**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**


**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»**

**ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ»**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

# ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΗΜΕΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ($SNP_S$) ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *LOXL1* ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΟ ΨΕΥΔΟΑΠΟΦΟΛΙΔΩΤΙΚΟ ΓΛΑΥΚΩΜΑ ΚΑΙ ΣΥΝΔΡΟΜΟ


**ΤΖΙΚΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ**

**ΧΗΜΙΚΟΣ**


**ΑΘΗΝΑ 2012**

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**


**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»**

**ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ»**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

# ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΗΜΕΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ($SNP_S$) ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *LOXL1* ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΟ ΨΕΥΔΟΑΠΟΦΟΛΙΔΩΤΙΚΟ ΓΛΑΥΚΩΜΑ ΚΑΙ ΣΥΝΔΡΟΜΟ


**ΤΖΙΚΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ**

**ΧΗΜΙΚΟΣ**



**ΑΘΗΝΑ 2012**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

# ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΗΜΕΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ($SNP_S$) ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *LOXL1* ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΟ ΨΕΥΔΟΑΠΟΦΟΛΙΔΩΤΙΚΟ ΓΛΑΥΚΩΜΑ ΚΑΙ ΣΥΝΔΡΟΜΟ

**ΤΖΙΚΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ**

**Α.Μ.: 72919**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

**Χρήστος Κρούπης,** Επίκουρος Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Διαγνωστικής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**Χρήστος Κρούπης,** Επίκουρος Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Διαγνωστικής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών

.

**Ευρύκλεια Λιανίδου,** Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Traeger J.,** Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 08/03/2012**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ψευδοαποφολιδωτικό σύνδρομο (Ψ/Α.Σ) αποτελεί μία εκτεταμένη εκφυλιστική πάθηση η οποία παρουσιάζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 40-50 ετών. Χαρακτηρίζεται από την παραγωγή και την προοδευτική συγκέντρωση ενός ινώδους υλικού, που ονομάζεται ψευδοαποφολιδωτικό υλικό (Ψ/Α υλικό), στους οφθαλμικούς ιστούς, στο δέρμα και στον συνδετικό ιστό διαφόρων σπλαχνικών οργάνων. Το Ψ/Α.Σ αποτελεί το πιο συχνά προσδιορισμένο αίτιο μίας υποκατηγορίας χρόνιου γλαυκώματος ανοικτής γωνίας, το ψευδοαποφολιδωτικό γλαύκωμα (Ψ/Α.Γ) και το οποίο έχει κακή πρόγνωση.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιολόγηση σε Ελληνικό πληθυσμό (Ήπειρος) δύο γνωστών σημειακών πολυμορφισμών (G153D και R141L) στο γονίδιο οξειδάση της λυσίνης-1 (*LOXL1)*, οι οποίοι έχουν αναφερθεί πρόσφατα στη βιβλιογραφία ότι συσχετίζονται με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ. Σ' αυτή τη μελέτη, εξετάσθηκαν 291 δείγματα DNA περιφερικού αίματος γλαυκωματικών ασθενών και υγιών μαρτύρων ίδιας ηλικιακής κατανομής. Για τη γονοτύπωση αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε μεθοδολογία PCR πραγματικού χρόνου και ανάλυση καμπύλων τήξης για τους προαναφερθέντες πολυμορφισμούς του γονιδίου *LOXL1* χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά κανάλια του οργάνου LightCycler (Roche), εξετάζοντας ξεχωριστά κάθε πολυμορφισμό. Η μεθοδολογία ήταν ταχεία και αξιόπιστη, επιδεικνύοντας καλή απόδοση και επαναληψιμότητα στην ποσοτικοποίηση (αναπαραγωγιμότητα Cq CV<2,5%) και αξιοπιστία στη γονοτύπωση (CV Tm<2,5%). Επίσης, ήταν ακριβής καθώς σε επιλεγμένα δείγματα έγινε σύγκριση με τη μέθοδο αναφοράς DNA sequencing (100% συμφωνία). Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια ανάπτυξης οικονομικότερης μεθοδολογίας που να εξετάζει ταυτόχρονα και τους δύο πολυμορφισμούς καθώς είναι κοντινοί και μπορεί να χρησιμοποιηθεί το ίδιο PCR προϊόν: σε περιπτώσεις αμφιβολίας στην καμπύλη τήξης, επαναλήφθηκε ξεχωριστά ο κάθε πολυμορφισμός. Από τα αποτελέσματα επιβεβαιώνεται η σύνδεση του *LOXL1* με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ σε Ελληνικό πληθυσμό. Η σύνδεση του Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ με τον G153D φάνηκε να είναι λιγότερο ισχυρή στον πληθυσμό που μελετήθηκε (Ψ/Α.Σ: OR=2,035, p=0,011, Ψ/Α.Γ: OR=2,630, p=0,003) σε σχέση με άλλους πληθυσμούς σε διάφορες μελέτες. Ενώ για τον πολυμορφισμό R141L η σύνδεση αποδείχθηκε μόνο για το Ψ/Α.Γ (OR=3,529, p=0,000).



**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Γενετική σύνδεση $SNP_s$ του *LOXL1* με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** Ψ/Α.Σ, Ψ/Α.Γ, *LOXL1*, $SNP_s$, Real Time PCR

# ABSTRACT

Pseudoexfoliation syndrome (PEX) is a degenerative disease which affects patients over 40-50 years of age. It is characterized by the production and the progressive accumulation of a fibrillar extracellular material in ocular tissues, skin and connective tissue of various internal organs. PEX is recognised as the most common identifiable cause of an open-angle glaucoma subcategory (POAG), PEX that is accompanied by bad prognosis.

The purpose of the present study was the evaluation of the association of two polymorphisms (G153D and R141L) in lysyl oxidase like-1 gene (*LOXL1)* with PEX/PEXG. In this study, 287 DNA samples of peripheral blood of patients from Greece (Epirus) and controls were tested. A novel methodology of real-time PCR and melting curve analysis was developed in order to genotype the G153D and R141L polymorphisms in *LOXL1* gene by using two different fluorescent channels of the LightCycler instrument (Roche) examining each SNP separately. The methodology was fast and reliable demonstrating good efficiency and reproducibility in quantitation (Cq between run precision CV<2.5%) and in genotyping (CV<2.5%). The methology was accurate as we compared it with the reference method of DNA Sequencing. We also attempted to develop a lost-effective methodology that examines simultaneously both $SNP_s$ which are very close and the same PCR product can be used. In cases of doubt in the melting curve analysis, every SNP was examined separately.

A statistically significant association was found for *LOXL1* gene with PXFS- PXFG in this Greek population. The association of PEX and PEXG with G153D appeared to be less powerful in this population (PEX: OR=2.204, p=0.025, PEXG: OR =2.849, p=0.001, POAG: OR=3.057, p=0.001) than in other populations and as for R141L, the association was proved only with PEXG (OR=3.529, p=0.000).



**SUBJECT AREA:** Genetic association of *LOXL1* $SNP_s$ with PXFS and PXFG

**KEYWORDS:** PEX, PEXG, *LOXL1*, $SNP_s$, Real Time PCR

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ..... 1

ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ Ψ/Α.Σ ..... 1

1.1 Εισαγωγή ..... 1

1.2 Ιστορική αναδρομή του ψευδοαποφολιδωτικού συνδρόμου ..... 2

1.3 Επιδημιολογία ..... 5

1.3.1 Συχνότητα στο γενικό πληθυσμό ..... 6

1.3.1.1 Ηλικία ..... 7

1.3.1.2 Φύλο ..... 7

1.3.2 Συχνότητα σε γλαυκωματικό πληθυσμό ..... 8

1.3.3 Το γλαύκωμα σε ασθενείς με Ψ/Α.Σ ..... 8

1.3.4 Ασυμμετρία εκδήλωσης ..... 9

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ..... 11

ΚΛΙΝΙΚΑ, ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ Ψ/Α.Σ ΚΑΙ Ψ/Α.Γ ..... 11

2.1 Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις Ψ/Α.Σ ΚΑΙ Ψ/Α.Γ ..... 11

2.1.1 Ο φακός ..... 11

2.1.2 Αστάθεια ζιννείου ζώνης και φακοδόνηση ..... 12

2.1.3 Καταρράκτης στο Ψ/Α.Σ ..... 13

2.1.4 Ίριδα και κόρη ..... 14

2.1.5 Κερατοειδής ..... 17

2.1.6 Επιπεφυκότας ..... 17

2.1.7 Ακτινωτό σώμα ..... 17

2.1.8 Πρόσθιος θάλαμος (anterior chamber) και γωνία (angle) πρόσθιου θαλάμου ..... 18

2.1.9 Υαλώδες σώμα (vitreous body) και αμφιβληστροειδής (retina) ..... 18

2.1.10 Οπτικός δίσκος (optic disc) ..... 19

2.1.11 Περιοφθάλμιοι ιστοί ..... 19

2.2 Κλινική πορεία-εξέλιξη προς Ψ/Α.Γ ..... 20
2.2.1 Κίνδυνος ανάπτυξης Ψ/Α.Γ σε ασθενείς με Ψ/Α.Σ ..... 21
2.2.2 Κίνδυνος ανάπτυξης Ψ/Α.Γ σε ασθενείς με Ψ/Α.Σ με φυσιολογική και υψηλή ΕΟΠ ..... 21
2.2.3 Κίνδυνος ανάπτυξης Ψ/Α.Γ στον άλλο οφθαλμό σε ασθενείς με μονόπλευρο Ψ/Α.Γ ..... 22
2.2.4 Η έναρξη του γλαυκώματος σε σχέση με την κλινική ανίχνευση του Ψ/Α υλικού ..... 23
2.5 Κλινικά χαρακτηριστικά Ψ/Α.Γ ..... 23
2.5.1 Κλινική εμφάνιση του Ψ/Α.Γ ..... 23
2.5.2 Χαρακτηριστικά της ΕΟΠ στο Ψ/Α.Γ ..... 23
2.5.3 Οπτική νευροπάθεια και βλάβη οπτικών πεδίων στο Ψ/Α.Γ ..... 24
2.6 Σχέση Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ με συστηματικές παθήσεις ..... 25
2.7 Βιοχημική σύσταση του Ψ/Α υλικού ..... 26
2.8 Προέλευση του Ψ/Α υλικού ..... 28
2.9 Αιτιολογία ..... 29
2.10 Θεωρίες παθογένειας ..... 30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ..... 33
ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ Ψ/Α.Σ ΚΑΙ ΤΟΥ Ψ/Α.Γ ..... 33
3.1 Εισαγωγή ..... 33
3.1.1 Κληρονομικότητα ..... 34
3.1.2 Συσχετιζόμενα γονίδια ..... 34
3.2 Το γονίδιο APOE ..... 36
3.3 Το γονίδιο της ομοκυστεΐνης (*MTHFR*) ..... 38
3.3 Το γονίδιο lysyl oxidase-like1 (*LOXL1*) ..... 40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ..... 49
ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ-ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ..... 49
4.1 Εισαγωγή ..... 49
4.1.1 Τεχνικές ανάλυσης μεταλλάξεων ..... 51

4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου και ανάλυση καμπυλών τήξης ..... 53
4.3 Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων DNA (DNA sequencing) ..... 62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ..... 71
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ..... 71
5.1 Κλινικά δείγματα ..... 71
5.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από λευκοκύτταρα αίματος με τη μέθοδο άλατος ..... 85
5.2.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός ..... 85
5.2.2 Πειραματική διαδικασία ..... 85
5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός DNA με το φθορισμόμετρο Qubit ..... 86
5.3.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός ..... 87
5.3.2 Πειραματική διαδικασία ..... 88
5.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ..... 88
5.4.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός ..... 89
5.4.2 Πηκτή αγαρόζης 1% w/v ..... 89
5.5 Real-time PCR και ανάλυση καμπύλων τήξης ..... 89
5.5.1 Οργανολογία ..... 90
5.5.2 Real-time PCR και ανάλυση καμπύλων τήξης για το γονίδιο LOXL1 ..... 92
5.6 Συμβατική PCR ..... 98
5.6.1 Οργανολογία ..... 99
5.6.2 Ενίσχυση με συμβατική PCR ..... 100
5.7 Καθαρισμός των PCR προϊόντων ..... 102
5.8 Αντίδραση θερμικών κύκλων (cycle sequencing) ..... 103
5.9 Καθαρισμός των προϊόντων του Cycle Sequencing ..... 104
5.10 Προετοιμασία δειγμάτων για DNA sequencing ..... 105
5.11 Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων του DNA (DNA sequencing) ..... 106
5.11.1 Οργανολογία ..... 106

5.11.2 Πειραματική πορεία ..... 108
5.12 Βιοπληροφορική ..... 108
5.12.1 Σχεδιασμός εκκινητών και ανιχνευτών ..... 108
5.12.2 Στατιστική επεξεργασία ..... 109
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ..... 113
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ..... 113
6.1 Αποτελέσματα για τους πολυμορφισμούς G153D και R141L ..... 120
6.2 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων ..... 133
6.2.1 Έλεγχος πληθυσμών ..... 133
6.2.2 Στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό G153D ..... 135
6.2.3 Στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό R141L ..... 138
6.2.4 Έλεγχος απλότυπου ..... 142
6.2.5 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ..... 142
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ..... 145
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ ..... 145
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ ..... 155
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ ..... 157
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ..... 159

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

**Σχήμα 2.1**: Περίληψη της τρέχουσας παθογενετικής θεωρίας για το Ψ/Α.Σ[6]. .....31

**Σχήμα 3.1**: Η οξειδάση της λυσίνης με οξειδωτική απαμίνωση της λυσίνης δημιουργεί την αλλυσίνη, η οποία αντιδρά αυθόρμητα με αντίστοιχες αλδεΰδες προς σχηματισμό δι-, τρι-, τετραλειτουργικών crosslinks .....41

**Σχήμα 4.1**: Αρχή της μεθόδου PCR. Α) Τα τρία στάδια ενός κύκλου PCR Β) Πολλαπλασιασμός της επιλεγμένης αλληλουχίας σε διαδοχικούς κύκλους PCR[173]. .....54

**Σχήμα 4.2**: Η κινητική της αντίδρασης PCR. Α) Γραφική παράσταση του αριθμού των DNA αντιγράφων ως προς τον αριθμό των PCR κύκλων, όπου διακρίνονται η φάση θορύβου, η λογαριθμική φάση και η φάση plateau. Β) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR που προκύπτουν μετά από διαφορετικό αριθμό κύκλων PCR[173]. .....56

**Σχήμα 4.3**: Γραφική παράσταση του αριθμού των DNA αντιγράφων ως προς τον αριθμό των PCR κύκλων για δύο δείγματα Α και Β με διαφορετική αρχική ποσότητα μορίων DNA. Η αρχική ποσότητα μορίων DNA του δείγματος Α ($qA_o$) είναι μεγαλύτερη από την αυτή του δείγματος Β ($qB_o$) και η υπέρβαση του θορύβου επιτυγχάνεται συντομότερα για το δείγμα Α από ότι για το δείγμα Β. Με άλλα λόγια, το Cq του δείγματος Α είναι μικρότερο από το Cq του δείγματος Β[173]. .....56

**Σχήμα 4.4**: Παράδειγμα σχεδιασμού της καμπύλης βαθμονόμησης (standard curve) με χρήση προτύπων δειγμάτων γνωστής αρχικής συγκέντρωσης. Τα δείγματα ενισχύονται και κατασκευάζεται γραφική παράταση των Cq ως προς τον αρχικό αριθμό μορίων DNA[175].57

**Σχήμα 4.5**: Διαφορετικοί τύποι φθοριζόντων μορίων ιχνηθετών που χρησιμοποιούνται σε αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου. Α) SybrGreen, Β) ανιχνευτές υδρόλησης, C) ανιχνευτές υβριδισμού, D) μοριακοί φάροι[173]. .....60

**Σχήμα 4.6:** Γραφική παράσταση της έντασης φθορισμού ως προς τη θερμοκρασία σε πειράματα ανάλυσης καμπύλης τήξης. Με την αύξηση της θερμοκρασίας τα δίκλωνα μόρια αποδιατάσσονται με αποτέλεσμα τη μείωση της καταγραφόμενης έντασης φθορισμού. Χαρακτηριστική για κάθε αλληλουχία είναι η θερμοκρασία τήξης Tm, στην οποία το 50% των μορίων DNA παραμένει δίκλωνο και το 50% γίνεται μονόκλωνο. .....60

**Σχήμα 4.7**:Σχηματική αναπαράσταση γονοτύπωσης με ανάλυση καμπύλων τήξης με χρήση ανιχνευτών υβριδισμού. Στο παράδειγμα ο ανιχνευτής είναι συμπληρωματικός του φυσιολογικού αλληλίου. Κατά την αύξηση της θερμοκρασίας ο ανιχνευτής αυτός αποδιατάσσεται ταχύτερα από το μεταλλαγμένο αλλήλιο, αφού η παρουσία του λάθος

ζευγαρώματος στην πολυμορφική θέση μειώνει την Tm του δίκλωνου μορίου. Η αποδιάταξη έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση των δύο ανιχνευτών, μεταξύ των οποίων δεν εκδηλώνεται πλέον το φαινόμενο FRET. Έτσι η μετρούμενη ένταση φθορισμού μειώνεται. Η αποδιάταξη και η συνεπακόλουθη μείωση της έντασης φθορισμού για το φυσιολογικό αλλήλιο επέρχεται σε υψηλότερη θερμοκρασία[172]. .....62

**Σχήμα 4.8**: Αρχή της χημικής μεθόδου DNA sequencing κατά Maxam & Gilbert[160]. .....63

# ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

**Εικόνα 1.1**: Η ανατομία του οφθαλμού. ..... 2

**Εικόνα 1.2**: α. Περιγραφή της Ψευδοαποφολίδωσης με χειρόγραφα σχέδια από τον Lindberg[7]. β. Η διδακτορική διατριβή του Lindberg με τα συμπεράσματά του πάνω στην Ψευδοαποφολίδωση το 1917[7]. ..... 3

**Εικόνα 1.3**: Η αντιλαμβανόμενη από γλαυκωματικό ασθενή εικόνα (σαν μέσα από τούνελ). ..... 10

**Εικόνα 2.1**: α. Κλασσική εικόνα φακού οφθαλμού με Ψ/Α.Σ. Διακρίνονται οι χαρακτηριστικές τρεις ζώνες καθώς και μία εναπομείνουσα γέγυρα Ψ/Α υλικού που εκτείνεται στη διαυγή ζώνη[5]. β. Κοκκιώδης περιφερική ζώνη[5]. ..... 12

**Εικόνα 2.2**: Πυκνή συσσώρευση Ψ/Α υλικού στην ζίννειο ζώνη και το ακτινωτό σώμα. Οι ίνες είναι αλλοιωμένες, κομματιασμένες ή και απούσες σε κάποιες περιοχές. Οι επιπλοκές κατά την διάρκεια της επέμβασης για την αφαίρεση του καταρράκτη είναι περισσότερο αυξημένες σε σχέση με τους φυσιολογικούς οφθαλμούς[5]. ..... 13

**Εικόνα 2.3**: Συμφήσεις μεταξύ κορικού χείλους και πρόσθιας επιφάνειας του φακού κατόπιν φαρμακευτικής μυδρίασης[5]. ..... 14

**Εικόνα 2.4**: Εκτεταμένες εναποθέσεις Ψ/Α υλικού. Κατά τόπους ατροφία του κορικού χείλους[5]. ..... 14

**Εικόνα 2.5**: Ελλείμματα στην διαφανοποίηση της ίριδας στην περιοχή του σφικτήρα του κορικού χείλους σε οφθαλμό με γλαύκωμα κλειστής γωνίας και Ψ/Α.Σ. ..... 15

**Εικόνα 2.6:** Αλλοιώσεις των αγγείου της ίριδας στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Αριστερά: Περιαγγειακή συγκέντρωση Ψ/Α (PEX) υλικού και εκφυλιστική αλλοίωση των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων (EN) και των περικυττάρων (PE). Δεξιά: «Αγγεία φαντάσματα» στα οποία ίνες Ψ/Α υλικού (PEX) περιβάλουν ολοκληρωτικά τα κύτταρα των τοιχωμάτων των αγγείων[6]. ..... 16

**Εικόνα 2.7**: Εναπόθεση χρωστικής στον κερατοειδή που μοιάζει με άτρακτο του Krukenberg. Στο Ψ/Α.Σ η εναπόθεση στον κερατοειδή είναι περισσότερο διάχυτη σε σύγκριση με το σύνδρομο διασποράς χρωστικής[5]. ..... 17

**Εικόνα 2.8**: Μετακίνηση του υδατοειδούς υγρού (aqueous humor) από τον οπίσθιο στον πρόσθιο θάλαμο. ..... 18

**Εικόνα 2.9:** α. Σωματίδια Ψ/Α υλικού στην πρόσθια υαλοειδική επιφάνεια σε αφακικό οφθαλμό. Η εναπόθεση ακολουθεί τα όρια μιας οπής του προσθίου υαλοειδούς. β. Εναπόθεση Ψ/Α υλικού σε ενδοφακό οπισθίου θαλάμου[5]. .....19

**Εικόνα 2.10**: Ψ/Α (PEX) υλικό ανάμεσα σε δύο κύτταρα του μυοκαρδίου (MC)[6]. .....25

**Εικόνα 2.11**: Ίνες Ψ/Α υλικού στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Α) Ίνες τύπου Α λεπτότερες με μεγάλη ικανότητα σύνδεσης Β) Ίνες τύπου Β παχύτερες C) Συνένωση μικροινιδίων σε ώριμες ψευδοαποφολιδωτικές ίνες με cross- bands στα 50 nm d) Immunogold labeling χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι φιμπριλλίνης- 1 δείχνει καθαρή συσχέτιση με το Ψ/Α υλικό[19].....28

**Εικόνα 2.12**: Διηθητικός ηθμός στο Ψ/Α.Σ χωρίς (a,b) και με (c,d) γλαύκωμα. a) Παραγωγή Ψ/Α ινών (βέλη) από ένα ενδοθηλιακό κύτταρο (E) στον διηθητικό ηθμό (TB). b) Παραγωγή Ψ/Α ινών (βέλη) από το ενδοθήλιο (E) στο κανάλι του Schlemm (SC) (PL, plaque material). c) Εξαφάνιση του καναλιού του Schlemm εξαιτίας συσσώρευσης Ψ/Α υλικού. d) Υποχώρηση του αυλού του καναλιού του Schlemm εξαιτίας της επαφής του εσωτερικού με το εξωτερικό τοίχωμα[5].....29

**Εικόνα 3.1**: Γενωμική τοποθεσία του γονιδίου LOXL1. .....43

**Εικόνα 3.2**: Πρωτεϊνική έκφραση του *LOX, LOXL1* και *LOXL2* σε οφθαλμικούς ιστούς[151]. .....44

**Εικόνα 5.1**:Το φθορισμόμετρο Qubit. .....87

**Εικόνα 5.2:** α. Το όργανο LightCycler 1.5 β. Ο περιστρεφόμενος δίσκος με χωρητικότητα 32 τριχοειδών.....90

**Εικόνα 5.3**: Σχηματική παράσταση της οργανολογίας του LightCycler. .....91

**Εικόνα 5.4:** Σχετική θέση των εκκινητών και των ανιχνευτών υβριδισμού για την γονοτύπωση των δύο πολυμορφισμών κατά μήκος του γονιδίου *LOXL1*. Με πράσινο χρώμα σημειώνεται το εξώνιο 1 του γονιδίου *LOXL1*. .....93

**Εικόνα 5.5**: Σχηματική παράσταση του θερμικού κυκλοποιητή Primus 25 της MWG.....100

**Εικόνα 5.6**: Σχετική θέση των εκκινητών επί του γονιδίου *LOXL1*.....101

**Εικόνα 5.7**: Ο γενετικός αναλυτής ABI Prism 310 Α) Εξωτερική άποψη Β) Εσωτερική άποψη.....107

**Εικόνα 6.1**: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. 1) δείκτης μοριακών βαρών (marker) 2) τυφλό δείγμα (blank) 3-6) δείγματα. .....121

**Εικόνα 6.2**: Στοίχιση (alignment) των γονιδίων *LOXL, LOXL1, LOXL2, LOXL3* και *LOXL4* (CLC-Sequence Viewer, CLCbio, Δανία). .....123

**Εικόνα 6.3:** Καμπύλη αναφοράς για την αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου για τον πολυμορφισμό G153D στο κανάλι F2. Επάνω φαίνεται η ενίσχυση του γνωστού δείγματος ομοζυγώτη (A/A) (C69) και των διαδοχικών αραιώσεων του (C69 1:10, C69 1:100, C69 1:1000). Κάτω η καμπύλη αναφοράς με κλίση -3,516.....125

**Εικόνα 6.4**: Καμπύλη αναφοράς για την αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου για τον πολυμορφισμό R141L στο κανάλι F3. Επάνω φαίνεται η ενίσχυση του γνωστού δείγματος ομοζυγώτη A/A (C16) και των διαδοχικών αραιώσεων του (C16 1:5, C16 1:10, C16 1:20, C16 1:40). Κάτω η καμπύλη αναφοράς με κλίση -3,970. .....126

**Εικόνα 6.5**: Ανάλυση καμπύλων τήξεως με συνδυασμένη γονοτύπωση (πρόγραμμα combined) στην πάνω εικόνα για τον πολυμορφισμό R141L στο κανάλι F3, για δύο ετεροζυγώτες G/T και έναν ομοζυγώτη G/G και στην κάτω εικόνα για πολυμορφισμό G153D στο κανάλι F2, για έναν ετεροζυγώτη G/A, για έναν ομοζυγώτη G/G και έναν ομοζυγώτη A/A. .....127

**Εικόνα 6.6**: Παράδειγμα ανάλυσης καμπύλων τήξεως με συνδυασμένη γονοτύπωση (πρόγραμμα combined) στην πάνω εικόνα για τον πολυμορφισμό R141L στο κανάλι F3 και στην κάτω εικόνα για τον πολυμορφισμό G153D στο κανάλι F2 σε δείγματα ασθενών. .....127

**Εικόνα 6.7**: Θερμοκρασίες τήξης για τον πολυμορφισμό R141L στο κανάλι F3 με συνδυασμένη γονοτύπωση (πρόγραμμα combined). .....128

**Εικόνα 6.8:** Θερμοκρασίες τήξης για τον πολυμορφισμό G153D στο κανάλι F2 με συνδυασμένη γονοτύπωση (πρόγραμμα combined). .....128

**Εικόνα 6.9**: Ανάλυση καμπύλων τήξεως (πρόγραμμα modified) για τον πολυμορφισμό R141L στο κανάλι F3, για δύο ετεροζυγώτες G/T και έναν ομοζυγώτη G/G. .....129

**Εικόνα 6.10:** Ανάλυση καμπύλων τήξεως (πρόγραμμα modified) για τον πολυμορφισμό G153D στο κανάλι F2, για έναν ετεροζυγώτη G/A, για έναν ομοζυγώτη G/G και έναν ομοζυγώτη A/A. .....129

**Εικόνα 6.11:** Θερμοκρασίες τήξης για τον πολυμορφισμό R141L στο κανάλι F3 (πρόγραμμα modified) (μέσο ΔTm=7,26 $^{0}$C).....129

**Εικόνα 6.12**: Θερμοκρασίες τήξης για τον πολυμορφισμό G153D στο κανάλι F2 (πρόγραμμα modified) (μέσο ΔTm=6,34 $^{0}$C).....130

**Εικόνα 6.13**: Παράδειγμα προγράμματος melting για τον πολυμορφισμό R141L στο κανάλι F3 σε δείγματα ασθενών. .....130

**Εικόνα 6.14**: Παράδειγμα προγράμματος melting για τον πολυμορφισμό G153D στο κανάλι F2 σε δείγματα ασθενών. .....130

**Εικόνα 6.15**: Γράφημα από DNA sequencer. Ετεροζυγώτης G/T στον πολυμορφισμό R141L (δύο κορυφές) και ετεροζυγώτης G/A στον πολυμορφισμό G153D (δύο κορυφές). .....132

**Εικόνα 6.16**: Γράφημα από DNA sequencer. Ετεροζυγώτης G/T στον πολυμορφισμό R141L (δύο κορυφές) και ομοζυγώτης G/G στον πολυμορφισμό G153D (μία κορυφή). .132

**Εικόνα 6.17**: Γράφημα από DNA sequencer. Ομοζυγώτης G/G στον πολυμορφισμό R141L (μία κορυφή) και ομοζυγώτης A/A στον πολυμορφισμό G153D (μία κορυφή).....133

# ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

**Πίνακας 1.1:** Συχνότητα του Ψ/Α.Σ στον γενικό πληθυσμό σε διάφορες εθνότητες. .....5

**Πίνακας 1.2**: Συχνότητα Ψ/Α.Γ σε ασθενείς με Ψ/Α.Σ. .....9

**Πίνακας 2.1**: Συνοπτική παρουσίαση των πρώιμων σημείων και επιπλοκών κλινικών και χειρουργικών του Ψ/Α.Σ σε σχέση με τους εμπλεκόμενους ιστούς[6]. .....20

**Πίνακας 5.1Α**: Ομάδα Ψ/Α.Σ (PEX). Στοιχεία για το φύλο, την ηλικία, τον ΣΔ: σακχαρώδης διαβήτης, την ΑΥ: αρτηριακή υπέρταση, την καρδιοπάθεια και την αγγειοπάθεια. .....71

**Πίνακας 5.1Β**: Ομάδα Ψ/Α.Σ (PEX). Στοιχεία για τα οφθαλμολογικά χαρακτηριστικά. Γλαύκωμα, Ψ/Α.Σ, μέγιστη ΕΟΠ (IOP), max c/dr: μέγιστο πηλίκο κοίλανσης (εξέταση οπτικού νεύρου). .....73

**Πίνακας 5.1Γ:** Ομάδα Ψ/Α.Γ (PEXG). Στοιχεία για το φύλο, την ηλικία, τον ΣΔ: σακχαρώδης διαβήτης, την ΑΥ: αρτηριακή υπέρταση, την καρδιοπάθεια και την αγγειοπάθεια. .....74

**Πίνακας 5.1Δ**: Ομάδα Ψ/Α.Γ (PEXG). Στοιχεία για τα οφθαλμολογικά χαρακτηριστικά. Γλαύκωμα, Ψ/Α.Σ, μέγιστη ΕΟΠ (IOP), max c/dr: μέγιστο πηλίκο κοίλανσης (εξέταση οπτικού νεύρου). .....76

**Πίνακας 5.2Α:** Ομάδα μαρτύρων (CONTROLS). Στοιχεία για το φύλο, την ηλικία, τον ΣΔ: σακχαρώδης διαβήτης (BDR=Παραγωγική Διαβητική Αμφιβληστρειδοπάθεια, ΙΝΣ.=Ινσουλίνη, PRP=Φωτοδυναμική θεραπεία), την ΑΥ: αρτηριακή υπέρταση, την καρδιοπάθεια (ΣΝ=Στεφανιαία νόσος) και την αγγειοπάθεια. .....78

**Πίνακας 5.2Β**: Ομάδα μαρτύρων (CONTROLS). Στοιχεία για τα οφθαλμολογικά χαρακτηριστικά. Γλαύκωμα, μέγιστη ΕΟΠ (IOP), max c/dr: μέγιστο πηλίκο κοίλανσης (εξέταση οπτικού νεύρου). .....80

**Πίνακας 5.2Γ**: Ομάδα με ΠΓΑΓ (POAG). Στοιχεία για το φύλο, την ηλικία, τον ΣΔ: σακχαρώδης διαβήτης, την ΑΥ: αρτηριακή υπέρταση, την καρδιοπάθεια και την αγγειοπάθεια. .....83

**Πίνακας 5.2Δ**: Ομάδα με ΠΓΑΓ (POAG). Στοιχεία για τα οφθαλμολογικά χαρακτηριστικά. Γλαύκωμα, μέγιστη ΕΟΠ (IOP), max c/dr: μέγιστο πηλίκο κοίλανσης (εξέταση οπτικού νεύρου). .....84

**Πίνακας 5.3:** Μέγιστο απορρόφησης και εκπομπής των χρωστικών που χρησιμοποιούνται στο όργανο LightCycler. .....92

**Πίνακας 5.4:** Οι αλληλουχίες και οι θερμοκρασίες τήξης (Tm) των ανιχνευτών και εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη real-time PCR για τη γονοτύπωση του *LOXL1.* ....94

**Πίνακας 5.5**: Πρωτόκολλο real-time PCR για το γονίδιο *LOXL1*. .....95

**Πίνακας 5.6:** Θερμοκρασιακό πρόγραμμα real-time PCR για το γονίδιο *LOXL1.* .....95

**Πίνακας 5.7:** Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης καμπύλων τήξης για το γονίδιο LOXL1.....96

**Πίνακας 5.8**: Πρωτόκολλο real-time PCR για τον πολυμορφισμό G153D ή R141L. .....96

**Πίνακας 5.9**: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα real-time PCR για τους πολυμορφισμούς G153D και R141L ξεχωριστά (modified). .....97

**Πίνακας 5.10**: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης καμπύλων τήξης για τους πολυμορφισμούς G153D και R141L ξεχωριστά (modified).....97

**Πίνακας 5.11**: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης καμπύλων τήξης για τους πολυμορφισμούς G153D και R141L (melting). .....98

**Πίνακας 5.12**: Πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του *LOXL1*.....100

**Πίνακας 5.13:** Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του LOXL1.....101

**Πίνακας 5.14**: Πρωτόκολλο Cycle Sequencing. .....104

**Πίνακας 5.15**: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα Cycle Sequencing. .....104

**Πίνακας 6.1Α**: Αποτελέσματα γονοτύπωσης για την ομάδα Ψ/Α.Σ (PEX). Για τον G153D πολυμορφισμό: G/G (ομοζυγώτης G), G/A (ετεροζυγώτης), A/A (ομοζυγώτης A). Για τον R141L πολυμορφισμό: G/G (ομοζυγώτης G), G/T (ετεροζυγώτης), T/T (ομοζυγώτης T), (amplifiable n=53 και amplifiable n=54 αντίστοιχα). .....113

**Πίνακας 6.1Β**: Αποτελέσματα γονοτύπωσης για την ομάδα Ψ/Α.Γ (PEXG). Για τον G153D πολυμορφισμό: G/G (ομοζυγώτης G), G/A (ετεροζυγώτης), A/A (ομοζυγώτης A). Για τον R141L πολυμορφισμό: G/G (ομοζυγώτης G), G/T (ετεροζυγώτης), T/T (ομοζυγώτης T), (amplifiable n=70 και amplifiable n=70 αντίστοιχα). .....114

**Πίνακας 6.2Α**: Αποτελέσματα γονοτύπωσης για την ομάδα υγειών μαρτύρων (CONTROLS). Για τον G153D πολυμορφισμό: G/G (ομοζυγώτης G), G/A (ετεροζυγώτης), A/A (ομοζυγώτης A). Για τον R141L πολυμορφισμό: G/G (ομοζυγώτης G), G/T

(ετεροζυγώτης), T/T (ομοζυγώτης T), (amplifiable n=100 και amplifiable n=96 αντίστοιχα). .....116

**Πίνακας 6.2B:** Αποτελέσματα γονοτύπωσης για την ομάδα με ΠΓΑΓ (POAG). Για τον G153D πολυμορφισμό: G/G (ομοζυγώτης G), G/A (ετεροζυγώτης), A/A (ομοζυγώτης A). Για τον R141L πολυμορφισμό: G/G (ομοζυγώτης G), G/T (ετεροζυγώτης), T/T (ομοζυγώτης T), (amplifiable n=62 και amplifiable n=63 αντίστοιχα). .....119

**Πίνακας 6.3**: Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των τριών γονοτύπων και των δύο αλληλίων για τον G153D πολυμορφισμό στις ομάδες PEX, PEXG, POAG και CONTROLS. .....131

**Πίνακας 6.4**: Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των τριών γονοτύπων και των δύο αλληλίων για τον R141L πολυμορφισμό στις ομάδες PEX, PEXG, CONTROLS και POAG. .....131

**Πίνακας 6.5:** Κανονική κατανομή K-S ($p_{value}$). Έλεγχος των ομάδων PEX, PEXG, POAG και CONTROLS σε σχέση με την ηλικία (AGE) και την ενδοφθάλμια πίεση (IOP).....133

**Πίνακας 6.6:** Δοκιμασία Anova. Έλεγχος των ομάδων PEX, PEXG, POAG και CONTROLS σε σχέση με την ηλικία (έλεγχος της ηλικιακής κατανομής).....134

**Πίνακας 6.7**: Kruskal-Wallis test. Έλεγχος των ομάδων PEX, PEXG, POAG και CONTROLS σε σχέση με την ενδοφθάλμια πίεση (IOP) (mean rank=διάμεσος).....134

**Πίνακας 6.8:** Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων στις ομάδες PEX και CONTROLS. .135

**Πίνακας 6.9**: Τεστ Hardy-Weinberg για τον πολυμορφισμό G153D.....135

**Πίνακας 6.10**: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό G153D και οι υπολογιζόμενοι ORs. .....136

**Πίνακας 6.11**: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων στις ομάδες PEXG και CONTROLS. .....136

**Πίνακας 6.12:** Τεστ Hardy-Weinberg για τον πολυμορφισμό G153D.....137

**Πίνακας 6.13:** Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό G153D και οι υπολογιζόμενοι ORs. .....137

**Πίνακας 6.14**: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων στις ομάδες POAG και CONTROLS. .....137

**Πίνακας 6.15:** Τεστ Hardy-Weinberg για τον πολυμορφισμό G153D.....138

**Πίνακας 6.16:** Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό G153D και οι υπολογιζόμενοι ORs. .....138

**Πίνακας 6.17**: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων στις ομάδες PEX και CONTROLS.139

**Πίνακας 6.18**: Τεστ Hardy-Weinberg για τον πολυμορφισμό R141L.....139

**Πίνακας 6.19**: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό R141L και οι υπολογιζόμενοι ORs. .....139

**Πίνακας 6.20**: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων στις ομάδες PEXG και CONTROLS. .....140

**Πίνακας 6.21**: Τεστ Hardy-Weinberg για τον πολυμορφισμό R141L.....140

**Πίνακας 6.22**: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό R141L και οι υπολογιζόμενοι ORs. .....140

**Πίνακας 6.23**: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων στις ομάδες POAG και CONTROLS. .....141

**Πίνακας 6.24**: Τεστ Hardy-Weinberg για τον πολυμορφισμό R141L.....141

**Πίνακας 6.25**: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό R141L και οι υπολογιζόμενοι ORs. .....141

**Πίνακας 6.26**: Υπολογισμός των συχνοτήτων των απλότυπων για τις ομάδες PEX, PEXG, POAG και CONTROLS. .....142

**Πίνακας 6.27**: Εκτίμηση κινδύνου απλότυπου για τις ομάδες PEXG-CONTROLS. .....142

**Πίνακας 6.28**: Οι ORs και τα $p_{values}$ για τον G153D πολυμορφισμό σύμφωνα με το υπολλειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας και ανάλυση SPSS. .....143

**Πίνακας 6.29**: Οι ORs και τα $p_{values}$ για τον R141L πολυμορφισμό σύμφωνα με το υπολλειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας και ανάλυση SPSS. .....143

**Πίνακας 6.30**: Logistic Regression για CONTROLS-POAG με μεταβλητές: φύλο (sex), ηλικία (age), ενδοφθάλμια πίεση (IOP), αλλήλιο153, αλλήλιο141. .....143

**Πίνακας 6.31**: Logistic Regression για CONTROLS-PEX με μεταβλητές: φύλο (sex), ηλικία (age), ενδοφθάλμια πίεση (IOP), αλλήλιο153, αλλήλιο141. .....144

**Πίνακας 6.32**: Logistic Regression για CONTROLS-PEXG με μεταβλητές: φύλο (sex), ηλικία (age), ενδοφθάλμια πίεση (IOP), αλλήλιο153, αλλήλιο141. .....144

# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας του Αττικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Αθηνών, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος ειδίκευσης στην Κλινική Χημεία υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Χρήστου Κρούπη.

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Χ. Κρούπη για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική του καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, δίνοντας μου την δυνατότητα να εξοικειωθώ με πολλές τεχνικές του κλινικού βιοχημικού εργαστηρίου αλλά και για την καλή του διάθεση και συνεργασία. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Ε. Λιανίδου, Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών για την όλη συμβολή της στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα και για τις εύστοχες παρατηρήσεις της κατά την διόρθωση της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διευθύντρια του Εργαστηρίου Κλινικής Βιοχημείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου ΑΤΤΙΚΟΝ κα. Κ. Δήμα, Επίκουρη καθηγήτρια Ιατρικής σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, για την φιλοξενία στον εργαστηριακό χώρο του νοσοκομείου και την προσφορά αντιδραστηρίων και εργαστηριακού υλικού. Θα ήταν παράλειψή μου να μην αναφέρω και να μην ευχαριστήσω τον κ. Δημήτρη Χήρα, Οφθαλμίατρο, για την προσφορά δειγμάτων, αντιδραστηρίων και την αμέριστη συμπαράστασή του με τις συμβουλές του και την καλή του την παρέα, τον Δρ. Μ. Petersen, Δ/ντή στο Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού καθώς και την Σ. Oliveira, μεταδιδακτορική υπότροφος. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. J. Traeger, Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής της Ιατρικής σχολής Αθηνών, για τις εποικοδομητικές της παρατηρήσεις στη διόρθωση της διατριβής.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην απόφοιτη πλέον του μεταπτυχιακού προγράμματος ειδίκευσης στην Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική, Βελισσάρη Αλίκη και την υποψήφια διδάκτορα Πουμπουρίδου Νικολέτα για την ανεκτίμητη βοήθειά τους στην εκμάθηση των τεχνικών, την συμπαράσταση και την ευχάριστη παρέα καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας αλλά και τη Μυρτώ Ρίζου, την Χριστίνα Σχίζα και τη Σοφία Φάρκωνα, τρεις ανθρώπους ξεχωριστούς που απλά υπήρξαν και έκαναν αυτά τα δύο χρόνια πολύ ευχάριστα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την αδερφική μου φίλη, Μικαέλα Αγγελοπούλου για την συμπαράστασή της καθώς και τους γονείς μου για την οικονομική και ψυχολογική τους υποστήριξη. ΑΘΗΝΑ 2012

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

# ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ Ψ/Α.Σ

## 1.1 Εισαγωγή

Το **ψευδοαποφολιδωτικό σύνδρομο** (Ψ/Α.Σ, PXFS ή PEX, pseudoexfoliation syndrome) είναι μια συσχετιζόμενη με την ηλικία γενικευμένη διαταραχή της εξωκυττάριας ουσίας. Χαρακτηρίζεται από την παραγωγή και την προοδευτική συγκέντρωση ενός ινώδους υλικού, το οποίο ονομάζεται **ψευδοαποφολιδωτικό υλικό** (Ψ/Α υλικό), στους οφθαλμικούς ιστούς, καθώς επίσης στο δέρμα και στον συνδετικό ιστό διαφόρων σπλαχνικών οργάνων.

Το Ψ/Α.Σ αποτελεί το πιο συχνά προσδιορισμένο αίτιο χρόνιου γλαυκώματος ανοικτής γωνίας, γνωστό ως **ψευδοαποφολιδωτικό γλαύκωμα** (Ψ/Α.Γ, PXFG ή PEXG, pseudoexfoliation glaucoma) και κατέχει το 25% και πλέον του συνόλου των χρονίων γλαυκωμάτων ανοικτής γωνίας παγκοσμίως[1, 2].

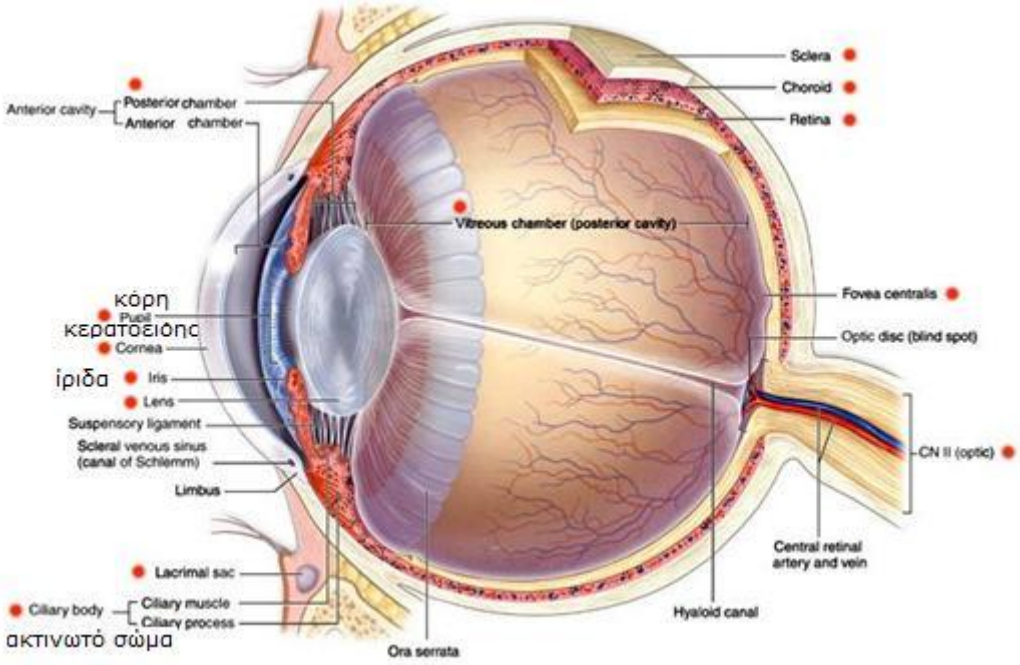
Οι εκφυλιστικές αλλοιώσεις που προκαλούνται στους οφθαλμικούς ιστούς από την εναπόθεση του Ψ/Α υλικού προκαλούν μεταξύ άλλων συχνότερη εμφάνιση καταρράκτη, ενώ αυξάνουν και τον κίνδυνο επιπλοκών κατά την διάρκεια της εγχείρησης του καταρράκτη[3].

Πολλοί οφθαλμίατροι ακόμα και σήμερα πιστεύουν ότι το Ψ/Α.Σ απαντάται κυρίως σε ορισμένες χώρες αλλά στην πραγματικότητα εντοπίζεται σε άτομα από όλες τις γεωγραφικές περιοχές του κόσμου και με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης απ' ότι προηγουμένως υποψιάζονταν[4, 5]. Αυτό σε συνδυασμό με την έλλειψη ενδιαφέροντος και εξειδικευμένης γνώσης για το νόσημα οδηγεί συχνά στην παράβλεψη ή λανθασμένη αναγνώριση του Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ. Επιπλέον, πρέπει να τονιστεί ότι το Ψ/Α.Γ αποτελεί συχνή απειλή για την όραση, καθώς διαφέρει από το κλασσικό **πρωτοπαθές γλαύκωμα ανοιχτής γωνίας** (ΠΓΑΓ, POAG) ως προς τα κλινικά χαρακτηριστικά, πορεία και πρόγνωση. Η πρόγνωση είναι χειρότερη σε σχέση με το ΠΓΑΓ, διότι η διακύμανση της 24ωρης **ενδοφθάλμιας πίεσης** (ΕΟΠ) είναι πιο μεγάλη, η οπτική νευροπάθεια και η βλάβη των οπτικών πεδίων είναι πιο σοβαρές κατά τη στιγμή της διάγνωσης, με ταχύτερη εξέλιξη ενώ και η ανάγκη για χειρουργική επέμβαση είναι πιο συχνή. Επίσης, το Ψ/Α.Σ συνδέεται αιτιολογικά με συστηματικές παθήσεις οι οποίες είναι στο επίκεντρο ερευνών που σκοπεύουν να προσδιορίσουν τις επιπτώσεις της συστηματικής διάστασης της πάθησης στην συνολική υγεία αυτής της ομάδας ασθενών[6]. Όλα τα παραπάνω δείχνουν

πόσο σημαντικό είναι για το καλό των ασθενών η αναγνώριση και κατανόηση του Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ εκ μέρους των οφθαλμιάτρων. Τέλος, είναι γνωστό ότι πολλοί όροι χρησιμοποιήθηκαν για να περιγράψουν αυτή την κατάσταση. Οι όροι αποφολίδωση και **ψευδοαποφολίδωση** (Ψ/Α) χρησιμοποιούνται το ίδιο συχνά στην έρευνα και στις δημοσιεύσεις παγκοσμίως.

## 1.2 Ιστορική αναδρομή του ψευδοαποφολιδωτικού συνδρόμου

Το Ψ/Α.Σ αποτελεί εκτεταμένη εκφυλιστική πάθηση, που παρουσιάζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 40-50 ετών, κατά την οποία ουσία ασαφούς προελεύσεως και υφής εναποτίθεται στο περιφάκιο, στο επιθήλιο της ίριδας και στο κορικό χείλος (pupillary margin), στο ακτινωτό σώμα (ciliary body), στη ζίννειο ζώνη (zonules) και στο διηθητικό ηθμό (**εικόνα 1.1**).



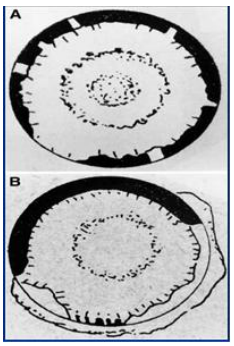

**Εικόνα 1.1: Η ανατομία του οφθαλμού.**

Η κατ' εξοχήν κλινική εικόνα είναι η εναπόθεση στο πρόσθιο περιφάκιο και στο κορικό χείλος μιας κοκκιώδους ουσίας η οποία μπορεί να παραμένει είτε με την μορφή γκριζόλευκων φολίδων είτε ως μεμβρανόμορφος σχηματισμός.

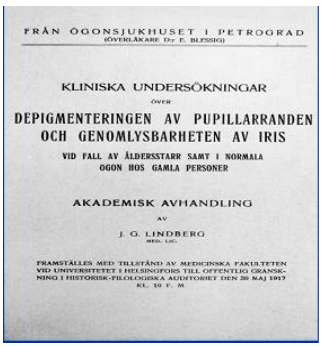
Το Ψ/Α.Σ έχει κατά καιρούς αναφερθεί από πολλούς ερευνητές με διάφορα ονόματα. Ο πρώτος οφθαλμίατρος που παρατήρησε και περιέγραψε το φαινόμενο της Ψ/Α ήταν ο **Lindberg**, φιλανδικής καταγωγής, ο οποίος ξεκίνησε την έρευνά του το 1914, στοχεύοντας

σε διδακτορική διατριβή. Στόχος του ήταν η αποσαφήνιση των παρατηρήσεων του Axenfeld πάνω στις αλλοιώσεις της ίριδας στους οφθαλμούς ηλικιωμένων ατόμων. Ο Axenfeld περιέγραψε δύο τύπους εκφύλισης της ίριδας: α) την εκφυλιστική υαλίδωση (hyaline) του κορικού χείλους της ίριδος που προκαλεί μειωμένη μυδρίαση (διαστολή) της κόρης και β) την ατροφεία του μελάγχρου επιθηλίου της ίριδας στο κορικό χείλος. Για την έρευνά του ο Lindberg έπρεπε να κατασκευάσει την σχισμοειδή λυχνία, βασιζόμενος στο προσχέδιο του Gullstrad, εφ' όσον δεν ήταν εμπορικά διαθέσιμη εκείνη την περίοδο. Μία λυχνία sach χρησιμοποιήθηκε για την διαφανοποίηση της ίριδας. Ο Lindberg κατά τη διεξαγωγή της έρευνάς του, παρατήρησε ελαφρά γκρίζες φολίδες στο κορικό χείλος. Επίσης, πρόσεξε ότι αυτό το παράξενο υλικό σχημάτιζε μια μεμβράνη στην πρόσθια επιφάνεια του φακού. Όλες του οι παρατηρήσεις συνοδεύτηκαν από επιδέξια φτιαγμένα χειρόγραφα σχέδια (**εικόνα 1.2α**). Το φαινόμενο αυτό βρέθηκε να είναι συχνό τόσο σε ασθενείς με καταρράκτη όσο και σε μη, ηλικίας άνω των 55 ετών. Επίσης, παρατηρήθηκε στο 50% των ασθενών με γλαύκωμα. Η ηλικία ήταν καθοριστικός παράγοντας αφού η συχνότητά του ήταν μεγαλύτερη με την αύξηση της ηλικίας.

Ο Lindberg παρουσίασε τη διδακτορική του διατριβή στο Πανεπιστήμιο του Ελσίνκι το 1917 (**εικόνα 1.2β**). Συμμετέχοντας σε ένα συνέδριο Οφθαλμολογίας στην Βόρεια Ευρώπη το 1921, γνώρισε έναν Νορβηγό οφθαλμίατρο τον Birger Malling και του έδωσε την διατριβή του εξηγώντας τα νέα του ευρήματα. Μεταξύ 1920-21, εργάστηκε στην κλινική του Axenfeld στο Freiburg στη Γερμανία. Αυτή την περίοδο, συνάντησε στην Βασιλεία της Ελβετίας έναν Ελβετό οφθαλμίατρο τον Alfred Vogt στον οποίο έδωσε επίσης την διατριβή του. Ο Malling και ο Vogt ωστόσο δημοσίευσαν μελέτες πάνω στην Ψ/Α το 1923 χωρίς να αναφέρονται στην δουλειά του Lindberg. Παρόλ' αυτά, τα κύρια συμπεράσματα του Lindberg πάνω στην Ψ/Α είναι έγκυρα και αναγνωρίζονται μέχρι και σήμερα[7, 5].




α) β)


FRÅN OGONSJUKHUSET I PETROGRAD
(ÖVERLÄKARE Dr E. BLESSIG)

KLINISKA UNDERSÖKNINGAR
ÖVER
DEPIGMENTERINGEN AV PUPILLARRANDEN
OCH GENOMLYSBARHETEN AV IRIS
VID FALL AV ÅLDERSSTARR SAMT I NORMALA
OGON HOS GAMLA PERSONER

AKADEMISK AVHANDLING
AV
J. O. LINDBERG
MEDL. LÄC.

FRAMSTÄLLES MED TILLSTÅND AV MEDICINSKA FAKULTETEN
VID UNIVERSITETET I HELSINGFORS TILL OFFENTLIG GRANSK-
NING I HISTORISK-FILOLOGISKA AUDITORIET DEN 20 MAJ 1917
KL. 10 F. M.

**Εικόνα 1.2: α. Περιγραφή της Ψευδοαποφολίδωσης με χειρόγραφα σχέδια από τον Lindberg[7]. β. Η διδακτορική διατριβή του Lindberg με τα συμπεράσματά του πάνω στην Ψευδοαποφολίδωση το 1917[7].**

Το 1923 ο **Malling** σε δημοσίευσή του συνέδεσε την παρουσία των γκριζόλευκων φολίδων με την ύπαρξη αυξημένης ενδοφθάλμιας πίεσης. Το 1925 ο **Vogt** διαπίστωσε την συσχέτιση ψευδοαποφολίδωσης και αυξημένης ενδοφθάλμιας πίεσης θεωρώντας ότι το ψευδοαποφολιδωτικό υλικό προέρχεται από το πρόσθιο περιφάκιο (Exfoliatio superficiale capsulae anteriotis) και έδωσε τον χαρακτηρισμό «**αποφολιδωτικό γλαύκωμα**». Ο **Busucca** ήταν της άποψης ότι οι φολίδες και ο μεμβρανόμορφος σχηματισμός στην πρόσθια επιφάνεια του φακού, προέρχονται από ουσίες που βρίσκονταν φυσιολογικά στο υδατοειδές υγρό. Το 1937 ο **Hörven** διατύπωσε την άποψη ότι η παρουσία των φολίδων στις ίνες της ζιννείου ζώνης αποτελούσε σταθερό εύρημα του συνδρόμου.

Το 1954 η **Giorgianna Theobald** εξέφρασε την άποψη ότι το γκριζόλευκο υλικό δεν προερχόταν από το περιφάκιο, φαινόμενο που μπορεί να συμβεί σε περιβάλλον με υψηλή θερμοκρασία, αλλά ότι είναι προϊόν εναποθέσεων ή/ και εκκρίσεων στο επίπεδο του προσθίου περιφακίου. Για το λόγο αυτό πρότεινε τον όρο «**ψευδοαποφολίδωση**» σε αντιδιαστολή με την πραγματική αποφολίδωση του περιφακίου που συνέβαινε σε εργαζόμενους παραγωγής υαλικών.

Το 1956 ο **Sunde** μίλησε για **αποφολιδωτικό σύνδρομο** και έρευνες με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κατέδειξαν την παρουσία του υλικού σε διάφορα σημεία του προσθίου ημιμορίου του οφθαλμού. Το 1959 ο **Sampaolesi** μελετώντας τη γωνία (μεταξύ ίριδας και κερατοειδούς) διαπίστωσε την αυξημένη συχνότητα παρουσίας χρωστικής από το μελάγχρου επιθήλιο της ίριδας, άνωθεν της γραμμής του Schwalbe (βρίσκεται στη γωνία οπισθίου θαλάμου). Το 1961 ο **Simon Torr** χρησιμοποίησε τον όρο **σύνθετο χρωστικό γλαύκωμα** με σκοπό να υπογραμμίσει την διαφορά του από το πρωτοπαθές χρωστικό γλαύκωμα. Το 1934 ο **Bertelsen** έκρινε πιο δόκιμη την έκφραση **ινιδοπάθεια του επιθηλίου του προσθίου περιφακίου (fibrillopathia epitheliocapsularis)** για την περιγραφή του νοσήματος.

Από ελληνικής πλευράς, πολλοί είναι οι μελετημένες του συνδρόμου. Στο σημείο αυτό αρχικά θα αναφέρουμε τον **Τράντα** (1932) ο οποίος θεώρησε ότι οι παρατηρούμενες αλλοιώσεις ήταν αποτέλεσμα γεροντικής εκφύλισης και συνέδεσε την παρουσία αυτών των αλλοιώσεων με συνύπαρξη παθολογικών μεταβολών στο αποχετευτικό δίκτυο της γωνίας του προσθίου θαλάμου (Π.Θ.). Στη συνέχεια τους **Ιωαννίδη**, **Κατσουράκη**, **Βελησσαρόπουλο** (1961) οι οποίοι μελέτησαν το αποφολιδωτικό γλαύκωμα, την **Στεφανιώτου** που μελέτησε την επιδημιολογία του Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ στην Ήπειρο και τον **Κώνστα Α.** που ασχολήθηκε κυρίως με την παθογένεια του Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ.

Έως το 1930 μόνο 42 διεθνείς μελέτες σχετικά με την Ψ/Α είχαν δημοσιευτεί ενώ από το 1988 έως και σήμερα οι μελέτες είναι πάνω από 885.

## 1.3 Επιδημιολογία

Ανατρέχοντας κανείς στην βιβλιογραφία θα διαπιστώσει σωρεία αντικρουόμενων απόψεων και δεδομένων ως προς τη συχνότητα εμφάνισης του Ψ/Α.Σ στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές (**πίνακας 1.1**). Αυτό οφείλεται: **1)** σε πραγματικές διαφορές στις συχνότητες, εξαιτίας εθνικών και φυλετικών καθώς και άλλων μη γνωστών παραγόντων, **2)** στη διαφορετική κατανομή των ομάδων ασθενών ως προς την ηλικία και το φύλο, **3)** στα διαφορετικά κλινικά κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διάγνωση του Ψ/Α.Σ, **4)** στην ικανότητα του εξεταστή ιατρού να ανιχνεύσει τα σημεία της πάθησης σε πρώιμα στάδια και **5)** στην σχολαστικότητα του εξεταστή. Επιπλέον, σημαντικό είναι ότι η διάγνωση εύκολα παραβλέπεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10% εάν η εξέταση του ασθενούς δεν γίνει κατόπιν διαστολής της κόρης.

Οι επιδημιολογικές μελέτες έχουν διεξαχθεί πάνω σε διαφορετικούς πληθυσμούς και περιλαμβάνουν γενικό πληθυσμό, άτομα πάνω από μία συγκεκριμένη ηλικία, ασθενείς από οφθαλμολογικές ή γενικές κλινικές, ασθενείς με καταρράκτη, με γλαύκωμα και γλαυκωματικούς ασθενείς που υποβάλλονται σε χειρουργική επέμβαση. Αυτές οι διαφορές έχουν προκαλέσει σύγχυση και πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν όταν συγκρίνονται μελέτες.

Η συχνότητα του Ψ/Α.Σ αυξάνει προοδευτικά στις παρακάτω ομάδες: **1)** γενικό πληθυσμό, **2)** άτομα ηλικίας άνω των 50 χρόνων, **3)** άτομα με οφθαλμική υπερτονία, **4)** ασθενείς με γλαύκωμα, **5)** ασθενείς με γλαύκωμα που εισάγονται στο νοσοκομείο, **6)** ασθενείς με γλαύκωμα που θα υποβληθούν σε χειρουργική επέμβαση, **7)** ασθενείς με απόλυτο γλαύκωμα (τύφλωση από γλαύκωμα) και **8)** ασθενείς με καταρράκτη[5].

**Πίνακας 1.1: Συχνότητα του Ψ/Α.Σ στον γενικό πληθυσμό σε διάφορες εθνότητες.**

| Τοποθεσία | Ηλικία (έτη) | Συχνότητα | Αναφορές |
|---|---|---|---|
| Αυστραλία (Aborigines) | >60 | 16,3% | Taylor και συν. 1977 |
| Αυστραλία (Blue Mountain) | >48 | 2,3% | Mitchell και συν. 1999[37] |
| Αυστραλία (Victoria) | >39 | 0,98% | Mccarty & Taylor 2000 |
| Κεντρική Σουηδία | 65-74 | 18,0% | Ekström 1987 |
| Βόρεια Σουηδία | 66 | 23,0% | Aström και συν. 2007 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Βόρεια Σουηδία | 87 | 61,0% | Aström και συν. 2007 |
| Ισλανδία (Reykjavik) | >49 | 10,3% | Jonasson και συν. 2003[14] |
| Ισλανδία (Reykjavik Eye Study) | 50-59<br>≥80 | 2,5%<br>40,6% | Arnarsson και συν. 2007 |
| Κεντρική Νορβηγία | >64 | 16,9% | Ringvold και συν. 1988 |
| Φιλανδία (Oulu) | >70 | 22,1% | Hirvelä και συν. 1995 |
| Ιαπωνία | >39 | 1,2% | Futa και συν. 1992 |
| Κεντρικό Ιράν | >49 | 13,1% | Nouri-Mahdavi και συν. 1999 |
| Νότια Ινδία | >39 | 6,0% | Krishnadas και συν. 2003 |
| Chinese Singaporean | >39 | 0,2% | Foster & Seah 2005 |
| Νότια Αφρική (Hlabisa/Temba) | >39 | 7,7/6,0% | Rotchford και συν. 2003 |
| Ελλάδα (Ήπειρος) | >50 | 24,3% | Stefaniotou και συν. 1990[8] |
| Ελλάδα (Κρήτη) | >39 | 16,1% | Kozobolis και συν. 1997[9] |
| Ελλάδα (Θεσσαλονίκη) | 55-59 | 5,4% | Bufidis 1998 |

### 1.3.1 Συχνότητα στο γενικό πληθυσμό

Το Ψ/Α.Σ απαντάται σε όλες τις γεωγραφικές περιοχές του κόσμου με ποσοστά συχνότητας τα οποία ποικίλουν από 10%-20% περίπου (ηλικία ατόμων 60 και άνω). Αυτό που πρέπει πάλι να σημειωθεί είναι ότι τα αναφερόμενα ποσοστά συχνότητας του Ψ/Α.Σ σε μία γεωγραφική περιοχή εξαρτώνται από τον εξεταστή. Συνεπώς, οι πιο αξιοσημείωτες συγκρίσεις είναι αυτές που έγιναν μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών από τον ίδιο εξεταστή. Ο **Aasved** βρήκε ποσοστά συχνότητας: 6,3%, 4%, 4,7% σε άτομα ηλικίας άνω των 60 ετών, τα οποία φιλοξενούνταν σε οίκους ευγηρίας στην Νορβηγία, Αγγλία και Γερμανία αντίστοιχα. Ο **Forsius** εξετάζοντας ασθενείς ηλικίας άνω των 60 ετών διαφορετικών πληθυσμών, βρήκε ποσοστά συχνότητας που ανέρχονταν από 0% σε Εσκιμώους της Γροιλανδίας έως 20% σε Ισλανδούς. Ο **Lantuκh** βρήκε χαμηλά ποσοστά συχνότητας σε γηγενείς της Σιβηρίας αλλά πολύ υψηλά ποσοστά συχνότητας σε εσωτερικούς μετανάστες της περιοχής. Στις Η.Π.Α τα αναφερόμενα ποσοστά συχνότητας του Ψ/Α.Σ είναι παρόμοια με αυτά της Δυτικής Ευρώπης. Στην Framingham Eye Study, η συχνότητα σε γενικό πληθυσμό ήταν 0,6% (ηλικία ατόμων 52-64) και 5% (ηλικία ατόμων 75-84). Τα ποσοστά σε Καυκάσιο πληθυσμό στις νότιες ΗΠΑ ήταν χαμηλότερα: η συχνότητα ήταν μόνο 1,6% σε 2121 άτομα γενικού πληθυσμού άνω των 60 ετών. Οι Αφροαμερικάνοι είχαν χαμηλότερα ποσοστά συχνότητας σε σύγκριση με τους Καυκάσιους[5].

Το Ψ/Α.Σ απαντάται συχνά στην Ελλάδα. Στην Ήπειρο, η Στεφανιώτου και άλλοι συνεργάτες μελέτησαν τη συχνότητα εμφάνισης του Ψ/Α.Σ. Σε 700 ασθενείς (εκ των οποίων μία ομάδα νοσοκομειακού και μία ομάδα γενικού πληθυσμού) ηλικίας άνω ή ίσης των 50 ετών, βρέθηκαν τα εξής: Ψ/Α.Σ στο 24,3%, η συχνότητα εμφάνισης αυξήθηκε προοδευτικά με την ηλικία, διαφορά μεταξύ των δύο φύλων δεν παρατηρήθηκε ενώ οφθαλμική υπερτονία (μεγάλη ενδοφθάλμια πίεση) βρέθηκε στο 39,5% των ασθενών[8].

Η συχνότητα μπορεί επίσης να ποικίλει στην ίδια ευρύτερη γεωγραφική περιοχή, σε όμοιο περιβάλλον και σε κοντινές αποστάσεις. Στους τέσσερις νομούς της Κρήτης, ο Κοζομπόλης[9] και οι συνεργάτες του βρήκαν Ψ/Α.Σ σε ποσοστό από 11,5% έως 27% σε άτομα ηλικίας άνω των 40. Ο Ringvold[10] βρήκε ποσοστά από 10,2%, 19,6%, και 21% σε τρεις συνορεύοντες δήμους στην Νορβηγία. Στο Νέο Μεξικό, οι Ισπανοαμερικανοί έχουν έξι φορές παραπάνω πιθανότητα να αναπτύξουν Ψ/Α.Σ σε σχέση με τους μη Ισπανοαμερικανούς. Στην Αυστραλία άτομα προερχόμενα από την Ελλάδα, τις Βόρειες χώρες και την Ινδία βρέθηκε ότι ήταν πιο πιθανό να πάσχουν από Ψ/Α.Σ.

Τα αίτια για τις πραγματικές διαφορές στις συχνότητες ανάμεσα σε παρόμοιας ηλικίας γεωγραφικούς και εθνικούς πληθυσμούς παραμένουν άγνωστα αλλά φαίνεται να αφορούν στην γενετική ποικιλομορφία του συνδρόμου ή και στις περιβαλλοντικές επιδράσεις[4, 11].

#### 1.3.1.1 Ηλικία

Απ' όλες τις μελέτες αποδεικνύεται ότι η συχνότητα του Ψ/Α.Σ αυξάνεται με την ηλικία. Επίσης, ασθενείς με Ψ/Α.Σ και γλαύκωμα τείνουν να είναι μεγαλύτεροι ηλικιακά από τους ασθενείς με Ψ/Α.Σ χωρίς γλαύκωμα. Ο Forsius ανακάλυψε ότι η συχνότητα του Ψ/Α.Σ διπλασιάζεται για κάθε δεκαετία μετά την ηλικία των 50 ετών[12].

#### 1.3.1.2 Φύλο

Σε κάποιες μελέτες οι γυναίκες φαίνεται να εμφανίζουν πιο συχνά Ψ/Α.Σ ενώ σε άλλες βρέθηκε ίδια κατανομή στα δύο φύλα ή συχνότερη εμφάνιση στους άντρες. Παρόλ' αυτά, το γλαύκωμα μπορεί να αναπτύσσεται συχνότερα και σε σοβαρότερο βαθμό στους άντρες[5, 12].

### 1.3.2 Συχνότητα σε γλαυκωματικό πληθυσμό

Η συχνότητα του Ψ/Α.Σ σε γλαυκωματικούς ασθενείς είναι σημαντικά υψηλότερη από ότι σε μη γλαυκωματικούς ασθενείς της ίδιας ηλικίας. Στην Ισλανδία τα ποσοστά συχνότητας ποικίλουν από 46-57%, στην Φιλανδία από 28%-47%, στην Νορβηγία από 33%-60%, στην Σουηδία 66% και στην Δανία 26%. Στην Ιρλανδία τα 2/3 των ασθενών με γλαύκωμα ανοιχτής γωνίας είχαν Ψ/Α.Σ[13, 14, 15]. Προκύπτει μία υψηλότερη συχνότητα Ψ/Α.Σ σε πληθυσμούς κελτικής προέλευσης. Ακόμα πιο αποκαλυπτικές είναι οι μελέτες που αποδεικνύουν ότι το Ψ/Α.Σ απαντάται σε γεωγραφικές περιοχές με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης απ' ότι προηγουμένως υποψιάζονταν. Αυτό ισχύει ιδίως για χώρες της Αφρικής και της Ασίας. Στην Αμερική, τρεις μελέτες αναφέρουν ποσοστό 12% σε γλαυκωματικούς ασθενείς, με συχνότητα χαμηλότερη στον νότο και στους Αφροαμερικανούς[5, 11]. Σε μερικούς πληθυσμούς (βαλτικούς, μεσόγειους και αραβικούς) η συχνότητα του Ψ/Α.Γ μπορεί να ξεπεράσει αυτή του ΠΓΑΓ. Για παράδειγμα το Ψ/Α.Σ ευθύνεται για το 77% των περιπτώσεων χρόνιου γλαυκώματος ανοιχτής γωνίας στην ανατολική περιοχή της Αραβικής Χερσονήσου[16].

