



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΧΗΜΕΙΑΣ- ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΜΑ:

«Μελέτη της επίδρασης πολυμορφισμών γονιδίων στην ενδοθηλιακή δυστροφία του Fuchs»

ΔΙΑΜΑΝΤΟΠΟΥΛΟΥ ΑΝΔΡΙΑΝΗ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΑΘΗΝΑ

2018

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:

«Μελέτη της επίδρασης πολυμορφισμών γονιδίων στην ενδοθηλιακή δυστροφία του Fuchs»

ΔΙΑΜΑΝΤΟΠΟΥΛΟΥ ΑΝΔΡΙΑΝΗ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΑΘΗΝΑ

ΑΠΡΙΛΙΟΣ

2018

**ΘΕΜΑ: «Μελέτη της επίδρασης πολυμορφισμών γονιδίων στην ενδοθηλιακή
δυστροφία του Fuchs»**

ΔΙΑΜΑΝΤΟΠΟΥΛΟΥ ΑΝΔΡΙΑΝΗ

A.M : 251602

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

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

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Χρήστος Κρούπης, Επίκουρος Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής
Διαγνωστικής, 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: 27 ΑΠΡΙΛΙΟΥ 2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η ενδοθηλιακή δυστροφία του κερατοειδούς του Fuchs (FECD, Fuchs endothelial corneal dystrophy) αποτελεί μία προοδευτικά εξελισσόμενη, κληρονομική, αμφοτερόπλευρη διαταραχή του ενδοθηλίου του κερατοειδούς. Χαρακτηρίζεται από την απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων, την πάχυνση της μεμβράνης Descemet, το σχηματισμό εστιακών εναποθέσεων που ονομάζονται guttae ενώ στο τελικό στάδιο παρουσιάζεται οίδημα στον κερατοειδή και σχηματίζονται επιθηλιακές φυσαλίδες με συνέπεια τη σημαντική μείωση της οπτικής οξύτητας, η οποία μπορεί να οδηγήσει ακόμα και σε τύφλωση. Για το τελικό στάδιο της νόσου, η μεταμόσχευση κερατοειδούς ή η κερατοπλαστική αποτελεί τη μοναδική οριστική θεραπεία. Ο επιπολασμός της FECD ποικίλλει σημαντικά σε ολόκληρο τον κόσμο.

Η FECD είναι μια γενετικά ετερογενής ασθένεια. Υπάρχουν δύο μορφές που καθορίζονται από την ηλικία έναρξης. Η FECD σε πρώιμο στάδιο η οποία είναι σπάνια και η πιο συχνή FECD όψιμης έναρξης που μπορεί να είναι είτε οικογενής είτε σποραδική με εμφάνιση συνήθως μετά την ηλικία των 50 ετών. Η FECD πρώιμης έναρξης σχετίζεται με μεταλλάξεις στο COL8A2 γονίδιο. Περαιτέρω, για την όψιμη έναρξης FECD έχει ταυτοποιηθεί ένας πολυμορφισμός g.97923C>A dbSNPrs613872, στο ιντρόνιο 3 του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα 4 (TCF4) που κωδικοποιεί ένα μέλος της οικογένειας E-πρωτεϊνών (E2-2) ο οποίος συσχετίζεται σημαντικά με το FECD, και αυξάνοντας την πιθανότητα εμφάνισης FECD κατά 30 φορές σε ομόζυγα άτομα.

Μέθοδοι: Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη νέας μεθοδολογίας real-time PCR και ανάλυση καμπυλών τήξης για τη γονοτύπηση του πολυμορφισμού rs613872 στο γονίδιο TCF4 και η εφαρμογή της σε δείγμα 22 Ελλήνων ασθενών με FECD (κριτήριο Krachmer ≥ 2 και 58 υγιών μαρτύρων, με ανάλογη κατανομή σε φύλο και ηλικία, στους οποίους απομονώθηκε DNA από περιφερικό αίμα, επιλεγμένων κατόπιν έγγραφης συγκατάθεσης, οφθαλμολογικής εξέτασης και συλλογής κλινικών δεδομένων. Επίσης με τη μέθοδο DNA Sequencing κατά Sanger σαρώθηκε γενωμική περιοχή του COL8A2 γονιδίου για την ανίχνευση των μεταλλάξεων g.31753T>G L450W rs8035192 και g.31767C>A Q455K rs8035191. Χρησιμοποιήθηκαν τα υπολογιστικά προγράμματα SNPStats και SPSS για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Αποτελέσματα: Αναπτύχθηκε ταχεία και αξιόπιστη μεθοδολογία για τον πολυμορφισμό rs613872 του TCF4 γονιδίου με τη χρήση δύο ανιχνευτών υβριδισμού για τη συμπληρωματική αλυσίδα στο όργανο LightCycler (Roche) και συλλέχθηκαν στοιχεία αναλυτικής επικύρωσης, (απόδοση E=1,89, CV αναπαραγωγιμότητα Cq $\leq 1,2\%$, Tm T αλληλίου 57,20°C και G αλληλίου 63,75°C CV=1,7% και CV=1,25% αντίστοιχα, $\Delta Tm=7,39$). Τα αποτελέσματα γονοτύπησης επιβεβαιώθηκαν 100% και με τη μέθοδο

αναφοράς DNA Sequencing. Παρατηρήθηκε αύξηση του G αλληλίου από 17,24% στους υγιείς σε 47,73% στους ασθενείς και στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το νόσημα με OR 4,82 (CI 1,98-11,73 log-additive μοντέλο). Συσχέτιση του αλληλίου κινδύνου με την ηλικία και το φύλο, δε διαπιστώθηκε στα υπό εξέταση δείγματα. Με τη σάρωση DNA Sequencing κατά Sanger στο *COL8A2* γονίδιο για την ανίχνευση των μεταλλάξεων L450W και Q455K δεν διαπιστώθηκε η ύπαρξη αυτών των μεταλλάξεων στα υπό εξέταση δείγματα και ανιχνεύθηκε σε 1 δείγμα ένας νεοαναφερόμενος πολυμορφισμός NM_005202.3:c1491G>A→p.A497T.

Συμπεράσματα: Από τα παραπάνω προκύπτει ότι ο πολυμορφισμός rs613872 του *TCF4* γονιδίου συσχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την FECD όψιμης έναρξης στον ελληνικό πληθυσμό, ενώ οι μεταλλάξεις L450W και Q455K στο γονίδιο *COL8A2* δεν σχετίζονται.

ABSTRACT

Introduction: Fuchs endothelial corneal dystrophy is a slowly progressive, bilateral but asymmetric, posterior corneal dystrophy. It is characterized by reduced density of corneal endothelial cells, thickening of Descemet's membrane and deposition of extracellular material in the form of guttae. As the endothelial cells regulate corneal hydration and maintain its transparency, their loss may eventually progress to corneal stromal edema, epithelial bullae and vision loss. For the end-stage disease corneal transplant surgery or keratoplasty represents the only definitive treatment. The prevalence of FECD varies markedly across the world.

FECD is a genetically heterogeneous disease. There are two forms defined by the age of onset. Early-onset FECD is rare and the more common late-onset FECD which can either be familial or sporadic, with onset typically after the age of 50 years. Early-onset FECD is associated with *COL8A2* mutations. Furthermore, for the late-onset FECD has been identified a polymorphism g.97923C>A dbSNPrs613872, in the intron 3 of the transcription factor 4 (*TCF4*) which encodes a member of the E-protein family (E2-2) and increases FECD risk by a factor of 30 for persons homozygotes.

Methods: The purpose of the present study was to develop real-time PCR method and melting curve analysis in order to genotype the rs613872 polymorphism in *TCF4* gene and to implement it on a sample of 22 Greek FECD patents (Krachmer scale ≥ 2) and 58 healthy controls, age and sex matched. DNA was isolated from blood samples, after signed informed consent, ophthalmological evaluation and clinical data collection. The same samples were screened using DNA Sequencing method in order to detect the g.31753T>G L450W rs8035192 and g.31767C>A Q455K rs8035191 mutations in a *COL8A2* genomic region. For the statistical analysis of the results, SPSS and SNPStats software packages were used.

Results: A rapid and reliable assay was developed for SNP rs613872 in *TCF4* gene, using hybridization probes in the complementary strand and a melting Curve in the LightCycler (Roche) instrument. Analytical validation was performed (efficiency E=1.89, Cq between run precision CV \leq 1.2%, Tm T-allele 57.20 °C CV=1.7% and G-allele 63.75 °C CV=1.25%, Δ Tm=7.39). The genotyping results were 100% concordant with the reference method of DNA Sequencing. A statistically significant association was found for SNPs rs613872 in *TCF4* gene and late-onset FECD with OR 4.82 (CI 1.98-11.73) with the log-additive model and a significant increase of the G allele from 17.24% in healthy to 47.73% in patients. No statistically significant association was found between the G risk allele the age and the sex in our population. DNA Sequencing methodology was applied for screening of L450W and Q455K mutations in *COL8A2* gene, but they were not detected in our population. However a novel polymorphism NM_005202.3:c1491G>A→p.A497T in one sample was identified.

Conclusions: The rs613872 SNP in *TCF4* gene was confirmed to be strongly and statistically associated with late-onset FECD in the Greek population. Also it was confirmed that the L450W and Q455K mutations in *COL8A2* gene were not associated with late-onset FECD.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία διπλώματος ειδίκευσης εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Διαγνωστικής 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 Διαγνωστικής της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ κ. Χρήστο Κρούπη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όσους συνέβαλαν στη διεκπεραίωση αυτής της εργασίας, ξεκινώντας από τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χρήστο 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 κα. Ευρύκλεια Λιανίδου για την ανάθεση ενός τόσο ενδιαφέροντος θέματος με σημαντικές δυνατότητες περαιτέρω εξέλιξης.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια Ιατρικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας κα. Παρασκευή Μουτσάτσου-Λαδικού και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Διαγνωστικής του ΑΤΤΙΚΟΝ Π.Γ.Ν και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την φιλοξενία στο εργαστήριο.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Μ. Μόσχου που συνέβαλε στη σύλληψη του θέματος, στη συλλογή των κλινικών δειγμάτων και που δέχτηκε να είναι στην τριμελή επιτροπή και τον Λέκτορα κ. Κ. Δρούτσα για τη συμβολή του στη συλλογή των δειγμάτων και στην καταγραφή του ιατρικού ιστορικού.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Μεταπτυχιακή φοιτήτρια Φλώρου - Χατζηγιαννίδου Χρυσίδα για την υποστήριξη και τη συνεργασία στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας του ΑΤΤΙΚΟΝ.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το σύζυγο μου και τις κόρες μου Στέλλα και Αναστασία για την αμέριστη ηθική συμπαράσταση, την κατανόηση και την υπομονή τους. Τους ευχαριστώ που είναι πάντα δίπλα μου, δίνοντάς μου δύναμη.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ABL	Anterior Banded Layer
AGBL1	ATP/GTP/Binding Protein Like 1
ARE	Antioxidant Response Element
ATF6	Activating Transcription Factor 6
bHLH	Basic helix-loop-helix
CCDF	Central Cloudy Dystrophy of François
CCP4	Cytosolic Carboxypeptidase 4
CD	Cell Density
CDPD	Corneal Dystrophy and Perceptive Deafness
CE	Corneal Endothilium
CHED2	Congenital Hereditary Endothelial Dystrophy 2
CHOP	Transcription factor C/EBP homologous protein
CLU	Clusterin
COL8A2	Collagen type VIII alpha 2 chain
Cq	Quantification Cycle
Ct	Cycle threshold
CTG	Cytocine-Thymine-Guanine
DLEK	Deep Lamellar Endothelial Keratoplasty
DM	Descemet Membrane
DMEK	Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty
DMET	Descemet Membrane Endothelial Transfer
ddNTPs	Dideoxynucleotide Triphosphates
dNTPs	deoxy Nucleotide Triphosphates
DRAM1	DNA damage-Regulated Autophagy Modulator protein 1

DSEK/DSAEK	Descemet Stripping/Automated Endothelial Keratoplasty
EBMB	Epithelial Basement Membrane Dystrophy
EMT	Epithelial–Mesenchymal Transition
ER	Endoplasmic Reticulum
FECD	Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy
FL	Fibrillar Layer
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GRP78	Glucose-Regulated Protein
GWAS	Genome-Wide Association Study
IC3D	International Committee for Classification of Corneal Dystrophies
IRE1	Inositol Requiring Enzyme 1
IVCM	In Vivo Confocal Microscopy
KANK4	KN motif- and ankyrin repeat domain-containing protein 4
LAMC1	laminin gamma 1
LINC00970 / ATP1B1	Na ⁺ / K ⁺ transporting ATPase, beta-1 polypeptide
LOXHD1	Lipoxygenase Homology Domain-containing 1
MAF	Minor Allele Frequency
OMIM	On line Mendelian Inheritance in Man
NAC	N-ακετυλοκυστεΐνη
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2–Related Factor 2
OCT	Optical Coherence Tomography
PBL	Posterior Banded Layer
PCL	Posterior Collagen Layer
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism

PERK	Pancreatic ER kinase (PKR)-like ER Kinase
PK	Penetrating Keratoplasty
PLK	Posterior Lamellar Keratoplasty
PNBL	Posterior Non Banded Layer
PPCD3	Posterior Polymorphous Corneal Dystrophy
PRDXs	Peroxiredoxin genes
PTHS	Pitt-Hopkins Syndrome
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
SLC4A11	Solute carrier family 4, sodium borate transporter, member 11
SNP	Single-Nucleotide Polymorphism
SODs	Superoxide Dismutase
TCF4	Transcription Factor 4
TCF8	Transcription Factor 8
TGFβ1	Transforming Growth Factor beta 1
TNR	Trinucleotide Repeat
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling
TXNRDs	Thioredoxin Reductases
UHR-OCT	Ultrahigh-Resolution Optical Coherence Tomography
UPR	Unfolded Protein Response
ZEB1	Zinc finger E-box-binding homeobox 1
ΕΔ	Ενδοθηλιακό δίκτυο
MT ₃	Υποδοχέας Μελατονίνης
φωσφο-eIF2a	Phosphorylated Eukaryotic initiation factor 2a

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΔΥΣΤΡΟΦΙΑ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ ΤΟΥ FUCHS. ΑΝΑΤΟΜΙΑ – ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ ΧΙΤΩΝΑ.....	1
1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ – ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	1
1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	3
1.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	6
1.4 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ.....	7
1.4.1 Μικροσκοπική Ανατομική του Κερατοειδούς Χιτώνα	8
1.4.2 Νεύρωση Κερατοειδούς Χιτώνα.....	15
1.5 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ.....	15
1.5.1 Μεταβολισμός του κερατοειδούς.....	15
1.5.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΕΝΥΔΑΤΩΣΗΣ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ	17
1.5.3 Η διαφάνεια του κερατοειδούς	21
1.5.4 Οι μηχανισμοί επούλωσης του κερατοειδή.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΔΥΣΤΡΟΦΙΩΝ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ... 25	25
2.1 ΔΥΣΤΡΟΦΙΕΣ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ.....	25
2.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ICD3	25
2.3 ΚΛΙΝΙΚΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ ΤΗΣ FECD	29
2.3.1 FECD πρώιμης έναρξης (early-onset FECD).....	29
2.3.2 FECD όψιμης έναρξης (late-onset FECD)	29
2.4 ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	30
2.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ FECD ΝΟΣΟΥ.....	35
2.5.1. Εξέταση με σχισμοειδή λυχνία	35
2.5.2. Κατοπτρική μικροσκοπία μη επαφής.....	36
2.5.3. ΠΑΧΥΜΕΤΡΙΑ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ	38
2.5.4. Οπτική τομογραφία συνοχής στο πρόσθιο τμήμα του οφθαλμού. (Anterior Segment OCT).....	39
2.5.5. Συνεστιακή μικροσκοπία (In vivo confocal microscopy, IVCM)	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΔΟΜΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ - ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΣΤΟΝ FECD ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗ	41
3.1 ΔΟΜΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ.....	41
3.1.1 ΠΡΟΣΘΙΟ ΤΜΗΜΑ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ.....	41
3.1.2 ΟΠΙΣΘΙΟ ΤΜΗΜΑ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ.....	47
3.2 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	54
3.2.1 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ.....	54

3.2.2 Clusterin and Transforming Growth Factor- β -Induced Protein.....	57
3.2.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ UPR	59
3.2.4 ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΦΡΑΓΜΟΥ Η ΑΝΤΛΙΑΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ	60
3.2.5 ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ Η ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ FECD.....	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4° : Η ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ FECD	63
4.1 ΓΟΝΙΔΙΑ.....	63
4.1.1 Transcription factor 4 (<i>TCF4</i>).....	63
4.1.2 ATP/GTP/Binding Protein Like 1 (<i>AGBL1</i>)	69
4.1.3 Lipoxygenase homology domain-containing 1 (<i>LOXHD1</i>).....	71
4.1.4 Solute carrier family 4, sodium borate transporter, member 1 (<i>SLC4A11</i>).....	71
4.1.5 ZEB1	73
4.1.6 Collagen type VIII alpha 2 chain (<i>COL8A2</i>) gene.....	74
4.2 Γενετικοί τόποι της FECD.....	76
4.2.1 FCD1 (FECD-2 OMIM)	77
4.2.2 FCD2 (FECD-3 OMIM)	78
4.2.3 FCD3 (FECD-5 OMIM)	79
4.2.4 FCD4 (FCD-7 OMIM).....	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5° : ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	82
5.1 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	82
5.2 ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	83
5.2.1 Διαμπερήs Κερατοπλαστική (Penetrating Keratoplasty – PK).....	84
5.2.3 Εν τω βάθει τμηματική ενδοθηλιακή κερατοπλαστική (Deep Lamellar Endothelial Keratoplasty – DLEK).....	86
5.2.4 Κερατοπλαστική ενδοθηλίου με απογύμνωση της δεσκεμετείου (Descemet Stripping/Automated Endothelial Keratoplasty - DSEK/DSAEK)	86
5.2.5 Κερατοπλαστική δεσκεμετείου μεμβράνης – ενδοθηλίου (Descemet’s membrane endothelial keratoplasty – DMEK)	88
5.2.6 Μεταφορά Δεσκεμετείου- Ενδοθηλιακής μεμβράνης (Descemet membrane endothelial transfer – DMET).....	88
5.3 Μελλοντικές θεραπείες.....	90
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6°: ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ DNA ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ	93
6.1 Εισαγωγή.....	93
6.2 Τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν	94
6.2.1 PCR	94
6.2.2 Real Time PCR.....	96
6.2.3 PCR - RFLP.....	102
6.2.4 Αλληλούχιση DNA – (DNA Sequencing)	103
6.2.4.1 Η ενζυμική μέθοδος κατά Sanger	104

6.2.4.2: Αυτοματοποίηση του DNA Sequencing	106
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	109
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	111
7.1 ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	111
7.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα.....	115
7.2.1 Εισαγωγή.....	115
7.2.2 Αρχή της μεθόδου.....	115
7.2.3 Αντιδραστήρια απομόνωσης DNA	115
7.2.4 Πειραματική διαδικασία απομόνωσης DNA.....	116
7.3 Ποσοτικός προσδιορισμός DNA με το φθορισμόμετρο Qubit.....	117
7.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	119
7.5 Εκκινητές.....	122
7.5.1 Σχεδιασμός εκκινητών	122
7.5.2 Επαλήθευση εκκινητών.	125
7.5.2.1 Οργανολογία.....	125
7.5.2.2 Συμβατική PCR και PCR-RFLP για το <i>TCF4</i> γονίδιο	126
7.6 Ανάπτυξη μεθοδολογίας Real-Time PCR και ανάλυση καμπυλών τήξης για το <i>TCF4</i> γονίδιο.	137
7.6.1 Οργανολογία – LightCycler.....	137
7.6.2 Σχεδιασμός ανιχνευτών	140
7.6.2.1 Σχεδιασμός ανιχνευτών για το <i>TCF4</i> γονίδιο.....	141
7.6.3 Πρωτόκολλο Real-time PCR και ανάλυση καμπυλών τήξης για το <i>TCF4</i> γονίδιο.	142
7.6.4 Καμπύλη βαθμονόμησης	145
7.7. Πιστοποίηση PCR προϊόντων: ανάλυση της DNA αλληλουχίας.....	146
7.7.1 Οργανολογία.....	146
7.7.2 Συνολική πειραματική πορεία.....	147
7.7.2.1 Ενίσχυση με συμβατική PCR.....	148
7.7.2.2 Καθαρισμός των PCR προϊόντων	148
7.7.2.3 Αντίδραση θερμικών κύκλων (Cycle Sequencing).	149
7.7.2.4 Καθαρισμός των προϊόντων του Cycle Sequencing.....	151
7.7.2.5 Προετοιμασία δειγμάτων για το Sequencing	152
7.8 Στατιστική επεξεργασία.....	153
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	157
8.1 Αποτελέσματα γονοτύπησης.	157
8.2 Αποτελέσματα συμβατικής PCR για το <i>TCF4</i> γονίδιο	160
8.3 Αποτελέσματα πέψης των προϊόντων PCR για το <i>TCF4</i> γονίδιο.....	164

8.4 Αποτελέσματα γονοτύπησης για τον πολυμορφισμό rs613872 στο <i>TCF4</i> γονίδιο .	165
8.4.1 Γονοτύπηση με Real-Time PCR –ανάλυσης καμπυλών τήξης	165
8.4.2 Βελτιστοποίηση real-time PCR μεθόδου για το <i>TCF4</i> γονίδιο.	165
8.4.2.1 Προσπάθειες βελτιστοποίησης της μεθόδου για το <i>TCF4</i> γονίδιο.	166
8.4.2.2 Παραδείγματα αποτελεσμάτων ανάλυσης καμπυλών τήξης σε κλινικά δείγματα.....	176
8.4.2.3 Παραδείγματα επιβεβαίωσης ορθότητας Real – Time PCR αποτελεσμάτων με DNA Sequencing σε κλινικά δείγματα	178
8.5 Αποτελέσματα συμβατικής PCR για το <i>COL8A2</i> γονίδιο	184
8.6 Αποτελέσματα πέψης των προϊόντων PCR για το <i>COL8A2</i> γονίδιο.....	184
8.7 Αποτελέσματα γονοτύπησης για τους πολυμορφισμούς rs80358192 και rs80358191 για το γονίδιο <i>COL8A2</i> και σάρωση γενωμικής περιοχής με DNA Sequencing.	185
8.8 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	191
8.8.1 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων με το στατιστικό πακέτο SPSS	191
8.8.1.1 Περιγραφική στατιστική ανάλυση ηλικιών και έλεγχος κανονικότητας κατανομής τους.....	191
8.8.1.2 Περιγραφική στατιστική ανάλυση ως προς το φύλο υγιών και ασθενών ..	194
8.8.1.3 Περιγραφική στατιστική ανάλυση ως προς το γονότυπο υγιών και ασθενών	196
8.8.1.4 Περιγραφική στατιστική ανάλυση ως προς τα αλληλία υγιών και ασθενών	197
8.8.1.5 Διαφορά κατανομής φύλου μεταξύ υγιών και ασθενών.....	200
8.8.1.6 Διαφορά ηλικίας μεταξύ υγιών και ασθενών	200
8.8.1.7 Συσχέτιση της ηλικίας μεταξύ ατόμων που φέρουν το G αλληλίο και ατόμων που δεν το φέρουν.	202
8.8.1.8 Συσχέτιση ηλικίας με τους γονότυπους.....	203
8.8.1.9 Διωνυμική Λογαριθμική Παλινδρόμηση (Binary Logistic Regression).....	204
8.8.2 Στατιστική ανάλυση για το rs613872 του <i>TCF4</i> γονιδίου με SNPstats.....	205
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο : ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	208
9.1 Συμπεράσματα – Συζήτηση – Μελλοντικές κατευθύνσεις	208
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	216

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΔΥΣΤΡΟΦΙΑ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ ΤΟΥ FUCHS. ΑΝΑΤΟΜΙΑ – ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ ΧΙΤΩΝΑ

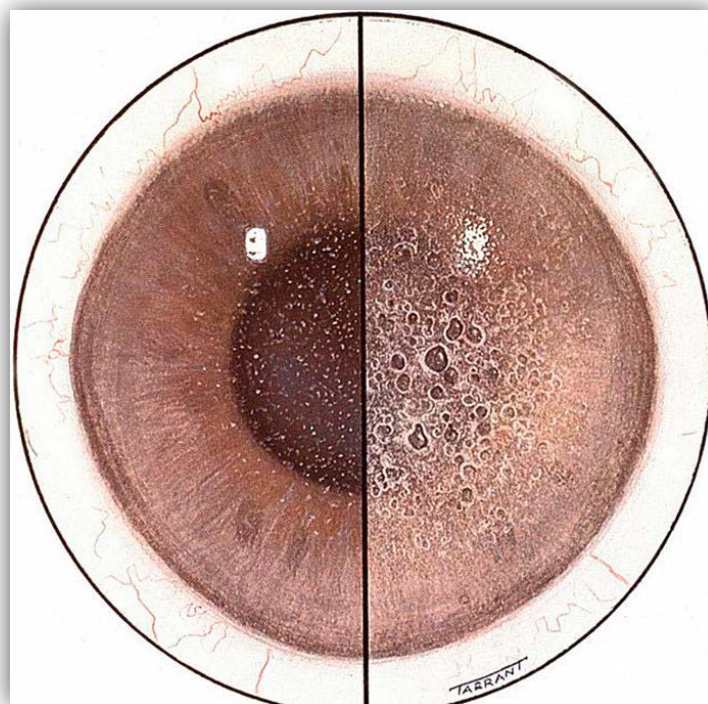
1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ – ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η ενδοθηλιακή δυστροφία του κερατοειδούς του Fuchs (FECD, Fuchs endothelial corneal dystrophy) αποτελεί μία προοδευτικά εξελισσόμενη, κληρονομική, αμφοτερόπλευρη διαταραχή του ενδοθηλίου του κερατοειδούς, που περιεγράφηκε αρχικά το 1910 από τον Αυστριακό οφθαλμίατρο Ernest Fuchs και έως σήμερα φέρει το όνομα του [1]. Χαρακτηρίζεται από την απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων, την πάχυνση της μεμβράνης Descemet, το σχηματισμό εστιακών εκδηλώσεων που ονομάζονται guttae ενώ στο τελικό στάδιο παρουσιάζεται η ανάπτυξη οιδήματος στον κερατοειδή και ο σχηματισμός επιθηλιακών φουσαλίδων (bullae) με συνέπεια τη σημαντική μείωση της οπτικής οξύτητας, η οποία μπορεί να οδηγήσει ακόμα και σε τύφλωση.

Ο καθηγητής Ernest Fuchs αναφέρει την ασθένεια πρώτη φορά το 1902 και αργότερα το 1910 δημοσιεύει μια σειρά από 13 περιστατικά ασθενών ηλικίας από 48 έως 75 ετών, τα οποία χαρακτηρίστηκαν από καθυστερημένη εμφάνιση, αργή πρόοδο, μειωμένη οπτική οξύτητα κυρίως το πρωί, έλλειψη φλεγμονής, διάχυτη αδιαφάνεια του κερατοειδούς και τραχύ επιθήλιο με χαρακτηριστικά κυστίδια. Ο τίτλος αυτής της δημοσίευσης, "Dystrophia Epithelialis Corneae," καθώς και τα τελικά του σχόλια δείχνουν σαφώς ότι ο καθηγητής Fuchs αποδίδει το πρωτογενές ελάττωμα σε αυτές τις περιπτώσεις στο επιθήλιο του κερατοειδούς, καθώς γράφει, «... η πρωταρχική θέση των αλλαγών είναι το επιθήλιο (εικόνα 1.1). Για το λόγο αυτό, ονομάζω την ασθένεια «Επιθηλιακή δυστροφία», ένα όνομα το οποίο μπορεί να αντικατασταθεί αργότερα όταν γίνει περισσότερο κατανοητή η φύση της νόσου. Η αιτία της ασθένειας καθώς και η θεραπεία της παραμένουν άγνωστα» [1]. Στη συνέχεια το 1916 με την εμφάνιση της σχισμοειδούς λυχνίας ο Koeppe παρατήρησε το κλασικό εύρημα των guttae στο ενδοθήλιο των κερατοειδών με οίδημα των ασθενών που περιέγραψε ο Fuchs [2].

Όμως ο όρος "cornea guttata" (που στα λατινικά σημαίνει "σταγόνα") για τις μεταβολές της ενδοθηλιακής βασικής μεμβράνης στο FECD εισήχθη το 1921 από τον Ελβετό οφθαλμίατρο Alfred Vogt, όπου η μειωμένη ευαισθησία του κερατοειδούς εγκαταλείφθηκε ως διαγνωστικό κριτήριο και για πρώτη φορά η εικόνα στη σχισμοειδή λυχνία

χαρακτηρίστηκε ως "σφυρήλατος χαλκός" [3]. Το 1920, ο Kraupa περιγράφει την εξέλιξη των ενδοθηλιακών αλλαγών στον κερατοειδή [4], οι οποίες επιβεβαιώθηκαν αργότερα από τους Graves et al.. [5] ενώ οι Αμερικανοί Harry και Juas Friedenwald το 1925 κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι μεταβολές στο ενδοθηλιακό στρώμα του κερατοειδούς προηγούνται των αλλαγών στο επιθήλιο [6]. Μεταγενέστεροι ερευνητές περιέγραψαν με τη χρήση του κατοπτρικού μικροσκοπίου τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις του ενδοθηλίου του κερατοειδούς και της μεμβράνης του Descemet σε αυτή τη διαταραχή. Το 1915, ο Clegg δημοσίευσε για πρώτη φορά την υπόνοια κληρονομικής μετάδοσης της συγκεκριμένης δυστροφίας, εύρημα που επιβεβαιώθηκε τις επόμενες δεκαετίες [7]. Το 1978 οι Krachmer et al δημοσίευσαν μία εργασία, που ήρθε να επιβεβαιώσει τις υπόνοιες για κληρονομική μετάδοση τα νόσου, στην οποία ανέφεραν ένα θετικό οικογενειακό ιστορικό στο 50% των ασθενών [4]. Η φυσική εξέλιξη της FECD από απομονωμένα, ασυμπτωματικά guttae στο σχηματισμό οιδήματος του κερατοειδούς με οδυνηρή απώλεια της όρασης πρωτοαναφέρθηκε το 1953 [8]. Από την αρχική περιγραφή αυτής της ενδοθηλιακής δυστροφίας τον προηγούμενο αιώνα, έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στην κατανόηση της επιδημιολογίας, της γενετικής και της παθοφυσιολογίας της, ενώ έχουν αναπτυχθεί και βελτιωμένες θεραπείες [9].



Εικόνα 1.1: Εικόνα ζωγραφισμένη στο χέρι, στο πρωτότυπο έγγραφο του καθηγητή Ernst Fuchs, που δείχνει την εμφάνιση bullae στη δεξιά πλευρά του οφθαλμού [1].

1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο επιπολασμός της FECD είναι δύσκολο να εκτιμηθεί δεδομένης της καθυστερημένης εμφάνισης της νόσου, της αργής εξέλιξής της και της έλλειψης συμπτωμάτων στα αρχικά στάδια. Αν και δεν έχουν διεξαχθεί επίσημες επιδημιολογικές μελέτες για την εκτίμηση του επιπολασμού ή της επίπτωσης αυτής της ασθένειας, έχει αναφερθεί ότι, στις Ηνωμένες Πολιτείες, η FECD πλήττει περίπου το 4% του πληθυσμού ηλικίας άνω των σαράντα, καθιστώντας την περισσότερο κοινή γενετική διαταραχή του ενδοθηλίου του κερατοειδούς. Ωστόσο, σε έναν γενετικά απομονωμένο πληθυσμό του νησιού Tangier στη Βιρτζίνια, σε δείγμα των μισών κατοίκων ηλικίας άνω των 50 ετών προτείνεται ένα ποσοστό επιπολασμού έως και 11% [10]. Σε πολλές μελέτες οι γυναίκες συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης FECD σε ποσοστό 2,5-3,5 :1 σε σχέση με τους άνδρες [11,12].

Η FECD πρώτα αξιολογήθηκε σε κλινικό επίπεδο και ο ίδιος ο Fuchs εκτίμησε ότι η εμφάνιση της νόσου ήταν 1 κάθε 10.000 οφθαλμολογικούς ασθενείς, ένα ποσοστό που πιθανόν αντικατοπτρίζει εκείνους που βρίσκονται σε προχωρημένη νόσο [1]. Το 1922, ο Moeschler εξέτασε 94 άτομα, αναφέροντας επιπολασμό 4,5% μεταξύ των ασθενών ηλικίας άνω των 50 ετών και 10,5% των ασθενών ηλικίας άνω των 60 ετών [6]. Το 1934 ο Goar εξέτασε 800 άτομα και ανέφερε συχνότητα 6,62%. [13]. Επιπρόσθετα guttae είναι δυνατόν να εμφανιστούν σε υγιή άτομα σε συνθήκες γήρανσης, οφθαλμικού τραύματος, σε φλεγμονή του οφθαλμού και στο γλαύκωμα. Σε μια μελέτη του 1967 σε υγιή άτομα βρέθηκαν διάσπαρτα κεντρικά guttata στο 0,18% των οφθαλμών ατόμων ηλικίας 20 έως 39 ετών και στο 3,9% των οφθαλμών ατόμων άνω των 40 ετών [14]. Σε μελέτη του Reykjavik Eye Study, με 774 συμμετέχοντες ηλικίας άνω των 55 ετών που πραγματοποιήθηκε τόσο με τη σχισμοειδή λυχνία όσο και με το κατοπτρικό μικροσκόπιο, ο επιπολασμός εμφάνισης οποιουδήποτε κεντρικού guttata ήταν 11% για τις γυναίκες και 7% για τους άνδρες [15]. Αντίστοιχα σε μια μελέτη στην Ιαπωνία με βάση το κατοπτρικό μικροσκόπιο ήταν 4,1% σε άτομα ηλικίας άνω των 40 ετών, με σημαντική διαφορά μεταξύ γυναικών (5,8%) και ανδρών (2,4%) [16]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει μια αναδρομική ιστοπαθολογική μελέτη από τους Santo et al στον Ιαπωνικό πληθυσμό όπου η συχνότητα της FECD σε δείγματα ασθενών που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση κερατοειδούς σε περίοδο 34 ετών (από το 1959 έως το 1992) ήταν μόλις 0,7% [17]. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να συσχετίζεται εν μέρει με τη σημαντικά υψηλότερη πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς του Ιαπωνικού πληθυσμού σε σύγκριση με τον Αμερικάνικο πληθυσμό [18].

