



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΧΗΜΕΙΑΣ- ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΜΑ:

**«Ανίχνευση νέων πολυμορφισμών για την Ηλικιακή Εκφύλιση Ωχράς Κηλίδας
στον Ελληνικό πληθυσμό»**

ΣΑΡΛΗ ΑΝΤΩΝΙΑ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ

2016



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΧΗΜΕΙΑΣ- ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΜΑ:

**«Ανίχνευση νέων πολυμορφισμών για την Ηλικιακή Εκφύλιση Ωχράς Κηλίδας
στον Ελληνικό πληθυσμό»**

ΣΑΡΛΗ ΑΝΤΩΝΙΑ

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΑΠΡΙΛΙΟΣ

2016

**ΘΕΜΑ: «Ανίχνευση νέων πολυμορφισμών για την Ηλικιακή Εκφύλιση Ωχράς
Κηλίδας στον Ελληνικό πληθυσμό»**

ΣΑΡΛΗ ΑΝΤΩΝΙΑ

A.M :240012

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Χρήστος Κρούπης, Επίκουρος Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Χρήστος Κρούπης, Επίκουρος Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Ευαγγελία- Μαρία Μόσχου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Α΄ Πανεπιστημιακή Οφθαλμολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας-Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 12 ΑΠΡΙΛΙΟΥ 2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

Πλήθος γονιδίων έχουν ενοχοποιηθεί για τη συσχέτισή τους με την ΗΕΩΚ. Πρόκειται κυρίως για γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του ανοσοποιητικού συστήματος και ιδίως της φυσικής ανοσίας, πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων, την αναδιαμόρφωση του εξωκυττάριου στρώματος, το πρωτεολυτικό σύστημα ουβικιτίνης και την απόκριση στο οξειδωτικό στρες. Πολύ ισχυρή συσχέτιση έχει διαπιστωθεί στην Καυκάσια φυλή για τον πολυμορφισμό A69S (rs.10490924) στο γενετικό τόπο *LOC387715* της χρωμοσωμικής περιοχής 10q26, όπου εδράζεται το γονίδιο *ARMS2*. Εκτός όμως από το προαναφερόμενο γονίδιο, στη μελέτη αυτή εξετάζεται και η συσχέτιση και με άλλα γονίδια, όπως είναι το *CD14*, για το οποίο δεν έχει υπάρξει άλλη σχετική βιβλιογραφική αναφορά και το *TLR4*. Και τα δύο αυτά γονίδια εμπλέκονται στο σύστημα της φυσικής ανοσίας, και σε πλήθος φλεγμονωδών παθήσεων. Πιο συγκεκριμένα εξετάζεται ο πολυμορφισμός C(260T), (rs.2569190) στον γενετικό τόπο *LOC929* για το γονίδιο *CD14* στη χρωμοσωματική περιοχή 5q31.1, ο οποίος επηρεάζει την mRNA παραγωγή του καθώς και οι πολυμορφισμοί Asp299Gly (rs.4986790) και Thr399Ile (rs.4986791) στον γενετικό τόπο *LOC 7099* στη χρωμοσωματική περιοχή 9q33.1 για το γονίδιο *TLR4*, οι οποίοι επηρεάζουν τη σύνδεση του *TLR4* με το LPS των Gram(-) βακτηρίων.

Μέθοδοι: Σε 120 ασθενείς με την υγρή μορφή της ΗΕΩΚ και σε 103 υγιείς μάρτυρες επιλεγμένων κατόπιν οφθαλμολογικής αξιολόγησης και συλλογής κλινικών δεδομένων, απομονώθηκε DNA από περιφερικό αίμα, μετά από έγγραφη συγκατάθεση. Έγινε εφαρμογή της PCR-RFLP μεθοδολογίας για τη γονοτύπωση του πολυμορφισμού A69S, (g.5270G>T) του γονιδίου *ARMS2*, του πολυμορφισμού C(260T), (g.5371T>C) για το γονίδιο *CD14* και των πολυμορφισμών Asp299Gly (g.13843A>G) και Thr399Ile (g.14143C>T) για το γονίδιο *TLR4*. Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο αναφοράς, DNA Sequencing. Επίσης έγινε προσπάθεια

ανάπτυξης νέας μεθοδολογίας Real-Time PCR και Υψηλής διακριτικής ικανότητας ανάλυσης καμπυλών τήξης (High Resolution Melting curve Analysis, HRMA) στο RotorGene QMDx για τον πολυμορφισμό Asp299Gly του γονιδίου *TLR4* και σύγκρισης των δυο μεθοδολογιών PCR-RFLP και HRMA. Χρησιμοποιήθηκαν τα υπολογιστικά προγράμματα SNPStats και SPSS για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Αποτελέσματα: Εφαρμόστηκε PCR-RFLP μεθοδολογία γονοτύπωσης για τους πολυμορφισμούς A69S, C260T, Asp299Gly και Thr399Ile και τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με τη μέθοδο αναφοράς DNA Sequencing. Προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση για τους πολυμορφισμούς A69S, Asp299Gly και Thr399Ile στα γονίδια *ARMS2* και *TLR4* με (OR=2,38, p=0,0017), (OR=4,40, p=0,01) (OR=5,61, p= 0,0088) αντίστοιχα. Η συσχέτιση για τον πολυμορφισμό C260T του γονιδίου *CD14* δεν έφτασε σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας. Αναπτύχθηκε ταχεία μεθοδολογία HRMA για τον πολυμορφισμό Asp299Gly του γονιδίου *TLR4*. Συσχέτιση της νόσου και των γονοτύπων με τους περισσότερους περιβαλλοντικούς και κλινικούς παράγοντες δεν διαπιστώθηκε, εκτός με το γλαύκωμα και τον διαβήτη που φάνηκε να είναι προστατευτικοί παράγοντες.

Συμπεράσματα: Επιβεβαιώθηκε ότι ο πολυμορφισμός A69S/*ARMS2* έχει στατιστικά σημαντική και ισχυρή συσχέτιση με την ασθένεια στον ελληνικό πληθυσμό. Για πρώτη φορά μελετήθηκε η πιθανή συσχέτιση μεταξύ των C(260T), Asp299Gly, Thr399Ile πολυμορφισμών και της ασθένειας HEΩΚ στον ελληνικό πληθυσμό. Η μελέτη μας απέτυχε να βρει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο C(260T) πολυμορφισμό του γονιδίου *CD14*, αλλά ανιχνεύθηκε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στους Asp299Gly, Thr399Ile πολυμορφισμούς του γονιδίου *TLR4* και της HEΩΚ. Αν και βρέθηκε αυτή η συσχέτιση για αυτούς τους πολυμορφισμούς, η μελέτη πρέπει να επιβεβαιωθεί και σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων εξαιτίας της σπανιότητας των ετεροζυγωτών αυτών των πολυμορφισμών. Όσον αφορά τη σύγκριση των δύο μεθόδων, παρατηρήσαμε ότι η Υψηλής διακριτικής ικανότητας μέθοδος υστερεί σε ειδικότητα, σε σχέση με την PCR-RFLP λόγω της ύπαρξης πολλαπλών DNA ελάσσονων παραλλαγών που εντοπίζονται στο ενισχυθέν γονιδιακό τμήμα.

ABSTRACT

Introduction: Age-related macular degeneration (AMD) is a multifactorial and degenerative disorder of the human eye which affects patients over 50 years of age and can lead to severe loss of central vision. The histological hallmark of AMD are small subretinal deposits, called drusen. Clinically, two forms of ARMD are recognized: the dry form, which affects 80% of the patients and the wet form which affects the remaining 20%. The causes of the disease are not fully understood, but it is believed that genetic and environmental factors, such as smoking, are involved.

A significant number of genes have been correlated with AMD. Mostly they are genes which encode proteins of the immune system and most remarkably of the innate immunity, proteins which participate in lipid metabolism, extracellular matrix remodeling, ubiquitin proteolytic system and response to oxidative stress. A strong association has been established in Caucasians for the A69S (rs.10490924) polymorphism for the genetic locus *LOC387715* in *ARMS2* gene in chromosomal region 10q26. Besides the aforementioned gene, in this study other genes are also being investigated such as *CD14* (with no previous literature report) and *TLR4*. Both genes are involved in the innate immune system and in several inflammatory diseases. More specifically, C260T polymorphism (rs.2569190) for the genetic locus *LOC929* in region 5q31.1, which affects its mRNA production and polymorphisms Asp299Gly (rs.4986790), Thr399Ile (rs.4986791) for the genetic locus *LOC 7099* in region 9q33.1, affecting TLR4's binding with the LPS of Gram(-) bacteria are examined.

Methods: In a cohort study of 120 patients, with the wet form of AMD, and 103 healthy controls selected after ophthalmologic evaluation and their clinical data collection, DNA was isolated from blood samples after signed informed consent. PCR-RFLP methodology was applied in order to genotype the A69S, (g.5270G>T) polymorphism in *ARMS2* gene, the C(260T), (g.5371T>C) polymorphism in *CD14* gene and the Asp299Gly, (g.13843A>G) and Thr399Ile, (g.14143C>T), polymorphisms in *TLR4* gene. The results were verified with the gold standard method, DNA Sequencing. Also there was an attempt to develop a novel methodology of Real-Time PCR and High resolution melting curve analysis (HRMA) in the RotorGene QMDx instrument for the polymorphism Asp299Gly in *TLR4* gene and to compare the two methodologies (PCR-RFLP and HRMA). For the statistical analysis of the results, SPSS and SNPStats software packages were used.

Results: PCR-RFLP methodology was applied for the genotyping of A69S, C260T, Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and the results were confirmed with the reference method of DNA

sequencing. Statistically significant association was detected between A69S, Asp299Gly and Thr399Ile SNPs in *ARMS2* and *TLR4* genes and AMD with (OR=2.38, p=0.0017), (OR=4.40, p=0.01) (OR=5.61, p= 0.0088) for each one. The association for C260T SNP in *CD14* gene did not reach statistical significance. A rapid assay was developed for SNP Asp299Gly in *TLR4* gene. No statistically significant association was found between the genotypes and the environmental and clinical parameters, except for glaucoma and diabetes, that seem to have a protective role against the disease.

Conclusions: The A69S SNP was confirmed to be strongly and statistically associated with AMD in the Greek population. This study investigated for the first time the possible association between C(260T), Asp299Gly, Thr399Ile SNPs and AMD in the Greek population. Our study failed to show a statistically significant association between SNP in *CD14* and AMD, but an association between Asp299Gly, Thr399Ile SNPs in *TLR4* and AMD was detected. However, the study must be replicated in further studies with larger samples due to the rarity of heterozygotes for these SNPs. Concerning to the comparison of the two methodologies we noted that the HRMA method lacks specificity, due to the presence of several variant minor alleles that exist in the amplified gene segment.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία διπλώματος ειδίκευσης εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας του ΑΤΤΙΚΟΝ Π.Γ.Ν, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης Κλινικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ κ. Χρ. Κρούπη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όσους συνέβαλαν στη διεκπεραίωση αυτής της εργασίας, ξεκινώντας από τον Επίκουρο Καθηγητή Χρ. Κρούπη. Τον ευχαριστώ θερμά για το συνεχές ενδιαφέρον, τις συμβουλές του και τη στήριξή του και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Ευχαριστώ επίσης την καθηγήτρια Ε. Λιανίδου για την ανάθεση ενός τόσο ενδιαφέροντος θέματος με σημαντικές δυνατότητες περαιτέρω εξέλιξης. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ Μόσχου που συνέβαλε στη συλλογή των δειγμάτων και που δέχτηκε να είναι στην τριμελή επιτροπή.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια Ιατρικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας κ. Π. Μουτσάτσου-Λαδικού και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Κλινικής Βιοχημείας του ΑΤΤΙΚΟΝ Π.Γ.Ν για την φιλοξενία στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ τον Δ/τη Γ. Κίτσο της Πανεπιστημιακής Οφθαλμολογικής Κλινικής των Ιωαννίνων και την Αναπλ. Καθηγήτρια Μ. Στεφανιώτου για τη συμβολή τους στη συλλογή των δειγμάτων.

Ευχαριστώ την Διδάκτορα του Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ κ. Νικ. Πουμπουρίδου για την συνεργασία, τη βοήθεια και την καθοδήγηση καθόλη την διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής, καθώς και τη Μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαρία Λάγιου για την υποστήριξη και τη συνεργασία στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας του ΑΤΤΙΚΟΝ.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την αμέριστη ηθική συμπαράσταση, την κατανόηση και την υπομονή τους. Τους ευχαριστώ που είναι πάντα δίπλα μου, δίνοντάς μου δύναμη, και που με ενθαρρύνουν.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περιεχόμενα

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο : Κλινική Θεώρηση της Ηλικιακής Εκφύλισης Ωχράς Κηλίδας.....	1
1.1 Ορισμός- Επιδημιολογία	1
1.2 Στοιχεία Ανατομίας-ιστολογίας-φυσιολογίας του οφθαλμού	7
1.3 Τύποι Ωχράς Κηλίδας	14
1.3.1 Ξηρή μορφή ΗΕΩΚ.....	15
1.3.2 Υγρή Μορφή ΗΕΩΚ	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο: Παθοφυσιολογικές αλλοιώσεις στον οφθαλμό στην ΗΕΩΚ.....	22
2.1 Μεταβολές στο χοριοειδή χιτώνα	22
2.2 Μεταβολές στη μεμβράνη του Bruch	26
2.3 Μεταβολές στο μελάγχρουν επιθήλιο	30
2.4 Μεταβολές στον ιδίως αμφιβληστροειδή χιτώνα	33
2.5 Drusen και βασικές εναποθέσεις (BlamD και BlinD)	35
2.6 Χοριοειδική νεοαγγείωση (CNV, Choroidal Neovascularization)	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο: Ο ρόλος του Οξειδωτικού stress και του Συστήματος του Συμπληρώματος στην ανάπτυξη της ΗΕΩΚ.....	44
3.1 Οξειδωτικό stress.....	44
3.1.1 Το οξειδωτικό stress στην εξέλιξη της ΗΕΩΚ.....	46
3.2 Ανοσολογικοί Μηχανισμοί στην ΗΕΩΚ	47
3.2.1 Σύστημα Συμπληρώματος	48
3.3 Πρωτεολυτικό Σύστημα ουβικιτίνης (UPS)	56
3.4 Ο αντιοξειδωτικός ρόλος του παράγοντα NRF2 και του DJ-1 στο ΜΕ.....	56
3.5 Βλάβες στα μιτοχόνδρια και στο μιτοχονδριακό DNA στην ΗΕΩΚ.....	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο: Γενετική της ΗΕΩΚ.....	61
4.1 Γενετική Επιδημιολογία	61
4.2 Μελέτη τριών γονιδίων.....	66
4.2.1 Το γονίδιο <i>ARMS2</i> και ΗΕΩΚ.....	66
4.2.2 Το γονίδιο <i>CD14</i> και ΗΕΩΚ.....	69
4.2.3 Το γονίδιο <i>TLR4</i> (Toll Like Receptor) και ΗΕΩΚ.....	72

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο : Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης πολυμορφισμών	75
5.1 Τεχνικές ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην αντίδραση της PCR	75
5.2 PCR- RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism)	79
5.3 Quantitative PCR (Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου, qPCR)	80
5.4 Υψηλής Διακριτικής ικανότητας Ανάλυση καμπυλών τήξης (High Resolution Melting curve Analysis, HRMA)	81
5.4.1 Εισαγωγή	81
5.4.2 Επεξεργασία Σήματος	84
5.4.3 Επιλογή χρωστικών	86
5.5 DNA sequencing	89
5.5.1 Η ενζυμική μέθοδος κατά Sanger.	89
5.5.2 Αυτοματοποίηση του DNA Sequencing	92
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	96
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο: Υλικά και Μέθοδοι	98
6.1 Κλινικά Δείγματα	98
6.2 Απομόνωση Γενωμικού DNA από ολικό αίμα	104
6.2.1 Εισαγωγή	104
6.2.2 Αρχή της μεθόδου	105
6.3 Ποσοτικός προσδιορισμός DNA με το φθορισμόμετρο Qubit	107
6.4 Αντίδραση PCR	108
6.4.1 Μέθοδος PCR- RFLP για το γονίδιο ARMS2 (LOC387715)	109
6.4.2 Μέθοδος PCR- RFLP για το γονίδιο CD14 (LOC929)	112
6.4.3 Μέθοδος PCR- RFLP για το γονίδιο TLR4 (LOC 7099)	115
6.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	119
6.5.1 Πηκτή Αγαρόζης υψηλής διαχωριστική ικανότητας 3%w/v	120
6.6 Θερμικός κυκλοποιητής Rotor-Gene Q MDx	121
6.6.1 Χαρακτηριστικά του θερμικού κυκλοποιητή Rotor-Gene Q MDx	121
6.6.2 Οργανολογία	121
6.7 Σχεδιασμός HRMA εκκινητών	122
6.8 Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων του DNA (DNA Sequencing)	125
6.8.1 Οργανολογία	125
Πειραματική Πορεία	127
6.8.2 Ενίσχυση με Συμβατική PCR	128

6.8.3 Καθαρισμός των PCR προϊόντων	128
6.8. 4 Αντίδραση θερμικών κύκλων (cycle sequencing)	130
6.8.5 Καθαρισμός των προϊόντων του Cycle Sequencing	131
6.8.6 Προετοιμασία δειγμάτων για DNA sequencing	132
6.9 Βιοπληροφορική ανάλυση	133
6.10 Στατιστική Ανάλυση	133
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο : Αποτελέσματα	137
7.1 Αποτελέσματα γονοτύπωσης με τη μέθοδο PCR-RFLP	137
7.2 Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό A69S του γονιδίου ARMS2 (LOC387715)	143
7.3 Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό C(260)T του γονιδίου CD14 (LOC)	144
7.4 Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό Asp299Gly του γονιδίου TLR4 (LOC7099)	145
7.5 Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό Thr399Ile του γονιδίου TLR4 (LOC7099)	146
7.6 Αποτελέσματα HRMA ανάλυσης	147
7.6.1 Αποτελέσματα HRMA για τον πολυμορφισμό Asp299Gly	148
7.7 Αποτελέσματα Sequencing	152
7.8 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων με το στατιστικό πακέτο SPSS	157
7.8.1 Περιγραφική στατιστική ανάλυση για τα ποσοτικά χαρακτηριστικά των μεταβλητών	157
7.8.2 Έλεγχος κανονικότητας δεδομένων	158
7.9 Συσχέτιση της νόσου με περιβαλλοντικούς και κλινικούς παράγοντες	159
7.10 Στατιστική ανάλυση για τους πολυμορφισμούς των γονιδίων ARMS2, CD14, TLR4	161
7.11 Στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό C(260)T για το γονίδιο CD14	162
7.12 Στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό Asp299Gly του γονιδίου TLR4	164
7.13 Στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό Thr399Ile του γονιδίου TLR4	165
7.14 Ανάλυση απλοτύπου για το <i>TLR4</i> γονίδιο με τους δύο πολυμορφισμούς Asp299Gly και Thr399Ile	167
7.15 Δισδιάστατοι πίνακες συνάφειας (Crosstabs) για την ομάδα των ασθενών του πολυμορφισμού ARMS2 (με επιλογή του dominant χαρακτήρα κληρονόμησης) με τους περιβαλλοντικούς και κλινικούς παράγοντες	168
7.16 Διωνυμική Λογαριθμιστική Παλινδρόμηση (Binary Logistic Regression) του συνόλου των δειγμάτων με όλους τους γονότυπους (εκτός του πολυμορφισμού C260T για το γονίδιο CD14)	169
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8ο : Συζήτηση-Συμπεράσματα	172
8.1 Συμπεράσματα – Συζήτηση-Μελλοντικές κατευθύνσεις	172
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	178

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση του οφθαλμικού βολβού (Copyright © 2001 Benjamin Cummings).....	8
Εικόνα 1.2: Τα στρώματα της μεμβράνης του Bruch, όπως φαίνονται μετά από παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (www.eophtha.com).	9
Εικόνα 1.3: Οπτική απεικόνιση αιμάτωσης του αμφιβληστροειδούς (www.eyepathology.gr).....	9
Εικόνα 1.4: Σχηματική απεικόνιση κυττάρων αμφιβληστροειδούς στην οποία φαίνονται καθαρά τα κωνία και τα ραβδία (www.eyepathology.gr).	10
Εικόνα 1.5: Ιστολογική αναπαράσταση των στοιβάδων του αμφιβληστροειδούς (emed.med.uoa.gr).	11
Εικόνα 1.6: Σχηματική αναπαράσταση των στοιβάδων του αμφιβληστροειδούς (www.eyepathology.gr).	12
Εικόνα 1.7: Φωτογραφία αμφιβληστροειδούς ανθρώπινου οφθαλμού, στην οποία απεικονίζονται :οι θέσεις και τα μεγέθη της ωχράς (macula), του κεντρικού βοθρίου (fovea), του βοθριδίου (foveola), της κεντρικής αναγγείου ζώνης (FAZ), του imbo και του οπτικού δίσκου (en.wikipedia.org).	13
Εικόνα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση ενός φυσιολογικού αμφιβληστροειδούς [29].	14
Εικόνα 1.9: Σχηματική αναπαράσταση των παθολογοανατομικών μεταβολών στη ξηρή μορφή της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας [29].	16
Εικόνα 1.10: Έγχρωμη φωτογραφία βυθού ασθενών με ξηρή ΗΕΩΚ. Εντός του κύκλου αναγνωρίζονται drusen [7].	17
Εικόνα 1.11: Σχηματική αναπαράσταση των παθολογοανατομικών μεταβολών στην υγρή μορφή της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας [29].	18
Εικόνα 1.12: Έγχρωμη φωτογραφία βυθού ασθενών με γεωγραφική ατροφία της υγρής μορφής ΗΕΩΚ [30].	19
Εικόνα 1.13: 10) Έγχρωμη φωτογραφία βυθού 11) πρώτη φάση φλουοροαγγειογραφίας και 12) όψιμη φάση φλουοροαγγειογραφίας σε ασθενή με κλασσική χοριοειδική νεοαγγείωση. Το θέλος στην εικόνα 10 δείχνει υπαμφιβληστροειδική συλλογή αίματος και εξιδρώματος, ο αστερίσκος στην εικόνα 11 σημειώνει τον δίκην τροχού αμάξης φθορισμό της νεοαγγειακής μεμβράνης και στην εικόνα 12 την εκσεσημασμένη διαρροή της χρωστικής στην όψιμη αγγειογραφική φάση [31].	20
Εικόνα 1.14: 13) Έγχρωμη φωτογραφία βυθού 14) πρώτη φάση φλουοροαγγειογραφίας και 15) όψιμη φάση φλουοροαγγειογραφίας σε ασθενή με κρύφια χοριοειδική νεοαγγείωση. Το μαύρο θέλος υποδεικνύει μια μονήρη περιοχή αιμορραγίας και το λευκό έναν δακτύλιο εξιδρωμάτων. Σημειώνεται ελάχιστος φθορισμός στην πρώτη φάση και σικτό πρότυπο φθορισμού στην όψιμη, σε αντιδιαστολή με την κλασσική χοριοειδική νεοαγγείωση [31].	20
Εικόνα 2.1: Ιστολογική απεικόνιση του χοριοειδούς όπου φαίνονται οι δύο στοιβάδες:1) η εξωτερική στοιβάδα με μεγάλου μεγέθους αγγεία (στοιβάδα του Haller) και μεσαίου μεγέθους αιμοφόρα αγγεία (στοιβάδα του Satler) και 2) η εσωτερική στοιβάδα πλούσια σε τριχοειδή η οποία καλείται χοριοτριχοειδική [36].	23
Εικόνα 2.2: Απεικόνιση του αγγειακού συστήματος του χοριοειδούς στην οποία φαίνονται με κόκκινο θέλος οι αρτηρίες και με μπλε-κόκκινο οι φλέβες [37].	23
Εικόνα 2.3: Απεικόνιση οφθαλμού που πάσχει από τη μη εξιδρωματική μορφή της ΗΕΩΚ. Με τη χρήση της μεθόδου OCT είναι δυνατή η σύγκριση του αλλοιωμένου και του φυσιολογικού οφθαλμού. Στην πάνω εικόνα φαίνεται η συσσώρευση drusen στην περιοχή του αμφιβληστροειδούς ενώ στην κάτω εικόνα απεικονίζεται ο φυσιολογικός (1960eye.com).	28

Εικόνα 2.4: Στα τρία στάδια A,B,C απεικονίζεται η σταδιακή καταστροφή της αρχιτεκτονικής δομής του αμφιβληστροειδούς λόγω του σχηματισμού αγγείων (<i>Chapter 13 Retina Marilyn C., Kincaid, Myron Yanoff and Ben S. Fine</i>).	29
Εικόνα 2.5: Αλλαγές που παρατηρούνται στο ME ανάμεσα σε νέους (A,C,E,G,I) και ηλικιωμένους (B,D,F,H,J) δότες [56].	32
Εικόνα 2.6: Παραδείγματα ασθενών με τη μη εξιδρωματικού τύπου HEΩΚ. Απεικονίζονται οι αλλαγές που συμβαίνουν στο ME με τη μέθοδο OCT [59].	33
Εικόνα 2.7: Απεικόνιση των BlamD. (A) Πρώιμος τύπος BlamD σχηματίζοντας στοιβάδα κάτω από το ME, όπως φαίνεται ύστερα από χρώση. (B) Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο απεικονίζοντας τη διαφορά που έχουν υποστεί το ME (RPE) και τα χοριοτριχοειδή (CC). (C) Τα BlamD με χαρακτηριστικές υαλώδεις μάζες. (D) Περαιτέρω συσσώρευση BlamD που οδηγούν στο σχηματισμό οζιδίων εξογκωμάτων [63].	36
Εικόνα 2.8: Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου που δείχνει τη συσσώρευση των Blind [67].	36
Εικόνα 2.9: Η σχέση των εναποθέσεων BlamD και Blind με την HEΩΚ. Η συνέργεια των δύο εναποθέσεων πυροδοτεί την έναρξη εμφάνισης της νόσου. Το μονοπάτι που θα ακολουθηθεί εξαρτάται από το ποσοστό των εναποθέσεων [63].	37
Εικόνα: 2.10: Σχηματική απεικόνιση του αγγειογενετικού μονοπατιού επαγόμενο από τον VEGF. Μετά την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων αρχίζει η διαρροή των αγγείων, η αποδόμηση της βασικής μεμβράνης μέσω πρωτεασών, ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων, η μετανάστευση και η αναδιαμόρφωση [81].	40
Εικόνα 2.11: Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών νεοαγγειογένεσης. FGF2:Fibrinoblast Growth Factor 2, VEGF: Vascular endothelial growth factor, PEDF: Pigment Epithilium Derived Factor, Ang2: αγγειοποιητίνη 2, MMPs: μεταλλοπρωτεϊνάσες στρώματος. Με κίτρινο χρώμα επισημαίνονται θεραπείες που στοχεύουν τη χοριοειδική νεοαγγειογένεση και συγκεκριμένα αντι-VEGF θεραπείες (μονοκλωνικά αντισώματα ή απταμερή έναντι του VEGF) και το anecortave acetate που βρίσκεται σε μελέτες φάσης 3 για την υγρή HEΩΚ [84].	43
Εικόνα 3.1: Κυτταρικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην σύνθεση και την αποβολή των ενεργών μορφών οξυγόνου [102].	46
Εικόνα 3.3: Ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος μέσω των τριών οδών (<i>Immunobiology, 6/e © Garland Science 2005</i>).	50
Εικόνα 3.4: Η εικόνα δείχνει μια άποψη του συμπληρώματος και παρουσιάζει τα σημεία όπου μπορεί να γίνει αναστολή των μονοπατιών για θεραπεία ασθενειών που χαρακτηρίζονται από φλεγμονή και εκφυλισμό [117].	54
Εικόνα 3.5: Στην εικόνα απεικονίζονται οι περιοχές εκείνες του συμπληρώματος που στοχεύονται καθώς και τα φάρμακα που αναπτύσσονται. Για τα φάρμακα αναφέρεται το στάδιο της κλινικής φάσης στο οποίο βρίσκονται και το είδος τους (μονοκλωνικό αντίσωμα, πεπτίδιο κ.ο.κ) [117].	55
Εικόνα 3.6: Η συμβολή του οξειδωτικού στρες στην παθογένεση της ξηράς HEΩΚ [102].	58
Εικόνα 3.7: Η θεωρία της φλεγμονής ως αίτιο για την εκφύλιση της ωχράς κηλίδας [114]	60
Εικόνα 4.1: Απεικόνιση του γενετικού τόπου 10q26 του γονιδίου ARMS2 (http://ghr.nlm.nih.gov).	67
Εικόνα 4.2: Απεικόνιση του γενετικού τόπου 5q.31 του γονιδίου CD14 (http://ghr.nlm.nih.gov).	69
Εικόνα 4.3: Δίκτυο αλληλεπίδραση της ανοσιακής απάντησης (www.genecards.org).	70
Εικόνα 4.4: Δίκτυο αλληλεπίδρασης σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK (www.genecards.org).	71
Εικόνα 4.6: Απεικόνιση του γενετικού τόπου 9q.33 του γονιδίου TLR4.....	72

Εικόνα 4.6: Δέσμευση του LPS πολυσακχαρίτη από το ομοδιμερές TLR4-TLR4 και διαχωρισμός της ανοσολογικής ανταπόκρισης σε προ-φλεγμονώδη και αντι-φλεγμονώδη με την αντίστοιχη παραγωγή ιντερλευκινών.....	74
Εικόνα 4.7: Απεικόνιση του συμπλόκου TLR4-MD2-CD14 (A) και η οδός ενεργοποίησης του μονοπατιού του NF-κB (B).	74
Εικόνα 5.1: Σχηματική αναπαράσταση της PCR στην οποία φαίνεται η ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος DNA (en.wikipedia.org).	75
Εικόνα 5.2: Σχηματική αναπαράσταση των τριών σταδίων της PCR (biosistemika.com).	77
Εικόνα 5.3: Σχηματική απεικόνιση της κινητικής της PCR (www.scielo.org).	78
Εικόνα 5.4: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου PCR-RFLP. Το γονίδιο που μελετάται ενισχύεται με κατάλληλους εκκινητές και στη συνέχεια επωάζεται με επιλεγμένη περιοριστική ενδονουκλεάση, η οποία αναγνωρίζει αλληλουχία που περιλαμβάνει την εξεταζόμενη πολυμορφική θέση [157].	79
Εικόνα 5.5: Σχηματική απεικόνιση της κινητικής της Real-Time PCR στην οποία φαίνεται η φάση θορύβου, η λογαριθμική φάση και η φάση κορεσμού (www.edvotek.com).	80
Εικόνα 5.6: Παρακολούθηση της συγκέντρωσης του DNA στόχου (dna.utah.edu).	81
Εικόνα 5.7: Καμπύλη HRM στην οποία με πράσινο απεικονίζεται η μετάβαση από τον υψηλό φθορισμό, της αρχικής φάσης με υβριδισμένα μόρια, προς μειωμένο φθορισμό κατά τη φάση της αποδιάταξης. Η μεταβολή οφείλεται στην αποδέσμευση της χρωστικής από το δίκλωνο DNA. Με διακεκομμένη παρουσιάζεται η θερμοκρασία τήξης. Με μαύρο παρουσιάζεται η φάση αποδιάταξης (www.dna.utah.edu).	83
Εικόνα 5.8: Σχηματική απεικόνιση μιας χαρακτηριστικής καμπύλης HRMA. Με πράσινο παρουσιάζεται ο ομόζυγος φυσιολογικός, με μπλε ο ετεροζυγώτης και με κόκκινο ο ομόζυγος μεταλλαγμένος (www.bio-rad.com).	84
Εικόνα 5.9: Φάσμα φθορισμού των SYBR Green και της Eva Green [166]	87
Εικόνα 5.10: Διαθέσιμα κανάλια του θερμικού κυκλοποιητή Rotor-Gene Q (www.qiagen.com).	88
Εικόνα 5. 11: Δομή dNTP και ddNTP.....	90
Εικόνα 5.12: Προσθήκη ενός ddNTP σταματά την επιμήκυνση της αλυσίδας.	90
Εικόνα 5.13: Αρχή ενζυμικής μεθόδου DNA sequencing κατά Sanger (www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006).....	92
Εικόνα 5.14: Μέθοδος θερμικών κύκλων β. Μέθοδος DNA Sequencing με χρήση Dye Terminators ddNTPs (http://www3.appliedbiosystems.com/cms).....	94
Εικόνα 5.15: Γράφημα από DNA Sequencing.	95
Εικόνα 6.2: Ποσοτικός προσδιορισμός DNA με τη χρήση του NanoDrop.	107
Εικόνα 6.3: Σχηματική παράσταση του θερμικού κυκλοποιητή Primus 25 της MWG (www.coleparmer.com).	109
Εικόνα 6.4: Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφόρησης (www.britannica.com).	119
Εικόνα 6.5: Θερμικός κυκλοποιητής Rotorgene Q (www.qiagen.com).	121
Εικόνα 6.6: Το σύστημα θέρμανσης του θερμικού κυκλοποιητή Rotor-Gene Q (www.qiagen.com).	122
Εικόνα 6.7: Το σύστημα ψύξης του θερμικού κυκλοποιητή Rotor-Gene (www.qiagen.com).	122
Εικόνα 6.8: Η τεχνολογία release on demand της χρωστικής Eva Green (www.interchim.fr)	124
Εικόνα 6.9: Απεικόνιση του γενετικού αναλυτή ABI Prism 310 (infohost.nmt.edu).	127
Εικόνα 6.10: Εσωτερική απεικόνιση του γενετικού αναλυτή (projects.nfstc.org).....	127

Εικόνα 7.2: Ηλεκτροφόρηση υψηλής διακριτικής ικανότητας για την ανάλυση του πολυμορφισμού C260T. Αριστερά στην πρώτη θέση τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους (φχ 174 PCR marker, Bioline, Αγγλία) και στις επόμενες θέσεις τα δείγματα.	145
Εικόνα 7.3: Ηλεκτροφόρηση υψηλής διακριτικής ικανότητας για την ανάλυση του πολυμορφισμού Asp299Gly. Αριστερά στην πρώτη θέση τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους (PCR marker) και στις επόμενες θέσεις τα δείγματα.	146
Εικόνα 7.4: Ηλεκτροφόρηση υψηλής διακριτικής ικανότητας για την ανάλυση του πολυμορφισμού Thr399Ile. Αριστερά στην πρώτη θέση τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους (PCR marker) και στις επόμενες θέσεις τα δείγματα.	147
Εικόνα 7.5α: Φαίνεται η ενίσχυση (Quantification) για ένα γνωστό ετεροζυγώτη (μωβ χρώμα) και για τους ομόζυγους φυσιολογικούς (κόκκινο, μπλε και κίτρινο χρώμα) για τον πολυμορφισμό Asp299Gly. Δεν υπήρξε δείγμα ομόζυγου μεταλλαγμένου.	148
Εικόνα 7.5β: Επιβεβαίωση της ενίσχυσης του επιθυμητού προϊόντος για τη μεθοδολογία HRMA με ηλεκτροφόρηση σε γέλη 1%.	148
Εικόνα 7.6: Θερμοκρασίες τήξης για το φυσιολογικό αλληλίο (Bin A) και για το μεταλλαγμένο (Bin B).	149
Εικόνα 7.7: Απεικονίζονται τα δείγματα ενός ετεροζυγώτη (μωβ χρώμα) και τριών ομόζυγων φυσιολογικών (κίτρινο, κόκκινο και μπλε χρώμα). Η ανάλυση καμπυλών τήξης γίνεται με το normalized graph.	149
Εικόνα 7.8: Απεικονίζονται τα δείγματα ενός ετεροζυγώτη (μωβ χρώμα) και τριών ομόζυγων φυσιολογικών (κίτρινο, κόκκινο και μπλεχρώμα) Η ανάλυση καμπυλών τήξης difference graph γίνεται με βάση τον ετεροζυγώτη (base line).	150
Εικόνα 7.9: Απεικονίζονται τα δείγματα ενός ετεροζυγώτη (μωβ χρώμα) και τριών ομόζυγων φυσιολογικών (κίτρινο, κόκκινο και μπλε χρώμα). Η ανάλυση καμπυλών τήξης difference graph γίνεται με βάση έναν ομόζυγο φυσιολογικό (κόκκινο χρώμα).	150
Εικόνα 7.10: Χρωματογραφήματα DNA Sequencing για Α) Ομοζυγώτη Φυσιολογικό Β) Ετεροζυγώτη και Γ) Ομόζυγο μεταλλαγμένο για τον πολυμορφισμό A69S του γονιδίου ARMS2.	154
Εικόνα 7.11: Χρωματογραφήματα DNA Sequencing για Α) Ομοζυγώτη Φυσιολογικό Β) Ετεροζυγώτη και Γ) Ομόζυγο μεταλλαγμένο για τον πολυμορφισμό C260T του γονιδίου CD14.	155
Εικόνα 7.12: Χρωματογραφήματα DNA Sequencing για Α) Ομοζυγώτη Φυσιολογικό Β) Ετεροζυγώτη για τον πολυμορφισμό Asp299Gly του γονιδίου TLR4.	155
Εικόνα 7.13: Χρωματογραφήματα DNA Sequencing για Α) Ομοζυγώτη Φυσιολογικό Β) Ετεροζυγώτη για τον πολυμορφισμό Thr399Ile του γονιδίου TLR4.	156

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Πίνακας επιπολασμού της ΗΕΩΚ στον εξετασθέντα πληθυσμό της Thessaloniki Eye Study, κατά φύλο και ηλικία.(AMD:ΗΕΩΚ, GA:Γεωγραφική ατροφία, NV: Χοριοειδική νεοαγγείωση) [28].	6
Πίνακας 2.1: Οι δομικές αλλαγές που παρατηρούνται στη μεμβράνη του Bruch σε άτομα με ΗΕΩΚ.	27
Πίνακας 4.1: Γονίδια τα οποία έχουν συσχετιστεί με κληρονομικές δυστροφίες του αμφιβληστροειδούς.	63
Πίνακας 4.2: Γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη ΗΕΩΚ.	64
Πίνακας 4.3: Συγκεντρωτικός πίνακας μελετών σε πληθυσμούς διαφορετικής καταγωγής για τη συσχέτιση του A69S SNP με την ΗΕΩΚ. Αναφέρονται η καταγωγή του πληθυσμού, ο αριθμός ασθενών και μαρτύρων, το ανευρεθέν επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (P) και ο λόγος συμπληρωματικών πιθανοτήτων (OR) λόγω της ύπαρξης έστω και ενός μεταλλαγμένου αλληλίου, άλλοι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν, οι ερευνητές και η χρονολογία της μελέτης [22].	68
Πίνακας 6.1: Ομάδα υγιών μαρτύρων. Στοιχεία για την ηλικία, το φύλο, την καταγωγή, το σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ), καρδιαγγειακό νόσημα (ΚΝ) {συμπεριλαμβάνεται η στεφανιαία νόσος (ΣΝ) και η αρτηριακή υπέρταση (ΑΥ)}, το κάπνισμα (Κ), το γλαύκωμα (ΓΛ) το και χειρουργημένο καταρράκτη (ΧΚ).	98
Πίνακας 6.2: Ομάδα ασθενών. Στοιχεία για την ηλικία, το φύλο, την καταγωγή, το σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ), καρδιαγγειακό νόσημα (ΚΝ) {συμπεριλαμβάνεται η στεφανιαία νόσος (ΣΝ) και η αρτηριακή υπέρταση (ΑΥ)}, το κάπνισμα (Κ), το γλαύκωμα (ΓΛ) και το χειρουργημένο καταρράκτη (ΧΚ).	102
Πίνακας 6.3: Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδιακού τμήματος του ARMS2.	110
Πίνακας 6.4: Πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του ARMS2.	110
Πίνακας 6.5: Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ενίσχυσης με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του ARMS2.	111
Πίνακας 6.6: Το πρωτόκολλο ενζυμικής πέψης του γονιδιακού τμήματος του ARMS2.	112
Πίνακας 6.7: Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του CD14.	112
Πίνακας 6.8: Πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του CD14.	113
Πίνακας 6.9: Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ενίσχυσης με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του CD14.	113
Πίνακας 6.10: Το πρωτόκολλο ενζυμικής πέψης του γονιδιακού τμήματος του CD14.	114
Πίνακας 6.11: Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του TLR4 για τον πολυμορφισμό Asp299Gly.	115
Πίνακας 6.12: Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του TLR4 για τον πολυμορφισμό Thr399Ile.	115
Πίνακας 6.13: Πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του TLR4.	116
Πίνακας 6.14: Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ενίσχυσης με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του TLR4.	116
Πίνακας 6. 15: Το πρωτόκολλο ενζυμικής πέψης του γονιδιακού τμήματος του TLR4, για τον πολυμορφισμό Asp299Gly.	118
Πίνακας 6.16 : Το πρωτόκολλο ενζυμικής πέψης του γονιδιακού τμήματος του TLR4, για τον πολυμορφισμό Thr399Ile	118
Πίνακας 6.17: Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με HRM του γονιδιακού τμήματος του TLR4,Asp299Gly.	123

Πίνακας 6.19: Πρωτόκολλο HRM για τον πολυμορφισμό Asp299Gly.....	124
Πίνακας 6.20: Πρωτόκολλο HRM για τον πολυμορφισμό Asp299Gly.....	125
Πίνακας 6.22: Πρωτόκολλο Cycle Sequencing.....	130
Πίνακας 6.23: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα Cycle Sequencing.....	130
Πίνακας 7.1: Αποτελέσματα γονοτύπωσης για την ομάδα των υγιών μαρτύρων.....	137
Πίνακας 7.3 : Αποτελέσματα HRMA ανάλυσης για τα δείγματα των υγιών μαρτύρων για τον πολυμορφισμό Asp299Gly.	151
Πίνακας 7.4: Αποτελέσματα HRMA ανάλυσης για τα δείγματα ασθενών για τον πολυμορφισμό Asp299Gly.	151
Πίνακας 7.5: Περιγραφική στατιστική ανάλυση των ποσοτικών μεταβλητών για το σύνολο των δειγμάτων.	157
Πίνακας 7.6: Περιγραφική στατιστική ανάλυση των ποσοτικών μεταβλητών για την ομάδα των υγιών. ...	157
Πίνακας 7.7: Περιγραφική στατιστική ανάλυση των ποσοτικών μεταβλητών για την ομάδα των ασθενών.	158
Πίνακας 7.8: Έλεγχος κανονικότητας των δεδομένων.....	158
Πίνακας 7.9: Δοκιμασία Mann-Whitney για ηλικία και οπτική οξύτητα.	159
Πίνακας 7.10: Συσχέτιση της νόσου με περιβαλλοντικούς και κλινικούς παράγοντες, όπου φαίνεται ο αριθμός και το αντίστοιχο ποσοστό των δειγμάτων τόσο για το σύνολο, αλλά και για την κάθε ομάδα ξεχωριστά. Επίσης αναγράφεται η τιμή του Pearson χ^2	160
Πίνακας 7.11 : Τεστ Hardy-Weinberg για το γονίδιο ARMS2 (status 0: υγιείς, status 1:ασθενείς)	161
Πίνακας 7.12: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για το γονίδιο ARMS2 και τα υπολογιζόμενα OR (status 0:υγιείς, status1: ασθενείς).....	161
Πίνακας 7.13: Συσχέτιση του φύλου με την ασθένεια.	162
Πίνακας 7.14: Τεστ Hardy-Weinberg για το γονίδιο ARMS2 (status 0: υγιείς, status 1:ασθενείς)	162
Πίνακας 7.15: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για το γονίδιο CD14 και τα υπολογιζόμενα OR (status 0:υγιείς, status 1:ασθενείς)	163
Πίνακας 7.16: Συσχέτιση του φύλου με την ασθένεια.	163
Πίνακας 7.17: Τεστ Hardy-Weinberg για τον πολυμορφισμό Asp299Gly του γονιδίου TLR4 (status 0:υγιείς, status 1:ασθενείς)	164
Πίνακας 7.18: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό Asp299Gly του γονιδίου TLR4 και τα υπολογιζόμενα OR (status 0:υγιείς, status 1:ασθενείς).....	165
Πίνακας 7.19: Συσχέτιση του φύλου με την ασθένεια.	165
Πίνακας 7.20: Τεστ Hardy-Weinberg για τον πολυμορφισμό Thr399Ile του γονιδίου TLR4 (status 0:υγιείς, status 1:ασθενείς)	165
Πίνακας 7.21: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό Thr399Ile του γονιδίου TLR4 και τα υπολογιζόμενα OR (status 0:υγιείς, status 1:ασθενείς).....	166
Πίνακας 7.22: Συσχέτιση του φύλου με την ασθένεια.	166
Πίνακας 7.23: Συχνότητες απλοτύπου.	168
Πίνακας 7.24: Συσχέτιση του πολυμορφισμού ARMS2 με τους περιβαλλοντικούς και κλινικούς παράγοντες.	169
Πίνακας 7.26: Πρόβλεψη της ασθένειας με βάση μόνο τους γονοτύπους	170
Πίνακας 7.27: Πρόβλεψη της ασθένειας με βάση και τους περιβαλλοντικούς και κλινικούς παράγοντες.....	

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο : Κλινική Θεώρηση της Ηλικιακής Εκφύλισης Ωχράς Κηλίδας

1.1 Ορισμός- Επιδημιολογία

Η Ηλικιακή Εκφύλιση της Ωχράς Κηλίδας (ΗΕΩΚ, στα αγγλικά Age related Macular Degeneration, AMD) αποτελεί μια ετερογενή, πολυπαραγοντική, εκφυλιστική νόσο του οφθαλμού που συνήθως εκδηλώνεται μετά την ηλικία των 50 ετών [1-4]. Είναι γνωστή στον ιατρικό κόσμο από πολύ νωρίς, καθώς μόλις το 1854 ο οφθαλμίατρος Fransiscus Cornelis Donders περιέγραψε για πρώτη φορά την ασθένεια με τον όρο «κεντρική συμμετρική χοριοειδοαμφιβληστροειδική πάθηση εμφανιζόμενη σε ηλικιωμένα άτομα» [5]. Ωστόσο σύμφωνα με το National Institute of Health Record ο όρος ηλικιακή εκφύλιση ωχράς κηλίδας είναι σχετικά πρόσφατος, αφού μόλις τα τελευταία 25 χρόνια έχει καθιερωθεί. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι πέρασε αρκετός καιρός μέχρι να δημοσιευτούν οι πρώτες ερευνητικές μελέτες, μόλις το 1904, καθώς μέχρι τότε θεωρούνταν μια σπάνια νόσος. Έκτοτε έχουν διενεργηθεί και δημοσιευτεί πλήθος ερευνητικών μελετών, οι οποίες καταγράφουν μια αρκετά μεγάλη αύξηση, επισημαίνοντας τη σοβαρότητα της ασθένειας, αφού σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) αποτελεί την κύρια αιτία τύφλωσης στον ανεπτυγμένο κόσμο [6]. Η ΗΕΩΚ περιγράφει μια πάθηση η οποία συνήθως επηρεάζει και τους δυο οφθαλμούς (αν και αυτό δεν συμβαίνει πάντοτε) και περιορίζεται στην περιοχή της ωχράς κηλίδας, δηλαδή ένα μικροσκοπικό σημείο στο κέντρο του αμφιβληστροειδούς χιτώνα, όπου βρίσκονται τα περισσότερα κωνία, δηλαδή φωτοϋποδοχείς που εξυπηρετούν την κεντρική ευκρινή όραση, προκαλώντας εκφυλιστικές και νεοαγγειακού τύπου βλάβες α) στους φωτοϋποδοχείς, β) στο μελάγχρουν επιθήλιο, γ) στη μεμβράνη του Bruch και δ) στον υποκείμενο χοριοειδή χιτώνα. Εκτός της επισήμανσης της επικινδυνότητας της ασθένειας, όλες αυτές οι μεγάλες ερευνητικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί κατά καιρούς μελετώντας πληθυσμούς διαφορετικής καταγωγής, έχουν επίσης βοηθήσει στην υιοθέτηση κοινών συστημάτων αξιολόγησης και κατάταξης των ασθενών καθώς και στην εκτίμηση των κληρονομικών και των περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου.

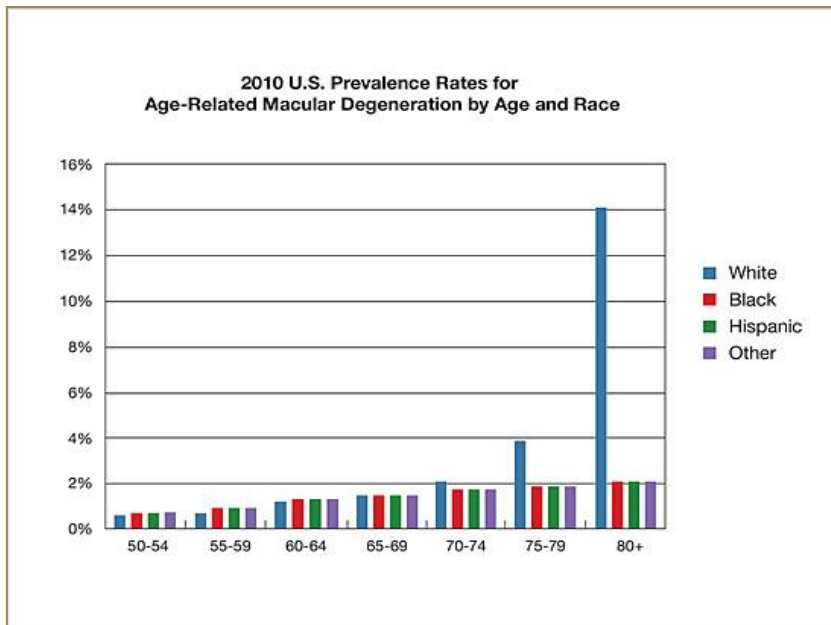
Χαρακτηριστικό παθολογοανατομικό εύρημα της ΗΕΩΚ είναι τα drusen. Ως drusen εννοούμε μικροσκοπικά κίτρινα ή λευκά συσσωματώματα λιπιδίων, πρωτεϊνών, υδατανθράκων και κυτταρικών στοιχείων τα οποία εναποτίθενται συνήθως μεταξύ της μεμβράνης του Bruch και του μελαγχρού επιθηλίου-ME (RPE, *retinal pigment epithelium*) του οφθαλμού. Οι μικρές αυτές

εναποθέσεις, όταν συσσωρευθούν προκαλούν ατροφία των υπερκείμενων στοιβάδων του αμφιβληστροειδούς [1-3,7,8] και επομένως βλάβη στην περιοχή της ωχράς κηλίδας έχοντας ως επακόλουθο την προοδευτική απώλεια της κεντρικής όρασης, όχι όμως και της περιφερειακής [πρακτικά η κατάσταση αυτή δε θεωρείται ολική τύφλωση, ωστόσο θεωρείται με τη νομική σημασία του όρου (καθώς η οπτική οξύτητα είναι μικρότερη από 1/10)].

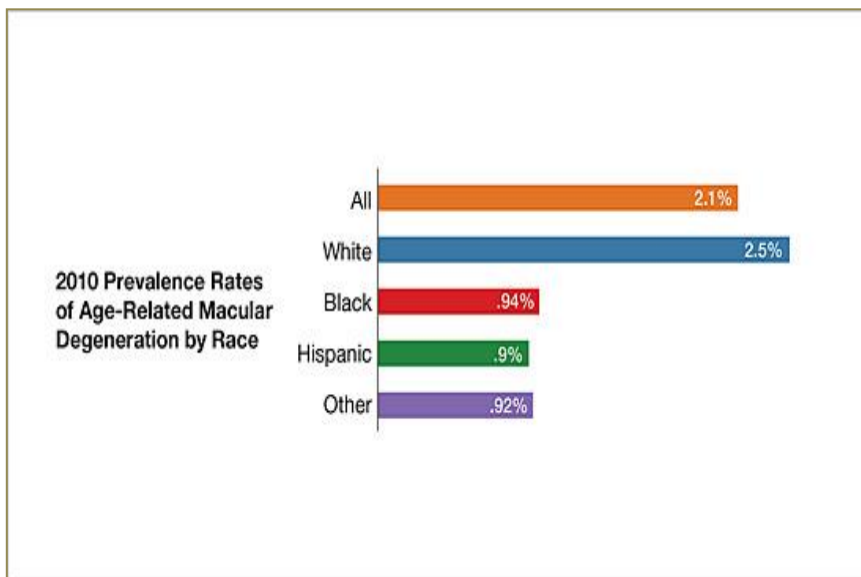
Η παρουσία τέτοιων μικρών drusen και λεπτών αλλοιώσεων του ΜΕ αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα των πρώιμων σταδίων της ΗΕΩΚ, αν και μόνο αυτά τα γνωρίσματα δεν αρκούν, καθώς αν συνοδεύεται από φυσιολογικά επίπεδα οπτικής οξύτητας δε θεωρείται εκφύλιση ωχράς, αλλά είναι αποτέλεσμα της φυσιολογικής διαδικασίας της γήρανσης [3]. Οι περισσότεροι άνθρωποι πάνω από το 40^ο έτος ηλικίας εμφανίζουν μερικά «σκληρά» drusen, όπως χαρακτηρίζονται. Ωστόσο, η παρουσία μεγαλύτερων και περισσότερων «μαλακών» drusen στην περιοχή της ωχράς κηλίδας είναι ένα εύρημα που σχετίζεται με την πάθηση της ΗΕΩΚ.

Προς διευκόλυνση της κατάταξης των ασθενών σε κλινικές μελέτες θεωρείται αναγκαίο να γίνεται διαχωρισμός μεταξύ των εννοιών της ΗΕΩΚ και της ηλικιακής ωχροπάθειας. Άτομα με ΗΕΩΚ θεωρούνται αυτά τα οποία εμφανίζουν αποκλειστικά γεωγραφική ατροφία ή νεοαγγείωση, ενώ άτομα με ωχροπάθεια θεωρούνται αυτά τα οποία εμφανίζουν μόνο τα πρωιμότερα στάδια της πάθησης [9]. Στην παρούσα ερευνητική μελέτη γίνεται ο εξής διαχωρισμός: τα αρχικά στάδια της ΗΕΩΚ που χαρακτηρίζονται από παρουσία drusen, αλλοιώσεις του ΜΕ και μείωση της οπτικής οξύτητας θεωρούνται ως πρώιμη ΗΕΩΚ, ενώ τα στάδια που χαρακτηρίζονται από γεωγραφική ατροφία και χοριοειδή νεοαγγείωση θεωρούνται ως όψιμη ΗΕΩΚ. Τέλος τα τελικά στάδια χαρακτηρίζονται από εκσεσημασμένη απώλεια της κεντρικής όρασης που οδηγούν έως και στην κεντρική τύφλωση του ασθενούς [1-4,8].

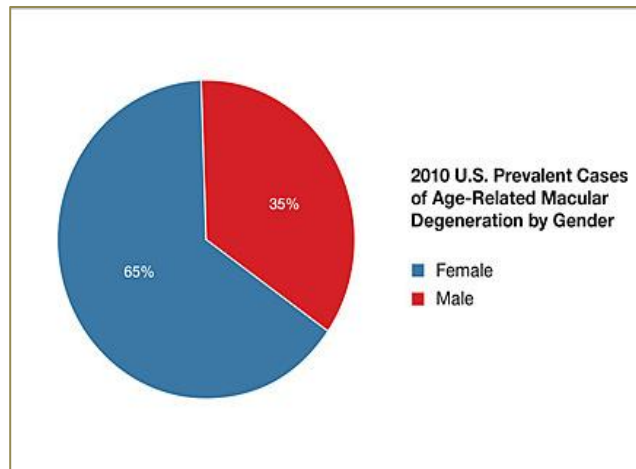
Ο κίνδυνος ανάπτυξης τόσο πρώιμης όσο και όψιμης ΗΕΩΚ έχει φανεί να συσχετίζεται εκτός από την ηλικία και με το φύλο, όπως φαίνεται σύμφωνα με τα στοιχεία στα παρακάτω διαγράμματα.



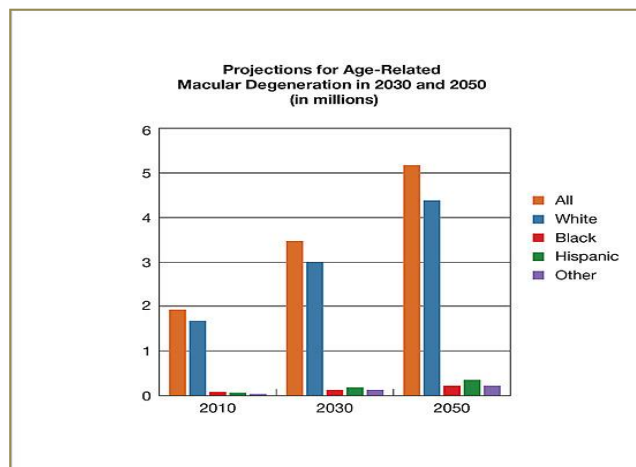
Διάγραμμα 1.1: Απεικονίζεται ο επιπολασμός της ΗΕΩΚ κατά το έτος 2010 με βάση την ηλικία και τη φυλή (<http://www.nih.gov/>).



Διάγραμμα 1.2: Απεικονίζεται ο επιπολασμός της ΗΕΩΚ κατά το έτος 2010 με βάση τη φυλή (<http://www.nih.gov/>).



Διάγραμμα 1.3: Απεικονίζεται ο επιπολασμός της ΗΕΩΚ κατά το έτος 2010 με βάση το φύλο (<http://www.nih.gov/>).



Διάγραμμα 1.4: Απεικονίζεται η εκτίμηση του επιπολασμού της ΗΕΩΚ κατά το διάστημα 2030-2050 (<http://www.nih.gov/>).

Από τα άνωθεν διαγράμματα φαίνεται ότι η καυκάσια φυλή εμφανίζει μια αυξημένη τάση στην ανάπτυξη ΗΕΩΚ σε σχέση με τη μαύρη και την ασιατική [10-13] (**Διαγράμματα 1.1,1.2**), καθώς επίσης σύμφωνα με μελέτη του ΝΙΗ φαίνεται να υπάρχει μια επιβάρυνση των γυναικών για εμφάνιση της ασθένειας (**Διάγραμμα 1.3**). Στην πλειάδα των παραγόντων που παίζουν ρόλο στην εμφάνιση της ασθένειας έρχεται να προστεθεί και το μορφωτικό επίπεδο [14], καθώς και μερικοί

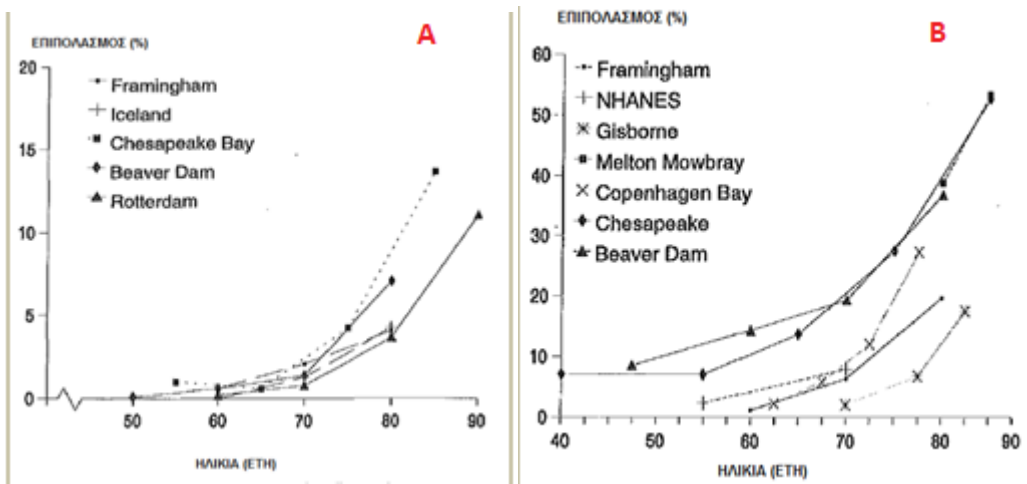
περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως το κάπνισμα [14-16], η κατανάλωση αλκοόλ [17,18] και οι εκάστοτε διατροφικές συνήθειες [19-21], παράμετροι οι οποίες επηρεάζουν άμεσα τον επιπολασμό της ασθένειας, ο οποίος αναμένεται να αυξηθεί αρκετά τα επόμενα χρόνια (**Διάγραμμα 1.4**).

Όσον αφορά το κάπνισμα ερευνητικές μελέτες σε διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες έχουν δείξει ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης ΗΕΩΚ και χοριοειδοδύς νεοαγγείωσης αυξάνεται δραματικά για τους ενεργούς καπνιστές. Η σχέση αυτή, δηλαδή η βαρύτητα της νόσου με το κάπνισμα φαίνεται να είναι δόσοεξαρτώμενη, αφού έχει διαπιστωθεί ότι σε περιπτώσεις διακοπής του καπνίσματος παρατηρήθηκε μείωση της πιθανότητας εξέλιξης της ασθένειας και εμφάνισης της στον έτερο υγιή οφθαλμό [16]. Την ίδια επίδραση φάνηκε να έχει και η υπέρμετρη κατανάλωση αλκοόλ, αφού αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης τόσο πρώιμης, αλλά και όψιμης ΗΕΩΚ [17,18]. Τέλος, οι διατροφικές συνήθειες και ο δείκτης μάζας σώματος έχουν ενοχοποιηθεί κατά καιρούς από ορισμένες μελέτες ότι σχετίζονται με την εμφάνιση ΗΕΩΚ, χωρίς όμως ακόμα να έχει πλήρως αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους [19-21]. Ακόμη δεν είναι λίγα τα περιστατικά ασθενών με ΗΕΩΚ που έχουν διαγνωστεί είτε με διαβήτη, είτε με καρδιαγγειακά νοσήματα, είτε με άλλες οφθαλμολογικές παθήσεις: όπως ο καταρράκτης, οι διαθλαστικές ανωμαλίες και το χρώμα της ίριδος και έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη της ΗΕΩΚ [15,21,22]. Ωστόσο όλες αυτές οι συσχετίσεις της ασθένειας με τις προαναφερθείσες καταστάσεις δεν γίνονται πλήρως αποδεκτές από την επιστημονική κοινότητα και υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις στη διεθνή βιβλιογραφία [19]. Αυτό που όμως είναι αποδεκτό και έχει μελετηθεί κατά κόρον από όλες τις ερευνητικές ομάδες είναι ο ρόλος του γενετικού υποβάθρου για την εκδήλωση της ΗΕΩΚ αφού αποτελεί ίσως τον πιο επιβαρυντικό παράγοντα [7, 22-26].

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (μελέτη Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης) η νόσος εμφανίζεται στο 2,5% του πληθυσμού άνω των 60 ετών. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το προσδόκιμο ζωής στον δυτικό κόσμο έχει αυξηθεί κατά πολύ (**Διαγράμματα 1.5,1.6**), η ΗΕΩΚ αποτελεί πλέον ένα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας το οποίο έχει σημαντικές κοινωνικές και οικονομικές επιπτώσεις. Επομένως θεωρείται επιτακτική η ανάγκη τόσο λήψης προληπτικών μέτρων, αλλά και ανακάλυψης νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την ασθένεια [27]. Στη χώρα μας, όπως καταδεικνύει ο **Πίνακας 1.1** από το ελληνικό σκέλος (Thessaloniki Eye Study) της Ευρωπαϊκής Οφθαλμολογικής Μελέτης (EUREYE-The European Eye Study) ο επιπολασμός της πάθησης ακολουθεί ανάλογη ηλικιακή κατανομή και αγγίζει το 10% στους ηλικιωμένους άνω των 80 ετών [28].

Πίνακας 1.1: Πίνακας επιπολασμού της ΗΕΩΚ στον εξετασθέντα πληθυσμό της Thessaloniki Eye Study, κατά φύλο και ηλικία. (AMD: ΗΕΩΚ, GA: Γεωγραφική ατροφία, NV: Χorioειδική νεοαγγείωση) [28].

	Number of Participants	Prevalence of AMD		
		AMD [†]	GA [‡]	NV [§]
Male	1352	33 (2.4%)	14 (1.0%)	20 (1.5%)
Female	1202	31 (2.6%)	18 (1.5%)	16 (1.3%)
Total	2554	64 (2.5%)	32 (1.3%)	36 (1.4%)
Age group				
60 to 64				
Male	161	1 (0.62%)	1 (0.62%)	0 (0.00%)
Female	150	1 (0.67%)	0 (0.00%)	1 (0.67%)
Total	311	2 (0.65%)	1 (0.32%)	1 (0.32%)
65 to 69				
Male	486	4 (0.82%)	3 (0.62%)	1 (0.21%)
Female	408	5 (1.23%)	4 (0.98%)	1 (0.25%)
Total	894	9 (1.0%)	7 (0.78%)	2 (0.22%)
70 to 74				
Male	388	8 (2.06%)	0 (0.00%)	8 (2.06%)
Female	306	6 (1.96%)	2 (0.65%)	5 (1.63%)
Total	694	14 (2.0%)	2 (0.3%)	13 (1.9%)
75 to 79				
Male	180	5 (2.78%)	2 (1.11%)	3 (1.67%)
Female	198	7 (3.54%)	3 (1.52%)	5 (2.53%)
Total	378	12 (3.2%)	5 (1.3%)	8 (2.1%)
Older than 80				
Male	137	15 (10.95%)	8 (5.84%)	8 (5.84%)
Female	140	12 (8.57%)	9 (6.43%)	4 (2.86%)
Total	277	27 (9.7%)	17 (6.1%)	12 (4.3%)



Διαγράμματα 1.5,1.6: Επιπολασμός της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας σε συνάρτηση με την ηλικία σύμφωνα με στοιχεία 7 μελετών. Στο διάγραμμα A απεικονίζεται ο επιπολασμός της ασθένειας ανεξαρτήτως σταδίου, ενώ στο διάγραμμα B απεικονίζεται ο επιπολασμός των όψιμων σταδίων της ασθένειας (γεωγραφική ατροφία και χοριοειδή νεοαγγείωση) [23].

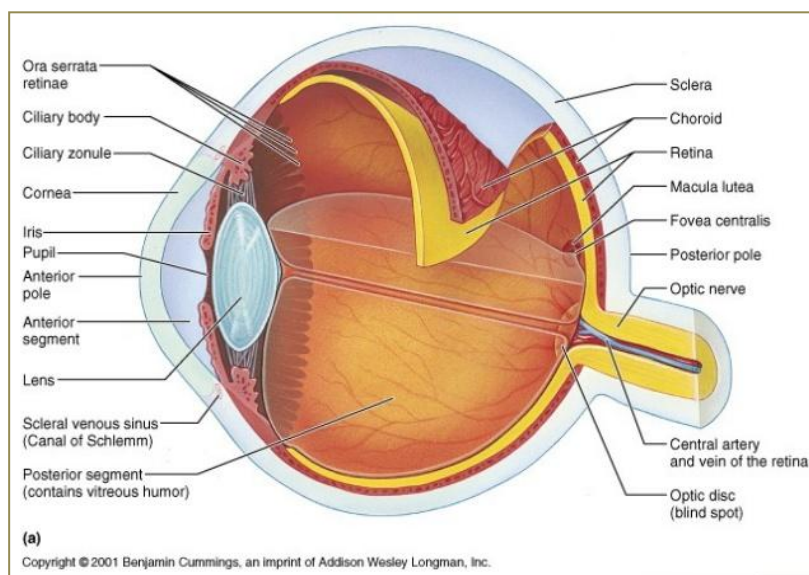
1.2 Στοιχεία Ανατομίας-ιστολογίας-φυσιολογίας του οφθαλμού

Ο οφθαλμικός κόγχος (**Εικόνα 1.1**) είναι μια κοιλότητα κλειστή προς τα έξω, προς τα έξω και προς τα πίσω. Τα οστά που σχηματίζουν τον οφθαλμικό κόγχο είναι το μετωπιαίο, το ζυγωματικό, η άνω γνάθος, το ηθμοειδές, το σφηνοειδές, το υπερώιο και το δακρυϊκό. Στην οστέινη αυτή κοιλότητα βρίσκεται προστατευμένος ο οφθαλμικός βολβός. Ο βολβός του ματιού αποτελείται από τρεις χιτώνες:

- A. τον ινώδη
 - a. σκληρός
 - b. κερατοειδής
- B. τον αγγειώδη
 - a. χοριοειδής
 - b. ακτινωτό σώμα
 - c. ίριδα-κόρη οφθαλμού
- C. τον αμφιβληστροειδή

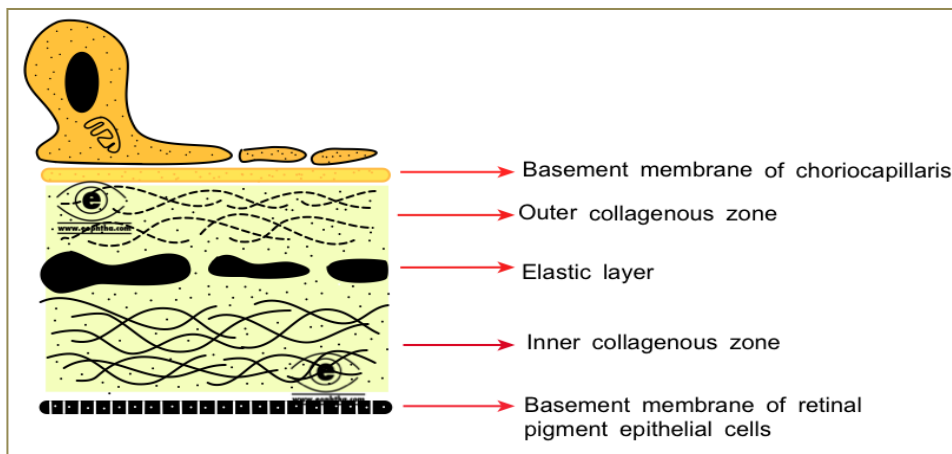
Εκτός από τους τρεις αυτούς χιτώνες στην κοιλότητα υπάρχουν ως περιεχόμενο:

- I. το υδατοειδές υγρό
- II. ο φακός
- III. το υαλώδες σώμα: μια πηκτώδης διαφανής μάζα που γεμίζει την κοιλότητα πίσω από το φακό

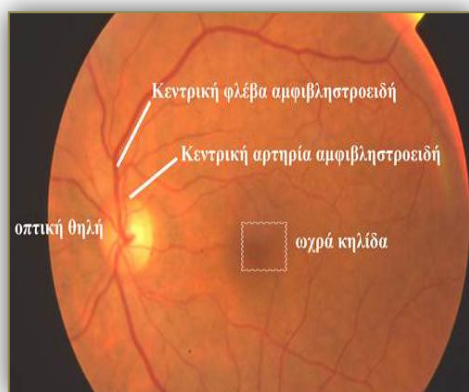


Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση του οφθαλμικού βολβού (Copyright © 2001 Benjamin Cummings).

Πιο συγκεκριμένα, ο χοριοειδής συνιστά το οπίσθιο μέρος του αγγειώδους χιτώνα και αποτελεί τον αγγειοβριθέστερο χιτώνα του ματιού που αιματώνει τις έξω στοιβάδες του αμφιβληστροειδούς. Μεταξύ των δυο αυτών χιτώνων, δηλαδή του χοριοειδούς και του αμφιβληστροειδούς παρεμβάλλεται η υαλοειδής μεμβράνη ή όπως είναι ευρέως γνωστή και ως μεμβράνη του Bruch. Η μεμβράνη αυτή αποτελείται από πέντε στρώματα: 1) τη βασική μεμβράνη του μελαγχρόου επιθηλίου (RPE BM: Retinal Pigment Epithelium Basal Membrane), 2) την έσω κολλαγονική στοιβάδα, 3) τη ζώνη των ελαστικών ινών, 4) την έξω κολλαγονική στοιβάδα και 5) τη βασική στοιβάδα των χοριοτριχοειδών όπως αυτή φαίνεται ύστερα από παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στην **Εικόνα 1.2**.



