών.

Υλικά-Μέθοδοι: Στη μελέτη συμμετείχαν 21 ασθενείς με HEΩΚ ξηράς μορφής και 19 ασθενείς με HEΩΚ υγρής μορφής, ελληνικής καταγωγής επιλεγμένοι κατόπιν οφθαλμολογικής αξιολόγησης και συλλογής κλινικών δεδομένων. Μετά την έγγραφη συναίνεση των ασθενών και την συλλογή περιφερικού αίματος τους ακολούθησε απομόνωση DNA και στη συνέχεια ο ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχός του. Επιπλέον σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι η ανάπτυξη αξιόπιστης και ευαίσθητης μεθοδολογίας αλληλούχισης κατά Sanger για την ανίχνευση του εξεταζόμενου πολυμορφισμού στους ασθενείς με HEΩ. Έτσι πραγματοποιήθηκε *in silico* ανάλυση και σχεδιασμός των κατάλληλων PCR εκκινήτων και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αλληλούχισης κατά Sanger για την αξιόπιστη ανίχνευση του πολυμορφισμού rs5754227. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τα λογισμικά SPSS και SNPSTATs.

Αποτελέσματα: Οι δύο ομάδες ασθενών δε διέφεραν στατιστικά για το φύλο και την ηλικία. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η κατανομή των γονοτύπων ακολουθεί την κατανομή κατά Hardy-Weinberg ($p > 0,05$) συνεπώς η γονοτύπωση είναι έγκυρη. Στο σύνολο των ασθενών το πιο συχνό αλληλίο ήταν το A με ποσοστό εμφάνισης 86% και το υπόλοιπο ήταν G (14%). Ο πιο συχνός γονότυπος ήταν ο A/A (72%), ακολουθούμενος από το γονότυπο A/G (28%). Πιο αναλυτικά, τα ποσοστά εμφάνισης των A και G αλληλίων στην ομάδα ασθενών με ξηρή HEΩ ήταν 88% και 12% αντίστοιχα, ενώ στην ομάδα ασθενών με υγρή HEΩ τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 84% και 16%. Όσον αφορά τα ποσοστά εμφάνισης των A/A και A/G γονοτύπων, στην ομάδα ασθενών με ξηρή HEΩ ήταν 76% και 24% αντίστοιχα ενώ στην ομάδα ασθενών με υγρή HEΩ τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 68% και 32%. Ο πολυμορφισμός εμφανίζει κίνδυνο ανάπτυξης της υγρής (32%) έναντι της ξηράς HEΩ (24%), ωστόσο η πιθανότητα αυτός ο

γονότυπος να αποτελεί κίνδυνο για ανάπτυξη της υγρής μορφής έχει $OR=1,77$ (95% CI 0,40-7,81) με διαστήματα εμπιστοσύνης που περιλαμβάνουν το 1 συνεπώς δεν είναι στατιστικά σημαντικός ($P=0,45$).

Συμπεράσματα: Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, συνάδουν με μεγάλη πρόσφατη ευρωπαϊκή μελέτη όσον αφορά το ποσοστό εμφάνισης του πιο συχνού αλληλίου A αλλά ο πολυμορφισμός G αντίκειται στα ποσοστά κατανομής του στην υγρή μορφή της ΗΕΩ, όπου είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερος.

ABSTRACT

Introduction: Age-related macular degeneration (AMD) is a multifactorial and degenerative eye disease that affects patients over 50 years and can lead to significant loss of vision. Although the etiology of the disease has not been fully clarified, several studies imply the implication of numerous genes in AMD pathogenesis, whereas recent sequencing data show that, many chromosomal sites are involved in AMD pathogenesis. Of particular interest is the chromosomal loci, where the *TIMP3* / *SYN3* genes are located. Several SNPs have been detected in this loci and some of them seems to be involved in AMD pathogenesis. In this study we aimed to investigate the distribution of several genotypes of the non-coding *SYN3* rs5754227 polymorphism, chr22:32709831 (GRCh38.p13) among AMD patients and the correlation of this distribution among the sex and age of the patients.

Materials and Methods: The study cohort consisted of 21 patients with dry AMD and 19 patients with wet AMD. The patients were selected after ophthalmic evaluation and a detailed database of their clinicopathological characteristics was created for the statistical analysis. After the written consent of the patients, DNA was isolated from peripheral blood followed by its qualitative and quantitative control. An additional purpose of the study was the development of a reliable and sensitive Sanger sequencing methodology for the detection of the examined polymorphism in patients with AMD. Thus, we initially performed *in silico* analysis and design of suitable PCR primers and then we proceeded to optimization of Sanger sequencing conditions for reliable rs5754227 polymorphism detection.

Results: The two groups of patients weren't statistically different according to sex and age. Our genotyping results were valid since they followed Hardy-Weinberg distribution ($p > 0.05$). In the sum of the patients, the most frequent allele was A with occurrence rate 86% while the rest was G (14%). The most frequent genotype was A/A (72%) followed by A/G (28%). In more detail, the occurrence rates for the alleles A and G in patients with dry AMD were 88% and 12% respectively, while in patients with wet AMD were 84% and 16% respectively. Regarding the occurrence rates of genotypes A/A and A/G in patients with dry AMD were 76% and 24% respectively and in patients with wet AMD the equivalent rates were 68% and 32% respectively. The polymorphism shows an increased percentage in wet AMD (32%) compared to dry AMD (24%), however the OR=1.77 (95%CI 0.40-7.81) has confidence intervals that include 1 and therefore, no statistical significance.

Conclusion: The results of the present study are in accordance with a large recent European study regarding the A allele being the major one however, the percentage of G polymorphism is statistically significant smaller compared to dry AMD.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	18
1.1 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΟΦΘΑΛΜΟΥ	18
1.1.1 <i>Ινώδης χιτώνας</i>	19
1.1.2 <i>Αγγειώδης χιτώνας</i>	19
1.1.3 <i>Αμφιβληστροειδής χιτώνας</i>	20
1.1.4 <i>Ωχρά κηλίδα</i>	22
1.2 ΗΛΙΚΙΑΚΗ ΕΚΦΥΛΙΣΗ ΩΧΡΑΣ ΚΗΛΙΔΑΣ (HEΩ)	23
1.2.1 <i>Ξηρή μορφή HEΩ</i>	25
1.2.2 <i>Υγρή μορφή HEΩ</i>	27
1.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ HEΩ	28
1.3.1 <i>Επιδημιολογία της HEΩ</i>	28
1.3.2 <i>Παράγοντες κινδύνου</i>	29
1.4 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ HEΩ	30
1.4.1 <i>Μεταβολές στο χοριοειδή χιτώνα</i>	30
1.4.2 <i>Μεταβολές στη μεμβράνη του Bruch</i>	31
1.4.3 <i>Μεταβολές στο μελαγχρούν επιθήλιο (ME)</i>	32
1.4.4 <i>Μεταβολές στον ιδίως αμφιβληστροειδή χιτώνα</i>	34
1.4.5 <i>Drusen και βασικές εναποθέσεις</i>	34
1.4.6 <i>Χοριοειδική νεοαγγείωση (Choroidal Neovascularization ή CNV)</i>	36
1.4.7 <i>Συμπληρωματικοί παράγοντες της παθοφυσιολογίας της HEΩ</i>	38
1.5 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ HEΩ	40
1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	51
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	52
2.1 ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	52
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ	52
2.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ DNA ΜΕ ΤΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΟ QUBIT	54
2.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	55
2.5 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	59
2.6 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	60
2.7 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΕΠΙΘΥΜΗΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ (CYCLE SEQUENCING)	62
2.8 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΟΥ CYCLE SEQUENCING	63
2.9 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ DNA SEQUENCING	66
2.10 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΕΙΔΙΚΑ ΛΟΓΙΣΜΙΚΑ	70
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	72
3.1 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	72
3.2 SANGER ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ	74
3.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	79
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	86
5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	93

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Συνοτομογραφία	Αγγλική Ορολογία	Ελληνική Ορολογία
AGE	Advanced Glycation End-products	
Ang-2	Angiopoietin 2	Αγγειοποιητίνη-2
ΑποΕ/ ΑποΒ	Apolipoprotein E/ Apolipoprotein B	Απολιποπρωτεΐνη Ε/ Απολιποπρωτεΐνη Β
ARMS2	Age-Related Maculopathy Susceptibility 2	
BLamD	Basal Laminar Deposits	
Blast	Basic Local Alignment Search Tool	
BLinD	Basal Linear Deposits	
C1	Complement Component 1	
CCD	Charge- Coupled Device	
CFB	Complement Factor B	Παράγοντας Β συμπληρώματος
CFH	Complement Factor H	Παράγοντας Η συμπληρώματος
CNV	Choroidal Neovascularization	Χοριοειδική νεοαγγείωση
CRP	C-Reactive Protein	C Αντιδρώσα πρωτεΐνη
CX3CR1	CX3 Chemokine Receptor 1	Υποδοχέας 1 της CX3 χυμοκίνης
ddNTPs	Dideoxynucleotides	Διδεοξυνουκλεοτίδια
dNTPs	Deoxynucleoside triphosphate	Δεοξυριβονουκλεοτίδια
dsDNA	Double-Strand DNA	Δίκλωνο DNA
ECM	ExtraCellular Matrix	Εξωκυττάρια μήτρα
FGF-2	Fibroblast growth factor-2	Αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών 2
GPCRs	G Protein Coupled Receptors	Υποδοχείς συνδεδεμένοι με G πρωτεΐνες
ME		Μελάγχρουν Επιθήλιο
MMP	Matrix MetalloProteinases	Μεταλλοπρωτεάσες της μήτρας
MTCO2	Mitochondrially Encoded Cytochrome C Oxidase II	
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης
PEDF	Pigment Epithilium Derived Factor	
ROI	Reactive Oxygen Intermediates	Αντιδραστικά ενδιάμεσα οξυγόνου
RPE	Retinal Pigment Epithelium	
RPE BM	Retinal Pigment Epithelium Basal Membrane	Βασική μεμβράνη του μελαγχρόου επιθηλίου
si-RNA	small interfering RNA	
SNP	Single nucleotide polymorphism	Πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου
SYN3	Synapsin III	Συναψίνη III
TIMP3	Tissue Inhibitor of MetalloProteinase 3	Ιστικός αναστολέας της μεταλλοπρωτεάσης 3
TTT	Transpupillary ThermoTherapy	
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
VEGFR-2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2	Υποδοχέας 2 του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα
EAM		Έσω Αφοριστική Μεμβράνη
EAM		Έξω Αφοριστική Μεμβράνη
ΕΔΣ		Έξω Δικτυωτή Στιβάδα

ΕΚΣ
Ηλικιακή
Εκφύλιση Ωχράς
Κηλίδας
ΝΟ
Π.Ο.Υ.

ΠΓΝ

ΣΓΚ

ΣΝΙ

Έξω Κοκκώδης Στιβάδα

ΗΕΩ ή ΗΕΩΚ

Μονοξείδιο του αζώτου
Παγκόσμιος Οργανισμός
Υγείας

Πανεπιστημιακό Γενικό
Νοσοκομείο

Στιβάδα Γαγγλιακών
Κυττάρων

Στιβάδα Νευρικών Ινών

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας (HEΩ) αποτελεί μία πολυπαραγοντική και εκφυλιστική νόσο του οφθαλμού που αφορά ασθενείς άνω των 50 ετών και μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική απώλεια της κεντρικής όρασης. Από ιστολογικής πλευράς, χαρακτηρίζεται από την παρουσία μικρών υπαμφιβληστροειδικών εναποθέσεων, των καλούμενων drusen. Από κλινικής άποψης διακρίνεται σε δύο μορφές: την ξηρή μορφή, που αφορά των 80% των ασθενών και την υγρή μορφή από την οποία πάσχει το υπόλοιπο 20% των ασθενών. Η αιτιολογία της πάθησης δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί, αλλά πιστεύεται ότι σε αυτή εμπλέκονται γενετικοί παράγοντες, αλλά και περιβαλλοντικοί όπως το κάπνισμα.

Πλήθος γονιδίων έχουν ενοχοποιηθεί για τη συσχέτισή τους με την HEΩ. Πρόκειται κυρίως για γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του ανοσοποιητικού συστήματος και ιδίως της φυσικής ανοσίας, πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων, την αναδιαμόρφωση του εξωκυττάριου στρώματος, το πρωτεολυτικό σύστημα ουβικιτίνης και την απόκριση στο οξειδωτικό στρες. Πρόσφατα δεδομένα αλληλούχισης αποκάλυψαν την συμμετοχή μίας πληθώρας χρωμοσωμικών τόπων στην HEΩ. Μία τέτοια περιοχή που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την συσχέτισή του με την εμφάνιση της HEΩ είναι ο chr22:32709831 (GRCh38.p13), όπου εντοπίζονται τα γονίδια *TIMP3/SYN3*. Η *TIMP3* εδράζεται εντός ενός ιντρονίου του *SYN3* και μεταγράφεται από την αντίθετη κατεύθυνση. Η πρωτεΐνη *TIMP3* έχει βρεθεί ότι καταστέλει την αγγειογένεση καθώς ανταγωνίζεται με τον VEGF για πρόσδεση στον VEGFR-2. Στον συγκεκριμένο γενετικό τόπο έχουν ανιχνευτεί αρκετοί SNPs και κάποιοι έχουν επίσης μελετηθεί για την συμμετοχή τους στην παθογένεια της HEΩ. Για παράδειγμα μία πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι ο πολυμορφισμός rs9621532 του συγκεκριμένου γενετικού τόπου σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης HEΩ, πιθανά λόγω της μείωσης της μεταγραφής του *TIMP3*.

Βασιζόμενοι στην διεθνή βιβλιογραφία που αναφέρει την πιθανή συμμετοχή του γενετικού τόπου 22q12 στην HEΩ στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της κατανομής των διαφόρων γονοτύπων του πολυμορφισμού rs5754227 του γονιδίου *SYN3* στους ασθενείς με HEΩ και η συσχέτιση της κατανομής αυτής με βασικά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά αυτών των ασθενών.

Στη συγκεκριμένη μελέτη συμμετείχαν 21 ασθενείς με ξηρή HEΩ και 19 ασθενείς με υγρή HEΩ, επιλεγμένων κατόπιν οφθαλμολογικής αξιολόγησης και συλλογής κλινικών δεδομένων. Μετά την συλλογή περιφερικού αίματος από τους συμμετέχοντες ακολούθησε απομόνωση DNA και στη συνέχεια ο ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος του. Παράλληλα έγινε πλήρης καταγραφή των κλινικοπαθολογικών δεδομένων των ασθενών προκειμένου να ακολουθήσει η στατιστική ανάλυση και συσχέτιση των πειραματικών δεδομένων με αυτά τα στοιχεία. Επιπλέον σκοπός της

συγκεκριμένης μελέτης είναι η ανάπτυξη αξιόπιστης και ευαίσθητης μεθοδολογίας αλληλούχισης κατά Sanger για την ανίχνευση του εξεταζόμενου πολυμορφισμού στους ασθενείς με ΗΕΩ. Έτσι πραγματοποιήθηκε *in silico* ανάλυση και σχεδιασμός των κατάλληλων εκκινητών και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αλληλούχισης κατά Sanger για την αξιόπιστη ανίχνευση του πολυμορφισμού rs5754227.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ανατομία οφθαλμού

Η όραση αποτελεί μία από τις πέντε αισθήσεις του ανθρώπου και βασίζεται σε ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων στο οποίο εμπλέκεται ο εγκέφαλος και φυσικά οι οφθαλμοί. Κάθε οφθαλμός εντοπίζεται εντός του οφθαλμικού κόγχου, ο οποίος έχει προστατευτικό ρόλο για αυτό το ευαίσθητο αισθητήριο όργανο του σώματος μας. Ο οφθαλμικός κόγχος σχηματίζεται από οστά (μετωπιαίο, ζυγωματικό, άνω γνάθος, ηθμοειδές, σφηνοειδές, υπερώιο και δακρυϊκό), η διάταξη των οποίων δημιουργεί τελικά μία κοιλότητα που είναι κλειστή προς τα έσω, προς τα έξω και προς τα πίσω. Μέσα στον οφθαλμικό κόγχο εκτός από τον οφθαλμό υπάρχουν επίσης ο δακρυϊκός αδένας, οι οφθαλμικοί μύες, το οπισθοβολβικό λίπος, αγγεία και νεύρα. Στην μπροστινή πλευρά ο οφθαλμός προστατεύεται από τα άνω και κάτω βλέφαρα.

Ο οφθαλμικός βολβός (Εικόνα 1.1) είναι μία κοιλότητα σφαιρικού σχήματος με διάμετρο περίπου 24mm και αποτελείται από τρεις χιτώνες:

1. Ινώδης

i.σκληρός

ii.κερατοειδής

2. Αγγειώδης

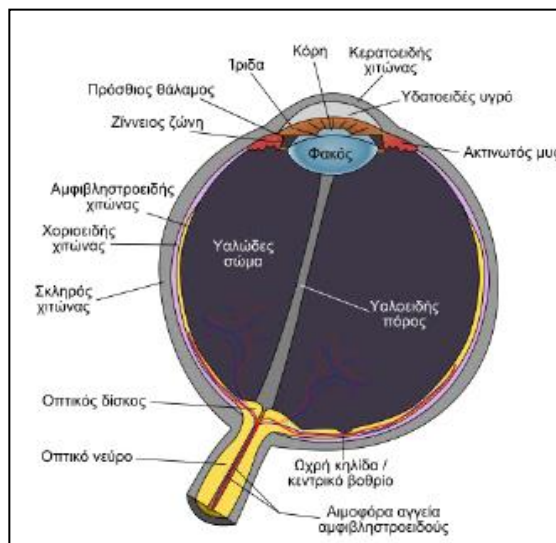
i.χοριοειδής

ii.ακτινωτό σώμα

iii.ίριδα-κόρη οφθαλμού

3. Αμφιβληστροειδής

Επιπλέον στην κοιλότητα υπάρχουν το υδατοειδές υγρό, ο φακός και το υαλώδες σώμα, το οποίο είναι μια διαφανής μάζα με μεγάλο ιξώδες η οποία γεμίζει την κοιλότητα πίσω από το φακό.



Εικόνα 1.1 Σχηματική απεικόνιση της ανατομίας του οφθαλμού

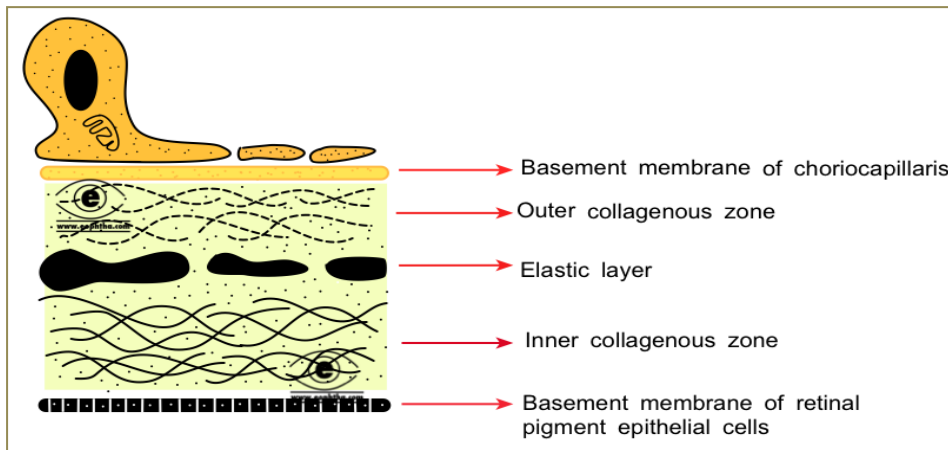
1.1.1 Ινώδης χιτώνας

Ο ινώδης χιτώνας διακρίνεται: 1. στον κερατοειδή, ο οποίος είναι διαφανής και βρίσκεται στο μπροστινό τμήμα του οφθαλμικού βολβού και 2. στον σκληρό χιτώνα, ο οποίος είναι αδιαφανής και εντοπίζεται στο πίσω μέρος του οφθαλμού (Εικόνα 1.1). Το σχήμα του κερατοειδούς χιτώνα είναι στρογγυλό, ωστόσο δεν είναι ισοπαχής καθώς στο κέντρο είναι πιο λεπτός (περίπου 0,50 mm) και στην περιφέρεια το πάχος του αυξάνεται (περίπου 0,70 mm). Ο κερατοειδής χιτώνας έχει τον σημαντικότερο ρόλο στο διαθλαστικό σύστημα του οφθαλμού. Στον οπίσθιο πόλο του ινώδους χιτώνα εντοπίζεται το σκληραίο τρήμα, μέσω του οποίου διέρχεται το οπτικό νεύρο, η κεντρική αρτηρία και η κεντρική φλέβα του αμφιβληστροειδούς.

1.1.2 Αγγειώδης χιτώνας

Ο αγγειώδης χιτώνας αποτελείται από την ίριδα, το ακτινωτό σώμα και το χοριοειδή χιτώνα (Εικόνα 1.1). Η ίριδα χωρίζει τον πρόσθιο από τον οπίσθιο θάλαμο του ματιού και στο μέσο της υπάρχει μια οπή, η κόρη. Η διάμετρος της κόρης της ίριδος επηρεάζεται από τον φωτισμό του περιβάλλοντος και έχει τη δυνατότητα να μεταβάλλεται αντανακλαστικά. Το ακτινωτό σώμα έχει σχήμα τριγωνικό και συμβάλλει σημαντικά στη διατήρηση της καλής λειτουργίας του οφθαλμικού βολβού, καθώς μία από τις λειτουργίες του είναι η παραγωγή του υδατοειδούς υγρού. Το ακτινωτό σώμα αποτελείται από τον ακτινωτό μυ και τις ακτινοειδείς προβολές. Ο ακτινωτός μυ συμμετέχει σημαντικά στην προσαρμογή του οφθαλμού στην κοντινή όραση. Οι ακτινοειδείς προβολές περιβάλλουν κυκλικά τον φακό σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο τον ακτινωτό κύκλο. Η ύπαρξη του χοριοειδούς χιτώνα εξασφαλίζει τη σωστή αιμάτωση των έξω στιβάδων του αμφιβληστροειδούς καθώς είναι ο αγγειοβριθέστερος χιτώνας του οφθαλμού. Ανάμεσα στον χοριοειδή και τον αμφιβληστροειδή χιτώνα βρίσκεται η μεμβράνη του Bruch, η οποία αποτελείται από πέντε στρώματα:

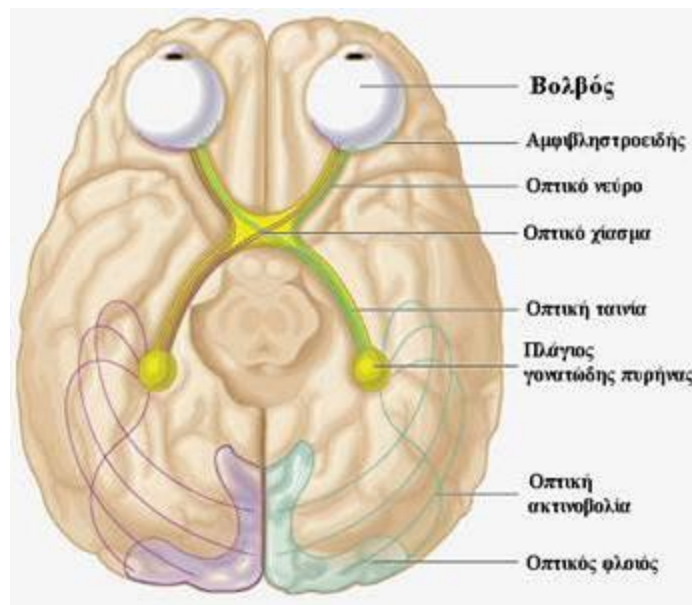
- i. τη βασική μεμβράνη του μελαγχρόου επιθηλίου (Retinal Pigment Epithelium Basal Membrane ή RPE BM)
- ii. την έσω κολλαγονική στιβάδα
- iii. τη ζώνη των ελαστικών ινών
- iv. την έξω κολλαγονική στιβάδα
- v. τη στιβάδα των χοριοτριχοειδών (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2 Τα πέντε στρώματα της μεμβράνης του Bruch

1.1.3 Αμφιβληστροειδής χιτώνας

Ο αμφιβληστροειδής αποτελεί τον εσωτερικό και πιο σημαντικό χιτώνα του οφθαλμού, καθώς εκεί επιτελείται η πρώτη φάση της διαδικασίας της όρασης. Ο χιτώνας αυτός είναι μια λεπτή και διαφανή στιβάδα νευρικού ιστού η οποία καλύπτει εσωτερικά το οπίσθιο ημιμόριο του οφθαλμικού βολβού. Σε γενικές γραμμές ο ρόλος του αμφιβληστροειδούς είναι ο σχηματισμός του οπτικού ειδώλου και η δημιουργία των κατάλληλων νευρικών ερεθισμάτων τα οποία στη συνέχεια μεταδίδονται κατά μήκος της οπτικής οδού προς τον εγκέφαλο για ανώτερη φλοιώδη επεξεργασία (Εικόνα 1.3).



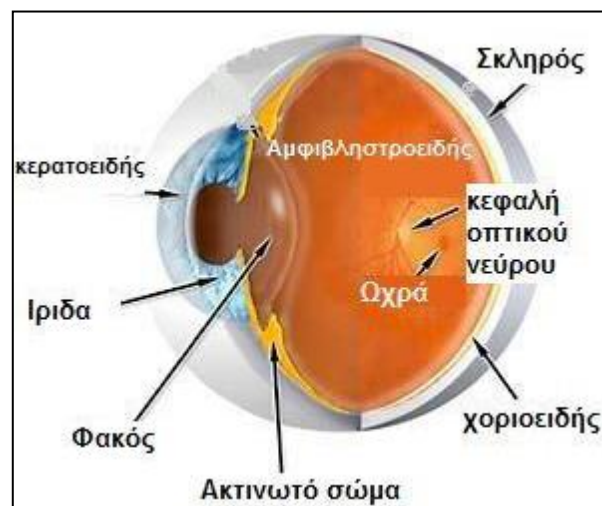
Εικόνα 1.3 Σχηματική απεικόνιση της οπτικής οδού (<http://www.eyerathology.gr>)

Η νευρική φύση του αμφιβληστροειδούς οφείλεται στην παρουσία των φωτοϋποδοχέων, η οποία δικαιολογεί και τον ρόλο του σαν τον αισθητηριακό χιτώνα του οφθαλμού (Εικόνα 1.2). Οι φωτοϋποδοχείς είναι ειδικά κύτταρα τα οποία είναι υπεύθυνα για τη φωτοχημική διεργασία κατά την οποία το φως μετατρέπεται σε νευρική ώση, η οποία στη συνέχεια μεταβιβάζεται στο

οπτικό νεύρο κι από εκεί στον οπτικό φλοιό του εγκεφάλου. Διακρίνονται δύο κατηγορίες φωτοϋποδοχέων: τα κωνία και τα ραβδία. Τα πρώτα εντοπίζονται κυρίως στο κεντρικό τμήμα, στην ωχρά και ευθύνονται για την ευκρινή κεντρική όραση σε έντονο φωτισμό και την αντίληψη του χρώματος, ενώ τα ραβδία βρίσκονται κυρίως στην περιφέρεια και ευθύνονται για την περιφερική και τη νυχτερινή όραση, καθώς και την αντίληψη της κίνησης¹.

Ο αμφιβληστροειδής (Εικόνα 1.4) πρόσθια συνδέεται με το επιθήλιο του ακτινωτού σώματος και της ίριδας ενώ στο πίσω μέρος του συνδέεται με το οπτικό νεύρο. Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας βρίσκεται σε επαφή εξωτερικά με τη μεμβράνη του Bruch του χοριοειδούς, και εσωτερικά με το υαλοειδές σώμα. Επιπλέον διακρίνονται δύο περιοχές του συγκεκριμένου χιτώνα:

- i. η κεντρική περιοχή ή οπίσθιος πόλος στην οποία εντοπίζεται η ωχρά κηλίδα, η οποία αποτελεί την περιοχή της ευκρινούς όρασης
- ii. η περιφέρεια, η οποία αποτελείται από ζώνες που βρίσκονται περιφερειακά της κεντρικής περιοχής



Εικόνα 1.4 Απεικόνιση της θέσης του αμφιβληστροειδούς χιτώνα στον οφθαλμό

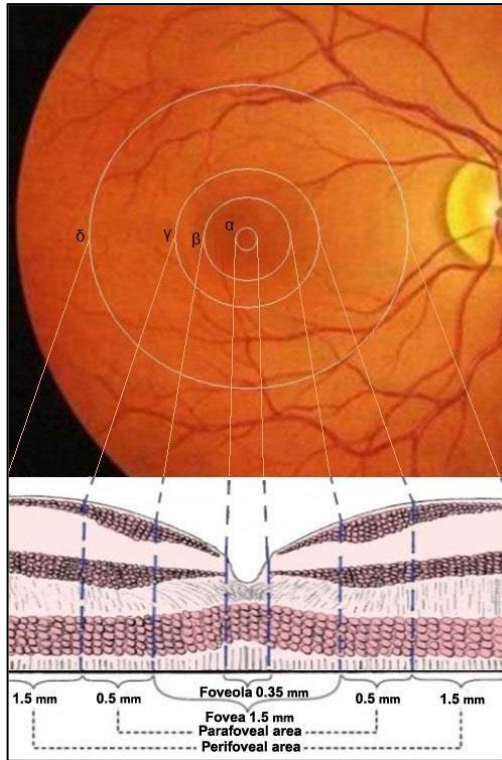
Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας αποτελείται από 1. τον ιδίως αμφιβληστροειδή ο οποίος συνίσταται από πολλά στρώματα νευρικών κυττάρων και βρίσκεται σε επαφή με το υαλοειδές και 2. το μελάγχρουν επιθήλιο (ME, RPE: Retinal Pigment Epithelium). Το ME είναι μια μονή κυτταρική στιβάδα στην οποία υπάρχει μελανίνη, η ποσότητα της οποίας διαφέρει μεταξύ των ατόμων αλλά και μεταξύ των διαφόρων περιοχών του ματιού. Ο δυνητικός χώρος μεταξύ ME και ιδίως αμφιβληστροειδούς ονομάζεται υποαμφιβληστροειδικός χώρος. Το ME κατέχει κεντρικό ρόλο στη λειτουργία του αμφιβληστροειδούς καθώς σχηματίζει τον έξω αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό, φαγοκυτταρώνει τα έξω τμήματα των κωνίων και των ραβδίων, εμπλέκεται στο μεταβολισμό της βιταμίνης A, απορροφά την φωτεινή ενέργεια με τα κοκκία μελανίνης και μειώνει τη διάχυση του φωτός, βελτιώνοντας την ευκρίνεια των εικόνων.

Από την άλλη πλευρά ο ιδίως αμφιβληστροειδής είναι διαφανής και λεπτός, αν και το πάχος του είναι μικρότερο στην περιφέρεια. Το συγκεκριμένο τμήμα του αμφιβληστροειδούς συντίθεται από νευρικό ιστό, γλοία και αγγειακό ιστό. Ο νευρικός ιστός περιλαμβάνει τα κύτταρα των φωτοϋποδοχέων, η γλοία παρέχει στήριξη και τροφή στο νευρικό ιστό, ενώ ο αγγειακός ιστός είναι υπεύθυνος για την αιμάτωση αυτής της περιοχής του οφθαλμού. Επιπλέον ο ιδίως αμφιβληστροειδής αποτελείται από εννέα στιβάδες, οι οποίες από έξω προς τα μέσα είναι η στιβάδα των φωτοϋποδοχέων (κωνίων και ραβδίων), η έξω αφοριστική μεμβράνη (ΕΑΜ), η έξω κοκκώδης (πυρηνική) στιβάδα (ΕΚΣ), η έξω δικτυωτή στιβάδα (ΕΔΣ), η έσω κοκκώδης (πυρηνική) στιβάδα (ΕΚΣ), η έσω δικτυωτή στιβάδα (ΕΔΣ), η στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (ΣΓΚ), η στιβάδα των νευρικών ινών (ΣΝΙ), η έσω αφοριστική μεμβράνη (ΕΑΜ)¹.

1.1.4 Ωχρά κηλίδα

Η ωχρά κηλίδα εντοπίζεται στο κέντρο της οπίσθιας μοίρας του αμφιβληστροειδούς και εμφανίζεται σαν μια ωοειδής, υποκίτρινη περιοχή η διάμετρος της οποίας είναι περίπου 5,5 mm. Τοπογραφικά στην ωχρά κηλίδα εντοπίζονται οι εξής περιοχές (Εικόνα 1.5):

- 1. Κεντρικό βοθρίο (fovea):** Μία κυκλική περιοχή στο κέντρο της ωχράς η οποία είναι υπεύθυνη για την κεντρική όραση και την αντίληψη των χρωμάτων. Σε αυτήν την περιοχή ο ιδίως αμφιβληστροειδής χαρακτηρίζεται από μικρό πάχος και πλήρη απουσία ραβδίων. Αντίθετα τα κωνία είναι πολυάριθμα, έχουν κυλινδρικό σχήμα και πιο μεγάλο μήκος σε σχέση με τα κωνία των άλλων περιοχών του βυθού.
- 2. Βοθρίδιο (foveola):** Το βοθρίδιο αποτελεί το κέντρο της κεντρικής περιοχής και έχει διάμετρο 0,3 mm. Είναι το λεπτότερο τμήμα του αμφιβληστροειδούς και στερείται γαγγλιακών κυττάρων. Ολόκληρο το πάχος του αποτελείται μόνο από κωνία με τους πυρήνες τους.
- 3. Παραβοθρική περιοχή (Parafoveal):** Είναι ένας δακτύλιος, το πάχος του οποίου είναι περίπου 0,5 mm. Ο δακτύλιος αυτός αποτελείται από πολλά γαγγλιακά και δίπολα κύτταρα, ενώ παρατηρείται ίδιος αριθμός κωνίων και ραβδίων.
- 4. Περιβοθρική περιοχή (Perifoveal):** Έχει σχηματισμό δακτυλίου ο οποίος βρίσκεται περιμετρικά της παραβοθρικής περιοχής. Στην περιβοθρική περιοχή η αναλογία κωνίων προς ραβδία είναι 1 προς 2.

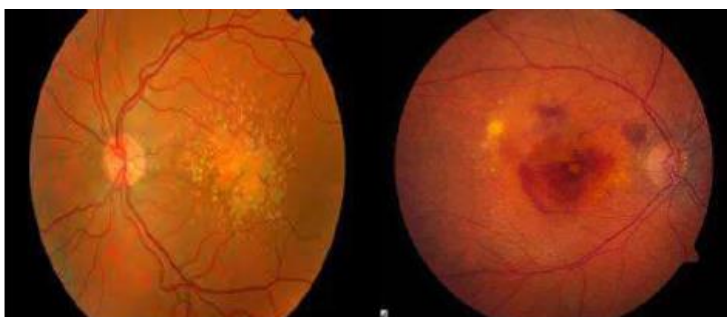


Εικόνα 1.5 Σχηματική απεικόνιση των περιοχών του αμφιβληστροειδούς με την αντίστοιχη ιστολογική τους αρχιτεκτονική: α. Βοθρίδιο, β. Κεντρικό βοθρίο, γ. Περιβοθρική περιοχή, δ. Παραβοθρική περιοχή

1.2 Ηλικιακή εκφύλιση ωχράς κηλίδας (ΗΕΩ)

Η πιο συχνή πάθηση της ωχράς κηλίδας ονομάζεται Ηλικιακή Εκφύλιση της Ωχράς Κηλίδας (ΗΕΩ). Πρόκειται για μία νευροεκφυλιστική νόσο, η οποία οδηγεί σε απώλεια της κεντρικής όρασης καθώς οι περιοχές που επηρεάζει είναι οι κεντρικές περιοχές του αμφιβληστροειδούς και του χοριοειδούς χιτώνα του οφθαλμού. Οι δομές του οφθαλμού που επηρεάζονται στην περίπτωση της ΗΕΩ είναι οι φωτοϋποδοχείς, το ΜΕ, η μεμβράνη του Bruch και τα τριχοειδή του χοριοειδούς χιτώνα στην περιοχή της ωχράς. Οι δομές αυτές είναι μεταβολικά αλληλοεξαρτώμενες και υπάρχει σημαντική ανταλλαγή μεταβολικών προϊόντων κατά μήκος της μεμβράνης του Bruch. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ένα τμήμα των φωτοϋποδοχέων φαγοκυτταρώνεται καθημερινά από κύτταρα του ΜΕ, αποδομείται στα λυσοσώματά του και μέρος του επαναχρησιμοποιείται για την αναγέννηση των φωτοϋποδοχέων. Το υπόλοιπο προϊόν της αποικοδόμησης φαίνεται ότι αποβάλλεται μέσω της μεμβράνης του Bruch και τελικά απομακρύνεται από τα χοριοειδικά τριχοειδή. Στην ΗΕΩ παρατηρείται διαταραχή αυτής της διαδικασίας, οδηγώντας τελικά στη συσσώρευση ηλεκτρονιόπυκνου υλικού και λιποφουσκίνης στο ΜΕ, γεγονός που επηρεάζει σημαντικά τη φυσιολογική λειτουργία των υπερκείμενων φωτοϋποδοχέων και συνεπώς την όραση².