Οι μελέτες επιπολασμού υποδηλώνουν υψηλότερη επικράτηση της νόσου στις Ευρωπαϊκές χώρες και στις ΗΠΑ σε σχέση με άλλες περιοχές του κόσμου, όπως είναι η Νότια Αμερική, η Ασία, η Αυστραλία, ενώ δεν υπάρχουν γνωστές αναφορές για σημαντικές μελέτες στην Αφρική [19]. Φυσικά η κλινική εμπειρία στις ΗΠΑ υποδηλώνει σημαντικά

μειωμένη επικράτηση της FECD μεταξύ ατόμων αφρικοαμερικανικής, λατινοαμερικανικής και ασιατικής καταγωγής (πίνακας. 1.1). Απαιτούνται φυσικά περισσότερες και μεγαλύτερες σε αριθμό μελέτες γιατί ο χαμηλός ρυθμός εμφάνισης της νόσου μπορεί απλώς να αντιπροσωπεύει αργή εξέλιξη της νόσου σε αυτούς τους πληθυσμούς [20].

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1: Ποσοστό διεισδυτικών κερατοπλαστικών λόγω της ενδοθηλιακής δυστροφίας του Fuchs, ανά κέντρο μεταμοσχεύσεων ή γεωγραφική θέση. Τα υψηλότερα ποσοστά βρέθηκαν στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική [20].

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	ΧΩΡΑ	ΕΤΗ	ΠΟΣΟΣΤΟ (%)	ΑΠΟΛΥΤΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ
Ολική κερατοπλαστική	Philadelphia, USA	2001–2005	10,8	126/1162
Ολική κερατοπλαστική	Philadelphia, USA	1996–2000	15,2	233/1529
Ολική κερατοπλαστική	Philadelphia, USA	1989–1995	15,7	384/2442
Ολική κερατοπλαστική	Philadelphia, USA	1983–1988	16	375/2299
Ολική κερατοπλαστική	North Carolina, USA	1980–1981	15,6	29/186
Ολική κερατοπλαστική	North Carolina, USA	1990–1991	13,0	41/316
Ολική κερατοπλαστική	North Carolina, USA	2000–2001	23,8	89/374
Ολική κερατοπλαστική	Indianapolis, USA	1982–1996	23,2	978/4217
Ολική κερατοπλαστική	Washington State, USA	1980–1988	12,5	200/1594
Ολική κερατοπλαστική	Utah, USA	1981–1990	5,8	11/199
Ολική κερατοπλαστική	Los Angeles, USA	1989–1993	4,8	53/1104
Ολική κερατοπλαστική	Los Angeles, USA	1984–1988	4,4	45/1019
Δείγματα κερατοειδούς	Montreal, Canada	1999–2004	10,2	51/500
Ολική κερατοπλαστική	Toronto, Canada	1996–2004	13,0	101/777
Ολική κερατοπλαστική	Toronto, Canada	1986–1995	7,7	69/904
Ολική κερατοπλαστική	Toronto, Canada	1964–1997	9,56	592/6222
Ολική κερατοπλαστική	Denmark	1984–1993	13,9	25/180
Ολική κερατοπλαστική	Katowice, Poland	2000–2004	9,0	47/517
Ολική κερατοπλαστική	France	2000–2001	9,1	1058/11.598
Ολική κερατοπλαστική	Paris, France	1980–1999	9,4	352/3736
Ολική κερατοπλαστική	Italy	2001–2004	3,6	159/4415
Ολική κερατοπλαστική	Erlangen, Germany	1992–1996	14,9	186/1250
Ολική κερατοπλαστική	Erlangen, Germany	1964–1986	11,0	178/1618
Ολική κερατοπλαστική	Belfast, Northern Ireland	1980–1988	9,7	17/175
Ολική κερατοπλαστική	London, UK	1985–1987	6,2	31/500
Ολική κερατοπλαστική	London, UK	1990–1999	9,3	73/784
Ολική κερατοπλαστική (αρχείο)	UK	2007–2008	15,4	227/1478
Ολική κερατοπλαστική	Sorocaba, Brazil	6–12/2003	1,9	2/171
Ολική κερατοπλαστική	São Paulo, Brazil	1996–2005	2,9	17/587
Ολική κερατοπλαστική	São Paulo, Brazil	1991–1995	3,6	9/249
Αρχείο μεταμοσχεύσεων	New Zealand	1991–1999	4,4	58/1370
Μοσχεύματα κερατοειδούς	Australia	1985–1991	4,7	170/3608
Ολική κερατοπλαστική	Taiwan	1987-1999	4,5	35/770
Ολική κερατοπλαστική	Qingdao, China	1997–2002	Corneal dystrophies 3,9	67/1702
Ολική κερατοπλαστική	Shanghai, China	1994–2003	Corneal dystrophies (non-Fuchs) 3,8	9/229
Ολική κερατοπλαστική	Singapore	1991–1995	Corneal dystrophies 10,4	34/327

Ολική κερατοπλαστική	Singapore	1991–2003	7,1	64/2100
Ολική κερατοπλαστική	New Delhi, India	1997–2003	0,74	15/2022
Ολική κερατοπλαστική	Hyderabad, India	6 years	1,34	30/2244
Ολική κερατοπλαστική (άμφω)	Tamil Nadu, India	1985–1997	5,3	2/38
Κερατοπλαστικές	Riyadh, Saudi Arabia	1983–1988	0,6	12/2108
Ολική κερατοπλαστική	Jerusalem, Israel	1981–2000	2,6	28/1057
Ολική κερατοπλαστική	Hadassah, Israel	1961–1990	3,1	32/1018

Στη χώρα μας σε παρόμοια μελέτη που έχει εξετάσει τις κύριες ενδείξεις διεισδυτικής κερατοπλαστικής και πραγματοποιήθηκε από το 1982 έως το 2006 εμφανίζει τον επιπολασμό της ενδοθηλιακής δυστροφίας κερατοειδούς του Fuchs σε 4,6% (πίνακας 1.2). Εξετάστηκαν 2233 περιπτώσεις από τρία πανεπιστημιακά νοσοκομεία στην Ελλάδα και τα δεδομένα επεξεργάστηκαν από τις αντίστοιχες μονάδες μεταμοσχεύσεων [21].

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.2: Διεισδυτικές κερατοπλαστικές στην Ελλάδα από 1982 έως 2006 [21].

ΔΙΕΙΣΔΥΤΙΚΗ ΚΕΡΑΤΟΠΛΑΣΤΙΚΗ	1982–1986 n (%)	1987–1991 n (%)	1992–1996 n (%)	1997–2001 n (%)	2002–2006 n (%)	1982–2006 n (%)
Αφακικό / ψευδοφακικό οίδημα κερατοειδούς	22 (37,3)	62 (35)	115 (26,4)	231 (27)	219 (31)	649 (29,1)
Κερατόκωνος	20 (33,9)	57 (32,2)	117 (26,8)	220 (25,7)	166 (23,5)	580 (26)
Αποκατάσταση	0 (0)	7 (4)	27 (6,2)	105 (12,3)	126 (17,9)	265 (11,9)
Μικροβιακή κερατίτιδα	1 (1,7)	6 (3,4)	51 (11,7)	75 (8,8)	55 (7,8)	188 (8,4)
Μετατραυματικές ουλές κερατοειδούς	0 (0)	8 (4,5)	36 (8,3)	82 (9,6)	45 (6,4)	171 (7,7)
Ερπητική κερατίτιδα	6 (10,2)	9 (5,1)	27 (6,2)	40 (4,7)	22 (3,1)	104 (4,6)
Ενδοθηλιακή δυστροφία κερατοειδούς Fuchs	0 (0)	7 (4)	28 (6,4)	35 (4,1)	34 (4,8)	104 (4,6)
Χημικό/Θερμικό έγκαυμα	0 (0)	1 (0,6)	18 (4,1)	25 (2,9)	17 (2,4)	61 (2,7)
Άλλες αιτίες	10 (16,9)	20 (11,2)	17 (3,9)	42 (4,9)	22 (3,1)	111 (5)
Σύνολο	59	177	436	855	706	2233

Παρά την έλλειψη ακριβούς εκτίμησης του επιπολασμού της FECD, παραμένει μία από τις πιο κοινές ενδείξεις για την μεταμόσχευση κερατοειδούς. Σε παγκόσμια έρευνα για τις μεταμοσχεύσεις κερατοειδούς που πραγματοποιήθηκαν παγκοσμίως, η FECD αποτελεί την πρωταρχική ένδειξη σε ποσοστό 39%, ακολουθεί ο κερατόκωνος σε ποσοστό 27% και η μολυσματική κερατίτιδα σε ποσοστό 16% [22]. Δεδομένα από την Eye Bank Association of America έχουν επίσης αναγνωρίσει το FECD ως την πιο κοινή ένδειξη για τη μεταμόσχευση κερατοειδούς που αντιπροσωπεύει το 22% όλων των μεταμοσχεύσεων κερατοειδούς στις ΗΠΑ [23].

1.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Η αναγνώριση των παραγόντων κινδύνου που σχετίζονται με το FECD θα αποφέρει μεγάλα οφέλη τόσο για τους ασθενείς όσο και για τους κλινικούς γιατρούς που επιδιώκουν να αποτρέψουν την εμφάνιση και την πρόοδο της νόσου.

Η ενδοθηλιακή δυστροφία του Fuchs μπορεί να είναι είτε σποραδική είτε κληρονομική. Σε κληρονομικές περιπτώσεις, η κληρονομικότητα της FECD έχει αποδειχθεί ότι είναι αυτοσωματική κυρίαρχη, με υψηλή διεισδυτικότητα. Σε μια μεγάλη μελέτη 228 συγγενών από 64 οικογένειες με FECD, οι Krachmer et al. παρατήρησε ότι το 38% των συγγενών πρώτου βαθμού άνω των 40 ετών επηρεάστηκαν, υποδηλώνοντας την αυτοσωμική κυρίαρχη κληρονομικότητα με πιθανή γενετική ή περιβαλλοντική τροποποίηση [4].

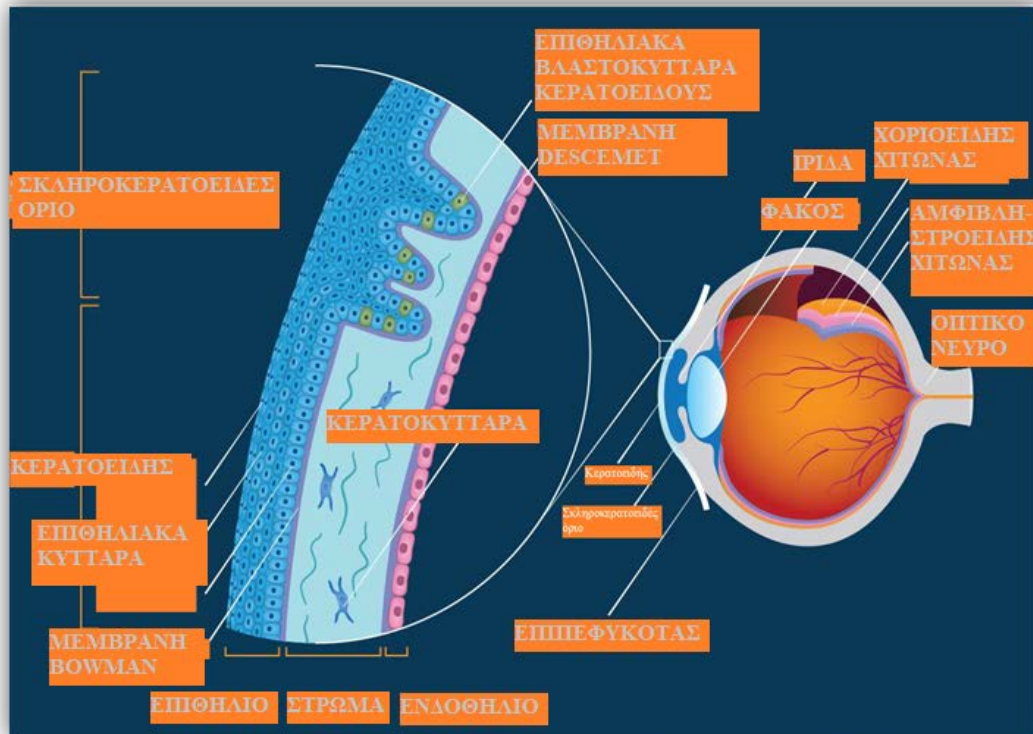
Διάφοροι παράγοντες κινδύνου εκτός από το φύλο έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη κεντρικών guttae και το βαθμό ανάπτυξης της FECD. Στην μελέτη Reykjavik Eye Study η οποία ήταν μια σύγχρονη τυχαία πληθυσμιακή μελέτη ατόμων 55 ετών και άνω, οι συμμετέχοντες με ιστορικό καπνίσματος άνω των 20 πακέτων/έτος είχαν 2,2 φορές αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης οποιουδήποτε πρωτογενούς guttae [15]. Μία πολυκεντρική ομάδα μελέτης της γενετικής της FECD, έχει συσχετίσει το γυναικείο φύλο και το κάπνισμα με αυξημένο κίνδυνο 34% και 30% αντίστοιχα των προχωρημένων FECD (βαθμίδα 4-6). [24]. Υπήρξε συσχέτιση καπνίσματος με αυξημένη παραγωγή αντιδραστικών ριζών O₂ ROS που προκαλούν οξειδωτική βλάβη στην ήδη επηρεασμένη αντιοξειδωτική άμυνα του οφθαλμού [25].

Ο ρόλος της ακτινοβολίας UV στην παθογένεση ή την επιδείνωση της FECD δεν είναι ακόμη σαφής. Ο υψηλότερος επιπολασμός της νόσου στη Σιγκαπούρη έναντι της Ιαπωνίας μπορεί να υποδηλώνει ρόλο της εγγύτητας στον Ισημερινό, [26] ωστόσο, η εκτίμηση της ηλιακής ακτινοβολίας UV μεταξύ των συμμετεχόντων στη μελέτη Eye του Ρέικιαβικ δεν έδειξε σημαντικό κίνδυνο από την αύξηση της έκθεσης στην υπεριώδη ακτινοβολία κατά την τρίτη, τέταρτη ή πέμπτη δεκαετία της ζωής. Αυτή η τελευταία μελέτη αναφέρει ότι το υψηλό σωματικό βάρος και ο υψηλός ΔΜΣ συσχετίστηκαν με αντίστοιχη μείωση κατά 2,5% και 7% του κινδύνου εμφάνισης κεντρικού guttae του κερατοειδούς. Γιατί αυτό μπορεί να συμβαίνει δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί, αν και η αυξημένη σωματική μάζα συσχετίζεται συχνά με αλλαγές στα επίπεδα των ορμονών [24].

Στις περισσότερες μελέτες δεν υπήρξαν συσχετίσεις μεταξύ της FECD, της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας, καθώς και των καρδιαγγειακών παθήσεων και του γλαυκώματος κλειστής γωνίας [24].

1.4 ANATOMIA ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ

Στο σημείο αυτό κρίνεται σκόπιμο να γίνει μια σύντομη αναφορά στην ανατομία και ιστολογία του κερατοειδούς που θα διευκολύνει την κατανόηση της παθοφυσιολογίας και της αιτιοπαθογένειας της FECD.



Εικόνα 1.2: Σχηματική δομή του οφθαλμικού βολβού (πηγή: <https://discovery.lifemapsc.com/>).

Ο κερατοειδής χιτώνας αποτελεί το «παράθυρο» του οφθαλμού. Πρόκειται για μία διαφανή δομή αποτελούμενη κυρίως από ίνες κολλαγόνου που επιτρέπει το σχηματισμό της οπτικής εικόνας στον αμφιβληστροειδή. Η υψηλή συγκέντρωση κολλαγόνου στον κερατοειδή τον καθιστά συμπαγή και ανθεκτικό σε παραμορφώσεις και τραυματισμούς και μαζί με το σκληρό χιτώνα συνθέτουν τον εξωτερικό χιτώνα του οφθαλμού [27]. Μαζί με τη δακρυϊκή στιβάδα με την οποία βρίσκεται σε επαφή συνθέτουν την πρόσθια διαθλαστική επιφάνεια του οφθαλμού. Η διαύγειά του είναι αποτέλεσμα τόσο της ανατομικής του δομής (εικόνα 1.2) όσο και των φυσιολογικών του ιδιοτήτων.

Ο κερατοειδής χιτώνας καταλαμβάνει το πρόσθιο και διαφανές εκτημόριο του ινώδους χιτώνα του οφθαλμού ενώ προς τα πίσω ο ινώδης χιτώνας συνεχίζει ως σκληρός χιτώνας. Οι δύο αυτές δομές του ινώδους χιτώνα διαχωρίζονται μεταξύ τους με την κυκλοτερή επιπολής σκληραία αύλακα εξωτερικά, μέσα στην οποία εντοπίζεται μία στενή ζώνη, η σκληροκερατοειδής στεφάνη. Ο κερατοειδής χιτώνας είναι μία ανάγγειος [28], διαφανής, άχρωμη δομή που λειτουργεί και σαν προστατευτικός φραγμός για τον οφθαλμό.

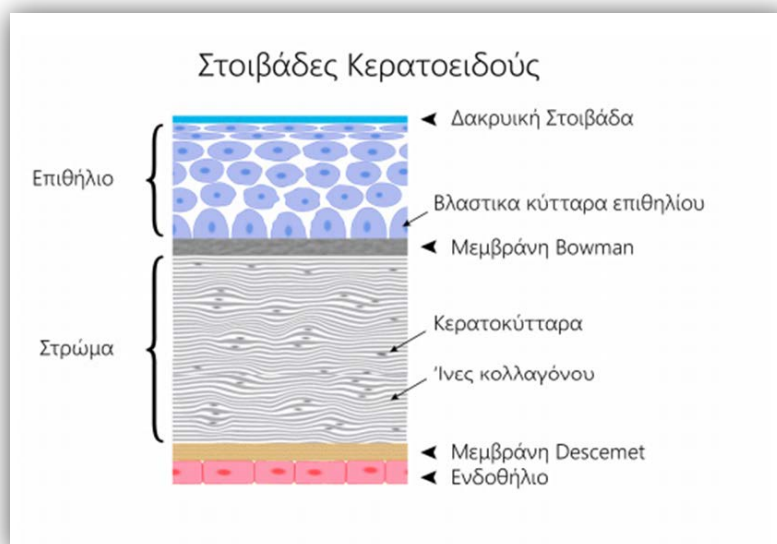
Από άποψη περιγραφικής ανατομικής ο κερατοειδής χιτώνας έχει δύο επιφάνειες, την πρόσθια και την οπίσθια και μία περιφέρεια που αντιστοιχεί στην επιτολής σκληραία αύλακα. Η πρόσθια επιφάνεια προβάλλει στη μεσοβλεφάρια σχισμή και εφυγραίνεται από τα δάκρυα και η κυρτότητά της διαφέρει ανάλογα με την ηλικία και από άτομο σε άτομο [29].

Περίπου το 70% του ξηρού βάρους του κερατοειδούς χιτώνα αποτελείται από το κολλαγόνο που οργανώνεται σε ίνες [27]. Στο στρώμα του κερατοειδούς έχουν βρεθεί τύποι κολλαγόνου I, II, III, V, VI, XII, XIV, με κύριο τύπο αυτό του τύπου I.

Σε ένα μέσο ενήλικα, κατά την παρατήρηση του κερατοειδούς από την πρόσθια πλευρά του, η διάμετρος του αγγίζει τα 11,5 με 12 mm στον οριζόντιο άξονα, ενώ στον κάθετο άξονα είναι κατά περίπου 1mm μικρότερη [30]. Το πάχος του είναι μικρότερο στο κέντρο (~0,5 mm) και σταδιακά αυξάνεται προς την περιφέρεια. Το σχήμα του είναι πιο επίπεδο στην περιφέρεια και γίνεται πιο κυρτό προς το κέντρο, γεγονός που καθιστά τον κερατοειδή μία μη σφαιρική δομή. Η καμπυλότητα αυτή του χιτώνα οφείλεται στην εσωτερική δομή του κυρίως με τις διάφορες δομές και είδη του κολλαγόνου καθώς και στο εξωτερικό περιβάλλον.

1.4.1 Μικροσκοπική Ανατομική του Κερατοειδούς Χιτώνα

Ο κερατοειδής χιτώνας του ανθρώπου αποτελείται από 3 κυτταρικές στιβάδες και είναι: το επιθήλιο, το στρώμα και το ενδοθήλιο, και 2 εσωτερικές μεμβράνες, τη μεμβράνη του Bowman και τη μεμβράνη του Descemet (DM) [30]. (Εικόνα 1.3). Σχετικά πρόσφατα ανακαλύφθηκε και μία ακόμα στιβάδα, η pre-Descemet μεμβράνη [31].



Εικόνα 1.3: Κατακόρυφη τομή του κερατοειδούς χιτώνα.[32].

Επιθήλιο: Το επιθήλιο του κερατοειδούς αποτελεί την πρώτη δομή του κερατοειδούς που έρχεται σ' επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον. Στον άνθρωπο έχει πάχος 50-60 μm [27]. Το επιθήλιο συνδέεται με τη δακρυϊκή στιβάδα και είναι στοιχείο βασικό για τη διαθλαστική ικανότητα του οφθαλμού. Είναι μία στιβάδα μη κερατινοποιημένη που αποτελείται από πλακώδη κύτταρα και χαρακτηρίζεται από ομοιομορφία ως προς τη δομή του. Αποτελείται από μη κερατινοποιημένα, στρωματοποιημένα κύτταρα και το πάχος φτάνει τις 4 με 6 στιβάδες κυττάρων. Στην περιφέρεια έχει πάχος 80 μm και φτάνει τις 10 στιβάδες, αντίστοιχα προς το σκληροκερατοειδές όριο, όπου μεταπίπτει στο επιθήλιο του επιπεφυκότα. [30].

Οι κυτταρικές στιβάδες διακρίνονται σε τρία μέρη:

- ❖ **Βασική στιβάδα** που είναι το έσω τμήμα και αποτελείται από τα βασικά κύτταρα τα οποία οργανώνονται σε μία μόνο στιβάδα. Είναι τα μόνα κύτταρα του επιθηλίου που αναπαράγονται. Τα βασικά κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με ημιδεσμοσωμάτια με τη βασική μεμβράνη. Χάρη σε αυτήν τη σύνδεση αποτρέπεται η αποκόλληση του επιθηλίου του κερατοειδούς. Για αυτό και σε βλάβη της βασικής στιβάδας μπορεί να προκύψουν διαταραχές στην ανάπλαση του επιθηλίου. Η βασική μεμβράνη αποτελείται από κολλαγόνο τύπου IV και πάχος 0,05 μm .
- ❖ **Μεσαία στιβάδα** που είναι το μέσο τμήμα του επιθηλίου και σχηματίζεται από δύο με τρεις στιβάδες κυπελλοειδών κυττάρων (goblet cells) ή wing cells, που ονομάζονται έτσι λόγω του σχήματός τους και τα οποία αποπλάτυνονται προς την επιφάνεια. Με τα υποκείμενα βασικά κύτταρα ενώνονται με δεσμοσωμάτια και μεταξύ τους με δεσμοσωμάτια και ασθενείς συνδέσεις (gap junctions).
- ❖ **Επιφανειακή μη κερατινοποιημένη στιβάδα** που είναι το τρίτο και πιο εξωτερικό τμήμα του επιθηλίου και αποτελείται από δύο έως τρεις στιβάδες κυττάρων που είναι αποπλάτυσμένα (με επίπεδο πυρήνα και λιγότερα κυτταρικά οργανύλια) και κυβοειδή/πολυγωνικά. Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν μικρολάχνες και μικροπτυχώσεις. Οι επεκτάσεις των μικρολαχνών αυξάνουν την επιφάνεια σύνδεσης μεταξύ των κυττάρων αυτών και της δακρυϊκής στιβάδας με την οποία βρίσκονται σε επαφή. Οι στερεές συνδέσεις (zonulae occludentes) και τα ημιδεσμοσωμάτια καθιστούν το επιθήλιο μια αποτελεσματικά ημιδιαπερατή μεμβράνη, η οποία επιτρέπει τη διείσδυση υγρών και μορίων διαμέσου των κυττάρων. Υπάρχουν, επίσης, κυτταρικά μικροστόμια με λειτουργία πινοκύττωσης και πιθανώς είναι χρήσιμα στο μεταβολισμό του κερατοειδούς.

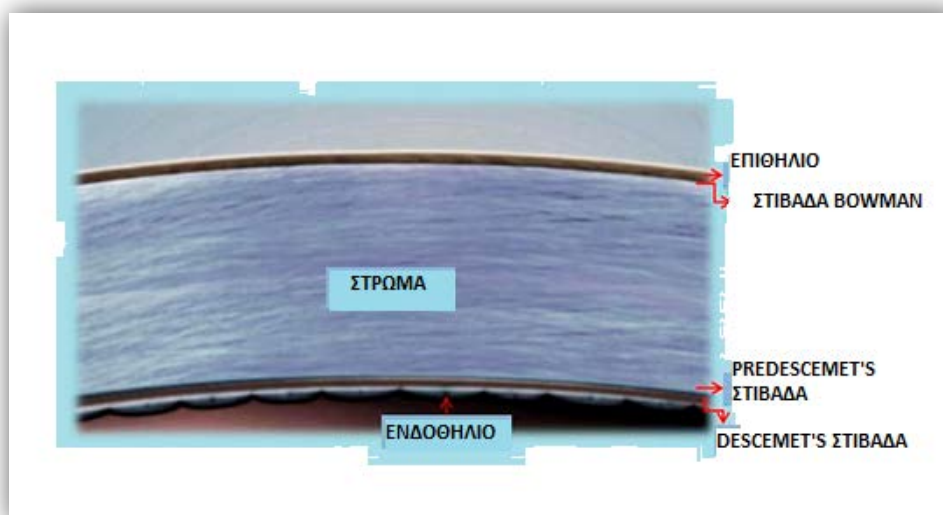
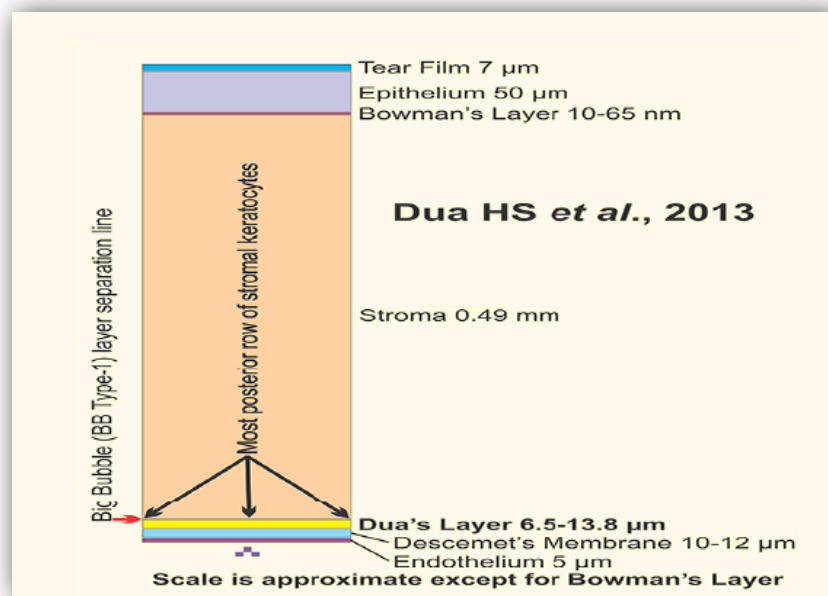
Στο ανθρώπινο μάτι το επιθήλιο του κερατοειδούς αποτελείται συνολικά από 5 έως 7 στιβάδες κυττάρων. Σε μικρότερα θηλαστικά υπάρχουν λιγότερες στιβάδες, ενώ σε μεγαλύτερα μπορεί να βρεθούν 10 έως και 20 κυτταρικές στιβάδες. Τα επιθηλιακά κύτταρα

επιβιώνουν για 7 με 10 ημέρες και απομακρύνονται με τη διαδικασία της απόπτωσης και της απολέπισης. Έτσι το επιθήλιο του κερατοειδούς ανανεώνεται κάθε εβδομάδα.

Μεμβράνη του Bowman: Η μεμβράνη του Bowman βρίσκεται ανάμεσα στο επιθήλιο και το στρώμα του κερατοειδούς και αποτελεί ουσιαστικά μία ακυτταρική συμπακνωμένη περιοχή του στρώματος. Το πάχος της είναι περίπου 8-12 μm στον ενήλικα και συμβάλλει στη διατήρηση του σχήματος του κερατοειδούς. Δεν έχει δυνατότητα αναγέννησης και όταν τραυματίζεται επουλώνεται με τη δημιουργία αδιαφανούς ουλής. [30]. Αποτελείται κυρίως από ίνες κολλαγόνου, τύπου I, III και V ενώ οι ίνες τύπου VII συνδέουν τη ζώνη με το επιθήλιο. Στη μεμβράνη του Bowman οι ίνες του κολλαγόνου είναι λεπτότερες σε σχέση με τις ίνες του στρώματος [27] και πιο τυχαία οργανωμένες ενώ διαπλέκονται άναρχα μέσα σε ένα περιβάλλον βλεννοπρωτεΐνης. Ο ρόλος της μεμβράνης του Bowman φαίνεται πως είναι η διατήρηση της ακεραιότητας του κερατοειδούς και η παρεμπόδιση εισβολής ιών [29].

Στρώμα ή Θεμέλια ουσία: Το στρώμα καταλαμβάνει περίπου το 90% του πάχους του κερατοειδούς και έχει πάχος περίπου 500 μm. Επομένως το πάχος του κερατοειδούς καθορίζεται κυρίως από το στρώμα, το οποίο είναι αρκετά πυκνό και αποτελείται από ίνες κολλαγόνου με κερατοκύτταρα διασπαρμένα ανάμεσά τους που αποτελούν τους ινοβλάστες του χιτώνα, πορευτικά κύτταρα και θεμέλια ουσία [30]. Η περιεκτικότητα του στρώματος σε κολλαγόνο είναι περίπου 71%. Κύρια μορφή είναι οι ίνες κολλαγόνου τύπου I ενώ έχουν βρεθεί και οι τύποι III και V σε χαμηλότερες ποσότητες [33]. Έχουν ακόμα εντοπιστεί και ίνες κολλαγόνου τύπου VI και XII. Το στρώμα διαθέτει ίνες κολλαγόνου τύπου I και V οι οποίες συμβάλλουν σημαντικά στη διαφάνεια και τη διαθλαστικότητα του οφθαλμού [27]. Οι μηχανικές ιδιότητες του κερατοειδούς διαδραματίζουν σοβαρό ρόλο και στη διαθλαστική δύναμή του [34]. Τα πετάλια αποτελούνται από κολλαγόνα ινίδια με ομαλή και παράλληλη διάταξη. Τα κερατοκύτταρα αποτελούν τροποποιημένα ινοπλαστικά κύτταρα, είναι λεπτά, αποπλατυσμένα και βρίσκονται συνήθως ανάμεσα στις δεσμίδες. Παράγουν τα συστατικά του στρώματος. Ανάμεσα στις δεσμίδες υπάρχουν και πορευτικά κύτταρα (κυρίως λευκοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και πολυμορφοπύρηνα), τα οποία αυξάνουν σε παθολογικές καταστάσεις (έντονη μιτωτική και μειωτική διαίρεση) και συντελούν στην επούλωση. Η θεμέλια ουσία που περιβάλλει τα ινίδια αποτελείται από βλεννοσακχαρίτες και γλυκοπρωτεΐνες (χονδροϊτίνη και κερατίνη). Συμβάλλουν στη διατήρηση των κανονικών αποστάσεων μεταξύ των κολλαγόνων ινιδίων, προστατεύουν τις ίνες από τα διάφορα ένζυμα, διατηρεί την υψηλή περιεκτικότητα σε ύδωρ.

Μεμβράνη Pre-Descemet (Dua's Layer): Ο Harminder S. Dua και οι συνεργάτες του ανακοίνωσαν την ύπαρξη μίας ακόμα στιβάδας, η οποία εντοπίζεται ανάμεσα στο στρώμα και τη μεμβράνη του Descemet. Η στιβάδα αυτή ονομάστηκε στιβάδα του Dua ή μεμβράνη pre-Descemet (Εικόνα 1.4). Πρόκειται για μία στιβάδα που αποτελείται από 5 έως 8 φύλλα κολλαγόνου τύπου I. Έχουν επίσης βρεθεί μικρές ποσότητες κολλαγόνου τύπου V αλλά και τύπου IV και VI [31].

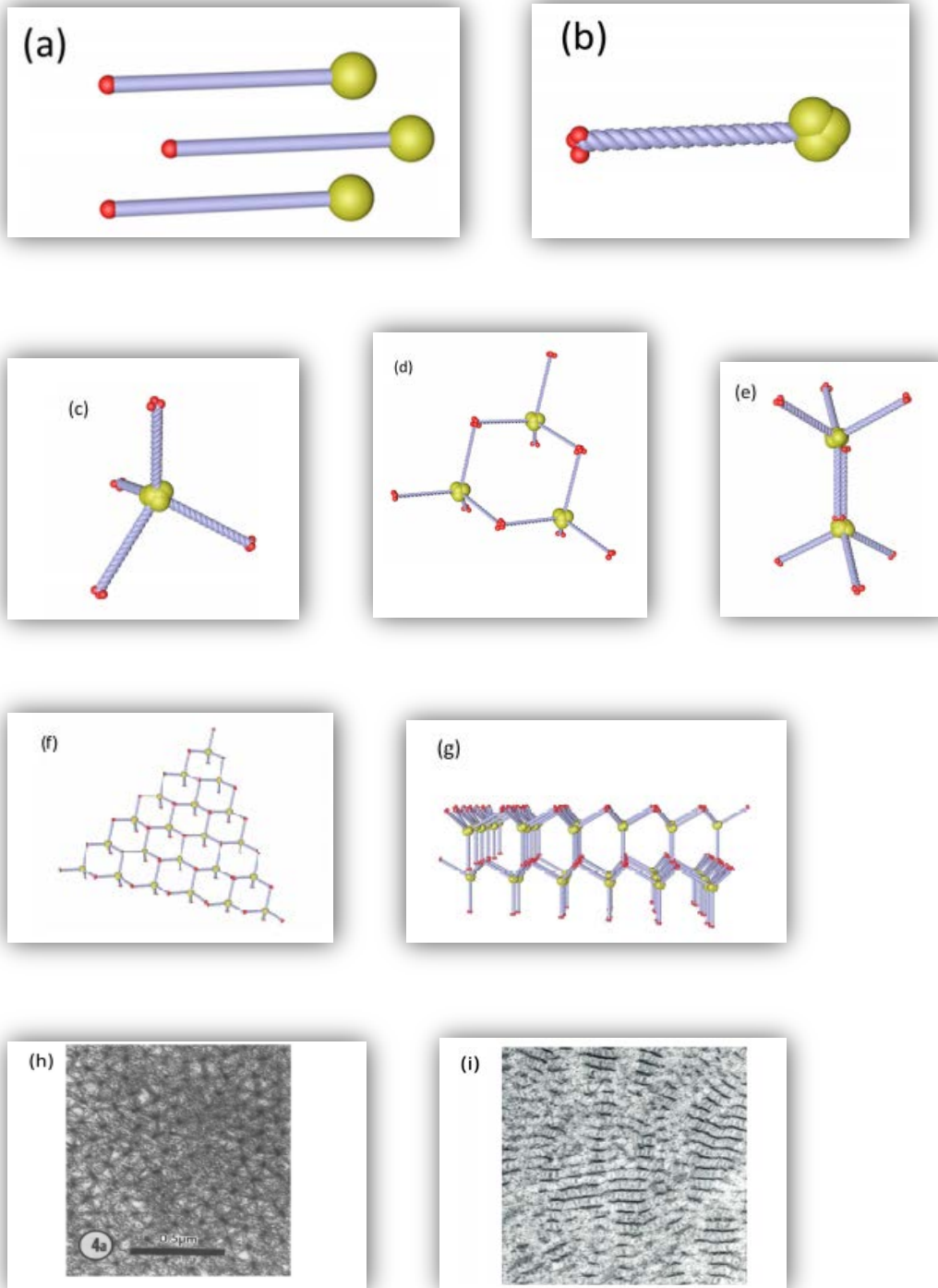


Εικόνα 1.4: Μεμβράνη Pre-Descemet (Dua's Layer) [31].