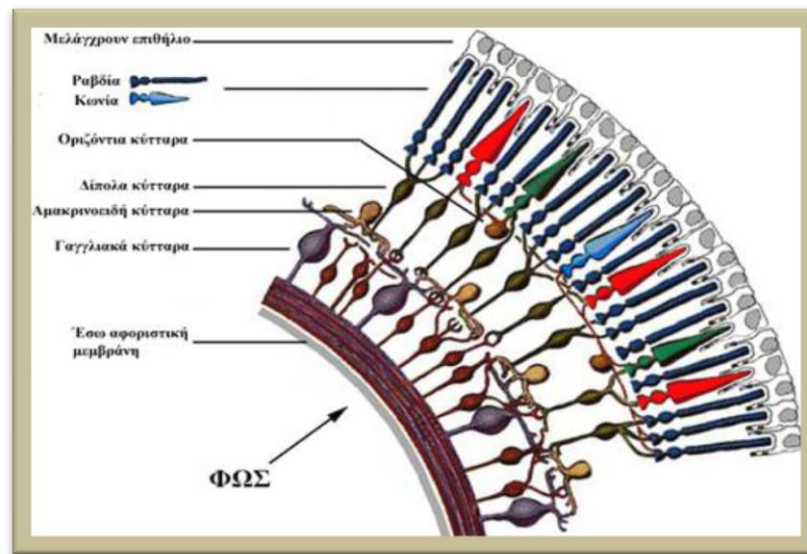
Εικόνα 1.2: Τα στρώματα της μεμβράνης του Bruch, όπως φαίνονται μετά από παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (www.eophtha.com).



Εικόνα 1.3: Οπτική απεικόνιση αιμάτωσης του αμφιβληστροειδούς (www.eyepathology.gr).

Ο αμφιβληστροειδής είναι μια λεπτή και διαφανή στιβάδα νευρικού ιστού η οποία επενδύει το εσωτερικό του οπίσθιου ημιμορίου του οφθαλμικού βολβού. Τα βασικά μέρη από τα οποία αποτελείται είναι: το κεντρικό του τμήμα, που ονομάζεται οπίσθιος πόλος και εκεί βρίσκεται η ωχρά κηλίδα και το περιφερικό του τμήμα που συνδέεται με το ακτινωτό σώμα (*pars plana*). Η κεντρική αρτηρία του αμφιβληστροειδούς είναι κλάδος της οφθαλμικής αρτηρίας, που όταν εισέρχεται μέσα στο μάτι διακλαδίζεται σε ρινικούς και κροταφικούς κλάδους (**Εικόνα 1.3**). Το αίμα από τον αμφιβληστροειδή απάγεται μέσω της κεντρικής φλέβας, και ακολουθεί την πορεία και τη διακλάδωση της κεντρικής αρτηρίας.

Ο χιτώνας αυτός είναι υπεύθυνος για τη μετατροπή του φωτός σε νευρική ώση, που μεταδίδεται μέσω του οπτικού νεύρου στον εγκέφαλο. Για να πραγματοποιηθεί η εν λόγω μετατροπή υπεύθυνοι είναι οι φωτοϋποδοχείς, κύτταρα τα οποία έχουν την ικανότητα να μεταβιβάζουν το σήμα διαμέσου των νευραξόνων προς τα γαγγλιακά κύτταρα μέσω των δίπολων κυττάρων και έτσι η πληροφορία να φτάνει έως το οπτικό νεύρο και από εκεί στον οπτικό φλοιό του εγκεφάλου. Οι φωτοϋποδοχείς περιέχουν φωτοευαίσθητες χρωστικές που όταν πέσει πάνω τους φως προκαλούν νευρική διέγερση (Εικόνα 1.4).



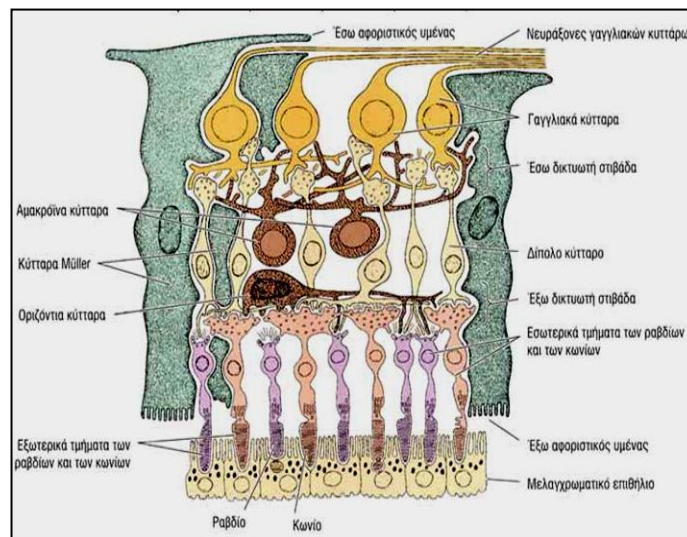
Εικόνα 1.4: Σχηματική απεικόνιση κυττάρων αμφιβληστροειδούς στην οποία φαίνονται καθαρά τα κωνία και τα ραβδία (www.eyepathology.gr).

Οι φωτοϋποδοχείς είναι δυο ειδών: τα κωνία και τα ραβδία. Τα μεν κωνία βρίσκονται κυρίως συγκεντρωμένα στο κεντρικό τμήμα, στην ωχρά και είναι υπεύθυνα για την ευκρινή κεντρική όραση σε έντονο φωτισμό και την αντίληψη του χρώματος [1-4], τα δε ραβδία βρίσκονται κυρίως στην περιφέρεια και ευθύνονται για την περιφερική και τη νυχτερινή όραση, καθώς και την αντίληψη της κίνησης.

Ο νευροαισθητηριακός αμφιβληστροειδής (*neural retina*- ή ιδίως αμφιβληστροειδής) σχηματίζεται από πολλές επάλληλες στοιβάδες νευρικών κυττάρων μεταξύ των οποίων: οι φωτοϋποδοχείς, τα γαγγλιακά κύτταρα και οι νευρικές ίνες, που βρίσκονται σε επαφή με το υαλοειδές υγρό του οφθαλμού (Εικόνες 1.5,1.6) [1]. Ο νευροαισθητηριακός αμφιβληστροειδής μπορεί να φανεί

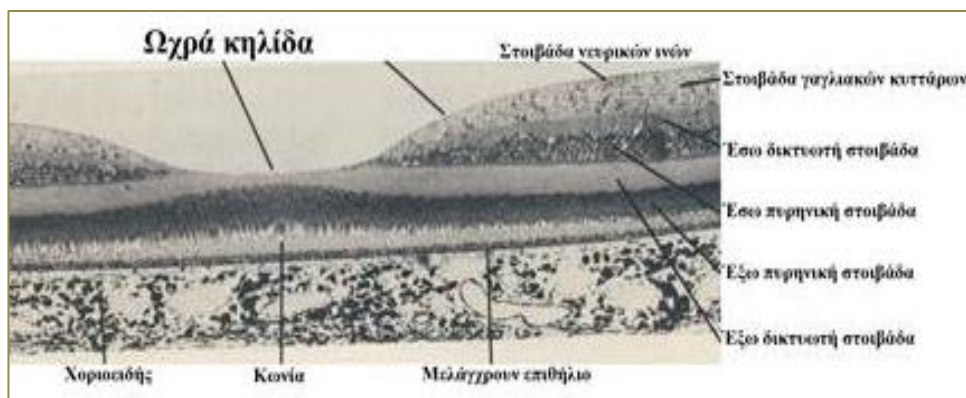
λεπτομερώς κατά την οφθαλμοσκόπηση, όπου μπορούν να φανούν οι διακριτές στοιβάδες κυττάρων που σχηματίζονται.

Ο δυνητικός χώρος μεταξύ ΜΕ και ιδίως αμφιβληστροειδούς ονομάζεται υπαμφιβληστροειδικός χώρος. Το ΜΕ συμμετέχει με πολλούς τρόπους στη λειτουργία του αμφιβληστροειδούς: σχηματίζει τον έξω αίματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό, αντλεί ενεργά ιόντα και νερό εκτός του υπαμφιβληστροειδικού χώρου, φαγοκυττάρώνει τα έξω τμήματα των κωνίων και των ραβδίων, συμμετέχει στο μεταβολισμό της βιταμίνης Α, απορροφά τη φωτεινή ενέργεια με τα κοκκία μελανίνης και μειώνει τη διάχυση του φωτός, βελτιώνοντας την ευκρίνεια των εικόνων [1-4].



Εικόνα 1.5: Ιστολογική αναπαράσταση των στοιβάδων του αμφιβληστροειδούς (emed.med.uoa.gr).

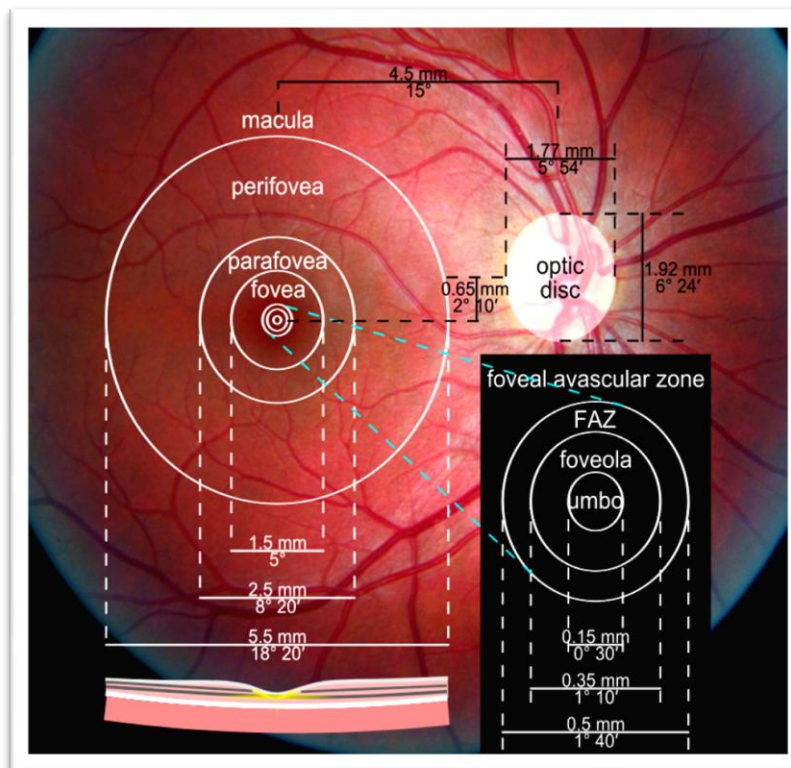
Εκ των έξω προς τα μέσα οι στοιβάδες κυττάρων εμφανίζονται ως εξής: α) γαγγλιακή στοιβάδα, β) έσω συναπτική-δικτυωτή στοιβάδα, γ) έσω κοκκώδη, δ) έξω συναπτική, ε) έξω κοκκώδη, στ) στοιβάδα των φωτοϋποδοχέων και ζ) τέλος χρωμοφόρος στοιβάδα.



Εικόνα 1.6: Σχηματική αναπαράσταση των στοιβάδων του αμφιβληστροειδούς (www.eyepathology.gr).

Για την καλύτερη κατανόηση των παθήσεων του αμφιβληστροειδούς συμπεριλαμβανομένου της εκφύλισης της ωχράς κηλίδας και για το πώς γίνεται η κατάταξη των ασθενών με βάση τα οφθαλμοσκοπικά τους ευρήματα θα ήταν χρήσιμη η τοπογραφική οριοθέτηση και ο ορισμός των ανατομικών σημείων όπως αυτά φαίνονται στην **Εικόνα 1.7**. Ο οπίσθιος πόλος είναι η περιοχή του αμφιβληστροειδούς που αφορίζεται από το οπτικό νεύρο και τα αγγειακά τόξα. Στο κέντρο του οπίσθιου πόλου εντοπίζεται η **ωχρά κηλίδα (macula)**, μια κυκλική περιοχή διαμέτρου 5,5 mm, που ιστολογικά χαρακτηρίζεται από την παρουσία της χρωστικής ξανθοφύλλης και περιέχει περισσότερες από μία στοιβάδες γαγγλιακών κυττάρων. Το **κεντρικό βοθρίο (fovea)** είναι ένα εντύπωμα της έσω επιφάνειας του αμφιβληστροειδή στο κέντρο της ωχράς. Ιστολογικά στην περιοχή αυτή (περίπου 1,5 mm σε διάμετρο), η οποία είναι υπεύθυνη για την κεντρική όραση και την αντίληψη των χρωμάτων, ο ιδίως αμφιβληστροειδής είναι λεπτός, τα ραβδία απουσιάζουν τελείως ή απαντούν πολύ σπάνια, ενώ τα κωνία είναι πολυάριθμα, κυλινδρικά και πιο επιμήκη σε σχέση με εκείνα άλλων περιοχών του βυθού. Το **βοθρίδιο (foveola)** σχηματίζει το έδαφος του κεντρικού βοθρίου και έχει διάμετρο 0,35 mm. Αποτελεί το λεπτότερο σημείο του αμφιβληστροειδή και στερείται γαγγλιακών κυττάρων. Το σύνολο του πάχους του αποτελούν αποκλειστικά κωνία και κύτταρα του Muller. Η **κεντρική ανάγγειος ζώνη (FAZ)** εντοπίζεται εντός του κεντρικού βοθρίου, αλλά εκτός του βοθριδίου και στερείται αμφιβληστροειδικών τριχοειδών τροφοδοτούμενη αιματικά με διάχυση από το χοριοειδικό αγγειακό δίκτυο. Τέλος το **umbo** συνιστά ένα πολύ μικρό εντύπωμα ακριβώς στο κέντρο του βοθριδίου το οποίο αντιστοιχεί στην οφθαλμοσκοπικά ορατή ωχρική αντανάκλαση, απώλεια της οποίας δυνατόν να αποτελεί ένα αρχικό σημείο βλάβης. **Παραβοθρική περιοχή** καλείται δακτύλιος πάχους 0,5 mm που περιβάλλει το κεντρικό βοθρίο με εκσεσημασμένη

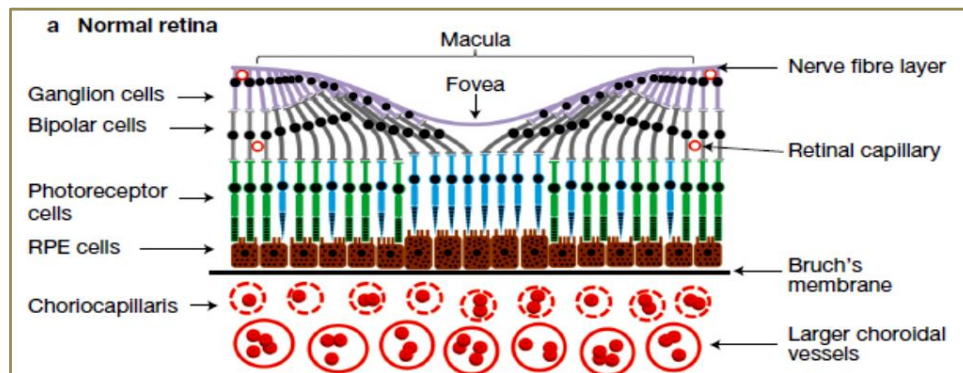
κυτταροβρίθεια των έσω αμφιβληστροειδικών στοιβάδων (4-6 στρώματα γαγγλιακών και 7-11 στρώματα διπόλων κυττάρων). **Περιβοθρική περιοχή** καλείται δακτύλιος περίπου 1,5 mm που περιβάλλει την παραβοθρική περιοχή. Στα περιφερικά όρια της περιοχής αυτής η στοιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων διατάσσεται πλέον σε ένα μόνο κυτταρικό στρώμα, όπως συμβαίνει και στον υπόλοιπο -εκτός της ωχράς- αμφιβληστροειδή [1-4].



Εικόνα 1.7: Φωτογραφία αμφιβληστροειδούς ανθρώπινου οφθαλμού, στην οποία απεικονίζονται :οι θέσεις και τα μεγέθη της ωχράς (macula), του κεντρικού βοθρίου (fovea), του βοθριδίου (foveola), της κεντρικής αναγγείου ζώνης (FAZ), του umbo και του οπτικού δίσκου (en.wikipedia.org).

Οι οπτικές δομές που εμπλέκονται στην παθογένεια της ΗΕΩΚ είναι οι φωτοϋποδοχείς, το ΜΕ, η μεμβράνη του Bruch και τα τριχοειδή του χοριοειδούς χιτώνα στην περιοχή της ωχράς κηλίδας (**Εικόνα 1.8**). Οι δομές αυτές είναι μεταβολικά αλληλοεξαρτώμενες και υπάρχει σημαντική ανταλλαγή μεταβολικών προϊόντων κατά μήκος της μεμβράνης του Bruch. Το εξωτερικό τμήμα των φωτοϋποδοχέων αποτελείται από ένα σύνολο μεμβρανών που σχηματίζουν δίσκους και περιέχουν φωτοχρωστικές. Το τμήμα αυτό φαγοκυτταρώνεται καθημερινά από κύτταρα του ΜΕ, αποδομείται στα λυσοσώματά του και μέρος του επαναχρησιμοποιείται για την αναγέννηση των φωτοϋποδοχέων. Το υπόλοιπο αποδομημένο προϊόν πιστεύεται ότι αποβάλλεται δια μέσου της μεμβράνης του Bruch προς απομάκρυνση από τα χοριοειδικά τριχοειδή. Διαταραχή αυτής της

διαδικασίας, όπως φαίνεται να συμβαίνει στην ΗΕΩΚ, οδηγεί στη συσσώρευση ηλεκτρονιόπυκνου υλικού και λιποφουσκίνης στο ΜΕ επηρεάζοντας τη φυσιολογική λειτουργία των υπερκείμενων φωτοϋποδοχέων και κατά συνέπεια την όραση. Ακόμα, η ανταλλαγή πλήθους μεταβολιτών και παρακρινώς δρώντων ουσιών μεταξύ των ως άνω δομών έχει τύχει ιδιαίτερου ερευνητικού ενδιαφέροντος όσον αφορά τη διαλεύκανση των μηχανισμών παθογένεσης της ΗΕΩΚ.



Εικόνα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση ενός φυσιολογικού αμφιβληστροειδούς [29].

1.3 Τύποι Ωχράς Κηλίδας

Η Ηλικιακή Εκφύλιση της ωχράς Κηλίδας διακρίνεται σε δυο τύπους: **A. την ξηρού τύπου** (ή μη εξιδρωματική ή ατροφική) η οποία είναι η πιο συχνά εμφανιζόμενη, σε ποσοστό 85-90 %, και η οποία εξελίσσεται σχετικά αργά και την **B. την υγρού τύπου** (εξιδρωματική ή νεοαγγειακή), η οποία εμφανίζεται πιο σπάνια σε ποσοστό 10-15%, όμως αποτελεί την πιο σοβαρή μορφή της νόσου προκαλώντας μεγαλύτερη μείωση της οπτικής οξύτητας σε συντομότερο χρονικό διάστημα. Παρόλο που οι δυο αυτές μορφές της νόσου παρουσιάζουν διαφορετική κλινική εικόνα, σημειολογία και κλινική εξέλιξη και στις δυο μορφές η διάγνωση των ασθενών γίνεται καταρχάς με την κλινική εξέταση. Πρωτίστως πραγματοποιείται η μέτρηση της οπτικής οξύτητας με τη βοήθεια του πίνακα Amsler, εκτιμώντας το οπτικό πεδίο 10° γύρω από το σημείο προσήλωσης δίνοντας τη δυνατότητα να εντοπιστεί ακόμη και η ήπια μορφή μεταμορφώσιμης. Ακολούθως η έμμεση βυθοσκόπηση σε σχισμοειδή λυχνία με φακό επαφής ή ένα ισχυρό κυρτό φακό (βυθοσκόπηση) μπορεί να προσφέρει επιπρόσθετες κλινικές παρατηρήσεις. Στις πιο εξειδικευμένες εξετάσεις υπάγονται η φλουροαγγειογραφία και η αγγειογραφία με πράσινη ινδοκυανίνη κατά τις οποίες εγχέονται στην κυκλοφορία του αίματος φθορίζουσες χρωστικές και κατόπιν λαμβάνονται διαδοχικές φωτογραφίες

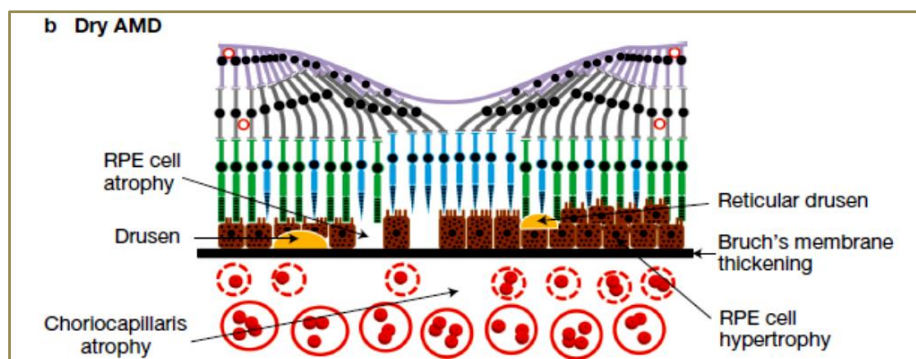
του βυθού. Με τις δυο αυτές συμπληρωματικές εξετάσεις αυτό που επιτυγχάνεται είναι να διαγιγνώσκεται η ύπαρξη της ΗΕΩΚ με μεγαλύτερη ακρίβεια ή να εκτιμώνται οι βλάβες της ξηράς μορφής. Στο σύνολο των προαναφερθέντων εξετάσεων πλέον προστίθεται και η εξέταση της οπτικής τομογραφίας συνοχής (Optical Coherence Tomography-OCT), η οποία και αυτή συνεισφέρει σημαντικά στη διάγνωση και την παρακολούθηση των ΗΕΩΚ ασθενών.

1.3.1 Ξηρή μορφή ΗΕΩΚ

Ο ξηρός τύπος αποτελεί την πιο συχνά εμφανιζόμενη μορφή της πάθησης στον παγκόσμιο πληθυσμό, σε ποσοστό που αγγίζει το 85%. Το κύριο κλινικό χαρακτηριστικό γνώρισμα των ασθενών με ξηρή ΗΕΩΚ είναι η βαθμιαία ελάττωση της οπτικής οξύτητας μέσα σε διάστημα λίγων εβδομάδων ή μηνών η οποία προκαλεί δυσκολία κατά την ανάγνωση και δυσχεραίνει την αναγνώριση των απομακρυσμένων αντικειμένων. Αν και η κεντρική όραση χάνεται σταδιακά, η περιφερική όραση διατηρείται κανονικά καθιστώντας τους ασθενείς ικανούς να κινούνται ικανοποιητικά στο χώρο. Κατά την κλινική εξέταση ο ασθενής αναφέρει ως κύριο σύμπτωμα, το οποίο είναι χαρακτηριστικό της πάθησης, ότι υπάρχει κάτι που παρεμποδίζει την κεντρική του όραση: μια κηλίδα που προκαλεί ένα θετικό σκότωμα. Το θετικό σκότωμα είναι κάτι διαφορετικό από το αρνητικό σκότωμα αφού το τελευταίο προκαλείται από βλάβη του οπτικού νεύρου, δίνοντας την αίσθηση στον ασθενή ότι υπάρχει μια τρύπα στο κέντρο του οπτικού του πεδίου. Βέβαια στη βιβλιογραφία αναφέρονται και περιπτώσεις ασθενών οι οποίοι παρόλο την παρουσία ευρημάτων στο βυθό του οφθαλμού να ήταν ασυμπτωματικοί για πάρα πολλά χρόνια [1-4].

Από παθολογοανατομικής πλευράς, η ξηρή μορφή χαρακτηρίζεται από τα συρρεόμενα drusen, δηλαδή συσσωματώματα που οφείλονται στη μακροχρόνια εναπόθεση πρωτεϊνών και λιπιδίων στην περιοχή που βρίσκεται κάτω από το μελάγχρουν επιθήλιο (το οποίο διαχωρίζει τον αμφιβληστροειδή από τον χοριοειδή χιτώνα) εντός της μεμβράνης του Bruch. Οι εναποθέσεις αυτές έχουν τη μορφή υβωδών υπεγέρσεων και αρχικά δεν δημιουργούν κάποιο πρόβλημα στην όραση, όμως όσο αυξάνονται σε μέγεθος και αριθμό οδηγούν στην καταστροφή των φωτοευαίσθητων κυττάρων, οδηγώντας παράλληλα στην ατροφική εκφύλιση του ΜΕ. Η καταστροφή και εν τέλει η απώλεια των κυττάρων αυτών έχει ως αποτέλεσμα τη λέπτυνση των ιστών της ωχράς προκαλώντας ατροφία στη στοιβάδα των φωτοϋποδοχέων του ιδίως αμφιβληστροειδή, η οποία καλείται και γεωγραφική ατροφία. Επίσης προκαλεί μια αργά εξελισσόμενη ατροφία των χοριοτριχοειδών και πάχυνση της μεμβράνης του Bruch προκαλώντας ένα σκοτεινό σημείο στο κέντρο της όρασης που

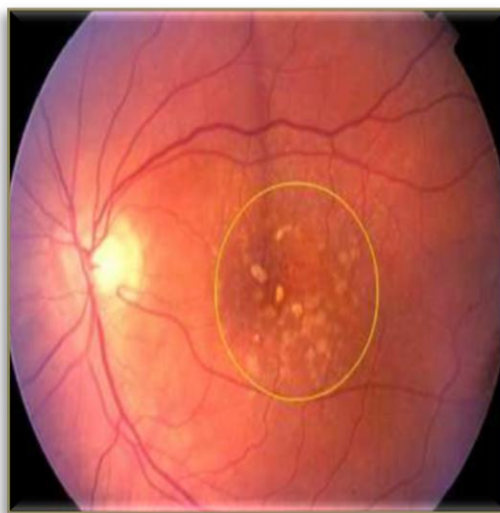
με την πάροδο του χρόνου μπορεί να εξελιχθεί και να γίνει πιο εκτεταμένο και να οδηγήσει στο θάνατο των οπτικών κυττάρων και άρα στην μείωση της κεντρικής όρασης (**Εικόνα 1.9**).



Εικόνα 1.9: Σχηματική αναπαράσταση των παθολογοανατομικών μεταβολών στη ξηρή μορφή της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας [29].

Αν και τα drusen θεωρούνται δείκτες της ΗΕΩΚ και είναι απαραίτητα για τη διάγνωση ενός ασθενούς, μέχρι και σήμερα δεν έχει αποσαφινιστεί πλήρως ο τρόπος παθογένεσής τους και ο ακριβής ρόλος τους στη ανάπτυξη της νόσου. Ωστόσο αυτό που είναι γνωστό είναι ότι απαντώνται σε ομάδες στην περιοχή της ωχράς και γίνονται ορατά οφθαλμοσκοπικά ως ημιδιαφανείς στικτές κουκίδες κατά την εξέταση με οπίσθιο φωτισμό, όταν η διάμετρός τους υπερβεί τα 25 μm . Όσον αφορά την κλινική τους ταξινόμηση τα drusen κατατάσσονται σε α) σκληρά β) μαλακά γ) οζώδη και δ) επασβεστωμένα. Η πρώτη κατηγορία, αυτή των σκληρών απαντάται συνήθως σε ηλικιωμένα άτομα σε ασθενείς και μη και κύριο χαρακτηριστικό τους είναι το μικρό τους μέγεθος (κάτω από 63 μm διάμετρο). Τα συσσωματώματα αυτά είναι μικρές, στικτές κιτρινωπές εναποθέσεις και διαφέρουν αρκετά από τη δεύτερη κατηγορία των μαλακών. Σε αντίθεση με τα πρώτα, τα μαλακά είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος, χωρίς τα όρια τους να είναι σαφή και έχουν πιο ανοικτό χρώμα. Αν και τα σκληρά drusen δεν εμπνέουν ανησυχία και η παρουσία τους θεωρείται φυσιολογική, δε συμβαίνει το ίδιο και για τα μαλακά. Η παρουσία των μαλακών συνιστά παράγοντα κινδύνου για τη μετέπειτα ανάπτυξη γεωγραφικής ατροφίας και χοριοειδικής νεοαγγείωσης και επίσης λόγω της τάσης τους να συνενώνονται δημιουργούν μεγαλύτερες αποκολλήσεις του ΜΕ στην περιοχή της ωχράς. Οι άλλοι δυο τύποι drusen τα οζώδη και τα επασβεστωμένα, εμφανίζουν ορισμένες μικρές διαφοροποιήσεις από τις δυο πρώτες κατηγορίες. Τα μεν οζώδη αποτελούν πολλαπλές ομοιομόρφου μεγέθους, στρογγυλές και ελαφρά υπεργερμένες υπαμφιβληστροειδικές αλλοιώσεις οι οποίες απαντώνται σε νεαρής ηλικίας άτομα, ενώ τα επασβεστωμένα προκύπτουν όταν κάποιος άλλος τύπος drusen υποστεί δυστροφική ασβέσωση και αποκτήσει λαμυρίζουσα εμφάνιση. Για να

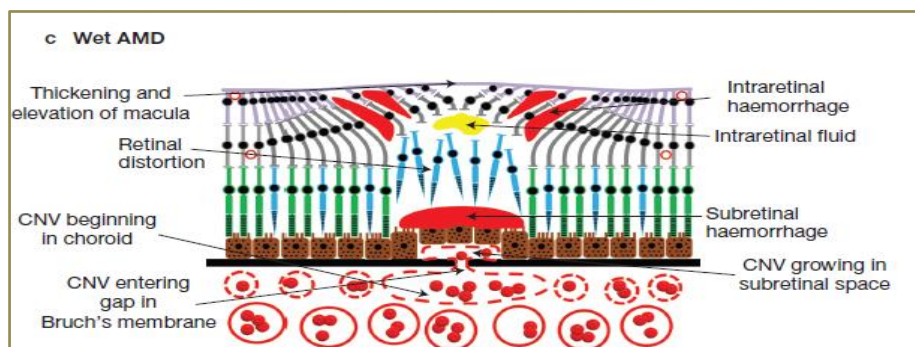
καταστεί δυνατή η παρατήρηση όλων των τύπων drusen είτε με τη φλουροαγγειογραφία είτε με τη φλουορεσκεΐνη χρησιμοποιείται η μέθοδος του φθορισμού. Κατά αυτόν τον τρόπο τα drusen φθορίζουν πρώιμα κατά το αγγειόγραμμα και καταγράφονται ως κηλίδες υπερφθορισμού από διαφάνεια (window defects) λόγω του ότι πάνω από αυτά το ΜΕ παρουσιάζει ατροφία. Μερικά drusen τα οποία είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος φθορίζουν καθυστερημένα κατά τρόπο παρόμοιο με τη συσσώρευση της φλουορεσκεΐνης επί αποκόλλησης του ΜΕ, και ως εκ τούτου δυσχεραίνεται η διαφοροδιάγνωση. Επίσης υπάρχουν ορισμένα drusen τα οποία δε φθορίζουν καθόλου στη φλουροαγγειογραφία και αυτό συμβαίνει γιατί είναι πιθανώς υδρόφοβα λόγω εκσεσημασμένης περιεκτικότητας σε ουδέτερα λίπη [1-4]. Τέλος υπάρχουν ορισμένες περιπτώσεις ασθενών οι οποίοι διαγιγνώσκονται με προχωρημένη ξηρή μορφή ΗΕΩΚ, στάδιο το οποίο καλείται γεωγραφική ατροφία. Στην κατάσταση αυτή παρατηρείται στον οφθαλμό του ασθενούς ατροφία του ΜΕ που χαρακτηρίζεται από οβάλ περιοχές υπόχρωσης ως συνέπεια απώλειας κυττάρων του ΜΕ (**Εικόνα 1.10**). Εκτός τούτου παρατηρείται και σταδιακή εκφύλιση των υπερκείμενων φωτοϋποδοχέων, λέπτυνση του αμφιβληστροειδούς και μείωση της οπτικής οξύτητας. Σε μερικές περιπτώσεις, η αμφιβληστροειδική ατροφία μπορεί να επεκταθεί και στην έξω δικτυωτή ή και την έσω κοκκώδη στοιβάδα καθώς ακόμη μπορεί να παρατηρηθεί υπέρχρωση λόγω αντιδραστικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων του ΜΕ [1-4].



Εικόνα 1.10: Έγχρωμη φωτογραφία βυθού ασθενούς με ξηρή ΗΕΩΚ. Εντός του κύκλου αναγνωρίζονται drusen [7].

1.3.2 Υγρή Μορφή ΗΕΩΚ

Η υγρού τύπου (εξιδρωματική ή νεοαγγειακή) εμφανίζεται πιο σπάνια, όμως αποτελεί την πιο σοβαρή μορφή της νόσου προκαλώντας μεγαλύτερη και πιο απότομη μείωση της οπτικής οξύτητας σε συντομότερο χρονικό διάστημα. Τα βασικά συμπτώματα της υγρής μορφής είναι κατά κύριο λόγο η μεταμορφοψία και η μικροψία, δηλαδή μεταβολές που επηρεάζουν το σχήμα και το μέγεθος της εικόνας και μπορεί να εμφανιστούν αιφνίδια. Αυτή η αιφνίδια απώλεια της όρασης μπορεί να οφείλεται στην έναρξη διαρροής από μια νεοαγγειακή μεμβράνη και για το λόγο αυτό ασθενείς με drusen θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα προσεκτικοί καθώς τέτοιου τύπου συμπτώματα είναι πιθανόν να σηματοδοτούν τη μετάπτωση από ξηρή σε υγρή μορφή [1-4]. Η εν λόγω διαρροή οδηγεί σε ανάπτυξη χοριοειδικής νεοαγγείωσης και αυτό αποτελεί τη θεμελιώδη διαφορά που διαχωρίζει τη ξηρή από την υγρή μορφή (**Εικόνα 1.11**). Τα παθολογικά αγγεία, τα οποία προέρχονται από τα χοριοτριχοειδή, περνούν μέσω ρήξεων της μεμβράνης του Bruch κάτω από το ME ή τον ιδίως αμφιβληστροειδή, όπου αναπτύσσονται περιβαλλόμενα βαθμιαία από ινώδη συνδετικό ιστό (υπαμφιβληστροειδική νεοαγγειακή μεμβράνη). Αυτές οι μεμβράνες μπορεί να προηγούνται ή να έπονται της ανάπτυξης μιας αποκόλλησης του ME, αν και τα δυο αυτά συμβάντα πιθανώς δεν έχουν άμεση σχέση [1-4].



Εικόνα 1.11: Σχηματική αναπαράσταση των παθολογοανατομικών μεταβολών στην υγρή μορφή της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας [29].

Επί το πλείστον η διάγνωση της χοριοειδικής νεοαγγείωσης δεν είναι εύκολη οφθαλμοσκοπικά και γι' αυτό συνήθως λαμβάνονται υπόψη οι εξιδρωματικές αλλοιώσεις που αναπτύσσονται στην ωχρά εξαιτίας του σαθρού τοιχώματος που παρουσιάζουν τα χοριοειδικά νεοαγγεία και γι' αυτό χρησιμοποιείται η μέθοδος της φλουοροαγγειογραφίας η οποία είναι πιο εξειδικευμένη. Συγκεκριμένα, στην περιοχή της ωχράς παρατηρούνται ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα ευρήματα: ορώδης υπέγερση του νευροεπιθηλίου, υπαμφιβληστροειδικές αιμορραγίες ή

αίμα υπό του ΜΕ και υπαμφιβληστροειδικά σκληρά εξιδρώματα. Σε μερικές περιπτώσεις η νεοαγγειακή μεμβράνη μπορεί να αποκαλυφθεί κλινικά σαν φαιοπράσινη ή ερυθροκίτρινη ελαφρώς υπεργερμένη υπαμφιβληστροειδική βλάβη ποικίλου μεγέθους. Εάν η μεμβράνη έχει περάσει μέσα στον υπαμφιβληστροειδικό χώρο συνήθως λαμβάνει ημιδιαφανή ανοιχτή ρόδινη χροιά ή λευκοκίτρινη εμφάνιση [1-4].

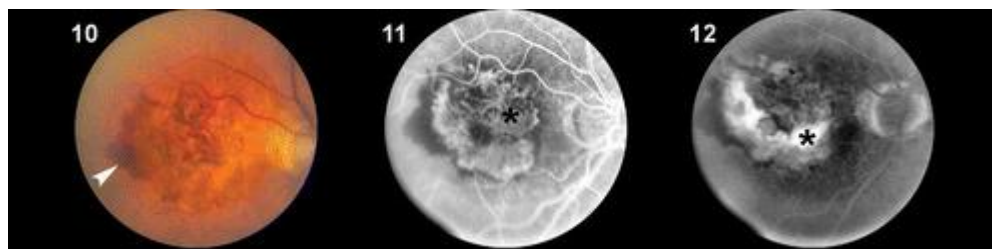
Χρησιμοποιώντας την εξέταση της φλουοροαγγειογραφίας, η νεοαγγειακή μεμβράνη διακρίνεται σε κλασική και κρύφια με βάση τα φλουοροαγγειογραφικά χαρακτηριστικά. Η κλασική νεοαγγειακή μεμβράνη εμφανίζεται με σαφώς αφοριζόμενα όρια, με δαντελωτό ή δίκην τροχού αμάξης σχήμα κατά τις πολύ πρώιμες φάσεις της αγγειογραφίας, φθορίζει έντονα στην αρτηριοφλεβική φάση και κατόπιν διαρρέει φλουοροσκειΐνη στον υπαμφιβληστροειδικό χώρο και γύρω από τη μεμβράνη εντός 1-2 λεπτών. Ο ινώδης ιστός μέσα στη μεμβράνη διαποτίζεται με χρωστική με αποτέλεσμα την εμφάνιση όψιμου υπερφθορισμού (**Εικόνα 1.12**). Οι κλασικές μεμβράνες κατατάσσονται ανάλογα με τη θέση τους ως προς το κέντρο της ανάγγειας ζώνης σε εξωβοθρικές, παραβοθρικές και υποβοθρικές. Οι εξωβοθρικές απέχουν περισσότερο από 200 μm από το κέντρο της ανάγγειας ζώνης, οι υποβοθρικές προσβάλλουν το κέντρο της ανάγγειας ζώνης και καταλαμβάνουν το βοθρίδιο, ενώ οι παραβοθρικές εντοπίζονται εντός της ανάγγειας ζώνης, φειδόμενες ωστόσο το βοθρίδιο [1-4].



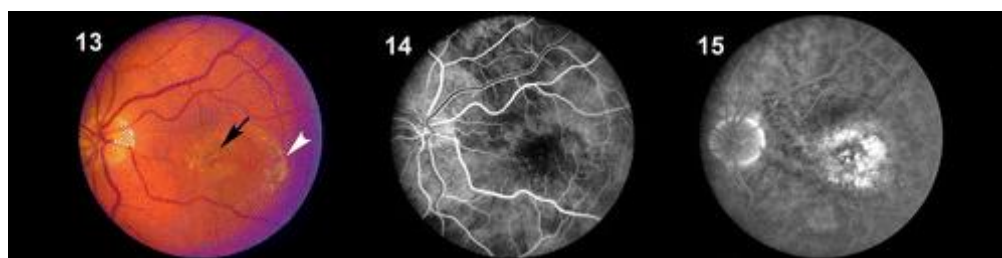
Εικόνα 1.12: Έγχρωμη φωτογραφία βυθού ασθενούς όπου απεικονίζεται ο όψιμος υπερφθορισμός [30].

Η κρύφια χοριοειδική νεοαγγείωση δεν απεικονίζεται ευκρινώς στη φλουοροαγγειογραφία. Τα όρια της εστίας φθορισμού που καταγράφονται φλουοροαγγειογραφικά είναι ασαφή και δεν συμπίπτουν

με τα παθολογοανατομικά όρια της νεοαγγείωσης (**Εικόνες 1.13, 1.14**). Σε αυτές τις περιπτώσεις σημαντική βοήθεια μπορεί να παρέχει η αγγειογραφία με πράσινη ινδοκυανίνη [1-4].



Εικόνα 1.13: 10) Έγχρωμη φωτογραφία βυθού 11) πρώτη φάση φλουοροαγγειογραφίας και 12) όψιμη φάση φλουοροαγγειογραφίας σε ασθενή με κλασική χοριοειδική νεοαγγείωση. Το βέλος στην εικόνα 10 δείχνει υπαμφιβληστροειδική συλλογή αίματος και εξιδρώματος, ο αστερίσκος στην εικόνα 11 σημειώνει τον δίκην τροχού αμάξης φθορισμό της νεοαγγειακής μεμβράνης και στην εικόνα 12 την εκσεσημασμένη διαρροή της χρωστικής στην όψιμη αγγειογραφική φάση [31].



Εικόνα 1.14: 13) Έγχρωμη φωτογραφία βυθού 14) πρώτη φάση φλουοροαγγειογραφίας και 15) όψιμη φάση φλουοροαγγειογραφίας σε ασθενή με κρύφια χοριοειδική νεοαγγείωση. Το μαύρο βέλος υποδεικνύει μια μονήρη περιοχή αιμορραγίας και το λευκό έναν δακτύλιο εξιδρωμάτων. Σημειώνεται ελάχιστος φθορισμός στην πρώτη φάση και σπικτικό πρότυπο φθορισμού στην όψιμη, σε αντιδιαστολή με την κλασική χοριοειδική νεοαγγείωση [31].

Η πρόγνωση για τη χοριοειδική νεοαγγείωση είναι πολύ φτωχή αν αυτή μείνει χωρίς θεραπευτική αντιμετώπιση καθώς πολύ συχνά ακολουθείται από σοβαρές επιπλοκές. Συγκεκριμένα ρήξη του αγγείου της μεμβράνης και επακόλουθη διαρροή αίματος μπορεί να οδηγήσει σε αιμορραγική αποκόλληση του ΜΕ, που είναι δυνατόν να εξελιχθεί σε 1-2 εβδομάδες σε αιμορραγική αποκόλληση του νευροεπιθηλίου καθώς το αίμα περνά στον υπαμφιβληστροειδικό χώρο. Σπάνια -ιδιαίτερος επί λήψεως αντιπηκτικών σκευασμάτων- το αίμα μπορεί να διαχυθεί στην υαλοειδική κοιλότητα προκαλώντας αιμορραγία του υαλοειδούς. Η βαθμιαία οργάνωση του αίματος και η περαιτέρω αύξηση νέων αγγείων από τον χοριοειδή χιτώνα έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δισκοειδούς ουλής. Σε μερικούς οφθαλμούς εμφανίζονται αναστοματωτικοί κλάδοι μεταξύ

της χοριοειδικής και αμφιβληστροειδικής κυκλοφορίας. Τελικά μια ινώδης δισκοειδής ουλή στην ωχρά προκαλεί μόνιμη απώλεια της κεντρικής όρασης. Τέλος, εξιδρωματική αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς μπορεί να εμφανισθεί σε ορισμένους οφθαλμούς με δισκοειδείς ουλές ως αποτέλεσμα άφθονης διαρροής από το νεοαγγειακό ιστό. Τα φαινόμενα αυτά έχουν ως συνέπεια τη μόνιμη έκπτωση της οπτικής οξύτητας σε πολύ χαμηλά επίπεδα, κάτω από 1/20 στη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων. Πρακτικά στα τελικά στάδια της νόσου ο πάσχων οφθαλμός έχει μόνο περιφερική όραση που επιτρέπει μεν στον ασθενή να αυτοεξυπηρετείται στοιχειωδώς, αλλά του απαγορεύει να επιτελεί οτιδήποτε απαιτεί καλή κεντρική όραση (όπως δηλαδή να διαβάσει, να δει τα χαρακτηριστικά του προσώπου των συνομιλητών του, να σχηματίσει έναν αριθμό στην τηλεφωνική συσκευή, να παρακολουθήσει κινηματογράφο ή τηλεόραση κλπ.) [1].

Όπως προαναφέρθηκε, η πάθηση της υγρής ΗΕΩΚ είναι πολύ συχνά αμφοτερόπλευρη. Η πιθανότητα προσβολής του δεύτερου οφθαλμού είναι αθροιστικά 10% κάθε χρόνο μετά την προσβολή του πρώτου και αυξάνεται ακόμα περισσότερο όταν συνυπάρχουν στον υγιή οφθαλμό ευρήματα ξηρής μορφής ΗΕΩΚ.

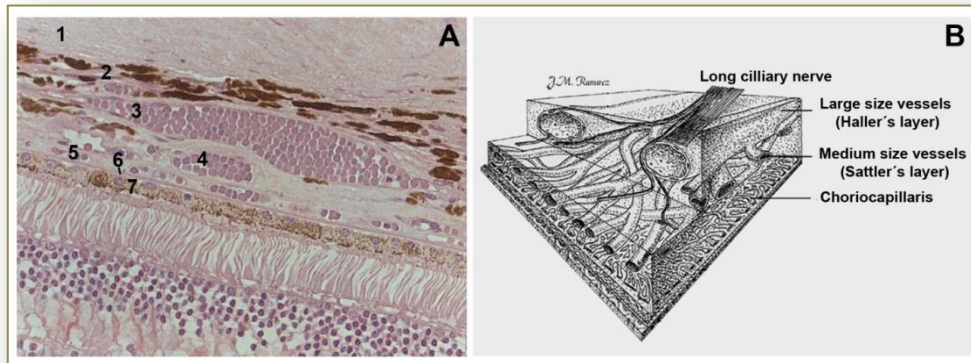
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο: Παθοφυσιολογικές αλλοιώσεις στον οφθαλμό στην ΗΕΩΚ

Για την καλύτερη κατανόηση της νόσου της ΗΕΩΚ και για το πώς αυτή εξελίσσεται, απαιτείται η μελέτη των δομικών αλλαγών που συμβαίνουν στους εμπλεκόμενους ιστούς τόσο σε μορφολογικό, όσο και σε κυτταρικό επίπεδο. Τέτοιου τύπου αλλοιώσεις παρατηρούνται στο χοριοειδή χιτώνα, στη μεμβράνη του Bruch, στο ΜΕ και στον ιδίως αμφιβληστροειδή χιτώνα. Για τη διερεύνηση της αιτιοπαθογένειας μελετώνται σε βάθος, εκτός από τις μορφολογικές αλλαγές, τα μοριακά χαρακτηριστικά και οι μηχανισμοί τους, που έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία των drusen και τη χοριοειδική νεοαγγείωση που συνδέονται άμεσα με την ασθένεια της ΗΕΩΚ.

2.1 Μεταβολές στο χοριοειδή χιτώνα

Ο χοριοειδής χιτώνας είναι ένας εξαιρετικά αγγειοβριθής, χρωστικοφόρος ιστός εντοπιζόμενος μεταξύ του αμφιβληστροειδούς και του σκληρού χιτώνα. Εκτείνεται στην επιφάνεια του οπίσθιου πόλου από το οπτικό νεύρο μέχρι την πριονωτή περιφέρεια (απώτερο όριο του νευροαμφιβληστροειδούς) όπου συνδέεται με το ακτινωτό σώμα και την ίριδα στο πρόσθιο πόλο. Αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό ο οποίος περικλείει ένα εκτεταμένο αγγειακό δίκτυο. Διαθέτει πλήθος ινοβλαστών, μακροφάγων, λεμφοκυττάρων, σιτευτικών κυττάρων, πλασματοκυττάρων, ινών κολλαγόνου και ελαστικών ινών. Η παρουσία άφθονων μελανοκυττάρων ευθύνεται για την κεχρωσμένη χροιά του ιστού και ελαχιστοποιεί το φαινόμενο σκέδασης των εισερχομένων ακτίνων του φωτός. Ένας δυνητικός χώρος ο υπερχοριοειδικός αναπτύσσεται μεταξύ σκληρού και χοριοειδούς χιτώνα [32]. Ιστολογικά παρατηρούνται δύο στοιβάδες στο χοριοειδή: α) η εξωτερική στοιβάδα με μεγάλους μεγέθους αγγεία (στοιβάδα του Haller) και μεσαίου μεγέθους αιμοφόρα αγγεία (στοιβάδα του Satler) και β) η εσωτερική στοιβάδα πλούσια σε τριχοειδή η οποία καλείται χοριοτριχοειδική (**Εικόνα 2.1**). Το έσω όριο του χοριοειδούς φράσσεται από μια λεπτή μεμβράνη πάχους 3-4 μm , τη μεμβράνη του Bruch [33,34]. Ο χοριοειδής είναι πλούσιος σε αιμάτωση. Η αιματική ροή του είναι εξαιρετικά υψηλή και έχει εκτιμηθεί ότι ο χοριοειδής είναι υπεύθυνος για το 90% της συνολικής ροής του αίματος εντός του βολβού. Μάλιστα το 70% αυτής αφορά τη χοριοτριχοειδική στοιβάδα (**Εικόνα 2.2**). Τα χοριοτριχοειδή αποτελούν ένα πλούσιο δίκτυο από θυριδωτά τριχοειδή διαμέτρου (12-25 μm) ώστε να διευκολύνεται η διάχυση μικρών μορίων (οξυγόνο, βιομόρια, διοξείδιο του άνθρακα, νερό, ιόντα, θρεπτικά στοιχεία, μεταβολικά παραπροϊόντα) προς και από τις έξω στοιβάδες του αμφιβληστροειδούς. Έτσι ο χοριοειδής ρυθμίζει

τη θερμοκρασία και υποστηρίζει το 90% των μεταβολικών αναγκών των εξωτερικών στοιβάδων του αμφιβληστροειδούς [33,35].



Εικόνα 2.1: Ιστολογική απεικόνιση του χοριοειδούς όπου φαίνονται οι δύο στοιβάδες: 1) η εξωτερική στοιβάδα με μεγάλου μεγέθους αγγεία (στοιβάδα του Haller) και μεσαίου μεγέθους αιμοφόρα αγγεία (στοιβάδα του Satler) και 2) η εσωτερική στοιβάδα πλούσια σε τριχοειδή η οποία καλείται χοριοτριχοειδική [36].

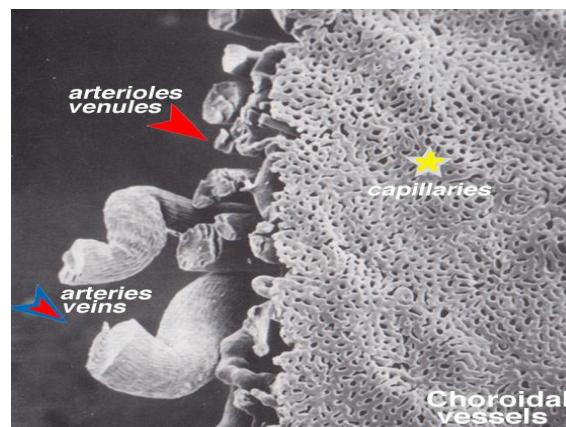


Fig. 21a. The three vascular layers in the choroid: outer arteries and veins (red/blue arrow), medial arterioles and venules (red arrow) and inner capillary bed (yellow star). Corrosion cast of a cut face of the human choroid (Zhang, 1994).

Εικόνα 2.2: Απεικόνιση του αγγειακού συστήματος του χοριοειδούς στην οποία φαίνονται με κόκκινο βέλος οι αρτηρίες και με μπλε-κόκκινο οι φλέβες [37].

Τα χοριοτριχοειδή ουσιαστικά συμβάλλουν στη μεταφορά των θρεπτικών συστατικών από το ΜΕ προς τους φωτοϋποδοχείς και είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων από τους φωτοϋποδοχείς είτε μέσω ανακύκλωσης τους, είτε μέσω αποδόμησης και εξωκυττάρωσής τους. Η στενή σχέση που έχουν το ΜΕ, η μεμβράνη του Bruch και τα χοριοτριχοειδή και ο τρόπος με τον οποίο είναι παρατεταγμένα βοηθά τα τριχοειδή να παρέχουν τις μεταβολικές ανάγκες στους

φωτοϋποδοχείς, συμπεριλαμβανομένου το 90% του καταναλισκόμενου O_2 σε συνθήκες σκότους. Από τη στιγμή που οι φωτοϋποδοχείς υφίστανται υποξικές συνθήκες όταν υπάρχει σκοτάδι, οποιαδήποτε διαταραχή συμβαίνει στην αιματική ροή του χοριοειδούς θα ήταν επιβλαβής για τα κύτταρα αυτά [38].

Σε νεαρά, υγιή άτομα τα χοριοτριχοειδή εμφανίζουν θυριδωτό ενδοθήλιο (*fenestrated endothelium*) χωρίς στενοσυνδέσμους και η ανάπτυξή τους εν μέρει εξαρτάται από την έκκριση του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF:Vascular Endothelial Growth Factor) από το ME. Ο VEGF υποδοχέας 1 και 2 αναφέρεται ότι εκφράζεται στην πλευρά που βρίσκεται ο αμφιβληστροειδής. Τα κύτταρα του ME στα πλαίσια μιας παρακρινούς τροφικής δραστηριότητας εκκρίνουν VEGF προς τη βασική τους πλευρά. Ο VEGF προάγει την αγγειοδιαστολή, την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, τη διατήρηση των θυριδώσεων και την αγγειογένεση και δεσμεύεται από τον υποδοχέα του KDR (kinase insert domain receptor ή VEGFR-2) ο οποίος εντοπίζεται στο παρακείμενο ενδοθήλιο των χοριοτριχοειδών [39]. Επίσης τα χοριοτριχοειδή αποτελούν το μοναδικό σύστημα στο οποίο τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν ένα ενδοκυτταρικό μόριο προσκόλλησης το ICAM-1. Το ICAM-1 είναι υπεύθυνο για την προσκόλληση των λευκοκυττάρων (μακροφάγα και ουδετερόφιλα) στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω του συμπλέγματος CD11b/CD18 στην επιφάνειά τους. Με την πάροδο του χρόνου και καθώς το άτομο μεγαλώνει, τα χοριοτριχοειδή υφίστανται μεταβολές στη δομή και τη λειτουργία τους και οι μεταβολές αυτές παρατηρούνται πολύ πιο έντονα σε άτομα που έχουν διαγνωστεί με ΗΕΩΚ [5,40-42]. Οι πιο σημαντικές αλλαγές που παρατηρούνται στου οφθαλμούς ατόμων με ΗΕΩΚ είναι: α) η μείωση της πυκνότητας και της διαμέτρου των χοριοτριχοειδών [43-47] β) η μετατροπή του αγγειακού συστήματος των χοριοτριχοειδών από κολποειδές σε σωληνοειδές [5] και γ) η μείωση ή η απώλεια της κυτταροβρίθειας.

Οι αλλαγές αυτές διαφέρουν ανάμεσα στις δύο μορφές της ΗΕΩΚ, αλλά και στις δύο περιπτώσεις επιδρούν στη μεταφορά οξυγόνου και μεταβολιτών από τα χοριοτριχοειδή προς το ενδότερο τμήμα του αμφιβληστροειδούς.

Στα άτομα που έχουν διαγνωστεί με τη μη εξιδρωματική μορφή, οι αλλαγές που παρατηρούνται είναι εκτενέστερες. Συγκεκριμένα σε οφθαλμούς με γεωγραφική ατροφία, εμφανίζεται δραματική μείωση των χοριοτριχοειδών και επιπρόσθετα εμφανίζουν μειωμένη διάμετρο και απώλεια της φυσιολογικής θυριδωτής δομής τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δίνεται η εντύπωση κατά τη διαδικασία της αγγειογραφίας ότι τα χοριοτριχοειδή κάτω από το ME έχουν

εξαφανιστεί πλήρως, χωρίς ωστόσο αυτό να αληθεύει. Αυτό οφείλεται στη μείωση της διαμέτρου τους και στην απώλεια των θυριδώσεων που δεν επιτρέπουν τη δίοδο και την εξαγγείωση της χρωστικής. Οι αλλαγές στο χοριοειδή χιτώνα είναι δευτεροπαθείς στην ατροφία του ΜΕ και στερεί τους αυξητικούς παράγοντες από τα χοριοτριχοειδή επηρεάζοντας την πυκνότητα και τα δομικά τους χαρακτηριστικά [40].

Όσον αφορά τα άτομα με την εξιδρωματική μορφή της ασθένειας από μελέτες έχει φανεί ότι η πρωτογενής βλάβη αφορά τα χοριοτριχοειδή και έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση ισχαιμίας του ΜΕ και άρα την έκκριση ουσιών που προάγουν την νεοαγγείωση [41]. Πολλοί ερευνητές έχουν επιβεβαιώσει τέτοιου τύπου αλλαγές στην αιματική ροή του χοριοειδούς χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές όπως την αγγειογραφία με φλουοροσκεΐνη και ινδοκυανίνη, το laser Doppler και την έγχρωμη Doppler απεικόνιση. Τα ευρήματα που βρέθηκαν με όλες τις τεχνικές ήταν η μειωμένη αιμάτωση του χοριοειδούς και η καθυστερημένη φάση πλήρωσης. Ακόμη οι Grunwald και συνεργάτες έδειξαν ότι τα άνωθι ευρήματα σχετίζονται με τη βαρύτητα της ΗΕΩΚ [46] και επιβεβαιώθηκαν από τους Metelitsina και συνεργάτες οι οποίοι παρατήρησαν ότι οι οφθαλμοί παρουσίαζαν χαμηλότερη ροή στην περιοχή της ωχράς και συνδέονταν με αυξημένο κίνδυνο απώλειας τριών ή και περισσότερων γραμμών οπτικής οξύτητας [48]. Επίσης από ιστολογική παρατήρηση προκύπτει ότι υπάρχει μείωση της πυκνότητας των χοριοτριχοειδών χωρίς όμως να έχει προηγηθεί γεωγραφική ατροφία.

Αυτό που χαρακτηρίζει και τις δύο μορφές ΗΕΩΚ και ειπώθηκε από τον Friedman και τους συνεργάτες είναι ότι η ΗΕΩΚ αποτελεί μια χρόνια αιμοδυναμική πάθηση χαρακτηριζόμενη από αθηροσκληρωτικές αλλαγές που επηρεάζουν τη χοριοειδική αγγείωση [49]. Αυτές οι αλλαγές οφείλονται στην εναπόθεση λιπιδίων στο σκληρό χιτώνα και στη μεμβράνη του Bruch και έχει ως συνέπεια την αύξηση μετατριχοειδικής πίεσης, τη μείωση χοριοτριχοειδικής ροής και την αύξηση υδροστατικής πίεσης εντός των χοριοτριχοειδών με την τελευταία αλλαγή να επιτρέπει την εξαγγείωση και εναπόθεση εξωκυττάρων πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων και λιπιδίων που αποτελούν το βασικό συστατικό για τη δημιουργία βασικών εναποθέσεων και drusen που εντοπίζονται στη μη εξιδρωματική μορφή. Στην εξιδρωματική μορφή το αιμοδυναμικό μοντέλο επηρεάζεται λόγω της ισχαιμίας και της υποξίας που επάγουν την έκκριση προαγγειογενετικών ουσιών και τη δημιουργία χοριοειδικής νεοαγγείωσης [50].

Επομένως γίνεται κατανοητό ότι αν και η αιτία μπορεί να διαφέρει στις δύο μορφές ΗΕΩΚ το βασικό χαρακτηριστικό και των δύο είναι ότι επηρεάζεται η σχέση του ΜΕ με τα χοριοτριχοειδή, με τα τελευταία να υφίστανται εκφύλιση.

2.2 Μεταβολές στη μεμβράνη του Bruch

Η μεμβράνη του Bruch (*vitreous lamina*) αποτελεί την ενδότερη στοιβάδα του χοριοειδούς με πάχος 2-4 μm και δομικά αποτελείται από πέντε στοιβάδες (εκ των έσω προς τα έξω): α) τη βάση της μεμβράνης του ΜΕ β) την εσωτερική κολλαγονούχο ζώνη γ) τη ζώνη ελαστικών ινών δ) την εξωτερική κολλαγονούχο ζώνη και ε) τη βάση της μεμβράνης των χοριοτριχοειδών οι οποίες είναι στρατηγικά τοποθετημένες μεταξύ του ΜΕ και των θυριδωτών τριχοειδών του χοριοειδούς χιτώνα. Η ύπαρξη της μεμβράνης λειτουργεί ως μοριακό φίλτρο μεταξύ του ΜΕ και της αιματικής κυκλοφορίας, αφού εξυπηρετεί τις μεταβολικές ανάγκες του αμφιβληστροειδούς καθώς το οξυγόνο, οι ηλεκτρολύτες, τα θρεπτικά και οι κυτοκίνες που προορίζονται για το ΜΕ και τους φωτοϋποδοχείς περνούν από τα χοριοτριχοειδή και μέσω της μεμβράνης του Bruch, ενώ τα υπολείμματα ακολουθούν την αντίθετη πορεία για την αποβολή τους. Το ίδιο ισχύει και για τις βιταμίνες, τα σηματοδοτικά μόρια και άλλους παράγοντες που χρειάζονται για τη λειτουργία των φωτοϋποδοχέων και που μεταφέρονται μέσω μορίων λιποπρωτεΐνης από τη μεμβράνη προς το ΜΕ. Εκτός όμως από τη ρύθμιση της διάχυσης των βιομορίων, η μεμβράνη επιτελεί και άλλες λειτουργίες όπως η στήριξη για την προσκόλληση, εμπλέκεται στη μετανάστευση και στη διαφοροποίηση των κυττάρων του ΜΕ και την αποτροπή της κυτταρικής μετανάστευσης μεταξύ χοριοειδούς και αμφιβληστροειδούς χιτώνα [34]. Με την πάροδο του χρόνου η μεμβράνη υφίσταται σημαντικές αλλαγές, επηρεάζοντας όλα της τα χαρακτηριστικά και τις λειτουργίες. Η δομή, η μοριακή σύσταση και οι φυσιολογικές της ιδιότητες μεταβάλλονται, με κύριο χαρακτηριστικό την αύξηση του πάχους της και μείωση της ικανότητας του φιλτραρίσματος και της μεταφοράς των μεταβολιτών όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 2.1**. Αυτό οδηγεί στην ανάπτυξη των drusen, βασικών γραμμικών και υμενικών εναποθέσεων, αλλά και στην αυξημένη συγκέντρωση υπολειμμάτων αποτελούμενα από φωσφολιπίδια όπως τα **Basal Linear Deposits (BLinD)** και τα **Basal Laminar Deposits (BLamD)** πάνω και εσωτερικά της μεμβράνης. Η συγκέντρωση φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στο κέντρο του βυθού παρά στην περιφέρειά του, προσδίδοντας έτσι ένα πεταλοειδές σχήμα στη δομή της μεμβράνης (**Εικόνα 2.3**). Με τον τρόπο αυτό προφλεγμονώδεις και νεοαγγειακοί παράγοντες επάγουν το σχηματισμό αγγείων, καταστρέφοντας την αρχιτεκτονική δομή του αμφιβληστροειδούς

(Εικόνα 2.4). Σε μοριακό επίπεδο παρατηρείται ανάπτυξη σταυροσυνδέσμων (crosslinks) μεταξύ των μορίων του κολλαγόνου, μείωση του ρυθμού αποδόμησης των πρωτεογλυκανών, εναπόθεση λιπιδίων και τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGE: Advanced Glycation End-points) και εναπόθεση ανόργανων στοιχείων όπως ασβεστίου, ψευδραγύρου και σιδήρου. Επίσης υπάρχει μεγάλη συσσώρευση πρωτεϊνών σχετιζόμενες με τη φλεγμονή και την άμυνα του ξενιστή με τη μορφή ολιγομερών που σε συνδυασμό όλες οι άνωθεν μεταβολές οδηγούν σε [5,51,52]:

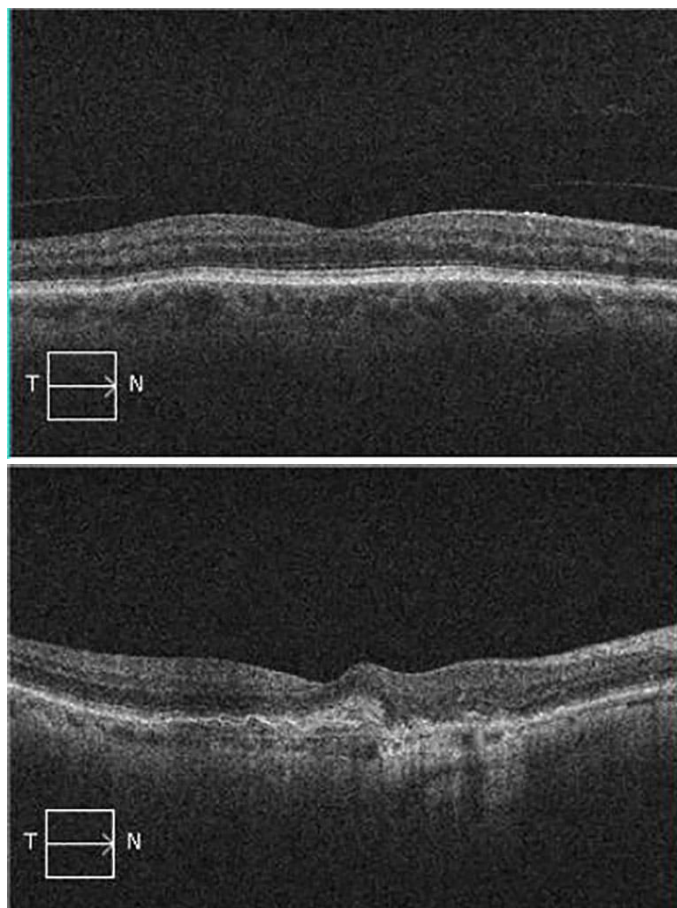
- a) Σταδιακή πάχυνση των δυο κολλαγονούχων στρωμάτων
- b) Τροποποίηση και εκφυλισμό του κολλαγόνου και της ελαστίνης
- c) Αυξημένα επίπεδα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης και τα προϊόντα αυτής
- d) Συσσώρευση διαφόρων ειδών υπολειμμάτων κάτω από το ME
- e) Εκφυλισμός των φωτοϋποδοχέων λόγω αυξημένης υδροφοβικότητας, μειωμένη διαπερατότητα, διαταραχές στην ανταλλαγή θρεπτικών μεταξύ του χοριοειδή και του ME
- f) Εκθετική μείωση της υδραυλικής αγωγιμότητας της μεμβράνης

Η αύξηση της αναλογίας της θειϊκής ηπαράνης στο κλάσμα των πρωτεογλυκανών έχει ως αποτέλεσμα να μειώνει την αντιφλεγμονώδη απόκριση (καθώς η θειϊκή ηπαράνη δεσμεύει το ρυθμιστικό παράγοντα του συμπληρώματος CFH), ενώ οι παρουσία των AGE επιδρά στη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών της μεμβράνης ενεργοποιώντας τους υποδοχείς των AGE (RAGE και AGER1) στο ME [34,51].

Πίνακας 2.1: Οι δομικές αλλαγές που παρατηρούνται στη μεμβράνη του Bruch σε άτομα με HEΩΚ.

Δομικές Αλλαγές	Λειτουργικό Επακόλουθο
Συσσώρευση λιπιδίων	Σχηματισμός του «λιπιδικού τείχους», διαταραχή της μεταφοράς
Αύξηση του πάχους της μεμβράνης του Bruch	Μείωση της ελαστικότητας και της διαπερατότητας
Σταυροσύνδεσμοι κολλαγόνου	Μείωση της διαπερατότητας, της ελαστικότητας και της ικανότητας διήθησης
Συσσώρευση AGE	Διαταραχή της πρωτεϊνικής λειτουργίας
Αύξηση μεγέθους πρωτεογλυκανών,	Μείωση της αντιφλεγμονώδους απόκρισης

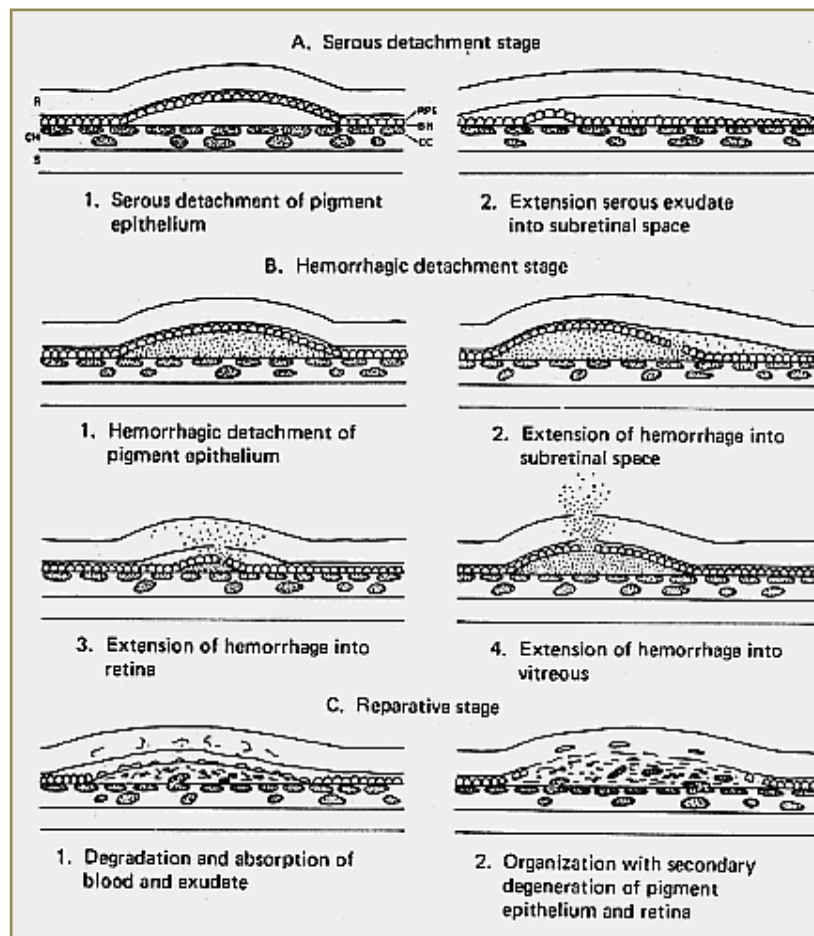
αύξηση κλάσματος θειϊκής ηπαράνης	
Ασβεστοποίηση της στοιβάδας των ελαστικών ινών	Μείωση της ελαστικότητας



Εικόνα 2.3: Απεικόνιση οφθαλμού που πάσχει από τη μη εξιδρωματική μορφή της ΗΕΩΚ. Με τη χρήση της μεθόδου OCT είναι δυνατή η σύγκριση του αλλοιωμένου και του φυσιολογικού οφθαλμού. Στην πάνω εικόνα φαίνεται η συσσώρευση drusen στην περιοχή του αμφιβληστροειδούς ενώ στην κάτω εικόνα απεικονίζεται ο φυσιολογικός (1960eye.com).