Η νόσος αυτή είναι ηλικιο-εξαρτώμενη και παρουσιάζεται κυρίως σε άτομα άνω των 50 ετών. Διακρίνονται δύο μορφές της συγκεκριμένης ασθένειας ανάλογα με τις αλλοιώσεις που παρατηρούνται στον αμφιβληστροειδή (Εικόνα 1.6) και είναι γνωστές σαν 1. Ξηρού τύπου ΗΕΩ (ή μη-εξιδρωματική ή ατροφική), η οποία είναι η πιο συχνή μορφή της νόσου καθώς χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά εμφάνισης στο γενικό πληθυσμό (85-90 %), και εξελίσσεται σχετικά αργά και 2. υγρού τύπου ΗΕΩ (εξιδρωματική ή νεοαγγειακή), η οποία είναι πιο σπάνια (10-15%), αλλά χαρακτηρίζεται από πιο σοβαρά συμπτώματα καθώς προκαλεί σημαντική μείωση της οπτικής οξύτητας σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα.



Εικόνα 1.6 Τύποι της ΗΕΩ. Ξηρού τύπου ή ατροφική (αριστερά) και υγρού τύπου ή εξιδρωματική (δεξιά)

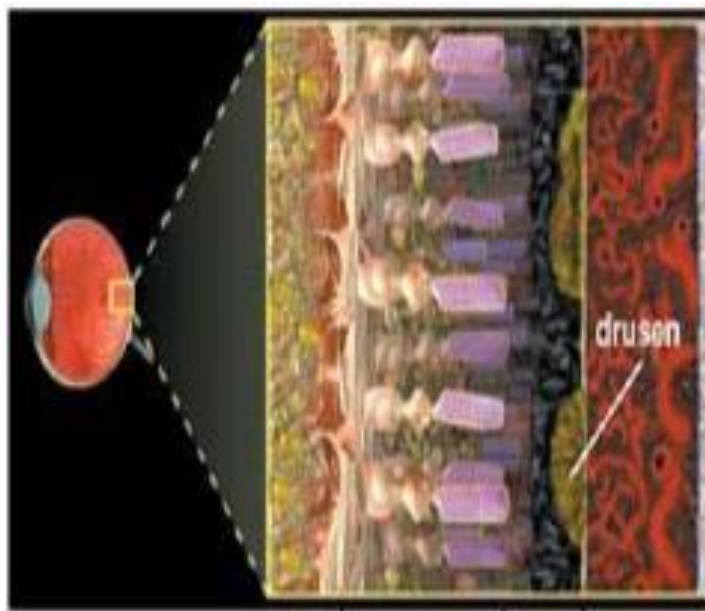
Οι δύο τύποι ΗΕΩ χαρακτηρίζονται από διαφορετική κλινική συμπεριφορά, συμπτωματολογία και εξέλιξη. Η ΗΕΩ μπορεί να προσβάλλει τον έναν ή και τους δύο οφθαλμούς, οπότε στην τελευταία περίπτωση ο ασθενής χαρακτηρίζεται από σημαντική μείωση της κεντρικής όρασής του, χωρίς ωστόσο να παρατηρείται αλλαγή στην περιφερική όρασή του (Εικόνα 1.7). Η εμφάνιση της ΗΕΩ στον έναν οφθαλμό αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης αυτής της διαταραχής και στον άλλον οφθαλμό σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα που κυμαίνεται από 3-5 χρόνια ³



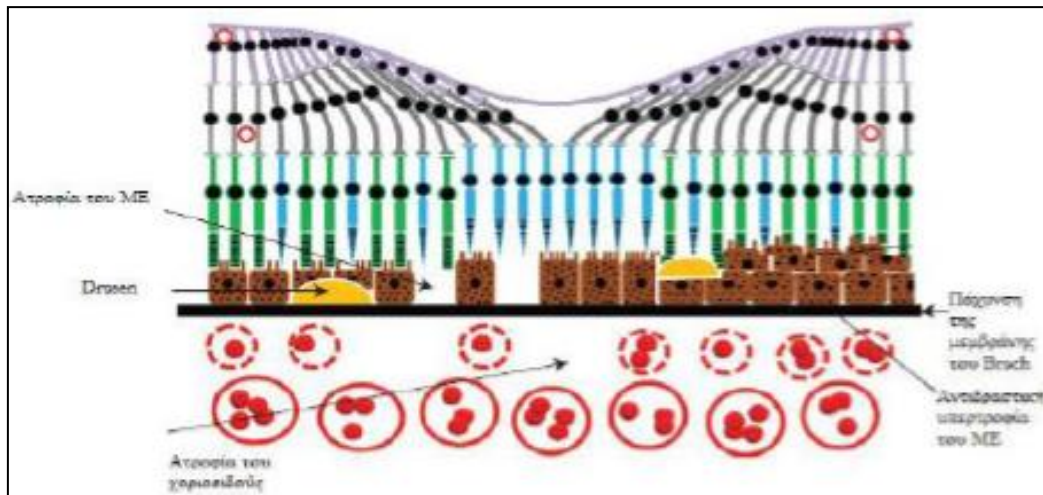
Εικόνα 1.7 Αριστερά: Άτομο με φυσιολογική όραση, Δεξιά: Ασθενής με ΗΕΩ

1.2.1 Ξηρή μορφή ΗΕΩ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η ξηρή μορφή παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης κι επηρεάζει περίπου το 85%-90% των ασθενών με ΗΕΩ. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτής της μορφής είναι η ήπια έως και σοβαρή απώλεια της κεντρικής όρασης, η οποία μπορεί να παρουσιαστεί σε ένα χρονικό διάστημα που κυμαίνεται από λίγους μήνες έως χρόνια. Από άποψη παθοφυσιολογίας η ξηρή μορφή ΗΕΩ πιστεύεται ότι οφείλεται σε διαταραχές του άξονα σύμπλεγμα ΜΕ - μεμβράνη του Bruch - χοριοειδοτριχοειδή, οι οποίες τελικά οδηγούν σε καταστροφή των φωτοϋποδοχέων της ωχράς κηλίδας και στην εμφάνιση αλλοιώσεων. Οι πιο σημαντικές αλλοιώσεις είναι τα drusen, τα οποία αποτελούν πολύπλοκα συσσωματώματα από λιπίδια, πρωτεΐνες και κυτταρικά υπολείμματα, τα οποία εντοπίζονται κυρίως κάτω από το ΜΕ του αμφιβληστροειδούς ⁴. Μακροσκοπικά φαίνονται σαν κίτρινα κοκκία των οποίων ο αριθμός, το μέγεθος και το σχήμα ποικίλουν (Εικόνα 1.8). Η παρουσία των drusen φαίνεται να οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο των κυττάρων του ΜΕ, ο οποίος τελικά έχει σαν αποτέλεσμα την ατροφία αυτής της περιοχής του οφθαλμού. Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα κύτταρα του ΜΕ βρίσκονται σε άμεση συνεργασία, τόσο σε λειτουργικό όσο και σε μεταβολικό επίπεδο, με τα εξωτερικά τμήματα των φωτοϋποδοχέων, γίνεται κατανοητό ότι η απώλεια των κυττάρων του ΜΕ οδηγεί σε λέπτυνση των ιστών της ωχράς προκαλώντας έτσι ατροφία στη στοιβάδα των φωτοϋποδοχέων του ιδίως αμφιβληστροειδή (γεωγραφική ατροφία) και κατά συνέπεια μείωση της κεντρικής όρασης. Παράλληλα εμφανίζεται ατροφία των χοριοτριχοειδών και πάχυνση της μεμβράνης του Bruch με αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός σκοτεινού σημείου στο κέντρο της όρασης που με την πάροδο του χρόνου μπορεί να επεκταθεί και να οδηγήσει στο θάνατο των οπτικών κυττάρων και συνεπώς στην απώλεια μέρους της κεντρικής όρασης (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.8 Σχηματική απεικόνιση της δημιουργίας drusen



Εικόνα 1.9 Σχηματική απεικόνιση των παθολογοανατομικών μεταβολών στη ξηρή μορφή της ΗΕΩ

Τα drusen διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθός τους:

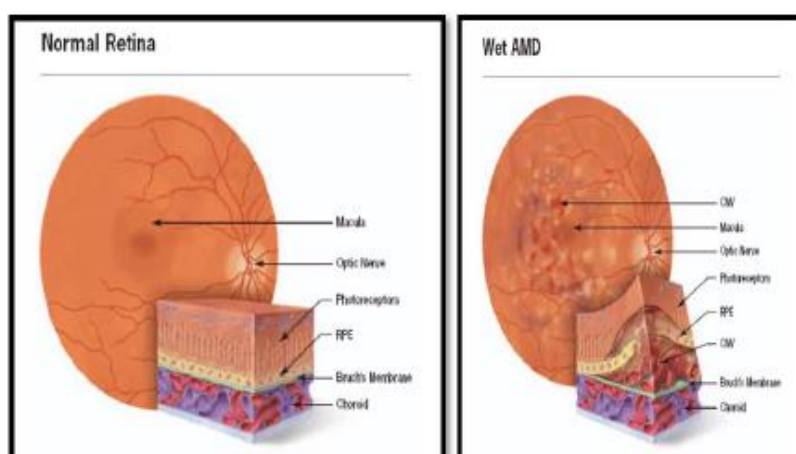
1. Μικρά τα οποία έχουν διάμετρο μικρότερη από 63 μm και είναι επίσης γνωστά σαν σκληρά drusen
2. Μεγάλα τα οποία έχουν διάμετρο μεγαλύτερη από 125 μm και είναι επίσης γνωστά σαν μαλακά drusen
3. Ενδιάμεσα τα οποία έχουν διάμετρο μεταξύ 63 και 125 μm και μπορεί να είναι σκληρά ή μαλακά drusen.

Από κλινικής άποψης η εκτίμηση του μεγέθους των drusen βασίζεται στη διάμετρο των κύριων φλεβικών κλάδων του αμφιβληστροειδούς στο σημείο όπου οι κλάδοι αυτοί διέρχονται από τα όρια του οπτικού δίσκου. Στο σημείο αυτό οι φλέβες έχουν διάμετρο 125 μm περίπου. Τα drusen σπανίως είναι κλινικά ορατά πριν την ηλικία των 45 ετών, ενώ μετά την ηλικία των 60 ετών αποτελούν σύνηθες φαινόμενο. Με την αύξηση της ηλικίας αυξάνονται σε μέγεθος και αριθμό, ενώ έχει αναφερθεί σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο μέγεθος των drusen και στον κίνδυνο εμφάνισης προχωρημένης ΗΕΩ σε μια περίοδο 5 ετών⁵.

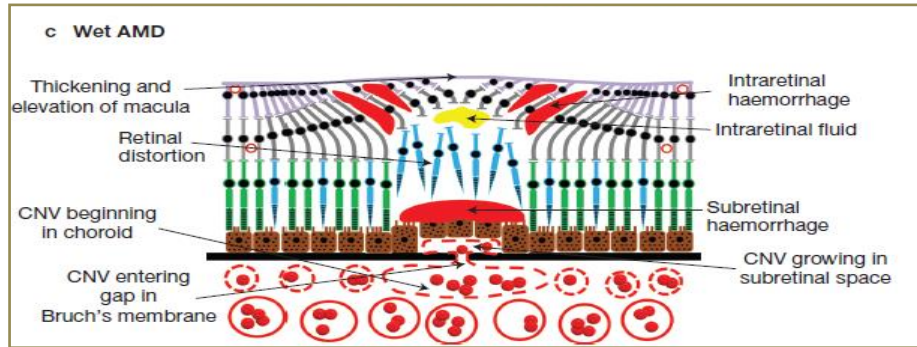
Άλλες αλλοιώσεις που μπορεί να εμφανιστούν στην περιοχή της ωχράς, εκτός από τις εναποθέσεις των drusen, είναι οι εστιακές αθροίσεις χρωστικής και οι ατροφικές εστίες του ME^{6,7}. Η πιο σοβαρή ατροφική αλλοίωση που παρατηρείται στην ΗΕΩ είναι η γεωγραφική ατροφία, η οποία είναι η κατάσταση κατά την οποία μια σαφώς περιγεγραμμένη περιοχή (στρογγυλή ή ωσειδής), εμφανίζει αποχρωματισμό ή έντονη έλλειψη κυττάρων του ME^{8,9}. Η γεωγραφική ατροφία του ME παρατηρείται στο 0,6% των ενηλίκων και ευθύνεται για το 12%-21% της τύφλωσης των ατόμων που πάσχουν από ΗΕΩ. Τέλος, σε ένα ποσοστό ασθενών με ξηρή ΗΕΩ της τάξης του 1%-18%, η ασθένεια μπορεί να εξελιχθεί στην υγρή μορφή η οποία αποτελεί τον σοβαρότερο κλινικό φαινότυπο^{10,11}.

1.2.2 Υγρή μορφή ΗΕΩ

Η υγρή μορφή χαρακτηρίζεται από μικρότερα ποσοστά εμφάνισης ωστόσο αποτελεί την πιο σοβαρή μορφή της νόσου, αφού οδηγεί σε άμεση και εκτεταμένη μείωση της οπτικής οξύτητας. Μάλιστα στατιστικά δεδομένα δείχνουν ότι το 90% των ασθενών με υγρή μορφή ΗΕΩ παρουσιάζουν σημαντική απώλεια της όρασής τους. Τα βασικά συμπτώματα της υγρής μορφής είναι γνωστά σαν μεταμορφοψία και μικροψία, τα οποία μπορούν να εμφανιστούν αιφνίδια και προκαλούν μεταβολές στο σχήμα και το μέγεθος της εικόνας. Η υγρή ΗΕΩ χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη χοριοειδικής νεοαγγείωσης, και το γεγονός αυτό αποτελεί τη βασική διαφορά μεταξύ της ξηρής και της υγρής μορφής της ΗΕΩ. Κατά την χοριοειδική νεοαγγείωση, τα παθολογικά αγγεία, τα οποία προέρχονται από τα χοριοτριχοειδή, διαπερνούν την μεμβράνη του Bruch κάτω από το ΜΕ ή τον ιδίως αμφιβληστροειδή, όπου εκεί παρουσιάζουν πλέον σταδιακή αύξηση η οποία συνοδεύεται από την ανάπτυξη γύρω τους ινώδους συνδετικού ιστού (υπαμφιβληστροειδική νεοαγγειακή μεμβράνη). Τα νέα αυτά αγγεία χαρακτηρίζονται από αυξημένη διαπερατότητα η οποία τελικά οδηγεί στη συσσώρευση ορώδους υγρού ή αίματος κάτω από το ΜΕ ή και μέσα στο νευροεπιθήλιο (Εικόνα 1.10, Εικόνα 1.11) Με τον τρόπο αυτό τελικά προκαλείται εξοίδηση ή αποκόλληση του κεντρικού βοθρίου, οδηγώντας τελικά στη δραματική μείωση της κεντρικής όρασης^{8,12}. Συχνά, ακολουθεί ινώδης μεταπλασία και οργάνωση του υποαμφιβληστροειδικού υλικού καταλήγοντας στο σχηματισμό μιας δισκοειδούς ουλής, η οποία αποτελεί το τελικό στάδιο της νόσου και συνδέεται με οριστική απώλεια της όρασης. Παρά το γεγονός ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό (~ 10%) αναπτύσσει χοριοειδική νεοαγγείωση, το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών που παρουσιάζουν σοβαρή ελάττωση της όρασης τους φέρει σημάδια της εξιδρωματικής μορφής της νόσου.



Εικόνα 1.10 Αριστερά: Φυσιολογικός αμφιβληστροειδής χιτώνας. Δεξιά: ΗΕΩ υγρού τύπου. Τα ταχέως αναπτυσσόμενα αγγεία διασπούν το ΜΕ και προκαλούν διαρροές και αιμορραγίες



Εικόνα 1.11 Σχηματική απεικόνιση των παθολογοανατομικών μεταβολών στην υγρή μορφή της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας

Η πάθηση της υγρής ΗΕΩΚ είναι πολύ συχνά αμφοτερόπλευρη. Η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου στον δεύτερο οφθαλμό είναι αθροιστικά 10% κάθε χρόνο μετά την προσβολή του πρώτου και αυξάνεται επιπρόσθετα όταν συνυπάρχουν στον υγιή οφθαλμό ευρήματα ξηρής μορφής ΗΕΩΚ.

1.3 Επιδημιολογία και Παράγοντες κινδύνου ΗΕΩ

1.3.1 Επιδημιολογία της ΗΕΩ

Η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κατέχει την πρώτη θέση μεταξύ των αιτιολογικών παραγόντων τύφλωσης στη Β. Αμερική, στη Δυτική Ευρώπη και στην Αυστραλία, και την τρίτη θέση στον κατάλογο των αιτιών πρόκλησης μέτριας και σοβαρής μείωσης της όρασης παγκοσμίως, μετά τον καταρράκτη και τις μη-διορθούμενες διαθλαστικές ανωμαλίες¹³. Στην χώρα μας ο επιπολασμός της νόσου έχει μελετηθεί σε πληθυσμό αποτελούμενο από άτομα ηλικίας μεγαλύτερη των 65 ετών (the Thessaloniki Eye Study)¹⁴ οπότε διαπιστώθηκε ότι το 1,3 % και 1,4% των εξεταζόμενων ατόμων εμφάνιζε γεωγραφική ατροφία και νεοαγγειακή μορφή αντίστοιχα, ενώ δεν αναφέρθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ποσοστά εμφάνισης της ΗΕΩ ανάμεσα στα δύο φύλα. Οι ασθενείς με αμφοτερόπλευρη νόσο αντιπροσώπευαν το 40% του συνολικού αριθμού των πασχόντων. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μελέτη παρατηρήθηκε επίσης μια δραματική αύξηση του ποσοστού των ασθενών μετά την ηλικία των 80 ετών, με γεωγραφική ατροφία στο 6,1 % και νεοαγγειακή μορφή στο 4,3 % αυτής της ηλικιακής ομάδας. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης συμφωνούν με αυτά άλλων αντίστοιχων μελετών στις οποίες επίσης συμπεριλήφθησαν καυκάσιοι πληθυσμοί. Συγκεκριμένα στην Ευρωπαϊκή μελέτη Eugeye, στην οποία συμμετείχαν ομάδες ασθενών άνω των 65 ετών από την Νορβηγία, την Εσθονία, το Ηνωμένο Βασίλειο, τη Γαλλία, την Ιταλία, την Ελλάδα και την Ισπανία, ο επιπολασμός της γεωγραφικής ατροφίας και της νεοαγγειακής μορφής παρουσίασε ποσοστά της τάξης 1.2 % 2.3 % αντίστοιχα¹⁵.

Διαχρονικές μελέτες έχουν υπολογίσει τόσο την επίπτωση της νόσου, όσο και το ποσοστό των ασθενών με πρώιμη νόσο που σταδιακά εμφανίζουν τις πιο σοβαρές μορφές της.

Συγκεκριμένα η μελέτη Beaver Dam Eye study που πραγματοποιήθηκε στις Η.Π.Α. αποκάλυψε την προοδευτική εξέλιξη της νόσου σε μία χρονική περίοδο 15 ετών, καθώς η βαρύτητα της νόσου αυξάνεται σταθερά με την ηλικία. Έτσι τα άτομα άνω των 75 ετών παρουσίασαν γεωγραφική ατροφία σε ποσοστό 3.2 % και νεοαγγειακή μορφή σε ποσοστό 4.4 % μέσα στο διάστημα των 15 ετών¹⁶. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξε και η μελέτη Blue Mountains Eye Study, η οποία έλαβε χώρα στην Αυστραλία και στην οποία εξετάστηκαν ασθενείς άνω των 49 ετών για διάστημα 10 ετών¹⁷.

Συνολικά τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων μελετών υποστηρίζουν ότι η ηλικία, τα χαρακτηριστικά των αλλοιώσεων και η βαρύτητα των πρώιμων μορφών αποτελούν σημαντικούς παράγοντες δυσμενούς πρόγνωσης αφού σχετίζονται με την εμφάνιση των σοβαρών όψιμων μορφών της νόσου. Η αναμενόμενη αύξηση των ατόμων με ηλικία άνω των 75 ετών τόσο στις αναπτυγμένες χώρες, όσο και στην Ελλάδα, αναμένεται να συνοδεύεται από μία σημαντική αύξηση στον απόλυτο αριθμό του συνόλου των ασθενών αλλά και των πασχόντων από τις σοβαρές μορφές της νόσου. Υπολογίζεται ότι σε παγκόσμια κλίμακα ο αριθμός των ασθενών με ΗΕΩ θα παρουσιάσει σημαντική αύξηση στα επόμενα 20 χρόνια φτάνοντας τον εντυπωσιακό αριθμό των 288 εκατομμυρίων ατόμων¹⁸. Σήμερα έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην ενημέρωση του πληθυσμού, με στόχους τόσο την πρόληψη της νόσου με την αποφυγή συμπεριφορών που αποτελούν προδιαθεσικούς παράγοντες, όσο και την έγκαιρη διάγνωσή της.

1.3.2 Παράγοντες κινδύνου

Βασικός παράγοντας κινδύνου για την ΗΕΩ είναι η μεγάλη ηλικία ενώ συμπληρωματικοί παράγοντες κινδύνου είναι το κάπνισμα¹⁹, η παχυσαρκία^{20,21} καθώς και οι παράγοντες κινδύνου των καρδιαγγειακών νόσων (υπέρταση, χοληστερόλη, σακχαρώδης διαβήτης)^{22,23} αλλά και η έλλειψη της βιταμίνης D²⁴. Το οικογενειακό ιστορικό της νόσου αποτελεί ισχυρό παράγοντα προδιάθεσης καθώς όπως αποδεικνύεται από μελέτες διδύμων παρατηρείται αυξημένη ενδοοικογενειακή κατανομή των πασχόντων²⁵.

Το 2005 δημοσιεύθηκε η πρώτη γονιδιακή μελέτη για την ΗΕΩ από τους Klein et.al σύμφωνα με την οποία το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση του παράγοντα Η του συμπληρώματος (CFH), φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου²⁶. Η μελέτη αυτή άνοιξε τον δρόμο για αντίστοιχες γονιδιακές μελέτες, οι οποίες αποκάλυψαν έναν μεγάλο αριθμό γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την εμφάνιση της συγκεκριμένης διαταραχής. Έτσι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί τουλάχιστον 19 γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ενεργοποίησης του συμπληρώματος, στο μεταβολισμό των λιπιδίων, στην αναδιάρθρωση της εξωκυττάριας ουσίας, του κολλαγόνου και στα μονοπάτια αγγειογένεσης²⁷. Η εμφάνιση, εξέλιξη και αμφοτερόπλευρη ανάπτυξη όλων των μορφών της ΗΕΩ καθορίζονται από τους παραπάνω βιολογικούς μηχανισμούς καθώς η γενετική προδιάθεση μπορεί να τροποποιηθεί εν μέρει από

τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, και όλοι οι παράγοντες αθροιστικά αποτελούν σημαντικούς προγνωστικούς παράγοντες για την εμφάνιση και εξέλιξη της ΗΕΩ^{28,29}.

1.4 Παθοφυσιολογία της ΗΕΩ

Είναι πλέον αποδεκτό ότι η νόσος της ωχράς κηλίδας είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια, βασικό χαρακτηριστικό της οποίας είναι η παρουσία drusen και νεοαγγείων, αλλά και ατροφικών φωτούποδοχέων και μεγάλης ποσότητας λιποφουσκίνης. Οι διαταραχές αυτές οδηγούν σε δομικές μεταβολές της μεμβράνης του Bruch και των χοριοτριχοειδών, επηρεάζοντας τελικά την περιοχή της ωχράς κηλίδας η οποία εμπλέκεται στην κεντρική όραση. Ωστόσο ακόμα και σήμερα παρά τις εντατικές μελέτες δεν έχει αποσαφηνιστεί αφενός ποιο μέρος της ωχράς επηρεάζεται αρχικά και αφετέρου ποιο είναι το εναρκτήριο γεγονός που πυροδοτεί την εμφάνιση της νόσου. Τα μέχρι τώρα δεδομένα υπογραμμίζουν τον κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της ΗΕΩ των drusen, των μορφολογικών και κυτταρικών αλλαγών στον χοριοειδή χιτώνα, στη μεμβράνη του Bruch, στο ΜΕ και στον ιδίως αμφιβληστροειδή χιτώνα. Σημαντικό επίσης ρόλο παίζει επίσης η κυτταρική γήρανση, όπως φαίνεται από τη συσσώρευση λιποφουσκίνης στα κύτταρα του ΜΕ, το οξειδωτικό στρες, η φλεγμονή, ο μεταβολισμός των λιπιδίων και η αγγειογένεση.

1.4.1 Μεταβολές στο χοριοειδή χιτώνα

Ο χοριοειδής χιτώνας είναι ένας εξαιρετικά αγγειοβριθής ιστός εντοπιζόμενος μεταξύ του αμφιβληστροειδούς και του σκληρού χιτώνα στον οποίο εντοπίζονται τα χοριοτριχοειδή. Τα τελευταία στην ουσία είναι ένα πλούσιο δίκτυο από θυριδωτά τριχοειδή διαμέτρου (12-25 μm), μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η εύκολη διάχυση μικρών μορίων εκατέρωθεν των στοιβάδων του αμφιβληστροειδούς. Τα χοριοτριχοειδή ουσιαστικά διευκολύνουν τη μεταφορά των θρεπτικών συστατικών από το ΜΕ προς τους φωτούποδοχείς και επιπλέον επιτρέπουν την απομάκρυνση των υπολειμμάτων από τους φωτούποδοχείς³⁰.

Στα νεαρά, υγιή άτομα τα χοριοτριχοειδή εμφανίζουν θυριδωτό ενδοθήλιο (*fenestrated endothelium*) χωρίς στενοσυνδέσμους και η ανάπτυξή τους εξαρτάται από την έκκριση του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF:Vascular Endothelial Growth Factor) από το ΜΕ. Ο VEGF προκαλεί την αγγειοδιαστολή, την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, τη διατήρηση των θυριδώσεων και την αγγειογένεση³¹. Με την πάροδο του χρόνου, παρατηρούνται δομικές και λειτουργικές αλλαγές των χοριοτριχοειδών, οι οποίες αναφέρονται κυρίως σε ασθενείς με ΗΕΩΚ^{1,32,33}. Οι πιο σημαντικές αλλαγές που παρατηρούνται σε άτομα με ΗΕΩΚ είναι: α) η μείωση της πυκνότητας και της διαμέτρου των χοριοτριχοειδών^{34,35} β) η αλλαγή της μορφής του αγγειακού συστήματος των χοριοτριχοειδών από κολποειδές σε σωληνοειδές¹ και γ) η μείωση ή η απώλεια της κυτταροβρίθειας. Στις δύο μορφές της ΗΕΩ παρατηρούνται διαφορετικές μεταβολές αλλά και στις δύο περιπτώσεις οι αλλαγές αυτές συντελούν στην παρεμπόδιση της

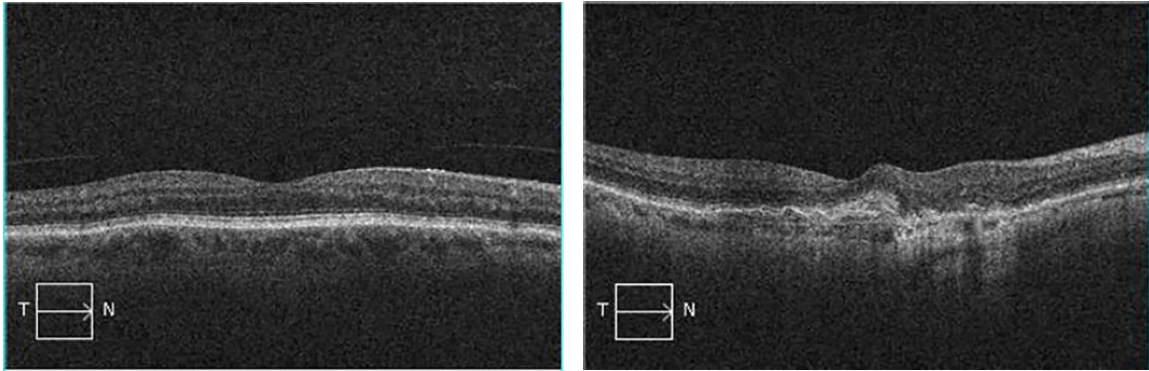
μεταφοράς επαρκούς ποσότητας οξυγόνου και μεταβολιτών από τα χοριοτριχοειδή προς τον αμφιβληστροειδή.

Στην περίπτωση της μη-εξιδρωματικής μορφής, εμφανίζονται εντονότερες μεταβολές. Αναλυτικότερα σε ασθενείς με γεωγραφική ατροφία, παρατηρείται σημαντική μείωση στον αριθμό και τη διάμετρο των χοριοτριχοειδών καθώς και απώλεια της φυσιολογικής θυριδωτής δομής τους. Οι αλλαγές στο χοριοειδή χιτώνα έπονται της ατροφίας του ΜΕ, οποία συμβάλλει στην έλλειψη των απαραίτητων για τα χοριοτριχοειδή αυξητικών παραγόντων με τελικό αποτέλεσμα τις παρατηρούμενες αλλαγές στην πυκνότητα και στα δομικά χαρακτηριστικά τους³⁶. Από την άλλη πλευρά, στην εξιδρωματική μορφή της νόσου παρατηρείται η αντίθετη σειρά των γεγονότων, δηλαδή φαίνεται ότι η πρωτογενής βλάβη εντοπίζεται στα χοριοτριχοειδή, η οποία στη συνέχεια προκαλεί ισχαιμία του ΜΕ και κατά συνέπεια απελευθέρωση ουσιών που προκαλούν την δημιουργία νέων αγγείων³⁷.

Κοινό χαρακτηριστικό και των δύο μορφών ΗΕΩ είναι η παρουσία μίας χρόνιας αιμοδυναμικής πάθησης, η οποία χαρακτηρίζεται από αθηροσκληρωτικές αλλαγές που επηρεάζουν τη χοριοειδική αγγείωση³⁸. Το συνολικό αποτέλεσμα αυτών των αλλαγών είναι η συσσώρευση εξωκυττάρων πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων και λιπιδίων τα οποία αποτελούν το βασικό συστατικό των drusen που παρατηρούνται στη μη-εξιδρωματική μορφή. Καθίσταται λοιπόν κατανοητό ότι οι δύο μορφές της ΗΕΩ έχουν διαφορετικές αιτίες εμφάνισης αλλά έχουν κοινό χαρακτηριστικό ότι επηρεάζεται η σχέση του ΜΕ με τα χοριοτριχοειδή, με τα τελευταία να υφίστανται εκφύλιση³⁹.

1.4.2 Μεταβολές στη μεμβράνη του Bruch

Βασική λειτουργία της μεμβράνης είναι η ρύθμιση της διάχυσης των βιομορίων, αλλά και η στήριξη προσκόλλησης, η διαφοροποίηση των κυττάρων του ΜΕ και η παρεμπόδιση της μετανάστευσης των κυττάρων μεταξύ χοριοειδούς και αμφιβληστροειδούς χιτώνα⁴⁰. Όπως και στην περίπτωση των χοριοτριχοειδών, η πάροδος του χρόνου δρα επιβαρυντικά καθώς επηρεάζει τη δομή, τη μοριακή σύσταση και τις φυσιολογικές της ιδιότητες της μεμβράνης. Η βασική αλλαγή που παρατηρείται είναι η αύξηση του πάχους της μεμβράνης και η ταυτόχρονη μείωση της διηθητικής ικανότητας της και της μεταφοράς των μεταβολιτών. Λόγω αυτών των αλλαγών παρατηρείται ανάπτυξη των drusen καθώς και συσσώρευση, στο άνω και εσωτερικό τμήμα της μεμβράνης, υπολειμμάτων που αποτελούνται από φωσφολιπίδια όπως τα **Basal Linear Deposits** ή **BLinD** και τα **Basal Lamellar Deposits** ή **BLamD** (Εικόνα 1.12).



Εικόνα 1.12 Απεικόνιση οφθαλμού που πάσχει από τη μη εξιδρωματική μορφή της ΗΕΩΚ. Δεξιά: συσσώρευση drusen στην περιοχή του αμφιβληστροειδούς. Αριστερά: φυσιολογικός αμφιβληστροειδής

Μεταξύ των μοριακών αλλαγών που παρατηρούνται περιλαμβάνονται η ανάπτυξη σταυροσυνδέσμων (crosslinks) ανάμεσα στα μόρια του κολλαγόνου, ο μειωμένος ρυθμός αποικοδόμησης των πρωτεογλυκανών, η συσσώρευση και εναπόθεση λιπιδίων, τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκίωσης (Advanced Glycation End-products ή AGE), ανόργανων στοιχείων (π.χ. ασβέστιο, ψευδάργυρος και σίδηρος) και πρωτεϊνών που σχετίζονται με την φλεγμονή. Συνδυαστικά οι μεταβολές αυτές οδηγούν σε^{1,41}:

1. Σταδιακή πάχυνση των δυο κολλαγονούχων στρωμάτων
2. Τροποποίηση και εκφυλισμό του κολλαγόνου και της ελαστίνης
3. Αυξημένα επίπεδα προχωρημένης γλυκίωσης και τα προϊόντα αυτής
4. Συσσώρευση διαφόρων ειδών υπολειμμάτων κάτω από το ΜΕ
5. Εκφυλισμός των φωτοϋποδοχέων (λόγω αυξημένης υδροφοβικότητας), μειωμένη διαπερατότητα, διαταραχές στην ανταλλαγή θρεπτικών μεταξύ του χοριοειδή και του ΜΕ
6. Εκθετική μείωση της υδραυλικής αγωγιμότητας της μεμβράνης

1.4.3 Μεταβολές στο μελαγχρόν επιθήλιο (ΜΕ)

Το ΜΕ αποτελείται από μια σειρά κυβοειδών κυττάρων που περιέχουν τη μελανίνη. Η βασική (έξω) πλευρά των κυττάρων χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολλών πτυχώσεων, οι οποίες αυξάνουν την επιφάνεια επαφής με την μεμβράνη του Bruch με την οποία συνδέονται πολύ ισχυρά. Αντίθετα η σύνδεση της έσω πλευράς των κυττάρων του ΜΕ είναι ασθενής και μπορεί εύκολα να διασπαστεί. Η έσω πλευρά των κυττάρων του ΜΕ φέρει πολλαπλές μικρολάχνες οι οποίες λειτουργούν σαν υποδοχείς στήριξης των φωτοϋποδοχέων. Βασικό χαρακτηριστικό των κυττάρων του ΜΕ είναι η μεταξύ τους στενή, πλευρική σύνδεση, η οποία επιτρέπει τη δημιουργία του έξω αιματοαμφιβληστροειδικού φραγμού. Το ΜΕ αποτελεί μία πολύ σημαντική δομή του οφθαλμού καθώς είναι υπεύθυνο για πολλές λειτουργίες οι οποίες διακρίνονται σε:

A) Φυσικές

1) Λειτουργεί ως φραγμός που παρέχει προστασία της οπτικής μοίρας του αμφιβληστροειδούς από την είσοδο υγρών από το χοριοειδή

2) Ισχυρή συγκόλληση του μελαγχρόου επιθηλίου και του αμφιβληστροειδούς

B) Οπτικές

1) Η παρουσία της μελανίνης στο ΜΕ μειώνει τη διάχυση του φωτός επιτυγχάνοντας έτσι μεγαλύτερη καθαρότητα της εικόνας

2) Βελτίωση της διακριτικής ικανότητας καθώς λειτουργεί ως φραγμός στο φως που εισέρχεται από το κερατοειδή χιτώνα

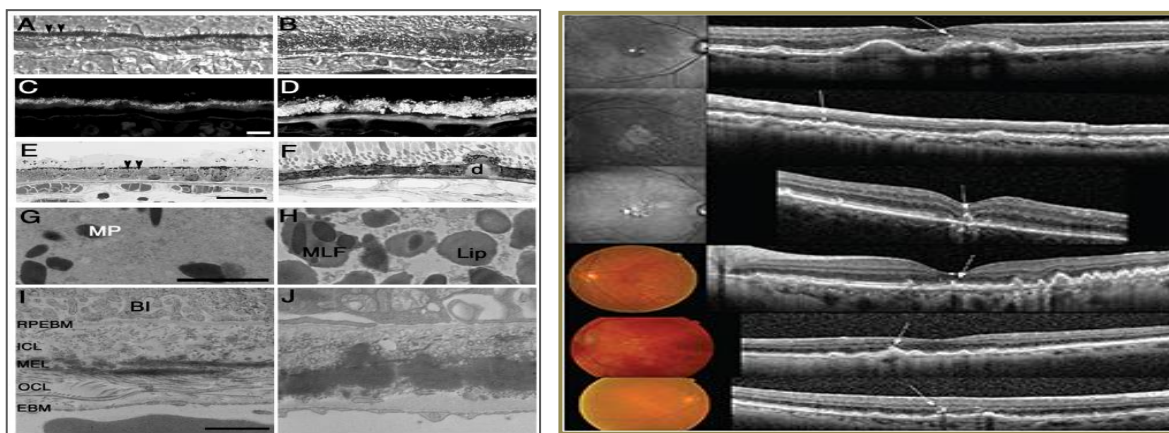
Γ) Μεταβολικές-Βιοχημικές

1) Επιτελείται η διαδικασία της φαγοκυττάρωσης των έξω τμημάτων των κωνίων και των ραβδίων

2) Συμμετέχει στο μεταβολισμό της βιταμίνης Α

3) Εμπλέκεται στη μεταφορά θρεπτικών υλικών από το χοριοειδή και στη σύνθεση κοκκίων μελανίνης

Η αύξηση της ηλικίας επηρεάζει και αυτή τη δομή του οφθαλμού και οδηγεί σε πληθώρα δομικών αλλαγών του ΜΕ, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται η απώλεια των κοκκίων μελανίνης και η αύξηση της συγκέντρωσης των υπολειπόμενων μη-αποδομημένων προϊόντων (ολικά λιπίδια και ουδέτερα λίπη), γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση λυσοσωμικών εγκλείστων και τη συσσώρευση κοκκίων λιποφουσκίνης (Εικόνα 1.13). Τα τελευταία είναι άχρηστες κυτταρικές εναποθέσεις από κύτταρα του ΜΕ που έχουν υποστεί απόπτωση αλλά και από λυσοφαγώματα των μεμβρανών των φωτοϋποδοχέων⁴².