Δεσκεμέτειος Μεμβράνη ή Descemet: Η μεμβράνη του Descemet βρίσκεται ανάμεσα στο στρώμα και το ενδοθήλιο θεωρείται ότι αποτελεί τη βασική μεμβράνη του ενδοθηλίου του κερατοειδούς. Το πάχος της αυξάνεται με την ηλικία. Ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι έχουν καταδείξει την ύπαρξη φμπρονεκτίνης, λαμινίνης και κολλαγόνου τύπου IV όπως και κολλαγόνου τύπου VIII η διάταξη του οποίου διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο (εικόνα 1.5). Η μεμβράνη του Descemet έχει πάχος 4-6 μm. Αποτελείται από άτυπα κολλαγόνα ινίδια, άμορφη βασική ουσία και από λεπτά ινίδια. Παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα σε τραυματισμούς, στη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων και άλλες παθολογικές καταστάσεις. Στην περιφέρεια, κοντά στο σκληροκερατοειδές όριο παρατηρείται μία πάχυνση από κολλαγόνο συνδετικό ιστό που ονομάζεται γραμμή του Schwalbe. Η μεμβράνη συνδέεται με ημιδεσμοσωμάτια με το ενδοθήλιο αλλά δεν υπάρχει σύνδεση με το στρώμα γι' αυτό και μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από αυτό (απόσπαση Δεσκεμετείου) [32]. Σε οίδημα του κερατοειδή αυξάνεται η καμπυλότητα της εξωτερικής επιφάνειας και σμικρύνεται η καμπυλότητα της εσωτερικής επιφάνειας, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πτυχών (folds, Vogt's line) (γραμμοειδής κερατίτις, striate keratitis).

Ενδοθήλιο κερατοειδούς: Το ενδοθήλιο του κερατοειδούς αποτελείται από μία μόνο στιβάδα αρμονικά τακτοποιημένων αποπλατυσμένων εξαγωνικών πολυεδρικών κυττάρων, τα οποία σχηματίζουν αυτό που έχει περιγραφεί ως ενδοθηλιακό μωσαϊκό και μοιάζει με μωσαϊκό «δίκην κηρήθρας» (εικόνα 1.6). Βρίσκεται προς την πλευρά του προσθίου θαλάμου και σε επαφή με το υδατοειδές υγρό. Εμβρυολογικά, με την έναρξη του σχηματισμού του κερατοειδούς χιτώνα μεταναστεύουν κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας σχηματίζοντας μία μονή στιβάδα κυβοειδών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά αποπλατύνονται σταδιακά και δημιουργούνται στενές συνδέσεις ανάμεσά τους (tight junction) [32].

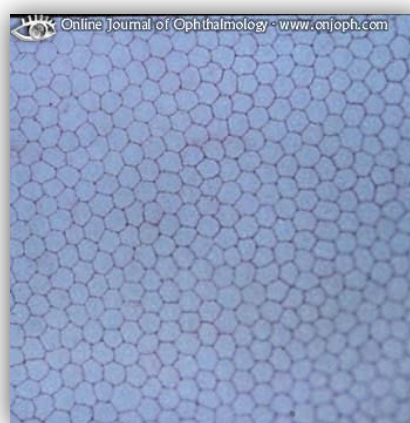
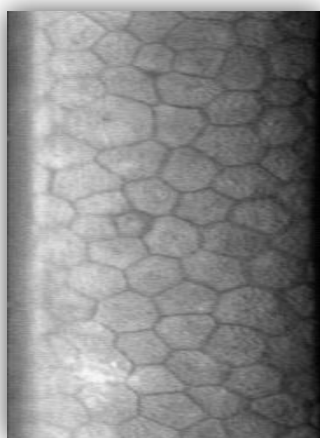
Η πυκνότητα του ενδοθηλίου μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου καθώς παρατηρείται ελάττωση (κατά τη γέννηση 4.000-5.000 κυτ/mm² 3.000-4.000 κυτ/mm² στους νέους, και 1.000-2.000 κυτ/mm² στην ηλικία των 80 ετών). Η κεντρική πυκνότητα σε ενδοθηλιακά κύτταρα ελαττώνεται με έναν μέσο ρυθμό 0,6% το χρόνο σε έναν φυσιολογικό κερατοειδή χιτώνα. Ελάχιστος αποδεκτός αριθμός θεωρείται περίπου 1500 κυτ/mm² ενώ σε δυνητικό οίδημα κερατοειδούς έχουμε σε περιπτώσεις <800 κυτ/mm². Επίσης δεν διαιρούνται και δεν αναπληρώνονται. Έχουν όμως την ικανότητα να εξαπλώνονται μεγεθυνόμενα και να καταλαμβάνουν χώρο μέχρι και 8 φυσιολογικών κυττάρων [35]



Εικόνα 1.5 : Η θεωρητική συναμολόγηση του κολλαγόνου VIII. Περιλαμβάνει δύο τύπους πολυπεπτιδικών αλυσίδων, α1 (VIII) και α2 (VIII) που αποτελούνται από (α) δύο σφαιρικές περιοχές η μεγαλύτερη στο -COOH άκρο, που συνδέονται με μία ράβδο που μοιάζει με τριπλή έλικα. (β) Αυτά τα πολυπεπίδια μπορούν να σχηματίσουν ομοιοπολυμερή. (γ) Τέσσερα από αυτά τα ομοιομερή μπορούν να συνδέονται μέσω των C-τελικών τους περιοχών για να σχηματίσουν τετραεδρικά συγκροτήματα. Αυτά τα τετράεδρα μπορούν να συναμολογηθούν περαιτέρω μέσω (d) NH₂- έως NH₂-τελικών αλληλεπιδράσεων ή (ε) NH₂- προς COOH-τελικές αλληλεπιδράσεις. (στ) Τα εκτεταμένα δίκτυα συναμολόγησης του κολλαγόνου VIII μπορούν να σχηματίσουν ένα εξαγωνικό δίκτυο(γ) που στοιβάζεται κατακόρυφα, όπως φαίνεται εδώ με βάση τις αλληλεπιδράσεις N-προς N-τελικού. Αυτό το θεωρητικό σχέδιο συναμολόγησης του κολλαγόνου VIII αντιστοιχεί στην υπερδομή του κολλαγόνου VIII, που απεικονίζεται μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας μετάδοσης σε μεμβράνη Descemet. (η) Σε ορθή απεικόνιση, το κολλαγόνο VIII εμφανίζεται ως εξαγωνικό δίκτυο, ενώ (ι) σε εγκάρσια απεικόνιση εμφανίζεται ως παράλληλες ζώνες [36].

Το τυπικό ενδοθηλιακό κύτταρο έχει ύψος 5 μm, πλάτος 18-20 μm και ένα ωοειδή πυρήνα διαμέτρου 7 μm. Η οπίσθια επιφάνεια του εμφανίζει 20-30 μικρολάχνες, οι οποίες προβάλλουν εντός του προσθίου θαλάμου. Το πρωτόπλασμα των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι πλούσιο σε οργανίδια, συσκευές Golgi, μιτοχόνδρια και ενδοπλασματικό δίκτυο, υποδηλώνοντας έντονη πρωτεϊνική σύνθεση και ενεργό μεταβολισμό. Ωστόσο, δεν έχουν τη δυνατότητα αναπαραγωγής *in vivo*. Γι' αυτό και κατά τη γέννηση ο αριθμός των κυττάρων αυτών είναι μεγάλος, με κυτταρική πυκνότητα. Έχει παρατηρηθεί ότι κερατοειδείς με χαμηλή πυκνότητα ενδοθηλιακών κυττάρων παρουσιάζουν μεγαλύτερη πιθανότητα εκδήλωσης οιδήματος κερατοειδούς [32].

Η σύνδεση των κυττάρων του ενδοθηλίου με τη δεσμεύεται μεμβράνη είναι χαλαρή (με ημιδεσμοσώματα). Ο φραγμός δεν είναι απόλυτα στεγανός και επιτρέπει την είσοδο θρεπτικών ουσιών, όπως γλυκόζης και αμινοξέων που συνοδεύονται και από νερό. Η περίσσεια του νερού αποβάλλεται με ενεργό μηχανισμό, την αντλία του ενδοθηλίου, που μεταφέρει ιόντα και νερό και διατηρεί ισορροπία της διάχυσης υγρών και ενεργού μεταφοράς υγρών. Έτσι τα ενδοθηλιακά κύτταρα διατηρούν τη συγκέντρωση ύδατος του στρώματος με μία λειτουργία αντλίας και η διαφορά ωσμωτικότητας ανάμεσα στο στρώμα και στο ενδοθήλιο του κερατοειδούς απομακρύνει τα υγρά προς το υπερτονικό ενδοθήλιο. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν δύο σημαντικά στοιχεία, τον **πλειομορφισμό**, δηλαδή ποικιλία στο σχήμα τους και **πολυμεγεθισμό**, δηλαδή ικανότητα να αυξάνονται σε μέγεθος. Έτσι, καθώς ο αριθμός των ενδοθηλιακών κυττάρων στον κερατοειδή χιτώνα ελαττώνεται με την ηλικία, τη φλεγμονή, τον τραυματισμό ή λόγω παθήσεων όπως η δυστροφία του Fuchs, τα εναπομείναντα κύτταρα «απλώνουν» ώστε να καλύψουν το κενό που προκύπτει από την καταστροφή των κυττάρων, αυξάνουν σε μέγεθος και χάνουν το εξαγωνικό τους σχήμα [30].



Εικόνα 1.6: Ενδοθήλιο κερατοειδούς χιτώνα. Εξαγωνικό σχήμα και διάταξη «δίκην κηρήθρας» [30].

1.4.2 Νεύρωση Κερατοειδούς Χιτώνα

Η νεύρωση του κερατοειδούς χιτώνα είναι αισθητική και προέρχεται από τα μακρά και βραχεία ακτινοειδή νεύρα, κλάδους του οφθαλμικού νεύρου (1^{ος} κλάδος του τριδύμου νεύρου). Σχηματίζονται τρία νευρικά δίκτυα, ένα στο στρώμα, ένα στη στιβάδα του Bowman και ένα στο επιθήλιο. Προς την σκληροκερατοειδή στεφάνη γίνονται εγκάρσιες αναστομώσεις που σχηματίζουν τελικά το κυκλοτερές περικεράτσιο πλέγμα. Από το πλέγμα ξεκινούν αμύελες ίνες που ύστερα από διακλαδώσεις φτάνουν στο στρώμα του κερατοειδούς και σχηματίζουν το θεμέλιο πλέγμα που νευρώνει το στρώμα. Από το περικεράτσιο πλέγμα φέρονται ίνες που διαπερνούν τη μεμβράνη του Bowman και σχηματίζουν το υποεπιθηλιακό πλέγμα. Συνεχίζουν την πορεία τους στο επιθήλιο, μεταξύ των κυττάρων. Στη νεύρωση αυτή οφείλεται η αίσθηση του πόνου και οι αντανakλάσεις του κερατοειδούς χιτώνα [30]. Το ενδοθήλιο και η μεμβράνη του Descemet δε δέχονται νεύρωση. Η αισθητική νεύρωση του κερατοειδούς είναι σημαντική για την ακεραιότητα του επιθηλίου. Απώλεια της αισθητικότητας του κερατοειδούς χιτώνα οδηγεί σε διαταραχές της μεταβολικής λειτουργίας των επιθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα την απόπτωση των κυττάρων [32].

1.5 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ

1.5.1 Μεταβολισμός του κερατοειδούς

Η φυσιολογική μεταβολική δραστηριότητα είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της θερμοκρασίας του κερατοειδούς, την ανανέωση των κυττάρων του, τη διατήρηση των διεργασιών μεταφοράς και τη διατήρηση της διαφάνειάς του. Επίσης είναι σημαντική για τη σωστή λειτουργία του κερατοειδούς που αφορά στη διάθλαση του φωτός και στην απάντησή του σε καταστάσεις όπως η αφυδάτωση, η εισβολή μικροοργανισμών και οι τραυματισμοί. Δεδομένης της έλλειψης αγγείων στον κερατοειδή, η λήψη των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών γίνεται μέσω των υγρών που τον περιβάλλουν, και συγκεκριμένα μέσω του υδατοειδούς υγρού, του διάμεσου υγρού που προέρχεται από περικερατοειδικά αγγεία και της δακρυϊκής στιβάδας. Κύριοι παράγοντες είναι η γλυκόζη και το οξυγόνο, ενώ τα προϊόντα του μεταβολισμού που πρέπει να απομακρύνονται είναι κυρίως το γαλακτικό οξύ και το διοξείδιο του άνθρακα [37].

Η γλυκόζη και το γλυκογόνο είναι οι κύριες πηγές ενέργειας για το επιθήλιο. Τα αποθέματα γλυκογόνου αλλά και αυτά της γλυκόζης, επιτρέπουν την φυσιολογική μεταβολική λειτουργία για ώρες μετά από εκτομή του κερατοειδούς [38]. Η γλυκόζη προέρχεται κυρίως από το υδατοειδές υγρό, ενώ ένα μικρό ποσοστό προέρχεται από τα αγγεία του σκληροκερατοειδούς ορίου ή από τα δάκρυα. Μεταβολίζεται τόσο με αερόβιους όσο και με αναερόβιους μηχανισμούς. Επικρατεί η αερόβια γλυκόλυση (κύκλος του Krebs) καθώς είναι ενεργειακά πιο αποδοτική από την αναερόβια, η οποία ενεργοποιείται κατά τη

διάρκεια υποξίας. Η παροχή γλυκόζης στο στρώμα γίνεται με διευκολυνόμενη διάχυση μέσω του ενδοθηλίου και στο επιθήλιο με παθητική διάχυση μέσω του στρώματος. Επιπλέον, το επιθήλιο έχει τη δυνατότητα αποθήκευσης γλυκογόνου, το οποίο και μεταβολίζει όταν προκύπτει ανεπάρκεια γλυκόζης όπως σε περίπτωση υποξίας ή τραύματος [38]. Από τον καταβολισμό της γλυκόζης παράγεται ATP και νικοτιναμίδιο, ενώσεις υψηλής ενέργειας που συμμετέχουν στις διάφορες κυτταρικές διεργασίες. Η παρουσία γαλακτικού οξέος καταδεικνύει τη σημασία της αναερόβιας γλυκόλυσης που λαμβάνει χώρα στον κερατοειδή. Το πυροσταφυλικό και γαλακτικό οξύ που παράγονται από τη γλυκόλυση, μετατρέπεται κατά το μεγαλύτερο μέρος σε διοξείδιο του άνθρακα που αποβάλλεται μέσω διάχυσης από το επιθήλιο και το ενδοθήλιο, ενώ το υπόλοιπο μετατρέπεται σε διττανθρακικό οξύ, αποβαλλόμενο μέσω του ενδοθηλίου στο υδατοειδές υγρό. Το γαλακτικό οξύ διαχέεται προς το υδατοειδές υγρό μέσω του στρώματος και του ενδοθηλίου. Σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις του κερατοειδούς, όπως η υποξία, η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος αυξάνεται, οδηγώντας σε οξέωση με αλλαγή της τοπικής οσμωτικής ισορροπίας με συνέπεια να δημιουργείται οίδημα του ενδοθηλίου και του στρώματος και να αλλοιώνεται η λειτουργία και η μορφολογία του ενδοθηλίου [32].

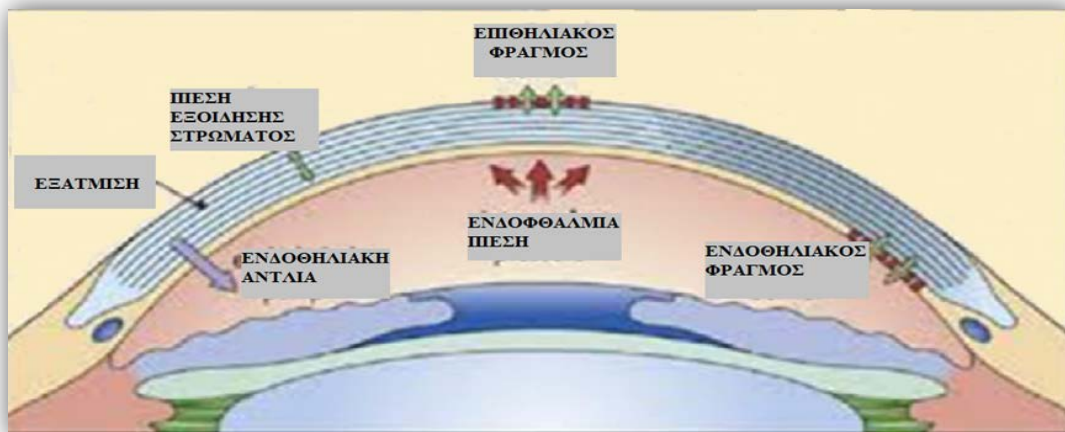
Το οξυγόνο είναι απαραίτητο για την υποστήριξη του μεταβολικού ρυθμού του επιθηλίου και του ενδοθηλίου, ο οποίος είναι αρκετά υψηλότερος σε σχέση με αυτόν του στρώματος. Δεδομένης της χαμηλής διαλυτότητάς του σε υγρά μέσα, η παροχή οξυγόνου αποτελεί ένα ιδιαίτερο πρόβλημα. Το υδατοειδές υγρό έχει φτωχή περιεκτικότητα σε οξυγόνο. Σε φυσιολογικές συνθήκες, όταν τα βλέφαρα είναι ανοιχτά, η κύρια πηγή οξυγόνου για τον κερατοειδή είναι το στρώμα των δακρύων. Όταν ο οφθαλμός είναι κλειστός ή καλύπτεται από μη διαπερατό σε οξυγόνο φακό επαφής, η κύρια πηγή οξυγόνου για τον κερατοειδή είναι τα αγγεία του επιπεφυκότα ή το υδατοειδές υγρό. Σε περίπτωση υποξίας δημιουργείται οίδημα στον κερατοειδή εξαιτίας της μειωμένης δραστηριότητας λόγω της ανεπαρκούς οξυγόνωσης του ενδοθηλίου, όσο και της πτώσης του pH η οποία προκαλείται από την αύξηση της συγκέντρωσης γαλακτικού και ανθρακικού οξέος. Οι αγγειακές αγκύλες του σκληροκερατοειδούς ορίου εμφανίζονται διευρυμένες και συμφορημένες, ενώ υπάρχει τάση για νεοαγγείωση. Κατά τη διάρκεια του ύπνου προκαλείται οίδημα στον κερατοειδή διότι το οξυγόνο της ατμόσφαιρας αδυνατεί να φτάσει μέσα από τα κλειστά βλέφαρα, με αποτέλεσμα την ελάττωση του οξειδωτικού μεταβολισμού [38].

Τα αμινοξέα είναι απαραίτητα για την παραγωγή ενζύμων και την ιστική ανανέωση. Σημαντική ποσότητα αμινοξέων περιέχεται στα δάκρυα, ενώ το υδατοειδές υγρό καλύπτει συμπληρωματικά τις ανάγκες του κερατοειδή. Η γλουταθειόνη είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του ενδοθηλίου λόγω της συμβολής της στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και των τοξικών σουπεροξειδίων, τα οποία σχηματίζονται από την έκθεση στο φως.

1.5.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΕΝΥΔΑΤΩΣΗΣ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ

Η ρύθμιση της ενυδάτωσης του κερατοειδούς αποτελεί έναν από τους βασικότερους παράγοντες στη διατήρηση της διαφάνειας του κερατοειδούς. Σε ιδανικές συνθήκες, η ενυδάτωση του ανθρώπινου κερατοειδούς διατηρείται σε ποσοστό 78%, ώστε ο κερατοειδής να θεωρείται ότι βρίσκεται σε κατάσταση σχετικής αφυδάτωσης. Κάθε διαταραχή στους μηχανισμούς της ρύθμισης της ενυδάτωσης του κερατοειδούς μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της διαφάνειας του, καθώς το στρώμα έχει την ιδιότητα να απορροφά νερό και να εξοιδαίνεται. Επειδή το οίδημα προκαλεί μια συνακόλουθη αύξηση στο πάχος του κερατοειδούς, η ενυδάτωση του και το κεντρικό του πάχος συνδέονται γραμμικά.

Οι πέντε βασικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την ενυδάτωση και συνεπώς το πάχος του κερατοειδούς είναι α) η εξάτμιση ύδατος από την επιφάνεια του κερατοειδούς, β) η λειτουργία επιθηλίου και ενδοθηλίου ως φραγμών, γ) η ενδοφθάλμια πίεση, δ) η πίεση εξοίδησης του στρώματος και ε) η λειτουργία της αντλίας του ενδοθηλίου (εικόνα 1.7) [30].



Εικόνα 1.7: Μηχανισμοί ρύθμισης ενυδάτωσης κερατοειδούς [30].

α) Εξάτμιση ύδατος από την επιφάνεια κερατοειδούς

Η εξάτμιση ύδατος από το στρώμα των δακρύων αυξάνει την συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών και κατά συνέπεια την ωσμωτικότητα των δακρύων. Η αναπτυσσόμενη βαθμίδωση της ωσμωτικότητας μεταξύ στρώματος δακρύων και επιθηλίου προκαλεί τη μεταφορά ύδατος από το επιθήλιο, και κατά συνέπεια από το στρώμα, προς τα έξω.

Όταν οι οφθαλμοί είναι ανοιχτοί, παρατηρείται εξάτμιση υγρών με ρυθμό περίπου 2,5 $\mu\text{L}/\text{cm}^2/\text{h}$ [32]. Σε φυσιολογικούς οφθαλμούς με ποιοτικά και ποσοτικά επαρκή έκκριση δακρύων, η εξάτμιση των δακρύων δε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο ισοζύγιο της περιεκτικότητας του κερατοειδούς σε ύδωρ. Για αυτό το λόγο, και η συμμετοχή αυτού του μηχανισμού στην αφυδάτωση του κερατοειδούς είναι εν μέρει αμφιλεγόμενη.

Έχει αποδειχθεί ότι ο ρυθμός της αναστροφής οίδηματος κερατοειδούς οφειλόμενο σε υποξία είναι σημαντικά ταχύτερος σε ανοικτούς παρά κλειστούς οφθαλμούς [39]. Σε άλλη μελέτη, όμως, η εξάτμιση δακρύων δεν θεωρείται σημαντικός μηχανισμός [40]. Παρ' όλα αυτά, σε περίπτωση που οι υπόλοιποι μηχανισμοί παρουσιάζουν κάποια διαταραχή, η εξάτμιση δακρύων μπορεί να αποτελέσει ένα βοηθητικό μηχανισμό στη διατήρηση της αφυδάτωσης του επιθηλίου, όπως στα πρώιμα στάδια της ενδοθηλιακής δυστροφίας του Fuchs, όπου παρατηρούνται ημερήσιες διακυμάνσεις της οπτικής οξύτητας (πιο θολή όραση νωρίς το πρωί, η οποία βελτιώνεται στη συνέχεια). Έτσι, ερμηνεύεται το φαινόμενο ότι ο κερατοειδής κατά τις πρωινές ώρες να είναι κατά 5% λεπτότερος από ότι κατά τη διάρκεια του ύπνου [32].

β) Πίεση εξοίδησης στρώματος

Το ποσοστό ενυδάτωσης του κερατοειδούς μπορεί να φτάσει μέχρι και 98%, όταν ο κερατοειδής τοποθετηθεί σε ένα υδαρές μέσο, με αναλογική αύξηση στο πάχος του. Παρομοίως, με την αφαίρεση του επιθηλίου και του ενδοθηλίου το στρώμα έχει την τάση να εξοιδηθεί όσο και δύο φορές το πάχος του υπό φυσιολογικές συνθήκες, λόγω της απορρόφησης ύδατος από την θεμέλια ουσία του στρώματος [32].

Οι πρωτεογλυκάνες του στρώματος διασυνδεδεμένες με το κολλαγόνο έλκουν ύδωρ και δημιουργούν μια ισχυρή κλίση πίεσης, που αποκαλείται πίεση εξοίδησης. Η εξοίδηση του στρώματος οφείλεται περισσότερο σε διαϊνιδιακή απορρόφηση ύδατος παρά σε εξοίδηση των ινιδίων του κολλαγόνου. Οι γλυκοζαμινογλυκάνες διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο σε αυτό το φαινόμενο, αφού έχουν αρνητική φόρτιση και απωθούνται μεταξύ τους, ενώ έχουν επίσης την τάση να προσλαμβάνουν κατιόντα για να διατηρήσουν ουδέτερο φορτίο (ισορροπία Donnan). Έτσι ευνοείται η απορρόφηση ύδατος από τη θεμέλια ουσία.

Επίσης, παρατηρούνται διαφορές μεταξύ του πρόσθιου τριτημορίου και των δύο οπίσθιων τριτημορίων του κερατοειδούς σε ιστολογικό, υπερηχογραφικό και βιοχημικό επίπεδο. Το πρόσθιο στρώμα περιέχει λιγότερο νερό από το οπίσθιο. Τα αίτια αυτής της διαφοράς είναι η μεγαλύτερη ποσότητα γλυκόζης στο οπίσθιο στρώμα καθώς και η ανομοιογενής κατανομή πρωτεογλυκανών στον κερατοειδή. Η θειική δερματάνη βρίσκεται κυρίως στο πρόσθιο μέρος του κερατοειδούς, ενώ περισσότερη θειική κερατάνη βρίσκεται στο οπίσθιο. Η θειική δερματάνη παρουσιάζει την ιδιότητα να διατηρεί ύδωρ αλλά μικρότερη ικανότητα να το απορροφά, ενώ η θειική κερατάνη παρουσιάζει αντίστροφες ιδιότητες. Αυτό το γεγονός εξηγεί γιατί το οίδημα του στρώματος επηρεάζει κυρίως το οπίσθιο μέρος και υποστρέφει εύκολα, όταν αποκατασταθεί η λειτουργία της αντλίας του ενδοθηλίου. Η ελάττωση της θερμοκρασίας του κερατοειδούς η οποία επηρεάζει τη συνοχή της δακρυϊκής στιβάδας, η ανάσχεση του αναερόβιου μηχανισμού της γλυκόλυσης, η ανεπαρκής οξυγόνωση και η ελάττωση παροχής γλυκόζης είναι αιτίες που προκαλούν οίδημα του στρώματος [41].

γ) Ενδοφθάλμια πίεση

Η ενδοφθάλμια πίεση εμφανίζει μικρή επίδραση στη ρύθμιση της ενυδάτωσης του στρώματος του κερατοειδούς. Είτε η χρόνια ή η οξεία αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης μπορεί να προκαλέσουν οίδημα του κερατοειδούς και αύξηση στο πάχος του, κυρίως λόγω βλάβης των ενδοθηλιακών κυττάρων παρά με το μηχανισμό του γλαυκώματος κλειστής γωνίας.

Όταν η ενδοφθάλμια πίεση ξεπεράσει την πίεση εξοίδησης του στρώματος (περίπου 55 mm Hg), προκαλείται μεταφορά ύδατος από το υδατοειδές προς το στρώμα. Σε περιπτώσεις όπου η λειτουργία του ενδοθηλίου εμφανίζεται μειωμένη και το πάχος του στρώματος ξεπερνά τα 600 μm, τότε το οίδημα του επιθηλίου μπορεί να προκληθεί ακόμα και με φυσιολογική ενδοφθάλμια πίεση [32].

δ) Λειτουργία επιθηλίου και ενδοθηλίου ως φραγμών

Τα κύτταρα του επιθηλίου και του ενδοθηλίου συνδέονται μεταξύ τους με στερεές συνδέσεις, οι οποίες είναι ορατές με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και χρώση με αντισώματα έναντι πρωτεϊνών, όπως η ZO-1 και οι οκκλουδίνες [42]. Αυτές οι στερεές συνδέσεις μαζί με τις κυτταρικές μεμβράνες σχηματίζουν ένα φυσικό φραγμό και δίνουν τη δυνατότητα στο επιθήλιο και στο ενδοθήλιο να λειτουργήσουν ως ημιδιαπερατές μεμβράνες που ρυθμίζουν τη ροή υγρού και ηλεκτρολυτών στον κερατοειδή και να αναχαιτίζουν την ταχεία μετακίνηση υγρών για ωσμωτικούς λόγους.

Το επιθήλιο παρουσιάζει διπλάσια αντίσταση στη ροή ύδατος από το ενδοθήλιο, αλλά το ενδοθήλιο είναι 200 φορές πιο αποτελεσματικό ως φραγμός στους ηλεκτρολύτες από το επιθήλιο. Αν αφαιρεθεί ή καταστραφεί το επιθήλιο, το στρώμα του κερατοειδούς μπορεί να αυξήσει το πάχος του μέσω του μηχανισμού της εξοίδησης κατά 150% σε χρονικό διάστημα 4 με 6 ωρών, όταν βρίσκεται σε επαφή με τη στιβάδα των δακρύων ή με άλλες τοξικές ουσίες.

Αρκετοί παράγοντες μπορούν να βλάψουν τη λειτουργία του επιθηλίου και του ενδοθηλίου ως φραγμών και να προκαλέσουν οίδημα κερατοειδούς με αντίστοιχη αύξηση του πάχους του. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι: μια μηχανική ή χημική βλάβη, η δυστροφία, η έκθεση σε διαλύματα χωρίς ασβέστιο, η οξείδωση της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης, μια αλλαγή στο pH, καθώς και η έκθεση σε τοξικά έκδοχα ή συντηρητικά.

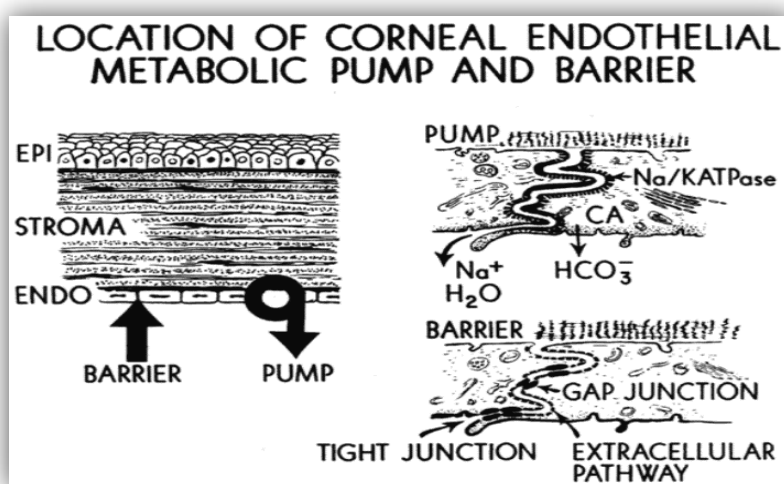
ε) Αντλία ενδοθηλίου

Η αντλία του ενδοθηλίου είναι ο κύριος ρυθμιστής της ενυδάτωσης του κερατοειδούς. Αυτή η λειτουργία επιτελείται μέσω ενός μηχανισμού “Pump-Leak”, όπου η Αντλία (“Pump”) εκφράζει τους μηχανισμούς ενεργού μεταφοράς του ενδοθηλίου και η

Διαρροή (“Leak”) την πίεση εξοίδησης του στρώματος. Για τη λειτουργία της Αντλίας, η παρουσία $\text{HCO}_3^- \text{Cl}^-$ και η δραστική ενεργότητα των ενζύμων της Na^+/K^+ -ΑΤΡάσης και της καρβονικής ανυδράσης θεωρούνται απαραίτητες [43]. Κυρίως το ενδοθήλιο ρυθμίζει την ενεργητική αφυδάτωση του κερατοειδούς μέσω της ενεργητικής μεταφοράς ιόντων όπως το Na^+ από το στρώμα στο υδατοειδές υγρό. Το νάτριο μεταφέρεται στα κύτταρα της επιφάνειας μέσω διαύλων και εξωθείται στο διάμεσο χώρο μέσω μιας αντλίας.

Μέχρι στιγμής αρκετοί μεταφορείς ανιόντων και διάλυτοι ιόντων έχουν ανιχνευθεί και θα μπορούσαν να υποστηρίξουν ένα μοντέλο έκκρισης ιόντων ως τη βάση της αντλίας του ενδοθηλίου. Όμως, δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία που να υποστηρίζουν πλήρως αυτή τη θεωρία. Για αυτό το λόγο, έχουν προταθεί άλλα μοντέλα, όπως η ηλεκτρώσμωση και η θεωρία ροής μεταβολιτών ως συστατικά της αντλίας του ενδοθηλίου, καθώς και ο ρόλος των ακουαπορινών. Αν και διάφορα δεδομένα υποστηρίζουν τη λειτουργία της αντλίας, εκκρεμεί ακόμα η παρουσίαση ενός ολοκληρωμένου μοντέλου για τη λειτουργία της [44].

Το επιθήλιο του κερατοειδούς έχει επίσης ικανότητα μεταφοράς ιόντων. Αποβάλλει ενεργητικά Cl^- στα δάκρυα μέσω ρύθμισης από ένα β-αδρενεργικό υποδοχέα με την ενδοκυττάρια παρεμβολή της αδενυλικής κυκλάσης. Η μεταφορά αυτή οδηγεί σε ωσμωτική μεταφορά του ύδατος έξω από τον κερατοειδή. Τα επιθηλιακά κύτταρα διαθέτουν επίσης μία αντλία $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPάσης}$ και έναν συµμεταφορέα Na^+/Cl^- , όπου Na^+ και Cl^- μεταφέρονται από την βασική προς την άνω επιφάνεια των κυττάρων και προς τα δάκρυα μέσω χαλαρών συνδέσεων. Ένας ακόμη μηχανισμός που λειτουργεί στο επιθήλιο είναι υπεύθυνος για τη ρύθμιση του ενδοκυττάριου pH μέσω της αποβολής ιόντων H^+ και γαλακτικού οξέος.