### 1.3.3 Το γλαύκωμα σε ασθενείς με Ψ/Α.Σ

Το γλαύκωμα απαντάται πιο συχνά σε άτομα με Ψ/Α.Σ σε σύγκριση με άτομα χωρίς Ψ/Α.Σ (**πίνακας 1.2**). Ο Kozart και ο Vanoff σε 100 ασθενείς με Ψ/Α.Σ βρήκαν γλαυκωματικές αλλοιώσεις στο οπτικό νεύρο ή βλάβες στα οπτικά πεδία στο 7% και οφθαλμική υπερτονία στο 15%. Το Ψ/Α.Σ ήταν μονόπλευρο στο 76% των ασθενών και ετερόπλευρο στο 24%.

Ο Aasved βρήκε υψηλή ΕΟΠ με ή χωρίς γλαύκωμα στο 22,7% των ασθενών με Ψ/Α.Σ ενώ αντίστοιχα μόνο στο 1,2% των ατόμων χωρίς Ψ/Α.Σ. Ανάλογα ο Ringvold βρήκε το ποσοστό να είναι 30% και 4,8% αντίστοιχα ενώ ο Κοζομπόλης 28,8% και 5,4% αντίστοιχα στην Κρήτη. Παρόμοιες μελέτες υπάρχουν σε χώρες στην Ευρώπη, Μέση Ανατολή, Αυστραλία και Ιαπωνία[5].

Σε ασθενείς με Ψ/Α.Σ ο κίνδυνος ανάπτυξης γλαυκώματος είναι αθροιστικός με το πέρασμα του χρόνου. Ο Henry και άλλοι βρήκαν ότι ο αθροιστικός κίνδυνος σε οφθαλμούς μη γλαυκωματικούς με Ψ/Α.Σ να αναπτύξουν γλαύκωμα σε 5 και σε 10 χρόνια να είναι 5,3 ±0,1% και 15,4±2% αντίστοιχα[17]. Ο Jeng και οι συνεργάτες του, σε μία καθορισμένη γεωγραφική περιοχή, βρήκαν το 16% των ασθενών με Ψ/Α.Σ να πάσχει από γλαύκωμα κατά την διάγνωση, ενώ από τους υπόλοιπους ασθενείς το 44% ανέπτυξε γλαύκωμα μέσα

σε 15 έτη. Παρόλ' αυτά, υπάρχουν και ασθενείς με Ψ/Α.Σ που παρακολουθήθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα και όμως δεν ανέπτυξαν γλαύκωμα[18].

**Πίνακας 1.2: Συχνότητα Ψ/Α.Γ σε ασθενείς με Ψ/Α.Σ.**

| Τοποθεσία | Ηλικία (έτη) | Συχνότητα | Αναφορές |
|---|---|---|---|
| Αυστραλία (Blue Mountain) | >48 | 14,2% | Mitchell και συν. 1999 |
| Βόρεια Σουηδία | 66 | 2,1% | Aström και συν. 2007 |
| Κεντρική Σουηδία | >45 | 0,9% | Ekstrom & Haglund 1991 |
| Κεντρική Νορβηγία | >64 | 5,0% | Ringvold και συν. 1991 |
| Φιλανδία (Oulu) | >70 | 5,0% | Hirvelä και συν. 1994 |
| Ισλανδία (Reykjavik) | >49 | 12,0% | Jonansson και συν. 2003[14] |
| Νότια Ινδία | >39 | 7,5% | Krishnadas και συν. 2003 |
| Νότια Αφρική (Hlabisa/Temba) | >39 | 2,3/2,8% | Rotchford και συν. 2003 |
| Ελλάδα (Κρήτη) | >39 | 4,5% | Kozobolis και συν. 2000 |

### 1.3.4 Ασυμμετρία εκδήλωσης

Κατά την διάγνωσή του το Ψ/Α.Σ είναι συνήθως ιστοπαθολογικά αμφοτερόπλευρο με ασύμμετρες κλινικές εκδηλώσεις. Στην πλειοψηφία τους οι οφθαλμοί χωρίς κλινική εκδήλωση παρουσιάζουν πρώιμα σημεία της πάθησης.

Υπάρχουν μελέτες στις οποίες φαίνεται να είναι πιο συχνή η αμφοτερόπλευρη εμφάνιση του Ψ/Α.Σ και σε άλλες η μονόπλευρη. Οι ασθενείς με αμφοτερόπλευρο Ψ/Α.Σ είναι συνήθως μεγαλύτερης ηλικίας σε σχέση με αυτούς που έχουν μονόπλευρο Ψ/Α.Σ. Επίσης, οι ασθενείς με αμφοτερόπλευρη πάθηση τείνουν να έχουν σε μεγαλύτερο ποσοστό οφθαλμική υπερτονία ή γλαύκωμα σε σχέση με αυτούς με μονόπλευρη. Σε ασθενείς με αμφοτερόπλευρο Ψ/Α.Σ υπάρχει η τάση το γλαύκωμα να αναπτύσσεται ταυτόχρονα και στους δύο οφθαλμούς ή σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Όταν εμπλέκεται μόνο ο ένας οφθαλμός, ο άλλος οφθαλμός συχνά παρουσιάζει γλαυκωματικές αλλοιώσεις οι οποίες όταν υπάρχουν είναι σχεδόν πάντα λιγότερο σοβαρές απ' ότι στον εμπλεκόμενο οφθαλμό. Παρόλ' αυτά, κλινικά ασύμμετρη εκδήλωση είναι πρόδρομος αμφοτερόπλευρης εκδήλωσης. Υπάρχουν αντιφατικές μελέτες ως προς την εξέλιξη των εκδηλώσεων. Σε ασθενείς με μονόπλευρη πάθηση, ο Tarkkanen βρήκε ότι μέσα σε 5 χρόνια δεν υπήρχε εκδήλωση Ψ/Α.Σ στον άλλο οφθαλμό ενώ οι Hansen και Sellevold βρήκαν ότι στο ίδιο χρονικό διάστημα η νόσος εκδηλώθηκε στον άλλο οφθαλμό σε ποσοστό 40,8% και 31% σε άντρες και γυναίκες αντίστοιχα. Αντίθετα ο Aasved βρήκε ότι το 43% ανέπτυξε αμφοτερόπλευρο Ψ/Α.Σ μέσα σε 7 χρόνια. Τέλος, ο Henry βρήκε την πιθανότητα ανάπτυξης Ψ/Α.Σ στον άλλο οφθαλμό να είναι 6,8% και 16,8% μέσα σε 5 και σε 10 χρόνια αντίστοιχα[5].

**Εικόνα 1.3: Η αντιλαμβανόμενη από γλαυκωματικό ασθενή εικόνα (σαν μέσα από τούνελ) (https://www.23andme.com).**

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

# ΚΛΙΝΙΚΑ, ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ Ψ/Α.Σ ΚΑΙ Ψ/Α.Γ

## 2.1 Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις Ψ/Α.Σ ΚΑΙ Ψ/Α.Γ

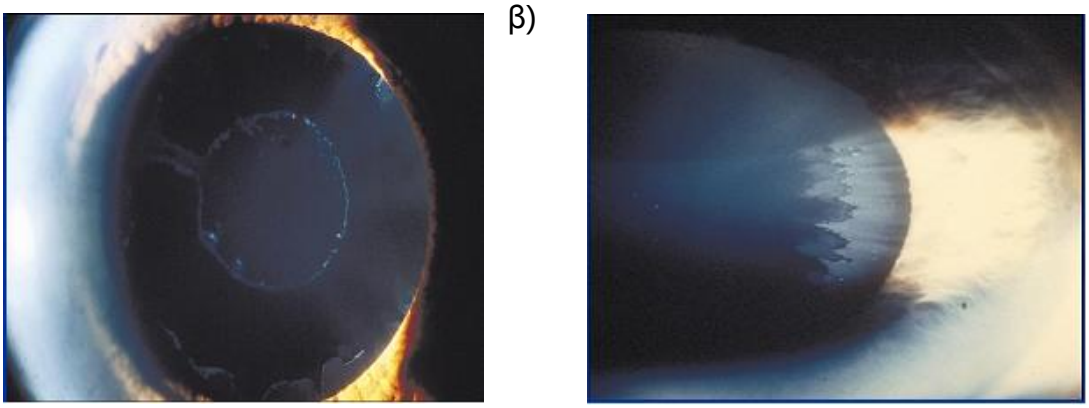
Οι οφθαλμικές εκδηλώσεις του Ψ/Α.Σ επηρεάζουν όλες τις δομές του προσθίου ημιμορίου (anterior segment) και οδηγούν σε ένα ευρύ φάσμα από αυτόματες και ενδοχειρουργικές οφθαλμολογικές επιπλοκές όπως η μετατόπιση του φακού, η ρήξη της ζιννείου ζώνης, η κατάργηση του αιματοοφθαλμικού φραγμού, η διασπορά χρωστικής, ο σχηματισμός οπίσθιων συνεχειών, οίδημα στον κερατοειδή (endothelial decompensation), το δευτεροπαθές γλαύκωμα ανοιχτής γωνίας (Ψ/Α.Γ) και το δευτεροπαθές γλαύκωμα κλειστής γωνίας[3]. Η αναγνώριση των οφθαλμικών εκδηλώσεων είναι σημαντική για κάθε οφθαλμίατρο ώστε να αντιληφθεί τον κίνδυνο για Ψ/Α.Γ και των πιθανών επιπλοκών κατά την διάρκεια του χειρουργείου (συνοπτικός **πίνακας 2.1**).

### 2.1.1 Ο φακός

Οι εναποθέσεις γκριζόλευκου υλικού στην πρόσθια επιφάνεια του φακού (lens) είναι το πιο σταθερό και σημαντικό διαγνωστικό χαρακτηριστικό του Ψ/Α.Σ. Η εξέταση κατόπιν μυδρίασης είναι σημαντική για την ακριβή διάγνωση του συνδρόμου. Η κλασσική εικόνα περιλαμβάνει τις εξής τρεις ζώνες που εκτιμώνται καλύτερα μετά από διαστολή της κόρης: **1)** έναν σχετικά ομοιογενή κεντρικό δίσκο με διάμετρο σχεδόν ανάλογη ή και ελαφρώς μικρότερη από αυτή της κόρης (pupil), **2)** μία κοκκιώδης περιφερική ζώνη (συχνά με οπές ή πριονωτή) και **3)** μία διαυγής ζώνη ανάμεσά τους[19] (**εικόνα 2.1α**).

Ο κεντρικός δίσκος έχει διάμετρο που ποικίλει από 1,5-3 mm και παρατηρείται καλύτερα με πλάγια δέσμη φωτός μετά από διαστολή της κόρης αφού τα όριά του μπορεί να κρύβονται πίσω από αυτά της ίριδας. Στο 10%-20% περίπου των περιπτώσεων ο κεντρικός δίσκος μπορεί να απουσιάζει. Μικρότερος κεντρικός δίσκος μπορεί να υπάρχει σε περίπτωση χρόνιας μύσης (συστολής) της κόρης και μεγαλύτερος σε περίπτωση χρόνιας διαστολής της κόρης. Για να ανιχνεύσει κανείς τα πρώιμα στάδια αυτού του σημείου στη σχισματοειδή λυχνία, η δέσμη φωτός θα πρέπει να τοποθετηθεί $45^{O}$ από το άξονα της παρατήρησης, η ένταση του φωτός θα πρέπει να είναι μειωμένη και η εστίαση να γίνεται 2-3 mm από το κέντρο του φακού[19, 20].

α) β)



**Εικόνα 2.1: α. Κλασσική εικόνα φακού οφθαλμού με Ψ/Α.Σ. Διακρίνονται οι χαρακτηριστικές τρεις ζώνες καθώς και μία εναπομείνουσα γέγυρα Ψ/Α υλικού που εκτείνεται στη διαυγή ζώνη[5]. β. Κοκκιώδης περιφερική ζώνη[5].**

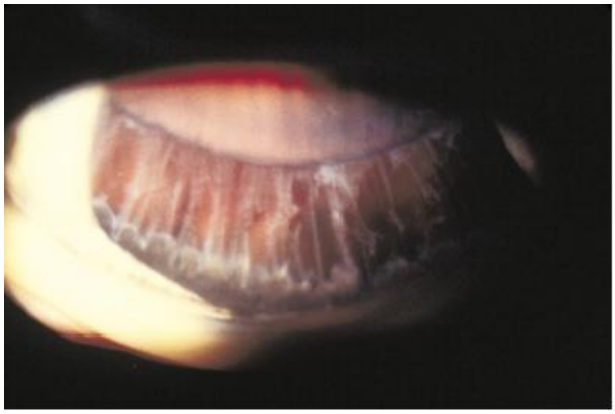
Η κοκκιώδης περιφερική ζώνη είναι το πιο αξιόπιστο σημείο για την διάγνωση του Ψ/Α.Σ. Γενικά, παρουσιάζει ένα σαφές εσωτερικό όριο και συχνά εμφανίζεται πριονωτή (**εικόνα 2.1β**).

Η διαυγής ζώνη ανάμεσά τους δημιουργείται από τον καθαρισμό της ίριδας πάνω στην επιφάνεια του φακού εξαιτίας της συνεχούς κίνησης της κόρης που μηχανικά καθαρίζει το Ψ/Α υλικό από τον φακό.

### 2.1.2 Αστάθεια ζιννείου ζώνης και φακοδόνηση

Η **φακοδόνηση** (**phacodonesis**), η οποία οφείλεται στην βλάβη των ινών της **ζιννείου ζώνης** (**zonules**) που συγκρατούν τον φακό στην θέση του, είναι μία από τις κύριες αιτίες που προδιαθέτουν στην αύξηση των επιπλοκών κατά την διάρκεια της επέμβασης του καταρράκτη.

Η αυτόματη απεξάρθρωση, μερική ή ολική, μπορεί να αποτελέσει συνέπεια αυτού. Το Ψ/Α υλικό εντοπίζεται στη ζίννειο ζώνη ήδη από τα πρώιμα στάδια της πάθησης. Οι ίνες της ζιννείου ζώνης (**κρεμαστήριοι σύνδεσμοι**, **suspensory ligaments**) διαχωρίζονται από τις προσφήσεις τους στο **ακτινωτό σώμα** (**ciliary body**) και δημιουργούν την χαρακτηριστική κατώτερη μετατόπιση του φακού (**εικόνα 2.2**).



**Εικόνα 2.2: Πυκνή συσσώρευση Ψ/Α υλικού στην ζίννειο ζώνη και το ακτινωτό σώμα. Οι ίνες είναι αλλοιωμένες, κομματιασμένες ή και απούσες σε κάποιες περιοχές. Οι επιπλοκές κατά την διάρκεια της επέμβασης για την αφαίρεση του καταρράκτη είναι περισσότερο αυξημένες σε σχέση με τους φυσιολογικούς οφθαλμούς[5].**

Η φακοδόνηση είναι συχνή αν και δεν συνοδεύεται πάντα από ιριδοδόνηση και αυτό μπορεί να οφείλεται στην σκλήρυνση της ίριδας. Η πρόσθια μετακίνηση του φακού λόγω της αστάθειας της ζιννείου ζώνης μπορεί να προδιαθέσει σε **κορικό αποκλεισμό** (**pupillary block**), κυρίως σε επικλινή θέση του σώματος.

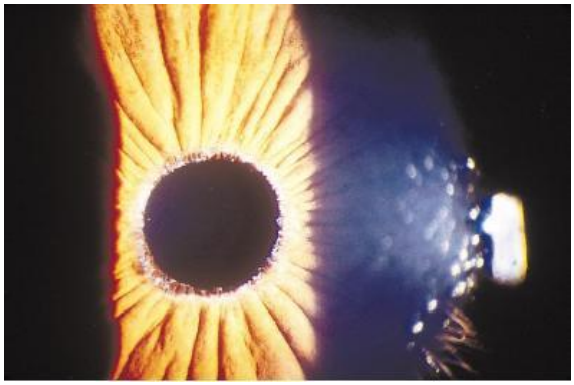
### 2.1.3 Καταρράκτης στο Ψ/Α.Σ

Υπάρχουν πολλές αποδείξεις που υποστηρίζουν την αιτιολογική σύνδεση του Ψ/Α.Σ με τον **καταρράκτη** (**cataract**)[16, 21]. Το μελάγχρουν επιθήλιο της ίριδας και η επιφάνεια του φακού, και τα δύο με εναποθέσεις Ψ/Α υλικού, τείνουν να συμφύονται (**οπίσθιες συνέχειες**, **posterior synechiae**) κυρίως όταν η κόρη βρίσκεται σε μύση λόγω θεραπείας (**εικόνα 2.3**). Το μικρό μέγεθος της κόρης είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου απώλειας υαλώδους κατά την διάρκεια της επέμβασης του καταρράκτη. Η ρήξη της ζιννείου ζώνης δεκαπλασιάζει τον κίνδυνο μετατόπισης του φακού[22, 23]. Έντονη διαστολή της κόρης μπορεί να προκαλέσει σύμφυση ολόκληρου του μελάγχρου επιθηλίου της ίριδας πάνω στην επιφάνεια του φακού[24, 25].

**Εικόνα 2.3: Συμφήσεις μεταξύ κορικού χείλους και πρόσθιας επιφάνειας του φακού κατόπιν φαρμακευτικής μυδρίασης[5].**

### 2.1.4 Ίριδα και κόρη

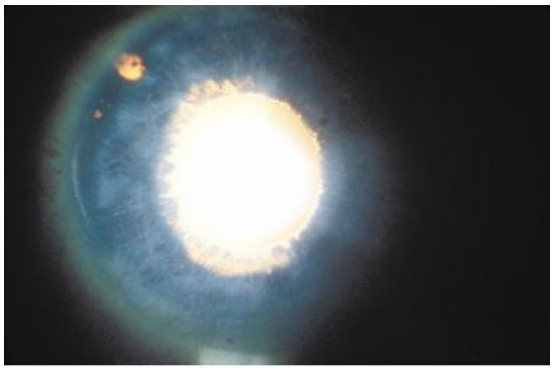
Οι διαταραχές της **ίριδας** (**iris**) είναι πρώιμες και χαρακτηριστικές στο Ψ/Α.Σ. Η ύπαρξη Ψ/Α υλικό είναι προεξέχουσα στο **κορικό χείλος** (**pupillary margin**) και θα μπορούσε να υποδείξει την διάγνωση του Ψ/Α.Σ ακόμα και πριν από την μυδρίαση[26]. Από την τριβή της ίριδας πάνω στον φακό προκαλείται ρήξη των κυττάρων του μελάγχρου επιθήλιου της ίριδας στην περιοχή του κορικού χείλους και του σφιγκτήρα της κόρης και διασπορά της χρωστικής στον **πρόσθιο θάλαμο** (**anterior chamber**), το οποίο είναι κλινικό σημείο στο Ψ/Α.Σ (**εικόνα 2.4**).



**Εικόνα 2.4: Εκτεταμένες εναποθέσεις Ψ/Α υλικού. Κατά τόπους ατροφία του κορικού χείλους[5].**

Η απελευθέρωση και διασπορά της χρωστικής οδηγεί σε ελλείμματα στην διαφανοποίηση της ίριδας στην περιοχή του σφικτήρα του κορικού χείλους, εναπόθεση της χρωστικής στην επιφάνεια της ίριδας και αύξηση της χρωστικής στον **διηθητικό ηθμό** (**trabecular meshwork**) (**εικόνα 2.5**). Ο κορικός αποκλεισμός μπορεί σπανίως να συμβεί εξαιτίας του συνδυασμού οπισθίων συνεχειών, αύξησης του πάχους και της σκληρότητας της ίριδας ή και της πρόσθιας μετακίνησης του φακού.

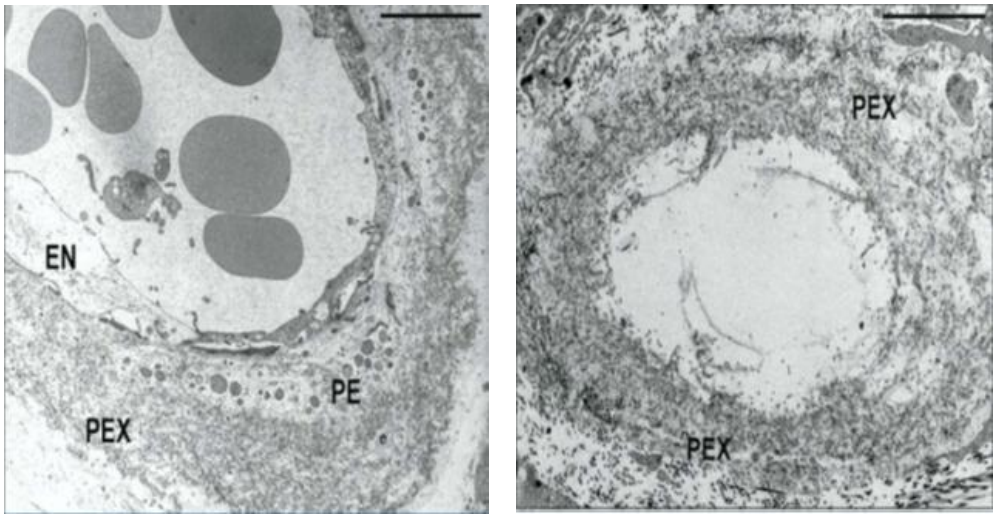
Οι οφθαλμοί με Ψ/Α.Σ εμφανίζουν πιο συχνή προδιάθεση για χρόνιο γλαύκωμα κλειστής γωνίας από ότι για οξύ γλαύκωμα κλειστής γωνίας. Η ανάπτυξη οπίσθιων συνεχειών προδιαθέτει σε δευτεροπαθές γλαύκωμα κλειστής γωνίας όταν ακολουθείται αγωγή με φάρμακα που προκαλούν μύση. Χρόνια κλειστή γωνία μπορεί να αναπτυχθεί σε οφθαλμούς που αρχικά είχαν ευρέως ανοιχτή γωνία, μετά από πολλά χρόνια με αγωγή και με μυοτικά φάρμακα, η οποία μπορεί να ενισχυθεί και από τη αστάθεια της ζιννείου ζώνης[27].



**Εικόνα 2.5: Ελλείμματα στην διαφανοποίηση της ίριδας στην περιοχή του σφικτήρα του κορικού χείλους σε οφθαλμό με γλαύκωμα κλειστής γωνίας και Ψ/Α.Σ. Μία laser ιριδετομή εμφανίζεται στην ενδεκάτη ώρα[5].**

Στο Ψ/Α.Σ, τα αιμοφόρα αγγεία της ίριδας παρουσιάζουν συχνά μείωση της διαμέτρου του αυλού και μπορεί να χάσουν την λειτουργικότητά τους καθώς στα προχωρημένα στάδια τα κύτταρα του τοιχώματος των αγγείων μπορούν να εκφυλιστούν ολοκληρωτικά (**εικόνα 2.6**).

Στη φλουροαγγειογραφία των αγγείων της ίριδας είναι δυνατόν να παρατηρηθεί διαρροή χρωστικής στο κορικό χείλος καθώς επίσης και μικρονεαγγείωση (ελαφρότερη μορφή νεοαγγείωσης συγκρινόμενη με αυτή που απαντάται στο νεοαγγειακό γλαύκωμα). Όλες αυτές οι διαταραχές του αγγειακού δικτύου της ίριδας οδηγούν σε μειωμένη αιμάτωση της ίριδας που προκαλεί ατροφία του μελάγχρου επιθηλίου και έχει ως συνέπεια την εναπόθεση χρωστικής στην πρόσθια επιφάνεια της ίριδας και κατάργηση του αιματοφθαλμικού φραγμού (pseudouveitis), υπόγεια του προσθίου ημιμορίου και αιμορραγίες στο στρώμα της ίριδας.




**Εικόνα 2.6: Αλλοιώσεις των αγγείου της ίριδας στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Αριστερά: Περιαγγειακή συγκέντρωση Ψ/Α (PEX) υλικού και εκφυλιστική αλλοίωση των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων (EN) και των περικυττάρων (PE). Δεξιά: «Αγγεία φαντάσματα» στα οποία ίνες Ψ/Α υλικού (PEX) περιβάλουν ολοκληρωτικά τα κύτταρα των τοιχωμάτων των αγγείων[6].**

Η μυδρίαση της κόρης είναι ελαττωματική και αυτό πιθανώς να οφείλεται εν μέρει στην ατροφία και στην εκφύλιση των μυϊκών κυττάρων της ίριδας[27].

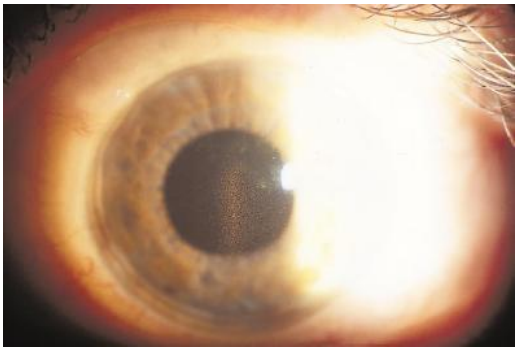
Η εναπόθεση χρωστικής στην επιφάνεια της ίριδας είναι συχνή αλλά σπανίως παρατηρείται. Η ανίχνευσή της πρέπει να αφυπνίσει τον εξεταστή για πιο προσεκτική αναζήτηση κλινικών σημείων του Ψ/Α.Σ.

Η χρωστική εναποτίθεται ομοιόμορφα πάνω στην επιφάνεια της ίριδας σε αντίθεση με την εναπόθεση στις κρύπτες της ίριδας που έχουμε στο σύνδρομο διασποράς χρωστικής. Το Ψ/Α υλικό προδιαθέτει στο σχηματισμό συνεχειών ανάμεσα στο μελάγχρου επιθήλιο της ίριδας και το πρόσθιο περιφάκιο του φακού ακόμα και σε απουσία αγωγής με μυοτικά φάρμακα[28]. Μικρά σωματίδια χρωστικής μπορούν να φανούν στο υδατοειδές υγρό σε οφθαλμούς χωρίς μυδρίαση. Η διασπορά χρωστικής είναι άφθονη κατόπιν μυδρίασης και σε άτομα με Ψ/Α.Σ είναι πιο συχνή και πιο σημαντική απ' ότι σε άτομα με ΠΓΑΓ[29].

Σημαντική αύξηση της ΕΟΠ μπορεί να συμβεί σε οφθαλμούς με Ψ/Α.Σ μετά από μυδρίαση και υπάρχει μία θετική συσχέτιση μεταξύ της έκτασης της αύξησης της ΕΟΠ και της ποσότητας της χρωστικής που απελευθερώθηκε[30]. Συμπερασματικά, σε ασθενείς με Ψ/Α.Σ που υποβάλλονται σε μυδρίαση θα πρέπει πάντα να ελέγχεται η ΕΟΠ.

### 2.1.5 Κερατοειδής

Οι φολίδες του Ψ/Α υλικού μπορεί να παρουσιαστούν στο ενδοθήλιο του **κερατοειδούς** (**cornea**). Υπάρχει περίπτωση να υπάρχει μία διάχυτη, μη ειδική εναπόθεση χρωστικής στο κεντρικό ενδοθήλιο που μπορεί να έχει την μορφή ατράκτου του Krukenberg (**εικόνα 2.7**). Ο αριθμός των ενδοθηλιακών κυττάρων μειώνεται σε οφθαλμούς με Ψ/Α.Σ ενώ το κεντρικό πάχος του κερατοειδούς μπορεί να αυξηθεί. Αυτό ίσως αντανακλά σε μία πρώιμη **δυσλειτουργία του κερατοειδούς**[26] (**corneal decompensation**) ακόμα και σε μικρές αυξήσεις της ΕΟΠ ή κατόπιν επέμβασης καταρράκτη. Οι εναποθέσεις μπορούν λανθασμένα να θεωρηθούν ως φλεγμονώδη ιζήματα. Πιο συχνά μία κυματοειδής γραμμή χρωστικής παρατηρείται πάνω από την γραμμή του Schwalbe κυρίως κατά την 6$^{η}$ ώρα και σε μεγάλο ποσοστό (90%)[31].



**Εικόνα 2.7: Εναπόθεση χρωστικής στον κερατοειδή που μοιάζει με άτρακτο του Krukenberg. Στο Ψ/Α.Σ η εναπόθεση στον κερατοειδή είναι περισσότερο διάχυτη σε σύγκριση με το σύνδρομο διασποράς χρωστικής[5].**

### 2.1.6 Επιπεφυκότας

Κλινικά ο **επιπεφυκότας** (**conjunctiva**) δεν φαίνεται να επηρεάζεται στο Ψ/Α.Σ. Παρόλ' αυτά, Ψ/Α υλικό μπορεί να ανιχνευθεί κατόπιν βιοψίας του επιπεφυκότα ενώ φλουοροαγγειογραφική μελέτη μπορεί να δείξει απώλεια της φυσιολογικής αγγείωσης (limbal vascular pattern), συμφόρηση των προσθίων ακτινοειδών αγγείων και πιθανή νεοαγγείωση.

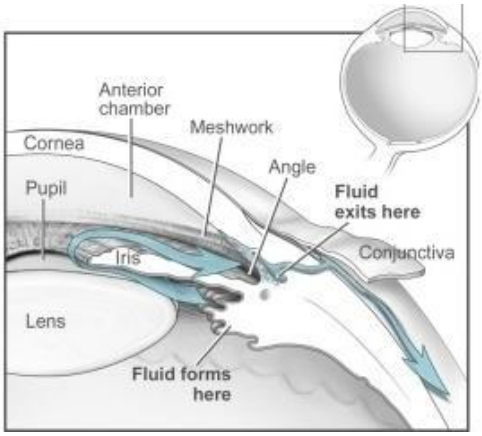
### 2.1.7 Ακτινωτό σώμα

Ψ/Α υλικό μπορεί επίσης να παρατηρηθεί στις **ακτινοειδείς προβολές** (**ciliary processes**) και στα ινίδια της ζιννείου ζώνης, χρησιμοποιώντας μία τροποποιημένη μέθοδο γωνιοσκόπησης γνωστή και ως κυκλοσκοπία. Όταν τα ινίδια είναι επικαλυμμένα

από Ψ/Α υλικό ή έχουν αντικατασταθεί πλήρως από αυτό, είναι ασθενή ή/και κατεστραμμένα[32]. Αυτό προδιαθέτει στην απεξάρθρωση του φακού και σε επιπλοκές κατά την χειρουργική επέμβαση του καταρράκτη. Μη φυσιολογική προσκόλληση των ινιδίων στο φακό ή στο ακτινωτό σώμα (ciliary body) μπορεί να εξηγήσει επαρκώς την εμφάνιση απεξάρθρωσης ή μετατόπισης του φακού.

### 2.1.8 Πρόσθιος θάλαμος (anterior chamber) και γωνία (angle) πρόσθιου θαλάμου

Στο Ψ/Α.Σ είναι χαρακτηριστική η εναπόθεση χρωστικής στη γραμμή του Schwalbe και μερικές φορές εμφανίζεται σαν κυματοειδής γραμμή πάνω από τη γραμμή του Schwalbe (Sampaolesi's line). Η παραγωγή Ψ/Α υλικού από τα κύτταρα του διηθητικού ηθμού και από τα κύτταρα του καναλιού του Schlemm προκαλεί εκφυλιστικές αλλοιώσεις στους παρακείμενους (juxtacanalicular) ιστούς. Η αύξηση της χρωστικής στον διηθητικό ηθμό στο Ψ/Α.Σ τείνει να είναι λιγότερο διακριτή απ' ότι η πυκνή και ομοιογενής εναπόθεση χρωστικής στον διηθητικό ηθμό στο σύνδρομο διασποράς χρωστικής. Κλινικά ο βαθμός της χρωστικής στο Ψ/Α.Σ φαίνεται να συνδέεται με τη σοβαρότητα του γλαυκώματος[33] (**εικόνα 2.8**).



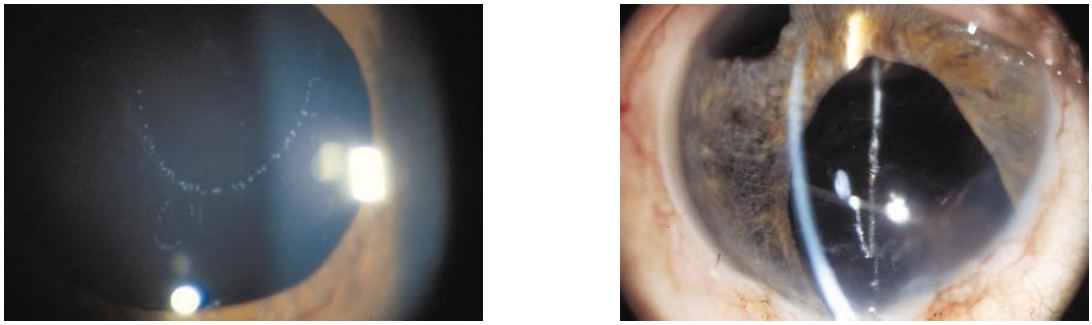

**Εικόνα 2.8: Μετακίνηση του υδατοειδούς υγρού (aqueous humor) από τον οπίσθιο στον πρόσθιο θάλαμο (https://www.23andme.com).**

### 2.1.9 Υαλώδες σώμα (vitreous body) και αμφιβληστροειδής (retina)

Ψ/Α υλικό μπορεί επίσης να φανεί στην πρόσθια επιφάνεια του **υαλοειδούς** (**vitreous body**) μετά από επέμβαση καταρράκτη, κατόπιν ρήξης της υαλοειδικής επιφάνειας (**εικόνα 2.9α**). Είναι δυνατή η παρουσία Ψ/Α υλικού στο οπίσθιο περιφάκιο και σε ενδοφακούς (φακοί που μπαίνουν μετά από επέμβαση με σκοπό την αντικατάσταση του

καταρρακτικού φακού) δείχνοντας ότι ο κρυσταλοειδής φακός δεν είναι απαραίτητος για τον σχηματισμό του Ψ/Α υλικού (**εικόνα 2.9β**).

α) β)



**Εικόνα 2.9: α. Σωματίδια Ψ/Α υλικού στην πρόσθια υαλοειδική επιφάνεια σε αφακικό οφθαλμό. Η εναπόθεση ακολουθεί τα όρια μιας οπής του προσθίου υαλοειδούς. β. Εναπόθεση Ψ/Α υλικού σε ενδοφακό οπισθίου θαλάμου[5].**

### 2.1.10 Οπτικός δίσκος (optic disc)

Στην μονόπλευρη εμφάνιση του Ψ/Α.Σ, οι παράμετροι της κεφαλής του οπτικού νεύρου: εμβαδόν δίσκου (disc area), neuroretinal rim area, rim/disc ratio, εμβαδόν κοίλανσης (cup area) και όγκος κοίλανσης (cup volume) δεν διαφέρουν ουσιαστικά ανάμεσα στον οφθαλμό με Ψ/Α.Σ και φυσιολογική πίεση και στον άλλο οφθαλμό[34]. Στην μονόπλευρη εκδήλωση Ψ/Α.Γ, οι συγκρίσεις μεταξύ των οφθαλμών δεν έδειξαν διαφορά στο μέγεθος των περιθηλαίων μηνίσκων. Η περιθηλαία ατροφία στο ΠΓΑΓ και στο Ψ/Α.Γ δεν ήταν μεταξύ τους σημαντικά διαφορετική.

### 2.1.11 Περιοφθάλμιοι ιστοί

Ψ/Α υλικό μπορεί να υπάρξει στους **περιοφθάλμιους ιστούς** (**peribulbar tissues**). Κατά την βιοψία μπορεί να ανιχνευτεί εκτός από τον επιπεφυκότα και στους παρακάτω ιστούς: στα τοιχώματα των βραχέων οπίσθιων ακτινοειδών αρτηριών, στους εξωφθάλμιους μύες, στα κεντρικά αγγεία του αμφιβληστροειδή, στις περιδίνητες φλέβες και στο κογχικό διάφραγμα[35].

**Πίνακας 2.1: Συνοπτική παρουσίαση των πρώιμων σημείων και επιπλοκών κλινικών και χειρουργικών του Ψ/Α.Σ σε σχέση με τους εμπλεκόμενους ιστούς[6].**

| Tissue Involvement | Early Clinical Signs | Clinical Complications | Surgical Complications |
|---|---|---|---|
| Lens, ciliary body, and zonules | • Diffuse precapsular layer<br>• Phacodonesis<br>• PEX deposits on zonules (UBM) | • Cataract (nuclear)<br>• Phacodonesis<br>• Lens subluxation<br>• Angle-closure glaucoma due to pupillary and ciliary block | • Zonular rupture/dialysis<br>• Vitreous loss<br>• Posterior capsule rupture<br>• Decentration of the lens implant<br>• Anterior capsule fibrosis<br>• Secondary cataract |
| Iris | • Peripupillary atrophy and iris sphincter region transillumination<br>• Melanin dispersion associated with pupillary dilation<br>• Poor mydriasis, asymmetric pupil sizes | • Melanin dispersion<br>• Poor mydriasis<br>• Iris rigidity<br>• Capillary hemorrhage<br>• Blood-aqueous barrier defects, pseudouveitis<br>• Anterior chamber hypoxia<br>• Posterior synechiae | • Miosis/poor surgical access<br>• Intra- and postoperative hyphema<br>• Postoperative inflammation<br>• Prolonged blood-aqueous barrier breakdown<br>• Posterior synechiae and pupillary block |
| Trabecular meshwork | • Pigment deposition<br>• Marked asymmetry of IOP<br>• Marked IOP rise after pupillary dilation | • Intraocular hypertension<br>• Open-angle glaucoma | • Postoperative IOP rise |
| Cornea | • Atypical cornea guttata | • Endothelial decompensation<br>• Endothelial migration/proliferation | • Endothelial decompensation |
| Posterior segment | | • Retinal vein occlusion | |

IOP = intraocular pressure; UBM = ultrasound biomicroscopy.

## 2.2 Κλινική πορεία-εξέλιξη προς Ψ/Α.Γ

Εκτιμάται ότι περίπου 60-70 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως πάσχουν από Ψ/Α.Σ. Από αυτούς περίπου το 25% παρουσιάζει αυξημένη ΕΟΠ και από αυτούς το 1/3 πάσχει από γλαύκωμα. Το Ψ/Α.Γ συνδέεται με αυξημένη αντίσταση στην αποχέτευση υδατοειδούς υγρού (aqueous humor). Πιθανοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί του Ψ/Α.Γ περιλαμβάνουν: **α)** ένα «κώλυμα» (block) στον ηθμό (trabecular meshwork), εξαιτίας συσσώρευσης χρωστικής από την ίριδα καθώς και Ψ/Α υλικού ενδογενούς (από τον ηθμό) και εξωγενούς (από άλλες δομές του πρόσθιου ημιμορίου). Παρόλο που τόσο η ποσότητα του Ψ/Α υλικού όσο και η ποσότητα της χρωστικής στην γωνία του προσθίου θαλάμου είναι σημαντικές για την αύξηση της ΕΟΠ, ο βαθμός της χρωστικής στην γωνία του προσθίου θαλάμου (anterior chamber angle) αντιπροσωπεύει ένα πιο σταθερό και σημαντικό παράγοντα κινδύνου **β)** μία δυσλειτουργία του ενδοθηλίου του ηθμού και **γ)** αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο υδατοειδές υγρό. Η κύρια αιτία φαίνεται να είναι η συγκέντρωση Ψ/Α υλικού στον juxtacanalicular ιστό, οι εκφυλιστικές αλλοιώσεις στο κανάλι του Schlemm και στη περιοχή juxtacanalicular[6].

### 2.2.1 Κίνδυνος ανάπτυξης Ψ/Α.Γ σε ασθενείς με Ψ/Α.Σ

Σε ασθενείς με Ψ/Α.Γ, οι γλαυκωματικές βλάβες του οπτικού νεύρου θεωρούνται συνέπεια της αυξημένης ΕΟΠ. Μολαταύτα το Ψ/Α.Σ ακόμα και χωρίς αύξηση της ΕΟΠ αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη γλαυκώματος[36-38]. Ο Mitchel και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης γλαυκώματος σε οφθαλμούς με Ψ/Α.Σ ήταν 5 φορές μεγαλύτερος και ότι ήταν ανεξάρτητος από άλλους γνωστούς παράγοντες κινδύνου για γλαύκωμα. Έναν πιθανό μηχανισμό για την ανάπτυξη βλάβης στο οπτικό νεύρο σε ασθενείς με Ψ/Α.Γ με φυσιολογική ΕΟΠ μπορεί να αποτελεί η διαταραχή της αιμάτωσης των οπίσθιων οφθαλμικών ιστών εξαιτίας της παρουσίας του Ψ/Α υλικού στα τοιχώματα των οπίσθιων ακτινοειδών αρτηριών και των vortex φλεβών.

### 2.2.2 Κίνδυνος ανάπτυξης Ψ/Α.Γ σε ασθενείς με Ψ/Α.Σ με φυσιολογική και υψηλή ΕΟΠ

Πολλοί οφθαλμοί με Ψ/Α.Σ και φυσιολογική ΕΟΠ στην διάρκεια του χρόνου αναπτύσσουν υψηλή ΕΟΠ και στη συνέχεια γλαύκωμα. Ο κίνδυνος ανάπτυξης οφθαλμικής υπερτονίας (υψηλή ΕΟΠ) βρέθηκε να είναι 5,3% και 15,4% μέσα σε 5 και 10 έτη αντίστοιχα[17].

Ο Hovding και ο Aasved βρήκαν ότι σε άτομα με Ψ/Α.Σ και φυσιολογική ή αυξημένη ΕΟΠ, ο κίνδυνος ανάπτυξης γλαυκώματος ήταν 2 φορές μεγαλύτερος απ' ότι σε άτομα χωρίς Ψ/Α.Σ (46,2% έναντι 23,1% μέσα σε 17-20 έτη)[39]. Οφθαλμοί με Ψ/Α.Σ και υψηλή ΕΟΠ παρουσιάζουν ιδιαίτερο κίνδυνο ανάπτυξης γλαυκώματος καθώς ανάπτυξαν 2 φορές πιο συχνά γλαύκωμα σε σύγκριση με οφθαλμούς με αυξημένη ΕΟΠ χωρίς Ψ/Α.Σ (35% έναντι 18% μέσα σε 9 έτη)[40]. Επίσης, ο Grodum και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η μετάπτωση σε γλαύκωμα ήταν 2 φορές πιο συχνή σε ασθενείς με Ψ/Α.Σ και αυξημένη ΕΟΠ σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς Ψ/Α.Σ, ελεγχοντας ως προς τις παραμέτρους ΕΟΠ, φύλο και ηλικία (55,1% έναντι 27,6% σε 8,7 έτη)[38].

Η Puska, σε μία μελέτη με δεκαετές follow-up σε μη γλαυκωματικούς ασθενείς με μονόπλευρο Ψ/Α.Σ (55 άτομα με φυσιολογική ΕΟΠ και 8 με αυξημένη ΕΟΠ), έδειξε ότι το ποσοστό μετάπτωσης σε γλαύκωμα ήταν 33% σε δέκα έτη[41]. Επιπλέον, στην μελέτη αυτή φάνηκε ότι η μετάπτωση ήταν ταχεία καθώς στα 2/3 των περιστατικών η μετάπτωση έγινε στα τρία έτη και στο 94% των περιστατικών έως πέντε έτη.

Ασθενείς με μονόπλευρο Ψ/Α.Σ με ή χωρίς ΕΟΠ που μεταπίπτουν σε γλαύκωμα παρουσίασαν υψηλότερη ΕΟΠ και περισσότερο ελαττωματική μυδρίαση σε σύγκριση με τους άλλους μη γλαυκωματικούς οφθαλμούς. Δεν βρέθηκε συσχέτιση με την ηλικία, τον

βαθμό χρωστικής στην γωνία του προσθίου θαλάμου και με την ποσότητα του Ψ/Α υλικού. Μέσα στην δεκαετία της μελέτης όλοι οι οφθαλμοί με Ψ/Α.Σ με ή χωρίς οφθαλμική υπερτονία ανάπτυξαν γλαύκωμα εκτός από ένα. Στους οφθαλμούς με Ψ/Α.Σ που μεταπίπτουν σε γλαύκωμα, στην μορφομετρία της κεφαλής του οπτικού νεύρου, φαίνεται να υπάρχει μεγαλύτερη cup area και cup volume όπως επίσης μικρότερο rim area και rim disc area ratio σε σχέση με τους οφθαλμούς με Ψ/Α.Σ που δεν μεταπίπτουν αλλά η διαφορά αυτή ήταν σημαντική μόνο για την rim area.

Είναι πιθανό στους οφθαλμούς με Ψ/Α.Σ οι γλαυκωματικές αλλοιώσεις στην οπτική θηλή να ξεκινούν πριν την ανίχνευση της αύξησης της ΕΟΠ[42]. Σε αυτή την περίπτωση θα πρέπει να ληφθούν υπόψη η στατιστικά πιο μεγάλη διακύμανση της ΕΟΠ και τα μη ανιχνεύσιμα spikes (κορυφές) της πίεσης που αποτελούν κλινικά χαρακτηριστικά του Ψ/Α.Γ[43]. Σε οφθαλμούς με Ψ/Α.Σ που δεν μεταπίπτουν σε γλαύκωμα η ενδοφθάλμια πίεση παρέμεινε χωρίς διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια της μελέτης. Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύονται και από άλλη μία μελέτη που διεξήχθη από τον Aasved[44].

### 2.2.3 Κίνδυνος ανάπτυξης Ψ/Α.Γ στον άλλο οφθαλμό σε ασθενείς με μονόπλευρο Ψ/Α.Γ

Σε μια μελέτη που εκτίμησε ασθενείς με μονόπλευρο Ψ/Α.Γ, η παρουσία Ψ/Α.Σ στον άλλο οφθαλμό ήταν σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη Ψ/Α.Γ. Ο κίνδυνος αυτός βρέθηκε να είναι 21%-26% μέσα σε ένα διάστημα πέντε ετών. Υπάρχει η τάση η μετάπτωση να γίνεται ταυτόχρονα και στους δύο οφθαλμούς ή σε σύντομο χρονικό διάστημα ο ένας από τον άλλο[45].

Σε μία follow-up μελέτη έξι ετών σε ασθενείς με μονόπλευρο Ψ/Α.Γ, το 25% των άλλων οφθαλμών με Ψ/Α.Σ χωρίς γλαύκωμα, ανάπτυξαν υψηλή ΕΟΠ και γλαύκωμα. Η Puska έδειξε ότι ποσοστό μετάπτωσης του οφθαλμού χωρίς Ψ/Α.Σ σε γλαύκωμα είναι 33% και 38% σε πέντε και δέκα χρόνια αντίστοιχα[41]. Σε όλους τους ασθενείς της, το γλαύκωμα κατά την διάρκεια των ετών έγινε αμφίπλευρο. Η μετάπτωση σε οφθαλμική υπερτονία και γλαύκωμα ήταν σχετικά ταχεία καθώς βρέθηκε να έγινε στο 88% και 100% μέσα σε πέντε και έξι έτη αντίστοιχα. Σ' αυτούς τους οφθαλμούς υψηλή ΕΟΠ βρέθηκε στο 50% αυτών πριν την κλινική ανίχνευση του Ψ/Α υλικού και στο 25% όταν το Ψ/Α υλικό ανιχνεύθηκε κλινικά.

### 2.2.4 Η έναρξη του γλαυκώματος σε σχέση με την κλινική ανίχνευση του Ψ/Α υλικού

Το γλαύκωμα μπορεί να αναπτυχθεί πριν, ταυτόχρονα ή ακόμα και μετά την εμφάνιση των κλινικών σημείων του Ψ/Α.Σ. Σε μία μελέτη του Aasved η εμφάνιση του Ψ/Α υλικού συνοδεύτηκε από αύξηση ή μη της ΕΟΠ[44].

Τα ευρήματα του Hansen και του Sellevold έδειξαν ότι η αύξηση της ΕΟΠ συμβαίνει στα πρώιμα στάδια του Ψ/Α.Σ[46]. Αυτή την άποψη επιβεβαίωσε η έρευνα της Puska[41]. Στη μελέτη της ο κίνδυνος αύξησης της ΕΟΠ και της ανάπτυξης γλαυκώματος φάνηκε να είναι μεγαλύτερος αμέσως μετά την κλινική ανίχνευση του Ψ/Α υλικού. Παρόλο αυτά ο κίνδυνος φαίνεται να είναι αθροιστικός και η μετάπτωση να είναι μέρος της φυσικής εξέλιξης της νόσου.

## 2.5 Κλινικά χαρακτηριστικά Ψ/Α.Γ

### 2.5.1 Κλινική εμφάνιση του Ψ/Α.Γ

Το Ψ/Α.Γ διαφέρει τόσο ιστοπαθολογικά όσο και κλινικά από το πρωτοπαθές γλαύκωμα ανοιχτής γωνίας. Συνήθως οι ασθενείς με Ψ/Α.Γ είναι μεγαλύτερης ηλικίας από αυτούς με ΠΓΑΓ. Κατά μία άποψη οι άντρες στο Ψ/Α.Γ έχουν σοβαρότερη κλινική εικόνα σε σχέση με τις γυναίκες[5]. Οι ασθενείς με Ψ/Α.Γ παραμένουν ασυμπτωματικοί μέχρις ότου να αναπτυχθούν σοβαρές βλάβες στην όραση. Παρόλ' αυτά, μερικοί ασθενείς ενδέχεται να διαμαρτυρηθούν για υποκειμενικές ενοχλήσεις όπως αμβλύς πόνος στον οφθαλμό ή αίσθημα πίεσης.

Προχωρημένη γλαυκωματική νευροπάθεια μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα όπως δυσκολία στην ανάγνωση, περιορισμό της περιφερικής ή νυχτερινής όρασης ή ακόμα και απώλεια όρασης. Αυτό συμβαίνει διότι σε μερικές περιπτώσεις, αγγειακά επεισόδια που μπορούν να μειώσουν σημαντικά την όραση (όπως απόφραξη κεντρικής φλέβας αμφιβληστροειδούς ή κλάδου) σχετίζονται με το Ψ/Α.Σ[3, 5].

### 2.5.2 Χαρακτηριστικά της ΕΟΠ στο Ψ/Α.Γ

Το Ψ/Α.Γ σε σχέση με το ΠΓΑΓ παρουσιάζει μέγιστη ΕΟΠ στατιστικά πιο υψηλή και διακύμανση της 24ωρης ΕΟΠ στατιστικά πιο μεγάλη. Σε μια μελέτη, υγιή άτομα παρουσίασαν διακύμανση της ΕΟΠ όχι μεγαλύτερη των 5mm Hg, ενώ περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς με Ψ/Α.Σ χωρίς οφθαλμική υπερτονία παρουσίασαν διακύμανση μεγαλύτερη των 5mm Hg και το 10% ίση ή μεγαλύτερη των 10mm Hg[47].

Σε άλλη μελέτη, ημερήσια διακύμανση μεγαλύτερη των 5mmHg ανιχνεύτηκε στο 58% των ασθενών με Ψ/Α.Σ και μόνο στο 16% των υγιών ατόμων. Οι ασθενείς με Ψ/Α.Σ που παρουσίαζαν σημαντική διακύμανση της ΕΟΠ είχαν μειωμένο πάχος στρώματος νευρικών ινών σε σχέση με τα υγιή άτομα το οποίο δείχνει την σημασία των μεταβολών της ΕΟΠ στην ανάπτυξη πρώιμης βλάβης στο Ψ/ΑΓ[48]. Ασθενείς με Ψ/Α.Γ συχνά παρουσιάζονται με επίπεδα ΕΟΠ που μπορεί να ξεπερνούν τα 35mmHg ενώ χαμηλά επίπεδα ΕΟΠ είναι σπάνια.

Σε μια ελληνική μελέτη που σύγκρινε ασθενείς με Ψ/Α.Γ και ασθενείς με ΠΓΑΓ που θα υποβάλλονταν σε χειρουργική επέμβαση γλαυκώματος, οι ασθενείς με Ψ/Α.Γ είχαν υψηλότερη μέγιστη ΕΟΠ σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΓΑΓ[49].

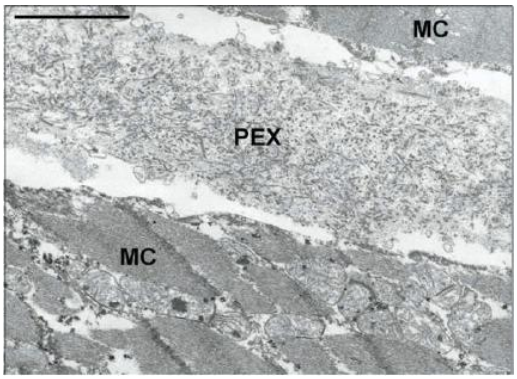
Στο Ψ/Α.Γ, όπως και στο ΠΓΑΓ η ΕΟΠ είναι υψηλότερη τις πρωινές ώρες, μολαταύτα μπορεί να υπάρχουν εξαιρέσεις σε αυτό τον κανόνα και κορυφές ΕΟΠ μπορούν να συμβούν οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της ημέρας. Οι μεγαλύτερες διακυμάνσεις της 24ωρης ΕΟΠ στο Ψ/Α.Γ μπορεί να ευθύνονται για την ταχύτερη εξέλιξη, δυσκολότερη αντιμετώπιση και πιο συχνή ανάγκη για χειρουργική επέμβαση ή τύφλωση των ατόμων αυτών σε σύγκριση με ασθενείς με ΠΓΑΓ (παρόλο που κατά την διάγνωση η νευροπάθεια και η βλάβη στα οπτικά πεδία μπορεί να είναι όμοια και στις δύο ομάδες ασθενών). Καθώς το 50% των ασθενών με Ψ/Α.Γ παρουσιάζει κορυφή ΕΟΠ εκτός ωρών εργασίας (αν και οι πρωινές μετρήσεις είναι οι πιο αξιόπιστες στη διαχείριση των περισσότερων ασθενών) θα ήταν συνετό να μην στηριχτεί κανείς σε μία μοναδική μέτρηση για να καθορίσει την μακροχρόνια σταθερότητα των ασθενών με Ψ/Α.Γ[43]. Η ημερήσια παρακολούθηση της ΕΟΠ των ασθενών με Ψ/Α.Γ υπό αγωγή είναι σημαντική για την σωστή διαχείριση τους. Σε αντίθεση με το ΠΓΑΓ, στο Ψ/Α.Γ οι οφθαλμοί απαντούν στην αγωγή με κορτικοστεροειδή σαν υγιείς οφθαλμοί.

### 2.5.3 Οπτική νευροπάθεια και βλάβη οπτικών πεδίων στο Ψ/Α.Γ

Μελέτες έχουν δείξει ότι η οπτική θηλή είναι μικρότερη στο Ψ/Α.Γ σε σύγκριση με το ΠΓΑΓ και το γλαύκωμα φυσιολογικής πίεσης. Ακόμα, σε σχέση με το ΠΓΑΓ, στο Ψ/Α.Γ η κοίλανση της οπτικής θηλής και οι βλάβες στο rim τείνουν να είναι περισσότερο διάχυτες. Γι' αυτό το λόγο μικρές οπτικές θηλές στο Ψ/Α.Γ μπορούν λανθασμένα να θεωρηθούν ως φυσιολογικές και αυτό να οδηγήσει σε μία καθυστέρηση στην έναρξη της αγωγής[50, 51].

## 2.6 Σχέση Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ με συστηματικές παθήσεις

Αν και οι πιο χαρακτηριστικές και καλά καθορισμένες κλινικές εκδηλώσεις του Ψ/Α.Σ είναι οι οφθαλμικές, το Ψ/Α.Σ είναι μία συστηματική νόσος[3, 5, 15]. Ψ/Α υλικό ανευρίσκεται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε περιοφθάλμιους ιστούς (επιπεφυκότα, ιστούς του κόγχου, δέρμα βλεφάρων, εξωφθάλμιους μύες, ακτινοειδείς αρτηρίες και στρώματα του οπτικού νεύρου) καθώς και σε εξωφθάλμιους ιστούς (δέρμα, συνδετικός ιστός σπλαγχνικών οργάνων όπως ήπαρ, νεφρά, πνεύμονες, εγκέφαλος, καρδιά, εγκεφαλικές μήνιγγες, τοιχώματα αγγείων)[1, 2] (**εικόνα 2.10**). Η παρουσία Ψ/Α υλικού στα αγγεία σε στενή επαφή με το κολλαγόνο, τα ελαστικά ινίδια και τα περικύτταρα, μπορεί να εξηγήσει μια πιθανή επίδραση του Ψ/Α υλικού στην λειτουργία των αγγείων[52].




**Εικόνα 2.10: Ψ/Α (PEX) υλικό ανάμεσα σε δύο κύτταρα του μυοκαρδίου (MC)[6].**

Μέχρι και σήμερα η κλινική σημασία της συστηματικής παρουσίας Ψ/Α υλικού δεν είναι ακόμα καθορισμένη. Τα αποτελέσματα διάφορων μελετών πάνω στην συσχέτιση του Ψ/Α.Σ με διάφορες συστηματικές παθήσεις και την θνησιμότητα των ασθενών με Ψ/Α.Σ είναι αμφιλεγόμενα[5, 49, 53-55]. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί λόγω των διαφορών των πληθυσμών που συμμετείχαν στις διάφορες μελέτες και τις διαφορετικές ομάδες αναφοράς. Οι περισσότερες συνδέσεις που βρέθηκαν ήταν μεταξύ του Ψ/Α.Σ και των αγγειακών παθήσεων[49, 53, 54].

Στη Blue Mountain Eye μελέτη, όπως και σε άλλες μελέτες που έγιναν στην Ευρώπη, προέκυψε μια στατιστικά σημαντική σύνδεση με καρδιαγγειακές παθήσεις και χρόνιες αγγειοεγκεφαλικές παθήσεις. Εντούτοις, η επιβίωση των ασθενειών με Ψ/Α.Σ βρέθηκε να είναι παρόμοια με αυτή του φυσιολογικού πληθυσμού[49, 53]. Έχει βρεθεί επίσης, μία σημαντική σύνδεση μεταξύ του Ψ/Α.Σ, της νόσου Alzheimer και της αγγειακής άνοιας[54]. Το Ψ/Α.Σ θεωρείται μια γενικευμένη εκφυλιστική πάθηση του συνδετικού ιστού και αυτό μπορεί να εξηγήσει τη σύνδεση του με το ανεύρυσμα της κοιλιακής αορτής, μία άλλη

πάθηση του συνδετικού ιστού, η οποία βέβαια δεν έχει επιβεβαιωθεί ωστόσο από όλες τις μελέτες[56].

Υπάρχει συσχέτιση του Ψ/Α.Σ με υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης στο πλάσμα[57-60]. Η ομοκυστεϊναιμία αυξάνει τον κίνδυνο φλεβικής θρόμβωσης και έχει βρεθεί ότι η απόφραξη της κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδούς είναι πιο συχνή στο Ψ/Α.Γ[61]. Η υπερομοκυστεϊναιμία βρέθηκε επίσης σε ασθενείς με γλαύκωμα φυσιολογικής πίεσης στο οποίο οι αγγειακές διαταραχές είναι επίσης συχνές[59]. Αυτό μας δείχνει ότι η αύξηση των επιπέδων της ομοκυστεΐνης στο πλάσμα δεν είναι ειδική για το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ αλλά συμβαίνει σε διάφορες (συστηματικές και οφθαλμικές) παθήσεις με αγγειακές διαταραχές.

Τέλος, μια μετρίου βαθμού νευροαισθητήρια απώλεια ακοής έχει βρεθεί σε ασθενείς με Ψ/Α.Σ αν και η κλινική σημασία καθώς και η ακριβής παθογένεια αυτής της κατάστασης δεν έχει ακόμα καθοριστεί.

Το γλαύκωμα αποτελεί μία από τις πιο κοινές αιτίες τύφλωσης παγκοσμίως, υπολογιζόμενη στο 12% των περιπτώσεων. Δεν υπάρχει προς το παρόν οριστική θεραπεία. Παρ' όλα αυτά η φαρμακευτική θεραπεία ή η χειρουργική μπορούν να επιβραδύνουν ή να αποτρέψουν απώλεια της όρασης. Η κατάλληλη θεραπευτική αντιμετώπιση εξαρτάται μεταξύ, άλλων παραγόντων, από τον τύπο του γλαυκώματος. Η πρώιμη ανίχνευση είναι ζωτικής σημασίας για την αποτροπή της εξέλιξης της νόσου. Το γλαύκωμα δεν είναι ιάσιμο και η όραση που έχει χαθεί δεν μπορεί να επανέλθει. Με τη βοήθεια φαρμακευτικής αγωγής ή/και χειρουργικής επέμβασης, είναι δυνατόν να σταματήσει η περαιτέρω απώλεια της όρασης. Δεδομένου ότι το γλαύκωμα είναι μια χρόνια κατάσταση, πρέπει να παρακολουθείται εφόρου ζωής. Η διάγνωση είναι το πρώτο βήμα για την διατήρηση της όρασης.

## 2.7 Βιοχημική σύσταση του Ψ/Α υλικού

Η ακριβής παθογένεια του Ψ/Α.Σ και η ακριβής βιοχημική σύσταση του Ψ/Α υλικού μέχρι και σήμερα είναι μερικώς γνωστά. Το παθογνωμικό εύρημα του Ψ/Α.Σ είναι μία διαταραχή της εξωκυττάριας ουσίας δηλαδή μια υπερβολική παραγωγή ή/και μειωμένη αποδόμηση ενός ανώμαλου εξωκυττάριου υλικού[3, 5].

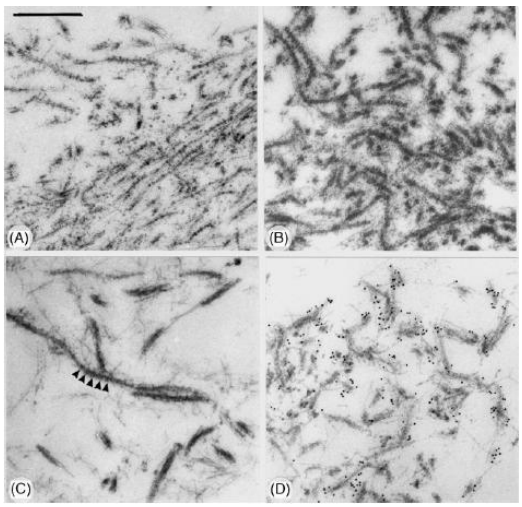
Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι Ψ/Α υλικό αποτελεί ένα σύμπλεγμα γλυκοπρωτεΐνης/πρωτεογλυκάνης το οποίο φέρει επιτόπους της βασικής μεμβράνης και ινών του συνδετικού ιστού. Τα χαρακτηριστικά ινίδια του Ψ/Α υλικού, τα οποία αποτελούνται από ελαστικά μικροϊνίδια περιβαλλόμενα από άμορφη ουσία η οποία

περιέχει διάφορες γλυκοζαμινογλυκάνες, περιλαμβάνουν επιτόπους ινών του συνδετικού ιστού όπως ελαστίνη, τροποελαστίνη, αμυλοειδές P, βιτρονεκτίνη (vitronectin) και συστατικά ελαστικών μικροϊνιδίων όπως φιμπριλλίνη-1 (fibrillin-1), LTBP1, LTBP2 (πρωτεΐνες που δεσμεύουν τον TGF-β) και MAGP-1 (microfibril-associated glycoprotein)[5].

Αντισώματα για συστατικά των ελαστικών μικροϊνιδίων και κυρίως για LTBP1, έχουν αποδειχθεί χρήσιμα σαν δείκτες για το Ψ/Α υλικό σε εξωφθάλμιους ιστούς[62]. Τελευταία, μελέτες χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας έδειξαν ότι το Ψ/Α υλικό αποτελείται από συστατικά ελαστικών μικροϊνιδίων όπως φιμπριλλίνη-1, φιμπουλίνη-2 και βιτρονεκτίνη, τις πρωτεογλυκάνες syndecan και versican, εξωκυττάριους συνοδούς πρωτεϊνών (chaperone) όπως την clusterin, cross linking ένζυμα όπως οξειδάση λυσίνης και άλλες πρωτεΐνες επιβεβαιώνοντας πολλά από τα παραπάνω ανοσοϊστοχημικά δεδομένα[6]. Όλα τα παραπάνω υποστηρίζουν τη άποψη ότι το Ψ/Α υλικό προέρχεται από την αυξημένη παραγωγή και συσσώρευση ελαστικών μικροϊνιδίων δεσμευμένων με διάφορες ουσίες.

Το Ψ/Α υλικό στο μικροσκόπιο ορατού φωτός διαθέτει χαρακτηριστικά όπως χρώση με periodic acid-Schiff (PAS) βαφή καθώς και ηωσινοφιλικά, bush-like, nodular ή feathery συμπλέγματα[63].

Δύο τύποι Ψ/Α ινών διακρίνονται. Οι **ίνες τύπου Α** που έχουν διάμετρο από 18-25nm, μήκος πάνω από 1μm με μεγάλη ικανότητα σύνδεσης. Οι **ίνες τύπου Β** είναι πιο κοντές (0,3- 0,5μm), παχύτερες (30, 45nm) με μικρότερη ικανότητα σύνδεσης (**εικόνα 2.11**). Παρόλο που οι ίνες του Ψ/Α υλικού στους εξωφθάλμιους ιστούς έχουν μικρότερη ικανότητα σύνδεσης και αυξημένη ποσότητα άμορφης ουσίας που τα περιβάλλει[2] οι ίνες του Ψ/Α υλικού και στους ενδοφθάλμιους και στους εξωφθάλμιους ιστούς έχουν χαρακτηριστικά δομικά κριτήρια που τις διαφοροποιούν από κάθε άλλη γνωστή εναπόθεση εξωκυττάριου υλικού.



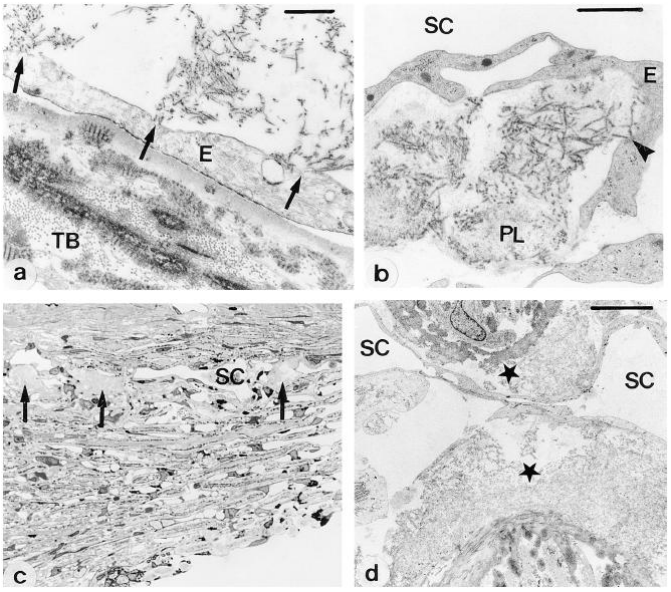

**Εικόνα 2.11: Ίνες Ψ/Α υλικού στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Α) Ίνες τύπου Α λεπτότερες με μεγάλη ικανότητα σύνδεσης Β) Ίνες τύπου Β παχύτερες C) Συνένωση μικροινιδίων σε ώριμες ψευδοαποφολιδωτικές ίνες με cross- bands στα 50 nm d) Immunogold labeling χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι φιμπριλλίνης- 1 δείχνει καθαρή συσχέτιση με το Ψ/Α υλικό[19].**

## 2.8 Προέλευση του Ψ/Α υλικού

Έχει αποδειχθεί στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ότι το Ψ/Α υλικό παράγεται από διάφορους τύπους κυττάρων όπως επιθηλιακά, ενδοθηλιακά κύτταρα του συνδετικού ιστού, των μυών και των αγγειακών τοιχωμάτων. Στον οφθαλμό (πρόσθιο ημιμόριο) παράγεται κυρίως από α) μη χρωστικό επιθήλιο του ακτινωτού σώματος β) οπίσθιο μελάγχρουν επιθήλιο της ίριδας και γ) περιφάκιο του φακού στην περιοχή του ισημερινού. Παράγεται επίσης από το ενδοθήλιο του κερατοειδούς, τα κύτταρα του ηθμού και τα περικύτταρα της ίριδας και του ακτινωτού σώματος. Η ενδοφθάλμια παραγωγή Ψ/Α υλικού φαίνεται να είναι πολυεστιακή ενώ υπάρχει και η δευτεροπαθής εναπόθεση που γίνεται παθητικά με το υδατοειδές υγρό.

Όλα τα είδη κυττάρων που εμπλέκονται στην παραγωγή ινιδίων παρουσιάζουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά: **1**) ανωμαλίες της επιφάνειας, **2**) διαταραχές της συνέχειας της βασικής μεμβράνης, **3**) συστήματα έκκρισης δίνοντας την εντύπωση μιας ενεργοποιημένης μεταβολικής κατάστασης και οι ίνες που παράγονται συχνά παρουσιάζουν μια διαδικασία «ωρίμανσης» ή συνένωσης από μικροϊνίδια σε πιο σύνθετες ίνες.

Οι Ψ/Α ίνες ποτέ δεν έχουν παρατηρηθεί ενδοκυττάρια αλλά πάντα εξωκυττάρια και σε στενή σύνδεση με την επιφάνεια των κυττάρων. Η περικυττάρια συσσώρευση αυτών των ινών προκαλεί πιθανώς διαταραχή της βασικής μεμβράνης με συνέπεια κυτταρική δυσλειτουργία (π.χ. στα κύτταρα του διηθητικού ηθμού) που οδηγεί στον εκφυλισμό των εμπλεκόμενων κυττάρων (εκφυλιστική ινιδοπάθεια)[64] (**εικόνα 2.12**).