Εικόνα 1.13 Αριστερά: Αλλαγές που παρατηρούνται στο ΜΕ ανάμεσα σε νέους (A,C,E,G,I) και ηλικιωμένους (B,D,F,H,J) δότες. Πάνω: Παραδείγματα ασθενών με τη μη εξιδρωματικού τύπου ΗΕΩΚ. Απεικονίζονται οι αλλαγές που συμβαίνουν στο ΜΕ με τη μέθοδο OCT

1.4.4 Μεταβολές στον ιδίως αμφιβληστροειδή χιτώνα

Ο ιδίως αμφιβληστροειδής (*neural retina*) είναι ένας διαφανής, λεπτός υμένας, ο οποίος εντοπίζεται μεταξύ του οπτικού νεύρου και της priονωτής περιφέρειας. Αυτός ο υμένας περιλαμβάνει πέντε κατηγορίες νευρικών κυττάρων: τους φωτοϋποδοχείς (ραβδία, κωνία), τα δίπολα, τα οριζόντια, τα βραχύινα ή αμακρinoειδή και τα γαγγλιακά κύτταρα. Η σύνδεση αυτών κυττάρων παρουσιάζει ένα πολύπλοκο στοιβαδωτό πρότυπο, η οποία ωστόσο εξασφαλίζει τη δίοδο του φωτός μέσα από στοιβάδες άλλων νευρικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς πριν επιδράσει στους φωτοϋποδοχείς.

Η ηλικία επηρεάζει αρνητικά και αυτό το τμήμα του οφθαλμού καθώς με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται μια σταδιακή απώλεια των φωτοϋποδοχέων. Η απώλεια αυτή σήμερα θεωρείται μία υποκλινική εκδήλωση της ΗΕΩ, η οποία όμως δεν είναι ορατή στον βυθό. Μάλιστα έχει βρεθεί ότι τα ραβδία είναι πιο ευάλωτα στη γήρανση σε σύγκριση με τα κωνία γεγονός που σημαίνει ότι τα κατά την ενήλικη ζωή ο συνολικός αριθμός των κωνίων στο κεντρικό βοθρίο είναι εξαιρετικά σταθερός, σε αντίθεση με τον αριθμό των ραβδίων, ο οποίος παρουσιάζει μία μείωση της τάξης του 30%. Αναφορικά με την απώλεια των φωτοϋποδοχέων έχει αναφερθεί ότι στα αρχικά στάδια της ξηρής ΗΕΩ η ποσότητα των κωνίων παραμένει αμετάβλητη στο κεντρικό βοθρίο, ενώ στην παραβοθρική περιοχή εντοπίζονται μεγάλα δυσμορφικά κωνία και μικρός αριθμός ραβδίων. Στην υγρή μορφή έχει παρατηρηθεί αυξημένη εκλεκτική απώλεια των ραβδίων με αποτέλεσμα το σύνολο των φωτοϋποδοχέων που απομένουν στην περιοχή της ωχράς κηλίδας να είναι κωνία^{43,44}. Άλλες τροποποιήσεις που έχουν παρατηρηθεί σε αυτούς τους ασθενείς είναι: α) η ανάπτυξη χοριοειδικής νεοαγγείωσης και ουλοποίησης που συνεπάγεται μειωμένη ικανότητα όρασης και β) η μείωση των διαθέσιμων ρετινοειδών στους φωτοϋποδοχείς, κυρίως της βιταμίνης Α και του παραγώγου της 11cis-ρετινάλης, με αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας αυτών των ασθενών να βλέπουν με χαμηλό φωτισμό ή να οδηγούν τη νύχτα⁴⁵.

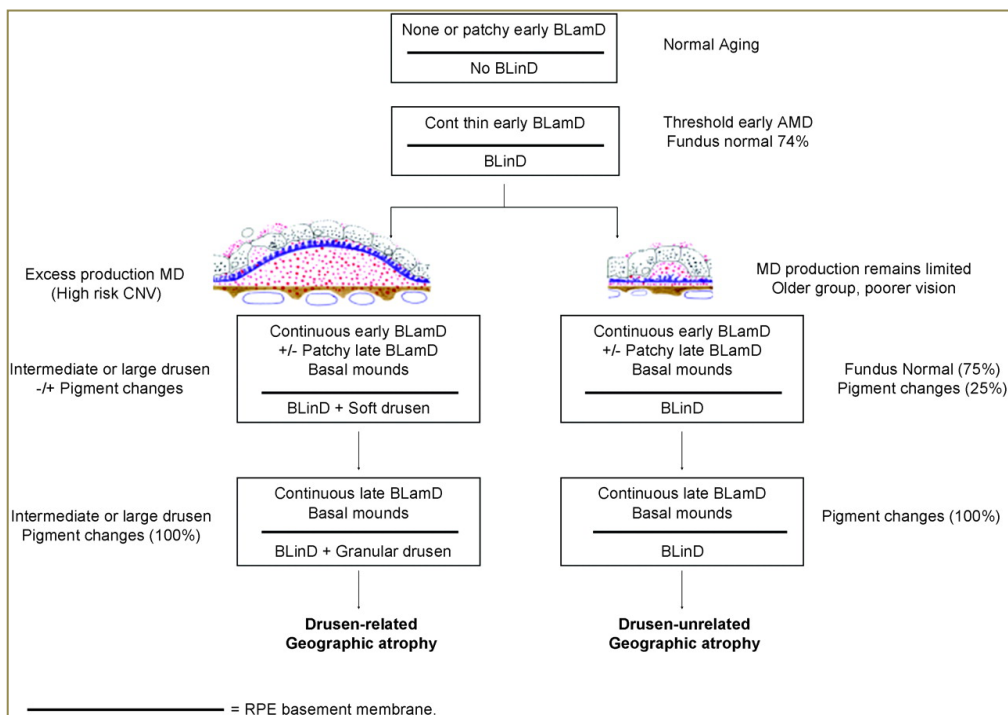
Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η εκφύλιση των φωτοϋποδοχέων είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη γήρανση και επεκτείνεται πριν η ΗΕΩ εξελιχθεί σε πιο προχωρημένο στάδιο στο ΜΕ. Από πολλούς υποστηρίζεται το γεγονός ότι η πρωτογενής βλάβης στην ΗΕΩ περιλαμβάνει τις αλλοιώσεις του ΜΕ και της μεμβράνης του Bruch. Ωστόσο, φαίνεται ότι η απώλεια της όρασης οφείλεται τελικά στη δυσλειτουργία, στην εκφύλιση ή στον κυτταρικό θάνατο των φωτοϋποδοχέων του ιδίως αμφιβληστροειδή καθώς σε αυτή την περιοχή εντοπίζεται η μεγαλύτερη βλάβη.

1.4.5 Drusen και βασικές εναποθέσεις

Χαρακτηριστικό γνώρισμα της ΗΕΩ, το οποίο εμφανίζεται από τα πρώτα κιάλας στάδια της ασθένειας, είναι η δημιουργία εξωκυττάρων παθολογοανατομικών βλαβών οι οποίες

εμφανίζονται στη μεμβράνη του Bruch είτε ως διάχυτες εναποθέσεις είτε με τη μορφή drusen⁴⁶⁻⁴⁹. Σήμερα γίνεται διάκριση αυτών των εναποθέσεων σε δυο κατηγορίες ανάλογα με τη θέση τους ως προς το ΜΕ και με τη σύστασή τους: 1) βασικές υμενώδεις (**Basal Laminar Deposits** ή **BLamD**) και 2) βασικές γραμμικές εναποθέσεις (**Basal Linear Deposits** ή **BLinD**). Οι **BLamD** εναποθέσεις εντοπίζονται στη βάση της μεμβράνης του ΜΕ και έχουν σύνθετη σύσταση η οποία περιλαμβάνει μεταξύ των άλλων μεμβρανικές πρωτεΐνες, λαμνίνη, γλυκοπρωτεΐνες, γλυκοζαμινογλυκάνες (χονδροϊτίνη καιθειική ηπαράνη), ζώνες κολλαγόνου τύπου IV, υδατάνθρακες, χοληστερόλη και απολιποπρωτεΐνες Β και Ε. Οι **BLamD** εναποθέσεις ανιχνεύονται κυρίως σε άτομα που διαγιγνώσκονταν με την πρώιμη μορφή της ασθένειας⁵⁰.

Από την άλλη πλευρά οι **BLinD** εναποθέσεις βρίσκονται εκτός της βασικής μεμβράνης του ΜΕ και αποτελούνται από επικαλυμμένα ή μη-μεμβρανικά υπολείμματα και κυστίδια. Οι εναποθέσεις αυτές φαίνεται να είναι πιο δυνατοί προγνωστικοί δείκτες από τις BLamD σε σχέση με την ανάπτυξη των drusen και την εξέλιξη της ΗΕΩ. Ωστόσο πρέπει να τονιστεί ότι η συνέργεια των **BLamD** και **BLinD** εναποθέσεων αποτελεί ουσιαστικό βήμα στην έναρξη της ασθένειας (Εικόνα 1.14).



Εικόνα 1.14 Η σχέση των εναποθέσεων BlamD και BlinD με την ΗΕΩΚ. Η συνέργεια των δύο εναποθέσεων πυροδοτεί την έναρξη εμφάνισης της νόσου. Το μονοπάτι που θα ακολουθηθεί εξαρτάται από το ποσοστό των εναποθέσεων

Η παρουσία drusen είναι το βασικό παθολογικό γνώρισμα της ΗΕΩ με σημαντική κλινική εφαρμογή, καθώς η αξιολόγησή τους σε κλινικό επίπεδο παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την κατάσταση του ασθενούς αλλά και για την πρόγνωση της ασθένειας. Ιστολογικά τα drusen

διακρίνονται βάσει του σχήματος και του μεγέθους τους σε σκληρά και μαλακά. Τα σκληρά drusen είναι στρογγυλές, κίτρινες εναποθέσεις οι οποίες είναι μικρού μεγέθους και με σαφή όρια. Η παρουσία αυτών των εναποθέσεων θεωρείται φυσιολογική με την πάροδο του χρόνου και για αυτόν τον λόγο τα σκληρά drusen δεν είναι επιβλαβή και δε συνδέονται πάντα με την εμφάνιση της ασθένειας. Από την άλλη πλευρά, τα μαλακά drusen έχουν μεγάλο μέγεθος χωρίς σαφή όρια και η παρουσία τους αποτελεί οϊωνό οφθαλμολογικών τροποποιήσεων⁴⁰.

Η έλευση νέων εξελιγμένων και αξιόπιστων μοριακών μεθόδων άνοιξε το δρόμο για την μελέτη της μοριακής σύστασης των drusen με απώτερο σκοπό την εις βάθος κατανόηση της μοριακής παθογένειας της HEΩ, η οποία αναμένεται να οδηγήσει στην αναγνώριση νέων πιθανών θεραπευτικών στόχων και την ανάπτυξη νέων πιο ειδικών φαρμάκων. Τα αποτελέσματα των μελετών για τη μοριακή σύσταση των drusen έχουν δείξει ότι αυτοί οι σχηματισμοί αποτελούνται από συσσωματώματα λιπιδίων, γλυκολιπιδίων, πρωτεϊνών και κυτταρικών στοιχείων⁷. Πολλές από τις πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα drusen σχετίζονται με τη φλεγμονή και την ανοσολογική απόκριση (κυρίως παράγοντες συμπληρώματος, αντιγόνα MHC τάξης II, λ αλυσίδες ανοσοσφαιρινών, CRP), με την ινωδόλυση και την πήξη (ινωδογόνο και παράγοντας X) καθώς και με το μεταβολισμό των λιπιδίων (π.χ. απολιποπρωτεΐνες apoE και apoB)⁷ και πολλές άλλες πρωτεΐνες, όπως το β-αμυλοειδές, η ουμπικουϊτίνη, οι ιντεγκρίνες, ο ιστικός αναστολέας της μεταλλοπρωτεϊνάσης 3 (TIMP3), η φμπρονεκτίνη, η βιτρονεκτίνη και οι κρυσταλλίνες^{46,51}.

Αν και ο μηχανισμός σχηματισμού των drusen αποτελεί ένα αντικείμενο εντατικής μελέτης ακόμα δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως τα μονοπάτια και οι διαταραχές που οδηγούν σε αυτές τις μεταβολές. Σήμερα επικρατούν δύο θεωρίες σχετικά με την εναπόθεση των drusen: α) θεωρία της εναπόθεσης σύμφωνα με την οποία τα drusen προέρχονται από τα κύτταρα του ME μέσω αποβολής ανώμαλου υλικού προς τη μεμβράνη του Bruch και β) θεωρία της μετατροπής σύμφωνα με την οποία τα drusen προέρχονται από την εκφυλιστική μετατροπή των ίδιων των κυττάρων σε drusen⁴⁶.

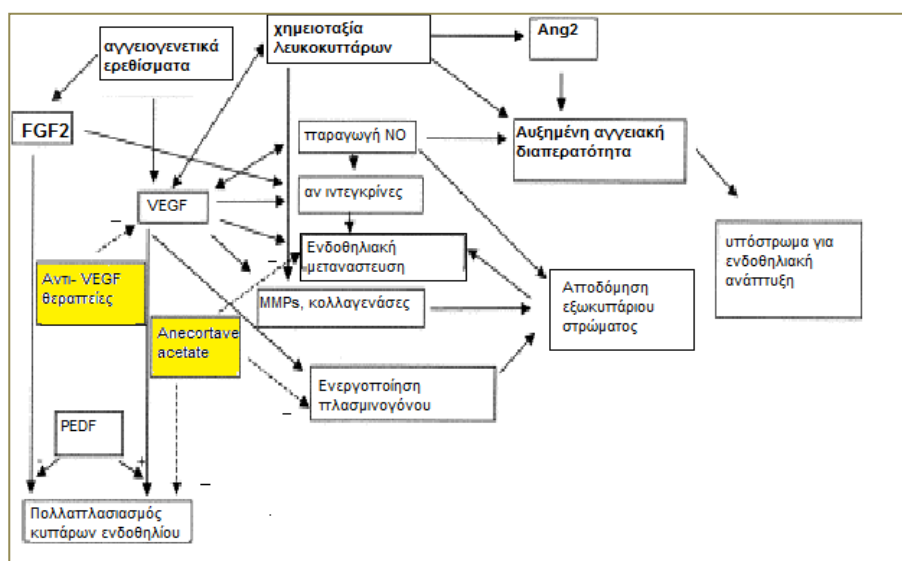
1.4.6 Χοριοειδική νεοαγγείωση (Choroidal Neovascularization ή CNV)

Η χοριοειδική νεοαγγείωση είναι το βασικό χαρακτηριστικό της πιο σοβαρής μορφής της ασθένειας, της εξιδρωματικής μορφής HEΩ και αποτελεί σταθερά ένα αντικείμενο ερευνητικού ενδιαφέροντος. Αφετηρία της νεοαγγείωσης φαίνεται ότι είναι το ME, τα κύτταρα του οποίου φέρουν υποδοχείς για τον VEGF, γεγονός που υποδηλώνει την ικανότητα αυτών των κυττάρων να δέχονται ερεθίσματα για την αγγειογένεση κάτω από τον αμφιβληστροειδή⁵². Υψηλές συγκεντρώσεις του VEGF και του αντίστοιχου υποδοχέα έχουν αναφερθεί στα κύτταρα του ME, στο υαλώδες σώμα αλλά και στο πλάσμα των ασθενών με HEΩΚ^{53,54}. Αυξημένα επίπεδα του συγκεκριμένου αυξητικού παράγοντα σε επίπεδο πρωτεΐνης αλλά και mRNA έχουν παρατηρηθεί

επίσης στο υαλώδες σώμα, στους ινοβλάστες και στα διαφοροποιημένα κύτταρα του ΜΕ που έχουν αφαιρεθεί μετά από χειρουργική επέμβαση⁵⁵. Άλλοι αυξητικοί παράγοντες που δρουν συνεργιστικά με τον VEGF για τη νεοαγγείωση, είναι ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF-2), η αγγειοποιητίνη-2 (Ang-2) και το μονοξείδιο του αζώτου (NO)⁵⁶.

Στον αντίποδα αυτών των παραγόντων βρίσκεται η πρωτεΐνη PEDF (Pigment Epithelium Derived Factor), η οποία εκφράζεται από τα κύτταρα του ΜΕ, και έχει την αντίθετη δράση από τον VEGF καθώς έχει ανασταλτική δράση αναφορικά με την αγγειογένεση^{57,58}. Έχει διαπιστωθεί ότι το οξειδωτικό στρες είναι κρίσιμος ρυθμιστής της ισορροπίας της έκφρασης στο ΜΕ των VEGF και PEDF καθώς επίσης και ότι η σχετική αναλογία ανάμεσα σε προαγγειογενετικούς και αντιαγγειογενετικούς παράγοντες στο χοριοειδικό μικροπεριβάλλον παίζει ουσιαστικό ρόλο στην ανάπτυξη ή μη της χοριοειδικής νεοαγγειογένεσης⁵⁹.

Είναι πλέον αποδεκτό ότι η χοριοειδική νεοαγγείωση αποτελεί έναν σημαντικό επιβαρυντικό παράγοντα για την εμφάνιση ΗΕΩ, γεγονός που έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη αρκετών θεραπευτικών προσεγγίσεων που στοχεύουν αυτή την διαταραχή. Μεταξύ αυτών των θεραπευτικών προσεγγίσεων περιλαμβάνονται: α) η διατροφή με τροφές πλούσιες σε αντιοξειδωτικά β) η θεραπεία με laser γ) η θεραπεία με laser φωτοπηξίας δ) η χειρουργική επέμβαση και ε) η χρήση laser υπερύθρων (Transpupillary ThermoTherapy ή TTT). Ωστόσο τα τελευταία χρόνια εφαρμόζεται η πιο σύγχρονη και ειδική θεραπεία με χρήση αντι-VEGF παραγόντων οι οποίοι αναστέλλουν τις προ-αγγειογενετικές κυτοκίνες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων φαρμάκων είναι η πεγκαπτανίμη (Macugen[®], Pegaptanib Sodium), η ρανιβιζουμάβη (Lucentis[®], ranibizumab), η amfilberseptη (Ευλεα), η μπεβασιζουμάβη (Avastin[®], bevacizumab)⁶⁰.



Εικόνα 1.15 Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών νεοαγγειογένεσης. FGF2: Fibrinoblast Growth Factor 2, VEGF: Vascular endothelial growth factor, PEDF: Pigment Epithelium Derived Factor, Ang2: αγγειοποιητίνη 2, MMPs: μεταλλοπρωτεϊνάσες στρώματος. Με κίτρινο χρώμα επισημαίνονται θεραπείες που στοχεύουν τη χοριοειδική νεοαγγειογένεση και συγκεκριμένα αντι-VEGF θεραπείες (μονοκλωνικά αντισώματα ή απταμερή έναντι του VEGF) και το anecortave acetate που βρίσκεται σε μελέτες φάσης 3 για την υγρή ΗΕΩΚ

1.4.7 Συμπληρωματικοί παράγοντες της παθοφυσιολογίας της ΗΕΩ

Στις μέρες μας η εντατική έρευνα για την αιτιοπαθολογία της ΗΕΩ έχει αποδώσει καρπούς και ήδη γνωρίζουμε αρκετούς παράγοντες κινδύνου. Ωστόσο, παραμένουν αρκετά κενά σχετικά με την αιτιολογία και τους μηχανισμούς παθογένειας της ΗΕΩ. Πληθώρα πειραματικών δεδομένων υποστηρίζουν τον κεντρικό ρόλο της κυτταρικής γήρανσης και του οξειδωτικού στρες, όπως φαίνεται από τη συσσώρευση λιποφουσκίνης στα κύτταρα του ΜΕ, της ισχαιμίας του χοριοειδούς, της φλεγμονής, του μεταβολισμού των λιπιδίων και της αγγειογένεσης.

Ο αμφιβληστροειδής και ειδικότερα η ωχρά εκτίθενται συνεχώς στις συνέπειες του οξειδωτικού στρες εξαιτίας της υψηλής πίεσης του οξυγόνου, της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και κατά συνέπεια στο φωτοοξειδωτικό στρες, καθώς και λόγω του ότι τα χρωμοφόρα που βρίσκονται στον αμφιβληστροειδή και το ΜΕ, όπως η μελανίνη, η λιποφουσκίνη και η ροδοψίνη, μπορεί να οδηγήσουν σε φωτοχημική βλάβη. Παράλληλα, η φαγοκυττάρωση των ακραίων τμημάτων των φωτοϋποδοχέων αποτελεί από μόνη της μία σημαντική πηγή αντιδραστικών ενδιάμεσων οξυγόνου (Reactive Oxygen Intermediates ή ROI)⁶¹. Το οξειδωτικό στρες μπορεί προκαλέσει τον κυτταρικό θάνατο ή ακόμα και ουσιαστικές λειτουργικές διαταραχές που τελικά οδηγούν αρχικά στην ανεπάρκεια του ιστού και στη συνέχεια στην ανεπάρκεια του οργάνου. Οι αιτίες αυτής της δυσλειτουργίας είναι πολλαπλές μεταξύ των οποίων η διαταραχή της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και του μεταβολισμού της εξωκυττάριας ουσίας. Στα πλαίσια της διαταραχής της κυτταρικής μεμβράνης το κύτταρο καταστρέφει και απομακρύνει ένα μέρος της κυτταρικής μεμβράνης αλλά και του κυτταροπλάσματος, έτσι ώστε να απομακρύνει κατεστραμμένα κυτταρικά οργανίδια χωρίς ωστόσο να επέρχεται κυτταρικός θάνατος⁶². Ο μεταβολισμός της εξωκυττάριας ουσίας συνιστά την απόλυτα εξισορροπημένη παραγωγή του κολλαγόνου και των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας ώστε να καλύπτονται οι ανάγκες της. Οποιαδήποτε μεταβολή αυτής της διαδικασίας συνεπάγεται σημαντικές διαταραχές στην λειτουργία της εξωκυττάριας ουσίας μεταξύ των οποίων είναι η αναδιοργάνωση των αγγείων. Φαίνεται ότι το εναρκτήριο γεγονός αποτελεί πιθανόν ο συνδυασμός γενετικών παραγόντων, οξειδωτικού στρες και υποξίας που οδηγούν σε αύξηση των επιπέδων των προαγγειογενετικών μορίων με αποτέλεσμα τη διάσπαση της εξωκυττάριας ουσίας και την αναδιοργάνωση των αγγείων και της νεοαγγείωσης, υπό τον έλεγχο των αγγειογενετικών παραγόντων⁶³.

Η παθολογοανατομική εξέταση των εστιών της ΗΕΩ έχει αποκαλύψει την παρουσία διήθησης από μακροφάγα και φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως είναι οι παράγοντες του συμπληρώματος και οι κυτοκίνες. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι ενδεικτικά σημάδια χρόνιας φλεγμονώδους βλάβης, συνδέοντας έτσι την εμφάνιση της ΗΕΩ με την φλεγμονώδη αντίδραση. Δεδομένα που υποστηρίζουν την προαναφερθείσα συσχέτιση ανάμεσα στη φλεγμονή και την ΗΕΩ είναι η σύνδεση μιας σειράς παραγόντων του συμπληρώματος (C1, C2, C3, C7, BF) και κυρίως τον

παράγοντα Η με τη νόσο, παρατηρήσεις που υπογραμμίζουν την συμβολή της υπερενεργοποίησης του συμπληρώματος στην παθογένεια της ΗΕΩ. Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός μελετών υποστηρίζει τη συμμετοχή του συστήματος του συμπληρώματος στην παθογένεια της ΗΕΩ. Ο φυσιολογικός αμφιβληστροειδής περιέχει το σύνολο των 35 πρωτεϊνών που αποτελούν το συμπλήρωμα αν και η ενεργότητά τους παραμένει σε χαμηλά επίπεδα και η δράση τους περιορίζεται στην προστασία του οφθαλμού από διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς και στην καταστολή της Τ-κυτταρικής απόκρισης. Η γενική υπόθεση συμμετοχής του συμπληρώματος στην παθογένεια της ΗΕΩ είναι ότι η διαδικασία καταστροφής του ΜΕ λόγω της φυσιολογικής γήρανσης και του οξειδωτικού στρες οφείλεται στην ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος. Η δημιουργία των drusen συμβάλλει περαιτέρω στην ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού του συστήματος, με αποτέλεσμα η τοπική αύξηση των ενεργοποιημένων συστατικών του συμπληρώματος C3b, C3a/C5a C5b-C9 να ενισχύει την ιστική βλάβη προωθώντας έτσι την φλεγμονή και την εκφύλιση του ΜΕ.

Σε ότι αφορά την ξηρή μορφή της νόσου, η συμμετοχή του συμπληρώματος στην εκδήλωσή της υποστηρίζεται από τη μοριακή σύσταση των drusen, που εμπεριέχει πολλά στοιχεία του συμπληρώματος προερχόμενα από όλες τις οδούς, όπως το C1q, η λεκτίνη, ο παράγοντας Β (Complement Factor Β ή CFB), ο CFH (Complement Factor Η), το C3 (Complement Component 3) και το C3a (Complement Component 3a). Επίσης έχουν ανιχνευθεί όψιμοι παράγοντες του συμπληρώματος όπως τα C5, C6, C7, C8, C9 (Complement Component 5,6,7,8,9 αντίστοιχα), συμπλέγματα MAC και ρυθμιστικές πρωτεΐνες όπως ο CR-1, η βιτρονεκτίνη και η κλαστερίνη (clusterin)⁶⁴. Παράλληλα υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που συσχετίζουν την υγρή ΗΕΩ με τον καταρράκτη του συμπληρώματος. Για παράδειγμα έχει αναφερθεί η πιθανή συμβολή των αναφυλατοξινών C3a και C5a, τα οποία ανιχνεύονται στα drusen, στην εκδήλωση και στην εξέλιξη της νεοαγγειογένεσης μέσω της επαγωγής της έκκρισης του VEGF⁶⁵. Ενώ όμως είναι επιβεβαιωμένη η ενεργοποίηση του συμπληρώματος στην υγρή ΗΕΩ, παραμένουν ακόμα άγνωστες οι αιτίες που προκαλούν αυτή την ενεργοποίηση. Πιθανές αιτίες είναι οι συστηματικές και τοπικές νόσοι (όπως το γλαύκωμα), η γήρανση καθώς και πρωτεΐνες των drusen. Παρά τα κενά που υπάρχουν σήμερα ωστόσο είναι αποδεκτό ότι ανεξάρτητα από το αρχικό ερέθισμα, αυτό που οδηγεί τελικά στην εμφάνιση της ασθένειας είναι η διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στην ευεργετική επίδραση του συμπληρώματος και την ελαττωματική του λειτουργία, η οποία μπορεί να προκαλέσει σοβαρή ιστική βλάβη και παθολογία^{64,66}.

Υπάρχουν ακόμα αρκετές γενετικές μελέτες, οι οποίες δείχνουν την ύπαρξη στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων ανάμεσα στην ΗΕΩ και τους πολυμορφισμούς αρκετών γονιδίων που σχετίζονται με το σύστημα του συμπληρώματος⁶⁷. Συνεπώς, πολυμορφισμοί σε γονίδια που κωδικοποιούν συστατικά του συμπληρώματος αλλά και ρυθμιστικές πρωτεΐνες συμβάλουν στην

επιδεκτικότητα ενός ατόμου στην εμφάνιση της ΗΕΩ εξηγώντας τον ρόλο της φλεγμονής και της γενετικής προδιάθεσης στην παθογένεια της ασθένειας. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες CFB, C2 (Complement Component 2) και CFH παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον και είναι συνακόλουθα με αυτήν την υπόθεση.

Πληθώρα πειραματικών δεδομένων υποστηρίζουν επίσης ότι στα αρχικά στάδια της ασθένειας προσβάλλονται τα χοριοτριχοειδή, και η τοπική ισχαιμία με τη σειρά της επηρεάζει τόσο το ΜΕ, όσο και τη μεμβράνη του Bruch και τους φωτοϋποδοχείς⁶⁸. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω φαίνεται ότι στους αιτιοπαθολογικούς παράγοντες περιλαμβάνεται και ο μεταβολισμός των λιπιδίων. Προς υποστήριξη αυτής της θεωρίας υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι γονίδια που συνδέονται με την εμφάνιση χοληστερόλης αποτελούν παράγοντες κινδύνου για τη νόσο. Επιπλέον, πολλοί συνδέουν την εμφάνιση της ΗΕΩ με τον ελαττωματικό μεταβολισμό των λιπιδίων λόγω της παρουσία υψηλής συγκέντρωσης χοληστερόλης στα drusen, στη γηρασμένη μεμβράνη του Bruch και σε άλλες εστίες⁶⁹.

1.5 Γενετική βάση της ΗΕΩ

Η συσχέτιση της ΗΕΩ με γενετικούς παράγοντες έχει αποδειχθεί από πολλές ανεξάρτητες μελέτες και η απαρχή καταγράφεται 40 χρόνια πριν όταν παρατηρήθηκε ένας ξεκάθαρα υψηλός βαθμός συμφωνίας στους μονοζυγωτικούς διδύμους σε σχέση με τους διζυγωματικούς⁷⁰. Η μελέτη αυτή άνοιξε το δρόμο για άλλες αντίστοιχες μελέτες τόσο με διδύμους²⁵, όσο και σε οικογένειες^{25,71}, όπου πραγματοποιήθηκε σύγκριση της συχνότητας εμφάνισης της ΗΕΩ σε συγγενείς ασθενών σε σχέση με τους συγγενείς ατόμων ελέγχου. Τα δεδομένα αυτών των ερευνών αποκάλυψαν την ξεκάθαρη ύπαρξη μίας γενετικής συνιστώσας για την ΗΕΩ κι αποκάλυψαν τη συμβολή του γενετικού υποβάθρου στον κίνδυνο εμφάνισης της ασθένειας. Το σύνολο των επόμενων ερευνών έδειξαν ότι περίπου το 20% των ατόμων με ΗΕΩ έχουν θετικό οικογενειακό ιστορικό.

Η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών μελέτης του γονιδιώματος μας έδωσε την δυνατότητα αναγνώρισης των γενετικών τόπων, των γονιδίων και των πολυμορφισμών που εμπλέκονται στην εμφάνιση της συγκεκριμένης ασθένειας και πιθανά στην κληρονόμησή της. Πράγματι πρόσφατες μελέτες έχουν οδηγήσει στην αναγνώριση υποψηφίων γονιδίων που παρουσιάζουν σημαντική συσχέτιση με την ασθένεια αλλά και με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της ΗΕΩ⁷². Οι σημαντικότεροι εκπρόσωποι αυτών των γονιδίων είναι το *CFH*⁷³⁻⁷⁵ και το *LOC387715* ή *ARMS2*⁷⁶⁻⁷⁸. Τα τελευταία χρόνια έχουν επίσης αναγνωρισθεί αρκετοί πολυμορφισμοί αυτών των γονιδίων που συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΗΕΩ, καθώς επίσης και πολυμορφισμοί γονιδίων, όπως τα γονίδια *C2* και *CFB*, που φαίνεται να έχουν προστατευτική δράση και σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Η ανάλυση των SNPs αποτελεί τα τελευταία χρόνια ένα χρήσιμο και ελκυστικό εργαλείο στην διερεύνηση της γενετικής βάσης πολυπαραγοντικών και σύνθετων νόσων όπως η ΗΕΩ, καθώς σήμερα έχουν αναπτυχθεί οι κατάλληλες εργαστηριακές

τεχνικές για την αξιόπιστη ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό αυτών των πολυμορφισμών, οι οποίοι βρίσκονται σε αφθονία και παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα⁷⁹.

Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων *CFH*, *CFB* και *C2* έχουν μελετηθεί εκτενώς και στο σύνολό τους τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι πολυμορφισμοί στα συγκεκριμένα γονίδια καθώς και σε άλλα που κωδικοποιούν παράγοντες του συμπληρώματος, μπορεί να εξηγούν περίπου το 75% των περιπτώσεων ΗΕΩ⁸⁰. Ασφαλώς οι μελέτες συσχέτισης διαφόρων γονιδίων με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου περιλαμβάνουν μία πληθώρα γονιδίων τα οποία έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται σε διάφορα βιοχημικά μονοπάτια καθώς και σε φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αντιδράσεις, των οποίων η λειτουργία τους φαίνεται να διαταράσσεται κατά την έναρξη και την εξέλιξη της ΗΕΩ (Πίνακας 1). Είναι φανερό ότι μεταξύ των γονιδίων που εμπλέκονται με την εμφάνιση της νόσου, υπάρχουν αρκετά που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του εξωκυττάρου στρώματος καθώς και πρωτεΐνες που σχετίζονται με το μεταβολισμό των λιπιδίων. Το γεγονός αυτό εξηγείται, καθώς η συσσώρευση των λιπιδίων είναι ένα από τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά στην παθολογοανατομική εικόνα της νόσου, ενώ η διαταραχή της δομής του εξωκυττάρου στρώματος συνιστά προαπαιτούμενο για την επέκταση της νεοαγγείωσης από τον χοριοειδή χιτώνα στο ΜΕ και τον αμφιβληστροειδή⁷².

Πίνακας 1. Γονίδια που σχετίζονται με την εμφάνιση της ΗΕΩ

Γονίδιο	Θέση	Πλήρης Ονομασία	Λειτουργία
<i>ABCR</i>	1p22.1-21	ATP-binding cassette, subfamily A, member 4	Μεταφέρει συμπλέγματα all-trans-ρετινάλης φωφατιδυλαιθανολαμίνης διαμέσου της μεμβράνης των δισκων
<i>HMCN1</i>	1q25.3-q31.1	Hemicentin 1	Πρωτεΐνη του εξωκυττάρου στρώματος
<i>CFH</i>	1q32	Complement Factor H	Παράγοντας του συμπληρώματος
<i>CX3CRI</i>	3pter-p21	Chemokine CX3C motif receptor 1	Υποδοχέας χημειοκινών, συμμετέχει στη χημειοταξία μακροφάγων και μικρογλοίας
<i>TLR3</i>	4q35	Toll like receptor 3	Υποδοχέας τύπου Toll-Αναγνώριση παθογόνων και ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας
<i>CFI</i>	4q25	Complement Factor I	Παράγοντας του συμπληρώματος
<i>BF</i>	6p21.3	Factor B	Παράγοντας της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος
<i>C2</i>	6p21.3	Complement factor 2	Κλάσμα της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος
<i>VEGF</i>	6p12	Vascular Endothelial Growth Factor	Αυξητικός παράγων του αγγειακού ενδοθηλίου-προάγει τη νεοαγγειογένεση
<i>ESR1</i>	6q25.1	Estrogen Receptor 1	Υποδοχέας των οιστρογόνων, μεταγραφικός παράγων

Γονίδιο	Θέση	Πλήρης Ονομασία	Λειτουργία
TLR4	9q32-q33	Toll like Receptor 4	Υποδοχέας τύπου Toll-Αναγνώριση παθογόνων και ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας
ARMS2	10q26	Age Related Macular Susceptibility 2	Άγνωστη λειτουργία, εντόπιση στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου
HTRA1	10q26	High-temperature requirement factor A1	Πρωτεάση σερίνης που ενεργοποιείται επί κυτταρικού στρες
PLEKHA1	10q26	Pleckstrin homology domain-containing protein, family A, member 1	Άγνωστη λειτουργία
ERCC6	10q11.23	Excision-repair cross-complementing group 6	Πρωτεΐνη επιδιόρθωσης DNA
SERPING1	11q11-q13.1	Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	Αναστολέας του C1 κλάσματος του συμπληρώματος
FBLN5	14q32.12	Fibulin 5	Πρωτεΐνη του εξωκυττάριου στρώματος
LIPC	15q21-q23	Hepatic Lipase	Συμμετέχει στο μεταβολισμό των λιπιδίων
C3	19p13.3-p13.2	Complement factor 3	Κλάσμα του συμπληρώματος
APOE	19q	Apolipoprotein E	Λιποπρωτεΐνη με σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό τη χοληστερόλης
CST3	20p11.2	Cystatin 3	Αναστολέας λυσοσωμικών πρωτεϊνών

Γονίδιο CFH (Complement Factor H)

Η ανακάλυψη ενός SNP στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον παράγοντα του συμπληρώματος H (CFH) αποτέλεσε το πρώτο σημαντικό βήμα στην προσπάθεια συσχέτισμού διαφόρων γονιδίων με την HEΩ. Το *CFH* ανήκει στην οικογένεια γονιδίων RCA (Regulators of Complement Activation), αποτελείται από 23 εξόνια κι εντοπίζεται στον γενετικό τόπο 1q32.3⁸¹⁻⁸⁴. Ο CFH είναι η βασική ρυθμιστική πρωτεΐνη της εναλλακτικής οδού του συστήματος του συμπληρώματος και ανιχνεύεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο πλάσμα του αίματος. Η βασική του λειτουργία είναι η αναστολή της δράσης του συμπληρώματος τόσο στο πλάσμα όσο και στις κυτταρικές επιφάνειες, προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο τα υγιή κύτταρα του ξενιστή. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών ο SNP T1277C, που οδηγεί στην αντικατάσταση του αμινοξέος στη θέση 402 από τυροσίνη σε ιστιδίνη, παρουσιάζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της HEΩ⁸⁵⁻⁸⁷. Η αμινοξική αυτή αλλαγή έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της δράσης του παράγοντα CFH και την ταυτόχρονη αύξηση της δράσης του συμπληρώματος οδηγώντας

τελικά στην καταστροφή των αγγείων. Το αλληλόμορφο C αποτελεί το αλληλόμορφο υψηλού κινδύνου εμφάνισης της ΗΕΩ και έχει βρεθεί ότι συνεισφέρει στην εκδήλωση του 50-57,3% όλων των περιπτώσεων. Μάλιστα έχει υπολογισθεί ότι οι φορείς του γονότυπου CC παρουσιάζουν 7,4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης ΗΕΩ ενώ για τους φορείς του γονότυπου TC ο κίνδυνος αυτός είναι 4,6 φορές. Ασφαλώς η πιθανότητα εμφάνισης της ασθένειας αυξάνεται σημαντικά όταν συνυπάρχουν επιπλέον παράγοντες προδιάθεσης όπως το κάπνισμα και η παχυσαρκία⁷⁴. Η παρουσία του συγκεκριμένου SNP σχετίζεται επίσης με την πρόγνωση και την ανταπόκριση στη θεραπεία, καθώς έχει βρεθεί ότι οι ομοζυγώτες ασθενείς παρουσιάζουν μικρά ποσοστά ανταπόκρισης στα αντιοξειδωτικά συμπληρώματα και στους αντι-VEGF παράγοντες.