Εικόνα 1.8: Διάγραμμα που απεικονίζει τις αντίθετες δυνάμεις του ενδοθηλιακού φραγμού του κερατοειδούς και της ενδοθηλιακής αντλίας. Όταν ο ρυθμός διαρροής ισούται με τον ρυθμό ενδοθηλιακής αντλίας, το στρώμα του κερατοειδούς είναι 78% ενυδατωμένο και ο κερατοειδής διατηρεί το πάχος του [45].

Συνοπτικά η διατήρηση του φυσιολογικού πάχους του κερατοειδούς επιτυγχάνεται με τη λειτουργία του επιθηλίου και του ενδοθηλίου ως φραγμών και ως αντλιών (εικόνα. 1.8):

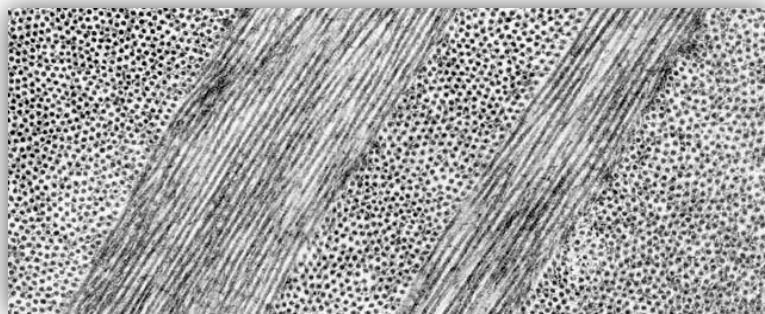
- ✚ προλαμβάνοντας την υπερβολική διαπότιση του κερατοειδούς από τα δάκρυα και το υδατοειδές υγρό
- ✚ μεταφέροντας ενεργητικά ορισμένα κατιόντα, ίσως διττανθρακικά, μαζί με την υποχρεωτική μεταφορά ύδατος έξω από τον κερατοειδή, διαμέσου του ενδοθηλίου.

1.5.3 Η διαφάνεια του κερατοειδούς

Ο κερατοειδής αποτελεί μία από τις κύριες διαθλαστικές δομές του οφθαλμού [41]. Ως διαφανές μέσο επιτρέπει τη διέλευση του φωτός που προσπίπτει σε αυτόν, σε ποσοστό περίπου 90% του ορατού φάσματος. Το ορατό φως δεν απορροφάται από έναν φυσιολογικό κερατοειδή και η διάχυση είναι αμελητέα αν και μπορεί να αυξηθεί σε περίπτωση οιδήματος του κερατοειδούς, σε χαλάρωση των κολλαγόνων ινιδίων του στρώματος λόγω διαταραχής της ενυδάτωσής του, σε αύξηση του πληθυσμού των κερατοκυττάρων ή σε ανωμαλίες του κερατοειδούς προερχόμενες από τραύμα. Ανακλάται μόνο το 1%. Επιπλέον ο κερατοειδής απορροφά κάθε φωτεινή ενέργεια με μήκος κύματος 300 nm ή και λιγότερο και το μεγαλύτερο μέρος του φωτός με μήκος κύματος μεγαλύτερο από 1400 nm. Ο κερατοειδής έχει δείκτη διαθλάσεως 1.376 και συμβάλλει στη διοπτρική ισχύ του οφθαλμού κατά τα 2/3 (περίπου 48 διοπτρίες) [41]. Η ισχύς αυτή είναι μεγαλύτερη στο κέντρο όπου και ο κερατοειδής εμφανίζει το μικρότερο πάχος.

Η έλλειψη αγγείων και λεμφαγγείων, η απουσία μυελίνης γύρω από τα νεύρα του κερατοειδούς, η σταθερή κατάσταση σχετικής αφυδάτωσης του στρώματος συμβάλλουν στη διατήρηση της διαφάνειας του κερατοειδούς. Συνθήκες που εξασφαλίζουν την καλή διαφάνεια του στρώματος είναι το σταθερό πάχος των κολλαγόνων ινών που έχουν παράλληλη διάταξη και οι σταθερές αποστάσεις μεταξύ των ινών (εικόνα. 1.9) [40]. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η ομαλή διάταξη της κατασκευής του στρώματος είναι καθοριστικός παράγοντας για τη διατήρηση της διαφάνειας του κερατοειδούς [32]. Οι κολλαγόνες ίνες διατάσσονται σε έναν περισσότερο συμπαγή σχηματισμό στον κεντρικό κερατοειδή παρά περιφερικά, κάτι που συμβάλλει επιπλέον στη μηχανική στήριξη και στην διοπτρική σταθερότητα. Ο κερατοειδής διατηρεί σταθερή ισορροπία μεταξύ των στερεών του συστατικών και του ύδατος σε μία αναλογία 22% και 78% αντίστοιχα. Συντηρεί δηλαδή μία φυσιολογική σχετική αφυδάτωση. Τα στρωματικά κύτταρα εκκρίνουν κολλαγόνο και πρωτεογλυκάνες, ουσίες καθοριστικές για την ενυδάτωση και τη διατήρηση της διαφάνειας του κερατοειδούς. Είναι προφανές ότι η ομοιόμορφη δομή των ινών κολλαγόνου και κατά

συνέπεια η διαφάνεια του κερατοειδή, επηρεάζεται άμεσα από την αλλαγή σε περιεκτικότητα νερού στο κερατοειδή.



Εικόνα 1.9: Ομοιόμορφη δομή ινών κολλαγόνου του κερατοειδούς [40].

Η θεμέλια ουσία του κερατοειδούς έχει σχετικά αυξημένη περιεκτικότητα σε βλεννοπολυσακχαρίτες, ουσίες ιδιαίτερα υδρόφιλες με τάση να απορροφούν και να κατακρατούν ύδωρ μέσα στον κερατοειδή. Αποτέλεσμα είναι η διαταραχή της φυσιολογικής σχετικής αφυδάτωσης, της δομής και των σχέσεων απόστασης μεταξύ των κολλαγόνων ινιδίων, η οποία αντισταθμίζεται με τη δράση των μηχανισμών ρύθμισης της ενυδάτωσης του κερατοειδούς και ιδιαίτερα αυτών του ενδοθηλίου. Διαταραχή των μηχανισμών αυτών έχει ως αποτέλεσμα το οίδημα και την αδιαφάνεια του κερατοειδούς, κάτι που συμβαίνει κατά τη διάρκεια του ύπνου ή την εφαρμογή φακών επαφής, όπου επέρχεται υποξία του ενδοθηλίου [39].

1.5.4 Οι μηχανισμοί επούλωσης του κερατοειδή

Οι δομικές και επανορθωτικές ιδιότητες του κερατοειδούς αποσκοπούν στη διατήρηση της δομικής συνοχής του βολβού και στην προστασία των εσωτερικών στοιχείων του οφθαλμού σε περίπτωση βλάβης. Καθότι ελαστικός και διαφανής, κάθε μηχανική ή βιολογική απάντηση σε βλάβη του κερατοειδούς ενδέχεται να επηρεάζει τη διαθλαστική ικανότητα του οφθαλμού [29].

Επιθήλιο – Μικρές βλάβες

Τα κύτταρα του επιθηλίου ανανεώνονται κάθε 7-10 ημέρες από έναν πληθυσμό πολυδύναμων αρχέγονων μητρικών κυττάρων τα οποία αυξάνονται σε μέγεθος κατά τη μετακίνησή τους κεντρικά του κερατοειδούς [46]. Σε περίπτωση βλάβης μικρού μεγέθους τα επιθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται γειτονικά στη βλάβη συσπώνται και παίρνουν αποστρωγγυλεμένη μορφή. Στη συνέχεια αρχίζουν να κινούνται προς την τραυματισμένη περιοχή με αμοιβαδοειδείς κινήσεις σχηματίζοντας μία νέα μονοκυτταρική στιβάδα. Τα

βασικά αυτά επιθηλιακά κύτταρα διαφοροποιούνται και εμφανίζουν μιτώσεις, δίνοντας γένεση σε θυγατρικά κύτταρα (περυγοειδή), τα οποία διαθέτουν χασμοσυνδέσμους, ενδοκυττάρειες διασυνδέσεις και δεσμοσώματα. Τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται περαιτέρω παίρνοντας πολυγωνική μορφή, παρόλα αυτά δεν υφίστανται κερατινοποίηση με αποτέλεσμα η νέα στιβάδα να είναι πάντα επιρρεπής σε αφυδάτωση και τραυματισμούς [32]. Μία μικρή βλάβη καλύπτεται από 4-5 στίχους κυττάρων μέσα σε 24-48 ώρες [38].

Επιθήλιο - Εκτεταμένες βλάβες (πλήρης απώλεια του επιθηλίου μετά από χειρουργική επέμβαση, τραύμα, θερμικό έγκαυμα, κλπ.)

Η επούλωση ξεκινά από τα κύτταρα του επιπεφυκότα κοντά στο σκληροκερατοειδές όριο. Τα κύτταρα αυτά λειτουργούν σαν αρχέγονα μητρικά κύτταρα του σκληροκερατοειδούς ορίου (stem cells), τα οποία θεωρούνται επίσης ότι αποτρέπουν την υπερκάλυψη του κερατοειδούς από κύτταρα του επιπεφυκότα [38]. Διαφοροποιούνται αυξάνοντας σε μέγεθος κατά τη μετανάστευσή τους κατά μήκος της βασικής μεμβράνης και αναπαράγονται [46]. Στη μετακίνηση συμμετέχουν αρχικά και βλεννογόνοι αδένες και κερατοκύτταρα. Στη συνέχεια όμως τα χαρακτηριστικά του επιπεφυκότα χάνονται βαθμιαία και το νέο επιθήλιο γίνεται τυπικά κερατοειδικό. Σε τέτοιες βλάβες χρειάζονται μερικές μέρες για το σχηματισμό μονοκυτταρικής στιβάδας και μερικές εβδομάδες μέχρι να δημιουργηθούν στέρεες συνδέσεις με δεσμοσώματα μεταξύ του νέου στρώματος των βασικών κυττάρων και της βασικής μεμβράνης [32].

Στρώμα

Βλάβη του στρώματος προκαλεί την άμεση συσσώρευση εξωκυττάριου υγρού γύρω από τη βλάβη που προέρχεται από το ύδωρ και τους ηλεκτρολύτες του στρώματος των δακρύων. Τα κερατοκύτταρα παίρνουν χαρακτηριστικά ινοβλαστών. Πολυμορφοπύρηννα και μονοκύτταρα φτάνουν στη βλάβη μέσω του στρώματος των δακρύων ή από τα αγγειακά τόξα του σκληροκερατοειδούς ορίου [29]. Τα μονοκύτταρα αρχίζουν να παίρνουν την όψη ινοβλαστών και μαζί με τα ενεργοποιημένα κερατοκύτταρα παράγουν προκολλαγόνο, το οποίο ωριμάζει σε κολλαγόνο. Στο στάδιο αυτό το επιθήλιο μπορεί να έχει ήδη επουλωθεί και να καλύπτει την επιφάνεια του τραύματος. Η οξεία φλεγμονώδης αντίδραση υποχωρεί και ο αριθμός των φλεγμονωδών κυττάρων μειώνεται. Ακολουθεί ενδυνάμωση και αναδιαμόρφωση της περιοχής. Το επιθήλιο που έχει διεισδύσει στο στρώμα απωθείται προς τα έξω. Τα ανώμαλα κολλαγόνα ινίδια και πετάλια που θα παραμείνουν τελικά, προκαλούν μόνιμες θολερότητες του κερατοειδή. Η αρχική δύναμη αντοχής του κερατοειδούς σε τάση επανέρχεται μετά από μερικούς μήνες [32].

Δεσκεμέτειος μεμβράνη και ενδοθήλιο

Η μεμβράνη του Descemet χαρακτηρίζεται από εκτασιμότητα και ανθεκτικότητα η οποία εξασφαλίζει αντοχή σε αυξημένες τιμές ενδοφθάλμιας πίεσης [32]. Σε περίπτωση βλάβης τα ενδοθηλιακά κύτταρα στα χείλη της βλάβης αρχίζουν να αυξάνουν σε μέγεθος και με αμοιβαδοειδείς κινήσεις την καλύπτουν [38]. Τα τμήματα της δεσκεμέτειας μεμβράνης στα άκρα της ρήξης συστρέφονται ενώ συχνά καλύπτονται από τη νέα δεσκεμέτειο που εκκρίνεται από τη στιβάδα των ενδοθηλιακών κυττάρων και παίρνουν την όψη πτυχών της δεσκεμέτειας μεμβράνης. Το τμήμα του στρώματος που βρίσκεται πάνω από τη βλάβη και το ίδιο το ενδοθήλιο είναι οίδηματώδη κατά τη διάρκεια των επανορθωτικών μηχανισμών. Αυτό οφείλεται στην ανεπάρκεια της αντλίας του ενδοθηλίου [38]. Το ενδοθήλιο αποτελείται από μία μόνο κυτταρική στιβάδα που όπως προαναφέρθηκε παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της διαφάνειας του κερατοειδούς. Αποτελείται από κυβοειδή κύτταρα τα οποία πρακτικά δεν ανανεώνονται ή ανανεώνονται σε πολύ μικρό βαθμό. Προκειμένου να καλυφθεί η απώλεια κυττάρων σε περίπτωση βλάβης τα ενδοθηλιακά κύτταρα είτε μεταναστεύουν είτε αυξάνονται σε μέγεθος. Τα κύτταρα αυτά που σε πρώτη φάση καλύπτουν τη βλάβη, δεν έχουν πλήρως φυσιολογική λειτουργία. Όταν καταστρέφεται μεγάλο μέρος του ενδοθηλίου τότε προκαλείται μόνιμο οίδημα στον κερατοειδή [38].

Βλάβη ολικού πάχους

Η πληγή ταμπονάρεται από ινική ή και ιστό ίριδας (πρόπτωση ίριδας). Ο ιστός υφίσταται ίνωση και ουλοποίηση, εφόσον δεν γίνει χειρουργική αντιμετώπιση. Η πληγή εμφανίζει συχνά νεοαγγείωση. Μετά από διαθλαστικές επεμβάσεις μπορεί να προκύψουν διάφορες βιομηχανικές μεταβολές στον κερατοειδή, όπως μεταβολές και αστάθεια της επιφάνειας του αλλά και αυξημένη ευαισθησία σε ερεθίσματα όπως η υποξία και η διαταραχή της ενυδάτωσής του [29,32].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΔΥΣΤΡΟΦΙΩΝ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ

2.1 ΔΥΣΤΡΟΦΙΕΣ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ

Η FECD ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των δυστροφιών του κερατοειδούς. Η λέξη δυστροφία προέρχεται από το συνθετικό δυσ- που σημαίνει λανθασμένη, δύσκολη και από τη λέξη τροφή που σημαίνει θρέψη. Στην ιατρική βιβλιογραφία εισήχθη από Wilhelm Erb (1840–1921) το 1884 περιγράφοντας μια ασθένεια των μυών. Το 1890 ο όρος εισάγεται στην Οφθαλμολογία από τον Arthur Groenouw (1862–1945) περιγράφοντας δύο ασθενείς όπου ο ένας είχε κοκκώδη κερατοειδή δυστροφία και ο άλλος κηλιδώδη δυστροφία κερατοειδούς. Παράλληλα, ο Biber δημοσίευσε τη διατριβή του σχετικά με τη δυσπλασία του κερατοειδούς, ενώ ο Fuchs χρησιμοποίησε και αυτός τη λέξη δυστροφία για να αναφερθεί σε οφθαλμολογική ασθένεια. Σε αυτή την εποχή που δεν υπήρχε η σχισμοειδής λυχνία, η έκταση της εξέτασης του κερατοειδούς ήταν περιορισμένη, οι δυστροφικοί ιστοί αποδόθηκαν στην έλλειψη τροφής, στις ορμόνες, στο αίμα και στην παροχή νεύρων. Ο Uthhoff και αργότερα ο Yoshida συνέχισαν να χρησιμοποιούν τον όρο στις δημοσιεύσεις τους [47,48].

Στην Οφθαλμολογία, ο όρος χρησιμοποιείται για μια ομάδα ασθενειών του κερατοειδούς οι οποίες είναι συνήθως κληρονομικές, επί τω πλείστον αμφοτερόπλευρες, συμμετρικές, βραδέως εξελισσόμενες, χωρίς στοιχεία φλεγμονής και οι οποίες δεν εξαρτώνται από περιβαλλοντικούς και συστηματικούς παράγοντες [49]. Φυσικά καθώς οι γνώσεις αυξάνονται, υπάρχουν εξαιρέσεις σε καθέναν από αυτούς τους ορισμούς. Έτσι η δυστροφία βασικής μεμβράνης επιθηλίου (EBMB) και η δυστροφία τύπου Francois (CCDF) θεωρούνται εκφυλίσεις και όχι κληρονομικές διαταραχές. Η οπίσθια πολύμορφη δυστροφία μπορεί να είναι ετερόπλευρη, ενώ η δυστροφία του Schynder σχετίζεται συχνά με υπερχοληστερολαιμία [50].

2.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ICD3 [47,51]

Όσο οι γνώσεις για τις δυστροφίες του κερατοειδούς αυξάνονταν δημιουργήθηκε η ανάγκη μιας σύγχρονης ταξινόμησης αφού οι περισσότερες περιεγράφηκαν πριν την έναρξη της εξέτασης με σχισμοειδή λάμπα και πριν την ανάπτυξη της γενετικής χαρτογράφησης. Τον Απρίλιο του 2005 λοιπόν, 17 ειδικοί για τον κερατοειδή από την Αμερική, την Ευρώπη και την Ασία, συγκεντρώθηκαν με σκοπό τη δημιουργία μιας διεθνούς αποδεκτής ταξινόμησης στηριζόμενης όχι μόνο στον φαινότυπο, αλλά και στην παθολογία (ιστολογία) και στη γενετική. Έτσι θεσπίστηκε η ταξινόμηση IC3D (International Committee for Classification of Corneal Dystrophies) των δυστροφιών, ένα νέο σύστημα ταξινόμησης που ενσωματώνει

πτυχές των παραδοσιακών ορισμών με νέες γενετικές, κλινικές και παθολογικές πληροφορίες.

Η πληθώρα των γενετικών αναλύσεων είχε καταδείξει τις ελλείψεις της τρέχουσας φαινοτυπικής μεθόδου ταξινόμησης των δυστροφιών του κερατοειδούς. Ανωμαλίες σε διαφορετικά γονίδια μπορούν να προκαλέσουν ένα μόνο φαινότυπο, ενώ διαφορετικές μεταλλάξεις σε ένα μόνο γονίδιο μπορούν να προκαλέσουν διαφορετικούς φαινότυπους. Τέλος ορισμένες διαταραχές που χαρακτηρίζονται δυστροφίες του κερατοειδούς δεν φαίνεται να έχουν γενετική βάση. Η μεγαλύτερη πρόκληση για την επιτροπή ήταν να σχεδιάσει μια ταξινόμηση που θα ήταν αρκετά ευέλικτη ώστε να έχει τη δυνατότητα επέκτασης χρησιμοποιώντας γνώσεις από άλλες πηγές συμπεριλαμβανομένου του προσδιορισμού του γονότυπου.

Η απόδειξη για την ύπαρξη κερατοειδούς δυστροφίας ξεκινά με την ταυτοποίηση ενός κλινικού φαινότυπου και την ύπαρξη διαταραχών του κερατοειδούς που επηρεάζουν σοβαρά την όραση και δικαιολογούν την εκτέλεση κερατοπλαστικής. Στη συνέχεια οι εκτιμήσεις των ιστών του κερατοειδούς του ασθενούς οδηγούν στη δημιουργία ξεχωριστών κλινοπαθολογικών οντοτήτων. Η επόμενη φάση περιλαμβάνει μελέτες γενετικής σύνδεσης που οδηγούν στην χαρτογράφηση του χρωμοσωμικού τόπου της διαταραχής. Η διαδικασία αυτή είναι δύσκολη και χρονοβόρα όταν συμμετέχουν περισσότερα από ένα γονίδια ή εάν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Η γονιδιακή χαρτογράφηση ακολουθείται από την ταυτοποίηση του ανάλογου γονιδίου και των συγκεκριμένων μεταλλάξεων που είναι υπεύθυνες για τις διαφορετικές φαινοτυπικές μορφές της διαταραχής. Η ταυτοποίηση αυτή παρέχει μεγαλύτερη κατανόηση του μηχανισμού της διαταραχής και μπορεί να παρουσιάσει κάποιες θεραπευτικές δυνατότητες.

Για να καθορίσει το επίπεδο των στοιχείων που υπάρχουν σε μια δεδομένη δυστροφία η επιτροπή του IC3D δημιούργησε την εξής κατάταξη:

Κατηγορία 1: Καλά καθορισμένη δυστροφία του κερατοειδούς στην οποία έχει χαρτογραφηθεί και αναγνωριστεί το γονίδιο ενώ είναι γνωστές και οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις.

Κατηγορία 2: Καλά καθορισμένη δυστροφία του κερατοειδούς που έχει χαρτογραφηθεί σε έναν ή περισσότερους συγκεκριμένους χρωμοσωμικούς τόπους, αλλά το γονίδιο ή τα γονίδια παραμένουν προς ταυτοποίηση.

Κατηγορία 3: Καλά καθορισμένη δυστροφία του κερατοειδούς στην οποία η διαταραχή δεν έχει ακόμα χαρτογραφηθεί σε έναν συγκεκριμένο χρωμοσωμικό τόπο.

Κατηγορία 4: Η κατηγορία αυτή προορίζεται για υποψία νέας ή προηγούμενα τεκμηριωμένης δυστροφίας του κερατοειδούς τα αποδεικτικά στοιχεία των οποίων δεν είναι πειστικά ότι αποτελούν ξεχωριστές οντότητες.

Η κατηγορία που αποδίδεται σε μια συγκεκριμένη δυστροφία του κερατοειδούς είναι δυνατόν να αλλάζει με την πάροδο του χρόνου καθώς οι γνώσεις προοδευτικά αυξάνονται και να περνάμε από την κατηγορία 4 στην 3, στην 2 και τελικά σταδιακά στην 1. Αντίθετα δυστροφίες που παραμένουν για πολύ καιρό στην κατηγορία 4 πρέπει να αφαιρούνται.

Το προτεινόμενο σύστημα ταξινόμησης των δυστροφιών του κερατοειδούς του 2008 βασίζεται πρωταρχικά στην ανατομία των στιβάδων του κερατοειδούς που εμπλέκονται [47].

Ταξινόμηση IC3D 2008/2011

1. Επιθηλιακές και υποεπιθηλιακές
2. Δυστροφίες της στιβάδας Bowman
3. Στρωματικές
4. Δυστροφίες της Δεσκεμετείου και ενδοθηλιακές

Η αναθεωρημένη ταξινόμηση του 2015 προέκυψε όταν διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν δυστροφίες του κερατοειδούς οι οποίες επηρεάζουν πολλαπλά στρώματα. Η αναθεωρημένη ταξινόμηση επιδιώκει να αντικατοπτρίσει με μεγαλύτερη ακρίβεια τη συμμετοχή των κυτταρικών στιβάδων του κερατοειδούς (αφαιρούνται οι ακυτταρικές στιβάδες του κερατοειδούς Bowman και η Δεσκεμέτειος).

Ταξινόμηση IC3D 2015

1. Επιθηλιακές και υποεπιθηλιακές
2. Επιθηλιακές – Στρωματικές TGFB1
3. Στρωματικές
4. Ενδοθηλιακές

Το σύστημα ταξινόμησης IC3D ενσωμάτωσε με επιτυχία όλα τα τελευταία δεδομένα σχετικά με την φαινοτυπική περιγραφή, την παθολογική εξέταση και τη γενετική ανάλυση των δυστροφιών του κερατοειδούς (πίνακας 2.1).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1: ICD3D ταξινόμηση 2015 (C = Category)

Επιθηλιακές και υποεπιθηλιακές δυστροφίες

1. Epithelial basement membrane dystrophy (EBMD) majority degenerative, rarely C1
2. Epithelial recurrent erosion dystrophies (EREDs)—Franceschetti corneal dystrophy (FRCD) C3, Dystrophia Smolandensis (DS) C3, and Dystrophia Helsinglandica (DH) C3
3. Subepithelial mucinous corneal dystrophy (SMCD) C4
4. Meesmann corneal dystrophy (MECD) C1
5. Lisch epithelial corneal dystrophy (LECD) C2
6. Gelatinous drop-like corneal dystrophy (GDLD) C1

Επιθηλιακές - Στρωματικές TGFBI δυστροφίες

1. Reis-Bücklers corneal dystrophy (RBCD) C1
2. Thiel-Behnke corneal dystrophy (TBCD) C1
3. Lattice corneal dystrophy, type 1 (LCD1) C1—variants (III, IIIA, I/IIIA, IV) of lattice corneal dystrophy C1
4. Granular corneal dystrophy, type 1 (GCD1) C1
5. Granular corneal dystrophy, type 2 (GCD2) C1

Στρωματικές δυστροφίες

1. Macular corneal dystrophy (MCD) C1
2. Schnyder corneal dystrophy (SCD) C1
3. Congenital stromal corneal dystrophy (CSCD) C1
4. Fleck corneal dystrophy (FCD) C1
5. Posterior amorphous corneal dystrophy (PACD) C1
6. Central cloudy dystrophy of François (CCDF) C4
7. Pre-Descemet corneal dystrophy (PDCD) C1 or C4

Ενδοθηλιακές δυστροφίες

- 1. Fuchs endothelial corneal dystrophy (FECD) C1, C2, or C3**
2. Posterior polymorphous corneal dystrophy (PPCD) C1 or C2
3. Congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED) C1
4. X-linked endothelial corneal dystrophy (XECD) C2

Δυστροφίες που αφαιρέθηκαν

Grayson-Wilbrandt corneal dystrophy (GWCD) C4

Η FECD που μελετάμε ανήκει στις ενδοθηλιακές δυστροφίες και κατατάσσεται σε 3 κατηγορίες σύμφωνα με την ICD3 ταξινόμηση

Κατηγορία 1: Ενδοθηλιακή δυστροφία του κερατοειδούς του Fuchs πρώιμης έναρξης.

Κατηγορία 2: Ενδοθηλιακή δυστροφία του κερατοειδούς του Fuchs με γνωστούς γενετικούς τύπους αλλά με γονίδια που δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμα.

Κατηγορία 3: Ενδοθηλιακή δυστροφία του κερατοειδούς του Fuchs σε ασθενείς χωρίς γνωστή κληρονομικότητα.

2.3 ΚΛΙΝΙΚΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ ΤΗΣ FECD

Υπάρχουν δύο παραλλαγές της FECD με βάση το χρόνο έναρξης της νόσου: Α) η FECD πρώιμης έναρξης (early-onset FECD) και Β) η FECD όψιμης έναρξης (late-onset FECD) [51].

2.3.1 FECD πρώιμης έναρξης (early-onset FECD)

Οι περισσότερες περιπτώσεις FECD αρχίζουν μετά την τέταρτη δεκαετία της ζωής του ατόμου, αλλά η πρώιμη έναρξη είναι σπάνια και εμφανίζεται σε ποσοστό 1% όλων των ασθενών με FECD ενώ μπορεί να ξεκινήσει και την πρώτη δεκαετία της ζωής με συνεχή εξέλιξη στις επόμενες 2 έως 3 δεκαετίες [52]. Χαρακτηρίζεται από μία πυκνή μεμβράνη Descemet κατά τη γέννηση και την αποεπένδυση του κερατοειδούς από την 3_η έως την 4_η δεκαετία. Η πρώιμη μορφή έχει συνδεθεί με συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο γονίδιο του κολλαγόνου VIII άλφα 2 (COL8A2) στο χρωμόσωμα 1 και συγκεκριμένα στο 1p34.3-p32.12. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την α2 έλικα του κολλαγόνου VIII που είναι συστατικό της μεμβράνης του ενδοθηλιακού υποστρώματος. Τα guttae μπορούν να αναπτυχθούν ήδη στην πρώτη δεκαετία της ζωής είναι τυπικά μικρά και στρογγυλά και τείνουν να εξαπλωθούν. Επίσης τα guttae εμφανίζουν διαφορετικά κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά σε σχέση με εκείνα της πρώιμης έναρξης [53]. Η μεμβράνη Descemet σε αυτούς τους ασθενείς είναι παχύτερη (έως 38 μm) σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες [54]. Σε αντίθεση με την FECD όψιμης έναρξης η οποία έχει ισχυρή γυναικεία υπεροχή στην πρώιμη έναρξης FECD οι άνδρες και οι γυναίκες επηρεάζονται εξίσου [53]. Το γεγονός αυτό αποτελεί μια αντανάκλαση του αυτοσωμικού κυρίαρχου τρόπου κληρονομικότητας της νόσου [51].

2.3.2 FECD όψιμης έναρξης (late-onset FECD)

Η FECD με καθυστερημένη έναρξη είναι σημαντικά πιο συνηθισμένη και αντιπροσωπεύει τη μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών με αυτή τη διάγνωση. Αυτή η μορφή της νόσου χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη διαφορετικών μεγεθών guttae στην κεντρική περιοχή του κερατοειδούς χιτώνα. Οι ασθενείς αυτής της μορφής εμφανίζουν συνήθως αλλαγές κατά την 4_η με 5_η δεκαετία της ζωής τους με βαθμιαία εξέλιξη κατά τις επόμενες δύο με τρεις δεκαετίες. Παρόλο που η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τουλάχιστον τέσσερις δεκαετίες αργότερα από εκείνο της όψιμης έναρξης και οι δύο εμφανίζουν έναν παρόμοιο γραμμικό ρυθμό εξέλιξης της νόσου με αύξηση της κλινικής σοβαρότητας που εμφανίζεται κατά μέσο όρο κάθε πέντε χρόνια [53]. Η νόσος φαίνεται να εμφανίζει και εκείνη αυτοσωμικό κυρίαρχο τύπο κληρονομικότητας με ελλιπή όμως διεισδυτικότητα αφού μόνο το 50% των περιπτώσεων παρουσιάζουν οικογενειακή συσσώρευση [55]. Στα αρχικά στάδια της νόσου, το μόνο που παρατηρείται στην εξέταση του κερατοειδούς είναι η παρουσία των guttae και η πάχυνση της μεμβράνης του Descemet. Ο αριθμός των ενδοθηλιακών κυττάρων

παραμένει αρκετός ώστε να αποτρέψει το οίδημα του κερατοειδούς, αν και η όραση μπορεί να επηρεάζεται από την περίθλαση των ακτινών του φωτός όταν αυτές πέφτουν πάνω στα guttae. Με τον καιρό, λόγω της συνεχούς μείωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, ο κερατοειδής αρχίζει να εμφανίζει πρωινό οίδημα που υποχωρεί κατά τη διάρκεια της ημέρας. Αυτό οφείλεται στο ότι κατά τη διάρκεια της νύχτας τα μάτια μας παραμένουν κλειστά και τα δάκρυα δεν μπορούν να εξατμιστούν, διογκώνοντας έτσι τον “ευπαθή” κερατοειδή [28]. Με το άνοιγμα των ματιών το πρωί, τα δάκρυα αρχίζουν πάλι να εξατμίζονται και ο κερατοειδής σταδιακά επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση. Έτσι, οι ασθενείς χαρακτηριστικά ξυπνούν το πρωί με θολή όραση που “καθαρίζει” όμως σταδιακά κατά τη διάρκεια της ημέρας.

Η παρουσία κερατοειδικού οιδήματος και μειωμένης όρασης καθόλη τη διάρκεια της ημέρας, σημαίνει ότι η νόσος έχει προχωρήσει σημαντικά. Στην αρχή το οίδημα εντοπίζεται μόνο στο στρώμα του κερατοειδούς αλλά, με την πάροδο του χρόνου, επεκτείνεται και στην επιθηλιακή του στιβάδα οδηγώντας στη δημιουργία επιφανειακών μικροφουσαλίδων. Πέραν της μειωμένης όρασης, οι ασθενείς που βρίσκονται σε αυτό το στάδιο μπορεί να βλέπουν “φωτεινή άλω” γύρω από τα φώτα και να έχουν αίσθημα ξένου σώματος. Με την αύξηση του οιδήματος, οι μικροφουσαλίδες ενώνονται κατά τόπους σχηματίζοντας μεγαλύτερες φουσαλίδες (bullae). Αυτές είναι εύθρυπτες και συχνά οδηγούν σε επιθηλιακά ελλείμματα που χαρακτηρίζονται από φωτοευαισθησία, έντονο πόνο και ερεθισμό στο μάτι. Εάν σε αυτό το στάδιο δεν αντιμετωπιστεί η νόσος χειρουργικά, η συνεχιζόμενη φλεγμονή οδηγεί σε μόνιμη ουλοποίηση του κερατοειδούς, ενώ η χρόνια παρουσία επιθηλιακών ελλειμμάτων προδιαθέτει σε μικροβιακή κερατίτιδα, μία πολύ σοβαρή επιπλοκή. Η εξέλιξη της νόσου μπορεί να επιδεινωθεί από τραύμα, χειρουργική επέμβαση, τοξική έκθεση ή λοίμωξη [20].

2.4 ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η κλινική εξέλιξη της FECD τυπικά ταξινομείται χρησιμοποιώντας την αναθεωρημένη κλίμακα κατά Krachmer (βαθμίδα 0-6). Η ταξινόμηση αυτή αντιπροσωπεύει μία διαρκώς αυξανόμενη περιφερική κατανομή των guttae με την πάροδο του χρόνου. Η νόσος ορίζεται με την ύπαρξη τουλάχιστον 12 κεντρικών guttae (1+) και εκτείνεται σε στρωματικό ή επιθηλιακό οίδημα (6+), με βαθμολογίες από 2 έως 4 με βάση τις ομόκεντρες διαμέτρους των συρρεόντων guttae, αυξάνοντας το μέγεθος (<2 mm, 2 έως 5 mm, ή >5 mm αντίστοιχα) [4].

Πίνακας 2.2: Κλίμακα κατά Krachmer.

ΚΛΙΜΑΚΑ	ΕΥΡΗΜΑΤΑ
Grade 0	1-12 κεντρικά guttae
Grade 1	>12 κεντρικά μη συρρέοντα guttae
Grade 2	1-2 mm από συρρέοντα κεντρικά guttae
Grade 3	2-5 mm από συρρέοντα κεντρικά guttae
Grade 4	>5 mm από συρρέοντα κεντρικά guttae
Grade 5	>5 mm από συρρέοντα κεντρικά guttae με στρωματικό ή επιθηλιακό οίδημα.