**Εικόνα 2.12: Διηθητικός ηθμός στο Ψ/Α.Σ χωρίς (a,b) και με (c,d) γλαύκωμα. a) Παραγωγή Ψ/Α ινών (βέλη) από ένα ενδοθηλιακό κύτταρο (E) στον διηθητικό ηθμό (TB). b) Παραγωγή Ψ/Α ινών (βέλη) από το ενδοθήλιο (E) στο κανάλι του Schlemm (SC) (PL, plaque material). c) Εξαφάνιση του καναλιού του Schlemm εξαιτίας συσσώρευσης Ψ/Α υλικού. d) Υποχώρηση του αυλού του καναλιού του Schlemm εξαιτίας της επαφής του εσωτερικού με το εξωτερικό τοίχωμα[5].**

## 2.9 Αιτιολογία

Τα αίτια της εμφάνισης του Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ είναι μέχρι σήμερα άγνωστα. Φαίνεται ότι το Ψ/Α.Σ αποτελεί μία σύνθετη και πολυπαραγοντική πάθηση με όψιμη έναρξη-εμφάνιση στην οποία εμπλέκονται γονιδιακοί και μη γονιδιακοί παράγοντες. Ενοχοποιείται συνδυασμός γονιδίων που προδιαθέτουν σε Ψ/Α.Σ και γονιδίων που προδιαθέτουν σε γλαύκωμα καθώς και εξωγενείς παράγοντες όπως: περιβάλλον (υπεριώδης ακτινοβολία), τοξικές ουσίες, διατροφή (μειωμένα επίπεδα ασκορβικού οξέος), λοιμώξεις (ιογενείς), οφθαλμικός τραυματισμός, οφθαλμική χειρουργική επέμβαση[65, 66].

Για τη διελεύκανση της αιτιολογίας θα ήταν χρήσιμες επιπλέον επιδημιολογικές μελέτες σε πληθυσμούς που δεν έχουν μελετηθεί όπως στην Κ. Αφρική και την Ν. Αμερική καθώς επίσης και μελέτες πάνω στην επίπτωση του Ψ/Α.Σ, γενεαλογικές μελέτες, genome wide screens και προσδιορισμός της συμβολής των μεταλλαγών ύποπτων γονιδίων για την ανάπτυξη και εκδήλωση του Ψ/Α.Σ.

## 2.10 Θεωρίες παθογένειας

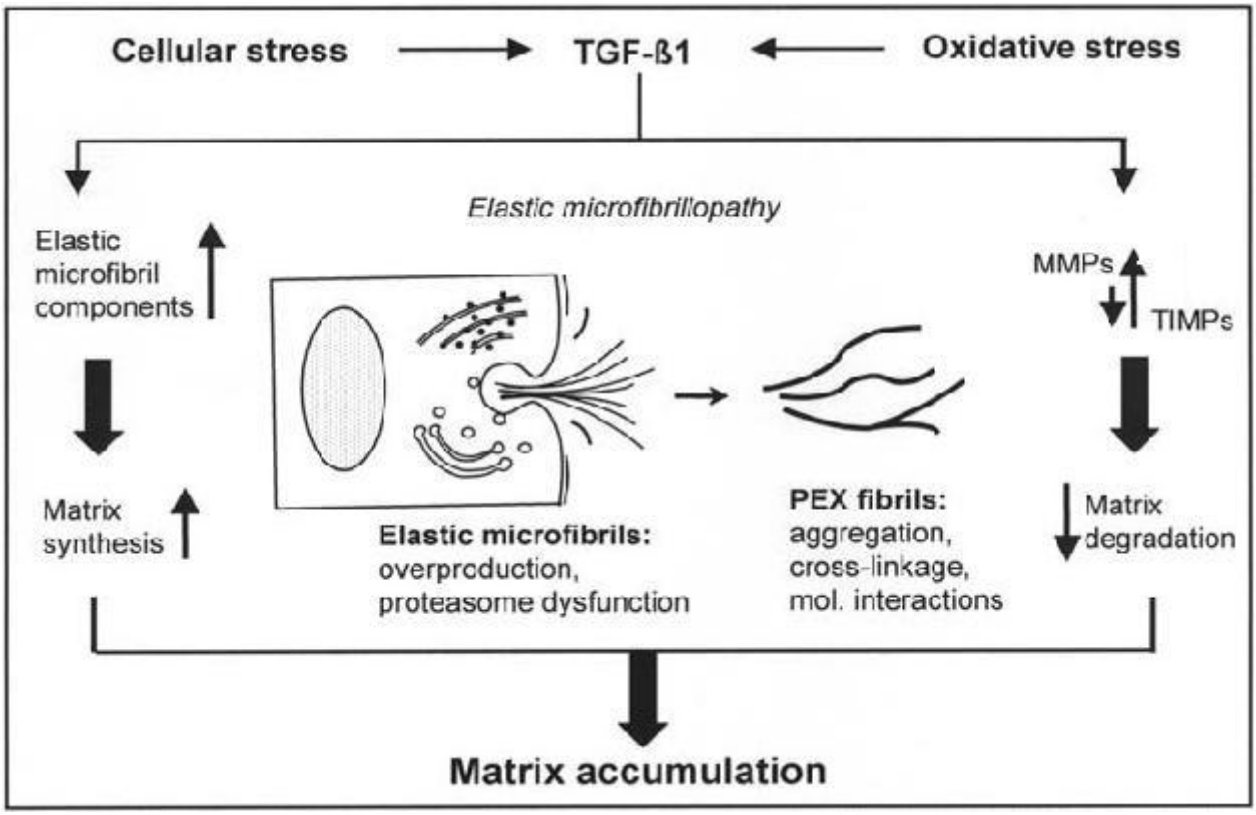
Η θεωρία του αμυλοειδούς δεν έχει επιβεβαιωθεί και βασίζεται στο ότι πεπτίδια β-αμυλοειδούς έχουν ανιχνευτεί στο υδατοειδές υγρό ασθενών με Ψ/Α.Σ και στο ότι το Ψ/Α.Σ μπορεί να συνυπάρχει με πρωτοπαθή αμυλοείδωση[67-70].

Η θεωρία της βασικής μεμβράνης, σύμφωνα με την οποία το Ψ/Α υλικό παράγεται ως αποτέλεσμα διαταραχής της βασικής μεμβράνης, υποστηρίζεται από τα παρακάτω: 1) ανωμαλίες της επιφάνειας των κυττάρων που το παράγουν, 2) ύπαρξη επιτόπων της βασικής μεμβράνης (λαμινίνη, ινωδογόνο, πρωτεογλυκανική θειική ηπαρίνη) και 3) αύξηση των επιπέδων του TGF- β1, (transforming growth factor) στο υδατοειδές υγρό ασθενών με Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ[70, 71].

Είναι γνωστό ότι ο TGF-β1 προάγει την συγκέντρωση του εξωκυττάριου υλικού και την ίνωση σε πολλές παθολογικές καταστάσεις. Επίσης έχει βρεθεί ότι έχει ενισχυμένη τοπική σύνθεση σε ιστούς του προσθίου τμήματος του οφθαλμού και βρέθηκε σημαντικά αυξημένος στο υδατοειδές υγρό ασθενών με Ψ/Α.Σ αλλά και με Ψ/Α.Γ. Η αποδόμηση του εξωκυττάριου υλικού ρυθμίζεται από τις μεταλλοπρωτεϊνάσες ($MMP_s$) ικανές να αποδομούν όλη σχεδόν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και τα πρωτεϊνικά συστατικά της βασικής μεμβράνης. Η παρουσία των μεταλλοπρωτεϊνασών έχει περιγραφεί στο υδατοειδές υγρό του ανθρώπου και η ενεργότητά τους ρυθμίζεται μερικώς από ειδικούς ενδογενείς ιστικούς αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνασών ($TIMP_s$). Ο TGF-β1 αυξάνει την έκφραση της MMP-2 και της TIMP-2 (αναστολείς) στο υδατοειδές υγρό ασθενών με Ψ/Α.Γ. Εξαιτίας της ανισορροπίας των ενζύμων αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας ($MMP_s$) και των αναστολέων τους ($TIMP_s$), το παθολογικό Ψ/Α υλικό δεν αποδομείται αλλά με την πάροδο του χρόνου αθροίζεται προοδευτικά εντός των ιστών[6].

Η θεωρία των ελαστικών μικροϊνιδίων υποστηρίζει ότι το Ψ/Α.Σ αποτελεί ένα τύπο ελάστωσης (αυξημένη παραγωγή/συσσώρευση ελαστικών μικροϊνιδίων). Βασίζεται στο ότι ίνες Ψ/Α υλικού βάσει ενδείξεων ανοσοϊστοχημικών και μορφολογικών, προέρχονται από την εκφύλιση των ινών του συνδετικού ιστού. Ακόμα βασίζεται και στην ύπαρξη πρωτεϊνών στο Ψ/Α υλικό όπως: LTBP (που δεσμεύουν τον TGF-β1) και φιμπριλλίνη-1 (κύριο συστατικό ελαστικών μικροϊνιδίων)[72].

Καταλήγοντας, η τρέχουσα αντίληψη για το Ψ/Α.Σ προτείνει μία υπερβολική σύνθεση ή ανεπαρκή αποδόμηση των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας, που διεγείρεται από τον TGF-β1 και οδηγεί σε άθροιση του εξωκυττάριου υλικού στις χαρακτηριστικές αποφολιδωτικές ίνες (ελάστωση) (**σχήμα 2.1**).




**Σχήμα 2.1: Περίληψη της τρέχουσας παθογενετικής θεωρίας για το Ψ/Α.Σ[6].**

Αυξητικοί παράγοντες, ειδικά ο TGF-β1, αυξημένο οξειδωτικό και κυτταρικό stress και μία ελλιπή κυτταρική προστασία φαίνεται ότι αποτελούν παράγοντες κλειδιά για την παθογένειά του. Εξαιτίας μιας ανισορροπίας μεταξύ των μεταλλοπρωτεϊνασών και των αναστολέων τους και μίας εκτενούς διαδικασίας cross linking που οδηγεί στον σχηματισμό των ινών, το παθολογικό υλικό δεν αποδομείται κατάλληλα αλλά προοδευτικά συσσωρεύεται στους ιστούς (π.χ. διηθητικό ηθμό) με την πάροδο του χρόνου. Η άποψη της γενικευμένης ελάστωσης κέρδισε έδαφος από μία πρόσφατη γενετική μελέτη που έδειξε ότι οι πολυμορφισμοί του γονιδίου της οξειδάσης λυσίνης-like1 (*LOXL1*), το οποίο είναι μέλος μιας οικογένειας γονιδίων που έχει σημαντικούς ρόλους στην σύνθεση ελαστίνης, είναι ισχυρά συνδεδεμένοι με το Ψ/Α.Σ και το Ψ/Α.Γ[6].

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

# ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ Ψ/Α.Σ ΚΑΙ ΤΟΥ Ψ/Α.Γ

## 3.1 Εισαγωγή

Η ακριβής αιτιοπαθογένεια του Ψ/Α.Σ είναι άγνωστη. Είναι όμως γνωστό ότι εμπλέκονται γενετικοί και μη γενετικοί παράγοντες. Αποδείξεις που υποστηρίζουν ότι το Ψ/Α.Σ έχει γενετική βάση είναι οι παρακάτω:

**1**) Η γεωγραφική κατανομή. Οι πραγματικές διαφορές στις συχνότητες ανάμεσα σε παρόμοιας ηλικίας γεωγραφικούς και εθνικούς πληθυσμούς υποδεικνύουν την γενετική ποικιλομορφία του συνδρόμου[12].

**2**) Η διαφορετική εξέλιξη. Κατά τη διάγνωση του Ψ/Α.Σ, το 25% των ασθενών παρουσιάζει υπερτονία με ή χωρίς γλαύκωμα, ενώ από τους υπόλοιπους ασθενείς κάποιοι θα παρουσιάσουν γλαύκωμα και κάποιοι όχι[5].

**3**) Ο οικογενής χαρακτήρας του συνδρόμου. Φαίνεται να κληρονομείται κατά τον αυτοσωματικό επικρατή χαρακτήρα με όψιμη έναρξη-εμφάνιση και με ελλιπή και ποικίλη διεισδυτικότητα[13, 73, 74].

**4**) Σε μία μελέτη διδύμων από την Ισλανδία: σε 5 από τους 8 μονοωογενείς διδύμους με Ψ/Α.Σ, το Ψ.Α.Σ ήταν παρόν και στους δύο (συνεπώς υπάρχουν επιγενετικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν)[75].

**5**) Σύνδεση με πολλές χρωμοσωματικές περιοχές. Γενετικά ελλείμματα (loss of heterozygosity) στο χρωμόσωμα 7 έχουν βρεθεί στο 60%-80% των ασθενών με ΨΑ.Σ με τη χρήση μικροδορυφορικών δεικτών (microsatellite markers)[76]. Επιπλέον, έχει γίνει ταυτοποίηση γενετικών θέσεων που συσχετίζονται με τάση για ανάπτυξη Ψ/Α.Σ: 18q12.1-21.33, 2q, 17p και 19q με σάρωση γονιδιώματος σε πληθυσμό από Φιλανδία[77].

**6**) Ανακάλυψη από τους Thorleifsson και τους συνεργάτες του μίας ιδιαίτερα ισχυρής σύνδεσης μεταξύ Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ και δύο ενιαίων νουκλεοτιδίων πολυμορφισμών ($SNP_s$) στο γονίδιο *LOXL1* (15q24) που κωδικοποιεί την οξειδάση λυσίνη – like1 (ή homolog 1)[78].

Όλα τα παραπάνω καταδεικνύουν ότι το Ψ/Α.Σ αποτελεί γενετικά ετερογενή οντότητα.

### 3.1.1 Κληρονομικότητα

Το Ψ/Α.Σ και το Ψ/Α.Γ φαίνεται να παρουσιάζουν ισχυρό οικογενή χαρακτήρα. Ενδείξεις κληρονομικότητας βασίζονται στον αυξημένο σχετικό κίνδυνο εμφάνισης Ψ/Α.Σ στους συγγενείς α΄ βαθμού των ασθενών[79], στις μελέτες διδύμων[75] , στα γενετικά ελλείμματα[76] και στις μελέτες που δείχνουν μετάδοση στις επόμενες δύο γενιές απογόνων.

Πολλαπλοί τρόποι κληρονομικότητας έχουν προταθεί για το Ψ/Α.Σ όπως: κατά τον αυτοσωματικό επικρατή χαρακτήρα[79, 80], κατά τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα[81], κατά τον φυλοσύνδετο[82], ή ακόμα και κληρονομικότητα μόνο από τη μητέρα (μιτοχονδριακή)[73].

Μία μελέτη επιπολασμού (cross-sectional study) με μεγάλο διάστημα παρακολούθησης (follow-up) είχε ως σκοπό να εκτιμήσει την συχνότητα του Ψ/Α.Σ και να αναλύσει τον τρόπο μετάδοσης του Ψ/Α.Σ σε πολλές γενιές σε ένα απομονωμένο πληθυσμό στη Ν.Φιλανδία. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της το Ψ/Α.Σ φαίνεται να κληρονομείται κατά τον αυτοσωματικό επικρατή χαρακτήρα με ατελή διεισδυτικότητα, η οποία είναι περισσότερο μειωμένη στους άντρες απ’ ότι στις γυναίκες. Παρ’ όλο αυτά φάνηκε ότι η παρουσία του Ψ/Α.Σ ήταν μεγαλύτερος παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης γλαυκώματος στους άντρες απ’ ότι στις γυναίκες[83].

Από όλα τα παραπάνω δεν συνάγεται ο τρόπος κληρονομικότητας πιθανότατα λόγω του σύνθετου χαρακτήρα του συνδρόμου που εμπλέκει συνδυασμό γονιδίων ή και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Επιπλέον, το Ψ/Α.Σ είναι μία διαταραχή με όψιμη έναρξη-εμφάνιση, του οποίου η συχνότητα αυξάνει με την αύξηση της ηλικίας. Η διάγνωση του Ψ/Α.Σ γίνεται συνήθως σε ηλικιωμένους ασθενείς και οι πάσχοντες απόγονοι δύο ή τριών γενεών είναι δύσκολο να προσδιοριστούν. Αυτό δυσκολεύει τον διαχωρισμό των φυσιολογικών νέων ατόμων από αυτά που πιθανώς να αναπτύξουν την νόσο. Γι’ αυτό τον λόγο οι παραδοσιακές γενεαλογικές μελέτες είναι δύσκολο να διεξαχθούν.

### 3.1.2 Συσχετιζόμενα γονίδια

Υπάρχουν 20 διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια με υψηλά επαναλήψιμα επίπεδα έκφρασης στους ιστούς με Ψ/Α υλικό τα οποία έχουν σχέση με τον μεταβολισμό του εξωκυττάριου υλικού και το κυτταρικό stress. Από αυτά, μία ομάδα γονιδίων παρουσιάζει αυξημένη έκφραση σε ιστούς του πρόσθιου οφθαλμικού ημιμορίου ασθενών με Ψ/Α.Σ όπως φιμπριλλίνη-1, LTBP-1, LTBP-2, TGase-2, TIMP-2, AKAP-2, απολιποπρωτεΐνη D, AdoR-A3. Ενώ μία άλλη ομάδα με μειωμένη έκφραση σε ιστούς με Ψ/Α.Σ όπως TIMP-1,

Clusterin, Mgst-1, GST-T1 και αμυλοειδές ορού A1[84]. Ο TGF-β1 ρυθμίζει τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια: αυξάνει την έκφραση της φιμπριλλίνης-1, των LTBP-1 και -2, TGase-2 και καταστέλλει την έκφραση Clusterin σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης (in vitro). Γι' αυτό θεωρείται βασικός μεσολαβητής στην ινική διαδικασία του Ψ/Α.Σ.

Με πρωτεομική προσέγγιση στο Ψ/Α υλικό έχει προσδιοριστεί η παρουσία συστατικών των ελαστικών ινιδίων (όπως φιμπριλλίνη-1, φιμπουλίνη-2, βιτρονεκτίνη), clusterin όπως επίσης και απολιποπρωτεΐνης Ε (APOE) προτείνοντας τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτές τις πρωτεΐνες ως υποψήφια γονίδια για την ανάπτυξη του συνδρόμου[85, 86]. Μία συχνή μέθοδος για τον προσδιορισμό γονιδίων υπόπτων για την ανάπτυξη παθήσεων είναι ο έλεγχος γενετικών δεικτών στο γονιδίωμα και ο προσδιορισμός των δεικτών των οποίων η έκφραση συνδέεται περισσότερο με τους πάσχοντες.

Μέχρι σήμερα, απ' όλα τα ύποπτα γονίδια με γενετική προδιάθεση για το Ψ/Α.Σ οι πολυμορφισμοί του γονιδίου που κωδικοποιεί την clusterin (CLU) έχει βρεθεί ότι συνδέονται με το Ψ/Α.Σ και το Ψ/Α.Γ σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Η clusterin είναι μία εξωκυττάρια chaperone πρωτεΐνη-συνοδός, της οποίας η έλλειψη μπορεί να προωθήσει την χρόνια και σταθερή συγκέντρωση Ψ/Α υλικού. Η clusterin έχει βρεθεί σημαντικά αυξημένη σε συνθήκες υποξίας/ισχαιμίας, κυτταρικού και οξειδωτικού stress, συνθήκες που χαρακτηρίζουν το Ψ/Α.Σ. Ωστόσο, αντίθετα από το αναμενόμενο, στο Ψ/Α.Σ η έκφρασή της είναι μειωμένη, κάτι που υποστηρίζει επιπλέον την άποψη ότι οι κυτταρικοί προστατευτικοί μηχανισμοί είναι ελλατωματικοί. Ο TGF-β1 έχει βρεθεί ότι μειώνει την έκφραση της clusterin σε μη χρωστικοφόρα επιθηλιακά κύτταρα in vitro υποστηρίζοντας την άποψη ότι μειώνει την έκφραση της clusterin σε οφθαλμούς με Ψ/Α.Σ in vivo[87, 88].

Η σύνδεση με τον πολυμορφισμό του γονιδίου *APOE* είναι αμφιλεγόμενη[89, 90]. Με σάρωση γονιδιώματος βρέθηκε ιδιαίτερα ισχυρή σύνδεση μεταξύ του Ψ/Α.Σ όπως και του Ψ/Α.Γ και δύο ενιαίων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών ($SNP_s$) στο γονίδιο *LOXL1* (που κωδικοποιεί την οξειδάση-λυσίνη-like1) σε ασθενείς από την Ισλανδία και την Σουηδία[78]. Η σύνδεση αυτή επιβεβαιώθηκε μετέπειτα σε πολλούς πληθυσμούς παγκοσμίως[91-101]. Τέλος, ένα ακόμα γονίδιο με συχνές αναφορές στην διεθνή βιβλιογραφία του οποίου οι πολυμορφισμοί έχουν μελετηθεί για πιθανή συσχέτιση με την ανάπτυξη του Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ είναι το γονίδιο της ομοκυστεΐνης (*MTHFR*).

## 3.2 Το γονίδιο APOE

Το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης Ε (*APO E*) στο χρωμόσωμα 19q13.2 έχει τρία αλλήλια (Ε2,Ε3,Ε4) που κωδικοποιούν για τρεις ισόμορφες της απολιποπρωτεΐνης Ε (Ε2, Ε3, Ε4). Οι τρεις ισομορφές διαφέρουν ως προς ένα αμινοξύ στη θέση 112 και 158. Το Ε3 (φυσιολογικό αλλήλιο) κωδικοποιεί για κυστεΐνη/αργινίνη, το Ε2 για κυστεΐνη/κυστεΐνη και το Ε4 για αργινίνη/αργινίνη στις θέσεις 112 και 158. Οι συχνότητες *APOE* αλληλίων που βρήκαν οι Σκλαβούνου και συνεργάτες (1997) σε 216 Έλληνες εθελοντές υγιείς αιμοδότες ήταν: 5,3% για το Ε2, 88% για το Ε3 και 6,5% για το Ε4[102]. Οι κατανομές των αλληλίων του γονιδίου *APOE* είναι διαφορετικές μεταξύ Βόρειας και Νότιας Ευρώπης αφού μεσογειακές χώρες όπως Ιταλία, Τουρκία και Ελλάδα έχουν τις χαμηλότερες συχνότητες αλληλίων Ε2 και Ε4[102, 103]. Αν και σε μία μελέτη του 2010 βρέθηκε ανάλογη κατανομή αλληλίων σε Ιταλικό και Γερμανικό πληθυσμό[104].

Τα αλλήλια κληρονομούνται με τον συνεπικρατή τρόπο με αποτέλεσμα να υπάρχουν 6 διαφορετικοί γονότυποι (Ε2/ Ε2, Ε2/Ε3, Ε2/Ε4, Ε3/Ε3, Ε3/Ε4, Ε4/Ε4). Ο ομόζυγος Ε3/Ε3 είναι ο φυσιολογικός γονότυπος (wild type). Η απολιποπρωτεΐνη Ε είναι μία γλυκοπρωτεΐνη 34-KDα η οποία αποτελείται από 299 αμινοξέα. Η APOE είναι μία από τις πέντε κύριες μορφές απολιποπρωτεϊνών του αίματος (Α-Ε). Παράγεται κυρίως από το ήπαρ και τον εγκέφαλο και έχει δύο κύριους μεταβολικούς ρόλους: α) μεταφορά τριγλυκεριδίων από την περιοχή σύνθεσής τους ή απορρόφησής τους στους ιστούς όπου τα λιπίδια αποθηκεύονται ή μεταβολίζονται μέσω χυλομικρών και VLDL και β) μεταφορά χοληστερόλης, από τα περιφερικά όργανα στο ήπαρ για καταβολισμό μέσω HDL. Η APOE επίσης ρυθμίζει την ενεργότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών. Είναι γνωστό ότι η APOE εμπλέκεται άμεσα στην εναπόθεση αμυλοειδούς και στο σχηματισμό χαρακτηριστικών ινιδίων αφού προωθεί την συνάθροιση των πρόδρομων αμυλοειδογενών πρωτεϊνών[105, 106].

Το αλλήλιο Ε4 έχει συνδεθεί με εγκεφαλικές και συστηματικές διαταραχές αμυλοειδούς όπως η ασθένεια του Alzheimer (AD) σε ενήλικες προχωρημένης ηλικίας και σε διαταραχές πριονίων (prion disordes)[107].

Γι’ αυτό η γονοτύπωση του APOE χρησιμοποιείται μερικές φορές σαν συμπληρωματική εξέταση στη διάγνωση πιθανής εμφάνισης AD σε ενήλικες προχωρημένης ηλικίας με συμπτώματα. Αποτελεί προδιάθεση ή ένα παράγοντα κινδύνου αφού η παρουσία του αλληλίου Ε4 αυξάνει την πιθανότητα η νοητική διαταραχή (γεροντική άνοια) να οφείλεται στην AD[105, 106]. Το αλλήλιο Ε4 έχει συνδεθεί επίσης με αυξημένο κίνδυνο για

καρδιαγγειακές παθήσεις[107]. Το αλλήλιο Ε2 επίσης συσχετίζεται με οικογενή υπερλιποπρωτεϊναιμία (τύπος ΙΙΙ). Η γονοτύπωση του APOE μερικές φορές χρησιμοποιείται όταν βρεθούν υψηλά επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο αίμα για να ελεγχθεί η κληρονομικότητα. Άτομα με το αλλήλιο Ε4 είναι περισσότερο πιθανό να ανταποκριθούν σε διατροφή χαμηλών λιπαρών και λιγότερο στις στατίνες αντίθετα με τα άτομα με αλλήλιο Ε2 που έχουν καλύτερη θεραπευτική ανταπόκριση στις στατίνες.

Διάφορες μελέτες έχουν εξετάσει τη σύνδεση των αλληλίων του *APOE* με οφθαλμικές παθήσεις. Ο κίνδυνος και ο προστατευτικός ρόλος των *APOE* αλληλίων έχει καθοριστεί στην ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας[108-110].

Για το ΠΓΑΓ υπάρχουν μελέτες που έχουν δείξει συσχέτιση των αλληλίων του *APOE* με την πάθηση[111, 112] ενώ σε άλλες υπήρξε αρνητική συσχέτιση[113, 114].

Το ενδιαφέρον για την συσχέτιση του Ψ/Α.Σ με τα αλλήλια του *APOE* βασίστηκε στο γεγονός ότι το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ έχουν κοινά χαρακτηριστικά με διαταραχές του αμυλοειδούς όπως η AD. Υπάρχουν οι παρακάτω ενδείξεις: 1) κλινικές μελέτες έδειξαν ότι ασθενείς με AD παρουσιάζουν πιο συχνά Ψ/Α.Σ[115], 2) στο υδατοειδές υγρό ασθενών με Ψ/Α.Σ έχουν ανιχνευθεί πεπτίδια β-αμυλοειδούς και υλικό που δεσμεύει τη χρωστική Congo Red[116, 117] και 3) αμυλοειδές Ρ έχει ανιχνευθεί στις εναποθέσεις Ψ/Α υλικού[6, 118]. Όμως, η παρουσία της APOE στις εξωκυττάριες εναποθέσεις στην AD δεν είναι ειδική καθώς συναντάται και σε άλλες διαταραχές του αμυλοειδούς και πριονίων όπως: σύνδρομο Down, νόσος του Creutzfeldt-Jakob, νόσος του Πάρκινσον[119-122].

Πρόσφατα στο Ψ/Α υλικό έχει αποδειχθεί η παρουσία της APOE[86] και άλλων απολιποπρωτεϊνών όπως της clusterin (ή αλλιώς APOJ) και της απολιποπρωτεΐνης D[4, 84, 85, 88]. Στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν κυρίως δύο μελέτες που εξετάζουν την πιθανή σύνδεση του γονότυπου του *APOE* με το Ψ/Α.Σ-ΨΑ.Γ με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Σε μία μελέτη απ' τη Τουρκία ο πολυμορφισμός του *APOE* βρέθηκε ότι έχει ισχυρή σύνδεση με την ανάπτυξη Ψ/Α.Σ. Συγκεκριμένα ο Yilmaz και οι συνεργάτες του το 2005 βρήκαν σημαντική σύνδεση μεταξύ του αλληλίου Ε2 και του Ψ/Α.Σ (n=76 ασθενείς) αφού οι ασθενείς είχαν σε ποσοστό 50% το αλλήλιο Ε2 ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στους μάρτυρες ήταν 20%. Αντίθετα, το αλλήλιο Ε3 βρέθηκε να είναι «προστατευτικό» αφού εμφανιζόταν στο 72% των μαρτύρων ενώ αντίστοιχα στο 42% των ασθενών[90]. Εντούτοις, μία ακόμα πιο πρόσφατη μελέτη με μεγαλύτερο δείγμα ασθενών από την Γερμανία και την Ιταλία δεν επιβεβαίωσε τα παραπάνω αποτελέσματα. Οι Krumbiegel και συν. το 2010 σε δείγμα 661 ασθενών από την Γερμανία (με και χωρίς γλαύκωμα) και 209 από την Ιταλία

(με και χωρίς γλαύκωμα) βρήκαν το αλλήλιο Ε3 να είναι πιο συχνό και στους δύο πληθυσμούς (80% έναντι 83%) ενώ το Ε2 ήταν πιο σπάνιο (6% έναντι 9%). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συχνότητες των αλληλίων και των γονοτύπων μεταξύ ασθενών και μαρτύρων και στους δύο πληθυσμούς[104].

### 3.3 Το γονίδιο της ομοκυστεΐνης (*MTHFR*)

Το γονίδιο της μεθυλενοτετραϋδροφυλλικής αναγωγάσης (*MTHFR*) αποτελείται από 11 εξώνια και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1p36.3. Η αναγωγάση του μεθυλενοτετραϋδροφυλλικού είναι ένα ένζυμο το οποίο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και ανάγει μη αντιστρεπτά το 5,10-μεθυλενοτετραϋδροφυλλικό (υπόστρωμα) προς 5-μεθυλενοτετραϋδροφυλλικό, το οποίο χρησιμοποιείται για τη μετατροπή της ομοκυστεΐνης (ενός δυνάμει τοξικού αμινοξέος) προς μεθειονίνη, με τη δράση του ενζύμου συνθάση της μεθειονίνης. Το ένζυμο MTHFR περιορίζει την συγκέντρωση της ομοκυστεΐνης στο αίμα, εμποδίζοντας την τοξική της δράση στο ενδοθήλιο των αγγείων. Μια μεταλλαγμένη μορφή του ενζύμου, που προκύπτει από την αντικατάσταση της θυμίνης από κυτοσίνη στη θέση 677, προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης της ομοκυστεΐνης στο αίμα (υπερομοκυστεϊναιμία) και θεωρείται ότι αποτελεί προδιαθετικό παράγοντα θρομβοφιλίας. Άλλη μετάλλαξη του ενζύμου εντοπίζεται στη θέση 1298 (αντικατάσταση της κυτοσίνης από αλανίνη).

Η μετάλλαξη C677T στο γονίδιο *MTHFR* καθιστά το ένζυμο θερμοευαίσθητο με μειωμένη καταλυτική δράση και στην ομοζυγωτία συνδέεται με υπερομοκυστεϊναιμία. Η παραπάνω μετάλλαξη σε ομοζυγώτες αποτελεί την πιο κοινή αιτία μέτριας υπερομοκυστεϊναιμίας (15-30μM/L). Η υπερομοκυστεϊναιμία μπορεί να οφείλεται και σε μη γενετικούς παράγοντες όπως κάπνισμα, υψηλή κατανάλωση καφέ, χαμηλά επίπεδα Β6 και Β12 βιταμινών και φυλλικού οξέος στο πλάσμα και καθιστική ζωή. Η συχνότητα της μετάλλαξης C677T του γονιδίου *MTHFR* βρέθηκε σε ομοζυγωτία από τους Αντωνιάδη και συν. (1999) σε 160 Έλληνες εθελοντές υγιείς αιμοδότες να είναι 8%[123].

Η ομοκυστεΐνη είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για στεφανιαία νόσο[124], εγκεφαλικά επεισόδια[125] και θρομβοφλεβίτιδα[126]. Πρόσφατα υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης στο πλάσμα έχει βρεθεί ότι συνδέονται ισχυρά με αγγειακές παθήσεις που εκδηλώνονται ειδικά στον οφθαλμό, όπως θρόμβωση αρτηρίας και φλέβας αμφιβληστροειδούς, πρόσθια ισχαιμική οπτική νευροπάθεια μη αρτηριδική, νεοαγγειακή εκφύλιση της ώχρας κηλίδας[127] και διαβητική αμφιβληστοειδοπάθεια[128]. Η ομοκυστεΐνη μπορεί να συνδέεται με την

ανάπτυξη γλαυκώματος ανοιχτής γωνίας αν αυτό θεωρηθεί εν μέρη αγγειακή οφθαλμική πάθηση. Η ακριβής αιτιοπαθογένεια του γλαυκώματος είναι ελάχιστα κατανοητή. Παρόλο που η αυξημένη ΕΟΠ θεωρείται ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου για το γλαύκωμα, παθογενετικοί μηχανισμοί πέραν της αύξησης της ΕΟΠ θεωρούνται σημαντικοί για την ανάπτυξη γλαυκώματος. Μικροαγγειακοί παράγοντες ίσως να συμβάλουν στην ισχαιμία της κεφαλής του οπτικού νεύρου και κατά συνέπεια στην απώλεια νευρικών ινών του αμφιβληστροειδούς. Ενδείξεις που υποστηρίζουν αυτή την άποψη αποτελούν οι διαταραχές στην ροή του αίματος, στις οφθαλμικές και αμφιβληστροειδικές αρτηρίες[129], η σύνδεση μεταξύ γλαυκώματος και συστηματικών αγγειακών παθήσεων[130] και μία επιδείνωση της γλαυκωματικής διαδικασίας παρουσία νυχτερινής υπότασης[131]. Γι' αυτό τον λόγο παράγοντες όπως η υπερομοκυστεϊναιμία που μπορούν να προκαλέσουν αγγειακές παθήσεις του οφθαλμού μπορούν με έμμεσο τρόπο να συμβάλουν στην παθογένεια του γλαυκώματος. Επιπρόσθετα, υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης στο αίμα προάγουν την επαναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας ουσίας[132] και έχει βρεθεί ότι προκαλούν απόπτωση των νευρικών ινών του αμφιβληστροειδούς σε μοντέλο ποντικιού[133].

Λίγες μελέτες έχουν εξετάσει την σύνδεση μεταξύ ομοκυστεΐνης και γλαυκώματος ανοιχτής γωνίας, χωρίς όμως συνέπεια στα αποτελέσματα. Ο Bleich και οι συν. έδειξαν υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης στο αίμα σε ασθενείς με ΠΓΑΓ και Ψ/Α.Γ[134, 135]. Δύο ακόμα μελέτες επιβεβαίωσαν τα παραπάνω αποτελέσματα για το Ψ/Α.Γ[58, 59] ενώ άλλες δύο μελέτες απέτυχαν στο να δείξουν σύνδεση μεταξύ ομοκυστεΐνης στο αίμα και ΠΓΑΓ και γλαύκωμα φυσιολογικής πιέσης[59, 136]. Όσον αφορά το Ψ/Α.Σ, η υπερομοκυστεΐναιμία ίσως να συμβάλει στον αυξημένο αγγειακό κίνδυνο που έχει βρεθεί ότι διατρέχουν οι ασθενείς με Ψ/Α.Σ και περιλαμβάνει και τα ανευρύσματα της κοιλιακής αορτής[56]. Ο ρόλος της υπερομοκυστεϊναιμίας στις αγγειακές διαταραχές είναι καλά καθορισμένος και στους ασθενείς με Ψ/Α.Σ οι διαταραχές αυτές θα μπορούσαν να ενισχυθούν επιπλέον από βλάβες σε γονίδια με σημαντικούς ρόλους στη σύνθεση ελαστίνης όπως το γονίδιο *LOXL1*[137].

Τα υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης στους ασθενείς με Ψ/Α.Σ έχουν ανιχνευθεί εκτός από το πλάσμα και στο υδατοειδές υγρό και τα δάκρυα[60, 135, 138]. Υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης στο αίμα έχουν βρεθεί και στους ασθενείς με AD και άνοια οφειλόμενη σε αγγειοπάθεια με τους οποίους οι ασθενείς με Ψ/Α.Γ έχουν κοινά ευρήματα[139, 140].

Υπάρχουν μελέτες που εξέτασαν τη σύνδεση της μετάλλαξης του MTHFR με το Ψ/Α.Γ. Μόνο σε μία από αυτές του Junemann και συν. (2005) βρέθηκε ότι η παραπάνω

μετάλλαξη ήταν πιο συχνή στο ΠΓΑΓ απ' ότι σε μάρτυρες εντούτοις στο Ψ/Α.Γ δεν ήταν σημαντικά συχνότερη[141]. Σε δύο τελευταίες μελέτες του 2008 και του 2009 δεν αποδείχθηκε σύνδεση της μετάλλαξης C677T του γονιδίου *MTHFR* και του Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ[142, 143].

### 3.3 Το γονίδιο lysyl oxidase-like1 (*LOXL1*)

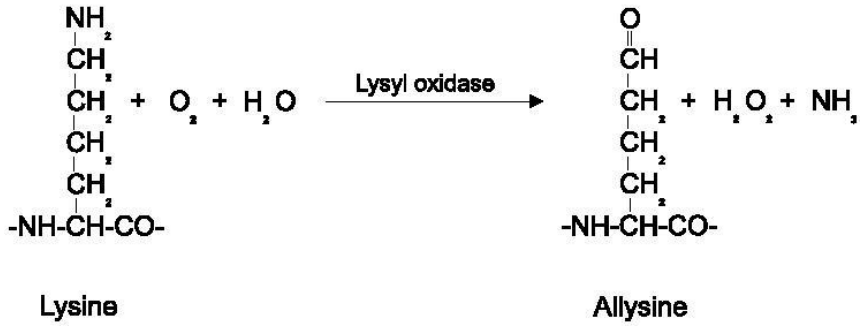
Οι οξειδάσες της λυσίνης είναι εξωκυττάρια ένζυμα με συμπαράγοντα χαλκό που καταλύουν τη διασύνδεση κολλαγόνου ή ελαστίνης (δημιουργία σταυροδεσμών) με οξειδωτική απαμίνωση των καταλοίπων λυσίνης[144]. Αυτή η οικογένεια ενζύμων περιλαμβάνει 5 μέλη: την οξειδάση της λυσίνης (LOX) και τα παράλογα: οξειδάση της λυσίνης like1-4 (LOXL1, LOXL2, LOXL3, LOXL4). Οι λειτουργικές διαφορές τους δεν είναι καλά καθορισμένες.

Το κάθε γονίδιο της *LOX* οικογένειας γονιδίων (*LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL3, LOXL4*) στους ανθρώπους περιέχει ένα μοτίβο ενωμένο με χαλκό, κατάλοιπα λύσιλο-tyrosyl-κινόνης (LTQ) και μία περιοχή παρόμοια με υποδοχέα κυτταροκίνης (CRL) στην καλά διατηρημένη περιοχή του COOH-τελικού άκρου. Τα παράλογα γονίδια εντοπίζονται σε άλλα χρωμοσώματα και είναι: *LOX*-5q23.2*, LOXL2*-8p21.3*, LOXL3*-2p13*, LOXL4*-10q24.

Το *LOXL1* (UniProtKB: Q08397, OMIM: 153456, HGNG: 6665, GeneID: 4016) είναι ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για ένα μέλος της οικογένειας οξειδασών της λυσίνης (LOXL1) (EC 1.4.3.13.). Η σηματοδοτική αλληλουχία περιλαμβάνει 25 αμινοξέα, η καταλυτική περιοχή 370-574 και ο χαλκός δεσμεύεται σε κάποιες ιστιδίνες των θέσεων 449, 451, 453. Το *LOXL1* διαθέτει επτά εξόνια, κωδικοποιεί mRNA (2358 βάσεις) και πρωτεΐνη 574 αμινοξέων (63KDa) (ενώ έχει αναφερθεί και άλλο ένα μετάγραφο που δίνει 436 αμινοξέα) (http://www.genecards.org). Μία εξαιρετικά διατηρούμενη αλληλουχία αμινοξέων στο C-τελικό άκρο φαίνεται να είναι επαρκής για την δραστηριότητα της αμινοοξειδάσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι κάθε μέλος της οικογένειας μπορεί να διατηρήσει αυτή τη λειτουργία. Το N-τελικό άκρο είναι λιγότερο διατηρημένο και μπορεί να προσδώσει πρόσθετους διαφορετικούς ρόλους στην αναπτυξιακή ρύθμιση, το γήρας, την καταστολή του όγκου, τον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης και την χημειοταξία σε κάθε ξεχωριστό μέλος της οικογένειας.

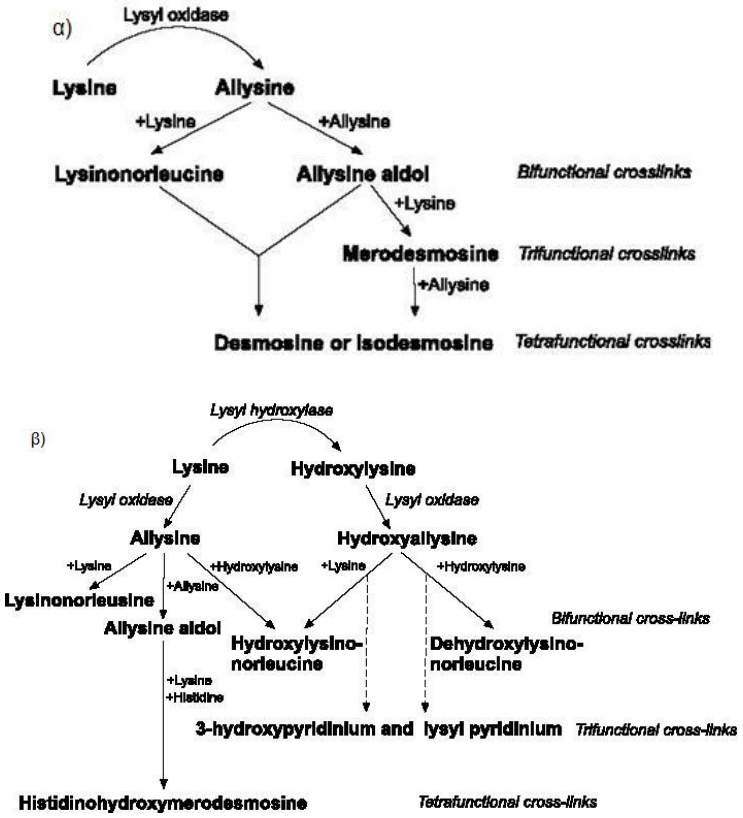
Η οικογένεια των ενζύμων LOXL1 καταλύουν τον σχηματισμό αλδεϋδών από κατάλοιπα λυσίνης σε πρόδρομες ουσίες κολλαγόνου ή ελαστίνης. Οι αλδεΰδες είναι υψηλής δραστικότητας και υποβάλλονται σε αυθόρμητες χημικές αντιδράσεις με τροποποιημένα

κατάλοιπα αλδεΰδης που προέρχονται από δράση άλλων οξειδασών της λυσίνης, (αντίδραση με τοπακινόνη που προκύπτει από οξείδωση τυροσίνης) (**σχήμα 3.1**).




**Σχήμα 3.1: Η οξειδάση της λυσίνης με οξειδωτική απαμίνωση της λυσίνης δημιουργεί την αλλυσίνη, η οποία αντιδρά αυθόρμητα με αντίστοιχες αλδεΰδες προς σχηματισμό δι-, τρι-, τετραλειτουργικών crosslinks (http://herkules.oulu.fi/isbn9514267397/html/i894480.html).**

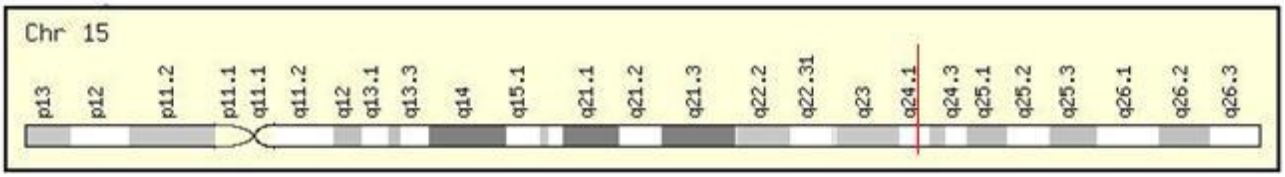
Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την τιθάσευση του κολλαγόνου και της ελαστίνης, η οποία είναι απαραίτητη για την σταθεροποίηση των ινών κολλαγόνου και για την ακεραιότητα των ωρίμων μορίων ελαστίνης. Πολύπλοκα crosslinks σχηματίζονται στο κολλαγόνο (πυριδινολίνες προερχόμενες από 3 κατάλοιπα λυσίνης) και στην ελαστίνη (δεσμοσίνες προερχόμενες από 4 κατάλοιπα λυσίνης) τα οποία διαφέρουν στη δομή (**σχήμα 3.2**).




**Σχήμα 3.2: α) Αντιδράσεις της λυσίνης και της υδροξυλυσίνης στην βιοσύνθεση των crosslinks με την ελαστίνη και β) το κολλαγόνο. Μετά από οξειδωτική απαμίνωση προς σχηματισμό δραστικών αλδεϋδών, διαδοχικές αντιδράσεις καταλήγουν σε δι-, τρι- και τετραλειτουργικά crosslinks (http://herkules.oulu.fi/isbn9514267397/html/i894480.html).**

Το γονίδιο *LOXL1* εντοπίζεται στη χρωμοσωμική θέση 15q24-25 (base pair 74,218,788-base pair 74,244,477) (**εικόνα 3.1**) και αποτελείται από επτά εξόνια, πέντε από τα οποία (εξόνια 2-6) παρουσιάζουν ισχυρή ομολογία μεταξύ τους, κωδικοποιούν την καταλυτική περιοχή του C τελικού άκρου και κάνουν crosslinks με την ελαστίνη. Όποιες διαφορές υπάρχουν στην αλληλουχία μεταξύ των γονιδίων *LOXL1* και των υπολοίπων ομολόγων βρίσκονται στο εξόνιο 1, το οποίο κωδικοποιεί την μοναδική περιοχή του N τελικού άκρου που απαιτείται για την κατάλληλη ενεργοποίηση του ενζύμου, την αναγνώριση του υποστρώματος και τον σχηματισμό δεσμού[145]. Περιοχές της LOX και LOXL1 που κωδικοποιούνται από συγκεκριμένες DNA ισομορφές των *LOX* και *LOXL1* διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κατεύθυνση εναπόθεσης των δύο ενζύμων σε ελαστικές ίνες με την διαμεσολάβηση αντιδράσεων με τροποελαστίνη. Ένα σημαντικό στοιχείο της αναγνώρισης του υποστρώματος βρίσκεται σε αυτή την περιοχή του μορίου της και η προμορφή του ενζύμου είναι αυτό που αντιδρά με το υπόστρωμα. Έτσι αυξάνεται η πιθανότητα οι

διαφορές στις αλληλουχίες αυτών των περιοχών της LOX και LOXL1 να είναι υπεύθυνες για τις λειτουργικές διαφορές που παρατηρούνται στα δύο ένζυμα[145].




**Εικόνα 3.1: Γενωμική τοποθεσία του γονιδίου LOXL1 (http://www.genecards.org).**

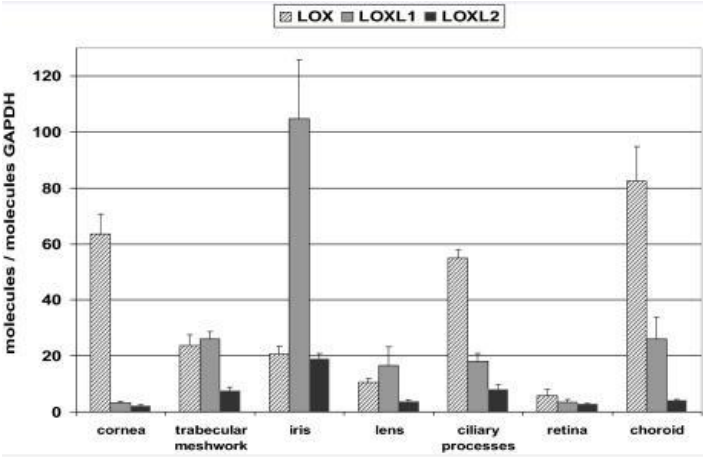
Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι το προπεπτίδιο LOXL1 εμπλέκεται στην ελαστογένεση καταλύοντας τον πολυμερισμό της τροποελαστίνης για τον σχηματισμό ώριμου πολυμερούς ελαστίνης και αλληλεπιδρώντας με την φιμπουλίνη-5. Όπως έχει αναφερθεί, οι ελαστικές ίνες είναι μέρη του εξωκυττάριου υλικού και προσδίδουν ανθεκτικότητα. Η απώλεια των ελαστικών ινών συνδέεται με την γήρανση του συνδετικού ιστού και σημαντικές παθήσεις όπως το εμφύσημα[145-147]. In vivo χρησιμοποιώντας knock- out ποντίκια (με έλλειψη της LOXL1 πρωτεΐνης) βρέθηκε μειωμένη παραγωγή ελαστίνης σε πολλούς ιστούς με αποτέλεσμα να υπάρχουν αγγειακές ανωμαλίες και πολλά άλλα με ταυτόχρονη συσσώρευση τροποελαστίνης[145, 147].

Ξεχωριστά από την LOX, η LOXL1 πρωτεΐνη εντοπίζεται ειδικά στους τόπους ελαστογένεσης. Έτσι, η εναπόθεση του πολυμερούς της ελαστίνης είναι σημαντικός παράγοντας για την διατήρηση των ελαστικών ινών και εξαρτάται από την LOXL1, η οποία λειτουργεί τόσο ως ένα cross-link ένζυμο όσο και ως παράγοντας που συμμετέχει στην οργάνωση χωρικά της ελαστογένεσης στους τόπους απόθεσης ελαστίνης[147].

Η πρωτεΐνη LOXL1 θεωρείται απαραίτητη για την ομοιόσταση των ελαστικών ινών τόσο κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των ιστών όσο και μετά από αυτή[145]. Έχει προταθεί ό τι μπορεί να έχει συγκεκριμένο ρόλο στην αναδιαμόρφωση του συνδετικού ιστού κατά την διάρκεια δυναμικών διαδικασιών όπως ή ίνωση, ο καρκίνος, η εξέλιξη ιστών και οι ιστικές βλάβες[148].

Στον άνθρωπο η πρωτεΐνη LOXL1 βρέθηκε σε πολλούς ιστούς όπως δέρμα, καρδιά, πλακούντας, πνεύμονας, ήπαρ, νεφροί και μυοσκελετικοί ιστοί[149]. Αν και ο ρόλος του *LOXL1* στον σχηματισμό και στην ομοιόσταση της εξωκυττάριας ουσίας στον οφθαλμό δεν είναι αποδεδειγμένος, η πρωτεϊνική έκφραση του *LOXL1* έχει πρόσφατα ανιχνευτεί σε διάφορους οφθαλμικούς ιστούς όπως κερατοειδής, ίριδα, φακός, ακτινωτό σώμα και

οπτικό νεύρο[74, 150]. Τα επίπεδα έκφρασης βρέθηκαν να είναι υψηλότερα στην ίριδα απ' ότι στον κερατοειδή και στον αμφιβληστροειδή. Το *LOX* βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα διαφόρων τύπων κυττάρων, στις εξωκυττάριες ίνες και στα οπτικά νεύρα. Οι LOXL2, LOXL3 και LOXL4 ισομορφές ανιχνεύτηκαν επίσης σχεδόν σε όλους τους οφθαλμικούς ιστούς. (**εικόνα 3.2**). Σε μία μελέτη της Schlötzrer-Schrehardt και συν. βρέθηκε ότι η πρωτεϊνική έκφραση του *LOXL1* ήταν σημαντικά αυξημένη στα πρώιμα στάδια σε ασθενείς με Ψ/Α.Σ και μειωμένη στα προχωρημένα στάδια με ή χωρίς γλαύκωμα σε σχέση με τους μάρτυρες. Η έκφραση των *LOX* και *LOXL2* δεν είχε διαφορά ανάμεσα στις ομάδες. Η LOXL1 συμμετέχει στα αρχικά στάδια της ελαστογένεσης. Τροποποιήσεις στην επεξεργασία, την ενεργοποίηση ή/και την ειδικότητα του υποστρώματος μπορεί να συμβάλλουν στην ανώμαλη συσσώρευση ελαστικών ινών σε χαρακτηριστικά ινίδια PEX[151].




**Εικόνα 3.2: Πρωτεϊνική έκφραση του *LOX, LOXL1* και *LOXL2* σε οφθαλμικούς ιστούς[151].**

Η πρωτεΐνη LOXL1 μαζί με άλλες πρωτεΐνες όπως APOE έχουν ανιχνευθεί στις εναποθέσεις Ψ/Α υλικού τόσο με ανοσοϊστοχημική ανάλυση όσο και με φασματοσκοπία μάζας[86]. Τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των LOX πρωτεϊνών καθώς και άλλες πρωτεΐνες οι οποίες συνεισφέρουν στη διατήρηση των ελαστικών ινών και στον σχηματισμό του εξωκυττάριου υλικού, μπορούν να αποτελέσουν υποψήφιους γενετικούς παράγοντες[91].

Οι Thorleifsson και οι συνεργάτες (2007) πρόσφατα δημοσίευσαν μία μελέτη που αποτελούσε σημαντικό βήμα για την κατανόηση του Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ αφού αναζήτησαν συγκεκριμένα γονίδια που προκαλούν γλαύκωμα σε ασθενείς από την Σουηδία και την Ισλανδία. Ανακάλυψαν ιδιαίτερα ισχυρή σύνδεση (> 99% population attributable risk) μεταξύ Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ και τριών ενιαίων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών ($SNP_s$) στο γονίδιο *LOXL1* στο χρωμόσωμα 15q24.1. Οι δύο πολυμορφισμοί ανιχνεύτηκαν στο εξόνιο

1 και ο τρίτος στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου. Ο πολυμορφισμός στο ιντρόνιο είναι αγνώστου λειτουργίας αφού δεν κωδικοποιεί κάποιο αμινοξύ ενώ οι δύο πολυμορφισμοί στο εξόνιο θεωρείται ότι απονέμουν κίνδυνο για Ψ/Α.Γ κυρίως μέσω του Ψ/Α.Σ. Είναι βιολογικά εύλογο ότι μεταβολές στη λειτουργία του *LOXL1* μπορούν να έχουν ως συνέπεια παθολογική παραγωγή ελαστίνης και συσσώρευση ινώδους υλικού τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα του Ψ/Α.Σ αν και ακριβής μηχανισμός που οδηγεί στην ανάπτυξη Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ δεν έχει ακόμα καθοριστεί[78].

Οι DNA ισομορφές του *LOXL1* που συνδέονται με την Ψ/Α βρίσκονται όλες στη μη διατηρούμενη Ν-τελική αλληλουχία η οποία μπορεί να έχει ρυθμιστική λειτουργία. Αυτό το μέρος της πρωτεΐνης μπορεί να παίξει ρόλο στην κατεύθυνση της LOXL1 πρωτεΐνης σε τόπους της ελαστογένεσης, αλλά είναι απίθανο να επηρεάζει την καταλυτική της δράση. Είναι πιθανό οι ισομορφές που σχετίζονται με την Ψ/Α να βρίσκονται σε ανισσοροπία με άλλες αλλαγές της DNA αλληλουχίας που επηρεάζουν την έκφραση γονιδίου γι' αυτό είναι απαραίτητο να γίνουν επιπλέον μελέτες για το *LOXL1* σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης για να καθοριστεί αν η μείωση του *LOXL1* σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης είναι υπεύθυνη γι'αυτή την κατάσταση[91].

Η σύνδεση του LOXL1 με Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ επιβεβαιώθηκε από πολλές μελέτες σε διαφορετικούς πληθυσμούς από Η.Π.Α[91], Αυστραλία[74], Ινδία[93], Ιαπωνία[99] και Ευρώπη[95, 100, 101, 152] αποδεικνύοντας ότι το γονίδιο *LOXL1* είναι κύριος γενετικός παράγοντας κινδύνου ο οποίος σχετίζεται σχεδόν με το σύνολο των περιπτώσεων Ψ/Α.Σ παγκοσμίως. Αντίθετα καμία σύνδεση δε βρέθηκε με το ΠΓΑΓ[153], το χρωστικοφόρο γλαύκωμα[154] και με το γλαύκωμα κλειστής γωνίας[155]. Τα παραπάνω σε συνδυασμό με το ότι δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ σε σχέση με το γονίδιο *LOXL1*, προτείνει ότι το γονίδιο συμβάλει στην έναρξη και εξέλιξη της πάθησης και όχι απαραίτητα μέσω της αύξησης της ΕΟΠ.

Ο πολυμορφισμός στο ιντρόνιο 1 (αλλαγή C σε T), rs2165241, που όπως προαναφέρθηκε είναι αγνώστου λειτουργίας αφού δεν κωδικοποιεί κάποιο αμινοξύ, βρέθηκε να έχει ισχυρή σύνδεση με το Ψ/Α.Γ σε Ισλανδικό και Σουηδικό πληθυσμό, n=15266 (OR=3,40)[78]. Βρέθηκε επιπλέον ότι το αλλήλιο κινδύνου είναι το T σε Φινλανδικό πληθυσμό (p=2,62 x 10(-13), p<0,0001) όπως και σε πληθυσμό στις Η. Π. Α., n=625 ($p=1,2 \times 10^{-11}$)[91].

Από τους 2 πολυμορφισμούς στο εξόνιο 1, ο rs3825942 (G153D) (αλλαγή G σε A) είναι ο πιο συχνός αφού ανιχνεύεται στο 94%-100% των ασθενών με Ψ/Α.Γ, στο 95%-100% των ασθενών με Ψ/Α.Σ και στο 57%-88% της ομάδας ελέγχου[156]. Συγκεκριμένα το G αλλήλιο

του rs3825942 SNP θεωρείται ότι είναι ο ισχυρότερος παράγοντας κινδύνου αφού ανιχνεύεται στο 95%-100% των περιπτώσεων με Ψ/Α.Σ με ένα μέσο odds ratio (OR) 10,89.

Ο δεύτερος πολυμορφισμός, ο rs1048661 (R141L) (αλλαγή G σε T) δεν έχει συνδεθεί στον ίδιο βαθμό όπως ο πρώτος. Η σύνδεση έχει αποδειχθεί σε μία μελέτη από την Αυστραλία[74], δύο από τις Η.Π.Α[92, 157] αλλά μία τρίτη απ' τις Η.Π.Α.[91] και μία από την Ινδία[93] δεν επιβεβαίωσαν την σύνδεση αυτή. Επιπρόσθετα, σε μελέτες με πληθυσμό από την Ιαπωνία φαίνεται ότι ο αυξημένος κίνδυνος αφορά στο αλλήλιο T σε αντίθεση με τις περισσότερες μελέτες όπου ο αυξημένος κίνδυνος αφορά στο αλλήλιο G. Στις περισσότερες μελέτες που έχει αποδειχθεί η σύνδεση, το G αλλήλιο ανιχνεύεται στο 78%-84% των ασθενών με Ψ/Α.Γ, στο 78%-83% των ασθενών με Ψ/Α.Σ και στο 60%-68% των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Στους πληθυσμούς από την Ιαπωνία αντίθετα ανιχνεύεται το αλλήλιο T στο 96%-100% των ασθενών με Ψ/Α.Γ, στο 98%-100% των ασθενών με Ψ/Α.Σ και στο 51%-54% των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Αυτή η διαφορετική συσχέτιση δείχνει μία ασαφή σύνδεση μεταξύ του rs1048661 SNP και του Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ. Είναι δυνατόν ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός να μην παίζει ρόλο στην ανάπτυξη Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ ή να απαιτεί την συνύπαρξη άλλων γενετικών ή περιβαλλοντικών παραγόντων γι' αυτό θεωρείται μικρότερου κινδύνου[156].

Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό της συσχέτισης του γονιδίου *LOXL1* με το Ψ/Α.Σ και το Ψ/Α.Γ είναι η πολλή υψηλή συχνότητα των πολυμορφισμών στους πάσχοντες, αφού το population attributable risk σε διάφορες μελέτες βρέθηκε μεταξύ 80%-99%.

Παρολ' αυτά η συχνότητα των πολυμορφισμών βρέθηκε σχετικά υψηλή και στα άτομα των ομάδων ελέγχου με αναφερόμενα ποσοστά έως και 88%. Αυτό δείχνει ότι πιθανώς γονίδια «προστατευτικά» ή περιβαλλοντικοί παράγοντες επιβραδύνουν την ανάπτυξη της νόσου. Από μία μελέτη των Challa και συνεργατών (2008) βρέθηκε και για τα δύο $SNP_s$ του *LOXL1* ότι έχουν πολλή υψηλή ευαισθησία (test θετικό σε άτομα που έχουν την διαταραχή) αλλά πολλή χαμηλή ειδικότητα (test αρνητικό σε άτομα που δεν έχουν την διαταραχή). Για τον rs3825942 SNP η ευαισθησία για το G αλλήλιο είναι 100% και η ειδικότητα 3,1% εγώ για τον rs1048661 η ευαισθησία για το G αλλήλιο είναι 95,7% και η ειδικότητα 13%[92]. Αυτό δείχνει ότι γενετικά test για πολυμορφισμούς του *LOXL1* θα είχαν περιορισμένη χρήση σε γενικό πληθυσμό. Επιπλέον οι ομοιότητες στις συχνότητες των πολυμορφισμών στους ασθενείς με Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ καθιστούν προβληματική την πρόβλεψη μέσω διαγνωστικών γενετικών test των ασθενών με Ψ/Α.Σ που θα αναπτύξουν Ψ/Α.Γ από αυτούς που δεν θα αναπτύξουν. Ακόμα, η έκφραση της πρωτεΐνης LOXL1 δεν είναι

ξεκάθαρο αν επηρεάζεται από τους πολυμορφισμούς του *LOXL1* σε τέτοιο βαθμό ώστε να οδηγήσει σε μία συστηματική πάθηση όπως το Ψ/Α.Σ. Αυτό ενισχύει την πολυπαραγοντική παθογένεια του Ψ/Α.Σ[156]. Ωστόσο διάφορες εταιρίες «ταχυδρομικής» γενετικής με δείγμα σάλιο έχουν συμπεριλάβει τους πολυμορφισμούς σχετιζόμενους με το Ψ/Α.Γ. Η εταιρία deCODEme έχει συμπεριλάβει γενετικά tests για τους πολυμορφισμούς rs2165241 και rs1078967, η 23andMe για τον rs2165241 ενώ οι εταιρίες Navigenics και Pathway έχουν συμπεριλάβει γενετικά tests αλλά δεν αναφέρουν για ποιους επακριβώς πολυμορφισμούς του *LOXL1* (τα γενετικά tests των εταιριών θεωρούνται εδραιωμένα εάν για πάνω από 750 περιπτώσεις βρεθεί το $p_{value}$ <0,01.

Υπάρχει μία μελέτη σε πληθυσμό έγχρωμων της Νοτίου Αφρικής, της οποίας τα αποτελέσματα διαφοροποιούνται από τα μέχρι τώρα γνωστά για την σύνδεση του rs3825942 SNP του *LOXL1* και του Ψ/Α.Γ. Σε αυτή την μελέτη το αλλήλιο κινδύνου για τον rs3825942 SNP ήταν το αλλήλιο A, σε αντίθεση με το αλλήλιο G που αφορά στους άλλους πληθυσμούς[158].

Τέλος, λόγω της επιβεβαιωμένης σύνδεσης του Ψ/Α.Σ με την AD και τις αγγειακές παθήσεις υπάρχουν δύο πρόσφατες μελέτες που εξέτασαν την πιθανή συσχέτισή τους με τους πολυμορφισμούς *LOXL1*. Οι Hollö και οι συνεργάτες (2011) ανέφεραν ότι η συχνότητα του G αλληλίου (αλλήλιο κινδύνου) και στους δύο πολυμορφισμούς του LOXL1 δεν διέφερε μεταξύ ασθενών με Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ και αγγειακή πάθηση και των ασθενών με Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ αλλά χωρίς αγγειακή πάθηση[152]. Οι Abramsson και οι συνεργάτες (2011) δεν βρήκαν σύνδεση μεταξύ των πολυμορφισμών των γονιδίων και της AD[159].

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

# ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ-ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ

## 4.1 Εισαγωγή

Ως μετάλλαξη **(mutation)** ορίζεται μία μόνιμη αλλαγή ή αλλοίωση στο γενετικό υλικό ενός κυττάρου, η οποία επηρεάζει την νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός ή περισσοτέρων γονιδίων. Οι μεταλλάξεις αποτελούν καθημερινότητα για τη ζωή ενός κυττάρου. Αν και οι πιο πολλές είναι επιβλαβείς εφόσον δεν επιδιορθωθούν, χωρίς αυτές η εξέλιξη θα ήταν αδύνατη. Μία νέα μετάλλαξη, για ένα δεδομένο γονίδιο, εμφανίζεται με συχνότητα περίπου μία στο εκατομμύριο κατά τη μετάβαση της γενετικής πληροφορίας από το μητρικό στο θυγατρικό κύτταρο. Συνεπώς αν θεωρηθεί σωστή η εκτίμηση πως το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει περίπου 25.000 γονίδια, τότε το 2,5% όλων των νεογέννητων φέρει μια νέα μετάλλαξη. Οι περισσότερες όμως από τις προαναφερθείσες μεταλλάξεις δεν εκδηλώνονται, αφού το αντισταθμιστικό γονίδιο του αλληλόμορφου χρωμοσώματος είναι φυσιολογικό, ενώ για να εκδηλωθεί κάποια γενετική ασθένεια είναι απαραίτητο να υπάρχει μετάλλαξη και στα δύο αλληλόμορφα χρωμοσώματα, στο συγκεκριμένο γονίδιο από το οποίο εξαρτάται η ασθένεια (υπολλειπόμενη κληρονόμηση).

Η κατάταξη των μεταλλάξεων γίνεται με διάφορους τρόπους. Μία αρχική κατάταξη γίνεται βάσει το είδος της βάσης που αντικαθίσταται κάθε φορά: 1) **Μεταλλάξεις μετάπτωσης (transition)** 2) **Μεταλλάξεις μεταστροφής** (**transversion**). Στις μεταλλάξεις μετάπτωσης μία πουρίνη (αδενίνη ή γουανίνη) αντικαθίσταται από μία άλλη πουρίνη ή μία πυριμιδίνη (θυμίνη ή κυτοσίνη) αντικαθίσταται από μία άλλη πυριμιδίνη. Στις μεταλλάξεις μεταστροφής μία πουρίνη αντικαθίσταται από μία πυριμιδίνη ή το αντίστροφο. Μία δεύτερη κατάταξη γίνεται βάσει του μεγέθους του γενετικού υλικού που υφίσταται μετάλλαξη: 1) **Μεταλλάξεις που προκαλούν μεγάλες αναδιατάξεις** στο μόριο του DNA, όπως ελλείμματα ή προσθήκες μεγάλων τμημάτων DNA και 2) **Σημειακές μεταλλάξεις (point mutations)** στις οποίες μόνο μία βάση υφίσταται την αλλοίωση. Οι σημειακές μεταλλάξεις κατηγοριοποιούνται ως εξής: α) **Μεταλλάξεις με λάθος νόημα ή παρερμηνεύσιμες (missense)**, στις οποίες η αλλαγή της βάσης οδηγεί κατά την μετάφραση σε αντικατάσταση ενός αμινοξέος από άλλο β) **Μεταλλάξεις χωρίς νόημα ή μη νοηματικές (nonsense)**, στις οποίες η αλλαγή της βάσης οδηγεί κατά την μετάφραση στη δημιουργία ενός εκ των τριών κωδικονίων λήξης της πρωτεϊνοσύνθεσης (UAA, UAG, UGA). Έτσι, δημιουργούνται πρωτεΐνες με μικρότερο μέγεθος και μειωμένη λειτουργικότητα γ) **Μεταλλάξεις αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης (frame shift)**, όπου υπάρχει προσθήκη ή

έλλειμμα ενός ή περισσοτέρων νουκλεοτιδίων, χωρίς ο αριθμός των προστιθέμενων ή αφαιρούμενων νουκλεοτιδίων να είναι πολλαπλάσιο του τρία, με αποτέλεσμα να αλλάζει το πλαίσιο ανάγνωσης και να δημιουργείται μία εντελώς διαφορετική πρωτεΐνη δ) **Σιωπηρές μεταλλάξεις (silent),** δηλαδή μεταλλάξεις στις οποίες έχει αντικατασταθεί το τρίτο νουκλεοτίδιο κάποιου κωδικονίου και λόγω του εκφυλισμού του γενετικού κώδικα, η μετάλλαξη αυτή δε συνεπάγεται την αλλαγή κάποιου αμινοξέος κατά τη μετάφραση ε) Μεταλλάξεις στις συντηρητικές αλληλουχίες **ματίσματος (splicing)** ιντρονίων, δηλαδή μεταλλάξεις που επηρεάζουν την ωρίμανση του mRNA παρεμποδίζοντας τη σωστή αποκοπή των αλληλουχιών που αντιστοιχούν στα ιντρόνια και την ανασυγκόλληση των αλληλουχιών που αντιστοιχούν στα εξόνια στ) **Μεταλλάξεις στους υποκινητές (promoter)** των γονιδίων όπου συνήθως εντοπίζονται σε θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων, με αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας μεταγραφής αυτού του γονιδίου ζ**) Μεταλλάξεις στις μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες (ιντρόνια)** των γονιδίων, με φυσική απόρροια την αποικοδόμηση mRNA και τελικά την μειωμένη ικανότητα πρωτεϊνοσύνθεσης.