Η συσσώρευση των λιπιδίων στη μεμβράνη του Bruch επηρεάζει την εξέλιξη της ασθένειας και γι' αυτό το λόγο εγείρει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον η μελέτη τους. Κατά κύριο λόγο τα λιπίδια που ανευρίσκονται είναι κυτταρικής προέλευσης όπως φωσφολιπίδια, τριγλυκερίδια και χοληστερόλη, προερχόμενα από το ΜΕ [53]. Ωστόσο η ολική ποσότητα, καθώς και η αναλογία μεταξύ των ουδέτερων λιπών και των φωσφολιπιδίων δεν είναι ίδια για όλα τα άτομα, αλλά

διαφέρει ίσως σε σχέση με τις εκάστοτε διατροφικές συνήθειες των ατόμων [5,34]. Σύμφωνα με επιστημονικές μελέτες η παρουσία λιπιδίων εντοπίζεται κυρίως στο κέντρο του βυθού και συγκεκριμένα στην περιοχή της ωχράς κηλίδας και λιγότερο στην περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς. Εν τέλει η αυξημένη συγκέντρωση των λιπιδίων έχει ως συνέπεια τη μειωμένη διακίνηση νερού, ιόντων και μακρομορίων μεταξύ του ME και της συστηματικής κυκλοφορίας. Η σταδιακή συσσώρευση των λιπιδίων στον υπαμφιβληστροειδικό χώρο εμποδίζει τη διέλευση του νερού μέσω της μεμβράνης και επομένως μπορεί να οδηγήσει σε αποκόλληση των κυττάρων του ME από τη βασική τους μεμβράνη [5,34].



Εικόνα 2.4: Στα τρία στάδια A,B,C απεικονίζεται η σταδιακή καταστροφή της αρχιτεκτονικής δομής του αμφιβληστροειδούς λόγω του σχηματισμού αγγείων (Chapter 13 Retina Marilyn C., Kincaid, Myron Yanoff and Ben S. Fine).

2.3 Μεταβολές στο μελάγχρουν επιθήλιο

Το μελάγχρουν επιθήλιο αποτελείται από μια σειρά κυβοειδών κυττάρων που περιέχουν κοκκία καφέ-μαύρης χρωστικής, τη μελανίνη. Η μελανίνη απορροφά φως μήκους κύματος μεταξύ 400 και 800 nm και έτσι μειώνει το φως που εισέρχεται μέσα στο μάτι, προστατεύοντας τους φωτοϋποδοχείς. Η βασική (έξω) πλευρά των κυττάρων παρουσιάζει πολύπλοκη πτύχωση με αποτέλεσμα να αυξάνεται η επιφάνεια επαφής τους με την παρακείμενη μεμβράνη του Bruch με την οποία συνδέονται πολύ ισχυρά. Αντίθετα η σύνδεσή τους με τον ιδίως αμφιβληστροειδή είναι χαλαρή και μπορεί εύκολα να διασπαστεί από μικρές σχετικά δυνάμεις. Στερεές συμφύσεις μεταξύ τους υπάρχουν μόνο στην περιοχή του οπτικού δίσκου και της πριονωτής περιφέρειας. Η κορυφή των κυττάρων (έσω πλευρά) φέρει πολλαπλές θηλώδεις προεκβολές (μικρολάχνες), οι οποίες υποδέχονται τα έξω τμήματα των φωτοϋποδοχέων. Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των κυττάρων του ME είναι η στενή σύνδεση που έχουν μεταξύ τους οι πλευρικές επιφάνειες τους, συμβάλλοντας έτσι στη δημιουργία του έξω αιματοαμφιβληστροειδικού φραγμού. Οι λειτουργίες που επιτελεί το ME είναι πολλαπλές και χωρίζονται σε:

A) Φυσικές

- 1) προστατεύει την οπτική μοίρα του αμφιβληστροειδούς από την είσοδο υγρών από το χοριοειδή, λειτουργώντας ως φραγμός
- 2) βοηθάει στη στερεή συγκόλληση του μελαγχρού επιθηλίου και του αμφιβληστροειδούς

B) Οπτικές

- 1) η μελανίνη περιορίζει τη διάχυση του φωτός και έτσι έχουμε καθαρότητα στην εικόνα
- 2) δρα σα φραγμός στο φως που εισέρχεται από το σκληρό χιτώνα, βελτιώνοντας τη διακριτική ικανότητα
- 3) τα κοκκία μελανίνης απορροφούν την ακτινοβολία του LASER προκαλώντας εγκαύματα, που αποτελούν τη βάση της θεραπείας με LASER σε παθήσεις όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η νεοαγγείωση, οι ρωγμές κλπ.

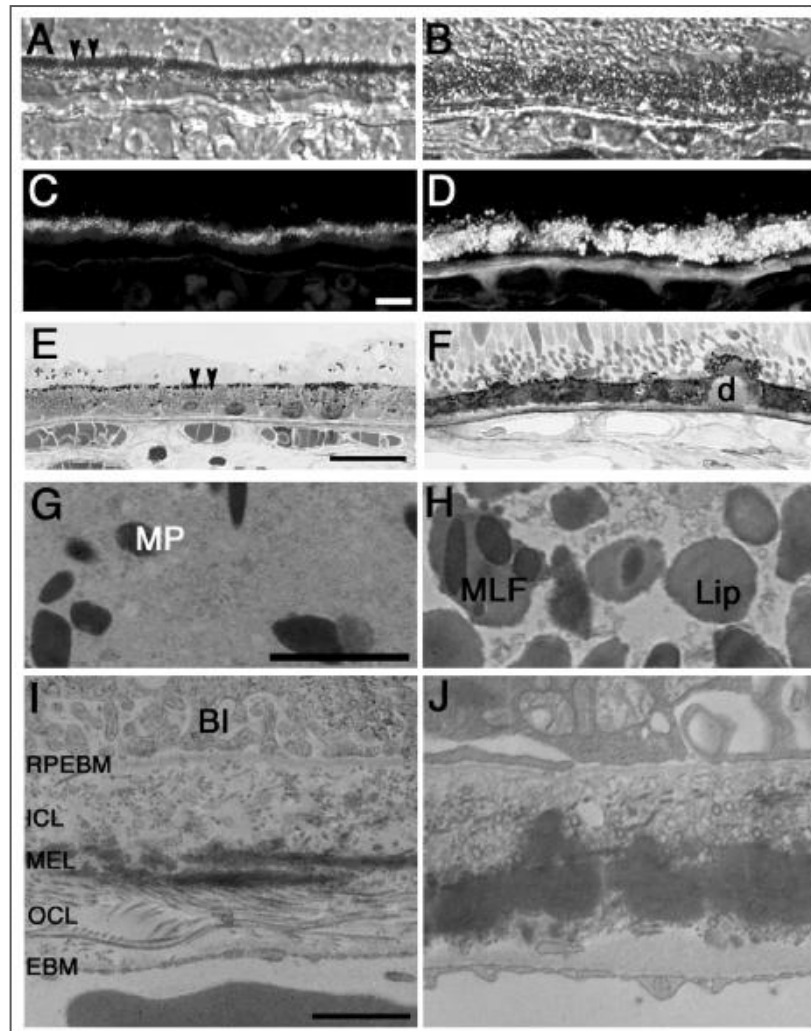
Γ) Μεταβολικές-Βιοχημικές

- 1) φαγοκυτταρώνει τα έξω τμήματα των κωνίων και των ραβδίων
- 2) συμβάλει στο μεταβολισμό της βιταμίνης A
- 3) μεταφέρει θρεπτικά υλικά από το χοριοειδή και βοηθάει στη σύνθεση κοκκίων μελανίνης

Καθώς ο άνθρωπος γερνά παρατηρείται πληθώρα δομικών αλλαγών στο ME, συμπεριλαμβανομένου της απώλειας των κοκκίων μελανίνης και της αύξησης της περιεκτικότητας των εναπομείναντων μη αποδομημένων προϊόντων (ολικά λιπίδια και ουδέτερα λίπη), που οδηγούν στην εμφάνιση λυσοσωμικών εγκλείστων και στη συσσώρευση λιποφουσκίνης (Εικόνες 2.5,2.6). Τα κοκκία λιποφουσκίνης αποτελούν άχρηστες κυτταρικές εναποθέσεις από αποπίπτοντα κύτταρα του ME και από λυσοφαγώματα των μεμβρανών των φωτοϋποδοχέων που βάσει μελετών αποτελούν παράγωγα της βιταμίνης A. Έως τώρα έχουν ταυτοποιηθεί δέκα διαφορετικά χρωμοφόρα τμήματα όπου όλα εμφανίζουν κοινές κορυφές απορρόφησης στην περιοχή του υπεριώδους, γύρω στα 280-330 nm. Από τις ίδιες μελέτες έχει βρεθεί η χημική σύσταση των κοκκίων της λιποφουσκίνης, με τα κύρια λιπαρά οξέα που τη συνιστούν να είναι το παλμιτικό, το αραχιδονικό και το ελαϊκό. Επίσης με την τεχνολογία Tandem mass spectrometry (MS/MS) έχουν ταυτοποιηθεί τοξικά παραπροϊόντα ρετινάλης τα οποία δημιουργούνται από την ένωση δύο μορίων all-trans ρετινάλης με ένα μόριο φωσφατιδιλο-αιθανολαμίνης (A2-PE) -το οποίο ενίοτε μπορεί να μετατραπεί στη μορφή A2E-, και συνιστούν οξειδωμένες μορφές της βιταμίνης A. Η πρόσληψη της βιταμίνης A η οποία έχει μελετηθεί σε πρότερες μελέτες σε ζωικά μοντέλα έδειξε ότι συνδέεται άμεσα με το σχηματισμό κοκκίων λιποφουσκίνης και ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία, τους γενετικούς και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες [54]. Τα κύτταρα του ME για να μπορέσουν να αποδομήσουν επιτυχώς τις μεγάλες ποσότητες των φαγοσωμάτων, πρέπει πρωτίστως να φαγοκυτταρώσουν τις ελεύθερες ρίζες. Οι ελεύθερες ρίζες είναι το αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες που μπορεί να οφείλεται στην ηλικία, στην έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, είτε σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως το κάπνισμα.

Οι μεγάλες ποσότητες των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που εντοπίζονται στους φωτοϋποδοχείς και στο ME μετατρέπονται σε υπεροξειδία μετά από τη δράση των ελευθέρων ριζών. Τα υπεροξειδία αυτά φαγοκυτταρώνονται από το ME και συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα προκαλώντας διαταραχή στον κυτταρικό μεταβολισμό, οδηγώντας στον κυτταρικό

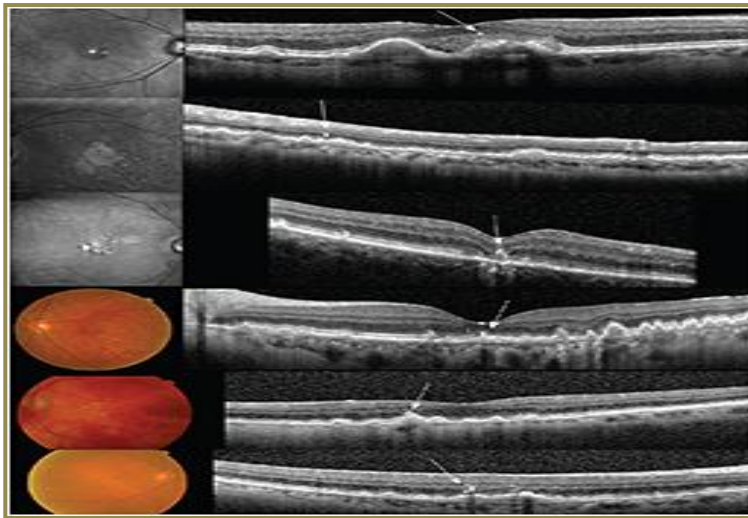
θάνατο. Έτσι ο κυτταροπλασματικός όγκος του ME καταλαμβάνεται ως επί το πλείστον από τη λιποφουσκίνη η οποία εντοπίζεται κυρίως στην περιοχή της ωχράς [55].



Εικόνα 2.5: Αλλαγές που παρατηρούνται στο ME ανάμεσα σε νέους (A,C,E,G,I) και ηλικιωμένους (B,D,F,H,J) δότες [56].

Η λιποφουσκίνη στο κύτταρο φαίνεται να προκαλεί βλάβες στα μιτοχόνδρια και στο μιτοχονδριακό DNA επάγοντας διαρροή λυσοσωμικού περιεχομένου με μηχανισμό που εμπλέκει την προαναφερθείσα αντίδραση της all-trans ρετινάλης -αιθανολαμίνης και ως εκ τούτου μειώνει τη δραστηριότητα των λυσοσωμικών ενζύμων. Αυτό οφείλεται στη μεταβολή της δομής των υποστρωμάτων τους και έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία πλήρους αποδόμησης των φαγοσωμάτων των φωτοϋποδοχέων [5,55].

Οι αλλοιώσεις έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό drusen ανάμεσα από το ΜΕ και τη μεμβράνη του Bruch καθώς και πάχυνση της μεμβράνης του Bruch οδηγώντας στην εκδήλωση της ασθένειας της ΗΕΩΚ. Οι μεταβολές αυτές εξελίσσονται αργά και διαφέρουν από άτομο σε άτομο [5,52,55-57]. Για το λόγο αυτό πλήθος μελετών έχει εστιάσει την έρευνα στο ρόλο που παίζει η γήρανση, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, η ηλιακή ακτινοβολία, τα αντιοξειδωτικά που μπορεί να προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής, οι οπτικές χρωστικές και ο ρόλος των λυσοσωμικών ενζύμων [58].



Εικόνα 2.6: Παραδείγματα ασθενών με τη μη εξιδρωματικού τύπου ΗΕΩΚ. Απεικονίζονται οι αλλαγές που συμβαίνουν στο ΜΕ με τη μέθοδο OCT [59].

2.4 Μεταβολές στον ιδίως αμφιβληστροειδή χιτώνα

Ο ιδίως αμφιβληστροειδής (*neural retina*) είναι οφθαλμοσκοπικά διαφανής, λεπτός υμένας. Εκτείνεται από την είσοδο του οπτικού νεύρου μέχρι την προιονωτή περιφέρεια και περιλαμβάνει πέντε μεγάλες κατηγορίες νευρικών κυττάρων εκ των έξω προς τα μέσα: τους φωτοϋποδοχείς (ραβδία, κωνία), τα δίπολα, τα οριζόντια, τα βραχύινα ή αμακρinoειδή και τα γαγγλιακά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά συνδέονται κατά ένα πολύπλοκο τρόπο, αλλά με μια συστηματική στοιβαδωτή ανατομική διάταξη. Οι φωτοϋποδοχείς έρχονται σε άμεση επαφή με το ΜΕ ενώ τα άλλα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς βρίσκονται πλησιέστερα στο φακό. Μια σημαντική συνέπεια της διάταξης αυτής είναι ότι το φως πρέπει να διέλθει δια μέσου στοιβάδων άλλων νευρικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς πριν επιδράσει στους φωτοϋποδοχείς. Για να μπορέσει το φως να φτάσει στους φωτοϋποδοχείς χωρίς να απορροφηθεί ή να διαχυθεί σε μεγάλο βαθμό οι εγγείς νευρικές στοιβάδες

του αμφιβληστροειδούς είναι αμύελες και άρα σχετικά διαφανείς. Επιπλέον σε μια περιοχή του αμφιβληστροειδούς στο κεντρικό βοθρίο τα κυτταρικά σώματα των εγγύς νευρώνων του αμφιβληστροειδούς έχουν μετατοπιστεί προς τα πλάγια επιτρέποντας στους φωτοϋποδοχείς της περιοχής να δεχθούν την οπτική εικόνα με την ελάχιστη οπτική παραμόρφωση.

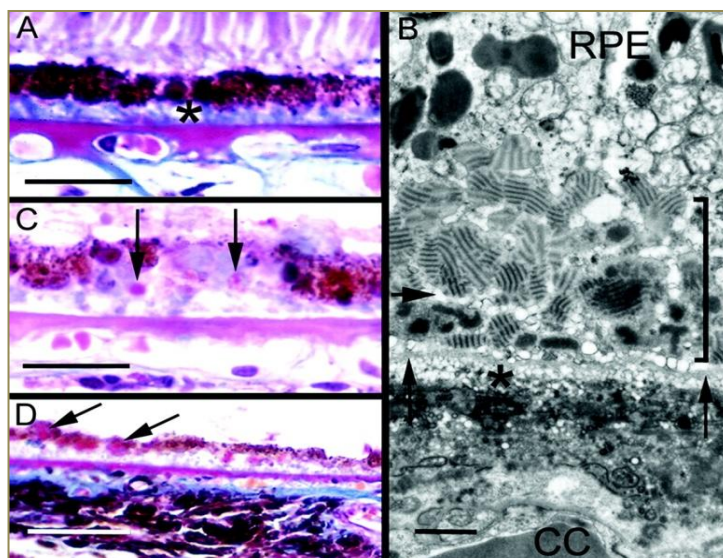
Αυξανομένης της ηλικίας έχει παρατηρηθεί μια σταδιακή απώλεια των φωτοϋποδοχέων η οποία με τα έως τώρα δεδομένα θεωρούταν φυσιολογική. Νέα δεδομένα από μελέτες επισημαίνουν ότι επειδή η ΗΕΩΚ είναι μια νόσος που ξεκινά από την παραβοθρική περιοχή είναι πολύ πιθανόν αυτό που έως τώρα θεωρούταν φυσιολογική απώλεια να είναι μια υποκλινική εικόνα έναρξης της ΗΕΩΚ που όμως δεν είναι ακόμα ορατή στο βυθό. Αν αυτό ισχύει τότε φαίνεται ότι τα ραβδία εμφανίζουν μια αυξημένη ευαλωτότητα σε σχέση με τα κωνία στη γήρανση και κατ' επέκταση στην εμφάνιση της ΗΕΩΚ. Συγκεκριμένα ο ολικός αριθμός των κωνίων στο κεντρικό βοθρίο παραμένει εξαιρετικά σταθερός κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής, ενώ ο αριθμός των ραβδίων μειώνεται έως και 30%. Όσον αφορά την απώλεια των φωτοϋποδοχέων στις δύο μορφές της ΗΕΩΚ έχει παρατηρηθεί ότι στα πρώιμα στάδια, στη ξηρή μορφή ΗΕΩΚ ο αριθμός των κωνίων δε μεταβάλλεται στο κεντρικό βοθρίο, ενώ η παραβοθρική περιοχή χαρακτηρίζεται από μεγάλα δυσμορφικά κωνία και μικρό αριθμό ραβδίων. Στην υγρή μορφή η εκλεκτική απώλεια των ραβδίων επιδεινώνεται τόσο ώστε όλοι οι φωτοϋποδοχείς που απομένουν στην περιοχή της ωχράς κηλίδας να είναι κωνία [60,61]. Επίσης αυτοί οι ασθενείς εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα όρασης εξαιτίας της ανάπτυξης χοριοειδικής νεοαγγείωσης και λόγω αυξημένης ουλοποίησης. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό των ασθενών είναι ότι η ικανότητά τους να βλέπουν με χαμηλό φωτισμό ή να οδηγούν τη νύχτα μειωνόταν δραματικά [62]. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι παρατηρούνται διαταραχές στη διαθεσιμότητα των ρετινοειδών στους φωτοϋποδοχείς, κυρίως της βιταμίνης Α και του παραγώγου της 11cis-ρετινάλης. Η έλλειψη των ουσιών αυτών επηρεάζει τόσο τα ραβδία όσο και τα κωνία ίσως λόγω των εναποθέσεων κάτω από το ΜΕ που λειτουργούν ως ένας μη ειδικός φραγμός στην ομαλή διακίνηση των ρετινοειδών από την κυκλοφορία προς τους φωτοϋποδοχείς [60].

Επομένως η εκφύλιση των φωτοϋποδοχέων είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη γήρανση και λαμβάνει διαστάσεις προτού η ΗΕΩΚ φτάσει σε προχωρημένο στάδιο στο ΜΕ. Αν και θεωρείται ότι οι αλλοιώσεις που συμβαίνουν στο ΜΕ και στη μεμβράνη του Bruch (κλινικές και ιστοπαθολογικές) συνιστούν την πρωτογενή βλάβη στην ΗΕΩΚ, εν τέλει η τυχόν δυσλειτουργία, η εκφύλιση ή ο κυτταρικός θάνατος των φωτοϋποδοχέων του ιδίως αμφιβληστροειδή είναι που θα

οδηγήσει στην απώλεια της όρασης, καθώς είναι αυτά που υφίστανται τη μεγαλύτερη και πρωιμότερη βλάβη.

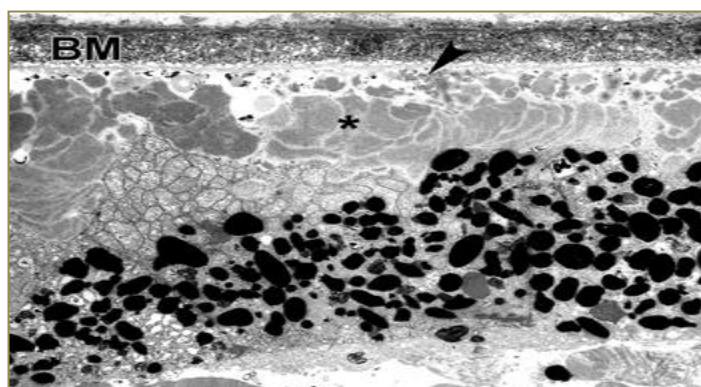
2.5 Drusen και βασικές εναποθέσεις (**BlamD** και **BlinD**)

Η κατανόηση της αιτιοπαθογένειας της ΗΕΩΚ απαιτεί την ενδελεχή παρατήρηση των παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών της ασθένειας. Από τα πρώτα στάδια της νόσου εμφανίζονται εξωκυττάρια παθολογοανατομικές βλάβες: εναποθέσεις στη μεμβράνη του Bruch είτε ως διάχυτες εναποθέσεις είτε με τη μορφή drusen [34,63-69]. Οι εναποθέσεις αυτές εντοπίζονται κάτω από το ΜΕ, εμφανίζονται πρώιμα κατά την εξέλιξη της νόσου και δεν είναι ορατές οφθαλμοσκοπικά. Υπάρχουν δύο διαφορετικά είδη βασικών εναποθέσεων 1) οι βασικές υμενώδεις (Basal laminar deposits: **BLamD**) και 2) οι βασικές γραμμικές εναποθέσεις (Basal linear deposits: **BLinD**). Ο διαχωρισμός τους γίνεται πρώτον ως προς τη θέση που έχουν με βάση το ΜΕ και δεύτερον ως προς τη σύστασή τους. Οι **BlamD** εναποθέσεις ανευρίσκονται στη βάση της μεμβράνης του ΜΕ και η ακριβής σύστασή τους δεν είναι απολύτως γνωστή, αλλά είναι γνωστό ότι εν μέρει αποτελούνται από μεμβρανικές πρωτεΐνες, λαμινίνη, γλυκοπρωτεΐνες, γλυκοζαμινογλυκάνες-χονδροϊτίνη καιθειϊκή ηπαράνη, ζώνες κολλαγόνου τύπου IV, υδατάνθρακες, χοληστερόλη και απολιποπρωτεΐνες Β και Ε (**Εικόνα 2.7**). Η συσσώρευσή τους χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως ιστοπαθολογικός δείκτης για την κατηγοριοποίηση των σταδίων της ΗΕΩΚ, καθώς υποδήλωνε την πάχυνση του ΜΕ, το βαθμό εκφύλισης των φωτοϋποδοχέων και τελικά την απώλεια όρασης. Μελέτες έδειξαν ότι αυτού του είδους εναποθέσεις ανευρίσκονταν κυρίως σε άτομα που διαγιγνώσκονταν με την πρώιμη μορφή της ασθένειας [70,71].

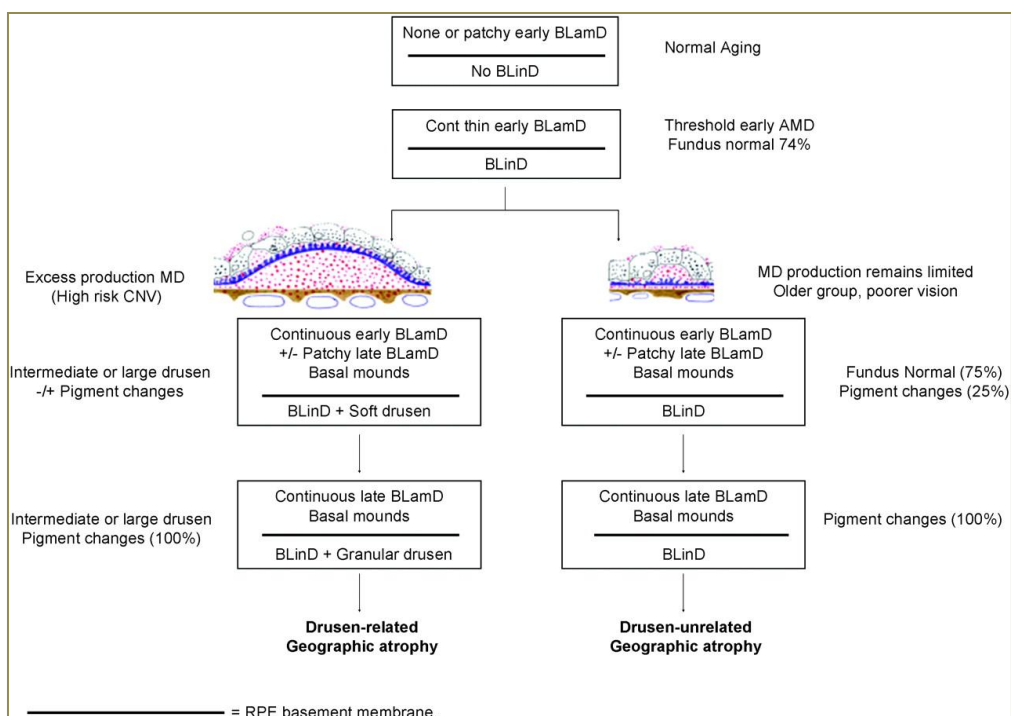


Εικόνα 2.7: Απεικόνιση των *BlamD*. (Α) Πρώιμος τύπος *BlamD* σχηματίζοντας στοιβάδα κάτω από το ΜΕ, όπως φαίνεται ύστερα από χρώση. (Β) Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο απεικονίζοντας τη διαφορά που έχουν υποστεί το ΜΕ (RPE) και τα χοριοτριχοειδή (CC). (C) Τα *BlamD* με χαρακτηριστικές υαλώδεις μάζες. (D) Περαιτέρω συσσώρευση *BlamD* που οδηγούν στο σχηματισμό οζωδών εξογκωμάτων [63].

Αντιθέτως οι ***BlinD*** εναποθέσεις εντοπίζονται εκτός της βασικής μεμβράνης του ΜΕ στην έσω κολλαγονική στοιβάδα της μεμβράνης του Bruch, αποτελούνται από μεμβρανικά υπολείμματα και από κυστίδια τα οποία είτε είναι επικαλυμμένα είτε όχι. Οι *BlinD* εναποθέσεις θεωρούνται πιο ισχυροί δείκτες σε σχέση με τις *BlamD* αναφορικά με την εμφάνιση drusen και την εξέλιξη της ΗΕΩΚ (**Εικόνα 2.8**) [34,63,64,66,68], ωστόσο η συνέργεια και των δύο εναποθέσεων είναι αυτή που πυροδοτεί την έναρξη της νόσου (**Εικόνα 2.9**).



Εικόνα 2.8: Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου που δείχνει τη συσσώρευση των *BlinD* [67].



Εικόνα 2.9: Η σχέση των εναποθέσεων *BlamD* και *BlinD* με την ΗΕΩΚ. Η συνέργεια των δύο εναποθέσεων πυροδοτεί την έναρξη εμφάνισης της νόσου. Το μονοπάτι που θα ακολουθηθεί εξαρτάται από το ποσοστό των εναποθέσεων [63].

Η ύπαρξη drusen αποτελεί το χαρακτηριστικό εύρημα της ασθένειας και η κλινική τους αξιολόγηση δίνει χρήσιμες πληροφορίες τόσο για την κατάσταση του ασθενούς όσο και για την πρόβλεψη της εξέλιξης της ασθένειας μέσω της αξιολόγησης των μικροσκοπικών χαρακτηριστικών τους, η οποία πραγματοποιείται είτε οφθαλμοσκοπικά είτε με τη χρήση αγγειογραφίας.

Ιστολογικά τα drusen μπορούν να ταξινομηθούν με βάση το σχήμα και το μέγεθος σε μαλακά, σκληρά, ασβεστιωμένα και διάχυτα. Αυτός ο διαχωρισμός γίνεται με τη βοήθεια μιας ειδικής χρωστικής, της PAS (Periodic Acid-Schiff) που είναι ειδική για γλυκογόνο και πρωτεογλυκάνες, αναγνωρίζοντας τα drusen ως μικρές εναποθέσεις στην περιοχή της ωχράς κηλίδας κάτω από το ΜΕ, εντός της μεμβράνης του Bruch. Κατόπιν της χρώσης είναι εφικτός ο διαχωρισμός τους σε δύο τύπους: α) τα σκληρά και β) τα μαλακά. Ο πρώτος τύπος αναγνωρίζεται ως μικρές, στρογγυλές, κίτρινες εναποθέσεις με σαφή όρια και η ύπαρξή τους θεωρείται φυσιολογική με την πάροδο της ηλικίας. Τέτοιου τύπου drusen δε θεωρούνται επιβλαβή και δεν προμηνύουν πάντα την ανάπτυξη ΗΕΩΚ. Τα μαλακά drusen διαφέρουν, καθώς είναι μεγαλύτερα με λιγότερο σαφή όρια και τυχόν εντοπισμός τους θεωρείται προπομπός οφθαλμολογικών αλλαγών. Συγκεκριμένα αυτές οι

εναποθέσεις θεωρούνται επιβλαβείς γιατί σχετίζονται με τα εναπομείνοντα προϊόντα που απομακρύνονται από την ωχρά και με τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που εισέρχονται σ' αυτήν [34].

Ωστόσο πλέον οι ερευνητές εστιάζουν στη μελέτη της μοριακής σύστασης των drusen θέλοντας να κατανοήσουν σε βάθος το μηχανισμό παθογένειας της νόσου, καθώς κάτι τέτοιο θα αποτελούσε σημαντικό όπλο στη φάρετρα αντιμετώπισης της ΗΕΩΚ με την ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Για τη μελέτη της πρωτεϊνικής σύστασης των drusen έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο οι ανοσοϊστοχημικές όσο και οι πρωτεωμικές προσεγγίσεις [34,66,67,69,72]. Οι έως τώρα μελέτες έδειξαν ότι τα drusen αποτελούνται κατά βάση από συσσωματώματα λιπιδίων, γλυκολιπιδίων, πρωτεϊνών και κυτταρικών στοιχείων. Εμφανίζουν υψηλή περιεκτικότητα σε ουδέτερα λίπη, χοληστερόλη (εστεροποιημένη και μη), ψευδάργυρο και υδατάνθρακες (με τη μορφή γλυκολιπιδίων και γλυκοπρωτεϊνών), με τους Hageman και συνεργάτες να προτείνουν ότι οι γλυκοπρωτεΐνες με Ο-γλυκοσιδικούς δεσμούς ανευρίσκονται στην κεντρική και πιθανώς αρχικά σχηματιζόμενη (χρονολογικά) περιοχή τους [67]. Επίσης πολλές από τις πρωτεΐνες που βρέθηκαν συνδέονται με τη φλεγμονή και την ανοσολογική απόκριση (κυρίως παράγοντες συμπληρώματος, αντιγόνα MHC τάξης II, λ αλυσίδες ανοσοσφαιρινών, CRP), με την ινωδόλυση και την πήξη (ινωδογόνο και παράγοντας X) καθώς και με το μεταβολισμό των λιπιδίων συμπεριλαμβανομένου των απολιποπρωτεϊνών apoE και apoB [67]. Επίσης εντοπίζονται τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης και οξειδωτικά τροποποιημένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα καθώς επίσης και πληθώρα άλλων πρωτεϊνών, όπως το β-αμυλοειδές, η ουμπικουϊνίνη, οι ιντεγκρίνες, ο ιστικός αναστολέας της μεταλλοπρωτεϊνάσης 3 (TIMP3), η φιμπρονεκτίνη, η βιτρονεκτίνη και οι κρυσταλλίνες [34,66,72].

Οι Crabb και συνεργάτες χρησιμοποιώντας πρωτεομική ανάλυση ταυτοποίησαν 129 διαφορετικές πρωτεΐνες στα drusen με το 65% αυτών να ανευρίσκονται τόσο σε drusen ασθενών όσο και σε υγιών ατόμων, χωρίς ωστόσο να είναι εφικτό να προσδιοριστεί το εμπλεκόμενο μονοπάτι που ευθύνεται για τη δημιουργία των εξωκυτταρικών εναποθέσεων [72]. Δεν είναι ξεκάθαρο εάν προέρχονται από τη συστηματική κυκλοφορία ή τα παρακείμενα κύτταρα, αν και μελέτες γονιδιακής έκφρασης έχουν δείξει πως ένα μεγάλο ποσοστό αυτών εκφράζεται τοπικά στα κύτταρα της περιοχής της ωχράς [34]. Τέλος, τα περισσότερα κυτταρικά συστατικά των drusen προέρχονται από τα κύτταρα του ME όπως οργανίδια, μεμβρανικά τμήματα, κυστίδια ή και ολόκληρα κύτταρα. Παραταύτα έχειδειχθεί βάσει ανοσοφαινοτυπικών μεθόδων ότι εντός των drusen ανευρίσκονται και κυτταρικές προεκτάσεις χοριοειδικών δενδριτικών κυττάρων [67,73].

Όσον αφορά το τρόπο δημιουργίας των drusen έχουν διατυπωθεί δύο θεωρίες: α) θεωρία της εναπόθεσης η οποία υποστηρίζει ότι τα drusen προέρχονται από τα κύτταρα του ME μέσω αποβολής ανώμαλου υλικού προς τη μεμβράνη του Bruch και β) θεωρία της μετατροπής που θεωρεί ότι προέρχονται μέσω της εκφυλιστικής μετατροπής των ίδιων των κυττάρων σε drusen. Το αγγειακό μοντέλο θεωρεί τα drusen απόρροια της αυξημένης εξαγγείωσης πρωτεϊνών και λιπιδίων από την πάσχουσα χοριοειδική κυκλοφορία. Οι Hageman και συνεργάτες αναφέρουν σε σχετική μελέτη ότι τυχόν βλάβη του ME μπορεί να προσελκύσει χημειοτακτικά δένδριτικά κύτταρα από το χοριοειδή χιτώνα, η ύπαρξη των οποίων οδηγεί σε τοπική φλεγμονώδη απόκριση, που εκφεύγουσα του ομοιοστατικού ελέγχου του οργανισμού δύναται να καταλήξει στη δημιουργία drusen και στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων [67]. Άλλοι ερευνητές, όπως ο Combadiere το 2007 εστιάζουν στο ρόλο της μικρογλοίας (ανοσολογικά κύτταρα) που φυσιολογικά εδράζεται στις εσωτερικές στοιβάδες του αμφιβληστροειδή [66].

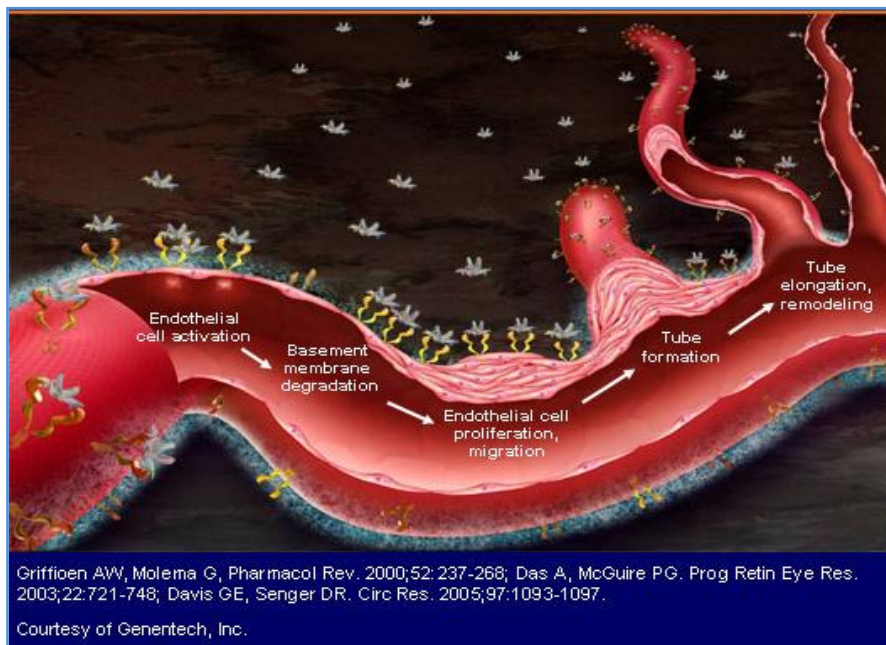
Παρόλη την ερευνητική προσπάθεια που έχει γίνει τα τελευταία χρόνια ακόμα δεν έχει ταυτοποιηθεί η ακριβής διαδικασία που απαιτείται για την δημιουργία των drusen.

2.6 Χοριοειδική νεοαγγείωση (CNV, Choroidal Neovascularization)

Η χοριοειδική νεοαγγείωση αποτελεί το κύριο χαρακτηριστικό της εξιδρωματικής μορφής HEΩΚ που όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1 αποτελεί την πιο σοβαρή μορφή της ασθένειας καθώς οδηγεί στην ξαφνική απώλεια όρασης του ασθενούς σε σύντομο χρονικό διάστημα. Για το λόγο αυτό, έχει προκαλέσει το έντονο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας αφού η κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών που την προκαλούν δίνει την ευκαιρία για ανακάλυψη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Η δημιουργία νεοαγγείωσης ξεκινά από το ME, τα κύτταρα του οποίου φέρουν υποδοχείς για τον VEGF υποδηλώνοντας μια παρακρινή δράση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες [74] η οποία προάγει την αγγειογένεση κάτω από τον αμφιβληστροειδή [75]. Ο VEGF εκκρίνεται ως μια ομοδιμερής πρωτεΐνη η οποία εκφράζεται στον ισχαιμικό αμφιβληστροειδή και διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων στα αιμοφόρα αγγεία. Έχουν ανευρεθεί υψηλές συγκεντρώσεις του VEGF και των VEGF υποδοχέων στα κύτταρα του ME (**Εικόνα 2.10**) [76,77,78]. Τα επίπεδα του VEGF είναι αυξημένα στο υαλώδες σώμα και στο πλάσμα των ασθενών με HEΩΚ [79], καθώς επίσης στους ινοβλάστες και στα διαφοροποιημένα κύτταρα του ME που

έχουν αφαιρεθεί μετά από χειρουργική επέμβαση [77]. Η αυξημένη παραγωγή του VEGF οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση του mRNA στο ME, στα ενδοθηλιακά κύτταρα του χοριοειδούς και στους ινοβλάστες [80] και είναι αρκετή για το σχηματισμό νεοαγγείωσης. Ο Schwesinger και οι συνεργάτες έδειξαν σε διαγονιδιακά ποντίκια ότι τα κύτταρα του ME που υπερεκφράζουν τον παράγοντα VEGF σχετίζονται με τα αυξημένα επίπεδα VEGF στο ME, στη μεμβράνη του Bruch και στο χοριοειδή λόγω των νέων αγγείων που δεν διαπερνούν τη μεμβράνη του Bruch [82].



Εικόνα: 2.10: Σχηματική απεικόνιση του αγγειογενετικού μονοπατιού επαγόμενο από τον VEGF. Μετά την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων αρχίζει η διαρροή των αγγείων, η αποδόμηση της βασικής μεμβράνης μέσω πρωτεασών, ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων, η μετανάστευση και η αναδιαμόρφωση [81].

Αυτή η διαπίστωση προτείνει ότι η αύξηση του VEGF στο ME πρέπει να συνοδεύεται και από άλλους παράγοντες που οδηγούν στην ανάπτυξη της νεοαγγείωσης [82]. Ενδοουλοειδική έγχυση VEGF σε σπονδυλωτά έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των χοριοειδικών ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ διαμόλυνση κυττάρων του ME με το γονίδιο του VEGF μέσω αδενοϊού σε ποντικούς προκάλεσε νεοαγγείωση και εξαγγείωση στο χοριοειδή που διαπέρασε τη μεμβράνη του Bruch, κατ' αναλογία με την ανθρώπινη παθολογία [83]. Παρά τα όσα προκύπτουν από τις μελέτες σε ζωικά μοντέλα, η πιο άμεση απόδειξη για τη συσχέτιση του VEGF με τη

χοριοειδική νεοαγγειογένεση προέρχεται από την κλινική πρακτική, όπου ενδοαλοειδική χορήγηση παραγόντων που αναστέλλουν ή μπλοκάρουν τον VEGF μειώνει τη νεοαγγειογένεση ή την διαρροή από ήδη σχηματισμένα νεοαγγεία και την απώλεια της όρασης σε ασθενείς με εξιδρωματική νόσο [84-87]. Σε συνδυασμό με τον VEGF υπάρχουν και άλλοι αυξητικοί παράγοντες που προάγουν τη νεοαγγείωση, όπως ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF-2), η αγγειοποιητίνη-2 (Ang-2) και το μονοξείδιο του αζώτου (NO). Οι αγγειοποιητίνες (Angiopoietins) είναι πρωτεΐνες που στοχεύουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα ειδικά για τον Tie-2 υποδοχέα. Η αγγειοποιητίνη-1 (Ang-1) και η Tie-2 παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσληψη και διατήρηση της διάταξης των κυττάρων (π.χ περικύτταρα) προάγοντας την ωρίμανση και σταθεροποίηση των αγγείων έχοντας ως αποτέλεσμα το σχηματισμό πολυκύτταρων αγγειακών δομών. Η αγγειοποιητίνη 2 (Ang-2) μπλοκάρει αυτή τη λειτουργία επιτρέποντας την αγγειογένεση μέσω της δράσης κυτοκινών, όπως ο VEGF. Οι συνθήκες υποξίας αυξάνουν την έκφραση της Ang-2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα [88], καθώς επίσης και του VEGF.

Τα κύτταρα του ME, εκτός από τον VEGF παράγοντα, εκφράζουν και μια ακόμη πρωτεΐνη, την PEDF (Pigment Epithelium Derived Factor) , η οποία επιδεικνύει νευροτροφική δράση για τους φωτοϋποδοχείς και έχει την ικανότητα να αναστέλλει την αγγειογένεση [84,85,89]. Συστηματική και τοπική χορήγηση PEDF σε ζωικά μοντέλα έχει φανεί ότι αναστέλλει την νεοαγγείωση που προκαλείται από την εφαρμογή laser ακτινοβολίας και από την εγκατάσταση χοριοειδικής νεοαγγείωσης σε διαγονιδιακούς ποντικούς που υπερεκφράζουν τον VEGF και επιπρόσθετα μπορεί να παρατηρηθεί υποχώρηση αυτής [90,91]. Το οξειδωτικό στρες έχει την ιδιότητα να επηρεάζει την ισορροπία έκφρασης μεταξύ του VEGF και της PEDF που παράγονται στο ME [92] και η σχετική αναλογία μεταξύ προαγγειογενετικών και αντιαγγειογενετικών παραγόντων στο χοριοειδικό μικροπεριβάλλον είναι εκείνη που θα καθορίσει την ανάπτυξη ή μη της χοριοειδικής νεοαγγειογένεσης .

Οι υποδοχείς κινάσης τυροσίνης Tie-1 και Tie-2 παίζουν ρόλο στα όψιμα στάδια της αγγειογένεσης [93]. Προς το παρόν δεν έχει αποδειχθεί εάν οι διαταραχές στην αιματική ροή του χοριοειδούς είναι αρκετές για να επάγουν απόκριση στο ME και στο χοριοειδή. Όπως επίσης δεν έχει αποδειχτεί ότι η πάχυνση και η εναπόθεση λιπιδίων στη μεμβράνη του Bruch επηρεάζουν τη διάχυση του οξυγόνου στους φωτοϋποδοχείς. Ο κίνδυνος εμφάνισης νεοαγγείωσης αυξάνει όσο αυξάνει ο αριθμός και το μέγεθος των drusen. Τα ενεργοποιημένα κλάσματα του συμπληρώματος, όπως τα C3a και C5a που ανευρίσκονται στα drusen, εκτός της χημειοτακτικής τους

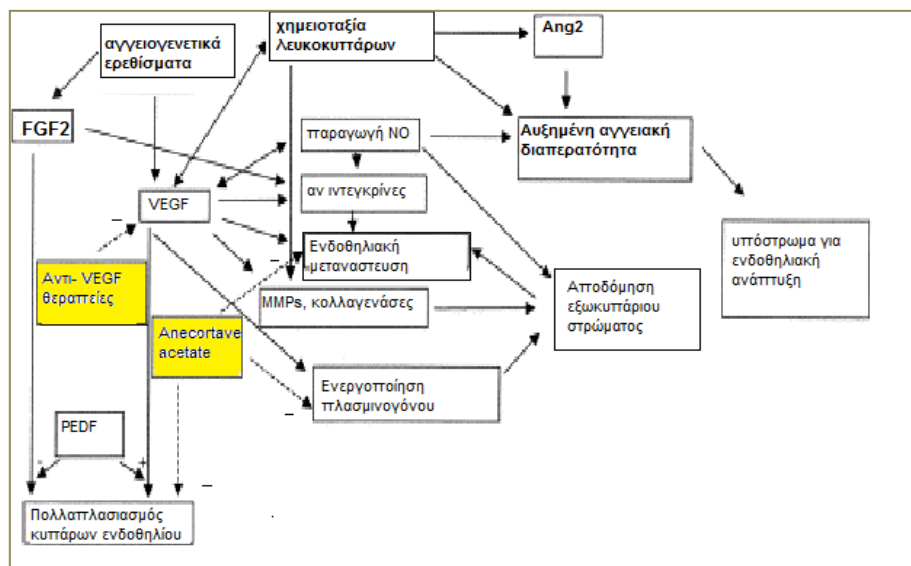
δραστηριότητας, διεγείρουν και την έκφραση του VEGF. Η βιτρονεκτίνη, η φμπρονεκτίνη και η προχωρημένη γλυκοζυλίωση τελικών προϊόντων αποτελούν επίσης μοριακά συστατικά των drusen που προάγουν την παραγωγή αγγειογενετικών παραγόντων [94]. Ακόμα, μελέτες αποκαλύπτουν την παρουσία μακροφάγων σε λεπτυσμένες περιοχές ή και σε ρήξεις της μεμβράνης του Bruch σε οφθαλμούς με νεοαγγείωση. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα μπορούν να εκκρίνουν πρωτεολυτικά ένζυμα, διευκολύνοντας τη μετανάστευση των νεοχοριοτριχοειδών καθώς και κυτταροκίνες, όπως την ιντερλευκίνη-1, η οποία επάγει την έκκριση του VEGF. Υπεροξειδωμένα λιπίδια που συσσωρεύονται στη μεμβράνη του Bruch όχι μόνο αλλάζουν την υδραυλική αγωγιμότητα αυτής, αλλά επάγουν την παραγωγή συστατικών για τη δημιουργία νεοαγγείωσης. Για την επέκταση των νεοσχηματιζόμενων αγγείων και τη διέλευση τους διαμέσου της μεμβράνης του Bruch, είναι απαραίτητη η διείσδυση και μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και η αναδιαμόρφωση του εξωκυτταρίου στρώματος. Αυτό φαίνεται να επιτυγχάνεται με τη συμβολή της οικογένειας των ιντεγκρινών, διαφόρων μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, των μεταλλοπρωτεϊνών και των αναστολέων τους. Σε μοντέλα υγρής HEΩΚ, η νεοαγγειογένεση μειώνεται με τη χορήγηση αναστολέων των ιντεγκρινών. Η έκφραση διαφόρων μεταλλοπρωτεϊνών, όπως των MMP-2 και MMP-9 καθώς και του αναστολέα TIMP-3 ανευρίσκεται αυξημένη στη μεμβράνη του Bruch των ασθενών, αν και τα πρώιμα αυτά δεδομένα χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης ως προς τη συμβολή τους στην αιτιοπαθογένεια της νεοαγγειογένεσης [84].

Όπως αναπτύχθηκε σε αυτό το εδάφιο, η χοριοειδική νεοαγγείωση αποτελεί πολύ σοβαρό και επιβαρυντικό παράγοντα για τα άτομα με HEΩΚ και για το λόγο αυτό δεν αποτελεί έκπληξη ότι πολλές θεραπευτικές παρεμβάσεις έχουν εστιάσει στην αντιμετώπιση αυτής. Αν και υπάρχουν διάφορες θεραπευτικές προσεγγίσεις όπως: α) η διατροφή με τροφές πλούσιες σε αντιοξειδωτικά β) η θεραπεία με laser (αργού, πλέγματος) γ) θεραπεία με laser φωτοπηξίας δ) χειρουργική επέμβαση και ε) χρήση laser υπερύθρων (TTT- transpupillary thermotherapy) καμία δεν έδειξε ικανοποιητικά αποτελέσματα για τις περισσότερες περιπτώσεις ατόμων με την εξιδρωματική HEΩΚ.

Η πιο πρόσφατη προσέγγιση που έχει αντικαταστήσει τις προαναφερθείσες, αφορά τη χρήση αντι-VEGF παραγόντων οι οποίοι αναστέλλουν τις προ-αγγειογενετικές κυτοκίνες. Το 2004 χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά η πεγκαπτανίμη (Macugen®, Pegaptanib Sodium), ένα RNA-αптаμερές ολιγονουκλεοτίδιο 25 nt έναντι της ισομορφής 165 του VEGF. Έκτοτε στην κλινική πράξη χρησιμοποιούνται και άλλοι τέτοιοι αναστολείς όπως: η ρανιβιζουμάβη (Lucentis®,

ranibizumab), ένα ανασυνδυασμένο, ανθρωποποιημένο ανοσοσφαιρινικό τμήμα Fab και το μονοκλωνικό αντίσωμα μπεβασιζουμάβη (Avastin®, bevacizumab). Σε κλινικές μελέτες είναι η θεραπεία με si-RNA (small interfering RNA) έναντι του VEGF όπως είναι η ουσία μπεβασιρανίβη, καθώς και η αφλιβερσέπτη ή «VEGF παγίδα» (Eylea), ουσία με μεγάλη συγγένεια για το VEGF, το PlGF και τα διμερή τους [87].

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η νεοαγγειογένεση στο χοριοειδή χιτώνα συνιστά μια περίπλοκη διαδικασία (**Εικόνα 2.11**) που ελέγχεται από ποικίλους μηχανισμούς στους οποίους πρωταγωνιστικό ρόλο παίζουν η ισχαιμία, η υποξία, το οξειδωτικό στρες και η φλεγμονή και οι επιδράσεις τους επί της έκφρασης, έκκρισης και δράσης προαγγειογενετικών και αντιαγγειογενετικών παραγόντων και πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αναδιαμόρφωση (remodelling) του εξωκυττάριου στρώματος.



Εικόνα 2.11: Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών νεοαγγειογένεσης. FGF2: Fibrinoblast Growth Factor 2, VEGF: Vascular endothelial growth factor, PEDF: Pigment Epithelium Derived Factor, Ang2: αγγειοποιητίνη 2, MMPs: μεταλλοπρωτεϊνάσες στρώματος. Με κίτρινο χρώμα επισημαίνονται θεραπείες που στοχεύουν τη χοριοειδική νεοαγγειογένεση και συγκεκριμένα αντι-VEGF θεραπείες (μονοκλωνικά αντισώματα ή απταμερή έναντι του VEGF) και το anecortave acetate που βρίσκεται σε μελέτες φάσης 3 για την υγρή ΗΕΩΚ [84].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο: Ο ρόλος του Οξειδωτικού stress και του Συστήματος του Συμπληρώματος στην ανάπτυξη της ΗΕΩΚ

Ανακεφαλαιώνοντας, η νόσος της ωχράς κηλίδας είναι μια ασθένεια πολυπαραγοντική, που χαρακτηρίζεται κυρίως από την ύπαρξη drusen και νεοαγγείων, καθώς και από ατροφία των φωτοϋποδοχέων και συσσώρευση λιποφουσκίνης. Αυτό έχει ως επακόλουθο μεταβολές στη μεμβράνη του Bruch και ανωμαλίες στη δομή των χοριοτριχοειδών, επηρεάζοντας την περιοχή της ωχράς κηλίδας που εξυπηρετεί την κεντρική όραση. Ακόμη όμως δεν είναι γνωστό ποιο μέρος της ωχράς είναι αυτό που επηρεάζεται αρχικά, όπως επίσης δεν είναι γνωστό ποιο γεγονός πυροδοτεί την εκδήλωση της νόσου. Το γεγονός το οποίο σίγουρα παίζει καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση της ΗΕΩΚ είναι η γήρανση. Η γήρανση είναι γνωστό ότι επιφέρει φυσιολογικές αλλαγές στον οφθαλμό, αλλά σε συνδυασμό με το γενετικό υπόβαθρο και τις περιβαλλοντικές επιδράσεις είναι δυνατή η μετάβαση από τη φυσιολογική γήρανση στην εκδήλωση ηλικιοεξαρτώμενης παθολογίας. Ο συνδυαστικός κρίκος για τη μετάβαση, φαίνεται να είναι το οξειδωτικό στρες και η απορρύθμιση των ανοσολογικών μηχανισμών που δυνητικά μπορούν να αποτελέσουν το εναρκτήριο ερέθισμα, αλλά και να εξελίσσουν την ασθένεια.

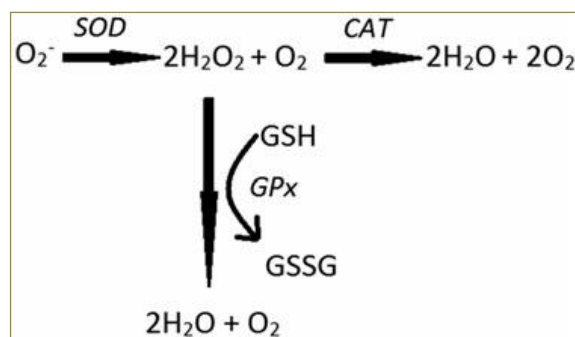
3.1 Οξειδωτικό stress

Το οξειδωτικό στρες αναφέρεται στην κυτταρική ή μοριακή καταστροφή που προκαλείται από τις ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS), οι οποίες κυρίως σχετίζονται με την αύξηση της ηλικίας και έχουν ως αποτέλεσμα την ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου και της αντιοξειδωτικής απάντησης του οργανισμού [95]. Η θέση και η διαφάνεια που χαρακτηρίζει το πίσω μέρος του ματιού το καθιστά ένα όργανο στο οποίο επιδρούν φυσικοί, χημικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες δημιουργώντας ένα οξειδωτικό περιβάλλον. Το οξειδωτικό στρες επηρεάζει την ακεραιότητα του κυττάρου, επειδή βιομόρια όπως είναι το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια καταστρέφονται εξαιτίας αυτής της διαδικασίας. Ο οφθαλμός λόγω της δομής του και των μεταβολικών του χαρακτηριστικών είναι ευάλωτος στο οξειδωτικό στρες δεδομένου ότι καταναλώνει μεγάλες ποσότητες ATP. Επίσης πρέπει να λάβουμε υπόψιν ότι τα κύτταρα του ΜΕ ζουν σε χρόνιες οξειδωτικές συνθήκες, επειδή εκτίθενται στο φως για πάρα πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα και έχουν υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια και υφίστανται υψηλή πίεση οξυγόνου από τα χοριοτριχοειδή. Κατά τη διάρκεια της οξείδωσης των λιπιδίων από τις ROS συμβαίνουν μια πληθώρα χημικών και φυσικών αλλαγών οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή των ειδικών επιτόπων

οξειδωσης (OSEs)-Oxidation specific epitopes [96]. Τα OSEs έχουν μικρή διάρκεια ζωής και μπορεί να προκαλέσουν χρόνια φλεγμονή αν δεν εξουδετερωθούν ή απομακρυνθούν. Θεωρείται ότι λειτουργούν ως σήματα κινδύνου-DAMPs (danger associated molecular pattern recognition) και ο ρόλος τους είναι να βοηθήσουν το σώμα να ταυτοποιήσει και να αντιμετωπίσει τον κίνδυνο. Τα OSEs ενεργοποιούν τη φυσική ανοσία μέσω αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς PRRs-pattern recognition receptors [97] και οδηγούν σε έκλυση κυτταροκινών [98]. Η ισορροπία που υπάρχει ανάμεσα στην προστατευτική απάντηση και στην παθολογική αυτοανοσιακή απάντηση είναι λεπτή και η συσσώρευση των OSEs επάγει την παραγωγή άλλων OSEs οι οποίοι μπορούν να εμποδίσουν την καταστροφή τους από τους PRRs. Αυτές οι αλλαγές εν τέλει οδηγούν στη μεγέθυνση της φλεγμονώδους απάντησης και συνεισφέρουν στη δημιουργία των drusen [97]. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι ο παράγοντας συμπληρώματος H (CFH) λειτουργεί ως PRR και ρόλος του είναι να δεσμεύει OSEs οι οποίοι συσσωρεύονται στην HEΩΚ [99]. Το CFH όπως θα αναλυθεί και παρακάτω, μπλοκάρει την πρόσληψη των πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί από τα OSEs από τα μακροφάγα και παρεμποδίζει την επαγωγή ιντερλευκίνης 8 (IL8) από τα κύτταρα του ME τόσο *in vivo* και *in vitro*. Οι ανακαλύψεις αυτές μπορούν να φανούν χρήσιμες για μελλοντικές θεραπευτικές προσεγγίσεις για την HEΩΚ, αλλά και για άλλου τύπου χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις [97].

Οι κύριες πηγές οξειδωτικού στρες περιλαμβάνουν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, τα περοξυσώματα και το κυτόχρωμα P450 [100]. Στους παράγοντες αυτούς σημαντικό ρόλο παίζει επίσης η UV ακτινοβολία, το κάπνισμα, η ενεργότητα ορισμένων ενζύμων καθώς και άλλοι παράγοντες. Οι πλέον τρεις σημαντικές ROS συμπεριλαμβάνουν το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), τη ρίζα υδροξυλίου ($OH^\cdot$) και τη ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^\cdot$). Για να ελαχιστοποιήσει ο οργανισμός την επίδραση του οξειδωτικού στρες, τα κύτταρα διαθέτουν τον δικό τους αντιοξειδωτικό μηχανισμό που συμπεριλαμβάνει τρία κυρίως ένζυμα: τη σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD), την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και την καταλάση (CAT), καθώς και πληθώρα άλλων μη ενζυμικών μορίων όπως τη γλουταθειόνη (GSH) και την οξειδωμένη της μορφή, τη δισουλφιδική γλουταθειόνη (GSSG) [101]. Η SOD καταλύει την μετατροπή του $O_2^\cdot$ σε H_2O_2 , ενώ η καταλάση μετατρέπει το H_2O_2 σε H_2O και O_2 στα περοξυσώματα. Αντίστοιχα η κυτταροπλασματική υπεροξειδάση της γλουταθειόνης έχοντας ως υπόστρωμα τη γλουταθειόνη καταλύει την οξείδωση δυο μορίων της σε GSSG καθώς και του H_2O όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3.1**. Επιπλέον στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό άμυνας ρόλο παίζει η μεταφορά S της γλουταθειόνης, η αναγωγή της γλουταθειόνης και η γλουταθειόνη. Εκτός από τους ενδογενείς

μηχανισμούς άμυνας, σημαντικό ρόλο έχουν και οι βιταμίνες A, C, E. Οι A και E που προστατεύουν τις μεμβράνες από τις ROS ενώ η C αλληλεπιδρά με τις ROS στο αίμα.



Εικόνα 3.1: Κυτταρικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην σύνθεση και την αποβολή των ενεργών μορφών οξυγόνου [102].

3.1.1 Το οξειδωτικό stress στην εξέλιξη της ΗΕΩΚ

Η άμεση μοριακή σύνδεση ανάμεσα στην ΗΕΩΚ και το οξειδωτικό στρες επιβεβαιώνεται από τις υψηλές συγκεντρώσεις CEP (carboxyethylpyrrole) στην μεμβράνη του Bruch και στα drusen που βρέθηκαν σε ασθενείς με ΗΕΩΚ [72]. Το CEP είναι ένα μοναδικό προϊόν οξείδωσης του DHA-εικοσιδυα-εξά-ενοϊκό οξύ (docosahexaenoic acid), το κύριο ω -3 λιπαρό οξύ στους φωτουποδοχείς. Εκτός από CEP βρέθηκαν και υψηλά επίπεδα αυτοαντισωμάτων CEP στο πλάσμα ασθενών [103]. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει τη χρησιμότητα της παρακολούθησης της αποτελεσματικότητας των θεραπευτικών μέσων για την ΗΕΩΚ αφού φαίνεται να επηρεάζει άμεσα τις βλάβες του ME σε ποντίκια-μοντέλα που ανέπτυξαν ΗΕΩΚ. Τα επίπεδα του CEP στο πλάσμα σε συνδυασμό με τους γενετικούς βιοδείκτες θα μπορούσε να βοηθήσει στο διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των ΗΕΩΚ ασθενών από τους υγιείς με 80% ακρίβεια στην πρόγνωση. Ο Schutt και οι συνεργάτες [104] χρησιμοποιώντας πρωτεομική ανάλυση ταυτοποίησαν 81 πρωτεΐνες λιποφουσκίνης οι οποίες προέρχονταν από τα κύτταρα του ME. Από αυτές τις πρωτεΐνες 32 είχαν MDA, 15 είχαν 4-hydroxynonenal και 4 AGE αλλαγές. Στο σύνολό τους αυτές οι αλλαγές υποδηλώνουν οξειδωτική βλάβη. Ο Rodriguez Diez και οι συνεργάτες [105] ανέφεραν ότι το οξειδωτικό στρες που επάγεται στον αμφιβληστροειδή παρουσία σιδήρου φαίνεται να έχει σχέση με την ΗΕΩΚ εξαιτίας της κυτταροσολικής φωσφολιπάσης A2 και των άλλων ασβεστιο-εξαρτώμενων ισομορφών. Πιο συγκεκριμένα η A2 φωσφολιπάση συνδέεται με την απάντηση στη φλεγμονή και συμμετέχει στον κύκλο της κυκλοοξυγενάσης-2 και στη ρύθμιση του πυρηνικού παράγοντα κΒ [102].

Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες επιβεβαιώνεται έμμεσα και κλινικά μέσω της αντιοξειδωτικής θεραπείας για τη ξηρή μορφή της ΗΕΩΚ. Η μελέτη έδειξε ότι υψηλές δόσεις ψευδαργύρου και βιταμινών μείωσαν τον παράγοντα κινδύνου απώλειας της όρασης και επιβράδυναν την εξέλιξη της ασθένειας.

Μάλιστα η ίδια μελέτη έδειξε ότι μειώθηκαν επίσης τα επίπεδα γλουταθειόνης και κυστεΐνης στο πλάσμα χάρις στην αντιοξειδωτική θεραπεία [106] και ιδίως αν αυτή γίνεται με ζεαξανθίνη και λουτεΐνη και όχι με β-καροτένιο. Ο Klein και οι συνεργάτες [107] παρατήρησαν μια αλληλεπίδραση ανάμεσα στον Y402H πολυμορφισμό του CFH και του συμπληρώματος διατροφής με αντιοξειδωτικά και ψευδάργυρο. Ο προστατευτικός ρόλος του ψευδαργύρου βρέθηκε να έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα σε άτομα των οποίων ο γονότυπος ήταν ομοζυγοτία για τα αλληλία Y402Y/ Y402Y και όχι για τα αλληλία που σχετίζονται με αυξημένο παράγοντα κινδύνου.

3.2 Ανοσολογικοί Μηχανισμοί στην ΗΕΩΚ

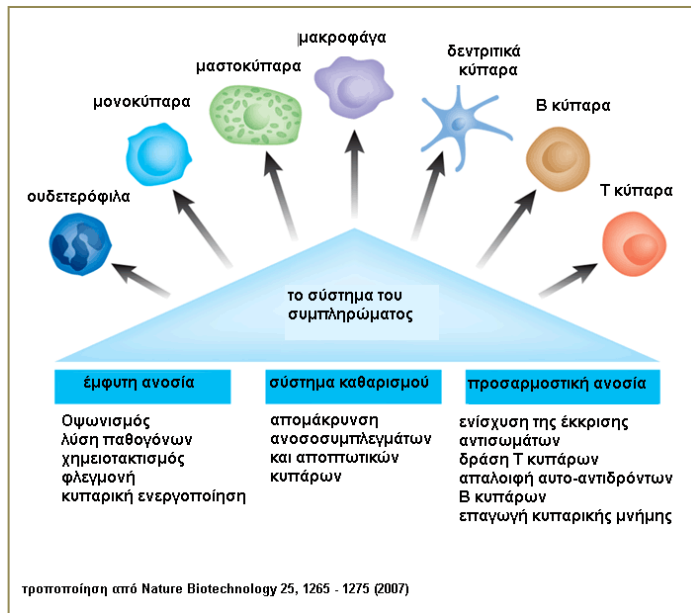
Από ερευνητικές μελέτες έχει φανεί ότι για την παθογένεση της νόσου της ωχράς σημαντικό ρόλο παίζουν οι ανοσολογικοί μηχανισμοί, όπως είναι οι μηχανισμοί της φλεγμονής και της ανοσιακής απόκρισης τόσο μέσω της φυσικής, αλλά και της ειδικής (χυμικής και κυτταρικής) ανοσίας. Ο οφθαλμός είναι ένα όργανο το οποίο προστατεύεται από την παρουσία φραγμών μεταξύ των ιστών του και της συστηματικής κυκλοφορίας και αφού δε διαθέτει λεμφογενή παροχέτευση, τα αντιγόνα παραμένουν στο εσωτερικό του εκκρίνοντας ανοσοκατασταλτικά μόρια που περιορίζουν την υπέρμετρη ανοσολογική απάντηση. Όπως και σε άλλα μέρη του σώματος, έτσι και στον οφθαλμό η πρώτη γραμμή ανοσιακής απάντησης εναντίον παθογόνων και φλεγμονών είναι η φυσική ανοσία, η οποία συντελείται μέσω των λευκοκυττάρων του αίματος και της δράσης της μικρογλοίας: των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν τα παθογόνα και να τα φαγοκυτταρώνουν. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μέσω φλεγμονωδών διαμεσολαβητών καθώς και μέσω κυτοκινών. Τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα προσελκύονται στην ωχρά κηλίδα ώστε να απομακρύνουν τυχόν εναποθέσεις και κυτταρικά απόβλητα από την περιοχή, ωστόσο όμως αυτό δεν είναι πάντα εφικτό. Παρουσία διαφορετικών υποπληθυσμών μακροφάγων, όπως τα M1 και M2 μακροφάγα, μπορεί να επιφέρει το αντίθετο αποτέλεσμα, δηλαδή να προκαλέσουν τη δημιουργία drusen, ή ακόμα και να δημιουργηθεί χοριοειδική νεοαγγείωση. Τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι εξειδικευμένα ανοσοκύτταρα του ΚΝΣ-

μακροφάγα που παρουσιάζουν χαμηλό επίπεδο φαγοκυτταρικής δραστηριότητας. Εισέρχονται στον αμφιβληστροειδή κατά την εμβρυική ανάπτυξη και παραμένουν εκεί σε αδρανή κατάσταση έως ότου κάποιο ερέθισμα όπως η εκφύλιση ή ο τραυματισμός του αμφιβληστροειδούς προκαλέσει την ενεργοποίησή τους. Άπαξ και η μικρογλοία ενεργοποιηθεί, πολλαπλασιάζεται και μεταναστεύει στις περιοχές τραυματισμού, φαγοκυτταρώνει τα κυτταρικά υπολείμματα και εκκρίνει προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χημειοκίνες. Για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των παθογόνων και να αναγνωριστούν απαιτείται η ύπαρξη υποδοχέων που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες δομές στα παθογόνα, τα PAMPs. Οι υποδοχείς αυτοί ανήκουν στην υπεροικογένεια των PRRs και κυρίως στην αναγνώριση αυτή, καθοριστικό ρόλο παίζουν οι υποδοχείς της οικογένειας των TLRs (Toll like receptors). Τα κύτταρα του κερατοειδούς, το ακτινωτό σώμα, το ενδοθήλιο της ίριδας και τα κύτταρα του ME εκφράζουν τους υποδοχείς Toll επάγοντας τη δράση των T-ρυθμιστικών κυττάρων, με τα κύτταρα του ME να είναι από αυτά τα πλέον σημαντικά, αφού σχηματίζουν τον αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό, και επομένως τυχόν ατροφία του οδηγεί στην απορρύθμιση των ανοσολογικών μηχανισμών [108]. Αν για κάποιο λόγο καταστραφεί ο εξω αιματο-αμφιβληστροειδικός φραγμός τότε επιτρέπεται η αναγνώριση των ενδοφθάλμικών αντιγόνων και έτσι δημιουργούνται αυτοαντισώματα. Σε ασθενείς με πρώιμα και όψιμα στάδια HEΩΚ ανευρίσκονται στον ορό ασθενών αντι-αμφιβληστροειδικά αυτοαντισώματα, τα οποία κατευθύνονται ενάντια πρωτεϊνικών συμπλόκων που βρίσκονται στην περιοχή της ωχράς και έχουν δημιουργηθεί λόγω οξειδωτικού στρες [103].