Αν και η μέθοδος χρησιμοποιείται από το 1978 (πίνακας 2.2) υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί που περιλαμβάνουν την υποκειμενικότητα του εξεταστή στην μεταβλητότητα της διαβάθμισης, την ταξινόμηση του ήπιου κερατοειδικού οιδήματος καθώς και την εξέλιξη της στρωματικής πάχυνσης ή του οιδήματος σε στάδια εκτός της βαθμίδος 6 [56]. Παρόλα αυτά η ταξινόμηση αυτή χρησιμοποιείται σήμερα από την πολυκεντρική ομάδα μελέτης της γενετικής της ενδοθηλιακής δυστροφίας του Fuchs χρησιμοποιώντας μια αναθεωρημένη κλίμακα (πίνακας 2.3) [57].

Πίνακας 2.3: Αναθεωρημένη Krachmer κλίμακα

ΣΟΒΑΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	Grade	Criteria (central/paracentral corneal guttae)
OXI ΝΟΣΟΣ	0	Χωρίς guttae
ΕΝΔΙΑΜΕΣΗ ΝΟΣΟΣ	1	1-12 κεντρικά μη συρρέοντα
	2	> 12 κεντρικά μη συρρέοντα
	3	1-2 mm συρρέοντα κεντρικά
	4	2-5 mm συρρέοντα κεντρικά
ΣΟΒΑΡΗ ΝΟΣΟΣ	5	>5 mm συρρέοντα κεντρικά
	6	>5 mm συρρέοντα κεντρικά με στρωματικό ή επιθηλιακό οίδημα

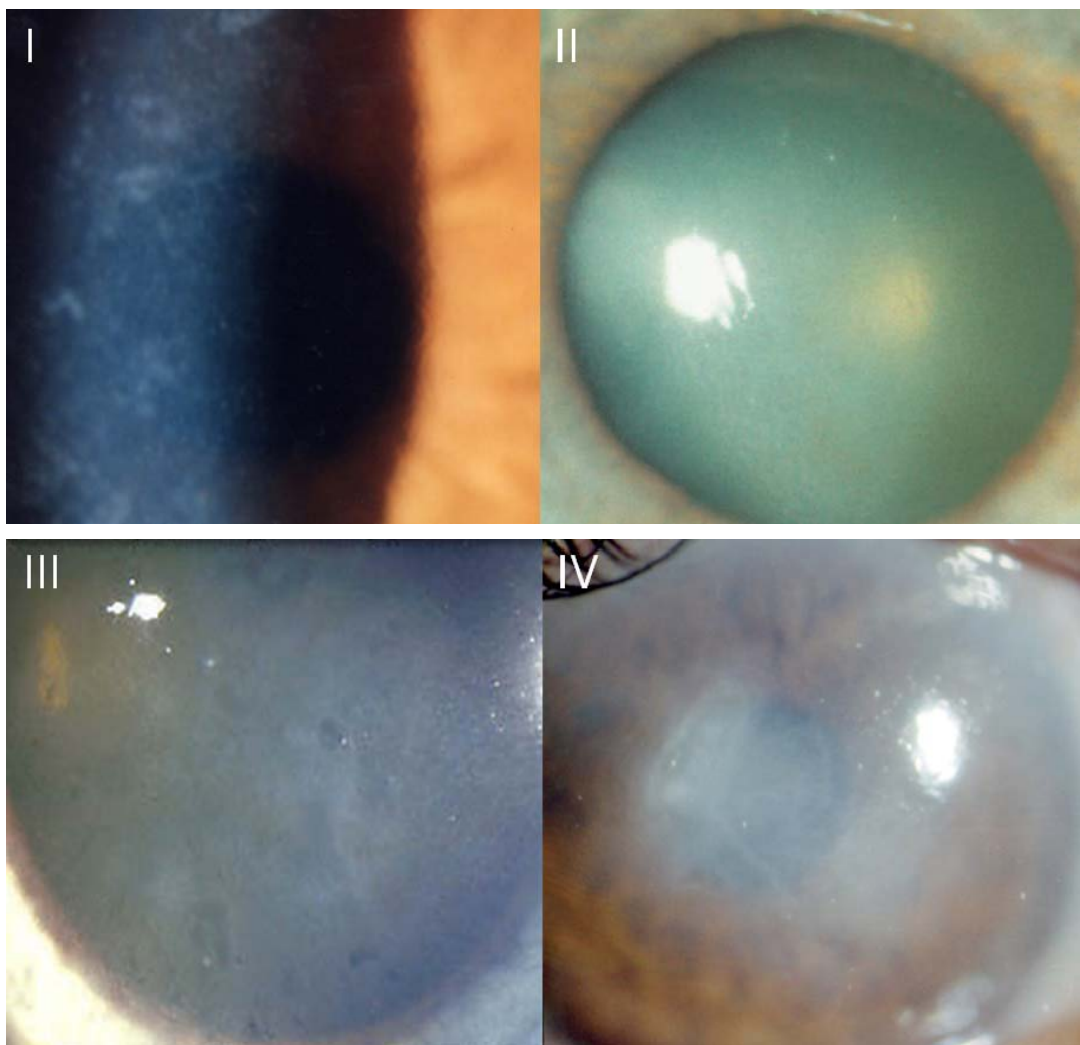
Ένα άλλο σύστημα σταδιοποίησης έχει περιγραφεί από τους Adamis et al. [58] και διαιρεί την κλινική πορεία της FECD σε τέσσερα στάδια τα οποία αναπτύσσονται σταδιακά σε διάστημα 25 ετών και είναι αμφοτερόπλευρα, αλλά ασύμμετρα (πίνακας 2.4). Αρχικά έχουμε την εμφάνιση σταγονοειδών βλαβών στο ενδοθήλιο (guttae), συνήθως την τέταρτη δεκαετία της ζωής. Υποκειμενικά συμπτώματα σπάνια εκδηλώνονται μέχρι την πέμπτη ή έκτη δεκαετία. Κατά τη διάρκεια αυτής της ασυμπτωματικής φάσης, τα guttae έχουν μεταβλητή ποσότητα πύκνωσης και χρωστικής και μπορούν να παρατηρηθούν με τη

σχισμοειδή λυχνία στο κεντρικό ενδοθήλιο. Πρώτα προσβάλλεται ο κεντρικός κερατοειδής και καθώς προχωράει η πάθηση επεκτείνεται στην περιφέρεια, αλλά η όραση δεν επηρεάζεται (στάδιο I). Ορισμένοι ασθενείς ενώ εμφανίζουν guttae, δεν προχωρούν ποτέ στα επόμενα στάδια της πάθησης. Άλλοι ασθενείς σταδιακά αναπτύσσουν μία ανώδυνη μείωση της οπτικής οξύτητας ιδιαίτερα μετά την αφύπνιση, θάμβος και άλω γύρω από φωτεινές πηγές που οφείλονται στην ανάπτυξη στρωματικού και επιθηλιακού οιδήματος λόγω της έλλειψης ενδοθηλιακής αντιρρόπησης (στάδιο II). Στην επόμενη φάση τα guttae γίνονται συρρέοντα, ενώ παράλληλα έχουμε την παρουσία επιθηλιακών και υποεπιθηλιακών φυσαλίδων (bullae), οι οποίες προκαλούν έντονο πόνο και αίσθηση ξένου σώματος κατά τη ρήξη τους (στάδιο III). Το επόμενο στάδιο (στάδιο IV) διακρίνεται από σοβαρή μείωση της οπτικής οξύτητας, την ανάπτυξη υποεπιθηλιακών ουλών κατά μήκος της βασικής μεμβράνης του επιθηλίου (rannus). Ο εκφυλιστικός rannus μειώνει την όραση, μειώνοντας συγχρόνως το σχηματισμό των επώδυνων φυσαλίδων, ώστε ο ασθενής δεν νιώθει πια πόνο. Το επιθηλιακό οίδημα μειώνεται ενώ το οίδημα στρώματος παραμένει αμετάβλητο ενώ έχουμε και την εμφάνιση περιφερικής επιφανειακής αγγειοποίησης. Αν και ο κερατοειδής είναι πεπαχυσμένος, οι ασθενείς αισθάνονται μειωμένη δυσφορία λόγω της σταθεροποίησης της κυτταρικής στιβάδας του επιθηλίου από την ανάπτυξη του ουλώδους ιστού (εικόνα 2.1) [59].

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.4: Κλινικά στάδια της FECD

Στάδια	Συμπτώματα	Κλινικά ευρήματα	Οπτική οξύτητα
Στάδιο I	Χωρίς συμπτώματα	Λίγα έως μέτρια guttae	Φυσιολογική (20/20)
Στάδιο II	Ήπια ως μέτρια απώλεια της όρασης, χωρίς πόνο	Λίγα ως πολυάριθμα guttae, ήπιο οίδημα κερατοειδούς	Ήπια ως μέτρια μείωση (20/20 έως 20/80)
Στάδιο III	Μέτρια έως σοβαρή απώλεια της όρασης, πόνος	Συρρέοντα guttata, Σοβαρό οίδημα του κερατοειδούς, επιθηλιακά bullae (φυσαλιδώδης κερατοειδοπάθεια)	Μέτρια ως σοβαρή μείωση (20/100 έως 20/400)
Στάδιο IV	Σοβαρή απώλεια της όρασης, μείωση του πόνου	Υποεπιθηλιακές ουλές, μείωση επιθηλιακών bullae	Σοβαρή μείωση (20/400 ή περισσότερο)

Και αυτό το σύστημα βαθμολόγησης εξακολουθεί να βασίζεται σε υποκειμενικές παραμέτρους που λαμβάνονται αποκλειστικά από τη σχισμοειδή λυχνία. Τα στάδια I και II μπορεί να είναι δύσκολο να διαφοροποιηθούν. Επομένως, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι σε μια μεγάλη μελέτη με 100 ασθενείς με FECD παρατηρήθηκαν αποκλίσεις μεταξύ δύο εξεταστών για αυτό το είδος κλινικής σταδιοποίησης [60].

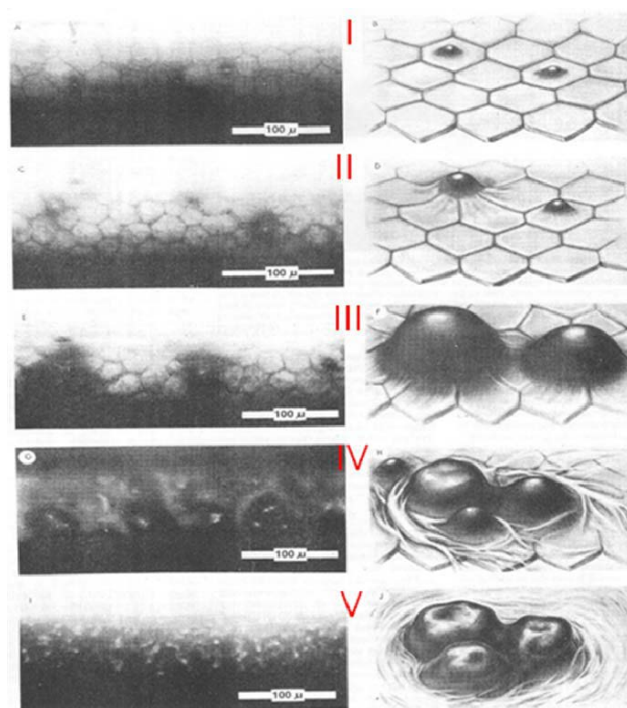


Εικόνα 2.1: Κλινικά στάδια της FECD I) Στάδιο I: Guttae – εμφάνιση «σφυρηλατιμένου μετάλλου». II) Στάδιο Δημιουργία οιδήματος στον κερατοειδή. III) Στάδιο III: Σοβαρή φυσαλιδώδη κερατοπάθεια (bullae) IV) Στάδιο IV: με υποεπιθηλιακή ίνωση ("raptnus").

Επίσης οι Laing et al. έχουν περιγράψει μια ταξινόμηση του FECD με βάση τα ενδοθηλιακά κύτταρα και την εμφάνιση guttae με τη χρήση κατοπτρικής μικροσκοπίας (πίνακας 2.5-εικόνα 2.2). Έχουν κατατάξει τη σοβαρότητα της νόσου σε πέντε στάδια [61]:

Πίνακας 2.5: Ταξινόμηση FECD κατά Laing.

ΣΤΑΔΙΑ	ΕΥΡΗΜΑΤΑ
Στάδιο I	Guttae μικρότερα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα
Στάδιο II	Guttae μεγαλύτερα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα
Στάδιο III	Guttae μεγαλύτερα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα γειτονικά ενδοθηλιακά κύτταρα εμφανίζονται μη φυσιολογικά
Στάδιο IV	Συρρέοντα guttae και τα γειτονικά ενδοθηλιακά κύτταρα είναι δύσκολο να αναγνωριστούν
Στάδιο V	Συρρέοντα guttae και πλήρης αποδιοργάνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων



Εικόνα 2.2: Εικόνες οπτικής μικροσκοπίας και σχέδια που απεικονίζουν τη σταδιοποίηση κατά Laing [61].

Φυσικά είναι σημαντικό να διαχωρίζονται τα απλά κλινικά ευρήματα από την πραγματική ασθένεια. Τα guttae είναι επομένως ένα τυπικό εύρημα στο FECD, αλλά αυτό δεν σημαίνει ότι κάθε κερατοειδής με guttae θα εξελιχθεί σε FECD [62].

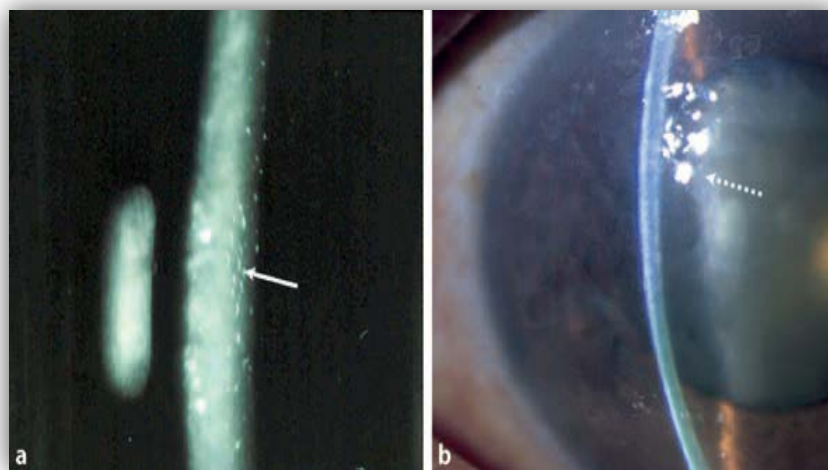
2.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ FECD ΝΟΣΟΥ

Η FECD είναι μία κλινική πάθηση που μελετάται για περισσότερο από 100 χρόνια με αποτέλεσμα να έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές εξέτασης χρήσιμες για τη διάγνωση, για τον προσδιορισμό του κλινικού σταδίου και για τον καθορισμό του κατάλληλου χρόνου κατά τον οποίο θα πραγματοποιηθεί η χειρουργική επέμβαση. Λόγω της μη επεμβατικής τους φύσης, όλες οι τεχνικές εξέτασης του οφθαλμού μπορούν να διεξαχθούν σε όλα τα στάδια της νόσου και είναι οι εξής:

1. Εξέταση με σχισμοειδή λυχνία.
2. Κατοπτρική μικροσκοπία μη επαφής (Noncontact specular microscopy)
3. Παχυμετρία (Pachymetry)
4. OCT πρόσθιου ημιμορίου (Anterior segment OCT)
5. Συνεστιακή μικροσκοπία (In vivo confocal microscopy IVCM)

2.5.1. Εξέταση με σχισμοειδή λυχνία

Η αρχική διάγνωση και αξιολόγηση της FECD γίνεται με τη σχισμοειδή λυχνία είτε σε ασθενείς που παρουσιάζουν συμπτώματα είτε ως τυχαίο εύρημα κατά την αξιολόγηση άλλων οφθαλμολογικών παθήσεων. Χαρακτηριστική είναι η εικόνα του «σφυρηλατημένου μετάλλου», που εμφανίζουν τα guttae (εικόνα 2.3). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα guttae φαίνονται στην σχισμοειδή λυχνία πριν να καταδειχθούν στην κατοπτρική μικροσκοπία [15].



Εικόνα 2.3: Εικόνες από οφθαλμολογική εξέταση με σχισμοειδή λυχνία α. Στάδιο I FECD. Σημειώστε διάσπαρτα, διάτρητα, διαθλαστικά ενδοθηλιακά guttae στα αριστερά του βέλους. β Στάδιο III FECD. Σημειώστε την πάχυνση του κερατοειδούς, με την ακανόνιστη επιφάνεια και επιθηλιακά bullae που υποδεικνύονται με διάσπαρτη επιφανειακή ανάκλαση (διακεκομμένο βέλος) [63].

2.5.2. Κατοπτρική μικροσκοπία μη επαφής

Το ενδοθήλιο του κερατοειδούς σε συνδυασμό με τις εκδηλώσεις από τη μεμβράνη Descemet είναι το ιστολογικό στρώμα για τη διάγνωση της FECD [64]. Για τη περιγραφή του ενδοθηλίου χρησιμοποιούμε τρεις μεταβλητές:

α) Μέγεθος κυττάρου. Εκφράζεται με τον όρο της κυτταρικής πυκνότητας (cell density, CD) και αντικατοπτρίζει τον αριθμό των κυττάρων.

β) Έκταση (spread) του κυτταρικού μεγέθους. Εκφράζεται με το συντελεστή μεταβλητότητας και αντικατοπτρίζει την ετερογένεια στο μέγεθος (πολυμεγεθυσμός).

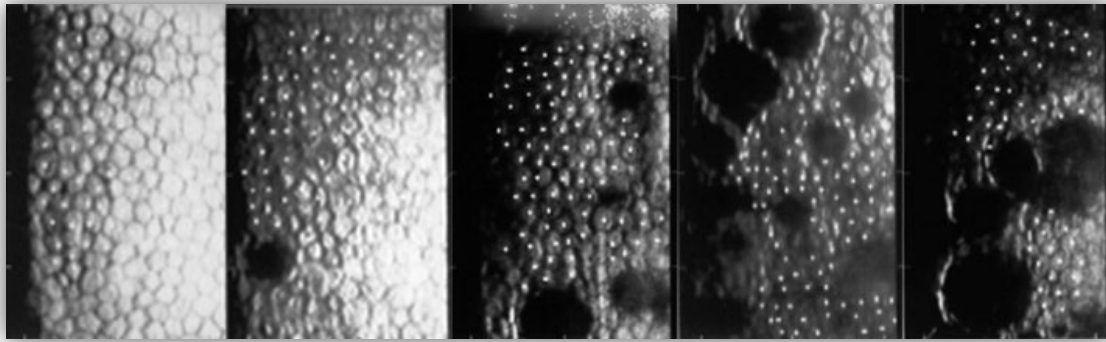
γ) Συντελεστής εξαγωνικότητας. Αντικατοπτρίζει την ασυμμετρία στο σχήμα (πλεομορφισμός).

Πραγματοποιείται ενδοθηλιομέτρηση της κεντρικής και παρακεντρικής περιοχής, καθώς γίνονται συστηματικές λήψεις χωρίς να υπάρχει επαφή με τον κερατοειδή. Η ανάλυση της εικόνας γίνεται με τυχαία επιλογή των δεδομένων που προέρχονται από τις απεικονίσεις του ενδοθηλίου της ίδιας περιοχής, έτσι όπως αυτές λαμβάνονται από το βίντεο. Για το καθορισμό της κυτταρικής πυκνότητας του ενδοθηλίου μετράμε 50 ενδοθηλιακά κύτταρα που συμπεριλαμβάνονται σε ένα χειροκίνητα καθοριζόμενο, τυχαία επιλεγόμενο ορθογώνιο πλαίσιο. Η περιοχή έχει διαστάσεις 4,0 x 4,5 mm και η μέτρηση γίνεται τόσο στα ολόκληρα (complete) κύτταρα εντός του πλαισίου όσο και στα μη ολόκληρα (partial) κύτταρα που βρίσκονται μεταξύ δύο παρακείμενων ορίων του πλαισίου.

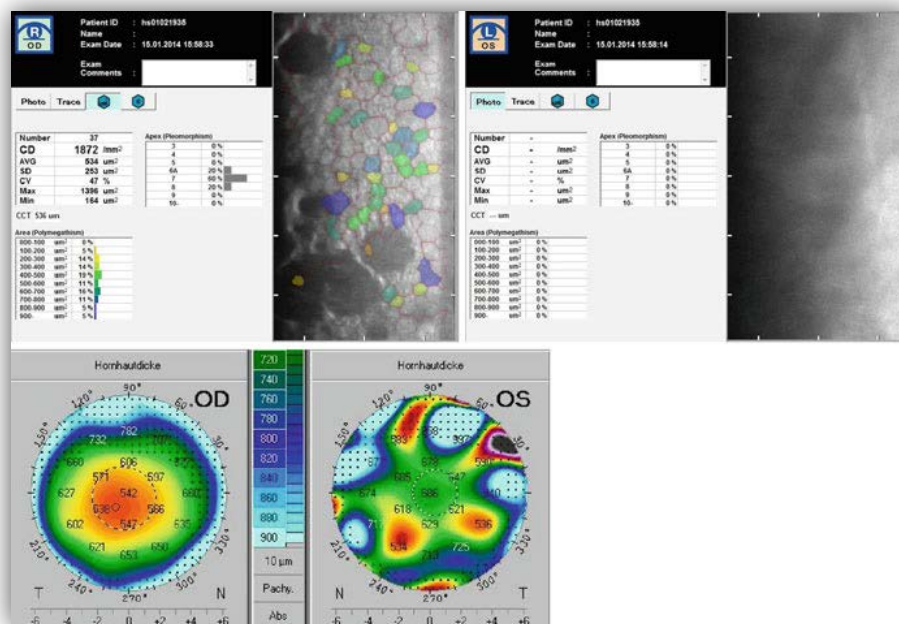
Οι παράμετροι που υπολογίζονται είναι (εικόνα 2.5):

- **AVE**- μέσος όρος του μεγέθους των κυττάρων
- **MAX**- το μεγαλύτερο κύτταρο από τα επιλεγμένα
- **MIN**- το μικρότερο κύτταρο από τα επιλεγμένα
- **NUM**- ο πραγματικός αριθμός κυττάρων που χρησιμοποίησε το λογισμικό
- **CD**- πυκνότητα κυττάρων σε ένα τετραγωνικό χιλιοστό
- **SD**- σταθερά απόκλισης μεγέθους
- **CV**- συντελεστής μεταβλητότητας μεγέθους
- **6A**- ποσοστό εξαγωνικών κυττάρων

Η μορφολογία των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι κλειδί για τη διάγνωση της FECD και οι κύριες αλλαγές περιλαμβάνουν τον πολυμεγεθυσμό και τον πλεομορφισμό [65]. Σύμφωνα με ερευνητές η εικόνα του κατοπτρικού μικροσκοπίου μπορεί να χωριστεί σε πέντε κατηγορίες όπου στην τελευταία τα guttae καταλαμβάνουν περισσότερο από 50% της επιφάνειας (εικόνα 2.4) [15].



Εικόνα 2.4: Ταξινόμηση των guttae κερατοειδούς όπως φαίνεται σε κατοπτρική μικροσκοπία και με βάση τη συνολική έκταση των σκοτεινών περιοχών. Από τα αριστερά προς τα δεξιά: Βαθμός 1 (0%, αλλά εμφανής με λαμπτήρα σχισμής), Βαθμός 2 (<10%), Βαθμός 3 (10-25%), Βαθμός 4 (25-50%) και Βαθμός 5 (περισσότερο από 50%) [66].



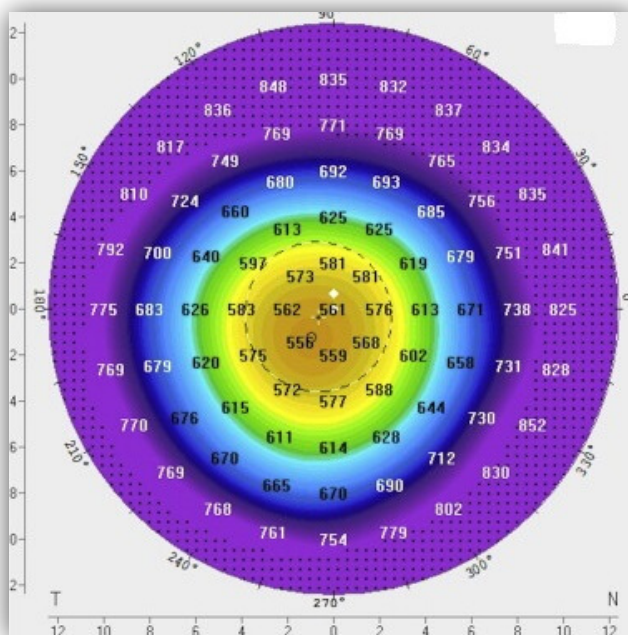
Εικόνα 2.5: Άντρας ηλικίας 80 ετών με ασύμμετρη εκδήλωση FECD. α) OD: εικόνα του ενδοθηλίου με λίγα guttae διαφορετικών μεγεθών, κανονικό κεντρικό πάχος κερατοειδούς 542 μm και οπτική οξύτητα 20/20. β) OS: έλλειψη εικόνας ενδοθηλίου ενδεχομένως λόγω αυξημένου οιδήματος (προκαλείται σκέδαση του φωτός, μειώνεται η ποιότητα της εικόνας και γίνεται δυσκολότερη η κεντρική ανάλυση), αυξημένο κεντρικό πάχος κερατοειδούς 686 μm και οπτική οξύτητα 20/100.

Έχει προταθεί σε μελέτες ότι η πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων μπορεί να αξιολογηθεί και με εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας, όπου παρέχουν ένα αντικειμενικό μέσο αξιολόγησης του ενδοθηλίου του κερατοειδούς στη δυστροφία του Fuchs και μπορεί να είναι ένα ακόμα χρήσιμο εργαλείο στις κλινικές μελέτες [67].

2.5.3. ΠΑΧΥΜΕΤΡΙΑ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ

Πρόκειται για τη διαδικασία μέτρησης του πάχους του κερατοειδή (εικόνα 2.6). Μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με τη χρήση υπερηχομετρίας, είτε με οπτικές μεθόδους. Το πάχος του κερατοειδούς μπορεί να κυμαίνεται μέχρι 1100 μm στο τελευταίο στάδιο της FECD σε σύγκριση με το κανονικό πάχος των 530 μm [68]. Ωστόσο, η αλλαγή του κεντρικού πάχους του κερατοειδούς κατά τις επισκέψεις της κλινικής παρακολούθησης είναι πιο σημαντική από τη συνολική τιμή [69].

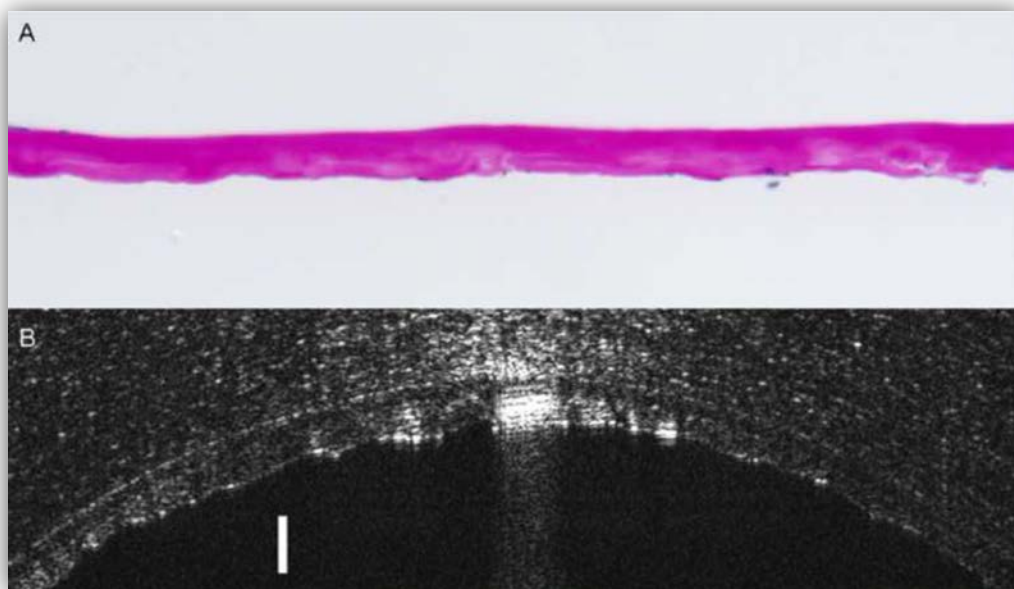
Αυτή η τεχνική παρουσιάζει πλεονεκτήματα λόγω του μειωμένου χρόνου που απαιτείται για την ολοκλήρωσή της, του χαμηλότερου κόστους για τον ασθενή αλλά και του μειωμένου κόστους εξοπλισμού για τον κλινικό ιατρό. Επιπλέον, δεν απαιτεί εκτεταμένη εκπαίδευση για τη διαχείριση ή την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Ωστόσο δεδομένης της δυσκολίας προσδιορισμού του ακριβούς κέντρου του κερατοειδούς χιτώνα, πρέπει να ληφθούν χωριστές μετρήσεις εάν το κεντρικό πάχος του κερατοειδούς μετράται με το χέρι χρησιμοποιώντας υπερήχους. Αρκετοί είναι οι ερευνητές που προτείνουν την μέτρηση του πάχους του κερατοειδούς με συνεστιακό μικροσκόπιο [70]. Ένα κεντρικό πάχος κερατοειδούς μεγαλύτερο από 640 μm συνήθως υποδηλώνει οίδημα του κερατοειδούς [60]. Τέσσερα χιλιοστά από το κέντρο, ο κερατοειδής χιτώνας εξακολουθεί να είναι στατιστικά παχύτερος από τον κανονικό, αλλά αυτό φαίνεται να είναι κλινικά πολύ λιγότερο σημαντικό. Έχει προταθεί η χρήση αναλογίας κεντρικού προς περιφερικό πάχος (CPTR), δηλ. μέτρηση του πάχους του κέντρου του κερατοειδούς και του πάχους στα 4 mm από το κέντρο για την εκτίμηση της εξέλιξης της νόσου [60].



Εικόνα 2.6: Παχυμετρικός χάρτης κερατοειδούς (απεικονιστική μέθοδος)

2.5.4. Οπτική τομογραφία συνοχής στο πρόσθιο τμήμα του οφθαλμού. (Anterior Segment OCT)

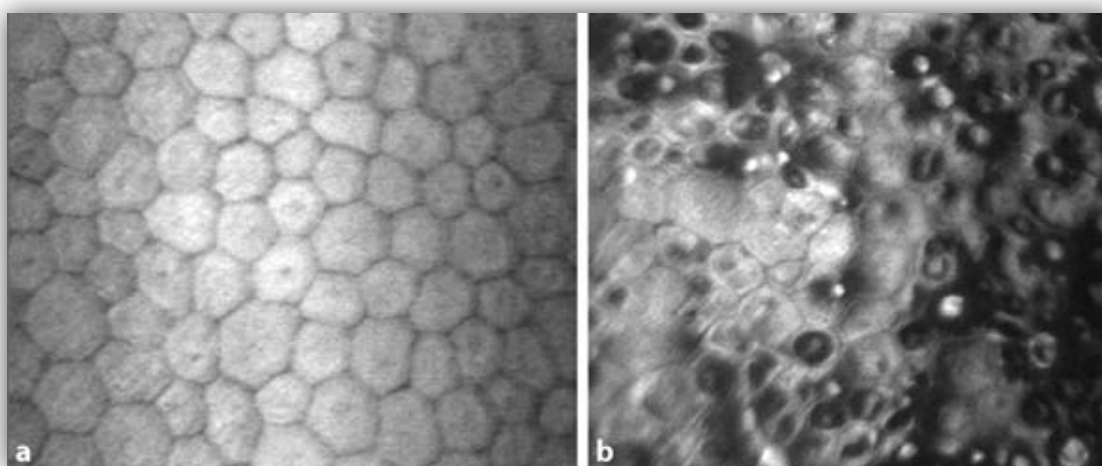
Η Οπτική Τομογραφία Συνοχής (Optical Coherence Tomography – OCT) είναι μια απεικονιστική και διαγνωστική μέθοδος του οφθαλμού που επιτρέπει την ιστολογική απεικόνιση των ιστών σε πραγματικό χρόνο χωρίς να απαιτηθούν βιοψία και ιστολογική εξέταση. Ένα ακόμα πλεονέκτημα του OCT του εμπρόσθιου τμήματος είναι η δυνατότητα μέτρησης του πάχους του κερατοειδούς από το στρώμα και όχι του συνολικού, ώστε να είναι σε θέση να διαφοροποιήσει καλύτερα το στρωματικό και το επιθηλιακό οίδημα. Αυτή η μέθοδος κατέχει ένα δεύτερο πλεονέκτημα σε ασθενείς με FECD, καθώς η μεμβράνη του Descemet εμφανίζεται ως μια παχιά ζώνη δύο αδιαφανών γραμμών. Η πρόσθια γραμμή είναι ομαλή και αντιπροσωπεύει την στρωματική επιφάνεια της μεμβράνης του Descemet, ενώ η οπίσθια γραμμή είναι ακανόνιστη και κυματιστή με τοπικές πυκνότητες που αντιστοιχούν σε μεγάλο βαθμό στην ιστολογική εικόνα [71]. Αυτό μπορεί να επιτρέψει τον προσδιορισμό της εξέλιξης της νόσου. Δυστυχώς, αυτός ο ξεκάθαρος διαχωρισμός περιορίζεται στα UHR-OCT (υψηλής ανάλυσης) (εικόνα 2.7). Αντίθετα, τα εμπορικά διαθέσιμα OCT του εμπρόσθιου τμήματος έχουν περιορισμένη ικανότητα με αποτέλεσμα να μην απεικονίζουν τη μεμβράνη του Descemet.



Εικόνα 2.7: Σύγκριση της ιστολογικής ανάλυσης του κερατοειδούς και της οπτικής τομογραφίας συνοχής υψηλής ανάλυσης (UHR-OCT) ασθενούς με δυστροφία του Fuchs. Η εικόνα (A) αποκαλύπτει την πυκνή μεμβράνη Descemet με περιοχές οξυδιακών εκδηλώσεων που συσχετίζονται με guttae κερατοειδούς. Η εικόνα UHR-OCT (B) της ίδιας μεμβράνης Descemet εμφανίζεται ως μια παχιά ζώνη αποτελούμενη από δύο αδιαφανείς γραμμές. Η πρόσθια γραμμή είναι ομαλή, ενώ η οπίσθια γραμμή έχει κυματιστή ακανόνιστη εμφάνιση με περιοχές με εντοπισμένες πυκνότητες που μπορούν να συσχετιστούν με guttae κερατοειδούς [71].