Γονίδιο LOC387715 ή ARMS2

Το γονίδιο *LOC387715* ή *ARMS2* αποτελεί ένα επίσης σημαντικό γονίδιο που συνδέεται με την εμφάνιση της ΗΕΩ γεγονός που έχει οδηγήσει στην εντατική του μελέτη τα τελευταία χρόνια. Το *ARMS2* εντοπίζεται στην περιοχή 10q26 αποτελείται από δύο εξώνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 12 kDa με 107 αμινοξέα. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης έχουν αναφερθεί στον πλακούντα, ενώ έχει αναφερθεί έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου σε επίπεδο mRNA στον αμφιβληστροειδή καθώς και σε ποικιλία άλλων ιστών και οργάνων⁴⁶. Η χρωμοσωμική περιοχή που εδράζεται το γονίδιο *ARMS2* προσέλκυσε το ενδιαφέρον δύο ανεξάρτητων ερευνητικών ομάδων, οι οποίες μελέτησαν τους πολυμορφισμούς αυτού του γονιδιακού τόπου, στον οποίο εντοπίζονται τρία γονίδια σε πολύ κοντινή απόσταση. Τα γονίδια αυτά είναι τα *HTRA1*, *PLEKHA1* και *ARMS2*, η διάταξη τους στο χρωμόσωμα επιτρέπει μία σημαντική ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ τους και τα μέχρι τώρα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν τη σύνδεση τους με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της ΗΕΩ^{46,47,77,88}

Ένας σημαντικός πολυμορφισμός που έχει συσχετιστεί με την ΗΕΩ είναι η αντικατάσταση στη θέση 270 της G από T (G270T), η οποία σε επίπεδο πρωτεΐνης οδηγεί στην αντικατάσταση της αλανίνης στη θέση 69 του πολυπεπτιδίου από σερίνη (rs10490924 [A69S])⁷⁷. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός βρέθηκε ότι εμπλέκεται στην εμφάνιση της ασθένειας στο 36%-57% των ασθενών που εξετάστηκαν^{88,89}. Η παρουσία του συγκεκριμένου πολυμορφισμού έχει υπολογιστεί ότι συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της ΗΕΩ, ο οποίος εξαρτάται από τον εάν βρίσκεται σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία καθώς ο αντίστοιχος κίνδυνος είναι 7,5 και 2,5 φορές υψηλότερος^{77,89}. Επιπλέον, η σύνδεση της ΗΕΩ με τον γενετικό τόπο 10q26 και το γονίδιο *ARMS2* εμφανίζει σημαντική επαναληψιμότητα σε άτομα διαφορετικών εθνικοτήτων.

Ωστόσο θα πρέπει να αναφερθεί ότι μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με τον μηχανιστικό ρόλο της πρωτεΐνης στην ασθένεια και η συμμετοχή της στην εμφάνιση και εξέλιξη στην ΗΕΩ συμπεραίνεται έμμεσα λόγω άλλων γνωστών της αλληλεπιδράσεων. Αρχικά φαίνεται

ότι η πρωτεΐνη ARMS2 έχει έναν ιστοειδικό ρόλο καθώς η έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου περιορίζεται στον αμφιβληστροειδή. Παράλληλα, ανεξάρτητες μελέτες υποστηρίζουν τη μιτοχονδριακή εντόπιση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης καθώς εντοπίζεται στην ελλειψοειδή περιοχή των εσώτερων τμημάτων των φωτοϋποδοχέων και συνεντοπίζεται με το μιτοχονδριακό δείκτη αντι-MTCO2. Οι ίδιες μελέτες δείχνουν ότι θέση της ARMS2 είναι στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Ο εντοπισμός αυτός υποδεικνύει την πιθανή παθοφυσιολογική συσχέτιση του πολυμορφισμού A69S με την HEΩ καθώς είναι επιβεβαιωμένη η συμμετοχή της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων στο γερασμένο αμφιβληστροειδή. Αναλυτικότερα έχει βρεθεί ότι ο αμφιβληστροειδής των ασθενών με HEΩ, περιέχει λιγότερα και μικρότερα μιτοχόνδρια, ενώ ταυτόχρονα υπάρχει μειωμένη ποσότητα στρώματος αλλά και ελλείψεις στο μιτοχονδριακό DNA. Λαμβάνοντας υπόψη αφενός ότι η ελαττωματική λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι μία βασική πηγή ανιόντων του υπεροξειδίου, καθώς και αφετέρου ότι το οξειδωτικό στρες ενοχοποιείται για την εμφάνιση της HEΩ, πολλοί μελετητές υποστηρίζουν ότι η αντικατάσταση στη θέση 69 της ARMS2 πρωτεΐνης της αλανίνης από σερίνη, ίσως συμμετέχει ενεργά στην βλάβη των φωτοϋποδοχέων που εξαρτάται από το οξειδωτικό στρες. Τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι ο πολυμορφισμός αυτός πιθανά να επηρεάζει τη δομή ή τη λειτουργία της συγκεκριμένης πρωτεΐνης αλλά όχι τα επίπεδα έκφρασης, τη σταθερότητα ή τον εντοπισμό της^{46,90}.

Σε κλινικό επίπεδο έχει βρεθεί ότι ο πολυμορφισμός A69S παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση με προχωρημένη νόσο και ιδιαίτερα με χοριοειδική νεοαγγείωση⁹¹, καθώς και με άλλους προδιαθεσικούς παράγοντες όπως το κάπνισμα. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι οι καπνιστές φορείς του πολυμορφισμού A69S χαρακτηρίζονται από 22 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της HEΩ συγκριτικά με μη-καπνιστές φορείς του πολυμορφισμού. Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι η συνύπαρξη των πολυμορφισμών rs1061170 [Y402H] στο *CFH* και rs10490924 [A69S] στο *ARMS2* παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου σε σχέση με άτομα που είναι φορείς μόνο του ενός από τους δύο πολυμορφισμούς. Μάλιστα εάν στην εξίσωση προστεθεί και το κάπνισμα υπολογίζεται ότι οι πολυμορφισμοί στα γονίδια *CFH* και *ARMS2* και το κάπνισμα εξηγούν το 61% του αποδιδόμενου κινδύνου για την εκδήλωση της HEΩ⁹⁰.

Γονίδια C2 (Complement Factor 2) και CFB (Complement Factor B)

Τα τελευταία χρόνια έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον η μελέτη της συσχέτισης της HEΩ και των γονιδίων και των πολυμορφισμών τους που κωδικοποιούν ρυθμιστικές πρωτεΐνες και συστατικά του συμπληρώματος. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα γονίδια του παράγοντα του συμπληρώματος 2 (C2) και παράγοντα του συμπληρώματος B (CFB). Τα συγκεκριμένα γονίδια εδράζονται στο χρωμόσωμα 6p, απέχουν μεταξύ τους 500 kb και κωδικοποιούν πρόδρομα μόρια της C3 κονβερτάσης. Οι πρωτεΐνες C2 και CFB χαρακτηρίζονται και από σημαντικές δομικές

ομοιότητες, ενώ παρουσιάζουν ένα κοινό πρότυπο έκφρασης, το οποίο εντοπίζεται στον οφθαλμό. Πιο αναλυτικά, διαπιστώθηκε ότι οι πρωτεΐνες C2 και CFB εντοπίζονται στο νευροεπιθήλιο του αμφιβληστροειδούς, στο ME και στο χοριοειδή ενώ η πρωτεΐνη CFB ανιχνεύθηκε επίσης στα drusen και στη βασική μεμβράνη. Τέλος παρατηρήθηκε μία ηλικιο-εξαρτώμενη έκκριση του CFB από τα κύτταρα του ME, γεγονός που πιθανά να είναι αποτέλεσμα της απόκρισης του οφθαλμού στην αυξημένη ανάγκη για ενεργοποίηση του συμπληρώματος⁹².

Στην ίδια μελέτη, εξετάστηκε η σχέση των SNPs των γονιδίων C2 και CFB με την HEΩ και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η παρουσία αυτών των πολυμορφισμών πιθανά να παρέχει ένα προστατευτικό αποτέλεσμα. Αναλυτικότερα, βρέθηκε ότι οι πολυμορφισμοί rs641153 [R32Q] και rs4151667 [L9H] στο CFB και ο πολυμορφισμός rs9332739 [E318D] στο C2 έχουν έναν προστατευτικό ρόλο και ελαττώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Γενικά ο CFB εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος και η παρουσία του πολυμορφισμού rs641153 [R32Q] φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά το ενεργοποιητικό δυναμικό και δράση του συγκεκριμένου παράγοντα. Μάλιστα, διαπιστώθηκε ότι ο προστατευτικός χαρακτήρας αυτού του πολυμορφισμού είναι τόσο ισχυρός που φαίνεται να υπάρχει ακόμα και παρουσία των πολυμορφισμών rs1061170 [Y402H] του CFH, rs10490924 [A69S] του ARMS2 σε καπνιστές ασθενείς. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από πολλές ανεξάρτητες μελέτες^{91,93,94} ενώ παράλληλα έχει βρεθεί ότι άλλοι πολυμορφισμοί όπως οι rs547154 [IVS10] και rs2072633 [IVS17] που εντοπίζονται σε εσώνια των C2 και CFB επίσης έχουν προστατευτική δράση⁹³.

Γονίδιο C3 (Complement Factor 3)

Ο παράγοντας του συμπληρώματος 3 είναι η πρωτεΐνη του συμπληρώματος με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο αίμα, η οποία αυξάνεται σημαντικά κατά την οξεία φλεγμονή. Ο παράγοντας C3 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη αποτελούμενη από 1663 αμινοξέα και έχει κεντρικό ρόλο καθώς η διάσπασή της στα C3a και C3b παίζει σημαντικό ρόλο και στις τρεις οδούς του συμπληρώματος. Ο παράγοντας C3 αλλά και το προϊόν ενεργοποίησης του C3a έχουν ανιχνευτεί στον αμφιβληστροειδή, στη βασική μεμβράνη, στα drusen, καθώς και στο χοριοειδή⁹⁵. Ο παράγων C3 παρουσιάζει ιστοειδική έκφραση και σύνθεση καθώς εντοπίζεται τοπικά στα κύτταρα του ME, στο νευροεπιθήλιο και στο χοριοειδικό ιστό. Η έκφραση και αυτού του παράγοντα είναι ηλικιο-εξαρτώμενη καθώς τα επίπεδα του αυξάνονται στον γηράσκοντα αμφιβληστροειδή και υποστηρίζεται ότι παίζει βασικό ρόλο στην παθογένεια της υγρής μορφής της HEΩ⁹⁶.

Ασφαλώς έχουν μελετηθεί οι πολυμορφισμοί του αντίστοιχου γονιδίου για τη συσχέτισή τους με την εμφάνιση και εξέλιξη της HEΩ και έχει βρεθεί από πολλές ανεξάρτητες μελέτες ότι ο πολυμορφισμός rs2230199 στο γονίδιο του C3 συνδέεται σημαντικά με την HEΩ^{97,98}. Ο

συγκεκριμένος πολυμορφισμός εντοπίζεται σε τμήμα του εξωνίου του γονιδίου C3 στο χρωμόσωμα 19 και οφείλεται στην μεταστροφή της κυτοσίνης στη θέση 7276 σε γουανίνη, η οποία επηρεάζει την αμινοξική αλληλουχία καθώς η αργινίνη στη θέση 80 της ώριμης πρωτεΐνης (rs2230199 [R80G]) ή στη θέση 102 της προ-πρωτεΐνης (rs2230199 [R120G]) αντικαθίσταται από γλυκίνη⁹⁷.

Παράγοντας VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

Ο VEGF αποτελεί ένα από το πιο καλά μελετημένα μόρια στην ΗΕΩ, καθώς φαίνεται να έχει κεντρικό ρόλο στην παθογένεια αυτής της νόσου και της εξιδρωματικής μορφής της ΗΕΩ κυρίως^{99,100}. Ο VEGF ανήκει στην ομάδα των κυτοκινών, και είναι ο κύριος ρυθμιστής της αγγειογένεσης και νεοαγγειογένεσης¹⁰¹. Αναλυτικότερα, ο VEGF αυξάνει τη μιτωτική δραστηριότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων που γειτνιάζουν με μικροαγγεία, ενεργοποιώντας έτσι με άμεσο τρόπο τον πολλαπλασιασμό τους ενώ ταυτόχρονα εμπλέκεται στη μετανάστευση και στην τροποποίηση της γενετικής έκφρασης αυτών των κυττάρων. Επιπλέον, ο VEGF αυξάνει σημαντικά τη διαπερατότητα της μεμβράνης αυτών των κυττάρων με αποτέλεσμα την αυξημένη διάχυση των πρωτεϊνών του πλάσματος στον εξωαγγειακό χώρο. Η κίνηση αυτή συνεπάγεται αλλαγές της σύστασης της μεσοκυττάριας ουσίας οι οποίες ευνοούν την αγγειογένεση¹⁰². Είναι χαρακτηριστικό ότι σε ασθενείς που πάσχουν από την εξιδρωματική μορφή της ΗΕΩ το υαλοειδές υγρό του οφθαλμού τους χαρακτηρίζεται από υψηλές συγκεντρώσεις του VEGF.

Ο VEGF κωδικοποιείται από μία οικογένεια γονιδίων, η οποία αποτελείται από τα γονίδια *VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D* και τα γονίδια για τον πλακούντιο αυξητικό παράγοντα (*PlGF*). Ο VEGF-A (ή απλά VEGF) είναι ο πιο καλά μελετημένος παράγοντας της οικογένειας, η δράση του είναι η πλέον σχετιζόμενη με την αγγειογένεση και αποτελεί τον στόχο των περισσότερων σύγχρονων αντι-VEGF θεραπειών. Το αντίστοιχο γονίδιο αποτελείται από 8 εξώνια και 7 εσώνια¹⁰³. Το γονίδιο αυτό υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα προκύπτοντας έτσι εννιά πρωτεϊνικές ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν στον αριθμό και την αλληλουχία των αμινοξέων που τις αποτελούν: VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF162, VEGF165, VEGF165b, VEGF183, VEGF189 και VEGF206 (οι αριθμοί στις ισομορφές αντιστοιχούν στον αριθμό των αμινοξέων που περιέχουν οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται). Στον αμφιβληστροειδή ανιχνεύονται κυρίως οι ισομορφές VEGF121 και VEGF165 με την τελευταία να αποτελεί την πιο συχνά εκφραζόμενη ισομορφή και αυτήν με τον κυριότερο ρόλο στην αγγειογένεση. Πρόσφατα βρέθηκε ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί την VEGF165 υφίσταται επιπλέον μάτισμα με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο επιπλέον ισομορφών: τη VEGF165a, η οποία επάγει την αγγειογένεση και τη VEGF165b, η οποία δρα ανασταλτικά. Ο ακριβής μηχανισμός ελέγχου του ματίσματος δεν είναι πλήρως γνωστός, φαίνεται όμως ότι η διατήρηση της απόλυτης ισορροπίας ανάμεσα σε αυτές τις δύο ισομορφές συμβάλλει στη

διατήρηση της αγγειακής ομοιόστασης¹⁰⁴. Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης του VEGF σε μεμβράνες με νεοαγγείωση, οι οποίες αφαιρέθηκαν χειρουργικά από οφθαλμούς ασθενών που έπασχαν από εξιδρωματική ΗΕΩ αποκάλυψε την υπερέκφραση του συγκεκριμένου παράγοντα και μάλιστα η αυξημένη έκφραση φαίνεται να σχετίζεται με την παρουσία πολυμορφισμών που εντοπίζονται στην αλληλουχία του υποκινητή ή της 5' αμετάφραστης περιοχής του γονιδίου του VEGF. Μάλιστα υπάρχουν μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν τη συσχέτιση διαφορετικών SNPs με την εκδήλωση της ΗΕΩ. Πιο αναλυτικά, έχουν αναγνωρισθεί οκτώ SNPs στον υποκινητή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -460 και -116, ένας SNP στην 5' αμετάφραστη περιοχή (405) και πέντε SNPs στα εσώνια του γονιδίου του VEGF. Τέλος έχει αναφερθεί ότι ο γονότυπος 674CC συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης της ΗΕΩ¹⁰⁵.

Γονίδιο APOE (Apolipoprotein E)

Η σύνδεση της ΗΕΩ με το γονίδιο που κωδικοποιεί την απολιποπρωτεΐνη E (apolipoprotein E ή APOE) αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1998 με τη μελέτη των Klaver et. al¹⁰⁶ και το έναυσμα για τη μελέτη του συγκεκριμένου μορίου είναι ο κεντρικός ρόλος της APOE στον μεταβολισμό των λιπιδίων του κεντρικού νευρικού συστήματος¹⁰⁷. Το APOE, αποτελείται από 4 εξώνια και 3 εσώνια και, εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 19q13.2. Υπάρχουν τρία αλληλόμορφα του συγκεκριμένου γονιδίου, γνωστά σαν e2, e3 και e4, και κωδικοποιούν τις ισομορφές E2, E3 και E4 αντίστοιχα. Η E3 είναι η κυρίαρχη ισομορφή, ενώ οι άλλες δύο έχουν προκύψει από σημειακές μεταλλάξεις της E3 στις θέσεις 112 και 158 (7903T>C και 8041C>T αντίστοιχα). Πιο αναλυτικά στο e2 αλληλόμορφο εντοπίζεται η αντικατάσταση κυτοσίνης από θυμίνη με αποτέλεσμα την αλλαγή στη θέση 158 της αργινίνης της πρωτεΐνης από κυστεΐνη. Αντίστοιχα στην ισομορφή E4 ανιχνεύεται στη θέση 112 μία αργινίνη αντί για κυστεΐνη και η αμινοξική αυτή αλλαγή προκύπτει από την αντικατάσταση στην αντίστοιχη θέση μίας θυμίνης από μια κυτοσίνη¹⁰⁸. Οι νουκλεοτιδικές και αμινοξικές διαφορές ανάμεσα στις ισομορφές E2 και E4 ασφαλώς επηρεάζουν και τη λειτουργία τους και σε σχέση με την ΗΕΩ φαίνεται ότι η πρώτη συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της ΗΕΩ, ενώ η E4 έχει αντίθετη επίδραση καθώς η παρουσία της σχετίζεται με μειωμένες πιθανότητες εκδήλωσης της νόσου¹⁰⁶. Φαίνεται λοιπόν, το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης E να έχει διττό ρόλο καθώς μπορεί να δρα προστατευτικά ή να αυξάνει την προδιάθεση εμφάνισης της ΗΕΩ.

Γονίδιο CX3CR1 (CX3 Chemokine Receptor 1)

Το γονίδιο CX3CR1 (CX3 Chemokine Receptor 1) αποτελεί ένα επιπλέον γονίδιο που παρουσιάζει ενδιαφέρον σε ότι αφορά τη συσχέτιση του με την ΗΕΩ. Το συγκεκριμένο γονίδιο εδράζεται στην περιοχή 3p21.3, αποτελείται από δύο εξώνια και ένα εσώνιο και κωδικοποιεί οποίο κωδικοποιεί τον υποδοχέα της χημειοκίνης CX3CL1 (CX3 Chemokine Ligand 1). Ο υποδοχέας αυτός είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνης της κυτταρικής μεμβράνης, αποτελείται από 355 αμινοξέα και ανήκει

στην οικογένεια των GPCRs (G Protein Coupled Receptors) Ο υποδοχέας CX3CR1 εκφράζεται στα μικρογλοιακά κύτταρα, στα μακροφάγα, στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στους φωτοϋποδοχείς του αμφιβληστροειδούς¹⁰⁹. Στο *CX3CL1* έχουν αναγνωρισθεί δύο SNPs, που επηρεάζουν τα κωδικόνια 249 (rs3732379) και 280 (rs3732378) αντίστοιχα και οι οποίοι έχουν συνδεθεί με μειωμένη υποαμφιβληστροειδική κυτταρική μετανάστευση, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο κίνδυνος για εκδήλωση της HEΩ¹¹⁰. Οι αμινοξικές αλλαγές που συνοδεύουν αυτούς τους πολυμορφισμούς είναι η αντικατάσταση στη θέση 249 της βαλίνης από ισολευκίνη (V249I) και στη θέση 280 της θρεονίνης από μεθειονίνη (T280M). Οι αλλαγές αυτές συνεπάγονται και λειτουργικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης καθώς έχει βρεθεί ότι τα λευκοκύτταρα ομόζυγων ατόμων I249/M280 έχουν σημαντικά λιγότερες θέσεις πρόσδεσης του υποδοχέα με την CX3CL1 σε σχέση με τα κύτταρα με γονότυπο V249/T280¹¹¹. Σε παρόμοια συμπεράσματα αλλά μόνο για το αλληλόμορφο I249 κατέληξε και η επόμενη μελέτη των Moatti et al.¹¹², ενώ και οι δύο μελέτες έδειξαν μία σημαντικά μικρότερη έκφραση του I249 σε σχέση με το V249. Τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα CX3CR1 καθορίζουν τη δυνατότητα των μακροφάγων να επάγουν τη φλεγμονή με τέτοιο τρόπο ώστε η υπερέκφραση του να συνεπάγεται καταστολή της φλεγμονής (antiinflammatory phenotype) ενώ αντίθετα η υποέκφραση του υποδοχέα να οδηγεί ενεργοποίηση της φλεγμονής (proinflammatory phenotype). Δημιουργείται λοιπόν έτσι ένας καταρράκτης αντιδράσεων όπου η συσσώρευση στον υποαμφιβληστροειδικό χώρο μικρογλοιακών κυττάρων με μειωμένη λειτουργία του CX3CR1 υποδοχέα έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους αντίδρασης οδηγώντας έτσι στη στρατολόγηση και άλλων φλεγμονωδών κυττάρων, δημιουργώντας έτσι ένα μικροπεριβάλλον που ευνοεί την ανάπτυξη της χοριοειδικής νεοαγγείωσης και κατά επέκταση της HEΩ. Η πρώτη μελέτη συσχέτισης των δύο αυτών πολυμορφισμών στο *CX3CR1* με την συγκεκριμένη ασθένεια έγινε από τους Tuo et al¹¹³, σύμφωνα με τους οποίους παρατηρείται αυξημένη συχνότητα των αλληλομόρφων I249 και M280 στους ασθενείς με HEΩ, σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου, επιβεβαιώνοντας την συμμετοχή αυτών των πολυμορφισμών στην παθογένεια της HEΩ.

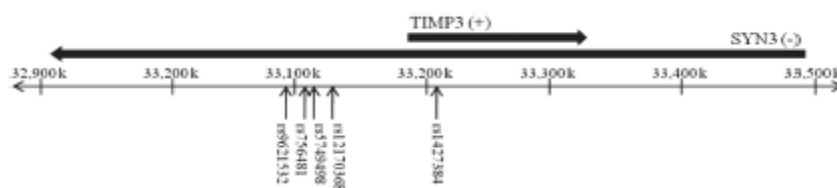
Γονίδιο ABCR

Η παρατήρηση ότι οι ασθένειες HEΩ και Stargardt μοιράζονται κάποιες φαινοτυπικές ομοιότητες οδήγησε στη διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης του *ABCR*, το οποίο είναι το κύριο γονίδιο που ευθύνεται για το μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων της νόσου του Stargardt, με την εκδήλωση της HEΩ. Δύο γνωστοί SNPs του *ABCR*, οι D2177N και G1961E, έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση της HEΩ^{114,115}, χωρίς ωστόσο τα αποτελέσματα αυτά να επιβεβαιωθούν από επόμενες μελέτες. Παρόλα αυτά, η συσχέτιση μεταξύ του γονιδίου *ABCR* και της HEΩ δεν έχει επιβεβαιωθεί από άλλες μελέτες¹¹⁶.

Το *ABCR*, εδράζεται στο χρωμόσωμα 1 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μεταφοράς η οποία εντοπίζεται στους φωτοϋποδοχείς και ο ρόλος της είναι η μεταφορά της βιταμίνης Α εντός των φωτοϋποδοχέων με ταυτόχρονη κατανάλωση ΑΤΡ. Η διαδικασία αυτή αποτελεί τμήμα ενός ευρύτερου μηχανισμού που ανανεώνει μια συγκεκριμένη στερεοχημική μορφή της βιταμίνης Α, την 11-cis retinal. Κατά την απορρόφηση του φωτός, η 11-cis retinal μετατρέπεται σε all-trans retinal, η οποία απελευθερώνεται και στη συνέχεια τροποποιείται χημικά για να μεταφερθεί σε ένα κύτταρο του ΜΕ. Η παρουσία ελαττωματικής *ABCR* έχει σαν αποτέλεσμα την επιβράδυνση της τροποποίησης της all-trans retinal, οδηγώντας τη συσσώρευσή της και στην μετέπειτα αντίδραση της με λιπίδια της μεμβράνης των φωτοϋποδοχέων. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μίας σταθεράς ουσίας, που είναι γνωστή σαν Α2Ε, η οποία δεν αποδομείται¹¹⁷. Όταν φαγοκυτταρώνεται από τα κύτταρα του ΜΕ, συσσωρεύεται με τη μορφή λιποφουσκίνης κι επιπλέον καθιστά τα κύτταρα αυτά πιο ευαίσθητα στις βλαπτικές επιδράσεις του φωτός. Συνεπώς, είναι πολύ πιθανό, τουλάχιστον κάποιες περιπτώσεις της νόσου, να επηρεάζονται από μεταβολές του *ABCR*.

Γονίδια *TIMP3/SYN3*

Τα τελευταία χρόνια έχει προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον η μελέτη της σχέσης των γονιδίων *TIMP3/SYN3* με την ΗΕΩ και τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν ότι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί των συγκεκριμένων γονιδίων επηρεάζουν κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Το *TIMP3* αποτελεί μέλος της γονιδιακής οικογένειας που κωδικοποιεί τους ιστικούς αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών (Tissue Inhibitor of MetalloProteinases ή TIMP). Πρόκειται για πρωτεΐνες που εκφράζονται σε όλο το σώμα και παίζουν σπουδαίο ρόλο μέσω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν αναστρέψιμα τη δράση ενζύμων που ανήκουν στην υπεροικογένεια των πρωτεϊνών ψευδαργύρου και κυρίως των μεταλλοπρωτεασών της μήτρας (Matrix MetalloProteinases ή MMPs). Η συγκεκριμένη οικογένεια πρωτεϊνών αποτελείται από τέσσερα μέλη, τα TIMP-1, -2, -3, -4. Το *TIMP-3* εδράζεται στην περιοχή chr22q12.13 και συγκεκριμένα βρίσκεται εντός ενός εσωνίου του γονιδίου της συναψίνης *SYN3* (Εικόνα 1.16), ένα χαρακτηριστικό που διακρίνει και δύο ακόμα μέλη αυτής της οικογένειας, των *TIMP-1* και *TIMP-4* τα οποία εντοπίζονται εντός ενός ιντρονίου των *SYN1* και *SYN2* αντίστοιχα¹¹⁸.

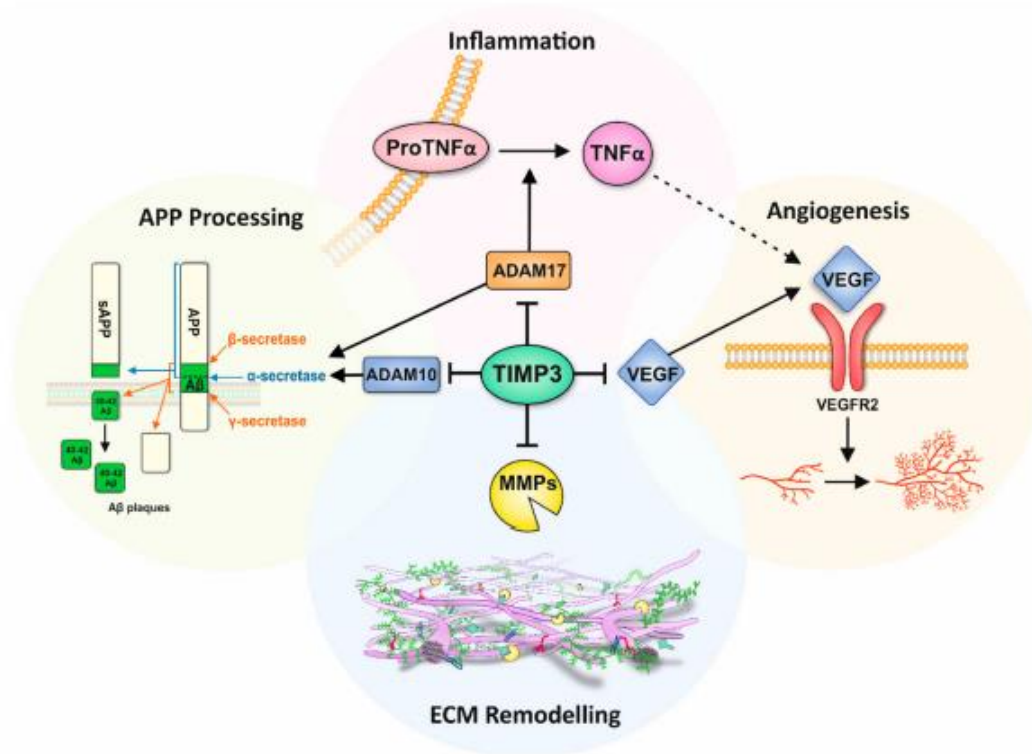


Εικόνα 1.16 Γονιδιακός τόπος της *TIMP* γονιδιακής οικογένειας

Σε πρωτεϊνικό επίπεδο παρατηρείται υψηλός βαθμός συντήρησης στη δομή των μελών αυτής της οικογένειας. Αναλυτικότερα κάθε πρωτεΐνη φέρει μία αμινοτελική περιοχή, αποτελούμενη από περίπου 125 αμινοξέα και μία καρβοξυτελική περιοχή, αποτελούμενη από 64 αμινοξέα, και κάθε μία από αυτές τις περιοχές σταθεροποιείται από τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι σχηματίζονται ανάμεσα σε συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης. Συγκεκριμένα η TIMP-3 φαίνεται να έχει κυρίως εξωκυττάριο ρόλο, καθώς αυτή η πρωτεΐνη είναι ικανή να προσδένεται στην εξωκυττάρια μήτρα (ExtraCellular Matrix ή ECM), μέσω της αμινο- ή καρβοξυτελικής περιοχής της και να επηρεάζει την αναδόμηση της ECM. Επιπλέον η TIMP-3 εμπλέκεται στην προώθηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στη ρύθμιση της αγγειογένεσης και της απόπτωσης^{119,120}.

Αναφορικά με το ρόλο της TIMP-3 στην ΗΕΩ έχει βρεθεί ότι τα drusen αποτελούνται κυρίως από λιπίδια και πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η C αντιδρώσα πρωτεΐνη, συστατικά του συστήματος του συμπληρώματος καθώς και αναστολείς τους. Ανάμεσα στους πιο συχνά απαντώμενους αναστολείς είναι η TIMP-3⁵¹. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι αλλαγές στη σύνθεση και/ή στη λειτουργία της TIMP-3 μπορούν να επάγουν αλλαγές οι οποίες συνδέονται με την εμφάνιση της ΗΕΩ. Για παράδειγμα αυξημένα επίπεδα της TIMP-3 σε ασθενείς με ΗΕΩ φαίνεται να προκαλούν λέπτυνση της μεμβράνης του Bruch¹²¹ ενώ η μελέτη γονιδιακών υπογραφών στον αμφιβληστροειδή συγκαταλέγει το *TIMP-3* στα υποψήφια γονίδια που εμπλέκονται στην ΗΕΩ¹²². Μάλιστα έχει βρεθεί ότι φορείς σπάνιων πολυμορφισμών του *TIMP-3* έχουν πάνω από 30 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου σε σχέση με τα άτομα ελέγχου¹²³. Επιπλέον σε ασθενείς που έχουν σπάνιους πολυμορφισμούς του συγκεκριμένου γονιδίου, κάποιοι από τους οποίους εντοπίζονται μάλιστα στην κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου, έχει αναφερθεί στατιστικά σημαντική συσχέτιση με άλλους πολυμορφισμούς που συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης της ΗΕΩ. Η σχέση αυτή προτείνει μία συνεργιστική δράση ανάμεσα σε κάποιους πολυμορφισμούς του *TIMP-3* και άλλους πολυμορφισμούς υψηλού κινδύνου στην καθυστερημένη ανάπτυξη της νόσου^{120,123,124}. Η TIMP-3 μπορεί επίσης να αναστέλλει τη σύνδεση του VEGF στον υποδοχέα VEGF-R2, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο κατωροϊκούς σηματοδοτικούς καταρράκτες και συνεπώς την VEGF-επαγόμενη αγγειογένεση¹²⁵. Η αυξημένη έκφραση της TIMP-3 μπορεί να εμποδίσει την αναδόμηση της ECM ενώ έχει βρεθεί ότι η αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης ή στη λειτουργία της TIMP-3, προκαλεί τροποποιήσεις στη διακυτταρική σηματοδότηση μέσω των MAPK μονοπατιών προτείνοντας ότι οι διαταραχές στην αναδόμηση της ECM μπορεί να ενεργοποιήσει σημαντικά κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Η απορυθμισμένη λειτουργία του MAPK μονοπατιού έχει συσχετισθεί με την παθογένεια της ΗΕΩ. Ταυτόχρονα οι λειτουργίες της TIMP-3 επεκτείνονται πέραν της ECM και της αναδόμησής της, καθώς επηρεάζει

κι άλλες λειτουργίες, μεταξύ των οποίων είναι η φλεγμονή και η αγγειογένεση στον γηράσκοντα αμφιβληστροειδή (Εικόνα 1.17)¹²⁶



Εικόνα 1.17 Οι πολλαπλοί ρόλοι της TIMP-3

1.6 Σκοπός εργασίας

Η ηλικιακή εκφύλιση ωχράς κηλίδας (ΗΕΩ) αποτελεί μια συνηθισμένη ασθένεια στον ελληνικό πληθυσμό με επιπολασμό 2,5% σε άτομα άνω των 65 ετών. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών υποστηρίζουν το γενετικό υπόβαθρο ως την κύρια αιτιοπαθογένεια της ασθένειας και ήδη έχουν αναγνωρισθεί συγκεκριμένα γονίδια που συμμετέχουν στον παθογενετικό μηχανισμό. Εκτός από τα ήδη εδραιωμένα γονίδια για τα οποία έχει αναφερθεί η ύπαρξη συσχέτισης με την ΗΕΩ, έχουν αναγνωρισθεί αρκετά υποψήφια γονίδια που φαίνεται να παίζουν μηχανιστικό αλλά και κλινικό ρόλο στην ΗΕΩ. Ένας από τους πρόσφατα αναγνωρισμένους υποψήφιους γενετικούς τόπους είναι η περιοχή *TIMP-3/SYN3* η οποία αποτελεί αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας. Πιο συγκεκριμένα σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μελέτη του πολυμορφισμού rs5754227 που εντοπίζεται στον γενετικό τόπο chr22:32709831 (GRCh38.p13, NG_029545.1:g.353561A>G) μεταξύ των εξονίων 7 και 8 του γονιδίου *SYN3* όπου και εδράζεται καθοδικά το γονίδιο *TIMP-3* σε ασθενείς με ΗΕΩ και η συσχέτιση αυτού του πολυμορφισμού με την ανάπτυξη είτε ξηράς μορφής είτε υγρής μορφής ΗΕΩ.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Κλινικά δείγματα

Για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης συλλέχθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος από 21 ασθενείς με ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας της ξηρής μορφής και 19 ασθενείς με ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας της υγρής μορφής. Η συλλογή των δειγμάτων έλαβε χώρα στο Νοσοκομείο ΠΓΝ ΑΤΤΙΚΟΝ την χρονική περίοδο 2018-2019. Αμέσως μετά τη συλλογή, το αίμα τοποθετήθηκε σε σωληνάριο με αντιπηκτικό EDTA και διατηρήθηκε μέχρι την επεξεργασία του, στους -20°C. Η συμμετοχή του συνόλου των ασθενών και των υγιών μαρτύρων αποφασίστηκε μετά από την αξιολόγησή τους από την υπεύθυνο οφθαλμίατρο Επίκουρο Καθηγήτρια Χατζηράλλη Ειρήνη (Διευθύντρια: Καθηγητής Π. Θεοδοσιάδης), στα πλαίσια της οποίας έγινε μέτρηση οπτικής οξύτητας, μέτρηση της ενδοφθάλμιας πίεσης, βυθοσκόπηση, έλεγχος χειρουργημένου καταρράκτη. Παράλληλα έγινε πλήρης καταγραφή των κλινικοπαθολογικών δεδομένων των συμμετοχόντων σε α οποία περιλαμβάνονται το οικογενειακό ιστορικό της νόσου, το ατομικό ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου και σακχαρώδη διαβήτη, καθώς και οι καπνιστικές τους συνήθειες. Τα δεδομένα αυτά μαζί με τις πληροφορίες για την καταγωγή, το φύλο και την ηλικία συμπεριλήφθησαν σε μία λεπτομερή βάση δεδομένων για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και την διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης των πειραματικών ευρημάτων με αυτά τα κλινικοπαθολογικά δεδομένα. Όλοι οι συμμετέχοντες στην μελέτη ενημερώθηκαν εκτενώς για τον σκοπό και τον τρόπο διεξαγωγής της παρούσας μελέτης και υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης. Η παρούσα μελέτη ασθενών-μαρτύρων είναι σύμφωνη με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι και έχει λάβει έγκριση από το Επιστημονικό Συμβούλιο και την Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας του Νοσοκομείου ΠΓΝ ΑΤΤΙΚΟΝ.