3.2.1 Σύστημα Συμπληρώματος

Το Σύστημα του Συμπληρώματος συνιστά βασικό ανοσολογικό μηχανισμό της φυσικής ανοσίας, αφού αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού εναντίον μικροοργανισμών και άλλων ξένων σωματιδίων και έχει ως βασικό ρόλο την αναγνώριση και τη θανάτωση των μικροοργανισμών, δημιουργώντας τους οπές στην κυτταρική τους μεμβράνη [109]. Επίσης όμως, αποτελεί συνδετικό κρίκο ανάμεσα στη φυσική και στην ειδική ανοσία, αφού έχει την ικανότητα να απομακρύνει ανοσοσυμπλέγματα και αποπτωτικά κύτταρα από την κυκλοφορία (**Εικόνα 3.2**). Το σύστημα του συμπληρώματος περιλαμβάνει τρεις ομάδες πρωτεϊνών: Α) πρωτεΐνες οδών ενεργοποίησης του συμπληρώματος Β) Υποδοχείς του συμπληρώματος και Γ) Ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Για την ενεργοποίηση του εμπλέκονται τρεις μεταβολικές οδοί: η κλασική οδός που ενεργοποιείται από αντισώματα συνδεδεμένα με αντιγόνα, η οδός λεκτίνης που ενεργοποιείται από

υδατάνθρακες στη μεμβράνη των παθογόνων και η εναλλακτική οδός που ενεργοποιείται από την παρουσία διαφόρων παθογόνων. Οι δυο τελευταίες οδοί παρέχουν μη ειδική φυσική ανοσία, ενώ η κλασική αντιπροσωπεύει μια πρόσφατη εξελικτική σύνδεση με το προσαρμοζόμενο ανοσοποιητικό σύστημα (**Εικόνα 3.3**). Ωστόσο και οι τρεις οδηγούν στην ενεργοποίηση του C3 [31]. Οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος δρουν ως ένας ενζυμικός καταρράκτης όπου κάθε βήμα λειτουργεί ως ενεργοποιητής ενζύμων που θα δράσουν στο επόμενο. Βασικό ερέθισμα στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος αποτελεί η διάσπαση του C3 σε δυο θραύσματα, το C3a και το C3b. Το C3a ενεργοποιεί μαστοκύτταρα και φαγοκύτταρα, ενώ το C3b μπορεί να προσκολληθεί ομοιοπολικά σε παρακείμενες επιφάνειες παθογόνων. Ο καταρράκτης αυτός έχει ως αποτέλεσμα: **1) Οψωνισμό και κυτταρική ενεργοποίηση**: το συνδεδεμένο C3b μπορεί να δράσει ως οψωνίνη, δηλαδή διευκολύνει την φαγοκυττάρωση του στόχου. Τα φαγοκύτταρα (μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα) διαθέτουν υποδοχείς αναγνώρισης του C3b και έτσι προσδένονται τα παθογόνα πάνω στην επιφάνειά τους **2) Χημειοτακτισμός**: τα μικρά θραύσματα που δημιουργούνται από την ενεργοποίηση του συμπληρώματος έχουν την ικανότητα να ελκύουν προς την περιοχή τους κύτταρα που φέρουν πάνω τους κατάλληλους υποδοχείς **3) Λύση των κυττάρων στόχων**: το τελικό στάδιο για την ενεργοποίηση είναι η συγκρότηση του συμπλέγματος επίθεσης της μεμβράνης (MAC-Membrane Attack Complex). Το MAC δημιουργεί πόρους στη μεμβράνη του παθογόνου και λόγω της ροής υγρών και ηλεκτρολυτών επέρχεται η λύση των κυττάρων **4) Ανοσολογικός καθαρισμός**: μετά την ανοσολογική απόκριση τα συστατικά του συμπληρώματος που είναι παρόντα στα ανοσοσυμπλέγματα που δημιουργήθηκαν, είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση αυτών των συμπλεγμάτων από την κυκλοφορία αποθέτοντάς τα στο σπρώτι και το σπλήνα. Τα μόρια που κυκλοφορούν είτε στο αίμα είτε ανευρίσκονται δεσμευμένα στις μεμβράνες των κυττάρων είναι ο αναστολέας του C1 (C1NH), η συνδέουσα πρωτεΐνη του C4 (C4BP), ο υποδοχέας του συμπληρώματος (CR-1/CD35), ο παράγοντας H (CFH), ο παράγοντας I (CFI), ο επιταχυντικός παράγων αποδομήσεως (DAF/CD55), η προτεκτίνη (CD59) και η πρωτεΐνη συνυποδοχέας μεμβράνης (MCP/CD46) [110,111].



Εικόνα 3.2: Το σύστημα του συμπληρώματος αποτελεί συνδετικό κρίκο ανάμεσα στη φυσική και στην ειδική ανοσία [112]

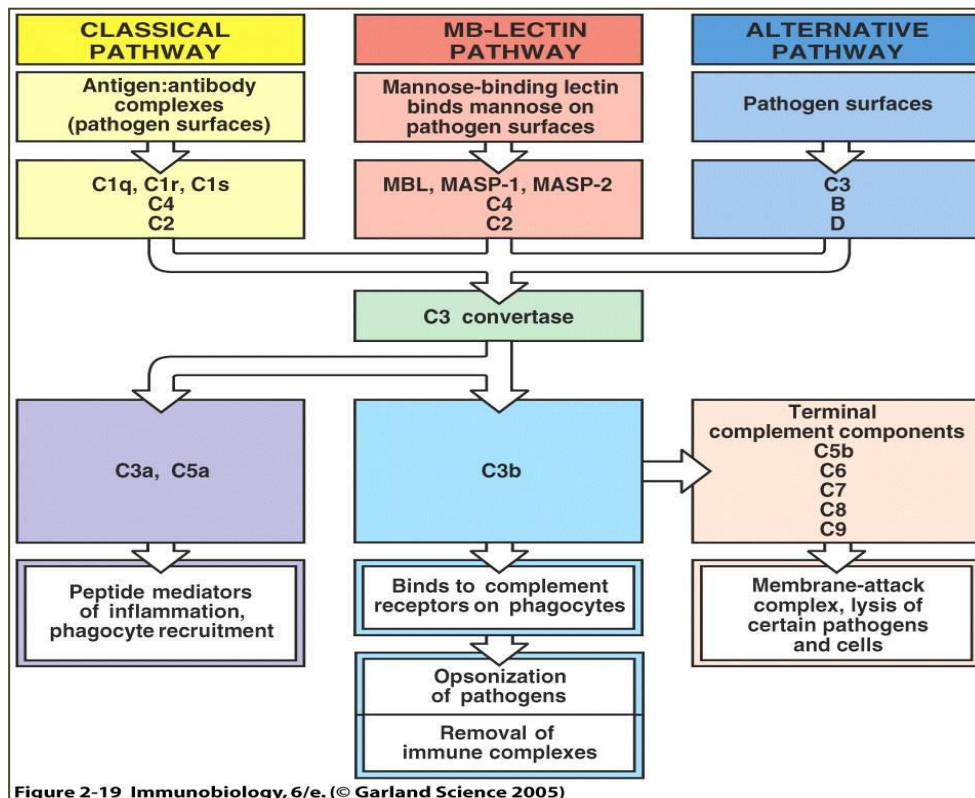


Figure 2-19 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Εικόνα 3.3: Ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος μέσω των τριών οδών (Immunobiology, 6/e © Garland Science 2005).

Ωστόσο παρατεταμένη ενεργοποίηση του συμπληρώματος μπορεί να οδηγήσει σε χρόνια φλεγμονή, σοβαρή ιστική καταστροφή καθώς συμβάλλει στην εξέλιξη της ασθένειας, όπως συμβαίνει στις ασθένειες του Alzheimer και της αθηροσκλήρωσης [113]. Για την αποτροπή τέτοιου είδους προβλημάτων, ένα πλήθος πρωτεϊνών, όπως είναι ο παράγοντας H, ένας διαλυτός αναστολέας του εναλλακτικού μονοπατιού του συμπληρώματος κρατά το σύστημα σταθερό. Επειδή οι περισσότερες αλλαγές που έχουν βρεθεί έχει διαπιστωθεί ότι επηρεάζουν σημαντικές λειτουργικές θέσεις της CFH πρωτεΐνης, οι ερευνητές προτείνουν ότι αυτές οι αλλαγές αλλάζουν τη συμπεριφορά της πρωτεΐνης εμποδίζοντας τον έλεγχο της ορθής λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου μπορεί να αλλάζουν τη δέσμευση του CFH στο τμήμα C3 του συμπληρώματος ή της C αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), του σιαλικού οξέος ή της ηπαρίνης. Παρομοίως αυτές οι αλλαγές μπορεί να επηρεάζουν την αλληλεπίδραση του CFH με τα μικρόβια, κάνοντας ορισμένους ιστούς ευάλωτους σε φλεγμονή όπως το μελάγχρουν επιθήλιο (ME). Βασιζόμενοι σε αυτές τις παραδοχές φαίνεται ότι οι κύριες αιτίες που πυροδοτούν την ενεργοποίηση του εναλλακτικού μονοπατιού είναι κοινά συστατικά που βρίσκονται στην επιφάνεια βακτηριδίων και ιών [113].

Πλέον γίνεται σαφές ότι το σύστημα του συμπληρώματος είναι ένας ενζυμικός καταρράκτης του οποίου ο ρόλος φαίνεται να είναι κάτι παραπάνω από το να απομακρύνει την ασθένεια. Κατέχει ένα σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση μεταξύ της έμφυτης και επίκτητης ανοσίας και συμβάλλει στη διατήρηση της ομοιόστασης μέσω της εξάλειψης αποπτωτικών, κατεστραμμένων και νεκρωτικών κυττάρων. Το σύστημα του συμπληρώματος επίσης επιφορτίζεται με το να διατηρεί την διαλυτότητα των κυκλοφορούντων ανοσοποιητικών μορίων, διευκολύνοντας την εξάλειψή τους [112]. Το σύστημα του συμπληρώματος αποτελείται από διαλυτούς και μεμβρανοδεσμευτικούς παράγοντες και είναι ενεργό σε ενδοαγγειακούς χώρους, σωματικά υγρά και ιστούς.

Στο φυσιολογικό αμφιβληστροειδή, το συμπλήρωμα εμφανίζει χαμηλή ενεργότητα προστατεύοντας έναντι παθογόνων, αλλά και καταστέλλοντας την T-κυτταρική απόκριση. Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι στην περιοχή του χοριοειδούς και του ME δρα ένα «τοπικό σύστημα συμπληρώματος», αποτελούμενο από πρωτεΐνες παραγόμενες τοπικά από τα παρακείμενα κύτταρα. Η εξωηπατική παραγωγή πρωτεϊνών του συμπληρώματος έχει ως στόχο την καλύτερη και αμεσότερη ανοσολογική απόκριση, δεδομένης και της μικρής διαθεσιμότητας των συστηματικά κυκλοφορούντων παραγόντων του συμπληρώματος στον αμφιβληστροειδή ένεκα της παρουσίας του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού. Το τοπικό αυτό σύστημα μπορεί να ελέγχεται από την

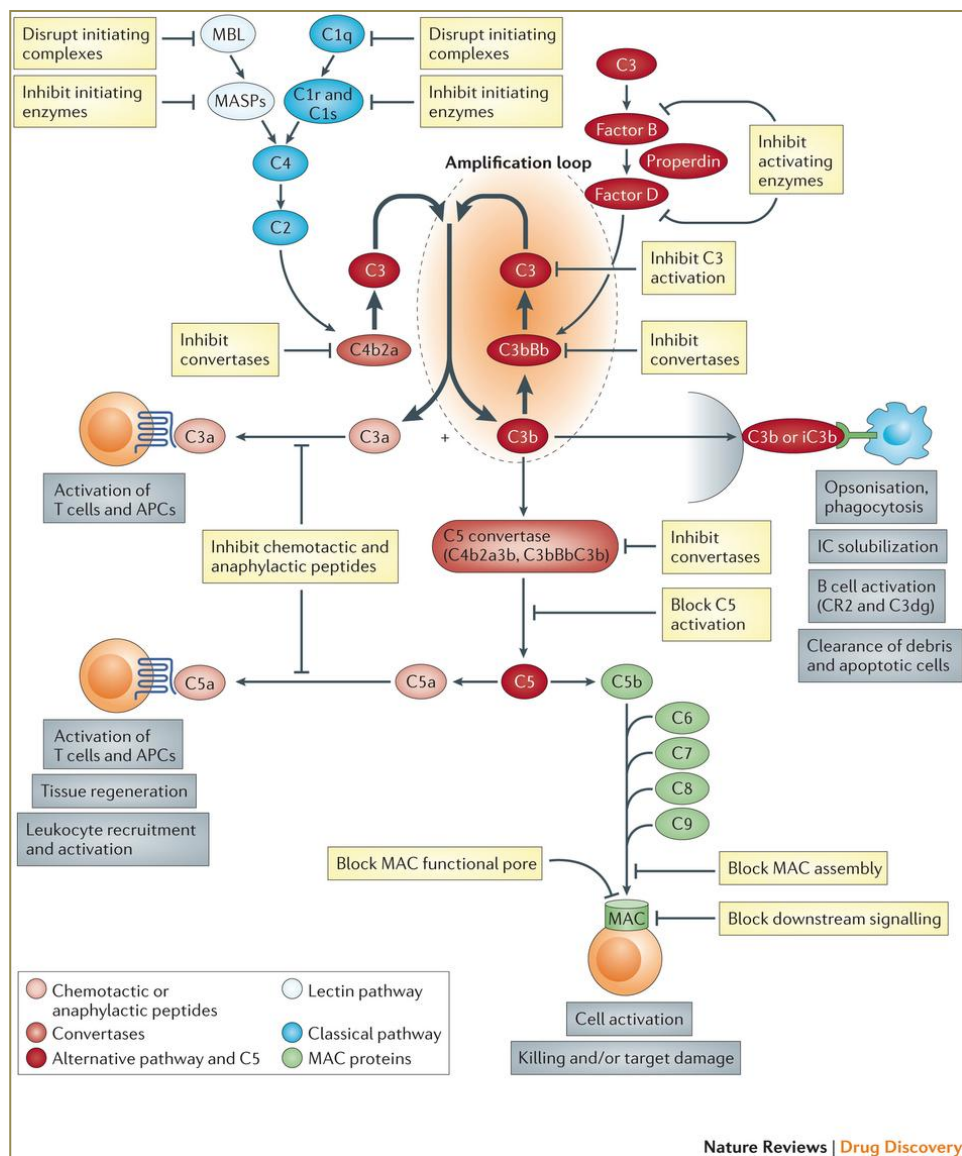
κλασσική ή την εναλλακτική οδό (οι παράγοντες της οδού της λεκτίνης έχουν χαμηλά τοπικά επίπεδα έκφρασης) και φαίνεται ότι στην πλειοψηφία του προέρχεται από το χοριοειδή χιτώνα, με την έκφραση παραγόντων του συμπληρώματος να είναι χαμηλότερη στα κύτταρα του ME και σχεδόν μη ανιχνεύσιμη στους φωτοϋποδοχείς. Χαρακτηριστική είναι η χαμηλή έκφραση των όψιμων παραγόντων του συμπληρώματος (με την εξαίρεση των C5 και C7 κλασμάτων), των παραγόντων εκείνων που σχηματίζουν δηλαδή το μεμβρανολυτικό σύμπλοκο και επιτυγχάνουν την κυτταρόλυση του στόχου. Για τους παράγοντες αυτούς η ωχρά κηλίδα εξαρτάται από τη συστηματική κυκλοφορία. Η παρουσία ενός «τοπικού συμπληρώματος» αναπαριστά ένα επιπρόσθετο σύστημα ελέγχου που αυξάνει τη βιολογική πολυπλοκότητα καθώς και τη δυσκολία κατανόησης τόσο της φυσιολογικής ανοσολογικής ρύθμισης όσο και της παθογόνου ανοσολογικής απορύθμισης [108,114].

Υπέρ της εμπλοκής του συμπληρώματος στην εμφάνιση ξηρής HEΩΚ συνηγορεί η μοριακή σύσταση των drusen, που εμπεριέχει πολλά στοιχεία του συμπληρώματος προερχόμενα από όλες τις οδούς, όπως το C1q, η λεκτίνη που προσδένει τη μαννόζη (MBL), ο παράγοντας B (CFB), ο CFI, ο CFH, το C3 και το C3a. Επίσης έχουν ανιχνευθεί όψιμοι παράγοντες του συμπληρώματος (όπως τα C5, C6, C7, C8, C9, συμπλέγματα MAC) και ρυθμιστικές πρωτεΐνες [όπως ο CR-1, η βιτρονεκτίνη και η κλαστερίνη (clusterin)] [108,111]. Ακόμα ισχυρή συσχέτιση βρέθηκε σε μελέτη των Reynolds και συνεργατών μεταξύ όψιμης HEΩΚ και υψηλών συγκεντρώσεων στο περιφερικό αίμα των ενεργοποιημένων συστατικών Bb και C5a, ενώ αντιστρόφως ανάλογη ήταν η σχέση με τη συγκέντρωση του CFH, υποδηλώνοντας μια συστηματική ενεργοποίηση του συστήματος [115].

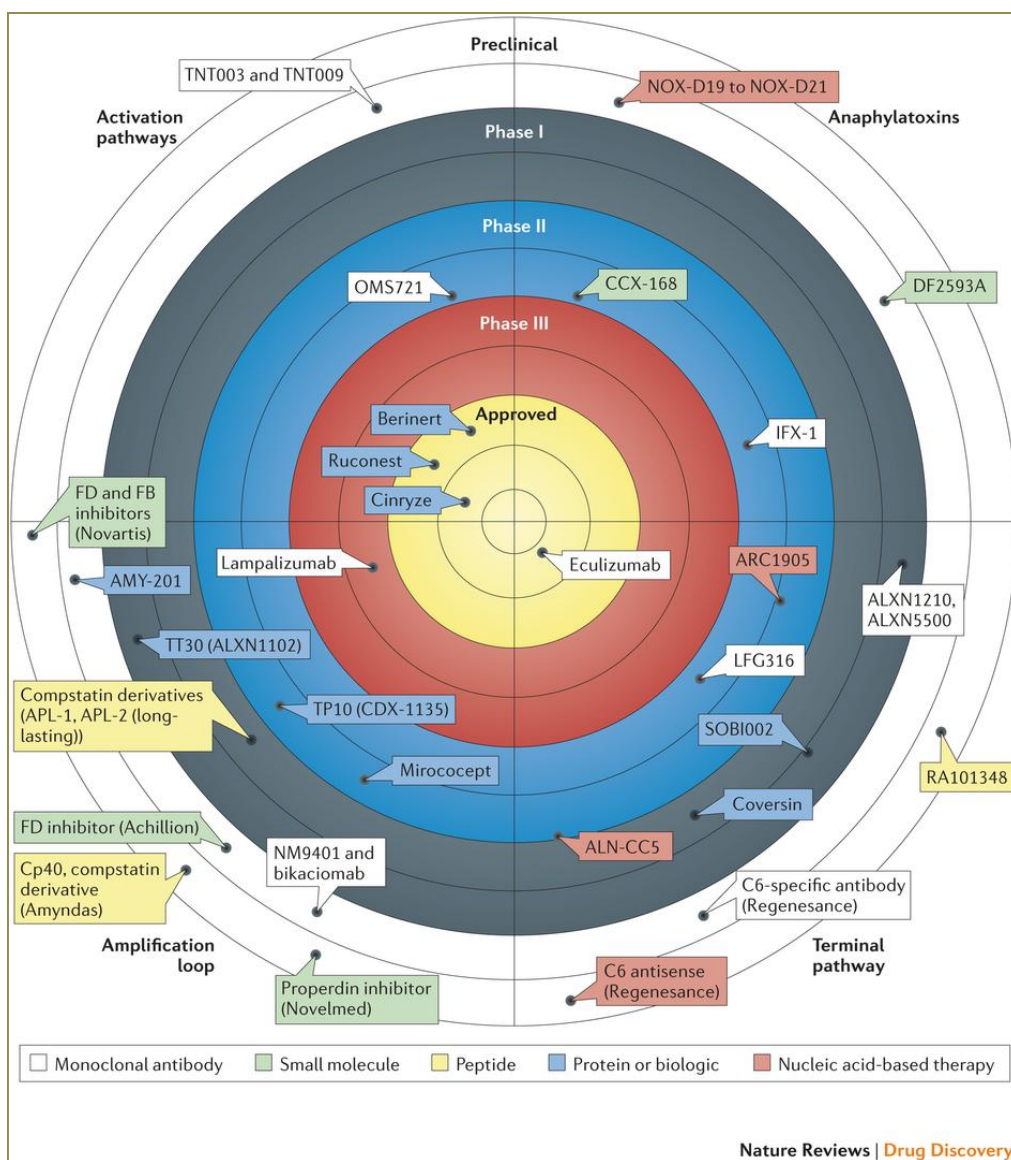
Όσον αφορά την υγρή HEΩΚ, δε λείπουν κι εδώ τα πειραματικά δεδομένα που να τη συνδέουν με τον καταρράκτη του συμπληρώματος. Αναφέρθηκε ήδη ο πιθανός ρόλος των αναφυλατοξινών C3a και C5a που εντοπίζονται στα drusen στην ανάπτυξη νεοαγγειογένεσης μέσω διέγερσης της έκκρισης του VEGF. Ακόμα, γενετικά τροποποιημένοι ποντικοί με έλλειψη της CD59 ρυθμιστικής πρωτεΐνης, εμφάνισαν πρόωπη και σοβαρή νεοαγγειογένεση μετά από εφαρμογή laser, συνηγορώντας υπέρ της υπόθεσης ότι η ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του συμπληρώματος πιθανώς ευοδώνει το σχηματισμό νέων αγγείων στο χοριοειδή [116].

Παρά τα ευρήματα που υποδηλώνουν ενεργοποίηση του συμπληρώματος στην HEΩΚ, τα αίτια αυτής δεν έχουν ακόμα αποσαφηνισθεί. Παθογόνοι μικροοργανισμοί, συστηματικές και τοπικές νόσοι (όπως το γλαύκωμα), η γήρανση καθώς και πρωτεΐνες των drusen, όπως το β-αμυλοειδές, η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, και ανοσοσφαιρίνες έχουν ενοχοποιηθεί. Όποιο κι αν είναι το αρχικό

ερέθισμα, αυτό που οδηγεί τελικά στην παθογένεια είναι η απώλεια της ισορροπίας μεταξύ των ευεργετικών ανοσολογικών δράσεων του συμπληρώματος και της ικανότητάς του επί απώλειας των φυσιολογικών ρυθμιστικών μηχανισμών να προκαλεί σοβαρή ιστική βλάβη και παθολογία [108,114]. Σε αυτά τα πλαίσια, αξιοποιώντας τη γνώση που προκύπτει από τη βασική έρευνα στο πεδίο της HEΩΚ και του συμπληρώματος, είναι σε εξέλιξη σήμερα κλινικές μελέτες φάσης I και II για διάφορες ουσίες που αναστέλλουν τον καταρράκτη του συμπληρώματος σε διάφορα σημεία του **(Εικόνες 3.4,3.5)** [117-119]. Οι ουσίες αυτές καθώς και οι μελέτες αυτομεταμόσχευσης αμφιβληστροειδικών βλαστικών κυττάρων και η γονιδιακή θεραπεία ή το gene editing φιλοδοξούν να καλύψουν στο μέλλον το θεραπευτικό κενό στο πεδίο της ξηράς HEΩΚ, για την οποία οι μόνες έως σήμερα υπάρχουσες παρεμβάσεις συνίστανται στη λήψη αντιοξειδωτικών και βιταμινών και σε αλλαγές στη διαίτα και στον τρόπο ζωής [87].



Εικόνα 3.4: Η εικόνα δείχνει μια άποψη του συμπληρώματος και παρουσιάζει τα σημεία όπου μπορεί να γίνει αναστολή των μονοπατιών για θεραπεία ασθενειών που χαρακτηρίζονται από φλεγμονή και εκφυλισμό [117].



Εικόνα 3.5: Στην εικόνα απεικονίζονται οι περιοχές εκείνες του συμπληρώματος που στοχεύονται καθώς και τα φάρμακα που αναπτύσσονται. Για τα φάρμακα αναφέρεται το στάδιο της κλινικής φάσης στο οποίο βρίσκονται και το είδος τους (μονοκλωνικό αντίσωμα, πεπτίδιο κ.ο.κ) [117].

3.3 Πρωτεολυτικό Σύστημα ουβικιτίνης (UPS)

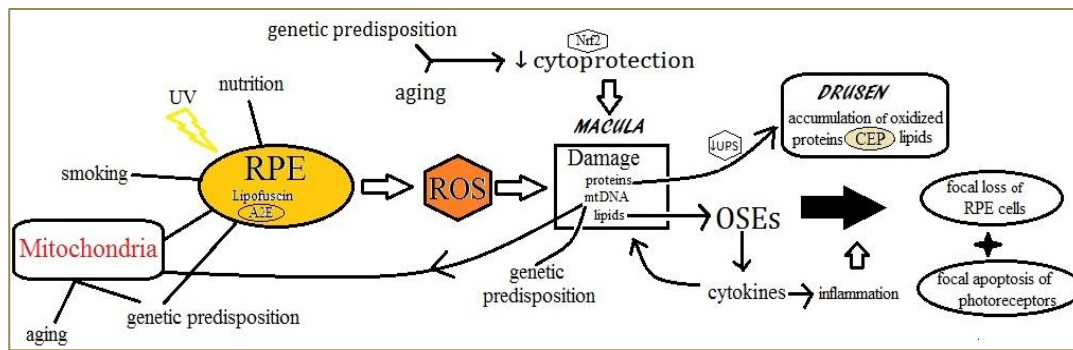
Το πρωτεολυτικό σύστημα ουβικιτίνης παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη στόχευση και αποικοδόμηση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών οι οποίες έχουν καταστραφεί από το οξειδωτικό στρες. Το βασικό συστατικό του συστήματος είναι η ουβικιτίνη, ένα υψηλά συντηρημένο πολυπεπτίδιο με 76 αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία προσαρτώνται μετα-μεταφραστικά στα κατάλοιπα λυσίνης στις στοχευμένες πρωτεΐνες. Πολλές μελέτες υποδεικνύουν ότι το σύστημα UPS επιτελεί σημαντική λειτουργία στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες στην περιοχή του αμιφιβληστροειδούς. Υπάρχουν ενδείξεις ότι το UPS έχει τη δυνατότητα να αποικοδομεί τις κατεστραμμένες από το οξειδωτικό στρες πρωτεΐνες στον αμιφιβληστροειδή και στο φακό. Αν για κάποιο λόγο ανασταλεί η λειτουργία του UPS, είτε εξαιτίας φαρμακευτικών μέσων είτε λόγω μετάλλαξης της ουβικιτίνης, αυτό θα οδηγήσει σε επιβλαβή συγκέντρωση οξειδωμένων πρωτεϊνών [120]. Παρά τη διαδεδομένη άποψη ότι το UPS αδιακρίτως αποικοδομεί τις κατεστραμμένες πρωτεΐνες ώστε να αποτρέψει την τοξική συγκέντρωσή τους, έχει ανακαλυφθεί προσφάτως ότι το UPS αποικοδομεί εν τέλει μόνο τις πρόσφατα συντεθειμένες πρωτεΐνες οι οποίες έχουν υποστεί οξειδωτική καταστροφή. Αντιθέτως οι πρωτεΐνες οι οποίες είναι παλιότερες (πάνω από 60 λεπτά) δημιουργούν σύμπλοκα με άλλα δεσμευτικά μόρια και έτσι είναι περισσότερο ανθεκτικές στη μετουσίωση από οξειδωτικά και άρα λιγότερο ευαίσθητες στην αποικοδόμηση από το σύστημα UPS [121]. Τα ευρήματα αυτά χρειάζεται να μελετηθούν εκτενέστερα για να εξακριβωθεί αν ισχύουν και για τα κύτταρα του αμιφιβληστροειδούς και ίσως αυτό να μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση της αιτιολογίας της HEΩΚ. Ως εκ τούτου εάν βελτιωθεί η ικανότητα του συστήματος UPS να αποικοδομεί και τις παλαιότερες πρωτεΐνες ίσως να αποτελέσει μια θεραπευτική προσέγγιση για την HEΩΚ.

3.4 Ο αντιοξειδωτικός ρόλος του παράγοντα NRF2 και του DJ-1 στο ME

Το ME προστατεύεται από το οξειδωτικό στρες μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών. Πολλές μελέτες δείχνουν ότι ο *NRF2* είναι το κύριο συστατικό της αντιοξειδωτικής απάντησης [122]. Κανονικά ο παράγοντας αυτός βρίσκεται απομονωμένος στο κυτταρόπλασμα και αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη KEAP1 η οποία διευκολύνει την πρωτεόλυση του *NRF2* μέσω του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεοσώματος [123]. Σε περίπτωση απουσίας οξειδωτικών συνθηκών, η KEAP1 συνεχώς καταστέλλει την έκφραση του *NRF2* παρεμποδίζοντάς τον να μεταβεί στον πυρήνα. Ωστόσο άπαξ και αρχίσει η παραγωγή των ROS, τότε η KEAP1 υφίσταται αλλαγές στη διαμόρφωση απελευθερώνοντας έτσι τον *NRF2* και παρεμποδίζοντας την αποικοδόμησή του. Η *in*

vitro απόπτωση των κυττάρων του ME παρεμποδίζεται εξαιτίας της αύξησης των επιπέδων της γλουταθειόνης μέσω των γονιδίων του *NRF2*, της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης και της αναγωγάσης NADPH-κινόνης [124]. Ο ψευδάργυρος αυξάνει τα επίπεδα της γλουταθειόνης στα κύτταρα του ME μέσω της σηματοδότησης του *NRF2* [125]. Ο Zhao και οι συνεργάτες [126] σε μελέτη τους περιέγραψαν ότι τυχόν δυσλειτουργία του *NRF2* έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνει την ευαισθησία του αμφιβληστροειδούς όσον αφορά τη λειτουργία και τη μορφολογία του. Πολλά από τα χαρακτηριστικά της HEΩΚ έχουν επιβεβαιωθεί χρησιμοποιώντας ποντίκια knockout για το γονίδιο *NRF2*. Μερικά από αυτά είναι: η συσσώρευση λιποφουσκίνης, τα μεμβρανικά κενά μέσα στο ME, οι εναποθέσεις των drusen και η συσσώρευση των φλεγμονωδών πρωτεϊνών στη μεμβράνη του Bruch. Απώλεια του *NRF2* συνεπάγεται μη ορθή λειτουργία του αποικοδομητικού συστήματος στο ME και επομένως τη συσσώρευση των άχρηστων προϊόντων στον υποαμφιβληστροειδικό χώρο και στη μεμβράνη του Bruch. Αυξημένη έκφραση του γονιδίου για το *NRF2* μπορεί να δράσει και ως αντιοξειδωτική, αλλά και ως προφλεγμονώδης απάντηση στη ξηρή μορφή της HEΩΚ. Ακόμη σε πειραματικά μοντέλα βρέθηκε ότι η σουλφοραφάνη, ένας ενεργοποιητής του *NRF2* προστατεύει τους φωτοϋποδοχείς από την αποικοδόμηση και ίσως αυτό να μπορούσε να βοηθήσει στην καθυστέρηση της εξέλιξης της ασθένειας. Έτσι π.χ. αντί για υψηλές και συχνές δόσεις αντιοξειδωτικών (τα οποία δεν στοχεύουν αποκλειστικά τον αμφιβληστροειδή), εναλλακτικά ίσως θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί γονιδιακή θεραπεία που να στοχεύει το UPS σύστημα.

Όσον αφορά τον παράγοντα DJ-1 και αυτός κατέχει σημαντικό ρόλο τόσο στην ανίχνευση, αλλά και στην προστασία ενάντια οξειδωτικών παραγόντων. Αυτό πραγματοποιείται μέσω της σταθεροποίησης του *NRF2*, παρεμποδίζοντας την επαφή του με την KEAP1 [127]. Ο DJ-1 λειτουργεί ως αισθητήρας στην ομοίωση και υπερέκφραση αυτού σε οξειδωτικές συνθήκες οδηγεί σε αισθητή μείωση παραγωγής των ROS. Με τη βοήθεια της ανοσοιστοχημείας έχει βρεθεί ότι εντοπίζονται αυξημένα επίπεδα DJ-1 στη μεμβράνη του Bruch και στα drusen και άρα αυτό υποδηλώνει ότι τα κύτταρα του ME απελευθερώνουν ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες προς την επιφάνεια μέσω όμως ενός μηχανισμού ο οποίος παραμένει άγνωστος. Επομένως η λειτουργία του DJ-1 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την προστασία του ME από το οξειδωτικό στρες. Βέβαια είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν και άλλες ερευνητικές μελέτες για να βρεθεί ο τρόπος με τον οποίο τα κύτταρα του ME απελευθερώνουν τον DJ-1 και επίσης εάν είναι δυνατόν αυτός να εντοπιστεί στον ορό των ασθενών με HEΩΚ. Μια σύνοψη της συμβολής του οξειδωτικού παράγοντα στην παθογένεση της ξηράς HEΩΚ απεικονίζεται στην **(Εικόνα 3.6)**.



Εικόνα 3.6: Η συμβολή του οξειδωτικού στρες στην παθογένεση της ξηράς ΗΕΩΚ [102].

3.5 Βλάβες στα μιτοχόνδρια και στο μιτοχονδριακό DNA στην ΗΕΩΚ

Οι περισσότερες μιτοχονδριακές διαταραχές είναι πολυπαραγοντικές και προκύπτουν από την αλληλεπίδραση διαφόρων γονιδίων με το περιβάλλον οδηγώντας στην εμφάνιση ασθενειών. Δεδομένου ότι τα μιτοχόνδρια έχουν το δικό τους DNA και ότι αυτό κληρονομείται από τη μητέρα, οι mtDNA πολυμορφισμοί και οι μεταλλάξεις είναι πολύ πιθανόν να αποτελούν κομμάτι της αιτιολογίας για μιτοχονδριακές ασθένειες. Καθώς το mtDNA κωδικοποιεί μόνο για πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στον ενεργειακό μεταβολισμό αυτό σημαίνει ότι η ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου αποτελεί παράγοντα παθογένεσης για πολλές κοινές διαταραχές. Υπάρχουν ολόένα και περισσότερες ενδείξεις ότι υπάρχει μια συσχέτιση ανάμεσα στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και τις παθήσεις του αμφιβληστροειδούς, συμπεριλαμβανομένου της ΗΕΩΚ, της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας και του γλαυκώματος [128]. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν πλούσια πηγή ROS λόγω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που επιτελούν, κάνοντάς τα έναν ευάλωτο στόχο στο οξειδωτικό στρες. Οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του μιτοχονδριακού DNA είναι ανεπαρκείς για να αντιμετωπίσουν την κατάσταση αυτή σε σχέση με το πυρηνικό DNA και επομένως τα μιτοχόνδρια συνεχώς πλήττονται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Την τελευταία δεκαετία έχει αναδειχθεί η θετική συσχέτιση μεταξύ της αστάθειας του μιτοχονδριακού γενώματος και της ανάπτυξης της ΗΕΩΚ και εν γένει ο ρόλος των μιτοχονδρίων σε ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία. Οι συσσωρευμένες mtDNA καταστροφές οδηγούν σε ετεροπλάσμια και εάν η καταστροφή αυτή επηρεάζει ένα μεγάλο ποσοστό των μιτοχονδρίων αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της κυτταρικής λειτουργίας και μια μεγαλύτερη ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες. Η καταστροφή του mtDNA αυξάνεται στον νευροαισθητηριακό αμφιβληστροειδή και στο μελάγχρουν επιθήλιο με την ηλικία και φαίνεται να είναι ακόμη μεγαλύτερη στην περίπτωση της ΗΕΩΚ. Αυτό συμβαίνει γιατί

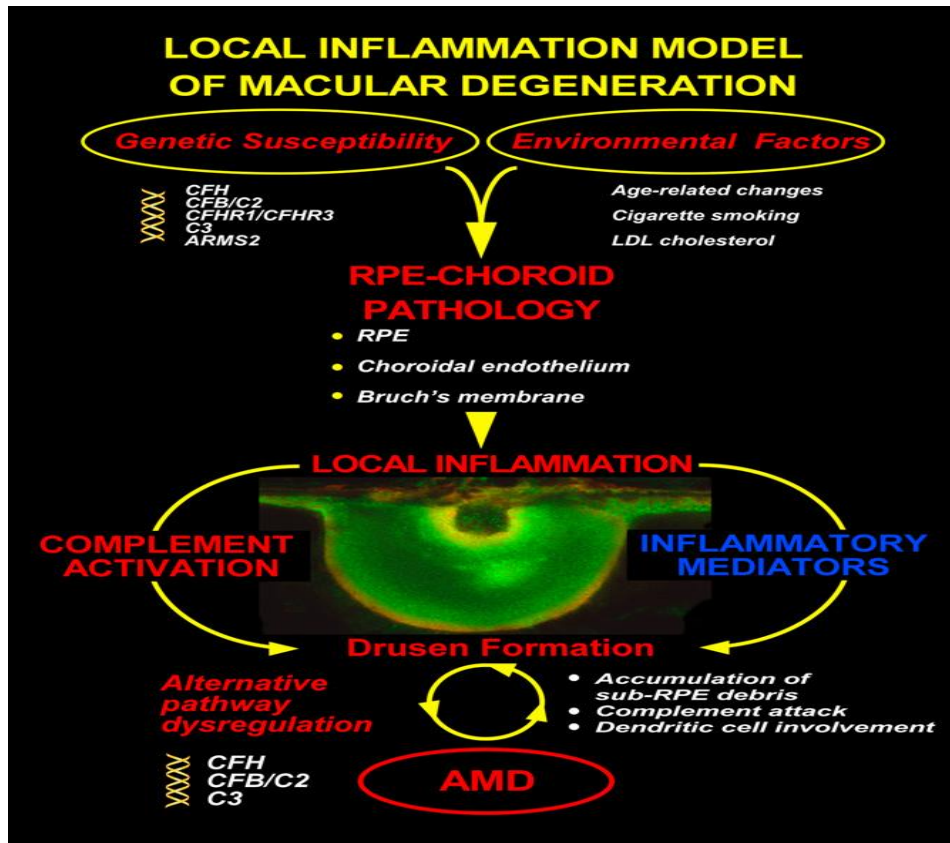
δε ρυθμίζονται σωστά οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες όπως είναι η ATP συνθάση, η οξειδάση του κυτοχρώματος C και η πρωτεΐνη 70 θερμικού σοκ [129].

Φαίνεται ότι τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια εκτός του ότι παράγουν χαμηλότερα επίπεδα ενέργειας, δημιουργούν και μια ανισορροπία μεταξύ των προ- και μετα- αποπτωτικών σημάτων συμβάλλοντας στη δυσλειτουργία του ME και στην απόπτωση των κυττάρων, το οποίο θεωρείται η αρχή της παθογένειας της HEΩΚ [130]. Πρόσφατες έρευνες μελέτησαν δυο πολυμορφισμούς α) LOC387715/ARMS2 [131] και β) A4917G στο mtDNA, οι οποίοι οδηγούν σε δομικές αλλαγές στις πρωτεΐνες, και εάν οι αλλαγές στα γονίδια αυτά συνοδεύονται με το κάπνισμα τότε συνεισφέρουν με μεγαλύτερο ποσοστό στην απόπτωση του ME και στην ανάπτυξη HEΩΚ. Ένας πολυμορφισμός, ο rs10490924 στην περιοχή LOC387715 στο χρωμόσωμα 10q συνδέεται με την HEΩΚ έχοντας τη δεύτερη υψηλότερη συσχέτιση μετά το *CFH*, αμφισβητείται ο λειτουργικός ρόλος του γονιδίου, που μάλλον κωδικοποιεί για ένα αλληλόμορφο σερίνης Ala69Ser και ένα μετάγραφο του LOC387715 εντοπίζεται σε πολλούς ιστούς, όπως και στον αμφιβληστροειδή. Το προβλεπόμενο προϊόν είναι μια πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας, η LOC387715-*HTRA1* σχετιζόμενη επίσης με άλλους πολυμορφισμούς που απέχουν 6kb.

Εκτός από τους προαναφερθέντες πολυμορφισμούς ο Synowiec και οι συνεργάτες του [132] σε πρόσφατη μελέτη περιέγραψαν τη συσχέτιση ανάμεσα σε πολυμορφισμούς σε γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που εμπλέκονται στην παραγωγή και εκκαθάριση οξειδωτικών συνθηκών: NQO1, NOS3, NFE2L2 και την HEΩΚ. Άλλοι πολυμορφισμοί στα γονίδια που κωδικοποιούν για το μιτοχονδριακό tRNA H και J έδειξαν ότι είτε είχαν προστατευτικό ρόλο είτε αποτελούσαν παράγοντα κινδύνου για την HEΩΚ.

Όπως αναφέρθηκε και στα προηγούμενα εδάφια τα πλέον εντυπωσιακά στοιχεία που συσχετίζουν το συμπλήρωμα, το πρωτεολυτικό σύστημα ουβικιτίνης και τις βλάβες των μιτοχονδρίων με την HEΩΚ συνδέονται άρρηκτα με τη γενετική και θα αναλυθεί εκτενώς στο επόμενο κεφάλαιο. Πλειάδα πολυμορφισμών σε γονίδια παραγόντων του συμπληρώματος και ρυθμιστικών πρωτεϊνών έχει δειχθεί ότι αυξάνουν τον κίνδυνο ή προσφέρουν προστασία έναντι της εκδήλωσης της νόσου. Αν και το γενετικό υπόβαθρο και η συσχέτιση αυτού με την ασθένεια δεν αποτελεί απόδειξη της γενεσιουργού αιτίας της νόσου, η μεγάλη προγνωστική αξία και η συσχέτισή του με τα παθολογοανατομικά και μοριακά ευρήματα, οδήγησαν στη διατύπωση της **θεωρίας της φλεγμονής** για την αιτιοπαθογένεια της HEΩΚ (**Εικόνα 3.7**). Σύμφωνα με αυτή, η HEΩΚ μπορεί

να προκληθεί από την επίδραση ενός ή περισσότερων περιβαλλοντολογικών παραγόντων σε ασθενείς γενετικά επιβαρυνμένους με μεταλλάξεις σε γονίδια του συμπληρώματος. Η επίδραση αυτή θα προκαλέσει, με την πάροδο της ηλικίας, παθολογικές αλλαγές στο ΜΕ και το χοριοειδή, επάγοντας χρόνια τοπική φλεγμονώδη απάντηση που περιλαμβάνει υπέρμετρη ενεργοποίηση του συμπληρώματος με τελική συνέπεια περαιτέρω μορφολογικές αλλαγές στη μεμβράνη του Bruch και τους παρακείμενους ιστούς και τελική απώλεια της όρασης [114].



Εικόνα 3.7: Η θεωρία της φλεγμονής ως αίτιο για την εκφύλιση της ωχράς κηλίδας [114]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο: Γενετική της ΗΕΩΚ

4.1 Γενετική Επιδημιολογία

Η γενετική επιδημιολογία των πολυπαραγοντικών ασθενειών, όπως είναι και η νόσος της ΗΕΩΚ, παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες σε σχέση με αυτή των ασθενειών που χαρακτηρίζονται από τον Μενδελιανό τρόπο κληρονόμησης. Στις πολυπαραγοντικές νόσους, πλήθος γενετικών παραγόντων μπορεί να συνεισφέρει στην εκδήλωση του φαινοτύπου, λαμβάνοντας υπόψη τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση, αλλά και την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων [133].

Για τη μελέτη ασθενειών που δεν είναι γνωστός ο τρόπος κληρονόμησης για να μπορέσει να υπολογιστεί η γενετική συμβολή στην εκδήλωση της ασθένειας χρησιμοποιούνταν οι μελέτες οικογενειών. Σε αυτές τις μελέτες διαχωρισμού, μετράται ο αριθμός των μελών της οικογένειας σε κάθε γενιά που εμφανίζει το χαρακτηριστικό ή τη νόσο και διερευνάται εάν υπάρχει συσσώρευση (clustering-segregation) της μετάλλαξης του γονιδίου στους νοσούντες στις υπό μελέτη οικογένειες. Όπως είναι κατανοητό, η έκθεση των μελών μιας οικογένειας στους ίδιους περιβαλλοντικούς παράγοντες μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό συγχυτικό παράγοντα σε τέτοιου είδους απόπειρες. Άλλες μελέτες εστιάζουν σε οικογένειες μονοζυγωτικών και διζυγωτικών διδύμων. Από τέτοιου είδους μελέτες είναι πιο εύκολο να βρεθεί σε τι ποσοστό το γενετικό υπόβαθρο συμβάλλει στην εκδήλωση της ασθένειας και άρα μπορεί να διευκρινιστεί η σχέση γονοτύπου-φαινοτύπου-περιβάλλοντος και ο τρόπος αλληλεπίδρασής τους [133].

Πρέπει να τονισθεί ότι όλες οι γενετικές επιδημιολογικές μελέτες θεωρούν την εκδήλωση νόσου ως δείκτη για την πιθανολογούμενη υποκείμενη γενετική αλλαγή. Μια τέτοια παραδοχή μπορεί να αποδειχθεί λανθασμένη για πολλούς λόγους. Συγκεκριμένα σε ασθένειες όπως η ΗΕΩΚ, εικάζεται ότι πολλοί διαφορετικοί φαινότυποι, απόρροια διαφορετικών γενετικών μεταβολών κατηγοριοποιούνται στην κοινή διάγνωση της ΗΕΩΚ. Έτσι, μπορεί να παρατηρηθεί μεγάλη ετερογένεια γενετικών τόπων (locus heterogeneity), καθένας από τους οποίους μπορεί να επιφέρει ευαλωτότητα για τη νόσο σε διαφορετικούς πληθυσμούς και γεωγραφικές περιοχές. Άλλωστε, δεν αποκλείεται κάποιος γενετικός τόπος να εμφανίζει μειωμένη διεισδυτικότητα εκδηλούμενος με διαφορετικούς φαινοτύπους σε διαφορετικά άτομα. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την παρουσία τροποποιητικών γονιδίων (modifier genes), αλλά και επιγενετικών αλλαγών που μεταβάλλουν τη γονιδιακή έκφραση.

Στην περίπτωση της ΗΕΩΚ η ακριβής αιτιοπαθογένεια της ωχράς κηλίδας είναι άγνωστη, όμως είναι γνωστό ότι εμπλέκονται γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Επιδημιολογικές

μελέτες σε πληθυσμούς ασθενών, σε οικογένειες που εμφανίζουν τη νόσο και σε διδύμους [25,26] έχουν αναδείξει τη συνεισφορά του γενετικού υποβάθρου στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Η κληρονομικότητα (heritability), η αναλογία δηλαδή της φαινοτυπικής διακύμανσης ενός πληθυσμού που οφείλεται στη γενετική διακύμανση, υπολογίζεται κυρίως από μελέτες διδύμων. Τέτοιες μελέτες υπολογίζουν την κληρονομικότητα της ΗΕΩΚ γύρω στο 45% και της όψιμης ΗΕΩΚ κοντά στο 71% τοποθετώντας τη γενετική συνιστώσα στο επίκεντρο της αιτιοπαθογένειας της νόσου.

Η απόπειρα εύρεσης των γενετικών τόπων που σχετίζονται με μια νόσο μπορεί να γίνει με διάφορες τεχνικές, όπως η ανάλυση σύνδεσης (linkage analysis) και οι μελέτες συσχέτισης [μελέτες υποψηφίων γονιδίων (candidate gene approach) και GWAS (genome-wide association μελέτες)]. Η ανάλυση σύνδεσης παρακολουθεί τη μεταβίβαση γενετικών δεικτών στις διάφορες γενιές μιας οικογένειας με σκοπό την εύρεση των δεικτών εκείνων που βρίσκονται εγγύτερα (και άρα εμφανίζουν μεγαλύτερο LOD:(Log of the odds score) στο υπεύθυνο για τη νόσο γονίδιο. Από την άλλη μεριά, οι μελέτες σύνδεσης βασίζονται στην υπόθεση ότι μια υπό μελέτη γενετική μεταβολή είναι συχνότερη σε ασθενείς παρά σε υγιείς μάρτυρες. Θεωρείται ότι οι πολυπαραγοντικές νόσοι καθορίζονται έως ένα σημείο από μια σειρά γενετικών μεταβολών που μπορεί μεν να είναι συχνές στον πληθυσμό, αλλά κάθε μία μεμονωμένη έχει μικρή επίδραση στην ευαλωτότητα του ατόμου για την εκδήλωση της νόσου [133]. Οι μεταβολές αυτές αφορούν ως επί το πλείστον σημειακούς πολυμορφισμούς (SNPs), δηλαδή αλλαγές ενός νουκλεοτιδίου που εξ ορισμού ανευρίσκονται σε ποσοστό του πληθυσμού μεγαλύτερο από 1%. Δημόσιες τράπεζες δεδομένων (π.χ. η dbSNP) φιλοξενούν σήμερα περισσότερους από 9 εκατομμύρια γνωστούς SNPs σε όλη την έκταση του γονιδιώματος. Η αναζήτηση των σχετιζόμενων με μια πολυπαραγοντική νόσο SNPs γίνεται είτε με τον έλεγχο υποψηφίων γονιδίων που βιοχημικά ή παθοφυσιολογικά εικάζεται ότι σχετίζονται με την αιτιοπαθογένεια της νόσου, είτε με την αξιοποίηση των σύγχρονων τεχνικών γονοτύπωσης που επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανάλυση χιλιάδων πολυμορφισμών σε ολόκληρο το γονιδίωμα με χρήση μικροσυστοιχιών (genome-wide association studies).

Όσον αφορά την ΗΕΩΚ, η αναζήτηση των εμπλεκόμενων γενετικών τόπων έγινε αρχικά με την αναζήτηση συσχέτισης μεταξύ της νόσου και υποψηφίων γονιδίων που συσχετίζονται με άλλες κληρονομικές μορφές αμφιβληστροειδικής εκφύλισης (*ABCR*, *TIMP3*, *RDS*, *EFEMP1*, *VMD2* και *ELOVL4* (**Πίνακας 4.1**) και εμφανίζουν παρόμοια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, χωρίς ωστόσο να ανακλύουν σημαντικά ευρήματα [22]. Μεταξύ αυτών των γονιδίων μόνο το *ABCR* (και συγκεκριμένα οι πολυμορφισμοί *G1961E* and *D2177N*) έχει δείξει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ΗΕΩΚ σε ορισμένες μελέτες [134].

Πίνακας 4.1: Γονίδια τα οποία έχουν συσχετιστεί με κληρονομικές δυστροφίες του αμφιβληστροειδούς.

Γονίδιο	Πρωτεΐνη	Ασθένεια
ABCR	μέλος 4 της υποοικογένειας 1 ATP-binding cassette	Δυστροφία Stargardt (υπολειπόμενη)
TIMP3	Αναστολέας μεταλλοπρωτεϊνών 3	Δυστροφία Sorsby
RDS	Περιφερίνη 2	Δυστροφία Vitelliform
EFEMP1	Πρωτεΐνη 1 του εξωκυτταρίου στρώματος ομοιάζουσα τη φιμπουλίνη, περιέχουσα EGF	Δυστροφία Doyme Honeycomb
VMD2	Μπεστροφίνη	Δυστροφία Best
ELOVL4	Πρωτεΐνη 4 της επιμήκυνσης των λιπαρών οξέων πολύ μακριάς αλύσου	Δυστροφία Stargardt (επικρατής)

Οι μελέτες σύνδεσης σε οικογένειες για την ΗΕΩΚ εμφανίζουν σημαντικές δυσκολίες καθότι πρόκειται περί πολυπαραγοντικής νόσου με καθυστερημένη ηλικία έναρξης και εκσεσημασμένη φαινοτυπική ποικιλομορφία. Παραταύτα οι GWAS έλεγχοι ανέδειξαν πάνω από 30 γενετικούς τόπους που συσχετίζονταν με τη νόσο [22]. Μια μετα-ανάλυση του 2005 χρησιμοποιώντας τα δεδομένα 6 μελετών σύνδεσης, σταθμισμένων ως προς τον αριθμό των συμμετεχόντων, κατέληξε σε 7 χρωμοσωμικές περιοχές στατιστικά σημαντικά συσχετιζόμενες με την ΗΕΩΚ (1q, 2p, 3p, 4q, 10q, 12q και 16q). Η ισχυρότερη σύνδεση αφορούσε το γενετικό τόπο 10q, όπου εντοπίζεται το γονίδιο *ARMS2*, ενώ η δεύτερη πιο σημαντική συσχέτιση αφορούσε την περιοχή 1q, όπου εδράζεται το γονίδιο *CFH*. Οριακή σημαντικότητα βρέθηκε για τους γενετικούς τόπους 9q ($p=0,051$) και την περιοχή 19q ($p=0,067$) που εδράζεται το γονίδιο *APOE* [135].

Εκτός από τα γονίδια που σχετίζονται με κληρονομικές αμφιβληστροειδικές εκφυλίσεις, μεγάλος αριθμός άλλων υποψήφιων γονιδίων έχει μελετηθεί για την πιθανή σχέση τους με την ΗΕΩΚ με βάση το ρόλο τους σε σηματοδοτικά και βιοχημικά μονοπάτια και τη συμμετοχή τους σε φλεγμονώδεις ή ανοσολογικές διεργασίες. Τα γονίδια εκείνα για τα οποία έχει βρεθεί στατιστικά σημαντική συσχέτιση συνοψίζονται στον **Πίνακα 4.2** [7].

Πίνακας 4.2: Γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη ΗΕΩΚ.

Γονίδιο	Θέση	Πλήρης Ονομασία	Λειτουργία
ABCR	1p22.1-21	ATP-binding cassette, subfamily A, member 4	Μεταφέρει συμπλέγματα all-trans-ρετινάλης φωφατιδυλαιθανολαμίνης διαμέσου της μεμβράνης των δισκων
HMCN1	1q25.3-q31.1	Hemicentin 1	Πρωτεΐνη του εξωκυττάριου στρώματος
CFH	1q32	Complement Factor H	Παράγοντας του συμπληρώματος
CX3CRI	3pter-p21	Chemokine CX3C motif receptor 1	Υποδοχέας χημειοκινών, συμμετέχει στη χημειοταξία μακροφάγων και μικρογλοίας
TLR3	4q35	Toll like receptor 3	Υποδοχέας τύπου Toll-Αναγνώριση παθογόνων και ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας
CFI	4q25	Complement Factor I	Παράγοντας του συμπληρώματος
BF	6p21.3	Factor B	Παράγοντας της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος
C2	6p21.3	Complement factor 2	Κλάσμα της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος
VEGF	6p12	Vascular Endothelial Growth Factor	Αυξητικός παράγων του αγγειακού ενδοθηλίου- προάγει τη νεοαγγειογένεση
ESR1	6q25.1	Estrogen Receptor 1	Υποδοχέας των οιστρογόνων, μεταγραφικός παράγων
TLR4	9q32-q33	Toll like Receptor 4	Υποδοχέας τύπου Toll-Αναγνώριση παθογόνων και ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας
ARMS2	10q26	Age Related Macular Susceptibility 2	Άγνωστη λειτουργία, εντόπιση στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου
HTRA1	10q26	High-temperature requirement factor A1	Πρωτεάση σερίνης που ενεργοποιείται επί κυτταρικού στρες
PLEKHA1	10q26	Pleckstrin homology domain-containing protein, family A, member 1	Άγνωστη λειτουργία
ERCC6	10q11.23	Excision-repair cross-complementing group 6	Πρωτεΐνη επιδιόρθωσης DNA
SERPING1	11q11-q13.1	Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	Αναστολέας του C1 κλάσματος του συμπληρώματος
FBLN5	14q32.12	Fibulin 5	Πρωτεΐνη του εξωκυττάριου στρώματος
LIPC	15q21-q23	Hepatic Lipase	Συμμετέχει στο μεταβολισμό των λιπιδίων
C3	19p13.3-p13.2	Complement factor 3	Κλάσμα του συμπληρώματος
APOE	19q	Apolipoprotein E	Λιποπρωτεΐνη με σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό τη χοληστερόλης
CST3	20p11.2	Cystatin 3	Αναστολέας λυσοσωμικών πρωτεϊνών

Σημειακοί πολυμορφισμοί (SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms) σε όλα τα παραπάνω γονίδια έχουν συσχετισθεί με αυξημένο (ή μειωμένο) κίνδυνο για την εκδήλωση ΗΕΩΚ. Υπενθυμίζεται ότι η στατιστική συσχέτιση ενός SNP με μια ασθένεια δεν εγκαθιδρύει κατ' ανάγκην αιτιολογικής φύσεως σχέση μεταξύ των δύο, ωστόσο η λειτουργική επίδραση αρκετών πολυμορφισμών εκ των ανωτέρω και η πιθανή εμπλοκή της σε μηχανισμούς παθογένεσης της νόσου έχουν συζητηθεί ή/και διερευνηθεί στη βιβλιογραφία.

Είναι φανερό ότι μεταξύ των εμπλεκόμενων γονιδίων, αρκετά κωδικοποιούν πρωτεΐνες του εξωκυττάριου στρώματος και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Εξετάζοντας την παθοφυσιολογία της ασθένειας στο αντίστοιχο Κεφάλαιο 2 φάνηκε ότι η συσσώρευση των λιπιδίων είναι ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της παθολογοανατομικής εικόνας των ατόμων με ΗΕΩΚ, ενώ η διαταραχή της δομής του εξωκυττάριου στρώματος συνιστά προαπαιτούμενο για την επέκταση της νεοαγγείωσης από το χοριοειδή χιτώνα στο ΜΕ και τον αμφιβληστροειδή [136].

Η εμπλοκή του υποδοχέα 1 των οιστρογόνων αποδόθηκε από τους ερευνητές στο ρόλο που έχουν τα τελευταία στον έλεγχο της έκφρασης της μεταλλοπρωτεΐνάσης 2 στο ΜΕ. Απορρύθμιση της έκφρασης έχει βρεθεί να αυξάνει την παρουσία εναποθέσεων στη μεμβράνη του Bruch [137]. Στο γονίδιο *ERCC6*, έχουν εντοπιστεί SNPs που ευθύνονται για την εμφάνιση του συνδρόμου Cockayne και πιστεύεται ότι μπορεί να υπάρχει κάποια συσχέτιση με την ΗΕΩΚ, καθώς οδηγούν σε μειωμένη ικανότητα επιδιόρθωσης των βλαβών στο DNA που προκαλείται στην περιοχή της ωχράς κηλίδας μέσω της ακτινοβολίας και του φωτοοξειδωτικού στρες [138]. Ο βιολογικός μηχανισμός ίσως να συνδέει την κυστατίνη 3, έναν αναστολέα λυσοσωμικών πρωτεασών, με την ΗΕΩΚ είναι η επίδραση του εν λόγω πολυμορφισμού στη δραστηριότητα της λυσοσωμικής πρωτεάσης καθεψίνης S. Πειραματικά, φαρμακευτική αναστολή της καθεψίνης S έχει δειχθεί να προάγει τη συσσώρευση φθορίζοντος υλικού στα κύτταρα του ΜΕ, θυμίζοντας τη φυσική ιστορία της ΗΕΩΚ [139].

Η μεγάλη ωστόσο πλειοψηφία των γονιδίων που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα να συσχετίζονται με την ΗΕΩΚ, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4.2**, αφορά πρωτεΐνες του ανοσοποιητικού συστήματος και ιδιαίτερα της φυσικής ανοσίας, με εξέχουσα θέση αυτή του συστήματος του συμπληρώματος και πιο συγκεκριμένα την εναλλακτική οδό αυτού. Εντυπωσιακή συσχέτιση φαίνεται να υπάρχει με τον παράγοντα H του συμπληρώματος καθώς και με τα γονίδια

του παράγοντα B (BF) και με του κλάσματος C2 του συμπληρώματος. Έως τώρα έχουν ταυτοποιηθεί δύο προστατευτικοί απλότυποι και ένας επιβαρυντικός των BF-C2 [140-142].

Τα δύο αυτά γονίδια εδράζονται στο χρωμόσωμα 6 με απόσταση μόλις 600 bp μεταξύ τους και φιλοξενούν πολυμορφισμούς που εμφανίζουν σημαντική ανισοροπία σύνδεσης μεταξύ τους. Ο Gold και συνεργάτες έδειξαν ότι οι απλότυποι i) rs4151667(BF)/ rs9332739(C2) και ii) rs641153(BF)/ rs547154(C2) προσφέρουν προστασία για τη νόσο και υπέθεσαν ότι η αιτιώδης σχέση αφορά το BF. Το BF συμμετέχει στην ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος και ο πολυμορφισμός rs641153 έχει βρεθεί να ελαττώνει την ενεργοποιητική του δραστηριότητα. Ένας λειτουργικός πολυμορφισμός στο C3, ο rs2230199, προδιαθέτει επίσης για την εκδήλωση HEΩΚ [143], όπως και ένα SNP (rs10033900) 2781 bp ανοδικά της 3' αμετάφραστης περιοχής του παράγοντα I, χωρίς λειτουργική επίδραση επί της πρωτεΐνης [144]. Τέλος πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν προστατευτικές επιδράσεις για δύο πολυμορφισμούς στο γονίδιο που κωδικοποιεί για τον παράγοντα C7 (rs2876849) [145] και στο γονίδιο SERPING1 που κωδικοποιεί για τον αναστολέα του C1 (rs2511989) [146].

4.2 Μελέτη τριών γονιδίων

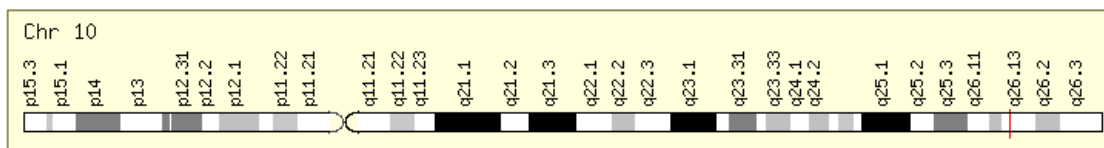
Στη μελέτη αυτή εξετάστηκαν τρία γονίδια (*ARMS2*, *CD14*, *TLR4*) ως προς τη συμβολή τους στην ανάπτυξη της εξιδρωματικής μορφής της HEΩΚ. Το *ARMS2* αποτελεί το δεύτερο, μετά το *CFH*, γονίδιο που έχει μελετηθεί όσον αφορά τη συσχέτισή του με την ασθένεια. Το συγκεκριμένο γονίδιο εμπλέκεται σε ένα από τα τέσσερα γνωστά βιοχημικά μονοπάτια που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με την HEΩΚ, αυτό του οξειδωτικού στρες. Τα γονίδια *CD14* και *TLR4* λειτουργούν ως σύμπλοκο και εμπλέκονται στην οδό της έμφυτης ανοσολογικής απάντησης. Τα συγκεκριμένα γονίδια δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς για το ρόλο που παίζουν στην ασθένεια, αλλά βάσει γενετικών μελετών γονίδια που εμπλέκονται στο σύστημα ανοσίας είναι αρκετά πιθανό να αποτελούν αιτία παθογένειας της νόσου.

4.2.1 Το γονίδιο *ARMS2* και HEΩΚ

Το *ARMS2* εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 10q26 αποτελείται από δύο εξώνια και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 12 kDa με 107 αμινοξέα και 9 θέσεις

φωσφορυλίωσης (**Εικόνα 4.1**). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον πλακούντα, χωρίς να είναι γνωστή η βιολογική της δράση, ενώ αναλύσεις με RT -PCR (reverse transcriptase PCR) πιστοποίησαν έκφραση και στον αμφιβληστροειδή καθώς και σε ποικιλία άλλων ιστών και οργάνων. Μελέτες στον ανθρώπινο αμφιβληστροειδή κατέδειξαν ότι η *ARMS2* πρωτεΐνη εντοπίζεται στην ελλειψοειδή περιοχή των εσωτερων τμημάτων των φωτοϋποδοχέων και συνεντοπίζεται με τον μιτοχονδριακό δείκτη αντι-MTCO2, υποδηλώνοντας μιτοχονδριακή εντόπιση. Η θέση της φαίνεται να είναι στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων [7,66].

Το ισχυρό σήμα σύνδεσης στη χρωμοσωμική περιοχή 10q26 οδήγησε δύο ανεξάρτητες ομάδες το 2005 να διερευνήσουν τους υποκείμενους πολυμορφισμούς [147,148]. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει τρία γονίδια σε κοντινή απόσταση, κάτι που επιτρέπει σημαντική ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ τους. Τα γονίδια αυτά είναι το *HTRA1*, *PLEKHA1* και *ARMS2/LOC387715* και έχουν όλα συνδεθεί από ερευνητικές μελέτες με αυξημένο κίνδυνο για ΗΕΩΚ [65,66,147,148].



Εικόνα 4.1: Απεικόνιση του γενετικού τόπου 10q26 του γονιδίου *ARMS2* (<http://ghr.nlm.nih.gov>).

Ο πολυμορφισμός που προτείνεται στο *ARMS2* (rs10490924) αφορά την αντικατάσταση μιας γουανίνης από μια θυμίνη (g.5270G>T) που οδηγεί σε αλλαγή μιας αλανίνης σε σερίνη στη θέση 69 της πρωτεΐνης (p.A69S). Μετα-ανάλυση του 2010 υπολόγισε ότι ο κίνδυνος εκδήλωσης ΗΕΩΚ για τους TT ομοζυγώτες είναι 7,5 φορές μεγαλύτερος και για τους TG ετεροζυγώτες 2,4 φορές μεγαλύτερος σε σύγκριση με τους GG ομοζυγώτες. Ο PAR για τον εν λόγω SNP υπολογίστηκε 47,9%, ενώ η συσχέτισή του με την υγρή μορφή της νόσου βρέθηκε ισχυρότερη από ότι για τη ξηρή [149]. Τα αποτελέσματα κάποιων από τις μελέτες που διερεύνησαν τη συσχέτιση A69S και ΗΕΩΚ σε διαφορετικής προέλευσης πληθυσμούς συνοψίζονται στον **Πίνακα 4.3**.

Πίνακας 4.3: Συγκεντρωτικός πίνακας μελετών σε πληθυσμούς διαφορετικής καταγωγής για τη συσχέτιση του A69S SNP με την HEΩΚ. Αναφέρονται η καταγωγή του πληθυσμού, ο αριθμός ασθενών και μαρτύρων, το ανευρεθέν επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (*P*) και ο λόγος συμπληρωματικών πιθανοτήτων (*OR*) λόγω της ύπαρξης έστω και ενός μεταλλαγμένου αλληλίου, άλλοι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν, οι ερευνητές και η χρονολογία της μελέτης [22].

Populations	Cases (n)	Controls (n)	<i>P</i> value	Odds ratio (95%CI)	Other associated variants	References
South East Asians	96	130	4.08×10^{-12}	NA		DeWan <i>et al.</i> 2006
Americans	323	117	< 0.00001	NA	1 exonic	Jakobsdottir <i>et al.</i> 2005
Americans	374	336	< 0.0001	NA		Jakobsdottir <i>et al.</i> 2005
Americans	466	280	5.3×10^{-30}	NA	1 exonic, 2 intronic	Kanda <i>et al.</i> 2007
Americans	457	1071	< 0.001	1.47 (0.77–2.81)		Schaumburg <i>et al.</i> 2007
Americans (AREDS)	701	175	< 0.00001	NA		Conley <i>et al.</i> 2006
Americans (CHS)	126	1051	< 0.00001	NA		Conley <i>et al.</i> 2006
Americans	399	329	1.80×10^{-18}	2.88 (2.26–3.67)		Ross <i>et al.</i> 2007
Americans	530	280	1.28×10^{-11}	3.13 (2.23–4.40)		Francis <i>et al.</i> 2007
Japanese	73	94	1.4×10^{-6}	3.0 (1.61–5.75)		Kondo <i>et al.</i> 2007
Japanese	95	99	3.23×10^{-6}	2.63 (1.74–3.96)		Tanimoto <i>et al.</i> 2007
Japanese	88	97	4.74×10^{-11}	NA		Yoshida <i>et al.</i> 2007
Japanese	56	77	1.0×10^{-3}	3.13 (1.52–6.45)	3'UTR indel	Gotoh <i>et al.</i> 2009
French	188	116	< 0.0001	4.41 (2.60–7.40)		Leveziel <i>et al.</i> 2007
Israeli	255	119	< 0.0001	3.10 (2.20–4.50)		Chowers <i>et al.</i> 2008
Finnish	332	455	3.75×10^{-9}	NA		Seitonen <i>et al.</i> 2008
Indian	228	152	5.34×10^{-12}	2.92 (2.17–3.97)	1 exonic	Kaur <i>et al.</i> 2008
German	794	612	3.9×10^{-34}	2.97 (2.32–3.81)		Rivera <i>et al.</i> 2005
German	760	549	2.8×10^{-29}	2.86 (2.38–3.44)	1 exonic, 1 indel	Fritsche <i>et al.</i> 2008
European	401	266	1.02×10^{-25}	3.71 (2.86–4.81)		Hughes <i>et al.</i> 2007
American	610	259	3.13×10^{-8}	NA	3 intronic	Schmidt <i>et al.</i> 2006
Greek	100	115	< 0.04	NA		Marioli <i>et al.</i> 2009
Chinese	159	140	2.68×10^{-6}	3.19 (2.28–4.46)		Jiang <i>et al.</i> 2009
Northern Chinese	121	132	< 0.001	2.43 (1.70–3.48)		Xu <i>et al.</i> 2008
Chinese (Taiwan)	95	90	9.2×10^{-6}	2.73 (1.77–4.21)		Lin <i>et al.</i> 2008
Russian	155	151	0.007	NA		Fisher <i>et al.</i> 2007

Η παθοφυσιολογική σχέση του A69S πολυμορφισμού με την HEΩΚ (εάν υφίσταται) προτείνεται ότι εμπλέκει τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων στο γηρασμένο αμφιβληστροειδή. Ιστολογικά έχει παρατηρηθεί ότι στον πάσχοντα από HEΩΚ αμφιβληστροειδή ο αριθμός και το μέγεθος των μιτοχονδρίων είναι μειωμένα και υπάρχει απώλεια πτυχών και ελαττωμένη πυκνότητα του στρώματος, καθώς και ελλείψεις στο μιτοχονδριακό DNA. Δεδομένου δε ότι η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων αποτελεί σημαντική πηγή ανιόντων υπεροξειδίου και το οξειδωτικό στρες ενοχοποιείται για την παθογένεση της HEΩΚ, κάποιοι ερευνητές έχουν προτείνει ότι η αντικατάσταση της αλανίνης από σερίνη στη θέση 69 της πρωτεΐνης *ARMS2* πιθανώς ενέχει κάποιο ρόλο στην εξαρτώμενη από το οξειδωτικό στρες βλάβη των φωτοϋποδοχέων. Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα στοιχεία, η εν λόγω αντικατάσταση δε φαίνεται να έχει επίδραση στην έκφραση, σταθερότητα ή εντόπιση της πρωτεΐνης. Πιθανώς λοιπόν να προκαλεί κάποια δομικής ή/και λειτουργικής φύσεως μεταβολή που μένει να διευκρινιστεί με εκτενέστερη πειραματική διερεύνηση [7,66,149].

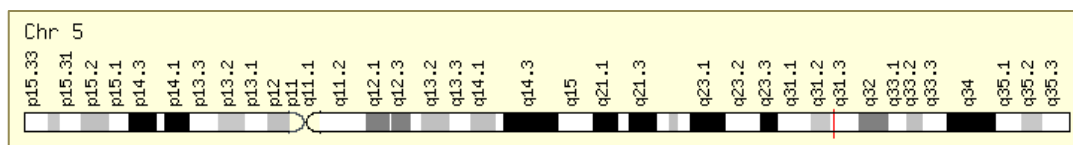
Η συχνότητα του A69S φαίνεται μεγαλύτερη στους ασιατικής προέλευσης πληθυσμούς [149]. Στον ελληνικό πληθυσμό μελέτη του πανεπιστημίου Πατρών βρήκε 46% επιπολασμό του T

αλληλίου στους ασθενείς και 34% στην ομάδα ελέγχου [150]. Αξίζει να σημειωθεί όσον αφορά τη σχέση γονοτύπου-φαινοτύπου ότι ο πολυμορφισμός αυτός σε πολλές μελέτες φαίνεται να συσχετίζεται με προχωρημένη νόσο και ιδιαίτερα με χοριοειδική νεοαγγείωση [151]. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση αφορά την αλληλεπίδραση μεταξύ του πολυμορφισμού αυτού και του ιστορικού καπνίσματος. Η αλληλεπίδραση αυτή γονοτύπου-περιβάλλοντος πιστοποιείται από μελέτη των Schmidt και συνεργατών που παρατήρησαν συνεργική δράση του A69S με το κάπνισμα [152].

Ολοκληρώνοντας την παράγραφο αυτή, πρέπει να σημειωθεί ότι σημαντική διχογνωμία υφίσταται για το ποιος πολυμορφισμός είναι υπεύθυνος για το ισχυρό σήμα σύνδεσης στην περιοχή 10q26. Εκτός από τον A69S, ένας άλλος SNP στον υποδοχέα του γονιδίου *HTRA1* (rs1120638) έχει δείξει σημαντική συσχέτιση με την HEΩΚ. Το *HTRA1* κωδικοποιεί για μια πρωτεάση σερίνης και η πιθανή σύνδεση του με την πάθηση θα μπορούσε να αποδοθεί σε μεταβολές στη δραστηριότητά αυτής στο εξωκυττάριο στρώμα. Η διευκρίνιση της ταυτότητας του αιτιολογικά σχετιζόμενου με τη νόσο πολυμορφισμού αποτελεί μια ουσιώδη ερευνητική πρόκληση στο ερευνητικό πεδίο της HEΩΚ [66,149].