2.5.5. Συνεστιακή μικροσκοπία (In vivo confocal microscopy, IVCN)

Η συνεστιακή μικροσκοπία είναι μια τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση μη εμφανών κλινικά, κυτταρικών και νευρικών μεταβολών στο πρώιμο στάδιο της FECD. Λόγω της ικανότητάς της να εστιάζει την πηγή φωτός και την εικόνα στο ίδιο εστιακό επίπεδο, επιτρέπει σε πραγματικό χρόνο την *in vivo* αξιολόγηση του κερατοειδούς, σε διαφορετικά επίπεδα συμπεριλαμβανομένου και του ενδοθηλιακού στρώματος. Με την τεχνική της IVCN μπορούν να μελετηθούν ο πλεομορφισμός και πολυμεγεθυνσμός των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα *guttae* που εμφανίζονται ως υποανακλαστικές στρογγυλές δομές, ενώ μπορεί να βοηθήσει στην αξιολόγηση του αριθμού και της μορφολογίας των ενδοθηλιακών κυττάρων κατ' αναλογία με την κατοπτρική μικροσκοπία (εικόνα 2.8) [64]. Έχει επίσης προταθεί ότι η συνεστιακή μικροσκοπία επιτρέπει βελτιωμένη απεικόνιση της FECD εντός του διογκωμένου κερατοειδούς, το οποίο είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στην εκτίμηση της πάθησης [72]. Μελέτες κερατοειδούς με συνεστιακή μικροσκοπία παρουσίασαν αξιοσημείωτη μείωση του συνολικού αριθμού των νευρών του κερατοειδούς και του αριθμού των διακλαδώσεων αυτών σε προχωρημένα στάδια της FECD σε σύγκριση με μια ομάδα ελέγχου [73]. Απομένει να καθοριστεί εάν οι μεταβολές αυτές οφείλονται στο στρωματικό οίδημα που αναπτύσσεται ή πιθανώς εμπλέκονται άμεσα στην παθοφυσιολογία της FECD, αφού είναι εμφανείς από τα αρχικά στάδια της νόσου [74].



Εικόνα 2.8: Εικόνα συνεστιακής μικροσκοπίας: α. φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα κερατοειδούς. β. ενδοθηλιακά κύτταρα κερατοειδούς σε FECD παρατηρήστε τις πολυάριθμες εκβολές (*guttae*) της μεμβράνης του Descemet καθώς και το ακανόνιστο μέγεθος και σχήμα των κυττάρων [63].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΔΟΜΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ - ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΣΤΟΝ FECD ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗ

3.1 ΔΟΜΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ

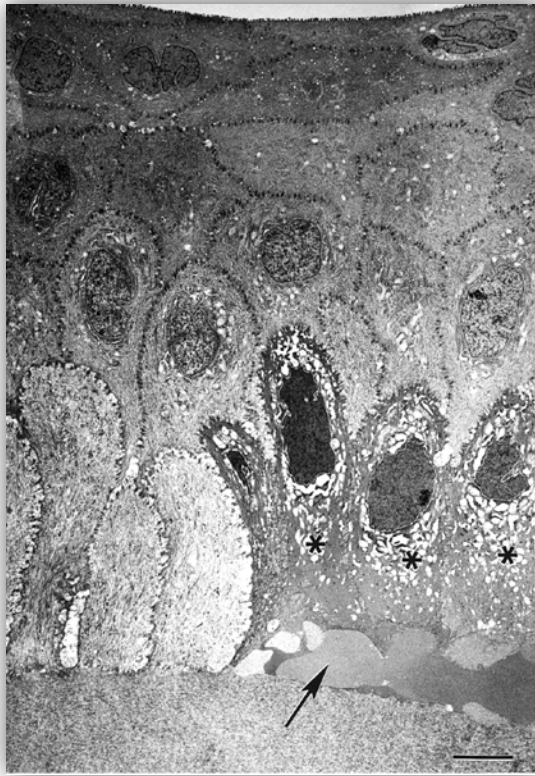
Η ενδοθηλιακή δυστροφία του Fuchs (FECD) είναι μια κοινή ασθένεια που εκδηλώνεται όμως με ποικίλους βαθμούς σοβαρότητας. Την τελευταία δεκαετία βελτιώθηκε σημαντικά η κατανόηση των ανατομικών και οπτικών παραγόντων που επηρεάζουν την όραση σε αυτή τη νόσο επειδή το τμήμα του κερατοειδούς που αφαιρείται μετά από θεραπεία με ενδοθηλιακή κερατοπλαστική, μελετήθηκε εκτενώς. Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι η FECD αποτελεί πρωτογενή δυσλειτουργία του ενδοθηλίου του κερατοειδούς, αλλά οι μεταβολές είναι εμφανείς σε όλο τον κερατοειδή χιτώνα και εκδηλώνονται από τα αρχικά στάδια της νόσου.

3.1.1 ΠΡΟΣΘΙΟ ΤΜΗΜΑ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ

Αρχικά περιεγράφηκε ως επιθηλιακή δυστροφία του κερατοειδούς από τον Ernst Fuchs σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο της νόσου, οι οποίοι παρουσίαζαν επιθηλιακό οίδημα, πρόσθια στρωματική θολερότητα και μειωμένη ευαισθησία [1], τώρα όμως είναι γνωστό ότι οι πρόσθιες αλλαγές του κερατοειδούς παρουσιάζονται νωρίτερα στην πορεία της νόσου [75-77]. Ενώ οι πρόσθιες αλλαγές του κερατοειδούς δεν είχαν μεγάλη σημασία στην εποχή της ολικής κερατοπλαστικής, η οποία αποκόπτει το ολικό πάχος του κερατοειδούς, η μελέτη των εμπρόσθιων αλλαγών στον κερατοειδή παρέχει καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων της ενδοθηλιακής κερατοπλαστικής και μπορεί να βοηθήσει στον προσδιορισμό του βέλτιστου χρόνου παρέμβασης για την επίτευξη καλύτερων αποτελεσμάτων [78].

ΕΠΙΘΗΛΙΟ

Στα προχωρημένα στάδια της νόσου οι επιθηλιακές αλλαγές είναι ορατές με τη σχισμοειδή λυχνία. Ο κερατοειδής χιτώνας εμφανίζει κηλίδες που οδηγούν σε μικροκύστες και τελικά υποεπιθηλιακές μικροφυσαλιδώδεις υπεγέρσεις (bullae) που μπορούν να «σπάσουν» και να προκαλέσουν έντονο πόνο, ενώ εξελίσσονται σε γκριζό νεφέλιο (haze). Οι κύστες σχηματίζονται ενδοκυτταρικά ή διακυτταρικά, ενώ το ενδοκυτταρικό οίδημα εκδηλώνεται κυρίως στα βασικά επιθηλιακά κύτταρα και οδηγεί σε διακυτταρικό οίδημα καθώς γίνεται η ρήξη των κυστών και των κυττάρων (εικόνα 3.1) [58]. Οι μικροκύστες μπορούν να διαρραγούν και ο κερατοειδής χιτώνας μπορεί να διαβρωθεί επανειλημμένα, να μολυνθεί και να αγγειοποιηθεί. Το χρόνιο οίδημα του κερατοειδούς σχετίζεται με υποεπιθηλιακές ουλές [79].



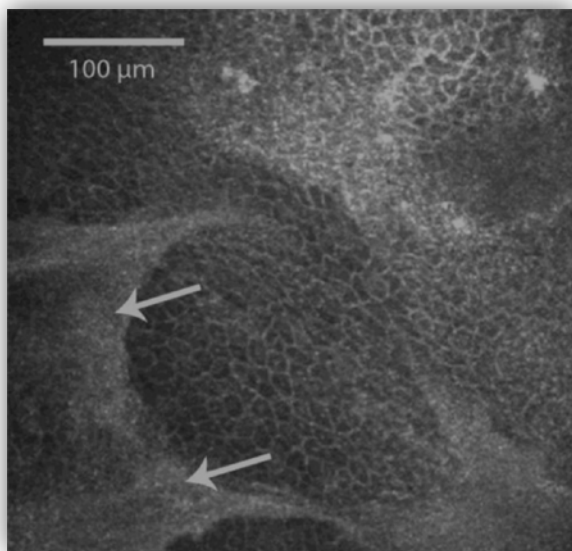
Εικόνα 3.1: Επιθήλιο στο FED. Το TEM εμφανίζει ενδοκυτταρικό οίδημα (βλέπε αστερίσκο) και αποκόλληση βασικών κυττάρων λόγω υποεπιθηλιακών υγρών (βλέπε βέλος) [58].*

Με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας, έχουν περιγραφεί τέσσερα διαφορετικά πρότυπα σχηματισμού κύστης [80]:

1. κυστικές βλάβες σφαιρικού σχήματος με καλά καθορισμένα περιγράμματα και χαμηλή εσωτερική ανακλαστικότητα (η πιο συχνή).
2. κυστικές αλλοιώσεις με ακανόνιστη ανακλαστικότητα μέσα στην κύστη, που περιβάλλεται από το κυτταρόπλασμα ενός επιθηλιακού κυττάρου.
3. σωληνοειδείς σχηματισμοί, περισσότερο επιμήκεις που περιέχουν υπερ-αντανακλαστικές δομές στίξης και εμφανίζονται διαχωρισμένες από τα υπόλοιπα επιθηλιακά κύτταρα σχηματίζοντας υποεπιθηλιακά bullae.
4. μη φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα με αυξημένο ενδοκυτταρικό χώρο.

Η φωτεινότητα της εικόνας σε συνεστιακή μικροσκοπία υποδηλώνει αυξημένη οπισθοσκέδαση του κερατοειδούς (που κλινικά ονομάζεται "θολερότητα") και οφείλεται στην εξέλιξη σε γκρίζο νεφέλιο (haze) των συσσωρευμένων μικροφυσσαλίδων του επιθηλίου που αναπτύσσονται λόγω της πρόσθιας μετακίνησης του υγρού μέσω του στρώματος του κερατοειδούς [56].

Η συνεστιακή μικροσκοπία (εικόνα 3.2) επιβεβαιώνει τη διάγνωση, όπου οι δυστροφικές περιοχές απεικονίζονται ως μαύρες τρύπες σε ένα κατά τα άλλα φυσιολογικό επιθήλιο, αν και το οίδημα μπορεί να παρεμποδίσει την καλή απεικόνιση [68]. Στο τελικό στάδιο, μπορεί να παρατηρηθεί ανάγγειος υποεπιθηλιακή ινώδης ουλοποίηση μεταξύ του επιθηλίου και της μεμβράνης του Bowman όπως και περιφερική επιφανειακή νεοαγγείωση κερατοειδούς [81]. Αυτές οι αλλαγές καθιστούν την πρόσθια επιφάνεια του κερατοειδούς ανώμαλη και προκαλούν οπτικές παραμορφώσεις, επιβαρύνοντας ακόμα περισσότερο την οπτική οξύτητα ενώ μπορεί να επιμείνουν ακόμη και μετά την ενδοθηλιακή κερατοπλαστική [82].



Εικόνα 3.2: Εικόνα συνεστιακής μικροσκοπίας όπου εμφανίζεται υποεπιθηλιακή υπεραντανακλαστικότητα (που αντιπροσωπεύει υποεπιθηλιακές ουλές) και παρατηρείται συνήθως στο τελευταίο στάδιο FECD [83].

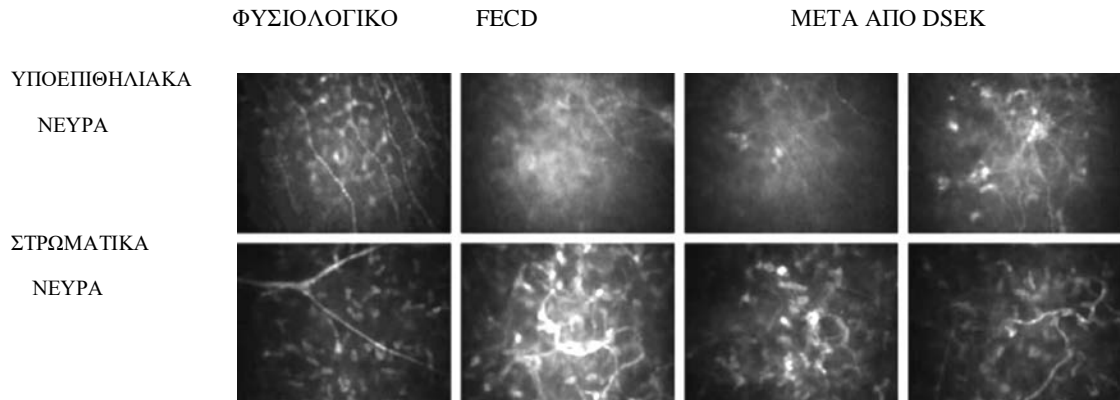
Τέλος σε διάφορες ανοσοϊστοχημικές μελέτες της νόσου έχουν επιβεβαιωθεί η παρουσία σημαντικής απόπτωσης στο επιθήλιο, η ανάπτυξη οξειδωτικής βλάβης σε αυτό και η ύπαρξη ουλών τόσο σε επιθηλιακό όσο και σε υποεπιθηλιακό επίπεδο [83].

MEMBRANΗ BOWMAN

Σε ηλεκτρονική μικροσκοπία ασθενών με FECD, οι περισσότεροι από τους μισούς εμφανίζουν μη φυσιολογική εικόνα της μεμβράνης του Bowman, η οποία εμφανίζεται παχιά και ακανόνιστη ενώ περιέχει και ουλώδη ιστό [84]. Σε άλλους ασθενείς μπορεί να είναι φυσιολογική, να απουσιάζει εντελώς ή να εμφανίζει ασυνέχειες και συμφύσεις μεταξύ της βασικής μεμβράνης και του υποκείμενου στρώματος.

ΠΕΡΙΚΕΡΑΤΕΙΟ ΚΑΙ ΥΠΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΠΛΕΓΜΑ

Παράλληλα τα υποεπιθηλιακά και στρωματικά νεύρα είναι ελλιπή (εικόνα 3.3) , έχουν χαμηλότερη πυκνότητα, έχουν ακανόνιστα πρότυπα διακλάδωσης, σχηματίζουν βρόχους και μειώνονται ο αριθμός των νεύρων και των κύριων νευρικών κορμών καθώς και το συνολικό μήκος των υποεπιθηλιακών νεύρων από τα αρχικά στάδια της νόσου [82]. Στο τελικό στάδιο της FECD, μπορεί τα υποεπιθηλιακά νεύρα να απουσιάζουν εντελώς [75].



Εικόνα 3.3: Εικόνα συνεστιακής μικροσκοπίας από υποεπιθηλιακά και στρωματικά νεύρα του κερατοειδούς. Τα υποεπιθηλιακά νεύρα εμφανίζονται ως γραμμικές φωτεινές δομές μεταξύ των βασικών επιθηλιακών κυττάρων και των πρόσθιων κερατοκυττάρων σε φυσιολογικούς κερατοειδείς χιτώνες, σε FECD, όταν είναι ορατά, συνήθως εμφανίζονται λεπτότερα και πιο αραιά από το κανονικό, ενώ μετά από DSEK για FECD, παραμένουν αραιά και περιστασιακά έχουν παχιά και μη φυσιολογικά πρότυπα διακλάδωσης. Τα στρωματικά νεύρα στους φυσιολογικούς κερατοειδείς εμφανίζονται συνήθως ως ευθείες αντανάκλαστικές δομές με καλά καθορισμένα σημεία διακλάδωσης, σε FECD, είναι συχνά σε βρόχους και συσχετίζονται συχνά με φωτεινή αντανάκλαση των πυρήνων των κερατοκυττάρων, ενώ μετά από το DSEK, η ελικοειδής αιμορραγία παραμένει και τα νεύρα εμφανίζονται συνήθως λεπτότερα από ό, τι πριν από την κερατοπλαστική, αν και εξακολουθούν να συνδέονται συχνά με πυρήνες κερατοκυττάρων που αντανακλούν έντονα [75].

Αυτές οι αλλαγές σχετίζονται με μειωμένη ευαισθησία κερατοειδούς, ακόμη και σε κερατοειδή χωρίς κλινικά προφανή πρόσθια νόσο. Η ευαισθησία του κερατοειδούς παραμένει χαμηλότερη από την κανονική ακόμη και 2 χρόνια μετά την ενδοθηλιακή κερατοπλαστική, μια ένδειξη βραδείας ή περιορισμένης επιδιόρθωσης μετά την αποκατάσταση της ενδοθηλιακής λειτουργίας [75]. Ο ρόλος των νεύρων του κερατοειδούς στην FECD είναι ασαφής, αλλά είναι πιθανό ότι βοηθούν στη διατήρηση της ακεραιότητας και της κανονικότητας του πρόσθιου τμήματος του κερατοειδούς, παρέχοντας αισθητικότητα και νευροτροφικούς παράγοντες [85]. Μεταβολές των νεύρων στην πυκνότητα και στη λειτουργία τους μπορεί να είναι μια απάντηση στις αλλαγές του μικροπεριβάλλοντος, που δημιουργούνται από το χρόνιο οίδημα. Οι μεταβολές αυτές είναι πιθανό να μειώσουν το νευροτροφικό ερέθισμα που είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της λειτουργίας των επιθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα την απόπτωσή τους. Άρα μεταβάλλεται έμμεσα το

πρόσθιο τμήμα του κερατοειδούς, επηρεάζεται η ακεραιότητα της πρόσθιας επιφάνειας με αποτέλεσμα την μείωση της οπτικής οξύτητας [77].

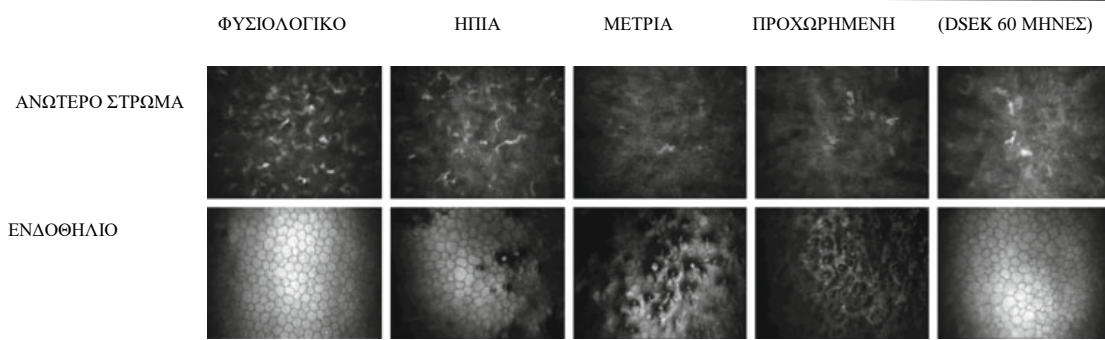
ΣΤΡΩΜΑ

Οι αλλαγές στο στρώμα του κερατοειδούς με FECD περιλαμβάνουν τα πρόσθια κερατοκύτταρα τα οποία εξαντλούνται και αναπτύσσεται μια υποκυτταρική ζώνη στο πρόσθιο τμήμα. Αυτές οι αλλαγές είναι ορατές με συνεστιακή μικροσκοπία (σημαντικά χαμηλότερη πυκνότητα εμπρόσθιων κερατοκυττάρων σε FECD τελευταίου σταδίου που απαιτούν διεισδυτική κερατοπλαστική (682 ± 274 κύτταρα / mm^2) συγκριτικά με τους φυσιολογικούς ελέγχους (1858 ± 404 κύτταρα / mm^2)) [82]. Επίσης έχουν επιβεβαιωθεί με ιστολογικές μελέτες σε ιστό κερατοειδούς που αποκόπτεται σε διεισδυτική κερατοπλαστική [84].

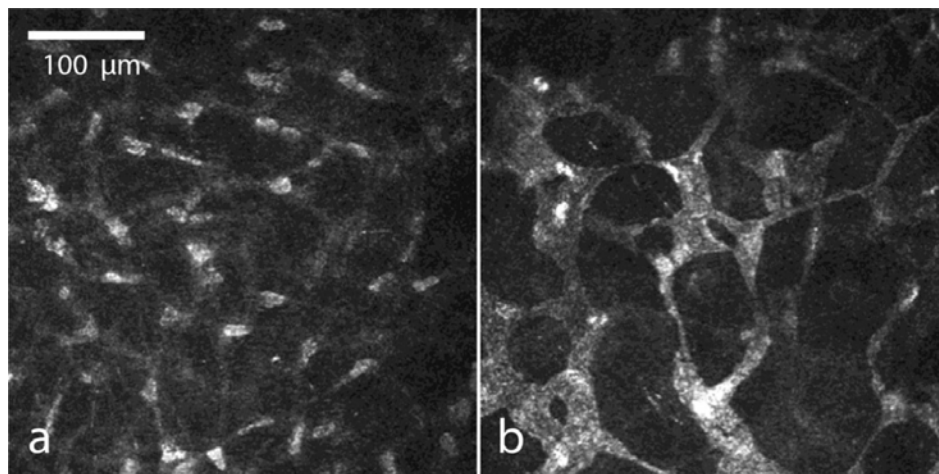
Συνεστιακές εικόνες των κερατοειδών με χρόνιο οίδημα δείχνουν εκφυλιστικούς και εξαντλημένους πυρήνες των εμπρόσθιων στρωματικών κυττάρων που συνοδεύονται από υποεπιθηλιακή και πρόσθια στρωματική ίνωση, που συμβάλλουν σημαντικά στην αυξημένη οπισθοσκέδαση του κερατοειδούς [82]. Είναι σημαντικό να ανιχνεύεται η εξάντληση των κερατοκυττάρων και η αυξημένη οπισθοσκέδαση από τον πρόσθιο κερατοειδή στα πρώτα στάδια της FED, πριν τα guttae γίνουν συρρέοντα και πριν το οίδημα είναι κλινικά ανιχνεύσιμο (Εικόνα 4.2) [76,85]. Αυτές οι πρόωρες ανατομικές μεταβολές θέτουν ερωτήματα ως προς το εάν η πρωτογενής δυσλειτουργία στην FED είναι αποκλειστικά σε ενδοθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς. Υποδεικνύουν επίσης ότι η FED είναι μια χρόνια ασθένεια που έχει υποκλινικές και κλινικές φάσεις. Μετά την ενδοθηλιακή κερατοπλαστική, η μείωση των κερατοκυττάρων επιμένει κατά τη διάρκεια τουλάχιστον 3 ετών [82], και παρόλο που βελτιώνεται η οπισθοσκέδαση του πρόσθιου κερατοειδούς, δεν επιστρέφει στο φυσιολογικό για τουλάχιστον 5 χρόνια (Εικόνα 3.4) [78]. Η αρχική βελτίωση του οπισθοσκεδασμού μπορεί να αποδοθεί στην μείωση του κερατοειδικού οιδήματος, αλλά η ύπαρξή της υποδηλώνει αλλοιώσεις της κερατοειδούς αρχιτεκτονικής ως απάντηση στο χρόνιο οίδημα πριν από την κερατοπλαστική.

Η εικόνα στη συνεστιακή μικροσκοπία (εικόνα 3.5) περιλαμβάνει την υπεραντανακλαστικότητα των κερατοκυττάρων με εκτεταμένα κυτταρικά σώματα των νευρώνων και διεργασίες, σκοτεινά μικρά παράπλευρα ενδοκυττάρια κενοτόπια μεγέθους 10-20 μm και μεγάλα εξωκυττάρια κενά μεγέθους 40-100 μm μεταξύ των κερατοκυττάρων [83].

Fuchs endothelial dystrophy



Εικόνα 3.4: Εικόνα συνεστιακής μικροσκοπίας εικόνες του πρόσθιου στρώματος του κερατοειδούς και του ενδοθηλίου σε έναν φυσιολογικό κερατοειδή, σε ήπια, μέτρια και προχωρημένη FECD, και σε 5 χρόνια μετά από την ενδοθηλιακή κερατοπλαστική (DSEK) για προχωρημένα στάδια της FECD. Υπάρχει αυξημένος οπισθοσκεδασμός στην FECD που σχετίζεται με την εξάντληση των πυρήνων των κερατοκυττάρων. Αυτές οι αλλαγές παραμένουν μετά από ενδοθηλιακή κερατοπλαστική [86].



Εικόνα 3.5: Εικόνα συνεστιακής μικροσκοπίας (α) φυσιολογικού στρώματος και (β) στρώματος με οίδημα κερατοειδούς με υπεραντανακλαστικά κερατοκύτταρα και εξωκυτάρια κενά σε FECD [83].

Οι ίνες κολλαγόνου στο πρόσθιο στρώμα είναι σφιχτά διατεταγμένες σε σχέση με το οπίσθιο στρώμα, στο οποίο τα ινίδια έχουν λιγότερες συνδέσεις. Συνεπώς το οίδημα του κερατοειδούς θα έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη ενυδάτωση του οπίσθιου κερατοειδούς και διόγκωση του οπίσθιου στρώματος στον πρόσθιο θάλαμο. Αυτή η εστιακή πάχυνση στο κεντρικό τμήμα του κερατοειδούς σε σχέση με την περιφέρεια μπορεί να εκτιμηθεί μέσω τομογραφίας οπτικής συνοχής εμπρόσθιου τμήματος και έχει χρησιμοποιηθεί για να επιδείξει αυξημένη αναλογία πάχους από περιφέρεια σε περιφέρεια του κερατοειδούς ασθενών με FECD σε σύγκριση με υγιείς [60].

3.1.2 ΟΠΙΣΘΙΟ ΤΜΗΜΑ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ

Η οριστική συσχέτιση των αλλαγών στο οπίσθιο τμήμα του κερατοειδούς με την FECD ήρθε μετά την ανακάλυψη της σχισμοειδούς λυχνίας το 1911 από τον Gullstrand όταν ο Koeppe διέκρινε κοιλότητες στην ενδοθηλιακή επιφάνεια [2].

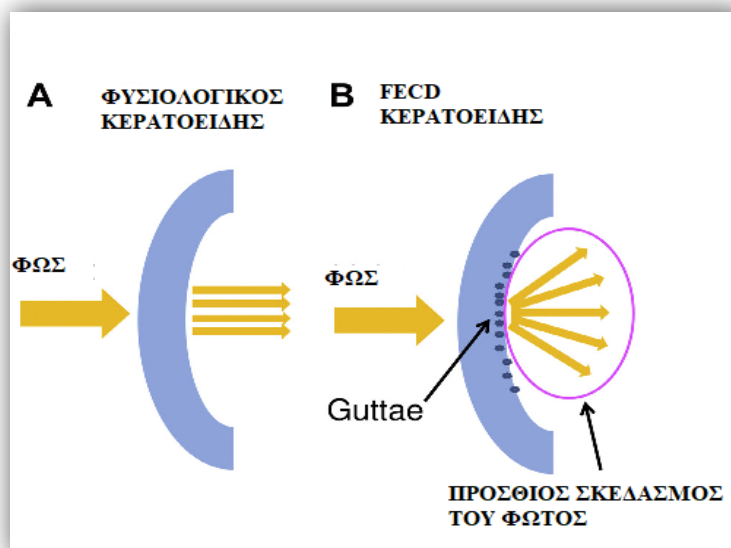
GUTTAE

Αυτές οι κοιλότητες αργότερα ονομάστηκαν guttae (από την λατινική λέξη σταγόνα) (εικόνα 3.6), από τον Vogt [3] και παραμένουν τα καθοριστικά διαγνωστικά χαρακτηριστικά της FECD [87]. Αν και παραδοσιακά υπάρχει διάκριση μεταξύ guttae και FECD, αυτοί οι σχηματισμοί αντιπροσωπεύουν ένα ευρύ φάσμα της νόσου και είναι πιθανόν να αντικατασταθούν από γενετικούς ορισμούς στο μέλλον.



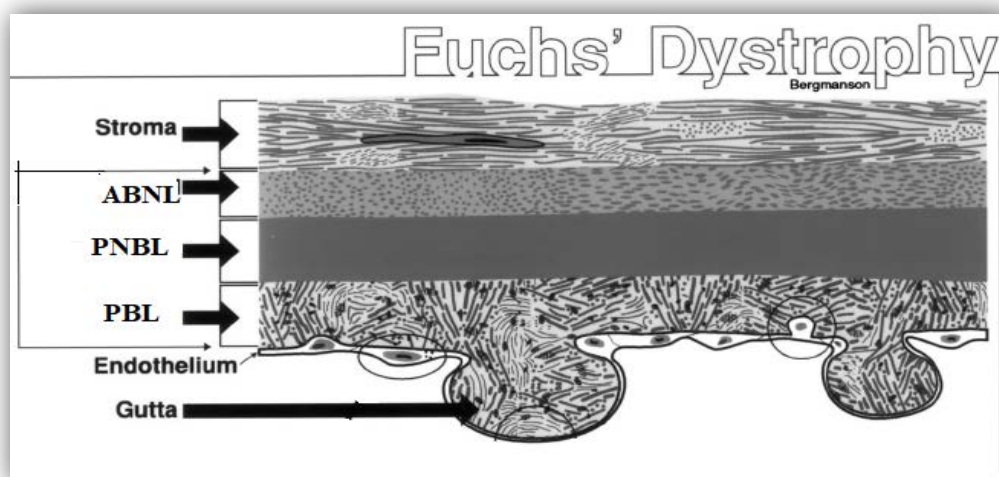
Εικόνα 3.6: Cornea guttata: εκβολές της μεμβράνης του Descemet όπως παρατηρούνται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

Παρόλη την αργή εξέλιξη της νόσου έχει βρεθεί σε μελέτη ότι νέα guttae αναπτύσσονται ακόμα και μέσα στη διάρκεια 2 ετών, γεγονός που καθιστά την παρακολούθησή τους απαραίτητη [88]. Τα guttae έχει βρεθεί ότι προκαλούν οπτικές διαταραχές στους ασθενείς ακόμα και σε περιπτώσεις που έχουμε απουσία οιδήματος. Αυξάνουν την πρόσθια σκέδαση του φωτός και επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα της όρασης των ασθενών (εικόνα 3.7) [89,90].



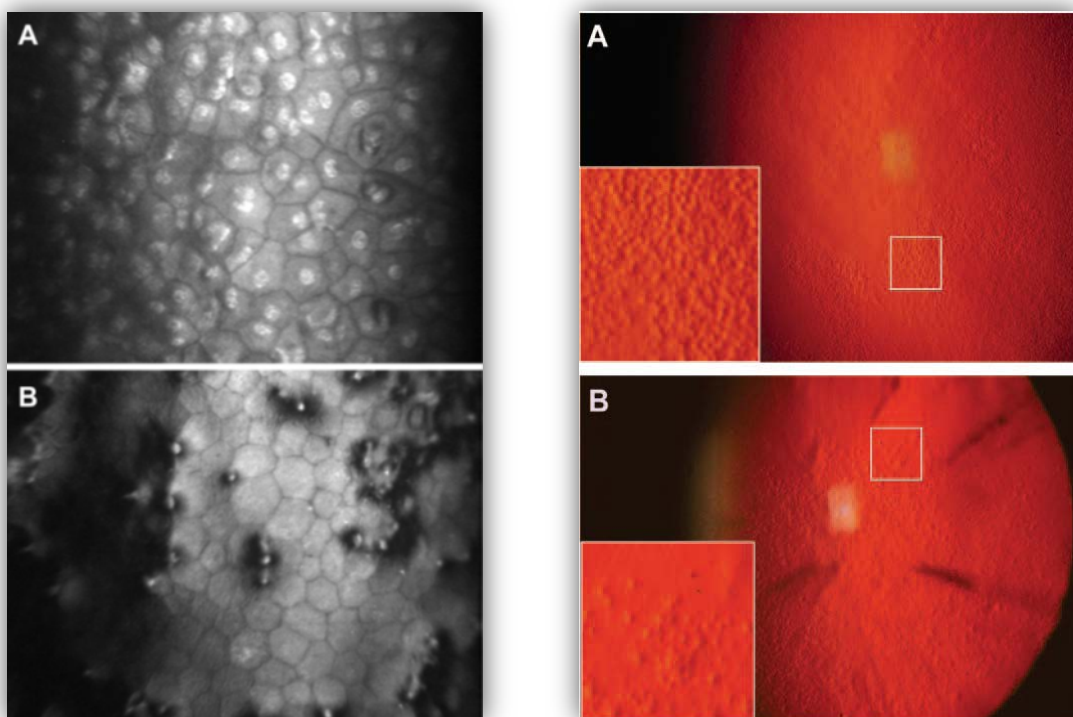
Εικόνα 3.7: Πρόσθιος σκεδασμός του φωτός λόγω των guttae [90].

Σε μια φυσιολογική μεμβράνη του Descemet, κολλαγόνο ευρείας απόστασης (wide-space) υπάρχει μόνο στο πρόσθιο στρώμα. Αυτός ο τύπος κολλαγόνου παράγεται από το ενδοθήλιο κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής και φτάνει στο πλήρες πάχος του μέχρι τη γέννηση. Σε φυσιολογικούς κερατοειδείς χιτώνες, το κολλαγόνο ευρείας δεν φαίνεται να παράγεται μετά τη γέννηση. Στη δυστροφία Fuchs, ο κερατοειδής αρχίζει πάλι να εκκρίνει κολλαγόνο ευρείας απόστασης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μεγάλες ποσότητες εναποτιθέμενου υλικού να σχηματίζουν ένα νέο επιπρόσθετο στρώμα, το οποίο ονομάζεται PBL (Posterior Banded Layer). Από αυτή την οπίσθια ταινία σχηματίζονται τα guttae του κερατοειδούς (εικόνα 3.8). Αυτό σημαίνει ότι τα guttae περιέχουν κολλαγόνο ευρείας απόστασης το οποίο κατασκευάζεται από κολλαγόνο τύπου VIII [91].



Εικόνα 3.8: Μηχανισμός ανάπτυξης guttae. Τροποποίηση από [91].

Τα guttae στην FECD πρώιμης έναρξης εμφανίζουν διαφορετικά κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά σε σχέση με εκείνα της όψιμης έναρξης (εικόνα 3.9). Στην εικόνα Α παρατηρούμε ασθενή με FECD πρώιμης έναρξης όπου τα guttae εμφανίζονται σε μεγάλες προσβεβλημένες περιοχές του ενδοθηλίου, με μια λεπτή κοκκώδη κατανομή, τα οποία έχουν όμως χαμηλή ανύψωση και είναι τοποθετημένα προς το κέντρο των ενδοθηλιακών κυττάρων. Σε αντίθεση, στην εικόνα Β παρατηρούμε ασθενή με FECD όψιμης έναρξης όπου τα guttae εμφανίζονται πιο χονδροειδή, περισσότερο διακριτά, είναι τοποθετημένα κατά μήκος των ορίων μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων ενώ είναι και περισσότερο ανυψωμένα. Η συσσωμάτωση των guttae είναι ορατή και οι διαυγείς περιοχές των φυσιολογικών ενδοθηλιακών κυττάρων είναι διάσπαρτες [53]. Ακόμα guttae που ανευρίσκονται μόνο στην περιφέρεια είναι φυσιολογικά ευρήματα στο γηράσκοντα πληθυσμό και ονομάζονται Hassal-Henle σώματα και ποτέ δεν οδηγούν σε οίδημα του κερατοειδούς. Τέλος μπορεί να σχηματιστούν δευτερογενώς μετά από τραύμα, μόλυνση, ή τοξική δράση ουσιών στο κερατοειδή. Έτσι, η διάγνωση FECD δεν μπορεί να γίνει μόνο με βάση την παρουσία guttae [12,92].