2.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin® Genomic DNA from Tissue kit (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία), το οποίο επιτρέπει την απομόνωση καθαρού DNA έτοιμο προς χρήση για εφαρμογές PCR. Η απομόνωση του DNA με τη χρήση του συγκεκριμένου kit βασίζεται στην ειδική σύνθεση της μεμβράνης της στήλης που περιέχει οξείδιο του πυριτίου (silica membrane), η οποία επιτρέπει την αντιστρεπτή πρόσδεση του DNA ανάλογα με την ιονική σύνθεση του διαλύματος αντίδρασης. Η διαδικασία ξεκινά με την κυτταρική λύση μέσω της πρωτεΐνωσης K και ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη αλκοόλης. Στη συνέχεια ακολουθεί μεταφορά του διαλύματος στη στήλη όπου διηθείται στη μεμβράνη επιτρέποντας έτσι μετά από φυγοκέντρηση την κατακράτηση του DNA στη στήλη και την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και άλλων μορίων. Ακολουθεί ο καθαρισμός του DNA με αιθανόλη και τέλος η έκλουσή του με νερό ελεύθερο νουκλεάσης ή με χαμηλής ιονικής ισχύος διάλυμα. Με

τον τρόπο αυτό, απομονώνεται με ικανοποιητική απόδοση υψηλής καθαρότητας DNA το οποίο είναι κατάλληλο για την χρήση του προς χρησιμοποίηση σε PCR ή άλλες ενζυμικές αντιδράσεις.

Αντιδραστήρια / Υλικά

- Λυοφιλοποιημένη Πρωτεΐνάση K (Macherey-Nagel)
- Ρυθμιστικό διάλυμα B3 (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα BW (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα B5 (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα BE (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Αιθανόλη 96-100%

Αναλώσιμα / Εξοπλισμός

- Στήλες (Macherey-Nagel)
- Σωληνάκια φυγοκέντρησης 1,5 ml (Eppendorfs)
- Σωληνάκια Συλλογής (Collection tubes)
- Πιπέτες (Labnet, ΗΠΑ)
- Ακρορύγχη με φίλτρο
- Φυγόκεντρος (Eppendorf, Γερμανία)
- Συσκευή vortex (Fisher, ΗΠΑ)

Πειραματική Πορεία

1. Προσθήκη 25 μl πρωτεΐνάσης K σε σωληναρίου eppendorf 1,5 ml
2. Προσθήκη 200 μl ολικού αίματος
3. Προσθήκη 200 μl ρυθμιστικό διάλυμα B3
4. Εντονη ανάδευση για 10-20sec
5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min
6. Έντονη ανάδευση για 10-20sec
7. Επώαση στους 70° C για 10-15 min
8. Πλύση με 210 μl καθαρής αιθανόλης
9. Έντονη ανάδευση για 15 sec
10. Μεταφορά του διαλύματος στην ειδική στήλη (παρέχεται από το kit)
11. Φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 x g.
12. Απόρριψη υγρού έκλουσης (περιέχει πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις)
13. 1η Έκπλυση: Προσθήκη 500 μl ρυθμιστικό διάλυμα BW στη στήλη και φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 x g.
14. Απόρριψη υγρού έκλουσης

15. 2η Έκπλυση: Προσθήκη 600 μl ρυθμιστικό διάλυμα B5 στη στήλη και φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 x g.
16. Απόρριψη υγρού έκλουσης
17. Στέγνωμα της στήλης μέσω φυγοκέντρησης για 1 min στα 11.000 x g
18. Προσθήκη στη στήλη 100 μl προθερμασμένου (70° C) ρυθμιστικού διαλύματος BE
19. Επάωση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min
20. Φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 x g
21. Συλλογή και φύλαξη του DNA στους -20° C

2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός DNA με το φθορισμόμετρο Qubit

Η ποσοτικοποίηση του DNA με χρήση του Qubit 1.0 (Invitrogen, Thermo Fisher, ΗΠΑ) πραγματοποιείται μέσω μίας χρωστικής [dsDNA BR (Invitrogen, Thermo Fisher ΗΠΑ)], η οποία φθορίζει μετά από την πρόσδεση της σε δίκλωνο DNA. Μετά από διέγερση με ακτινοβολία στο κατάλληλο μήκος κύματος, η χρωστική εκπέμπει ακτινοβολία τα επίπεδα της οποίας διαφέρουν σημαντικά αν είναι ελεύθερη ή προσδεδεμένη σε δίκλωνο DNA. Πριν από κάθε μέτρηση πραγματοποιείται η αυτόματη κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης μέσω μέτρησης πρότυπων διαλυμάτων (standards) που παρέχονται με το kit. Βάση της πρότυπης καμπύλης πραγματοποιείται η ποσοτικοποίηση του DNA που περιέχεται στα εξεταζόμενα δείγματα. Το εύρος της πρότυπης καμπύλης κυμαίνεται μεταξύ 2-1000 ng. Η συγκεκριμένη μέθοδος ποσοτικοποίησης νουκλεϊκών οξέων υπερέρχει της ευρέως χρησιμοποιούμενης φωτομέτρησης ως προς την ειδικότητα και τη ευαισθησία καθώς επιτρέπει διάκριση μεταξύ του DNA και του RNA και επίσης μπορεί να δώσει αξιόπιστες τιμές ακόμα στην περίπτωση πολύ αραιών δειγμάτων.



Εικόνα 2.1 Qubit 1.0

Αντιδραστήρια / Αναλώσιμα / Εξοπλισμός

- Αντιδραστήριο Qubit™ dsDNA BR (Component A), ρυθμιστικό διάλυμα
- Αντιδραστήριο Qubit™ dsDNA BR (Component B), χρωστική
- Πρότυπο διάλυμα #1 Qubit™ dsDNA BR (Component C), 0 ng/μl
- Πρότυπο διάλυμα #2 Qubit™ dsDNA BR (Component D), 100 ng/μl
- Σωληνάρια erpendorf
- Πιπέτες (Labnet, ΗΠΑ)
- Συσκευή vortex (Fisher, ΗΠΑ)

Πειραματική πορεία

1. Για κάθε εξεταζόμενο δείγμα ετοιμάζεται το διάλυμα εργασίας με ανάδευση 199 μl ρυθμιστικού διαλύματος (Component A) και 1 μl χρωστικής (Component B) σε ένα σωληνάριο erpendorf
2. Για τη μέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων (standards) ετοιμάζεται κατάλληλο διάλυμα με προσθήκη 10 μl κάθε προτύπου δείγματος σε 190 μl διαλύματος εργασίας
3. Για την μέτρηση των αγνώστων δειγμάτων ετοιμάζεται κατάλληλο με προσθήκη 1-20 μl άγνωστου δείγματος σε 180-199 μl διαλύματος εργασίας
4. Επώαση για 2min
5. Μέτρηση του φθορισμού στα πρότυπα και άγνωστα δείγματα με το φθορισμόμετρο Qubit 1.0

2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

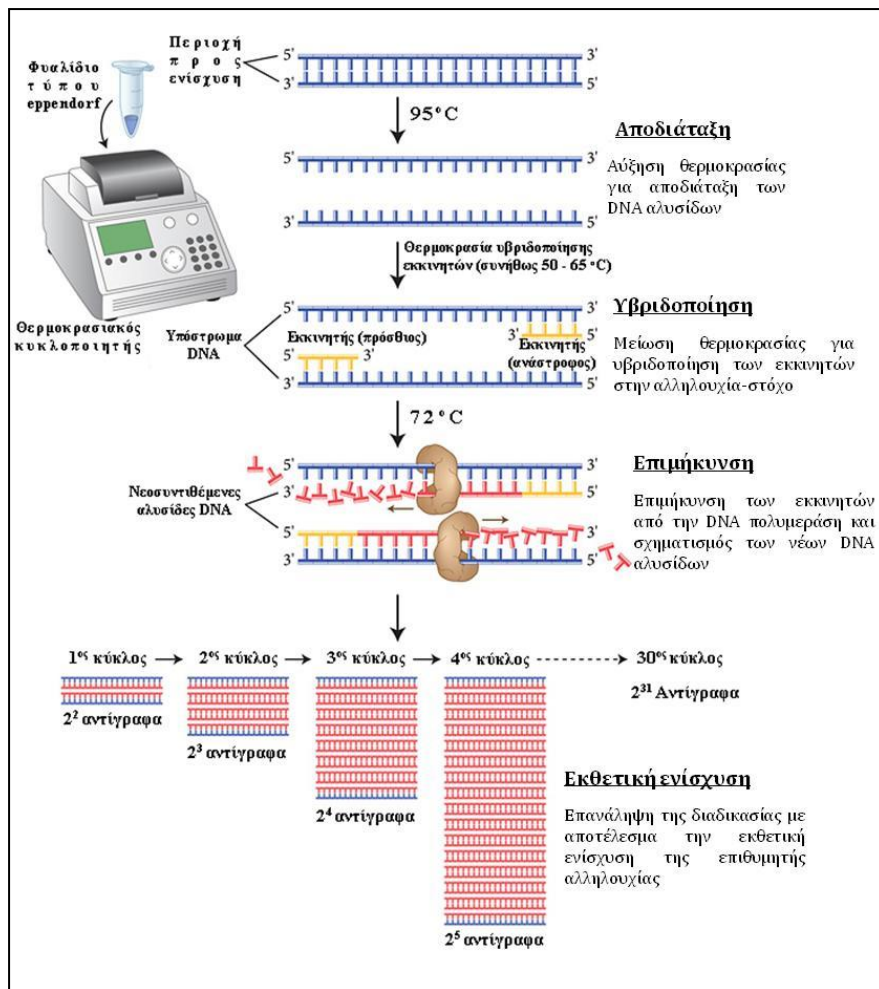
Το 1983 από τον Kary Mullis (Νόμπελ Χημείας, 1993) ανακοίνωσε την ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), η οποία πραγματικά έφερε επανάσταση στον τομέα των βιοεπιστημών και ακόμα και σήμερα θεωρείται μια από τις πιο σημαντικές επιστημονικές ανακαλύψεις του 20ου αιώνα. Η PCR είναι για μία εύκολη, γρήγορη και οικονομική μέθοδος με πληθώρα εφαρμογών όχι μόνο στον ερευνητικό αλλά και στον διαγνωστικό τομέα. Στα βασικά πλεονεκτήματα της PCR είναι η αυξημένη ειδικότητα και ευαισθησία στην ανίχνευση και ενίσχυση ακόμα και ενός μόνο μορίου DNA. Με την παρόδο του χρόνου, η μεγάλη χρησιμότητα αυτής της μεθόδου οδήγησε στην έρευνα για τη βελτιστοποίηση αυτής μεθόδου κι έτσι τα επόμενα χρόνια από την αρχική ανακάλυψη της, σημειώθηκε σημαντική πρόοδος λόγω της εισαγωγής θερμοανθεκτικών πολυμερασών, της χρήσης βελτιωμένων και αυτοματοποιημένων οργάνων και της ανάπτυξης πληθώρας παραλλαγών της (π.χ. ασύμμετρη PCR, ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο). Έτσι η PCR καθιερώθηκε ένα πολύτιμο και προσιτό εργαλείο όχι μόνο στην έρευνα αλλά και στο πεδίο της Κλινικής Βιοχημείας.

Συνοπτικά η αρχή της μεθόδου της PCR είναι η *in vitro* επιλεκτική ενίσχυση ενός τμήματος DNA, μέσω διαδοχικών μεταβολών θερμοκρασίας, με στόχο την σύνθεση πολλών ίδιων αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου. Η διαδικασία περιλαμβάνει πολλούς επαναλαμβανόμενους «θερμοκρασιακούς κύκλους», καθένας από τους οποίους αποτελείται από τρία στάδια:

1. Αποδιάταξη δίκλωνου DNA υποστρώματος (denaturation) που περιλαμβάνεται στο μίγμα της αντίδρασης. Η αποδιάταξη επιτυγχάνεται με θέρμανση του μίγματος αντίδρασης στους 94-95°C για 2-10 min,
2. Μείωση της θερμοκρασίας του μίγματος μειώνεται μεταξύ 50 - 71°C, έτσι ώστε να γίνει υβριδισμός των εκκινητών (annealing) στο μονόκλωνο DNA-εκμαγείο στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας.
3. Αύξηση της θερμοκρασίας στους 72°C (βέλτιστη θερμοκρασία ενεργότητας της θερμοάντοχης DNA πολυμεράσης) έτσι ώστε να γίνει τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA (elongation) με τη χρήση δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs). Ο χρόνος του σταδίου της επιμήκυνσης κυμαίνεται από 1-3 λεπτά και καθορίζεται από το μήκος της αλληλουχίας-στόχου.

Η ολοκλήρωση των επαναλαμβανόμενων θερμοκρασιακών κύκλων, ακολουθείται από την επώαση του μίγματος αντίδρασης στους 72°C για 5 - 10 min προκειμένου να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός πιθανών μη ολοκληρωμένων PCR προϊόντων (Εικόνα 2.2).

Το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται σε κατάλληλο θερμικό κυκλοποιητή που στη συγκεκριμένη εργασία ήταν ο Mastercycler gradient 5331 PCR engine (Eppendorf, Γερμανία). Το όργανο αυτό διαθέτει υποδοχείς είτε για σωληνάρια PCR των 0,2 mL (χωρητικότητα 96 θέσεων) είτε των 0,5 mL (χωρητικότητα 77 θέσεων) είτε για μια πλάκα μικροτιτλοδότησης. Ο συγκεκριμένος θερμικός κυκλοποιητής προγραμματίζει μέσω ψηφιακού ηλεκτρολογίου και έκθεσης εικόνας σε LCD οθόνη. Επίσης μπορεί χάρη στα θερμικά στοιχεία peltier που διαθέτει να υποβάλλει τα δείγματα σε ταχύτατες ανυψώσεις θερμοκρασίας (3 °C/sec) ή και μειώσεις (2 °C/sec) και σε κύκλους αλλαγής θερμοκρασίας μεταξύ 4 °C και 99 °C με ακρίβεια $\pm 0,2$ °C.



Εικόνα 2.2 Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της PCR

Το μίγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει όλα τα απαραίτητα συστατικά και πιο συγκεκριμένα περιλαμβάνονται η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, το μίγμα των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), το ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιέχει κατιόντα Mg²⁺, που χρησιμεύουν ως συμπαράγοντας του ενζύμου της πολυμεράσης και ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων που κατέχουν το ρόλο των εκκινητών της αντίδρασης και οριοθετούν την επιθυμητή αλληλουχία προς ενίσχυση. Μάλιστα η επιλογή και ο σχεδιασμός των κατάλληλων εκκινητών είναι μεγάλης σημασίας για την ειδικότητα των PCR προϊόντων. Για τον λόγο αυτό ο σχεδιασμός των εκκινητών πραγματοποιείται με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού και λαμβάνοντας υπόψιν τους βασικούς κανόνες σχεδιασμού:

1. Το ζεύγος εκκινητών θα πρέπει να έχει παρόμοια θερμοκρασία τήξης (melting temperature, T_m) καθώς και όμοια περιεκτικότητα G+C βάσεων (περίπου 45-55%), ενώ το μήκος τους ιδανικά είναι μεταξύ 18 – 25 νουκλεοτίδια.
2. Αποφυγή διαδοχικών επαναλήψεων των ίδιων νουκλεοτιδίων, κυρίως των GC επαναλήψεων κοντά στο 3' άκρο του εκκινητή.

3. Αποφυγή συμπληρωματικότητας των 3' άκρων των εκκινητών με σκοπό τον περιορισμό της δημιουργίας διμερών εκκινητών.

4. Χρήση κατάλληλων αλγορίθμων (π.χ. nucleotide BLAST) για τον έλεγχο της ειδικότητας υβριδοποίησης των εκκινητών και κυρίως του 3' άκρου στη επιθυμητή αλληλουχία.

Ακολουθώντας τα προαναφερόμενα κριτήρια για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές για το γενετικό τόπο *SYN3/TIMP3* (Πίνακας 2.1), οι οποίοι προστέθηκαν στο αντίστοιχο μίγμα αντίδρασης τελικού όγκου 25μl (Πίνακας 2.2.). Το τελευταίο περιείχε το ένζυμο Taq στο BioMix Red 2x mix (Bioline, Μεγάλη Βρετανία).

Πίνακας 2.1 Χαρακτηριστικά των εκκινητών που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την επιλεκτική ενίσχυση τμήματος του γενετικού τόπου *SYN3/TIMP3* με τη χρήση συμβατικής PCR

Γονίδιο	Κατεύθυνση	Αλληλουχία (5'-3')	Tm	GC περιεκτικότητα
SYN3	Forward	GATTTATATGCAAAGCCATTCCTGA	57,5	34,6%
	Reverse	CCAGTGGGATATTTCCAAAGCT	57,8	40%
	Sense	ACCTGTACAGTAATCCGATTAGTGA	54,4	42,9%
	Antisense	CCCACAACCTCTTTCAATGCA	57,0	45,5%

Πίνακας 2.2 Μίγμα αντίδρασης για την επιλεκτική ενίσχυση τμήματος του γενετικού τόπου *SYN3/TIMP3* με τη χρήση συμβατικής PCR

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	8.5	-
SYN3F	1	0,8 pmol/μl
SYN3A	1	0,8 pmol/μl
Taq πολυμεράση	12.5	1X
BioMix Red (2X)		
DNA	2	<250 ng
Τελικός όγκος	25	

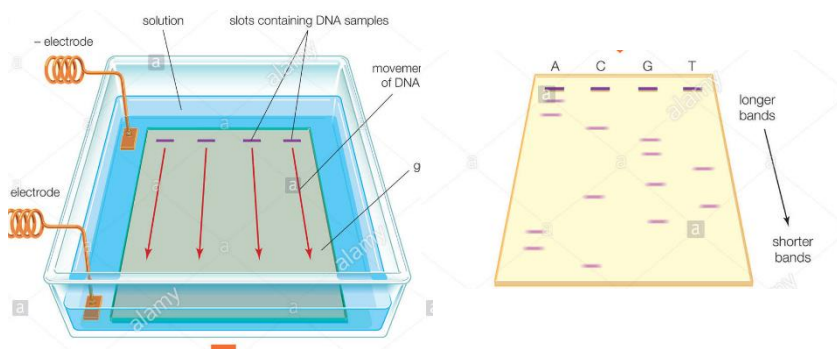
Το στάδιο της αρχικής αποδιάταξης πραγματοποιήθηκε στους 95°C για 5 min ακολουθώντας στη συνέχεια 40 κύκλοι των τριών σταδίων της PCR. Οι κύκλοι ξεκινούν με την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 94°C για 60 sec, ακολουθεί το στάδιο της υβριδοποίησης των εκκινητών στους 55°C για 60 sec και ολοκληρώνονται με το στάδιο της επέκτασης στους 72°C για 60 sec. Τέλος, λαμβάνει χώρα το στάδιο της τελικής επέκτασης με επώαση του μίγματος στους 72°C για 5 min. Σε κάθε σειρά αντιδράσεων περιλαμβάνεται και ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου στο οποίο αντί για υπόστρωμα έχει προστεθεί ο αντίστοιχος όγκος από στείρο H₂O (Πίνακας 2.3).

Πίνακας 2.3 Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο για την επιλεκτική ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *SYN3* με τη χρήση συμβατικής PCR

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχική αποδιάταξη	95	5 min	40 κύκλοι
Αποδιάταξη	94	1 min	
Υβριδισμός	55	1 min	
Επέκταση	60	4 min	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72	5 min	

2.5 Ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, είναι η πιο κοινή, απλή και γρήγορη μέθοδος οπτικοποίησης, ανίχνευσης και ανάλυσης των προϊόντων της PCR. Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται στην διαφορετική κινητικότητα που εμφανίζουν τα μόρια DNA, όταν κινούνται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα υπό την εξωγενή επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η διαφορετική αυτή κινητικότητα οφείλεται στο διαφορετικό μέγεθος των τμημάτων DNA που υπάρχουν στο εξεταζόμενο μίγμα. Πιο αναλυτικά τα μόρια DNA, που φέρουν αρνητικό φορτίο, κινούνται με ταχύτητα που είναι αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογαρίθμου (\log_{10}) του μοριακού τους βάρους. Η κίνηση γίνεται προφανώς προς τη θετικά φορτισμένη άνοδο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ευδιάκριτων ζωνών που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο μοριακό βάρος (Εικόνα 2.3). Η κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται επίσης από τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη στερεοδιάταξή του αλλά και την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος.



Εικόνα 2.3 Σχηματική απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων (Εικόνα τροποποιημένη από www.alamy.com)

Αντιδραστήρια / Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα 5X TBE (τρεις-βορικό-EDTA): 54 g Trisma Base (Sigma #201-064-4, 27,5 g βορικό οξύ (Sigma #036K0210) και 20 ml EDTA 0,5 M pH 8,0 σε 1 L H₂O
- Βρωμιούχο αιθίδιο (500 µg/mL, Sigma, 012K8934)

- Αγαρόζη (HT Biotechnology, UK) 100 g
- Δείκτης μοριακών βαρών φχ174 (NEB, ΗΠΑ)
- Χρωστική 6X (loading dye) με κυανό της βρωμοφαινόλης (BPB) και φικόλη
- Πιπέτες των 20 μl και 100 μl
- Ρύγχη πιπετών χωρίς φίλτρο
- Ηλεκτροφορητικές συσκευές (Pqrlab και SciPlus, Γερμανία)
- Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης EPS5301 (Amersham, Αγγλία)
- Τράπεζα ακτινοβολίας UV (Vilbert Loumart, Γαλλία)

Η παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης ξεκινά με τη διαλυτοποίηση 0,4 g αγαρόζης σε 40 mL ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5X έτσι ώστε η αναλογία βάρους κατ' όγκο να είναι 2% w/v. Η πλήρης διαλυτοποίηση γίνεται με θέρμανση του διαλύματος μέχρι τη δημιουργία ομοιογενούς διαυγούς διαλύματος και κατόπιν προστίθεται 40 μl βρωμιούχο αιθίδιο, 500 μg/mL. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την επώαση του διαλύματος μέχρι να πήξει. Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR στο πήκτωμα, αυτό μεταφέρεται στην ηλεκτροφορητική συσκευή όπου καλύπτεται με ρυθμιστικό διάλυμα TBE (0.5x). Στη συνέχεια ετοιμάζονται τόσο τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση όσο και ο δείκτης μοριακών βαρών, με ανάμειξη 15 μL προϊόντος PCR με 3 μL ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης 6x DNA Loading Dye (6:1). Με αυτόν τον τρόπο σε κάθε δείγμα προκύπτει τελική συγκέντρωση 1,66 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0,005% (w/v) χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue), 0,005% (w/v) χρωστική κυανολικού ξυλενίου FF (xylene cyanol FF), και 10% (v/v) γλυκερόλη (glycerol). Τέλος, τα δείγματα και ο DNA Ladder μεταφέρονται στις κατάλληλες θέσεις που έχουν δημιουργηθεί στο πήκτωμα αγαρόζης (πηγάδια) και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε συνθήκες σταθερής τάσης 100 V, σε θερμοκρασία δωματίου, για 50 min περίπου. Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα παρατηρείται κάτω από λάμπα UV όπου και φωτογραφίζεται με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή.

2.6 Καθαρισμός των PCR προϊόντων

Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων πραγματοποιήθηκε με το εμπορικά διαθέσιμο kit PureLink PCR Purification kit της Invitrogen. Ο καθαρισμός επιτυγχάνεται χάρη στις ειδικά διαμορφωμένες στήλες που περιέχονται στο kit, οι οποίες περιέχουν μεμβράνες πυριτίου επιτρέποντας έτσι την κατακράτηση του DNA. Στο kit περιλαμβάνεται επίσης ειδικό διάλυμα πρόσδεσης (Binding Buffer) το οποίο δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες (υψηλές συγκεντρώσεις άλατος και κατάλληλο pH) αφενός για την απορρόφηση του DNA στην μεμβράνη της στήλης και αφετέρου για την ταυτόχρονη απομάκρυνση, μέσω εκπλύσεων με κατάλληλο διάλυμα, των

διαφόρων προσμίξεων (π.χ. περίσσεια εκκινητών, άλατα, ένζυμα, μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια, αγαρόζη, χρωστικές, βρωμιούχο αιθίδιο). Η στήλες επιτρέπουν την αποτελεσματική πρόσδεση PCR προϊόντων που έχουν μέγεθος μεγαλύτερο των 70 bp. Μετά τον καθαρισμό του DNA μέσω των εκπλύσεων, αυτό εκλούεται με 10 ή 20 μl από το διάλυμα έκλουσης.

Αντιδραστήρια / Υλικά

- Διάλυμα δέσμευσης (B2 ή B3) (πριν από τη πρώτη χρήση προστίθεται 100% Ισοπροπανόλη)
- Διάλυμα έκπλυσης W1 (πριν από τη πρώτη χρήση προστίθεται 96-100% αιθανόλη)
- Διάλυμα έκλουσης E1
- PureLink® PCR Spin στήλες
- Σωληνάρια συλλογής
- PureLink σωληνάρια έκλουσης
- 100% Ισοπροπανόλη
- 96-100% Αιθανόλη
- Πιπέτες (Thermo, Fisher USA) των 100 μl , 200 μl και 1000 μl
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus,Thermo Fisher, USA)

Πειραματική Πορεία

Δέσμευση DNA

- Προσθήκη 4 φορές του όγκου του PCR προϊόντος (στη συγκεκριμένη εργασία ο όγκος του PCR προϊόντος είναι ~15 μl) από το διάλυμα δέσμευσης B2 ή B3. Ο τελικός όγκος του διαλύματος πρέπει να είναι 50-100 μl. Ακολουθεί καλή ανακίνηση.
- Τοποθέτηση της PureLink Spin στήλης σε σωληνάριο συλλογής.
- Προσθήκη του δείγματος με το κατάλληλο διάλυμα δέσμευσης (από το βήμα ένα της διαδικασίας) στη PureLink spin στήλη.
- Φυγοκέντρηση της στήλης στα 10.000 x g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απόρριψη του συλλεχθέντος υγρού από το σωληνάριο συλλογής και επανατοποθέτηση της στήλης σε σωληνάριο συλλογής.

Καθαρισμός DNA

- Προσθήκη στη στήλη 650 μl διαλύματος έκπλυσης W1.
- Φυγοκέντρηση της στήλης στα 10.000 x g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απόρριψη του συλλεχθέντος υγρού από το σωληνάριο συλλογής και επανατοποθέτηση της στήλης σε σωληνάριο συλλογής.

- Φυγοκέντρηση της στήλης στη μέγιστη ταχύτητα για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, για να απομακρυνθεί οποιοδήποτε κατάλοιπο από το διάλυμα έκπλυσης.
- Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής.

Έκλυση DNA

- Τοποθέτηση της στήλης σε ένα 1,7 ml PureLink σωληνάριο έκλυσης.
- Προσθήκη 50 μ l διαλύματος έκλυσης (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) ή αποστειρωμένου νερού (pH >7,0) στο κέντρο της στήλης.
- Επώαση της στήλης για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση της στήλης στη μέγιστη ταχύτητα για 2 λεπτά.
- Το σωληνάριο έκλυσης περιέχει το καθαρό PCR προϊόν. Ακολουθεί απόρριψη της στήλης. Ο ανακτημένος όγκος έκλυσης είναι ~48 μ l.
- Αποθήκευση του καθαρού PCR προϊόντος στους -20 °C ή χρήση αυτού για την επιθυμητή εφαρμογή.

2.7 Ενίσχυση επιθυμητού τμήματος για αλληλούχιση (cycle sequencing)

Η διαδικασία που ακολουθείται για την προετοιμασία των δειγμάτων για την αλληλούχιση είναι παρόμοια με αυτή της PCR, καθώς το μίγμα αντίδρασης περιέχει τα ίδια συστατικά (Πίνακας 2.4) και υπόκειται στην ίδια διαδικασία εναλλαγής των θερμικών κύκλων (Πίνακας 2.5). Οι διαφορές μεταξύ αυτών των διαδικασιών είναι ότι α) στην περίπτωση των αντιδράσεων cycle sequencing χρησιμοποιείται είτε ο πρόσθιος είτε ο ανάστροφος εκκινητής, γεγονός που οδηγεί σε γραμμική και όχι εκθετική ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος και β) χρησιμοποιούνται διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs), τα οποία διακόπτουν την επέκταση του DNA όταν ενσωματωθούν. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο antisense εκκινητής.

Πίνακας 2.4 Μίγμα αντίδρασης για cycle sequencing

Αντιδραστήριο	Όγκος (μ l)	Τελική συγκέντρωση
BigDye 1.1 RRmix, ABI	0.3	-
5X Sequencing Buffer, ABI	2	1X
SYN3A εκκινητής (5 pmol/ μ L)	1	0,5 pmol/ μ L
H ₂ O	4,5	
Καθαρισμένο PCR προϊόν	2	
Τελικός όγκος	10	

Πίνακας 2.5 Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο για cycle sequencing

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός	96	1 min	40 κύκλοι
Διαχωρισμός κλώνων	96	10 sec	
Υβριδισμός	50	10 sec	
Επέκταση	60		

2.8 Καθαρισμός των προϊόντων του cycle sequencing

Για τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκαν τρεις μέθοδοι:

- Το εμπορικά διαθέσιμο Kit Nucleoseq της Macherey – Nagel (Γερμανία), το οποίο περιλαμβάνει τις στήλες NucleoSEQ που περιέχουν gel επιτρέποντας την αποτελεσματική απομάκρυνση των μικρότερων μορίων από τα νουκλεϊκά οξέα
- Ο καθαρισμός με καθίζηση μέσω αιθανόλης
- Το εμπορικά διαθέσιμο Kit BigDye XTerminator (Applied Biosystems, USA).

Μέθοδος με στήλες NucleoSEQ (Macherey – Nagel)

Οι στήλες αυτές είναι σχεδιασμένες για τον γρήγορο και αποτελεσματικό καθαρισμό μη-ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων. Περιέχουν gel το οποίο παρέχει αξιόπιστη αφαίρεση των μικρότερων μορίων από τα νουκλεϊκά οξέα. Ακαθαρσίες όπως άλατα, περίσσεια επισημαντών, νουκλεοτίδια, ίχνη οργανικών διαλυτών και εκκινητών συγκρατούνται από τη στήλη ενώ τα νουκλεϊκά οξέα που μας ενδιαφέρουν ανακτούνται με υψηλή απόδοση.

Αντιδραστήρια / Υλικά

- Πιπέτες (Thermo, Fisher USA) των 100 μl και 1000 μl
- Ακρορύγχη των 200 μl και 1000 μl
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus, Thermo Fisher, ΗΠΑ)
- Αποστειρωμένο νερό (BIOΣΕΡ Α.Ε, Ελλάδα)
- Συσκευή Vortex (Fisher, ΗΠΑ)
- Σωληνάκια τύπου eppendorfs των 1,5 ml
- Στήλες NucleoSEQ (Macherey – Nagel, Γερμανία)

Πειραματική πορεία

1. Φυγοκέντρηση των στηλών NucleoSEQ για 30 sec στα 750 x g για να συλλεχθεί στον πυθμένα, η πηκτή που βρίσκεται σε σκόνη μέσα στις στήλες

2. Προσθήκη 600 μl στείρου νερού και έντονη ανακίνηση ώστε να ενυδατωθεί το gel. Αφαιρούνται οι φυσαλίδες κάνοντας vortex
3. Επώαση τουλάχιστον 30 min ή όλη τη νύχτα. Η επώαση μπορεί να γίνει σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4°C. Οι ενυδατωμένες στήλες μπορούν να φυλαχθούν στους 4°C για το πολύ 14 μέρες. Γίνεται ανασύσταση του gel που έχει συγκεντρωθεί στον πάτο της στήλης κάνοντας έντονη ανάδευση. Δεν πρέπει να δημιουργηθούν φυσαλίδες. Αφαιρείται το πώμα που βρίσκεται στον πυθμένα της στήλης και τοποθετείται η στήλη μέσα στο δοχείο συλλογής
4. Φυγοκέντρηση για 2 min στα 750 x g για να αφαιρεθεί το διάλυμα αποθήκευσης που περισσεύει. Απορρίπτεται το δοχείο συλλογής με το διάλυμα και τοποθετείται η στήλη στο κατάλληλο δοχείο συλλογής
5. Ανοίγουμε το καπάκι της στήλης. Προσεκτικά φορτώνεται το δείγμα στο κέντρο του gel χωρίς να διαταραχτεί η επιφάνειά του. Τοποθετώντας το δείγμα στα πλάγια της στήλης μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της αποτελεσματικότητας της στήλης. Ο όγκος του δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 20 μl
6. Φυγοκέντρηση της στήλης για 4 – 6 min στα 750 x g. Απορρίπτεται η στήλη, ξηραίνεται το δείγμα ή χρησιμοποιείται απευθείας

Μέθοδος καθαρισμού με αιθανόλη και EDTA

Η μέθοδος καθαρισμού με αιθανόλη παρέχει καθαρό σήμα ενώ ελαχιστοποιεί τον αριθμό των ddNTPs που δεν έχουν ενσωματωθεί. Είναι πολύ ωφέλιμο να απομακρύνονται τα μη-ενσωματωμένα ddNTPs που επισκιάζουν τα δεδομένα ιδιαίτερα στην αρχή της ανάλυσης της αλληλουχίας. Παρόλο που αυτή η μέθοδος παρέχει καθαρό σήμα, είναι χρονοβόρα και μπορεί να προκαλέσει απώλεια των κλασμάτων με μικρό μοριακό βάρος.

Αντιδραστήρια / Υλικά

- Πιπέτες (Thermo, Fisher USA) των 10 μl και των 100 μl
- Ρύγχη των 10 μl και 200 μl
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus, Thermo Fisher, USA)
- Διάλυμα EDTA 125 mM
- Αιθανόλη 70% και 100%
- Αποστειρωμένο νερό
- Hi-di Φορμαμίδιο (Applied Biosystems, USA)
- Σωληνάρια τύπου eppendorfs των 1,5 ml

Πειραματική πορεία

1. Προσθήκη 5 μL EDTA 125 mM σε καθαρό σωληνάριο τύπου Eppendorf.
2. Προσθήκη δείγματος στο παραπάνω σωληνάριο με το EDTA.
3. Προσθήκη 60 μL 100% παγωμένης αιθανόλης στο παραπάνω διάλυμα.
4. Τοποθέτηση μίγματος στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 15 λεπτά.
5. Φυγοκέντρηση δειγμάτων στα $12.000 \times g$ στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 30 λεπτά.
6. Αφαίρεση eppendorfs από τη φυγόκεντρο με τη συγκεκριμένη φορά που έχουν τοποθετηθεί σε αυτήν και απόρριψη υπερκείμενου με αποφυγή αλλαγής της κλίσης του Eppendorf.
7. Προσθήκη 60 μL 70% αιθανόλης (η οποία διατηρείται στους $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$).
8. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα.
9. Αφαίρεση eppendorfs από τη φυγόκεντρο με τη συγκεκριμένη φορά που έχουν τοποθετηθεί σε αυτήν και απόρριψη υπερκείμενου με αποφυγή αλλαγής της κλίσης του Eppendorf.
10. Επώαση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτεινό μέρος, για 1,5 ώρα μέχρι να εξατμιστεί η αιθανόλη τελείως.
11. Προσθήκη 15 μL φορμαμίδιου (highly deionized, Hi-Di).
12. Αποστολή δειγμάτων για sequencing.

Μέθοδος καθαρισμού με BigDye XTerminator (Applied Biosystems)

Ο καθαρισμός με την μέθοδο του kit BigDye XTerminator είναι μια γρήγορη και απλή μέθοδος για τις αντιδράσεις DNA sequencing οι οποίες απομακρύνει τα μη-ενσωματωμένα ddNTPs. Ο καθαρισμός ολοκληρώνεται σε 40 min και απαιτεί λιγότερο από 10 λεπτά εργασίας στον εργαστηριακό πάγκο.