4.2.2 Το γονίδιο *CD14* και HEΩΚ

Το γονίδιο *CD14* (LOC929) εδράζεται στη χρωμοσωματική περιοχή 5q31.1 (**Εικόνα 4.2**), αποτελείται από τρία εξόνια και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 40 kDa με 375 αμινοξέα η οποία εκφράζεται κατά κύριο λόγο σε υψηλά επίπεδα στο ήπαρ. Υπάρχει σε δύο μορφές, την *mCD14* που βρίσκεται πάνω στη μεμβράνη και την *sCD14* που είναι διαλυτή –εκκρινόμενη και αποκόπτεται.

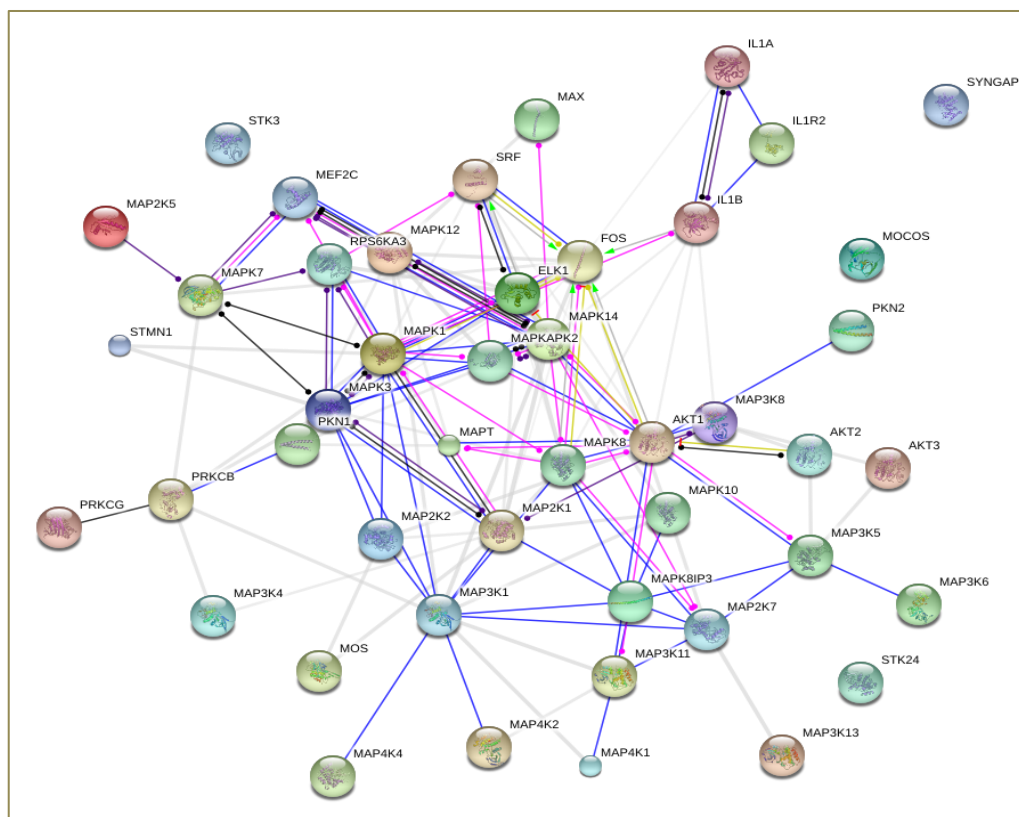


Εικόνα 4.2: Απεικόνιση του γενετικού τόπου 5q.31 του γονιδίου *CD14* (<http://ghr.nlm.nih.gov>).

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο είναι ένα αντιγόνο επιφανείας το οποίο εκφράζεται κυρίως από τα μονοκύτταρα/μακροφάγα. Σε συνδυασμό με άλλες πρωτεΐνες συμμετέχει στην πρώτη γραμμή άμυνας, τη φυσική ανοσιακή απάντηση (**Εικόνα 4.3**). Το εναλλακτικό μάτισμα

μπορεί να δώσει πολλαπλές παραλλαγές που όμως να κωδικοποιούν για την ίδια πρωτεΐνη. Το *CD14* για να ενεργοποιηθεί απαιτεί την ύπαρξη του πρωτεϊνικού συμπλόκου *CD14-TLR4-MD2*, σύμπλοκο το οποίο σχετίζεται με το μονοπάτι της ανοσιακής απάντησης και το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK (**Εικόνα 4.4**). Ο προφλεγμονώδης μηχανισμός αναγνώρισης μιας απειλής ξεκινά με την αναγνώριση του πολυσακχαρίτη LPS, ο οποίος παράγεται από τα Gram(-) βακτήρια και αποτελεί τον κύριο συνδέτη του *CD14*. Για να επιτευχθεί η αναγνώριση του LPS απαιτείται η παρουσία του λιποπολυσακχαρίτη LBP και παρόλο που ο LPS θεωρείται ο κύριος, εάν απουσιάζει το *CD14* μπορεί να αναγνωρίσει και άλλα μόρια ως PAMPs.

Εικόνα 4.3: Δίκτυο αλληλεπίδραση της ανοσιακής απάντησης (www.genecards.org).



Εικόνα 4.4: Δίκτυο αλληλεπίδρασης σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK (www.genecards.org).

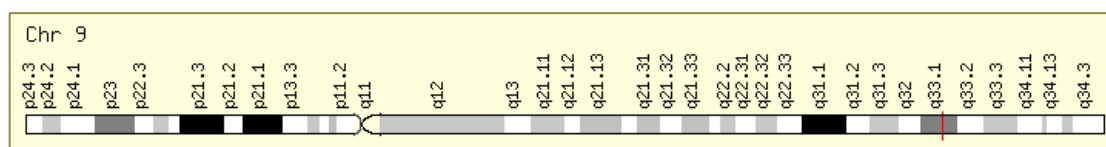
Οι έως τώρα γενετικές μελέτες είχαν εστιάσει στη μελέτη γονιδίων τα οποία σχετίζονταν με την κληρονόμηση άλλων οφθαλμολογικών ασθενειών και γονιδίων που εμπλέκονται στην ανοσιακή απάντηση μέσω του συστήματος του συμπληρώματος. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων γονιδίων τα οποία έχουν συσχετιστεί με την ΗΕΩΚ αναφέρονται στον **Πίνακα 4.2**. Παρότι υπάρχουν και άλλα γονίδια τα οποία μπορεί να εμπλέκονται στην ανοσιακή απάντηση, στο μεταβολισμό των λιπιδίων ή στο εξωκυτταροπλασματικό δίκτυο είτε δεν έχουν μελετηθεί είτε δεν έχει αποδειχτεί η εμπλοκή τους στην ανάπτυξη της ασθένειας.

Το γονίδιο *CD14*, όπως προαναφέρθηκε, κατέχει βασικό ρόλο στην ανοσιακή απάντηση, αφού ενεργοποιεί την προφλεγμονώδη απόκριση του οργανισμού γι' αυτό και πλήθος μελετών έχει συνδέσει το συγκεκριμένο γονίδιο με καρδιαγγειακές νόσους, και πιο συγκεκριμένα με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αθηροσκλήρωσης και στεφανιαίας νόσου [153]. Ο πολυμορφισμός που έχει μελετηθεί είναι ένας λειτουργικός πολυμορφισμός, ο C(-260T)/ rs2569190 που εντοπίζεται στην περιοχή του υποκινητή και έχει φανεί ότι επηρεάζει την προφλεγμονώδη απόκριση στα

ανθρώπινα λευκοκύτταρα. Η αλλαγή αφορά την αντικατάσταση μιας θυμίνης από μια κυτοσίνη (g.5371 T>C) στη θέση -159 και έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της μεταγραφικής ικανότητας του υποκινητή και συνεπώς μπορεί να επηρεάσει θετικά την παραγωγή του sCD14 και τον καταρράκτη της προφλεγμονώδους απόκρισης π.χ του TNF-a.

4.2.3 Το γονίδιο *TLR4* (Toll Like Receptor) και ΗΕΩΚ

Το γονίδιο *TLR4* (LOC 7099) εδράζεται στο χρωμόσωμα 9q33.1 (**Εικόνα 4.5**), αποτελείται από τέσσερα εξώνια και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 96 kDa με 839 αμινοξέα η οποία εκφράζεται στα μακροφάγα και τα Β λεμφοκύτταρα.

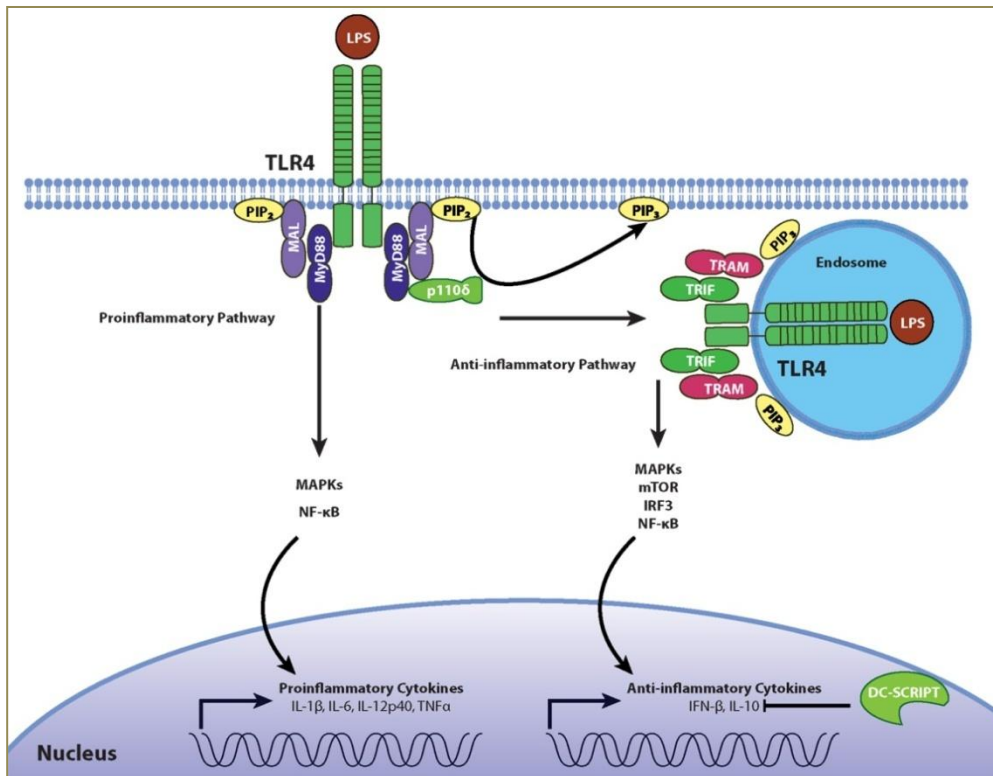


Εικόνα 4.6: Απεικόνιση του γενετικού τόπου 9q.33 του γονιδίου *TLR4*

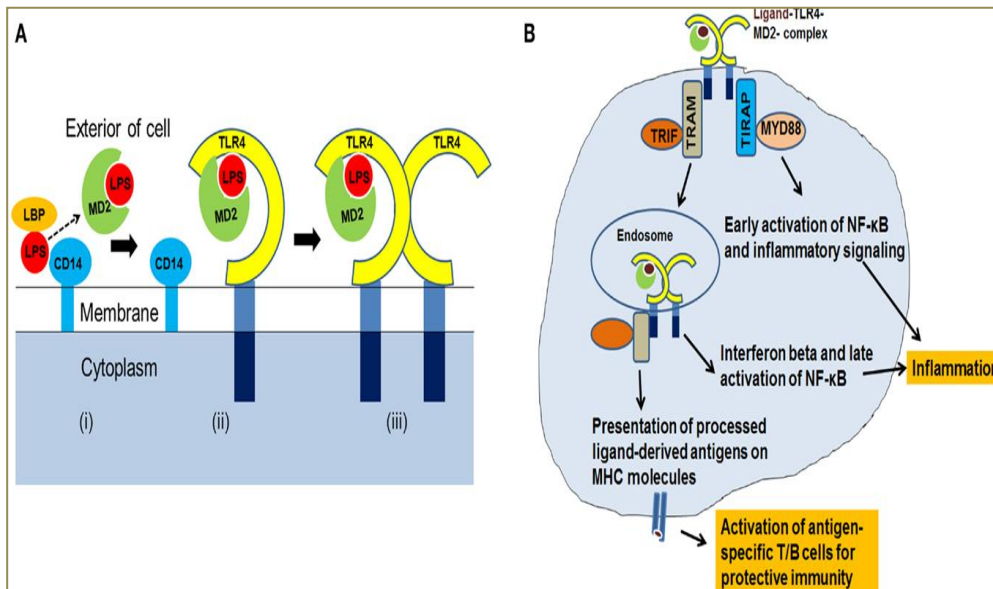
Η κωδικοποιούσα πρωτεΐνη ανήκει στον τύπο I διαμεμβρανικής πρωτεΐνης με μια επαναλαμβανόμενη εξωκυτταρική περιοχή, πλούσια σε λευκίνη, και μια εσωκυτταρική περιοχή ομόλογη με τον υποδοχέα της ανθρώπινης ιντερλευκίνης I. Η πρωτεΐνη που παράγεται από το γονίδιο αυτό παίζει καθοριστικό ρόλο στην αναγνώριση των παθογόνων και τη μετέπειτα ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού. Η οικογένεια των *TLR* υποδοχέων είναι εξαιρετικά συντηρημένη σε όλα τα είδη, από τη μύγα *drosophila* μέχρι τον άνθρωπο, εμφανίζοντας ίδια δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Αναγνωρίζουν ειδικά μοτίβα, τα PAMPs και μεσολαβούν για την παραγωγή κυτοκινών που είναι απαραίτητες για την περαιτέρω ενεργοποίηση της ανοσολογικής απάντησης. Ο συγκεκριμένος *TLR* υποδοχέας παράγει μια ευρέως εκφραζόμενη διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία αναγνωρίζει το LPS από τα Gram αρνητικά βακτήρια και εμπλέκεται στη μεταγωγή σήματος. Η σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων Toll επάγεται από τον υποδοχέα ιντερλευκίνης 1-IL1R μέσω του μονοπατιού του NF-kB. Η ενεργοποίηση ξεκινά με τη δέσμευση του LPS που οδηγεί στον ομοδιμερισμό. Αλληλεπιδρά με το LY96 (lymphocyte antigen), γνωστό ως MD2 μέσω της εξωκυτταρικής περιοχής και ακολούθως αλληλεπιδρά με το MYD88 και το TIRAP μέσω των TIR περιοχών (**Εικόνες 4.6,4.7**). Ο καταρράκτης ενεργοποίησης συνεχίζεται μέσω της

αλληλεπίδρασης με το TICAM2, το NOX4 και το CNPY3 και τη HSP90B1. Η αλληλεπίδραση των δύο τελευταίων μορίων είναι απαραίτητη για να γίνει η αναδίπλωση στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Κατόπιν αλληλεπιδρά με το MLK4 και έτσι επάγεται η αρνητική ρύθμιση του TLR4. Αλληλεπιδρά με το CD36 ύστερα από το ερέθισμα του oxDL και κατ'αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται ένα ετεροδιμερές με τον TLR6. Το σύμπλοκο αυτό εν τέλει πυροδοτεί την ανοσολογική απόκριση μέσω της δράσης της LYN κινάσης που διευκολύνει τον ετεροδιμερισμό του TLR4-TLR6.

Ο βασικός ρόλος που κατέχει στην ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας έδωσε το ερέθισμα σε πολλούς ερευνητές να μελετήσουν διάφορους πολυμορφισμούς οι οποίοι σχετίζονται με ασθένειες που οφείλονται στην απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος. Αρχικά οι πολυμορφισμοί Asp299Gly και Thr399Ile του γονιδίου *TLR4* συνδέθηκαν, όπως και ο πολυμορφισμός C260T του γονιδίου *CD14*, με καρδιαγγειακές ασθένειες [154], όμως από γενετικές μελέτες έχει βρεθεί ότι υπάρχει συσχέτιση με την ασθένεια της ωχράς κηλίδας και οι μεταλλάξεις αυτές στο γονίδιο έχουν συσχετιστεί με διαφορετική ανταπόκριση στον LPS. Ο Zareparsι και οι συνεργάτες [155] εξέτασαν τις παραλλαγές D299G και T399I του *TLR4* ως προς τη συμβολή τους στην ανάπτυξη της HEΩΚ και βρήκαν έναν αυξημένο παράγοντα κινδύνου για τους HEΩΚ ασθενείς που έφεραν το αλληλίο G στον *TLR4* στη θέση 299. Η παραλλαγή αυτή έδειξε έναν προσθετικό παράγοντα κινδύνου σε συνδυασμό με παραλλαγές του *ApoE* και της ATP δεσμευτικής κασέτας μεταφοράς-ABCA1, δυο γονίδια τα οποία συμμετέχουν στην εκροή της χοληστερίνης. Το αλληλόμορφο Gly έχει προστατευτικό ρόλο ενάντια της αθηροσκλήρωσης. Οι αλλαγές για τους πολυμορφισμούς Asp299Gly και Thr399Ile αφορούν μια αντικατάσταση αδερίνης από γουανίνη (g.13843 A>G) και μια αλλαγή κυτοσίνης από θυμίνη (g.14143C>T) αντίστοιχα.



Εικόνα 4.6: Δέσμευση του LPS πολυσακχαρίτη από το ομοδιμερές TLR4-TLR4 και διαχωρισμός της ανοσολογικής ανταπόκρισης σε προ-φλεγμονώδη και αντι-φλεγμονώδη με την αντίστοιχη παραγωγή ιντερλευκινών.

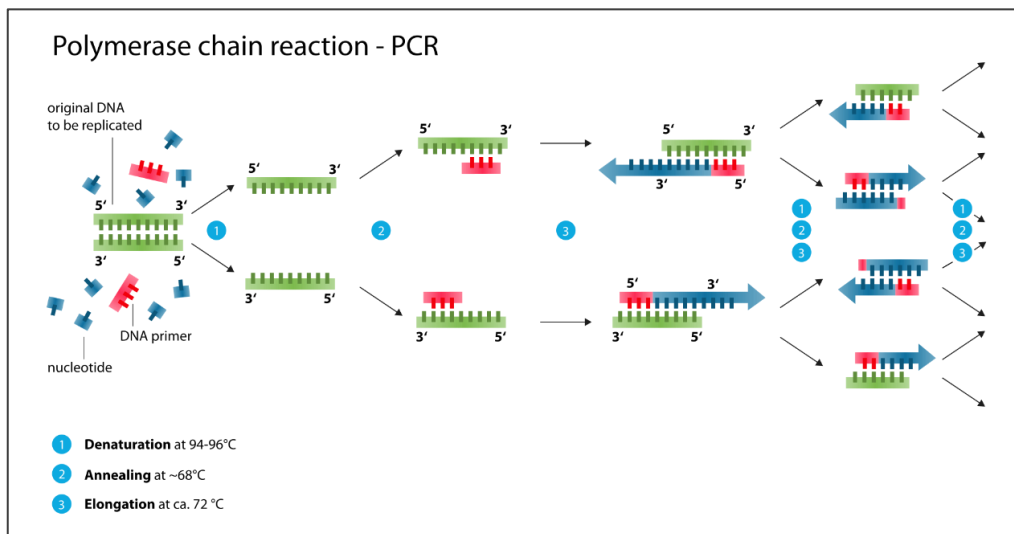


Εικόνα 4.7: Απεικόνιση του συμπλόκου TLR4-MD2-CD14 (A) και η οδός ενεργοποίησης του μονοπατιού του NF-κB (B).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο : Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης πολυμορφισμών

5.1 Τεχνικές ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην αντίδραση της PCR

Η μέθοδος της Αλυσιδωτής αντίδρασης Πολυμεράσης (Συμβατική PCR) είναι μια σχετικά απλή και ταχεία *in vitro* μέθοδος πολλαπλασιασμού, για την ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Το αρχικό υλικό είναι ένα δίκλωνο μόριο DNA. Με την PCR μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, υπό την προϋπόθεση πως είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία ώστε να σχεδιαστούν οι κατάλληλοι εκκινητές (συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μήκους 18-30 βάσεων). Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί, καθορίζουν δηλαδή τα άκρα της περιοχής που θα πολλαπλασιαστεί. Η PCR βασίζεται στον επαναλαμβανόμενο κύκλο τριών απλών διαδοχικών αντιδράσεων οι οποίες διαφέρουν ως προς τη θερμοκρασία και το χρόνο (**Εικόνα 5.1**).



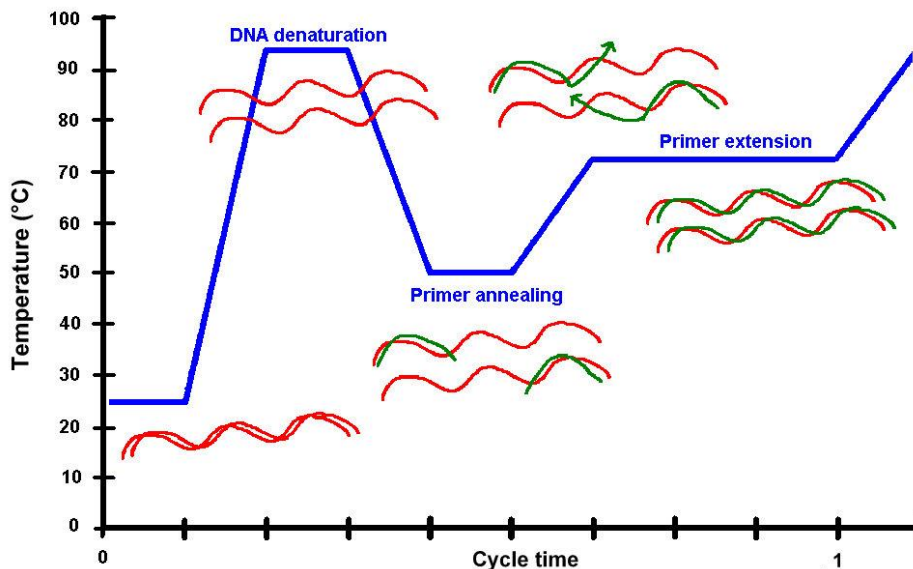
Εικόνα 5.1: Σχηματική αναπαράσταση της PCR στην οποία φαίνεται η ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος DNA (en.wikipedia.org).

Τα στάδια από τα οποία αποτελείται ο κάθε κύκλος είναι τα εξής: 1) αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, 2) υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία στόχο και τέλος 3) σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών με τη βοήθεια του ενζύμου της πολυμεράσης (**Εικόνα 5.2**).

1. **Αποδιάταξη:** Κατά το πρώτο στάδιο οι αλυσίδες αποχωρίζονται με θέρμανση του μίγματος της αντίδρασης (μεταξύ 92° C και 96° C). Η θερμοκρασία διατηρείται συνήθως για ένα περίπου λεπτό.
2. **Υβριδισμός:** Στο δεύτερο στάδιο, του υβριδισμού, η θερμοκρασία του μίγματος κατεβαίνει σταδιακά περίπου στους (50-65° C), με τη θερμοκρασία να ποικίλει ανάλογα με τις ακολουθίες των εκκινητών. Η διαδικασία αυτή γίνεται ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν σχηματίζοντας ζεύγη βάσεων με τις συμπληρωματικές περιοχές του DNA στόχου, έχοντας τα 3'-OH άκρα αντικριστά μεταξύ τους.
3. **Επέκταση:** Στο τρίτο στάδιο, η θερμοκρασία ανεβαίνει περίπου στους 72° C, όπου είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για την καταλυτική δράση της πολυμεράσης. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Για την έναρξη της σύνθεσης όμως, η DNA πολυμεράση απαιτεί την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA.

Στο στάδιο αυτό στο δοχείο αντίδρασης περιέχονται: τα dNTPs, η θερμοανθεκτική πολυμεράση και το ζεύγος εκκινητών σε περίσσεια, ο σχεδιασμός των οποίων αποτελεί το πλέον σημαντικό στάδιο για μια επιτυχή αντίδραση PCR. Οι δυο συνθετικοί νουκλεοτιδικοί εκκινητές (~20 νουκλεοτίδια ο καθένας), πρέπει να είναι συμπληρωματικοί σε αντίθετες πλευρές των δυο αλυσίδων έτσι ώστε να περικλείεται ανάμεσά τους ο DNA στόχος.

Επομένως το σημείο έναρξης της σύνθεσης του DNA μπορεί να καθοριστεί με τη χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδίου εναρκτήριου μορίου (εκκινητή, primer) που συνδέεται με τη μήτρα σε αυτό ακριβώς το σημείο. Έτσι με την κατάλληλη επιλογή εκκινητών μπορούμε να κατευθύνουμε τη DNA πολυμεράση να συνθέσει συγκεκριμένη περιοχή του DNA. Έτσι, η *Taq* πολυμεράση συνθέτει νέες αλυσίδες το μήκος των οποίων περιορίζεται στην αλληλουχία-στόχο και οι οποίες είναι συμπληρωματικές προς τις μητρικές και προεκτείνονται πέρα από τη θέση δέσμευσης του εκκινητή στη νέα αλυσίδα.



Εικόνα 5.2: Σχηματική αναπαράσταση των τριών σταδίων της PCR (biosistemika.com).

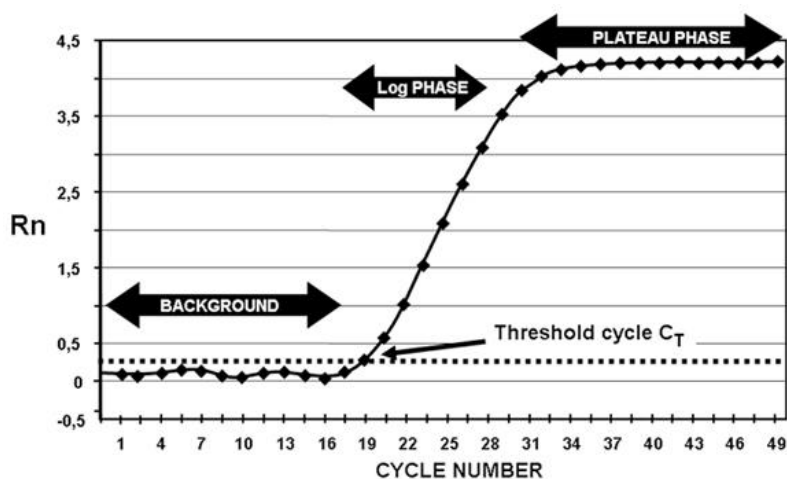
Ο χρόνος επώασης ποικίλει ανάλογα με το μήκος του τμήματος στόχου. Η σύνθεση του DNA αρχίζει στο 3'-OH άκρο κάθε εκκινητή. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται, παράγοντας δίκλωνα τμήματα DNA που είναι όμοια με την αλληλουχία-στόχο. Η ίδια διαδικασία συνεχίζεται με εκθετική ενίσχυση της περιοχής του DNA-στόχου. Μετά από n κύκλους έχουν παραχθεί θεωρητικά 2^n δίκλωνα μόρια DNA [156].

Οι παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη για ένα επιτυχημένο πρωτόκολλο PCR είναι:

- 1) Η αλληλουχία στόχος, δείγματος DNA, που βρίσκεται μεταξύ του ζεύγους των εκκινητών και μπορεί να έχει μήκος 100-35000 bp
- 2) Η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση ώστε να αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αποδιάταξη του DNA
- 3) Η θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών
- 4) Η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου Mg^{2+}
- 5) Η παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος και αντιδραστηρίων που δρουν ενισχυτικά ή ανασταλτικά
- 6) Η συγκέντρωση των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων dNTPs: (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 7) Ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης

Από κινητικής άποψης, μια βασική αντίδραση PCR μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις (**Εικόνα 5.3**):

- **Εκθετική φάση**: Σε κάθε κύκλο συσσωρεύεται διπλασιασμένο προϊόν (υποθέτοντας 100% απόδοση της αντίδρασης). Η αντίδραση είναι πολύ ειδική και ακριβής. Η εκθετική ενίσχυση πραγματοποιείται επειδή όλα τα αντιδραστήρια είναι φρέσκα και διαθέσιμα και η κινητική της αντίδρασης ωθεί την αντίδραση προς το διπλασιασμό των προϊόντων.
- **Γραμμική φάση** (υψηλή μεταβλητότητα): Τα συστατικά της αντίδρασης έχουν αρχίσει να καταναλώνονται, η αντίδραση επιβραδύνεται και τα προϊόντα αρχίζουν να αποικοδομούνται.
- **Φάση κορεσμού - Plateau**: Η αντίδραση έχει σταματήσει, δεν παράγονται άλλα προϊόντα και αν μείνει αρκετό διάστημα σε αυτή τη φάση, τα PCR προϊόντα θα αρχίσουν να αποικοδομούνται. Η φάση κορεσμού είναι το σημείο όπου γίνεται συνήθως η μέτρηση/ανίχνευση της παραδοσιακής PCR, επίσης γνωστή ως ανίχνευση τελικού σημείου (end-point).



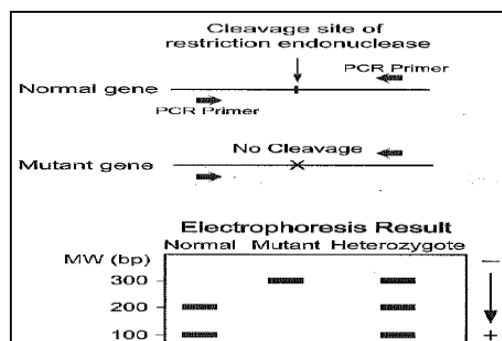
Εικόνα 5.3: Σχηματική απεικόνιση της κινητικής της PCR (www.scielo.org).

5.2 PCR- RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism)

Η μέθοδος PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism) χρησιμοποιείται για τη γονοτύπωση γνωστών σημειακών μεταλλάξεων και βασίζεται στην ιδιότητα των περιοριστικών ενζύμων να πέπτουν το DNA αφού αναγνωρίσουν την ειδική για κάθε ένζυμο αλληλουχία. Αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια:

- 1) την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου με συμβατική PCR (και τον έλεγχο με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης)
- 2) την πέψη των PCR προϊόντων με ειδικό ένζυμο περιορισμού και
- 3) την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης και ανάλυση των ζωνών

Τα περιοριστικά ένζυμα ή περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που πέπτουν το δίκλωνο ή μονόκλωνο DNA σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία αναγνώρισης που ονομάζεται αλληλουχία πέψης (restriction site). Τέτοια ένζυμα ανευρίσκονται σε βακτήρια και αρχαία και θεωρείται ότι συνιστούν αμυντικό μηχανισμό έναντι σε ιούς. Τα ένζυμα αναγνωρίζουν ειδικά το ξένο DNA, φειδόμενα το DNA του βακτηρίου που προστατεύεται μέσω μεθυλίωσης.



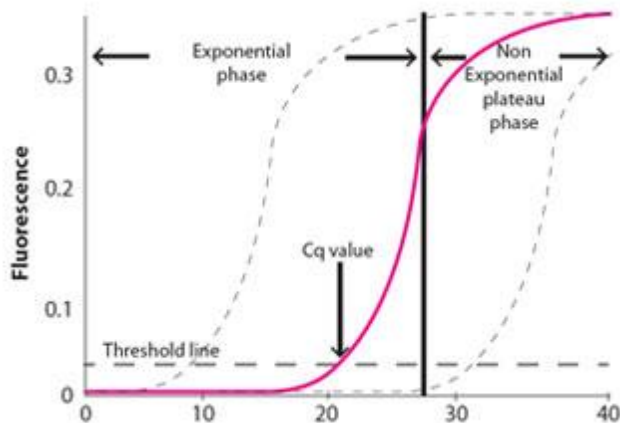
Εικόνα 5.4: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου PCR-RFLP. Το γονίδιο που μελετάται ενισχύεται με κατάλληλους εκκινητές και στη συνέχεια επωάζεται με επιλεγμένη περιοριστική ενδονουκλεάση, η οποία αναγνωρίζει αλληλουχία που περιλαμβάνει την εξεταζόμενη πολυμορφική θέση [157].

Όσον αφορά τη χρησιμοποίηση των ενζύμων αυτών στη διάγνωση γνωστών σημειακών μεταλλάξεων, η διαδικασία έχει ως εξής: Αρχικά, περιοχή του γενετικού τόπου που εμπεριέχει την υπό εξέταση σημειακή μετάλλαξη ενισχύεται με τη μέθοδο PCR. Τα PCR προϊόντα επωάζονται στη συνέχεια με περιοριστικό ένζυμο που αναγνωρίζει τη θέση της μετάλλαξης, οπότε η πέψη του

μορίου του DNA εξαρτάται από την ταυτότητα της νουκλεοτιδικής βάσης που βρίσκεται στη θέση αυτή. Με την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης και το διαχωρισμό τους ανάλογα με το μοριακό τους βάρος προσδιορίζεται εύκολα αν το δείγμα ανήκει σε ομοζυγώτη, ετεροζυγώτη ή φυσιολογικό για τη μετάλλαξη άτομο [157].

5.3 Quantitative PCR (Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου, qPCR)

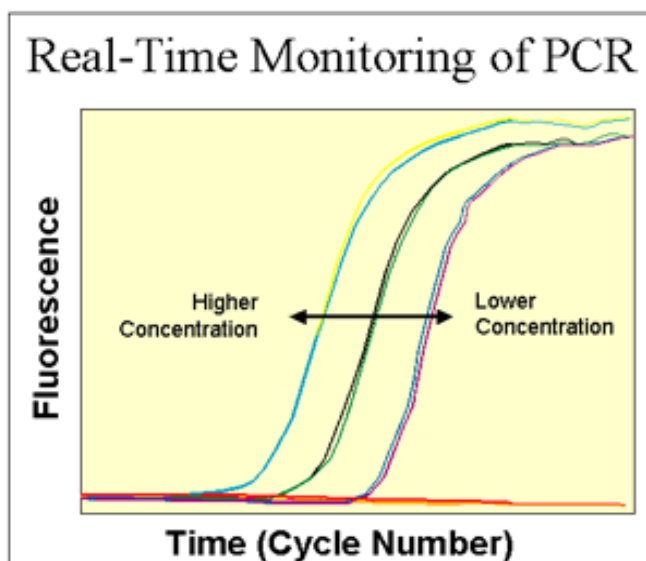
Η ποσοτική PCR είναι μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος, η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών στόχων. Ένα είδος ποσοτικής PCR είναι η πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) [158]. Στη τεχνολογία Real-Time PCR η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Ο φθορισμός που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, αποτελεί το δείκτη παραγωγής αντιγράφων σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (**Εικόνα 5.5**). Το όλο σύστημα βασίζεται στην ανίχνευση και στον ποσοτικό προσδιορισμό μιας φθορίζουσας ουσίας αναφοράς.



Εικόνα 5.5: Σχηματική απεικόνιση της κινητικής της Real-Time PCR στην οποία φαίνεται η φάση θορύβου, η λογαριθμική φάση και η φάση κορεσμού (www.edvotek.com).

Αντίθετα με τη συμβατική PCR δε χρειάζεται περαιτέρω ανάλυση με ηλεκτροφόρηση. Στην PCR τεχνική καθορίζεται η χρονική στιγμή κατά την διάρκεια του κύκλου που για πρώτη φορά θα ανιχνευθεί ενίσχυση του PCR προϊόντος, με αποτέλεσμα να μην απαιτείται η μέτρηση του DNA-στόχου μετά από ένα καθορισμένο αριθμό κύκλων. Αυτό καθορίζεται από τον προσδιορισμό του

αριθμού των κύκλων στον οποίο η ένταση εκπομπής της φθορίζουσας ουσίας υψώνεται πάνω από το θόρυβο του υποβάθρου. Αυτός ο αριθμός των κύκλων αναφέρεται ως C_q (quantification cycle). Το C_q καθορίζεται κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης PCR και είναι αντιστρόφως ανάλογο με τον αριθμό αντιγράφων του DNA-στόχου (**Εικόνα 5.6**). Συνεπώς όσο υψηλότερος είναι ο αριθμός των αρχικών αντιγράφων του DNA-στόχου, τόσο πιο γρήγορα παρατηρείται σημαντική αύξηση του φθορισμού και τόσο χαμηλότερη η τιμή C_q [158]. Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη επίσης για ανάλυση σημειακών πολυμορφισμών (SNPs). Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, όπως: απαιτείται μικρή ποσότητα δείγματος για ανάλυση, μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία, ταυτόχρονη μελέτη μεγάλου αριθμού δειγμάτων, μικρός χρόνος ολοκλήρωσης των αποτελεσμάτων, ικανότητα να παράγει ακριβή δεδομένα και αυτοματοποίηση της μεθόδου.



Εικόνα 5.6: Παρακολούθηση της συγκέντρωσης του DNA στόχου (dna.utah.edu).

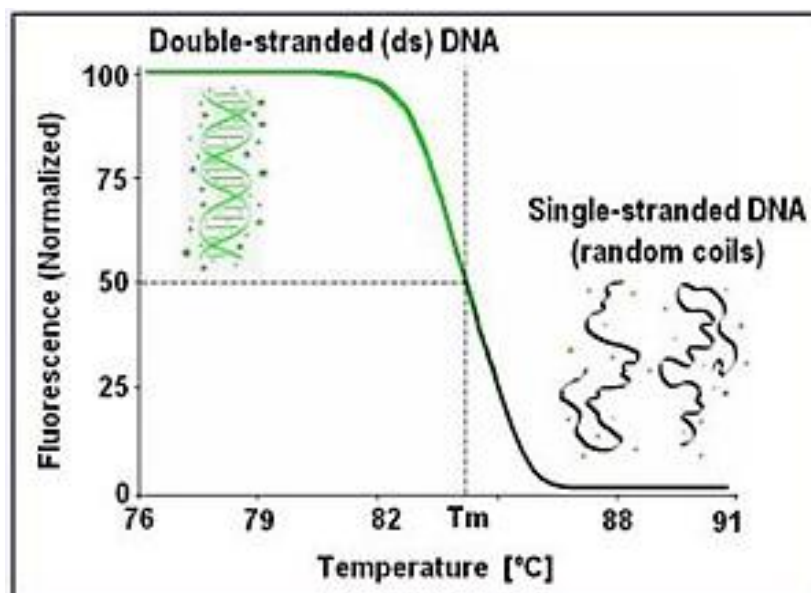
5.4 Υψηλής Διακριτικής ικανότητας Ανάλυση καμπυλών τήξης (High Resolution Melting curve Analysis, HRMA)

5.4.1 Εισαγωγή

Η ανάλυση καμπυλών τήξης των προϊόντων της PCR σε συνδυασμό με PCR πραγματικού χρόνου εισήχθη για πρώτη φορά το 1997 και αποτελεί μια φυσική επέκταση της συνεχούς παρακολούθησης της PCR σε κάθε κύκλο [159]. Η ανάλυση με καμπύλες τήξης είναι μια γρήγορη, απλή οικονομική και μη καταστροφική μέθοδος που χρησιμοποιείται τόσο για την ανίχνευση

γνωστών όσο και για τη σάρωση άγνωστων μεταλλάξεων σε δείγματα και δεν απαιτεί το διαχωρισμό των προϊόντων της PCR σε πηκτές ή στήλες. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην φθορισμομετρική παρακολούθηση και καταγραφή των προϊόντων PCR κατά τη φάση της αποδιάταξης υπό ελεγχόμενη αύξηση της θερμοκρασίας, παρουσία ουσιών που όταν ενσωματώνονται στη διπλή έλικα του DNA φθορίζουν. Η ποιότητα και η ακρίβεια των καμπυλών τήξης φαίνεται ότι είναι άμεσα συνδεδεμένες με την απόδοση, την ειδικότητα και την ευαισθησία της αντίδρασης PCR που προηγείται, καθώς επίσης εξαρτάται από το όργανο και τη φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιείται [160].

Ουσιαστικά η HRMA ανάλυση στηρίζεται σε μια χαρακτηριστική ιδιότητα του γενετικού υλικού, την τήξη. Όταν το DNA θερμαίνεται, η διπλή έλικα αρχίζει να αποδιατάσσεται και το φαινόμενο αυτό αναφέρεται ως τήξη (melting). Έτσι, η θερμοκρασία τήξης (melting temperature, T_m) είναι χαρακτηριστικό μέγεθος για συγκεκριμένη αλληλουχία και ορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία το 50% του γενετικού υλικού χάνει κατά το ήμισυ την ελικοειδή του μορφή ή διαφορετικά γίνεται μονόκλωνο. Το μέγεθος αυτό αποτελεί ένα μέρος της πληροφορίας που λαμβάνουμε τελικά από την ανάλυση των καμπυλών τήξης (**Εικόνα 5.7**) [161]. Οι τιμές των T_m υπολογίζονται μετά τη μαθηματική αφαίρεση του υποβάθρου (background) και την κανονικοποίηση (normalization) της καμπύλης τήξης. Οι διάφορες τιμές των T_m εξαρτώνται από τους παρακάτω παράγοντες: 1) το μήκος της αλυσίδας DNA, 2) την αναλογία του γενετικού υλικού σε βάσεις γουανίνης (G) και κυτοσίνης (C), διότι όσο πιο πλούσιο είναι το μόριο σε γουανίνη και κυτοσίνη, τόσο πιο ψηλή είναι η θερμοκρασία τήξης λόγω των τριών δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ τους, 3) την αλληλουχία και τέλος 4) το βαθμό συμπληρωματικότητας μεταξύ των κλώνων.



Εικόνα 5.7: Καμπύλη HRM στην οποία με πράσινο απεικονίζεται η μετάβαση από τον υψηλό φθορισμό, της αρχικής φάσης με υβριδισμένα μόρια, προς μειωμένο φθορισμό κατά τη φάση της αποδιάταξης. Η μεταβολή οφείλεται στην αποδέσμευση της χρωστικής από το δίκλωνο DNA. Με διακεκομμένη παρουσιάζεται η θερμοκρασία τήξης. Με μαύρο παρουσιάζεται η φάση αποδιάταξης (www.dna.utah.edu).

Πιο αναλυτικά, η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην προσθήκη επισημασμένων ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων - ιχνηθετών ή μορίων που φθορίζουν όταν δεσμεύονται με δίκλωνο DNA, κατά την PCR αντίδραση. Μετά την αντίδραση, λαμβάνεται μια καμπύλη τήξης, η οποία έχει παραχθεί ύστερα από θέρμανση του ενισχυμένου προϊόντος της PCR αντίδρασης παρουσία του ιχνηθέτη ή της χρωστικής. Οι μεταβολές στα σήματα φθορισμού που προκύπτουν, οφείλονται στην αποδιάταξη ή την τήξη των προϊόντων της PCR και στην αποδέσμευση του ιχνηθέτη από το προϊόν της αντίδρασης, με αποτέλεσμα μια σημαντική μείωση της έντασης του φθορισμού.

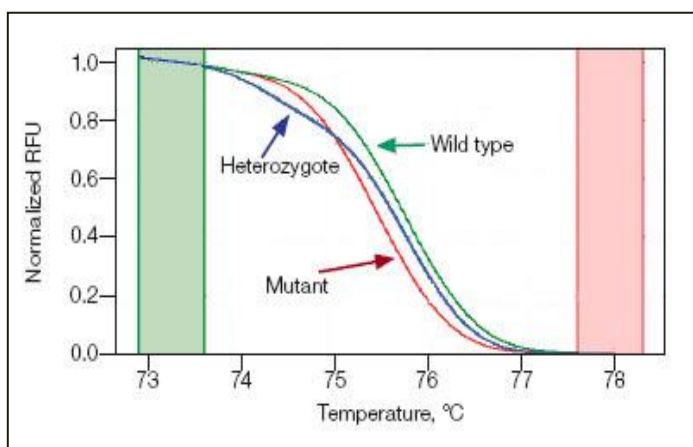
Μερικές από τις φθορίζουσες ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι οι χρωστικές SYBR Green I, LC Green, LC Green Plus, SYTO 9 και Eva Green [160]. Αυτές οι χρωστικές έχουν την ιδιότητα να ενσωματώνονται στο υβριδισμένο (δίκλωνο) DNA και ενόσω το μόριο είναι δίκλωνο φθορίζουν έντονα. Αντίθετα, κατά την αποδιάταξη του μορίου, αποβάλλονται και ο φθορισμός τους μειώνεται σημαντικά. Ο βασικότερος λόγος για τον οποίο η χρήση αυτών των ουσιών αυξάνεται όλο και περισσότερο είναι η απλότητά τους όσον αφορά τη χρήση τους κατά το στάδιο της βελτιστοποίησης των συνθηκών. Συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή απαιτεί δυο εκκινητές (primers), έναν θερμικό κυκλοποιητή PCR και ένα υψηλής ακρίβειας όργανο τήξης. Τα όργανα υψηλής διακριτικής

ικανότητας μπορούν να λαμβάνουν αξιόπιστα σήματα φθορισμού ακόμα και ανά 0,002° C. Έχουν την ικανότητα να ανακτήσουν μέχρι και 50 σημεία σήματος για κάθε βαθμό κελσίου.

Υπάρχουν πολλές παράμετροι που επηρεάζουν την υψηλή ευκρίνεια ενός οργάνου, καθορίζοντας έτσι την ορθότητα και την ακρίβεια του, οι οποίοι είναι η θερμική ομοιογένεια, ο θερμοκρασιακός έλεγχος, η ανάκτηση δεδομένων θερμοκρασίας και φθορισμού, η πυκνότητα δεδομένων (σημεία / ° C), η ένταση σήματος, η ένταση θορύβου, ο ρυθμός τήξης, ο χρόνος ολοκλήρωσης και η μετατροπή του σήματος από αναλογικό σε ψηφιακό, των δυαδικών ψηφίων [162, 163].

5.4.2 Επεξεργασία Σήματος

Η ανάλυση τήξεως εκμεταλλεύεται τις αλλαγές που προκύπτουν στην καμπύλη τήξεως. Η διαφοροποίηση μπορεί να προκύψει με δύο τρόπους: α) αλλαγές στο σχήμα της καμπύλης τήξης και β) διαφορά στο σημείο τήξης T_m . Για τη διαφοροποίηση αυτή τα μόρια DNA χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Όταν ένα μόριο δίκλωνου DNA είναι πλήρως συμπληρωματικό ως προς τις βάσεις των δύο κλώνων του, ονομάζεται ομόδιπλο, ενώ όταν δύο υβριδισμένοι κλώνοι αλληλόμορφοι, δεν είναι πλήρως συμπληρωματικοί, αλλά σχηματίζουν ένα δίκλωνο μόριο διαφέροντας μεταξύ τους σε μια ή περισσότερες βάσεις, τότε το δίκλωνο αυτό μόριο ονομάζεται ετερόδιπλο. Η HRMA παρέχει την δυνατότητα διαχωρισμού μεταξύ ομόζυγων και ετερόζυγων δειγμάτων, καθώς και τη διαφοροποίηση μεταξύ ομάδας ομόζυγων και ομάδας ετερόζυγων δειγμάτων (**Εικόνα 5.8**) [164].



Εικόνα 5.8: Σχηματική απεικόνιση μιας χαρακτηριστικής καμπύλης HRMA. Με πράσινο παρουσιάζεται ο ομόζυγος φυσιολογικός, με μπλε ο ετεροζυγώτης και με κόκκινο ο ομόζυγος μεταλλαγμένος (www.bio-rad.com).

Μια μετάλλαξη στην ομόζυγη αλληλουχία αλλάζει τη θερμοκρασία τήξης του δίκλωνου μορίου. Όπου εντοπίζεται μια ανταλλαγή ζευγών βάσεων μεταξύ γουανίνης-κυτοσίνης και αδενίνης-θυμίνης, παρατηρείται μια σχετικά μεγάλη αλλαγή στην T_m περίπου $0,8-1,4^\circ \text{C}$. Εάν ωστόσο οι βάσεις ανταλλάξουν σκέλη χωρίς να μεταβληθεί το ζεύγος βάσεων, η αλλαγή στη θερμοκρασία είναι μικρότερη και καθίσταται μη ανιχνεύσιμη, από την άλλη, ετερόζυγο δείγμα σχηματίζει τέσσερα ετερόδιπλα δίκλωνα προϊόντα DNA που οφείλονται στην ενίσχυση δύο διαφορετικών αλληλίων κατά την διάρκεια της PCR και η παρατηρούμενη σύνθετη καμπύλη τήξης αποτελείται από τέσσερις διαφορετικές καμπύλες. Η συνεισφορά των σχετικά ασταθών ετερόδιπλων αλλάζει το σχήμα της ετερόζυγης καμπύλης τήξης [164].

Η διαφορά μεταξύ των καμπυλών τήξης δεν είναι πάντοτε διακριτή. Έτσι για να επιτευχθεί ένα καλύτερο αποτέλεσμα απαιτείται η επεξεργασία των αποτελεσμάτων, η οποία αποτελείται από διάφορες διαδικασίες όπως:

- **Κανονικοποίηση (normalization)** των καμπυλών τήξης, θέτοντας το μέγιστο φθορισμό ως 100% και τον ελάχιστο ως 0% σε κάθε καμπύλη
- **Καμπύλες θερμοκρασιακής μετατόπισης (temperature shifted / temperature overlay curves)** οδηγώντας τις κανονικοποιημένες καμπύλες σε χαμηλού ποσοστού φθορισμό. Η θερμοκρασιακή μετατόπιση αποδίδει μια νέα σειρά καμπυλών με σκοπό την καλύτερη διάκριση και σύγκριση των ετεροζυγωτών και ομοζυγωτών μεταξύ τους. Συνηθίζεται η επιλογή μετατόπισης να είναι σε περιοχή μέχρι 5% του φθορισμού, αναπόφευκτα όμως σε όργανα χαμηλότερης ποιότητας δεδομένων χρειάζεται μια περιοχή μέχρι 20%. Ωστόσο, τίποτα δεν απαγορεύει η μετατόπιση να γίνει σε υψηλότερα επίπεδα φθορισμού για την καλύτερη διάκριση των προϊόντων
- **Κατασκευή της καμπύλης πρώτης παραγώγου** του λαμβανομένου σήματος φθορισμού [$-dF/dT$]
- **Καμπύλες διαφοράς φθορισμού (fluorescence different curves)** από την wild type καμπύλη, που υπολογίζεται αφαιρώντας από την κάθε ανακτηθείσα καμπύλη, τη μέση τιμή της καμπύλης wild type.

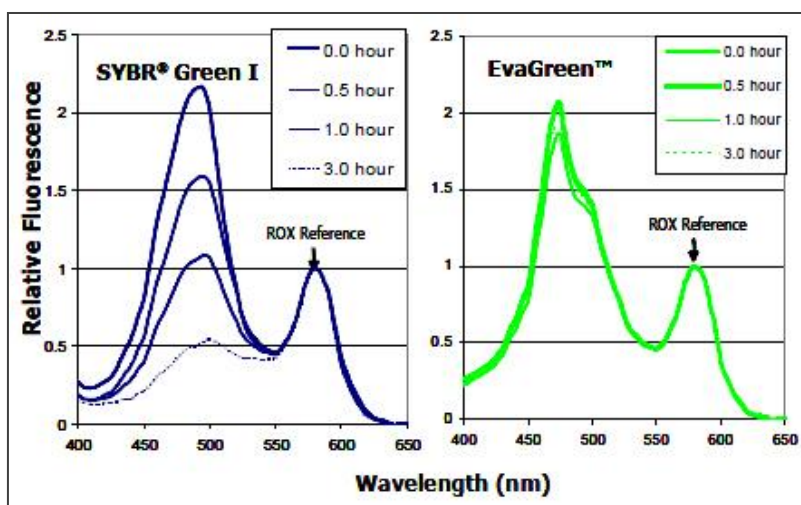
Οι καμπύλες τήξης είναι δυνατό να επηρεαστούν από τους εξής παράγοντες: 1) τη συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος, 2) το pH, 3) την ιονική ισχύ, 4) τις μεταβολές στη συγκέντρωση Mg^{2+} , 5) το είδος της χρωστικής, 6) τη συγκέντρωση της χρωστικής, 7) το ρυθμό θέρμανσης, 8) το ρυθμό

ψύξης του δείγματος, 9) το μήκος του προϊόντος PCR που αναλύεται και 10) το ποσοστό wild type προς το ομόζυγο μεταλλαγμένο στο δείγμα, στη διάκριση των ετεροζυγωτών. Γι' αυτό και κρίνεται απαραίτητη η μελέτη βελτιστοποίησης της κάθε μεθόδου. Η εξέλιξη της τεχνολογίας HRMA και η ενσωμάτωση της στη PCR πραγματικού χρόνου, καθώς και το γεγονός ότι δεν απαιτείται ιδιαίτερος χειρισμός του δείγματος μετά την PCR αντίδραση σε σύγκριση με άλλες τεχνικές ανίχνευσης μεταλλάξεων, έχει βοηθήσει ώστε η ανάλυση καμπυλών τήξης να αποτελεί μέρος πολλών πρωτοκόλλων PCR. Εύκολα προστίθεται στο πρόγραμμα της PCR και ένα τελευταίο στάδιο για τη λήψη καμπυλών. Συνεπώς εύκολα και άμεσα εκτιμάται η ενίσχυση του επιθυμητού προϊόντος κατά την αντίδραση καθώς και η παρουσία παραπροϊόντων.

Η υψηλής διακριτικότητας ανάλυση καμπυλών τήξης είναι μια σχετικά πρόσφατη τεχνική. Η σύγκρισή της με άλλες μεθόδους ανίχνευσης της προσδίδουν υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα, ταχύτητα και χαμηλό κόστος, δεδομένου ότι είναι μια τεχνική κλειστού τύπου (close tube). Λόγω της απλότητας της, η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για να προβλέψει τη θεραπευτική ανταπόκριση στην εξατομικευμένη ιατρική. Η ανίχνευση των ετεροζυγωτών δεν εξαρτάται από τον τύπο της αντικατάστασης των βάσεων, ούτε από τη θέση της μετάλλαξης στο PCR προϊόν. Μικρές ενθέσεις και ελλείψεις ίσως είναι πιο δύσκολο να ανιχνευτούν από τις αντικαταστάσεις. Όσον αφορά την επιλογή των χρωστικών τα καλύτερα αποτελέσματα στην ανίχνευση ετεροζυγωτών επιτυγχάνονται με την LC-Green Plus, τη SYTO 9 και την Eva Green. Η εξάρτηση της ακρίβειας της ανίχνευσης με το μήκος του PCR προϊόντος έχει μελετηθεί και παρουσιάζει αμφίβολα αποτελέσματα σε μήκος μεγαλύτερο από 400 ζεύγη βάσεων.

5.4.3 Επιλογή χρωστικών

Αν και υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός χρωστικών ουσιών, οι SYBR Green I, LC-Green Plus και LC-Green και Eva Green χρησιμοποιούνται ευρέως τόσο στην ανάλυση καμπυλών τήξης όσο και στην παρακολούθηση των προϊόντων σε PCR πραγματικού χρόνου. Ανάμεσα στις δυο LC-Green δεν αναφέρεται κάποια σημαντική διαφορά, παρά μόνον το υψηλότερο σήμα φθορισμού της LC-Green Plus [165]. Η χρωστική της LC-Green παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 440-470 nm και μέγιστη εκπομπή στα 470-520 nm, η SYBR-Green στα 480-510 nm και 510-540 nm, και η Eva Green εμφανίζει διέγερση και εκπομπή κοντά με αυτό της SYBR-Green (**Εικόνα 5.9**).



Εικόνα 5.9: Φάσμα φθορισμού των SYBR Green και της Eva Green [166] .

Η φθορίζουσα χρωστική, που έχει την ικανότητα να προσδένεται στη διπλή έλικα του DNA, εισέρχεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου μορίου και με τη σύνδεσή του σε αυτό αυξάνει το φθορισμό του μέχρι και 100 φορές. Το σήμα του φθορισμού είναι ανάλογο της ποσότητας της χρωστικής που προσδένεται στο δίκλωνο μόριο με αποτέλεσμα να παρέχεται δυνατότητα ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης. Στην περίπτωση της ανάλυσης των καμπυλών τήξης, με την αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου προς μονόκλωνο μειώνεται η ένταση του φθορισμού, την οποία και μπορούμε να μετρήσουμε μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή μπορεί να ξεπεράσει το εμπόδιο του ειδικά επισημασμένου με φθορίζουσα ουσία, ανιχνευτή, καθορίζοντας έτσι την ειδικότητα αποκλειστικά από την αλληλουχία των εκκινητών. Αντίστοιχα, στην παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, μετράται η ένταση του φθορισμού στο τέλος της επέκτασης των εκκινητών κάθε κύκλου PCR. Η έλλειψη ειδικότητας στη δέσμευση στο δίκλωνο DNA των χρωστικών αυτών, αποτελεί μειονέκτημα και πλεονέκτημα ταυτόχρονα.

Μειονέκτημα διότι τα διμερή των εκκινητών και των μη ειδικών προϊόντων ανιχνεύονται με τις χρωστικές αυτές, αφού η σύνδεσή τους δεν είναι ειδική και πλεονέκτημα διότι δεν απαιτούνται εξειδικευμένα μόρια ή ολιγονουκλεοτίδια για την επισήμανση του παραγόμενου δίκλωνου προϊόντος. Παρόλα αυτά, το εμπόδιο της παρουσίας των διμερών μπορεί να επιλυθεί με την κατάλληλη βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR και επιλογή εκκινητών ώστε τα διμερή να αποδιαταχθούν σε σημαντικά χαμηλότερη θερμοκρασία, χωρίς να παρεμποδιστεί η ανάλυση.

Κανάλι	Διέγερση (nm)	Ανίχνευση (nm)	Παραδείγματα φθορισμών που ανιχνεύθηκαν
Μπλε	365±20	460±20	Marina Blue®, Edans Bothell Blue, Alexa Fluor® 350, AMCA-X, ATTO 390
Πράσινο	470±10	510±5	FAM®, SYBR® Green I, Fluorescein, EvaGreen®, Alexa Fluor 488
Κίτρινο	530±5	557±5	JOE™, VIC®, HEX, TET™, CAL Fluor® Gold 540, Yakima Yellow®
Πορτοκαλί	585±5	610±5	ROX™, CAL Fluor Red 610, Cy®3.5, Texas Red®, Alexa Fluor 568
Κόκκινο	625±10	660±10	Cy5, Quasar® 670, LightCycler® Red640, Alexa Fluor 633
Βυσσινί	680±5	712 high pass	Quasar 705, LightCycler Red705, Alexa Fluor 680
Υψηλής διακριτικής ικανότητας καμπύλη τήξης (HRM)	460±20	510±5	SYBR Green I, SYTO®9, LC Green®, LC Green Plus+, EvaGreen

Εικόνα 5.10: Διαθέσιμα κανάλια του θερμικού κυκλοποιητή Rotor-Gene Q (www.qiagen.com).

Έχει όμως παρατηρηθεί ότι η SYBR Green I δεν παρέχει έναν διακριτό χαρακτηρισμό των αλληλουχιών που έχουν ενισχυθεί, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται ο διαχωρισμός των ετεροδιπλων και ομοδιπλων αλληλουχιών. Η πιθανότερη εξήγηση σε αυτό είναι ότι κατά την διάρκεια της τήξης η SYBR Green I αποδεσμεύεται από χαμηλού σημείου τήξης δίκλωνες περιοχές για να δεσμευτεί με υψηλότερου σημείου τήξης περιοχές, αλλά και από μονόκλωνο DNA σε δίκλωνο που δεν έχει πλήρως αποδιαταχθεί. Έτσι αλλοιώνεται η καταγραφή της πραγματικής πορείας της μετάβασης. Ως αποτέλεσμα η SYBR Green I αδυνατεί να δώσει υψηλό σήμα σε δίκλιωνα μόρια DNA που τήκονται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Έτσι δεν μπορεί να χαρακτηριστεί η καμπύλη τήξης με βάση τα πραγματικά δεδομένα της θερμικής τους σταθερότητας, επομένως δε θα είναι εμφανής η οποιαδήποτε σταδιακή αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου που θα μπορούσε να χαρακτηρίσει την καμπύλη αυτή. Η Eva Green είναι μια χρωστική η οποία εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 500 nm και μέγιστη εκπομπή στα 530 nm και είναι συμβατή με όργανα τα οποία διαθέτουν λέιζερ αργού με μήκος κύματος στα 488 nm ή με οποιοδήποτε όργανο που να εμφανίζει διέγερση σε μήκη κύματος κοντά σ' αυτό. Πρόκειται για μια εξαιρετικά σταθερή χρωστική τόσο θερμικά όσο και υδρολυτικά, προσφέροντας ευκολία κατά το χειρισμό της. Η χρωστική αυτή καθ' αυτή χαρακτηρίζεται ως μη φθορίζουσα, αλλά όταν δεσμευτεί σε δίκλωνο DNA (dsDNA) μετατρέπεται

σε φθορίζουσα. Σε αντίθεση με τη SYBR Green, που εισέρχεται στα κύτταρα και είναι γνωστή ως ενισχυτής μετάλλαξης, η Eva Green είναι μη μεταλλαξιογόνος και μη κυτταροτοξική, καθώς είναι αδιαπέραστη στις κυτταρικές μεμβράνες. Οι μοναδικές ιδιότητες της Eva Green την καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμη σε εφαρμογές Real-Time PCR, καθώς δεν δρα ανασταλτικά και δεν παρουσιάζει μη ειδική ενίσχυση. Ως εκ τούτου η χρωστική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τη SYBR Green I επιτυγχάνοντας έτσι καλύτερο και πιο ισχυρό σήμα στην PCR, καθώς επίσης θεωρείται ιδανική για περιοχές που εμφανίζουν υψηλά ποσοστά σε CG και AT νουκλεοτίδια.

Οι φθορίζουσες χρωστικές τρίτης γενιάς δεν έχουν ιδιαίτερα ανασταλτική δράση στη PCR, γεγονός που δηλώνει ότι η υψηλότερη συγκέντρωση της χρωστικής ουσίας δεν αποτελεί εμπόδιο. Η υψηλότερη συγκέντρωση των χρωστικών ουσιών αυξάνει τα επίπεδα κορεσμού του δίκλωνου μορίου με τα μόρια των χρωστικών. Ο κορεσμός φαίνεται να μειώνει τα φαινόμενα ανακατανομής χρωστικών ουσιών κατά την διάρκεια της αποδιάταξης του DNA, αυξάνοντας τη διακριτικότητα της ανάλυσης καμπυλών τήξης.

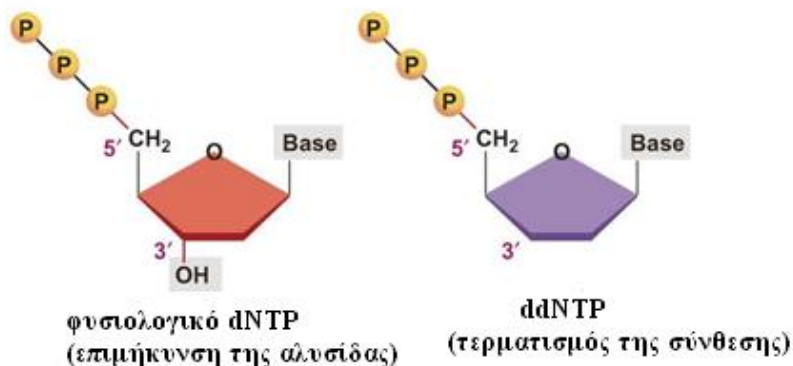
5.5 DNA sequencing

Με τον όρο DNA sequencing έχει καθιερωθεί η τεχνική προσδιορισμού της αλληλουχίας των βάσεων δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων (DNA) και γενικότερα των νουκλεϊκών οξέων. Ένας σημαντικός σταθμός στην ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων ήταν το 1977 όταν οι Maxam & Gilbert περιέγραψαν μια μέθοδο ανάλυσης της αλληλουχίας του DNA με χημική αποικοδόμηση των βάσεων. Αργότερα το ίδιο έτος προτάθηκε από τον Sanger και τους συνεργάτες του μια ενζυμική μέθοδος για την ανάγνωση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων.

5.5.1 Η ενζυμική μέθοδος κατά Sanger.

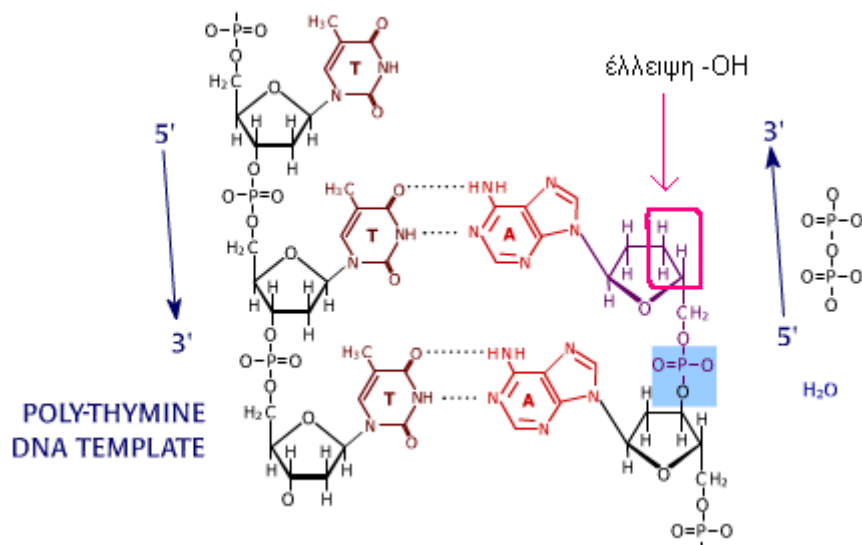
Η ενζυμική μέθοδος κατά Sanger ή η μέθοδος των διδεοξυ αντιδράσεων βασίστηκε σε προηγούμενη εργασία του Arthur Kornberg (<http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/sangerseq.html>) στην αντιγραφή του DNA καθώς και στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης να χρησιμοποιεί εκτός των τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) και τα 2',3'-τριφωσφορικά διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) σαν υποστρώματα. Κατά την διαδικασία αντιγραφής του DNA το άτομο άνθρακα στο 5' άκρο του εισερχόμενου δεοξυνουκλεοτιδίου (dNTP) ενώνεται με το άτομο άνθρακα στο 3' άκρο στο τέλος της αλυσίδας (www.dnalc.org/ddnalc/resources/sangerseq.html). Οι ομάδες υδροξυλίου σε κάθε θέση σχηματίζουν εστερικούς δεσμούς με ένα κεντρικό άτομο φωσφόρου και η αλυσίδα

επιμηκύνεται. Το «κλειδί» στη μέθοδο του Sanger είναι η ιδιαίτερη χημεία των διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTP). Όπως γίνεται με ένα δεοξυνουκλεοτίδιο, έτσι και ένα ddNTP ενσωματώνεται στην αλυσίδα σχηματίζοντας έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό στο 5' άκρο. Ωστόσο το ddNTP δεν έχει ομάδα υδροξυλίου (OH) στη θέση 3' που είναι απαραίτητη για τη δημιουργία δεσμού με ένα εισερχόμενο νουκλεοτίδιο. Έτσι η προσθήκη ενός ddNTP σταματά την επιμήκυνση της αλυσίδας [167].



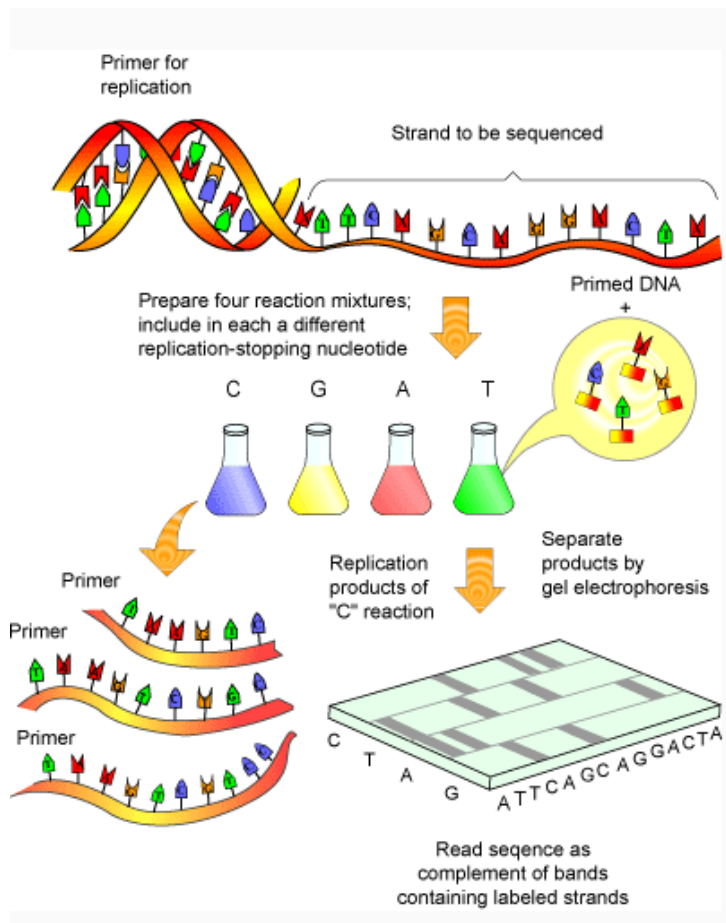
Εικόνα 5. 11: Δομή dNTP και ddNTP

(http://campus.queens.edu/faculty/jannr/Genetics/images/dnatech/FG12_12aDideoxy.JPG).



Εικόνα 5.12: Προσθήκη ενός ddNTP σταματά την επιμήκυνση της αλυσίδας.

Για την αντίδραση του προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA, ένας ολιγονουκλεοτιδικός φορέας- εκκινητής υβριδίζεται στον 3'- 5' κλάδο του προς προσδιορισμό DNA και με τη βοήθεια του ενζύμου DNA Πολυμεράση επεκτείνεται σε κατεύθυνση 5'- 3', συμπληρωματικά στον αντιγραφόμενο κλάδο με την ανάπτυξη φωσφοδιεστερικών δεσμών ανάμεσα στο 3' άκρο του εκκινητή και το 5' άκρο του προστιθέμενου νουκλεοτιδίου που δρα ως δομικός λίθος. Εκτελούνται ταυτόχρονα τέσσερις αντιδράσεις, στις οποίες το ένα είδος από τα τέσσερα χρησιμοποιούμενα dNTPs είναι ραδιοεπισημασμένο (συνήθως με ³⁵S). Επίσης, κάθε μία από τις τέσσερις αντιδράσεις φέρει εκτός των τεσσάρων dNTPs και ένα από τα τέσσερα ddNTPs το οποίο εξ' αιτίας της έλλειψης 3' υδροξυλομάδας τερματίζει την αντίδραση νουκλεϊκής σύνθεσης όπως προαναφέρθηκε και χαρακτηρίζει την τελευταία βάση αυτού του κομματιού. Το συγκεκριμένο ddNTP είναι και αυτό που δίνει το όνομα της κάθε αντίδρασης. Τελικά, τα σχηματιζόμενα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υψηλής διακριτικής ικανότητας (τα προϊόντα κάθε αντίδρασης σταματούν σε διαδοχικές θέσεις εντός του πηκτώματος ανάλογα με το μοριακό τους βάρος) και η αλληλουχία του DNA μπορεί να διαβαστεί απ' ευθείας από το πήκτωμα. Είναι πολύ σημαντικό να ρυθμιστεί σωστά η αναλογία dNTP : ddNTP σε κάθε μια από τις τέσσερις αντιδράσεις ώστε η αντίδραση σύνθεσης του συμπληρωματικού κλάδου να τερματίζεται σε ένα από τα ζητούμενα νουκλεοτίδια της κάθε μίας αντίδρασης, δηλαδή, πρέπει να σχηματιστούν όλα τα δυνατά προϊόντα ανά αντίδραση για να είναι σωστός ο προσδιορισμός της ελεγχόμενης αλληλουχίας DNA.