Ως **σημειακοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs)**, ορίζονται οι διαλληλικές διαφοροποιήσεις σε ποσοστό>1% του πληθυσμού κάθε 1:250 έως 1:300 βάσεις στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Μπορεί να βρίσκονται είτε σε κωδικοποιούσες περιοχές είτε όχι και μπορεί να συνδέονται με νόσημα ή όχι.

Οι μεταλλάξεις, θα μπορούσαν επιπροσθέτως να χωρισθούν στις **κληρονομούμενες (hereditary)** και στις **επίκτητες ή αυθόρμητες (acquired or spontaneous)**. Οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις είναι αυτές που μεταβιβάζονται από γενιά σε γενιά, γιατί βρίσκονται στο γενετικό υλικό των γαμετικών κυττάρων **(germline mutations)**, ενώ οι επίκτητες ή αυθόρμητες είναι το αποτέλεσμα τυχαίων λαθών στην αντιγραφή του DNA, συναντώνται στα σωματικά κύτταρα και δε μεταβιβάζονται από γενιά σε γενιά. Οι **σωματικές μεταλλάξεις (somatic mutations)** συνήθως υπάρχουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα παρουσία υψηλών επιπέδων φυσιολογικών αλληλουχιών **«φυσικού τύπου» (wild-type)** που λειτουργούν σαν υπόβαθρο. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη μεθόδων με μεγαλύτερη ευαισθησία συγκριτικά με αυτές που χρησιμοποιούνται για ανάλυση μεταλλάξεων στη γαμετική σειρά[160].

### 4.1.1 Τεχνικές ανάλυσης μεταλλάξεων

- Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα για την ανάλυση και τον προσδιορισμό μεταλλάξεων είναι ποικίλες και βασίζονται σε πολλές και διαφορετικές αρχές με πιο σύνηθες κοινό χαρακτηριστικό τον **ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό**. Οι τεχνικές ανάλυσης μεταλλάξεων χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες σύμφωνα με το αν μπορούν να προσδιορίσουν γνωστές ή άγνωστες μεταλλάξεις. Εάν είναι γνωστό το φάσμα των μεταλλάξεων ενός συγκεκριμένου πληθυσμού θα χρησιμοποιηθούν τεχνικές ανίχνευσης που στοχεύουν συγκεκριμένες μεταλλάξεις όπως:
- **Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLPs, Ανίχνευση μεταλλάξεων με χρήση περιοριστικών ενζύμων)**: Η τεχνική RFLPs ήταν από τις πρώτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση DNA τόσο στη Μοριακή Διαγνωστική, όσο και στη Γενετική. Σήμερα, η χρήση της δεν είναι τόσο ευρεία όσο στο παρελθόν, λόγω της ανακάλυψης νέων τεχνικών, πιο απλών, γρήγορων και ευαίσθητων. Η χρήση περιοριστικών ενζύμων και η εμφάνιση του αποτελέσματος με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό και την τεχνική της αποτύπωσης ήταν από τις πρώτες προσεγγίσεις για την ανίχνευση μεταλλάξεων.
- **Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων του DNA – Maxam & Gilbert Sequencing, Sanger Sequencing:** τεχνική προσδιορισμού της αλληλουχίας των βάσεων δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων (DNA) και γενικότερα των νουκλεϊκών οξέων (δηλαδή και RNA)[163, 164].
- **Pyrosequencing (Αλληλούχηση DNA σε πραγματικό χρόνο):** μέθοδος αλληλούχησης DNA πραγματικού χρόνου (Real-time DNA-sequencing) σε μικρό τμήμα του DNA που βασίζεται στην ανίχνευση πυροφωσφορικού (PPi) που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης πολυμερισμού του DNA[165].
- **Next Generation Sequencing – Sequencing νέας γενιάς:** νεώτερη τεχνολογία ανάλυσης αλληλουχίας DNA η οποία καθιστά δυνατή τη λήψη πληροφοριών για όλο το γονιδίωμα[166].
- **Quantitative PCR (QPCR, Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου με χρήση ανιχνευτών υβριδισμού ή TaqMan):** βασίζεται στην ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια και την καταγραφή του φθορισμού που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR[160]. Τα PNAs (Peptide Nucleic Acids, Πεπτιδικά Νουκλεϊκά Οξέα) και τα LNAs (Locked Nucleic Acids, «Κλειδωμένα» Νουκλεϊκά Οξέα) είναι ένα είδος ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση της PCR. Πρόκειται για μία τεχνική που χρησιμοποιεί φυσικές μοριακές ρυθμίσεις

για επίτευξη ειδικότητας[167]. Η ασύμμετρη PCR με χρήση ανιχνευτών υβριδισμού (Asymmetric PCR with probes) είναι μία παραλλαγή της PCR. Η κύρια διαφορά της από τη συνήθη PCR είναι ότι χρησιμοποιούνται άνισες συγκεντρώσεις των δύο εκκινητών[160].

- **Αλληλοειδική ενίσχυση PCR (Allele – Specific Amplification, ASA ή ARMS):** Μία άλλη κατηγορία μεθοδολογιών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων είναι αυτές που βασίζονται στην αλληλοειδική ενίσχυση κατά την αντίδραση της PCR (Allele-Specific Amplification, ASA). Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε δύο παράλληλες αντιδράσεις.
- **ASO (Υβριδισμός με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια)**: τεχνική ανάλυσης γνωστών σημειακών μεταλλάξεων, βασίζεται στο γεγονός ότι τα ολιγονουκλεοτίδια (probes) υβριδίζονται μόνο με αλληλουχίες που παρουσιάζουν απόλυτη συμπληρωματικότητα[160].
- **Μικροσυστοιχίες Ολιγονουκλεοτιδίων DNA (DNA Microarrays)**: βασίζεται στον υβριδισμό ιχνηθετημένου RNA ή DNA του δείγματος προς εξέταση με συμπληρωματικά μόρια DNA ακινητοποιημένα σε συγκεκριμένα σημεία επάνω σε μία σταθερή επιφάνεια[160].

Σε αντίθετη περίπτωση, θα χρησιμοποιηθούν τεχνικές που μπορούν να προσδιορίσουν οποιαδήποτε μετάλλαξη σαρώνοντας τη γενωμική περιοχή όπως:

- **SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism):** τεχνική απλή και σχετικά γρήγορη για την ανίχνευση άγνωστων μεταλλάξεων, βασίζεται στην ιδιότητα που έχει το μονόκλωνο DNA να σχηματίζει δευτεροταγείς δομές[160].
- **DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με κλίση αποδιατακτικού):** βασική μέθοδος ανίχνευσης σημειακών μεταλλάξεων, βασίζεται στη διαφορά κινητικότητας που έχει μία νουκλεοτιδική αλληλουχία σε σχέση με μία άλλη, όταν κινείται σε πηκτή που περιέχει βαθμίδωση σε αποδιατακτικό (οι δύο συμπληρωματικές αλυσίδες αποδιατάσσονται είτε λόγω αύξησης της θερμοκρασίας είτε λόγω παρουσίας συγκεκριμένων χημικών αποδιατακτικών ουσιών)[160, 161].
- **TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis, Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση θερμοκρασίας):** η μέθοδος TGGE αποτελεί μια παραλλαγή της μεθόδου DGGE, καθώς αντί της χρήσης βαθμίδωσης συγκέντρωσης χημικών αποδιατακτικών, χρησιμοποιείται βαθμίδωση θερμοκρασίας[162].

- **COLD-PCR (Co-amplification at Lower Temperature, Συν-ενίσχυση σε χαμηλότερη θερμοκρασία αποδιάταξης-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης):** νέα παραλλαγή της κλασικής τεχνικής της PCR που ενισχύει ειδικά και επιλεκτικά μία μετάλλαξη ή γενικότερα ένα μεταλλαγμένο αλλήλιο που βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση μέσα σε ένα μείγμα με περίσσεια φυσιολογικών αλληλίων (π.χ σωματική μετάλλαξη), ανεξάρτητα από το είδος της μετάλλαξης ή τη θέση της μέσα στην αλληλουχία[168].
- **PTT (Protein Truncation Test, Δοκιμασία πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης)**: ανιχνεύει γρήγορα και με αξιοπιστία μη νοηματικές μεταλλάξεις καθώς και μεταλλάξεις που αλλάζουν το πλαίσιο ανάγνωσης[160].
- **D-HPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography, Αποδιατακτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης)**: παραλλαγή της ήδη καταξιωμένης τεχνικής HPLC σε δείγματα PCR.
- **Φασματομετρία Μάζας με Ιοντισμό Εκρόφησης** με τη βοήθεια υλικού μήτρας σε συνδυασμό με ανιχνευτή χρόνου πτήσης **(Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)**: επιτρέπει την αλληλούχηση εκατοντάδων βάσεων σε μερικά μόνο δευτερόλεπτα[169].

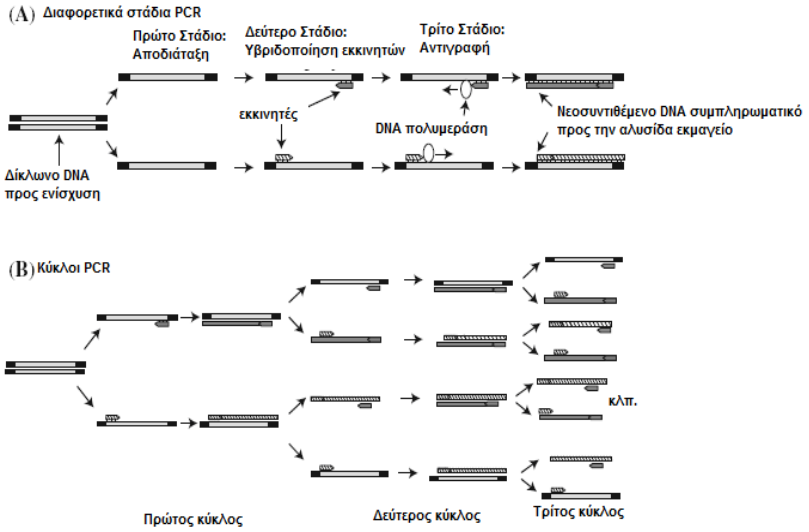
Τέλος μία τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων, αλλά και τον έλεγχο ύπαρξης νέων, άγνωστων μεταλλάξεων σε δείγματα είναι η **Υψηλής διακριτικότητας ανάλυση καμπυλών τήξεως (High Resolution Melting Curve Analysis)**. Είναι μια γρήγορη μέθοδος που βασίζεται στην ανάλυση των καμπυλών τήξης των προϊόντων PCR παρουσία ειδικών φθοριζουσών ουσιών, με ειδικά όργανα υψηλής διακριτικής ικανότητας[170].

## 4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου και ανάλυση καμπυλών τήξης

Η τεχνολογία της PCR σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR) είναι διαθέσιμη εδώ και περισσότερο από δέκα χρόνια, αλλά σημειώνεται μεγάλη αύξηση στην εφαρμογή της τα τελευταία χρόνια[171].

Μία μέθοδος ανάλυσης $SNP_S$ που προσφέρει ταχύτητα και ακρίβεια στη γονοτύπωση είναι η ανάλυση καμπύλων τήξης (**melting curve analysis**) κατόπιν ενίσχυσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (**Real-time PCR**). Η τεχνική επιτρέπει γονοτύπωση σε ένα κλειστό τριχοειδές χωρίς να παρεμβάλλονται άλλοι χειρισμοί μετά την

PCR, ελαχιστοποιώντας με τον τρόπο αυτό τον κίνδυνο επιμόλυνσης και μειώνοντας τον απαιτούμενο για την ανάλυση χρόνο[172]. Η PCR πραγματοποιείται με στόχο τον πολλαπλασιασμό ορισμένης αλληλουχίας ενός υποστρώματος γενωμικού DNA (**σχήμα 4.1**). Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης είναι απαραίτητοι δύο ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που οριοθετούν την προς ενίσχυση περιοχή, τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (**dNTPs-deoxy nucleotide triphosphates**), μια θερμοανθεκτική πολυμεράση και ιόντα μαγνησίου. Η PCR πραγματοποιείται με διαδοχικές αλλαγές της θερμοκρασίας (θερμικούς κύκλους). Αρχικά εφαρμόζεται υψηλή θερμοκρασία για το διαχωρισμό των δίκλωνων μορίων (**denaturation-melting**), στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώνεται ώστε να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες (**annealing**) και τελικά η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 72°C, την ιδανική θερμοκρασία για την αντιγραφή από τη χρησιμοποιούμενη πολυμεράση (**extension-elongation**). Η θερμοκρασία και η διάρκεια της αποδιάταξης (denaturation) εξαρτάται από το μήκος και την αλληλουχία του υποστρώματος, καθώς και από το όργανο και τα σωληνάρια ή τριχοειδή που χρησιμοποιούνται. Η θερμοκρασία του υβριδισμού (annealing) πρέπει να είναι λίγους βαθμούς χαμηλότερη από τη θερμοκρασία τήξης (**Tm**) των δύο εκκινητών (οι οποίοι σχεδιάζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες τήξης), έτσι ώστε να σχηματίζονται σταθερά σύμπλοκα εκκινητών- αλληλουχιών στόχων αλλά όχι άλλα μη-ειδικά σύμπλοκα[160, 172, 173].



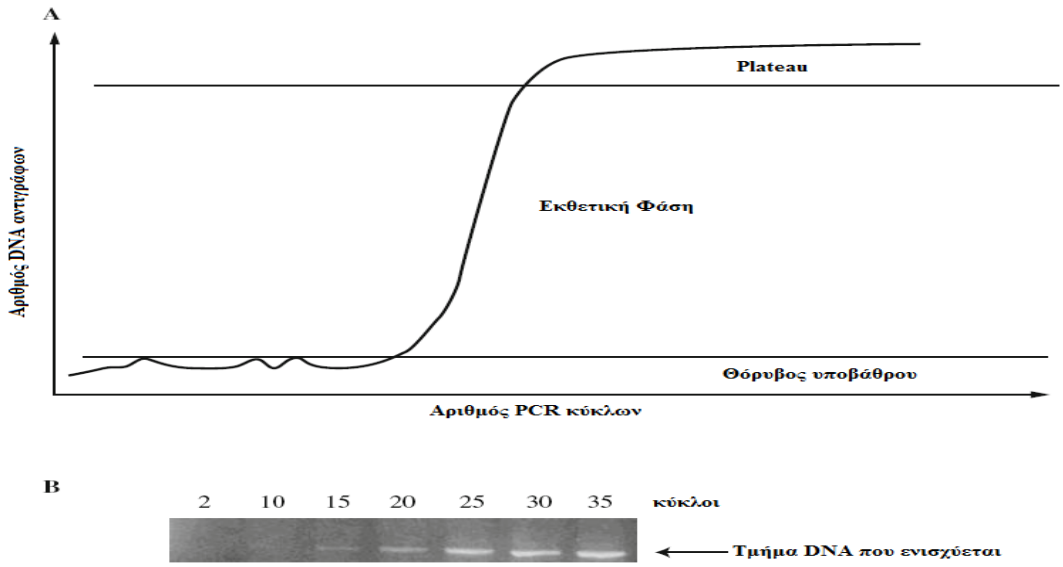

**Σχήμα 4.1: Αρχή της μεθόδου PCR. Α) Τα τρία στάδια ενός κύκλου PCR Β) Πολλαπλασιασμός της επιλεγμένης αλληλουχίας σε διαδοχικούς κύκλους PCR[173].**

Στην PCR πραγματικού χρόνου, τα δεδομένα συλλέγονται κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης του DNA και όχι σε ένα μόνο τελικό σημείο, όπως με τη συμβατική PCR. Η τεχνική

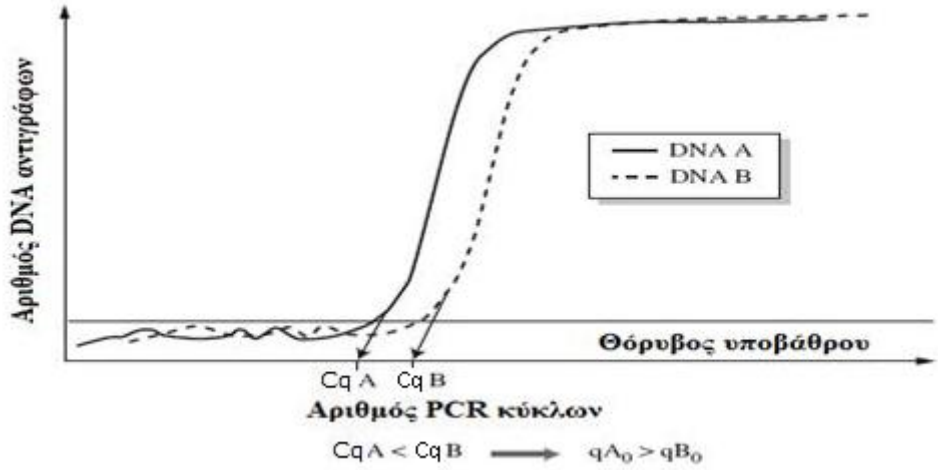
χρησιμοποιεί φθορίζοντα μόρια που ιχνηθετούν τα προϊόντα της PCR και οργανολογία που καταγράφει το φθορισμό κατά την πρόοδο της αντίδρασης. Τα δεδομένα που συλλέγονται δίνουν πληροφορίες για την ταυτότητα, ποσότητα και αλληλουχία των ενισχυόμενων τμημάτων DNA[160, 172]. Ο μειωμένος κίνδυνος επιμολύνσεων, η ευκολία στη διαχείριση των δειγμάτων, ο περιορισμός των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, η ελάττωση του συνολικού όγκου αντίδρασης και η μεγάλη ευαισθησία, ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου έχουν συντελέσει στην αύξηση της χρήσης της τόσο στην έρευνα όσο και σε κλινικά εργαστήρια[160, 174].

Από κινητικής άποψης, μια αντίδραση PCR μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από τρεις φάσεις: την πρώιμη φάση «υποβάθρου» ή φάση «θορύβου» **(background phase)**, την εκθετική φάση **(exponential growth phase)** ή λογαριθμική φάση **(log phase)** και τη φάση κορεσμού **(plateau)** (**σχήμα 4.2**). Η φάση του θορύβου διαρκεί έως ότου το σήμα του προϊόντος της PCR γίνει μεγαλύτερο από το σήμα του υποβάθρου του συστήματος. Η φάση της εκθετικής ανάπτυξης ξεκινά μόλις συσσωρευτεί επαρκής ποσότητα προϊόντος, έτσι ώστε να είναι ανιχνεύσιμο πάνω από το θόρυβο και ολοκληρώνεται όταν η απόδοση της αντίδρασης μειωθεί, καθώς η αντίδραση εισέρχεται στη φάση κορεσμού[160, 173] (**σχήμα 4.2**).Ο κορεσμός οφείλεται στην εξάντληση κάποιου κρίσιμου παράγοντα που μπορεί να είναι οι εκκινητές, οι φθορίζοντες ιχνηθέτες (όταν είναι ιχνηθέτες υδρόλυσης) ή τα dNTPs [175].

Πρέπει να σημειωθεί ότι σε ένα τυπικό πείραμα real-time PCR οι καμπύλες όλων των δειγμάτων φθάνουν στο ίδιο επίπεδο κορεσμού και έτσι οι μετρήσεις τελικού σημείου δε δίνουν καμία πληροφορία για την αρχική ποσότητα των μορίων στόχων στο δείγμα. Η διάκριση μπορεί να γίνει ωστόσο στη λογαριθμική φάση, κατά την οποία η πρώτη σημαντική αύξηση του μετρούμενου φθορισμού συσχετίζεται με την αρχική ποσότητα του εκμαγείου-στόχου. Με άλλα λόγια ο κύκλος όπου κάθε αντίδραση δίνει πρώτη φορά σήμα μεγαλύτερο του σήματος υποβάθρου (κύκλος ουδός-Ct:Cycle Threshold ή κύκλος ποσοτικοποίησης-Cq: Cycle Quantification) εξαρτάται από την ποσότητα του DNA-στόχου που υπήρχε στο δείγμα στην αρχή της αντίδρασης. Όσο λιγότερα μόρια περιέχει αρχικά το δείγμα, τόσο περισσότεροι κύκλοι απαιτούνται για την ανίχνευση του σήματος, δηλαδή τόσο μεγαλύτερη είναι η τιμή Cq[160, 173, 175] (**σχήμα 4.3**).




**Σχήμα 4.2: Η κινητική της αντίδρασης PCR. Α) Γραφική παράσταση του αριθμού των DNA αντιγράφων ως προς τον αριθμό των PCR κύκλων, όπου διακρίνονται η φάση θορύβου, η λογαριθμική φάση και η φάση plateau. Β) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR που προκύπτουν μετά από διαφορετικό αριθμό κύκλων PCR[173].**




**Σχήμα 4.3: Γραφική παράσταση του αριθμού των DNA αντιγράφων ως προς τον αριθμό των PCR κύκλων για δύο δείγματα Α και Β με διαφορετική αρχική ποσότητα μορίων DNA. Η αρχική ποσότητα μορίων DNA του δείγματος Α ($qA_o$) είναι μεγαλύτερη από την αυτή του δείγματος Β ($qB_o$) και η υπέρβαση του θορύβου επιτυγχάνεται συντομότερα για το δείγμα Α από ότι για το δείγμα Β. Με άλλα λόγια, το Cq του δείγματος Α είναι μικρότερο από το Cq του δείγματος Β[173].**

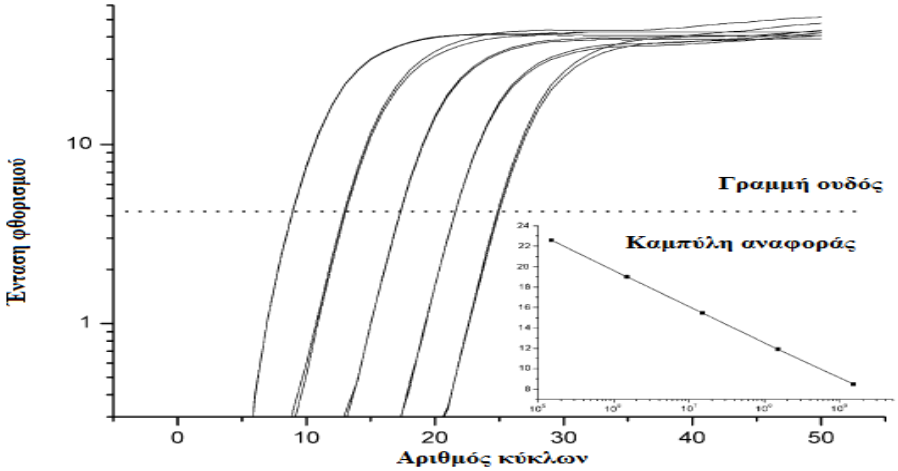
Αυτή η εξάρτηση μεταξύ του Cq και του αριθμού των μορίων που αρχικά υπήρχαν στο δείγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό άγνωστων δειγμάτων. Για δύο δείγματα Α και Β ο λόγος μεταξύ του αριθμού των μορίων του υποστρώματος στα αρχικά δείγματα $[No]_A$ και $[No]_B$ δίνεται από τη σχέση:

$$\frac{[N_0]_A}{[N_0]_B} = (1+E)^{Cq_B - Cq_A}$$

όπου E η απόδοση της αντίδρασης. Ιδανικά η απόδοση ισούται με 1 και σε κάθε κύκλο τα μόρια της αλληλουχίας στόχου διπλασιάζονται, κάτι που ωστόσο δεν επιτυγχάνεται στα συνήθη πειράματα. Με τη χρήση σειριακών αραιώσεων δειγμάτων πλασμιδιακού ή άλλου DNA που περιέχει την αλληλουχία στόχο είναι δυνατόν να υπολογιστεί η απόδοση και να κατασκευαστεί διάγραμμα βαθμονόμησης με γραμμική παλινδρόμηση μεταξύ των τιμών της αρχικής συγκέντρωσης και των τιμών Ct για κάθε δείγμα με τύπο:

$$Cq = k \times \log(N_0) + Cq(1)$$

όπου k η κλίση της ευθείας και Cq(1) η τιμή Cq για αραιωμένο δείγμα που περιέχει 1 αντίγραφο της αλληλουχίας στόχου[175] (**σχήμα 4.4**).




**Σχήμα 4.4: Παράδειγμα σχεδιασμού της καμπύλης βαθμονόμησης (standard curve) με χρήση προτύπων δειγμάτων γνωστής αρχικής συγκέντρωσης. Τα δείγματα ενισχύονται και κατασκευάζεται γραφική παράταση των Cq ως προς τον αρχικό αριθμό μορίων DNA[175].**

Από την κλίση της καμπύλης υπολογίζεται η απόδοση με τη σχέση:

$$E = 10^{-\frac{1}{k}} - 1$$

Με βάση το διάγραμμα βαθμονόμησης μπορεί να υπολογισθεί η αρχική συγκέντρωση κάθε άγνωστου δείγματος. Ωστόσο πρέπει να αναφερθεί ότι η απόδοση της αντίδρασης στα βιολογικά δείγματα μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά από την παρουσία ποικίλων ουσιών-αναστολέων της PCR, κάτι που δεν λαμβάνεται υπ' όψιν στη σχεδίαση της καμπύλης αναφοράς με πρότυπα διαλύματα που δεν περιέχουν αναστολείς. Έτσι, η

προετοιμασία των δειγμάτων πρέπει να είναι όσο το δυνατόν καλύτερα βελτιστοποιημένη και προτυποποιημένη[160, 175].

Το μεγαλύτερο μέρος της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων γίνεται με υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το εκάστοτε όργανο της PCR σε πραγματικό χρόνο, με τη βοήθεια ειδικών λογισμικών, που επιτρέπουν τη γρήγορη και αξιόπιστη παρουσίαση τους[160]. Μια σημαντική παράμετρος της real-time PCR που δεν εξετάσθηκε μέχρι στιγμής είναι η φύση και οι ιδιότητες των φθοριζόντων μορίων ιχνηθετών. Μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά τέτοια μόρια που εμπίπτουν σε μια από τις ακόλουθες κατηγορίες: χρωστικές που προσδένονται στη διπλή έλικα του DNA (όπως η SYBR Green), ανιχνευτές υβριδισμού DNA (hybridization probes), ανιχνευτές υδρόλυσης διπλής χρωστικής (τύπου TaqMan), «μοριακοί φάροι» (molecular beacons) και μόρια «σκορπιοί»[160, 173] (**σχήμα 4.5**).

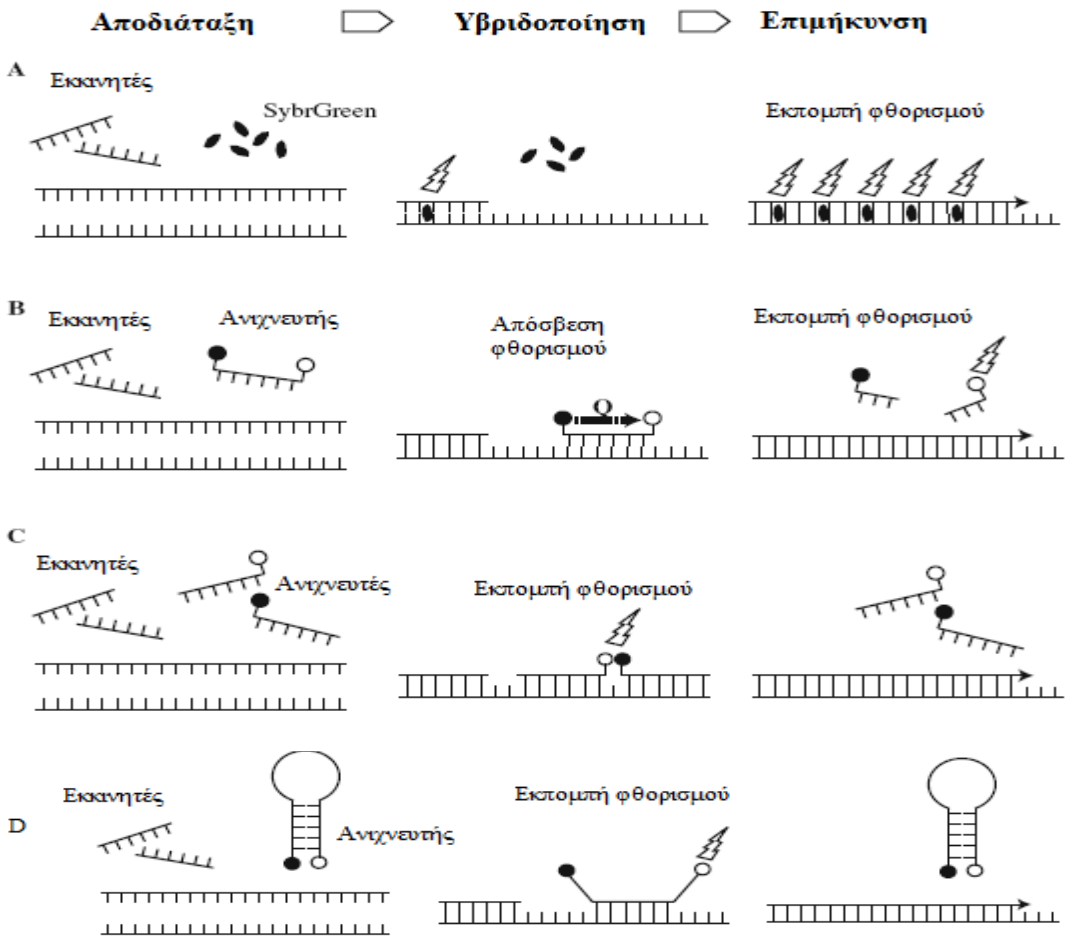
Όλα τα προαναφερθέντα συστήματα ανίχνευσης εκτός των χρωστικών που προσδένονται στη διπλή έλικα, βασίζονται στο φαινόμενο μεταφοράς ενέργειας με φθορισμό **(FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer)**. Το φαινόμενο αυτό βασίζεται στη μεταφορά ενέργειας από ένα ηλεκτρονιακά διεγερμένο μόριο, το φθορισμοφόρο δότη, σε ένα γειτονικό μόριο αποδέκτη, με αποτέλεσμα το μόριο δότης να επιστρέφει στη βασική μη διεγερμένη του κατάσταση. Το φαινόμενο FRET μπορεί να συμβεί μόνο όταν τα δύο μόρια (δότης και δέκτης) βρεθούν σε μια συγκεκριμένη απόσταση, που ονομάζεται ακτίνα Förster, στην οποία η απόδοση της μεταφοράς ενέργειας είναι 50% και εξαρτάται από τις φασματοσκοπικές ιδιότητες των μορίων. Όταν το κατάλληλο ζεύγος δότη-δέκτη βρεθεί στην απαιτούμενη απόσταση, λόγω του φαινομένου FRET το μόριο δότης δεν εκπέμπει πλέον φθορισμό. Εάν το μόριο δέκτης είναι επίσης φθορίζον, εκπέμπει φθορισμό στο χαρακτηριστικό για αυτό μήκος κύματος, οπότε και μπορεί να ανιχνευθεί. Η κύρια προϋπόθεση για να συμβεί κάτι τέτοιο είναι η ενέργεια που χάνει το μόριο δότης επιστρέφοντας στη βασική κατάσταση να ταυτίζεται με την ενέργεια που απαιτείται για τη διέγερση του μορίου δέκτη. Με άλλα λόγια το φάσμα απορρόφησης του μορίου δέκτη πρέπει να επικαλύπτει το φάσμα εκπομπής του μορίου δότη[160].

Στην παρούσα ερευνητική εργασία έγινε χρήση ανιχνευτών υβριδισμού. Πρόκειται για ανιχνευτές σχεδιασμένους να υβριδοποιούνται ο ένας δίπλα στον άλλον στην υπό ενίσχυση αλληλουχία. Το 3΄ άκρο του ενός ανιχνευτή είναι επισημασμένο με μια χρωστική, η οποία δρα ως δότης στο φαινόμενο FRET, ενώ το 5΄ άκρο του δεύτερου ανιχνευτή είναι επισημασμένο με μια χρωστική δέκτη. Στη real-time PCR, η πρώτη χρωστική διεγείρεται από πηγή ακτινοβολίας που υπάρχει στο χρησιμοποιούμενο όργανο και στη συνέχεια εκπέμπει ακτινοβολία σε λίγο μεγαλύτερο μήκος κύματος. Όταν οι δύο χρωστικές βρεθούν

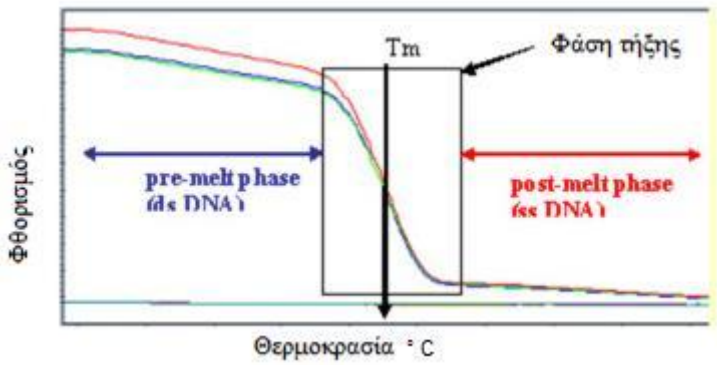
κοντά, η εκπεμπόμενη ακτινοβολία διεγείρει τη δεύτερη χρωστική που με τη σειρά της εκπέμπει ακτινοβολία σε ακόμα μεγαλύτερο μήκος κύματος, η οποία και καταγράφεται από το όργανο. Η απόδοση μεταφοράς της ενέργειας μεταξύ των δύο χρωστικών εξαρτάται όπως αναφέρθηκε από την απόσταση μεταξύ τους, η οποία πρακτικά είναι 1-5 νουκλεοτίδια όταν οι ανιχνευτές υβριδοποιούνται στην αλληλουχία-στόχο και σε διάταξη «κεφαλή-ουρά». Η μέτρηση της έντασης του φθορισμού πραγματοποιείται σε κάθε κύκλο μετά το στάδιο του υβριδισμού και η αύξησή της κατά την πρόοδο της αντίδρασης είναι ανάλογη με την αύξηση της ποσότητας της ενισχυόμενης αλληλουχίας. Ενίοτε, είναι χρησιμότερο να λαμβάνονται οι λόγοι των σημάτων της χρωστικής που λειτουργεί ως δέκτης (τα οποία συνεχώς αυξάνουν) προς τα σήματα της χρωστικής που λειτουργεί ως δότης (τα οποία συνεχώς φθίνουν).

Οι ανιχνευτές υβριδισμού παρέχουν μεγάλη ευαισθησία και εξειδίκευση στην ταυτοποίηση των προϊόντων της PCR, ακόμα και στις περιπτώσεις που τα προς προσδιορισμό δείγματα περιέχουν μικρό αριθμό προσδιοριζόμενων μορίων[172, 173].

Οι ανιχνευτές υβριδισμού παίζουν σημαντικό ρόλο και στη γονοτύπωση που επιτυγχάνεται εν συνεχεία με την ανάλυση των καμπύλων τήξης. Η ανάλυση αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι κάθε μόριο δίκλωνου DNA έχει τη δική του ειδική θερμοκρασία τήξης **(Tm)**, η οποία ορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA παραμένει δίκλωνο και το 50% γίνεται μονόκλωνο (**σχήμα 4.6**). Η τιμή της Tm εξαρτάται από το μήκος μιας αλληλουχίας, την περιεκτικότητά της σε ζεύγη γουανίνης-κυτοσίνης και την παρουσία λάθος ζευγαρώματος βάσεων **(mismatch)**[172].



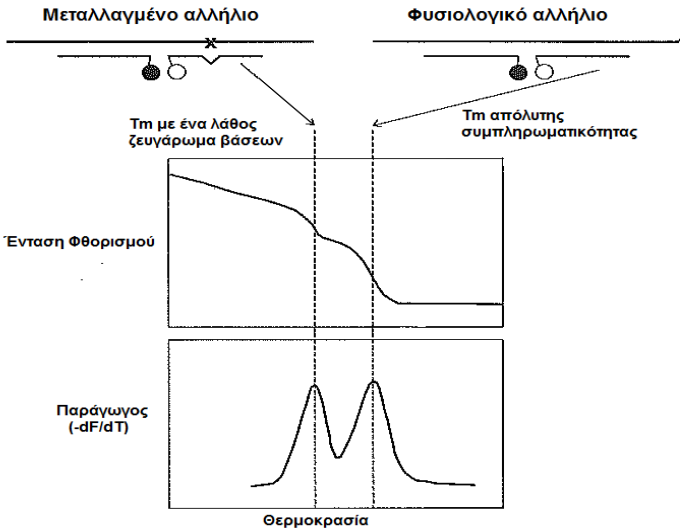

**Σχήμα 4.5: Διαφορετικοί τύποι φθοριζόντων μορίων ιχνηθετών που χρησιμοποιούνται σε αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου. A) SybrGreen, B) ανιχνευτές υδρόλησης, C) ανιχνευτές υβριδισμού, D) μοριακοί φάροι[173].**




**Σχήμα 4.6: Γραφική παράσταση της έντασης φθορισμού ως προς τη θερμοκρασία σε πειράματα ανάλυσης καμπύλης τήξης. Με την αύξηση της θερμοκρασίας τα δίκλωνα μόρια αποδιατάσσονται με αποτέλεσμα τη μείωση της καταγραφόμενης έντασης φθορισμού. Χαρακτηριστική για κάθε αλληλουχία είναι η θερμοκρασία τήξης Tm, στην οποία το 50% των μορίων DNA παραμένει δίκλωνο και το 50% γίνεται μονόκλωνο.**

Η ανάλυση καμπύλων τήξης ακολουθεί την ενίσχυση με real-time PCR. Αρχικά εφαρμόζεται υψηλή θερμοκρασία για την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων, στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώνεται ώστε να επιτευχθεί υβριδισμός των ανιχνευτών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες και τελικά η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά ώστε να προσδιορισθούν τα Tm των δίκλωνων μορίων, με ταυτόχρονη συνεχή μέτρηση της έντασης του φθορισμού. Είναι σημαντικό για τη λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων να σχηματισθούν κατά το δυνατόν περισσότερα διμερή αλληλουχίας στόχου-ανιχνευτών και λιγότερα δίκλωνα PCR προϊόντα. Σε αυτό μπορεί να βοηθήσει η εφαρμογή μεθοδολογίας ασύμμετρης PCR[176] και η χρήση πολυμερασών που δε διαθέτουν ικανότητα 5' εξωνουκλεάσης[172].

Στην περίπτωση που εξετάζεται ένας SNP στην ενισχυμένη αλληλουχία, σχεδιάζονται κατάλληλοι ανιχνευτές, ένας εκ των οποίων υβριδίζεται σε περιοχή που περιλαμβάνει την πολυμορφική θέση. Γενικά ο ανιχνευτής μπορεί να είναι συμπληρωματικός είτε για το φυσιολογικό είτε για το μεταλλαγμένο αλλήλιο. Σε χαμηλή θερμοκρασία ο ανιχνευτής αυτός υβριδοποιείται και στα δύο αλλήλια. Με τη βραδεία αύξηση της θερμοκρασίας, ο ανιχνευτής αποδιατάσσεται αρχικά από το αλλήλιο με το οποίο δεν είναι απόλυτα συμπληρωματικός και σε υψηλότερη θερμοκρασία και από το έτερο αλλήλιο. Καλά σχεδιασμένοι ανιχνευτές μπορούν να επιτύχουν διαφορά στην Tm της τάξης των 8-10° C για μία μόνο αλλαγή βάσης στην περιοχή υβριδοποίησης του ανιχνευτή. Η μείωση του μετρούμενου σήματος φθορισμού που προκύπτει από την ελάττωση του αριθμού των υβριδισμένων ανιχνευτών, παράγει τις χαρακτηριστικές καμπύλες τήξης για τους ομοζυγώτες φυσιολογικούς, τους ετεροζυγώτες και τους ομοζυγώτες μεταλλαγμένους. Η αρνητική πρώτη παράγωγος παρέχει καλύτερη οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων[172, 177] (**σχήμα 4.7**).

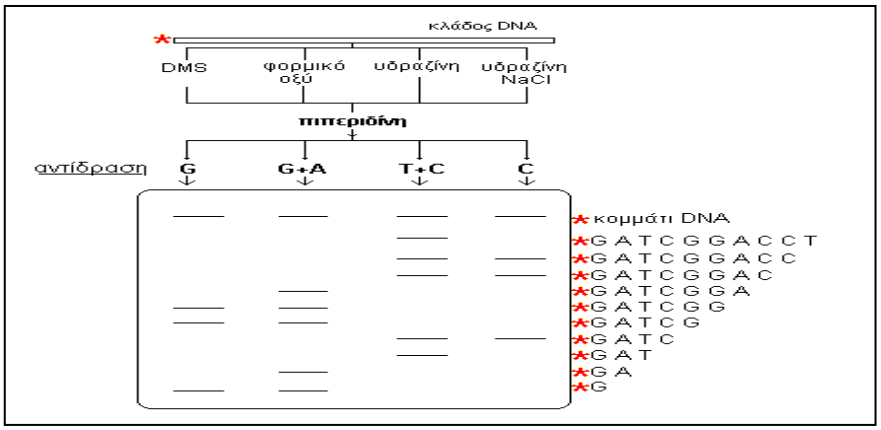



**Σχήμα 4.7:Σχηματική αναπαράσταση γονοτύπωσης με ανάλυση καμπύλων τήξης με χρήση ανιχνευτών υβριδισμού. Στο παράδειγμα ο ανιχνευτής είναι συμπληρωματικός του φυσιολογικού αλληλίου. Κατά την αύξηση της θερμοκρασίας ο ανιχνευτής αυτός αποδιατάσσεται ταχύτερα από το μεταλλαγμένο αλλήλιο, αφού η παρουσία του λάθος ζευγαρώματος στην πολυμορφική θέση μειώνει την Tm του δίκλωνου μορίου. Η αποδιάταξη έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση των δύο ανιχνευτών, μεταξύ των οποίων δεν εκδηλώνεται πλέον το φαινόμενο FRET. Έτσι η μετρούμενη ένταση φθορισμού μειώνεται. Η αποδιάταξη και η συνεπακόλουθη μείωση της έντασης φθορισμού για το φυσιολογικό αλλήλιο επέρχεται σε υψηλότερη θερμοκρασία[172].**

## 4.3 Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων DNA (DNA sequencing)

Πρόκειται για μία τεχνική προσδιορισμού της αλληλουχίας των βάσεων δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων (DNA) και γενικότερα των νουκλεϊκών οξέων (δηλαδή και RNA). Ένας σημαντικός σταθμός στην ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων έγινε το 1977 όταν περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους **Maxam & Gilbert**[163] μια μέθοδος ανάλυσης της αλληλουχίας του DNA με χημική αποικοδόμηση των βάσεων. Αργότερα το ίδιο έτος, προτάθηκε από τον Sanger[164] και τους συνεργάτες του μια ενζυμική μέθοδος για την ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας βασιζόμενη στον πρόωρο τερματισμό της νουκλεϊκής σύνθεσης. Σήμερα, οι δύο αυτές μέθοδοι έχουν υποστεί αρκετές τροποποιήσεις (δημιουργία διάφορων πρωτοκόλλων), οι βασικές τους αρχές όμως εξακολουθούν να παραμένουν αναλλοίωτες. Όλα τα σύγχρονα αυτοματοποιημένα μηχανήματα ανάλυσης του DNA (**DNA sequencers**) στηρίζονται κυρίως στην εφαρμογή της μεθόδου του Sanger.

Η μέθοδος των Maxam & Gilbert βασίζεται στην ιδιότητα ορισμένων χημικών ενώσεων, όπως η υδραζίνη, το διμεθυλοθειϊκό (DMS) ή το φορμικό οξύ, να μπορούν να τροποποιήσουν τις βάσεις του DNA εντός του μορίου αυτού[163] . Το DNA που προορίζεται για ανάλυση/ανάγνωση, επισημαίνεται με κάποιο ραδιοϊσότοπο σε ένα από τα 3', 5' άκρα του, και ακολούθως με τη βοήθεια των προαναφερθέντων χημικών ενώσεων, τροποποιείται σε τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις -σε κάθε μία εκ των οποίων χρησιμοποιείται ένα από τα παραπάνω αντιδραστήρια- σε συγκεκριμένη βάση για κάθε αντίδραση. Ακολούθως προστίθεται το αντιδραστήριο πιπεριδίνη, το οποίο καταλύει το σπάσιμο του φωσφοδιεστερικού δεσμού στο σημείο της τροποποιημένης βάσης. Ακολουθεί ο διαχωρισμός των παραγόμενων προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε ειδική πηκτή πολυακρυλαμιδίου μεγάλης διαχωριστικής ικανότητας και κατόπιν αυτοραδιογραφία σε φιλμ. Με αυτό τον τρόπο, εμφανίζονται ολιγονουκλεοτιδικά προϊόντα τα οποία έχουν ως αρχή το επισημασμένο άκρο και τερματίζουν σε όλες τις δυνατές ανά είδος βάσεις σε κάθε μία από τις τέσσερεις διαφορετικές αντιδράσεις (**σχήμα 4.8**). Η μέθοδος των Maxam & Gilbert παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες από πλευράς εκτέλεσης, ενώ τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι τοξικά και ασταθή. Παρ' όλα αυτά όμως, παρουσιάζει και κάποια πλεονεκτήματα συγκριτικά με τη μέθοδο του Sanger: α) δε χρειάζεται να προηγηθεί αντίδραση PCR έτσι ώστε να ενισχυθεί η αλληλουχία που πρόκειται να αναλυθεί β) αναλύει απευθείας τμήματα γενωμικού DNA, χωρίς να απαιτείται ενζυμική ενίσχυση κατά την οποία ενδέχεται να συμβούν λάθη γ) η πιθανότητα να συμβούν λάθη λόγω δευτεροταγών δομών της αλληλουχίας που αναλύεται είναι πολύ περιορισμένη[178].

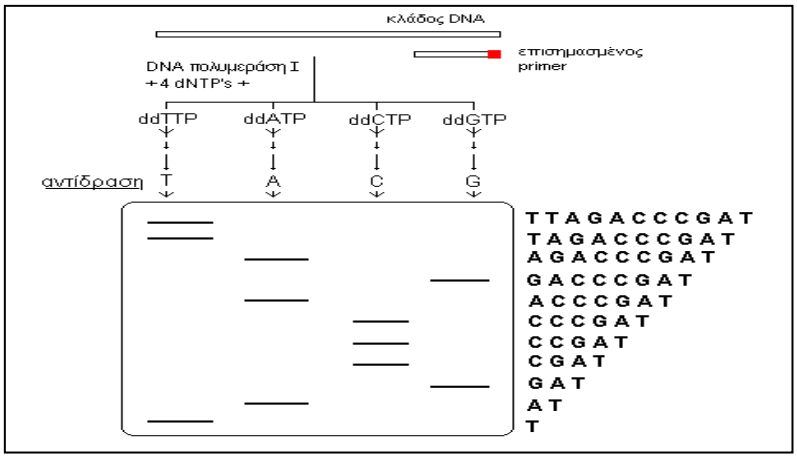



**Σχήμα 4.8: Αρχή της χημικής μεθόδου DNA sequencing κατά Maxam & Gilbert[160].**

Η μέθοδος των Maxim και Gilbert έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες περιπτώσεις όπως: α) αλληλούχηση γενωμικού DNA με παράλληλη εξαγωγή πληροφοριών σχετικά με τη

μεθυλίωση του DNA καθώς και τη δομή της χρωματίνης[179] β) ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων[180] γ) επιβεβαίωση της αλληλουχίας συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων ή περιοχών DNA με δομές φουρκέτας ή θηλιάς[181].

Η τεχνική του Sequencing κατά Sanger είναι μία διαδικασία με την οποία επιτυγχάνεται η αλληλούχηση τμημάτων DNA που συνήθως είναι προϊόντα μιας αντίδρασης PCR που έχει προηγηθεί. Βασίζεται στην παρουσία στο μείγμα της αντίδρασης **δι-δεοξυνουκλεοτιδίων** (**di-deoxynucleotide, ddNTPs**) και των τεσσάρων αζωτούχων βάσεων (A, T, G, C), τα οποία όταν τοποθετηθούν στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα από τη DNA-πολυμεράση, τότε η σύνθεση της νέας αλυσίδας διακόπτεται και το συγκεκριμένο δι-δεοξυνουκλεοτίδιο σηματοδοτεί τον τερματισμό της αλυσίδας. Αυτό συμβαίνει διότι, τα δι-δεοξυνουκλεοτίδια στερούνται επιπλέον και της υδροξυλομάδας στην 3’ θέση του δακτυλίου της δεοξυριβόζης. Λόγω της έλλειψης αυτής της υδροξυλομάδας, αφού η πολυμεράση τοποθετήσει αυτό το δι-δεοξυνουκλεοτίδιο στην αλυσίδα που συντίθεται, δεν μπορεί πια να τοποθετηθεί άλλο νουκλεοτίδιο στη συνέχεια γιατί δεν είναι εφικτό να σχηματιστεί ο φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ των νουκλεοτιδίων. Ο σχηματισμός του φωσφοδιεστερικού δεσμού απαιτεί την παρουσία μιας 3’-υδροξυλομάδας από το ήδη υπάρχον –τελευταίο- νουκλεοτίδιο και μιας 5’-φωσφορικής ομάδας από το «επόμενο» νουκλεοτίδιο που θα τοποθετηθεί στην αλυσίδα. Πραγματοποιούνται τέσσερις σειρές τέτοιων αντιδράσεων όπου στην καθεμία χρησιμοποιείται ένα από τα τέσσερα δι-δεοξυνουκλεοτίδια. Μετά το τέλος όλης της διαδικασίας προκύπτουν τμήματα DNA των οποίων το μέγεθος εξαρτάται από το σημείο όπου τοποθετήθηκε το δι-δεοξυνουκλεοτίδιο. Τα τμήματα αυτά αναλύονται με ηλεκτροφόρηση κατά την οποία επιβεβαιώνεται το μήκος του[164] (**σχήμα 4.9**). Οι πληροφορίες αυτές συνδυάζονται και προκύπτει η πλήρης αλληλουχία των αζωτούχων βάσεων στο τμήμα του DNA που μας ενδιαφέρει. Έτσι μπορούμε να ανιχνεύσουμε αν σε κάποια θέση υπάρχει μετάλλαξη ή αν πρόκειται για φυσιολογικό DNA.




**Σχήμα 4.9: Αρχή ενζυμικής μεθόδου DNA sequencing κατά Sanger[160].**

Παρά το γεγονός ότι, η μέθοδος του **Sanger** για DNA sequencing είναι ο πιο αξιόπιστος τρόπος για τον ακριβή προσδιορισμό της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων ενός τμήματος DNA και έχει χαρακτηριστεί ως το «χρυσό πρότυπο» (gold standard) μεταξύ όλων των μεθόδων ανίχνευσης μεταλλάξεων, δυστυχώς χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλή ευαισθησία που κυμαίνεται περίπου στο 5-20%. Αυτό σημαίνει ότι η μέθοδος αυτή δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση π.χ σωματικών μεταλλάξεων σε αλλήλια που βρίσκονται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση μέσα στο δείγμα και παρουσία περίσσειας φυσιολογικών αλληλίων. Υπάρχει δηλαδή κίνδυνος πολλά δείγματα που φέρουν τη μετάλλαξη να χαρακτηριστούν ως φυσιολογικά (ψευδώς αρνητικά).

Κατά την ανάλυση μεταλλάξεων με τη χρήση **αυτόματου DNA sequencer**, οι σημειακές μεταλλάξεις φαίνονται σαν δύο αλληλοεπικαλυπτόμενες κορυφές εξαιτίας της ύπαρξης και του φυσιολογικού νουκλεοτιδίου στο αλληλόμορφο γονίδιο. Για μεταλλάξεις που προκαλούν αλλαγή στο πλαίσιο ανάγνωσης (προσθήκες ή απαλοιφές), υπάρχει εμφάνιση διπλών κορυφών από το σημείο της αλλαγής και μέχρι το τέλος του γραφήματος. Οι διπλές κορυφές είναι ισοϋψείς μόνο σε περίπτωση ετεροζυγωτίας, δηλαδή σε περίπτωση που η μετάλλαξη υπάρχει στο ένα από τα δύο αλληλόμορφα γονίδια (και συνεπώς στο 50% όλων των μορίων DNA). Με αυτόν το τρόπο, παρουσιάζονται οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις[182].

Η τροποποίηση της μεθόδου Sanger με την αντικατάσταση της ραδιενεργούς σήμανσης από φθορίζουσες χρωστικές κατέστησε δυνατή την αυτοματοποίηση του DNA sequencing και τον ταχύ και αξιόπιστο προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων του DNA με τη χρήση ειδικών αυτοματοποιημένων οργάνων (DNA Sequencers). Το προς ανάλυση δείγμα

υπόκειται αρχικά ενίσχυση με συμβατική PCR με κατάλληλους εκκινητές, η οποία ακολουθείται από τη μέθοδο των θερμικών κύκλων (cycle sequencing). Σε αυτή το προϊόν PCR, αφού προηγουμένως καθαρισθεί με στήλες ή με ενζυμική κατεργασία με ExoSAP-IT (Affymetrix, ΗΠΑ), αντιγράφεται με χρήση της Taq πολυμεράσης παρουσία ενός εκκινητή, dNTPS και επισημασμένων με φθορίζουσες χρωστικές ddNTPs. Τα διαφορετικού μεγέθους τμήματα που παράγονται, εισάγονται στη συνέχεια στο DNA sequencer, όπου πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση σε ειδικά τριχοειδή στα οποία διοχετεύεται ειδικό πολυμερές που αναγεννάται μετά το πέρας της αντίδρασης. Εφ' όσον τα φάσματα της εκπομπής των τεσσάρων χρωστικών δεν αλληλεπικαλύπτονται τότε με μια οπή στο τέλος του τριχοειδούς και το κατάλληλο laser και ανιχνευτή είναι δυνατόν να ανιχνεύονται τα σήματα φθορισμού που προκύπτουν από τις τέσσερις χρωστικές σε ένα μόνο πέρασμα στο ίδιο τριχοειδές. Τα σήματα αντιστοιχίζονται σε καμπύλες με διαφορετικά χρώματα και στη συνέχεια «μεταφράζονται» σε βάσεις DNA με κατάλληλο λογισμικό[160, 183].

Τέλος, με τον όρο **Next Generation Sequencing** (**NGS**) περιγράφονται οι νεότερες και ταχύτερες τεχνολογίες ανάλυσης αλληλουχίας DNA οι οποίες καθιστούν δυνατή τη λήψη πληροφοριών για τη γενωμική αλληλουχία σε ένα επίπεδο που ήταν παλιότερα αδιανόητο. Οι νέες τεχνολογίες γενετικής ανάλυσης δεν είναι μόνο ευέλικτες, αλλά χαρακτηρίζονται και από ικανοποιητικές αποδόσεις και αρκετά χαμηλό κόστος ώστε να επεξεργάζονται το μεγάλο αριθμό των δειγμάτων που απαιτούνται για να ληφθούν στατιστικώς σημαντικές πληροφορίες. Η πληροφορία που προκύπτει από το NGS τροφοδοτεί ένα παγκόσμιο υπολογιστικό σύστημα που λειτουργεί χάρη σε μεγάλους παρόχους βιοπληροφορικών υπηρεσιών. Η πληροφορία αυτή αποτελεί τη βάση για εκτενέστερες σειρές ερμηνείας, όπως η ομαδοποίηση σε πλήρη γονιδιώματα, ο σχολιασμός της δομής γονιδίων καθώς και η χαρτογράφηση ως προς ήδη γνωστά πρότυπα γονιδιώματα και μεταγραφήματα προκειμένου για ποσοτική ανάλυση έκφρασης. Οι εναλλακτικές στρατηγικές του Next Generation DNA sequencing μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 4 επιμέρους κατηγορίες: α) μικροηλεκτροφορητικές μεθόδους, β) sequencing με υβριδισμό, γ) με παρατήρηση μορίων σε πραγματικό χρόνο και δ) με sequencing κυκλικών συστοιχιών[184].

Η πλέον διαδεδομένη μέθοδος NGS είναι αυτή των κυκλικών συστοιχιών η οποία συγκεντρώνει τα εξής πλεονεκτήματα:

**1)** η in vitro κατασκευή της βιβλιοθήκης, ακολουθούμενη από in vitro ενίσχυση των κλώνων, ώστε να παραχθούν οι αποικίες παρακάμπτει αρκετές δυσχέρειες που δεν επιτρέπουν την παράλληλη ανάλυση με τη συμβατική μέθοδο.

**2)** το sequencing που βασίζεται στις συστοιχίες επιτρέπει σε μεγαλύτερο βαθμό την παράλληλη ανάλυση σε σχέση με το συμβατικό sequencing των τριχοειδών. Καθώς το μέγεθος των αποικιών μπορεί να είναι της τάξης του ενός μικρομέτρου, εκατοντάδες εκατομμυρίων αποικιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν παράλληλα για το διάβασμα της αλληλουχίας σε μία μικρή επιφάνεια.

**3)** επειδή οι αποικίες είναι ακινητοποιημένες σε μια επίπεδη επιφάνεια, μπορούν να προσεγγιστούν από τα ένζυμα από μικρό όγκο αντιδραστηρίων. Συλλογικά, όλα αυτά μεταφράζονται σε δραματικά μικρότερο κόστος για την προετοιμασία του DNA sequencing[184].

Όμως από την άλλη πλευρά δεν παύουν να υπάρχουν και ορισμένα μειονεκτήματα. Τα πλέον σημαντικά από αυτά συνιστούν το μέγεθος του πλαισίου ανάγνωσης (για όλες τις νέες πλατφόρμες, τα μεγέθη αυτά παραμένουν πολύ μικρότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα του συμβατικού sequencing), καθώς και η ακρίβεια (κατά μέσο όρο, οι νέες πλατφόρμες είναι τουλάχιστον δέκα φορές λιγότερο ακριβείς σε σχέση με τις πλατφόρμες τύπου Sanger)[184].

# ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν:

**α) η αξιολόγηση σε ελληνικό πληθυσμό (από την Ήπειρο) του επιπολασμού δύο γνωστών πολυμορφισμών στο γονίδιο *LOXL1***, οι οποίοι έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι συσχετίζονται με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ. Ο προσανατολισμός προς το *LOXL1* προέκυψε από το γεγονός ότι βλάβες στο *LOXL1* μπορούν να έχουν ως συνέπεια παθολογική παραγωγή ελαστίνης και συσσώρευση ινώδους υλικού τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα του Ψ/Α.Σ αν και ακριβής μηχανισμός που οδηγεί στην ανάπτυξη Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ δεν έχει ακόμα καθοριστεί. Με σάρωση γονιδιώματος βρέθηκε ιδιαίτερα ισχυρή σύνδεση μεταξύ του Ψ/Α.Σ όπως και του Ψ/Α.Γ και των δύο ενιαίων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών ($SNP_s$) στο γονίδιο *LOXL1* (που κωδικοποιεί την οξειδάση-λυσίνη-like1) σε ασθενείς από την Ισλανδία και την Σουηδία. Η σύνδεση αυτή επιβεβαιώθηκε μετέπειτα σε πολλούς πληθυσμούς παγκοσμίως και

**β) η ανάπτυξη γι'αυτό το σκοπό μεθοδολογίας για την ανίχνευση των πολυμορφισμών G153D και R141L του γονιδίου *LOXL1*** με την χρήση πραγματικού χρόνου PCR και ανάλυση καμπύλων τήξης. Συνιστά μία εύκολη μέθοδο που παρέχει ταχύτητα στην ανίχνευση μεταλλάξεων και μετά από το αρχικό στάδιο των βελτιστοποιήσεων η μέθοδος είναι εξαιρετικά ταχεία και ακριβής, προσφερόμενη για ευρείας κλίμακας κλινική εφαρμογή.

Θα εξετασθούν δείγματα περιφερικού αίματος γλαυκωματικών ασθενών (PEX, PEXG, POAG) και υγιών μαρτύρων, οι οποίοι και επελέγησαν στο σύνολό τους κατόπιν ενημέρωσης, έγγραφης συγκατάθεσης και οφθαλμολογικής αξιολόγησης και για τη γονοτύπωση θα αναπτυχθεί και θα βελτιστοποιηθεί μεθοδολογία PCR πραγματικού χρόνου και ανάλυση καμπύλων τήξης στο όργανο LightCycler.

Η μεθοδολογία πρέπει να είναι ταχεία και αξιόπιστη, επιδεικνύοντας καλή απόδοση και επαναληψιμότητα στην ποσοτικοποίηση (αναπαραγωγιμότητα Ct CV<3,5%) και αξιοπιστία στη γονοτύπωση (CV<2,5%). Θα υπάρξει πρόβλεψη να μπορούν να αναλυθούν ταυτόχρονα και οι δύο πολυμορφισμοί στο ίδιο PCR προϊόν καθώς είναι πολύ κοντινοί χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά κανάλια ανίχνευσης του οργάνου. Τα αποτελέσματα θα επιβεβαιωθούν για επιλεγμένα δείγματα με τη μέθοδο αναφοράς DNA sequencing.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 5.1 Κλινικά δείγματα

Έγινε συλλογή 356 δειγμάτων περιφερικού αίματος (δείγματα αίματος 10 mL σε δοκιμαστικούς σωλήνες με EDTA) μετά από ενημέρωση και τελική έγγραφη συγκατάθεση των υπό εξέταση ατόμων που συμμετείχαν στην έρευνα αυτή. Η συλλογή του υλικού (δείγματα αίματος) έγινε από τον Ιατρό κ. Χήρα Δημήτριο στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων- Οφθαλμολογική Κλινική-Τμήμα Γλαυκώματος (Αναπλ. Καθηγητής Γ. Κίτσος) και η απομόνωση του DNA στο Ινστιτούτο Υγείας Του Παιδιού (Δ/ντής Δρ. M. Petersen).

Τα δείγματα αίματος κατηγοριοποιήθηκαν στις εξής ομάδες: 1) Σε ασθενείς με Ψ/Α.Σ και 2) σε άτομα που δεν πάσχουν από Ψ/Α.Σ (μάρτυρες). Στην πρώτη ομάδα ανήκουν 72 δείγματα ασθενών με Ψ/Α.Σ (PEX) και 86 δείγματα ασθενών με Ψ/Α.Γ (PEXG) και η διάγνωση του Ψ/Α.Σ έγινε βάσει των διεθνών κριτηρίων για τη νόσο υπό την εποπτεία και καθοδήγηση του Επιβλέποντα Καθηγητή κ. Γεωργίου Κίτσου. Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν 123 υγειών δείγματα μαρτύρων (controls) και 75 δείγματα ατόμων με ΠΓΑΓ (POAG) (ως clinical relevant control). Η οφθαλμολογική εξέταση για τον αποκλεισμό της νόσου (Ψ/Α.Σ), έγινε στα Εξωτερικά Ιατρεία της Οφθαλμολογικής Κλινικής του ιδίου Νοσοκομείου.

Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε λήψη λεπτομερούς ιστορικού, ατομικού και οικογενειακού και σε πλήρη οφθαλμολογική εξέταση που περιέλαβε: λήψη οπτικής οξύτητας (με τα οπτότυπα Snellen), οπτικών πεδίων (με το περίμετρο του Humphrey), εξέταση των πρόσθιων μορίων (με τη σχισμοειδή λυχνία), βυθοσκόπηση (με οφθαλμοσκόπιο) και γωνιοσκοπία (με την ειδική ύαλο γωνιοσκοπίας).

Τα δεδομένα που συνελέγησαν για το φύλο, την ηλικία, το ατομικό ιστορικό και την παρούσα οφθαλμολογική νόσο παρουσιάζονται στους ακόλουθους **πίνακες 5.1** και **5.2**.