Αντιδραστήρια / Υλικά

- Πιπέτες (Thermo, Fisher USA) των 1000 μl
- Ρύγχη των 1000 μl
- Φυγόκεντρος (Hermle Labortechnik, GmbH Z 287 A)
- Συσκευή Vortex (IKA, MS1 Minishaker)
- Σωληνάρια τύπου eppendorfs των 1,5 ml
- Πλάκες μικροτιτλοδότησης
- Διάλυμα SAM (Applied Biosystems, USA)
- Διάλυμα BigDye XTerminator (Applied Biosystems, USA)

Πειραματική πορεία

1. Ανάλογα με τον όγκο της αντίδρασης χρησιμοποιείται ο όγκος των διαλυμάτων που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Όγκος αντίδρασης (μl)	Διάλυμα SAM (μl)	Διάλυμα BigDye XTerminator (μl)
10	45	10

2. Προσθήκη των δειγμάτων απευθείας στα πηγαδάκια της πλάκας μικροτιτλοδότησης.
3. Μίξη διαλύματος SAM και διαλύματος BigDye XTerminator σε σωληνάριο Eppendorf. (Ο όγκος τους ορίζεται από τον παραπάνω πίνακα και ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων)
4. Προσθήκη στο κάθε δείγμα της ποσότητας του μίγματος (SAM και BigDye XTerminator) χρησιμοποιώντας ρύγχη με διάμετρο μεγαλύτερη από 1 mm (συνεχή ανάδευση μίγματος με τη χρήση πιπέτας πριν τη προσθήκη του σε κάθε δείγμα).
5. Σφράγιση της πλάκας μικροτιτλοδότησης με μεμβράνη.
6. Έντονη ανάδευση για 30 min.
7. Φυγοκέντρηση στα 1000 x g για 2 min.

2.9 Προετοιμασία δειγμάτων για DNA sequencing

Τα κεκαθαυμένα προϊόντα του cycle sequencing τοποθετούνται στη συνέχεια στον γενετικό αναλυτή SeqStudio, της Thermo Applied Biosystem (Εικόνα 2.4). Ο αναλυτής είναι ένα αυτοματοποιημένο όργανο για την ανάλυση κλασμάτων DNA τα οποία είναι επισημασμένα με φθορίζουσες ουσίες, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές. Επιτρέπει τόσο την αλληλούχιση όσο και την ανάλυση κλασμάτων DNA χωρίς την ανάγκη αλλαγής του τύπου του πολυμερούς ή του μήκους του τριχοειδούς.

Οι πλάκες στις οποίες εισάγεται το δείγμα τοποθετούνται στο δίσκο του δειγματολήπτη που μπορεί να δεχτεί μέχρι 96 δείγματα. Ο δειγματολήπτης φέρνει σε επαφή το ηλεκτρόδιο της κάθodu και το ένα άκρο του τριχοειδούς γεμίζει με πολυμερές. Το ηλεκτρόδιο της ανόδου από το άλλο άκρο του τριχοειδούς είναι βυθισμένο στο ρυθμιστικό διάλυμα. Το δείγμα εισέρχεται στο τριχοειδές καθώς ρέει το ρεύμα από την κάθοδο προς την άνοδο. Το μικρό χρονικό διάστημα της ηλεκτροφόρησης κατά το οποίο το τριχοειδές και η κάθodos είναι βυθισμένα μέσα στο δείγμα ονομάζεται ηλεκτροκινητική έγχυση. Το δείγμα δημιουργεί μια στενή ζώνη μέσα στο τριχοειδές κατά τη διάρκεια της έγχυσης. Το άκρο του τριχοειδούς κοντά στην κάθοδο είναι τοποθετημένο μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα. Εφαρμόζεται ξανά το ρεύμα για να συνεχιστεί η ηλεκτροφόρηση. Όταν τα κλάσματα του DNA φτάσουν στο παράθυρο ανίχνευσης του τριχοειδούς, το laser διεγείρει τις φθορίζουσες χρωστικές ουσίες. Ο εκπεμπόμενος φθορισμός από τις ουσίες συγκεντρώνεται κάθε δευτερόλεπτο από μία ψυχρή, διπλού φορτίου κάμερα (charge-coupled

device, CCD) με συγκεκριμένου μήκους κύματος ζώνες (εικονικά φίλτρα) και αποθηκεύεται ως ψηφιακό σήμα είτε στην οθόνη του seq studio είτε στον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος για περαιτέρω επεξεργασία. Το Seq studio data collection software μεταφράζει τα αποτελέσματα, αναγνωρίζοντας τις βάσεις από την ένταση του φθορισμού σε κάθε σημείο.



Εικόνα 2.4 Γενετικός αναλυτής Thermo ABI SeqStudio. 1.Πίνακας ένδειξης - κατάσταση αναλυτή, 2.Οθόνη αφής, 3.Πόρτα αναλυτή-πρόσβαση κασέτας, ρυθμιστικού διαλύματος καθόδου, πλάκας μικροτιπλοδότησης ή σωληναρίων, 4.Θύρα USB.

Το όργανο αυτό χρησιμοποιεί ομάδες εικονικών φίλτρων για να ανιχνεύσει την ένταση του φθορισμού σε τέσσερις μη-επικαλυπτόμενες περιοχές πάνω στην CCD κάμερα που αντιστοιχούν στις τέσσερις χρωστικές που χρησιμοποιούνται: για το A→R66, για το C→R0X, για το G→R110 και για το T→TAMRA. Κάθε περιοχή αντιστοιχεί σε ένα φάσμα μηκών κύματος που περιέχει ή είναι κοντά στο μέγιστο της εκπομπής της χρωστικής του ABI prism. Αυτή η διαδικασία είναι αντίστοιχη με την χρήση ενός φυσικού φίλτρου που χωρίζει το φως σε διαφορετικά μήκη κύματος. Εν τούτοις, οι ομάδες των φίλτρων ονομάζονται «εικονικά φίλτρα» επειδή το όργανο δεν έχει φυσικά φίλτρα ως εξαρτήματα για να κάνει τον διαχωρισμό. Οι ακριβείς θέσεις των CCD περιοχών και οι κατάλληλοι συνδυασμοί των χρωστικών για αυτές τις θέσεις εξαρτώνται από τις ομάδες των εικονικών φίλτρων που χρησιμοποιούνται. Για παράδειγμα, με την ομάδα εικονικών φίλτρων E το όργανο καταγράφει την ένταση του φωτός σε τέσσερις περιοχές ή «παράθυρα» κεντραρισμένα στα 540 nm, στα 570 nm, στα 595 nm και στα 625 nm. Οι θέσεις των παραθύρων σε κάθε ομάδα εικονικού φίλτρου έχει βελτιστοποιηθεί ώστε να παρέχει το μέγιστο δυνατό διαχωρισμό μεταξύ των κέντρων ανίχνευσης για τις διαφορετικές χρωστικές ενώ διατηρεί καλή ένταση σήματος.

Το Data Collection Software κωδικοποιεί την ένταση και το χρώμα από τις τέσσερις περιοχές συγκέντρωσης του φωτός. Αυτές εμφανίζονται σαν μπλε, πράσινες, μαύρες και κόκκινες κορυφές στα ακατέργαστα δεδομένα. Το Sequencing Analysis Software χρησιμοποιεί τα ίδια τέσσερα χρώματα για τα αναλυμένα δεδομένα από όλους τους συνδυασμούς των φίλτρων και των χρωστικών. Η έκθεση των χρωμάτων αναπαριστά τη σχετική, όχι την πραγματική, ανίχνευση των

μηκών κύματος. Για σταθερότητα, το λογισμικό συμβολίζει πάντα στα αναλυόμενα δεδομένα το A με πράσινο, το C με μπλε, το G με μαύρο και το T με κόκκινο στο ηλεκτροφορογράφημα. Στους πίνακες 2.6 και 2.7 φαίνονται οι χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και τα μήκη κύματος στα οποία έχουν μέγιστη εκπομπή και απορρόφηση. Το αρχείο που λαμβάνεται μπορεί να συγκριθεί με τη φυσιολογική αλληλουχία του PKD2 μέσω BLAST του PubMed ή με το πρόγραμμα CLC (Aarhus, Denmark) ή με το πρόγραμμα NovoSNP.

Πίνακας 2.6 Εύρος περιοχών των μηκών κύματος των ομάδων των εικονικών φίλτρων.

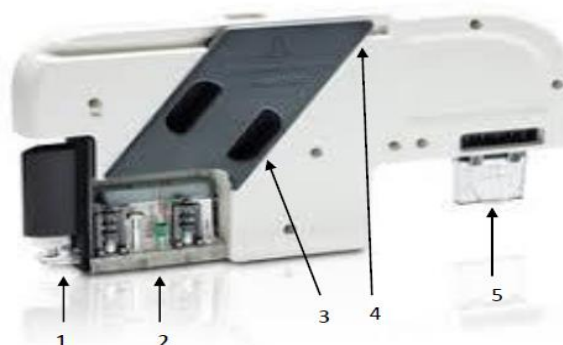
Ομάδα εικονικού φίλτρου	Χρώμα	Εύρος μήκους κύματος του εικονικού φίλτρου
A	Μπλε	530-541
	Πράσινο	554-564
	Μαύρο	581-591
	Κόκκινο	610-620
E	Μπλε	535-545
	Πράσινο	565-575
	Μαύρο	590-600
	Κόκκινο	620-630

Πίνακας 2.7 Μέγιστη απορρόφηση και εκπομπή των χρωστικών.

Χρωστική	Μέγιστη απορρόφηση (nm)	Μέγιστη εκπομπή (nm)
NED	546	575
6FAM	494	518
VIC	538	552
PET	-	-

Ο αναλυτής διαθέτει μια αυτόνομη, αντικαταστάσιμη κασέτα με:

- Μία συστοιχία τεσσάρων τριχοειδών.
- Ένα πολυμερές ικανό να εκτελεί ανάλυση αλληλουχίας και θραυσμάτων.
- Ένα σύστημα παροχής πολυμερούς POP-1.
- Ένα ρυθμιστικό διάλυμα ανόδου.



Εικόνα 2.5 Κασέτα SeqStudio. 1. Πολυμερές, 2. Σύστημα μεταφοράς πολυμερούς, 3. Παράθυρο οπτικής ανίχνευσης, 4. Συστοιχία τεσσάρων τριχοειδών.

Ο γενετικός αναλυτής SeqStudio αυτόματα:

- Εκτελεί οπτική ευθυγράμμιση κάθε φορά που τοποθετείται μια κασέτα.
- Εκτελεί αυτόματη φασματική βαθμονόμηση για κάθε ένα δείγμα για διόρθωση της φασματικής επικάλυψης.

Ο αναλυτής αυτός είναι συμβατός με στάνταρ πλάκες μικροτιτλοδότησης οι οποίες διαθέτουν 96 πηγαδάκια στα οποία γίνεται η φόρτωση του δείγματος και τυπικά σωληνάρια 8 λωρίδων.

Ο γενετικός αναλυτής SeqStudio είναι ένα αυτόνομο όργανο. Εκτελείται απευθείας από την οθόνη αφής με το λογισμικό συλλογής δεδομένων SeqStudio και δεν απαιτεί υπολογιστή. Η ρύθμιση της πλάκας μπορεί να γίνει απευθείας στην οθόνη αφής, σε έναν υπολογιστή με SeqStudio Plate Manager, στο Thermo Fisher Cloud ή ακόμα σε USB. Μπορεί να παρακολουθηθεί μια εκτέλεση απευθείας στην οθόνη αφής του οργάνου ή απομακρυσμένα στο Thermo Fisher Cloud.

Το seq studio data collection software δημιουργεί ένα ηλεκτροφορογράφημα για κάθε χρωστική που βασίζεται στη μετανάστευση θραυσμάτων DNA κατά μήκος των τριχοειδών. Η μορφή των αρχείων καθορίζεται από τον τύπο του πειράματος που καθορίζεται κατά την τοποθέτηση της πλάκας.

- Τα πειράματα αλληλούχισης δημιουργούν ένα AB1 αρχείο.
- Τα πειράματα ανάλυσης θραυσμάτων δημιουργούν ένα FSA αρχείο.

Οι μορφές αρχείων AB1 και FSA μπορούν να αναλυθούν με λογισμικό δευτερεύουσας ανάλυσης. Το λογισμικό δευτερεύουσας ανάλυσης είναι διαθέσιμο για υπολογιστή και στο Thermo Fisher Cloud.

Η ποιότητα των αποτελεσμάτων είναι χρωματικά κωδικοποιημένη.

- Πράσινο: Η ποιότητα ήταν εξαιρετική.
- Κίτρινο: Τουλάχιστον μια ειδοποίηση προειδοποίησης για την ποιότητα.
- Κόκκινο: Τουλάχιστον μια ειδοποίηση για αποτυχία.

Αντιδραστήρια / Υλικά / Εξοπλισμός

- Γενετικός αναλυτής Seq Studio
- Πλάκες μικροτιτλοδότησης χωρητικότητας 96 δειγμάτων
- Διαχωριστικό διάφραγμα (Septum), A35641
- Πιπέτες (Thermo, Fisher USA) των 20μl
- Hi-di Φορμαμίδιο (Applied Biosystems, USA)

Πειραματική Πορεία

1. Τοποθετούμε στο καθαρό cycle sequencing προϊόν 10 μl Hi-di φορμαμίδιο.

2. Μεταφέρονται τα δείγματα στις πλάκες μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων και καλύπτονται με το ειδικό διαχωριστικό διάφραγμα (septum).
3. Καταγράφονται οι θέσεις που χρησιμοποιούνται.
4. Φορτώνονται τα δείγματα στον γενετικό αναλυτή Seq Studio.

2.10 Βιοπληροφορική ανάλυση αποτελεσμάτων με ειδικά λογισμικά

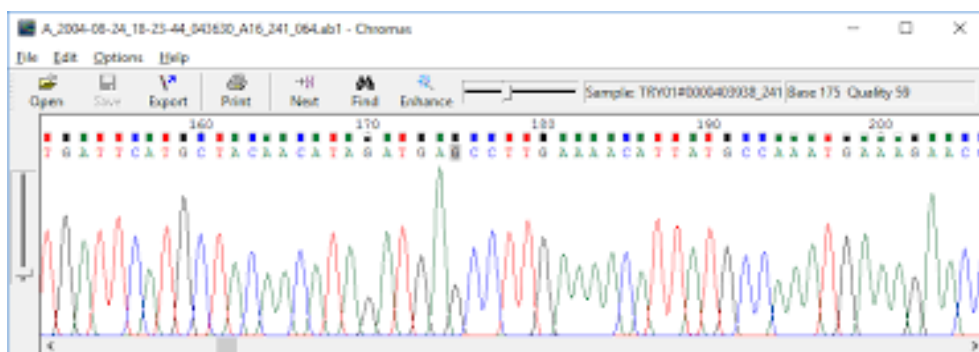
Τα προγράμματα βιοπληροφορικής τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία για την ανάλυση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν από το Sequencing είναι τα ακόλουθα:

- **Λογισμικό Πρόγραμμα Blast**

Το αλγοριθμικό πρόγραμμα Blast (Basic Local Alignment Search Tool) εντοπίζει ομοιότητες μεταξύ βιολογικών αλληλουχιών. Το πρόγραμμα αυτό συγκρίνει αλληλουχίες νουκλεοτιδίων ή πρωτεϊνών με αλληλουχίες οι οποίες εντοπίζονται σε βάσεις δεδομένων και εκτελεί στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Το Blast μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να συμπεράνει λειτουργικές και εξελικτικές σχέσεις μεταξύ αλληλουχιών καθώς και να βοηθήσει στην αναγνώριση γονιδίων που ανήκουν στην ίδια γονιδιακή οικογένεια.

- **Λογισμικό Chromas (Technelysium, Αυστραλία)**

Το chromas είναι ένα λογισμικό πρόγραμμα ανάλυσης αλληλούχισης DNA κατά Sanger. Είναι δωρεάν, απλό στη χρήση και δεν απαιτεί συναρμολόγηση πολλαπλών αλληλουχιών. Είναι απαραίτητο να γίνει εισαγωγή μιας αλληλουχίας αναφοράς του γονιδίου που μας ενδιαφέρει, ώστε να συγκριθεί με την αλληλουχία του δείγματος το οποίο χρειάζεται ανάλυση. Το chromas ανοίγει αρχεία χρωματογράφου ab1 από αλληλουχίες DNA Applied Biosystems. Το διάγραμμα που εμφανίζεται παρέχει την εικόνα κορυφών η μια δίπλα στην άλλη σχηματίζοντας την αλληλουχία του γονιδίου. Η κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο νουκλεοτίδιο. Το κάθε νουκλεοτίδιο αντιπροσωπεύεται από διαφορετικό χρώμα κορυφής. Η αδενίνη με πράσινο χρώμα, η θυμίνη με κόκκινο, η κυτοσίνη με μπλε και η γουανίνη με μαύρο χρώμα (Εικόνα 2.6).



Εικόνα 2.6 Αντιπροσωπευτική εικόνα του προγράμματος chromas.

- **Λογισμικό Πρόγραμμα NovoSNP**

Το NovoSNP είναι ένα πρόγραμμα το οποίο βοηθάει στον εντοπισμό πολυμορφισμών (σημεικών μεταλλάξεων καθώς και πολυμορφισμών εισαγωγής ή απαλοιφής). Απαραίτητη είναι μια αλληλουχία αναφοράς και η διαφορά του με άλλα προγράμματα γενετικής ανάλυσης είναι ότι συγκρίνει και δίνει αποτελέσματα ταυτόχρονα από αλληλουχίες οι οποίες προέρχονται από την ίδια γονιδιωματική περιοχή πολλών διαφορετικών ατόμων σε όλο το μήκος του γονιδίου. Δημιουργείται μια λίστα με πιθανούς πολυμορφισμούς και με δείκτη ποιότητας (quality score) των αλληλουχιών αυτών. Το NovoSNP επιτρέπει την ταξινόμηση και τον έλεγχο των πολυμορφισμών που εμφανίζονται οπτικά, καθώς και την παρακολούθηση των επαληθεύσεων.

- **Λογισμικό CLC Genomic Workbench**

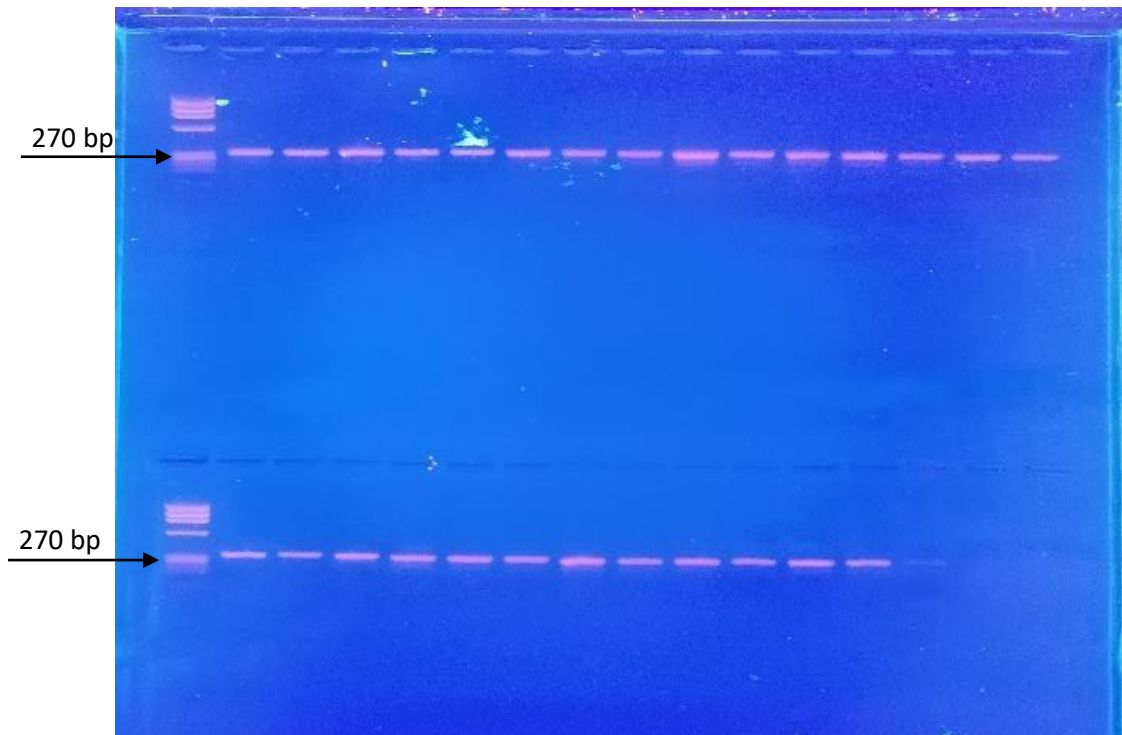
Το πρόγραμμα CLC Genomic Workbench είναι ένα χρήσιμο πρόγραμμα βιοπληροφορικής το οποίο έχει δημιουργηθεί από την εταιρία της Qiagen. Βασικό χαρακτηριστικό είναι ότι παρέχεται η δυνατότητα επεξεργασίας της αλληλουχίας αμινοξέων, DNA ή RNA με ποικίλους τρόπους, ώστε να αποκτηθούν χρήσιμες πληροφορίες για το γονίδιο. Επίσης, παρέχεται μέσω του προγράμματος σχεδιασμός εκκινητών, μοριακή κλωνοποίηση, ανάλυση γονιδιακής έκφρασης, φυλογενετική ανάλυση και πρόβλεψη της δομής του RNA. Στη συγκεκριμένη εργασία αποτέλεσε απαραίτητο πρόγραμμα αρχικά για την επιλογή των εκκινητών και στη συνέχεια για την ανάλυση των αποτελεσμάτων σε συνδυασμό, είτε με το πρόγραμμα NovoSNP, είτε με το πρόγραμμα Blast και Chromas. Με τα προγράμματα NovoSNP, Blast και Chromas εντοπίζονται τυχόν πολυμορφισμοί ή μεταλλάξεις στο γονίδιο *PKD2* των δειγμάτων μας, αφού γίνει η σύγκριση με την αλληλουχία αναφοράς. Αντίστοιχα το πρόγραμμα CLC Genomic Workbench εξυπηρετεί στο να εντοπιστεί η ακριβή θέση της μετάλλαξης μέσα στο γονίδιο η οποία μπορεί να βρίσκεται σε περιοχή εσονίου ή εξονίου του γονιδίου. Επιπρόσθετα με το πρόγραμμα αυτό παρέχεται η δυνατότητα αντιστοίχισης αμινοξέων κάτω από την αλληλουχία του γονιδίου, συνεπώς είναι δυνατός ο εντοπισμός της θέσης της μετάλλαξης πάνω στη τριπλέτα. Με το τρόπο αυτό μπορεί να ελεγχθεί εάν ή όχι η μετάλλαξη ενδιαφέροντος επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

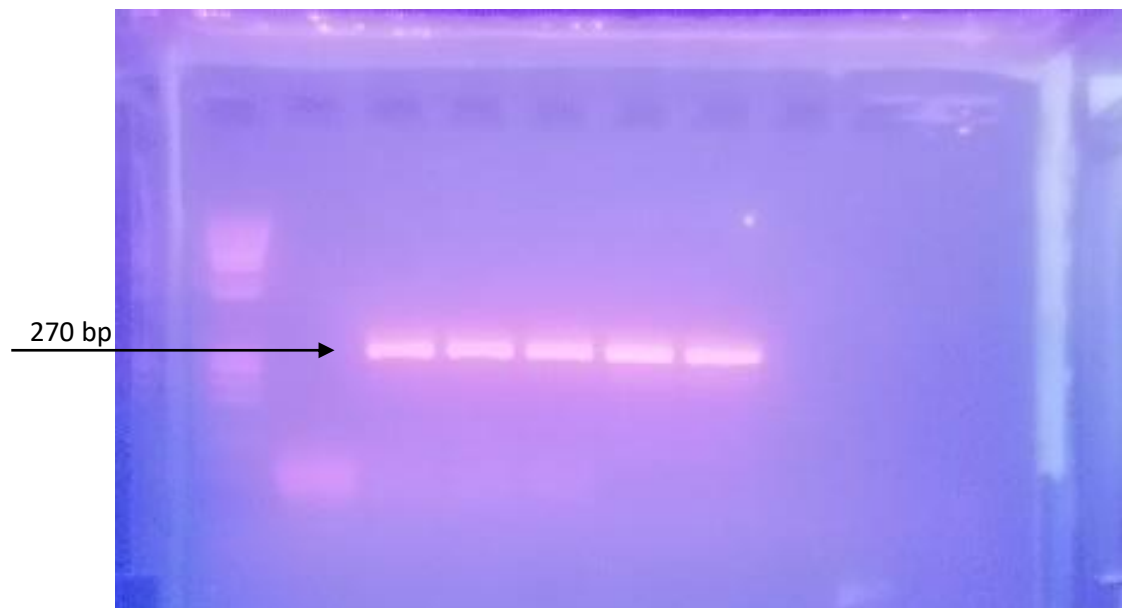
Για την ανίχνευση του εξεταζόμενου πολυμορφισμού στο γενετικό τόπο *SYN3/TIMP3* χρησιμοποιήθηκε συμβατική PCR για την επιλεκτική ενίσχυση 270 βάσεων και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε γέλη αγαρόζης 2% w/v για την επιβεβαίωση της επιτυχούς ενισχύσης της επιθυμητής αλληλουχίας. Κατόπιν, τα PCR προϊόντα καθαρίστηκαν με το PureLink PCR Purification kit της Invitrogen. Ακολούθησε cycle sequencing με BigDye αντιδραστήριο και τα αντίστοιχα προϊόντα καθαρίστηκαν με το προτυποποιημένο σετ αντιδραστηρίων BigDye XTerminator (Applied Biosystems, USA). Τα καθαρά προϊόντα τοποθετήθηκαν απευθείας σε plate και στη συνέχεια αναλυθήκαν στον γενετικό αναλυτή SeqStudio (Thermo Applied Biosystems).

3.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Όπως προαναφέρθηκε πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης για την επιβεβαίωση της επιλεκτικής ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος DNA. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, αποτελεί μία εύκολη, γρήγορη και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την ανίχνευση και ανάλυση των PCR προϊόντων. Η αρχή της μεθόδου της ηλεκτροφόρησης είναι η διαφορετική κινητικότητα των μορίων DNA, η οποία οφείλεται στο διαφορετικό μέγεθος τους, μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου pH υπό την εξωγενή επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Τα μόρια DNA φέρουν αρνητικό φορτίο και η ταχύτητα μετακίνησης τους μέσα στο πήκτωμα αγαρόζης προς τη θετικά φορτισμένη άνοδο, είναι αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογαρίθμου (\log_{10}) του μοριακού τους βάρους. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ευδιάκριτων ζωνών που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο μοριακό βάρος, το οποίο προσδιορίζεται με την ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση κατάλληλου δείκτη μοριακών βαρών. Στις εικόνες 3.1 και 3.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR του γενετικού τόπου *SYN3/TIMP3* σε τυχαία επιλεγμένα δείγματα ασθενών με ΗΕΩ ξηρής και υγρής μορφής αντίστοιχα. Όπως προκύπτει από τις εικόνες η αντίδραση PCR που εφαρμόστηκε χαρακτηρίζεται από ειδικότητα καθώς σε όλα τα δείγματα το PCR προϊόν έχει το επιθυμητό μέγεθος (270 bp) κι επίσης δεν παρατηρείται η παραγωγή παραπροϊόντων μικρότερου μοριακού βάρους.



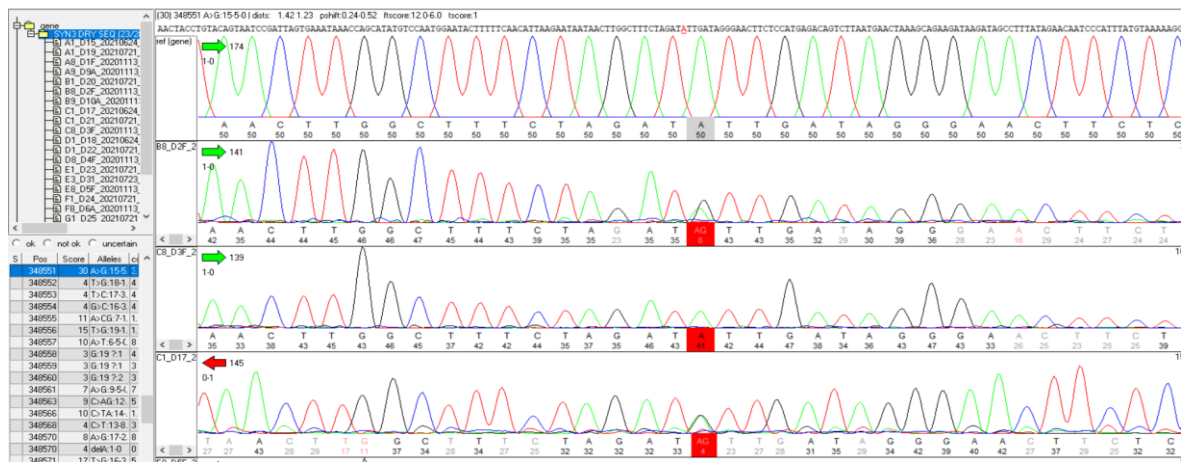
Εικόνα 3.1 Αντιπροσωπευτική εικόνα ηλεκτροφόρησης για τμήμα του γενετικού τύπου SYN3/TIMP3 σε ασθενείς με ΗΕΩΚ ξηρής μορφής, σε πήκτωμα αγαρόζης



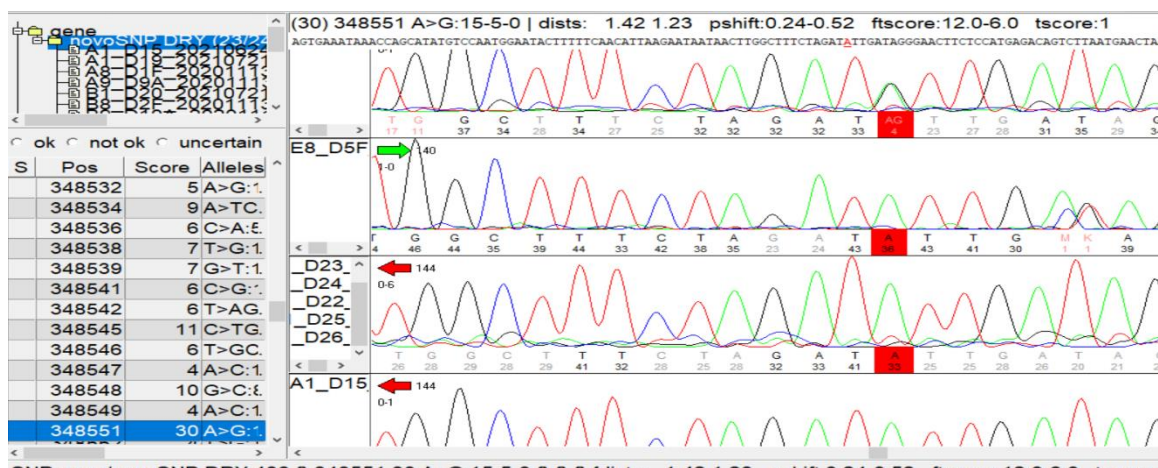
Εικόνα 3.2 Αντιπροσωπευτική εικόνα ηλεκτροφόρησης για τμήμα του γενετικού τύπου SYN3/TIMP3 σε ασθενείς με ΗΕΩΚ υγρής μορφής, σε πήκτωμα αγαρόζης

3.2 Sanger Αλληλούχιση

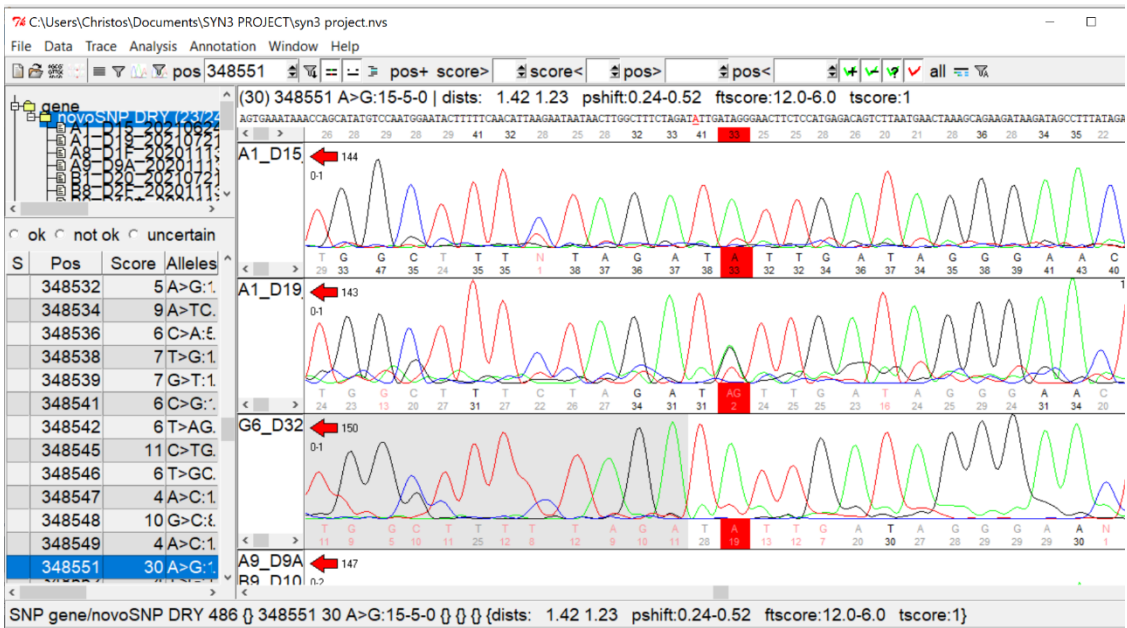
Η ορθότητα των αποτελεσμάτων κατοχυρώνεται από τη χρήση του DNA Sequencing που είναι η καθαυτή μέθοδος αναφοράς. Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε για όλα τα δείγματα και τα αποτελέσματα παρατίθενται στη συνέχεια. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα NonoSNP. Αφού εισήχθη στο πρόγραμμα η αλληλουχία αναφοράς από το NCBI, προστέθηκαν τα αποτελέσματα από το μηχάνημα. Στις εικόνες 3.3-3.7 απεικονίζονται αντιπροσωπευτικά ηλεκτρογραφήματα σε δείγματα ασθενών με ΗΕΩ ξηρής μορφής ενώ στις εικόνες 3.8-3.13 παρουσιάζονται ηλεκτρογραφήματα που προέκυψαν μετά την DNA αλληλούχιση σε δείγματα ασθενών που πάσχουν από την υγρή μορφή της νόσου.