Εικόνα 5.13: Αρχή ενζυμικής μεθόδου DNA sequencing κατά Sanger

(www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006).

5.5.2 Αυτοματοποίηση του DNA Sequencing

Ένα άλλο σημαντικό σταθμό του DNA Sequencing απετέλεσε η ανάπτυξη και η χρήση αυτοματοποιημένων συσκευών (DNA sequencers) για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας νουκλεϊκών οξέων. Έτσι από τις αρχές της δεκαετίας του '90, η χρήση αυτής της τεχνολογίας αυτοματοποιεί:

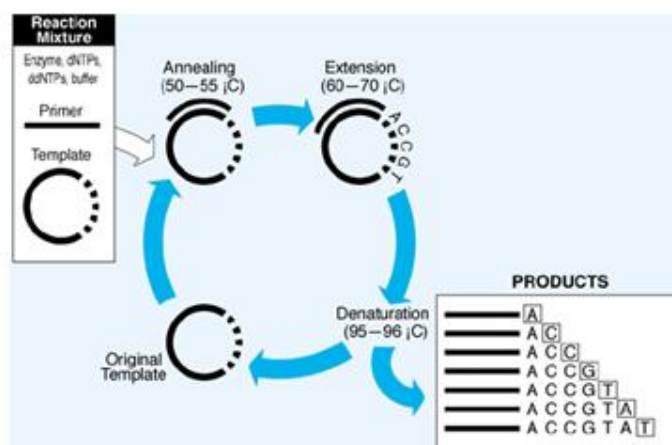
1. Την ηλεκτροφόρηση
2. Την ανίχνευση του σήματος
3. Την ανάγνωση της αλληλουχίας.

Η καινοτομία αυτή οφείλεται στην κατάργηση της ραδιενεργούς σήμανσης και στη χρήση φθορίζουσών ουσιών αντί αυτής. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται αποτελεί τροποποίηση την ενζυμικής μεθόδου του Sanger. Σε αυτή την μέθοδο η επισήμανση γίνεται όπως και πριν, δηλαδή οι φθορίζουσες ουσίες εξακολουθούν να βρίσκονται είτε στους εκκινητές, είτε στα ddNTPs. Ο διαχωρισμός των πολυνουκλεοτιδικών μορίων που παράγονται κατά την ενζυμική σύνθεση, επιτυγχάνεται είτε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, είτε στους πλέον αυτοματοποιημένους sequencers, με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis). Τέλος η ανάγνωση της αλληλουχίας γίνεται μέσω μέτρησης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας φθορισμού, που εκπέμπουν τα επισημασμένα τμήματα DNA κατά την ηλεκτροφόρηση, όταν περνούν από ορισμένο σημείο έπειτα από την διέγερση με κατάλληλη πηγή laser. Το μόνο μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι το αυξημένο κόστος ανάλυσης το οποίο όμως αντισταθμίζεται από τον αυξημένο αριθμό αποτελεσμάτων στον ίδιο χρόνο.

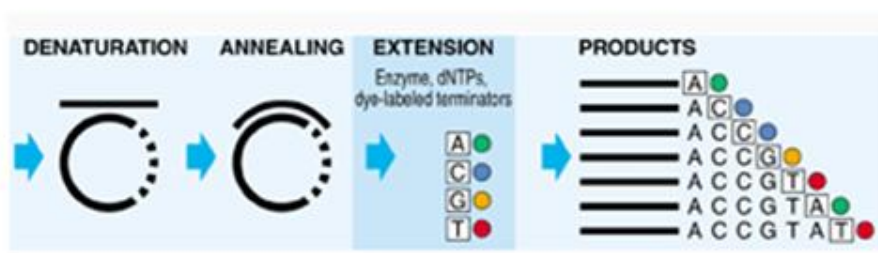
Σε σχέση με την κλασσική μέθοδο αναφοράς από το 1977 έχουν γίνει σημαντικές βελτιώσεις:

1. Έχει επικρατήσει η μέθοδος των θερμικών κύκλων (cycle sequencing). Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο χρησιμοποιείται
 - Taq πολυμεράση
 - Ένας μόνο εκκινητής
 - Διδεόξυ νουκλεοτίδια
 - Και αντίδραση cycle sequencing για 20- 35 κύκλους (ανάλογα με το μέγεθος της αναλυόμενης περιοχής)
2. Υπάρχει πλέον η δυνατότητα είτε να επισημανθούν τα ddNTPs με τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές σε μία μόνο αντίδραση (dye terminators) είτε να επισημανθεί ο εκκινητής με τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες και να γίνουν τέσσερις αντιδράσεις (dye primers).

α.

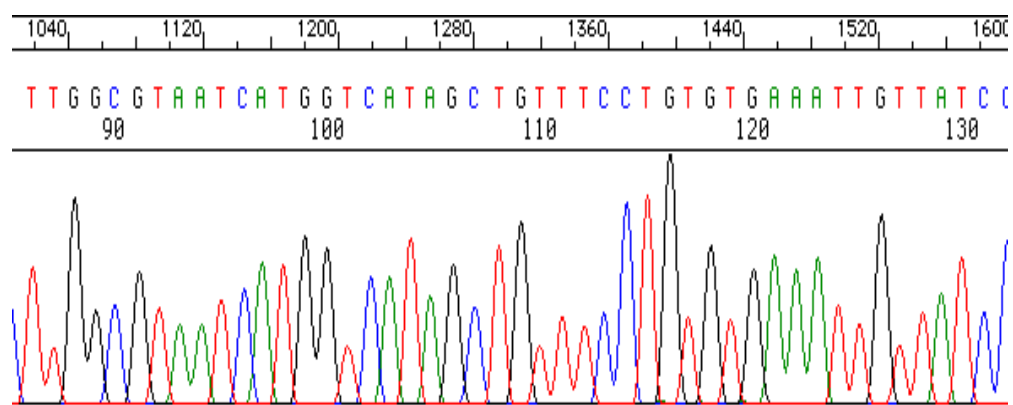


β.



Εικόνα 5.14: Μέθοδος θερμικών κύκλων β. Μέθοδος DNA Sequencing με χρήση Dye Terminators ddNTPs (<http://www3.appliedbiosystems.com/cms>).

3. Αποφεύγεται η χρήση πολυακρυλαμιδίου καθώς πλέον η ηλεκτροφόρηση γίνεται εύκολα και πιο γρήγορα σε ειδικά τριχοειδή στα οποία διοχετεύεται ειδικό πολυμερές το οποίο αναγεννάται μετά το πέρας της ανάλυσης.
4. Εφ' όσον τα φάσματα εκπομπής των τεσσάρων χρωστικών δεν αλληλεπικαλύπτονται τότε μια διάφανη οπή στο τέλος του τριχοειδούς και με το κατάλληλο laser και ανιχνευτή είναι δυνατόν να ανιχνεύονται τα σήματα που προκύπτουν και από τις τέσσερις χρωστικές μέσα σε ένα μόνο πέραςμα στο ίδιο τριχοειδές .



Εικόνα 5.15: Γράφημα από DNA Sequencing.

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός Εργασίας

Η ηλικιακή εκφύλιση ωχράς κηλίδας (HEΩΚ) συνιστά μια κοινή πάθηση στον ελληνικό πληθυσμό με επιπολασμό 2,5% σε άτομα άνω των 65 ετών. Πλήθος μελετών έχουν αναδείξει το γενετικό υπόβαθρο ως την κύρια αιτιοπαθογένεια της νόσου και έχουν εντοπιστεί συγκεκριμένα γονίδια που εμπλέκονται στον παθογενετικό μηχανισμό και το *ARMS2* αποτελεί ένα από τα πλέον καλά μελετημένα γονίδια που έχει συσχετιστεί με την HEΩΚ. Εκτός από τα ήδη εδραιωμένα γονίδια με τα οποία έχει φανεί ότι υπάρχει συσχέτιση με τη νόσο, υπάρχουν και άλλα τα οποία είναι υπό διερεύνηση. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δύο τέτοιες περιπτώσεις νέων γονιδίων (*CD14*, *TLR4* δύο πολυμορφισμοί) καθώς και ενός ήδη συσχετισμένου (*ARMS2*).

Σκοπός της εργασίας ήταν:

A) Η εφαρμογή δημοσιευμένης μεθοδολογίας PCR-RFLP για τη γονοτύπωση του πολυμορφισμού A69S του γονιδίου *ARMS2* σε κλινικά δείγματα υγιών μαρτύρων και ασθενών που έχουν διαγνωστεί με την εξιδρωματική μορφή της HEΩΚ.

B) Η εφαρμογή μεθοδολογίας PCR-RFLP για τη γονοτύπωση του πολυμορφισμού C260T του γονιδίου *CD14* σε κλινικά δείγματα υγιών μαρτύρων και ασθενών που έχουν διαγνωστεί με την εξιδρωματική μορφή της HEΩΚ. Επιβεβαίωση με τη μέθοδο αναφοράς DNA Sequencing.

Γ) Η εφαρμογή μεθοδολογίας PCR-RFLP για τη γονοτύπωση των πολυμορφισμών Asp299Gly και Thr399Ile του γονιδίου *TLR4* σε κλινικά δείγματα υγιών μαρτύρων και ασθενών που έχουν διαγνωστεί με την εξιδρωματική μορφή της HEΩΚ. Επιβεβαίωση με τη μέθοδο αναφοράς DNA Sequencing.

Δ) Η επιβεβαίωση της συσχέτισης του πολυμορφισμού A69S του γονιδίου *ARMS2* με την εξιδρωματική μορφή της ασθένειας.

Ε) Η αξιολόγηση της συμβολής των προαναφερθέντων πολυμορφισμών C260T, Asp299Iy και Thr399IleH στην προδιάθεση για εκδήλωση της ασθένειας.

ΣΤ) Η ανάπτυξη HRMA μεθοδολογίας για τον πολυμορφισμό Asp299Gly του TLR4 γονιδίου και σύγκριση της με την PCR-RFLP εφαρμοθείσα μέθοδο.

Ζ) Στατιστική ανάλυση των δεδομένων γονοτύπωσης με την ασθένεια και τα κλινικά δεδομένα των ασθενών.

Η ανίχνευση μεταλλάξεων με την HRMA ανάλυση καμπυλών τήξης συνιστά μια εύκολη και οικονομική μέθοδο μαζικής γονοτύπωσης που παρέχει ταχύτητα στην ανίχνευση πολυμορφισμών, γεγονός το οποίο την καθιστά ιδανική για ευρείας κλίμακας κλινική εφαρμογή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο: Υλικά και Μέθοδοι

6.1 Κλινικά Δείγματα

Στη μελέτη εντάχθηκαν 103 υγιείς εθελοντές και 120 Έλληνες ασθενείς με ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας της υγρής μορφής. Τα δείγματα περιφερικού αίματος συνελέγησαν σε σωληνάρια με αντιπηκτικό EDTA στο Γενικό νοσοκομείο Τζάνειο και στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών "Γ. Γεννηματάς" την περίοδο 2010-2011, καθώς και από την Πανεπιστημιακή Οφθαλμολογική Κλινικών των Ιωαννίνων (Δ/ντής Γ. Κίτσος και Αναπλ. Καθηγήτρια Μ. Στεφανιώτου) και συντηρήθηκαν στους -20°C έως την απομόνωση DNA. Όλοι οι συμμετέχοντες, κατόπιν αρχικής ενημέρωσης και ενυπόγραφης συγκατάθεσης, αξιολογήθηκαν από τον υπεύθυνο οφθαλμίατρο Σκαλιδάκη Ιωσήφ (υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Χ. Κουτσανδρέα και της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Μ.Μόσχου). Η εκτίμηση των ασθενών περιλάμβανε μέτρηση οπτικής οξύτητας, μέτρηση της ενδοφθάλμιας πίεσης, βυθοσκοπήση, έλεγχο χειρουργημένου καταρράκτη και συμπλήρωση ερωτηματολογίου αναφορικά με την καταγωγή τους, το οικογενειακό ιστορικό της νόσου, το ατομικό ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου και σακχαρώδη διαβήτη, καθώς και για τις καπνιστικές τους συνήθειες. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τους υγιείς μάρτυρες (clinically relevant controls). Για όλους τους συμμετέχοντες καταγράφηκαν τα δεδομένα που σχετίζονται με το φύλο, την ηλικία, την καταγωγή, το ατομικό ιστορικό (σακχαρώδης διαβήτης, καρδιαγγειακή νόσος) και την παρούσα οφθαλμολογική νόσο (καταρράκτης) όπως αυτά φαίνονται στους ακόλουθους **Πίνακες 6.1,6.2**:

Πίνακας 6.1: Ομάδα υγιών μαρτύρων. Στοιχεία για την ηλικία, το φύλο, την καταγωγή, το σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ), καρδιαγγειακό νόσημα (ΚΝ) {συμπεριλαμβάνεται η στεφανιαία νόσος (ΣΝ) και η αρτηριακή υπέρταση (ΑΥ)}, το κάπνισμα (Κ), το γλαύκωμα (ΓΛ) το και χειρουργημένο καταρράκτη (ΧΚ).

A/A	Όνομα	Ηλικία	Φύλο	Καταγωγή	ΣΔ	ΚΝ	Κ	ΓΛ	ΧΚ
1	Σ.Χ	84	Γ	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
2	Δ.Ε	83	Α	ΠΑΡΟΣ	ΟΧΙ	ΣΝ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
3	Π.Ε	76	Γ	ΑΤΤΙΚΗ	ΝΑΙ	ΑΥ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
4	Τ.Β	75	Γ	ΑΤΤΙΚΗ	ΟΧΙ	ΣΝ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
5	Α.Χ	72	Γ	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΝΑΙ	ΑΥ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ
6	Κ.Σ	82	Α	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΟΧΙ	ΣΝ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ

7	Τ.Μ	73	Α	ΜΗΛΟΣ	ΝΑΙ	ΣΝ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
8	Δ.Σ	73	Γ	ΓΥΘΕΙΟ	ΟΧΙ	ΣΝ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
9	Μ.Α	78	Γ	ΘΗΒΑ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
10	Σ.Κ	81	Α	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΟΧΙ	ΧΚΜ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
11	Π.Ε	75	Γ	ΝΙΚΑΙΑ	ΝΑΙ	ΑΥ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
12	Κ.Χ	81	Γ	ΓΥΘΕΙΟ	ΟΧΙ	ΑΥ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
13	Π.Κ	87	Α	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΝΑΙ	ΑΥ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
14	Π.Χ	76	Γ	ΔΡΑΜΑ	ΟΧΙ	ΚΑ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
15	Π.Γ	78	Γ	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ
16	Κ.Α	81	Γ	Β.ΗΠΕΙΡΟΣ	ΝΑΙ	ΑΥ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
17	Δ.Ι	72	Α	ΤΡΙΠΟΛΗ	ΟΧΙ	ΣΝ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
18	Π.Δ	87	Α	ΣΑΛΑΜΙΝΑ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
19	Π.Π	86	Γ	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
20	Σ.Μ	85	Γ	ΣΑΛΑΜΙΝΑ	ΟΧΙ	ΣΝ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
21	Κ.Α	67	Α	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΟΧΙ	ΣΝ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
22	Κ.Α	72	Α	ΞΑΝΘΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
23	Σ.Α	88	Γ	ΔΟΜΟΚΟΣ	ΟΧΙ	ΣΝ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
24	Α.Α	74	Γ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
25	Κ.Σ	73	Γ	ΚΑΒΑΛΑ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
26	Δ.Ζ	77	Γ	ΣΑΛΑΜΙΝΑ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
27	Ψ.Π	84	Α	ΚΥΚΛΑΔΕΣ	ΝΑΙ	ΑΥ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
28	Τ.Γ	83	Γ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	ΟΧΙ	ΑΥ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
29	Κ.Ε	77	Γ	ΚΕΦΑΛΛΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
30	Σ.Α	88	Γ	ΚΕΦΑΛΛΟΝΙΑ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ
31	Δ.Γ	79	Α	ΚΕΦΑΛΛΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
32	Μ.Σ	74	Γ	ΣΜΥΡΝΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
33	Σ.Ε	79	Γ	ΚΑΒΑΛΑ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
34	Κ.Σ	71	Γ	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
35	Μ.Κ	81	Α	ΙΟΣ	ΟΧΙ	ΣΝ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
36	Κ.Ι	73	Α	ΠΥΡΓΟΣ ΗΛΕΙΑΣ	ΝΑΙ	ΑΥ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
37	Γ.Ν	84	Α	ΜΕΓΑΛΟΠΟΛΗ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
38	Γ.Ν	88	Γ	ΡΕΘΥΜΝΟ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
39	Κ.Α	70	Α	ΡΕΘΥΜΝΟ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
40	Α.Ν	84	Α	ΡΕΘΥΜΝΟ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ

41	Μ.Δ	84	Α	ΠΕΡΑΙΑΣ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
42	Β.Ε	75	Γ	ΚΥΚΛΑΔΕΣ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
43	Μ.Α	86	Α	ΑΘΗΝΑ	ΟΧΙ	ΑΥ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
44	Π.Μ	76	Γ	ΑΘΗΝΑ	ΟΧΙ	ΣΝ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
45	Λ.Σ	75	Α	ΠΑΤΡΑ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
46	Α.Σ	76	Α	ΡΕΘΥΜΝΟ	ΟΧΙ	ΣΝ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
47	Δ.Α	82	Α	ΚΡΗΤΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
48	Μ.Π	80	Γ	ΑΘΗΝΑ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
49	Μ.Ε	74	Α	ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
50	Μ.Α	80	Γ	ΑΘΗΝΑ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ
51	Σ.Δ	78	Α	ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
52	Θ.Μ	82	Α	ΚΡΗΤΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
53	Τ.Α	82	Γ	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
54	Ν.Β	74	Γ	ΑΘΗΝΑ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
55	Π.Σ	81	Γ	ΡΕΘΥΜΝΟ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
56	Σ.Α	72	Γ	ΑΘΗΝΑ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
57	Τ.Α	78	Γ	ΝΙΚΑΙΑ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
58	Α.Σ	75	Α	ΚΡΗΤΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
59	Μ.Δ	84	Α	ΑΘΗΝΑ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
60	Σ.Ε	75	Α	ΚΑΒΑΛΑ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
61	Θ.Κ	75	Α	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
62	Χ.Α	88	Γ	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ
63	Λ.Μ	76	Α	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
64	Λ.Ν	79	Α	ΚΡΗΤΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
65	Λ.Α	80	Γ	ΚΡΗΤΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ
66	Α.Ν	84	Α	ΑΘΗΝΑ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
67	Μ.Γ	74	Γ	ΚΡΗΤΗ	ΝΑΙ	ΣΝ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
68	Κ.Ε	75	Γ	ΡΟΔΟΣ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
69	Μ.Μ	78	Γ	ΚΡΗΤΗ	ΟΧΙ	ΑΥ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
70	Τ.Δ	76	Γ	ΚΡΗΤΗ	ΟΧΙ	ΑΥ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
71	Β.Σ	74	Α	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
72	Ρ.Α	78	Γ	ΚΑΡΠΑΘΟΣ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
73	Λ.Ι	78	Α	ΡΟΔΟΣ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ
74	Α.Α	75	Γ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
75	Γ.Α	76	Γ	ΡΕΘΥΜΝΟ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ

76	T.E	79	Γ	ΧΑΝΙΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
77	T.Z	88	A	ΑΘΗΝΑ	OXI	OXI	OXI	NAI	NAI
78	N.E	82	Γ	ΡΕΘΥΜΝΟ	NAI	AY	OXI	OXI	NAI
79	Θ.M	78	Γ	ΚΡΗΤΗ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
80	Σ.N	82	A	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	NAI	OXI	NAI	OXI	OXI
81	Σ.Σ	83	Γ	ΣΗΤΕΙΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	NAI
82	Ξ.M	82	Γ	ΑΘΗΝΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	NAI
83	K.I	76	A	ΡΕΘΥΜΝΟ	NAI	ΣΝ	NAI	OXI	OXI
84	Z.Σ	73	Γ	ΡΕΘΥΜΝΟ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
85	P.I	82	A	ΡΕΘΥΜΝΟ	OXI	HA	NAI	NAI	OXI
86	Z.B	88	Γ	ΧΑΝΙΑ	OXI	NA	OXI	OXI	NAI
87	Σ.Θ	74	Γ	ΑΘΗΝΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
88	Π.E	71	Γ	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
89	M.A	76	Γ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	OXI	AY	OXI	OXI	OXI
90	T.Σ	82	A	ΧΑΝΙΑ	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
91	A.M	87	Γ	ΣΠΑΡΤΗ	OXI	OXI	OXI	OXI	NAI
92	B.Σ	74	A	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	OXI	OXI	NAI	OXI	OXI
93	Φ.N	74	A	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	OXI	AY	OXI	OXI	OXI
94	Σ.A	85	Γ	ΡΟΔΟΣ	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
95	N.B	84	Γ	ΚΡΗΤΗ	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
96	Δ.M	77	Γ	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	NAI	OXI	OXI	NAI	OXI
97	Π.X	73	Γ	ΑΘΗΝΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
98	Σ.E	87	Γ	ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	NAI	OXI	OXI	OXI	NAI
99	Χ.M	84	Γ	ΑΓΙΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ	NAI	ΣΝ,AY	NAI	OXI	NAI
100	M.Σ	81	A	ΤΡΙΠΟΛΗ	OXI	OXI	NAI	NAI	OXI
101	Σ.E	80	A	ΡΕΘΥΜΝΟ	OXI	AY	NAI	OXI	OXI
102	M.I	82	A	ΑΘΗΝΑ	OXI	OXI	NAI	OXI	OXI
103	B.Π	76	A	ΧΑΝΙΑ	OXI	AY	OXI	OXI	OXI

Πίνακας 6.2: Ομάδα ασθενών. Στοιχεία για την ηλικία, το φύλο, την καταγωγή, το σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ), καρδιαγγειακό νόσημα (ΚΝ) {συμπεριλαμβάνεται η στεφανιαία νόσος (ΣΝ) και η αρτηριακή υπέρταση. (ΑΥ}}, το κάπνισμα (Κ), το γλαύκωμα (ΓΛ) και το χειρουργημένο καταρράκτη (ΧΚ).

A/A	Όνομα	Ηλικία	Φύλο	ΚΑΤΑΓΩΓΗ	ΣΔ	ΚΝ	Κ	ΓΛ	ΧΚ
1	Μ.Σ	79	Α	ΧΑΝΙΑ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
2	Α.Γ	85	Α	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
3	Κ.Γ	89	Α	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΟΧΙ	ΣΝ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
4	Μ.Α	83	Γ	ΤΡΙΠΟΛΗ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
5	Γ.Γ	72	Α	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
6	Α.Ι	83	Α	ΣΑΝΤΟΡΙΝΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
7	Π.Γ	74	Α	ΣΑΛΑΜΙΝΑ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
8	Β.Μ	85	Α	ΧΙΟΣ	ΟΧΙ	ΑΕΕ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
9	Β.Α	75	Γ	ΛΑΜΙΑ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
10	Κ.Α	82	Α	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	ΟΧΙ	ΣΝ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
11	Α.Ι	86	Α	ΛΑΚΩΝΙΑ	ΟΧΙ	ΣΝ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
12	Μ.Σ	75	Γ	ΧΙΟΣ	ΟΧΙ	ΣΝ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
13	Α.Μ	85	Γ	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
14	Τ.Φ	78	Γ	ΛΑΚΩΝΙΑ	ΝΑΙ	ΑΥ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
15	Α.Α	83	Γ	ΣΗΤΕΙΑ	ΝΑΙ	ΑΥ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
16	Ψ.Ε	64	Γ	ΧΑΝΙΑ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
17	Σ.Α	81	Γ	ΜΥΤΙΛΗΝΗ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
18	Α.Γ	58	Γ	ΕΒΡΟΣ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
19	Κ.Γ	88	Γ	ΣΑΜΟΣ	ΟΧΙ	ΣΝ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
20	Μ.Ι	76	Α	ΣΕΡΙΦΟΣ	ΟΧΙ	ΣΝ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ
21	Ν.Ε	71	Γ	ΧΙΟΣ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
22	Κ.Γ	61	Α	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
23	Μ.Μ	79	Α	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
24	Κ.Μ	74	Α	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
25	Β.Δ	73	Α	ΛΕΥΚΑΔΑ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
26	Γ.Β	85	Γ	ΙΜΒΡΟΣ	ΟΧΙ	ΑΥ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
27	Μ.Α	75	Γ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	ΝΑΙ	ΑΥ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
28	Π.Π	80	Α	ΑΘΗΝΑ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
29	Μ.Κ	85	Α	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
30	Π.Δ	81	Γ	ΛΑΥΡΙΟ	ΝΑΙ	ΑΥ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
31	Τ.Γ	71	Α	ΑΓΡΙΝΙΟ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
32	Γ.Μ	79	Γ	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
33	Π.Ι	72	Α	ΕΥΒΟΙΑ	ΟΧΙ	ΑΥ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
34	Κ.Ε	77	Γ	ΑΘΗΝΑ	ΟΧΙ	ΑΥ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
35	Α.Α	75	Γ	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΟΧΙ	ΑΥ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
36	Δ.Α	61	Γ	ΛΑΜΙΑ	ΟΧΙ	ΣΝ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
37	Π.Γ	67	Α	ΚΟΡΙΝΘΟΣ	ΟΧΙ	ΣΝ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
38	Τ.Ν	70	Α	ΚΕΡΚΥΡΑ	ΟΧΙ	ΑΥ,Σ Ν	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
39	Σ.Χ	70	Α	ΣΑΛΑΜΙΝΑ	ΟΧΙ	ΑΥ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
40	Κ.Σ	70	Α	ΑΘΗΝΑ	ΟΧΙ	ΑΥ,Σ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
41	Π.Ε	69	Γ	ΚΟΖΑΝΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
42	Δ.Ζ	68	Γ	ΑΘΗΝΑ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
43	Δ.Β	75	Γ	ΛΑΡΙΣΑ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
44	Β.Β	81	Α	ΑΘΗΝΑ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
45	Σ.Μ	78	Γ	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
46	Χ.Β	74	Α	ΦΩΚΙΔΑ	ΟΧΙ	ΑΥ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
47	Κ.Ε	79	Γ	ΠΥΡΓΟΣ ΗΛΕΙΑΣ	ΟΧΙ	ΑΥ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ

48	I.E	75	Γ	ΠΕΡΙΣΤΕΡΙ	OXI	OXI	OXI	OXI	NAI
49	Λ.Α	86	Γ	ΗΛΕΙΑ	NAI	AY	OXI	OXI	OXI
50	K.Σ	72	A	ΑΝΔΡΟΣ	OXI	AY	OXI	OXI	OXI
51	Γ.Ε	73	A	ΜΥΚΟΝΟΣ	OXI	AY	NAI	NAI	OXI
52	K.Γ	65	A	ΙΩΑΝΝΙΝΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
53	N	69	Γ	ΙΩΑΝΝΙΝΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
54	M	70	A	ΙΩΑΝΝΙΝΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
55	P.K	73	A	ΑΡΤΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
56	M	76	Γ	ΙΩΑΝΝΙΝΑ	OXI	ΣΝ	OXI	OXI	OXI
57	M.Π	72	A	ΠΡΑΜΑΝΤΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
58	K	81	A	ΠΑΛΕΡΜΟΣ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
59	T.Φ	74	Γ	ΙΩΑΝΝΙΝΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
60	Γ	75	A	ΙΩΑΝΝΙΝΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
61	M.B	75	A	ΗΓΟΥΜΕΝΙΤΣ Α	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
62	Z	73	Γ	ΙΩΑΝΝΙΝΑ	OXI	ΣΝ	OXI	OXI	OXI
63	A.E	69	A	ΚΑΡΥΕΣ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
64	K.T.A	79	Γ	ΚΕΡΚΥΡΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
65	A.N	80	A	ΜΕΛΙΣΣΙΑ	NAI	AY	NAI	OXI	OXI
66	Π.Δ	79	Γ	ΠΑΠΑΔΙΑΝΙΚΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
67	A.Σ	86	A	ΚΑΛΑΒΡΥΤΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
68	T.Γ	72	Γ	ΠΕΤΡΟΥΠΟΛΗ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
69	Z.E	80	A	ΑΘΗΝΑ	NAI	ΣΝ	NAI	OXI	NAI
70	K.O	82	Γ	ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
71	Λ.Γ	69	A	ΑΝΔΡΟΣ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
72	M.Γ	68	A	ΠΕΥΚΗ	OXI	OXI	NAI	OXI	OXI
73	M.Φ	83	Γ	ΠΥΡΓΟΣ	OXI	OXI	NAI	OXI	OXI
74	Γ.B	86	A	ΤΡΙΚΑΛΑ	OXI	ΣΝ	OXI	OXI	OXI
75	M.M	75	Γ	ΡΕΘΥΜΝΟ	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
76	Δ.Ι	81	A	ΑΘΗΝΑ	OXI	OXI	NAI	OXI	OXI
77	N.Σ	86	A	ΑΘΗΝΑ	OXI	NA	OXI	OXI	NAI
78	Γ.X	74	A	ΔΟΜΟΚΟΣ	OXI	ΣΝ	NAI	OXI	NAI
79	Λ.Π	79	A	ΚΑΡΠΕΝΗΣΙ	OXI	AY	NAI	OXI	NAI
80	Λ.Ι	89	A	ΜΟΝΕΜΒΑΣΙΑ	OXI	ΣΝ	OXI	OXI	OXI
81	Z.A	73	Γ	ΚΟΡΙΝΘΙΑ	OXI	ΣΝ	NAI	OXI	OXI
82	T.E	79	A	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	OXI	AY	NAI	OXI	OXI
83	Z.M	67	Γ	ΑΓΡΙΝΙΟ	NAI	AY	NAI	OXI	OXI
84	Π.Γ	80	Γ	ΚΕΡΚΥΡΑ	OXI	ΣΝ	NAI	OXI	OXI
85	K.M	78	Γ	ΜΥΤΙΛΗΝΗ	OXI	AY	NAI	OXI	NAI
86	X.A	73	A	ΚΑΤΕΡΙΝΗ	OXI	OXI	NAI	OXI	OXI
87	Φ.M	72	Γ	ΑΘΗΝΑ	OXI	AY	NAI	OXI	OXI
88	Γ.Ι	66	Γ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
89	Σ.K	80	A	ΑΡΤΑ	OXI	AY	NAI	OXI	OXI
90	Σ.N	81	A	ΠΕΙΡΑΙΑΣ	OXI	OXI	OXI	OXI	NAI
91	Σ.Γ	72	A	ΤΡΙΚΑΛΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	NAI
92	Δ.K	79	A	ΚΩΝ/ΛΗ	OXI	OXI	NAI	OXI	NAI
93	K.X	80	A	ΟΡΩΠΟΣ	OXI	ΣΝ	OXI	OXI	OXI
94	Γ.Σ	57	A	ΗΓΟΥΜΕΝΙΤΣ Α	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
95	T.Π	87	Γ	ΚΑΛΑΜΠΑΚΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
96	X.M	74	Γ	ΙΩΑΝΝΙΝΑ	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI

97	M.Θ	81	A	ΙΩANNINA	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
98	Σ.Ι	82	Γ	ΙΩANNINA	OXI	NAI	NAI	OXI	OXI
99	T.Γ	79	Γ	ΙΩANNINA	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
100	K.K	96	A	ΑΡΤΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
101	P.Ι	57	Γ	ΚΕΡΚΥΡΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
102	Π.Γ							OXI	
103	N.Π	84	Γ	ΤΕΡΟΒΟ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
104	X.K	81	A	ΑΜΠΕΛΩΝΑΣ	OXI	NAI	ΠΑΛΙΟ Σ	OXI	OXI
105	Π.Ε	87	Γ	ΙΩANNINA	NAI	NAI	NAI	OXI	OXI
106	Π.Γ	87	A	ΙΩANNINA	OXI	NAI	OXI	OXI	OXI
107	X.K	77	A	ΦΙΛΙΠΠΙΑΔΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
108	M.E	76	Γ	ΑΡΤΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
109	N.X	68	Γ	ΙΩANNINA	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
110	Π.Μ		A	ΚΑΛΑΜΠΙΑΚΑ	OXI	NAI	OXI	OXI	OXI
111	T.E	86	Γ	ΙΩANNINA	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
112	T.A	82	Γ	ΠΡΕΒΕΖΑ	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
113	M.H	65	A	ΚΑΛΑΜΠΙΑΚΑ	OXI	NAI	NAI	OXI	OXI
114	Γ.Α	80	Γ	ΙΤΕΑ	OXI	NAI	OXI	OXI	OXI
115	K.Ι	70	A	ΑΓΡΙΝΙΟ	OXI	NAI	NAI		OXI
116	K.X	83	A	ΙΩANNINA	OXI	NAI	OXI		OXI
117	P.M	87	A	ΙΩANNINA	OXI	OXI	OXI		OXI
118	T.E		Γ	ΙΩANNINA	OXI	NAI	OXI		OXI
119	K.M	57	A	ΙΩANNINA	OXI	OXI	OXI		OXI
120	K.K	61	Γ	ΠΡΕΒΕΖΑ	OXI	OXI	ΠΑΛΙΟ Σ		OXI

6.2 Απομόνωση Γενωμικού DNA από ολικό αίμα

6.2.1 Εισαγωγή

Η απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του NucleoSpin® Genomic DNA from Tissue kit (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία), το οποίο βασίζεται στην ειδική σύνθεση της μεμβράνης της στήλης που περιέχει οξείδιο του πυριτίου (silica membrane). Η μέθοδος αυτή συνιστά μια απλή και ταχεία διαδικασία που εμπίπτει στις μεθόδους απομόνωσης DNA στερεής φάσης και επιτρέπει την ταυτόχρονη επεξεργασία ικανοποιητικού αριθμού δειγμάτων ολικού αίματος που έχει φυλαχθεί σε αντιπηκτικό με κιτρικά, ηπαρίνη ή και EDTA, καθώς και από ποικιλία ιστών με ταχύτητα και αξιοπιστία ανώτερη των μεθόδων υγρής φάσης.

Το NucleoSpin® Genomic DNA from Tissue kit επιτρέπει την απομόνωση καθαρού DNA με αναλογία A260/A280 1,7 έως 1,9. Το απομονωμένο DNA είναι έτοιμο προς χρήση για εφαρμογές PCR.

6.2.2 Αρχή της μεθόδου

Η απομόνωση DNA από ολικό αίμα με τη χρήση των στηλών φυγοκέντρησης (spin-columns) NucleoSpin® βασίζεται στην ειδική σύνθεση της μεμβράνης της στήλης, η οποία μπορεί να προσδέσει το DNA κατά τρόπο αντιστρεπτό ανάλογα με την ιονική σύνθεση του περιβάλλοντος. Μετά την κυτταρική λύση και αποδόμηση των πρωτεϊνών, το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη αλκοόλης. Κατόπιν το διάλυμα διηθείται δια μέσου της μεμβράνης της στήλης με την εφαρμογή φυγοκέντρησης και το DNA κατακρατείται, ενώ οι πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις διαπερνούν τη στήλη. Το προσδεσμένο DNA εκπλένεται και τέλος εκλούεται με νερό ελεύθερο νουκλεάσης ή με χαμηλής ιονικής ισχύος διάλυμα. Με τον τρόπο αυτό, προκύπτει με ικανοποιητική απόδοση DNA προς χρησιμοποίηση στην PCR ή άλλες ενζυματικές αντιδράσεις.

Αντιδραστήρια / Υλικά

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

Αναλώσιμα / Εξοπλισμός

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

- Συσκευή vortex (Fisher, ΗΠΑ)

Πειραματική Πορεία

1. Στον πυθμένα ενός σωληναρίου erppendorf των 1,5 ml τοποθετείται 25 μl πρωτεΐνης K
2. Προστίθεται 200 μl αποψυχθέντος ολικού αίματος
3. Προστίθεται 200 μl ρυθμιστικό διάλυμα B3 και ακολουθεί έντονη ανάδευση για 10-20sec
4. Επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και ακολουθεί έντονη ανάδευση
5. Επωάζονται τα δείγματα στους 70° C για 10-15 min
6. Προστίθεται 210 μl καθαρή αιθανόλη και αναδεύονται έντονα για 15 sec
7. Για κάθε δείγμα τοποθετείται μια στήλη (παρέχεται από το kit) σε ένα collection tube (παρέχεται από το kit) και προστίθεται το δείγμα
8. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 x g. Εάν τα δείγματα δεν έχουν περάσει επιτυχώς από τη στήλη ξαναγίνεται φυγοκέντρηση, αλλά σε μεγαλύτερες στροφές στα 15.000 x g
9. Απορρίπτεται το υγρό που έχει συλλεχθεί στο collection tube και επανατοποθετείται η στήλη τη σε collection tube
10. 1^η Έκπλυση: Προστίθεται 500 μl ρυθμιστικό διάλυμα BW και φυγοκεντρείται για 1 min στα 11.000 x g. Απορρίπτεται το υγρό και επανατοποθετείται η στήλη σε collection tube
11. 2^η Έκπλυση: Προστίθεται 600 μl ρυθμιστικό διάλυμα B5 στη στήλη και φυγοκεντρείται για 1 min στα 11.000 x g. Απορρίπτεται το υγρό και επανατοποθετείται η στήλη σε collection tube
12. Φυγοκεντρείται για 1 min στα 11.000 x g ώστε να αφαιρεθεί η περίσσεια αιθανόλης
13. Τοποθετείται η στήλη σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρησης 1,5 ml και προστίθεται 100 μl προθερμασμένου (70° C) ρυθμιστικού διαλύματος BE
14. Επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min
15. Φυγοκεντρείται για 1 min στα 11.000 x g
16. Συλλογή του DNA και φύλαξη στους -20° C

6.3 Ποσοτικός προσδιορισμός DNA με το φθορισμόμετρο Qubit

Η ποσοτικοποίηση του DNA (Qubit 1.0, Invitrogen, Thermo Fisher, ΗΠΑ) επιτυγχάνεται με τη χρήση ουσίας που φθορίζει κατά την πρόσδεση σε δίκλωνο DNA, η οποία παρέχεται με το kit dsDNA BR (Invitrogen, Thermo Fisher ΗΠΑ). Η χρωστική αυτή εκπέμπει ακτινοβολία κατόπιν διέγερσης σε 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 αραιώση.



Εικόνα 6.1: Το φθορισμόμετρο Qubit της Invitrogen



Εικόνα 6.2: Ποσοτικός προσδιορισμός DNA με τη χρήση του NanoDrop.

Αντιδραστήρια / Αναλώσιμα / Εξοπλισμός

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

Πειραματική πορεία

1. Ετοιμάζεται το διάλυμα εργασίας σε ένα σωληνάριο eppendorf προσθέτοντας 199 μl ρυθμιστικό διάλυμα (Component A) και 1 μl χρωστικής (Component B) για κάθε δείγμα και αναδεύεται έντονα
2. Τοποθετείται 190 μl διαλύματος εργασίας σε δυο σωληνάρια για τα πρότυπα διαλύματα (standards)
3. Προστίθεται 10 μl κάθε προτύπου δείγματος στο αντίστοιχο σωληνάριο και αναδεύεται έντονα
4. Τοποθετείται 180-199 μl διαλύματος εργασίας σε σωληνάρια για τα άγνωστα δείγματα
5. Προστίθεται 1-20 μl άγνωστου δείγματος σε κάθε σωληνάριο, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 200 μl και αναδεύεται έντονα
6. Επωάζονται για 2min
7. Μετράται ο φθορισμός των προτύπων και άγνωστων δειγμάτων με το φθορισμόμετρο Qubit 1.0

6.4 Αντίδραση PCR

Για την εκτέλεση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε θερμικός κυκλοποιητής: Primus 25 PCR engine της MWG Biotech, Γερμανίας (**Εικόνα 6.3**). Το όργανο αυτό διαθέτει υποδοχείς για σωληνάρια PCR των 0,2 ml και μπορεί χάρις στα θερμικά Peltier στοιχεία που διαθέτει να

υποβάλλει τα δείγματα σε ταχείς κύκλους εναλλαγής θερμοκρασίας μεταξύ 4° C/sec και 105° C, με ακρίβεια $\pm 0,1^{\circ}$ C, χωρίς τη 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° C-105° C. Το όργανο διαθέτει θερμαινόμενο καπάκι (lid) και η ταχύτητα της ανόδου θερμοκρασίας (ramp time) είναι 4° C/sec, ενώ της ψύξης 2° C/sec.



Εικόνα 6.3: Σχηματική παράσταση του θερμικού κυκλοποιητή Primus 25 της MWG (www.coleparmer.com).

6.4.1 Μέθοδος PCR- RFLP για το γονίδιο ARMS2 (LOC387715)

Ο πολυμορφισμός rs10490924/A69S που εξετάσθηκε στο γονίδιο *ARMS2* αφορά μια αλλαγή G→T (g.5270G>T). Για τις ανάγκες της γονοτύπωσης ενισχύθηκε περιοχή 449 bp του γονιδίου *ARMS2* στη χρωμοσωμική περιοχή 10q26 (GenBank accession number: NG_011725) με τη χρήση εκκινητών (Invitrogen, ΗΠΑ) η αλληλουχία των οποίων φαίνεται στον ακόλουθο **Πίνακα 6.3**.

Πίνακας 6.3: Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου ARMS2.

Πρόσθιος εκκινητής, LOCF	5'- caatggtagccaggacccat -3'
Ανάστροφος εκκινητής, LOCR	5'- atccgttaagtcggaaggag -3'

Η PCR έγινε με τη χρήση του ενζύμου GoTaq® G2 Green Master Mix της εταιρείας Promega. Το mix αυτό είναι ένα έτοιμο προς χρήση διάλυμα, το οποίο περιλαμβάνει την GoTaq® G2 DNA πολυμεράση, dNTPs, MgCl₂ και τα reaction buffers σε κατάλληλες συγκεντρώσεις για ικανοποιητική ενίσχυση. Το GoTaq® G2 Green Master Mix περιέχει δυο χρωστικές (μια μπλε και μια κίτρινη) οι οποίες επιτρέπουν την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Οι αντιδράσεις οι οποίες έχουν γίνει με το GoTaq® G2 Green Master Mix έχουν ικανοποιητική πυκνότητα ώστε τα δείγματα να φορτωθούν κατευθείαν στη γέλη αгарόζης. Το πρωτόκολλο της PCR αντίδρασης σε τελικό όγκο 25 μl αναγράφεται στον **Πίνακα 6.4:**

Πίνακας 6.4: Πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του ARMS2.

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική Συγκέντρωση
ddH ₂ O	8,5	-
Πρόσθιος εκκινητής, 10μM	1	0,1–1,0μM
Ανάστροφος εκκινητής, 10μM	1	0,1–1,0μM
GoTaq® G2 Green Master Mix, 2X	12,5	1X
Δείγμα DNA	2	<250 ng

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον ακόλουθο **Πίνακα 6.5**:

Πίνακας 6.5: Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ενίσχυσης με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του ARMS2.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	94°C	10 min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C	30 sec	40 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	56°C	30 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	45 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	7 min	-

Τα προϊόντα της PCR επώασθηκαν κατόπιν με την περιοριστική ενδονουκλεάση *PvuII* (10U/mL, Fermentas, Λιθουανία). Το ένζυμο αυτό προέρχεται από το μικρόβιο *Proteus vulgaris* και δρα βέλτιστα σε θερμοκρασία 37°C σε συνδυασμό με το παρεχόμενο Buffer G [10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA)]. Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου σε δίκλωνο DNA είναι:

5'...C A G[^] C T G...3'

3'...G T C[^] G A C...5'

Η επώαση γίνεται με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 4 ώρες και πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 15 µL, το οποίο φαίνεται στον παρακάτω **Πίνακα 6.6**:

Πίνακας 6.6: Το πρωτόκολλο ενζυμικής πέψης του γονιδιακού τμήματος του ARMS2.

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος (μL)
Ένζυμο <i>PvuII</i>	0,5 μl
Buffer G	1,5 μL
PCR προϊόν	13 μL

Μετά την επώαση τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης υψηλής διακριτικής ικανότητας, 3% w/v, η οποία παρασκευάζεται με 0,6 g αгарόζης και 0,6 g αгарόζης NuSieve σε 40 ml TBE 0,5X. Ο χρόνος της ηλεκτροφόρησης είναι 50 λεπτά.

6.4.2 Μέθοδος PCR- RFLP για το γονίδιο CD14 (LOC929)

Ο πολυμορφισμός rs2569190/C260T που εξετάσθηκε για το γονίδιο *CD14* αφορά μια αλλαγή T→C (g.5371T>C). Για τις ανάγκες της γονοτύπωσης ενισχύθηκε περιοχή 561 bp του προαγωγέα γονιδίου *CD14* στη χρωμοσωμική περιοχή 5q31.1 (GenBank accession number: NG_023178) με τη χρήση των εκκινητών (IDT) η αλληλουχία των οποίων φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 6.7 [168].

Πίνακας 6.7: Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του *CD14*.

Πρόσθιος εκκινητής, CD14 (F)	5'- ttggtgccaacagatgaggttcac -3'
Ανάστροφος εκκινητής, CD14 (R)	5' – ttctttcctacacagcggcacc -3'

Η PCR έγινε με τη χρήση του ενζύμου GoTaq® G2 Green Master Mix της εταιρείας Promega. Το πρωτόκολλο της PCR αντίδρασης σε τελικό όγκο 25μl φαίνεται στον **Πίνακα 6.8**:

Πίνακας 6.8: Πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του CD14.

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος(μl)	Τελική Συγκέντρωση
ddH ₂ O	8,5	-
Πρόσθιος εκκινητής (20 pmol/μl)	1	0,02 mM
Ανάστροφος εκκινητής (20 pmol/μl)	1	0,02 mM
GoTaq® G2 Green Master Mix, 2X	12,5	1X
Δείγμα DNA	2	<250 ng

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον ακόλουθο **Πίνακα 6.9** [168]:

Πίνακας 6.9: Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ενίσχυσης με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του CD14.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επανάληψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	94°C	5 min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C	30sec	35 κύκλοι
Υβριδισμός των	62°C	35 sec	

εκκινητών στο DNA			
Επέκταση των εκκινητών	72°C	50 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	5 min	-

Τα προϊόντα της PCR επώασθηκαν κατόπιν με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Hae III* (10,000 U/ml, New England BioLabs, USA) . Το ένζυμο αυτό προέρχεται από το βακτήριο *Haemophilus aegyptius* και δρα σε βέλτιστη θερμοκρασία 37° C σε συνδυασμό με το παρεχόμενο NEB 4 (10X) (50 mM Potassium Acetate, 20 mM Tris-Acetate, 10 mM Magnesium Acetate, 1mM DTT, pH 7,9). Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου σε δίκλωνο DNA είναι:

5'...GG[^]CC...3'

3'...C C[^]G G...5'

Η επώαση γίνεται με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 4 ώρες και πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 20 μ L, το οποίο φαίνεται στον παρακάτω **Πίνακα 6.10**:

Πίνακας 6.10: Το πρωτόκολλο ενζυμικής πέψης του γονιδιακού τμήματος του *CD14*.

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος (μ L)
Ένζυμο <i>Hae III</i> (10,000 U/ml)	2
Buffer 4 (10X)	0,5
PCR προϊόν	17,5

Μετά την επώαση τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης υψηλής διακριτικής ικανότητας, 3% w/v, η οποία παρασκευάζεται με 0,6g αгарόζης και 0,6 g αгарόζης NuSieve σε 40 ml TBE 0,5X. Ο χρόνος της ηλεκτροφόρησης είναι 50 λεπτά.

6.4.3 Μέθοδος PCR- RFLP για το γονίδιο TLR4 (LOC 7099)

Οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν για το γονίδιο *TLR4* είναι δυο: α) rs4986790/ Asp299Gly και β) rs4986791/ Thr399Ile και αφορούν αλλαγές αμινοξέων από ασπαραγίνη σε γλυκίνη (g.13843A>G) και από θρεονίνη σε ισολευκίνη (g.14143C>T) και αντίστοιχα.

Για τις ανάγκες της γονοτύπωσης ενισχύθηκε περιοχή 249 bp του γονιδίου *TLR4* για τον πολυμορφισμό Asp299Gly και 406 bp για τον πολυμορφισμό Thr399Ile, στη χρωμοσωμική περιοχή 9q33.1(GenBank accession number: NG_011475) με τη χρήση των εκκινητών (IDT) η αλληλουχία των οποίων φαίνεται στους παρακάτω Πίνακες 11,12 [168]:

Πίνακας 6.11: Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του *TLR4* για τον πολυμορφισμό Asp299Gly.

Πρόσθιος εκκινητής, Asp299Gly (TLR4_1)	5'- gattagcatacttagactactacctc at g -3'
Ανάστροφος εκκινητής, Asp299Gly (TLR4_2)	5'- gatcaacttctgaaaaagcattccac -3'

Πίνακας 6.12: Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του *TLR4* για τον πολυμορφισμό Thr399Ile.

Πρόσθιος εκκινητής, Thr399Ile (F)	5' – gggttgctgttctcaaagtgatttgggag aa -3'
Ανάστροφος εκκινητής, Thr399Ile (R)	5'- cctgaaga ctggagagtgaagttaaagtct – 3'

Οι υπογραμμισμένες βάσεις στους πρόσθιους εκκινητές υποδηλώνουν ένα αλλαγμένο νουκλεοτίδιο το οποίο εισήχθη ώστε να δημιουργηθούν σημεία αναγνώρισης για την περιοριστική

ενδονουκλεάση *NcoI* (Takara, Ιαπωνία) για τον πολυμορφισμό Asp299Gly για την περιοριστική ενδονουκλεάση *HinfI* (New England BioLabs, ΗΠΑ) για τον πολυμορφισμό Thr399Ile σε περίπτωση που υπάρχει ο σημειακός πολυμορφισμός. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των δυο πολυμορφισμών του γονιδιακού τμήματος του TLR4 παρουσιάζεται στον **Πίνακα 6.13**:

Πίνακας 6.13: Πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του TLR4.

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος(μl)	Τελική Συγκέντρωση
ddH ₂ O	8,5	-
Πρόσθιος εκκινητής (20 pmol/μl)	1	0,02 mM
Ανάστροφος εκκινητής (20 pmol/μl)	1	0,02 mM
GoTaq® G2 Green Master Mix, 2X	12,5	1X
Δείγμα DNA	2	<250 ng

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον ακόλουθο **Πίνακα 6.14** [168]:

Πίνακας 6.14: Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ενίσχυσης με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του TLR4 .

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
---------------	-------------	----------	-------------

Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	95°C	5 min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95 °C	30 s	35 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	55 °C	30 s	
Επέκταση των εκκινητών	72 °C	30 s	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72 °C	5 min	-

Τα προϊόντα της PCR για τον πολυμορφισμό Asp299Gly επωάστηκαν κατόπιν με την περιοριστική ενδονουκλεάση *NcoI* (500U, Takara, Ιαπωνία). Το ένζυμο αυτό προέρχεται από το βακτήριο *Nocardia corallina* και δρα σε βέλτιστη θερμοκρασία 37° C σε συνδυασμό με τα παρεχόμενα 0,1% BSA και 10X Buffer K (200 mM Tris-HCl, pH 8,5, 100 mM MgCl₂, 10 mM διθειοθρεϊτόλη (DTT) 1000 mM KCl). Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου σε δίκλωνο DNA είναι:

5'...C[^]CATGG...3'

3'...GGTAC[^]C...5'

Αντίστοιχα, τα προϊόντα της PCR για τον πολυμορφισμό Thr399Ile επωάστηκαν με την περιοριστική ενδονουκλεάση *HinfI* (10,000U, New England BioLabs, ΗΠΑ). Το ένζυμο αυτό προέρχεται από τον *Haemophilus influenzae* και δρα σε βέλτιστη θερμοκρασία 37° C σε συνδυασμό με το παρεχόμενο Buffer 4 (10X) (50 mM οξικό κάλιο, 20 mM Tris-Acetate, 10mM οξικό μαγνήσιο, 1 mM DTT, pH 7,9) . Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου σε δίκλωνο DNA είναι:

5'...G[^]ANTC...3'

3'...CTNA[^]G...5'

Η επώαση και για τους δυο πολυμορφισμούς γίνεται με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 4 ώρες και πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 20 μL , το οποίο φαίνεται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 6.15: Το πρωτόκολλο ενζυμικής πέψης του γονιδιακού τμήματος του *TLR4*, για τον πολυμορφισμό *Asp299Gly*.

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος (μL)
Ένζυμο <i>NcoI</i> (500U)	0,5
BSA 0,1%	2
Buffer K (10X)	2
PCR προϊόν	15,5

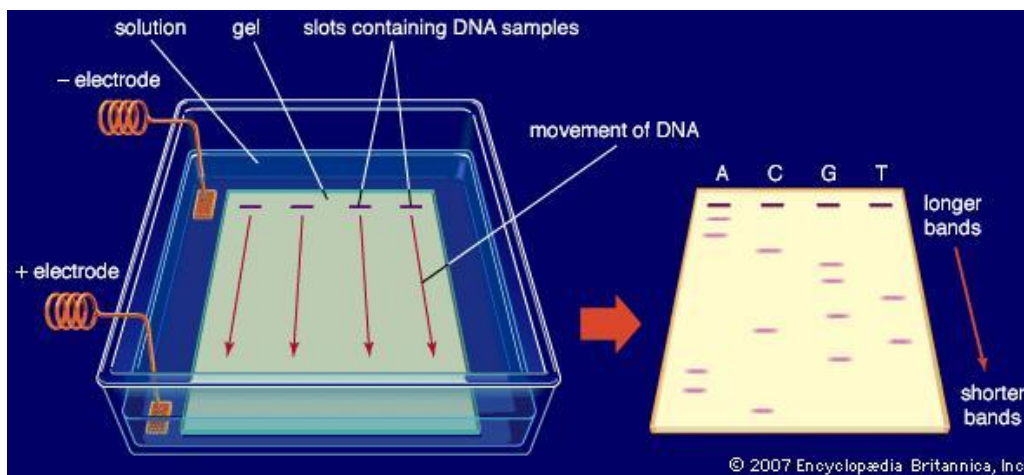
Πίνακας 6.16: Το πρωτόκολλο ενζυμικής πέψης του γονιδιακού τμήματος του *TLR4*, για τον πολυμορφισμό *Thr399Ile*.

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος (μL)
Ένζυμο <i>Hinf</i> I (10,000U)	0,5
Buffer 4 (10X)	2
PCR προϊόν	17,5

6.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι η κυριότερη τεχνική ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων, η οποία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την απομόνωση τμημάτων DNA που συντίθενται κατά την PCR. Η τεχνική αυτή είναι απλή, γρήγορη και 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 (agarose gel electrophoresis). Η ταχύτητα μετακίνησης των μορίων DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογαρίθμου του αριθμού των βάσεων τους ($\log_{10}$).

Κατ' αυτόν τον τρόπο, τα μικρότερα μόρια DNA μετακινούνται στην πηκτή πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα και έτσι επιταχύνεται ο διαχωρισμός μορίων διαφορετικού μεγέθους. 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. Οι ζώνες αυτές καθίστανται ορατές κατόπιν σχηματισμού συμπλόκων παρεμβολής του DNA με μόρια, 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.



Εικόνα 6.4: Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφόρησης (www.britannica.com).

Αντιδραστήρια / Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα 5X TBE (τρис-βορικό-EDTA): 54 g Trisma Base (Sigma #201-064-4, 27,5 g βορικό οξύ (Sigma #036K0210) και 20 ml EDTA 0,5 M pH 8,0 σε 1 L H₂O
- Βρωμιούχο αιθίδιο (500 µg/mL, Sigma, 012K8934)
- Αγαρόζη (HT Biotechnology, UK) 100 g
- Δείκτης μοριακών βαρών (PCR marker) 50-766 bp (NEB, ΗΠΑ, N3234G) και δείκτης μοριακών βαρών φχ174 (NEB, ΗΠΑ)
- Χρωστική 6X (loading dye) με κυανό της βρωμοφαινόλης (BPB) και φικόλη
- Πιπέτες των 20 µl και 100 µl
- Ρύγχη πιπετών χωρίς φίλτρο
- Ηλεκτροφορητικές συσκευές (Peqlab και SciPlus, Γερμανία)
- Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης EPS5301 (Amersham, Αγγλία)
- Τράπεζα ακτινοβολίας UV (Vilbert Loumart, Γαλλία) και photo-Doc-it 70 κάμερα UVP, Γερμανία)

6.5.1 Πηκτή Αγαρόζης υψηλής διαχωριστική ικανότητας 3%w/v

Για το διαχωρισμό των προϊόντων της συμβατικής PCR έγινε ηλεκτροφόρηση υψηλής ευκρίνειας σε πηκτή αγαρόζης 3%w/v. Η πηκτή παρασκευάζεται με 0,6 g αγαρόζης SeaKem (Lonza, Ελβετία) και 0,6 g Nusieve (Lonza, Ελβετία) σε 40mL ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5X. Κατόπιν θερμάνσεως σε φούρνο μικροκυμάτων και διαλυτοποίησης της αγαρόζης, προστίθεται 40 µl βρωμιούχο αιθίδιο, 500 µg/mL. Κατάλληλος όγκος δείγματος (5-10 µl) αναμιγνύεται με χρωστική πλήρωσης (gel loading dye), εάν αυτό απαιτείται, σε αναλογία 6:1. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE 0,5X, υπό σταθερή τάση 100V για 50 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.

6.6 Θερμικός κυκλοποιητής Rotor-Gene Q MDx

6.6.1 Χαρακτηριστικά του θερμικού κυκλοποιητή Rotor-Gene Q MDx

Το Rotor-Gene Q (Εικόνα 6.5) είναι ένα καινοτόμο όργανο που παρέχει τη δυνατότητα για υψηλής ακρίβειας qPCR αντιδράσεις και είναι απολύτως κατάλληλο για *in vitro* διαγνωστικές εφαρμογές σε συνδυασμό με τα kit της QIAGEN που φέρουν σήμανση CE-IVD.

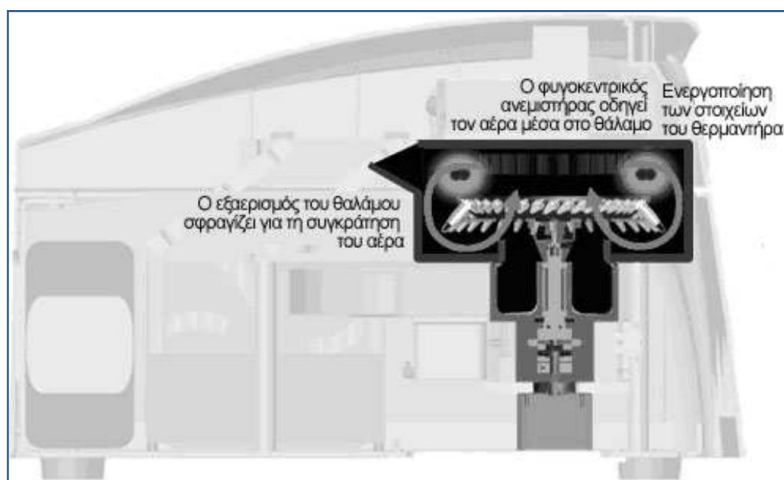


Εικόνα 6.5: Θερμικός κυκλοποιητής Rotorgene Q (www.qiagen.com).

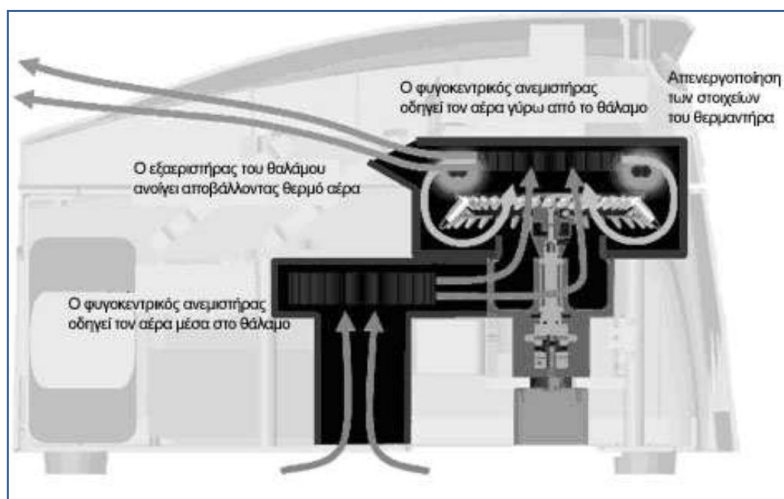
6.6.2 Οργανολογία

Το Rotor-Gene Q χρησιμοποιεί έναν εξελιγμένο σχεδιασμό θέρμανσης (Εικόνα 6.7) και ψύξης (Εικόνα 6.8) για να επιτύχει τις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης. Τα δείγματα θερμαίνονται και ψύχονται σε με ανακύκλωση αέρα σε χαμηλής μάζας αέρα κλίβανο. Η θέρμανση επιτυγχάνεται από ένα στοιχείο νικελίου-χρωμίου στο καπάκι. Ο θάλαμος ψύχεται από την εξαέρωση μέσω της οροφής του θαλάμου ενώ αέρας σε θερμοκρασία περιβάλλοντος εμφυσείται μέσω της βάσης.

Η μοναδική περιστροφική μορφή του εξασφαλίζει βέλτιστη θερμική και οπτική ομοιομορφία ανάμεσα στα δείγματα, η οποία είναι σημαντική για την ακριβή και αξιόπιστη ανάλυση. Τα δείγματα περιστρέφονται συνεχώς στις 400 rpm κατά τη διάρκεια της κυκλοποίησης. Η φυγοκέντρωση εμποδίζει τη συμπύκνωση και αφαιρεί τις φυσαλίδες αέρα, αλλά δεν ιζηματοποιεί το DNA. Επιπλέον, τα δείγματα δεν χρειάζεται να φυγοκεντρηθούν πριν από την έναρξη της κυκλοποίησης.



Εικόνα 6.6: Το σύστημα θέρμανσης του θερμικού κυκλοποιητή Rotor-Gene Q (www.qiagen.com).



Εικόνα 6.7: Το σύστημα ψύξης του θερμικού κυκλοποιητή Rotor-Gene (www.qiagen.com).

6.7 Σχεδιασμός HRMA εκκινήτων

Η ειδικότητα και η αξιοπιστία της ανάλυσης καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το σωστό σχεδιασμό των εκκινήτων για μια αντίδραση real-time PCR και την ανάλυση των καμπυλών τήξης. Οι εκκινήτες θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από παρόμοια περιεκτικότητα σε γουανίνες-κυτοσίνες (GC%), να μη φέρουν συμπληρωματικές αλληλουχίες (κυρίως στο 3' άκρο τους) και να μη σχηματίζουν δευτεροταγείς και παλινδρομικές δομές. Σημαντική προϋπόθεση αποτελεί οι εκκινήτες να είναι 100% συμπληρωματικοί της αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί και να μην προσδένονται μη ειδικά σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος, γεγονός το οποίο μπορεί να

διασφαλιστεί τόσο με την κατάρτιση ενός καλού θερμοκρασιακού προγράμματος, όσο και με τη σωστή επιλογή των εκκινητών.

Για να διασφαλιστεί μια επιτυχής HRMA ανάλυση, επιλέχθηκαν κατάλληλοι εκκινητές αξιοποιώντας τα διαδικτυακά εργαλεία GenBank και Blast του NCBI (National Center of Biotechnology Information) και UCSC Genome Browser για τον έλεγχο SNPs και MAF αλληλίων στη γονιδιακή περιοχή που θα σαρωθεί και αφετέρου το λογισμικό CLC-Sequence Viewer (CLCbio, Δανία) τα οποία επιτρέπουν την καλύτερη οπτικοποίηση, σχεδιασμό και αξιολόγηση των αλληλουχιών που μας ενδιαφέρουν.

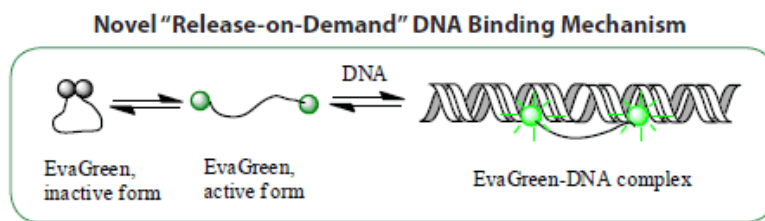
❖ HRMA για το γονίδιο TLR4 για τον πολυμορφισμό Asp299Gly

Πίνακας 6.17: Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με HRM του γονιδιακού τμήματος του TLR4, Asp299Gly.

Πρόσθιος εκκινητής, Asp299Gly (TLR4_5)	5'- atttgaccattgaagaattccgatt- 3'
Ανάστροφος εκκινητής, Asp299Gly (TLR4_6)	5' -tcaccagggaaaatgaagaaa -3'

Λαμβάνοντας υπόψη τα πλεονεκτήματα της Eva Green:

- Μικρή αναστολή της PCR σε σχέση με τη SYBR Green I χάρις στη νέα τεχνολογία δέσμευσης release-on-demand, επιτρέποντας σχετικά μεγάλη συγκέντρωση της χρωστικής χωρίς να αναστέλλει την PCR
- Υψηλή ευαισθησία και ισχυρό σήμα της PCR
- Μη μεταλλαξιογόνος και μη κυτταροτοξική
- Συμβατή με Fast PCR πρωτόκολλα
- Συμβατή με multiplex PCR
- Θερμικά, υδρολυτικά Σταθερή
- Μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής παρόμοιο με αυτό της SYBR Green I



Εικόνα 6.8: Η τεχνολογία *release on demand* της χρωστικής *Eva Green* (www.interchim.fr)

Επιλέχθηκε για την HRMA ανάλυση το Type-it HRM PCR kit της εταιρείας Qiagen (Γερμανία). Το συγκεκριμένο kit είναι κατάλληλο για ακριβή ανίχνευση γενετικών μεταλλάξεων και σημειακών πολυμορφισμών (SNPs).

Το πρωτόκολλο της PCR αντίδρασης σε τελικό όγκο 20 μ l φαίνεται στον **Πίνακα 6.19**:

Πίνακας 6.19: Πρωτόκολλο HRM για τον πολυμορφισμό *Asp299Gly*.

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος (μ l)	Τελική Συγκέντρωση
ddH ₂ O	6	
Πρόσθιος εκκινητής, Asp299Gly (20 pmol/ μ l)	1	
Ανάστροφος εκκινητής, Asp299Gly (20 pmol/ μ l)	1	
HRM PCR Master Mix (2x)	10	1x
Δείγμα DNA	2	

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον ακόλουθο **Πίνακα 6.20**:

Πίνακας 6.20: Πρωτόκολλο HRM για τον πολυμορφισμό *Asp299Gly*.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	95° C	5min	40 κύκλοι
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95° C	10sec	
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	55° C	30sec	
Επέκταση των εκκινητών	72° C	10sec	
HRMA	Ρυθμός ανόδου θερμοκρασίας ανά 0,1° C 65-95° C 0,1° C	2sec	

6.8 Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων του DNA (DNA Sequencing)

6.8.1 Οργανολογία

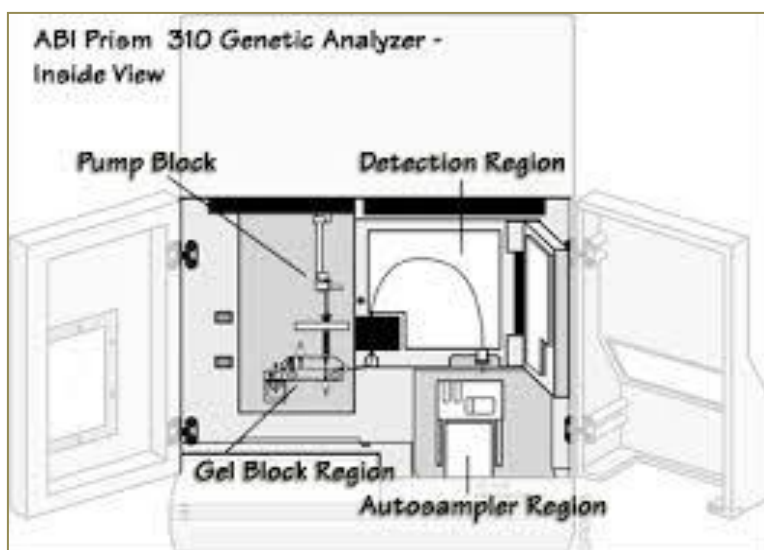
Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων πραγματοποιήθηκε με το όργανο ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ΗΠΑ) (**Εικόνες 6.9 και 6.10**). Για την πραγματοποίηση της αλληλούχισης τα σωληνάρια τοποθετούνται σε αυτόματο δειγματολήπτη (autosampler tray). Ο δίσκος αυτός εν συνεχεία φέρνει κάθε δείγμα σε επαφή με το ηλεκτρόδιο-

κάθοδο και με το ένα άκρο ενός υάλινου τριχοειδούς που περιέχει πολυμερές. Το ηλεκτρόδιο-άνοδος στο άλλο άκρο του τριχοειδούς βυθίζεται ακολούθως σε ρυθμιστικό διάλυμα. Καθώς το ρεύμα ρέει από την κάθοδο προς την άνοδο, μέρος του δείγματος εισέρχεται στο τριχοειδές, σε μια διαδικασία που ονομάζεται 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 φτάσουν 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 E το όργανο καταγράφει την ένταση του φωτός σε τέσσερις περιοχές ή παράθυρα τα οποία είναι 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 παρέχεται ο μέγιστος δυνατός διαχωρισμός μεταξύ των κέντρων ανίχνευσης για τις διαφορετικές χρωστικές ενώ παράλληλα να διατηρείται καλή ένταση του σήματος [168].



Εικόνα 6.9: Απεικόνιση του γενετικού αναλυτή ABI Prism 310 (infohost.nmt.edu).



Εικόνα 6.10: Εσωτερική απεικόνιση του γενετικού αναλυτή (projects.nfstc.org).

Πειραματική Πορεία

Για την πραγματοποίηση της αλληλούχησης ενός τμήματος DNA απαιτούνται τα εξής διαδοχικά βήματα τα οποία αναλύονται :

- Ενίσχυση του τμήματος DNA με συμβατική PCR
- Καθαρισμός των PCR προϊόντων (π.χ 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 το πρόγραμμα Chromas Lite 2.01 (Technelysium, Αυστραλία)

6.8.2 Ενίσχυση με Συμβατική PCR

Τα πρωτόκολλα ενίσχυσης με συμβατική PCR των γονιδίων *ARMS2*, *CD14* και *TLR4* και για τους δύο πολυμορφισμούς του *TLR4* γονιδίου (Asp299Gly και Thr399Ile) καθώς και τα θερμοκρασιακά προγράμματα παρουσιάζονται αναλυτικά στις ενότητες 6.4.2. και 6.4.3.