**Πίνακας 5.1Α: Ομάδα Ψ/Α.Σ (PEX). Στοιχεία για το φύλο, την ηλικία, τον ΣΔ: σακχαρώδης διαβήτης, την ΑΥ: αρτηριακή υπέρταση, την καρδιοπάθεια και την αγγειοπάθεια.**

| | ΦΥΛΟ | ΗΛΙΚΙΑ | ΣΔ | ΑΥ | ΚΑΡΔΙΟΠ. | ΑΓΓΕΙΟΠ. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **PEX1** | Α | 82 | | ΝΑΙ | | ΝΑΙ |
| **PEX2** | Θ | 89 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX3** | Θ | 72 | | ΝΑΙ | | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **PEX4** | Α | 76 | | | | |
| **PEX5** | Θ | 71 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | | |
| **PEX6** | Θ | 71 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX7** | Α | 90 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **PEX8** | Θ | 76 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **PEX9** | Θ | 62 | | | | |
| **PEX10** | Θ | 63 | | | | |
| **PEX11** | Θ | 85 | | | | |
| **PEX12** | Θ | 77 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX13** | Θ | 75 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX14** | Α | 78 | ΝΑΙ | | | |
| **PEX15** | Α | 65 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | ΝΑΙ |
| **PEX16** | Θ | 71 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX17** | Α | 80 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX18** | Θ | 80 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **PEX19** | Α | 69 | | | | |
| **PEX20** | Θ | 77 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | | |
| **PEX21** | Θ | 80 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | | |
| **PEX22** | Θ | 80 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **PEX23** | Α | 74 | | | | |
| **PEX24** | Θ | 70 | | | | |
| **PEX25** | Θ | 71 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX26** | Θ | 74 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX27** | Θ | 68 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX28** | Α | 71 | | | | |
| **PEX29** | Θ | 78 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **PEX30** | Α | 71 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX31** | Α | 72 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX32** | Θ | 78 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX33** | Α | 77 | ΝΑΙ | | | |
| **PEX34** | Α | 68 | | | | |
| **PEX35** | Θ | 76 | | | | |
| **PEX36** | Α | 86 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **PEX37** | Α | 76 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX38** | Θ | 76 | | | | |
| **PEX39** | Α | 71 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX40** | Θ | 75 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX41** | Θ | 79 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **PEX42** | Α | 81 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **PEX43** | Θ | 84 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | | |
| **PEX44** | Θ | 89 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **PEX45** | Θ | 61 | | | | |
| **PEX46** | Θ | 72 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | | |
| **PEX47** | Θ | 88 | ΝΑΙ | | | |
| **PEX48** | Α | 83 | | | | |
| **PEX49** | Θ | | | ΝΑΙ | | |
| **PEX50** | Θ | 90 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX51** | Α | 89 | | | | |
| **PEX52** | Α | 77 | | ΝΑΙ | | ΝΑΙ |
| **PEX53** | Α | 81 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | | |
| **PEX54** | Α | 65 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **PEX55** | Α | 81 | | | | |
| **PEX56** | Α | 81 | | | | |
| **PEX57** | Θ | | | | | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **PEX58** | Θ | 77 | | | | |
| **PEX59** | Θ | 78 | | | | |
| **PEX60** | Θ | 76 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX61** | Θ | 70 | | | | |
| **PEX62** | Θ | 75 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | | |
| **PEX63** | Α | 80 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX64** | Α | 76 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **PEX65** | Α | 76 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX66** | Θ | 80 | | | | |
| **PEX67** | Θ | 90 | | | | |
| **PEX68** | Θ | 74 | | ΝΑΙ | | |
| **PEX69** | Θ | 81 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **PEX70** | Α | 84 | | | | |
| **PEX71** | Θ | 77 | | | | |
| **PEX72** | Θ | 71 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | | |

**Πίνακας 5.1Β: Ομάδα Ψ/Α.Σ (PEX). Στοιχεία για τα οφθαλμολογικά χαρακτηριστικά. Γλαύκωμα, Ψ/Α.Σ, μέγιστη ΕΟΠ (IOP), max c/dr: μέγιστο πηλίκο κοίλανσης (εξέταση οπτικού νεύρου).**

| | **ΓΛΑΥΚΩΜΑ** | **Ψ/Α** | **Max IOP** | **Max c/d r** |
|---|---|---|---|---|
| **PEX1** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 18 | 0,3 |
| **PEX2** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 15 | 0,2 |
| **PEX3** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 12 | 0,2 |
| **PEX4** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 10 | 0,3 |
| **PEX5** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 12 | 0,8 |
| **PEX6** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 16 | 0,3 |
| **PEX7** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 16 | 0,3 |
| **PEX8** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 15 | 0,5 |
| **PEX9** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΑΟ | 13 | 0,2 |
| **PEX10** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΑΟ | 8 | 0,3 |
| **PEX11** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 13 | 0,5 |
| **PEX12** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 14 | 0,3 |
| **PEX13** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 16 | 0,2 |
| **PEX14** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΑΟ | 14 | 0,4 |
| **PEX15** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 11 | 0,5 |
| **PEX16** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 10 | 0,2 |
| **PEX17** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 18 | 0,4 |
| **PEX18** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 14 | 0,3 |
| **PEX19** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΑΟ | 12 | 0,2 |
| **PEX20** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 12 | 0,2 |
| **PEX21** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 13 | 0,2 |
| **PEX22** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΑΟ | 14 | 0,2 |
| **PEX23** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 12 | 0,2 |
| **PEX24** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΑΟ | 10 | 0,2 |
| **PEX25** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 11 | 0,2 |
| **PEX26** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 11 | 0,2 |
| **PEX27** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 14 | 0,2 |
| **PEX28** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ | 22 | 0,4 |
| **PEX29** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 15 | 0,3 |
| **PEX30** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΑΟ | 14 | 0,2 |
| **PEX31** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 13 | 0,1 |
| **PEX32** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 10 | 0,3 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **PEX33** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ | 11 | 0,2 |
| **PEX34** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ | 16 | 0,2 |
| **PEX35** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΑΟ | 17 | 0,4 |
| **PEX36** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 14 | 0,3 |
| **PEX37** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 15 | 0,3 |
| **PEX38** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΑΟ | 13 | 0,3 |
| **PEX39** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 12 | 0,2 |
| **PEX40** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 13 | 0,2 |
| **PEX41** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ | 14 | 0,3 |
| **PEX42** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 12 | 0,2 |
| **PEX43** | ΟΧΙ | ΝΑΙ Δ0 | 16 | |
| **PEX44** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ ΑΟ | 13 | |
| **PEX45** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 12 | 0,3 |
| **PEX46** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 10 | 0,3 |
| **PEX47** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 13 | |
| **PEX48** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΑΟ | 12 | 0,8 |
| **PEX49** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 16 | 0,3 |
| **PEX50** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΑΟ | 15 | |
| **PEX51** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΑΟ | 16 | 0,3 |
| **PEX52** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΑΟ | 17 | |
| **PEX53** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 12 | 0,2 |
| **PEX54** | ΟΧΙ | ΝΑΙ ΔΟ | 12 | 0,1 |
| **PEX55** | ΟΧΙ | ΝΑΙ+++ | 13 | 0,3 |
| **PEX56** | ΟΧΙ | ΝΑΙ | 16 | 0,2 |
| **PEX57** | ΟΧΙ | ΝΑΙ | 16 | 0,2 |
| **PEX58** | ΟΧΙ | ΝΑΙ | 20 | 0,3 |
| **PEX59** | ΟΧΙ | ΝΑΙ++ | 14 | 0,2 |
| **PEX60** | ΟΧΙ | ΝΑΙ+++ | 16 | 0,2 |
| **PEX61** | ΟΧΙ | ΝΑΙ | 14 | 0,3 |
| **PEX62** | ΟΧΙ | ΝΑΙ Δ0 | 14 | 0,2 |
| **PEX63** | ΟΧΙ | ΝΑΙ Α0 | 13 | 0,2 |
| **PEX64** | ΟΧΙ | ΝΑΙ | 14 | 0,2 |
| **PEX65** | ΟΧΙ | ΝΑΙ | 15 | 0,1 |
| **PEX66** | ΟΧΙ | ΝΑΙ | 16 | 0,2 |
| **PEX67** | ΟΧΙ | ΝΑΙ | 17 | 0,4 |
| **PEX68** | ΟΧΙ | ΝΑΙ+++ | 13 | 0,2 |
| **PEX69** | ΟΧΙ | ΝΑΙ+ | 16 | 0,4 |
| **PEX70** | ΟΧΙ | ΝΑΙ+++ | 12 | 0,4 |
| **PEX71** | ΟΧΙ | ΝΑΙ | 16 | N/A |
| **PEX72** | ΟΧΙ | ΝΑΙ | 16 | 0,1 |

**Πίνακας 5.1Γ: Ομάδα Ψ/Α.Γ (PEXG). Στοιχεία για το φύλο, την ηλικία, τον ΣΔ: σακχαρώδης διαβήτης, την ΑΥ: αρτηριακή υπέρταση, την καρδιοπάθεια και την αγγειοπάθεια.**

| | **ΦΥΛΟ** | **ΗΛΙΚΙΑ** | **ΣΔ** | **ΑΥ** | **ΚΑΡΔΙΟΠ.** | **ΑΓΓΕΙΟΠ.** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **PEXG1** | Θ | 75 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **PEXG2** | Α | 68 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG3** | Θ | 67 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG4** | Θ | 40 | | | | |
| **PEXG5** | Α | 84 | | | | |
| **PEXG6** | Θ | 69 | | | | |
| **PEXG7** | Α | 67 | | | | |
| **PEXG8** | Α | 59 | | | | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **PEXG9** | A | 82 | | | | |
| **PEXG10** | A | 71 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG11** | A | | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG12** | A | 85 | | | | |
| **PEXG13** | A | 56 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | | |
| **PEXG14** | Θ | 75 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG15** | A | 82 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG16** | A | 71 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG17** | Θ | 66 | | | | |
| **PEXG18** | A | 73 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG19** | Θ | 77 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG20** | A | 66 | ΝΑΙ | | | |
| **PEXG21** | A | 68 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG22** | Θ | 79 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **PEXG23** | Θ | 75 | | | | |
| **PEXG24** | Θ | 81 | | | | |
| **PEXG25** | A | 79 | | | | |
| **PEXG26** | Θ | 72 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG27** | Θ | 75 | | | | |
| **PEXG28** | Θ | 66 | | | ΝΑΙ | ΝΑΙ |
| **PEXG29** | Θ | 81 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG30** | A | 80 | | | | |
| **PEXG31** | Θ | 62 | | | | |
| **PEXG32** | Θ | 80 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | ΝΑΙ |
| **PEXG33** | A | 81 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG34** | A | 80 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG35** | Θ | 88 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG36** | Θ | 74 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | ΝΑΙ | ΝΑΙ |
| **PEXG37** | Θ | 76 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **PEXG38** | Θ | 75 | ΝΑΙ | | | ΝΑΙ |
| **PEXG39** | Θ | 78 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG40** | A | 72 | | | | |
| **PEXG41** | A | 71 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | ΝΑΙ |
| **PEXG42** | A | 68 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | ΝΑΙ |
| **PEXG43** | Θ | 75 | | | | |
| **PEXG44** | A | 73 | | | | |
| **PEXG45** | A | 79 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **PEXG46** | Θ | 94 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG47** | Θ | 84 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG48** | A | 85 | | | | |
| **PEXG49** | Θ | 75 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG50** | Θ | 75 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG51** | A | 89 | | | | |
| **PEXG52** | Θ | 84 | | | | |
| **PEXG53** | A | 84 | ΝΑΙ | | | |
| **PEXG54** | | 65 | | | | |
| **PEXG55** | A | 72 | | | | |
| **PEXG56** | Θ | 81 | | | | |
| **PEXG57** | Θ | 69 | | | | |
| **PEXG58** | Θ | 69 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG59** | A | 68 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG60** | A | 85 | | | | |
| **PEXG61** | A | 67 | | | | |
| **PEXG62** | A | 72 | | | | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **PEXG63** | Α | 56 | | | | |
| **PEXG64** | Θ | 75 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG65** | Α | 80 | | | | |
| **PEXG66** | Α | 82 | | | | |
| **PEXG67** | Θ | 73 | | | | |
| **PEXG68** | Α | 75 | | | | |
| **PEXG69** | Α | 72 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG70** | Α | 72 | | ΝΑΙ | | ΝΑΙ |
| **PEXG71** | Α | 66 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **PEXG72** | Θ | 80 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG73** | Α | 64 | | | | |
| **PEXG74** | Α | 64 | | | | |
| **PEXG75** | Θ | 77 | | | | |
| **PEXG76** | Θ | 75 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | | |
| **PEXG77** | Θ | 73 | | | | |
| **PEXG78** | Θ | 73 | ΝΑΙ | | | |
| **PEXG79** | Α | 68 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG80** | Α | 61 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG81** | Α | 69 | | | | |
| **PEXG82** | Α | 82 | | | ΝΑΙ | |
| **PEXG83** | Α | 66 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **PEXG84** | Α | 73 | | ΝΑΙ | | |
| **PEXG85** | Α | 74 | | | | |
| **PEXG86** | Α | 76 | | ΝΑΙ | | |

**Πίνακας 5.1Δ: Ομάδα Ψ/Α.Γ (PEXG). Στοιχεία για τα οφθαλμολογικά χαρακτηριστικά. Γλαύκωμα, Ψ/Α.Σ, μέγιστη ΕΟΠ (IOP), max c/dr: μέγιστο πηλίκο κοίλανσης (εξέταση οπτικού νεύρου).**

| | **ΓΛΑΥΚΩΜΑ** | **Ψ/Α** | **Max IOP** | **Max c/d r** |
|---|---|---|---|---|
| **PEXG1** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 17 | 0,6 |
| **PEXG2** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 14 | 0,9 |
| **PEXG3** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΔΟ | 22 | 0,6 |
| **PEXG4** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 25 | 0,6 |
| **PEXG5** | ΝΑΙ ΔΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 25 | 0,9 |
| **PEXG6** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 16 | 0,4 |
| **PEXG7** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΔΟ | 14 | 0,5 |
| **PEXG8** | ΝΑΙ ΔΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 19 | |
| **PEXG9** | ΝΑΙ ΔΟ | ΝΑΙ ΔΟ | 30 | 0,9 |
| **PEXG10** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 15 | 0,5 |
| **PEXG11** | ΝΑΙ ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 18 | 0,4 |
| **PEXG12** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | | 0,6 |
| **PEXG13** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΑΟ | 21 | 0,9 |
| **PEXG14** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 12 | 0,7 |
| **PEXG15** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 12 | 0,9 |
| **PEXG16** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 13 | 0,8 |
| **PEXG17** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 14 | 0,6 |
| **PEXG18** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 17 | 0,9 |
| **PEXG19** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 25 | 0,9 |
| **PEXG20** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 23 | 0,7 |
| **PEXG21** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 10 | 0,9 |
| **PEXG22** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 16 | 0,9 |
| **PEXG23** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 22 | 0,8 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **PEXG24** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΔΟ | 42 | |
| **PEXG25** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 14 | |
| **PEXG26** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 18 | 0,8 |
| **PEXG27** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 16 | 0,6 |
| **PEXG28** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 16 | 0,4 |
| **PEXG29** | ΝΑΙ ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ | 30 | 0,8 |
| **PEXG30** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 16 | 0,5 |
| **PEXG31** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΑΟ | 13 | 0,9 |
| **PEXG32** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 19 | 0,5 |
| **PEXG33** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | | 0,9 |
| **PEXG34** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 11 | 0,9 |
| **PEXG35** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΔΟ | 16 | 0,6 |
| **PEXG36** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΔΟ | 20 | 0,9 |
| **PEXG37** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 13 | 0,6 |
| **PEXG38** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 20 | 0,7 |
| **PEXG39** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 16 | 0,6 |
| **PEXG40** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 16 | 0,8 |
| **PEXG41** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΑΟ | 19 | 0,7 |
| **PEXG42** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΔΟ | 18 | 0,6 |
| **PEXG43** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 17 | 0,7 |
| **PEXG44** | ΝΑΙ ΔΟ | ΝΑΙ Δ0/ΑΟ | 11 | 0,5 |
| **PEXG45** | ΝΑΙ ΑΟ | ΝΑΙ ΑΟ | 30 | 0,8 |
| **PEXG46** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 20 | 0,7 |
| **PEXG47** | ΝΑΙ | ΝΑΙ | 2Ο | 0,9 |
| **PEXG48** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 16 | 0,5 |
| **PEXG49** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 14 | 0,7 |
| **PEXG50** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΔΟ | 18 | 0,3 |
| **PEXG51** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 18 | |
| **PEXG52** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 22 | 0,6 |
| **PEXG53** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ | 18 | 0,7 |
| **PEXG54** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΑΟ | 24 | 0,9 |
| **PEXG55** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 42 | 0,9 |
| **PEXG56** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ | 48 | 0,9 |
| **PEXG57** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 17 | 0,5 |
| **PEXG58** | ΝΑ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 21 | 0,7 |
| **PEXG59** | ΝΑ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑ ΔΟ/ΑΟ | 14 | 0,9 |
| **PEXG60** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ | 15 | 0,6 |
| **PEXG61** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ | 18 | 0,9 |
| **PEXG62** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 27 | 0,7 |
| **PEXG63** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 30 | 0,9 |
| **PEXG64** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 20 | 0,3 |
| **PEXG65** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 18 | 0,9 |
| **PEXG66** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 12 | 0,9 |
| **PEXG67** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΔΟ | 19 | 0,8 |
| **PEXG68** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 20 | 0,8 |
| **PEXG69** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | | 0,6 |
| **PEXG70** | ΝΑΙ ΔΟ | ΝΑΙ ΔΟ | 25 | 0,6 |
| **PEXG71** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 19 | 0,9 |
| **PEXG72** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΑΟ | 18 | 0,3 |
| **PEXG73** | ΝΑΙ ΔΟ | ΝΑΙΔΟ | 30 | 0,7 |
| **PEXG74** | ΝΑΙ ΔΟ | ΝΑΙ ΔΟ | 22 | 0,5 |
| **PEXG75** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 18 | 0,7 |
| **PEXG76** | ΝΑΙ ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 15 | 0,6 |
| **PEXG77** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | | 0,6 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **PEXG78** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | | 1,0 |
| **PEXG79** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | | 1,0 |
| **PEXG80** | ΝΑΙ ΑΟ | ΝΑΙ ΑΟ | 18 | 0,4 |
| **PEXG81** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 42 | |
| **PEXG82** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | | 1,0 |
| **PEXG83** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 40 | 1,0 |
| **PEXG84** | ΝΑΙ | ΝΑΙ ΔΟ | | 0,5 |
| **PEXG85** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | | |
| **PEXG86** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 13 | 0,8 |

**Πίνακας 5.2Α: Ομάδα μαρτύρων (CONTROLS). Στοιχεία για το φύλο, την ηλικία, τον ΣΔ: σακχαρώδης διαβήτης (BDR=Παραγωγική Διαβητική Αμφιβληστρειδοπάθεια, ΙΝΣ.=Ινσουλίνη, PRP=Φωτοδυναμική θεραπεία), την ΑΥ: αρτηριακή υπέρταση, την καρδιοπάθεια (ΣΝ=Στεφανιαία νόσος) και την αγγειοπάθεια.**

| | **ΦΥΛΟ** | **ΗΛΙΚΙΑ** | **ΣΔ** | **ΑΥ** | **ΚΑΡΔΙΟΠ.** | **ΑΓΓΕΙΟΠ.** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **C 1** | Θ | 73 | | ΝΑΙ | ΣΝ | ΝΑΙ |
| **C 2** | Θ | 75 | | ΝΑΙ | | |
| **C 3** | Α | 71 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | | |
| **C 4** | Θ | 78 | | | | |
| **C 5** | Θ | 77 | | | | |
| **C 6** | Α | 72 | | ΝΑΙ | | |
| **C 7** | Θ | 94 | | | | |
| **C 8** | Θ | 76 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **C 9** | Θ | 85 | | ΝΑΙ | | |
| **C 10** | Θ | 71 | | ΝΑΙ | | |
| **C 11** | Α | 66 | | ΝΑΙ | | |
| **C 12** | Θ | 71 | | ΝΑΙ | | |
| **C 13** | Α | 60 | ΝΑΙ | | | |
| **C 14** | Θ | 75 | | | | |
| **C 15** | Α | 73 | | | | |
| **C 16** | Θ | 85 | | | | |
| **C 17** | Α | 76 | | ΝΑΙ | | |
| **C 18** | Θ | 81 | | | | |
| **C 19** | Θ | 71 | | ΝΑΙ | | |
| **C 20** | Θ | 72 | | | | |
| **C 21** | Θ | 75 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **C 22** | Θ | 67 | | ΝΑΙ | | |
| **C 23** | Θ | 73 | ΝΑΙ | | | |
| **C 24** | Θ | 82 | | | ΝΑΙ | |
| **C 25** | Θ | 80 | ΝΑΙ /BDR | | | |
| **C 26** | Θ | 48 | | | ΑΡΡΥΘΜ. | |
| **C 27** | Α | 88 | | | ΝΑΙ | |
| **C 28** | Α | 60 | | | | |
| **C 29** | Θ | 75 | | ΝΑΙ | | |
| **C 30** | Α | 73 | | | | |
| **C 31** | Α | 81 | | ΝΑΙ | ΑΡΡΥΘΜ. | |
| **C 32** | Θ | 70 | | | | |
| **C 33** | Θ | 72 | | | | |
| **C 34** | Θ | 66 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | /ΙΝΣ. | | | |
| **C 35** | Α | 78 | | | | |
| **C 36** | Θ | 82 | | ΝΑΙ | | |
| **C 37** | Θ | 75 | | ΝΑΙ | | |
| **C 38** | Α | 65 | | ΝΑΙ | | |
| **C 39** | Α | 56 | | ΝΑΙ | | |
| **C 40** | Θ | 82 | | | | |
| **C 41** | Θ | 82 | | | ΝΑΙ /ΑΝΤΙΠ. ΑΓΩΓΗ | |
| **C 42** | Θ | 48 | | | ΑΡΡΥΘΜ. | |
| **C 43** | Α | 59 | | | | |
| **C 44** | Α | 84 | | | | |
| **C 45** | Θ | 77 | | | ΣΝ / "Ε" | |
| **C 46** | Θ | 78 | | ΝΑΙ | | |
| **C 47** | Α | 74 | | ΝΑΙ | ΣΝ | |
| **C 48** | Θ | 70 | ΝΑΙ | | | |
| **C 49** | Α | 76 | | | | |
| **C 50** | Θ | 80 | | ΝΑΙ | | |
| **C 51** | Α | 78 | | ΝΑΙ | ΣΝ | |
| **C 52** | Θ | 75 | | | | |
| **C 53** | Θ | 75 | | | | |
| **C 54** | Α | 68 | | | | |
| **C 55** | Α | 78 | | ΝΑΙ | | |
| **C 56** | Α | 58 | ΝΑΙ | | | |
| **C 57** | Α | 68 | | | | |
| **C 58** | Α | 57 | | | | |
| **C 59** | Θ | 70 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **C 60** | Α | 81 | | | | |
| **C 61** | Α | 79 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ / ANGORON | |
| **C 62** | Α | 80 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **C 63** | Θ | 74 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | | |
| **C 64** | Θ | 76 | | ΝΑΙ | | |
| **C 65** | Θ | 68 | | | | |
| **C 66** | Α | 50 | ΝΑΙ /ΙΝΣ /BDR | | | |
| **C 67** | Α | 83 | | ΝΑΙ | | |
| **C 68** | Α | 82 | | ΝΑΙ | | |
| **C 69** | Α | 64 | ΝΑΙ /ΙΝΣ | ΝΑΙ | | |
| **C 70** | Θ | 82 | | | | |
| **C 71** | Θ | 75 | ΝΑΙ /PRP | | | |
| **C 72** | Θ | 72 | | | | |
| **C 73** | Α | 55 | | ΝΑΙ | | |
| **C 74** | Θ | 70 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | | |
| **C 75** | Α | 79 | | | ΝΑΙ | |
| **C 76** | Θ | 85 | | | | |
| **C 77** | Α | 84 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **C 78** | Θ | 82 | | ΝΑΙ | | |
| **C 79** | Θ | 86 | | | ΝΑΙ | |
| **C 80** | Θ | 74 | | ΝΑΙ | | |
| **C 81** | Θ | 79 | | ΝΑΙ | | |
| **C 82** | Α | 84 | | ΝΑΙ | | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **C 83** | Θ | 83 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **C 84** | Θ | 71 | | | | |
| **C 85** | Α | 73 | | ΝΑΙ | | |
| **C 86** | Α | 79 | | | | |
| **C 87** | Θ | 87 | | | | ΝΑΙ |
| **C 88** | Θ | 66 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **C 89** | Α | 78 | | | | |
| **C 90** | Α | 75 | | | ΣΝ /BYPASS | |
| **C 91** | Α | 74 | | ΝΑΙ | | |
| **C 92** | Α | 92 | | ΝΑΙ | | ΑΕΕ |
| **C 93** | Α | 63 | | ΝΑΙ | ΑΡΡΥΘΜ. | ΑΝΕΥΡ. ΑΟΡΤΗΣ |
| **C 94** | Α | 59 | | ΝΑΙ | | |
| **C 95** | Θ | 79 | | | | |
| **C 96** | Θ | 75 | | | | |
| **C 97** | Α | 72 | | | | |
| **C 98** | Θ | 75 | | | | |
| **C 99** | Θ | 80 | | ΝΑΙ | | |
| **C100** | Α | 77 | | | | |
| **C101** | Θ | 72 | | | | |
| **C102** | Θ | 69 | | | | |
| **C103** | Α | 58 | | | | |
| **C104** | Θ | 74 | | | | |
| **C105** | Α | 79 | | | | |
| **C106** | Θ | 70 | | ΝΑΙ | | |
| **C107** | Α | 73 | | | | |
| **C108** | Α | 80 | | | | |
| **C109** | Θ | 72 | | | | |
| **C110** | Θ | 70 | | ΝΑΙ | | |
| **C111** | Α | 63 | | | | ΝΑΙ |
| **C112** | Θ | 80 | | | | |
| **C113** | Θ | 44 | | ΝΑΙ | | |
| **C114** | Α | 64 | | | | |
| **C115** | Θ | 64 | ΝΑΙ | | | ΝΑΙ |
| **C116** | Θ | 83 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | | |
| **C117** | Θ | 84 | | ΝΑΙ | | |
| **C118** | Α | 82 | | | | ΝΑΙ |
| **C119** | Α | 77 | | | | |
| **C120** | Θ | 64 | | ΝΑΙ | | |
| **C121** | Α | 80 | | | | |
| **C122** | Θ | 77 | | | | ΝΑΙ |
| **C123** | Θ | 71 | | | | |

**Πίνακας 5.2Β: Ομάδα μαρτύρων (CONTROLS). Στοιχεία για τα οφθαλμολογικά χαρακτηριστικά. Γλαύκωμα, μέγιστη ΕΟΠ (IOP), max c/dr: μέγιστο πηλίκο κοίλανσης (εξέταση οπτικού νεύρου).**

| | **ΓΛΑΥΚΩΜΑ** | **Max IOP** | **Max c/d r** |
|---|---|---|---|
| **C 1** | ΟΧΙ | 14 | 0,3 |
| **C 2** | ΟΧΙ | 14 | 0,25 |
| **C 3** | ΟΧΙ | 15 | 0,2 |
| **C 4** | ΟΧΙ | 11 | 0,4 |
| **C 5** | ΟΧΙ | 18 | 0,3 |
| **C 6** | ΟΧΙ | 14 | 0,2 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **C 7** | ΟΧΙ | 15 | N/A |
| **C 8** | ΟΧΙ | 17 | 0,2 |
| **C 9** | ΟΧΙ | 12 | 0,2 |
| **C 10** | ΟΧΙ | 12 | 0,2 |
| **C 11** | ΟΧΙ | 15 | 0,1 |
| **C 12** | ΟΧΙ | 17 | 0,1 |
| **C 13** | ΟΧΙ | 13 | 0,4 |
| **C 14** | ΟΧΙ | 12 | 0,3 |
| **C 15** | ΟΧΙ | 18 | 0,2 |
| **C 16** | ΟΧΙ | 14 | 0,3 |
| **C 17** | ΟΧΙ | 15 | 0,1 |
| **C 18** | ΟΧΙ | 14 | 0,2 |
| **C 19** | ΟΧΙ | 14 | 0,3 |
| **C 20** | ΟΧΙ | 14 | 0,2 |
| **C 21** | ΟΧΙ | 18 | 0,4 |
| **C 22** | ΟΧΙ | 14 | 0,2 |
| **C 23** | ΟΧΙ | 13 | 0,2 |
| **C 24** | ΟΧΙ | 14 | 0,3 |
| **C 25** | ΟΧΙ | 15 | 0,1 |
| **C 26** | ΟΧΙ | 16 | 0,2 |
| **C 27** | ΟΧΙ | 15 | 0,3 |
| **C 28** | ΟΧΙ | 14 | 0,2 |
| **C 29** | ΟΧΙ | 18 | 0,3 |
| **C 30** | ΟΧΙ | 10 | 0,4 |
| **C 31** | ΟΧΙ | 10 | 0,5 |
| **C 32** | ΟΧΙ | 18 | 0,3 |
| **C 33** | ΟΧΙ | 16 | 0,2 |
| **C 34** | ΟΧΙ | 17 | 0,5 |
| **C 35** | ΟΧΙ | 11 | 0,2 |
| **C 36** | ΟΧΙ | 13 | 0,1 |
| **C 37** | ΟΧΙ | 16 | 0,3 |
| **C 38** | ΟΧΙ | 16 | 0,2 |
| **C 39** | ΟΧΙ | 14 | 0,6 /ΚΑΛΟ RIM |
| **C 40** | ΟΧΙ | 15 | 0,3 |
| **C 41** | ΟΧΙ | 14 | 0,3 |
| **C 42** | ΟΧΙ | 14 | 0,2 |
| **C 43** | ΟΧΙ | 14 | 0,1 |
| **C 44** | ΟΧΙ | 16 | 0,2 |
| **C 45** | ΟΧΙ | 18 | 0,2 |
| **C 46** | ΟΧΙ | 14 | 0,2 |
| **C 47** | ΟΧΙ | 13 | 0,2 |
| **C 48** | ΟΧΙ | 16 | 0,2 |
| **C 49** | ΟΧΙ | 17 | 0,3 |
| **C 50** | ΟΧΙ | 16 | 0,4 / RIM ΑΟ ΦΑΓΩΜ. |
| **C 51** | ΟΧΙ | 13 | 0,2 |
| **C 52** | ΟΧΙ | 19 | 0,6 |
| **C 53** | ΟΧΙ | 12 | 0,3 |
| **C 54** | ΟΧΙ | 19 | 0,6 |
| **C 55** | ΟΧΙ | 15 | 0,5 |
| **C 56** | ΟΧΙ | 18 | N/A |
| **C 57** | ΟΧΙ | 19 | 0,2 |
| **C 58** | ΟΧΙ | 14 | 0,2 |
| **C 59** | ΟΧΙ | 18 | 0,3 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **C 60** | ΟΧΙ | 14 | 0,2 |
| **C 61** | ΟΧΙ | 15 | 0,4 |
| **C 62** | ΟΧΙ | 15 | 0,3 |
| **C 63** | ΟΧΙ | 15 | 0,2 |
| **C 64** | ΟΧΙ | 17 | 0,4 |
| **C 65** | ΟΧΙ | 14 | 0,3 |
| **C 66** | ΟΧΙ | 20 | 0,2 |
| **C 67** | ΟΧΙ | 18 | 0,2 |
| **C 68** | ΟΧΙ | 17 | 0,3 |
| **C 69** | ΟΧΙ | 12 | 0,3 |
| **C 70** | ΟΧΙ | 14 | 0,3 |
| **C 71** | ΟΧΙ | 14 | 0,3 |
| **C 72** | ΟΧΙ | 12 | 0,1 |
| **C 73** | ΟΧΙ | 14 | 0,3 |
| **C 74** | ΟΧΙ | 16 | 0,2 |
| **C 75** | ΟΧΙ | 15 | 0,3 |
| **C 76** | ΟΧΙ | 13 | 0,3 |
| **C 77** | ΟΧΙ | 12 | 0,5 |
| **C 78** | ΟΧΙ | 15 | 0,4 /ΚΑΛΟ RIM |
| **C 79** | ΟΧΙ | 14 | N/A |
| **C 80** | ΟΧΙ | 18 | 0,3 |
| **C 81** | ΟΧΙ | 15 | 0,3 |
| **C 82** | ΟΧΙ | 12 | 0,3 |
| **C 83** | ΟΧΙ | 17 | 0,1 |
| **C 84** | ΟΧΙ | 13 | 0,3 |
| **C 85** | ΟΧΙ | 12 | 0,2 |
| **C 86** | ΟΧΙ | 10 | 0,1 |
| **C 87** | ΟΧΙ | 12 | 0,3 |
| **C 88** | ΟΧΙ | 16 | 0,3 |
| **C 89** | ΟΧΙ | 12 | 0,1 |
| **C 90** | ΟΧΙ | 14 | 0,1 |
| **C 91** | ΟΧΙ | 12 | 0,2 |
| **C 92** | ΟΧΙ | 14 | 0,2 |
| **C 93** | ΟΧΙ | 14 | 0,4 |
| **C 94** | ΟΧΙ | 13 | 0,1 |
| **C 95** | ΟΧΙ | 15 | 0,4 |
| **C 96** | ΟΧΙ | 12 | 0,2 |
| **C 97** | ΟΧΙ | 10 | 0,1 |
| **C 98** | ΟΧΙ | 16 | 0,2 /ΑΝΩΜ. RIM ΑΟ |
| **C 99** | ΟΧΙ | 14 | 0,3 |
| **C 100** | ΟΧΙ | 15 | 0,2 |
| **C 101** | ΟΧΙ | 13 | 0,2 |
| **C 102** | ΟΧΙ | 11 | 0,2 |
| **C 103** | ΟΧΙ | 12 | 0,1 |
| **C 104** | ΟΧΙ | 12 | 0,2 |
| **C 105** | ΟΧΙ | 13 | 0,3 |
| **C 106** | ΟΧΙ | 17 | 0,3 |
| **C 107** | ΟΧΙ | 12 | |
| **C 108** | ΟΧΙ | 14 | |
| **C 109** | ΟΧΙ | 17 | |
| **C 110** | ΟΧΙ | 14 | 0,1 |
| **C 111** | ΟΧΙ | 13 | 0,1 |
| **C 112** | 0ΧΙ | 13 | 0,2 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **C 113** | ΟΧΙ | 21 | 0,2 |
| **C 114** | ΟΧΙ | 14 | 0,2 |
| **C 115** | ΟΧΙ | 14 | 0,2 |
| **C 116** | ΟΧΙ | 15 | |
| **C 117** | ΟΧΙ | 10 | |
| **C 118** | 0ΧΙ | 20 | |
| **C 119** | ΟΧΙ | 13 | |
| **C 120** | ΟΧΙ | 15 | 0,3 |
| **C 121** | ΟΧΙ | 15 | 0,2 |
| **C 122** | ΟΧΙ | 12 | |
| **C 123** | ΟΧΙ | | 0,3 |

**Πίνακας 5.2Γ: Ομάδα με ΠΓΑΓ (POAG). Στοιχεία για το φύλο, την ηλικία, τον ΣΔ: σακχαρώδης διαβήτης, την ΑΥ: αρτηριακή υπέρταση, την καρδιοπάθεια και την αγγειοπάθεια.**

| | **ΦΥΛΟ** | **ΗΛΙΚΙΑ** | **ΣΔ** | **ΑΥ** | **ΚΑΡΔΙΟΠ.** | **ΑΓΓΕΙΟΠ.** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **POAG 1** | Α | 75 | | ΝΑΙ | | |
| **POAG 2** | Θ | 57 | | | | |
| **POAG 3** | Α | 60 | ΝΑΙ | | | |
| **POAG 4** | Θ | 85 | | | | |
| **POAG 5** | Α | 65 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **POAG 6** | Θ | 61 | | | | |
| **POAG 7** | Θ | 65 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **POAG 8** | Θ | 51 | | ΝΑΙ | | |
| **POAG 9** | Θ | 74 | | ΝΑΙ | | |
| **POAG 10** | Α | 70 | | ΝΑΙ | | |
| **POAG 11** | Α | 76 | | | | |
| **POAG 12** | Θ | 58 | | ΝΑΙ | | |
| **POAG 13** | Α | 71 | | ΝΑΙ | | |
| **POAG 14** | Θ | 54 | | ΝΑΙ | | |
| **POAG 15** | Θ | 56 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | ΝΑΙ | ΝΑΙ |
| **POAG 16** | Θ | 78 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | | |
| **POAG 17** | Θ | 71 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **POAG 18** | Θ | 72 | | ΝΑΙ | | |
| **POAG 19** | Α | 61 | ΝΑΙ | | | |
| **POAG 20** | Α | 36 | | | | |
| **POAG 21** | Α | 68 | ΝΑΙ | | ΝΑΙ | |
| **POAG 22** | Θ | 59 | | | | |
| **POAG 23** | Θ | 77 | | ΝΑΙ | | |
| **POAG 24** | Α | 66 | | | | |
| **POAG 25** | Α | 68 | | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **POAG 26** | Α | 74 | | | | |
| **POAG 27** | Α | 59 | ΝΑΙ | ΝΑΙ | ΝΑΙ | |
| **POAG 28** | Α | 66 | | | | |
| **POAG 29** | | | | | | |
| **POAG 30** | Α | 52 | | | | |
| **POAG 31** | Α | 57 | | | | |
| **POAG 32** | Α | 50 | | | | |
| **POAG 33** | Θ | 83 | | | | |
| **POAG 34** | Α | 82 | | | | |
| **POAG 35** | Α | 62 | | | | |
| **POAG 36** | Α | 65 | | | | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **POAG 37** | Θ | 79 | | | | |
| **POAG 38** | Θ | 81 | | | | |
| **POAG 39** | Θ | 38 | | | | |
| **POAG 40** | Α | 81 | | | | |
| **POAG 41** | Θ | 56 | | | | |
| **POAG 42** | Α | 72 | | | | |
| **POAG 43** | Θ | 66 | | | | |
| **POAG 44** | Θ | 69 | | | | |
| **POAG 45** | | | | | | |
| **POAG 46** | Α | 54 | | | | |
| **POAG 47** | Θ | 73 | | | | |
| **POAG 48** | Θ | 68 | | | | |
| **POAG 49** | Α | 81 | | | | |
| **POAG 50** | Α | 62 | | | | |
| **POAG 51** | | | | | | |
| **POAG 52** | Α | 66 | | | | |
| **POAG 53** | Α | 68 | | | | |
| **POAG 54** | Α | 70 | | | | |
| **POAG 55** | Α | 21 | | | | |
| **POAG 59** | Α | 84 | | | | |
| **POAG 60** | Θ | 38 | | | | |
| **POAG 66** | Α | 64 | | | | |

**Πίνακας 5.2Δ: Ομάδα με ΠΓΑΓ (POAG). Στοιχεία για τα οφθαλμολογικά χαρακτηριστικά. Γλαύκωμα, μέγιστη ΕΟΠ (IOP), max c/dr: μέγιστο πηλίκο κοίλανσης (εξέταση οπτικού νεύρου).**

| | **ΓΛΑΥΚΩΜΑ** | **Max IOP** | **Max c/d r** |
|---|---|---|---|
| **POAG 1** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 18 | |
| **POAG 2** | ΝΑΙ | 17 | 0,5 |
| **POAG 3** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 20 | 0,3 |
| **POAG 4** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 38 | 0,9 |
| **POAG 5** | ΝΑΙ | 16 | 0,4 |
| **POAG 6** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 16 | 0,9 |
| **POAG 7** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 12 | 0,6 |
| **POAG 8** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 16 | 0,3 |
| **POAG 9** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 14 | 0,8 |
| **POAG 10** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 14 | 0,3 |
| **POAG 11** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 12 | |
| **POAG 12** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 18 | 0,4 |
| **POAG 13** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 19 | 0,8 |
| **POAG 14** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 18 | 0,3 |
| **POAG 15** | ΝΑΙ | 16 | 0,5 |
| **POAG 16** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 15 | 0,7 |
| **POAG 17** | ΝΑΙ | 14 | 0,5 |
| **POAG 18** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 15 | 0,9 |
| **POAG 19** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 20 | 0,9 |
| **POAG 20** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 15 | 0,8 |
| **POAG 21** | ΝΑΙ | 15 | 0,6 |
| **POAG 22** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 15 | 0,4 |
| **POAG 23** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 16 | 0,9 |
| **POAG 24** | ΝΑΙ | 15 | 0,3 |
| **POAG 25** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 13 | 0,6 |
| **POAG 26** | ΝΑΙ ΔΟ/ΑΟ | 14 | 0,4 |
| **POAG 27** | ΝΑΙ | 17 | 0,3 |

## 5.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από λευκοκύτταρα αίματος με τη μέθοδο άλατος

Η απομόνωση γενωμικού DNA από λευκοκύτταρα αίματος έγινε με τη μέθοδο εξαλάτωσης[185]. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ταυτόχρονη επεξεργασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

### 5.2.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός

- Αντιπηκτικό διάλυμα $Na_2$-EDTA 10% w/v
- Διάλυμα Lysis I (16,6 g $NH_4Cl$, 2,0 g $KHCO_3$, 0,7 g EDTA-$Na_2$ και $dH_2O$ σε τελικό όγκο 2,0 L και pH = 7)
- Διάλυμα Lysis II (2,42 g Tris HCl, 46,6 g NaCl, 1,48 g EDTA-$Na_2$ και $dH_2O$ σε τελικό όγκο 2,0 L και pH = 8,3)
- Διάλυμα NaCl 6 M
- Διάλυμα SDS 10%
- Πρωτεϊνάση K (10 mg/mL)
- Απόλυτη αιθανόλη
- Αιθανόλη 70%
- Σωληνάρια φυγοκέντρησης 50 mL
- Σωληνάρια φυγοκέντρησης 15 mL
- Ακρορύγχη
- Πιπέτα (Pasteur γυάλινη)
- Φυγόκεντρος (Heraeus Laboratory Centrifuges, United Kingdom)
- Κλίβανος (Biometra, Germany)
- Συσκευή Vortex (Heidolph REAX 2000, Germany)

### 5.2.2 Πειραματική διαδικασία

1. Λήψη 10 mL αίματος σε σωληνάριο με αντιπηκτικό EDTA. Προσθήκη 30 mL απεσταγμένου νερού ($dH_2O$), ήπια ανάδευση για να επιτευχθεί λύση των ερυθροκυττάρων του αίματος.

2. Φυγοκέντρηση για 20 min στις 4.000 στροφές/min στους 4 $^oC$, προκειμένου να καθιζάνουν τα λευκοκύτταρα. Μετά τη φυγοκέντρηση απομακρύνουμε το υπερκείμενο διάλυμα που περιέχει τα λυμένα ερυθροκύτταρα και το πλάσμα του αίματος.

3. Προσθήκη 15 mL διαλύματος λύσης Ι. Ήπια ανάδευση προκειμένου να λυθούν τυχόν ερυθροκύτταρα που δεν λύθηκαν στο πρώτο στάδιο. Φυγοκέντρηση για 20 min στις 4.000 στροφές/λεπτό στους 4 $^{o}$C. Απομάκρυνση του υπερκείμενου που αποτελείται από λυμένα ερυθροκύτταρα και το πλάσμα του αίματος.

4. Προσθήκη 5 mL διαλύματος λύσης ΙΙ και ανακίνηση μέχρι τη διάλυση του ιζήματος. Το διάλυμα λύσης ΙΙ είναι υποτονικό και προκαλεί τη λύση των μεμβρανών των λευκοκυττάρων.

5. Προσθήκη 20 μL πρωτεϊνάσης Κ και 400 μL διαλύματος SDS 10%. Επώαση σε κλίβανο στους 37 $^{o}$C για 24 ώρες ή στους 55 $^{o}$C για 2 ώρες. Η πρωτεϊνάση διασπά τις πρωτεΐνες, ιστόνες και μη ιστόνες οι οποίες είναι δεσμευμένες με το DNA. Το διάλυμα SDS είναι αποδιατακτικό και μετουσιώνει τις πρωτεΐνες με αποτέλεσμα την κατακρήμνισή τους.

6. Προσθήκη διαλύματος NaCl 6 M και ισχυρή ανακίνηση για 30 sec. Με τον τρόπο αυτό γίνεται πιο εφικτή η καταβύθιση των πρωτεϊνών κι άλλων μετουσιωμένων μορίων.

7. Φυγοκέντρηση για 20 min στις 4.000 στροφές/min στους 4 $^{o}$C, οπότε καθιζάνουν τα μετουσιωμένα μόρια με τη μορφή ιζήματος, ενώ στο υπερκείμενο διάλυμα παραμένει το ολικό DNA.

8. Μεταφορά του υπερκείμενου διαλύματος σε άλλο σωληνάριο και φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 4.000 στροφές/λεπτό στους 4 $^{o}$C προκειμένου να καθιζάνουν τυχόν εναπομείναντα μόρια εκτός του DNA.

9. Προσθήκη 2 όγκων καθαρής (απόλυτης) αιθανόλης, περίπου μέχρι τελικού όγκου 20 mL. Με ήπια ανάδευση προκαλείται αφυδάτωση του μορίου DNA και κατακρήμνιση του. Συλλογή του DNA με τη χρήση αποστειρωμένης γυάλινης πιπέτας Pasteur.

10. Έκπλυση του DNA πάνω στην πιπέτα Pasteur με 70% αιθανόλη για σταδιακή ενυδάτωση του και διάλυση του σε 1 mL $dH_2O$ σε σωληνάριο eppendorf και ανάδευση του σωληναρίου για 24 ώρες στους 4 $^{o}$C.

### 5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός DNA με το φθορισμόμετρο Qubit

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA έγινε με το όργανο Qubit 1.0 (Invitrogen,USA) (**εικόνα 5.1**).

Η ποσοτικοποίηση του DNA επιτυγχάνεται με τη χρήση ουσίας που φθορίζει κατά την πρόσδεση σε δίκλωνο DNA, η οποία παρέχεται με το kit dsDNA BR (Invitrogen, ΗΠΑ). Η

χρωστική αυτή εκπέμπει ακτινοβολία κατόπιν διέγερσης με κατάλληλο μήκος κύματος, η οποία διαφέρει κατά αρκετές τάξεις μεγέθους ανάλογα με το αν η χρωστική είναι ελεύθερη ή προσδεδεμένη σε μόριο δίκλωνου DNA. Η μέτρηση πρότυπων διαλυμάτων (standards), που παρέχονται με το kit, επιτρέπει τον αυτοματοποιημένο σχεδιασμό καμπύλης βαθμονόμησης με βάση την οποία γίνεται η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης. Το εύρος της δοκιμασίας κυμαίνεται μεταξύ 2–1000 ng. Πλεονέκτημα της μεθόδου σε σχέση με τη μέτρηση της απορρόφησης της UV ακτινοβολίας (π.χ. στο ευρέως χρησιμοποιούμενο Nanodrop) είναι η εκλεκτικότητα των μετρήσεων που επιτρέπει διάκριση μεταξύ του DNA και του RNA όταν αυτά συνυπάρχουν σε ένα δείγμα και η ακρίβεια στην ποσοτικοποίηση σε δείγματα με χαμηλές συγκεντρώσεις, ακόμα και σε επίπεδα των 10 pg/μL. Αντίθετα το Nanodrop υπερέχει στο ότι δεν απαιτεί τη χρήση κυψελίδων και πρότυπων δειγμάτων, ενώ μπορεί να μετράει υψηλές συγκεντρώσεις χωρίς να χρειάζεται αραίωση.

**Εικόνα 5.1:Το φθορισμόμετρο Qubit (www.invitrogen.com).**

### 5.3.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και 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 eppendorf
- Πιπέτες (Thermo, Fisher USA)
- Συσκευή Vortex (Fisher, USA)

### 5.3.2 Πειραματική διαδικασία

1. Ετοιμάζουμε το διάλυμα εργασίας σε ένα σωληνάριο eppendorf προσθέτοντας 200 μL ρυθμιστικό διάλυμα (Component A) και 1 μL χρωστικής (Component B) για κάθε δείγμα. Αναδεύουμε έντονα.

2. Τοποθετούμε 190 μL διαλύματος εργασίας σε δύο σωληνάρια για τα πρότυπα διαλύματα (standards).

3. Προσθέτουμε 10 μL κάθε πρότυπου δείγματος στο αντίστοιχο σωληνάριο και αναδεύουμε έντονα.

4. Τοποθετούμε 180–199 μL διαλύματος εργασίας σε σωληνάρια για τα άγνωστα δείγματα.

5. Προσθέτουμε 1–20 μL άγνωστου δείγματος σε κάθε σωληνάριο, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 200 μL. Αναδεύουμε έντονα.

6. Επωάζουμε για 2 min.

7. Μετράμε το φθορισμό των πρότυπων και άγνωστων δειγμάτων με το φθορισμόμετρο Qubit 1.0.

## 5.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι η πιο κοινή τεχνική ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων. Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την απομόνωση τμημάτων DNA που συντίθενται κατά την PCR. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι τόσο το DNA όσο και το RNA είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH λόγω των φωσφορικών ομάδων τους και κατά συνέπεια θα μετακινηθούν προς την άνοδο (το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο) όταν εφαρμοσθεί ηλεκτρικό πεδίο. Ο διαχωρισμός των νουκλεϊκών οξέων επιτυγχάνεται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος όταν αυτά ηλεκτροφορηθούν σε γέλη πολυμερούς. Η ταχύτητα μετακίνησης των μορίων DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογαρίθμου του αριθμού των βάσεων τους. Έτσι, τα μικρότερα μόρια DNA μετακινούνται στην πηκτή πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα. Επειδή η πηκτή εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μεγέθους διαχωρίζονται σε «ζώνες». Η συγκέντρωση της αγαρόζης που χρησιμοποιείται σε κάθε εφαρμογή εκφράζεται σε %w/v και εξαρτάται από την ικανότητα διάκρισης (resolution) που επιδιώκεται. Η πηκτή αγαρόζης είναι διαπερατή για χρωστικές, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο έχει τη δυνατότητα να παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα και να σχηματίζει φθορίζον σύμπλοκο με το DNA, καθιστώντας ορατές τις ζώνες των διαχωρισμένων μορίων.

### 5.4.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός

- Ρυθμιστικό διάλυμα 5XTBE (τρις-βορικό-EDTA) [54g Trizma Base (Sigma #201-064-4), 27,5 g βορικό οξύ (Sigma #036K0210) και 20ml EDTA 0,5M pH 8.0 σε 1L]
- Βρωμιούχο αιθίδιο (500μg/ml), [Sigma,012K8934]
- Αγαρόζη (HT Biotechnology, UK), 100g
- Δείκτης μοριακών βαρών 50-766bp, (NEB, ΗΠΑ, N3234G)
- Χρωστική 6X (loading dye) με κυανό της βρωμοφαινόλης (BPB) και φικόλη
- Πιπέτες (Thermo, Γερμανία) των 20μL και των 100μL
- Ρύγχη των 20μL χωρίς φίλτρο
- Ηλεκτροφορητική συσκευή Peqlab (Γερμανία)
- Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης EPS5301 (Amersham, Αγγλία)
- Τράπεζα ακτινοβολίας UV (Vilbert Loumart, Γαλλία) και κάμερα (Vilbert Loumart, Γαλλία)

### 5.4.2 Πηκτή αγαρόζης 1% w/v

Για το διαχωρισμό των προϊόντων της συμβατικής και real-time PCR έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v. Η πηκτή παρασκευάζεται με 0,4g αγαρόζης σε 40 mL ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0.5X. Κατόπιν θερμάνσεως σε φούρνο μικροκυμάτων και διαλυτοποίησης της αγαρόζης, προστίθενται 40 μL βρωμιούχο αιθίδιο. Κατάλληλος όγκος δείγματος (5-10 μL) αναμιγνύεται με χρωστική πλήρωσης (gel-loading dye) σε αναλογία 6:1. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρηρησης TBE 0,5X, υπό σταθερή τάση 100V για 30 min. Παράλληλα με τα δείγματα γίνεται ηλεκτροφόρηση του δείκτη μοριακών βαρών DNA (molecular weight marker) για τον προσδιορισμό του μεγέθους των PCR προϊόντων. Οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές με την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας μήκους κύματος 312 nm λόγω της εκπομπής ακτινοβολίας φθορισμού από το προσδεδεμένο στο DNA βρωμιούχο αιθίδιο.

## 5.5 Real-time PCR και ανάλυση καμπύλων τήξης

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 4, η ανάλυση καμπύλων τήξης μετά από ενίσχυση με PCR πραγματικού χρόνου αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο γονοτύπωσης πολυμορφισμών μονού νουκλεοτιδίου που εκμεταλλεύεται τη μεταβολή στη θερμοκρασία τήξης ενός δίκλωνου μορίου DNA, όταν στην αλληλουχία υπάρχει κάποιο λάθος ζευγάρωμα βάσεων

(mismatch). Στην παρούσα εργασία αυτή η μέθοδος επιλέγχθηκε και αναπτύχθηκε για την ανάλυση δύο σημειακών πολυμορφισμών στο γονίδιο ***LOXL1***.

### 5.5.1 Οργανολογία

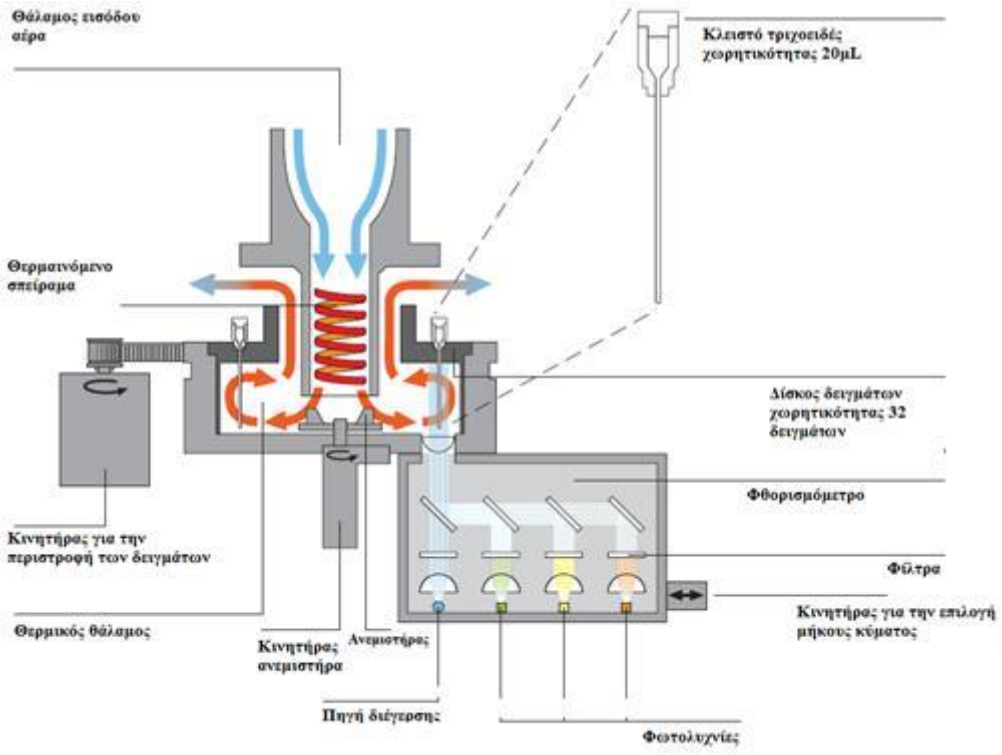
Οι αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου και η ανάλυση καμπύλων τήξης πραγματοποιήθηκαν με το θερμικό κυκλοποιητή LightCycler 1.5 (**εικόνα 5.2**) της εταιρείας Roche Applied Science. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε υάλινα τριχοειδή (capillaries) τα οποία τοποθετούνται σε ένα περιστρεφόμενο δίσκο χωρητικότητας 32 δειγμάτων (**εικόνα 5.2**).

α)


β)

**Εικόνα 5.2: α. Το όργανο LightCycler 1.5 β. Ο περιστρεφόμενος δίσκος με χωρητικότητα 32 τριχοειδών.**

Σε αντίθεση με τους συμβατικούς θερμικούς κυκλοποιητές που επιτυγχάνουν τη θέρμανση και ψύξη των δειγμάτων με θερμικά block ή με αξιοποίηση του θερμοηλεκτρικού φαινομένου Peltier, στο LightCycler οι θερμοκρασιακές αλλαγές επέρχονται με μεγάλη ταχύτητα μέσω ροής αέρα διαμέσου των εξαιρετικά λεπτών γυάλινων τριχοειδών (**εικόνα 5.3**). Ο αέρας θερμαίνεται από ένα θερμικό σπείραμα με ±0,3°C ακρίβεια στην επιτυγχανόμενη θερμοκρασία, ενώ ένας ανεμιστήρας ανακατανέμει τη ροή του αέρα εντός του θερμικού θαλάμου, ώστε να εξασφαλίζονται ταυτόσημες συνθήκες για όλα τα τριχοειδή του περιστρεφόμενου δίσκου (**εικόνα 5.3**). Τα τριχοειδή, με χωρητικότητα 20 μl, διαθέτουν υψηλό λόγο επιφάνειας προς όγκο, επιτρέποντας γρήγορη εξισορρόπηση της θερμοκρασίας μεταξύ αέρα και δείγματος. Έτσι επιτυγχάνονται γρήγοροι ρυθμοί μεταβολής της θερμοκρασίας που φτάνουν μέχρι και τους 20°C ανά δευτερόλεπτο και επιτρέπουν την τέλεση μιας PCR αντίδρασης 30-40 κύκλων σε χρονικό διάστημα 20-30 λεπτών (Lightcycler manual).




**Εικόνα 5.3: Σχηματική παράσταση της οργανολογίας του LightCycler.**

Η οπτική μονάδα του LightCycler ανιχνεύει το φθορισμό ανά προγραμματισμένα χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της ανίδρασης PCR και κατά συνεχή τρόπο κατά την ανάλυση καμπύλων τήξης. Οι οπτικές ιδιότητες των τριχοειδών τα καθιστούν κατάλληλα για χρήση σαν κυψελίδες για τις φθορισμομετρικές μετρήσεις. Η οπτική μονάδα διαθέτει τρία κανάλια ανίχνευσης που μετρούν το εκπεμπόμενο φως σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος (530 nm, 640 nm και 710 nm) καθώς και μία δίοδο εκπομπής φωτός (LED: Light Emiting Diode) που δρα ως πηγή διέγερσης. Έτσι οι κυριότερες φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται για την επισήμανση των ανιχνευτών DNA στο όργανο LightCycler είναι η φλουορεσκεΐνη, η LightCycler-Red 640 (LC-Red 640) και η LightCycler-Red 705 (LC-Red 705) με μέγιστα απορρόφησης και εκπομπής που σημειώνονται στον **πίνακα 5.3**.

Κατά τη μέτρηση του σήματος φθορισμού, ιώδες φως μήκους κύματος 470 nm εκπέμπεται από την πηγή διέγερσης και εστιάζεται στην άκρη του τριχοειδούς, διεγείροντας τα φθορισμοφόρα της αντίδρασης. Κατόπιν ο παραγόμενος φθορισμός κατευθύνεται εκ νέου προς την οπτική μονάδα, όπου μια σειρά φίλτρων και κατόπτρων διαχωρίζει τη φωτεινή ακτινοβολία σε διαφορετικά μήκη κύματος που μετρώνται από τα τρία κανάλια. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων ένας κατάλληλος κινητήρας περιστρέφει κυκλικά το δίσκο με τα

δείγματα, έτσι ώστε το άκρο κάθε τριχοειδούς να τοποθετείται ακριβώς στο εστιακό σημείο της φθορισμομετρικής οπτικής. Η βέλτιστη θέση για τη μέτρηση καθορίζεται για κάθε τριχοειδές σε μια «διαδικασία αναζήτησης» ("seek process") που προηγείται κάθε PCR αντίδρασης (Lightcycler manual).

**Πίνακας 5.3: Μέγιστο απορρόφησης και εκπομπής των χρωστικών που χρησιμοποιούνται στο όργανο LightCycler.**

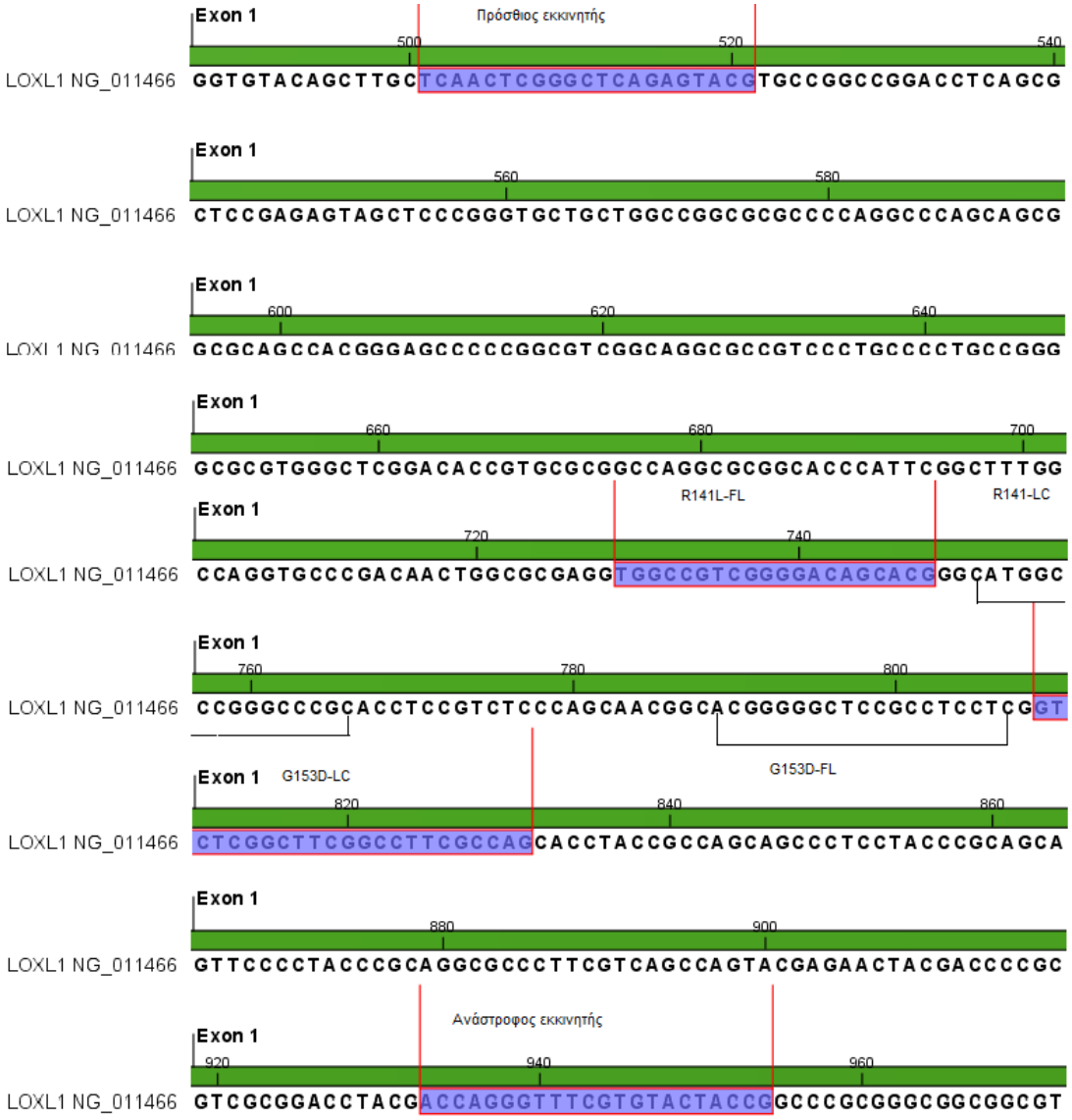
| | **Φλουορεσκεΐνη** | **LC-Red 640** | **LC-Red 705** |
|---|---|---|---|
| **Μέγιστο απορρόφησης** | 493 nm | 625 nm | 685 nm |
| **Μέγιστο εκπομπής** | 525 nm | 640 nm | 705 nm |

Για την παρακολούθηση της αντίδρασης ενώ αυτή εξελίσσεται, οι διάφορες πληροφορίες μεταφέρονται από και προς έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή, μέσω κατάλληλης σύνδεσης. Ο χρήστης εισάγει τα δεδομένα μέσω πληκτρολογίου στο κατάλληλο πειραματικό πρωτόκολλο μέσα στον υπολογιστή και στη συνέχεια ο υπολογιστής μεταφέρει τις πληροφορίες στο όργανο. Επίσης, ο υπολογιστής καταγράφει τις θερμοκρασίες και τα σήματα φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και επεξεργάζεται τέλος τα αποτελέσματα μέσω κατάλληλου αναλυτικού λογισμικού (Lightcycler manual).

### 5.5.2 Real-time PCR και ανάλυση καμπύλων τήξης για το γονίδιο LOXL1

Για το γονίδιο *LOXL1* (lysyl oxidase-like 1) εξετάστηκαν δύο μη συνώνυμοι πολυμορφισμοί (SNPs): rs1048661 και rs3825942 στο εξόνιο 1. Ο πολυμορφισμός rs3825942 συνιστά μια μετάπτωση g→a και αντιστοιχεί σε μία γλυκίνη σε ασπαρτικό αντικατάσταση (gly→asp) στο κωδικόνιο 153 (G153D). Ο πολυμορφισμός rs1048661 συνιστά μία μετάπτωση g→t και αντιστοιχεί σε μία αργινίνη σε λευκίνη αντικατάσταση (arg→leu) στο κωδικόνιο 141 (R141L). Για τις ανάγκες της γονοτύπωσης ενισχύθηκε με real-time PCR γενωμικό τμήμα 453 bp, στο οποίο θα μπορούσαν να προσδεθούν όλοι οι ειδικοί ανιχνευτές υβριδισμού (hybridization probes) και για τους δύο πολυμορφισμούς καθώς οι πολυμορφισμοί είναι πολύ κοντά ο ένας στον άλλο. Το τμήμα αυτό εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 15q24.1 (GenBank accession number: NG_011466). Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάσθηκαν in silico από την ομάδα μας με τη βοήθεια βιοπληροφορικού λογισμικού (κεφάλαιο 6). Επειδή οι πολυμορφισμοί απέχουν λίγο μεταξύ τους, οι ανιχνευτές είναι επισημασμένοι με δύο διαφορετικές φθορίζουσες

χρωστικές και τα δύο σετ ανιχνευτών μπορούν να μπουν ακόμα και στην ίδια αντίδραση με την εξής διάταξη: κεφαλή- ουρά και ουρά- κεφαλή στο PCR προϊόν (**εικόνα 5.4**), ώστε κατά τον υβριδισμό να εκδηλώνεται φαινόμενο FRET και να εκπέμπεται ακτινοβολία.




**Εικόνα 5.4: Σχετική θέση των εκκινητών και των ανιχνευτών υβριδισμού για την γονοτύπωση των δύο πολυμορφισμών κατά μήκος του γονιδίου *LOXL1*. Με πράσινο χρώμα σημειώνεται το εξώνιο 1 του γονιδίου *LOXL1*.**

Συγκεκριμένα κατά το στάδιο του υβριδισμού (annealing) το όργανο διεγείρει με ακτινοβολία μήκους κύματος 470 nm τη χρωστική φλουορεσκεΐνη των ανιχνευτών LOXL1-FL. Η φλουορεσκεΐνη εκπέμπει στη συνέχεια ακτινοβολία που απορροφάται από την παρακείμενη φθορίζουσα χρωστική LC640 ή LC705 των ανιχνευτών LOXL1-LC, η οποία και φθορίζει στα 640 nm ή 705 nm αντίστοιχα. Το σήμα του φθορισμού μετράται από το

όργανο και καταγράφεται σε διάγραμμα σε συνάρτηση με τους κύκλους της αντίδρασης. Οι αλληλουχίες και οι θερμοκρασίες τήξης (Tm) των ανιχνευτών και εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη real-time PCR για το *LOXL1* παρουσιάζονται στον **πίνακα 5.4**:

**Πίνακας 5.4: Οι αλληλουχίες και οι θερμοκρασίες τήξης (Tm) των ανιχνευτών και εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη real-time PCR για τη γονοτύπωση του *LOXL1.***

| Εκκινητής/ Ανιχνευτές | Αλληλουχία | Tm (°C) | Θέση στη GeneBank αλληλουχία NG_011466 |
|---|---|---|---|
| Πρόσθιος εκκινητής, LOXL1F | TCAACTCGGGCTCAGAGTACG | 59,0 | 501-521 |
| Ανάστροφος εκκινητής, LOXL1R | CGGTAGTACACGAAACCCTGGT | 59,9 | 933-954 |
| Ανιχνευτές FL | TGGCCGTCGGGGACAGCACG-FL (R141L)<br>ACGGGGACTCCGCCTCCTC-FL (G153D) | 72,2<br>64,9 | 729-748<br>789-807 |
| Ανιχνευτές LC | LC705-CATGGCCCTGGCCCGC (R141L)<br>LC640-GTCTCGGCTTCGGCCTTCGCCAG (G153D) | 66,0<br>73,2 | 751-766<br>809-831 |

Με κόκκινο χρώμα φαίνονται οι πολυμορφικές θέσεις.

Στην αντίδραση της real-time PCR για το *LOXL1* χρησιμοποιήθηκαν ένα ζευγάρι εκκινητών, δύο ζευγάρια ανιχνευτών (ένα για κάθε πολυμορφισμό, 100% συμπληρωματικοί των αλληλίων A και T), DMSO (χημικός παράγοντας απαραίτητος λόγω υψηλής περιεκτικότητας σε GC νουκλεοτίδια), μίγμα πολυμεράσης και μαγνήσιο από το kit LightCycler Faststart DNA Master HybProbe της Roche Applied Science. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα «combined» του Lightcycler εάν εξετάζονται ταυτόχρονα οι δύο πολυμορφισμοί για οικονομικούς λόγους. Το πρωτόκολλο σε τελικό όγκο 10 μL και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της ενίσχυσης φαίνονται στους **πίνακες 5.5** και **5.6**.

Πραγματοποιείται asymmetric PCR (πρόσθιος:ανάστροφος 1:4) με σκοπό να ενισχυθεί περισσότερο η μία αλυσίδα ώστε να έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση το υπόστρωμα του ανιχνευτή, πράγμα το οποίο οδηγεί σε δυνατότερο σήμα άρα και χαμηλότερο όριο ανίχνευσης του πολλαπλασιασμένου τμήματος του DNA. Επίσης, σε όλα τα δείγματα έγινε

αραίωση 1:5 με στόχο την αποφυγή αναστολέων και την οριοθέτησή τους σε επιθυμητή συγκέντρωση ανά αντίδραση (100 ng).

**Πίνακας 5.5: Πρωτόκολλο real-time PCR για το γονίδιο *LOXL1*.**

| Αντιδραστήρια | Αρχική Συγκέντρωση | Προστιθέμενος όγκος (μL) | Τελική συγκέντρωση |
|---|---|---|---|
| $H_2O$ | - | 2,4 | - |
| $MgCl_2$ | 25mM | 1,6 | 4mM |
| DMSO | - | 0,6 | - |
| G153D-FL | 3 mM | 0,6 | 0,18 mM |
| G153D-LC | 3 mM | 0,6 | 0,18 mM |
| Πρόσθιος εκκινητής-LOXL1F | 20 pmol/μL | 0,2 | 0,4 pmol/μL |
| Ανάστροφος εκκινητής-LOXL1R | 20 pmol/μL | 0,8 | 1,6 pmol/μL |
| R141L-FL | 3 mM | 0,6 | 0,18 mM |
| R141L-LC | 3 mM | 0,6 | 0,18 mM |
| Roche Mix | 10X | 1 | 1X |

**Πίνακας 5.6: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα real-time PCR για το γονίδιο *LOXL1.***

| Στάδιο PCR | Θερμοκρασία | Διάρκεια | Ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας | Επαναλήψεις |
|---|---|---|---|---|
| Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA | 95°C | 10 min | | |
| Διαχωρισμός των κλώνων του DNA | 95°C | 20 sec | 20°C/sec | 45 κύκλοι |
| Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA | 58°C | 20 sec | 20°C/sec | |
| Επέκταση των εκκινητών | 72°C | 20 sec | 20°C/sec | |

Μετά την ενίσχυση ακολουθεί πρόγραμμα τήξης κατά το οποίο η θερμοκρασία μετά από αρχική αποδιάταξη στους 95°C, μειώνεται στους 40°C και κατόπιν σταδιακά αυξάνεται με

παράλληλη συνεχή καταγραφή της έντασης του φθορισμού. Η καμπύλη τήξης, η οποία και σχεδιάζεται αυτόματα από το όργανο, προκύπτει από τη αρνητική πρώτη παράγωγο της συνάρτησης μεταβολής της έντασης του φθορισμού ως προς τη θερμοκρασία. Ο **πίνακας 5.7** συνοψίζει το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της δοκιμασίας τήξης:

**Πίνακας 5.7: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης καμπύλων τήξης για το γονίδιο LOXL1.**

| Στάδιο ανάλυσης τήξης | Θερμοκρασία | Διάρκεια | | Ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας |
|---|---|---|---|---|
| $1^o$ | 95°C | 30 sec | | 20°C/sec |
| $2^o$ | 45°C | 1 min | | 20°C/sec |
| $3^o$ | 85°C | - | | 0,5°C/sec |
| **Στάδιο cooling** | | 40°C | 30sec | 20°C/sec |

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα modified του Lightcycler εάν εξετάζονται ξεχωριστά οι δύο πολυμορφισμοί. Τα πρωτόκολλα σε τελικό όγκο 10 μL και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της ενίσχυσης και ανάλυσης καμπυλών τήξης φαίνονται στους **πίνακες 5.8-5.11**.

**Πίνακας 5.8: Πρωτόκολλο real-time PCR για τον πολυμορφισμό G153D ή R141L.**

| Αντιδραστήρια | Αρχική Συγκέντρωση | Προστιθέμενος όγκος (μL) | Τελική συγκέντρωση |
|---|---|---|---|
| $H_2O$ | - | 3,6 | - |
| $MgCl_2$ | 25mM | 1,6 | 4mM |
| DMSO | - | 0,6 | - |
| G153D-FL ή R141L-FL | 3 mM | 0,6 | 0,18 mM |
| G153D-LC ή R141L-LC | 3 mM | 0,6 | 0,18 mM |
| Πρόσθιος εκκινητής-LOXL1F | 20 pmol/μL | 0,2 | 0,4 pmol/μL |
| Ανάστροφος εκκινητής-LOXL1R | 20 pmol/μL | 0,8 | 1,6 pmol/μL |
| Roche Mix | 10X | 1 | 1X |

**Πίνακας 5.9: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα real-time PCR για τους πολυμορφισμούς G153D και R141L ξεχωριστά (modified).**

| Στάδιο PCR | Θερμοκρασία | Διάρκεια | Ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας | Επαναλήψεις |
|---|---|---|---|---|
| Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA | 95°C | 10 min | | |
| Διαχωρισμός των κλώνων του DNA | 95°C | 20 sec | 20°C/sec | 45 κύκλοι |
| Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA | 60°C | 20 sec | 20°C/sec | |
| Επέκταση των εκκινητών | 72°C | 20 sec | 20°C/sec | |

**Πίνακας 5.10: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης καμπύλων τήξης για τους πολυμορφισμούς G153D και R141L ξεχωριστά (modified).**

| Στάδιο ανάλυσης τήξης | Θερμοκρασία | Διάρκεια | Ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας | |
|---|---|---|---|---|
| 1$^{o}$ | 95°C | 30 sec | 20°C/sec | |
| 2$^{o}$ | 45°C | 1 min | 20°C/sec | |
| 3$^{o}$ | 85°C | - | 0,5°C/sec | |
| **Στάδιο cooling** | | 40°C | 30sec | 20°C/sec |

Για την καλύτερη ανάλυση των καμπυλών τήξης, τα ήδη υπάρχοντα ενισχυμένα δείγματα μπορούν να αναλυθούν ξανά με το πρόγραμμα melting. Πρέπει να αναφερθεί ότι ο ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας ήταν ρυθμισμένος στο 0,3°C/sec με εξέταση 10 δειγμάτων ενώ σε λιγότερα δείγματα η καλύτερη δυνατή εικόνα εμφανίζεται με ρυθμό μεταβολής 0,7°C/sec.