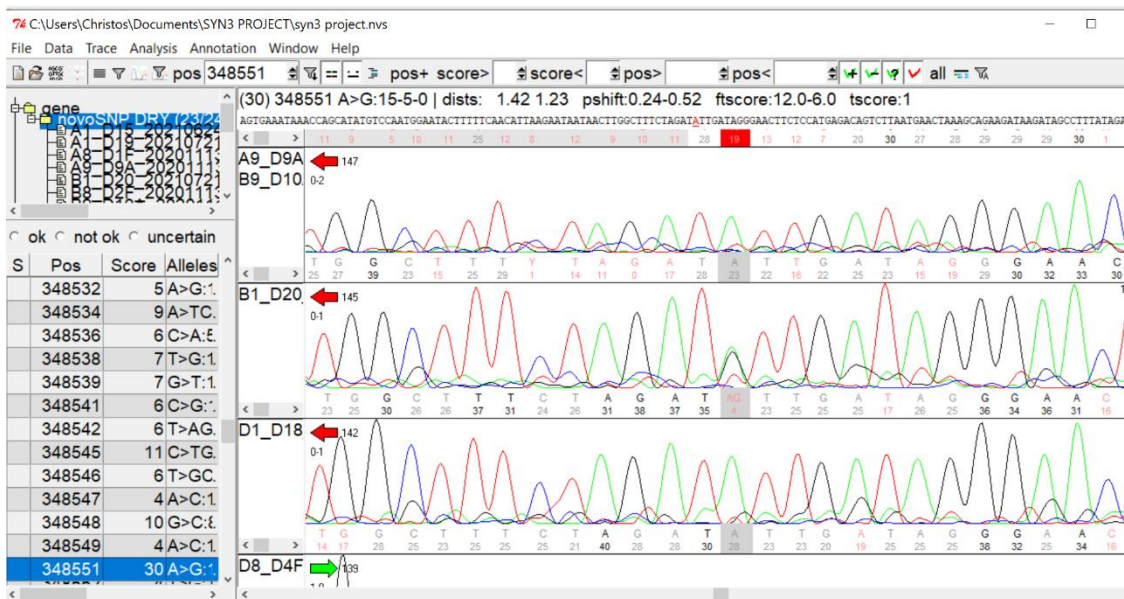
Εικόνα 3.3 Από πάνω προς τα κάτω παρουσιάζονται τα ηλεκτρογραφήματα της αλληλουχίας αναφοράς, του δείγματος D2, D3 με χρήση του πρόσθιου εκκινητή και D17 με χρήση του ανάστροφου εκκινητή



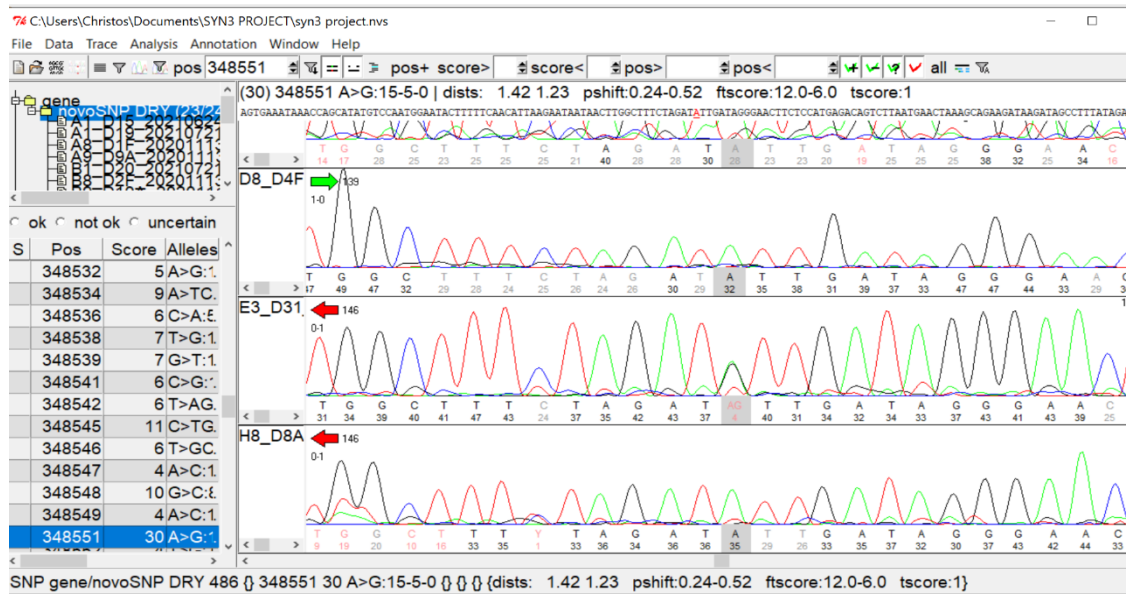
Εικόνα 3.4 Ηλεκτροφόρημα DNA sequencing για τα δείγματα D5 με πρόσθιο εκκινητή και τα δείγματα D23, D22, D24, D25 και D26 με ανάστροφο εκκινητή



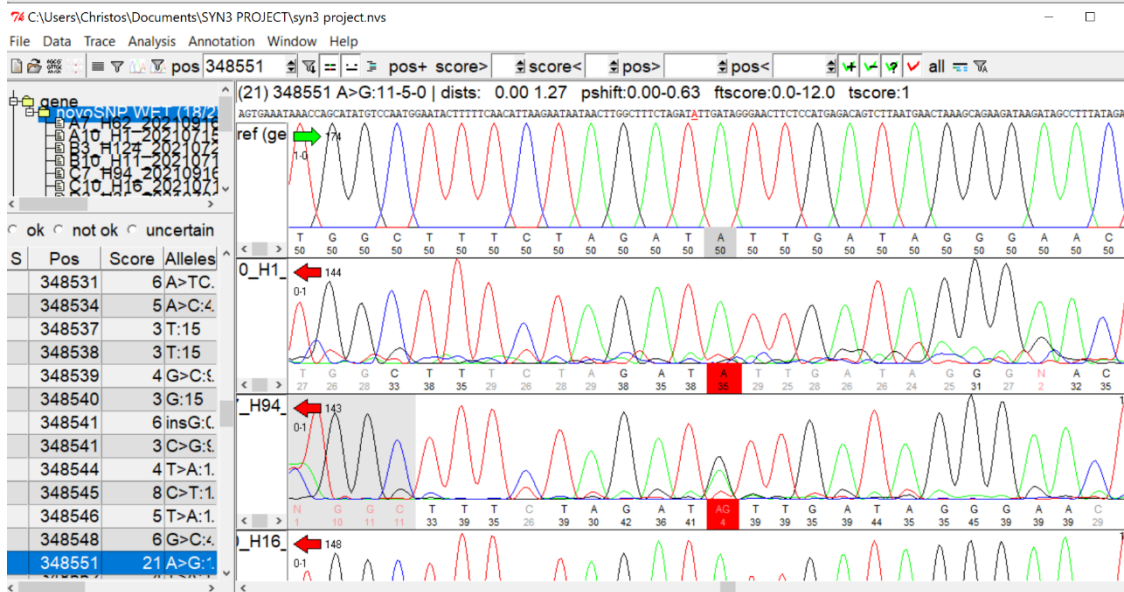
Εικόνα 3.5 Ηλεκτροφόρημα DNA sequencing για τα δείγματα D15, D19 και D32 με ανάστροφο εκκινητή



Εικόνα 3.6 Ηλεκτροφόρημα DNA sequencing για τα δείγματα D9, D10, D20 και D18 με ανάστροφο εκκινητή



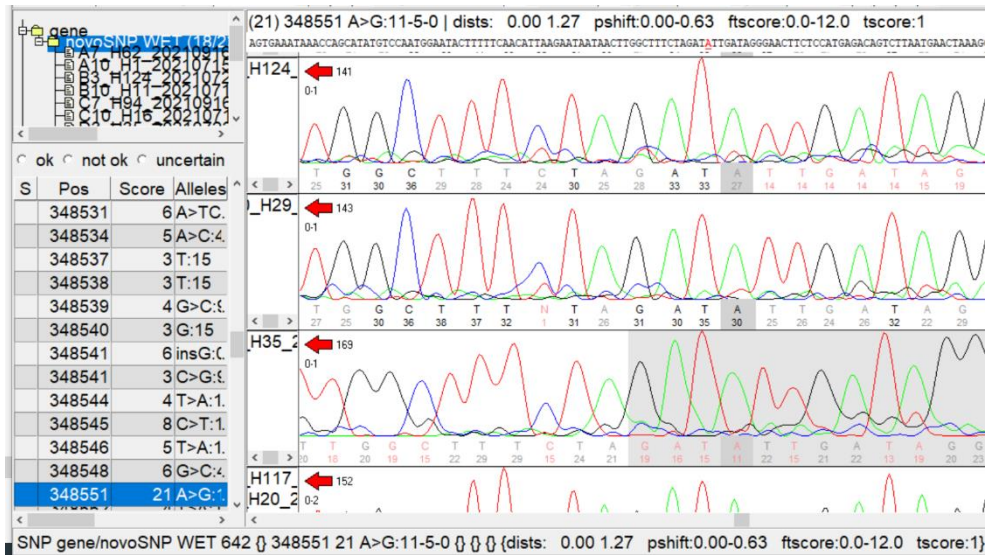
Εικόνα 3.7 Ηλεκτροφόρημα DNA sequencing για τα δείγματα D4 με πρόσθιο εκκινήτη και D31 και D8 με ανάστροφο εκκινήτη



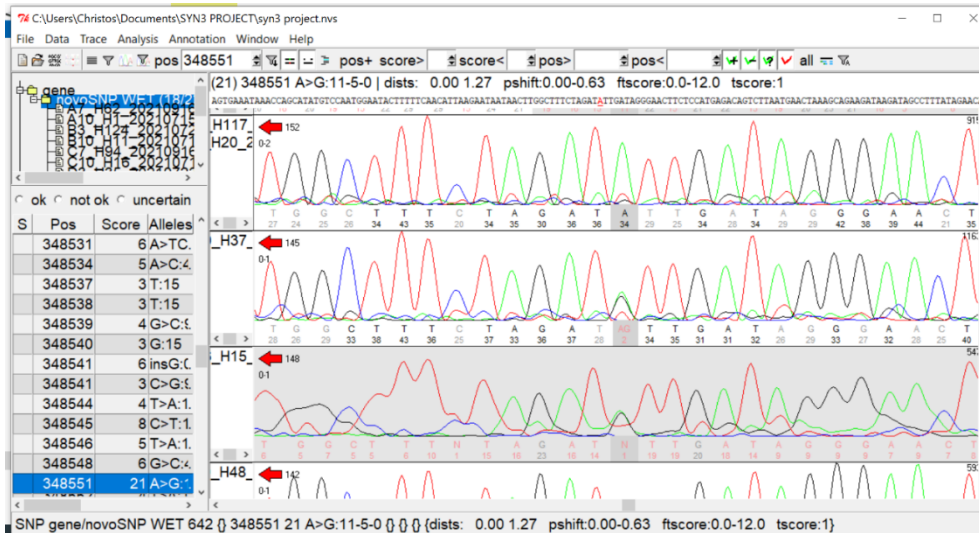
Εικόνα 3.8 Από πάνω προς τα κάτω παρουσιάζονται τα ηλεκτρογραφήματα της αλληλουχίας αναφοράς, του δείγματος H1 και H94 με ανάστροφο εκκινήτη



Εικόνα 3.9 Ηλεκτροφόρημα DNA sequencing για τα δείγματα H16 και H62 με ανάστροφο εκκινήτη



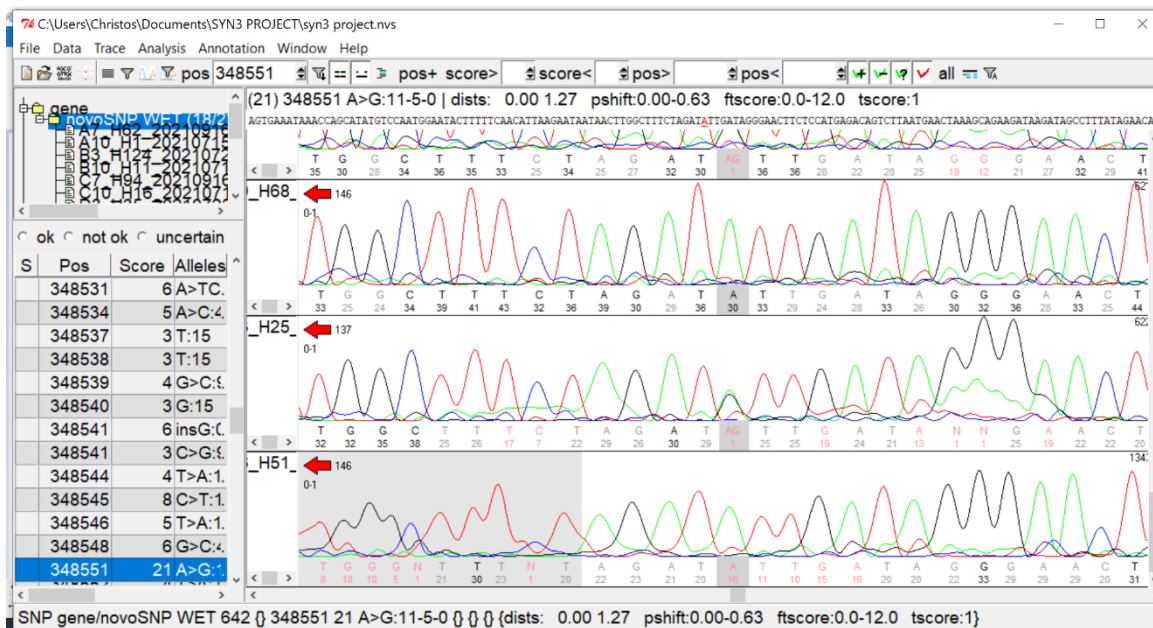
Εικόνα 3.10 Ηλεκτροφόρημα DNA sequencing για τα δείγματα H124, H29 και H35 με ανάστροφο εκκινητή



Εικόνα 3.11 Ηλεκτροφόρημα DNA sequencing για τα δείγματα H117, H20, H37 και H15 με ανάστροφο εκκινητή



Εικόνα 3.12 Ηλεκτροφόρημα DNA sequencing για τα δείγματα H48, H33 και H53 με ανάστροφο εκκινητή



Εικόνα 3.13 Ηλεκτροφόρημα DNA sequencing για τα δείγματα H68, H25 και H51 με ανάστροφο εκκινητή

Από την ανάλυση των ηλεκτρογραφημάτων που προέκυψαν από τη γονοτύπηση του DNA όλων των συμμετεχόντων ασθενών, προέκυψαν οι Πίνακες 3.1 και 3.2 όπου παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα για τους ασθενείς με ΗΕΩ ξηρής και υγρής μορφής αντίστοιχα.

Πίνακας 3.1 Αποτελέσματα γονοτύπησης rs5754227 *SYN3/TIMP3* για την ομάδα των ασθενών με ξηράς μορφής ΗΕΩΚ

Δείγμα ΗΕΩΚ ξηρής μορφής	Όνομα	Ηλικία	Φύλο	Γονότυπος <i>SYN3/TIMP3</i>	Ερμηνεία
D1	Σ.Κ.	79	M	A/A	WT
D2	Χ.Φ.	78	F	A/G	HETERO
D3	Β.Α.	75	F	A/A	WT
D4	Π.Α.	76	F	A/A	WT
D5	Δ.Α.	63	F	A/A	WT
D8	Κ.Α.	73	F	A/A	WT
D9	Ζ.Σ.	68	M	A/A	WT
D10	Α.Ι.	71	M	A/A	WT
D15	Μ.Α.	63	F	A/A	WT
D17	Χ.Α.	78	F	A/G	HETERO
D18	Φ.Ο.	80	F	A/A	WT
D19	Μ.Α.	67	F	A/G	HETERO
D20	Μ.Φ.	85	F	A/G	HETERO
D21	Κ.Σ.	80	F	A/A	WT
D22	Κ.Η.	80	M	A/A	WT
D23	Ζ.Γ.	85	M	A/A	WT
D24	Γ.Χ.	80	F	A/A	WT
D25	Ν.Σ.	80	F	A/A	WT
D26	Σ.Κ.	78	F	A/A	WT
D31	Π.Θ.	71	F	A/G	HETERO
D32	Π.Χ.	77	M	A/A	WT

Πίνακας 3.2 Αποτελέσματα γονοτύπησης rs5754227 *SYN3/TIMP3* για την ομάδα των ασθενών με υγρής μορφής ΗΕΩΚ

Δείγμα ΗΕΩΚ υγρής μορφής	Όνομα	Ηλικία	Φύλο	Γονότυπος <i>SYN3/TIMP3</i>	Ερμηνεία
H1	M.Σ.	79	M	A/A	WT
H16	T.Φ.	78	F	A/A	WT
H10	B.A.	75	F	A/A	WT
H62	M.A.	76	F	A/A	WT
H11	K.A.	82	M	A/A	WT
H29	Z.I	68	M	A/A	WT
H37	T.Γ.	71	M	A/G	HETERO
H48	Δ.Z.	68	F	A/G	HETERO
H94	Π.Γ.	80	F	A/G	HETERO
H15	A.M.	85	F	A/G	HETERO
H124	Γ.A.	80	F	A/A	WT
H33	Π.Π	80	M	A/A	WT
H35	M.K.	85	M	A/A	WT
H20	Σ.A.	81	F	A/A	WT
H51	Σ.M.	78	F	A/A	WT
H25	N.E.	71	F	A/G	HETERO
H117	Χ.K.	77	M	A/A	WT
H93	Z.M.	67	F	A/A	WT
H53	K.E.	79	F	A/G	HETERO

3.3 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων περιλαμβάνει τον αρχικό έλεγχο εάν οι δύο υποομάδες ασθενών είναι παρόμοιες αναφορικά με την ηλικία και το φύλο και στη συνέχεια την ανάλυση της συσχέτισης της συχνότητας του γονοτύπου με την εμφάνιση της υγρής ή της ξηρής μορφής της ΗΕΩ.

Σύμφωνα με την περιγραφική στατιστική ανάλυση η μέση ηλικία των ασθενών που συμμετείχαν στην μελέτη ήταν 76,2 έτη με διάμεσο τα 78,0 έτη, ενώ η μέγιστη και η ελάχιστη ηλικία ήταν τα 85 και 63 έτη αντίστοιχα (Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.3 Περιγραφική στατιστική ηλικίας ασθενών

Ηλικία		
N	Valid	40
	Missing	0
Mean		76,18
Median		78,00
Std. Deviation		5,913
Minimum		63
Maximum		85

Για τον έλεγχο της κανονικότητας της κατανομής της ηλικίας πραγματοποιήθηκε το Kolmogorov-Smirnov Test οπότε προέκυψαν τα αποτελέσματα του πίνακα 3.4, σύμφωνα με τα οποία φαίνεται ότι η ηλικία δεν ακολουθεί κανονική κατανομή ($p=0,05$) εάν εξετασθεί το σύνολο των ασθενών ωστόσο σε κάθε ξεχωριστή ομάδα η κατανομή των ηλικιών είναι κανονική (πίνακας 3.4B).

Πίνακας 3.4 A και B Κανονικότητα κατανομής της ηλικίας στο σύνολο ή στους δύο υποπληθυσμούς των ασθενών

A. One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		AGE
N		40
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	76,18
	Std. Deviation	5,913
Most Extreme Differences	Absolute	,171
	Positive	,109
	Negative	-,171
Test Statistic		,171
Asymp. Sig. (2-tailed)		,005 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

B. Independent-Samples Kolmogorov-Smirnov Test AGE across STATUS

Independent-Samples Kolmogorov-Smirnov Test Summary

Total N		40
Most Extreme Differences	Absolute	,115
	Positive	,115
	Negative	,000
Test Statistic		,364
Asymptotic Sig.(2-sided test)		,999

Ακολούθως ελέγχθηκε η κατανομή της ηλικίας στις δύο ομάδες εφαρμόζοντας είτε με το παραμετρικό t-test είτε με το μη-παραμετρικό το Mann-Whitney U Test (Πίνακας 3.5, Εικόνα 3.14).

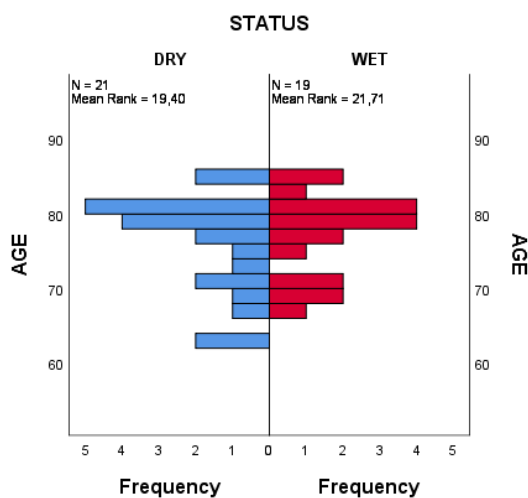
Πίνακας 3.5 Αποτελέσματα σύγκρισης μέσου όρου ή διαμέσου ηλικιών στις δύο ομάδες ασθενών

		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
AGE	Equal variances assumed	,421	,520	-.674	38	,504	1,886	-5,088	2,546
	Equal variances not assumed			-.679	37,943	,501	1,872	-5,061	2,519

Independent-Samples Mann-Whitney U Test Summary

Total N	40
Mann-Whitney U	222,500
Wilcoxon W	412,500
Test Statistic	222,500
Standard Error	36,684
Standardized Test Statistic	,627
Asymptotic Sig.(2-sided test)	,531
Exact Sig.(2-sided test)	,537

Independent-Samples Mann-Whitney U Test



Εικόνα 3.14 Εμφάνιση της υγρής και ξηρής ΗΕΩ σε συνάρτηση με την ηλικία

Και με τα δύο τεστ, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορετική κατανομή της ηλικίας στις δύο ομάδες των ασθενών ($p=0,5$).

Στο σύνολο των 40 ασθενών, παρατηρήθηκε ότι η ξηρή ΗΕΩ έχει λίγο μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης (52.5%) σε σχέση με την υγρή ΗΕΩ (47.5%), χωρίς ωστόσο η διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική ($P>0,5$).

Στη συνέχεια εφαρμόζοντας τη διαδικασία χ^2 διερευνήθηκε εάν διαφέρει το ποσοστό του φύλου στις δύο ομάδες υγρής και ξηρής ΗΕΩ (Πίνακας 3.6).

Πίνακας 3.6 Συσχέτιση της μορφής της ΗΕΩ με το φύλο

		STATUS		Total	
		DRY	WET		
SEX	FEM	Count	15	12	27
		% within SEX	55,6%	44,4%	100,0%
		% within STATUS	71,4%	63,2%	67,5%
	MALE	Count	6	7	13
		% within SEX	46,2%	53,8%	100,0%
		% within STATUS	28,6%	36,8%	32,5%
Total	Count	21	19	40	
	% within SEX	52,5%	47,5%	100,0%	
	% within STATUS	100,0%	100,0%	100,0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,311 ^a	1	,577		
Continuity Correction ^b	,048	1	,826		
Likelihood Ratio	,311	1	,577		
Fisher's Exact Test				,738	,413
Linear-by-Linear Association	,303	1	,582		
N of Valid Cases	40				

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν αρχικά ότι στο σύνολο των 27 γυναικών ασθενών οι 15 (55.6%) εμφάνιζαν την ξηρή μορφή της νόσου και οι 12 (44,4%) την υγρή ΗΕΩ. Παρόμοια ποσοστά προέκυψαν και όταν μελετήθηκε η κατανομή της μορφής της ΗΕΩ στους 13

άνδρες ασθενείς που συμμετείχαν στην μελέτη, χωρίς ωστόσο να παρατηρηθούν υψηλά επίπεδα σημαντικότητας. Πιο συγκεκριμένα, 6 (46.2%) από αυτούς έπασχαν από ξηρή HEΩ και οι υπόλοιποι 7 (53.8%) από υγρή HEΩ. Ωστόσο η παρατηρούμενη διαφορά στα ποσοστά εμφάνισης των δύο μορφών της HEΩ δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,577$).

Στη συνέχεια αναλύθηκε η συχνότητα εμφάνισης του εξεταζόμενου πολυμορφισμού rs5754227 *SYN3/TIMP3* στις δύο μορφές της HEΩ (Πίνακας 3.7).

Από τη συγκεκριμένη ανάλυση προέκυψε ότι στο σύνολο των ασθενών το πιο συχνό αλληλίο ήταν το A με ποσοστό εμφάνισης 86% και το υπόλοιπο ήταν G (14%) ενώ ο πιο συχνός γονότυπος ήταν ο A/A με ποσοστό εμφάνισης 72%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για το γονότυπο ήταν A/G ήταν 28%.

Σε ότι αφορά τα ποσοστά εμφάνισης των A και G αλληλίων στην ομάδα ασθενών με ξηρή HEΩ ήταν 88% και 12% αντίστοιχα ενώ στην ομάδα ασθενών με υγρή HEΩ τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 84% και 16%. Σε ότι αφορά τα ποσοστά εμφάνισης των A/A και A/G γονοτύπων στην ομάδα ασθενών με ξηρή HEΩ ήταν 76% και 24% αντίστοιχα ενώ στην ομάδα ασθενών με υγρή HEΩ τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 68% και 32%. Παρατηρείται λοιπόν αρχικά ότι σε όλες τις εξεταζόμενες περιπτώσεις ο πιο συχνός γονότυπος είναι το A/A. Η κατανομή των γονοτύπων ακολουθεί την κατανομή κατά Hardy-Weinberg ($p>0,05$) συνεπώς η γονοτύπωση είναι έγκυρη.

Πίνακας 3.7 Συχνότητα εμφάνισης των A/A και A/G αλληλομόρφων στους ασθενείς με HEΩ

SYN3 allele frequencies (n=40)						
	All subjects		Status=0		Status=1	
Allele	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
A	69	0.86	37	0.88	32	0.84
G	11	0.14	5	0.12	6	0.16

SYN3 genotype frequencies (n=40)						
	All subjects		Status=0		Status=1	
Genotype	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
A/A	29	0.72	16	0.76	13	0.68
A/G	11	0.28	5	0.24	6	0.32

SYN3 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=40)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	29	11	0	69	11	1
Status=0	16	5	0	37	5	1
Status=1	13	6	0	32	6	1

Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα συνάδουν με τα αντίστοιχα της μελέτης των Fritsche et al¹²⁷, σύμφωνα με τα οποία αφενός το αλληλίο A είναι το πιο συχνό στους Ευρωπαίους που ανήκουν στη Καυκάσια φυλή (Εικόνα 3.15, εδώ αναφέρεται η άλλη αλυσίδα του DNA συνεπώς στο αλληλίο A αντιστοιχεί το T και στο αλληλίο G το C). Ωστόσο αυτό δεν ισχύει σε άλλους πληθυσμούς όπου η συχνότητα του αλληλίου G είναι σημαντικά μεγαλύτερη και φθάνει έως και το 44% (C στην άλλη αλυσίδα, Πίνακας 3.8).

Διαφέρουν όμως στην κατανομή μεταξύ των ομάδων της ξηράς και της υγρής μορφής σε σχέση με τα αντίστοιχα της μελέτης των Fritsche et al¹²⁷, σύμφωνα με τα οποία στην υγρή μορφή υπάρχουν τα μικρότερα ποσοστά του ελάσσονος αλληλίου G (C στην Εικόνα 3.15) περίπου 11%, 12% στην ξηρά μορφή, 14% στους υγιείς (στη δική μας μελέτη αντίστοιχα 16% και 12%).

Locus Name	Lead variant	Major/minor allele	MAF			CNV vs Co. ^a		GA vs. Co. ^b		CNV vs GA ^c
			CNV	GA	Co	OR	P	OR	P	P _{diff}
CFH	rs10922109	C/A	0.228	0.217	0.426	0.39	4.6x10 ⁻⁴⁵⁷	0.37	3.7x10 ⁻²²⁰	0.22
COL4A3	rs11884770	C/T	0.258	0.262	0.278	0.90	2.6 x 10 ⁻⁷	0.93	1.9 x 10 ⁻²	0.26
ADAMTS9-AS2	rs62247658	T/C	0.469	0.450	0.433	1.14	4.5 x 10 ⁻¹²	1.09	2.1 x 10 ⁻³	0.12
COL8A1	rs140647181	T/C	0.023	0.019	0.016	1.64	7.2 x 10 ⁻¹¹	1.32	2.0 x 10 ⁻²	0.052
CFI	rs10033900	C/T	0.508	0.508	0.477	1.14	7.1 x 10 ⁻¹²	1.13	7.2 x 10 ⁻⁶	0.84
C9	rs62358361	G/T	0.016	0.015	0.009	1.73	3.1 x 10 ⁻¹⁰	2.06	1.2 x 10 ⁻⁹	0.10
SPEF2	rs114092250	G/A	0.015	0.018	0.022	0.69	6.8 x 10 ⁻⁷	0.66	2.2 x 10 ⁻⁴	0.76
C2/CFB/SKIV2L	rs116503776	G/A	0.092	0.092	0.148	0.59	1.4 x 10 ⁻⁷²	0.58	5.9 x 10 ⁻³⁴	0.90
VEGFA	rs943080	T/C	0.465	0.463	0.497	0.88	2.0 x 10 ⁻¹¹	0.87	7.0 x 10 ⁻⁷	0.65
KMT2E/SRPK2	rs1142	C/T	0.211	0.207	0.346	1.13	1.4 x 10 ⁻⁹	1.07	2.2 x 10 ⁻²	0.12
PILRB/PILRA	rs7803454	C/T	0.373	0.362	0.190	1.14	4.1 x 10 ⁻³	1.11	1.8 x 10 ⁻³	0.62
TNFRSF10A	rs79037040	T/G	0.449	0.459	0.479	0.89	1.8 x 10 ⁻⁹	0.92	2.0 x 10 ⁻³	0.39
TRPM3	rs71507014	GC/G	0.429	0.421	0.405	1.11	8.3 x 10 ⁻⁸	1.07	1.8 x 10 ⁻²	0.29
MIR6130/RORB	rs10781182	G/T	0.330	0.319	0.306	1.12	5.5 x 10 ⁻⁸	1.07	2.5 x 10 ⁻²	0.19
TGFBF1	rs1626340	G/A	0.187	0.199	0.209	0.87	1.7 x 10 ⁻⁹	0.94	5.4 x 10 ⁻²	0.037
ABCA1	rs2740488	A/C	0.257	0.252	0.275	0.90	2.4 x 10 ⁻⁶	0.89	1.9 x 10 ⁻⁴	0.58
ARHGAP21	rs12357257	G/A	0.244	0.239	0.223	1.12	3.4 x 10 ⁻⁷	1.11	2.4 x 10 ⁻³	0.71
ARMS2/HTRA1	rs3750846	T/C	0.447	0.384	0.208	2.95	3.1x10⁻⁶³²	2.33	3.6x10⁻¹⁷³	1.0 x 10⁻¹⁷
RDH5/CD63	rs3138141	C/A	0.221	0.223	0.207	1.16	5.2 x 10 ⁻⁷	1.16	4.1 x 10 ⁻⁴	0.88
ACAD10	rs61941274	G/A	0.024	0.023	0.018	1.57	2.3 x 10 ⁻⁹	1.42	1.8 x 10 ⁻³	0.35
B3GALT1	rs9564692	C/T	0.279	0.267	0.299	0.90	2.5 x 10 ⁻⁷	0.86	2.1 x 10 ⁻⁶	0.23
RAD51B	rs61985136	T/C	0.361	0.361	0.384	0.89	1.0 x 10 ⁻⁸	0.91	1.8 x 10 ⁻³	0.37
LIPC	rs2043085	T/C	0.353	0.356	0.381	0.87	2.7 x 10 ⁻¹²	0.89	2.7 x 10 ⁻⁶	0.54
CETP	rs5817082	C/CA	0.228	0.250	0.264	0.82	6.0 x 10⁻¹⁹	0.93	2.3 x 10⁻²	3.2 x 10⁻⁴
CTRB2/CTRB1	rs72802342	C/A	0.065	0.071	0.080	0.77	1.3 x 10 ⁻¹¹	0.85	4.4 x 10 ⁻³	0.083
TMEM97/VTN	rs11080055	C/A	0.459	0.472	0.486	0.90	8.8 x 10 ⁻⁹	0.94	3.3 x 10 ⁻²	0.099
NPLOC4/TSPAN10	rs6565597	C/T	0.404	0.385	0.381	1.15	2.1 x 10 ⁻¹¹	1.05	0.10	0.0080
C3	rs2230199	C/G	0.465	0.453	0.208	1.39	7.3 x 10 ⁻⁴⁷	1.53	7.2 x 10 ⁻³⁷	0.0047
CNN2	rs67538026	C/T	0.262	0.279	0.498	0.91	7.3 x 10 ⁻⁶	0.90	8.2 x 10 ⁻⁴	0.74
APOE	rs429358	T/C	0.102	0.099	0.135	0.73	7.2 x 10 ⁻²⁶	0.69	2.4 x 10 ⁻¹⁰	0.38
MMP9	rs142450006	TTTTC	0.116	0.144	0.141	0.78	8.4 x 10⁻¹⁷	1.04	0.39	4.1 x 10⁻¹⁰
C20orf85	rs201459901	T/T	0.054	0.057	0.070	0.74	2.5 x 10 ⁻¹⁴	0.82	5.4 x 10 ⁻⁴	0.12
SYN3/TIMP3	rs5754227	T/C	0.106	0.121	0.137	0.75	2.5 x 10⁻²⁴	0.88	3.4 x 10⁻³	3.8 x 10⁻⁴
SLC16A8	rs8135665	C/T	0.216	0.217	0.195	1.13	5.1 x 10 ⁻²	1.14	9.3 x 10 ⁻²	0.87

MAF = minor allele frequency, Co = control subjects; ^a Association in CNV versus controls; ^b Association in GA versus controls; ^c Association in CNV versus GA

Εικόνα 3.15 Συχνότητα εμφάνισης του A/G αλληλίου rs5754227 SYN3/TIMP3 (στο σχήμα T/C στην άλλη αλυσίδα του DNA) σε ασθενείς με υγρή HEΩ (CNV), με ξηρή HEΩ (GA) και υγιείς μάρτυρες (Controls) και OR των ασθενών με υγρή HEΩ (CNV) σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου, των ασθενών με ξηρή HEΩ (GA) σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου και των ασθενών με υγρή HEΩ σε σχέση με τους ασθενείς με ξηρή HEΩ όπου παρατηρείται στατιστική σημαντικότητα¹²⁷

Πίνακας 3.8 Συχνότητα εμφάνισης των αλληλίων του πολυμορφισμού rs5754227 σε διάφορους πληθυσμούς (από τη βάση δεδομένων dbSNP)

Position: chr22:32709831 (GRCh38.p13) SNV: rs5754227 (T>C)		
Variation Type	Frequency	Study
C	0.303412	80310/264690, TOPMED
C	0.267097	37346/139822, GnomAD
C	0.44091	34695/78690, PAGE_STUDY
C	0.21349	4195/19650, ALFA
T	0.34212	5734/16760, 8.3KJPN
C	0.3744	1875/5008, 1000G
C	0.1187	532/4480, Estonian
C	0.1243	479/3854, ALSPAC
C	0.1332	494/3708, TWINSUK
T	0.3287	963/2930, KOREAN
T	0.3221	590/1832, Korea1K
C	0.150	150/998, GoNL
C	0.112	67/600, NorthernSweden
C	0.442	145/328, HapMap
T	0.335	93/278, SGDP_PRJ
C	0.259	56/216, Qatari
T	0.368	78/212, Vietnamese
C	0.20	8/40, GENOME_DK
T	0.43	12/28, Siberian

Τέλος πραγματοποιήθηκε ανάλυση κινδύνου προκειμένου να εκτιμηθεί ποιο αλληλόμορφο συνδέεται με μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της υγρής μορφής της ΗΕΩ. Σύμφωνα με αυτήν την ανάλυση, ο γονότυπος A/G φαίνεται να αυξάνεται από 24% στη ξηρά σε 32% στην υγρή ωστόσο η πιθανότητα αυτός ο γονότυπος να αποτελεί κίνδυνο για ανάπτυξη της υγρής μορφής έχει OR=1.77 (95% CI 0.40-7.81) με διαστήματα εμπιστοσύνης που περιλαμβάνουν το 1 συνεπώς δεν είναι στατιστικά σημαντικός (P=0.45). Ο έλεγχος συμπεριέλαβε επίσης και τη μεταβλητή του φύλου, όπου δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των δύο φύλων αναφορικά με την ύπαρξη ή όχι πολυμορφισμού (Πίνακας 3.9).

Πίνακας 3.9 Ανάλυση κινδύνου για τον εξεταζόμενο πολυμορφισμό σε σχέση με την ΗΕΩ

SYN3 association with response Status (n=40, adjusted by Sex)

Model	Genotype	Status=DRY	Status=WET	OR (95% CI)	P-value
---	A/A	16 (76.2%)	13 (68.4%)	1.00	0.45
---	A/G	5 (23.8%)	6 (31.6%)	1.77 0.40-7.81)	

Interaction analysis with covariate Sex

SYN3 and Sex cross-classification interaction table (n=40, crude analysis)

	F			M		
	Status=0	Status=1	OR (95% CI)	Status=0	Status=1	OR (95% CI)
A/A	10	7	1.00	6	6	1.43 (0.32-6.32)
A/G	5	5	1.43 (0.30-6.88)	0	1	---

Interaction p-value: 0.34

Sex within SYN3 (n=40, crude analysis)

		Status=0	Status=1	OR (95% CI)
A/A	F	10	7	1.00
	M	6	6	1.43 (0.32-6.32)
		Status=0	Status=1	OR (95% CI)
A/G	F	5	5	1.00
	M	0	1	---

Test for interaction in the trend: 0.34

SYN3 within Sex (n=40, crude analysis)

		Status=0	Status=1	OR (95% CI)
F	A/A	10	7	1.00
	A/G	5	5	1.43 (0.30-6.88)
		Status=0	Status=1	OR (95% CI)
M	A/A	6	6	1.00
	A/G	0	1	---

Test for interaction in the trend: 0.34

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ΗΕΩ αποτελεί μια νευροεκφυλιστική νόσο του οφθαλμού με αυξημένα ποσοστά επιπολασμού αλλά και με κληρονομικό υπόβαθρο. Βασικό χαρακτηριστικό της νόσου αποτελεί η παρουσία των λεγόμενων drusen που αποτελούν μικρές εναποθέσεις εντοπισμένες κάτω από το ΜΕ. Ο πυρήνας του παθογενετικού μηχανισμού της ΗΕΩ περιλαμβάνει τον σχηματισμό συσσωματωμάτων που αποτελούνται από λιπίδια, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες, τα οποία συμβάλλουν στην εκφύλιση των φωτοϋποδοχέων και στη νεοαγγείωση του χοριοειδούς χιτώνα, η οποία με τη σειρά της επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τη δομή και τη λειτουργικότητα της ωχράς κηλίδας και συνεπώς την κεντρική όραση. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι ακόμα παραμένουν άγνωστες πολλές πτυχές του παθογενετικού μηχανισμού της ΗΕΩ και ασφαλώς δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί η γενεσιουργός αιτία της συγκεκριμένης νόσου, αποτελώντας έτσι ένα αντικείμενο μελέτης ιδιαίτερου ενδιαφέροντος το οποίο στοχεύει στην κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών με απώτερο σκοπό την αξιοποίηση αυτών των γνώσεων στην αναγνώριση μορίων-βιοδεικτών για την αποτελεσματική διαχείριση των ασθενών με ΗΕΩ¹²⁸. Πληθώρα πειραματικών δεδομένων υποστηρίζουν τη συμμετοχή του ανοσοποιητικού συστήματος, του μεταβολισμού των λιπιδίων, του οξειδωτικού στρες αλλά και των περιβαλλοντικών παραγόντων στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.) η ΗΕΩ παραμένει η πρώτη αιτία μη αναστρέψιμης τύφλωσης σε παγκόσμιο επίπεδο, αποτελώντας έτσι ένα σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας με αξιοσημείωτες κοινωνικοοικονομικές συνέπειες. Στο τελευταίο συμβάλλουν ο σοβαρός βαθμός αναπηρίας που συνοδεύει την νόσο, η έλλειψη αποτελεσματικής θεραπείας για την ξηρή ΗΕΩ καθώς και το υψηλό κόστος θεραπείας της υγρής μορφής. Έχοντας αυτά ως δεδομένα η αναγνώριση δεικτών που θα συμβάλλουν στην έγκαιρη διάγνωση της ασθένειας αλλά και νέων αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων ικανών να περιορίσουν στο ελάχιστο την υποβάθμιση της ποιότητας ζωής και λειτουργικότητας αυτών των ασθενών ασφαλώς αποτελεί μονόδρομο. Η ανάπτυξη της επιστήμης της γενετικής, διευκολύνει την αναγνώριση εμπλεκόμενων, στους παθογενετικούς μηχανισμούς, γενετικών πολυμορφισμών, οι οποίοι αποτελούν εν δυνάμει μελλοντικούς δείκτες προδιάθεσης στην εμφάνιση της ασθένειας ικανοί να προσδιορίσουν ομάδες αυξημένου κινδύνου εμφάνισης της ασθένειας που χρήζουν τακτικής παρακολούθησης ως ένα μέτρο έγκαιρης διάγνωσης στα αρχικά στάδια. Επιπλέον, η αναγνώριση τέτοιων πολυμορφισμών αναμένεται να συμβάλλει στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων, η εφαρμογή των οποίων θα βασίζεται στο γενετικό προφίλ του εκάστοτε ασθενή, βάζοντας έτσι τις βάσεις για την εξατομικευμένη θεραπεία της ΗΕΩ και ασφαλώς για την αποτελεσματικότερη και με λιγότερες παρενέργειες θεραπεία αυτών των ασθενών.