6.8.3 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, αгарόζη, χρωστικές, βρωμιούχο αιθίδιο) διαπερνούν τη 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, εκλύεται με 10 ή 20 μl από το διάλυμα έκλυσης.

Αντιδραστήρια / Υλικά

- Πιπέτες (Thermo, Fisher USA) των 10 μl, 100 μl, 200 μl και 1000 μl
- Ακρορύγχη με φίλτρο των 10 μl, 200 μl και 1000 μl
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus, Thermo Fisher, USA)
- Συσκευή Vortex (Fisher, USA)
- Αποστειρωμένο νερό (BIOSEP A.E, 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 Πορεία

1. Προστίθεται δις απεσταγμένο ύδωρ στο δείγμα μέχρι τελικού όγκου 100μl
2. Σε κάθε δείγμα (των 100 μL) προστίθεται 400 μL διάλυμα πρόσδεσης, ακολουθεί έντονη ανάδευση και φυγοκέντρωση σε σύντομο διάστημα
3. Εισάγεται μια στήλη High Pure Filter Tube σε ένα σωληνάριο συλλογής Μεταφέρεται το δείγμα του δεύτερου βήματος στο επάνω μέρος της στήλης και φυγοκεντρείται για 30- 60 sec στα 8000 x g
4. Απορρίπτεται το διήθημα και τοποθετείται η στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο
5. Προστίθεται 400 μl διάλυμα εκπλύσεων στη στήλη και φυγοκεντρείται για 30- 60 sec στα 8000 x g
6. Απορρίπτεται το διήθημα και τοποθετείται η στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο
7. Προστίθεται 300 μl διάλυμα εκπλύσεων στη στήλη και φυγοκεντρείται για 30- 60 sec στα 8000 x g
8. Απορρίπτεται το διήθημα και τοποθετείται η στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο και φυγοκεντρείται στα 17900 x g για ένα επιπλέον λεπτό
9. Απορρίπτεται το σωληνάριο συλλογής με το διήθημα και τοποθετείται η στήλη σε ένα καθαρό eppendorf των 1.5 ml
10. Για την έκλουση του DNA, προστίθενται 20 μl διαλύματος έκλουσης. Φυγοκεντρείται στα 8000 x g για 1 min

6.8. 4 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 χρησιμοποιείται μόνο ο ένας εκκινητής 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 6.22** καταγράφονται τα συστατικά της αντίδρασης cycle sequencing και στον **Πίνακα 6.23** το ακολουθούμενο θερμοκρασιακό πρόγραμμα:

Πίνακας 6.22: Πρωτόκολλο Cycle Sequencing.

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική Συγκέντρωση
RRmix, ABI	1	
5x sequencing buffer, ABI	7	1,75x
Εκκινητής (5 pmol/μl)	1	0,25 pmol/μl
ddH ₂ O	9	
Κεκαθαρμένο προϊόν	2	

Πίνακας 6.23: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα Cycle Sequencing.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	96° C	1min	
Διαχωρισμός των	96° C	10sec	25 κύκλοι

κλώνων DNA			
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	50° C	10sec	
Επέκταση των εκκινητών	60° C	4 min	

6.8.5 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 / Υλικά

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

Πειραματική πορεία

1. Φυγοκέντρωση 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°C. Οι ενυδατωμένες στήλες μπορούν να φυλαχθούν στους 4°C για το πολύ 14 μέρες. Γίνεται ανασύσταση του gel που έχει συγκεντρωθεί στον πάτο της στήλης κάνοντας έντονη ανάδευση. Δεν πρέπει να δημιουργηθούν φυσαλίδες. Αφαιρείται το πώμα που βρίσκεται στον πυθμένα της στήλης και τοποθετείται η στήλη μέσα στο δοχείο συλλογής
4. Φυγοκέντρωση για 2 min στα 750 x g για να αφαιρεθεί το διάλυμα αποθήκευσης που περισσεύει. Απορρίπτεται το δοχείο συλλογής με το διάλυμα και τοποθετείται η στήλη στο κατάλληλο δοχείο συλλογής
5. Ανοίγουμε το καπάκι της στήλης. Προσεκτικά φορτώνεται το δείγμα στο κέντρο του gel χωρίς να διαταραχτεί η επιφάνειά του. Τοποθετώντας το δείγμα στα πλάγια της στήλης μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της αποτελεσματικότητας της στήλης. Ο όγκος του δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 20 μl
6. Φυγοκέντρωση της στήλης για 4 – 6 min στα 750 x g. Απορρίπτεται η στήλη, ξηραίνεται το δείγμα ή χρησιμοποιείται απευθείας

6.8.6 Προετοιμασία δειγμάτων για DNA sequencing

Τα καθαρισμένα προϊόντα του cycle sequencing τοποθετούνται στη συνέχεια στο ABI Prism 310 Genetic Analyzer, με την εξής διαδικασία:

- Τοποθετούμε σε ένα σωληνάριο τύπου eppendorf των 1,5 ml 10 μl από το καθαρό cycle sequencing προϊόν και 10 μl υπερκαθαρό φορμαμίδιο
- Επωάζουμε στους 95° C για 2 min και στη συνέχεια στους 4° C για άλλα 2 min
- Τα μεταφέρουμε στα σωληνάρια αντίδρασης των 0,5 ml και τα φορτώνουμε στον γενετικό αναλυτή

Αντιδραστήρια / Αναλώσιμα / Εξοπλισμός

- Επωαστήρας σωληναρίων (Grant, Αγγλία)
- Πιπέτες των 100 μl Αποστειρωμένο νερό (BIOSEP A.E, Ελλάδα)

- Συσκευή Vortex (Fisher, ΗΠΑ)
- Σωληνάρια τύπου eppendorfs tvn 1,5 ml
- Πολυμερές POP4 (Applied Biosystems, ΗΠΑ)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10X (Applied Biosystems, ΗΠΑ)
- Φορμαμίδιο (Applied Biosystems, ΗΠΑ)
- Σωληνάρια αντίδρασης 0,5 ml (Applied Biosystems, ΗΠΑ)
- Τριχοειδές 47 mm (Applied Biosystems, ΗΠΑ)
- Γενετικός Αναλυτής ABI310 (Applied Biosystems, ΗΠΑ)

6.9 Βιοπληροφορική ανάλυση

Για την πραγματοποίηση της HRMA ανάλυσης έγινε χρήση κατάλληλων λογισμικών με στόχο τον σχεδιασμό εκκινήτων, τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των αναλύσεων και την ανάδειξη συσχετίσεων μεταξύ των υπό μελέτη πολυμορφισμών.

6.10 Στατιστική Ανάλυση

Αρχικά πραγματοποιήθηκε περιγραφική στατιστική ανάλυση (εύρος, μέσος όρος, διάμεσος, ελάχιστο, μέγιστο) των ποσοτικών μεταβλητών της ηλικίας και της οπτικής οξύτητας τόσο στο σύνολο των δειγμάτων (υγιείς μάρτυρες και ασθενείς), αλλά και ξεχωριστά για την κάθε ομάδα. Ακολούθησε ο έλεγχος κανονικότητας των ποσοτικών μεταβλητών με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov. Όταν δεν ακολουθείται κανονική κατανομή δεν εφαρμόζεται η δοκιμασία t-test, αλλά η μη παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney για τη σύγκριση των διαμέσων τιμών.

Στη συνέχεια τα ποιοτικά δεδομένα αξιολογήθηκαν μέσω διασδιάστατων πινάκων συνάφειας (cross-tabulation) όπου ελέγχθηκε η ύπαρξη ή μη ανεξαρτησίας μεταξύ των ποσοστών των μεταβλητών με τη δοκιμασία Pearson χ^2 ή τη Fisher' exact. Στη συνέχεια εκτελέστηκε Διωνυμική Λογαριθμιστική Παλινδρόμηση (Binary Logistic Regression) με στόχο την εύρεση ενός μοντέλου που θα προβλέπει το νόσημα με βάση το γονότυπο και τους περιβαλλοντικούς και κλινικούς παράγοντες. Ορίστηκαν τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας (p-value) και η στάθμη εμπιστοσύνης στο 0,05. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου IBM® SPSS® statistics version 22 (IBM, ΗΠΑ).

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για τη συσχέτιση της νόσου με τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν με ειδικό λογισμικό SNPStats [169]. Ένας πολυμορφισμός μπορεί να θεωρηθεί ως μια κατηγορική μεταβλητή με τρεις δυνατές τιμές (ομοζυγώτης φυσιολογικός, ετεροζυγώτης, ομοζυγώτης μεταλλαγμένος). Έτσι είναι δυνατόν να ελεγχθεί με στατιστικά μέτρα η συσχέτιση ενός πολυμορφισμού SNP με μια 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 χ^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 των αλληλίων με την υπόθεση ανεξαρτησίας στην κληρονομηση.

Εφόσον επιβεβαιωθεί η υπόθεση της ανεξαρτησίας στη μεταβίβαση των αλληλίων, η στατιστική ανάλυση είναι έγκυρη. Συγκεκριμένα κατασκευάζεται πίνακας συνάφειας (contingency table) και εφαρμόζεται το τεστ χ^2 . Ο υπολογισμός του σχετικού λόγου συμπληρωματικών πιθανοτήτων OR (Odds Ratio) για κάθε γονότυπο συγκριτικά με το γονότυπο αναφοράς (ομοζυγώτες φυσιολογικοί) προϋποθέτει 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 όπου το 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 γονότυπο να προσδίδει έναν διαφορετικό και μη αθροιστικό κίνδυνο. Το μοντέλο αυτό συγκρίνει τους ετεροζυγώτες και ομοζυγώτες μεταλλαγμένους ως προς τους ομοζυγώτες φυσιολογικούς και υπολογίζει δύο OR αντίστοιχα, ένα για ετεροζυγώτες (He) και ένα για τον ομοζυγώτη μεταλλαγμένο (Va). 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 αλληλίο θεωρείται αρκετό για να μεταβάλλει τον κίνδυνο, με αποτέλεσμα οι ετερόζυγοι και ομόζυγοι μεταλλαγμένοι να φέρουν τον ίδιο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου. Έτσι η σύγκριση γίνεται μεταξύ του συνόλου των γονοτύπων των μεταλλαγμένων (Do) ως προς τους φυσιολογικούς. 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 μεταλλαγμένου αλληλίου είναι απαραίτητα για τη μεταβολή του κινδύνου. Η σύγκριση γίνεται μεταξύ του συνόλου των φυσιολογικών και ετεροζυγωτών (Re) με τους ομοζυγώτες μεταλλαγμένους. 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 φυσιολογικούς και μεταλλαγμένους ομοζυγώτες με τους ετεροζυγώτες (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 αλληλίου επιδρά στον κίνδυνο κατά τρόπο αθροιστικό ώστε οι ομοζυγώτες φυσιολογικοί να φέρουν διπλάσιο

κίνδυνο από τους ετεροζυγώτες. Έτσι η σύγκριση γίνεται μεταξύ του συνδυασμού των γονοτύπων του ομοζυγώτη μεταλλαγμένου και του ετεροζυγώτη με βάρη 2 και 1 αντίστοιχα (Ad) και του γονοτύπου του ομόζυγου φυσιολογικού 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 καταλληλότητας του μοντέλου (goodness of fit) και εκτιμά ποιο μοντέλο ταιριάζει καλύτερα στο μελετούμενο σύνολο δεδομένων. Η εξίσωση που συγκρίνει το σκορ πιθανοφάνειας (likelihood score) δυο μοντέλων έχει ως εξής:

$$LR = 2 * (\ln L1 - \ln L2)$$

Όπου L1 και L2 η πιθανοφάνεια (likelihood) των δυο μοντέλων που συγκρίνονται.

Ωστόσο, κάποιες φορές το LRT δεν αρκεί ώστε να επιλεγεί κάποιο μοντέλο σε σχέση με κάποιο άλλο. 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:

$$AIC = -2 \log L + 2 \# \text{parameters}$$

Όπου L η πιθανοφάνεια (likelihood) του μοντέλου και #parameters ο αριθμός των παραμέτρων που συμπεριλαμβάνονται στο μοντέλο [169].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο : Αποτελέσματα

7.1 Αποτελέσματα γονοτύπωσης με τη μέθοδο PCR-RFLP

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της γονοτύπωσης για τις ομάδες των υγιών και των ασθενών παρουσιάζονται στους Πίνακες 7.1 και 7.2 αντίστοιχα. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων για το κάθε γονίδιο δίδεται ξεχωριστά στη συνέχεια:

Πίνακας 7.1: Αποτελέσματα γονοτύπωσης για την ομάδα των υγιών μαρτύρων.

A/A	Όνομα	Ηλικία	Γονότυπος <i>ARMS2</i>	Γονότυπος <i>CD14</i>	Γονότυπος <i>TRL4</i> <i>Asp299Gly</i>	Γονότυπος <i>TLR4</i> <i>Thr399Ile</i>
1	Σ.Χ	84	MUTANT	MUTANT	WT	WT
2	Δ.Ε	83	WT	HETERO	WT	WT
3	Π.Ε	76	WT	WT	WT	WT
4	Τ.Β	75	WT	HETERO	WT	WT
5	Α.Χ	72	MUTANT	HETERO	WT	WT
6	Κ.Σ	82	WT	MUTANT	WT	WT
7	Τ.Μ	73	MUTANT	WT	HETERO	WT
8	Δ.Σ	73	MUTANT	WT	WT	WT
9	Μ.Α	78	WT	MUTANT	WT	WT
10	Σ.Κ	81	HETERO	MUTANT	WT	WT
11	Π.Ε	75	WT	WT	WT	WT
12	Κ.Χ	81	HETERO	WT	WT	WT
13	Π.Κ	87	WT	WT	WT	WT
14	Π.Χ	76	WT	WT	WT	WT
15	Π.Γ	78	WT	HETERO	HETERO	WT
16	Κ.Α	81	WT	HETERO	WT	WT
17	Δ.Ι	72	WT	WT	WT	WT
18	Π.Δ	87	WT	WT	WT	WT
19	Π.Π	86	WT	HETERO	WT	WT
20	Σ.Μ	85	WT	HETERO	WT	WT
21	Κ.Α	67	HETERO	HETERO	WT	WT
22	Κ.Α	72	WT	HETERO	WT	WT
23	Σ.Α	88	HETERO	WT	WT	WT
24	Α.Α	74	MUTANT	HETERO	WT	WT

25	K.Σ	73	HETERO	MUTANT	WT	WT
26	Δ.Z	77	HETERO	HETERO	WT	WT
27	Ψ.Π	84	HETERO	HETERO	WT	WT
28	T.Γ	83	HETERO	MUTANT	WT	WT
29	K.E	77	WT	HETERO	WT	WT
30	Σ.A	88	WT	WT	WT	WT
31	Δ.Γ	79	WT	HETERO	WT	WT
32	M.Σ	74	WT	HETERO	WT	WT
33	Σ.E	79	HETERO	MUTANT	WT	WT
34	K.Σ	71	WT	HETERO	WT	WT
35	M.K	81	HETERO	MUTANT	WT	WT
36	K.I	73	WT	HETERO	WT	WT
37	Γ.N	84	HETERO	HETERO	WT	WT
38	Γ.N	88	WT	WT	WT	WT
39	K.A	70	WT	HETERO	WT	WT
40	A.N	84	HETERO	WT	WT	WT
41	M.Δ	84	HETERO	WT	WT	WT
42	B.E	75	HETERO	HETERO	WT	HETERO
43	M.A	86	HETERO	WT	WT	WT
44	Π.M	76	HETERO	MUTANT	WT	WT
45	Λ.Σ	75	HETERO	HETERO	WT	WT
46	A.Σ	76	HETERO	HETERO	WT	WT
47	Δ.A	82	HETERO	WT	WT	WT
48	M.Π	80	HETERO	WT	WT	WT
49	M.E	74	HETERO	HETERO	WT	WT
50	M.A	80	WT	HETERO	WT	WT
51	Σ.Δ	78	HETERO	HETERO	WT	WT
52	Θ.M	82	WT	HETERO	WT	WT
53	T.A	82	WT	WT	WT	WT
54	N.B	74	HETERO	WT	WT	WT
55	Π.Σ	81	HETERO	WT	WT	WT
56	Σ.A	72	HETERO	WT	WT	WT
57	T.A	78	WT	HETERO	WT	WT
58	A.Σ	75	HETERO	HETERO	WT	WT
59	M.Δ	84	WT	WT	WT	WT
60	Σ.E	75	WT	WT	WT	WT
61	Θ.K	75	WT	HETERO	WT	WT

62	X.A	88	WT	WT	WT	WT
63	Λ.M	76	HETERO	HETERO	WT	WT
64	Λ.N	79	HETERO	HETERO	WT	WT
65	Λ.A	80	WT	HETERO	WT	WT
66	A.N	84	WT	HETERO	WT	WT
67	M.Γ	74	HETERO	MUTANT	WT	WT
68	K.E	75	MUTANT	HETERO	WT	WT
69	M.M	78	MUTANT	WT	WT	WT
70	T.Δ	76	WT	HETERO	WT	WT
71	B.Σ	74	HETERO	WT	WT	WT
72	P.A	78	MUTANT	HETERO	WT	WT
73	Λ.I	78	HETERO	HETERO	WT	WT
74	A.A	75	WT	WT	WT	WT
75	Γ.A	76	WT	HETERO	WT	WT
76	T.E	79	HETERO	HETERO	WT	WT
77	T.Z	88	MUTANT	HETERO	WT	WT
78	N.E	82	HETERO	HETERO	WT	WT
79	Θ.M	78	WT	HETERO	WT	WT
80	Σ.N	82	WT	MUTANT	WT	WT
81	Σ.Σ	83	WT	WT	WT	WT
82	Ξ.M	82	WT	MUTANT	WT	WT
83	K.I	76	WT	WT	WT	WT
84	Z.Σ	73	WT	HETERO	WT	WT
85	P.I	82	WT	MUTANT	WT	WT
86	Z.B	88	MUTANT	WT	WT	WT
87	Σ.Θ	74	WT	HETERO	WT	WT
88	Π.E	71	WT	WT	WT	WT
89	M.A	76	WT	HETERO	WT	WT
90	T.Σ	82	WT	WT	WT	WT
91	A.M	87	WT	HETERO	WT	WT
92	B.Σ	74	HETERO	MUTANT	WT	WT
93	Φ.N	74	HETERO	HETERO	WT	WT
94	Σ.A	85	WT	HETERO	WT	WT
95	N.B	84	WT	WT	WT	WT
96	Δ.M	77	HETERO	HETERO	WT	WT
97	Π.X	73	HETERO	WT	WT	WT

98	Σ.Ε	87	WT	HETERO	WT	WT
99	Χ.Μ	84	WT	HETERO	WT	WT
100	Μ.Σ	81	HETERO	HETERO	WT	WT
101	Σ.Ε	80	HETERO	MUTANT	HETERO	HETERO
102	Μ.Ι	82	WT	MUTANT	WT	WT
103	Β.Π	76	HETERO	HETERO	WT	WT

Πίνακας 7.2: Αποτελέσματα γονοτύπωσης για την ομάδα των ασθενών.

A/A	Όνομα	Ηλικία	Γονότυπος <i>ARMS2</i>	Γονότυπος <i>CD14</i>	Γονότυπος <i>TRL4</i> <i>Asp299Gly</i>	Γονότυπος <i>TLR4</i> <i>Thr399Ile</i>
1	Μ.Σ	79	HETERO	MUTANT	WT	WT
2	Α.Γ	85	HETERO	HETERO	WT	WT
3	Κ.Γ	89	HETERO	HETERO	WT	WT
4	Μ.Α	83	HETERO	MUTANT	WT	WT
5	Γ.Γ	72	WT	HETERO	WT	WT
6	Α.Ι	83	HETERO	WT	WT	WT
7	Π.Γ	74	WT	HETERO	WT	WT
8	Β.Μ	85	WT	HETERO	WT	WT
9	Β.Α	75	WT	WT	WT	WT
10	Κ.Α	82	WT	HETERO	WT	WT
11	Α.Ι	86	WT	HETERO	WT	WT
12	Μ.Σ	75	HETERO	WT	WT	WT
13	Α.Μ	85	MUTANT	HETERO	WT	WT
14	Τ.Φ	78	HETERO	HETERO	WT	WT
15	Α.Α	83	WT	HETERO	WT	WT
16	Ψ.Ε	64	MUTANT	MUTANT	WT	WT
17	Σ.Α	81	WT	HETERO	WT	WT
18	Α.Γ	58	HETERO	WT	WT	WT
19	Κ.Γ	88	MUTANT	HETERO	WT	WT
20	Μ.Ι	76	WT	HETERO	WT	WT
21	Ν.Ε	71	HETERO	MUTANT	WT	WT
22	Κ.Γ	61	HETERO	WT	WT	WT
23	Μ.Μ	79	HETERO	HETERO	WT	WT
24	Κ.Μ	74	HETERO	WT	WT	WT

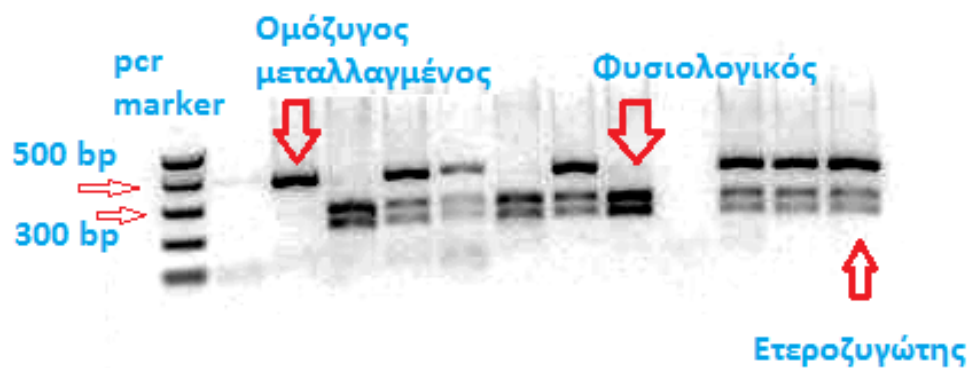
25	B.Δ	73	HETERO	HETERO	WT	WT
26	Γ.B	85	HETERO	HETERO	WT	WT
27	M.A	75	WT	WT	WT	WT
28	Π.Π	80	WT	WT	WT	WT
29	M.K	85	HETERO	WT	WT	WT
30	Π.Δ	81	HETERO	WT	WT	WT
31	T.Γ	71	WT	HETERO	WT	WT
32	Γ.M	79	MUTANT	MUTANT	WT	WT
33	Π.I	72	HETERO	HETERO	WT	WT
34	K.E	77	WT	HETERO	WT	WT
35	A.A	75	HETERO	HETERO	WT	WT
36	Δ.A	61	WT	HETERO	WT	WT
37	Π.Γ	67	HETERO	MUTANT	WT	WT
38	T.N	70	HETERO	WT	WT	WT
39	Σ.X	70	MUTANT	WT	HETERO	HETERO
40	K.Σ	70	WT	MUTANT	HETERO	WT
41	Π.E	69	MUTANT	WT	WT	WT
42	Δ.Z	68	WT	WT	HETERO	HETERO
43	Δ.B	75	HETERO	HETERO	WT	WT
44	B.B	81	MUTANT	MUTANT	HETERO	HETERO
45	Σ.M	78	HETERO	MUTANT	WT	WT
46	X.B	74	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
47	K.E	79	HETERO	HETERO	WT	WT
48	I.E	75	HETERO	WT	WT	WT
49	Λ.A	86	WT	HETERO	WT	WT
50	K.Σ	72	MUTANT	HETERO	WT	WT
51	Γ.E	73	HETERO	HETERO	WT	WT
52	K.Γ	65	WT	HETERO	WT	WT
53	N	69	HETERO	MUTANT	WT	WT
54	M	70	MUTANT	HETERO	WT	WT
55	P.K	73	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
56	M	76	WT	HETERO	HETERO	HETERO
57	M.Π	72	HETERO	WT	WT	WT
58	K	81	HETERO	HETERO	WT	WT
59	T.Φ	74	HETERO	HETERO	HETERO	WT
60	Γ	75	WT	HETERO	WT	WT
61	M.B	75	MUTANT	HETERO	WT	WT

62	Z	73	WT	HETERO	WT	WT
63	A.E	69	WT	HETERO	WT	WT
64	K.T.A	79	WT	HETERO	WT	HETERO
65	A.N	80	WT	HETERO	WT	WT
66	Π.Δ	79	HETERO	WT	WT	WT
67	A.Σ	86	HETERO	HETERO	WT	WT
68	T.Γ	72	MUTANT	WT	WT	WT
69	Z.E	80	HETERO	MUTANT	WT	WT
70	K.O	82	MUTANT	WT	WT	WT
71	Λ.Γ	69	HETERO	WT	WT	WT
72	M.Γ	68	MUTANT	HETERO	WT	WT
73	M.Φ	83	HETERO	WT	WT	WT
74	Γ.B	86	MUTANT	WT	HETERO	HETERO
75	M.M	75	MUTANT	HETERO	WT	WT
76	Δ.I	81	HETERO	HETERO	WT	WT
77	N.Σ	86	WT	HETERO	WT	WT
78	Γ.X	74	MUTANT	HETERO	WT	WT
79	Λ.Π	79	HETERO	HETERO	WT	WT
80	Λ.I	89	MUTANT	MUTANT	HETERO	HETERO
81	Z.A	73	MUTANT	WT	WT	WT
82	T.E	79	HETERO	HETERO	WT	WT
83	Z.M	67	WT	HETERO	WT	WT
84	Π.Γ	80	HETERO	HETERO	WT	WT
85	K.M	78	WT	HETERO	WT	WT
86	X.A	73	HETERO	MUTANT	WT	WT
87	Φ.M	72	HETERO	HETERO	WT	WT
88	Γ.I	66	HETERO	HETERO	WT	WT
89	Σ.K	80	HETERO	WT	WT	WT
90	Σ.N	81	MUTANT	HETERO	WT	WT
91	Σ.Γ	72	WT	HETERO	WT	WT
92	Δ.K	79	MUTANT	MUTANT	WT	WT
93	K.X	80	WT	WT	WT	WT
94	Γ.Σ	57	WT	HETERO	HETERO	HETERO
95	T.Π	87	MUTANT	HETERO	WT	WT
96	X.M	74	HETERO	HETERO	WT	WT
97	M.Θ	81	HETERO	HETERO	WT	WT
98	Σ.I	82	HETERO	MUTANT	WT	WT

99	T.Γ	79	WT	HETERO	WT	WT
100	K.K	96	WT	HETERO	WT	WT
101	P.I	57	WT	HETERO	WT	HETERO
102	Π.Γ		HETERO	HETERO	WT	WT
103	N.Π	84	HETERO	HETERO	WT	WT
104	X.K	81	WT	WT	WT	WT
105	Π.Ε	87	HETERO	HETERO	HETERO	WT
106	Π.Γ	87	HETERO	WT	WT	WT
107	X.K	77	HETERO	HETERO	WT	WT
108	M.E	76	MUTANT	HETERO	WT	WT
109	N.X	68	MUTANT	WT	WT	WT
110	Π.Μ		HETERO	MUTANT	HETERO	WT
111	T.E	86	HETERO	WT	WT	WT
112	T.A	82	WT	HETERO	WT	WT
113	M.H	65	HETERO	HETERO	WT	WT
114	Γ.A	80	WT	HETERO	WT	WT
115	K.I	70	WT	HETERO	WT	WT
116	K.X	83	MUTANT	HETERO	WT	WT
117	P.M	87	HETERO	MUTANT	WT	WT
118	T.E		HETERO	MUTANT	WT	WT
119	K.M	57	HETERO	MUTANT	WT	WT
120	K.K	61	MUTANT	MUTANT	HETERO	WT

7.2 Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό A69S του γονιδίου ARMS2 (LOC387715)

Η συμβατική PCR που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου *ARMS2*, το πρωτόκολλο και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της οποίας αναφέρεται λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 6 οδήγησε στην ενίσχυση ενός προϊόντος μήκους 449 bp, χωρίς μη ειδικά προϊόντα όπως φάνηκε από την ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης 1%. Ακολούθησε επώαση με την περιοριστική ενδονουκλεάση *PvuII* και ηλεκτροφόρηση σε γέλη υψηλής διακριτικής ικανότητας 3%, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 7.1**:

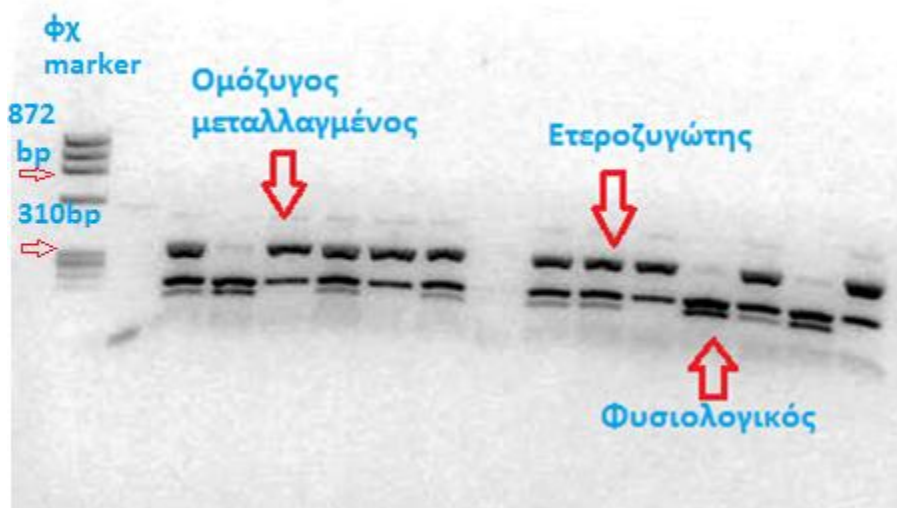


Εικόνα 7.1: Ηλεκτροφόρηση υψηλής διακριτικής ικανότητας για την ανάλυση του πολυμορφισμού A69S. Αριστερά στην πρώτη θέση τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους (PCR MW-marker, NEB, ΗΠΑ) και στις επόμενες θέσεις τα δείγματα.

Στην περίπτωση που υπάρχει ο πολυμορφισμός σε ομόζυγη κατάσταση, τότε το ένζυμο παραμένει ανενεργό και δεν αποκόπτει την ενισχυθείσα περιοχή και το PCR προϊόν παραμένει 449bp συνεπώς, βλέπουμε μόνο μια ζώνη στην ηλεκτροφόρηση. Στην περίπτωση που ο πολυμορφισμός απουσιάζει, η περιοριστική ενδονουκλεάση αποκόπτει την περιοχή σε δύο κομμάτια 259 και 190 bp, ενώ αν το δείγμα πρόκειται για ετεροζυγώτη στην ηλεκτροφόρηση θα παρατηρηθούν τρεις ζώνες 449, 259 και 190 bp.

7.3 Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό C(260)T του γονιδίου CD14 (LOC)

Η συμβατική PCR που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου *CD14*, το πρωτόκολλο και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της οποίας αναφέρεται λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 6 οδήγησε στην ενίσχυση ενός προϊόντος μήκους 561 bp, χωρίς μη ειδικά προϊόντα όπως φάνηκε από την ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης 1%. Ακολούθησε επώαση με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Hae III* και ηλεκτροφόρηση σε γέλη υψηλής διακριτικής ικανότητας 3%, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 7.2** :

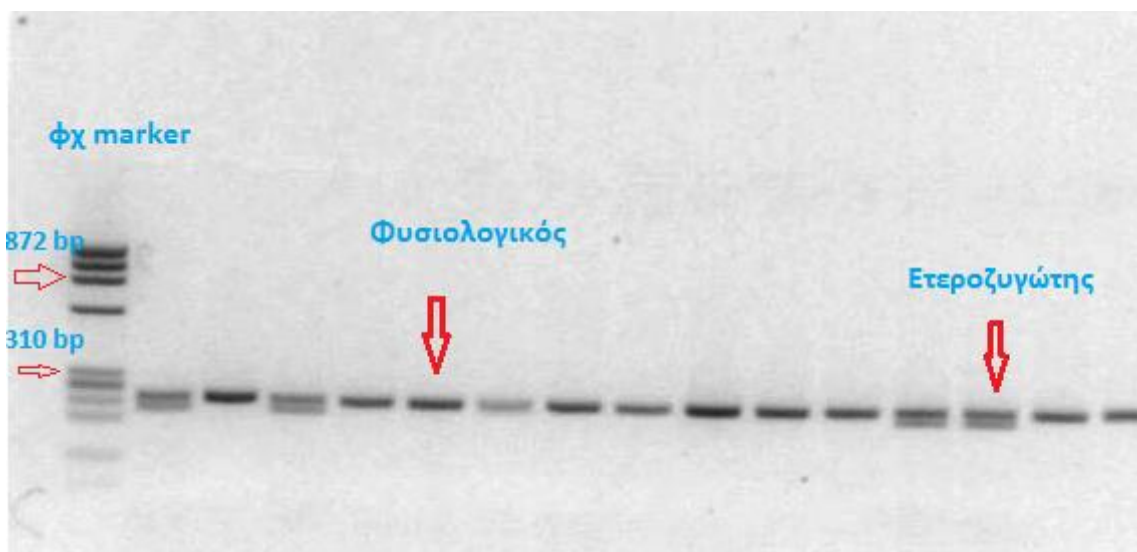


Εικόνα 7.2: Ηλεκτροφόρηση υψηλής διακριτικής ικανότητας για την ανάλυση του πολυμορφισμού C260T. Αριστερά στην πρώτη θέση τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους (φχ 174 PCR marker, Bioline, Αγγλία) και στις επόμενες θέσεις τα δείγματα.

Στην περίπτωση που υπάρχει ο πολυμορφισμός σε ομόζυγη κατάσταση τότε το περιοριστικό ένζυμο αποκόπτει την περιοχή σε δύο κομμάτια 360 bp και 201 bp. Στην περίπτωση που ο πολυμορφισμός απουσιάζει, ομόζυγος φυσιολογικός, τότε η περιοριστική ενδονουκλεάση επίσης κόβει σε κομμάτια των 204 bp, 201 bp και 156 bp τα οποία φαίνονται ως δύο ζώνες, καθώς δεν διαχωρίζονται, ενώ αν πρόκειται για ετεροζυγώτη τότε η περιοριστική ενδονουκλεάση κόβει στα εξής κομμάτια 360 bp, 204 bp, 201 bp και 156 bp. Τα κομμάτια αυτά φαίνονται ως τρεις ζώνες, καθώς τα κομμάτια 204 bp και 201 bp δεν διαχωρίζονται και φαίνονται ως μια ενιαία μπάντα στη γέλη αγαρόζης.

7.4 Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό Asp299Gly του γονιδίου TLR4 (LOC7099)

Η συμβατική PCR που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου *TLR4*, το πρωτόκολλο και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της οποίας αναφέρεται λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 6 οδήγησε στην ενίσχυση ενός προϊόντος μήκους 249 bp, χωρίς μη ειδικά προϊόντα όπως φάνηκε από την ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 1%. Ακολούθησε επώαση με την περιοριστική ενδονουκλεάση *NcoI* και ηλεκτροφόρηση σε γέλη υψηλής διακριτικής ικανότητας 3%, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 7.3:**

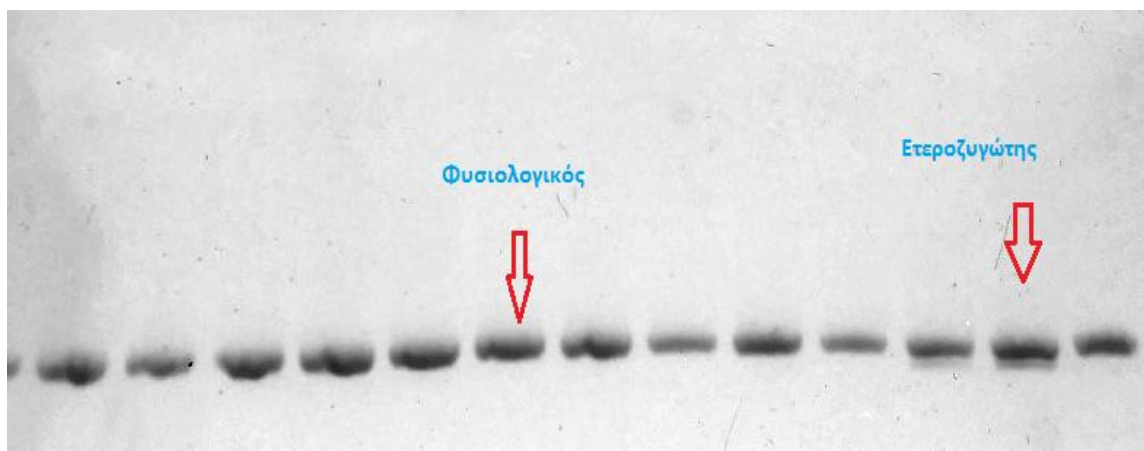


Εικόνα 7.3: Ηλεκτροφόρηση υψηλής διακριτικής ικανότητας για την ανάλυση του πολυμορφισμού *Asp299Gly*. Αριστερά στην πρώτη θέση τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους (PCR marker) και στις επόμενες θέσεις τα δείγματα.

Στην περίπτωση που ο πολυμορφισμός απουσιάζει η περιοριστική ενδονουκλεάση παραμένει ανενεργή και δεν αποκόπτει την ενισχυθείσα περιοχή και το PCR προϊόν παραμένει 249 bp, ενώ στην περίπτωση που υπάρχει ο πολυμορφισμός τότε από 249 bp γίνεται 223 bp. Στον ετεροζυγώτη ανιχνεύονται δύο ζώνες 249 bp και 223 bp οι οποίες διαχωρίζονται στη γέλη υψηλής διακριτικής ικανότητας. Για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό δεν υπήρξε ομόζυγο μεταλλαγμένο δείγμα.

7.5 Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό Thr399Ile του γονιδίου TLR4 (LOC7099)

Η συμβατική PCR που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου *TLR4*, το πρωτόκολλο και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της οποίας αναφέρεται λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 6 οδήγησε στην ενίσχυση ενός προϊόντος μήκους 406 bp, χωρίς μη ειδικά προϊόντα όπως φάνηκε από την ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης 1%. Ακολούθησε επώαση με την περιοριστική ενδονουκλεάση *HinfI* και ηλεκτροφόρηση σε γέλη υψηλής διακριτικής ικανότητας 3%, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 7.4:**



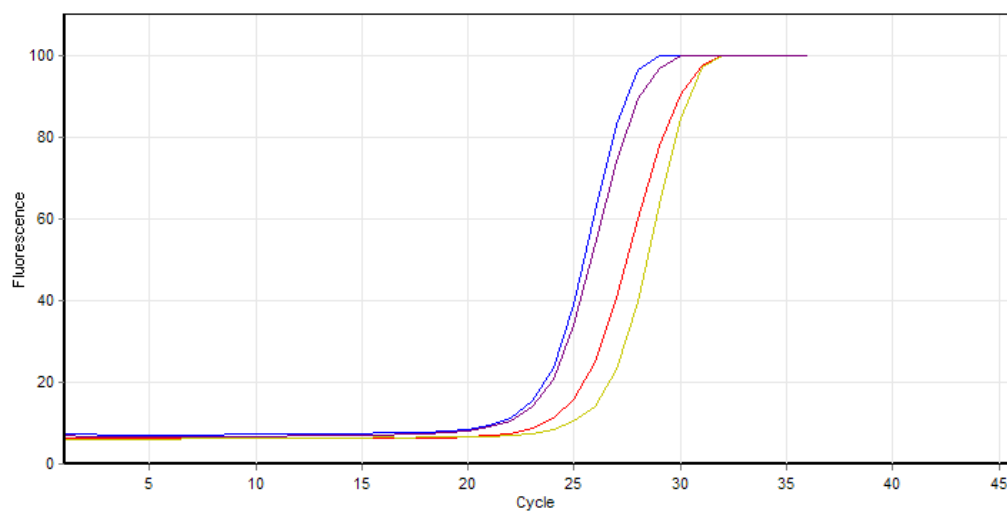
Εικόνα 7.4: Ηλεκτροφόρηση υψηλής διακριτικής ικανότητας για την ανάλυση του πολυμορφισμού Thr399Ile. Αριστερά στην πρώτη θέση τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους (PCR marker) και στις επόμενες θέσεις τα δείγματα.

Στην περίπτωση που ο πολυμορφισμός απουσιάζει η περιοριστική ενδονουκλεάση παραμένει ανενεργή και δεν αποκόπτει την ενισχυθείσα περιοχή και το PCR προϊόν παραμένει 406 bp, ενώ στην περίπτωση που υπάρχει τότε από 406 bp γίνεται 377 bp. Στον ετεροζυγώτη ανιχνεύονται δύο ζώνες 406 bp και 377 bp οι οποίες διαχωρίζονται στη γέλη υψηλής διακριτικής ικανότητας. Για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό δεν υπήρξε ομόζυγος μεταλλαγμένος.

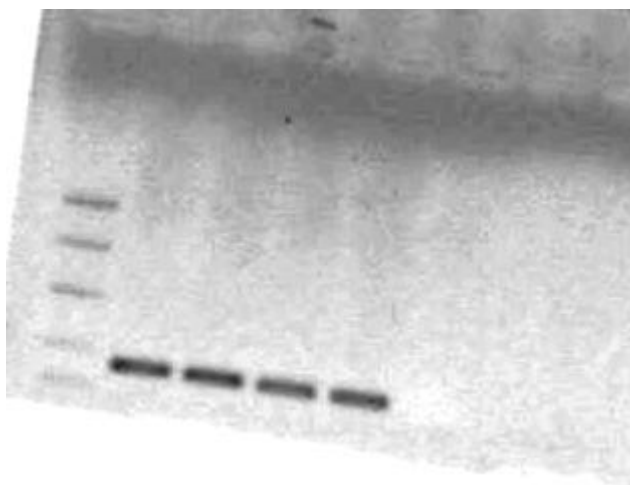
7.6 Αποτελέσματα HRMA ανάλυσης

Επειδή η μέθοδος PCR-RFLP είναι χρονοβόρα έγινε προσπάθεια ανάπτυξης μια πιο οικονομικής και γρήγορης μεθόδου για τη γονοτύπωση. Έτσι αναπτύχθηκε HRMA μεθοδολογία και έγινε σύγκριση με τη μέθοδο PCR-RFLP για τον ένα από τους δύο πολυμορφισμούς του TLR4 γονιδίου (Asp299Gly) και δεν εξετάστηκαν όλα τα δείγματα, αλλά έγινε δειγματοληπτικός έλεγχος τόσο για δείγματα των υγιών μαρτύρων όσο και στα δείγματα των ασθενών. Τα αποτελέσματα φαίνονται στους παρακάτω πίνακες :

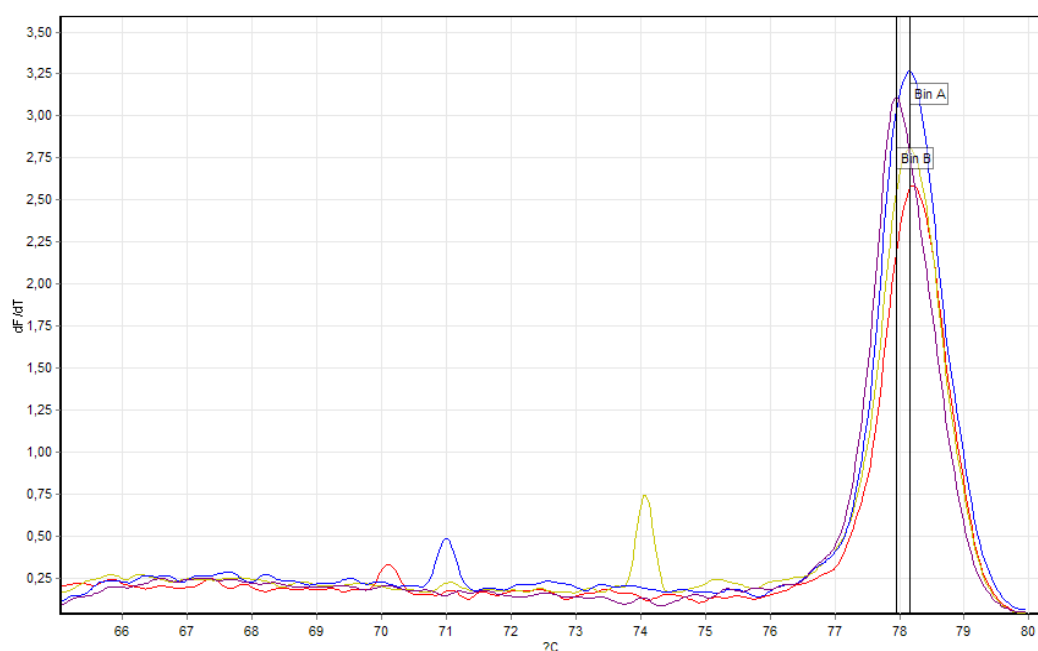
7.6.1 Αποτελέσματα HRMA για τον πολυμορφισμό Asp299Gly



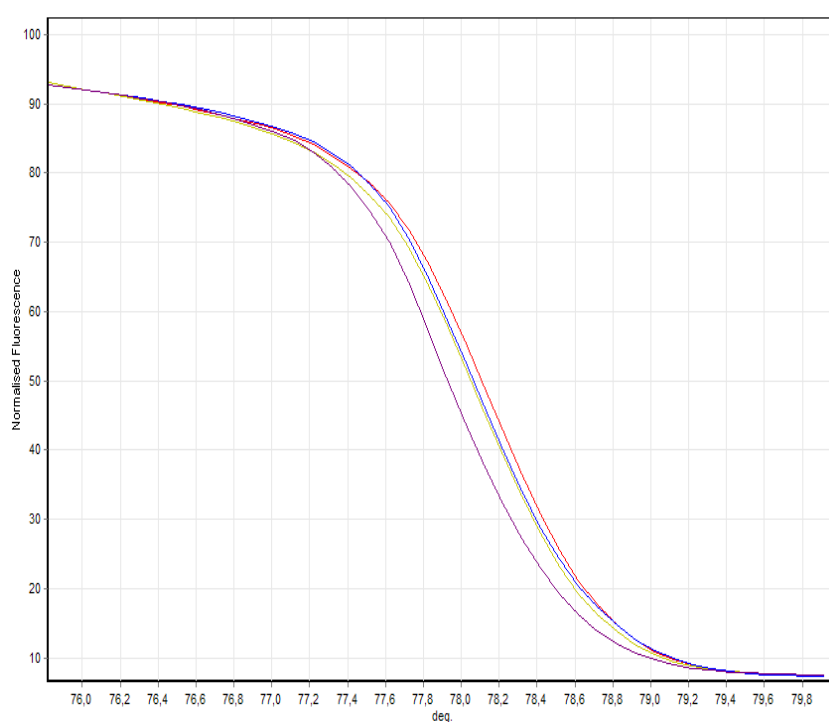
Εικόνα 7.5α: Φαίνεται η ενίσχυση (Quantification) για ένα γνωστό ετεροζυγώτη (μωβ χρώμα) και για τους ομόζυγους φυσιολογικούς (κόκκινο, μπλε και κίτρινο χρώμα) για τον πολυμορφισμό Asp299Gly. Δεν υπήρξε δείγμα ομόζυγου μεταλλαγμένου.



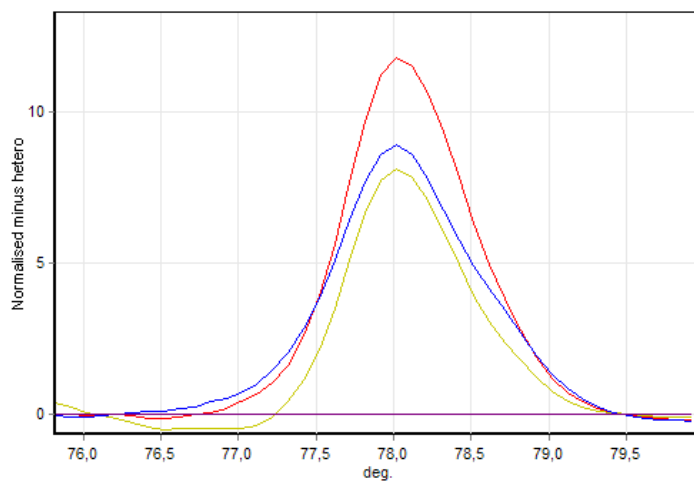
Εικόνα 7.5β: Επιβεβαίωση της ενίσχυσης του επιθυμητού προϊόντος για τη μεθοδολογία HRMA με ηλεκτροφόρηση σε γέλη 1%.



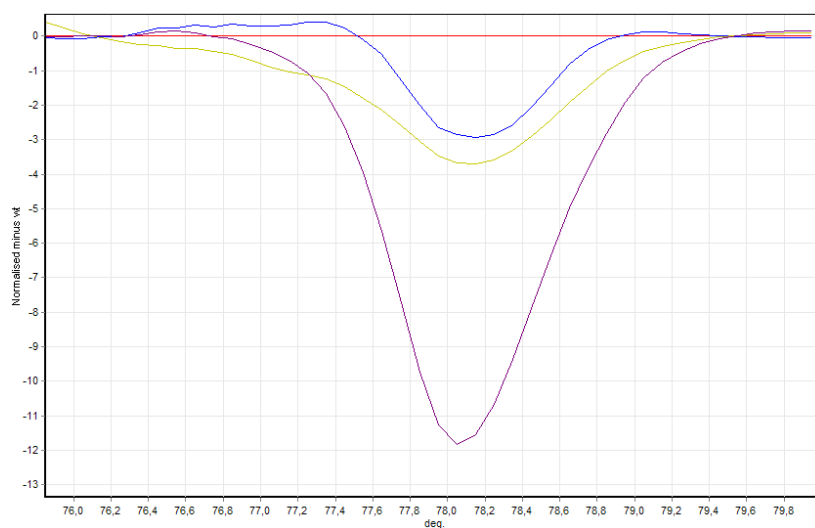
Εικόνα 7.6: Θερμοκρασίες τήξης για το φυσιολογικό αλλήλιο (Bin A) και για το μεταλλαγμένο (Bin B).



Εικόνα 7.7: Απεικονίζονται τα δείγματα ενός ετεροζυγώτη (μωβ χρώμα) και τριών ομόζυγων φυσιολογικών (κίτρινο, κόκκινο και μπλε χρώμα). Η ανάλυση καμπυλών τήξης γίνεται με το normalized graph.



Εικόνα 7.8: Απεικονίζονται τα δείγματα ενός ετεροζυγώτη (μωβ χρώμα) και τριών ομόζυγων φυσιολογικών (κίτρινο, κόκκινο και μπλεχρώμα) Η ανάλυση καμπυλών τήξης *difference graph* γίνεται με βάση τον ετεροζυγώτη (*base line*).



Εικόνα 7.9: Απεικονίζονται τα δείγματα ενός ετεροζυγώτη (μωβ χρώμα) και τριών ομόζυγων φυσιολογικών (κίτρινο, κόκκινο και μπλε χρώμα). Η ανάλυση καμπυλών τήξης *difference graph* γίνεται με βάση έναν ομόζυγο φυσιολογικό (κόκκινο χρώμα).

➤ **Αποτελέσματα HRMA ανάλυσης για τον πολυμορφισμό Asp299Gly**

Πίνακας 7.3 : Αποτελέσματα HRMA ανάλυσης για τα δείγματα των υγιών μαρτύρων, όπου συμβολίζεται με το γράμμα(E), για τον πολυμορφισμό Asp299Gly.

<i>A/A</i>	<i>Όνομα</i>	<i>Γονότυπος με HRMA</i>	<i>Γονότυπος με την PCR-RFLP</i>
E7	T.M	HETERO	HETERO
E15	Π.Γ	HETERO	HETERO
E27	Ψ.Π	WT	WT
E31	Δ.Γ	WT	WT
E36	K.I	VARIATION	WT
E42	B.E	VARIATION	WT
E48	M.Π	VARIATION	WT
E74	A.A	VARIATION	WT
E81	Σ.Σ	WT	WT
E94	Σ.Α	WT	WT
E101	Σ.Ε	VARIATION	WT

Πίνακας 7.4: Αποτελέσματα HRMA ανάλυσης για τα δείγματα ασθενών, όπου συμβαλίζεται με το γράμμα (H), για τον πολυμορφισμό Asp299Gly.

<i>/A</i>	<i>Όνομα</i>	<i>Γονότυπος με HRMA</i>	<i>Γονότυπος με την PCR-RFLP</i>
H16	T.Φ	VARIATION	WT
H22	K.Γ	WT	WT
H26	K.Γ	WT	WT
H39	Π.Ι	VARIATION	WT
H44	T.N	WT	WT
H45	Σ.Χ	HETERO	HETERO

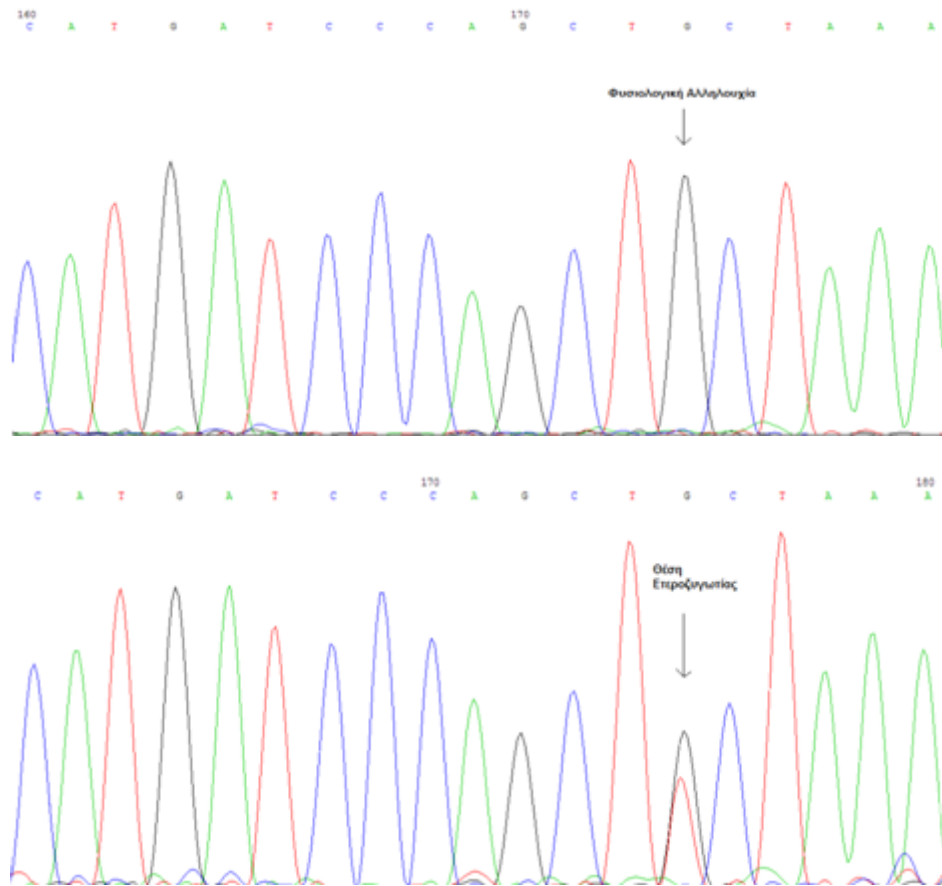
H46	K.Σ	HETERO	HETERO
H48	Δ.Z	HETERO	HETERO
H50	B.B	HETERO	HETERO
H52	X.B	HETERO	HETERO
H58	K.Γ	VARIATION	WT
H61	P.K	VARIATION	HETERO
H62	M	HETERO	HETERO
H65	T.Φ	VARIATION	HETERO
H80	Λ.Γ	VARIATION	WT
H83	Γ.B	HETERO	HETERO
H90	Λ.Γ	HETERO	HETERO
H100	Σ.N	VARIATION	WT
H104	Γ.Σ	HETERO	HETERO
H115	Π.E	HETERO	HETERO
H120	Π.M	VARIATION	HETERO
H130	K.K	HETERO	HETERO

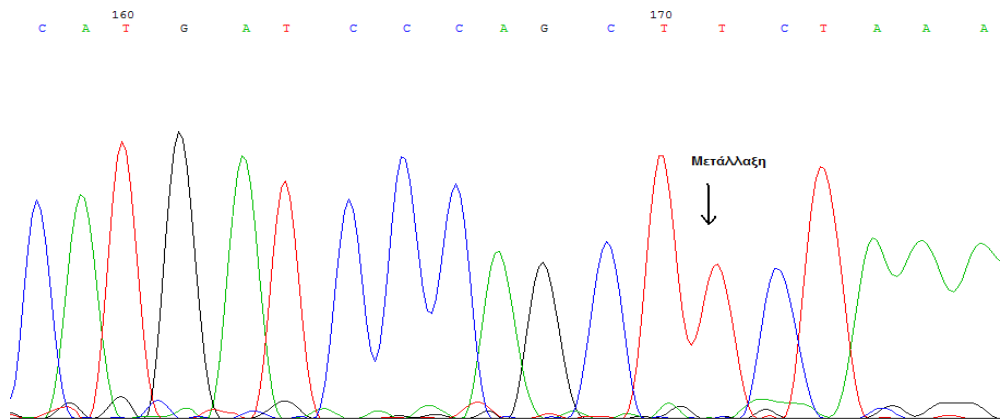
Συνολικά από τα τριάντα τρία (33) δείγματα που ελέγχθηκαν με την HRMA μεθοδολογία τα είκοσι δύο δείγματα (22) επιβεβαιώθηκαν, ενώ εννέα (9) δείγματα έδειξαν παραλλαγή, ενώ σύμφωνα με την PCR-RFLP μεθοδολογία φάνηκε ότι ήταν ομόζυγοι φυσιολογικοί. Στην γενωμική αυτή περιοχή υπάρχουν πολλές DNA παραλλαγές με χαμηλή συχνότητα (minor variants).

7.7 Αποτελέσματα Sequencing

Για την την εξασφάλιση της ορθότητας των αποτελεσμάτων της μεθόδου PCR-RFLP ήταν απαραίτητη η επαλήθευση τους και με τη μέθοδο αναφοράς, DNA Sequencing. Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε για όλα τα γονίδια (*ARMS2*, *CD14*, *TLR4*: Asp299Gly και Thr399Ile και τα αποτελέσματα παρατίθενται στη συνέχεια.

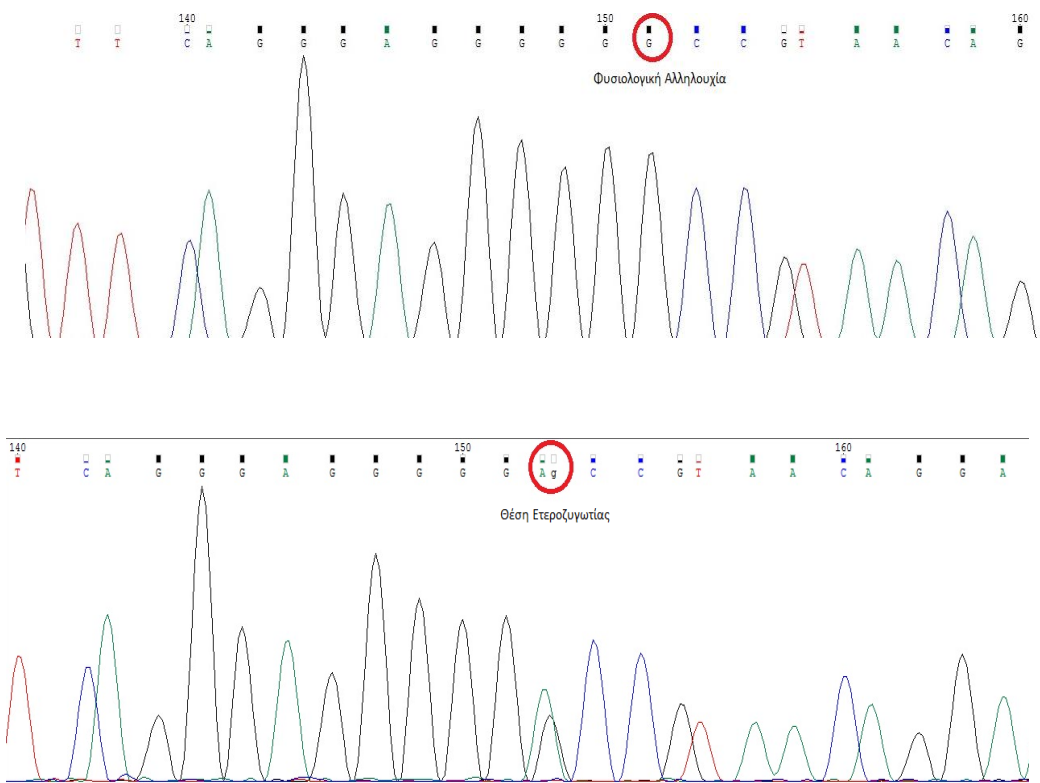
➤ **Αποτελέσματα DNA Sequencing για τον A69S πολυμορφισμό του γονιδίου *ARMS2***

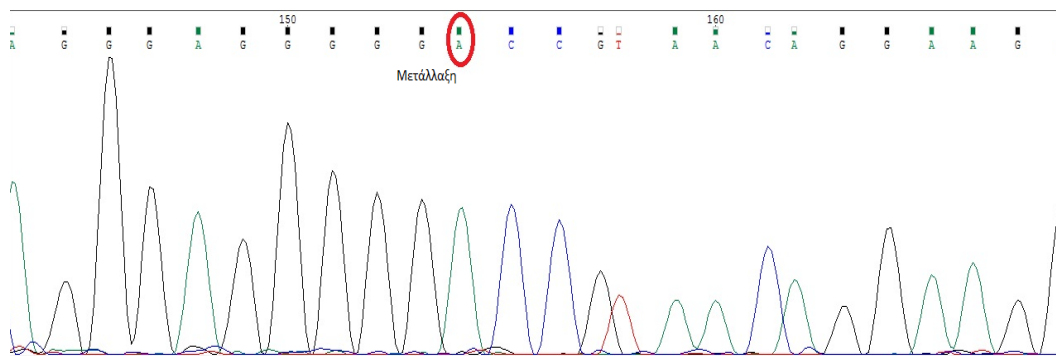




Εικόνα 7.10: Χρωματογραφήματα DNA Sequencing για Α) Ομοζυγώτη Φυσιολογικό Β) Ετεροζυγώτη και Γ) Ομόζυγο μεταλλαγμένο για τον πολυμορφισμό A69S του γονιδίου ARMS2.

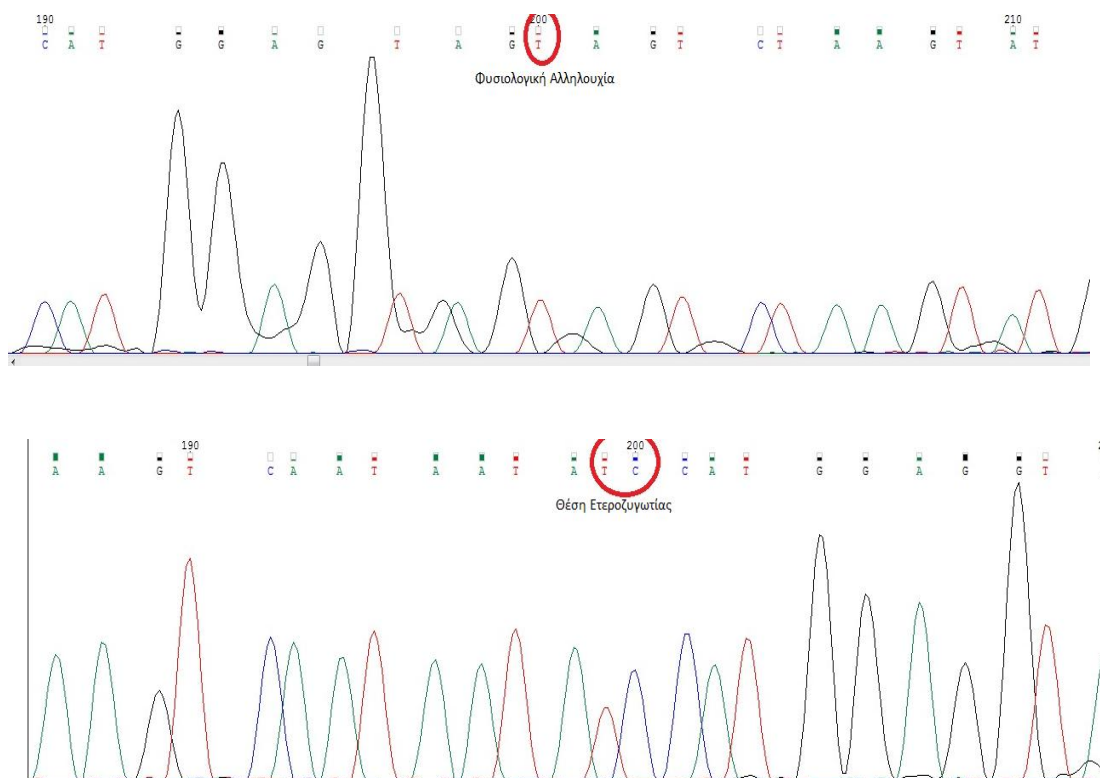
➤ **Αποτελέσματα DNA Sequencing για το C260T πολυμορφισμό του γονιδίου CD14**





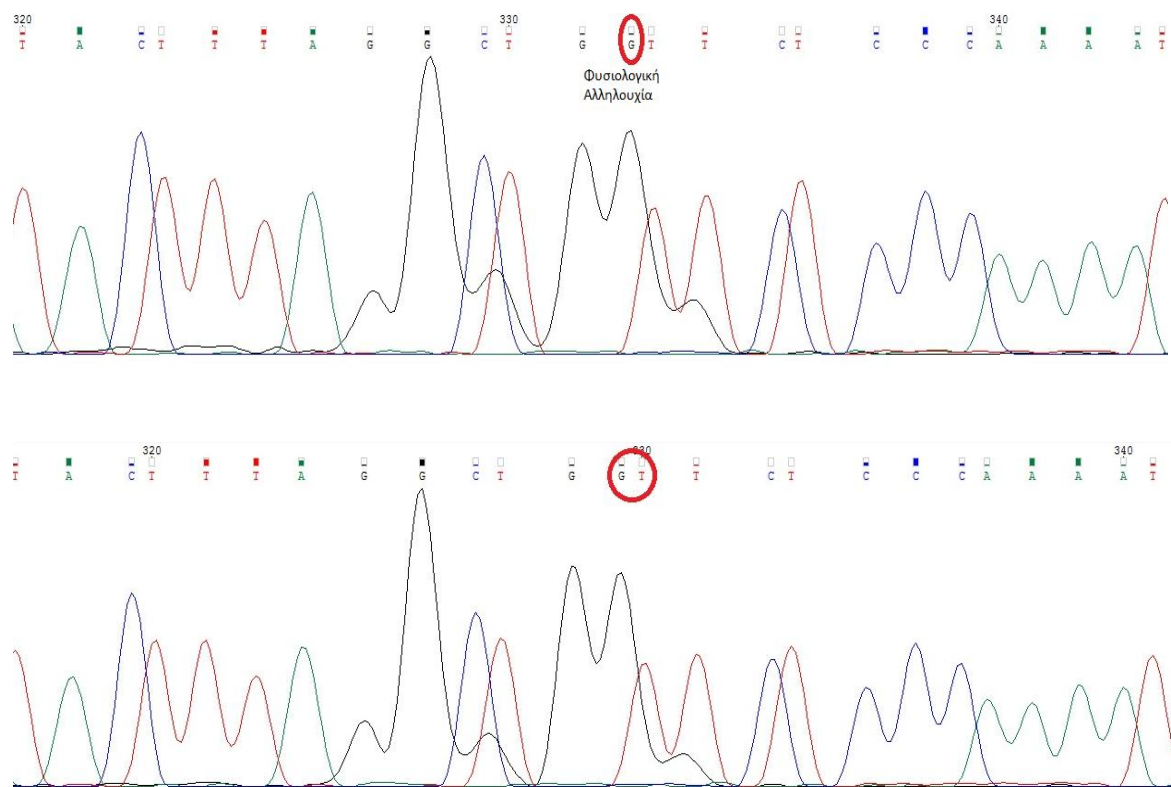
Εικόνα 7.11: Χρωματογραφήματα DNA Sequencing για Α) Ομοζυγώτη Φυσιολογικό Β) Ετεροζυγώτη και Γ) Ομόζυγο μεταλλαγμένο για τον πολυμορφισμό C260T του γονιδίου CD14.

➤ **Αποτελέσματα DNA Sequencing για το γονίδιο TLR4 για τον πολυμορφισμό Asp299Gly**



Εικόνα 7.12: Χρωματογραφήματα DNA Sequencing για Α) Ομοζυγώτη Φυσιολογικό Β) Ετεροζυγώτη για τον πολυμορφισμό Asp299Gly του γονιδίου TLR4.

➤ **Αποτελέσματα DNA Sequencing για το γονίδιο *TLR4* για τον πολυμορφισμό για τον πολυμορφισμό Thr399Ile**



Εικόνα 7.13: Χρωματογραφήματα DNA Sequencing για Α) Ομοζυγώτη Φυσιολογικό Β) Ετεροζυγώτη για τον πολυμορφισμό Thr399Ile του γονιδίου *TLR4*.

7.8 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων με το στατιστικό πακέτο SPSS

7.8.1 Περιγραφική στατιστική ανάλυση για τα ποσοτικά χαρακτηριστικά των μεταβλητών

Πίνακας 7.5: Περιγραφική στατιστική ανάλυση των ποσοτικών μεταβλητών για το σύνολο των δειγμάτων.

Περιγραφική στατιστική για υγιείς και ασθενείς				
		AGE	ΟΞ/ΔΟ	ΟΞ/ΑΟ
N	Valid	220	216	211
	Missing	3	7	12
Mean		77,50	,541	,600
Median		78,00	,600	,600
Std. Deviation		6,640	,3719	,3313
Minimum		57	,0	,0
Maximum		96	1,0	1,0

Πίνακας 7.6: Περιγραφική στατιστική ανάλυση των ποσοτικών μεταβλητών για την ομάδα των υγιών.

Περιγραφική στατιστική για τους υγιείς				
		AGE	ΟΞ/ΔΟ	ΟΞ/ΑΟ
N	Valid	103	103	103
	Missing	0	0	0
Mean		78,82	,811	,816
Median		78,00	,900	,900
Std. Deviation		4,996	,2240	,2226
Minimum		67	,0	,0
Maximum		88	1,0	1,0

Πίνακας 7.7: Περιγραφική στατιστική ανάλυση των ποσοτικών μεταβλητών για την ομάδα των ασθενών.

Περιγραφική στατιστική για τους ασθενείς				
		AGE	ΟΞ/ΔΟ	ΟΞ/ΑΟ
N	Valid	117	113	108
	Missing	3	7	12
Mean		76,33	,296	,395
Median		77,00	,200	,400
Std. Deviation		7,642	,3036	,2846
Minimum		57	,0	,0
Maximum		96	1,0	1,0

7.8.2 Έλεγχος κανονικότητας δεδομένων

Από τον έλεγχο κανονικότητας των δεδομένων των ποσοτικών μεταβλητών στα δείγματα ελήφθησαν τα εξής αποτελέσματα:

Πίνακας 7.8: Έλεγχος κανονικότητας των δεδομένων.

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
AGE	,063	208	,042	,974	208	,001
ΟΞ/ΔΟ	,161	208	,000	,870	208	,000
ΟΞ/ΑΟ	,146	208	,000	,901	208	,000
a. Lilliefors Significance Correction						

Εφόσον τα δεδομένα είναι περισσότερα από 50 λαμβάνουμε υπόψιν τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov και όχι τη δοκιμασία Shapiro-Wilk με το επιθυμητό να είναι ($p > 0,05$).