**Πίνακας 5.11: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης καμπύλων τήξης για τους πολυμορφισμούς G153D και R141L (melting).**

| Στάδιο ανάλυσης τήξης | Θερμοκρασία | Διάρκεια | Ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας |
|---|---|---|---|
| 1$^{o}$ | 95°C | 30 sec | 20°C/sec |
| 2$^{o}$ | 45°C | 1min 30sec | 20°C/sec |
| 3$^{o}$ | 80°C | - | 0,3°C/sec |

## 5.6 Συμβατική PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια μέθοδος αποτελεσματική για την in vitro παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων συγκεκριμένων περιοχών DNA. Τα απαραίτητα συστατικά για την διαδικασία αυτή είναι:

- Δυο συνθετικοί νουκλεοτιδικοί εκκινητές (~20 νουκλεοτίδια ο καθένας), συμπληρωματικοί περιοχών σε αντίθετες πλευρές των δύο αλυσίδων έτσι ώστε να περικλείεται ανάμεσα τους το DNA στόχος. Οι εκκινητές αυτοί μετά τον υβριδισμό με το DNA στόχο έχουν τα 3’ –OH άκρα αντικριστά μεταξύ τους.
- Μια αλληλουχία στόχος, δείγματος DNA, που βρίσκεται μεταξύ του ζεύγους των εκκινητών και μπορεί να έχουν μήκος 100-35000 bp.
- Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, ώστε να αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για να βρουν οι εκκινητές τις συμπληρωματικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων του DNA.
- Τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs).
- Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για την σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Τα μονόκλωνα μόρια μπορούν να παραχθούν με απλό τρόπο από δίκλωνα μόρια του DNA, όταν θερμαίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες, οπότε αποχωρίζονται. Η DNA πολυμεράση απαιτεί επίσης την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Επομένως το σημείο έναρξης της σύνθεσης του DNA μπορεί να καθοριστεί με την χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδίου εναρκτήριου μορίου (εκκινητή, primer), που συνδέεται με την μήτρα σε αυτό ακριβώς το σημείο. Έτσι με την κατάλληλη επιλογή εκκινητών μπορούμε να κατευθύνουμε τη DNA πολυμεράση να συνθέσει συγκεκριμένη περιοχή του DNA.

Μία τυπική διαδικασία PCR περιέχει έναν αριθμό επαναλαμβανόμενων κυκλικών διαδικασιών, για τον πολλαπλασιασμό του DNA στόχου. Κάθε κύκλος περιέχει τρία βήματα:

1. **Αποδιάταξη**. Το πρώτο στάδιο είναι η θερμική αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας στόχου, που επιτυγχάνεται αυξάνοντας τη θερμοκρασία στο σωληνάριο της αντίδρασης συνήθως στους 95 $^{o}$C. Στο στάδιο αυτό στο δοχείο αντίδρασης περιέχονται: τα dNTPs, η θερμοανθεκτική πολυμεράση και το ζεύγος εκκινητών σε περίσσεια. Η θερμοκρασία διατηρείται συνήθως για ένα περίπου λεπτό.
2. **Υβριδισμός**. Στο δεύτερο στάδιο, του υβριδισμού, η θερμοκρασία του μίγματος σταδιακά κατεβαίνει περίπου στους 55 $^{o}$C. Η θερμοκρασία αυτή ποικίλει ανάλογα με τις ακολουθίες. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου οι εκκινητές σχηματίζουν ζεύγη βάσεων με τις συμπληρωματικές περιοχές του DNA στόχου.
3. **Επέκταση**. Στο τρίτο στάδιο, η θερμοκρασία αυξάνεται περίπου στους 72$^{o}$C, όπου είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για την καταλυτική δράση της πολυμεράσης. Ο χρόνος επώασης ποικίλει ανάλογα με το μήκος του τμήματος στόχο. Η σύνθεση του DNA αρχίζει στο 3’ –OH άκρο κάθε εκκινητή.

### 5.6.1 Οργανολογία

Για την εκτέλεση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε θερμικός κυκλοποιητής: Primus 25 της MWG Biotech, Γερμανίας. Το όργανο αυτό διαθέτει υποδοχείς για σωληνάρια PCR των 0,2 ml και μπορεί χάρη στα θερμικά Peltier στοιχεία που διαθέτει να υποβάλλει τα δείγματα σε ταχείς κύκλους εναλλαγής θερμοκρασίας μεταξύ 4$^{o}$ C/sec και 105$^{o}$ C, με ακρίβεια ±0,1$^{o}$ C, χωρίς την χρήση εξωτερικών παροχών εκτός του βασικού ενισχυτή ηλεκτρονικού ρεύματος. Επίσης προγραμματίζεται μέσω ψηφιακού πληκτρολογίου και έκθεσης εικόνας σε LCD οθόνη και έχει δυνατότητα αποθήκευσης 90 προγραμμάτων. Επιπρόσθετα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως επωαστήρας με εύρος θερμοκρασιών από 4$^{o}$C-105$^{o}$C (**εικόνα 5.5**). Το όργανο διαθέτει θερμαινόμενο καπάκι (lid) και η ταχύτητα της ανόδου θερμοκρασίας (ramp time) είναι 4$^{o}$ C/sec ενώ της ψύξης 2$^{o}$ C/sec.

**Εικόνα 5.5: Σχηματική παράσταση του θερμικού κυκλοποιητή Primus 25 της MWG.**

### 5.6.2 Ενίσχυση με συμβατική PCR

Η ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδίου *LOXL1* στο όργανο Primus, ο καθαρισμός των PCR προϊόντων, το cycle sequencing, ο καθαρισμός των cycle sequencing προϊόντων και το DNA sequencing αποτελούν διαδικασία επιβεβαίωσης της γονοτύπωσης κάποιων δειγμάτων. Η ενίσχυση με συμβατική PCR έγινε με το ακόλουθο πρωτόκολλο με τελικό όγκο 25 μL (kit πολυμεράσης kapa Biosystems, **πίνακας 5.12**) και θερμοκρασιακό πρόγραμμα (**πίνακας 5.13**):

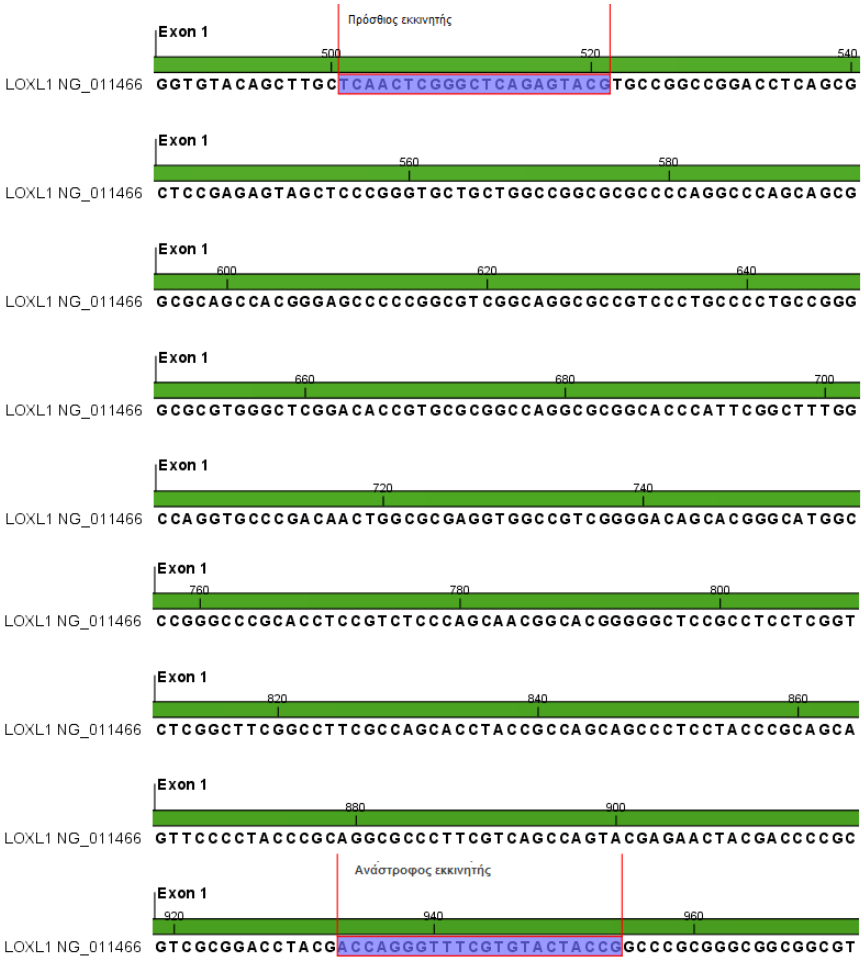
**Πίνακας 5.12: Πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του *LOXL1*.**

| Αντιδραστήρια | Αρχική Συγκέντρωση | Προστιθέμενος όγκος (μL) | Τελική συγκέντρωση |
|---|---|---|---|
| $H_2O$ | - | 11,9 | - |
| Buffer B (+Mg) | 5X | 5 | 1X |
| Enhancer 1 | 5X | 5 | 1X |
| dNTPs (kapa) | 10 mM | 0,5 | 0,2mM |
| Πρόσθιος εκκινητής LOXL1F | 20 pmol/μL | 0,5 | 0.4 pmol/μL |
| Ανάστροφος εκκινητής LOXL1R | 20 pmol/μL | 0,5 | 0.4 pmol/μL |
| Kapa Πολυμεράση (Robust) | 5U/μL | 0,1 | 0,02U/μL |

**Πίνακας 5.13: Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του LOXL1.**

| Στάδιο PCR | Θερμοκρασία | Διάρκεια | Επαναλήψεις |
|---|---|---|---|
| Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA | 95°C | 3 min | - |
| Διαχωρισμός των κλώνων του DNA | 94°C | 1 min | 40 κύκλοι |
| Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA | 55°C | 1 min | |
| Επέκταση των εκκινητών | 72°C | 1 min | |
| Τελικό στάδιο επέκτασης | 72°C | 5 min | - |

Όπως προαναφέρθηκε ενισχύθηκε περιοχή 453 bp του γονιδίου LOXL1 στη χρωμοσωμική περιοχή 15q24 (GenBank accession number: NG_011466) με τη χρήση εκκινητών (αλληλουχία στον **πίνακα 5.4**), (η σχετική τους θέση **εικόνα 5.6**).




**Εικόνα 5.6: Σχετική θέση των εκκινητών επί του γονιδίου *LOXL1.***

## 5.7 Καθαρισμός των PCR προϊόντων

Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων έγινε με το προτυποποιημένο σετ αντιδραστηρίων High Pure PCR Cleanup Micro Kit της Roche Applied Science (Ελβετία). Η μέθοδος βασίζεται στην κατακράτηση του DNA από τις ειδικές στήλες του kit που περιέχουν μεμβράνες πυριτίου. Το DNA απορροφάται στην μεμβράνη παρουσία του διαλύματος πρόσδεσης (Binding Buffer) το οποίο εξασφαλίζει τις απαραίτητες συνθήκες (υψηλές συγκεντρώσεις άλατος και κατάλληλο pH). Οι προσμίξεις (όπως περίσσεια εκκινητών, άλατα, ένζυμα, μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια, αγαρόζη, χρωστικές, βρωμιούχο αιθίδιο) διαπερνούν την στήλη και απομακρύνονται με εκπλύσεις. Η κάθε στήλη παρέχει αποτελεσματική πρόσδεση PCR προϊόντων μεγέθους μεγαλύτερου των 70 bp. Το DNA μετά την ολοκλήρωση των εκπλύσεων, εκλούεται με 10 ή 20 μL από το διάλυμα έκλουσης.

### Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός

- Πιπέτες (Thermo, Fisher USA) των 10μl, 100μl , 200μl και 1000μl
- Ακρορύγχη με φίλτρο των 10μl, 200μl και 1000μl
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus,Thermo Fisher, USA)
- Συσκευή Vortex (Fisher, USA)
- Αποστειρωμένο νερό (ΒΙΟΣΕΡ Α.Ε, Ελλάδα)
- Σωληνάρια τύπου eppendorfs των 1,5 ml
- Σωληνάρια συλλογής των 2ml (Collection Tubes)
- Στήλες High Pure Micro Filter Tubes
- Διάλυμα πρόσδεσης (Binding Buffer)
- Διάλυμα εκπλύσεων (Washing Buffer)
- Διάλυμα έκλουσης (Elution Buffer)
- Αιθανόλη

### Πειραματική διαδικασία

1. Προσθέτουμε δις απεσταγμένο νερό στο δείγμα μέχρι τελικού όγκου 100μL.

2. Σε κάθε δείγμα (των 100 μL) προσθέτουμε 400 μL διάλυμα πρόσδεσης, αναδεύουμε έντονα και φυγοκεντρούμε σύντομα.

3. Εισάγουμε μια στήλη High Pure Filter Tube σε ένα σωληνάριο συλλογής. Μεταφέρουμε το δείγμα του δεύτερου βήματος στο επάνω μέρος της στήλης και φυγοκεντρούμε για 30-60 sec στα 8000 x g.

4. Απορρίπτουμε το διήθημα και τοποθετούμε την στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο.

5. Προσθέτουμε 400 μl διάλυμα εκπλύσεων στη στήλη και φυγοκεντρούμε για 30- 60 sec στα 8000 x g.

6. Απορρίπτουμε το διήθημα και τοποθετούμε την στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο.

7. Προσθέτουμε 300 μl διάλυμα εκπλύσεων στη στήλη και φυγοκεντρούμε για 30- 60 sec στα 8000 x g.

8. Απορρίπτουμε το διήθημα και τοποθετούμε την στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο και φυγοκεντρούμε στα 17900 x g για ένα επιπλέον λεπτό.

9. Απορρίπτουμε το σωληνάριο συλλογής με το διήθημα και τοποθετούμε την στήλη σε ένα καθαρό eppendorf των 1,5 ml.

10. Για την έκλουση του DNA, προστίθενται 20 μl διαλύματος έκλουσης. Φυγοκεντρούμε στα 8000 x g για 1 min.

## 5.8 Αντίδραση θερμικών κύκλων (cycle sequencing)

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η αντίδραση των θερμικών κύκλων είναι παρόμοια με αυτή της PCR. Τα περισσότερα συστατικά που χρησιμοποιούνται είναι τα ίδια με αυτά της PCR και ακολουθείται η ίδια διαδικασία με θερμικούς κύκλους. Μια διαφορά είναι ότι μόνο ο ένας εκκινητής χρησιμοποιείται σε κάθε αντίδραση cycle sequencing (είτε ο πρόσθιος είτε ο ανάστροφος), με αποτέλεσμα η ενίσχυση του προϊόντος να είναι γραμμική και όχι εκθετική. Μια άλλη διαφορά είναι ότι στην αντίδραση χρησιμοποιούνται και διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs), τα οποία διακόπτουν την επέκταση του DNA όταν ενσωματωθούν. Επειδή η αντίδραση του cycle sequencing είναι μια διαδικασία γραμμικής ενίσχυσης είναι λιγότερο επιρρεπής στις επιμολύνσεις, αλλά παρόλα αυτά δεν παύει να χρειάζεται στείρες συνθήκες. Στον **πίνακα 5.14** καταγράφονται τα συστατικά της αντίδρασης cycle sequencing και στον **πίνακα 5.15** το ακολουθούμενο θερμοκρασιακό πρόγραμμα:

**Πίνακας 5.14: Πρωτόκολλο Cycle Sequencing.**

| Αντιδραστήρια | Προστιθέμενος όγκος (μl) | Τελική συγκέντρωση |
|---|---|---|
| RRmix, ABI (Applied Biosystems) | 1 | |
| 5X sequencing ρυθμιστικό διάλυμα, ABI | 7 | 1,75X |
| Εκκινητής LOXL1F (5 pmol/μl) | 1 | 0,25 pmol/μl |
| $H_2O$ | 9 | |
| Κεκαθαρμένο PCR προϊόν | 2 | |

**Πίνακας 5.15: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα Cycle Sequencing.**

| Στάδιο PCR | Θερμοκρασία | Διάρκεια | Επαναλήψεις |
|---|---|---|---|
| Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA | 96°C | 1 min | |
| Διαχωρισμός των κλώνων του DNA | 96°C | 10 sec | 25 κύκλοι |
| Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA | 50°C | 10 sec | |
| Επέκταση των εκκινητών | 60°C | 4 min | |

## 5.9 Καθαρισμός των προϊόντων του Cycle Sequencing

Ο καθαρισμός των προϊόντων του Cycle Sequencing έγινε με το προτυποποιημένο σετ αντιδραστηρίων Nucleoseq της Macherey – Nagel (Γερμανία). Το kit αυτό αποτελείται από στήλες NucleoSEQ, σχεδιασμένες για τον γρήγορο και αποτελεσματικό καθαρισμό νουκλεϊκών οξέων. 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, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός

- Πιπέτες (Thermo, Fisher USA) των 100μl και 1000μl
- Ακρορύγχη των 200μl και 1000μl
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus, Thermo Fisher, USA)

- Αποστειρωμένο νερό (ΒΙΟΣΕΡ Α.Ε, Ελλάδα)
- Συσκευή Vortex (Fisher, USA)
- Σωληνάρια τύπου eppedorfs των 1,5 ml
- Στήλες NucleoSEQ ( Macherey – Nagel, Γερμανία)

**Πειραματική διαδικασία**

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 600μl 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$^{o}$C. Οι ενυδατωμένες στήλες μπορούν να φυλαχθούν στους 4$^{o}$C για τον πολύ 14 μέρες. Γίνεται ανασύσταση του gel που έχει συγκεντρωθεί στον πάτο της στήλης κάνοντας έντονη ανάδευση. Δεν πρέπει να δημιουργηθούν φυσαλίδες. Αφαιρούμε το πώμα που βρίσκεται στον πυθμένα της στήλης και τοποθετούμε τη στήλη μέσα στο δοχείο συλλογής.

4. Φυγοκέντρηση για 2 min στα 750 x g για ν αφαιρεθεί το διάλυμα αποθήκευσης που περισσεύει. Απορρίπτουμε το δοχείο συλλογής με το διάλυμα και τοποθετούμε τη στήλη στο κατάλληλο δοχείο συλλογής.

5. Ανοίγουμε το καπάκι της στήλης. Προσεκτικά φορτώνουμε το δείγμα στο κέντρο του gel χωρίς να διαταράξουμε την 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. Απορρίπτουμε τη στήλη ξηραίνουμε το δείγμα η το χρησιμοποιούμε απευθείας.

## 5.10 Προετοιμασία δειγμάτων για DNA sequencing

Τα κεκαθαρμένα προϊόντα του Cycle Sequencing τοποθετούνται στη συνέχεια στο ABI Prism 310 Genetic Analyzer, με τη διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω:

**Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός**

- Επωαστήρας σωληναρίων (Grant, Αγγλία)
- Πιπέτες (Thermo, Fisher USA) των 100μl
- Αποστειρωμένο νερό (ΒΙΟΣΕΡ Α.Ε, Ελλάδα)
- Συσκευή Vortex (Fisher, USA)
- Σωληνάρια τύπου eppendorfs των 1,5 ml
- Πολυμερές POP4 (Applied Biosystems, USA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10X (Applied Biosystems, USA)
- Φορμαμίδιο (Applied Biosystems, USA)
- Σωληνάρια αντίδρασης 0,5 ml (Applied Biosystems, USA)
- Τριχοειδές 47 mm (Applied Biosystems, USA)
- Γενετικός Αναλυτής ABI 310 (Applied Biosystems, USA)

**Πειραματική διαδικασία**

1.Τοποθετούμε σε ένα σωληνάριο τύπου Eppendorf των 1,5 ml, 10 μl από το καθαρό cycle sequencing προϊόν και 10 μl υπερκαθαρό φορμαμίδιο.

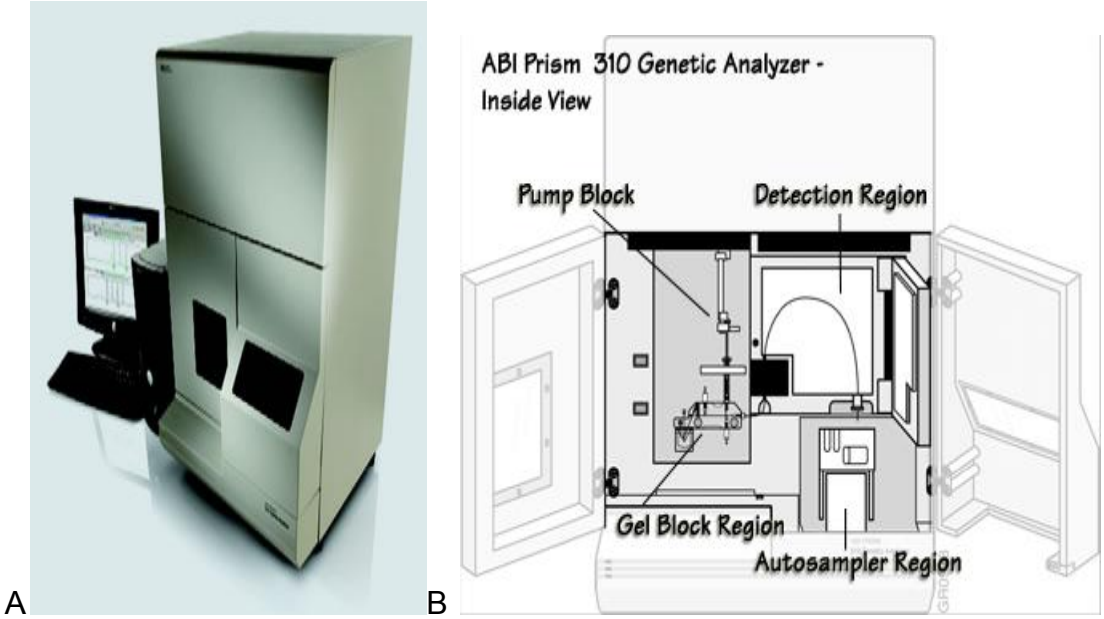
2. Επωάζουμε τους 95$^{o}$C για 2 min και στην συνέχεια στους 4 $^{o}$C για άλλα 2 min.

3. Τα μεταφέρουμε στα σωληνάρια αντίδρασης των 0,5 ml και τα φορτώνουμε στον γενετικό αναλυτή ABI310.

## 5.11 Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων του DNA (DNA sequencing)

### 5.11.1 Οργανολογία

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με το όργανο ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ΗΠΑ) (**εικόνα 5.7**).




**Εικόνα 5.7: Ο γενετικός αναλυτής ABI Prism 310 Α) Εξωτερική άποψη Β) Εσωτερική άποψη (www.invitrogen.com).**

Για την πραγματοποίηση της αλληλούχισης τα σωληνάρια τοποθετούνται σε αυτόματο δειγματολήπτη (autosampler tray). Ο δίσκος αυτός εν συνεχεία φέρνει κάθε δείγμα σε επαφή με το ηλεκτρόδιο-κάθοδο και το ένα άκρο ενός υάλινου τριχοειδούς που περιέχει πολυμερές. Το ηλεκτρόδιο-άνοδος στο άλλο άκρο του τριχοειδούς βυθίζεται ακολούθως σε ρυθμιστικό διάλυμα. Καθώς ρεύμα ρέει από την κάθοδο προς την άνοδο, μέρος του δείγματος εισέρχεται στο τριχοειδές, σε μια διαδικασία που καλείται ηλεκτροκινητική έγχυση. Το άκρο του τριχοειδούς που βρίσκεται προς την κάθοδο εισέρχεται κατόπιν στο ρυθμιστικό διάλυμα. Ηλεκτρικό ρεύμα εφαρμόζεται εκ νέου, ώστε να συνεχισθεί η ηλεκτροφόρηση. Όταν τα νουκλεοτίδια φθάσουν στο παράθυρο ανίχνευσης μια πηγή laser διεγείρει τις φθορίζουσες χρωστικές και ο φθορισμός καταγράφεται από μια ψυχρή, διπλού φορτίου κάμερα (charge-coupled device-CCD). Το λογισμικό ερμηνεύει τέλος το αποτέλεσμα και αναγνωρίζει τις βάσεις που αντιστοιχούν στα δεδομένα της μετρούμενης έντασης φθορισμού.

Το όργανο αυτό χρησιμοποιεί ομάδες εικονικών φίλτρων για να ανιχνεύσει την ένταση του φθορισμού σε τέσσερις μη επικαλυπτόμενες περιοχές πάνω στην CCD κάμερα. 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 Ε 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[183].

### 5.11.2 Πειραματική πορεία

Για την πραγματοποίηση της αλληλούχισης ενός τμήματος DNA απαιτούνται τα εξής διαδοχικά βήματα τα οποία αναλύονται στα επόμενα εδάφια:

- Ενίσχυση του τμήματος DNA με συμβατική PCR ή με real-time PCR
- Καθαρισμός των PCR προϊόντων με στήλες
- Εφαρμογή της μεθόδου θερμικών κύκλων (Cycle Sequencing) στα κεκαθαρμένα PCR προϊόντα
- Καθαρισμός των προϊόντων του Cycle Sequencing και προετοιμασία για εισαγωγή στο ABI Prism 310 Genetic Analyzer
- Αλληλούχιση και λήψη των δεδομένων
- Ανάλυση δεδομένων με πρόγραμμα Chromas Lite 2.01 (Technelysiym, Αυστραλία)

## 5.12 Βιοπληροφορική

Σ’ αυτή την εργασία έγινε χρήση κατάλληλων λογισμικών με σκοπό τον σχεδιασμό εκκινητών και ανιχνευτών, τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των αναλύσεων και την ανάδειξη συσχετίσεων μεταξύ των υπό μελέτη πολυμορφισμών.

### 5.12.1 Σχεδιασμός εκκινητών και ανιχνευτών

Η ειδικότητα και η αξιοπιστία της ανάλυσης καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τον σωστό σχεδιασμό των εκκινητών και ανιχνευτών για μια αντίδραση real-time PCR και ανάλυση καμπυλών τήξης. Οι εκκινητές θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από παρόμοια

περιεκτικότητα σε γουανίνες-κυτοσίνες, να μη φέρουν συμπληρωματικές αλληλουχίες (ιδιαίτερα στο 3΄ άκρο τους) και να μη σχηματίζουν δευτεροταγείς και παλινδρομικές δομές. Σημαντική προϋπόθεση αποτελεί οι εκκινητές να είναι 100% συμπληρωματικοί της αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί και να μην προσδένονται μη ειδικά σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος, κάτι που μπορεί να διασφαλισθεί τόσο με την κατάρτιση ενός κατάλληλου θερμοκρασιακού προγράμματος, όσο κυρίως με τη σωστή επιλογή των εκκινητών[160].

Οι προδιαγραφές που θα πρέπει να τηρούν οι ανιχνευτές υβριδισμού πρέπει επίσης να λαμβάνονται σοβαρά υπ' όψιν κατά τη σχεδίαση ενός πειράματος. Συγκεκριμένα, οι ανιχνευτές πρέπει να υβριδίζονται στον ίδιο κλώνο του PCR προϊόντος σε απόσταση 1-5 βάσεων μεταξύ τους, δεν πρέπει να περιέχουν επαναλαμβανόμενες, μονότονες ή συμπληρωματικές με τον εαυτό τους αλληλουχίες, συμπλέγματα από βάσεις G και C στα άκρα τους και αλληλουχίες πλούσιες σε βάσεις πουρίνης. Ακόμα, οι ανιχνευτές δε θα πρέπει να υβριδίζονται με τους εκκινητές και καλό θα ήταν να έχουν σημεία τήξης 5-10°C ψηλότερα από αυτούς. Το σημείο τήξης του ανιχνευτή που καλύπτει τη μετάλλαξη (mutation sencor probe) επιδιώκεται να είναι 5°C χαμηλότερο από αυτό του έτερου ανιχνευτή (ανιχνευτής πρόσδεσης-anchor probe). Όσον αφορά τέλος την αλληλουχία-στόχο των ανιχνευτών αυτή είναι προτιμότερο να είναι μια «ισορροπημένη» περιοχή, να περιλαμβάνει δηλαδή ίσες αναλογίες των τεσσάρων βάσεων και να μην είναι συμπληρωματική με τον εαυτό της, μονότονη ή επαναλαμβανόμενη[160].

Για την επιτυχή επιλογή εκκινητών και ανιχνευτών αξιοποιήθηκαν αφενός τα διαδικτυακά εργαλεία GenBank και Blast του NCBI (National Center of Biotechnology Information) και αφετέρου το λογισμικό CLC-Sequence Viewer (CLCbio, Δανία), που επιτρέπουν την καλύτερη οπτικοποίηση, σχεδιασμό και αξιολόγηση των αλληλουχιών και ειδικά για το *LOXL1* που διαθέτει μεγάλη ομολογία με το *LOX* και τα *LOX2-4* στην περιοχή που μας ενδιαφέρει.

### 5.12.2 Στατιστική επεξεργασία

Από στατιστικής σκοπιάς ένας πολυμορφισμός μπορεί να θεωρηθεί ως μία κατηγορική μεταβλητή με τρεις δυνατές τιμές (ομοζυγώτης φυσιολογικός, ετεροζυγώτης, ομοζυγώτης μεταλλαγμένος). Έτσι είναι δυνατόν να ελεγχθεί με στατιστικά μέτρα η συσχέτιση ενός SNP με μία νόσο.

Πριν από την εφαρμογή κάθε στατιστικής επεξεργασίας, πρέπει να γίνει έλεγχος για την καταλληλότητα του υπό εξέταση πληθυσμού, μέσω της ισορροπίας Hardy-Weinberg. Ο έλεγχος αυτός εκτιμά την ανεξαρτησία μεταξύ των αλληλίων που κληρονομούνται από τους γονείς, ακολουθεί $\chi^2$ κατανομή με 1 βαθμό ελευθερίας και έχει τύπο:

$$HW=\sum\frac{(O-E)^2}{E}$$

όπου O: η παρατηρούμενη συχνότητα των αλληλίων, E: η αναμενόμενη συχνότητα του αλληλίων με την υπόθεση ανεξαρτησίας στην κληρονόμηση.

Εφόσον επιβεβαιωθεί η υπόθεση της ανεξαρτησίας στη μεταβίβαση των αλληλίων, μπορεί να εξακολουθήσει η στατιστική ανάλυση. Συγκεκριμένα κατασκευάζεται πίνακας συνάφειας (contingency table) και εφαρμόζεται το τεστ $\chi^2$. Ο υπολογισμός του σχετικού λόγου συμπληρωματικών πιθανοτήτων OR (Odds Ratio) για κάθε γονότυπο συγκριτικά με το γονότυπο αναφοράς (ομοζυγώτες φυσιολογικοί) προϊδεάζει για το μέγεθος της υποκείμενης συσχέτισης.

Σε περίπτωση που χρειάζεται προσαρμογή του μοντέλου λόγω συγχυτικών παραγόντων χρησιμοποιούνται μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης, τα οποία εύκολα εκτιμούν την αλληλεπίδραση μεταξύ SNPs και άλλων παραγόντων. Ο γενικός τύπος της λογιστικής παλινδρόμησης είναι:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right)=\alpha+\beta G+\gamma Z$$

όπου: p η πιθανότητα εκδήλωσης της νόσου, G η κατηγορική μεταβλητή του πολυμορφισμού και Z η μεταβλητή που συνυπολογίζεται για την καλύτερη προσαρμογή του μοντέλου. Η εξίσωση αυτή περιλαμβάνει τρεις παραμέτρους (α,β,γ) που πρέπει να υπολογισθούν.

Ας πάρουμε για παράδειγμα τον πολυμορφισμό G153D, όπου το G αλλήλιο θεωρείται αλλήλιο κινδύνου. Ανάλογα με τον αριθμό των αλληλίων που χρειάζονται για τη μεταβολή του κινδύνου διακρίνονται 5 μοντέλα κληρονομικότητας:

- **Συνεπικρατές μοντέλο (Co-dominant model):** Είναι το πιο γενικό μοντέλο και επιτρέπει κάθε γονότυπος να προσδίδει έναν διαφορετικό και μη αθροιστικό κίνδυνο. Το μοντέλο αυτό συγκρίνει τους ετεροζυγώτες (He) και ομοζυγώτες μεταλλαγμένους (Va) προς τους ομοζυγώτες φυσιολογικούς και υπολογίζει δύο ORs αντίστοιχα. Ο τύπος που περιγράφει το μοντέλο είναι:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right)=\alpha+\beta_1 He+\beta_2 Va+\gamma Z$$

- **Επικρατές μοντέλο (Dominant model):** Στο μοντέλο αυτό ένα μόνο G αλλήλιο θεωρείται αρκετό για να μεταβάλλει το κίνδυνο, με αποτέλεσμα οι ετερόζυγοι και ομόζυγοι φυσιολογικοί να φέρουν τον ίδιο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου. Έτσι η σύγκριση γίνεται μεταξύ του συνόλου των G/G και G/A γονοτύπων (Do) προς τους A/A με βάση την εξίσωση:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right)=\alpha+\beta Do+\gamma Z$$

- **Υπολειπόμενο μοντέλο (Recessive model):** Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό δύο αντίγραφα του φυσιολογικού αλληλίου είναι απαραίτητα για τη μεταβολή του κινδύνου, με αποτέλεσμα οι γονότυποι G/G και G/A να έχουν την ίδια επίδραση. Ο συνδυασμός των G/G και G/A (Re) συγκρίνεται με το γονότυπο A/A με βάση την εξίσωση:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right)=\alpha+\beta Re+\gamma Z$$

- **Υπερ-επικρατές μοντέλο (Over-dominant model):** Το μοντέλο αυτό συγκρίνει τους ομοζυγώτες (G/G και A/A) με τους ετεροζυγώτες (G/A-He) με χρήση της εξίσωσης:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right)=\alpha+\beta He+\gamma Z$$

- **Αθροιστικό μοντέλο (Additive Model):** Το μοντέλο αυτό θεωρεί ότι κάθε αντίγραφο του G αλληλίου επιδρά στον κίνδυνο κατά τρόπο αθροιστικό, ώστε οι ομοζυγώτες φυσιολογικοί G/G να φέρουν διπλάσιο κίνδυνο από τους ετεροζυγώτες G/A. Έτσι η σύγκριση γίνεται μεταξύ του συνδυασμού των γονοτύπων G/G και G/A με βάρη 2 και 1 αντίστοιχα (Ad: 2G/G + 1TG/A) και του γονοτύπου A/A με τύπο:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right)=\alpha+\beta Ad+\gamma Z$$

Για την επιλογή του πλέον κατάλληλου μοντέλου κληρονομικότητας συγκρίνεται κάθε μοντέλο με το πιο γενικό (το συνεπικρατές) μέσω της εφαρμογής του ελέγχου λόγου πιθανοφάνειας (Likelihood Ratio Test- LRT). Το τεστ αυτό παρέχει ένα μέτρο της καταλληλότητας του μοντέλου (goodness of fit) και εκτιμά ποιό μοντέλο ταιριάζει καλύτερα

στο μελετούμενο σύνολο δεδομένων. Η εξίσωση που συγκρίνει το σκορ πιθανοφάνειας (likelihood score) δύο μοντέλων έχει ως εξής:

$$LR = 2*(lnL1-lnL2)$$

όπου L1 και L2 η πιθανοφάνεια (likelihood) των δύο μοντέλων που συγκρίνονται.

Ωστόσο, κάποιες φορές το LRT δεν αρκεί ώστε να επιλεγεί κάποιο μοντέλο εις βάρος κάποιου άλλου. Κριτήρια όπως το AIC (Akaike information) μπορεί να φανούν χρήσιμα σε τέτοιες περιπτώσεις. Το μοντέλο με τη μικρότερη τιμή AIC είναι αυτό που προτιμάται. Η AIC υπολογίζεται από τον τύπο:

$$AIC=-2logL + 2\#parameters$$

όπου L η πιθανοφάνεια (likelihood) του μοντέλου και #parameters ο αριθμός των παραμέτρων που συμπεριλαμβάνονται στο μοντέλο.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τα προγράμματα SPSS 16.0 (IBM, USA) και SNPStats[186].

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της γονοτύπωσης για τις ομάδες των ασθενών και των υγιών παρουσιάζονται στους **πίνακες 6.1** και **6.2** (παύλα: το δείγμα δεν ενισχύθηκε, ∄: δεν υπήρχε υπόλοιπο δείγμα προς εξέταση παρόλο που έγινε η συλλογή του) και στη συνέχεια συζητούνται τα αποτελέσματα για τους δύο πολυμορφισμούς.

**Πίνακας 6.1Α: Αποτελέσματα γονοτύπωσης για την ομάδα Ψ/Α.Σ (PEX). Για τον G153D πολυμορφισμό: G/G (ομοζυγώτης G), G/A (ετεροζυγώτης), A/A (ομοζυγώτης A). Για τον R141L πολυμορφισμό: G/G (ομοζυγώτης G), G/T (ετεροζυγώτης), T/T (ομοζυγώτης T), (amplifiable n=53 και amplifiable n=54 αντίστοιχα).**

| | LOXL1 G153D | LOXL1 R141L |
|---|---|---|
| **PEX1** | G/G | G/T |
| **PEX2** | G/G | G/G |
| **PEX3** | G/G | G/G |
| **PEX4** | G/A | G/G |
| **PEX5** | G/A | G/G |
| **PEX6** | G/A | G/G |
| **PEX7** | G/G | G/T |
| **PEX8** | G/G | G/G |
| **PEX9** | G/G | G/G |
| **PEX10** | G/G | G/G |
| **PEX11** | G/G | G/T |
| **PEX12** | G/G | G/G |
| **PEX13** | G/G | G/G |
| **PEX14** | G/G | T/T |
| **PEX15** | G/G | G/G |
| **PEX16** | - | - |
| **PEX17** | - | - |
| **PEX18** | G/G | G/G |
| **PEX19** | - | - |
| **PEX20** | - | - |
| **PEX21** | G/G | G/T |
| **PEX22** | G/G | G/T |
| **PEX23** | G/G | G/G |
| **PEX24** | G/G | G/T |
| **PEX25** | G/G | G/T |
| **PEX26** | G/G | G/G |
| **PEX27** | G/G | G/G |
| **PEX28** | G/G | G/G |
| **PEX29** | G/G | G/G |
| **PEX30** | G/G | G/T |
| **PEX31** | G/G | G/T |
| **PEX32** | G/A | G/G |
| **PEX33** | G/G | T/T |
| **PEX34** | G/A | G/G |
| **PEX35** | G/A | G/G |

| | | |
|---|---|---|
| **PEX36** | G/A | G/G |
| **PEX37** | G/A | G/G |
| **PEX38** | ∄ | |
| **PEX39** | G/A | G/G |
| **PEX40** | G/A | G/G |
| **PEX41** | G/A | G/T |
| **PEX42** | G/G | G/G |
| **PEX43** | G/G | G/T |
| **PEX44** | G/A | G/G |
| **PEX45** | G/G | G/T |
| **PEX46** | G/G | G/G |
| **PEX47** | G/A | G/G |
| **PEX48** | - | - |
| **PEX49** | G/G | G/G |
| **PEX50** | - | - |
| **PEX51** | - | - |
| **PEX52** | G/G | G/T |
| **PEX53** | - | - |
| **PEX54** | ∄ | |
| **PEX55** | - | - |
| **PEX56** | - | - |
| **PEX57** | ∄ | |
| **PEX58** | - | - |
| **PEX59** | G/A | G/G |
| **PEX60** | - | - |
| **PEX61** | G/A | G/T |
| **PEX62** | G/G | G/T |
| **PEX63** | G/G | G/T |
| **PEX64** | - | G/G |
| **PEX65** | G/G | G/T |
| **PEX66** | G/A | G/T |
| **PEX67** | G/G | G/T |
| **PEX68** | G/G | G/G |
| **PEX69** | - | - |
| **PEX70** | - | - |
| **PEX71** | - | - |
| **PEX72** | G/A | G/G |

**Πίνακας 6.1Β: Αποτελέσματα γονοτύπωσης για την ομάδα Ψ/Α.Γ (PEXG). Για τον G153D πολυμορφισμό: G/G (ομοζυγώτης G), G/A (ετεροζυγώτης), A/A (ομοζυγώτης A). Για τον R141L πολυμορφισμό: G/G (ομοζυγώτης G), G/T (ετεροζυγώτης), T/T (ομοζυγώτης T), (amplifiable n=70 και amplifiable n=70 αντίστοιχα).**

| | **LOXL1 G153D** | **LOXL1 R141L** |
|---|---|---|
| **PEXG1** | G/G | G/G |
| **PEXG2** | G/G | G/G |
| **PEXG3** | G/G | G/G |
| **PEXG4** | G/G | G/G |
| **PEXG5** | G/G | G/T |
| **PEXG6** | G/G | G/G |
| **PEXG7** | G/G | G/G |
| **PEXG8** | G/G | G/G |
| **PEXG9** | G/G | G/G |
| **PEXG10** | G/G | G/G |
| **PEXG11** | - | - |

| | | |
|---|---|---|
| **PEXG12** | - | - |
| **PEXG13** | - | - |
| **PEXG14** | - | - |
| **PEXG15** | - | - |
| **PEXG16** | - | - |
| **PEXG17** | G/G | G/G |
| **PEXG18** | G/G | G/G |
| **PEXG19** | G/G | G/G |
| **PEXG20** | G/G | G/G |
| **PEXG21** | G/G | G/G |
| **PEXG22** | G/G | G/T |
| **PEXG23** | G/G | G/T |
| **PEXG24** | G/G | G/G |
| **PEXG25** | G/G | G/G |
| **PEXG26** | G/G | G/G |
| **PEXG27** | G/G | G/G |
| **PEXG28** | G/G | G/G |
| **PEXG29** | G/G | G/T |
| **PEXG30** | G/G | G/T |
| **PEXG31** | G/G | G/T |
| **PEXG32** | G/A | G/G |
| **PEXG33** | G/A | G/G |
| **PEXG34** | G/A | G/G |
| **PEXG35** | G/G | T/T |
| **PEXG36** | G/A | G/G |
| **PEXG37** | G/A | G/G |
| **PEXG38** | G/A | G/G |
| **PEXG39** | G/G | G/T |
| **PEXG40** | G/G | G/T |
| **PEXG41** | G/A | G/G |
| **PEXG42** | G/A | G/G |
| **PEXG43** | G/A | G/G |
| **PEXG44** | G/A | G/G |
| **PEXG45** | G/G | G/G |
| **PEXG46** | G/G | G/T |
| **PEXG47** | G/A | G/G |
| **PEXG48** | G/G | G/T |
| **PEXG49** | G/A | G/G |
| **PEXG50** | G/A | G/G |
| **PEXG51** | G/G | G/G |
| **PEXG52** | G/G | G/G |
| **PEXG53** | - | - |
| **PEXG54** | G/G | G/G |
| **PEXG55** | G/G | G/G |
| **PEXG56** | G/G | G/G |
| **PEXG57** | G/G | G/G |
| **PEXG58** | - | - |
| **PEXG59** | G/A | G/G |
| **PEXG60** | ∄ | |
| **PEXG61** | - | - |
| **PEXG62** | - | - |
| **PEXG63** | ∄ | |
| **PEXG64** | G/A | G/G |
| **PEXG65** | G/A | G/G |

| | | |
|---|---|---|
| **PEXG66** | G/G | G/G |
| **PEXG67** | - | - |
| **PEXG68** | G/A | G/G |
| **PEXG69** | G/G | G/G |
| **PEXG70** | G/A | G/G |
| **PEXG71** | ∄ | |
| **PEXG72** | G/G | G/G |
| **PEXG73** | G/G | G/T |
| **PEXG74** | G/A | G/G |
| **PEXG75** | ∄ | |
| **PEXG76** | G/G | G/T |
| **PEXG77** | G/G | G/T |
| **PEXG78** | G/G | G/G |
| **PEXG79** | G/G | G/G |
| **PEXG80** | G/G | G/G |
| **PEXG81** | G/G | G/G |
| **PEXG82** | G/G | G/G |
| **PEXG83** | G/G | G/G |
| **PEXG84** | G/G | G/G |
| **PEXG85** | G/G | - |
| **PEXG86** | G/G | G/G |

**Πίνακας 6.2Α: Αποτελέσματα γονοτύπωσης για την ομάδα υγειών μαρτύρων (CONTROLS). Για τον G153D πολυμορφισμό: G/G (ομοζυγώτης G), G/A (ετεροζυγώτης), A/A (ομοζυγώτης A). Για τον R141L πολυμορφισμό: G/G (ομοζυγώτης G), G/T (ετεροζυγώτης), T/T (ομοζυγώτης T), (amplifiable n=100 και amplifiable n=96 αντίστοιχα).**

| | **LOXL1 G153D** | **LOXL1 R141L** |
|---|---|---|
| **C 1** | G/G | G/G |
| **C 2** | G/G | G/T |
| **C 3** | G/G | G/T |
| **C 4** | G/G | - |
| **C 5** | G/G | G/T |
| **C 6** | G/G | G/T |
| **C 7** | G/G | T/T |
| **C 8** | G/G | G/T |
| **C 9** | G/A | G/G |
| **C10** | G/A | G/G |
| **C11** | G/G | G/G |
| **C12** | G/G | G/T |
| **C13** | G/A | G/G |
| **C14** | G/A | G/G |
| **C15** | G/G | G/T |
| **C16** | G/G | T/T |
| **C17** | A/A | G/T |
| **C18** | G/A | G/G |
| **C19** | G/A | G/G |
| **C20** | ∄ | |
| **C21** | G/A | G/G |
| **C22** | G/G | T/T |
| **C23** | G/G | G/T |

| | | |
|---|---|---|
| **C24** | - | - |
| **C25** | G/G | G/T |
| **C26** | G/G | G/G |
| **C27** | - | - |
| **C28** | G/G | G/G |
| **C29** | G/G | - |
| **C30** | G/G | G/G |
| **C31** | G/A | G/G |
| **C32** | G/G | G/G |
| **C33** | G/A | G/T |
| **C34** | G/A | G/G |
| **C35** | G/G | G/T |
| **C36** | G/G | G/T |
| **C37** | G/A | G/G |
| **C38** | G/A | G/G |
| **C39** | G/G | G/G |
| **C40** | G/A | G/T |
| **C41** | G/A | G/G |
| **C42** | G/G | G/G |
| **C43** | G/G | - |
| **C44** | G/G | G/T |
| **C45** | G/G | - |
| **C46** | G/G | - |
| **C47** | G/G | - |
| **C48** | G/G | G/T |
| **C49** | G/G | G/T |
| **C50** | G/A | G/T |
| **C51** | G/G | G/T |
| **C52** | G/G | G/G |
| **C53** | G/G | G/T |
| **C54** | G/G | T/T |
| **C55** | G/A | G/T |
| **C56** | - | - |
| **C57** | G/A | G/T |
| **C58** | G/G | G/G |
| **C59** | - | - |
| **C60** | G/G | G/G |
| **C61** | G/A | G/G |
| **C62** | - | - |
| **C63** | G/G | T/T |
| **C64** | G/A | G/G |
| **C65** | - | - |
| **C66** | G/G | G/T |
| **C67** | G/G | G/T |
| **C68** | - | - |
| **C69** | A/A | G/G |
| **C70** | G/A | G/G |
| **C71** | G/G | G/T |
| **C72** | G/A | G/G |
| **C73** | - | - |
| **C74** | G/A | G/G |
| **C75** | G/A | G/G |
| **C76** | G/A | G/G |
| **C77** | G/A | G/G |

| | | |
|---|---|---|
| **C78** | G/G | G/T |
| **C79** | - | - |
| **C80** | ∄ | |
| **C81** | G/A | G/G |
| **C82** | G/G | G/T |
| **C83** | G/A | G/G |
| **C84** | G/A | G/G |
| **C85** | G/A | G/G |
| **C86** | G/G | G/T |
| **C87** | G/G | - |
| **C88** | - | - |
| **C89** | A/A | G/G |
| **C90** | - | - |
| **C91** | G/A | G/T |
| **C92** | G/A | G/G |
| **C93** | G/A | G/G |
| **C94** | - | - |
| **C95** | G/A | G/G |
| **C96** | A/A | G/G |
| **C97** | G/A | G/G |
| **C98** | G/A | G/T |
| **C99** | G/A | G/T |
| **C100** | - | G/G |
| **C101** | - | - |
| **C102** | G/G | G/T |
| **C103** | - | - |
| **C104** | G/G | G/T |
| **C105** | - | G/G |
| **C106** | G/A | G/T |
| **C107** | G/A | G/G |
| **C108** | G/A | G/G |
| **C109** | - | G/G |
| **C110** | G/G | G/T |
| **C111** | G/A | G/G |
| **C112** | G/G | G/T |
| **C113** | G/G | G/T |
| **C114** | G/A | G/T |
| **C115** | G/A | G/G |
| **C116** | G/A | G/G |
| **C117** | G/A | G/T |
| **C118** | G/G | G/T |
| **C119** | G/A | G/G |
| **C120** | ∄ | |
| **C121** | ∄ | |
| **C122** | ∄ | |
| **C123** | ∄ | |

**Πίνακας 6.2Β: Αποτελέσματα γονοτύπωσης για την ομάδα με ΠΓΑΓ (POAG). Για τον G153D πολυμορφισμό: G/G (ομοζυγώτης G), G/A (ετεροζυγώτης), A/A (ομοζυγώτης A). Για τον R141L πολυμορφισμό: G/G (ομοζυγώτης G), G/T (ετεροζυγώτης), T/T (ομοζυγώτης T), (amplifiable n=62 και amplifiable n=63 αντίστοιχα).**

| | LOXL1 G153D | LOXL1 R141L |
|---|---|---|
| **POAG1** | G/G | G/T |
| **POAG2** | G/G | G/T |
| **POAG3** | G/G | G/G |
| **POAG4** | G/G | G/G |
| **POAG5** | G/A | G/G |
| **POAG6** | G/G | T/T |
| **POAG7** | G/A | G/G |
| **POAG8** | G/A | G/T |
| **POAG9** | G/G | G/G |
| **POAG10** | G/G | G/G |
| **POAG11** | G/G | G/T |
| **POAG12** | G/A | G/G |
| **POAG13** | G/G | G/T |
| **POAG14** | G/A | G/G |
| **POAG15** | G/G | G/T |
| **POAG16** | G/G | G/G |
| **POAG17** | G/G | G/T |
| **POAG18** | G/G | T/T |
| **POAG19** | G/A | G/G |
| **POAG20** | G/G | G/G |
| **POAG21** | G/G | G/T |
| **POAG22** | G/A | G/T |
| **POAG23** | G/G | G/G |
| **POAG24** | G/A | G/G |
| **POAG25** | G/A | G/T |
| **POAG26** | G/A | G/T |
| **POAG27** | G/A | G/G |
| **POAG28** | G/G | G/G |
| **POAG29** | - | - |
| **POAG30** | G/G | G/G |
| **POAG31** | G/A | G/T |
| **POAG32** | G/G | G/T |
| **POAG33** | G/G | G/G |
| **POAG34** | G/A | G/G |
| **POAG35** | G/A | G/G |
| **POAG36** | G/G | G/T |
| **POAG37** | G/G | G/G |
| **POAG38** | G/G | G/G |
| **POAG39** | G/G | G/T |
| **POAG40** | G/G | G/T |
| **POAG41** | G/A | G/G |
| **POAG42** | G/A | G/T |
| **POAG43** | G/G | G/T |
| **POAG44** | G/G | G/T |
| **POAG45** | G/G | T/T |
| **POAG46** | G/G | G/G |
| **POAG47** | G/G | G/G |

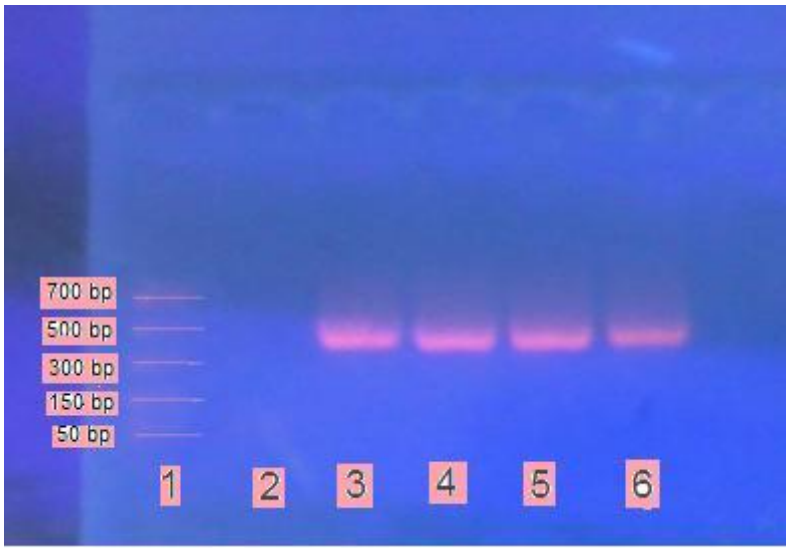
| | | |
|---|---|---|
| **POAG48** | G/G | G/T |
| **POAG49** | G/G | G/T |
| **POAG50** | G/G | G/G |
| **POAG51** | - | - |
| **POAG52** | G/G | G/G |
| **POAG53** | G/G | G/G |
| **POAG54** | G/G | T/T |
| **POAG55** | G/G | G/T |
| **POAG56** | - | - |
| **POAG57** | - | - |
| **POAG58** | - | - |
| **POAG59** | G/G | G/G |
| **POAG60** | G/G | G/T |
| **POAG61** | - | - |
| **POAG62** | - | - |
| **POAG63** | - | - |
| **POAG64** | - | - |
| **POAG65** | - | - |
| **POAG66** | G/G | G/T |
| **POAG67** | ∄ | |
| **POAG68** | - | - |
| **POAG69** | G/G | G/G |
| **POAG70** | G/G | G/G |
| **POAG71** | G/G | G/T |
| **POAG72** | G/G | G/G |
| **POAG73** | G/G | G/G |
| **POAG74** | G/G | G/G |
| **POAG75** | G/G | T/T |

Παρατηρώντας τους πίνακες πρέπει να αναφερθεί ότι: το κόκκινο χρώμα τονίζει τους ομοζυγώτες T/T και A/A (T και A αλλήλια προστατευτικά με βάση την βιβλιογραφία) και η σήμανση των δειγμάτων με κίτρινο χρώμα δείχνει τον αριθμό των δειγμάτων με γονότυπο G/G (G αλλήλιο κινδύνου) στον ένα ή και στους δύο πολυμορφισμούς στις ομάδες ασθενών. Στην ομάδα Ψ/Α.Σ (PEX) υπάρχουν μόνο τρία δείγματα από τα 54 με γονότυπους G/A και G/T (ταυτόχρονα) στους πολυμορφισμούς G153D και R141L αντίστοιχα για τα οποία δεν εξηγείται το σύνδρομο. Δηλαδή εξηγείται σε ποσοστό δειγμάτων 94% έναντι του 6% . Στην ομάδα Ψ/Α.Γ (PEXG) το νόσημα εξηγείται για όλα τα δείγματα (100%).

## 6.1 Αποτελέσματα για τους πολυμορφισμούς G153D και R141L

Σύμφωνα με το πρόγραμμα Mutation taster αυτές οι αλλαγές (G153D και R141L) δεν προβλέπεται να έχουν παθογνωμική αξία σαν αλλαγές αμινοξέων, άρα πρόκειται για πολυμορφισμούς (R141L: score=2,78, p=0,73, G153D: score=2,56, p=0,023). Η PCR

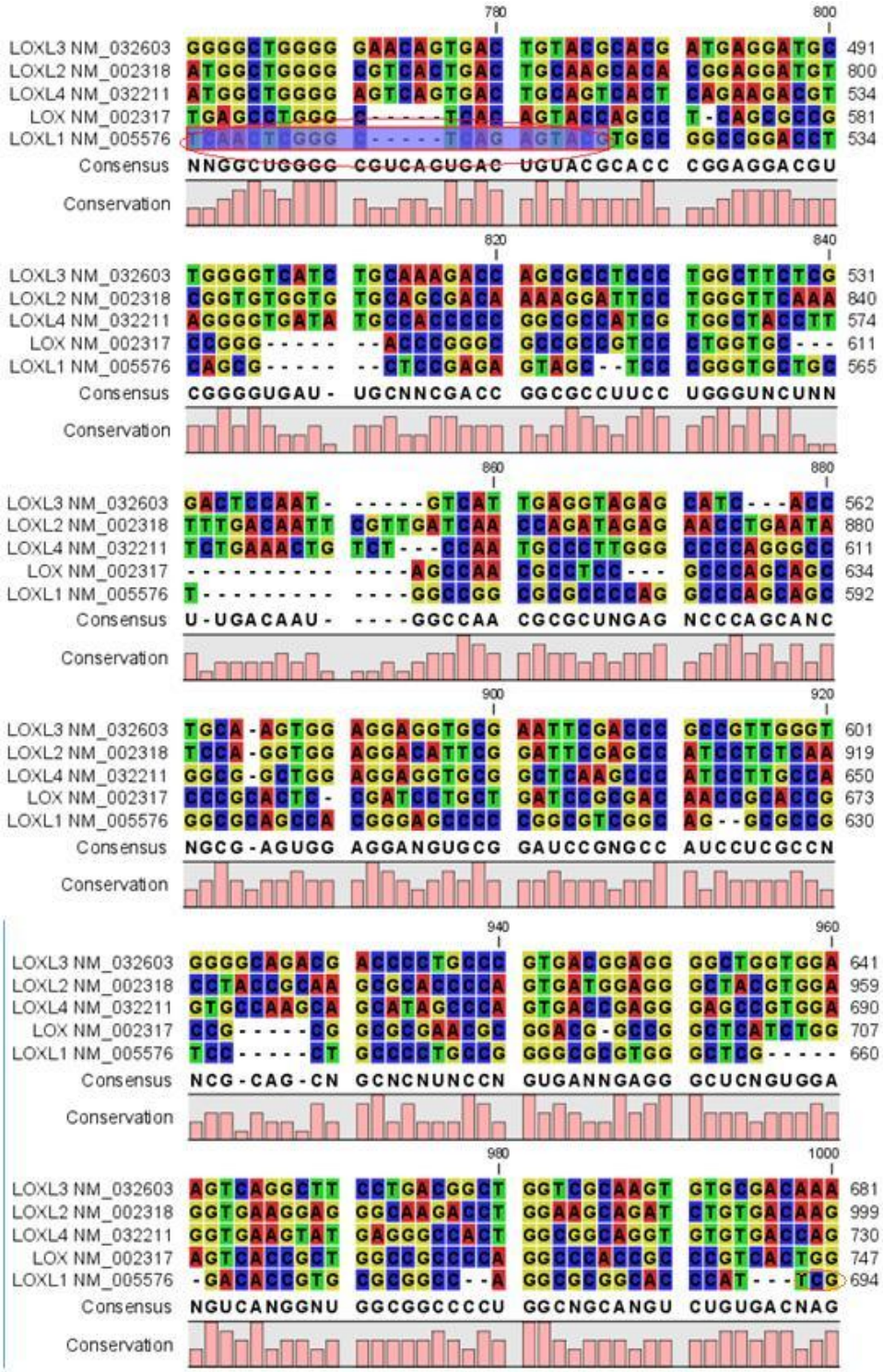
πραγματικού χρόνου για το *LOXL1* με το πρωτόκολλο και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που αναφέρθηκε, οδήγησε σε ενίσχυση γονιδιακού τμήματος 453 bp, χωρίς παραπροϊόντα, όπως επιβεβαιώθηκε μετά από αναστροφή των τριχοειδών μετά το πέρας της αντίδρασης και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (**εικόνα 6.1**).

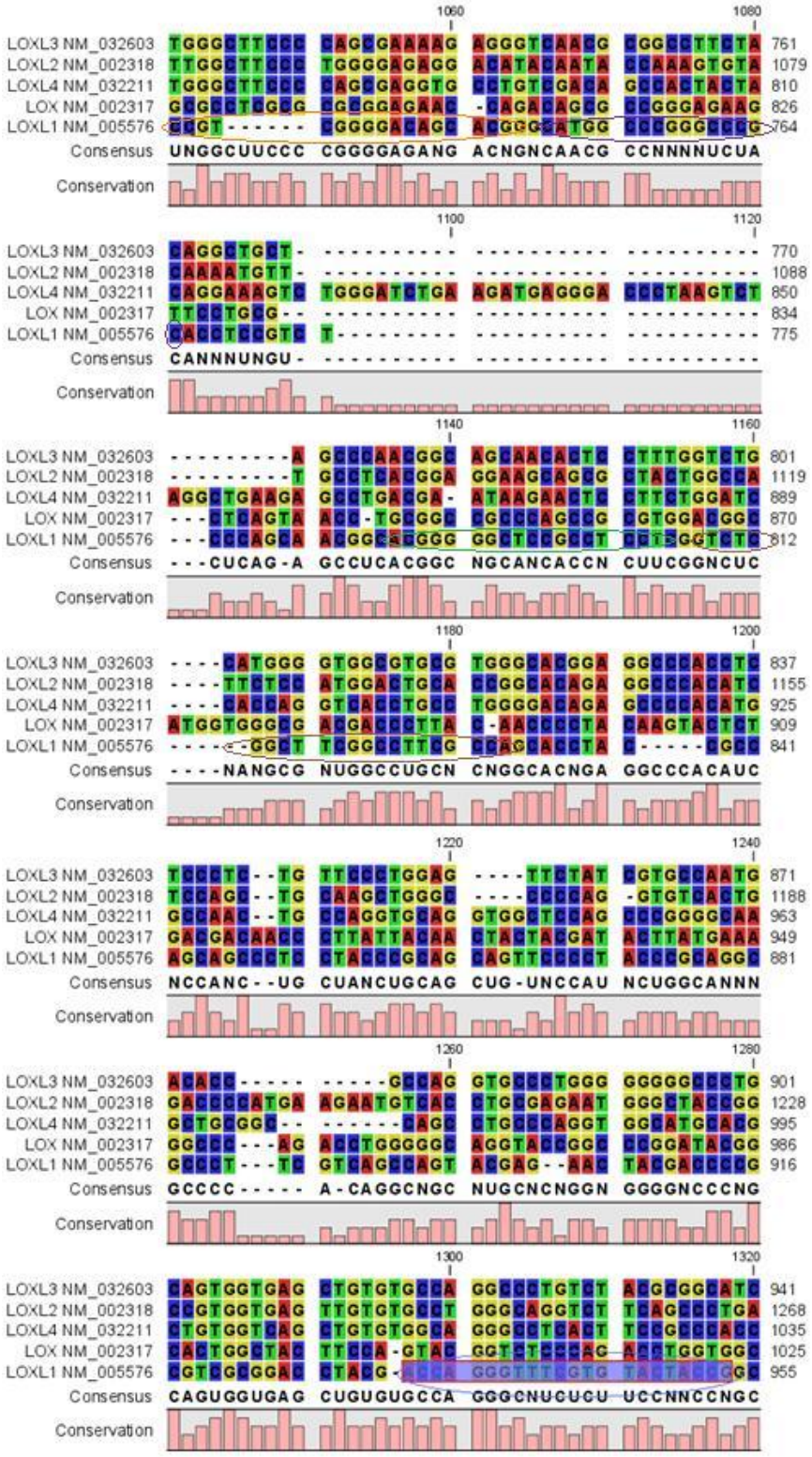



**Εικόνα 6.1: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. 1) δείκτης μοριακών βαρών (marker) 2) τυφλό δείγμα (blank) 3-6) δείγματα.**

Για την κατάλληλη επιλογή εκκινητών και ανιχνευτών και για να εξεταστεί η πιθανότητα οποιαδήποτε ενίσχυσης με τα ομόλογα του *LOXL* γονίδια, έγινε στοίχιση (alignment) του *LOXL1* με τα *LOXL, LOXL2, LOXL3, LOXL4.* Έτσι επελέγησαν εκκινητές και ανιχνευτές όσο το δυνατόν πιο ειδικοί. Στην παρακάτω **εικόνα 6.2** βλέπουμε το alignment των γονιδίων *LOXL1* (ref NM_005576), *LOX* (ref NM_002317), *LOXL2* (ref NM_002318), *LOXL3* (ref NM_032603) και *LOXL4* (ref NM_032211).

Οι διάφορες βάσεις παρουσιάζονται με διαφορετικά χρώματα για καλύτερη οπτικοποίηση, ενώ ο βαθμός συμφωνίας (consensus) μεταξύ των πέντε αλληλουχιών αποδίδεται αναλογικά με τις ροζ στήλες κάτω από τις αλληλουχίες. Με κόκκινο κύκλο σημειώνεται ο πρόσθιος εκκινητής και με μπλε ο ανάστροφος εκκινητής. Με πορτοκαλί ο R141L-FL, με μωβ ο R141-LC, με πράσινο ο G153-FL και με καφέ ο G153D-LC ανιχνευτής.


LOXL3 NM_032603
LOXL2 NM_002318
LOXL4 NM_032211
LOX NM_002317
LOXL1 NM_005576
Consensus
Conservation

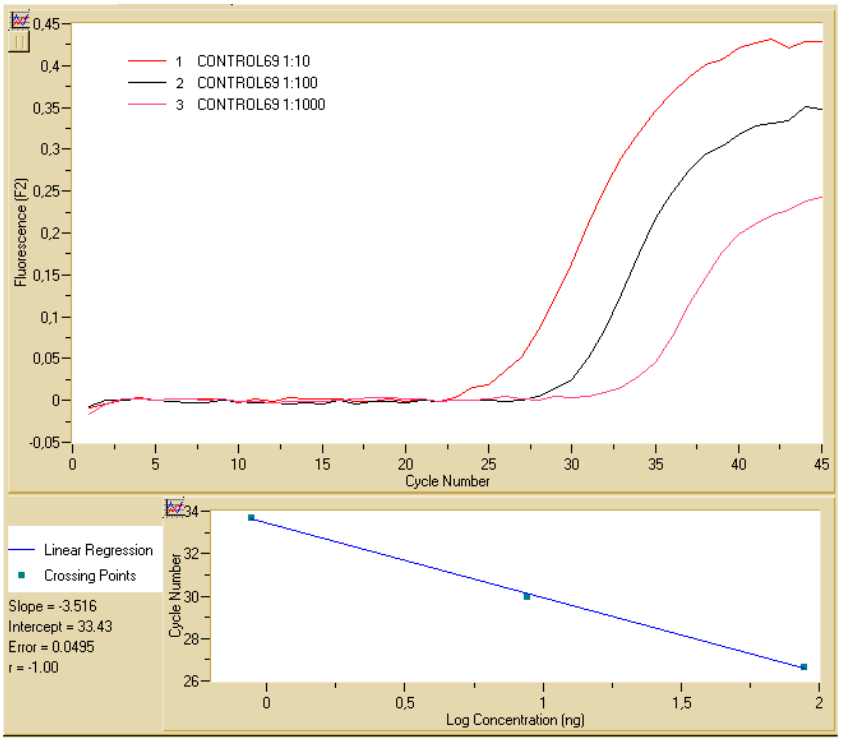



**Εικόνα 6.2: Στοίχιση (alignment) των γονιδίων *LOXL, LOXL1, LOXL2, LOXL3* και *LOXL4* (CLC-Sequence Viewer, CLCbio, Δανία).**

Κατόπιν βελτιστοποιήσεων, κατέστη σαφές ότι το σήμα φθορισμού ήταν ισχυρότερο με εφαρμογή ασύμμετρης PCR και έτσι ο πρόσθιος εκκινητής προστίθετο σε αναλογία 4:1 ως προς τον ανάστροφο. Όπως είναι κατανοητό, η προσθήκη περίσσειας του πρόσθιου εκκινητή είχε ως αποτέλεσμα τη σύνθεση περίσσειας της συμπληρωματικής του αλυσίδας, στην οποία και προσδένονταν οι ανιχνευτές υβριδοποίησης. Κατ' επέκταση το σήμα φθορισμού που προέκυπτε στο στάδιο του υβριδισμού ήταν μεγαλύτερο καθώς και η αναλυτική ευαισθησία ήταν καλύτερη. Επίσης, όλα τα δείγματα αραιώθηκαν 1:5 όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο 5. Πολύ καθοριστική υπήρξε η προσθήκη DMSO στην αντίδραση καθώς χωρίς αυτό δεν υπήρχε πολλαπλασιασμός. Μετά από δοκιμή DMSO σε τελικές συγκεντρώσεις 6%, 10% και 15% επιλέχθηκε η συγκέντρωση 6%. Η βελτιστοποίηση της [$Mg^{2+}$] με 3, 4, 5 και 6 nM τελική συγκέντρωση δεν έδωσαν διαφορές. Προτιμήθηκε ως τελική [$Mg^{2+}$] η 4 nM.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα διαμορφώθηκε ύστερα από διαδοχικές βελτιστοποιήσεις. Μετά από σειρά αλλαγών στη θερμοκρασία υβριδισμού (55°C, 58°C, 60°C) κατά την ενίσχυση και στο δεύτερο θερμοκρασιακό στάδιο της τήξης βρέθηκε ότι οι ιδανικότερες θερμοκρασίες ήταν στους 58°C και 45°C αντίστοιχα με το πρόγραμμα της συνδυασμένης γονοτύπωσης (combined) και 60°C και 45°C αντίστοιχα όταν ανιχνεύονταν ξεχωριστά (modified). Ο ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας κατά την τήξη επιλέχθηκε 0,5°C/sec και με τα δύο προγράμματα ενώ με το πρόγραμμα melting όπου γίνεται μόνο ανάλυση καμπυλών τήξης επιλέχθηκε 0,3°C/sec στην περίπτωση των δέκα δειγμάτων και 0,7°C/sec στην περίπτωση λιγότερων δειγμάτων.