Εικόνα 3.9: α) ασθενής με νόσο βαθμού 3 (ηλικία 33) με τη μετάλλαξη L450W του COL8A2 γονιδίου β) ασθενής με όψιμη έναρξη FECD βαθμού 3, χωρίς γνωστές μεταλλάξεις του COL8A2[53]

ΔΕΣΚΕΜΕΤΕΙΟΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

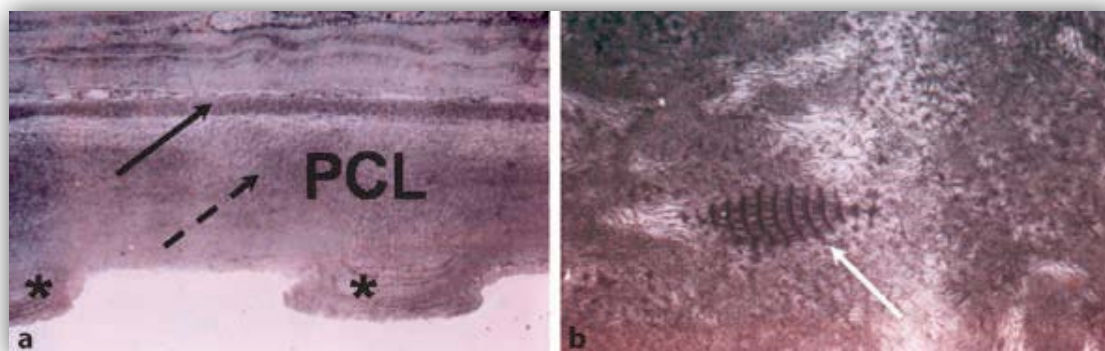
Στο φυσιολογικό κερατοειδή, το πάχος της δεσκεμετείου μεμβράνης που σχηματίζεται από το κολλαγόνο (εικόνα 3.10) που εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αυξάνεται με την ηλικία [93]. Για το λόγο αυτό κατά τη συνεστιακή μικροσκοπία, δεν είναι ορατή σε φυσιολογικά νεαρά άτομα, ενώ σταδιακά γίνεται ορατή με την πάροδο των χρόνων [94]. Η δομή αυτή αποτελείται από 2 διαφορετικά στρώματα [56]:

- ❖ Το ομοιόμορφο πρόσθιο στρώμα (ABL, anterior banded layer) που έχει πάχος περίπου 3 μm και είναι σχετικά σταθερό με την πάροδο του χρόνου και οι ίνες του κολλαγόνου VIII βρίσκονται σε αραιή αλλά τακτική διάταξη (εικόνα 3.11).
- ❖ Το οπίσθιο μη συνδεδεμένο στρώμα (PNBL, posterior non banded layer) το οποίο πυκνώνει σταδιακά και το πάχος του κυμαίνεται από 2 μm στην ηλικία των 10 ετών έως περίπου 10 μm στην ηλικία των 80 ετών αντανακλώντας τη συνεχιζόμενη σύνθεση και εναπόθεση της μεμβράνης του Descemet από το ενδοθήλιο του κερατοειδούς. Οι ίνες του κολλαγόνου VIII βρίσκονται σε τυχαία διάταξη και μέτρια πυκνότητα.

Στη FECD, η μεμβράνη Descemet είναι παχύτερη από την κανονική και έχει ένα ακανόνιστο περίγραμμα, ενώ το PNBL γίνεται λεπτότερο και μη ομοιόμορφο. Η πάχυνση εμφανίζεται αρχικά στο κεντρικό τμήμα του κερατοειδούς και επεκτείνεται προς την περιφέρεια όσο προχωράει η νόσος. Οι αλλαγές στο τρόπο κατανομής του κολλαγόνου θεωρείται ότι υποδεικνύουν την μη φυσιολογική λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα μη φυσιολογικά οπίσθια στρώματα που αναπτύσσονται, αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μέρος του αυξανόμενου πάχους της DM και οι εστιακές εκδηλώσεις του κολλαγόνου αναπτύσσονται ως guttae [95].

Το PNBL στην FECD είτε απουσιάζει εντελώς είτε είναι πολύ λεπτό, γεγονός υποδηλώνει ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία αρχίζει πρώιμα στην ασθένεια. Η ενδοθηλιακή έκκριση τροποποιημένου κολλαγόνου VIII και άλλων σχετικών πρωτεϊνών οδηγούν στο σχηματισμό δύο νέων μη φυσιολογικών οπίσθιων στρωμάτων κολλαγόνου στην DM. Το ένα στρώμα εμφανίζει ίνες κολλαγόνου ευρείας απόστασης, με ακανόνιστη διάταξη, περιέχει τα guttae και ονομάζεται οπίσθιο συνδεδεμένο στρώμα (PBL, posterior banded layer), ενώ άλλοι ερευνητές το ονομάζουν οπίσθιο στρώμα κολλαγόνου (PCL, posterior collagen layer). Το άλλο στρώμα αποτελείται από ινώδη ιστό, καλύπτει τα guttae καθιστώντας την ενδοθηλιακή επιφάνεια ομαλή και ονομάζεται FL (fibrillar layer) [96]. Το PNBL απαιτεί συνεχή εναπόθεση κολλαγόνου από το ενδοθήλιο, με αποτέλεσμα στην FECD που είναι πλέον καλυμμένο από τα μη φυσιολογικά στρώματα να αδυνατεί να λάβει την απαραίτητη ποσότητα και να οδηγείται σε λέπτυνση. Έτσι η DM μπορεί να εμφανιστεί γκρίζα και ακανόνιστη σε FECD, ενώ τα guttae είναι εύκολα ορατά έναντι του μωσαϊκού των ενδοθηλιακών κυττάρων και, όταν συρρέουν, εμφανίζονται ως ογκώδεις κορυφές στην

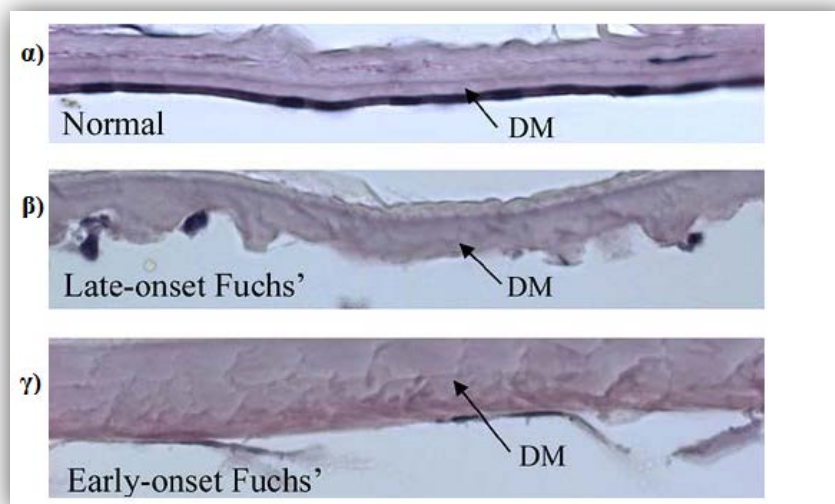
οπίσθια επιφάνεια του κερατοειδούς, ως φωτεινά σημεία, κάθε ένα από τα οποία περιβάλλεται από σκοτεινούς κυκλικούς δακτυλίους [68].



Εικόνα 3.11: α. Ηλεκτρονική μικροσκοπία μικρής ισχύος της μεμβράνης Descemet από FECD ασθενή. Παρατηρήστε την φυσιολογική ABL (βέλος), το έντονα πυκνό και μη φυσιολογικό οπίσθιο στρώμα κολλαγόνου που αναπτύσσεται στη θέση του PNB (PBL ή αλλιώς PCL, διακεκομμένο βέλος) και τα guttae (αστερίσκοι). β Ηλεκτρονική μικροσκοπία της PBL που δείχνει δέσμη κολλαγόνου ευρείας απόστασης (λευκό βέλος) [63].

Σε FECD πρώιμης έναρξης έχουμε αξιοσημείωτη πάχυνση του ABL και εφόσον το στρώμα αυτό θεωρείται ότι αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της πρώιμης εμβρυϊκής ζωής, οι μεταβολές σε αυτό υποδεικνύουν μια προγεννητική έναρξη της παθολογικής διαδικασίας που αναπτύσσονται μέχρι την ενηλικίωση. Από την άλλη πλευρά σε FECD όψιμης έναρξης το ABL είναι φυσιολογικό αλλά σχηματίζονται μη φυσιολογικά μεταγεννητικά στρώματα πίσω από το PNB, με αποτέλεσμα την πάχυνση της DM λόγω της εναπόθεσης ινιδίων κολλαγόνου και την εμφάνιση των guttae. Σε ορισμένους ασθενείς έχουμε και οπίσθιο ινώδες στρώμα (FL) [12,81].

Σε χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης των κερατοειδών χιτώνων και μικροσκόπηση φωτεινού πεδίου (εικόνα 3.12) παρατηρούμε ότι: α) τα ενδοθηλιακά κύτταρα του υγιούς κερατοειδούς χρωματίστηκαν σκούρα και ευθυγραμμίστηκαν καλά β) σε κερατοειδή FECD με καθυστέρηση έναρξης, εμφανίζονται διαθλαστικές δομές στο πρόσθιο και κεντρικό τμήμα του DM (βέλη). Διακεκριμένες εστιακές εκβολές υπήρχαν στην οπίσθια επιφάνεια του DM. Λίγα εκφυλισμένα ενδοθηλιακά κύτταρα υπήρχαν μεταξύ των εκδηλώσεων γ) σε μεταλλαγμένο FECD COL8A2 L450W πρώιμης εκδήλωσης, παρουσιάζεται εμφανές δίκτυο σχηματισμών ρυτίδων (βέλη). Το υπόλοιπο ενδοθήλιο στην οπίσθια όψη (κάτω) παρουσιάζει κυτταροπλασματικές εκφυλιστικές μεταβολές ενώ η μεμβράνη Descemet εμφανίζεται πολύ παχύτερη σε σύγκριση με τις άλλες δυο περιπτώσεις [53].



Εικόνα 3.12: α) DM φυσιολογικό β) DM σε όψιμη έναρξη γ) DM σε πρόιμη έναρξη (<https://www.hopkinsmedicine.org>).

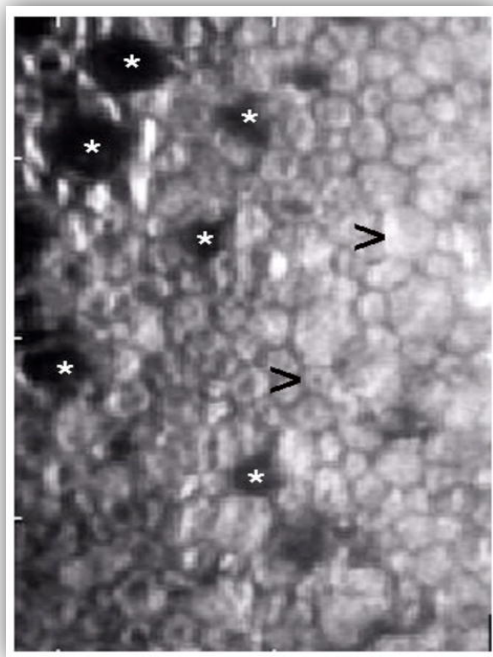
Έχει ταυτοποιηθεί ότι το κολλαγόνο VIII κατέχει μεγάλο μέρος στα μη φυσιολογικά εκκρινόμενα οπίσθια στρώματα της DM όπου σχηματίζονται τα guttae. Το παθολογικό ευρείας απόστασης κολλαγόνο που είναι τυπικό εύρημα της FECD είναι μαλακότερο από τον υπόλοιπο ιστό και όχι τόσο άκαμπτο, ενώ παρουσιάζει και αυξανόμενη ικανότητα διόγκωσης. Τα χαρακτηριστικά αυτά μεταβάλλουν τις μηχανικές ιδιότητες ολόκληρης της DM και αλλάζουν τη μορφολογία και τη λειτουργικότητά της [97].

ΕΝΔΟΘΗΛΙΟ

Δεδομένου ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν παρουσιάζουν ικανότητα διαίρεσης, η απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων που παρατηρείται στην FECD είναι μόνιμη. Συγχρόνως τα ενδοθηλιακά κύτταρα διαταράσσονται από την εμφάνιση των guttae τα οποία συχνά είναι επενδυμένα με ένα λεπτό στρώμα κυτταροπλάσματος. Σκοτεινές οβάλ περιοχές αντιπροσωπεύουν τα guttae που αναπτύσσονται μεταξύ ρευστών και παραμορφωμένων ενδοθηλιακών κυττάρων. Υπάρχουν σημαντικές μεταβολές στο κυψελιδικό ενδοθηλιακό μωσαϊκό του φυσιολογικού κερατοειδούς που είναι ορατές με κατοπτρική μικροσκοπία και έχει παρατηρηθεί ότι το ενδοθήλιο καταστρέφεται πιο έντονα στην κεντρική του ζώνη σε σχέση με την περιφέρεια [98].

Στην FECD το ενδοθήλιο χαρακτηρίζεται από μειωμένη πυκνότητα ενδοθηλιακών κυττάρων, μεταβολή στο σχήμα τους (πλεομορφισμός) και διακύμανση στο μέγεθός τους (πολυμεγεθυνσμός) [68] (εικόνα 3.13). Μελέτες συνεστιακής μικροσκοπίας παρουσίασαν 45% έως 59% χαμηλότερη πυκνότητα ενδοθηλιακών κυττάρων σε FECD σε σύγκριση με

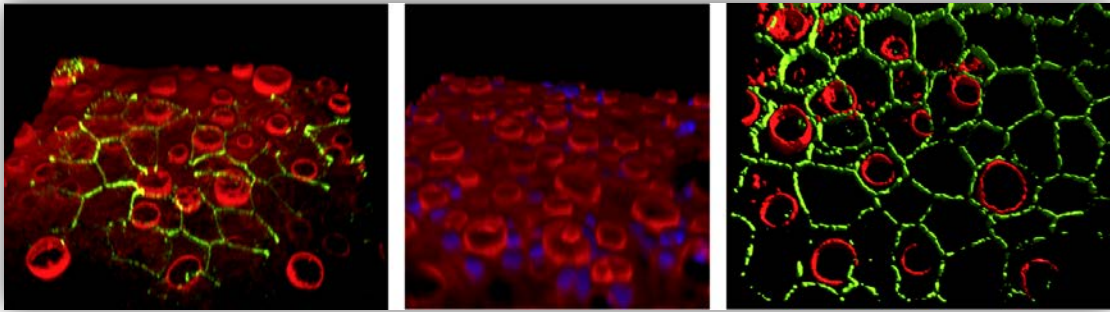
υγιείς κερατοειδείς, ενώ έδειξαν ότι το πάχος του ενδοθηλίου είναι σημαντικά πιο λεπτό, ιδιαίτερα σε περιοχές που υπερκαλύπτονται από guttae [96].



Εικόνα 3.13: Εικόνα κατοπτρικής μικροσκοπίας ασθενούς με FECD. Τα βέλη δείχνουν την μεταβλητότητα που παρατηρείται στο μέγεθος και στο σχήμα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι αστερίσκοι αντιπροσωπεύουν τα guttae [12].

Κατά την εξέλιξη της FECD τα ενδοθηλιακά κύτταρα υποβάλλονται σε ένα είδος μεταπλασίας και αποκτούν έναν ενεργοποιημένο ινοβλαστικό ή επιθηλιακό φαινότυπο. Οι ιστολογικές μελέτες δείχνουν ότι κάποια ενδοθηλιακά κύτταρα αποκτούν εμφάνιση τύπου ινοβλάστη με διογκωμένα μιτοχόνδρια, αυξημένο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο με κοκκώδες υλικό και αυξημένα κυτταροπλασματικά νημάτια [99]. Ενώ μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης επιβεβαίωσαν την ύπαρξη ενδοθηλιακών κυττάρων με επιθηλιακά χαρακτηριστικά, όπως είναι η παρουσία μικρολάχνων, τα αυξημένα δεσμοσωμάτια και η θετική ανοσολογική σήμανση σε επιθηλιακούς δείκτες όπως είναι η κυτοκερατίνη [100].

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι σε θέση να διατηρήσουν τη λειτουργία του φραγμού μέχρι τα προχωρημένα στάδια της FECD, όπου διαταράσσεται ενώ η ικανότητά τους να μεταναστεύουν και να εξαπλώνονται φαίνεται να παραμένει ανεπηρέαστη, (εικόνα 3.14) αντίθετα η λειτουργία της αντλίας νερού σταδιακά μειώνεται όσο εξελίσσεται η ασθένεια και οδηγεί στην ανάπτυξη στρωματικού οιδήματος [83]. Ωστόσο τα ενδοθηλιακά κύτταρα στην FECD παρουσιάζουν δείκτες κυτταρικής απόπτωσης, ενεργοποίησης, γήρανσης, καθώς και οξειδωτικού στρες και όλα αυτά φαίνεται να είναι η αιτία και όχι το αποτέλεσμα της δυσλειτουργίας της DM [83,101].



Εικόνα 3.14: Χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές 3D απεικόνισης, μετά από χρώση του ενδοθηλίου, τα guttae είναι ορατά αποδεικνύοντας πώς μπορούν να διαταράξουν τη φυσιολογική λειτουργία του φραγμού των ενδοθηλιακών κυττάρων [35].

3.2 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η FECD είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια του κερατοειδούς η παθογένεια της οποίας δεν είναι πλήρως κατανοητή. Πολλοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για να περιγράψουν την παθοφυσιολογία της νόσου, συμπεριλαμβανομένου του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου λόγω οξειδωτικού stress.

3.2.1 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Η απώλεια της πυκνότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των FCD και έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με αυξημένες αποπτωτικές διεργασίες [12]. Πρώτος ο Borderie et al ανίχνευσε με τη χρήση τεχνικών πυρηνικής σήμανσης αυξημένα ποσοστά αποπτωτικών ενδοθηλιακών κυττάρων σε δείγματα κερατοειδών με FECD. Ο αποπτωτικός ρυθμός ήταν 2,65% στην ομάδα FECD και 0,23% στην ομάδα ελέγχου. Στη συνέχεια και άλλοι μελετητές ανίχνευσαν αυξημένες αποπτωτικές διαδικασίες στη βασική επιθηλιακή στιβάδα και στο στρώμα κερατοειδών με FECD σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες [101-103]. Υπάρχουν μελέτες που εστιάζουν στα αυξημένα επίπεδα του p53 που ανιχνευθήκαν στο ενδοθήλιο σε FECD και τόνισαν την αναγκαιότητα να διερευνηθεί η πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ της αποπτωτικής οδού που ρυθμίζεται από το p53 και της αντιοξειδωτικής άμυνας του κερατοειδούς, η οποία είναι ανεπαρκής στην FECD [104].

Παρόλες τις μελέτες ακόμα δεν έχει επιβεβαιωθεί κατά πόσο τα ευρήματα απόπτωσης στα διάφορα στρώματα των κερατοειδών με FECD αντιπροσωπεύουν ένα παθογόνο μηχανισμό ή είναι δευτερογενή λόγω του εκφυλισμού που εμφανίζει το ενδοθήλιο και του οιδήματος που υπάρχει στον κερατοειδή.

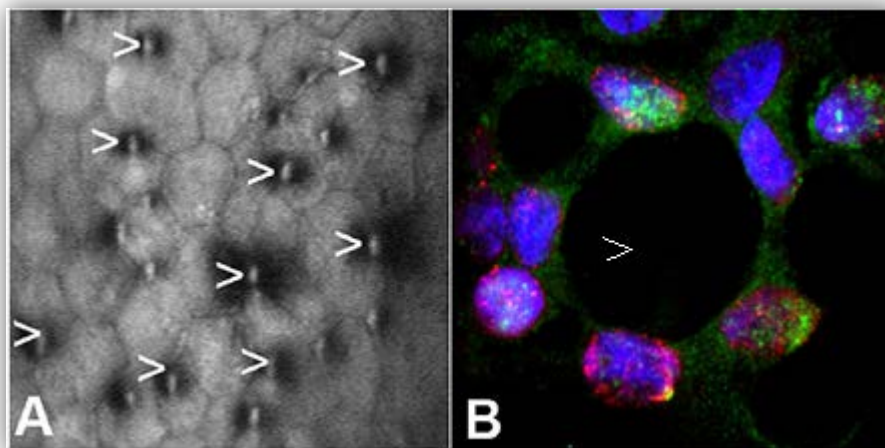
Ένας από τους κύριους επαγωγείς της κυτταρικής απόπτωσης είναι η μακρομοριακή βλάβη λόγω οξειδωτικού στρες και πολλές είναι οι μελέτες που το συσχετίζουν με την FECD. Όπως είναι γνωστό ο κερατοειδής χιτώνας είναι ένας διαφανής μη αγγειακός ιστός που επιτρέπει τη διέλευση του προσπίπτοντος φωτός στις οπίσθιες οφθαλμικές δομές. Επομένως, αυτός ο ιστός εκτίθεται συνεχώς σε ένα ευρύ φάσμα φωτός, συμπεριλαμβανομένης της υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας. Η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία είναι καλά τεκμηριωμένη ότι αποτελεί έναν από τους παράγοντες περιβαλλοντικού στρες που παράγει ελεύθερες ρίζες και ROS επιζήμιες για τα περισσότερα κύτταρα και ιστούς. Απορροφά το μεγαλύτερο μέρος της υπεριώδους ακτινοβολίας που εισέρχεται στο μάτι, με αποτέλεσμα να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στη βλάβη από τα ROS. Στον υγιή κερατοειδή υπάρχει ένας αριθμός αμυντικών μηχανισμών που ελαχιστοποιούν και μειώνουν αυτόν τον κίνδυνο. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι στην FECD πολλοί από αυτούς τους μηχανισμούς δεν λειτουργούν σωστά [25].

Έχουν ανιχνευθεί στο FECD ενδοθήλιο και στην DM αυξημένα επίπεδα τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκίωσης, μη ενζυματικές γλυκιωμένες πρωτεΐνες που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με αυξημένο κυτταρικό οξειδωτικό στρες, φλεγμονή και γήρανση σε σύγκριση με φυσιολογικούς ελέγχους. Εξίσου αυξημένη είναι η συσσώρευση προϊόντων ROS / RNS, τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν οξειδωτικό στρες [20].

Παράλληλα κατά την πρωτεωμική ανάλυση του ενδοθηλίου του κερατοειδούς που λαμβάνεται από ασθενείς με FECD και από φυσιολογικούς μάρτυρες που συμφωνούν με την ηλικία έχει ανευρεθεί μειωμένη έκφραση υπεροξυρεδοξινών 2, 3 και 5 (PRDXs). Τα PRDXs εκφράζονται στο ανθρώπινο ενδοθήλιο του κερατοειδούς και προστατεύουν έναντι του οξειδωτικού στρες απομακρύνοντας το κυτταρικό H_2O_2 , ενώ συγχρόνως αναστέλλουν την επαγόμενη από ROS κυτταρική απόπτωση. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε με PCR όπου βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα mRNA των PRDXs. Συγχρόνως παρατηρήθηκε μειωμένη μεταγραφική ρύθμιση και όλων αντιοξειδωτικών παραγόντων όπως είναι το SOD_2 , MT_3 και $TXNRD_1$. Με βάση μελέτες άλλων τύπων κυττάρων, είναι γνωστό ότι ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών γονιδίων όπως PRDXs, TXNRDs, SODs και MT_3 εξαρτώνται από τη μεταγραφή του Nrf2 παράγοντα μέσω της δέσμευσής του στον κύριο ρυθμιστή του αντιοξειδωτικού συστήματος, ARE (Antioxidant Response Element). Η ανίχνευση μειωμένων επιπέδων της πρωτεΐνης Nrf2 σε δείγματα FECD σε σύγκριση με φυσιολογικούς ελέγχους που πραγματοποιήθηκαν, μπορεί να επηρεάσει την έκφραση πολλαπλών αντιοξειδωτικών γονιδίων στο ενδοθήλιο του κερατοειδούς FECD, προκαλώντας συσσώρευση ελεύθερων ριζών και άλλων δραστικών ειδών [105].

Το οξειδωτικό στρες σε ένα κύτταρο οδηγεί σε βλάβη του DNA. Βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα 8-OHdG, δείκτη οξειδωτικής βλάβης στο DNA, στο FECD ενδοθήλιο σε σύγκριση με υγιή άτομα ανάλογης ηλικίας. Η εύρεση αυξημένων επιπέδων 8-OHdG στο FECD είναι

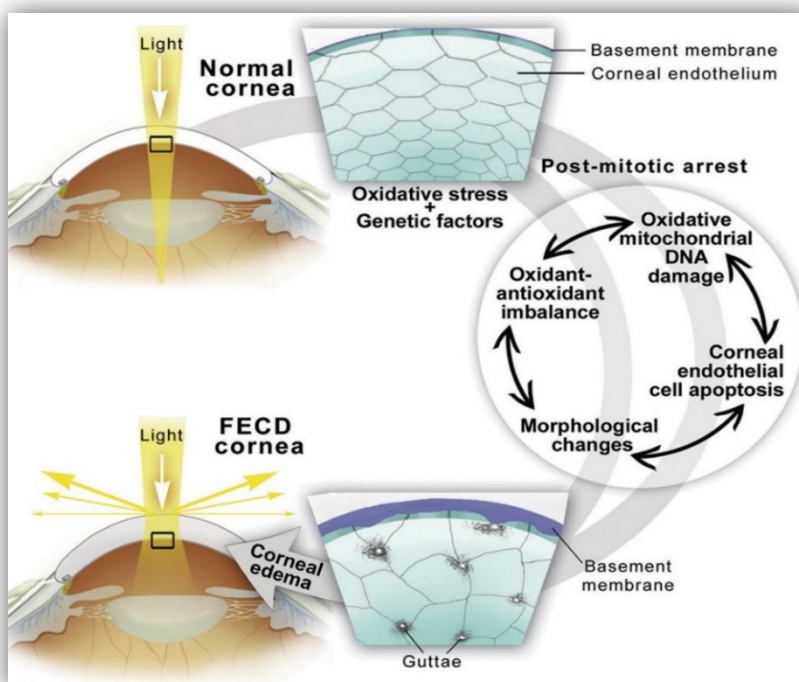
ιδιαίτερα σημαντική αφού για πρώτη φορά τοποθετεί το FECD στην κατηγορία των διαταραχών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Στη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι το mtDNA είναι ο κύριος στόχος της οξειδωτικής βλάβης στο FECD. Το mtDNA είναι ιδιαίτερα επιρρεπές σε οξειδωτικές βλάβες αφού δεν καλύπτεται από ιστόνες και δεν διαθέτει ισχυρό σύστημα DNA επιδιόρθωσης σε σύγκριση με το πυρηνικό DNA. Με τη σειρά του, η καταστροφή του mtDNA μπορεί να οδηγήσει σε ελαττωματική λειτουργία της οξειδωτικής αλυσίδας, παράγοντας περίσσεια ROS / RNS και αύξηση οξειδωτικού στρες. Επιπλέον, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορεί να προκαλέσει απώλεια ακεραιότητας της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και να ξεκινήσει τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Έχει αναφερθεί αυξημένο επίπεδο οξειδωτικής βλάβης του DNA δίπλα στα guttae του κερατοειδούς (εικόνα 3.15), υποδεικνύοντας μια συσχέτιση μεταξύ της μακρομοριακής βλάβης που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες και της απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα τη βλάβη και δυσλειτουργία των ιστών και τελικά τη συμβολή στον φαινότυπο της νόσου FECD [25].



Εικόνα 3.15: Κατοπτρική μικροσκοπία FECD ασθενούς. Α. Οι μαύρες περιοχές (κεφαλή βέλους) αντιπροσωπεύουν τα guttae του κερατοειδούς που διασκορπίζονται μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, διακόπτοντας το συνεχές στρώμα κελιών εξαγωνικού σχήματος. Β. Μεγέθυνση ενός gutta (κεφαλής βέλους) με κέντρο που στερείται ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα υπόλοιπα ενδοθηλιακά κύτταρα συσσωματώνονται γύρω από το gutta, όπου παρατηρούνται θετικές χρώσεις για το TUNEL (κόκκινο), ως δείκτη απόπτωση και για το 8-OHdG (πράσινο), ως δείκτης DNA οξειδωτικής βλάβης [48].

Από κοινού, τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών υποδεικνύουν ότι η οξειδωτική-αντιοξειδωτική ισορροπία στη νόσο FECD έχει επηρεαστεί και τα ενδοθηλιακά κύτταρα μετατοπίζονται σε μια προ-οξειδωτική κατάσταση η οποία μπορεί να οδηγήσει σε βλάβες μιτοχονδριακού και πυρηνικού DNA, σε μεταβολές της μορφολογία τους και τελικά στην απόπτωσή τους. Υπάρχουν όλο και περισσότερες ενδείξεις που υποστηρίζουν την υπόθεση ότι το χρόνια οξειδωτικό στρες συμβάλλει στην κυτταρική και μοριακή βλάβη των ευαίσθητων ενδοθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς, τα οποία με τη σειρά τους οδηγούν

σε παθολογικά ευρήματα της FECD [25, 106, 107]. Με βάση τα ευρήματα των μελετών, έχει προταθεί μια σχηματική αναπαράσταση της παθογένειας της FECD (εικόνα 3.16).



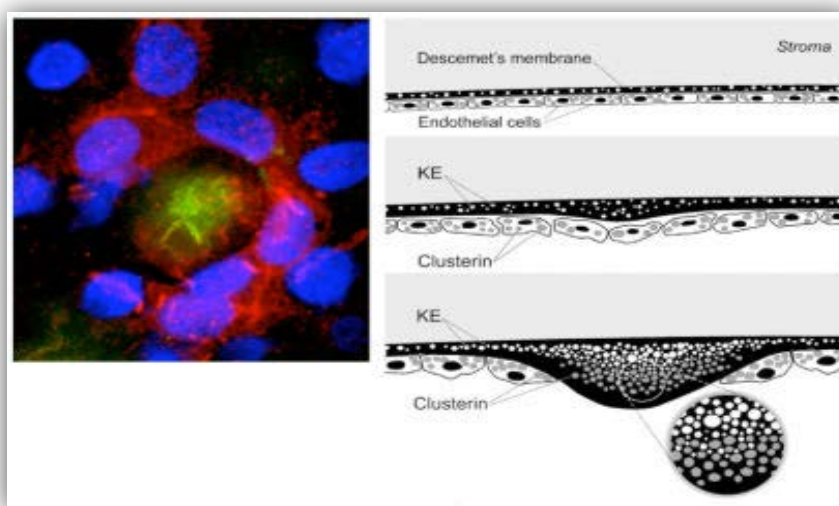
Εικόνα 3.16: Διάγραμμα της παθογένειας της FECD. Το ενδογενές και εξωγενές οξειδωτικό στρες σε συνδυασμό με γενετικούς παράγοντες και τη μη δυνατότητα διαίρεσης του ενδοθηλίου μπορούν να οδηγήσουν σε ανάπτυξη οιδήματος του κερατοειδούς που παρατηρείται στην FECD, καθώς προκαλείται ανισορροπία οξειδωτικού-αντιοξειδωτικού, οξειδωτική μιτοχονδριακή καταστροφή DNA, απόπτωση και μορφολογικές αλλαγές ενδοθηλίου [12].

3.2.2 Clusterin and Transforming Growth Factor- β -Induced Protein

Μελέτες σύγκρισης πρωτεϊνών από σύμπλοκα μεμβράνης ενδοθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς και μεμβράνης Descemet σε δείγματα FECD, ταυτοποίησαν την έντονη υπερέκφραση της προ-συσσωματικής πρωτεΐνης που ονομάζεται clusterin (CLU), η οποία έχει κυτταροπροστατευτική και αντιαποπτωτική δράση. Γενικά, η CLU υπερεκφράζεται σε πολλούς ιστούς που υποβάλλονται σε στρες, π.χ. σε καρκίνους και νευροεκφυλιστικές διαταραχές και βοηθούν στην κυτταρική επιβίωση υπό κυτταροτοξικές συνθήκες. Οι μελέτες ανοσοκυτταροχημείας αποκάλυψαν συσσωμάτωση ενδοθηλιακών κυττάρων γύρω από τα guttae και αυξημένη ενδοκυτταρική χρώση CLU καθώς και στα κέντρα αυτών. Οι πυρήνες των ενδοθηλιακών κυττάρων συσπειρώθηκαν επίσης γύρω από τα guttae, πιθανώς λόγω της συσσωρευτικής και ενδεχομένως προστατευτικής λειτουργίας της CLU. Η έκφραση της CLU είναι αξιοσημείωτα αυξημένη σε ιστό που έχει προσβληθεί από FECD, υποδεικνύοντας μια ακόμη ανεξερεύνητη μορφή δυσλειτουργίας των ενδοθηλιακών κυττάρων που εμπλέκονται στην παθογένεση της FECD [12,108].

Περαιτέρω ανάλυση της πρωτεωμικής σύνθεσης των guttae, αποκάλυψε ότι ο μετασχηματισμός του αυξητικού παράγοντα β σχηματίζει την πρωτεΐνη TGF β 1 η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό τους. Η TGF β 1 είναι μία πρωτεΐνη της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας που μεσολαβεί στην κυτταρική προσκόλληση μέσω αλληλεπίδρασης με κολλαγόνο, φιμπρονεκτίνη και ιντεγκρινών και βρίσκεται σε αυξημένη έκφραση στη νόσο FECD. Η real-time PCR αποκάλυψε αυξημένα επίπεδα του mRNA του TGF β 1 σε ενδοθήλιο FECD σε σύγκριση με υγιή ενδοθήλια που αποδεικνύει ότι η διαφορά προέρχεται από το επίπεδο μεταγραφής του γονιδίου [12,109].

Τελικά, η έμμεση ανάλυση ανοσοφθορισμού αποκάλυψε τη συγκέντρωση CLU και TGF β 1 σε ενδοθήλιο FECD με σημαντικά αυξημένη ένταση στα κέντρα των guttae (εικόνα 3.17). Η TGF β 1 έδειξε σημαντική χρώση στο επίπεδο της DM, με την πιο έντονη χρώση να τείνει προς τα κατώτερα τμήματα των guttae, ενώ η CLU σχηματίζει συσσωματώματα στην κορυφή των αποθέσεων της TGF β 1 στο επίπεδο των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τόσο η TGF β 1 όσο και η CLU εντοπίζονται στη μέση των guttae (κυκλικό ένθετο στην εικόνα 3.17) [12].