Συνεπώς, όπως παρατηρούμε με βάση τον πίνακα οι μεταβλητές δεν ακολουθούν κανονική κατανομή και άρα θα χρησιμοποιηθεί η μη-παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney για τη σύγκριση των μέσων όρων ηλικίας και της οπτικής οξύτητας.

Πίνακας 7.9: Δοκιμασία Mann-Whitney για ηλικία και οπτική οξύτητα.

Test Statistics ^a			
	AGE	ΟΞ/ΔΟ	ΟΞ/ΑΟ
Mann-Whitney U	4907,000	1280,50 0	1444,50 0
Wilcoxon W	11810,00 0	7721,50 0	7330,50 0
Z	-2,378	-9,979	-9,368
Asymp. Sig. (2-tailed)	,017	,000	,000
a. Grouping Variable: AMD			

Οι ασθενείς ασφαλώς έχουν χαμηλότερη οπτική οξύτητα από τους υγιείς. Ο διάμεσος (median) είναι λίγο μικρότερος στους ασθενείς (77,00) σε σχέση με τους υγιείς (78,00) [170].

7.9 Συσχέτιση της νόσου με περιβαλλοντικούς και κλινικούς παράγοντες

Με βάση τα δεδομένα μας βρήκαμε ότι στην ομάδα των ασθενών 20 ασθενείς (16,7 %) είχαν γεωγραφική ατροφία και 20 ασθενείς (16,7 %) είχαν drusen ενώ οι υγιείς ασφαλώς δεν είχαν. Στη συνέχεια έγινε περιγραφική στατιστική ανάλυση των ποσοστών στο φύλο και στις περιβαλλοντικές (κάπνισμα) και κλινικές παραμέτρους και στις δύο ομάδες (υγιείς και ασθενείς) και σύγκριση τους με χ^2 δοκιμασία.

Πίνακας 7.10: Συσχέτιση της νόσου με περιβαλλοντικούς και κλινικούς παράγοντες, όπου φαίνεται ο αριθμός και το αντίστοιχο ποσοστό των δειγμάτων (σε παρένθεση) τόσο για το σύνολο, αλλά και για την κάθε ομάδα ξεχωριστά. Επίσης αναγράφεται η τιμή *p-value* (X^2 κατά Pearson ή exact).

	<i>N (%) all</i>	<i>N (%) healthy</i>	<i>N (%) patients</i>	<i>Pearson X^2</i>
SEX				0,067
MALE	110 (49,3)	44 (42,7)	66 (55,0)	
FEMALE	113 (50,7)	59 (57,3)	54 (45,0)	
SMO				0,287
YES	73 (32,7)	30 (29,1)	43 (35,8)	
NO	150 (67,3)	73 (70,9)	77 (64,2)	
SURG. CATAR.				0,155
YES	51 (22,9)	28 (27,2)	23 (19,2)	
NO	172 (77,1)	75 (72,8)	97 (80,8)	
GLAUCOMA				0,016
YES	23 (10,4)	16 (15,7)	7 (5,8)	
NO	199 (89,6)	86 (84,3)	113(94,2)	
ART. HYP.				0,745
YES	41 (18,4)	18 (17,5)	23 (19,2)	
NO	182	85 (82,5)	97 (80,8)	
DIABETES				0,003
YES	55 (24,7)	35 (34,0)	20 (16,7)	
NO	168 (75,3)	68 (66,0)	100 (83,3)	
HEART DISEASE				0,742
YES	37 (16,6)	18 (17,5)	19 (15,8)	
NO	186 (83,4)	85 (82,5)	101 (84,2)	

Οι δυο ομάδες είναι ισοσκελισμένες οριακά στο φύλο (45 % οι γυναίκες ασθενείς έναντι 57% των υγιών) και σε όλες τις κλινικές παραμέτρους που μελετήθηκαν εκτός από δύο, αυτές του γλαυκώματος και του διαβήτη, όπου παρατηρείται μείωσή τους στους ασθενείς AMD.

7.10 Στατιστική ανάλυση για τους πολυμορφισμούς των γονιδίων ARMS2, CD14, TLR4

Ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg, ο έλεγχος χ^2 και οι σχετικοί κίνδυνοι, τα όρια εμπιστοσύνης και οι τιμές AIC για κάθε μοντέλο κληρονομικής των αλληλίων για τα γονίδια ARMS2, CD14 και TLR4 υπολογίσθηκαν με το πρόγραμμα SNPStats και παρατίθενται παρακάτω συμπεριλαμβανομένου και της παραμέτρου του φύλου:

Πίνακας 7.11 : Τεστ Hardy-Weinberg για το γονίδιο ARMS2 (status 0: υγιείς, status 1:ασθενείς).

ARMS2 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=223)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	90	98	35	278	168	0.39
AMD=0	53	40	10	146	60	0.63
AMD=1	37	58	25	132	108	0.85

Πίνακας 7.12: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για το γονίδιο ARMS2 και τα υπολογιζόμενα OR (status 0:υγιείς, status1: ασθενείς)

ARMS2 association with response AMD (n=223, crude analysis)							
Model	Genotype	AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	G/G	53 (51.5%)	37 (30.8%)	1.00	0.0031	302.3	312.5
	G/T	40 (38.8%)	58 (48.3%)	2.08 (1.16-3.72)			
	T/T	10 (9.7%)	25 (20.8%)	3.58 (1.54-8.34)			
Dominant	G/G	53 (51.5%)	37 (30.8%)	1.00	0.0017	302	308.8
	G/T-T/T	50 (48.5%)	83 (69.2%)	2.38 (1.38-4.11)			
Recessive	G/G-G/T	93 (90.3%)	95 (79.2%)	1.00	0.02	306.5	313.3
	T/T	10 (9.7%)	25 (20.8%)	2.45 (1.11-5.38)			

Overdominant	G/G-T/T	63 (61.2%)	62 (51.7%)	1.00	0.15	309.8	316.6
	G/T	40 (38.8%)	58 (48.3%)	1.47 (0.86-2.51)			
Log-additive	---	---	---	1.94 (1.31-2.88)	7e-04	300.4	307.2

Πίνακας 7.13: Συσχέτιση του φύλου με την ασθένεια.

ARMS2 and SEX cross-classification interaction table (n=223, crude analysis)						
	A			Γ		
	AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)	AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)
G/G	19	21	1.00	34	16	0.43 (0.18-1.01)
G/T	23	33	1.30 (0.57-2.94)	17	25	1.33 (0.55-3.19)
T/T	2	12	5.43 (1.07-27.45)	8	13	1.47 (0.50-4.32)
Interaction p-value: 0.21						
SEX within ARMS2 (n=223, crude analysis)						
G/G	AMD=0 AMD=1 OR (95% CI)					
	A	19	21	1.00		
	Γ	34	16	0.43 (0.18-1.01)		
G/T		AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)		
	A	23	33	1.00		
	Γ	17	25	1.02 (0.45-2.31)		
T/T	AMD=0 AMD=1 OR (95% CI)					
	A	2	12	1.00		
	Γ	8	13	0.27 (0.05-1.54)		
Test for interaction in the trend: 0.78						

ARMS2 within SEX (n=223, crude analysis)				
A	AMD=0 AMD=1		OR (95% CI)	
	G/G	19	21	1.00
	G/T	23	33	1.30 (0.57-2.94)
	T/T	2	12	5.43 (1.07-27.45)
Γ	AMD=0 AMD=1		OR (95% CI)	
	G/G	34	16	1.00
	G/T	17	25	3.12 (1.33-7.36)
	T/T	8	13	3.45 (1.19-9.99)
Test for interaction in the trend: 0.21				

7.11 Στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό C(260)T για το γονίδιο CD14

Πίνακας 7.14: Τεστ Hardy-Weinberg για το γονίδιο ARMS2
(status 0: υγείς, status 1:ασθενείς)

CD14 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=223)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	63	124	36	250	196	0.077
AMD=0	34	53	16	121	85	0.68
AMD=1	29	71	20	129	111	0.045

Πίνακας 7.15: Τα μοντέλα κληρομικότητας για το γονίδιο CD14 και τα υπολογιζόμενα OR (status 0:υγιείς, status 1:ασθενείς)

CD14 association with response AMD (n=223, crude analysis)							
Model	Genotype	AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	C/C	34 (33%)	29 (24.2%)	1.00	0.34	311.7	321.9
	C/T	53 (51.5%)	71 (59.2%)	1.57 (0.85-2.89)			
	T/T	16 (15.5%)	20 (16.7%)	1.47 (0.64-3.34)			
Dominant	C/C	34 (33%)	29 (24.2%)	1.00	0.14	309.7	316.5
	C/T-T/T	69 (67%)	91 (75.8%)	1.55 (0.86-2.78)			
Recessive	C/C-C/T	87 (84.5%)	100 (83.3%)	1.00	0.82	311.8	318.6
	T/T	16 (15.5%)	20 (16.7%)	1.09 (0.53-2.23)			
Overdominant	C/C-T/T	50 (48.5%)	49 (40.8%)	1.00	0.25	310.5	317.3
	C/T	53 (51.5%)	71 (59.2%)	1.37 (0.80-2.32)			
Log-additive	---	---	---	1.26 (0.84-1.89)	0.26	310.6	317.4

Πίνακας 7.16: Συσχέτιση του φύλου με την ασθένεια.

CD14 and SEX cross-classification interaction table (n=223, crude analysis)						
	Α			Γ		
	AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)	AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)
C/C	13	14	1.00	21	15	0.66 (0.24-1.81)
C/T	23	41	1.66 (0.67-4.12)	30	30	0.93 (0.37-2.30)
T/T	8	11	1.28 (0.39-4.17)	8	9	1.04 (0.31-3.52)
Interaction p-value: 0.88						

SEX within CD14 (n=223, crude analysis)			
C/C	AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)

	A	13	14	1.00	
	Γ	21	15	0.66 (0.24-1.81)	
C/T	AMD=0 AMD=1 OR (95% CI)				
	A	23	41	1.00	
	Γ	30	30	0.56 (0.27-1.15)	
T/T		AMD=0 AMD=1		OR (95% CI)	
	A	8	11	1.00	
	Γ	8	9	0.82 (0.22-3.06)	
	Test for interaction in the trend: 0.84				

CD14 within SEX (n=223, crude analysis)				
A		AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)
	C/C	13	14	1.00
	C/T	23	41	1.66 (0.67-4.12)
	T/T	8	11	1.28 (0.39-4.17)
Γ		AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)
	C/C	21	15	1.00
	C/T	30	30	1.40 (0.61-3.22)
	T/T	8	9	1.57 (0.49-5.03)
Test for interaction in the trend: 0.88				

7.12 Στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό Asp299Gly του γονιδίου TLR4

Πίνακας 7.17: Τεστ Hardy-Weinberg για τον πολυμορφισμό Asp299Gly του γονιδίου TLR4 (status 0:υγιείς, status 1:ασθενείς).

TLR_299 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=223)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	206	17	0	429	17	1
AMD=0	100	3	0	203	3	1
AMD=1	106	14	0	226	14	1

Πίνακας 7.18: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό *Asp299Gly* του γονιδίου *TLR4* και τα υπολογιζόμενα OR (*status 0:υγιείς, status 1:ασθενείς*)

TLR_299 association with response AMD (n=223, crude analysis)							
Model	Genotype	AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
---	C/C	100 (97.1%)	106 (88.3%)	1.00	0.01	305.2	312.1
	C/T	3 (2.9%)	14 (11.7%)	4.40 (1.23-15.78)			

Πίνακας 7.19: Συσχέτιση του φύλου με την ασθένεια.

TLR_299 and SEX cross-classification interaction table (n=223, crude analysis)						
	A			Γ		
	AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)	AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)
C/C	42	57	1.00	58	49	0.62 (0.36-1.08)
C/T	2	9	3.32 (0.68-16.15)	1	5	3.68 (0.41-32.71)
Interaction p-value: 0.67						

SEX within TLR_299 (n=223, crude analysis)				
C/C		AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)
	A	42	57	1.00
	Γ	58	49	0.62 (0.36-1.08)
C/T		AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)
	A	2	9	1.00
	Γ	1	5	1.11 (0.08-15.53)
Test for interaction in the trend: 0.67				

7.13 Στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό *Thr399Ile* του γονιδίου *TLR4*

Πίνακας 7.20: Τεστ *Hardy-Weinberg* για τον πολυμορφισμό *Thr399Ile* του γονιδίου *TLR4* (*status 0:υγιείς, status 1:ασθενείς*).

TLR_399 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=223)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	209	14	0	432	14	1
AMD=0	101	2	0	204	2	1
AMD=1	108	12	0	228	12	1

Πίνακας 7.21: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό Thr399Ile του γονίδιου TLR4 και τα υπολογιζόμενα OR (status 0:υγιείς, status 1:ασθενείς).

TLR_399 association with response AMD (n=223, crude analysis)							
Model	Genotype	AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
---	A/A	101 (98.1%)	108 (90%)	1.00	0.0088	305	311.8
	A/G	2 (1.9%)	12 (10%)	5.61 (1.23-25.68)			

Πίνακας 7.22: Συσχέτιση του φύλου με την ασθένεια.

TLR_399 and SEX cross-classification interaction table (n=223, crude analysis)						
	A			Γ		
	AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)	AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)
A/A	43	59	1.00	58	49	0.62 (0.36-1.06)
A/G	1	7	5.10 (0.61-43.01)	1	5	3.64 (0.41-32.33)
Interaction p-value: 0.92						
SEX within TLR_399 (n=223, crude analysis)						
A/A	AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)			
	A	43	59	1.00		
	Γ	58	49	0.62 (0.36-1.06)		
A/G	AMD=0	AMD=1	OR (95% CI)			
	A	1	7	1.00		
	Γ	1	5	0.71 (0.04-14.35)		
Test for interaction in the trend: 0.92						

7.14 Ανάλυση απλοτύπου για το *TLR4* γονίδιο με τους δύο πολυμορφισμούς Asp299Gly και Thr399Ile

Η ανάλυση απλοτύπου πραγματοποιήθηκε μόνο για το γονίδιο *TLR4* καθώς στο συγκεκριμένο γονίδιο εδράζονται οι δύο πολυμορφισμοί που εντοπίζονται στο ίδιο χρωμόσωμα από τους τέσσερις που μελετήθηκαν και μέσω της ανάλυσης θελήσαμε να διαπιστώσουμε εάν αυτοί οι δύο πολυμορφισμοί κληρονομούνται μαζί.

Linkage disequilibrium analysis

D statistic

	TLR_299	TLR_399
TLR_299	.	0.0211
TLR_399	.	.

D' statistic

	TLR_299	TLR_399
TLR_299	.	0.6984
TLR_399	.	.

r statistic

	TLR_299	TLR_399
TLR_299	.	0.6316
TLR_399	.	.

P-values

	TLR_299	TLR_399
TLR_299	.	0
TLR_399	.	.

Από την παραπάνω ανάλυση φαίνεται ότι το D' αλλά και το υπολογιζόμενο r^2 (0,398) να είναι μακριά από τη μονάδα 1 και συνεπώς οι δύο πολυμορφισμοί του γονιδίου δεν είναι ιδιαίτερα συνδεδεμένοι.

Πίνακας 7.23: Συχνότητες απλοτύπου.

Haplotype frequencies estimation (n=223)						
	TLR_299	TLR_399	Total	group.0	group.1	Cumulative frequency
1	C	A	0.9528	0.9805	0.9289	0.9528
2	T	G	0.0223	0.0048	0.0372	0.975
3	T	A	0.0158	0.0098	0.0211	0.9909
4	C	G	0.0091	0.0049	0.0128	1
Haplotype association with response (n=223, crude analysis)						
	TLR_299	TLR_399	Freq	OR (95% CI)	P-value	
1	C	A	0.9528	1.00	---	
2	T	G	0.0223	8.66 (1.06 - 70.82)	0.045	
3	T	A	0.0158	2.40 (0.46 - 12.67)	0.3	
rare	*	*	0.0091	2.88 (0.29 - 28.19)	0.36	
Global haplotype association p-value: 0.036						

7.15 Δισδιάστατοι πίνακες συνάφειας (Crosstabs) για την ομάδα των ασθενών του πολυμορφισμού *ARMS2* (με επιλογή του dominant χαρακτήρα κληρονόμησης) με τους περιβαλλοντικούς και κλινικούς παράγοντες

Στη συνέχεια, καθώς ο πολυμορφισμός *ARMS2* έδωσε ισχυρή συσχέτιση με το νόσημα ενώ το *CD14* όχι και οι δύο πολυμορφισμοί του *TLR4* είναι σπάνιοι, έγινε συσχέτιση των κλινικών παραμέτρων μόνο με τον πολυμορφισμό *ARMS2* (επιλέχθηκε μόνο το dominant μοντέλο κληρονόμησης) μέσα μόνο στην ομάδα των ασθενών.

Πίνακας 7.24: Συσχέτιση του πολυμορφισμού ARMS2 με τους περιβαλλοντικούς και κλινικούς παράγοντες.

N			
	RISK	NON-RISK	Pearson X ²
SMO			0,760
YES	29	14	
NO	54	23	
SURG. CATAR.			0,584
YES	17	6	
NO	66	31	
GLAUCOMA			0,894
YES	5	2	
NO	78	35	
ART.HYP.			0,648
YES	15	8	
NO	68	29	
DIABETES			0,331
YES	12	8	
NO	71	29	
HEART DISEASE			0,246
YES	11	8	
NO	72	29	

7.16 Διωνυμική Λογαριθμιστική Παλινδρόμηση (Binary Logistic Regression) του συνόλου των δειγμάτων με όλους τους γονότυπους (εκτός του πολυμορφισμού C260T για το γονίδιο CD14)

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η δυνατότητα πρόβλεψης του νοσήματος με βάση μόνο τους πολυμορφισμούς που έχουν συσχέτιση με το νόσημα και στη συνέχεια προστέθηκαν περιβαλλοντικοί και κλινικοί παράγοντες. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες 7.25 και 7.26.

Πίνακας 7.25: Πρόβλεψη της ασθένειας με βάση μόνο τους γονοτύπους.

Variables in the Equation									
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
Step 1	TLR_299	,833	,762	1,195	1	,274	2,301	,516	10,248
	TLR_399	1,246	,898	1,925	1	,165	3,477	,598	20,222
	ARMS2dom	,860	,284	9,153	1	,002	2,364	1,354	4,128
	Constant	-3,050	1,032	8,739	1	,003	,047		
a. Variable(s) entered on step 1: TLR_299, TLR_399, ARMS2dom.									

Πίνακας 7.26: Πρόβλεψη της ασθένειας με βάση και τους περιβαλλοντικούς και κλινικούς παράγοντες.

Variables in the Equation									
	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)		
							Lower	Upper	
TLR_299	,879	,807	1,185	1	,276	2,408	,495	11,715	
TLR_399	,996	,930	1,145	1	,285	2,706	,437	16,757	
ARMS2dom	,882	,302	8,528	1	,003	2,417	1,337	4,370	
SMO	,605	,335	3,253	1	,071	1,830	,949	3,531	
SURG.CAT	-,495	,357	1,927	1	,165	,609	,303	1,226	
GLAUC	-1,125	,513	4,815	1	,028	,325	,119	,887	
ART.HYP	,148	,403	,135	1	,714	1,159	,526	2,555	
DIABET	-,902	,346	6,790	1	,009	,406	,206	,800	
HEARTDIS	-,339	,402	,711	1	,399	,712	,324	1,567	
Constant	-2,819	1,116	6,383	1	,012	,060			

a. Variable(s) entered on step 1: TLR_299, TLR_399, ARMS2dom, SMO, SURG.CAT, GLAUC, AORT.HYP, DIABET, HEARTDIS.

Στην εξέταση όλων των πολυμορφισμών μαζί αλλά και των κλινικών δεδομένων, το ARMS2 (επιλέχθηκε μόνο το dominant μοντέλο κληρονόμησης) παραμένει ισχυρός, ανεξάρτητος προβλεπτικός παράγων κινδύνου, ενώ το γλαύκωμα και ο διαβήτης είναι προστατευτικοί παράγοντες (είχε διαπιστωθεί η διαφορά των ποσοστών τους και με χ^2 δοκιμασία μεταξύ ασθενών και υγιών).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8ο : Συζήτηση-Συμπεράσματα

8.1 Συμπεράσματα – Συζήτηση-Μελλοντικές κατευθύνσεις

Η ΗΕΩΚ αποτελεί μια συχνή εκφυλιστική νόσο του οφθαλμού με μεγάλη κληρονομικότητα, κύριο χαρακτηριστικό της οποίας είναι η παρουσία μικρών εναποθέσεων, των drusen. Ακόμα παραμένει άγνωστος ο παθογενετικός μηχανισμός που ευθύνεται για τη δημιουργία τους και πώς τα συσσωματώματα των λιπιδίων, πρωτεϊνών και υδατανθράκων οδηγούν στην εκφύλιση των φωτοϋποδοχέων και στη νεοαγγείωση του χοριοειδούς χιτώνα, γεγονός που επηρεάζει τη δομή και τη λειτουργικότητα της ωχράς κηλίδας, ενός καίριου σημείου για την κεντρική όραση. Επειδή η αιτιοπαθογένεια της νόσου δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητή ως προς το γενεσιουργό της αίτιο αποτέλεσε ένα ιδανικό πεδίο μελέτης για τους ερευνητές με στόχο την ανακάλυψη και συσχέτιση βιοδεικτών με την ασθένεια [136]. Από τις μελέτες αυτές έχει επισημανθεί ο σημαντικός ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος, του οξειδωτικού στρες, του μεταβολισμού των λιπιδίων και των περιβαλλοντικών παραγόντων στην ανάπτυξη της ασθένειας.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το προσδόκιμο ζωής στον δυτικό κόσμο έχει αυξηθεί κατά πολύ η ΗΕΩΚ αποτελεί πλέον ένα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας το οποίο έχει σημαντικές κοινωνικές και οικονομικές επιπτώσεις, καθώς σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) αποτελεί την πρώτη σε συχνότητα αιτία μη αναστρέψιμης τύφλωσης παγκοσμίως στον ανεπτυγμένο κόσμο. Ο συνδυασμός της σοβαρής αναπηρίας που προκαλείται από την ασθένεια με την έλλειψη θεραπείας για τη ξηρή μορφή της ασθένειας, αλλά και το πόσο κοστοβόρα είναι η θεραπεία της υγρής μορφής της ασθένειας καθιστούν επιτακτική την ανάγκη εφαρμογής προληπτικών μέτρων και αναζήτησης νέων θεραπειών. Στο πλαίσιο αυτό ερευνητές εστιάζουν στην κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών γνωστών πολυμορφισμών που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της ασθένειας και στοχεύουν στην ανακάλυψη νέων σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς παράγοντες που προδιαθέτουν για την εμφάνιση της νόσου με στόχο να προσδιοριστούν ομάδες αυξημένου κινδύνου εμφάνισης της ασθένειας που χρήζουν τακτική παρακολούθηση ως ένα μέτρο έγκαιρης διάγνωσης της ασθένειας στα πρώιμα στάδια. Εκτός αυτού ο προσδιορισμός τέτοιων γενετικών πολυμορφισμών συμβάλλει στην ανακάλυψη νέων μέσων θεραπείας και εφαρμογής τους με βάση ενός εξατομικευμένου γενετικού προφίλ των ασθενών μέσω φαρμακογενωμικών μελετών.

Σκοπός της μελέτης ήταν η αξιολόγηση του επιπολασμού του γνωστού πολυμορφισμού A69S του γονιδίου *ARMS2* και η διερεύνηση των πολυμορφισμών C260T του γονιδίου *CD14* (για

πρώτη φορά) και των Asp299Gly και Thr399Ile του γονιδίου *TLR4* ως προς τη συσχέτισή τους με την ασθένεια στον ελληνικό πληθυσμό.

Ο πολυμορφισμός A69S (rs10490924) του γονιδίου *ARMS2* εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 10q26 και έχει αναγνωριστεί από πολλές μελέτες σύνδεσης ότι σχετίζεται με την εκδήλωση της ΗΕΩΚ. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για μια μιτοχονδριακή πρωτεΐνη και ο πολυμορφισμός αφορά την αντικατάσταση μιας γουανίνης από μια θυμίνη (g.5270G>T) που οδηγεί σε αλλαγή μιας αλανίνης σε σερίνη στη θέση 69 της πρωτεΐνης (p.A69S) και πιθανώς ενέχει κάποιο ρόλο στην εξαρτώμενη από το οξειδωτικό στρες βλάβη των φωτοϋποδοχέων και επομένως να προκαλεί κάποια δομικής ή/και λειτουργικής φύσεως μεταβολή.

Ο πολυμορφισμός C(-260T) (rs2569190) είναι ένας λειτουργικός πολυμορφισμός, που εντοπίζεται στην περιοχή του υποκινητή και έχει φανεί ότι επηρεάζει την προφλεγμονώδη απόκριση στα ανθρώπινα λευκοκύτταρα. Η αλλαγή αφορά την αντικατάσταση μιας θυμίνης από μια κυτοσίνη (g.5371 T>C) στη θέση -159 και έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της μεταγραφικής ικανότητας του υποκινητή και συνεπώς μπορεί να επηρεάσει θετικά την παραγωγή του sCD14 και τον καταρράκτη της προφλεγμονώδους απόκρισης π.χ του TNF-α. Δεν έχει ελεγχθεί έως τώρα αναφορικά με τη συσχέτισή του με την εκφύλιση της ωχράς κηλίδας.

Οι πολυμορφισμοί Asp299Gly και Thr399Ile του γονιδίου *TLR4* αρχικά συνδέθηκαν με τις λοιμώξεις από βακτήρια καθώς και τις καρδιαγγειακές ασθένειες, όμως από γενετικές μελέτες έχει βρεθεί ότι υπάρχει συσχέτιση με την ασθένεια της ωχράς κηλίδας και οι μεταλλάξεις αυτές στο γονίδιο έχουν συσχετιστεί με διαφορετική ανταπόκριση στον LPS. Οι αλλαγές για τους πολυμορφισμούς Asp299Gly και Thr399Ile αφορούν μια αλλαγή αδενίνης από γουανίνη (g.13843 A>G) και μια αντικατάσταση κυτοσίνης από θυμίνη (g.14143C>T) αντίστοιχα.

Για τον παραπάνω σκοπό εξετάστηκαν 103 δείγματα DNA περιφερικού αίματος υγιών μαρτύρων και 120 ασθενών με την πιο σοβαρή μορφή της ΗΕΩΚ, οι οποίοι αξιολογήθηκαν οφθαλμολογικά και κατόπιν έγγραφης συγκατάθεσης, επιλέγησαν για να ενταχθούν στη μελέτη. Ο μοναδικός περιορισμός της μελέτης, που θα έπρεπε να ληφθεί υπόψη αφορά την ηλικιακή κατανομή, η οποία αν και θα έπρεπε, στη συγκεκριμένη μελέτη δεν είναι απόλυτα ομοιόμορφη μεταξύ των δύο ομάδων.

Για τη γονοτύπωση των προαναφερθέντων πολυμορφισμών εφαρμόστηκε μεθοδολογία PCR-RFLP για τα γονίδια *ARMS2*, *CD14* και *TLR4* (και για τους δύο πολυμορφισμούς) σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν για ορισμένο αριθμό δειγμάτων που επιλέχθηκαν με τη βοήθεια της μεθόδου αναφοράς DNA Sequencing. Παράλληλα έγινε προσπάθεια ανάπτυξης μεθοδολογίας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMA) για τον έναν πολυμορφισμό του γονιδίου *TLR4*, τον Asp299Gly με απώτερο σκοπό τη σύγκριση των δύο αυτών μεθοδολογιών ως προς την ευκολία, το κόστος και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων τους. Ωστόσο η παρουσία και άλλων μη κλινικά σημαντικών πολυμορφισμών στο υπό εξέταση ενισχυόμενο γονιδιακό τμήμα, μειώνει την αξία της μεθόδου αυτής καθώς θα υπάρχει καθυστέρηση στην αξιολόγηση των ευρημάτων με την αλληλούχιση κάθε ευρήματος με παραλλαγμένη καμπύλη τήξης.

Από τα ευρήματα της γονοτύπωσης και τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τα προγράμματα SNPstats και SPSS που εφαρμόστηκαν εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

1) Οι ετεροζυγώτες *ARMS2* αυξάνονται από το 38,8% στους υγιείς σε 48,3% στους ασθενείς και οι ομοζυγώτες από το 9,7% σε 20,8%. Όντως υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού A69S του γονιδίου *ARMS2* με την ασθένεια στον ελληνικό πληθυσμό, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία, όπως αναφέρει και η Brion σε αντίστοιχη γενετική μελέτη στον ισπανικό πληθυσμό [171] όπου αναφέρει ότι το γονίδιο *ARMS2* συμβάλλει ουσιαστικά στην ανάπτυξη της ασθένειας. Με βάση τα δικά μας αποτελέσματα από τη στατιστική μελέτη για την εξιδρωματική μορφή, HEΩΚ φαίνεται ότι ο πολυμορφισμός A69S εμφανίζει μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ασθένεια με το OR (95% CI) να είναι 2,38 (1,38-4,11, dominant μοντέλο κληρονόμησης). Επίσης παρατηρούμε ότι ο πολυμορφισμός φαίνεται να λειτουργεί δυσμενώς για τις γυναίκες, αφού επηρεάζει και αυτές που εμφανίζουν έστω και ένα μεταλλαγμένο αλληλίο και αυτές που εμφανίζουν και τα δύο μεταλλαγμένα αλληλία με τα ORs (95% CI) να είναι 3,12 (1,33-7,36) και 3,45 (1,19-9,99) αντίστοιχα.

2) Στον ελληνικό πληθυσμό, δε φαίνεται να υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού C260T του γονιδίου *CD14* και της HEΩΚ. Απ'όσον γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν άλλες σχετικές γενετικές μελέτες που να έχουν μελετήσει τον πολυμορφισμό αυτό του γονιδίου σε σχέση με την HEΩΚ.

3) Όσον αφορά τους πολυμορφισμούς (Asp299Gly και Thr399Ile) του γονιδίου *TLR4*, με βάση τα αποτελέσματά μας φαίνεται να υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ και των δύο πολυμορφισμών με την ΗΕΩΚ. Οι ετεροζυγώτες Asp299Gly αυξάνονται από 2,9% στους υγιείς σε 11,7% στους ασθενείς και οι ετεροζυγώτες Thr399Ile από 1,9% στους υγιείς σε 10% στους ασθενείς. Τα ORs (95% CI) για τους Asp299Gly και Thr399Ile πολυμορφισμούς είναι 4,40 (1,23-15,78) και 5,61 (1,23-25,68) αντίστοιχα. Βέβαια πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι ο αριθμός των δειγμάτων που εμφανίζουν τους σημειακούς πολυμορφισμούς είναι σχετικά μικρός καθώς οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί (Asp299Gly και Thr399Ile) ανευρίσκονται σχετικά σπάνια στον πληθυσμό και επομένως δεν μπορούν να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα για τον εάν υφίσταται αυτή η συσχέτιση. Σχετικά με τους προαναφερθέντες πολυμορφισμούς στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν ορισμένες μελέτες που και αυτές επιβεβαιώνουν τη συσχέτιση των πολυμορφισμών με την ασθένεια, όπως για παράδειγμα ο Zareparsī και οι συνεργάτες [155] όπου εξέτασαν τις παραλλαγές D299G και T399I του *TLR4* ως προς τη συμβολή τους στην ανάπτυξη της ΗΕΩΚ και βρήκαν έναν αυξημένο παράγοντα κινδύνου για τους ΗΕΩΚ ασθενείς που έφεραν το αλληλίο G στον *TLR4* στη θέση 299. Η παραλλαγή αυτή έδειξε έναν προσθετικό παράγοντα κινδύνου σε συνδυασμό με παραλλαγές του *ApoE* και της ATP δεσμευτικής κασέτας μεταφοράς-ABCA1, δυο γονίδια τα οποία συμμετέχουν στην εκροή της χοληστερίνης. Βέβαια υπάρχουν και άλλες γενετικές μελέτες οι οποίες δε βρίσκουν κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

Με λογαριθμιστική ανάλυση, στην εξέταση όλων των πολυμορφισμών μαζί αλλά και των κλινικών δεδομένων, το *ARMS2* (επιλέχθηκε μόνο το dominant μοντέλο κληρονόμησης) παραμένει ισχυρός, ανεξάρτητος προβλεπτικός παράγων κινδύνου, με OR 2,42 (1,35-3,47), ενώ το γλαύκωμα και ο διαβήτης είναι προστατευτικοί παράγοντες (είχε διαπιστωθεί η διαφορά των ποσοστών τους και με χ^2 δοκιμασία μεταξύ ασθενών και υγιών).

Ενδιαφέρουσα θα είναι η προοπτική επέκτασης της μελέτης και σε δείγματα ασθενών με τη μη εξιδρωματική μορφή ΗΕΩΚ με την ίδια ηλικιακή κατανομή σε φύλο και ηλικία ώστε να προκύψει μια ολοκληρωμένη εικόνα για τη συσχέτιση της ΗΕΩΚ με τους πολυμορφισμούς. Ακόμα, μεγάλο ενδιαφέρον θα είχε η εκπόνηση μελλοντικά προοπτικών μελετών εφαρμογής προληπτικών ή θεραπευτικών μέτρων με βάση το γονότυπο. Κάτι τέτοιο θα έθετε τις βάσεις αφενός για την πιστοποίηση της αποτελεσματικότητας των μέτρων και αφετέρου για την επιλογή της πλέον κατάλληλης και λιγότερο επικίνδυνης για κάθε ασθενή αντιμετώπισης στα πλαίσια παρεμβάσεων

εξατομικευμένης ιατρικής. Άλλωστε η φαρμακογενωμική θα μπορούσε να επιτρέψει την αποτελεσματικότερη διερεύνηση στην ΗΕΩΚ «έξυπνων» θεραπειών, όπως νεότερα αντι-VEGF μονοκλωνικά αντισώματα και si-RNA (small interfering RNA).

Είναι κατανοητό ότι η αναζήτηση γενετικών συσχετίσεων για μια ετερογενή φαινοτυπικά νόσο δεν είναι εύκολο έργο. Οι διαφορετικοί φαινότυποι που συλλήβδην κατατάσσονται κάτω από τη γενική διάγνωση της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας μπορεί να αντιπροσωπεύουν διαφορετικές παθογενετικές διαδικασίες που με τη σειρά τους σχετίζονται με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο. Έτσι μια σημαντική συσχέτιση για έναν συγκεκριμένο υποπληθυσμό ασθενών μπορεί να περάσει απαρατήρητη στο σύνολο των εξεταζομένων, ενώ αντίθετα μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση για το σύνολο μπορεί να μην έχει την ίδια επίδραση σε όλους τους υποπληθυσμούς. Έχοντας το συλλογισμό αυτό κατά νου, καθίσταται σαφές ότι το μεγάλο ζητούμενο για τέτοιου είδους μελέτες στο μέλλον θα είναι η κατά το δυνατόν ακριβής και προτυποποιημένη κατάταξη των ασθενών σε υποομάδες βάσει φαινοτυπικών ευρημάτων.

Στη μελέτη του υποβάθρου της ασθένειας και στην περαιτέρω ταυτοποίηση των εμπλεκόμενων γονιδίων, κομβικό ρόλο παίζει η ανάπτυξη τεχνολογιών όπως η αλληλούχιση της επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing) σε DNA από περιφερικό αίμα καθώς και η microarray ανάλυση σε ιστικό επίπεδο ασθενών με ΗΕΩΚ, οι οποίες επιτρέπουν την παράλληλη ανάλυση πολλών γονιδίων μαζί με οικονομικό τρόπο (όταν ειδικά χρησιμοποιείται η προσέγγιση του Targeted Sequencing). Ήδη υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα τεστ με ανίχνευση πολλαπλών πολυμορφισμών και με παροχή αλγορίθμων κινδύνου ανάπτυξης της υγρής ΗΕΩΚ (RetnaGene, Macula Risk, Asper Biotech). Η microarray ανάλυση της RNA έκφρασης σε ιστικό επίπεδο έχει επίσης βοηθήσει στην κατασκευή ενός προφίλ γονιδιακής έκφρασης και επίσης στην ανακάλυψη miRNAs των οποίων η έκφραση διαφέρει μεταξύ υγιών και ασθενών και τα οποία δυνητικά θα μπορούσαν να κυκλοφορούν στο αίμα και να αποτελούν ένα άριστο μη-επεμβατικό βιοδείκτη.

Τα έως τώρα αποτελέσματα των ερευνητικών προσπαθειών σε συνδυασμό με την κατανόηση της επίδρασης των περιβαλλοντικών παραγόντων μπορούν να προβλέψουν ως ένα βαθμό το συνολικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου και ίσως στο μέλλον η ΗΕΩΚ αποτελέσει πεδίο νέων στοχευμένων θεραπειών (Precision Medicine) [131]. Πολλά από τα χαρακτηριστικά της ΗΕΩΚ είναι ξεχωριστά και συνάμα πολύπλοκα π.χ. το οξειδωτικό στρες και το σύστημα συμπληρώματος. Το οξειδωτικό στρες ευθύνεται τόσο για την εμφάνιση όσο και για την εξέλιξη της ΗΕΩΚ και επομένως αποτελεί στόχο για την πρόληψη και τη θεραπεία της ασθένειας.

Νέες θεραπείες θα μπορούσαν να στοχεύουν στην βελτίωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας καθώς και στην ικανότητα της αντιοξειδωτικής απάντησης ή στη μείωση της παραγωγής των ROS μέσω μεθόδων, όπως είναι η γενετική χειραγώγηση (gene editing) καθώς ακόμη ο συνδυασμός της με χρήση αντιοξειδωτικών στη διατροφή. Μελλοντικές ελκυστικές προσπάθειες θα μπορούσαν να στοχεύουν στη βελτίωση του αμυντικού μηχανισμού των κυττάρων εναντίον του οξειδωτικού στρες μέσω της ενίσχυσης της δράσης του NFR2. Η πολυπλοκότητα του συστήματος του συμπληρώματος καθώς και οι πρόσφατες ανακαλύψεις για την απορρύθμιση του συμπληρώματος σε άλλες χρόνιες ασθένειες εγείρουν ερωτήματα για πιθανούς φαρμακολογικούς και γενετικούς χειρισμούς του συμπληρώματος τόσο για την θεραπεία όσο και για την πρόληψη της HEΩΚ. Αν και οι γνώσεις μας για το σύστημα του συμπληρώματος είναι ακόμα περιορισμένες και ειδικά για το ρόλο του στην εξέλιξη της HEΩΚ ολοένα και περισσότερες πληροφορίες έρχονται στο φως μέρα με τη μέρα.

Η εξακρίβωση της παθοφυσιολογίας της HEΩΚ, ο προσδιορισμός των βιοδεικτών και παραγόντων κινδύνου είναι αναγκαία για την κατανόηση της παθογένειας της νόσου. Η καλύτερη κατανόηση θα βοηθήσει τους ασθενείς και την κοινωνία αφού η απώλεια όρασης επηρεάζει δραματικά την καθημερινότητα των ασθενών αλλά και των οικογενειών τους καθώς επίσης επιβαρύνει και τα συστήματα υγείας και τις υπηρεσίες κοινωνικής πρόνοιας παγκοσμίως.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Μόσχος Μ.Ν, Εισαγωγή στην Οφθαλμολογία, Εκδόσεις ΖΗΤΑ, Αθήνα, σελ. 340-346
2. Kanski J.J, Κλινική Οφθαλμολογία, 3^η έκδοση, Εκδόσεις Παρισιάνος, Αθήνα, σελ 390-397
3. Kanski J.J, Νόσοι της Ωχράς, Εκδόσεις Παρισιάνος, Αθήνα, σελ.19-34
4. Batterbury, Bowling, Οφθαλμολογία, Εκδόσεις Παρισιάνος, Αθήνα, σελ. 56-57
5. Bird, AC, Therapeutic targets in age-related macular disease, 2010, J Clin Invest. **120(9)**, 3033-41.
6. Resnikoff, S, Pascolini, D, Etya'ale, D, Kocur, I, Pararajasegaram, R, Pokharel, GP and Mariotti SP, Global data on visual impairment in the year 2002, 2004, Bull World Health Organ. **82(11)**, 844-51
7. Kokotas, H, Grigoriadou, M and Petersen, MB, 2011, Age-related macular degeneration: genetic and clinical findings, Clin Chem Lab Med. **49(4)**, 601-616
8. Maruko, I., Iida, T., Saito, M., Nagayama, D. and Saito, K, 2007, Clinical characteristics of exudative age-related macular degeneration in Japanese patients. Am. J. Ophthalmol. **144**, 15-22.
9. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD, de Jong PT, Klaver CC, Klein BE and Klein R, 1995, An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. **39(5)**, 367-74.
10. Li Y, Xu L, Jonas JB, Yang H, Ma Y and Li J, 2006, Prevalence of age-related maculopathy in the adult population in China: the Beijing eye study, Am J Ophthalmol., **142(5)**, 788-93.
11. Bressler SB, Muñoz B, Solomon SD and West SK; Salisbury Eye Evaluation (SEE) Study Team, 2008, Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Salisbury Eye Evaluation (SEE) Project, Arch Ophthalmol., **126(2)**, 241-5.
12. Kawasaki R, Yasuda M, Song SJ, Chen SJ, Jonas JB, Wang JJ, Mitchell P and Wong TY, 2010, The prevalence of age-related macular degeneration in Asians: a systematic review and meta-analysis, Ophthalmology, **117(5)**, 921-7.
13. Leske MC, Wu SY, Hennis A, Nemesure B, Yang L, Hyman L and Schachat AP; Barbados Eye Studies Group, 2006, Nine-year incidence of age-related macular degeneration in the Barbados Eye Studies, Ophthalmology, **113(1)**, 29-35.
14. Clemons TE, Milton RC, Klein R, Seddon JM and Ferris FL 3rd; Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2005, Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19, Ophthalmology, **112(4)**, 533-9.
15. Chakravarthy U, Wong TY, Fletcher A, Piau E, Evans C, Zlateva G, Buggage R, Pleil A and Mitchell P, 2010, Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis, BMC Ophthalmol., **13**, 10:31.

16. Thornton J, Edwards R, Mitchell P, Harrison RA, Buchan I and Kelly SP, Eye (Lond). 2005, Smoking and age-related macular degeneration: a review of association, **19(9)**, 935-44.
17. Chong EW, Kreis AJ, Wong TY, Simpson JA and Guymer RH, 2008, Alcohol consumption and the risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis, Am J Ophthalmol., **145(4)**, 707-715.
18. Fraser-Bell S, Wu J, Klein R, Azen SP and Varma R, 2006, Smoking, alcohol intake, estrogen use, and age-related macular degeneration in Latinos: the Los Angeles Latino Eye Study, Am J Ophthalmol. 2006, **141(1)**, 79-87.
19. Chong EW, Kreis AJ, Wong TY, Simpson JA and Guymer RH, 2008, Dietary omega-3 fatty acid and fish intake in the primary prevention of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis, Arch Ophthalmol., **126(6)**, 826-33.
20. Cho E, Hung S, Willett WC, Spiegelman D, Rimm EB, Seddon JM, Colditz GA and Hankinson SE, 2001, Prospective study of dietary fat and the risk of age-related macular degeneration, Am J Clin Nutr., **73(2)**, 209-18.
21. Binder ,S and Falkner-Radler ,C.I, in Age-Related Changes of the Human Eye, Carlo A. P. Cavallotti and Luciano Cerulli, HUMANA PRESS, New York, 2008, Chapter 12: Age-Related Macular Degeneration I: Types and Future Directions σελ.239-256
22. Katta S, Kaur I and Chakrabarti S, 2009, The molecular genetic basis of age-related macular degeneration: an overview, J Genet., **88(4)**, 425-49.
23. Vingerling J.R, Epidemiology of age-related maculopathy, Haveka B.Y., Alblasterdam, The Netherlands,1995, 1-16
24. Seddon JM, Cote J, Page WF, Aggen SH and Neale MC, The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences, Arch Ophthalmol., **123(3)**, 321-7.
25. Hammond CJ, Webster AR, Snieder H, Bird AC, Gilbert CE and Spector TD, 2002, Genetic influence on early age-related maculopathy: a twin study, Ophthalmology, 109(4), 730-6.
26. Seddon JM, Ajani UA and Mitchell BD, 1997, Familial aggregation of age-related maculopathy, Am J Ophthalmol., **123(2)**, 199-206.
- 27.Seddon JM, Reynolds R, Maller J, et al.Predictin model for prevalence and incidence of advanced age-related macular degeneration based on genetic, demographic, and environmental variables. Invest Ophthalmol Vis Sci 2009;50:2044-53.
28. Topouzis F, Coleman AL, Harris A, Anastasopoulos E, Yu F, Koskosas A, Pappas T, Mavroudis L and Wilson MR, 2006, Prevalence of age-related macular degeneration in Greece: the Thessaloniki Eye Study, Am J Ophthalmol.,**142(6)**,1076-9.

29. Khandhadia S and Lotery A, 2010, Oxidation and age-related macular degeneration: insights from molecular biology, *Expert Rev Mol Med.*, **20**,12:e34.
30. Donoso LA, Kim D, Frost A, Callahan A and Hageman G, 2006, The role of inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration, *Surv Ophthalmol.*, **51(2)**, 137-52.
31. Gehrs KM, Anderson DH, Johnson LV and Hageman GS, 2006, Age-related macular degeneration--emerging pathogenetic and therapeutic concepts, *Ann Med.* **38(7)**, 450-71.
32. Malhotra A, Minja FJ, Crum A, Burrowes D. Ocular anatomy and cross-sectional imaging of the eye. *Semin Ultrasound CT MR* 2011;32:2-13.
33. Nickla DL, Wallman J. The multifunctional choroid. *Prog Retin Eye Res* 2010;29:144-68.
34. Booij JC, Baas DC, Beisekeeva J, Gorgels TG and Bergen AA, 2009, The dynamic nature of Bruch's membrane, *Prog Retin Eye Res.*, **29(1)**, 1-18.
35. Zhang SX, Ma JX. Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Prog Retin Eye Res* 2007;26:1-37.
36. J.M. Ramírez, , J.J. Salazar, , R. de Hoz, , B. Rojas, , B.I. Gallego, , A.I. Ramírez, and A. Triviño, Choroidal Vessel Wall: Hypercholesterolaemia-Induced Dysfunction and Potential Role of Statins DOI: 10.5772/47794
37. Zhang HR. Scanning electron-microscopic study of corrosion casts on retinal and choroidal angioarchitecture in man and animals. *Prog Ret Eye Res.* 1994;13:243–270.
38. Wangsa-Wirawan ND, Linsenmeier RA. Retinal oxygen: fundamental and clinical aspects. *Arch Ophthalmol* 2003;121:547-57.
39. Blaauwgeers HG, Holtkamp GM, Rutten H, Witmer AN, Koolwijk P, Partanen TA, Alitalo K, Kroon ME, Kijlstra A, van Hinsbergh VW and Schlingemann RO, 1999, Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation, *Am J Pathol.*, **155(2)**, 421-8.
40. McLeod DS, Grebe R, Bhutto I, et al. Relationship between RPE and choriocapillaris in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:4982-91.
41. Feigl, B, 2009 Age-related maculopathy – Linking aetiology and pathophysiological changes to the ischaemia hypothesis, *Prog Retin Eye Res.*, **28(1)**, 63-86.
42. Stefánsson E, Geirsdóttir A and Sigurdsson H., 2011, Metabolic physiology in age related macular degeneration, *Prog Retin Eye Res.*, **30(1)**, 72-80.
43. Ramrattan RS, van der Schaft TL, Mooy CM, de Bruijn WC, Mulder PG and de Jong PT., 1994, Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging, *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, **35(6)**, 2857-64.

44. Grunwald JE, Hariprasad SM, DuPont J. Effect of aging on foveolar choroidal circulation. *Arch Ophthalmol* 1998;116:150-4.
45. Grunwald JE, Hariprasad SM, DuPont J et al. Foveolar choroidal blood flow in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:385-90.
46. Grunwald JE, Metelitsina TI, Dupont JC, Ying GS and Maguire MG, 2005, Reduced foveolar choroidal blood flow in eyes with increasing AMD severity, *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, **46(3)**, 1033-8.
47. Metelitsina TI, Grunwald JE, DuPont JC, Ying GS. Effect of systemic hypertension on foveolar choroidal blood flow in age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2006;90:342-6.
48. Metelitsina TI, Grunwald JE, DuPont JC, Ying GS, Brucker AJ and Dunaief JL, 2008, Foveolar choroidal circulation and choroidal neovascularization in age-related macular degeneration, *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, **49(1)**, 358-63.
49. Friedman E, Krupsky S, Lane AM, et al. Ocular blood flow velocity in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 1995;102:640-6.
50. Friedman E, The role of the atherosclerotic process in the pathogenesis of age-related macular degeneration, *Am J Ophthalmol.*, 2000;**130(5)**, 658-63.
51. Yuan X, Gu X, Crabb JS, Yue X, Shadrach K, Hollyfield JG and Crabb JW, Quantitative proteomics: comparison of the macular Bruch membrane/choroid complex from age-related macular degeneration and normal eyes, *Mol Cell Proteomics*, **9(6)**, 1031-46.
52. Ehrlich R, Harris A, Kheradiya NS, Winston DM, Ciulla TA and Wirostko B, 2008, Age-related macular degeneration and the aging eye, *Clin Interv Aging*, **3(3)**, 473-82.
53. Holz FG, Sheraiadah G, Pauleikhoff D, Bird AC. Analysis of lipid deposits extracted from human macular and peripheral Bruch's membrane. *Arch Ophthalmol* 1994;112:402-6.
54. Katz ML and Norberg M, 1992, Influence of dietary vitamin A on autofluorescence of leupeptin-induced inclusions in the retinal pigment epithelium, *Exp Eye Res.*, **54(2)**, 239-46.
55. Cavallotti, C.A and Schveoller, M, in *Age-Related Changes of the Human Eye*, Carlo A. P. Cavallotti and Luciano Cerulli, HUMANA PRESS, New York, 2008, Chapter 10: Aging of the Retinal Pigmented Epithelium.
56. Bonilha VL. Age and disease-related structural changes in the retinal pigment epithelium. *Clin Ophthalmol* 2008;2:413-24.
57. Chen H, Liu B, Lukas TJ, Neufeld AH, 2008, The Aged Retinal Pigment Epithelium/Choroid: A Potential Substratum for the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration, *PLoS One* , **3(6)**, e2339.
58. Chris J Kennedy, Pirooska E Rakoczy and Ian J Constable, Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: A Review *Eye* (1995) 9, 763–771; doi: 10.1038/eye.1995.192

59. Mark E. Brezinski, Guillermo J. Tearney, Brett E. Bouma, Joseph A. Izatt, Michael R. Hee, et al. Optical Coherence Tomography for Optical Biopsy Properties and Demonstration of Vascular Pathology 1996; 93: 1206-1213.
60. Jackson GR, Owsley C and Curcio CA, 2002, Photoreceptor degeneration and dysfunction in aging and age-related maculopathy, *Ageing Res Rev.*, 1(3), 381-96.
61. Curcio CA, 2001, Photoreceptor topography in ageing and age-related maculopathy, *Eye (Lond)*, **15(Pt 3)**, 376-83.
62. Scilley K, Jackson GR, Cideciyan AV, Maguire MG, Jacobson SG and Owsley C., 2002, Early age-related maculopathy and self-reported visual difficulty in daily life, *Ophthalmology*, **109(7)**, 1235-42.
63. Sarks S, Cherepanoff S, Killingsworth M and Sarks J, 2007, Relationship of Basal laminar deposit and membranous debris to the clinical presentation of early age-related macular degeneration, *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, **48(3)**, 968-77.
64. Curcio CA, Presley JB, Millican CL and Medeiros NE, 2005, Basal deposits and drusen in eyes with age-related maculopathy: evidence for solid lipid particles, *Exp Eye Res.*, **80(6)**, 761-75.
65. Lotery A and Trump D, 2007, Progress in defining the molecular biology of age related macular degeneration, *Hum Genet.*, **122(3-4)**, 219-36.
66. Ding X, Patel M and Chan CC, 2009, Molecular pathology of age-related macular degeneration, *Prog Retin Eye Res.*, **28(1)**, 1-18.
67. Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, Johnson LV, Anderson DH and Mullins RF, 2001, An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration, *Prog Retin Eye Res.*, **20(6)**, 705-32.
68. Green WR, 1999, Histopathology of age-related macular degeneration, *Mol Vis.*, **5**, 27.
69. Smith, R.T., Ahmad U.F. in *Retinal Degenerations Biology, Diagnostics, and Therapeutics*, Tombran-Tink, J., Barnstabe, J.C, Humana Press, New York, 2007, Chapter 11: The Role of Drusen in Macular Degeneration and New Methods of Quantification, 197-211
70. Spraul CW, Lang GE, Grossniklaus HE, Lang GK. Histologic and morphometric analysis of the choroid, Bruch's membrane, and retinal pigment epithelium in postmortem eyes with age-related macular degeneration and histologic examination of surgically excised choroidal neovascular membranes. *Surv Ophthalmol* 1999;44 Suppl 1:S10-S32.
71. Marshall GE, Konstas AG, Reid GG, Edwards JG, Lee WR. Type IV collagen and laminin in Bruch's membrane and basal linear deposit in the human macula. *Br J Ophthalmol* 1992;76:607-14.
72. Crabb JW, Miyagi M, Gu X, Shadrach K, West KA, Sakaguchi H, Kamei M, Hasan A, Yan L, Rayborn ME, Salomon RG and Hollyfield JG, 2002, Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99(23)**, 14682-7.

73. Rudolf M, Clark ME, Chimento MF, et al. Prevalence and morphology of drusen types in the macula and periphery of eyes with age-related maculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:1200-9.
74. Kim I, Ryan AM, Rohan R, et al. Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2 in normal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2115-21.
75. Kaplan HJ, Leibole MA, Tezel T, Ferguson TA. Fas ligand (CD95 ligand) controls angiogenesis beneath the retina. *Nat Med* 1999;5:292-7.
76. Lopez PF, Sippy BD, Lambert HM, Thach AB, Hinton DR. Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:855-68.
77. Kliffen M, Sharma HS, Mooy CM, Kerkvliet S, de Jong PT. Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. *Br J Ophthalmol* 1997;81:154-62.
78. Kvanta A, Algvere PV, Berglin L, Seregard S. Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1929-34.
79. Lip PL, Blann AD, Hope-Ross M, Gibson JM, Lip GY. Age-related macular degeneration is associated with increased vascular endothelial growth factor, hemorheology and endothelial dysfunction. *Ophthalmology* 2001;108:705-10.
80. Krzystolik MG, Afshari MA, Adamis AP, et al. Prevention of experimental choroidal neovascularisation with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. *Arch Ophthalmol* 2002;120:338-46.
81. Howard F. Fine, Richard F. Spaide, *Exudative Age-Related Macular Degeneration: Causes and Treatment* Released: 09/29/2006; Valid for credit through 09/29/2007
82. Schwesinger C, Yee C, Rohan RM, et al. Intrachoroidal neovascularisation in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol* 2001;158:1161-72.
83. Baffi J, Byrnes G, Chan CC and Csaky KG, 2000, Choroidal neovascularization in the rat induced by adenovirus mediated expression of vascular endothelial growth factor, *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, **41(11)**, 3582-9.
84. Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, Ianchulev S and Adamis AP, 2003, Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies, *Surv Ophthalmol.*, **48(3)**, 257-93.
85. Bressler SB, 2009, Introduction: Understanding the role of angiogenesis and antiangiogenic agents in age-related macular degeneration, *Ophthalmology*, 116(**10 Suppl**), S1-7.
86. Campa C, Costagliola C, Incorvaia C, Sheridan C, Semeraro F, De Nadai K, Sebastiani A and Parmeggiani F, 2010, Inflammatory mediators and angiogenic factors in choroidal neovascularization: pathogenetic interactions and therapeutic implications, *Mediators Inflamm.*, pii: 546826.

87. Prasad PS, Schwartz SD, Hubschman JP, 2010, Age-related macular degeneration: current and novel therapies, *Maturitas*, **66(1)**, 46-50.
88. Oh H, Takagi H, Suzuma K, et al. Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectivity up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1999;274:15732-9.
89. Bhutto IA, McLeod DS, Hasegawa T, Kim SY, Merges C, Tong P and Luty GA, 2006, Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration, *Exp Eye Res.*, **82(1)**, 99-110.
90. Mori K, Gehlbach P, Ando A, et al. Regression of ocular neovascularization in response to increased expression of pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2428-34.
91. Mori K, Gehlbach P, Yamamoto S, et al. AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:1994-2000.
92. Ohno-Matsui K, Morita I, Tombran-Tink J, et al. Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. *J Cell Physiol* 2001;189:323-33.
93. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995;376:70-4.
94. Mousa SA, Lorelli W, Campochiaro PA. Role of hypoxia and extracellular matrix-intergrin binding in the modulation of angiogenic growth factors secretion by retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Biochem* 1999;74:135-43.
95. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997;82:291-5.
96. Chou MY, Hartvigsen K, Hansen LF, et al. Oxidation-specific epitopes are important targets of innate immunity. *J Intern Med* 2008;263:479-88.
97. Barnett BP, Handa JT. Retinal microenvironment imbalance in dry age-related macular degeneration: a mini-review. *Gerontology* 2014;59:297-306.
98. Kanda A, Chen W, Othman M, et al. A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:16227-32.
99. Weismann D, Hartvisen K, Lauer N, et al. Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress. *Nature* 2011;478:76-81.
100. Nickel A, Kohlhaas M, Maack C. Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *J Mol Cell Cardiol* 2014;73:26-33.
101. Aslan M, Dogan S, Kucuksayan E. Oxidative stress and potential applications of free radical scavengers in glaucoma. *Redox Rep* 2013;18:76-87.
102. Chiras D, Kitsos G, Petersen MB, Skalidakis I, Kroupis C. Oxidative stress in dry age-related macular degeneration and exfoliation syndrome. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2015;52:12-27.

103. Gu X, Meer SG, Miyagi M, et al. Carboxyethylpyrrole protein adducts and autoantibodies, biomarkers for age-related macular degeneration. *J Biol Chem* 2003;278:42027-35.
104. Schutt F, Bergmann M, Holz FG, Kopitz J. Proteins modified by malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, or advanced glycation end products in lipofuscin of human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3663-8.
105. Rodriguez DG, Sanchez CS, Giusto NM, Salvador GA. Specific roles for Group V secretory PLA(2) in retinal iron-induced oxidative stress. Implications for age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2013;113:172-81.
106. Moriarty-Craige SE, Adkison J, Lynn M, et al. Antioxidant supplements prevent oxidation of cysteine/cystine redox in patients with age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2005;140:1020-6.
107. Klein ML, Francis PJ, Rosner B, et al. CFH and LOC387715/ARMS2 genotypes and treatment with antioxidants and zinc for age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2008;115:1019-25.
108. Buschini E, Piras A, Nuzzi R and Vercelli A, 2011, Age related macular degeneration and drusen: Neuroinflammation in the retina, *Prog Neurobiol.*, **95(1)**, 14-25.
109. Bok D. Evidence for an inflammatory process in age-related macular degeneration gains new support. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:7053-4.
110. Janeway , Travers, Κλινική Ανοσοβιολογία, Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα, σελ. 8:31-8:50
111. Mastellos DC, 2009, Targeting innate immune pathways in cancer immunotherapy: state of the art, *J BUON.*, **14 Suppl 1**, S123-30.
112. Ricklin D, Lambris JD. Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol* 2007;25:1265-75.
113. Shen Y, Meri S. Yin and Yang: complement activation and regulation in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 2003;70:463-72.
114. H. Anderson, M.J. Radeke, N.B. Gallo, E.A. Chapin, P.T. Johnson, C.R. Curletti, L.S. Hancox, J. Hu, J.N. Ebright, G. Malek, M.A. Hauser, C.B. Rickman, D. Bok, G.S. Hageman and L.V. Johnson, 2010, The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited, *Prog. Retin. Eye Res.*, **29**, 95–112
115. R. Reynolds, M.E. Hartnett, J.P. Atkinson, P.C. Giclas, B. Rosner and J.M. Seddon, 2009, Plasma complement components and activation fragments: associations with age-related macular degeneration genotypes and phenotypes, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **50**, 5818–5827
116. Bora NS, Kaliappan S, Jha P, Xu Q, Sivasankar B, Harris CL, Morgan BP, Bora PS, 2007, CD59, a complement regulatory protein, controls choroidal neovascularization in a mouse model of wet-type age-related macular degeneration. *J Immunol* **178**, 1783–1790

117. Morgan BP, Harris CL. Complement, a target for therapy in inflammatory and degenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2015;14:857-77.
118. Gehrs KM, Jackson JR, Brown EN, Allikmets R and Hageman GS, 2010, Complement, age-related macular degeneration and a vision of the future, *Arch Ophthalmol.*, **128(3)**, 349-58.
119. Charbel Issa P, Chong NV and Scholl HP, 2011, The significance of the complement system for the pathogenesis of age-related macular degeneration - current evidence and translation into clinical application, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.*, **249(2)**, 163-74.
120. Dudek EJ, Shang F, Valverde P, et al. Selectivity of the ubiquitin pathway for oxidatively modified proteins: relevance to protein precipitation diseases. *FASEB J* 2005;19:1707-9.
121. Medicherla B, Goldberg AL. Heat shock and oxygen radicals stimulate ubiquitin-dependent degradation mainly of newly synthesized proteins. *J Cell Biol* 2008;182:663-73.
122. Osburn WO, Kensler TW, Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat Res* 2008;659:31-9.
123. Yu X, Kensler T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention. *Mutat Res* 2005;591:93-102.
124. Gao X, Talalay P. Induction of phase 2 genes by sulforaphane protects retinal pigment epithelial cells against photooxidative damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:10446-51.
125. Ha KN, Chen Y, Cai J, Sternberg P, Jr. Increased glutathione synthesis through an ARE-Nrf2-dependent pathway by zinc in the RPE: implication for protection against oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:2709-15.
126. Zhao Z, Chen Y, Wang J, et al. Age-Related retinopathy in NRF2-deficient mice. *PLoS One* 2011;6:e19456.
127. Malhotra D, Thimmulappa R, Navas-Acien A, et al. Decline in Nrf2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:592-604.
128. Jarett SG, Lin H, Godley BF, Boulton ME. Mitochondrial DNA damage and its potential role in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2008;27:596-607.
129. Nordgaard CL, Karunadharma PP, Feng X, Olsen TW, Ferrington DA. Mitochondrial proteomics of the retinal pigment epithelium at progressive stages of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2848-55.
130. Kinnunen K, Petrovski G, Moe MC, Berta A, Kaarniranta K. Molecular mechanisms of retinal pigment epithelium damage and development of age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol* 2004;122:353-60.
131. Shen WY, Lee SY, Yeo I, et al. Predilection of the macular region to high incidence of choroidal neovascularization after intense laser photocoagulation in the monkey. *Arch Ophthalmol* 2004;122:353-60.

132. Synowiec E, Sliwinski T, Danisz K, et al. Association between polymorphism of the NQO1, NOS3 and NFE2L2 genes and AMD. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2013;18:80-90.
133. Williams MA, Carson R, Passmore P, Silvestri G and Craig D, 2011, Introduction to genetic epidemiology, *Optometry*, **82(2)**, 83-91.
134. Allikmets R, 2000, Further evidence for an association of ABCR alleles with age-related macular degeneration. The International ABCR Screening Consortium, *Am J Hum Genet.*, **67(2)**, 487-91.
135. Fisher SA, Abecasis GR, Yashar BM, Zarepari S, Swaroop A, Iyengar SK, Klein BE, Klein R, Lee KE, Majewski J, Schultz DW, Klein ML, Seddon JM, Santangelo SL, Weeks DE, Conley YP, Mah TS, Schmidt S, Haines JL, Pericak-Vance MA, Gorin MB, Schulz HL, Pardi F, Lewis CM and Weber BH, 2005, Meta-analysis of genome scans of age-related macular degeneration, *Hum Mol Genet.*, **14(15)**, 2257-64.
136. Ting AY, Lee TK, MacDonald IM, 2009, Genetics of age-related macular degeneration, *Curr Opin Ophthalmol.*, **20(5)**, 369-76.
137. Boekhoorn SS, Vingerling JR, Uitterlinden AG, Van Meurs JB, van Duijn CM, Pols HA, et al., 2007, Estrogen receptor alpha gene polymorphisms associated with incident aging macula disorder, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **48**, 1012-7.
138. Baas DC, Despriet DD, Gorgels TG, Bergeron-Sawitzke J, Uitterlinden AG, Hofman A, van Duijn CM, Merriam JE, Smith RT, Barile GR, ten Brink JB, Vingerling JR, Klaver CC, Allikmets R, Dean M and Bergen AA, 2010, The ERCC6 gene and age-related macular degeneration, *PLoS One*, **5(11)**, e13786.
139. Zurl J, Finckh U, Menzer G, Nitsch RM and Richard G, 2002, CST3 genotype associated with exudative age related macular degeneration, *Br J Ophthalmol.*, **86(2)**, 214-9.
140. Gold, B., Merriam, J.E., Zernant, J., Hancox, L.S., Taiber, A.J., Gehrs, K., Cramer, K., Neel, J., Bergeron, J., Barile, G.R., Smith, R.T., Hageman, G.S., Dean, M. and Allikmets, R., 2006, Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* 38, 458-462.
141. Jakobsdottir J, Conley YP, Weeks DE, Ferrell RE and Gorin MB, 2008, C2 and CFB genes in age-related maculopathy and joint action with CFH and LOC387715 genes, *PLoS One*, **3(5)**, e2199.
142. McKay GJ, Silvestri G, Patterson CC, Hogg RE, Chakravarthy U and Hughes AE, 2009, Further Assessment of the Complement Component 2 and Factor B Region Associated with Age-Related Macular Degeneration, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009, **50(2)**, 533-9.
143. Yates JR, Sepp T, Matharu BK, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Hayward C, Morgan J, Wright AF, Armbrecht AM, Dhillon B, Deary IJ, Redmond E, Bird AC and Moore AT; Genetic Factors in AMD Study Group, 2007, Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration, *N Engl J Med.*, 357(6), 553-61.
144. Fagerness JA, Maller JB, Neale BM, Reynolds RC, Daly MJ and Seddon JM, 2009, Variation near complement factor I is associated with risk of advanced AMD, *Eur J Hum Genet.*, **17(1)**, 100-4.

145. Dinu V, Miller PL and Zhao H, 2007, Evidence for association between multiple complement pathway genes and AMD, *Genet Epidemiol.*, **31(3)**, 224-37.
146. Ennis, S., Jomary, C., Mullins, R., Cree, A., Chen, X., Macleod, A., Jones, S., Collins, A., Stone, E. and Lotery, A., 2008, Association between the SERPING1 gene and age-related macular degeneration: a two-stage case-control study, *Lancet*, 372(9652):1828-34
147. Jakobsdottir J, Conley YP, Weeks DE, Mah TS, Ferrell RE and Gorin MB, 2005, Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26, *Am J Hum Genet*, **77(3)**, 389-407
148. Rivera A, Fisher SA, Fritsche LG, Keilhauer CN, Lichtner P, Meitinger T and Weber BH 2005, Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk, *Hum Mol Genet*, **14**, 3227–3236.
149. Tong Y, Liao J, Zhang Y, Zhou J, Zhang H and Mao M, 2010, LOC387715/HTRA1 gene polymorphisms and susceptibility to age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis, *Mol Vis.*, **16**, 1958-81.
150. Marioli DI, Pharmakakis N, Deli A, Havvas I and Zarkadis IK, 2009, Complement factor H and LOC387715 gene polymorphisms in a Greek population with age-related macular degeneration, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.*, **247(11)**, 1547-53.
151. Shuler RK Jr, Hauser MA, Caldwell J, Gallins P, Schmidt S, Scott WK, Agarwal A, Haines JL, Pericak-Vance MA, Postel EA, 2007, Neovascular age-related macular degeneration and its association with LOC387715 and complement factor H polymorphism, *Arch Ophthalmol*, **125**, 63–67
152. Schmidt S, Hauser MA, Scott WK, Postel EA, Agarwal A, Gallins P, Wong F, Chen YS, Spencer K, Schnetz-Boutaud N, Haines JL, Pericak-Vance MA, 2006, Cigarette smoking strongly modifies the association of LOC387715 and age-related macular degeneration, *Am J Hum Genet*, **78**, 852–864
153. Morange PE, Tiret L, Saut N et al. TLR4/Asp299Gly, CD14/C-260T, plasma levels of the soluble receptor CD14 and the risk of coronary heart disease: The PRIME Study. *Eur J Hum Genet* 2004;12:1041-9.
154. Skochko OV, Vesnina LE, Bobrova NA, et al. Quantitative analysis of individual groups of microorganisms, extracted from atherosclerotic lesions in the coronary arteries in patients depending upon ASP299GLY polymorphism of TLR4 gene. *Lik Sprava* 2012;82-6.
155. Zarepari S, Buraczynska M, Branham KE, et al. Toll-like receptor 4 variant D299G is associated with susceptibility to age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* 2005;14:1449-55.
156. Λιανίδου Ε. Τεχνικές Μοριακής Διαγνωστικής, 2012
157. Burt C.A, Ashwood E.R and Bruns D.E, Tietz Textbook of Clinical chemistry and molecular diagnostics, 4th Edition, Elsevier, St Louis, 2006, σελ. 1393-1445

158. Bustin S, ed. Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics, Real Time PCR
159. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rausmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22:130-8.
160. Wittwer CT. High Resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum Mutat* 2009;30:857-9.
161. Reed Gh, Kent JO, Wittwer CT. High Resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 2007;8:597-608.
162. Herrmann MG, Durtschi JD, Bromley LK, Wittwer CT., Voelkerding KV. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin Chem* 2006;52:494-503.
163. Zhou L, Myers AN, et al. Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturation DNA dye. *Clin Chem* 2004;50:1328-35.
164. Taylor CF. Mutation scanning using high-resolution melting. *Biochem Soc Trans* 2009;37:433-7.
165. Seipp MT, Pattison D, et al. Quadruplex genotyping of F5, F2, and MTHFR variants in a single closed tube by high-resolution amplicon melting. *Clin Chem* 2008;54:108-15.
166. Mao F, Leung WY, Xin X. Characterization of Eva green and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnol* 2007;7:76.
167. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-7.
168. Konstantinidou MK, Goutas N., Vlachodimitropoulos D., Chaidaroglou A., Stefanou D, Poumpouridou N., et al. TLR-4 and CD14 Genotypes and Soluble CD14: Could They Predispose to Coronary Atherosclerosis? *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2016;3,9.
169. Xavier Sole, Elisabet Guino, Joan Valls, Raquel Iniesta, and Victor Moreno, 2006, SNPStats: a web tool for the analysis of association studies, *Bioinformatics*, 22, 1928-1929.
170. Velissari A, Skolidakis I, Oliveira SC, Koutsandrea C, Kitsos G, Petersen MB, Kroupis C. Novel association of FCGR2A polymorphism with age-related macular degeneration (AMD) and development of a novel CFH real-time genotyping method. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:1521-9.
171. Brion M, Sanchez –Salorio M, de la Fuente M, Pazos B, Othman M, Swaroop A, et al. Genetic association study of age-related macular degeneration in the Spanish population. *Acta Ophthalmol* 2011;89:12-22.