Καθώς οι ανιχνευτές είναι απόλυτα ειδικοί για το αλληλόμορφο A στον πολυμορφισμό G153D για τον σχεδιασμό καμπύλης αναφοράς της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις δείγματος ομοζυγώτη A/A, ανιχνευθέντος με Lightcycler (και με τα δύο προγράμματα combined και modified) και επιβεβαιωμένου με DNA Sequencing. Η αρχική συγκέντρωση του δείγματος σε DNA, η οποία μετρήθηκε με το φθορισμόμετρο Qubit, ήταν 876,3 ng/μL. Οι μετρήσεις έγιναν μόνο παρουσία των ανιχνευτών για τον G153D στο κανάλι F2. Το όριο ανίχνευσης (LOD:Limit Of Detection) ήταν η αραίωση 1:1000 (0,8663 ng/μL), καθώς ανιχνεύθηκε σε 4/5 προσπάθειες (80%). Η κλίση της καμπύλης αναφοράς βρέθηκε -3,516 και η απόδοση της καμπύλης ήταν 1,92 (n=3).



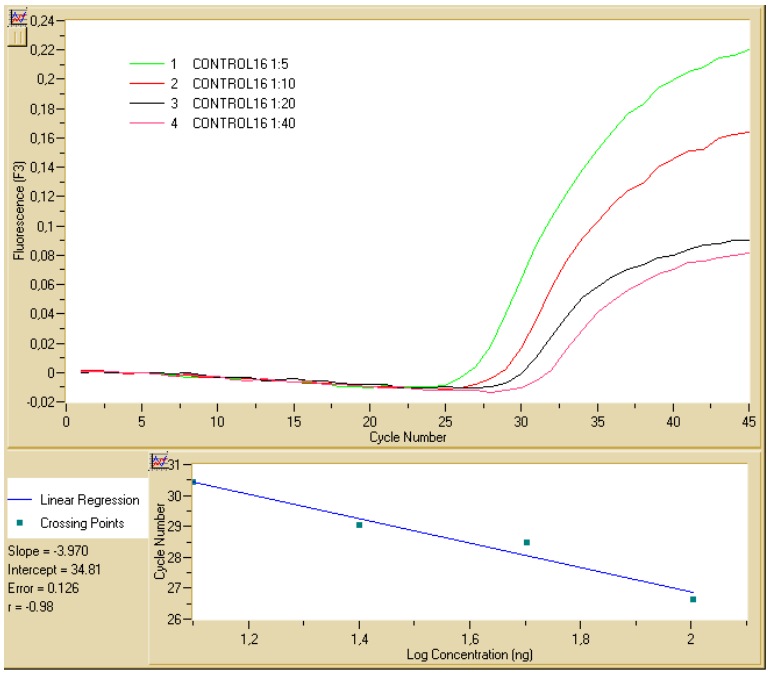

**Εικόνα 6.3: Καμπύλη αναφοράς για την αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου για τον πολυμορφισμό G153D στο κανάλι F2. Επάνω φαίνεται η ενίσχυση του γνωστού δείγματος ομοζυγώτη (A/A) (C69) και των διαδοχικών αραιώσεων του (C69 1:10, C69 1:100, C69 1:1000). Κάτω η καμπύλη αναφοράς με κλίση -3,516.**

Η επαναληψιμότητα της ποσοτικοποίησης ελέγχθηκε με ενίσχυση τριών δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης ($C_1$:87,63 ng/μL, $C_2$:8,763 ng/μL, $C_3$:0,8763 ng/μL) εις τριπλούν (n=3) στην ίδια αντίδραση (within-run precision) με μέση τιμή (x) των Cq ($Cq_1$=26,66, $Cq_2$=29,99, $Cq_3$=33,69) και συντελεστής διακύμανσης (CV) των Cq κάτω του 2,5%.

Η αναπαραγωγιμότητα με ενίσχυση δείγματος ομοζυγώτη A/A σε διαφορετικές αντιδράσεις (between-run precision) και σε διαφορετικές μέρες ελέγχθηκε με μέση τιμή των Cq=28,69 (<2,5%) και μέση τιμή Tm=68,25 $^0$C (CV<2,5%), δείγματος ετεροζυγώτη G/A με μέση τιμή των Cq=29,87 (<2,5%) και μέση τιμή Tm=67,22 (CV<2,5%) αλληλίου A και δείγματος ομοζυγώτη G/G με μέση τιμή των Cq=32,00 (<2,5%) και μέση τιμή Tm=61,91 $^0$C (CV<2,5%) αλληλίου G. Η διαφορά στις μέσες τιμές των Tm των δύο αλληλίων G και A ήταν ΔTm=6,34 $^0$C.

Για το σχεδιασμό καμπύλης αναφοράς της αντίδρασης για τον πολυμορφισμό R141L χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις δείγματος ομοζυγώτη A/A, επιβεβαιωμένου με Lightcycler (με προγράμματα combined και modified) και με DNA Sequencing. Η αρχική συγκέντρωση του δείγματος σε DNA, η οποία μετρήθηκε με το φθορισμόμετρο Qubit, ήταν

504 ng/μL. Οι μετρήσεις έγιναν μόνο παρουσία των ανιχνευτών για τον R141L στο κανάλι F3. Το όριο ανίχνευσης (LOD:Limit Of Detection) ήταν η αραίωση 1:320 (1,6 ng/μL), καθώς ανιχνεύθηκε σε 4/5 προσπάθειες (80%). Η κλίση της καμπύλης αναφοράς βρέθηκε -3,970 και η αποδοτικότητα της καμπύλης ήταν 1,79 (n=3) .

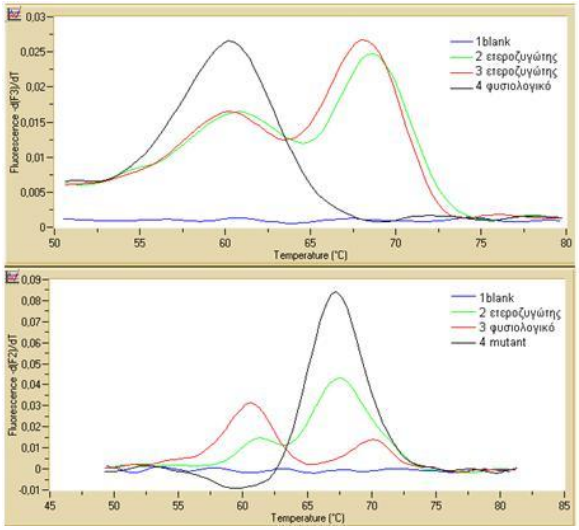



**Εικόνα 6.4: Καμπύλη αναφοράς για την αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου για τον πολυμορφισμό R141L στο κανάλι F3. Επάνω φαίνεται η ενίσχυση του γνωστού δείγματος ομοζυγώτη A/A (C16) και των διαδοχικών αραιώσεων του (C16 1:5, C16 1:10, C16 1:20, C16 1:40). Κάτω η καμπύλη αναφοράς με κλίση -3,970.**

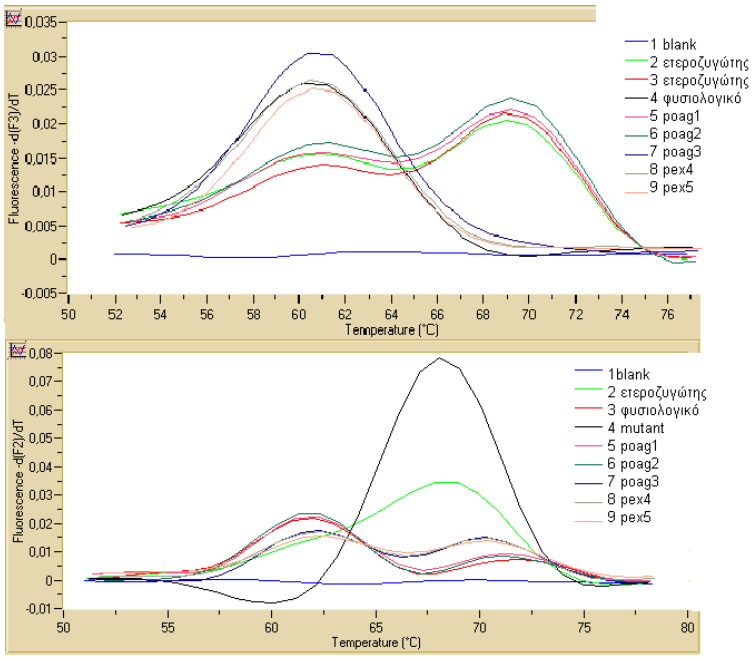
Η επαναληψιμότητα της ποσοτικοποίησης ελέγχθηκε με ενίσχυση τεσσάρων δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης ($C_1$:100,8 ng/μL, $C_2$:50,4 ng/μL, $C_3$:25,2 ng/μL, $C_4$:12,6 ng/μL) εις τριπλούν (n=3) στην ίδια αντίδραση (within-run precision) με μέση τιμή (x) των Cq ($Cq_1$=26,65, $Cq_2$=28,47, $Cq_3$=29,05 $Cq_4$=30,44) και συντελεστή διακύμανσης (CV) των Cq βρέθηκε κάτω του 2,5%.

Η αναπαραγωγιμότητα με ενίσχυση δείγματος ομοζυγώτη T/T σε διαφορετικές αντιδράσεις (between-run precision) και σε διαφορετικές μέρες ελέγχθηκε με μέση τιμή των Cq=27,42 (<2,5%) και μέση τιμή Tm=69,54 $^0$C (CV<2,5%), δείγματος ετεροζυγώτη G/T με μέση τιμή των Cq=28,85 (<2,5%) και μέση τιμή Tm=68,63 $^0$C (CV<2,5%) αλληλίου T και δείγματος ομοζυγώτη G/G με μέση τιμή των Cq=31,27 (<2,5%) και μέση τιμή Tm=62,28 $^0$C (CV<2,5%) αλληλίου G. Η διαφορά στις μέσες τιμές των Tm των δύο αλληλίων G και A ήταν ΔTm=7,26 $^0$C.

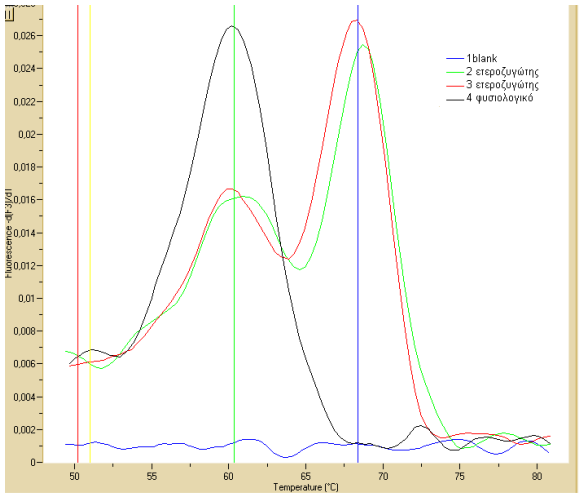
Η ανάλυση καμπύλων τήξης για τους δύο πολυμορφισμούς με τα δύο προγράμματα φαίνονται παρακάτω:



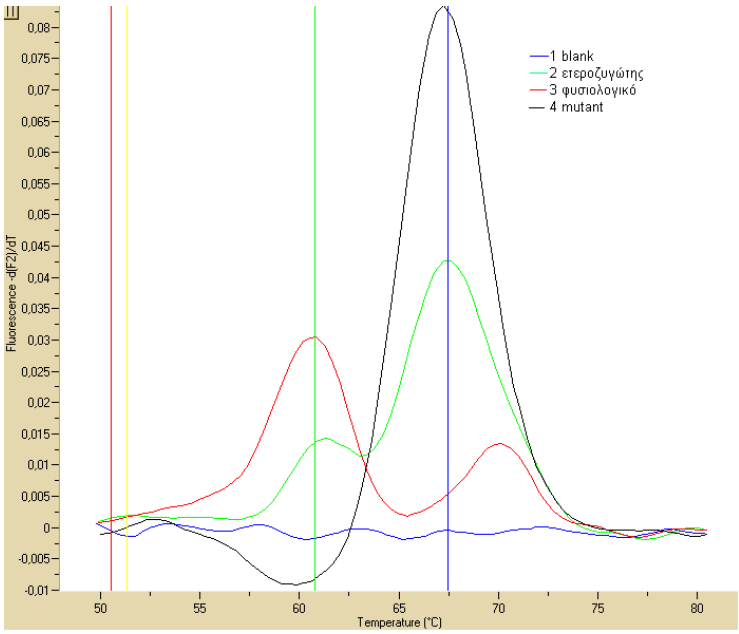

**Εικόνα 6.5: Ανάλυση καμπύλων τήξεως με συνδυασμένη γονοτύπωση (πρόγραμμα combined) στην πάνω εικόνα για τον πολυμορφισμό R141L στο κανάλι F3, για δύο ετεροζυγώτες G/T και έναν ομοζυγώτη G/G και στην κάτω εικόνα για πολυμορφισμό G153D στο κανάλι F2, για έναν ετεροζυγώτη G/A, για έναν ομοζυγώτη G/G και έναν ομοζυγώτη A/A.**



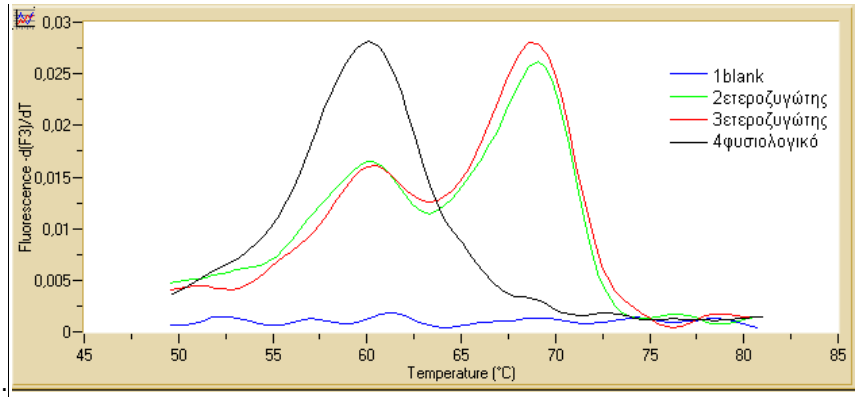

**Εικόνα 6.6: Παράδειγμα ανάλυσης καμπύλων τήξεως με συνδυασμένη γονοτύπωση (πρόγραμμα combined) στην πάνω εικόνα για τον πολυμορφισμό R141L στο κανάλι F3 και στην κάτω εικόνα για τον πολυμορφισμό G153D στο κανάλι F2 σε δείγματα ασθενών.**



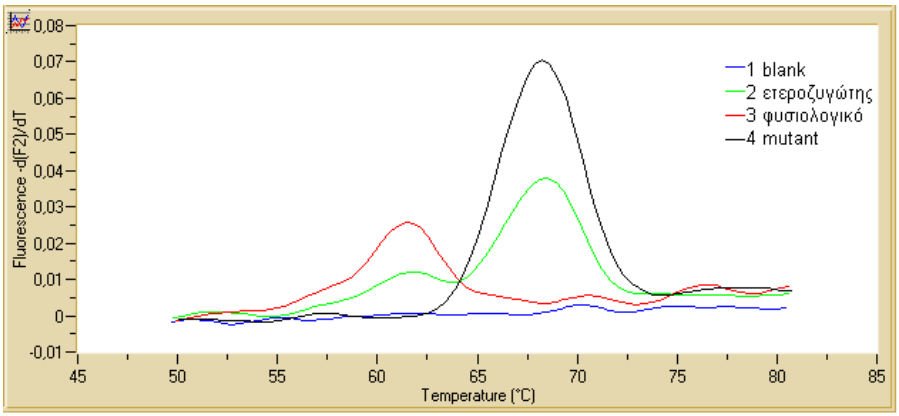

**Εικόνα 6.7: Θερμοκρασίες τήξης για τον πολυμορφισμό R141L στο κανάλι F3 με συνδυασμένη γονοτύπωση (πρόγραμμα combined).**



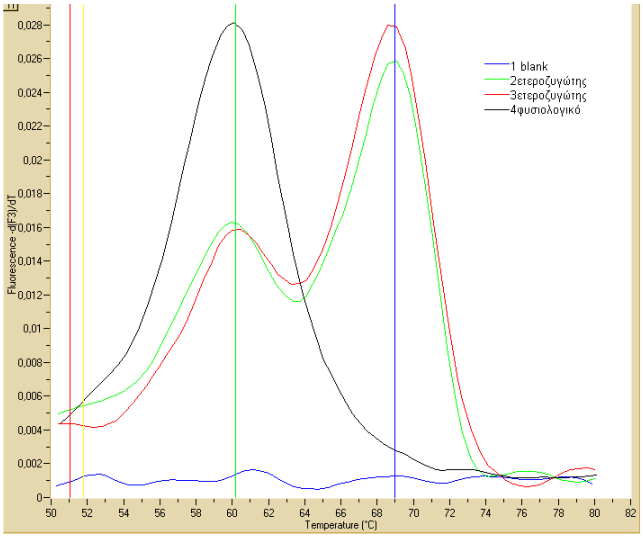

**Εικόνα 6.8: Θερμοκρασίες τήξης για τον πολυμορφισμό G153D στο κανάλι F2 με συνδυασμένη γονοτύπωση (πρόγραμμα combined).**



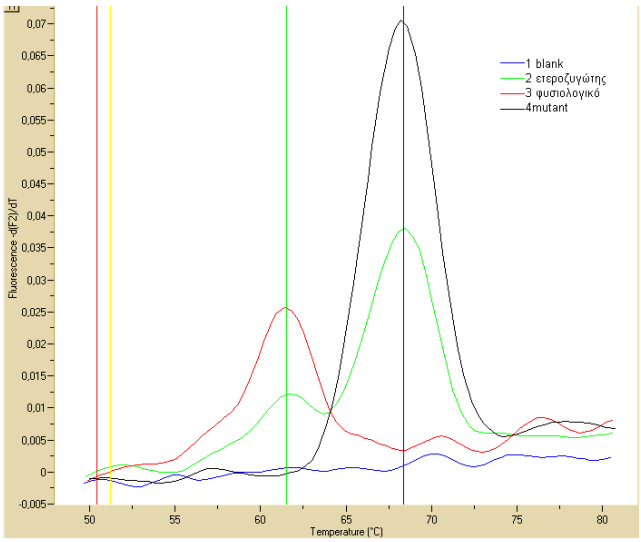

**Εικόνα 6.9: Ανάλυση καμπύλων τήξεως (πρόγραμμα modified) για τον πολυμορφισμό R141L στο κανάλι F3, για δύο ετεροζυγώτες G/T και έναν ομοζυγώτη G/G.**



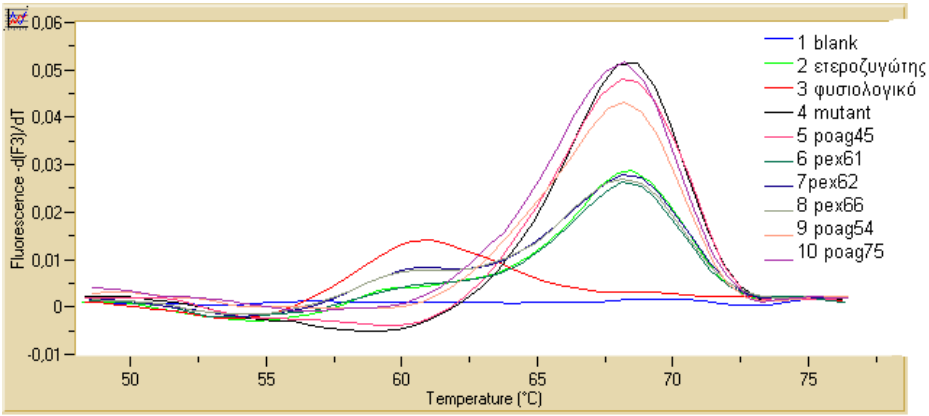

**Εικόνα 6.10: Ανάλυση καμπύλων τήξεως (πρόγραμμα modified) για τον πολυμορφισμό G153D στο κανάλι F2, για έναν ετεροζυγώτη G/A, για έναν ομοζυγώτη G/G και έναν ομοζυγώτη A/A.**



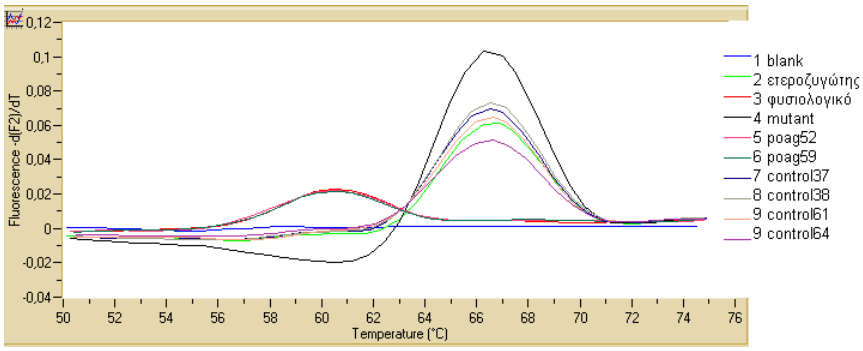

**Εικόνα 6.11: Θερμοκρασίες τήξης για τον πολυμορφισμό R141L στο κανάλι F3 (πρόγραμμα modified) (μέσο ΔTm=7,26 $^{0}$C).**




**Εικόνα 6.12: Θερμοκρασίες τήξης για τον πολυμορφισμό G153D στο κανάλι F2 (πρόγραμμα modified) (μέσο ΔTm=6,34 $^{0}$C).**




**Εικόνα 6.13: Παράδειγμα προγράμματος melting για τον πολυμορφισμό R141L στο κανάλι F3 σε δείγματα ασθενών.**




**Εικόνα 6.14: Παράδειγμα προγράμματος melting για τον πολυμορφισμό G153D στο κανάλι F2 σε δείγματα ασθενών.**

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα γονοτύπωσης σε ασθενείς και Controls στους δύο *LOXL1* πολυμορφισμούς παρατίθονται στους **πίνακες 6.3** και **6.4**:

**Πίνακας 6.3: Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των τριών γονοτύπων και των δύο αλληλίων για τον G153D πολυμορφισμό στις ομάδες PEX, PEXG, POAG και CONTROLS.**

| | PEX | PEXG | POAG | CONTROLS |
|---|---|---|---|---|
| Γονότυπος | Απόλυτος αριθμός Αναλογία (%) | Απόλυτος αριθμός Αναλογία (%) | Απόλυτος αριθμός Αναλογία (%) | Απόλυτος αριθμός Αναλογία (%) |
| G/G (ομοζυγώτης) | 36 (67,9 %) | 52 (73,2 %) | 47 (74,6 %) | 51 (51 %) |
| G/A (Ετεροζυγώτης) | 17 (32,1%) | 19 (26,8 %) | 16 (25,4 %) | 45 (45 %) |
| A/A (ομοζυγώτης) | 0 (0 %) | 0 (0 %) | 0 (0 %) | 4 (4 %) |
| N (total=287) | 53 | 71 | 63 | 100 |
| G αλλήλιο | 89 (84 %) | 123 (86,6 %) | 110 (87,3 %) | 147 (73,5 %) |
| A αλλήλιο | 17 (16 %) | 19 (13,4 %) | 16 (12,7 %) | 53 (26,5 %) |
| N (total= 574) | 106 | 142 | 126 | 200 |

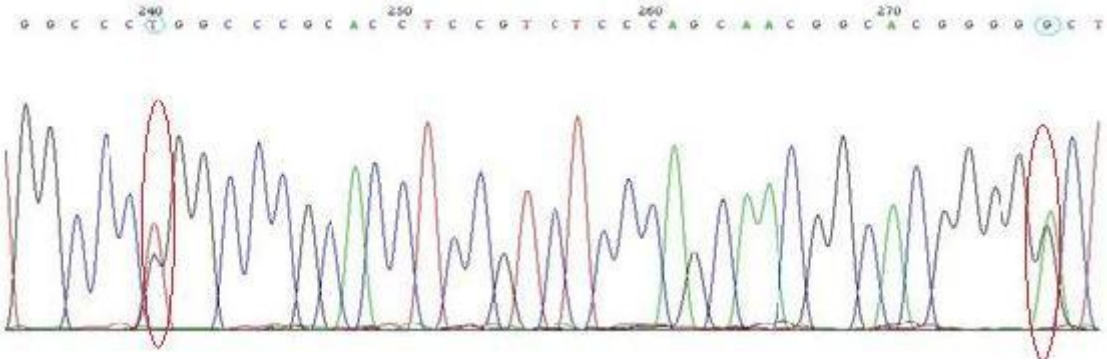
**Πίνακας 6.4: Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των τριών γονοτύπων και των δύο αλληλίων για τον R141L πολυμορφισμό στις ομάδες PEX, PEXG, CONTROLS και POAG.**

| | PEX | PEXG | POAG | CONTROLS |
|---|---|---|---|---|
| Γονότυπος | Απόλυτος αριθμός Αναλογία (%) | Απόλυτος αριθμός Αναλογία (%) | Απόλυτος αριθμός Αναλογία (%) | Απόλυτος αριθμός Αναλογία (%) |
| G/G (ομοζυγώτης) | 33 (61,1 %) | 56 (80 %) | 33 (52,4 %) | 51 (53,1 %) |
| G/T (Ετεροζυγώτης) | 19 (35,2 %) | 13 (18,6 %) | 25 (39,7 %) | 40 (41,7 %) |
| T/T (ομοζυγώτης) | 2 (3,7 %) | 1 (1,4 %) | 5 (7,9 %) | 5 (5,2 %) |
| N (total=283) | 54 | 70 | 63 | 96 |
| G αλλήλιο | 85 (78,7 %) | 125 (89,3 %) | 91 (72,2 %) | 142 (74 %) |
| T αλλήλιο | 23 (21,3 %) | 15 (10,7 %) | 35 (27,8 %) | 50 (26 %) |
| N (total=566) | 108 | 140 | 126 | 192 |

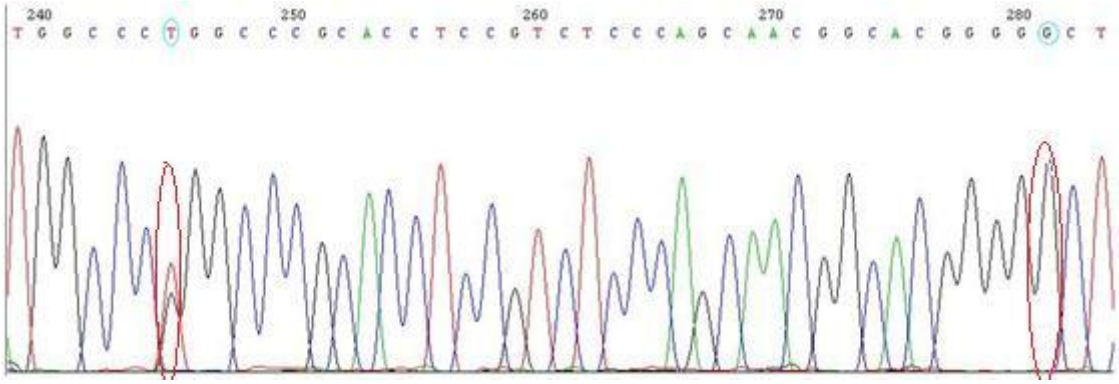
Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν σε επιλεγμένα δείγματα (10) και με την μέθοδο DNA sequencing. Το πρώτο γράφημα αφορά σε δείγμα που είναι 1) ετεροζυγώτης (G/T) στον πολυμορφισμό R141L, με αλληλουχία CCCTGG και δύο κορυφές και 2) ετεροζυγώτης (G/A) στον πολυμορφισμό G153D, με αλληλουχία CGGGGG και δύο κορυφές.

Το δεύτερο δείγμα είναι 1) ετεροζυγώτης (G/T) στον πολυμορφισμό R141L, με αλληλουχία CCCTGG και δύο κορυφές και 2) ομοζυγώτης (G/G) στον πολυμορφισμό G153D, με αλληλουχία CGGGGG και μία κορυφή.

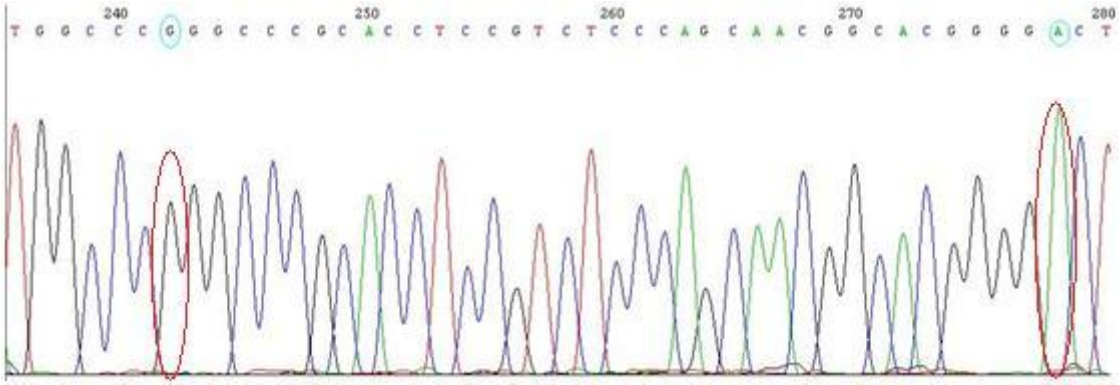
Τέλος, το τρίτο δείγμα είναι 1) ομοζυγώτης (G/G) στον πολυμορφισμό R141L, με αλληλουχία CCCGGG και μία κορυφή και 2) ομοζυγώτης (A/A) στον πολυμορφισμό G153D, με αλληλουχία CGGGGA και μία κορυφή.



**Εικόνα 6.15: Γράφημα από DNA sequencer. Ετεροζυγώτης G/T στον πολυμορφισμό R141L (δύο κορυφές) και ετεροζυγώτης G/A στον πολυμορφισμό G153D (δύο κορυφές).**



**Εικόνα 6.16: Γράφημα από DNA sequencer. Ετεροζυγώτης G/T στον πολυμορφισμό R141L (δύο κορυφές) και ομοζυγώτης G/G στον πολυμορφισμό G153D (μία κορυφή).**



**Εικόνα 6.17: Γράφημα από DNA sequencer. Ομοζυγώτης G/G στον πολυμορφισμό R141L (μία κορυφή) και ομοζυγώτης A/A στον πολυμορφισμό G153D (μία κορυφή).**

## 6.2 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

### 6.2.1 Έλεγχος πληθυσμών

Αρχικά στις ποσοτικές μεταβλητές εφαρμόστηκε η δοκιμασία **Kolmogorov-Smirnov** (έλεγχος κανονικής κατανομής) εντός των υποομάδων ασθενών και υγιών με χρήση του προγράμματος SPSS. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον **πίνακα 6.5:**

**Πίνακας 6.5: Κανονική κατανομή K-S ($p_{value}$). Έλεγχος των ομάδων PEX, PEXG, POAG και CONTROLS σε σχέση με την ηλικία (AGE) και την ενδοφθάλμια πίεση (IOP).**

| Πληθυσμός | AGE | IOP |
|---|---|---|
| **PEX** | 0,764 | 0,348 |
| **PEXG** | 0,714 | 0,008* |
| **POAG** | 0,641 | 0,099 |
| **CONTROLS** | 0,089 | 0,027* |

Με * σημειώνονται οι μη κανονικές κατανομές.

Στη συνέχεια, αναφορικά με την ηλικία, καθώς όλες οι κατανομές στις υποομάδες είναι κανονικές πραγματοποιήθηκε **Anova δοκιμασία μέσων όρων** ώστε να ελεγχθούν εάν παρουσιάζουν την ίδια ηλικιακή κατανομή. Παρατηρήθηκε από τα αποτελέσματα, ότι η ομάδα των ασθενών με POAG δεν είναι σωστά ηλικιακά ισοσκελισμένη δίνοντας $p_{value}$<0,001 (στατιστικά σημαντικό στο γενικό Anova test και στις πολλαπλές συγκρίσεις κατά Bonferrroni). Ενδεικτικά αναφέρονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις στον **πίνακα 6.6**:

**Πίνακας 6.6: Δοκιμασία Anova. Έλεγχος των ομάδων PEX, PEXG, POAG και CONTROLS σε σχέση με την ηλικία (έλεγχος της ηλικιακής κατανομής).**

| | ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ | ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ |
|---|---|---|
| **PEX** | 76,02 | 6,846 |
| **PEXG** | 73,90 | 8,066 |
| **POAG** | 65,00 | 12,858 |
| **CONTROLS** | 73,98 | 8,869 |
| **ΣΥΝΟΛΙΚΑ** | 72,59 | 9,992 |

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το **Kruskal-Wallis test** (λόγω μη κανονικών κατανομών ως προς την ενδοφθάλμια πίεση σε ορισμένες υποομάδες) με σκοπό τον έλεγχο των ομάδων PEX, PEXG, POAG και CONTROLS σε σχέση με την ενδοφθάλμια πίεση (IOP) (**πίνακας 6.7**).

**Πίνακας 6.7: Kruskal-Wallis test. Έλεγχος των ομάδων PEX, PEXG, POAG και CONTROLS σε σχέση με την ενδοφθάλμια πίεση (IOP) (mean rank=διάμεσος).**

| | DISEASE | N | Mean Rank |
|---|---|---|---|
| **IOP** | **CTRLS** | 103 | 104,96 |
| | **POAG** | 27 | 145,41 |
| | **PEX** | 54 | 88,92 |
| | **PEXG** | 62 | 174,89 |
| | **Total** | 246 | |

Από την επεξεργασία των δεδομένων προκύπτει ότι είναι λογικά τα αποτελέσματα ως προς την πίεση στους γλαυκωματικούς ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (υψηλότερη IOP) με εξαίρεση την ομάδα των ασθενών με PEX, οι οποίοι έχουν χαμηλότερη IOP σε σχέση με τους υγιείς. Γι' αυτό τον λόγο, εξετάστηκαν επιπλέον οι ομάδες PEX και CONTROLS ως προς την IOP με το **Mann Whitney test** (μη παραμετρική δοκιμασία) αλλά δεν έφτασε σε στατιστική σημαντικότητα αυτή η διαφορά ($p_{value}$=0,123).

Τέλος, ελέγχοντας τις ομάδες PEX, PEXG, POAG και CONTROLS ως προς την ποιοτική μεταβλητή του φύλου δεν παρατηρήθηκαν διαφορές παρά μόνο στις ομάδες POAG και CONTROLS με ποσοστά στους άντρες 56% και 42% αντίστοιχα (PEX: 35%, PEXG: 52%). Έγινε επιπλέον επεξεργασία και η διαφορά αυτή δεν έφτασε σε στατιστική σημαντικότητα

(δοκιμασία $\chi^2$=0,077). Με βάση τον έλεγχο ομάδων που κάναμε, η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων συσχέτισης με τον γονότυπο θα ενισχυθεί εάν εξαιρεθούν από την ομάδα των υγιών μαρτύρων δείγματα που αντιστοιχούν σε νεώτερη ηλικία και σε γυναικείο φύλο.

### 6.2.2 Στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό G153D

Ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg, ο έλεγχος $\chi^2$ και οι σχετικοί κίνδυνοι, τα όρια εμπιστοσύνης και οι τιμές AIC για κάθε μοντέλο κληρονόμησης των αλληλίων του *LOXL1* υπολογίσθηκαν με το πρόγραμμα SNPStats. Για τον καλύτερο έλεγχο αυτών μελετήθηκαν οι ομάδες Ψ/Α.Σ (PEX), Ψ/Α.Γ (PEXG), και υγιών μαρτύρων (CONTROLS) ανά δύο δηλαδή: PEX- CONTROLS, PEXG- CONTROLS. Επίσης έγινε και έλεγχος των ασθενών με ΠΓΑΓ (POAG) σε σχέση με τους CONTROLS.

Αρχικά μελετήθηκαν οι ομάδες PEX (status=2) και CONTROLS (status=0) και τα αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό G153D (SNP1) παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

**Πίνακας 6.8: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων στις ομάδες PEX και CONTROLS.**

| SNP1 allele frequencies (n=153) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | All subjects | | STATUS=0 | | STATUS=2 | |
| Allele | Count | Proportion | Count | Proportion | Count | Proportion |
| G | 236 | 0.77 | 147 | 0.74 | 89 | 0.84 |
| A | 70 | 0.23 | 53 | 0.26 | 17 | 0.16 |

| SNP1 genotype frequencies (n=157) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | All subjects | | STATUS=0 | | STATUS=2 | |
| Genotype | Count | Proportion | Count | Proportion | Count | Proportion |
| A/A | 4 | 0.03 | 4 | 0.04 | 0 | 0 |
| G/A | 62 | 0.41 | 45 | 0.45 | 17 | 0.32 |
| G/G | 87 | 0.57 | 51 | 0.51 | 36 | 0.68 |
| NA | 4 | --- | 3 | --- | 1 | --- |

**Πίνακας 6.9: Τεστ Hardy-Weinberg για τον πολυμορφισμό G153D.**

| SNP1 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=153) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | N11 | N12 | N22 | N1 | N2 | P-value |
| All subjects | 87 | 62 | 4 | 236 | 70 | 0.11 |
| STATUS=0 | 51 | 45 | 4 | 147 | 53 | 0.2 |
| STATUS=2 | 36 | 17 | 0 | 89 | 17 | 0.33 |

**Πίνακας 6.10: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό G153D και οι υπολογιζόμενοι ORs.**

| SNP1 association with response STATUS (n=153, crude analysis) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | Genotype | STATUS=0 | STATUS=2 | OR (95% CI) | P-value | AIC | BIC |
| Codominant | G/G | 51 (51%) | 36 (67.9%) | 1.00 | 0.037 | 196.8 | 205.9 |
| | G/A | 45 (45%) | 17 (32.1%) | 0.54 (0.27-1.08) | | | |
| | A/A | 4 (4%) | 0 (0%) | 0.00 (0.00-NA) | | | |
| Dominant | G/G | 51 (51%) | 36 (67.9%) | 1.00 | 0.042 | 197.3 | 203.4 |
| | G/A-A/A | 49 (49%) | 17 (32.1%) | **0.49 (0.24-0.99)** | | | |
| Recessive | G/G-G/A | 96 (96%) | 53 (100%) | 1.00 | 0.063 | 198 | 204 |
| | A/A | 4 (4%) | 0 (0%) | 0.00 (0.00-NA) | | | |
| Overdominant | G/G-A/A | 55 (55%) | 36 (67.9%) | 1.00 | 0.12 | 199 | 205.1 |
| | G/A | 45 (45%) | 17 (32.1%) | 0.58 (0.29-1.16) | | | |
| Log-additive | --- | --- | --- | **0.47 (0.25-0.92)** | 0.022 | 196.2 | 202.2 |

Όπως φαίνεται από τα ανωτέρω, για τον πολυμορφισμό G153D πιστοποιείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το σύνδρομο, με τους ομοζυγώτες G/G να εμφανίζουν ποσοστό 67,9% επί των ασθενών με PEX και 51% επί των υγιών μαρτύρων. Από τα προτεινόμενα μοντέλα κληρονόμησης διαλέγουμε το αθροιστικό καθώς είναι εκείνο που δίνει τη μικρότερη τιμή AIC (196,2) και ο OR που υπολογίζεται για το λιγότερο συχνό αλλήλιο A είναι 0,47 με 95% όρια εμπιστοσύνης 0,25-0,92 (p=0,022) και συνεπώς είναι προστατευτικό για το νόσημα.

Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι ομάδες PEXG (status=3) και CONTROLS (status=0) και τα αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό G153D (SNP1) παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

**Πίνακας 6.11: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων στις ομάδες PEXG και CONTROLS.**

| SNP1 allele frequencies (n=171) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | All subjects | | STATUS=0 | | STATUS=3 | |
| Allele | Count | Proportion | Count | Proportion | Count | Proportion |
| G | 270 | 0.79 | 147 | 0.74 | 123 | 0.87 |
| A | 72 | 0.21 | 53 | 0.26 | 19 | 0.13 |

| SNP1 genotype frequencies (n=174) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | All subjects | | STATUS=0 | | STATUS=3 | |
| Genotype | Count | Proportion | Count | Proportion | Count | Proportion |
| A/A | 4 | 0.02 | 4 | 0.04 | 0 | 0 |
| G/A | 64 | 0.37 | 45 | 0.45 | 19 | 0.27 |
| G/G | 103 | 0.6 | 51 | 0.51 | 52 | 0.73 |
| NA | 3 | --- | 3 | --- | 0 | --- |

**Πίνακας 6.12: Τεστ Hardy-Weinberg για τον πολυμορφισμό G153D.**

| SNP1 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=171) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | N11 | N12 | N22 | N1 | N2 | P-value |
| All subjects | 103 | 64 | 4 | 270 | 72 | 0.16 |
| STATUS=0 | 51 | 45 | 4 | 147 | 53 | 0.2 |
| STATUS=3 | 52 | 19 | 0 | 123 | 19 | 0.35 |

**Πίνακας 6.13: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό G153D και οι υπολογιζόμενοι ORs.**

| SNP1 association with response STATUS (n=171, crude analysis) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | Genotype | STATUS=0 | STATUS=3 | OR (95% CI) | P-value | AIC | BIC |
| Codominant | G/G | 51 (51%) | 52 (73.2%) | 1.00 | 0.0032 | 226.6 | 236.1 |
| | G/A | 45 (45%) | 19 (26.8%) | 0.41 (0.21-0.80) | | | |
| | A/A | 4 (4%) | 0 (0%) | 0.00 (0.00-NA) | | | |
| Dominant | G/G | 51 (51%) | 52 (73.2%) | 1.00 | 0.0031 | 227.3 | 233.6 |
| | G/A-A/A | 49 (49%) | 19 (26.8%) | 0.38 (0.20-0.73) | | | |
| Recessive | G/G-G/A | 96 (96%) | 71 (100%) | 1.00 | 0.037 | 231.8 | 238 |
| | A/A | 4 (4%) | 0 (0%) | 0.00 (0.00-NA) | | | |
| Overdominant | G/G-A/A | 55 (55%) | 52 (73.2%) | 1.00 | 0.014 | 230.1 | 236.4 |
| | G/A | 45 (45%) | 19 (26.8%) | 0.45 (0.23-0.86) | | | |
| Log-additive | --- | --- | --- | 0.38 (0.20-0.70) | 0.0013 | 225.8 | 232.1 |

Όπως φαίνεται από τα ανωτέρω, για τον πολυμορφισμό G153D πιστοποιείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη νόσο, με τους ομοζυγώτες G/G να εμφανίζουν ποσοστό 73,2% επί των ασθενών με PEXG και 51% επί των υγιών μαρτύρων (CONTROLS). Από τα προτεινόμενα μοντέλα κληρονόμησης διαλέγουμε το αθροιστικό καθώς είναι εκείνο με τη μικρότερη τιμή AIC (225,8) και ο OR που υπολογίζεται για το λιγότερο συχνό αλλήλιο A είναι 0,38 με 95% όρια εμπιστοσύνης 0,20-0,70.

Τέλος, μελετήθηκαν οι ομάδες POAG (status=1) και CONTROLS (status=0) και τα αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό G153D (SNP1) παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

**Πίνακας 6.14: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων στις ομάδες POAG και CONTROLS.**

| SNP1 allele frequencies (n=163) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | All subjects | | STATUS=0 | | STATUS=1 | |
| Allele | Count | Proportion | Count | Proportion | Count | Proportion |
| G | 257 | 0.79 | 147 | 0.74 | 110 | 0.87 |
| A | 69 | 0.21 | 53 | 0.26 | 16 | 0.13 |

| SNP1 genotype frequencies (n=166) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | All subjects | | STATUS=0 | | STATUS=1 | |
| Genotype | Count | Proportion | Count | Proportion | Count | Proportion |
| A/A | 4 | 0.02 | 4 | 0.04 | 0 | 0 |
| G/A | 61 | 0.37 | 45 | 0.45 | 16 | 0.25 |
| G/G | 98 | 0.6 | 51 | 0.51 | 47 | 0.75 |
| NA | 3 | --- | 3 | --- | 0 | --- |

**Πίνακας 6.15: Τεστ Hardy-Weinberg για τον πολυμορφισμό G153D.**

| SNP1 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=163) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | N11 | N12 | N22 | N1 | N2 | P-value |
| All subjects | 98 | 61 | 4 | 257 | 69 | 0.16 |
| STATUS=0 | 51 | 45 | 4 | 147 | 53 | 0.2 |
| STATUS=1 | 47 | 16 | 0 | 110 | 16 | 0.58 |

**Πίνακας 6.16: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό G153D και οι υπολογιζόμενοι ORs.**

| SNP1 association with response STATUS (n=163, crude analysis) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | Genotype | STATUS=0 | STATUS=1 | OR (95% CI) | P-value | AIC | BIC |
| Codominant | G/G | 51 (51%) | 47 (74.6%) | 1.00 | | | |
| | G/A | 45 (45%) | 16 (25.4%) | 0.39 (0.19-0.77) | 0.003 | 211.9 | 221.2 |
| | A/A | 4 (4%) | 0 (0%) | 0.00 (0.00-NA) | | | |
| Dominant | G/G | 51 (51%) | 47 (74.6%) | 1.00 | 0.0024 | 212.2 | 218.4 |
| | G/A-A/A | 49 (49%) | 16 (25.4%) | 0.35 (0.18-0.71) | | | |
| Recessive | G/G-G/A | 96 (96%) | 63 (100%) | 1.00 | 0.046 | 217.5 | 223.7 |
| | A/A | 4 (4%) | 0 (0%) | 0.00 (0.00-NA) | | | |
| Overdominant | G/G-A/A | 55 (55%) | 47 (74.6%) | 1.00 | 0.011 | 215 | 221.2 |
| | G/A | 45 (45%) | 16 (25.4%) | 0.42 (0.21-0.83) | | | |
| Log-additive | --- | --- | --- | 0.35 (0.18-0.68) | 0.0011 | 210.8 | 217 |

Όπως φαίνεται από τα ανωτέρω, για τον πολυμορφισμό G153D πιστοποιείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη νόσο, με τους ομοζυγώτες G/G να εμφανίζουν ποσοστό 74,6% επί των ασθενών με POAG και 51% επί των υγιών μαρτύρων (CONTROLS). Από τα προτεινόμενα μοντέλα κληρονόμησης διαλέγουμε το αθροιστικό καθώς είναι εκείνο με τη μικρότερη τιμή AIC (210,8) και ο OR που υπολογίζεται που υπολογίζεται για το λιγότερο συχνό αλλήλιο A είναι 0,35 με 95% όρια εμπιστοσύνης 0,18-0,68.

### 6.2.3 Στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό R141L

Η στατιστική ανάλυση του πολυμορφισμού R141L έγινε κατά τον ίδιο τρόπο με την ανάλυση του πολυμορφισμού G153D. Αρχικά μελετήθηκαν οι ομάδες PEX (status=2) και CONTROLS (status=0) και τα αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό R141L (SNP2) παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

**Πίνακας 6.17: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων στις ομάδες PEX και CONTROLS.**

| SNP2 allele frequencies (n=150) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | All subjects | | STATUS=0 | | STATUS=2 | |
| Allele | Count | Proportion | Count | Proportion | Count | Proportion |
| G | 227 | 0.76 | 142 | 0.74 | 85 | 0.79 |
| T | 73 | 0.24 | 50 | 0.26 | 23 | 0.21 |

| SNP2 genotype frequencies (n=155) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | All subjects | | STATUS=0 | | STATUS=2 | |
| Genotype | Count | Proportion | Count | Proportion | Count | Proportion |
| G/G | 84 | 0.56 | 51 | 0.53 | 33 | 0.61 |
| G/T | 59 | 0.39 | 40 | 0.42 | 19 | 0.35 |
| T/T | 7 | 0.05 | 5 | 0.05 | 2 | 0.04 |
| NA | 5 | --- | 5 | --- | 0 | --- |

**Πίνακας 6.18: Τεστ Hardy-Weinberg για τον πολυμορφισμό R141L.**

| SNP2 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=150) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | N11 | N12 | N22 | N1 | N2 | P-value |
| All subjects | 84 | 59 | 7 | 227 | 73 | 0.51 |
| STATUS=0 | 51 | 40 | 5 | 142 | 50 | 0.6 |
| STATUS=2 | 33 | 19 | 2 | 85 | 23 | 1 |

**Πίνακας 6.19: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό R141L και οι υπολογιζόμενοι ORs.**

| SNP2 association with response STATUS (n=150, crude analysis) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | Genotype | STATUS=0 | STATUS=2 | OR (95% CI) | P-value | AIC | BIC |
| Codominant | G/G | 51 (53.1%) | 33 (61.1%) | 1.00 | 0.63 | 201.1 | 210.1 |
| | G/T | 40 (41.7%) | 19 (35.2%) | 0.73 (0.36-1.48) | | | |
| | T/T | 5 (5.2%) | 2 (3.7%) | 0.62 (0.11-3.37) | | | |
| Dominant | G/G | 51 (53.1%) | 33 (61.1%) | 1.00 | 0.34 | 199.1 | 205.1 |
| | G/T-T/T | 45 (46.9%) | 21 (38.9%) | 0.72 (0.37-1.42) | | | |
| Recessive | G/G-G/T | 91 (94.8%) | 52 (96.3%) | 1.00 | 0.67 | 199.8 | 205.9 |
| | T/T | 5 (5.2%) | 2 (3.7%) | 0.70 (0.13-3.74) | | | |
| Overdominant | G/G-T/T | 56 (58.3%) | 35 (64.8%) | 1.00 | 0.43 | 199.4 | 205.4 |
| | G/T | 40 (41.7%) | 19 (35.2%) | 0.76 (0.38-1.52) | | | |
| Log-additive | --- | --- | --- | 0.75 (0.42-1.35) | 0.34 | 199.1 | 205.1 |

Όπως συνάγεται από τους πίνακες, αν και διαφαίνεται κάποια τάση συσχέτισης με ποσοστό ομοζυγωτών G/G στους ασθενείς με PEX 61,1% σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (CONTROLS) 53,1%, αυτή δε φθάνει σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας στο μελετούμενο πληθυσμό.

Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι ομάδες PEXG (status=3) και CONTROLS (status=0) και τα αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό R141L (SNP2) παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

**Πίνακας 6.20: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων στις ομάδες PEXG και CONTROLS.**

| SNP2 allele frequencies (n=166) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | All subjects | | STATUS=0 | | STATUS=3 | |
| Allele | Count | Proportion | Count | Proportion | Count | Proportion |
| G | 267 | 0.8 | 142 | 0.74 | 125 | 0.89 |
| T | 65 | 0.2 | 50 | 0.26 | 15 | 0.11 |

| SNP2 genotype frequencies (n=172) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | All subjects | | STATUS=0 | | STATUS=3 | |
| Genotype | Count | Proportion | Count | Proportion | Count | Proportion |
| G/G | 107 | 0.64 | 51 | 0.53 | 56 | 0.8 |
| G/T | 53 | 0.32 | 40 | 0.42 | 13 | 0.19 |
| T/T | 6 | 0.04 | 5 | 0.05 | 1 | 0.01 |
| NA | 6 | --- | 5 | --- | 1 | --- |

**Πίνακας 6.21: Τεστ Hardy-Weinberg για τον πολυμορφισμό R141L.**

| SNP2 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=166) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | N11 | N12 | N22 | N1 | N2 | P-value |
| All subjects | 107 | 53 | 6 | 267 | 65 | 1 |
| STATUS=0 | 51 | 40 | 5 | 142 | 50 | 0.6 |
| STATUS=3 | 56 | 13 | 1 | 125 | 15 | 0.57 |

**Πίνακας 6.22: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό R141L και οι υπολογιζόμενοι ORs.**

| SNP2 association with response STATUS (n=166, crude analysis) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | Genotype | STATUS=0 | STATUS=3 | OR (95% CI) | P-value | AIC | BIC |
| Codominant | G/G | 51 (53.1%) | 56 (80%) | 1.00 | 0.0012 | 218.6 | 227.9 |
| | G/T | 40 (41.7%) | 13 (18.6%) | 0.30 (0.14-0.62) | | | |
| | T/T | 5 (5.2%) | 1 (1.4%) | 0.18 (0.02-1.61) | | | |
| Dominant | G/G | 51 (53.1%) | 56 (80%) | 1.00 | 3e-04 | 216.8 | 223 |
| | G/T-T/T | 45 (46.9%) | 14 (20%) | 0.28 (0.14-0.58) | | | |
| Recessive | G/G-G/T | 91 (94.8%) | 69 (98.6%) | 1.00 | 0.17 | 228.2 | 234.4 |
| | T/T | 5 (5.2%) | 1 (1.4%) | 0.26 (0.03-2.31) | | | |
| Overdominant | G/G-T/T | 56 (58.3%) | 57 (81.4%) | 1.00 | 0.0013 | 219.7 | 225.9 |
| | G/T | 40 (41.7%) | 13 (18.6%) | 0.32 (0.15-0.66) | | | |
| Log-additive | --- | --- | --- | 0.32 (0.17-0.62) | 3e-04 | 216.9 | 223.1 |

Όπως φαίνεται από τα ανωτέρω, για τον πολυμορφισμό R141L πιστοποιείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη νόσο, με τους ομοζυγώτες G/G να εμφανίζουν ποσοστό 80% επί των ασθενών με PEXG και 53,1% επί των υγιών μαρτύρων. Από τα προτεινόμενα μοντέλα κληρονόμησης διαλέγουμε το αθροιστικό με τη τιμή AIC (216,9) και ο OR που υπολογίζεται για το λιγότερο συχνό αλλήλιο A είναι 0,32 με 95% όρια εμπιστοσύνης 0,17-0,62 συνεπώς το αλλήλιο T είναι προστατευτικό για το νόσημα.

Τέλος, μελετήθηκαν οι ομάδες POAG (status=1) και CONTROLS (status=0) και τα αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό R141L (SNP2) παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

**Πίνακας 6.23: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων στις ομάδες POAG και CONTROLS.**

| SNP2 allele frequencies (n=159) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | All subjects | | STATUS=0 | | STATUS=1 | |
| Allele | Count | Proportion | Count | Proportion | Count | Proportion |
| G | 233 | 0.73 | 142 | 0.74 | 91 | 0.72 |
| T | 85 | 0.27 | 50 | 0.26 | 35 | 0.28 |

| SNP2 genotype frequencies (n=164) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | All subjects | | STATUS=0 | | STATUS=1 | |
| Genotype | Count | Proportion | Count | Proportion | Count | Proportion |
| G/G | 84 | 0.53 | 51 | 0.53 | 33 | 0.52 |
| G/T | 65 | 0.41 | 40 | 0.42 | 25 | 0.4 |
| T/T | 10 | 0.06 | 5 | 0.05 | 5 | 0.08 |
| NA | 5 | --- | 5 | --- | 0 | --- |

**Πίνακας 6.24: Τεστ Hardy-Weinberg για τον πολυμορφισμό R141L.**

| SNP2 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=159) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | N11 | N12 | N22 | N1 | N2 | P-value |
| All subjects | 84 | 65 | 10 | 233 | 85 | 0.69 |
| STATUS=0 | 51 | 40 | 5 | 142 | 50 | 0.6 |
| STATUS=1 | 33 | 25 | 5 | 91 | 35 | 1 |

**Πίνακας 6.25: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό R141L και οι υπολογιζόμενοι ORs.**

| SNP2 association with response STATUS (n=159, crude analysis) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | Genotype | STATUS=0 | STATUS=1 | OR (95% CI) | P-value | AIC | BIC |
| Codominant | G/G | 51 (53.1%) | 33 (52.4%) | 1.00 | 0.79 | 219 | 228.2 |
| | G/T | 40 (41.7%) | 25 (39.7%) | 0.97 (0.50-1.88) | | | |
| | T/T | 5 (5.2%) | 5 (7.9%) | 1.55 (0.42-5.75) | | | |
| Dominant | G/G | 51 (53.1%) | 33 (52.4%) | 1.00 | 0.93 | 217.5 | 223.7 |
| | G/T-T/T | 45 (46.9%) | 30 (47.6%) | 1.03 (0.55-1.95) | | | |
| Recessive | G/G-G/T | 91 (94.8%) | 58 (92.1%) | 1.00 | 0.49 | 217.1 | 223.2 |
| | T/T | 5 (5.2%) | 5 (7.9%) | 1.57 (0.44-5.66) | | | |
| Overdominant | G/G-T/T | 56 (58.3%) | 38 (60.3%) | 1.00 | 0.8 | 217.5 | 223.6 |
| | G/T | 40 (41.7%) | 25 (39.7%) | 0.92 (0.48-1.76) | | | |
| Log-additive | --- | --- | --- | 1.10 (0.65-1.84) | 0.73 | 217.4 | 223.5 |

Όπως συνάγεται από τους πίνακες, δεν διαφαίνεται κάποια τάση συσχέτισης με ποσοστό ομοζυγωτών G/G στους ασθενείς με POAG 52,4% σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (CONTROLS) 53,1% και έτσι δε φθάνει σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας στο μελετούμενο πληθυσμό.

### 6.2.4 Έλεγχος απλότυπου

Επιπλέον, καταγράφηκαν οι συχνότητες των υπολογιζόμενων απλοτύπων με το πρόγραμμα SNPstats καθώς και ο παράγων d' του linkage disequilibrium (LD). Ανευρέθησαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συχνότητες απλοτύπου με δοκιμασία $\chi^2$ ανάμεσα στις ομάδες PEX-CONTROLS ($p_{value}$=0,023) και PEXG-CONTROLS ($p_{value}$=0,001) ενώ δεν ευρέθη για POAG-CONTROLS ($p_{value}$=0,065) [**πίνακας 6.26]:**

**Πίνακας 6.26: Υπολογισμός των συχνοτήτων των απλότυπων για τις ομάδες PEX, PEXG, POAG και CONTROLS.**

| SNP1-SNP2 | PEX | PEXG | POAG | CONTROLS |
|---|---|---|---|---|
| G G | 63% | 76% | 59% | 47% |
| A G | 16% | 13% | 13% | 26% |
| G T | 21% | 11% | 28% | 26% |
| A T | 0% | 0% | 0% | 1% |
| d' | 0,9979 | 0,9945 | 0,9987 | O,8955 |

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος κινδύνου του απλότυπου για τις ομάδες PEXG-CONTROLS και φάνηκε ότι οι απλότυποι AG και GT είναι προστατευτικοί (**πίνακας 6.27**).

**Πίνακας 6.27: Εκτίμηση κινδύνου απλότυπου για τις ομάδες PEXG-CONTROLS.**

| Haplotype association with response (n=174, crude analysis) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | SNP1 | SNP2 | Freq | OR (95% CI) | P-value |
| 1 | G | G | 0.5873 | 1.00 | --- |
| 2 | A | G | 0.2089 | 0.17 (0.08 - 0.38) | <0.0001 |
| 3 | G | T | 0.1986 | 0.16 (0.07 - 0.35) | <0.0001 |
| rare | * | * | 0.0052 | 0.00 (-Inf - Inf) | 1 |
| Global haplotype association p-value: <0.0001 | | | | | |

Το φύλο (ελεγχόμενο ως προς την ηλικία) δεν τροποποιεί στατιστικά σημαντικά ούτε τις κατανομές γονοτύπου ούτε το OR είτε ξέχωρα για τα δύο SNPs είτε στον απλότυπο (interaction analysis στο SNPStats).

### 6.2.5 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα

Για να είναι πιο συγκρίσιμα τα αποτελέσματα με τη διεθνή βιβλιογραφία παρακάτω παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα με ORs και $p_{values}$ και στους δύο πολυμορφισμούς για το υπολλειπόμενο μοντέλο για το αλλήλιο G (G/G σε σχέση με G/A και A/A) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SPSS. Καθώς το SNPstats κάνει συγκρίσεις με το αλλήλιο σε μεγαλύτερο ποσοστό (OR για το A ή το T αλλήλιο που είναι προστατευτικό),

χρησιμοποιήθηκε και το πρόγραμμα SPSS όπου μπορούμε να χρησιμοποιούμε ως βάση για τη σύγκριση και το αλλήλιο με το μικρότερο ποσοστό (OR για το G αλλήλιο που είναι αλλήλιο κινδύνου) (**πίνακες 6.28-6.29**).

**Πίνακας 6.28: Οι ORs και τα $p_{values}$ για τον G153D πολυμορφισμό σύμφωνα με το υπολλειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας και ανάλυση SPSS.**

| | ORs (95% όρια εμπιστοσύνης) | $p_{values}$ |
|---|---|---|
| **CONTROLS- PEX** | 2,035 (1,013-4,087) | 0,011* |
| **CONTROLS- PEXG** | 2,630 (1,365-5,065) | 0,003* |
| **CONTROLS- POAG** | 2,822 (1,416-5,625) | 0,003* |

**Πίνακας 6.29: Οι ORs και τα $p_{values}$ για τον R141L πολυμορφισμό σύμφωνα με το υπολλειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας και ανάλυση SPSS.**

| | ORs (95% όρια εμπιστοσύνης) | $p_{values}$ |
|---|---|---|
| **CONTROLS- PEX** | 1,387 (0,704-2,732) | 0,344 |
| **CONTROLS- PEXG** | 3,529 (1,736-7,177) | 0,000* |
| **CONTROLS- POAG** | 0,971 (0,514-1,834) | 0,927 |

Με * σημειώνεται η στατιστικά σημαντική συσχέτιση

Τέλος, εφαρμόστηκε το στατιστικό εργαλείο Logistic Regression (SPSS πρόγραμμα) ανά ζεύγη ομάδων CONTROLS-PEX, CONTROLS-POAG και CONTROLS-PEXG για να κατασκευάσουμε μοντέλο πρόβλεψης του νοσήματος ως προς γνωστούς παράγοντες κινδύνου (ηλικία, IOP, φύλο) και τους γονότυπους των δύο *LOXL1* πολυμορφισμών που ανιχνεύσαμε (αλλήλια GG vs υπόλοιπα). Τα αποτελέσματα της λογαριθμιστικής παλινδρόμησης παρουσιάζονται στους **πίνακες 6.30-6.32**.

**Πίνακας 6.30: Logistic Regression για CONTROLS-POAG με μεταβλητές: φύλο (sex), ηλικία (age), ενδοφθάλμια πίεση (IOP), αλλήλιο153, αλλήλιο141.**

Variables in the Equation

| | B | S.E. | p | OR | 95,0% C.I | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower | Upper |
| SEX | ,244 | ,489 | ,618 | 1,277 | ,489 | 3,332 |
| AGE | -,081 | ,026 | ,002 | ,923 | ,877 | ,970 |
| MAX_IOP | ,179 | ,078 | ,022 | 1,197* | 1,026 | 1,395 |
| ALLEL153 | ,105 | ,531 | ,844 | 1,110 | ,392 | 3,145 |
| ALLEL141 | -,159 | ,536 | ,767 | ,853 | ,299 | 2,438 |
| Constant | 1,781 | 4,732 | ,707 | 5,937 | | |

a Variable(s) entered on step 1: SEX, AGE, MAX_IOP, ALLEL153, ALLEL141.

**Πίνακας 6.31: Logistic Regression για CONTROLS-PEX με μεταβλητές: φύλο (sex), ηλικία (age), ενδοφθάλμια πίεση (IOP), αλλήλιο153, αλλήλιο141.**

Variables in the Equation

| | B | S.E. | p | OR | 95,0% C.I. | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower | Upper |
| SEX | -,284 | ,385 | ,461 | ,753 | ,354 | 1,601 |
| AGE | ,058 | ,025 | ,022 | 1,060* | 1,008 | 1,114 |
| MAX_IOP | -,127 | ,080 | ,114 | ,881 | ,753 | 1,031 |
| ALLEL153 | 1,457 | ,460 | ,002 | 4,292* | 1,744 | 10,567 |
| ALLEL141 | 1,061 | ,461 | ,021 | 2,888* | 1,170 | 7,127 |
| Constant | -14,536 | 4,856 | ,003 | ,000 | | |

a Variable(s) entered on step 1: SEX, AGE, MAX_IOP, ALLEL153, ALLEL141.

**Πίνακας 6.32: Logistic Regression για CONTROLS-PEXG με μεταβλητές: φύλο (sex), ηλικία (age), ενδοφθάλμια πίεση (IOP), αλλήλιο153, αλλήλιο141.**

Variables in the Equation

| | B | S.E. | p | OR | 95,0% C.I. | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower | Upper |
| SEX | ,443 | ,450 | ,325 | 1,557 | ,644 | 3,764 |
| AGE | ,065 | ,028 | ,018 | 1,067* | 1,011 | 1,127 |
| MAX_IOP | ,381 | ,082 | ,000 | 1,464* | 1,248 | 1,718 |
| ALLEL153 | 1,942 | ,556 | ,000 | 6,974* | 2,348 | 20,717 |
| ALLEL141 | 2,711 | ,618 | ,000 | 15,040* | 4,476 | 50,539 |
| Constant | -33,049 | 6,462 | ,000 | ,000 | | |

a Variable(s) entered on step 1: SEX, AGE, MAX_IOP, ALLEL153, ALLEL141.

Μεταξύ των ομάδων CONTROLS-PEX βρέθηκε στατιστική σημαντικότητα ως προς την ηλικία, το αλλήλιο153 και το αλλήλιο141 (σύνδεση με Ψ/Α.Σ), μεταξύ των ομάδων CONTROLS-PEXG ως προς την ηλικία, την ενδοφθάλμια πίεση, το αλλήλιο153 και το αλλήλιο141 (σύνδεση με Ψ/Α.Γ) ενώ μεταξύ των ομάδων CONTROLS-POAG μόνο ως προς την ενδοφθάλμια πίεση.

Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα, φαίνεται ότι ο γονότυπος GG και στα δύο SNPs είναι πιο σημαντικός παράγων κινδύνου από την ηλικία και την ΕΟΠ. Ειδικά για το PEXG, ο ρόλος του 141 αλληλίου (GG γονότυπος) γίνεται πολύ πιο ισχυρός (OR=15,040, 95% CI 4,476-50,539) απ' ότι στο PEX και αντιστρέφεται σε σχέση με το αλλήλιο 153 (GG γονότυπος). Αντιθέτως στο POAG οι δύο πολυμορφισμοί δεν φαίνεται να προβλέπουν το νόσημα. Η ηλικία και η ενδοφθάλμια πίεση παραμένουν παράγοντες κινδύνου για PEX, PEXG ενώ το φύλο δεν παίζει στατιστικά σημαντικό ρόλο.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

# ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το Ψ/Α.Σ αποτελεί μία εκτεταμένη εκφυλιστική πάθηση η οποία παρουσιάζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 40-50 ετών και χαρακτηρίζεται από την παραγωγή και την προοδευτική συγκέντρωση ενός ινώδους υλικού (Ψ/Α υλικό) στο περιφάκιο, στο επιθήλιο της ίριδας και στο κορικό χείλος, στο ακτινωτό σώμα, στη ζίννειο ζώνη και στο διηθητικό ηθμό. Η κατ' εξοχήν κλινική εικόνα είναι η εναπόθεση στο πρόσθιο περιφάκιο και στο κορικό χείλος μιας κοκκιώδους ουσίας η οποία μπορεί να παραμένει είτε με την μορφή γκριζόλευκων φολίδων είτε ως μεμβρανόμορφος σχηματισμός. Το Ψ/Α.Σ αποτελεί το πιο συχνά προσδιορισμένο αίτιο χρόνιου γλαυκώματος ανοικτής γωνίας (Ψ/Α.Γ) και κατέχει το 25% και πλέον του συνόλου των χρονίων γλαυκωμάτων ανοικτής γωνίας παγκοσμίως. Η ακριβής παθογένεια του Ψ/Α.Σ και η ακριβής βιοχημική σύνθεση του Ψ/Α υλικού παραμένουν μέχρι και σήμερα άγνωστα. Το παθογνωμικό εύρημα του Ψ/Α.Σ είναι μία διαταραχή της εξωκυττάριας ουσίας δηλαδή μια υπερβολική παραγωγή ή/και μειωμένη αποδόμηση ενός ανώμαλου εξωκυτταρικού υλικού. Πρόκειται για ένα συστηματικό νόσημα που προκαλεί βλάβες και σε άλλους ιστούς.

Το Ψ/Α.Σ εντοπίζεται σε άτομα από όλες τις γεωγραφικές περιοχές του κόσμου και με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης απ' ότι προηγουμένως υποψιάζονταν. Αυτό σε συνδυασμό με την έλλειψη ενδιαφέροντος και εξειδικευμένης γνώσης οδηγεί συχνά στην παράβλεψη ή λανθασμένη αναγνώριση του Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ. Επιπλέον, πρέπει να τονιστεί ότι το Ψ/Α.Γ αποτελεί συχνή απειλή για την όραση, καθώς η πρόγνωση είναι επιβαρημένη, η οπτική νευροπάθεια και η βλάβη των οπτικών πεδίων είναι πολύ σοβαρές κατά τη στιγμή της διάγνωσης, με ταχεία εξέλιξη ενώ και η ανάγκη για χειρουργική επέμβαση είναι πολύ συχνή.