Βάσει των παραπάνω δεδομένων σχεδιάστηκε και πραγματοποιήθηκε η παρούσα ερευνητική εργασία με σκοπό τη μελέτη της κατανομής και της κλινικής αξίας του πολυμορφισμού rs5754227 σε ασθενείς με ΗΕΩ ξηράς και υγρής μορφής. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός εντοπίζεται στη γενετική θέση chr22:32709831 (GRCh38.p13), όπου εδράζονται τα γονίδια *TIMP3/SYN3*.

Το *TIMP-3* βρίσκεται εντός ενός εσωνίου του γονιδίου *SYN3*, ένα χαρακτηριστικό που διακρίνει και δύο ακόμα μέλη αυτής της οικογένειας, των *TIMP-1* και *TIMP-4* τα οποία εντοπίζονται εντός ενός ιντρονίου των *SYN1* και *SYN2* αντίστοιχα¹¹⁸. Η γονιδιακή οικογένεια *TIMP* κωδικοποιεί πρωτεΐνες που εκφράζονται σε όλο το σώμα και ο ρόλος τους συνίσταται στην αναστρέψιμη αναστολή της δράσης ενζύμων που ανήκουν στην οικογένεια των MMPs. Τα τελευταία χρόνια έχει προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον η μελέτη της σχέσης των γονιδίων *TIMP3/SYN3* με την ΗΕΩ και τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν ότι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί των συγκεκριμένων γονιδίων συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου¹²⁷. Συγκεκριμένα οι Fritsche et al. αναφέρουν ότι εννέα σπάνιοι πολυμορφισμοί του *TIMP3* αθροιστικά σχετίζονται με 30 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της ΗΕΩ¹²⁷. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι αλλαγές στη σύνθεση και/ή στη λειτουργία της *TIMP-3* μπορούν να επάγουν αλλαγές οι οποίες συνδέονται με την εμφάνιση της ΗΕΩ. Για παράδειγμα αυξημένα επίπεδα της *TIMP-3* σε ασθενείς με ΗΕΩ φαίνεται να προκαλούν λέπτυνση της μεμβράνης του Bruch¹²¹, ενώ η μελέτη γονιδιακών υπογραφών στον αμφιβληστροειδή συγκαταλέγει το *TIMP-3* στα υποψήφια γονίδια που εμπλέκονται στην ΗΕΩ^{122,127}. Επίσης πολλές ανεξάρτητες μελέτες υπογραμμίζουν την ύπαρξη συνεργιστικής δράσης ανάμεσα σε κάποιους πολυμορφισμούς του *TIMP-3* και άλλους πολυμορφισμούς υψηλού κινδύνου στην καθυστερημένη ανάπτυξη της νόσου^{120,123,124}. Επιπλέον, φαίνεται ότι η *TIMP-3* εμποδίζει την VEGF-επαγόμενη αγγειογένεση¹²⁵, ενώ παράλληλα υποστηρίζεται ότι η αυξημένη έκφραση της *TIMP-3* μπορεί να εμποδίσει την αναδόμηση της ECM και να επηρεάσει επιπρόσθετες λειτουργίες, μεταξύ των οποίων η φλεγμονή και η αγγειογένεση στον γηράσκοντα αμφιβληστροειδή¹²⁶.

Για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης συλλέχθηκε ολικό αίμα από 40 διαγνωσμένους ασθενείς και συγκεκριμένα από 21 ασθενείς με ΗΕΩ ξηρής μορφής και 19 ασθενείς με ΗΕΩ υγρής μορφής. Η εξέταση των ασθενών πραγματοποιήθηκε από εξειδικευμένο οφθαλμίατρο και περιελάμβανε μέτρηση οπτικής οξύτητας και ενδοφθάλμιας πίεσης, βυθοσκόπηση, έλεγχο χειρουργημένου καταρράκτη. Παράλληλα έγινε πλήρη καταγραφή των κλινικοπαθολογικών δεδομένων των συμμετεχόντων στα οποία περιλαμβάνονται το οικογενειακό ιστορικό της νόσου, το ατομικό ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου και σακχαρώδη διαβήτη, καθώς και οι καπνιστικές τους συνήθειες. Μετά τη έγγραφη συναίνεση των ασθενών και τη συλλογή του αίματος τους

ακολούθησε απομόνωση του γενετικού υλικού και ενδεδειγμένος ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος του για την αξιολόγηση της καταλληλότητάς του για περαιτέρω χρήση στις πειραματικές διαδικασίες της παρούσας μελέτης. Ακολούθησε ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας μέσω συμβατικής PCR, και στη συνέχεια DNA αλληλούχιση κατά Sanger στον γενετικό αναλυτή SeqStudio (Thermo Applied Biosystem). Στη συνέχεια έγινε ανάλυση των αποτελεσμάτων με εργαλεία βιοπληροφορικής (Blast, Chromas, NovoSNP CLC Genomic Workbench) και ακολούθως στατιστική επεξεργασία των δεδομένων με χρήση των προγραμμάτων SPSS και SNPstats, για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη συσχέτιση των πειραματικών ευρημάτων με τα κλινικοπαθολογικά δεδομένα των ασθενών.

Στο σύνολο των 40 ασθενών, η ξηρή HEΩ είχε λίγο μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης (52.5%) σε σχέση με την υγρή HEΩ (47.5%), χωρίς ωστόσο η διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική ($P>0.5$).

Ακολούθως μελετήθηκε η κανονικότητα της κατανομής της ηλικίας με το Kolmogorov-Smirnov Test όπου ενώ στο σύνολο του ελεγχόμενου πληθυσμού δεν παρουσιάζει κανονική κατανομή, σε κάθε ξεχωριστή ομάδα αυτή είναι κανονική. Εφαρμόζοντας είτε το παραμετρικό t-test είτε το μη-παραμετρικό Mann-Whitney U Test αναφορικά με την ηλικία, προέκυψε ότι δεν παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες των ασθενών.

Εφαρμόζοντας χ^2 ελέγχθηκε η κατανομή (τα ποσοστά) του φύλου στις δύο ομάδες ασθενών με HEΩ και βρέθηκε να μην είναι στατιστικά σημαντική ($p=0,577$). Στη συνέχεια αφού ελέγχθηκε ότι οι δύο πληθυσμοί ασθενών στις δύο μορφές της HEΩ δεν διαφέρουν αναφορικά με την ηλικία και το φύλο αναλύθηκε η συχνότητα εμφάνισης του εξεταζόμενου πολυμορφισμού.

Από τη συγκεκριμένη ανάλυση προέκυψε ότι στο σύνολο των ασθενών το πιο συχνό αλληλίο ήταν το A με ποσοστό εμφάνισης 86% και το υπόλοιπο ήταν G (14%) ενώ ο πιο συχνός γονότυπος ήταν ο A/A με ποσοστό εμφάνισης 72%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για το γονότυπο ήταν A/G ήταν 28%.

Σε ότι αφορά τα ποσοστά εμφάνισης των A και G αλληλίων στην ομάδα ασθενών με ξηρή HEΩ ήταν 88% και 12% αντίστοιχα ενώ στην ομάδα ασθενών με υγρή HEΩ τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 84% και 16%. Σε ότι αφορά τα ποσοστά εμφάνισης των A/A και A/G γονοτύπων στην ομάδα ασθενών με ξηρή HEΩ ήταν 76% και 24% αντίστοιχα ενώ στην ομάδα ασθενών με υγρή HEΩ τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 68% και 32%. Παρατηρείται λοιπόν αρχικά ότι σε όλες τις εξεταζόμενες περιπτώσεις ο πιο συχνός γονότυπος είναι το A/A. Η κατανομή των γονοτύπων ακολουθεί την κατανομή κατά Hardy-Weinberg ($p>0,05$), συνεπώς η γονοτύπωση ήταν έγκυρη.

Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα της πρώτης αυτής μελέτης σε Έλληνες ασθενείς συνάδουν με τα αντίστοιχα της μελέτης των Fritsche et al¹²⁷, αναφορικά με το γεγονός ότι ο γονότυπος A/A είναι πιο συχνός στους Ευρωπαίους που ανήκουν στην Καυκάσια φυλή. Ωστόσο οι Fritsche et al. έδειξαν σε ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων (10.749 με υγρή μορφή, 3.235 ασθενείς με ξηρά μορφή και 17,832 υγιείς), ότι το ποσοστό του αλληλίου G (και ο γονότυπος A/G κατ' επέκταση) του rs5754227 εμφανίζεται σημαντικά μειωμένος στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς και ειδικά μπορεί να ξεχωρίσει με στατιστική σημαντικότητα τους ασθενείς με υγρή απ' αυτούς με ξηρά μορφή (πιο μεγάλη μείωση στους ασθενείς με υγρή HEΩ). Πιθανότατα ο πολυμορφισμός δρα στα επίπεδα έκφρασης TIMP3 που εδράζεται καθοδικά και μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι γενικά προστατευτικός έναντι της ανάπτυξης νόσου.

Στη δική μας μελέτη ο πληθυσμός με υγρή HEΩ είχε ελαφρά αυξημένα ποσοστά G αλληλίου ή γονοτύπου A/G που αντίκειται στη μελέτη των Fritsche et al. Σημαντικοί περιορισμοί ωστόσο αποτελούν ο μικρός αριθμός δειγμάτων και η απουσία υγιούς πληθυσμού. Επίσης οι συσχετισμοί με το νόσημα ή με την ανάπτυξη μιας συγκεκριμένης μορφής του νοσήματος μπορεί να ποικίλουν σημαντικά ανά διαφορετική εθνική ομάδα π.χ. στους Κορεάτες είναι σημαντικά υψηλότερη η συχνότητα του πολυμορφισμού, όπως κατέδειξε μια πρόσφατη μελέτη¹³⁰.

Λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων δεν έγινε περαιτέρω στατιστική ανάλυση αναφορικά με την ηλικία δηλαδή εάν π.χ. επηρεάζει ο πολυμορφισμός την ηλικία ανάπτυξης κάποιας μορφής HEΩ. Μία πρόσφατη εργασία όπου συμμετείχαν 14.539 ασθενείς με HEΩ, οι οποίοι κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με την ηλικία εμφάνισης της νόσου, και μελετήθηκαν αρκετοί πολυμορφισμοί γονιδίων που εμπλέκονται στην HEΩ αποκάλυψε ότι ο rs5754227 δεν επηρεάζει την ηλικία εμφάνισης της HEΩ¹²⁹. Από την άλλη πλευρά μία άλλη μελέτη έδειξε ότι ο rs5754227 περιλαμβάνεται μεταξύ των εξεταζόμενων SNPs που σχετίζονται με την εμφάνιση HEΩ σε μεγάλη ηλικία (late AMD)¹³⁰.

Η συγκεκριμένη εργασία είναι μία πρώτη προσπάθεια διερεύνησης της συσχέτισης του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με την ανάπτυξη κάποιας από τις δύο μορφές HEΩ στον Ελληνικό πληθυσμό και ασφαλώς θα είχε ενδιαφέρον η επέκταση αυτής της μελέτης σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με HEΩ καθώς επίσης και επιπλέον πολυμορφισμών του συγκεκριμένου γενετικού τόπου καθώς επίσης και η μελέτη της εμφάνισης του αλληλίου σε υγιή πληθυσμό. Μία ακόμα ενδιαφέρουσα προοπτική θα ήταν η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της εφαρμογής προληπτικών ή θεραπευτικών προσεγγίσεων μετά από αξιολόγηση του γονότυπου του κάθε ασθενή. Μία τέτοια προσέγγιση θα άνοιγε το δρόμο για εξατομικευμένη πρόληψη αλλά και θεραπευτική αντιμετώπιση της HEΩ η οποία ασφαλώς θα απέδιδε πολλά οφέλη στους ασθενείς,

σε ότι αφορά τόσο την ποιότητα ζωής τους όσο και το κόστος αντιμετώπισης της νόσου. Εξάλλου η φαρμακογενωμική ενδεχομένως να συμβάλλει στην αναγνώριση νέων και πιο «έξυπνων» θεραπειών της HEΩ, όπως τα νεότερα αντι-VEGF μονοκλωνικά αντισώματα και si-RNA (small interfering RNA).

Τα μέχρι τώρα δεδομένα υπογραμμίζουν έντονα την ετερογενή φύση της HEΩ, γεγονός που καθιστά δύσκολη την αναγνώριση των γενετικών προφίλ που σχετίζονται με την εμφάνιση και την εξέλιξη της νόσου. Με άλλα λόγια το ευρύ φάσμα φαινοτύπων των ασθενών με HEΩ βρίσκεται κάτω από την γενική διάγνωση της HEΩ, ωστόσο τις περισσότερες φορές οι φαινότυποι αυτοί οφείλονται σε διαφορετικές παθογενετικές διαδικασίες, οι οποίες με τη σειρά τους προκύπτουν από διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα. Εξάγεται λοιπόν το συμπέρασμα ότι, ένα γενετικό προφίλ μπορεί να έχει ιδιαίτερα παθογόνο επίδραση σε έναν συγκεκριμένο υποπληθυσμό, αλλά όχι στο σύνολο των εξεταζόμενων, ενώ από την άλλη πλευρά ένα γενετικό προφίλ με στατιστικά σημαντική συσχέτιση για το σύνολο ενδεχομένως να μην έχει την ίδια επίδραση σε όλους τους υποπληθυσμούς. Λαμβάνοντας λοιπόν αυτά υπόψη καθίσταται σαφές ότι το ο απώτερος σκοπός των μελλοντικών ερευνών θα είναι η ακριβέστερη και προτυποποιημένη κατηγοριοποίηση των ασθενών σε υποομάδες με βάση τα φαινοτυπικά ευρήματα.

Η μεγάλη εξέλιξη στην ανάπτυξη σύγχρονων μεθοδολογιών μελέτης του γονιδιώματος (π.χ. αλληλούχιση νέας γενιάς και ανάλυση μικροσυστοιχιών) ασφαλώς θα συμβάλλει τα μέγιστα στην αποκωδικοποίηση του γενετικού υποβάθρου της HEΩ. Οι συγκεκριμένες μεθοδολογίες αποτελούν ένα σχετικά εύκολο και οικονομικό τρόπο για την ταυτόχρονη μελέτη και ανάλυση πολλών μεταλλάξεων/πολυμορφισμών σε μεγάλο αριθμό γονιδίων χρησιμοποιώντας DNA το οποίο μπορεί να απομονωθεί από εύκολα προσβάσιμα βιολογικά υλικά (π.χ. αίμα). Ήδη είναι εμπορικά διαθέσιμα αρκετά τεστ τα οποία επιτρέπουν την αξιόπιστη ανίχνευση πολυάριθμων πολυμορφισμών αλλά και την εκτίμηση κινδύνου ανάπτυξης της υγρής HEΩ μέσω ειδικών αλγορίθμων (RetnaGene, Macula Risk, Asper Biotech). Συμπληρωματικό ρόλο παίζει και η ανάλυση RNA μικροσυστοιχιών, η οποία επιτρέπει τη δημιουργία ενός γονιδιακού προφίλ της HEΩ καθώς και την αναγνώριση miRNAs τα οποία παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση μεταξύ υγιών και ασθενών. Τα miRNAs αυτά, τα οποία μπορούν να απομονωθούν από το αίμα ασθενών με HEΩ, μπορεί να αποτελέσουν σημαντικούς μελλοντικούς διαγνωστικούς δείκτες, οι οποίοι μπορούν με εύκολο και μη-επεμβατικό τρόπο να προσδιοριστούν.

Είναι προφανές ότι η αποκωδικοποίηση των παθογενετικών μηχανισμών της HEΩ μπορεί να συμβάλει επίσης και στην αποτελεσματικότερη θεραπεία των συγκεκριμένων ασθενών, καθώς θα οδηγήσει στην αναγνώριση μορίων τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν θεραπευτικοί

στόχοι. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη δυνατότητα δημιουργίας του γονιδιακού προφίλ του κάθε ασθενή αναμένεται να καθιερώσει την εποχή της εξατομικευμένης θεραπείας της ΗΕΩ, όπου σε κάθε ασθενή θα χορηγείται η θεραπεία που θα στοχεύει τον συγκεκριμένο μηχανισμό που έχει οδηγήσει στην εμφάνιση και την εξέλιξη της νόσου.

Σε κάθε περίπτωση η διαλεύκανση της γενετικής και μοριακής βάσης της ΗΕΩ θα έχει πολλαπλά οφέλη όχι μόνο για τους ίδιους τους ασθενείς, των οποίων η ποιότητα ζωής τους επηρεάζεται δραματικά λόγω της απώλειας όρασης, αλλά και τους οικείους τους καθώς και τα συστήματα υγείας και τις υπηρεσίες κοινωνικής πρόνοιας σε παγκόσμιο επίπεδο.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bird, A. C. Therapeutic targets in age-related macular disease. *The Journal of Clinical Investigation* **120**, 3033 (2010).
2. Bourne, R. R. A. *et al.* Prevalence and causes of vision loss in high-income countries and in Eastern and Central Europe: 1990-2010. *The British journal of ophthalmology* **98**, 629–638 (2014).
3. Jager, R. D., Mieler, W. F. & Miller, J. W. Age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine* **358**, 2606–2617 (2008).
4. Anderson, D. H. *et al.* Characterization of beta amyloid assemblies in drusen: the deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Experimental eye research* **78**, 243–256 (2004).
5. Bressler, N. M., Bressler, S. B., West, S. K., Fine, S. L. & Taylor, H. R. The grading and prevalence of macular degeneration in Chesapeake Bay watermen. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* **107**, 847–852 (1989).
6. Al-Hussaini, H., Schneiders, M., Lundh, P. & Jeffery, G. Drusen are associated with local and distant disruptions to human retinal pigment epithelium cells. *Experimental eye research* **88**, 610–612 (2009).
7. Hageman, G. S. *et al.* An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Progress in retinal and eye research* **20**, 705–732 (2001).
8. Bhutto, I. & Lutty, G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Molecular aspects of medicine* **33**, 295–317 (2012).
9. Stone, E. M. Macular Degeneration. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.58.111405.133335> **58**, 477–490 (2007).
10. Krueger, D. E., Milton, R. C. & Maunder, L. R. The Framingham eye study: Introduction to the monograph. *Survey of Ophthalmology* **24**, 614–620 (1980).
11. Hyman, L. G., Lilienfeld, A. M., Ferris, F. L. & Fine, S. L. Senile macular degeneration: a case-control study. *American journal of epidemiology* **118**, 213–227 (1983).
12. Adamis, A. P. *et al.* Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* **193**, 631–638 (1993).
13. Bourne, R. R. A. *et al.* Prevalence and causes of vision loss in high-income countries and in Eastern and Central Europe in 2015: magnitude, temporal trends and projections. *The British journal of ophthalmology* **102**, 575–585 (2018).

14. Topouzis, F. *et al.* Prevalence of age-related macular degeneration in Greece: the Thessaloniki Eye Study. *American journal of ophthalmology* **142**, 1076–1079 (2006).
15. Augood, C. A. *et al.* Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye Study (EUREYE). *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* **124**, 529–535 (2006).
16. Klein, R. *et al.* Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* **114**, 253–262 (2007).
17. Wang, J. J. *et al.* Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: the blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* **114**, 92–98 (2007).
18. Wong, W. L. *et al.* Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Global health* **2**, (2014).
19. Myers, C. E. *et al.* Cigarette smoking and the natural history of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* **121**, 1949–1955 (2014).
20. Zhang, Q. Y. *et al.* Overweight, Obesity, and Risk of Age-Related Macular Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **57**, 1276–1283 (2016).
21. Howard, K. P., Klein, B. E. K., Lee, K. E. & Klein, R. Measures of Body Shape and Adiposity as Related to Incidence of Age-Related Eye Diseases: Observations From the Beaver Dam Eye Study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **55**, 2592 (2014).
22. Choudhury, F., Varma, R., McKean-Cowdin, R., Klein, R. & Azen, S. P. Risk factors for four-year incidence and progression of age-related macular degeneration: the los angeles latino eye study. *American journal of ophthalmology* **152**, 385–395 (2011).
23. Ghaem Maralani, H. *et al.* Metabolic syndrome and risk of age-related macular degeneration. *Retina (Philadelphia, Pa.)* **35**, 459–466 (2015).
24. Millen, A. E. *et al.* Association between vitamin D status and age-related macular degeneration by genetic risk. *JAMA ophthalmology* **133**, 1171–1179 (2015).
25. Seddon, J. M., Cote, J., Page, W. F., Aggen, S. H. & Neale, M. C. The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* **123**, 321–327 (2005).
26. Klein, R. J. *et al.* Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science (New York, N.Y.)* **308**, 385–389 (2005).
27. Fritsche, L. G. *et al.* Seven new loci associated with age-related macular degeneration. *Nature genetics* **45**, 433–439 (2013).
28. Chew, E. Y. *et al.* Ten-year follow-up of age-related macular degeneration in the age-related eye disease study: AREDS report no. 36. *JAMA ophthalmology* **132**, 272–277 (2014).

29. Seddon, J. M., Reynolds, R., Yu, Y., Daly, M. J. & Rosner, B. Risk models for progression to advanced age-related macular degeneration using demographic, environmental, genetic, and ocular factors. *Ophthalmology* **118**, 2203–2211 (2011).
30. Wangsa-Wirawan, N. D. & Linsenmeier, R. A. Retinal oxygen: fundamental and clinical aspects. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* **121**, 547–557 (2003).
31. Blaauwgeers, H. G. T. *et al.* Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *The American journal of pathology* **155**, 421–428 (1999).
32. Stefánsson, E., Geirsdóttir, Á. & Sigurdsson, H. Metabolic physiology in age related macular degeneration. *Progress in retinal and eye research* **30**, 72–80 (2011).
33. Mcleod, D. S. *et al.* Relationship between RPE and choriocapillaris in age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* **50**, 4982 (2009).
34. Grunwald, J. E., Metelitsina, T. I., DuPont, J. C., Ying, G. S. & Maguire, M. G. Reduced foveolar choroidal blood flow in eyes with increasing AMD severity. *Investigative ophthalmology & visual science* **46**, 1033–1038 (2005).
35. Metelitsina, T. I., Grunwald, J. E., DuPont, J. C. & Ying, G. S. Effect of systemic hypertension on foveolar choroidal blood flow in age related macular degeneration. *The British Journal of Ophthalmology* **90**, 342 (2006).
36. Mcleod, D. S. *et al.* Relationship between RPE and choriocapillaris in age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* **50**, 4982–4991 (2009).
37. Feigl, B. Age-related maculopathy - linking aetiology and pathophysiological changes to the ischaemia hypothesis. *Progress in retinal and eye research* **28**, 63–86 (2009).
38. Friedman, E. *et al.* Ocular blood flow velocity in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **102**, 640–646 (1995).
39. Friedman, E. The role of the atherosclerotic process in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology* **130**, 658–663 (2000).
40. Booij, J. C., Baas, D. C., Beisekeeva, J., Gorgels, T. G. M. F. & Bergen, A. A. B. The dynamic nature of Bruch's membrane. *Progress in Retinal and Eye Research* **29**, 1–18 (2010).
41. Yuan, X. *et al.* Quantitative proteomics: comparison of the macular Bruch membrane/choroid complex from age-related macular degeneration and normal eyes. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **9**, 1031–1046 (2010).
42. Cavallotti, C., Artico, M., Pescosolido, N., Tranquilli Leali, F. M. & Feher, J. Age-related changes in the human retina. *Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie* **39**, 61–68 (2004).

43. Curcio, C. A. Photoreceptor topography in ageing and age-related maculopathy. *Eye (London, England)* **15**, 376–383 (2001).
44. Jackson, G. R., Owsley, C. & Curcio, C. A. Photoreceptor degeneration and dysfunction in aging and age-related maculopathy. *Ageing research reviews* **1**, 381–396 (2002).
45. Scilley, K. *et al.* Early age-related maculopathy and self-reported visual difficulty in daily life. *Ophthalmology* **109**, 1235–1242 (2002).
46. Ding, X., Patel, M. & Chan, C. C. Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Progress in retinal and eye research* **28**, 1 (2009).
47. Lotery, A. & Trump, D. Progress in defining the molecular biology of age related macular degeneration. *Human genetics* **122**, 219–236 (2007).
48. Curcio, C. A., Presley, J. B., Millican, C. L. & Medeiros, N. E. Basal deposits and drusen in eyes with age-related maculopathy: evidence for solid lipid particles. *Experimental eye research* **80**, 761–775 (2005).
49. Sarks, S., Cherepanoff, S., Killingsworth, M. & Sarks, J. Relationship of Basal laminar deposit and membranous debris to the clinical presentation of early age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* **48**, 968–977 (2007).
50. Spraul, C. W., Lang, G. E., Grossniklaus, H. E. & Lang, G. K. Histologic and morphometric analysis of the choroid, Bruch's membrane, and retinal pigment epithelium in postmortem eyes with age-related macular degeneration and histologic examination of surgically excised choroidal neovascular membranes. *Survey of ophthalmology* **44 Suppl 1**, (1999).
51. Crabb, J. W. *et al.* Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 14682–14687 (2002).
52. Kaplan, H. J., Leibole, M. A., Tezel, T. & Ferguson, T. A. Fas ligand (CD95 ligand) controls angiogenesis beneath the retina. *Nature medicine* **5**, 292–297 (1999).
53. Lip, P. L., Blann, A. D., Hope-Ross, M., Gibson, J. M. & Lip, G. Y. H. Age-related macular degeneration is associated with increased vascular endothelial growth factor, hemorheology and endothelial dysfunction. *Ophthalmology* **108**, 705–710 (2001).
54. Kliffen, M., Sharma, H. S., Mooy, C. M., Kerkvliet, S. & de Jong, P. T. V. M. Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. *The British Journal of Ophthalmology* **81**, 154 (1997).
55. Krzystolik, M. G. *et al.* Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* **120**, 338–346 (2002).
56. Schwesinger, C. *et al.* Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *The American journal of pathology* **158**, 1161–1172 (2001).

57. Bhutto, I. A. *et al.* Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. *Experimental eye research* **82**, 99 (2006).
58. Bressler, S. B. Introduction: Understanding the role of angiogenesis and antiangiogenic agents in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **116**, (2009).
59. Ohno-Matsui, K. *et al.* Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. *Journal of cellular physiology* **189**, 323–333 (2001).
60. Leung, E. & Landa, G. Update on current and future novel therapies for dry age-related macular degeneration. *Expert review of clinical pharmacology* **6**, 565–579 (2013).
61. Ambati, J., Ambati, B. K., Yoo, S. H., Ianchulev, S. & Adamis, A. P. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Survey of ophthalmology* **48**, 257–293 (2003).
62. Marin-Castaño, M. E., Csaky, K. G. & Cousins, S. W. Nonlethal Oxidant Injury to Human Retinal Pigment Epithelium Cells Causes Cell Membrane Blebbing but Decreased MMP-2 Activity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **46**, 3331–3340 (2005).
63. Marin-Castaño, M. E. *et al.* Repetitive Nonlethal Oxidant Injury to Retinal Pigment Epithelium Decreased Extracellular Matrix Turnover In Vitro and Induced Sub-RPE Deposits In Vivo. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **47**, 4098–4112 (2006).
64. Buschini, E., Piras, A., Nuzzi, R. & Vercelli, A. Age related macular degeneration and drusen: neuroinflammation in the retina. *Progress in neurobiology* **95**, 14–25 (2011).
65. Bora, N. S. *et al.* CD59, a complement regulatory protein, controls choroidal neovascularization in a mouse model of wet-type age-related macular degeneration. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **178**, 1783–1790 (2007).
66. Anderson, D. H. *et al.* The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. *Progress in retinal and eye research* **29**, 95–112 (2010).
67. Gorin, M. B. Genetic insights into age-related macular degeneration: controversies addressing risk, causality, and therapeutics. *Molecular aspects of medicine* **33**, 467–486 (2012).
68. Whitmore, S. S. *et al.* Complement activation and choriocapillaris loss in early AMD: implications for pathophysiology and therapy. *Progress in retinal and eye research* **45**, 1–29 (2015).
69. Pikuleva, I. A. & Curcio, C. A. Cholesterol in the retina: the best is yet to come. *Progress in retinal and eye research* **41**, 64–89 (2014).
70. Gass, J. D. M. Drusen and disciform macular detachment and degeneration. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* **90**, 206–217 (1973).

71. Klaver, C. C. W. *et al.* Genetic risk of age-related maculopathy. Population-based familial aggregation study. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* **116**, 1646–1651 (1998).
72. DeAngelis, M. M. *et al.* Genetics of age-related macular degeneration (AMD). *Human molecular genetics* **26**, R45–R50 (2017).
73. Zarepari, S. *et al.* Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration. *American journal of human genetics* **77**, 149–153 (2005).
74. Edwards, A. O. *et al.* Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science (New York, N.Y.)* **308**, 421–424 (2005).
75. Haines, J. L. *et al.* Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science (New York, N.Y.)* **308**, 419–421 (2005).
76. DeWan, A. *et al.* HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science (New York, N.Y.)* **314**, 989–992 (2006).
77. Rivera, A. *et al.* Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Human molecular genetics* **14**, 3227–3236 (2005).
78. Kanda, A. *et al.* A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 16227–16232 (2007).
79. Tuo, J., Bojanowski, C. M. & Chan, C. C. Genetic factors of age-related macular degeneration. *Progress in retinal and eye research* **23**, 229 (2004).
80. Jager, R. D., Mieler, W. F. & Miller, J. W. Age-Related Macular Degeneration. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra0801537> **358**, 2606–2617 (2009).
81. Maller, J. *et al.* Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nature genetics* **38**, 1055–1059 (2006).
82. Shuler, R. K. *et al.* Neovascular age-related macular degeneration and its association with LOC387715 and complement factor H polymorphism. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* **125**, 63–67 (2007).
83. DeAngelis, M. M. *et al.* Cigarette Smoking, CFH, APOE, ELOVL4, and Risk of Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Archives of Ophthalmology* **125**, 49–54 (2007).
84. Li, M. *et al.* CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration. *Nature genetics* **38**, 1049–1054 (2006).
85. Hageman, G. S. *et al.* A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 7227–7232 (2005).

86. Hughes, A. E. *et al.* A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration. *Nature genetics* **38**, 1173–1177 (2006).
87. Postel, E. A. *et al.* Complement factor H increases risk for atrophic age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **113**, 1504–1507 (2006).
88. Jakobsdottir, J. *et al.* Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26. *American journal of human genetics* **77**, 389–407 (2005).
89. Ross, R. J. *et al.* The LOC387715 polymorphism and age-related macular degeneration: replication in three case-control samples. *Investigative ophthalmology & visual science* **48**, 1128–1132 (2007).
90. Kokotas, H., Grigoriadou, M. & Petersen, M. B. Age-related macular degeneration: genetic and clinical findings. *Clinical chemistry and laboratory medicine* **49**, 601–616 (2011).
91. Shuler, R. K. *et al.* Neovascular age-related macular degeneration and its association with LOC387715 and complement factor H polymorphism. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* **125**, 63–67 (2007).
92. Gold, B. *et al.* Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nature genetics* **38**, 458–462 (2006).
93. Thakkinstian, A. *et al.* The association between complement component 2/complement factor B polymorphisms and age-related macular degeneration: a HuGE review and meta-analysis. *American journal of epidemiology* **176**, 361–372 (2012).
94. Sun, C., Zhao, M. & Li, X. CFB/C2 gene polymorphisms and risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Current eye research* **37**, 259–271 (2012).
95. Nozaki, M. *et al.* Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 2328–2333 (2006).
96. Rutar, M., Valter, K., Natoli, R. & Provis, J. M. Synthesis and propagation of complement C3 by microglia/monocytes in the aging retina. *PLoS one* **9**, (2014).
97. Despret, D. D. G. *et al.* Complement component C3 and risk of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **116**, (2009).
98. Seddon, J. M. *et al.* Prediction Model for Prevalence and Incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration Based on Genetic, Demographic, and Environmental Variables. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **50**, 2044–2053 (2009).
99. Haines, J. L. *et al.* Functional candidate genes in age-related macular degeneration: significant association with VEGF, VLDLR, and LRP6. *undefined* **47**, 329–335 (2006).

100. Churchill, A. J. *et al.* VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. *Human molecular genetics* **15**, 2955–2961 (2006).
101. Brown, L. F. *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS* **79**, 233–269 (1997).
102. Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* **2003** *9*:6 **9**, 669–676 (2003).
103. Pasqualetti, G., Danesi, R., del Tacca, M. & Bocci, G. Vascular endothelial growth factor pharmacogenetics: a new perspective for anti-angiogenic therapy. *Pharmacogenomics* **8**, 49–66 (2007).
104. Magnussen, A. L. *et al.* VEGF-A165B is cytoprotective and antiangiogenic in the retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **51**, 4273–4281 (2010).
105. Churchill, A. J. *et al.* VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. *Human molecular genetics* **15**, 2955–2961 (2006).
106. Klaver, C. C. W. *et al.* Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration. *American journal of human genetics* **63**, 200–206 (1998).
107. Souied, E. H. *et al.* The epsilon4 allele of the apolipoprotein E gene as a potential protective factor for exudative age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology* **125**, 353–359 (1998).
108. Guo, C., Marynen, P. & Cassiman, J. J. A rapid, semiautomated method for apolipoprotein e genotyping. *Genome Research* **2**, 348–350 (1993).
109. Cardona, A. E. *et al.* Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature neuroscience* **9**, 917–924 (2006).
110. Combadière, C. *et al.* CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *The Journal of clinical investigation* **117**, 2920–2928 (2007).
111. Faure, S. *et al.* Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science (New York, N.Y.)* **287**, 2274–2277 (2000).
112. Moatti, D. *et al.* Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood* **97**, 1925–1928 (2001).
113. Tuo, J. *et al.* The involvement of sequence variation and expression of CX3CR1 in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**, 1297–1299 (2004).
114. Allikmets, R. *et al.* Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science (New York, N.Y.)* **277**, 1805–1807 (1997).

115. Allikmets, R. *et al.* Further evidence for an association of ABCR alleles with age-related macular degeneration. The International ABCR Screening Consortium. *American journal of human genetics* **67**, 487–491 (2000).
116. Fuse, N. *et al.* Molecular genetic analysis of ABCR gene in Japanese dry form age-related macular degeneration. *Japanese journal of ophthalmology* **44**, 245–249 (2000).
117. Radu, R. A., Mata, N. L., Bagla, A. & Travis, G. H. Light exposure stimulates formation of A2E oxiranes in a mouse model of Stargardt’s macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 5928 (2004).
118. Ardeljan, D. *et al.* Influence of TIMP3/SYN3 polymorphisms on the phenotypic presentation of age-related macular degeneration. *European Journal of Human Genetics* **21**, 1152 (2013).
119. Dewing, J. M., Carare, R. O., Lotery, A. J. & Ratnayaka, J. A. The Diverse Roles of TIMP-3: Insights into Degenerative Diseases of the Senescent Retina and Brain. *Cells* **9**, (2019).
120. Chen, W. *et al.* Genetic variants near TIMP3 and high-density lipoprotein-associated loci influence susceptibility to age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 7401–7406 (2010).
121. Bailey, T. A., Alexander, R. A., Dubovy, S. R., Luthert, P. J. & Victor Chong, N. H. Measurement of TIMP-3 expression and Bruch’s membrane thickness in human macula. *Experimental Eye Research* **73**, 851–858 (2001).
122. Strunnikova, N. v. *et al.* Transcriptome analysis and molecular signature of human retinal pigment epithelium. *Human molecular genetics* **19**, 2468–2486 (2010).
123. Fritsche, L. G. *et al.* Age related Macular Degeneration: Genetics and Biology coming together. *Annual Rev Genomics Human Genetics* **15**, 151-171 (2014).
124. Lambert, N. G. *et al.* Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration. *Progress in retinal and eye research* **54**, 64–102 (2016).
125. Qi, J. H. *et al.* A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nature medicine* **9**, 407–415 (2003).
126. Manousopoulou, A. *et al.* Systems proteomic analysis reveals that clusterin and tissue inhibitor of metalloproteinases 3 increase in leptomenigeal arteries affected by cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathology and applied neurobiology* **43**, 492–504 (2017).
127. Fritsche, L. G. *et al.* A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nature genetics* **48**, 134–143 (2016).
128. Ting, A. Y. C., Lee, T. K. M. & MacDonald, I. M. Genetics of age-related macular degeneration. *Current opinion in ophthalmology* **20**, 369–376 (2009).

129. Schick, T. *et al.* The Effect of Genetic Variants Associated With Age-Related Macular Degeneration Varies With Age. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **61**, 17–17 (2020).
130. Shin, H. T., Yoon, B. W. & Seo, J. H. Comparison of risk allele frequencies of single nucleotide polymorphisms associated with age-related macular degeneration in different ethnic groups. *BMC Ophthalmology* **21**, 1–14 (2021).