Πρόκειται για μία πάθηση που αναπόφευκτα επιφέρει μεγάλη επιβάρυνση για τον ασθενή, τον κοινωνικό του περίγυρο και τα συστήματα κοινωνικής ασφάλισης. Σε αυτά τα πλαίσια γίνεται κατανοητό ότι η ανάγκη εφαρμογής προληπτικών μέτρων και η αναζήτηση νέων θεραπειών είναι επιτακτική. Η αναγνώριση γενετικών παραγόντων που προδιαθέτουν για τη νόσο μπορεί να συμβάλλει τα μέγιστα προς την κατεύθυνση αυτή, καθότι θα καταστήσει δυνατό τον καθορισμό των ομάδων αυξημένου κινδύνου, οι οποίες και χρήζουν τακτικότερης παρακολούθησης και κυρίως αυστηρότερης προληπτικής αντιμετώπισης. Άλλωστε, οι γενετικοί πολυμορφισμοί μπορεί να παίξουν σημαντικό ρόλο και αναφορικά με τη θεραπεία, στα πλαίσια φαρμακογενωμικών προσεγγίσεων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιολόγηση σε Ελληνικό πληθυσμό (πιο συγκεκριμένα της Ηπείρου), του επιπολασμού δύο γνωστών πολυμορφισμών στο γονίδιο *LOXL1*, οι οποίοι έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι συσχετίζονται με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ.

Με σάρωση γονιδιώματος βρέθηκε ιδιαίτερα ισχυρή σύνδεση μεταξύ του Ψ/Α.Σ όπως και του Ψ/Α.Γ και των δύο ενιαίων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών ($SNP_s$) στο γονίδιο *LOXL1* (που κωδικοποιεί την οξειδάση-λυσίνη-like1) σε ασθενείς από την Ισλανδία και την Σουηδία. Η σύνδεση αυτή επιβεβαιώθηκε μετέπειτα σε πολλούς πληθυσμούς παγκοσμίως. Διάφορες εταιρίες «ταχυδρομικής» γενετικής με δείγμα σάλιο έχουν συμπεριλάβει τους *LOXL1* πολυμορφισμούς σχετιζόμενους με το Ψ/Α.Γ. Η εταιρία deCODEme έχει συμπεριλάβει γενετικά tests για τους πολυμορφισμούς rs2165241 και rs1078967, η 23andMe για τον rs2165241 ενώ οι εταιρίες Navigenics και Pathway έχουν συμπεριλάβει γενετικά tests αλλά δεν αναφέρουν για ποιους επακριβώς πολυμορφισμούς του *LOXL1* (τα γενετικά tests των εταιριών θεωρούνται εδραιωμένα εάν για πάνω από 750 περιπτώσεις το $p_{value}$ είναι μικρότερο από 0,01). Είναι βιολογικά εύλογο ότι βλάβες στο *LOXL1* μπορούν να έχουν ως συνέπεια παθολογική παραγωγή ελαστίνης και συσσώρευση ινώδους υλικού τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα του Ψ/Α.Σ αν και ακριβής μηχανισμός που οδηγεί στην ανάπτυξη Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ δεν έχει ακόμα καθοριστεί.

Ο πολυμορφισμός G153D (rs3825942, g→a) εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 15q24, στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την οξειδάση-λυσίνη-like1 (*LOXL1*) και έχει βρεθεί από πλήθος μελετών να συσχετίζεται με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ. Η σημειακή αυτή μετάλλαξη οδηγεί σε αντικατάσταση μιας γλυκίνης από ένα ασπαρτικό στο κωδικόνιο 153. Ο μεγάλος επιπολασμός της μετάλλαξης στους ασθενείς καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη ταχέων και αξιόπιστων μεθόδων γονοτύπωσης, δυνάμενων να εφαρμοσθούν σε ευρεία κλίμακα πληθυσμού αφού ο rs3825942 (G153D) ανιχνεύεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στους ασθενείς με Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Ο πολυμορφισμός R141L (rs1048661, g→t) εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 15q24, στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την οξειδάση-λυσίνη-like1 (*LOXL1*) και έχει βρεθεί από πλήθος μελετών να συσχετίζεται με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ. Η σημειακή αυτή μετάλλαξη οδηγεί σε αντικατάσταση μιας αργινίνης από μια λευκίνη στο κωδικόνιο 141. Ο rs1048661 (R141L) δεν έχει ανιχνευθεί στον ίδιο βαθμό όπως ο πρώτος. Είναι δυνατόν ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός να μην παίζει ρόλο στην ανάπτυξη Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ ή να απαιτεί την συνύπαρξη άλλων γενετικών ή περιβαλλοντικών παραγόντων γι' αυτό θεωρείται μικρότερου κινδύνου. Πρέπει να σημειωθεί ότι βρέθηκε και για τους δύο $SNP_s$

του *LOXL1* ότι διαθέτουν υψηλή ευαισθησία (test θετικό σε άτομα που έχουν την διαταραχή) αλλά χαμηλή ειδικότητα (test αρνητικό σε άτομα που δεν έχουν την διαταραχή).

Για τους σκοπούς της μελέτης, εξετάσθηκαν 291 δείγματα περιφερικού αίματος (αρχικά 356 δείγματα, εκ των οποίων κάποια δεν υπήρχαν και τα υπόλοιπα δεν έδωσαν αποτελέσματα λόγω μη ενίσχυσης) γλαυκωματικών ασθενών (PEX, PEXG, POAG) και υγιών μαρτύρων ίδιας ηλικιακής κατανομής, οι οποίοι και επελέγησαν στο σύνολό τους κατόπιν ενημέρωσης, έγγραφης συγκατάθεσης και οφθαλμολογικής αξιολόγησης. Για τη γονοτύπωση των δύο πολυμορφισμών G153D και R141L του γονιδίου *LOXL1* αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε μεθοδολογία PCR πραγματικού χρόνου και ανάλυση καμπύλων τήξης. Η μεθοδολογία αναπτύχθηκε στο όργανο LightCycler με ικανοποιητικό τρόπο, ήταν ταχεία και αξιόπιστη, επιδεικνύοντας καλή απόδοση και επαναληψιμότητα στην ποσοτικοποίηση (αναπαραγωγιμότητα Ct CV<2,5%) και αξιοπιστία στη γονοτύπωση (CV<2,5%) εξετάζοντας ξεχωριστά τους δύο πολυμορφισμούς. Επίσης, ήταν ακριβής καθώς σε επιλεγμένα δείγματα (10) έγινε σύγκριση με τη μέθοδο αναφοράς DNA sequencing (100% συμφωνία). Καθώς οι δύο πολυμορφισμοί είναι κοντινοί και οι αναπτυχθείσες μεθοδολογίες ανίχνευσης χρησιμοποιούν το ίδιο PCR προϊόν, για λόγους εξοικονόμησης χρόνου και αντιδραστηρίων έγινε προσπάθεια ανάπτυξης μεθοδολογίας που να εξετάζει ταυτόχρονα και τους δύο πολυμορφισμούς με το πρόγραμμα συνδυασμένης γονοτύπωσης (combined) με probes που χρησιμοποιούσαν διαφορετικά φθορισμοχρώματα. Σε περιπτώσεις αμφιβολίας, τα αποτελέσματα είτε επιβεβαιώθηκαν για επιλεγμένα δείγματα με τη μέθοδο αναφοράς DNA Sequencing είτε εξετάζοντας ξεχωριστά κάθε πολυμορφισμό στο LightCycler (με το πρόγραμμα modified).

Πρέπει ωστόσο να αναφερθεί ότι η μέθοδος συνδυασμένης γονοτύπωσης έχει κάποιους περιορισμούς διότι οι δύο πολυμορφισμοί που εξετάστηκαν βρίσκονται πολύ κοντά οπότε απαιτείται προσεκτική σχεδίαση εκκινητών και ανιχνευτών με σκοπό την αποφυγή της δυσχερούς υβριδοποίησης και της χαμηλής απόδοσης. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η ανάλυση των καμπυλών τήξης έχει καλύτερο αποτέλεσμα κατά την εξέταση έως 16 περίπου δειγμάτων κάθε φορά (δηλαδή στη μισή χωρητικότητα του LightCycler). Με το όργανο LightCycler 1.5 η μέτρηση του σήματος γίνεται από συγκεκριμένο σημείο ανά ένα capillary και παίρνει ένδειξη ανά $0,1^0$C. Θα μπορούσαμε να είχαμε καλύτερα αποτελέσματα κατά την ανάλυση των καμπυλών τήξης εάν η ίδια μεθοδολογία εφαρμοζόταν σε LightCycler 480 ή LightCycler 1536 διότι όλα τα δείγματα αναλύονται ταυτόχρονα και επειδή οι ανωτέρω εξοπλισμοί έχουν και τη δυνατότητα high resolution melting (με λήψη σήματος ανά $0,01^0$C). Τα δείγματα διαβάζονται πιο έγκαιρα και με

μεγαλύτερη λεπτομέρεια. Επίσης, σε αυτούς τους εξοπλισμούς η μεθοδολογία θα ήταν high-throughput (με δυνατότητα εκτέλεσης πολλαπλάσιου αριθμού δειγμάτων).

Τα δείγματα απομονώθηκαν με την μέθοδο της εξαλάτωσης και όχι με στήλες με αποτέλεσμα να χρειαστούν αραίωση 1:5 με στόχο την αποφυγή αναστολέων και την οριοθέτησή τους σε επιθυμητή συγκέντρωση ανά αντίδραση (~100 ng) για να καθαριστούν και να ενισχυθούν.

Στην αντίδραση της real-time PCR για το *LOXL1* χρησιμοποιήθηκαν ένα ζευγάρι εκκινητών, ένα ή δύο ζευγάρια ανιχνευτών (ένα για κάθε πολυμορφισμό, συμπληρωματικοί των μεταλλαγμένων αλληλίων, ένα με FL2 και ένα με FL3 ), DMSO σε ποσοστό 6% (απαραίτητος χημικός παράγοντας λόγω υψηλής περιεκτικότητας σε GC νουκλεοτίδια), μίγμα πολυμεράσης και μαγνήσιο από το kit LightCycler Faststart DNA Master HybProbe της Roche Applied Science σε τελικό όγκο 10 μL. Η αντίδραση πραγματοποιείται στο LightCycler είτε με το πρόγραμμα combined εάν εξετάζονται ταυτόχρονα οι δύο πολυμορφισμοί για οικονομία είτε ξεχωριστά (με το πρόγραμμα modified). Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι με την συνδυασμένη γονοτύπωση (combined) ήταν δυσχερής η διαφοροποίηση των ετεροζυγωτών G/A και G/T με τους ομοζυγώτες A/A και T/T αντίστοιχα. Γι' αυτό τον λόγο κάποια δείγματα εξετάστηκαν για τους δύο πολυμορφισμούς ξεχωριστά ή γονοτυπώθηκαν χρησιμοποιώντας το DNA Sequencing.

Κατόπιν βελτιστοποιήσεων με προσθήκη DMSO, κατάλληλης συγκέντρωσης μαγνησίου (4 mM) και βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού, κατέστη επίσης σαφές ότι το σήμα φθορισμού ήταν ισχυρότερο με εφαρμογή ασύμμετρης PCR και έτσι ο πρόσθιος εκκινητής προστίθετο σε αναλογία 4:1 ως προς τον ανάστροφο. Όπως είναι κατανοητό, η προσθήκη περίσσειας του πρόσθιου εκκινητή είχε ως αποτέλεσμα τη σύνθεση περίσσειας της συμπληρωματικής του αλυσίδας, στην οποία και προσδένονταν οι ανιχνευτές υβριδισμού. Κατ' επέκταση το σήμα φθορισμού που προέκυπτε στο στάδιο του υβριδισμού ήταν μεγαλύτερο καθώς και η αναλυτική ευαισθησία ήταν καλύτερη.

Για τον πολυμορφισμό G153D, η αναπαραγωγιμότητα με ενίσχυση δείγματος ομοζυγώτη A/A σε διαφορετικές αντιδράσεις (between-run precision) και σε διαφορετικές μέρες ελέγχθηκε με μέση τιμή των Cq=28,69 (<2,5%) και μέση τιμή Tm=68,25 $^{0}$C (CV<2,5%), δείγματος ετεροζυγώτη G/A με μέση τιμή των Cq=29,87 (<2,5%) και μέση τιμή Tm=67,22 $^{0}$C (CV<2,5%) αλληλίου A και δείγματος ομοζυγώτη G/G με μέση τιμή των Cq=32,00 (<2,5%) και μέση τιμή Tm=61,91 $^{0}$C (CV<2,5%) αλληλίου G. Η διαφορά στις μέσες τιμές των Tm των δύο αλληλίων G και A ήταν ΔTm=6,34 $^{0}$C. Για τον πολυμορφισμό R141L η

αναπαραγωγιμότητα με ενίσχυση δείγματος ομοζυγώτη T/T σε διαφορετικές αντιδράσεις (between-run precision) και σε διαφορετικές μέρες ελέγχθηκε με μέση τιμή των Cq=27,42 (<2,5%) και μέση τιμή Tm=69,54 $^0$C (CV<2,5%), δείγματος ετεροζυγώτη G/T με μέση τιμή των Cq=28,85 (<2,5%) και μέση τιμή Tm=68,63 $^0$C (CV<2,5%) αλληλίου T και δείγματος ομοζυγώτη G/G με μέση τιμή των Cq=31,27 (<2,5%) και μέση τιμή Tm=62,28 $^0$C (CV<2,5%) αλληλίου G. Η διαφορά στις μέσες τιμές των Tm των δύο αλληλίων G και A ήταν ΔTm=7,26 $^0$C.

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, εξετάστηκαν δείγματα και για τους δύο πολυμορφισμούς από τις ομάδες Ψ/Α.Σ (PEX), Ψ/Α.Γ (PEXG), και υγιών μαρτύρων (CONTROLS) ανά δύο δηλαδή: PEX-CONTROLS και PEXG-CONTROLS. Επίσης έγινε και έλεγχος των ασθενών με ΠΓΑΓ (POAG) σε σχέση με τους CONTROLS. Για όλες τις περιπτώσεις και στους δύο πολυμορφισμούς έγινε έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg, χρησιμοποιήθηκαν διάφορα μοντέλα κληρονομικότητας για την εξήγηση της συσχέτισης και έγινε έλεγχος απλότυπου με την βοήθεια του στατιστικού προγράμματος SNPstats. Επιπλέον, έγινε έλεγχος των πληθυσμών που χρησιμοποιήθηκαν ως προς την ηλικία, το φύλο και την ενδοφθάλμια πίεση με την βοήθεια στατιστικών δοκιμασιών (Kolmogorov Smirnov, Anova test, Kruskal Wallis test, Mann Whitney test, $x^2$) του προγράμματος SPSS.

Στον πολυμορφισμό G153D βρέθηκε ότι: 1) 67,9% ήταν ομοζυγώτες G/G, 32,1% ήταν ετεροζυγώτες G/A και 0% ήταν ομοζυγώτες A/A σε σύνολο 53 ασθενών με PEX, 2) 73,2% ήταν ομοζυγώτες G/G, 26,8% ήταν ετεροζυγώτες G/A και 0% ήταν ομοζυγώτες A/A σε σύνολο 71 ασθενών με PEXG, 3) 51% ήταν ομοζυγώτες G/G, 45% ήταν ετεροζυγώτες G/A και 4% ήταν ομοζυγώτες A/A σε σύνολο 100 υγιών μαρτύρων, 4) 74,6% ήταν ομοζυγώτες G/G, 25,40% ήταν ετεροζυγώτες G/A και 0% ήταν ομοζυγώτες A/A σε σύνολο 63 ασθενών με POAG.

Στον πολυμορφισμό R141L βρέθηκε ότι: 1) 61,1% ήταν ομοζυγώτες G/G, 35,2% ήταν ετεροζυγώτες G/T και 3,7% ήταν ομοζυγώτες T/T σε σύνολο 54 ασθενών με PEX, 2) 80% ήταν ομοζυγώτες G/G, 18,6% ήταν ετεροζυγώτες G/T και 1,4% ήταν ομοζυγώτες T/T σε σύνολο 70 ασθενών με PEXG, 3) 53,1% ήταν ομοζυγώτες G/G, 41,7% ήταν ετεροζυγώτες G/T και 5,2% ήταν ομοζυγώτες T/T σε σύνολο 96 υγειών μαρτύρων, 4) 52,4% ήταν ομοζυγώτες G/G, 39,7% ήταν ετεροζυγώτες G/T και 7,9% ήταν ομοζυγώτες T/T σε σύνολο 63 ασθενών με POAG.

Για τον πολυμορφισμό G153D πιστοποιήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη νόσο κατά την εξέταση των ομάδων PEXG-CONTROLS με τους ομοζυγώτες G/G να εμφανίζουν ποσοστό 73,2% επί των ασθενών με PEXG και 51% επί των υγιών μαρτύρων (CONTROLS). Ο σχετικός λόγος συμπληρωματικών πιθανοτήτων υπολογίσθηκε OR=0,35 (SNPstats) σύμφωνα με το αθροιστικό μοντέλο για το αλλήλιο A (OR=2,630 σύμφωνα με το υπολλειπόμενο μοντέλο (SPSS) για το αλλήλιο G). Επίσης, πιστοποιήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το σύνδρομο κατά την εξέταση των ομάδων PEX-CONTROLS με τους ομοζυγώτες G/G να εμφανίζουν ποσοστό 67,9% επί των ασθενών με PEX και 51% επί των υγιών μαρτύρων (CONTROLS). Ο σχετικός λόγος συμπληρωματικών πιθανοτήτων υπολογίσθηκε OR=0,44 σύμφωνα με το αθροιστικό μοντέλο (SNPstats) για το αλλήλιο A (OR=2,035 σύμφωνα με το υπολλειπόμενο μοντέλο (SPSS) για το αλλήλιο G).

Για τον πολυμορφισμό R141L πιστοποιήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη νόσο κατά την εξέταση των ομάδων PEXG-CONTROLS με τους ομοζυγώτες G/G να εμφανίζουν ποσοστό 80% επί των ασθενών με PEXG και 53,1% επί των υγιών μαρτύρων (CONTROLS). Ο σχετικός λόγος συμπληρωματικών πιθανοτήτων υπολογίσθηκε OR=0,32 σύμφωνα με το αθροιστικό μοντέλο (SNPstats) για το αλλήλιο T (OR=3,529 σύμφωνα με το υπολλειπόμενο μοντέλο (SPSS) για το αλλήλιο G).

Ενώ δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του ΠΓΑΓ (POAG) με τον R141L κατά την εξέταση των ομάδων POAG-CONTROLS, υπήρξε για τον G153D με τους ομοζυγώτες G/G να εμφανίζουν ποσοστό 74,6% επί των ασθενών με POAG και 51% επί των υγιών μαρτύρων (CONTROLS). Ο σχετικός λόγος συμπληρωματικών πιθανοτήτων υπολογίσθηκε OR=0,33 σύμφωνα με το αθροιστικό μοντέλο (SNPstats) για το αλλήλιο A (OR=2,822 σύμφωνα με το υπολλειπόμενο μοντέλο (SPSS) για το αλλήλιο G).

Υπολογίστηκαν και οι συχνότητες των απλότυπων με υψηλότερη συχνότητα αυτή του GG στην ομάδα PEXG (76%) και ανευρέθησαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συχνότητες απλοτύπου με δοκιμασία $\chi^2$ ανάμεσα στις ομάδες PEX-CONTROLS ($p_{value}$=0,023) και PEXG-CONTROLS ($p_{value}$=0,001) ενώ δεν ευρέθη για POAG-CONTROLS ($p_{value}$=0,065). Στη συνέχεια ο κίνδυνος απλότυπου για τις ομάδες PEXG-CONTROLS (AG και GT απλότυποι προστατευτικοί, p=0,001).

Το φύλο (ελεγχόμενο ως προς την ηλικία) δεν τροποποιεί στατιστικά σημαντικά ούτε τις κατανομές γονοτύπου ούτε το OR είτε ξέχωρα για τα δύο SNPs είτε στον απλότυπο (interaction analysis στο SNPStats).

Εφαρμόζοντας το στατιστικό εργαλείο Logistic Regression (SPSS πρόγραμμα) ανά ζεύγη ομάδων CONTROLS-PEX, CONTROLS-POAG και CONTROLS-PEXG κατασκευάσαμε μοντέλο πρόβλεψης του νοσήματος ως προς γνωστούς παράγοντες κινδύνου (ηλικία, IOP, φύλο) και τους γονότυπους που ανιχνεύσαμε (αλλήλια GG vs υπόλοιπα). Για τις ομάδες CONTROLS-PEX βρέθηκε στατιστική σημαντικότητα ως προς την ηλικία, το αλλήλιο153 και το αλλήλιο141 (σύνδεση με Ψ/Α.Σ), για τις ομάδες CONTROLS-POAG ως προς την ηλικία και την ενδοφθάλμια πίεση και για τις ομάδες CONTROLS-PEXG ως προς την ηλικία, την ενδοφθάλμια πίεση, το αλλήλιο153 και το αλλήλιο141 (σύνδεση με Ψ/Α.Γ). Με βάση τα αποτελέσματα που βρήκαμε, φαίνεται ότι ο γονότυπος GG και στα δύο SNPs είναι ο πιο σημαντικός παράγων κινδύνου από την ηλικία και την ΕΟΠ. Ειδικά για το PEXG, ο ρόλος του 141 αλληλίου γίνεται πολύ πιο ισχυρός (OR=15,040, 95% CI 4,476-50,539) απ' ότι στο PEX και αντιστρέφεται σε σχέση με το αλλήλιο 153 (GG γονότυπος). Αντιθέτως στο POAG οι δύο πολυμορφισμοί δεν φαίνεται να προβλέπουν το νόσημα. Η ηλικία και η ενδοφθάλμια πίεση παραμένουν παράγοντες κινδύνου για PEX, PEXG ενώ το φύλο δεν παίζει στατιστικά σημαντικό ρόλο.

Γνωρίζοντας ότι το *LOXL1* εμπλέκεται στην ομοιόσταση του συνδετικού ιστού και ότι το Ψ/Α.Σ είναι τύπος ελαττωματικής ελάστωσης, είναι βιολογικά εύλογο το γονίδιο αυτό να εμπλέκεται στην ανάπτυξη και εκδήλωση της νόσου χωρίς όμως να έχει καθοριστεί ακόμα ο ακριβής μηχανισμός. Από τα αποτελέσματα της μελέτης μας επιβεβαιώνεται η σύνδεση του *LOXL1* με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ σε ελληνικό πληθυσμό (Ήπειρος).

Η σύνδεση του Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ με τον G153D φάνηκε να είναι λιγότερο ισχυρή στον πληθυσμό που μελετήθηκε (67,9% και 73,2% αντίστοιχα) σε σχέση με άλλους πληθυσμούς σε διάφορες μελέτες στις οποίες τα ποσοστά είναι υψηλότερα. Ενώ για τον πολυμορφισμό R141L η σύνδεση αποδείχθηκε μόνο για το Ψ/Α.Γ με ποσοστό (80%) παρόμοιο με τα ποσοστά σε άλλους πληθυσμούς και όπως επίσης αποδείχθηκε στην λογαριθμιστική παλινδρόμηση (Logistic Regression) είναι ισχυρότερη από την σύνδεση με τον G153D.

Παρατηρείται επίσης, η ύπαρξη υψηλού επιπολασμού του αλληλίου κινδύνου G και στην ομάδα ελέγχου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να περιορίζει την ανάπτυξη γενετικών test για την πρόβλεψη αυτών που θα νοσήσουν από Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ αλλά υπάρχει αξία στην *LOXL1* γονοτύπωση στους νοσούντες με Ψ/Α.Σ για κίνδυνο ανάπτυξης Ψ/Α.Γ.

Ενώ το Ψ/Α.Γ και το ΠΓΑΓ διαφέρουν κλινικά, παθογενετικά και ιστοπαθολογικά και αναμένουμε διαφορετικούς γενετικούς παράγοντες να επηρεάζουν την ανάπτυξη και την

εκδήλωση των δύο αυτών παθήσεων, βρέθηκε σύνδεση του ΠΓΑΓ με τον πολυμορφισμό G153D. Αυτό οφείλεται στο γεγονός, καθώς αποδείχθηκε με δοκιμασία Anova (SPSS) (δίνοντας $p_{value}$< 0,001), ότι οι ασθενείς με ΠΓΑΓ που συμμετείχαν στη μελέτη δεν ήταν ηλικιακά ισοσκελισμένοι καθώς ορισμένοι ήταν κάτω των 60 χρόνων. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ είναι μία σύνθετη πάθηση με όψιμη-εμφάνιση οπότε η κλινική εκδήλωση της Ψ/Α μπορεί να ακολουθήσει την εμφάνιση του ΠΓΑΓ. Οφείλουμε να πούμε ότι απαιτείται βελτίωση της ομάδας είτε με απαλοιφή νεότερων γυναικών ή προσθήκη νέων δειγμάτων.

Ακόμα, ελέγχοντας τις ομάδες PEX, PEXG, POAG και CONTROLS ως προς την ποιοτική μεταβλητή του φύλου δεν παρατηρήθηκαν διαφορές παρά μόνο στις ομάδες POAG και CONTROLS με ποσοστά στους άντρες 56% και 42% αντίστοιχα (PEX: 35%, PEXG: 52%). Έγινε επιπλέον επεξεργασία και η διαφορά αυτή δεν έφτασε σε στατιστική σημαντικότητα (δοκιμασία $\chi^2$=0,077). Με βάση τον έλεγχο ομάδων που κάναμε, η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων συσχέτισης με τον γονότυπο θα ενισχυθεί εάν εξαιρεθούν από την ομάδα των υγιών μαρτύρων δείγματα που αντιστοιχούν σε νεώτερη ηλικία και σε γυναικείο φύλο.

Όπως προαναφέρθηκε για τον πολυμορφισμό G153D βρέθηκε σύνδεση και με το Ψ/Α.Σ και με το Ψ/Α.Γ ενώ με τον R141L μόνο με το Ψ/Α.Γ. Το γονίδιο βρέθηκε στην παρούσα μελέτη να συμβάλλει στην έναρξη και εξέλιξη της πάθησης Ψ/Α.Γ είτε μέσω του Ψ/ΑΣ με αυξημένη ΕΟΠ είτε ανεξαρτήτως του Ψ/ΑΣ, εφόσον το Ψ/Α.Γ είναι δυνατόν να εμφανιστεί πριν, ταυτόχρονα ή και μετά την εμφάνιση του Ψ/ΑΣ. Είναι γνωστό ότι η αυξημένη ΕΟΠ είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου για το γλαύκωμα αλλά ενοχοποιούνται και διάφοροι παθογενετικοί μηχανισμοί και υπάρχει συνδυασμός γονιδίων που προδιαθέτουν στο σύνδρομο και στο γλαύκωμα.

Ακόμα, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Kruskal-Wallis με σκοπό τον έλεγχο των ομάδων PEX, PEXG, POAG και CONTROLS σε σχέση με την ενδοφθάλμια πίεση (IOP). Από την επεξεργασία των δεδομένων προκύπτει ότι είναι λογικά τα αποτελέσματα ως προς την πίεση στους γλαυκωματικούς ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (υψηλότερη IOP) με εξαίρεση την ομάδα των ασθενών με PEX, οι οποίοι έχουν χαμηλότερη IOP σε σχέση με τους υγιείς. Γι' αυτό τον λόγο, εξετάστηκαν επιπλέον οι ομάδες PEX και CONTROLS ως προς την IOP με την Mann Whitney μη-παραμετρική δοκιμασία αλλά δεν έφτασε σε στατιστική σημαντικότητα αυτή η διαφορά ($p_{value}$=0,123).

Επίσης, στην ομάδα PEX υπάρχουν τρία δείγματα από τα 54 με γονότυπους G/A και G/T (ταυτόχρονα) στους πολυμορφισμούς G153D και R141L αντίστοιχα για τα οποία δεν

εξηγείται το σύνδρομο με βάση ομοζυγωτία G είτε στον ένα είτε και στους δύο πολυμορφισμούς. Δηλαδή εξηγείται σε ποσοστό δειγμάτων 94% έναντι του 6% . Ενώ στην ομάδα PEXG δεν συμβαίνει το ίδιο και το νόσημα εξηγείται για όλα τα δείγματα σε ποσοστό 100%.

Τέλος, απαιτείται μελλοντική έρευνα για να εξηγήσει τον τρόπο με τον οποίο το γονίδιο *LOXL1* οδηγεί στην ανάπτυξη Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ. Επειδή έχει γίνει αντιστροφή των αλληλίων κινδύνου σε ορισμένες εθνότητες (π.χ για τον πολυμορφισμό R141L το αλλήλιο κινδύνου ήταν το G σε κάποιους πληθυσμούς ενώ σε άλλους ήταν το T) δηλαδή υπάρχουν ασυνεπή γενετικά ευρήματα, αυτό υποδεικνύει ότι οι πολυμορφισμοί αυτοί δεν συνιστούν αιτιολογικούς παράγοντες για την ανάπτυξη του Ψ/Α.Γ. Οι DNA ισομορφές του *LOXL1* που συνδέονται με την Ψ/Α βρίσκονται όλες στη μη διατηρούμενη N-τελική αλληλουχία η οποία μπορεί να έχει ρυθμιστική λειτουργία. Αυτό το μέρος της πρωτεΐνης μπορεί να παίξει ρόλο στην κατεύθυνση της LOXL1 πρωτεΐνης σε τόπους της ελαστογένεσης, αλλά είναι απίθανο να επηρεάζει την καταλυτική της δράση. Είναι πιθανό οι ισομορφές που σχετίζονται με την Ψ/Α να βρίσκονται σε ανισσοροπία με άλλες αλλαγές της DNA αλληλουχίας που επηρεάζουν την έκφραση γονιδίου γι' αυτό είναι απαραίτητο να γίνουν επιπλέον μελέτες για το *LOXL1* σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης για να καθοριστεί εάν η μείωση του *LOXL1* σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης είναι υπεύθυνη γι'αυτή την κατάσταση. Επίσης, είναι δυνατόν οι ισομορφές που σχετίζονται με την Ψ/Α να επηρεάζουν την αλληλεπίδραση της LOXL1 με τις πρωτεΐνες με σταυροδεσμούς (σκαλωσιά) που απαιτούνται για την ελαστογένεση. Έτσι επιπλέον μοριακές μελέτες για τις επιπτώσεις αυτών των ισομορφών στην πρωτεολυτική επεξεργασία της LOXL1 ή στις αλληλεπιδράσεις με την τροποελαστίνη και τις microfibril-σχετιζόμενες πρωτεΐνες είναι απαραίτητες[187]. Τέλος, σε πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση των απλοτύπων με SNPs από τον υποκινητή του *LOXL1* με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ σε Καυκάσιο πληθυσμό στην Αμερική. Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι SNPs στην περιοχή του υποκινητή μπορεί να επηρεάσουν εύλογα την έκφραση του LOXL1 γονιδίου πιθανώς προκαλώντας μια μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας που μπορεί να προδιαθέτει στη νόσο[188]. Η μελέτη θα μπορούσε να επεκταθεί και στον τρίτο πολυμορφισμό rs2165241. Με την υπάρχουσα τεχνολογία και μεθόδους υπάρχει η δυνατότητα να δοθεί λύση για την αντιμετώπιση αυτής της κοινής, σοβαρής και ενδεχομένως ιάσιμης διαταραχής που αποτελεί την δεύτερη κατά σειρά αιτία τύφλωσης παγκοσμίως.

Απώτερος σκοπός είναι η πρώιμη διάγνωση και η καλύτερη θεραπευτική προσέγγιση. Εφικτός στόχος μπορεί να είναι η ανακάλυψη φαρμάκων που επεμβαίνουν σ'ένα αρχικό

στάδιο της πάθησης π.χ. με την παρεμπόδιση του σχηματισμού ή την αφαίρεση Ψ/Α υλικού πριν την ανάπτυξη γλαυκώματος.

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

| Αγγλικός όρος | Ελληνικός όρος |
|---|---|
| **fibrillopathia epitheliocapsularis** | ινιδοπάθεια του επιθηλίου του προσθίου περιφακίου (κάψας του φακού) |
| **phacodonesis** | φακοδόνηση |
| **corneal decompensation** | οίδημα του κερατοειδούς |
| **zonules** | ζίννειος ζώνη |
| **lens** | φακός |
| **pupil** | κόρη |
| **pupillary block** | κορικός αποκλεισμός |
| **suspensory ligaments** | κρεμαστήριοι σύνδεσμοι |
| **cataract** | καταρράκτης |
| **posterior synechiae** | οπίσθιες συνέχειες |
| **iris** | ίριδα |
| **pupillary margin** | κορικό χείλος |
| **anterior chamber** | πρόσθιος θάλαμος |
| **trabecular meshwork** | διηθητικός ηθμός |
| **cornea** | κερατοειδής |
| **conjunctiva** | επιπεφυκότας |
| **ciliary body** | ακτινωτό σώμα |
| **ciliary processes** | ακτινοειδείς προβολές |
| **vitreous body** | υαλοειδές |
| **optic disc** | οπτικός δίσκος |
| **peribulbar tissues** | περιοφθάλμιοι ιστοί |
| **aqueous humor** | υδατοειδές υγρό |
| **disc area** | εμβαδόν δίσκου |
| **cd ratio** | πηλίκο κοίλανσης δίσκου |
| **cup area** | εμβαδόν κοίλανσης |
| **cup volume** | όγκος κοίλανσης |
| **spikes** | κορυφές |
| **microsatellite markers** | μικροδορυφορικοί δείκτες |
| **clusterin** | κλαστερίνη |
| **mutation** | μετάλλαξη |
| **transition** | μετάπτωση |
| **transversion** | μεταστροφή |

| | |
|---|---|
| **point mutations** | Σημειακές μεταλλάξεις |
| **missense mutations** | παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις |
| **nonsense mutations** | μη νοηματικές μεταλλάξεις |
| **frameshift mutations** | μεταλλάξεις αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης |
| **silent mutations** | σιωπηρές μεταλλάξεις |
| **splicing mutations** | μεταλλάξεις ματίσματος |
| **promoter** | υποκινητής |
| **hereditary mutation** | κληρονομούμενη μετάλλαξη |
| **acquired or spontaneous** | επίκτητη ή αυθόρμητη μετάλλαξη |
| **somatic mutation** | σωματική μετάλλαξη |
| **wild-type** | φυσιολογικό αλληλόμορφο |
| **germline mutation** | μετάλλαξη γαμετικής σειράς |
| **melting curve analysis** | ανάλυση καμπύλων τήξης |
| **background phase** | φάση «υποβάθρου» ή φάση «θορύβου» |
| **plateau** | φάση «κορεσμού» |
| **log phase** | εκθετική φάση ή λογαριθμική φάση |
| **DNA Microarrays** | μικροσυστοιχίες Ολιγονουκλεοτιδίων DNA |
| **DNA sequencer** | μηχάνημα ανάλυσης αλληλουχίας DNA |
| **resolution** | ικανότητα διάκρισης |
| **gel-loading dye** | χρωστική πλήρωσης γέλης |
| **molecular weight marker** | δείκτης μοριακών βαρών DNA |
| **mismatch** | λάθος ζευγάρωμα βάσεων |
| **hybridization probe** | ανιχνευτής υβριδισμού DNA |
| **cycle sequencing** | Αντίδραση θερμικών κύκλων |
| **molecular Beacons** | «μοριακοί φάροι» |
| **autosampler tray** | αυτόματος δειγματολήπτης |
| **hyaline** | υαλίδωση |

# ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

| | |
|---|---|
| **Ψ/Α.Σ** | Ψευδοαποφολιδωτικό σύνδρομο |
| **Ψ/Α.Γ** | Ψευδοαποφολιδωτικό γλαύκωμα |
| **ΕΟΠ** | Ενδοφθάλμια πίεση |
| **Ψ/Α** | Ψευδοαποφολίδωση |
| **Ψ/Α υλικό** | Ψευδοαποφολιδωτικό υλικό |
| **ΠΓΑΓ** | Πρωτοπαθές γλαύκωμα ανοιχτής γωνίας |
| **Π.Θ.** | Πρόσθιος θάλαμος |
| **TGF- β1** | Transforming grow factor-β1 |
| **MAGP-1** | Microfibril associated- glycoprotein-1 |
| **PAS** | Periodic acid- Schiff- positive |
| **CLU** | Clusterin |
| **SNPs** | Single Nucleotide Polymorphisms |
| **LOXL1** | Lysyl oxidase- like 1(or homolog-1) |
| **APOE** | Apolipoprotein E |
| **MTHFR** | Μεθυλενοτετραϋδροφυλλική αναγωγάση |
| **AD** | Alzheimer disease |
| **SSCP** | Single Strand Conformation Polymorphism |
| **DGGE** | Denaturing Gradient Gel Electrophoresis |
| **TGGE** | Temperature Gradient Gel Electrophoresis |
| **RFLPs** | Restriction Fragment Length Polymorphism |
| **PTT** | Protein Truncation Test |
| **D-HPLC** | Denaturing High Performance Liquid |
| **q PCR** | Quantitative PCR |
| **NGS** | Next generation sequencing |
| **PNAs** | Peptide Nucleic Acids |
| **LNAs** | Locked Nucleic Acids |
| **COLD-PCR** | Co-amplification at Lower Temperature |
| **ASO** | Allele-Specific Oligonucleotides |
| **FRET** | Fluorescence Resonance Energy Transfer |
| **ddNTP** | Dideoxy nucleoside triphosphates |
| **PEX** | Pseudoexfoliation syndrome |
| **PEXG** | Pseudoexfoliation glaucoma |
| **POAG** | Primary open- angle glaucoma |
| **CCD** | charge- coupled device |

| | |
|---|---|
| **dNTPs** | Deoxy nucleoside triphosphates |
| **LED** | Light Emission Diode |
| **OR** | Odds ratio |
| **Tm** | Melting temperature |
| **CV** | Coefficient of variance |
| **AIC** | Akaike information criterion |

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ


1. Schlötzer-Schrehardt U, Dorfler S, Naumann GO. Immunohistochemical localization of basement membrane components in pseudoexfoliation material of the lens capsule. *Curr Eye Res* 1992;11:343-355.
2. Streeten BW, Li ZY, Wallace RN et al. Pseudoexfoliative fibriollopathy in visceral organs of a patient with pseudoexfoliation syndrome. *Arch Ophthalmol* 1992;110:1757-1762.
3. Naumann GOH, Schlötzer-Schrehardt U, Küchle M. Pseudoexfoliation syndrome for the comprehensive ophthalmologist: intraocular and systemic manifestations. *Ophthalmology* 1998;105:951-968.
4. Ringvold A. Epidemiology of the pseudoexfoliation syndrome. *Acta Ophthalmol Scand* 1999;77:371-375.
5. Ritch R, Schlötzer-Schrehardt U. Exfoliation syndrome. *Survey Ophthalmol* 2001;45:265-315.
6. Schlötzer-Schrehardt U, Naumann GOH. Ocular and systemic Pseudoexfoliation syndrome. *Am J Ophthalmol* 2006;141:921.
7. Lindberg JG. Clinical investigations on depigmentation of the pupillary border and translucency of the iris in cases of senile cataract and normal eyes in elderly persons. *Acta Ophthalmol* 1998;67:190 (Suppl.):1-96.
8. Stefaniotou M, Petroutsos G, Psilas K. The frequency of Pseudo exfoliation in a region of Grecce (Epirus). *Acta Ophthalmol* 1990;68(3):307-309.
9. Kozobolis VP, Papatzanaki M, Vlachonikolis IG. Epidemiology of pseudoexfoliation in the island of Crete (Greece). *Acta Ophthalmol Scand* 1997;75:726-729.
10. Ringvold A, Blika S, Elsas T. The prevalence of pseudoexfoliation in three separate municipalities of Middle-Norway. A preliminary report. *Acta Ophthalmol* 1987;182:17-20.
11. Ringvold A. Epidemiology of glaucoma in Northem Europe. *Eur J Ophthalmol* 1996;6:26-29.
12. Forsius H. Exfoliation syndrome in various ethnic populations. *Acta Ophthalmol* 1988;184:71-85.
13. Allingham RR, Loftsdottir M, Gottfredsdottir MS et al. Pseudoexfoliation syndrome in Icelandic familes. *Br J Ophthalmol* 2001;85:702-707.
14. Jonasson F, Damji KF, Arnarsson A et al. Prevalence of open-angle glaucoma in Iceland: Reykjavik Eye Study. *Eye* 2003;17:747-753.

**15.** Vesti E, Kivela T. Exfoliation syndrome and exfoliation glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 2000;19:345-368.

**16.** Bialasiewicz AA, Wali U, Shenoy R et al. Patients with secondary open-angle glaucoma in pseudoexfoliation (PEX) syndrome among a population with high prevalence of PEX: clinical findings and morphological and surgical characteristics. *Ophthalmologe* 2005;102:1064-1068.

**17.** Henry JC, Krupin T, Schmitt M et al. Long-term follow-up of pseudoexfoliation and the development of elevated intraocular pressure. *Ophthalmology* 1987;94:545-552.

**18.** Jeng S, Karger R, Hodge D et al. The risk of Glaucoma in Pseudoexfoliation Sydrome. *J Claucoma* 2007;16:117-121.

**19.** Ritch R, Schlötzer-Schrehardt U, Konstas AGP. Why is glaucoma associated with exfoliation syndrome? *Progress in Retinal and Eye Research* 2003;22:253-275.

**20.** Joannides T, Katsourakis N, Velissaropoulos P. Glaucoma capsulare. *Ophthalmologica* 1961;142:160-189.

**21.** Seland JH, Chylack LT. Ctataracts in the exfoliation syndrome (Fibrillopathia epitheliocapsularis). *Trans Ophthalmol Soc UK* 1982;102:375-379.

**22.** Schlötzer-Schrehardt U, Naumann GOH. An histopathologic study of zonular instability in pseudoexfoliation syndrome. *Am J Ophthalmol* 1994;118:730-743.

**23.** Futa R, Furuyoshi N. Phakodonesis in capsular glaucoma: A clinical and electron microscopic study. *Jpn J Ophthalmol* 1989;33:311-317.

**24.** Hietanen J, Kivela T, Vesti E et al. Exfoliation syndrome in patiens scheduled for cataract surgey. Acta Ophthalmol (Copenh) 1992;70:440-446.

**25.** Hirvela H, Luukinen H, Laatikainen L. Prevalence and risk factors of lens opacities in the elderly in Finland. A population based study. Ophthalmology 2000;102:108-117.

**26.** Prince AM, Ritch R. Clinical signs of the pseudoexfoliation syndrome. Ophthalmology 1986;93:803-807.

**27.** Kristensen P. Mydriasis-induced pigment liberation in the anterior chamber associated with acute rise in intraocular pressure open-angle glaucoma. Acta Ophthalmol (Copenh) 1965;43:714-724.

**28.** Krause U, Tarkkanen A. Cataract and pseudoexfoliation. A clinicopathological study. Acta Ophthalmol (Copenh) 1978;56:329-334.

**29.** Mapstone R. Pigment release. Br J Ophthalmol 1981;65:258-263.

**30.** Puska P, Vasara K, Harju Met al. Corneal thickness and corneal endothelium in normotensive subjects with unilateral exfoliation syndrome. Graefe' s Arch Clin Exp Ophthalmol 2000;238:659-663**.**

**31.** Sampaolesi R, Zarate J, Croxatto O. The chamber angle in exfoliation syndrome. Clinical and pathological findings. Acta Ophthalmol (Copenh) 1988;66 (Suppl.184):48-53.

**32.** Wishart PK, Spaeth GL, Poryzees EM. Anterior chamber angle in the exfoliation syndrome. *Br J Ophthalmol* 1985;69:103-107.

**33.** Puska P, Raitta C. Peripapillary atrophy in unilateral capsular glaucoma. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993;231:642-646.

**34.** Küchle M, Schlöltzer-Schrehardt U, Naumann G. Occurrence of pseudoexfoliative material in parabulbar structures in pseudoexfoliation syndrome. *Acta Ophthalmol* (Copenh) 1991;69:124-130.

**35.** Konstas AGP, Tsironi S, Ritch R. Current concepts in the pathogenesis and management of exfoliation syndrome and exfoliative glaucoma. *Comp Ophthalmol Update* 2006;7:131-141.

**36.** Ekström C. Elevated intraocular pressure and pseudoexfoliation of the lens capsule as risk factors for chronic open-angle glaucoma. A population-based five-year follow-up study. *Acta Ophthalmol* (Copenh) 1993;71:189-195.

**37.** Mitchell P, Wang JJ, Hourihan F. The relationship between glaucoma and pseudoexfoliation. The Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol* 1999;117:1319-1324.

**38.** Grodum K, Heijl A, Bengtssom B. Risk of glaucoma in ocular hypertension with and without pseudoexfoliation. *Ophthalmology* 2005;112:386-390.

**39.** Hovding G, Aasved H. Prognostic factors in the development of manifest open angle glaucoma. A long-term follow-up study of hypertensive and normotensive eyes. *Acta Ophthalmol* (Copenh) 1986;64:601-608.

**40.** Pohjanpelto P. Influence of exfoliation syndrome on prognosis in ocular hypertension > 25mmHg. A long-term follow-up. *Acta Ophthalmol* (Copenh) 1986;64:39-44.

**41.** Puska P. Unilateral exfoliation syndrome: Conversion to bilateral exfoliation and to glaucoma: A prospective 10-year follow-up study. *J Glaucoma* 2002;11:517-524.

**42.** Tomita G, Puska P, Raitta C. Interocular differences in optic disc configuration in the unilateral exfoliation syndrome. *Acta Ophthalmol* 1994;72:162-167.

**43.** Konstas AGP, Mantziris DA, Stewart WC. Diurnal intraocular pressure in untreated exfoliation and primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1997;115:182-185.

**44.** Aasved H. Intraocular pressure in eyes with and without fibrillopathia epitheliocapsularis (so- called senile pseudoexfoliation). *Acta Ophthalmol* (Copenh) 1971;9:601-610.

**45.** Hansen E, Sellevold Oj. Pseudoexfoliation of the lens capsule ll. Development of the exfoliation syndrome. *Acta Ophthalmol* (Copenh) 1969;47:161-173.

**46.** Hansen E, Sellevold Oj. Pseudoexfoliation of the lens capsule lll. Ocular tension in eyes with pseudoexfoliation. *Acta Ophthalmol* (Copenh) 1970;48:446-454.

**47.** Altintas Ö, Yüksel N, Karabas VL et al. Diurnal intraocular pressure variation in pseudoexfoliation syndrome. *Eur J Ophthalmol* 2004;14:495-500.

**48.** Gumus MK, Bozkurt B, Sonmez B et al. Diurnal variation of intraocular pressure and its correlation with retinal fiber analysis in Turkish population with exfoliation syndrome. *Graefe's Arvh Clin Exp Ophthalmol* 2006;244:170-176.

**49.** Konstas AGP, Tsatsos I, Kardasopoulos A et al. Preoperative features of patiens with exfoliation glaucoma and primary open-angle glaucoma. The AHERA study. *Acta Ophthalmol Scand* 1998;76:208-212.

**50.** Jonas JB, Papastathopoulos KI. Optic disk appearance in pseudo exfoliation syndrome*. Am J Ophthalmol* 1997;123:174-180.

**51.** Harju M. Exfoliation glaucoma: studies on intraocular pressure, optic nerve head morphometry, and ocular blood flow. *Acta Ophthalmol Scand* 2002;80:228-229.

**52.** Asano N, Schlötzer-Schrehardt U, Naumann GOH. A histopathologist study of iris changes in pseudoexfoliation syndrome. *Ophthalmology* 1995;102:1279-1290.

**53.** Mitchell P, Wang JJ, Smith W. Association of pseudoexfoliation syndrome with increased vascular risk. *Am J Ophthalmol* 1997;124:685-687.

**54.** Ritland JS, Egge K, Lydersen Set al. Exfoliative glaucoma and primary open-angle glaucoma: associations with death causes and comorbidity. *Acta Ophthalmol Scand* 2004;82:401-404.

**55.** Grodum K, Heijl A, Bengtsson B. Glaucoma and mortality. *Graefe's Arch Clin Exp Opthalmol* 2004;242:397-401.

**56.** Schumacher S, Schlötzer-Schrehardt U, Martus P et al. Pseudoexfoliation syndrome and aneurysms of the abdominal aorta. *Lancet* 2001;357:359-360.

**57.** Puustjärvi T, Blomster H, Kontkamen M et al. Plasma and aqueous humour levels of homocysteine in exfoliation syndrome. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004;242:749-754.

**58.** Leibovitch I, Kurtz S, Shemesh G et al. Hyperhomocystinemia in pseudoexfoliation glaucoma. *J Glaucoma* 2003;12:36-39.

**59.** Vessani RM, Ritch R, Liebmann JM et al. Plasma homocysteine is elevated in patiens with exfoliation syndrome. *Am J Ophthalmol* 2003;136:41-46.

**60.** Altintas Ö, Maral H, Yüksel N et al. Homocysteine and nitric oxide levels in plasma of patiens with pseudoexfoliation syndrome, pseudoexfoliation glaucoma, and primary open-angle glaucoma. *Graefe's Arch Clin Exp Opthalmol* 2005;243:1213-1217.

**61.** Cursiefen C, Hammer T, Küchle M et al. Pseudoexfoliation syndrome in eyes with ischemic central retinal vein occlusion. *Acta Ophthalmol Scand* 2001;79:476-478.

**62.** Schlötzer-Schrehardt U, Küchle M, Hofmann-Rummelt C et al. Latent TGF- β1 binding protein (LTBP-1): a new marker for intra and extraocular PEX deposits. *Klim Monatsbl Augenheilkd* 2000;216:412-419.

**63.** Morrison JC, Green WR. Light microscopy of the exfoliation syndrome. *Acta Ophthalmol* 1998;184 (Suppl): 5-27.

**64.** Shimizu T, Futa R. The fine structure of pigment epithelium of the iris in capsular glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1985;223:77-82.

**65.** Damji KF, Bains HS, Stefansson E et al. Is pseudoexfoliation syndrome inherited? A review of genetic and nongenetic factors and a new observation. *Ophthalmic Genetics* 1998;19:175-185.

**66.** Orr AC, Robitail JM, Price PA et al. Exfoliation syndrome: clinical and genetic features. *Ophthalmic Genet* 2001;22:171-185.

**67.** Aasved H: The frequency of fibrillopathia epitheliocapsularis (so-called senile exfoliation or pseudoexfoliation) in patients with open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol* (Copenh) 1971;49:194-210.

**68.** Streeten BW, Qi Y, Wallace RN. Comparison of components in pseudoexfoliation fibers and Alzheimers disease plaques [abstract]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(Suppl):S90.

**69.** Barbujani G, Jacquez GM, Ligi L. Diversity of some gene frequencies in European and Asian populations. V. Steep multilocus clines. *Am J Hum Genet* 1990;47:867-875.

**70.** Meretoja J, Tarkkanen A. Occurrence of amyloid in eyes with pseudoexfoliation. *Ophthalmic Res* 1977;9:80-91.

**71.** Koliakos GG, Konstas AG, Triantos A, Ritch R. Increased growth factor activity in the aqueous humour of patiens with exfoliation syndrome. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000;238:491-495.

**72.** Schlötzer-Schrehardt U, Von de Mark K, Sakai LYet al. Increased extracellular deposition of fibrillin- containing fibrils in pseudoexfoliation syndrome. *Invest Ophthalmol* 1997;38:970-984.

**73.** Damji KF, Bains HS, Amjadi K et al. Familial occurrence of pseudoexfoliation in Canada. *Can J Ophthalmol* 1999;34:257-265.

**74.** Hewitt AW, Sharma S, Burdon KP et al. Ancestral *LOXL1* variants are associated with pseudoexfoliation in Caucasian Australians but with markedly lower penetrance than in Nordic people. *Hum Mol Genet* 2008;17:710-716.

**75.** Gottfredsdottir MS, Sverrisson T, Musch DC et al. Chronic open-angle glaucoma and associated ophthalmic findings in monozygotic twins and their spouses in Iceland. *J Glaucoma* 1999;8:134-139.

**76.** Kozobolis VP, Detorakis ET, Sourvinos G et al. Loss of heterozygosity in pseudoexfoliation syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1255-1260.

**77.** Lemmela S, Forsman E, Sistonen P et al. Genomwide scan of exfoliation syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4136-4142.

**78.** Thorleifsson G, Magnusson KP, Sulem P et al. Common sequence variants in the LOXL1 gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science* 2007;317:1397-1400.

**79.** Aasved H. Study of relatives of persons with fibrillopathia epitheliocapsularis (pseudoexfoliation of the lens capsule). *Acta Ophthalmol* (Copenh) 1975;53:879-886.

**80.** Tarkkanen A, Voipio H, Koivusalo P. Family study of pseudoexfoliation and glaucoma. *Acta Ophthalmol* (Copenh) 1965;43:679-683.

**81.** Klouman OF. Pseudoexfoliation in ophthalmic practice. *Acta Ophthalmol* (Copenh) 1967;45:822-828.

**82.** Sood GC, Sofat BK, Mehrotra SK et al. Capsular exfoliation syndrome. *Br J Ophthalmol* 1973;57:120-124.

**83.** Forsman E, Cantor R, Lu A et al. Exfoliation Syndrome: prevalence and inheritance in a subisolate of the Finnish population. *Acta Ophthalmol* 2007;85:500-507.

**84.** Zenkel M, Pöschl E, Von der Mark K et al. Differential gene expression in pseudoexfoliation syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:3742-3752.

**85.** Ovodenko B, Rostango A, Neubert TA et al. Proteomic analysis of exfoliation deposits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:1447-1457.

**86.** Sharma S, Chataway T, Burdon KP et al. Identification of LOXL1 protein and Apolipoprotein E as components of surgically isolated pseudoexfoliation material by direct mass spectrometry. *Exp Eye Res* 2009;89:479-485.

**87.** Burdon KP, Sharma S, Hewitt AW et al. Genetic analysis of the clusterin gene in pseudoexfoliation syndrome. *Mol Vis* 2008;14:1727-1736.

**88.** Krumbiegel M, Pasutto F, Mardin CY et al. Exploring functional candidate genes for genetic association in german patients with pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2796-2801.

**89.** Ritland JS, Utheim TP, Utheim OA et al. Effects of APOE and CHRNA4 genotypes on retinal nerve fibre layer thickness at the optic disc and on risk for developing exfoliation syndrome. *Acta Ophthalmol Scand* 2007;85:257-261.

**90.** Yilmaz A, Tamer L, Ates NA et al. Effects of apolopoprotein E genotypes on the development of exfoliation syndrome. *Exp Eye Res* 2005;80:871-875.

**91.** Fan BJ, Pasquale L, Grosskreutz CL et al. DNA sequence variants in the *LOXL1* gene are associated with pseudoexfoliation glaucoma in a US clinic-based population with broad ethnic diversity. *BMC Med Genet* 2008;9:5.

**92.** Challa P, Schmidt S, Liu Y et al. Analysis of LOXL1 polymorphisms in a United States population with pseudoexfoliation glaucoma. *Mol Vis* 2008;14:146-149.

**93.** Ramprasad VL, George R, Soumittra N et al. Association of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the *LOXL1* gene with pseudoexfoliation syndrome in India. *Mol Vis* 2008;14:318-322.

**94.** Aragon-Martin JA, Ritch R, Liebmann J et al. Evaluation of *LOXL1* gene polymorphisms in exfoliation syndrome and exfoliation glaucoma. *Mol Vis* 2008;14:533-541.

**95.** Mossbock G, Renner W, Faschinger C et al. Lysyl oxiadse-like protein 1 (*LOXL1*) gene polymorphisms and exfoliation glaucoma in a Central European population. *Mol Vis* 2008;14:857-861.

**96.** Mori K, Imai K, Matsula A et al. *LOXL1* genetic polymorphisms are associated with exfoliation glaucoma in the Japanese population. *Mol Vis* 2008;14:1037-1040.

**97.** Fuse N, Miyazawa A, Nakazawa T et al. Evaluation of *LOXL1* polymorphisms in eyes with exfoliation glaucoma in Japanese. *Mol Vis* 2008;14:1338-1343.

**98.** Gong WF, Chiang SW, Chen LJ et al. Evaluation of *LOXL1* polymorphisms in primary open-angle glaucoma in southern and northern Chinese. *Mol Vis* 2008;14:2381-2389.

**99.** Hayashi H, Gotoh N, Ueda Y et al. Lysyl oxidase-like 1 polymorphisms and exfoliation syndrome in the Japanese population. *Am J Ophthalmol* 2008;145:582-585.

**100.** Lemmela S, Forsman E, Onkamo P et al. Association of *LOXL1* gene with Finnish exfoliation syndrome patiens. *J Hum Genet* 2009;54:289-297.

**101.** Pasutto F, Krumbiegel M, Mardin CY et al. Association of LOXL1 common sequence variants in German and Italian patiens with pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma. *Invest Ophthalmol* Vis Sci 2008;49:1459-1463.

**102.** Sklavounou E, Economou-Petersen E, Karadima G et al. Apolipoprotein E polymorphism in the Greek population. *Clin Genet* 1997;52:216-218.

**103.** Corbo RM, Scacchi R, Mureddu L et al. Apolipoprotein E polymorphism in Italy investigated in native plasma by a simple polyacrylamide gel isoelectric focusing technique. Comparison with frequency data of other European populations. *Ann Hum Genet* 1995;59:197-209.

**104.** Krumbiegel M, Pasutto F, Mardin CY et al. Apolipoprotein E genotypes in pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma. *J Glaucoma* 2010;19:561-565.

**105.** Stritmatter WJ, Saunders AM, Schmechei D et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*. 1993;90:1977-1981.

**106.** Castano EM, Prelli FC, Frangione B. Apolipoprotein E and amyloidogenesis. *Lab Invest* 1995;73:457-460.

**107.** Prasher VP, Sajith SG, Ress SD et al. Significant effect of APOE epsilon 4 genotype on the risk of dementia in Alzheimer's disease and mortality in persons with Down syndrome. *Int J Geriatr Psychiatry* 2008;23:1134-1140.

**108.** Klaver CC, Kliffen M, Van Duijn CM et al. Genetic Association of apolipoprtotein E with age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 1998;63:200-206.

**109.** Baird PN, Guida E, Chu DT et al. The epsilon2 and epsilon4 allels of the apolipoprotein gene are associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1311-1315.

**110.** Utheim OA, Ritland JS, Utheim TP et al. Apolipoprotein E genotype and risk for development of cataract and age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol* 2008;86:401-403.

**111.** Al-Dabbagh NM, Al-Dohayan N, Arfin M et al. Apolipoprotein E polymorphisms and primary glaucoma in Saudis. *Mol Vis* 2009;15:912-919.

**112.** Yuan HP, Xiao Z, Yang BB. A study on the association of apolipoprotein E genotypes with primary open-angle glaucoma and primary angle-closure glaucoma in northeast of China. *Zhonghua Yam Ke Za Zhi* 2007;43:416-420.

**113.** Jia LY, Tam PO, Chiang SW et al. Multiple gene polymorphisms analysis revealed a different profile of genetic polymorphisms of primary open-angle glaucoma in northern Chinese. *Mol Vis* 2009;15:89-98.

**114.** Zetterberg M, Tasa G, Palmer MS et al. Apolipoprotein E polymorphisms in patients with primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2007;143:1059-1060.

**115.** Linner E, Popovic V, Gottfries CG et al. The exfoliation syndrome in cognitive impairment of cerebrovascular or Alzheimer's type. *Acta Ophthalmol Scand* 2001;79:283-285.

**116.** Janciauskiene S, Krakau T. Alzheimer's peptide: a possible link between glaucoma, exfoliation syndrome and Alzheimer's disease. *Acta Ophthalmol Scand* 2001;79:328-329.

**117.** Berlau J, Lorenz P, Beck R et al. Analysis of aqueous humour proteins of eyes with and without pseudoexfoliation syndrome. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001;239:743-746.

**118.** Li ZY, Streeten BW, Yohai N. Amyloid P protein in pseudoexfoliative fibrillopathy. *Curr Eye Res* 1989;8:217-227.

**119.** Benjamin R, Leake A, Ince PG et al. Effects of apolipoprotein E genotype on cortical neuropathology in senile dementia of the Lewy body and Alzheimer's disease. *Neurodegeneration* 1995;4:443-448.

**120.** Arai H, Muramatsu T, Higuchi S et al. Apolipoprotein E gene in Parkinson's disease with or without dementia. *Lancet* 1994;344:889.

**121.** Schupf N, Kapell D, Lee JH et al. Onset of demetia is associated with apolipoprotein E epsilon4 in Down's syndrome. *Ann Neurol* 1996;40:799-801.

**122.** Wisniewski T, Frangione B. Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett* 1992;135:235-238.

**123.** Antoniadi T, Hatzis T, Kroupis C et al. Prevalence of factor V Leiden, Prothrombin G20210A, and MTHFR C677T Mutations in a Greek population of Blood Donors. *Am J Hematology* 1999;61:265-267.

**124.** Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H et al. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *NEJM* 1997;337:230-236.

**125.** Perry IJ, Refsum H, Morris RW et al. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet* 1995;346:1395-1398.

**126.** Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *NEJM* 1998;338:1042-1050.

**127.** Axer-Siegel R, Bourla D, Ehrlich R et al. Association of neovascular agerelated macular degeneration and hyperhomocysteinemia. *Am J Opthalmol* 2004;137:84-89.

**128.** Goldstein M, Leibovitch I, Yeffimov I et al. Hyperhomocysteinemia in patients with diabetes mellitus and without diabetic retinopathy. *Eye* 2004;18:460-465.

**129.** Flammer J, Orgul S, Costa VP et al. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 2002;21:359-393.

**130.** Lee DJ, Gomez-Marin O, Lam BL et al. Glaucoma and survival: the national health interview survey 1986-1994. *Ophthalmology* 2003;110:1476-1483.

**131.** Tokunaga T, Kashiwagi K, Tsumura T et al. Association between nocturnal blood pressure reduction and progression of visual field defect in patients with primary open-angle glaucoma or normal-tension glaucoma. *Jpn J Ophthalmol* 2004;48:380-385.

**132.** Tyagi SC, Lominadze D, Roberts AM. Homocysteine in microvascular endothelial cell barrier permeability. *Cell Biochem Biophys* 2005;43:37-44.

**133.** Moore P, El-sherbeny A, Roon P et al. Apoptotic cell death in the mouse retinal ganglion cell layer is induced in vivo by the excitatory amino acid homocysteine. *Exp Eye Res* 2001;73:45-57.

**134.** Bleich S, Junemann A, Von Ahsen N et al. Homocysteine and risk of open-angle glaucoma. *J Neural Transm* 2002;109:1499-1504.

**135.** Bleich S, Roedl J, Von Ahsen N et al. Elevated homocysteine levels in aqueous humor of patients with pseudoexfoliation glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2004;138:162-164.

**136.** Wang G, Medeiros FA, Barshop BA et al. Total plasma homocysteine and primary open angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2004;137:401-406.

**137.** Wierzbicki AS. Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Diad Vasc Dis Res* 2007;4:143-150.

**138.** Roedl JB, Bleich S, Reulbanch U et al. Homocystein in tear fluid of patients with pseudoexfoliation glaucoma. *J Glaucoma* 2007;16:234-239.

**139.** Leblhuber F. Walli J. Artner-Dworzak E. Hyperhomocysteinemia in dementia. *J Neural Transm* 2000;107:1469-1474.

**140.** Seshadri S, Beiser A, Selhub J. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002;346:476-483.

**141.** Junemann AG, Von Ahsen N, Reulbanch U et al. C677T variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2005;139:721-723.

**142.** Bao JF, Chen T, Grosskreutz C et al. Lack of association of polymorphisms in homocysteine metabolism genes with pseudoexfoliation syndrome and glaucoma. *Mol Vis* 2008;14:2484-2491.

**143.** Clement C, Goldberg I, Healey P et al. Plasma homocysteine, MTHFR gene mutation and Open-angle glaucoma. *Journal of glaucoma* 2009;18(1):73-78.

**144.** Lucero HA, Kagan HM. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:2304-2316.

**145.** Thomassin L, Werneck CC, Broekelmann T et al. The pro-regions of lysyl oxidase and lysyl oxidase-like 1 are required for deposition onto elastic fibers. *J Biol Chem* 2005;280:42848-42855.

**146.** Hirai M, Ohbayashi T, Horiguchi M et al. Fibulin-5/ DANCE has an elastogenic organizer activity that is abrogated by proteolytic cleavage in vivo. *J Cell Biol* 2007;176:1061-1071.

**147.** Liu X, Zhao Y, Gao J et al. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet* 2004;36:178-182.

**148.** Decitre M, Gleyzal C, Raccurt M et al. Lysyl oxidase- like protein localizes to sites of de novo fibrinogenesis in fibrosis and in the early stromal reaction of ductal breast carcinomas. *Lab Invest* 1998;78:143-151.

**149.** Hayashi K, Fong KSK, Mercier F et al. Comparative immunocytochemical localization of lysyl oxidase (LOX) and the lysyl oxydase-like (LOXL) proteins: changes in the expression of *LOXL* during development and growth of mouse tissues. *J Mol Histol* 2004;35:845-855.

**150.** Urban Z, Agapova O, Hucthagowder V et al. Population defferences in elastin maturation in optic head tissue and astrocyres. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:3209-3215.

**151.** Schlötzer-Schrehardt U, Pasutto F, Sommer P et al. Genotype-Correlated Expression of Lysyl Oxidase-like 1 in ocular tissues of patients with pseudoexfoliation syndrome/ glaucoma and Normal Patiens. *Am J Ophthalmol* 2008;173:1724-1735.

**152.** Hollö G, Gal A, Kothy P et al. *LOXL1* gene sequence variants and vascular disease in exfoliation syndrome and exfoliative glaucoma. J Glaucoma 2010 in press.

**153. Liu** Y, Schmidt S, Qin X et al. Lack of association between *LOXL1* variants and primary open- angle glaucoma in three different populations. Inv Ophthalmol Vis Sci 2008;49:3465-3468.

**154.** Rao KN, Ritch R, Dorairaj SK et al. Exfoliation syndrome and exfoliation glaucoma-associated *LOXL1* variations are not involved in pigment dispersion syndrome and pigmentary glaucoma. *Mol Vis* 2008;14:1254-1262.

**155.** Chakrabarti S, Rao KN, Kaur I et al. The *LOXL1* gene variations are not associated with primary open- angle and primary angle- closure glaucomas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2343-2347.

**156.** Challa P. Genetics of pseudoexfoliation syndrome. *Currrent Opinion in Ophthalmology Issue* 2009;20:88-91.

**157.** Fingert JH, Alward WL, Kwon YH et al. *LOXL1* mutations are associated with exfoliation syndrome in patients from the Midwestern United States. *Am J Ophthalmol* 2007;144:974-975.

**158.** Williams SE, Whigham BT, Liu Y et al. Major *LOXL1* risk allele is reversed in exfoliation glaucoma in a South African population. *Mol Vis* 2010;16:705-712.

**159.** Abramsson A, Landgren S, Zetterberg M et al. No association of *LOXL1* gene polymorphisms with Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 2011;13:160-166.

**160.** Λιανίδου Ε.Σ. Τεχνικές Μοριακής Διαγνωστικής. Αθήνα, 2009.

**161.** Myers R.M, Fischer S.G. et al. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1985;13(9):3111-3129.

**162.** Warteii R.M, Hosseini S.H, Moran C.P. Detecting base pair substitutions in DNA fragments by temperature-gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1990;18:2699-2705.

**163.** Maxam A.M, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;74(2): 560-564.

**164.** Sanger F, Nicklen S, Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5463-5467.

**165.** Nyren P, Lundin A. Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Anal Biochem* 1985;151(2): 504-509.

**166.** Next-generation genome, Editorial. *Nat Methods* 2008; 5(12):989.

**167.** Nielsen P.E, Egholm M et al. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 1991; 254(5037):1497-1500.

**168.** Li J, Wang L et al. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat Med* 2008;14(5): 579-584.

**169.** Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988; 60(20);2299-2301.

**170.** Wittwer C.T, Reed G.H et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 2003;49(6 Pt 1):853-860.

**171.** Schmittgen T.D. Real-Time Quantitative PCR. *Methods* 2001;25:383-385.

**172.** Burt C.A, Ashwood E.R, Bruns D.E. *Tietz Textbook of Clinical chemistry and molecular diagnostics* 2006; 4:1393-1445.

**173.** Evrard A, Boulle N, Lutfalla G.S et al. Nanoscience: Nanobiotechnology and Nanobiology. *Real Time PC*R 2010;15:845-869.

**174.** Kaltenboeck B, Wang C. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics*. Adv Clin Chem* 2005;40:219-59.

**175.** Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27(2-3):95-125.

**176.** Kroupis C, Christopoulos K, Devetzoglou M et al. Asymmetric real-time PCR detection of BRCA1 5382insC mutation by melting curve analysis in the LightCycler. *Clin Chim Acta* 2008;390(1-2):141-4.

**177.** Lyon E, Wittwer CT. LightCycler technology in molecular diagnostics. *J Mol Diagn* 2009;11(2): 93-101.

**178.** Boland E.J, Pillai A et al. Automation of the Maxam-Gilbert chemical sequencing reactions. *Biotechniques* 1994;16(6):1088-5.

**179.** Church G.M, Gilbert W. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(7):1991-1995.

**180.** Ferraboli S, Negri R et al. One-lane chemical sequencing of 3'-fluorescent-labeled DNA. *Anal Biochem* 1993;214(2):566-570.

**181.** Ornstein D.L.&.K.M.A. Sequencing DNA using $^{35}$S-labeling: a troubleshooting guide, *BioTechniques* 1985.

**182.** Σχίζα Χ. Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην υψηλής-διακριτικότητας ανάλυση καμπυλών τήξης DNA (HRMA) ΚΑΙ ARMS-PCR. Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης στην Κλινική Χημεία, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2011.

**183.** Πουμπουρίδου Ν. Ανίχνευση πολυμορφισμών και μεταλλάξεων στο γονίδιο PALB2 σε BRCA αρνητικούς Έλληνες ασθενείς με κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών. Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης στην Κλινική Χημεία, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2009.

**184.** Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2008; 26(10):1135-1145.

**185.** Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215.

**186.** Sole X, Guino E, Valls J et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. Bioinformatics 2006;22:1928-1929.

**187.** Kim S, Kim Y. Variants in *LOXL1* associated with exfoliation glaucoma do not affect amine oxidase activity. *Molecular Vision* 2012;18:265-270.

**188.** Fan B, Pasquale LR, Rhee D et al. *LOXL1* promoter haplotypes are associated with exfoliation syndrome in a U.S. Caucasian population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(5):2372-8.