Εικόνα 3.17: Αριστερά: Συσσωμάτωση της CLU (κόκκινη χρώση) και της TGF β 1 (πράσινη χρώση) σε ενδοθήλιο που έχει προσβληθεί από FECD. Οι πυρήνες των ενδοθηλιακών κυττάρων (μπλε χρώση) γύρω από ένα guttae. Δεξιά: Σχηματική αναπαράσταση των guttae απεικονίζεται από πάνω προς τα κάτω ο σχηματισμός και η βαθμιαία συσσώρευση CLU και TGF β 1 ή κερατοεπιθηλίνης (KE) στην μεμβράνη Descemet (B) [12].

Αν και η ακριβής σημασία της αλληλεπίδρασης CLU και TGF β 1 είναι ασαφής, η υπερπαραγωγή αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να οφείλεται σε αντίδραση στο οξειδωτικό στρες κατά την οποία τα κύτταρα προσπαθούν να συσσωματωθούν μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους και με το υπόστρωμα και να εξουδετερώσουν προαποπτωτικά ερεθίσματα. Υπάρχουν αυξανόμενα αποδεικτικά στοιχεία στην τρέχουσα βιβλιογραφία ότι το οξειδωτικό στρες παίζει ρόλο στη FECD. Επομένως, είναι πιθανό ότι η δυσλειτουργία στην παραγωγή αυτών των πρωτεϊνών δείχνει έμμεσα τον μηχανισμό παθογένειας της FECD, που

συνεπάγεται βλάβη στο ενδοθήλιο του κερατοειδούς και προκαλείται από το οξειδωτικό στρες [12].

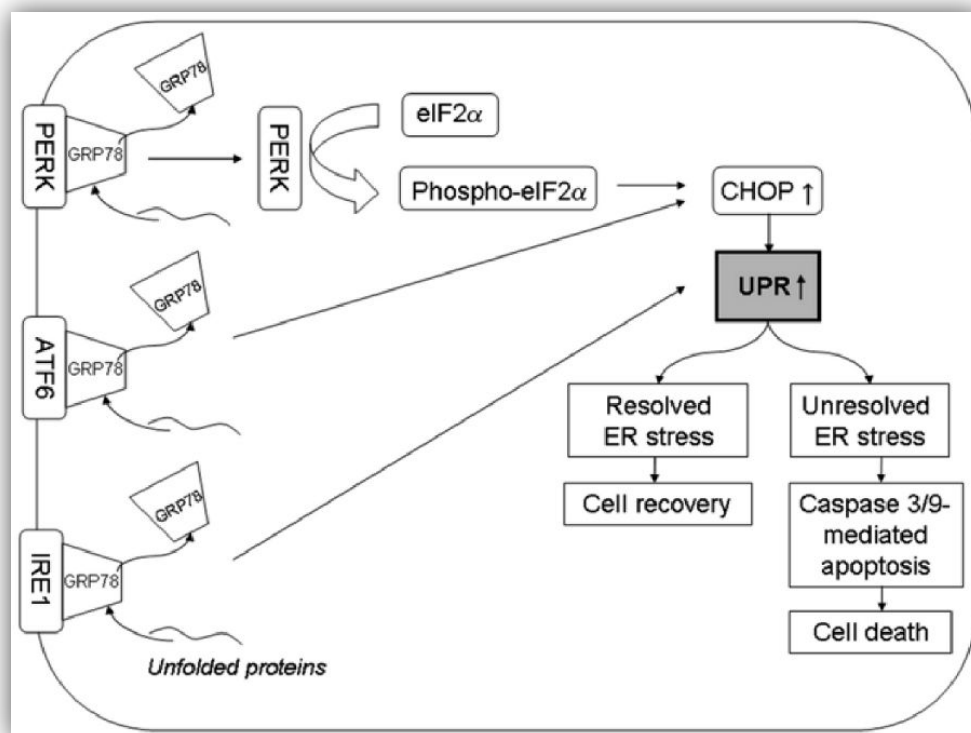
3.2.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ UPR

Μία από τις βασικότερες λειτουργίες του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) που διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στη λειτουργία του κυττάρου είναι η σωστή ωρίμανση και αναδίπλωση των πρωτεϊνών που προορίζονται για έκκριση στον εξωκυττάριο χώρο. Όταν παύει να υπάρχει ισορροπία μεταξύ των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και των πρωτεϊνών που μπορούν να διπλωθούν ορθά, το ενδοπλασματικό δίκτυο αποκρίνεται σε αυτήν την ανισορροπία και ενεργοποιεί διάφορα ενδοκυττάρια μονοπάτια, ώστε να μπορεί να επανέλθει ισορροπία. Η αντίδραση αυτή του ΕΔ καλείται μηχανισμός απόκρισης σε σήμα λανθασμένα αναδιπλωμένης πρωτεΐνης, ή Unfolded Protein Response (UPR), με σκοπό την εξασφάλιση της σωστής αναδίπλωσης των πρωτεϊνών και της απόρριψης των μη αναστρέψιμων λανθασμένων πρωτεϊνών. Η συσσώρευση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει το ενδοπλασματικό δίκτυο σε στρες, κατάσταση που είναι τοξική για το κύτταρο [110].

Σε μια μελέτη σύγκρισης κερατοειδών σε ασθενείς με FECD, σε ασθενείς με κερατόκωνο και σε φυσιολογικούς, οι λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες βρέθηκαν να αυξάνονται σε FECD. Από 10 κερατοειδείς με FECD και 9 μη-FECD κερατοειδείς, όλοι οι FECD κερατοειδείς εμφάνιζαν προεξέχοντα τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο, σε αντίθεση με τους μη FECD κερατοειδείς όπου εμφάνισε μόνο το ένα τρίτο και το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό σημάδι του στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο και της UPR. Οι συνδεδεμένοι με FECD κερατοειδείς έδειξαν επίσης αυξημένη σήμανση ανοσοφθορισμού για GRP78 (glucose-regulated protein), φωσφο-eIF2a (phosphorylated eukaryotic initiation factor 2a) και CHOP (C/EBP homologous protein), σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες ελέγχου. Αυτές οι τρεις πρωτεΐνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην UPR. Παρομοίως, οι δείκτες απόπτωσης κασπάση 3 και κασπάση 9 αυξήθηκαν σημαντικά σε κερατοειδή FECD, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι αυξημένες ποσότητες των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο FECD μπορούν να συμβάλουν σε αυξημένη UPR και σε εξαρτώμενη από κασπάση απόπτωση [20]. Ένας προτεινόμενος μηχανισμός UPR απεικονίζεται στην εικόνα 3.18.

Τα ευρήματα αυτά αποδεικνύουν ότι σε έντονο και παρατεταμένο χρονικά στρες του ΕΔ, το οποίο δεν μπορεί να επιλύσει επαρκώς η UPR, τότε από μηχανισμός επιβίωσης μετατρέπεται σε μηχανισμό που ενεργοποιεί τα μονοπάτια της απόπτωσης στο κύτταρο. Η διαδικασία αυτή αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω ως ένας πιθανός μηχανισμός της παθοφυσιολογίας της νόσου. Φυσικά πρέπει να σημειωθεί ότι τα ευρήματα αυτά να περιορίζονται σε ιστούς που μελετήθηκαν από το τελικό στάδιο της FECD. Εναλλακτικές προσεγγίσεις για τον ποσοτικό προσδιορισμό της UPR μέσω τεχνικών Western blot ή real

time PCR θα ήταν επιθυμητές ωστόσο, αυτές οι τεχνικές δεν είναι εύκολα εφικτές δεδομένης της μικρής ποσότητας ενδοθηλιακού ιστού που λαμβάνεται στην κερατοπλαστική. Μία αρχική επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί σε κυτταροκαλλιέργειες και ζωικά μοντέλα με FECED [99].



Εικόνα 3.18: Απλοποιημένο διάγραμμα της UPR. Τρεις διαμεμβρανικοί αισθητήρες στρες του ΕΔ IRE1, ATF6 και PERK, διατηρούνται σε ανενεργή κατάσταση καθώς είναι δεσμευμένοι στο GRP78. Η δέσμευση λανθασμένα αναδιπλωμένης πρωτεΐνης στο GRP78 προκαλεί την απελευθέρωσή του και έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους. Τα ενεργοποιημένα ATF6 (activating transcription factor 6) και IRE1 (inositol requiring enzyme 1), οδηγούν σε αυξημένη δραστηριότητα της CHOP πρωτεΐνης που διεγείρει την UPR. Η ενεργοποιημένη PERK (pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase) ενεργοποιεί επίσης το CHOP μέσω της φωσφορυλίωσης του eIF2α. Ανάλογα με το μέγεθος και τη διάρκεια του ΕΔ στρες, η UPR έχει ως αποτέλεσμα την επάνοδο σε φυσιολογική κατάσταση, είτε τον κυτταρικό θάνατο του κυττάρου μέσω απόπτωσης που προκαλείται από την κασπάση 3 και 9 [99].

3.2.4 ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΦΡΑΓΜΟΥ Η ΑΝΤΛΙΑΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι επιλεκτικοί φραγμοί που επιτρέπουν τη διαρροή διαλυμένων ουσιών και θρεπτικών συστατικών από το υδατοειδές υγρό έως τον ανάγγειο κερατοειδή. Από την άλλη πλευρά, οι αντλίες Na-K ATPase, που βρίσκονται στην ενδοθηλιακή μεμβράνη, μεταφέρουν ενεργά το υγρό από τον κερατοειδή πίσω στο υδατοειδές υγρό για τη διατήρηση του κερατοειδούς σε μια σταθερή κατάσταση ενυδάτωσης/αφυδάτωσης. Δυσλειτουργία είτε του φραγμού είτε της αντλίας έχουν ως αποτέλεσμα το οίδημα του κερατοειδούς στην FECED.

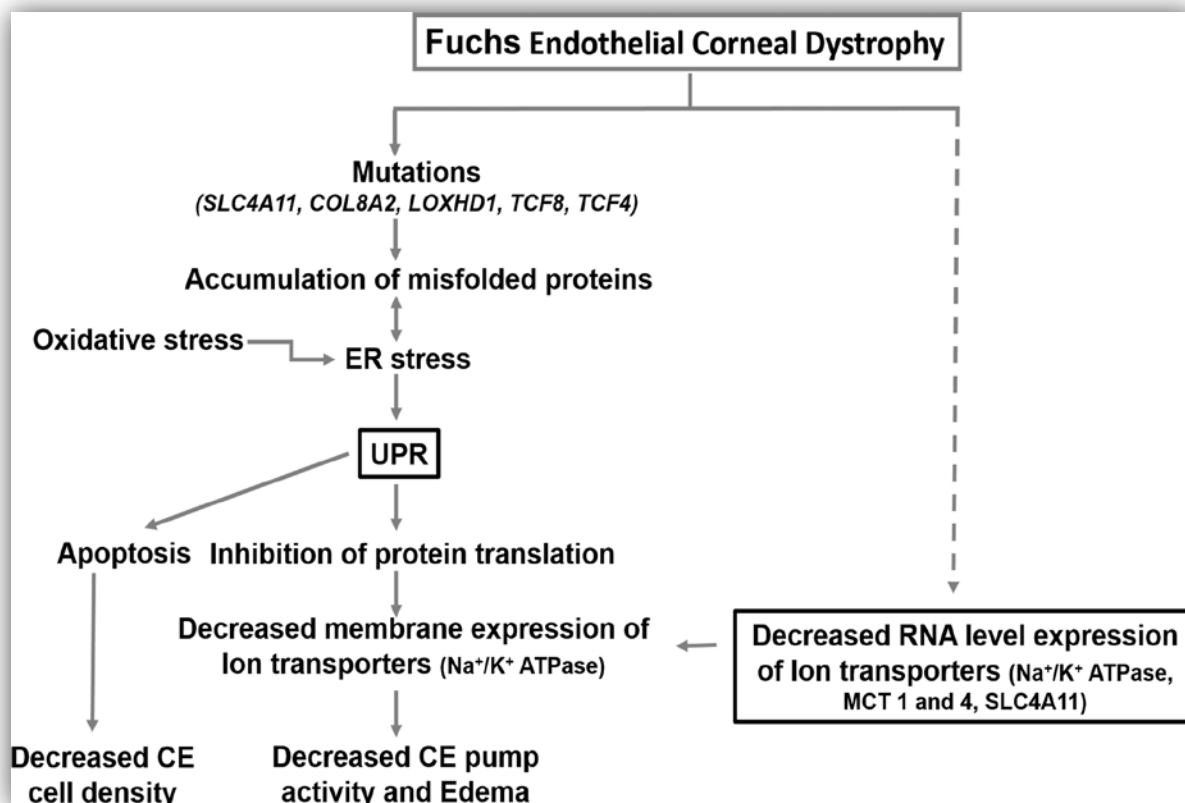
Οι Burns et al. μελέτησαν τους ασθενείς με FECD με αυξημένο πάχος του κερατοειδούς αλλά χωρίς επιθηλιακό οίδημα. Το σημαντικότερο εύρημα ήταν ο αυξημένος ρυθμός διαπερατότητας του ενδοθηλίου στην FECD, χωρίς όμως να εμφανίζεται δυσλειτουργία στην λειτουργία της αντλίας, υποδηλώνοντας ότι το αρχικό ελάττωμα στην FECD είναι η διάσπαση της λειτουργίας φραγμού της ενδοθηλιακής μονοστιβάδας, η οποία προκαλεί αυξημένη ροή υγρού στον κερατοειδή, χωρίς επαρκή αντισταθμιστική αύξηση της λειτουργίας της αντλίας [111]. Ωστόσο, σε μια μεταγενέστερη μελέτη, οι Wilson et al. δεν διαπίστωσαν διαφορά στον ρυθμό διαπερατότητας ενός μεγαλύτερου δείγματος ασθενών με FECD σε σύγκριση με φυσιολογικούς εθελοντές, υποδηλώνοντας ότι ο ρυθμός της αντλίας είναι μειωμένος και η λειτουργία φραγμού είναι άθικτη στην FECD. Η διαφορά μεταξύ των δύο μελετών μπορεί να αντικατοπτρίζει το γεγονός ότι οι λειτουργίες της αντλίας και του φράγματος μπορεί να επηρεάζονται διαφορετικά στα διάφορα στάδια της νόσου, όπως μπορεί να επηρεάζονται και από άλλες αιτίες [112].

Αρκετές άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η αλλοιωμένη δυσλειτουργία της αντλίας παίζει βασικό ρόλο στην FECD. Οι Bergmanson et al. εξέτασαν ιστοπαθολογικές τομές των κερατοειδών FECD και ανίχνευσαν ότι η ανώμαλη εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας προκάλεσε τέντωμα και λέπτυνση των ενδοθηλιακών κυττάρων που βρίσκονται στην κορυφή των guttae. Τα κυτταρικά σώματα μετατοπίστηκαν περιφερικά στο στέλεχος των guttae, ενώ πάνω από τις κορυφές των guttae, οι κυτταρικές μεμβράνες ήταν άθικτες. Δεδομένου ότι δεν υπήρχε χώρος για οργανίδια σε αυτές τις τεντωμένες περιοχές, οι συγγραφείς υποστήριξαν ότι είναι απίθανο η λειτουργία της αντλίας της ενδοθηλιακής στιβάδας να παραμένει άθικτη σε αυτές τις περιοχές [91]. Παρομοίως, άλλες μελέτες σχετικά με τη δραστηριότητα αντλίας Na-K ATPάσης στο κερατοειδές οίδημα, έδειξαν ότι η πυκνότητα της αντλίας μειώνεται σημαντικά στο τελικό στάδιο της FFCD νόσου [112].

Η μελέτη των Jalimarada et al. εστίασε στη συγκριτική ανάλυση επιπέδων έκφρασης σημαντικών μεταφορέων ενδοθηλιακών ιόντων του ενδοθηλίου στην FECD και φυσιολογικών μαρτύρων. Αυτή η μελέτη βρήκε αλλοιωμένη έκφραση των $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{ATPase}$, pNBCe1 , NHE1 και MCT στο FECD, οι οποίες θα μπορούσαν να αποτελούν μια πιθανή αιτιολογία για την δυσλειτουργία της αντλίας στη νόσο [110].

Συνοπτικά, η απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων οδηγεί στη διάσπαση της λειτουργίας φραγμού, παρόλο που τα απομένοντα ενδοθηλιακά κύτταρα προσπαθούν να αντισταθμίσουν την απώλεια αυτή, αυξάνοντας τη λειτουργία της αντλίας. Η συνεχής απώλεια κυττάρων οδηγεί στον κρίσιμο χαμηλό αριθμό των θέσεων της αντλίας η οποία σε συνδυασμό με τα μειωμένα επίπεδα RNA σημαντικών μεταφορέων των ιόντων της παύει να λειτουργεί σωστά [12].

3.2.5 ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ Η ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ FECD



Εικόνα 3.19: Συνοπτικά απεικονίζονται οι μηχανισμών που πιθανόν να συμβάλλουν στα κλινικά συμπτώματα που σχετίζονται με την FECD. Τα στοιχεία των μεταλλάξεων και του οξειδωτικού στρες υποστηρίζουν την επαγωγή του UPR στην FECD, γεγονός που θα μπορούσε να προκαλέσει μειωμένη πυκνότητα ενδοθηλιακών κυττάρων και δυσλειτουργία της αντλίας, με αποτέλεσμα τη δημιουργία οιδήματος στον κερατοειδή. Οι κλινικές ενδείξεις θα μπορούσαν επίσης να συμβούν ως αποτέλεσμα της μη σωστής λειτουργίας της αντλίας που προκαλείται από τη μειωμένη έκφραση επιπέδου RNA των μεταφορέων ιόντων [110].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο : Η ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ FECD

Η FECD είναι μια πολύπλοκη και ετερογενής γενετική διαταραχή του ενδοθηλίου του κερατοειδούς με μεταβλητή διεισδυτικότητα. Δύο γενετικές μέθοδοι – η ανάλυση σύνδεσης και η μελέτη συσχέτισης με το γονιδίωμα (GWAS) - έχουν χρησιμοποιηθεί για να διασαφηνίσουν τη γενετική βάση της FECD. Αυτή τη στιγμή, πέντε αιτιακά γονίδια (*TCF4*, *AGBL1*, *LOXHD1*, *SLC4A11* και *ZEB1*) και τέσσερις αιτιώδεις γενετικοί τόποι στα χρωμοσώματα 5, 9, 13 και 18 έχουν ταυτοποιηθεί σε άτομα με FECD με καθυστερημένη έναρξη. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *COL8A2* έχουν αποδειχθεί ότι προκαλούν FECD πρώιμης έναρξης [92,113].

4.1 ΓΟΝΙΔΙΑ

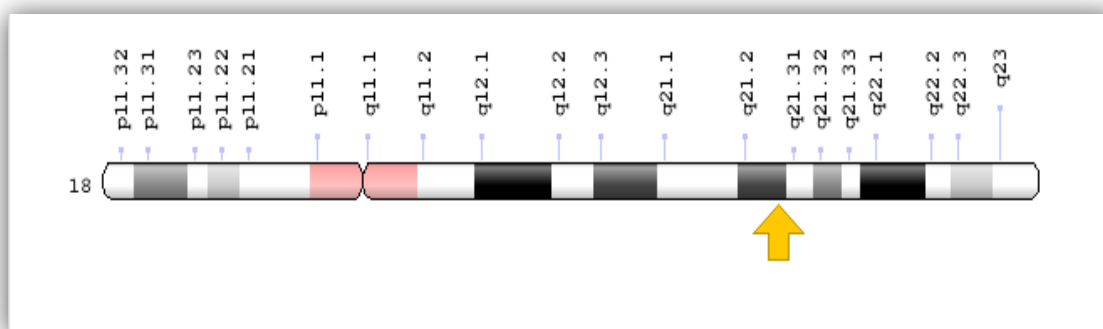
4.1.1 Transcription factor 4 (*TCF4*)

Το γονίδιο *TCF4* και η πρωτεΐνη που αντιπροσωπεύει, αποτελούν μια ενδιαφέρουσα περιοχή για τη μελέτη της γενετικής της FECD και αξίζει ιδιαίτερης συζήτησης αφού θεωρείται ότι διαδραματίζει ρόλο τόσο σε συνηθισμένες όσο και σε σπάνιες διαταραχές. Οι μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος έχουν εντοπίσει κοινές παραλλαγές στο *TCF4* ως τόπους ευαισθησίας για τη σχιζοφρένεια, την ενδοθηλιακή δυστροφία του κερατοειδούς και την πρωτογενή σκληρυντική χολαγγειίτιδα. Αντίθετα, σπάνιες μεταλλάξεις του *TCF4* προκαλούν σύνδρομο Pitt-Hopkins (PTHS), διαταραχή που χαρακτηρίζεται από διανοητική αναπηρία, αναπτυξιακή καθυστέρηση, επιληπτικές κρίσεις και επεισοδιακό υπεραερισμό, ενώ έχει επίσης περιγραφεί σε ασθενείς με άλλες νευροαναπτυξιακές διαταραχές [114-115].

Το γονίδιο *TCF4* παρέχει οδηγίες για τη δημιουργία ενός μεταγραφικού παράγοντα που συνδέεται (δεσμεύεται) με συγκεκριμένες περιοχές του DNA και βοηθά στον έλεγχο της δραστηριότητας πολλών άλλων γονιδίων. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18q21.2 (εικόνα 4.1). Με βάση αυτή τη δράση, η πρωτεΐνη *TCF4* που κωδικοποιείται είναι γνωστή ως παράγοντας μεταγραφής 4 ή E2-2. Η πρωτεΐνη *TCF4* είναι μέρος μιας ομάδας πρωτεϊνών γνωστών ως E-πρωτεϊνών, των βασικών παραγόντων μεταγραφής της βασικής περιοχής έλικας-θηλιάς-έλικας [helix-loop-helix (bHLH)], με τις οποίες αλληλοεπιδρά σχηματίζοντας μεταγραφικά δίκτυα που λειτουργούν στη ρύθμιση πολλαπλών αναπτυξιακών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης της νευρογένεσης, των λεμφοκυττάρων, της κυτταρικής διαφοροποίησης αλλά και της απόπτωσης [116].

Η πρωτεΐνη E2-2 εκφράζεται στο αναπτυσσόμενο ενδοθήλιο του κερατοειδούς και καταστέλλει την έκφραση της πρωτεΐνης κυτταρικής προσκόλλησης E-καδερίνης, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην επιθηλιακή μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), καθώς και στην απώλεια κυτταρικής πολικότητας και επαφής κυττάρου με κύτταρο. Επίσης οι E-πρωτεΐνες συνδέονται έκαστη με άλλη ταυτόσημη ή παρόμοια πρωτεΐνη και έπειτα

συνδέονται με μία ειδική αλληλουχία DNA γνωστή ως E-Box η οποία είναι ικανή είτε να καταστείλει ή να ενεργοποιήσει την γονιδιακή έκφραση [117]. Ένα γονίδιο το οποίο είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη E2-2 ρυθμίζει προς τα πάνω είναι το *ZEB1* το οποίο έχει βρεθεί, όπως θα αναφέρουμε στη συνέχεια, να έχει μεταλλαχθεί σε ορισμένες περιπτώσεις FECD με καθυστερημένη έναρξη. Δεδομένου ότι το *TCF4* εμπλέκεται στη ρύθμιση του *ZEB1* και ότι οι βιολογικές λειτουργίες των δύο γονιδίων είναι παρόμοιες, έχει προταθεί ότι ίσως οι μεταλλάξεις ενεργούν εντός του ίδιου μονοπατιού, γεγονός που οδηγεί σε υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης της FECD [118].

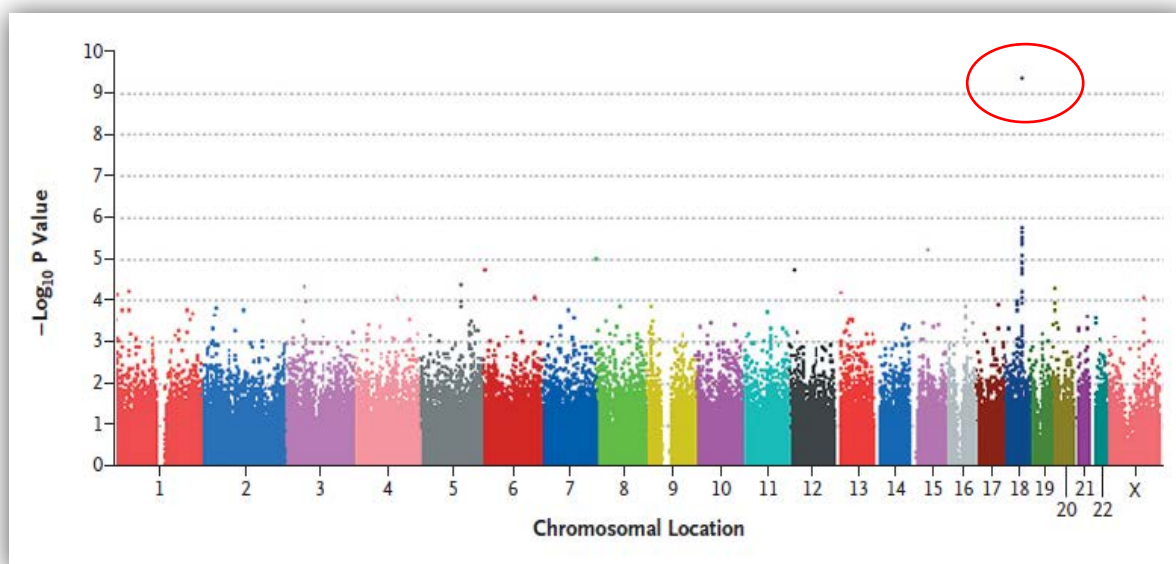


Εικόνα 4.1: Απεικόνιση του γενετικού τόπου 18q21.2 του γονιδίου *TCF4*. (<http://ghr.nlm.nih.gov>).

Το *TCF4* έχει μια πολύπλοκη γονιδιακή οργάνωση με 34 εξόνια που παράγουν ισομορφές ειδικές για ιστούς που ρυθμίζουν τόσο θετικές όσο και αρνητικές εκφράσεις γονιδίων. Η ισόμορφη *TCF4* πλήρους μήκους που περιέχει 671 αμινοξέα έχει μία αμινοτελική περιοχή ενεργοποίησης μεταγραφής (activation domain AD1), ακολουθούμενη από ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal NLS), ένα δεύτερο τομέα μεταγραφικής ενεργοποίησης (AD2) και μια καρβοξυλοτελική περιοχή βασικής έλικας-θηλιάς-έλικας που μεσολαβεί στο διμερισμό και στη δέσμευση του E-box. Εναλλακτικό μάτισμα στο 5-άκρο οδηγεί σε πρωτεΐνες *TCF4* με 18 διαφορετικά N-άκρα. Όλες οι ισομορφές έχουν περιοχές AD2 και bHLH αλλά μπορεί να λείπει η περιοχή AD1 και / ή NLS [119].

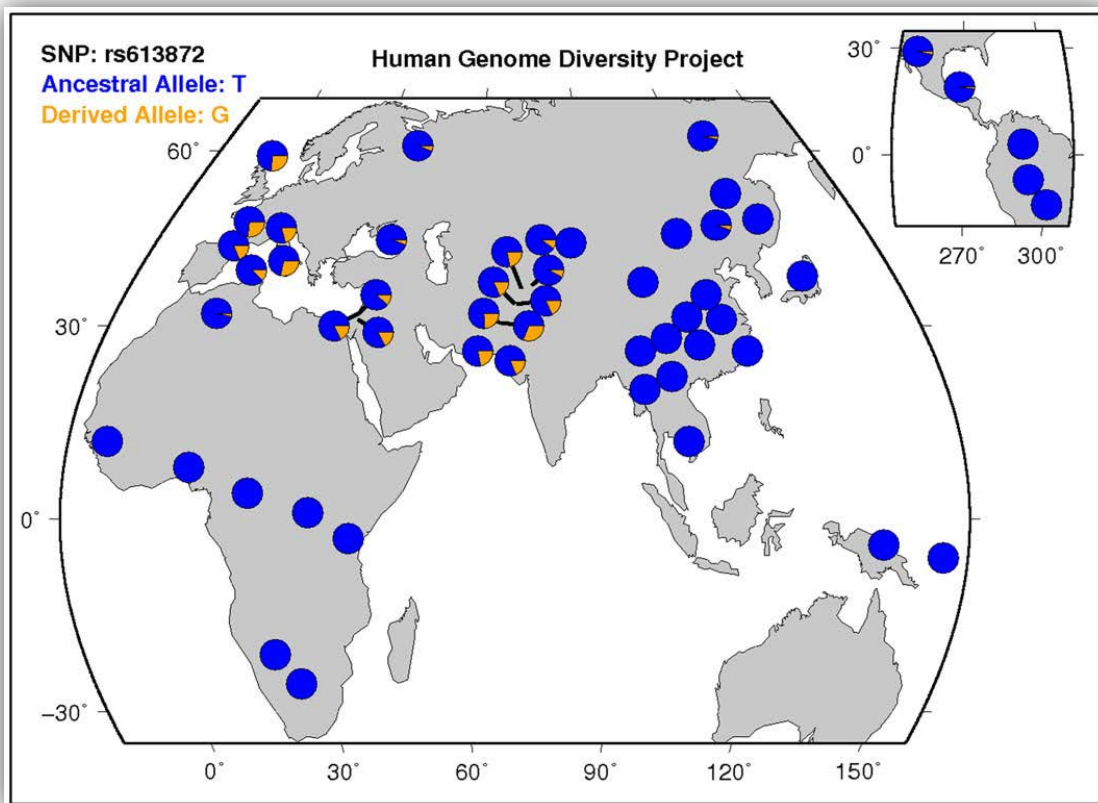
Οι μεταβολές σε αυτό το γονίδιο περιεγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Baratz et al., το 2010. Αυτή η ομάδα εξέτασε ασθενείς με FECD χωρίς οικογενειακό ιστορικό της νόσου. Αξιολογήθηκαν το εύρος της σοβαρότητας της νόσου, καθώς και η ηλικία και το φύλο. Οι μελέτες σύνδεσης γονιδιώματος διεξήχθησαν για να εντοπιστούν οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNP) που συσχετίστηκαν με FECD και αρκετές βρέθηκαν να βρίσκονται στο ιντρονικό τμήματα του *TCF4* γονιδίου. Οι μεμονωμένοι απλότυποι που συσχετίστηκαν περισσότερο με το FECD είχαν επικράτηση από 11% έως 17% μεταξύ των υποκειμένων και από 1% έως 4% μεταξύ των ατόμων ελέγχου υποδηλώνοντας ότι οι ασυνήθεις απλότυποι είχαν μεγάλη επίδραση στον κίνδυνο ανάπτυξης του FECD. Η ομάδα χρησιμοποίησε τέσσερα

SNPs που συνδέονταν ανεξάρτητα με το FECD σε όλη την περιοχή *TCF4* για την κατασκευή ενός μοντέλου κινδύνου με διαγνωστική ακρίβεια 76-78%. Ο επιπολασμός των περιγραφόμενων απλοτύπων κινδύνου είναι χαμηλός, αλλά η παρουσία αυτών των απλοτύπων προσδίδει υψηλό κίνδυνο FECD. Αν και η ανάλυση απλοτύπου σε ολόκληρη την περιοχή *TCF4* αποκάλυψε ότι τέσσερα SNP συνδέονταν ανεξάρτητα με το FECD, σημειώθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ ενός ιντρονικού SNP (rs613872) στο *TCF4* (εικόνα 4.2) και FECD και στις δύο ομάδες ανίχνευσης και επικύρωσης [116].



Εικόνα 4.2: Σύνδεση μεταξύ 338.727 SNPs και *TCF4*. Αναφέρεται η ισχύς της συσχέτισης μεταξύ μεμονωμένων SNPs και FECD στο γονιδίωμα. Η συσχέτιση επιτυγχάνει γενωμική σημασία σε μία περιοχή στο χρωμόσωμα 18 που εκτείνεται στον τόπο που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα 4 (*TCF4*) [116].

Η ομάδα υποθέτει ότι οι μεταβολές των ιντρονίων οδηγούν σε μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης παρά στην πλήρη απώλεια της λειτουργίας, η οποία είναι γνωστό ότι έχει ως αποτέλεσμα το Pitt-Hopkins syndrome (PTHS) [114]. Το rs613872 θεωρείται ένας ρυθμιστικός τόπος και όχι μια παραλλαγή κωδικοποίησης [120]. Επιπλέον βρίσκεται εντός της θέσης δέσμευσης δύο παραγόντων μεταγραφής, των *Ini1* (*SMARCB1*) και *BRG1* (*SMARCA4*) οι οποίοι αποτελούν συστατικά του συμπλέγματος αναδιαμόρφωσης χρωματίνης SWI / SNF και εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση [121]. Τα ευρήματα επικυρώθηκαν και από τις μελέτες των Li et al. (2011) και Kuot et.al (2012), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η παρουσία των ίδιων SNPs παρείχε 2,5-4 φορές τον κίνδυνο ανάπτυξης FECD από ότι για τους μη φορείς. Συζητούν επίσης ότι αυτή η αλληλόμορφη παραλλαγή είναι ουσιαστικά ανύπαρκτη στους πληθυσμούς της Αφρικής, της Ανατολικής Ασίας και της Νότιας Αμερικής, αλλά είναι πιο διαδεδομένη στους πληθυσμούς της Ευρώπης, της Μέσης Ανατολής και της Νότιας Ασίας (εικόνα 4.3) [118,122-125]. Στον πίνακα 4.1 που ακολουθεί συνοψίζονται μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για το rs61387 [126].



Εικόνα 4.3: Παγκόσμια κατανομή *TCF4* μεταλλαγμένου G αλληλίου [118].

Πίνακας 4.1: Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για το SNPs rs61387 [126].

First Author (year)	Country	Ethnicity	Study design	Genotyping method	Case/Control
Baratz (2010)	USA	Caucasian	GWAS	Taqman assay	130/260
Baratz (2010)	USA	Caucasian	GWAS	Taqman assay	150/150
Li (2011) [23]	USA	Caucasian	Case-control	Taqman assay	450/340
Riazuddin (2011)	USA	Caucasian	Case-control	Taqman assay	170/180
Igo (2012)	USA	Caucasian	Case-control	Taqman assay	531/204
Kuot (2012)	Australia	Caucasian	Case-control	MassArray	103/275
Stamler (2013)	USA	Caucasian	Case-control	Taqman assay	82/163
Nanda (2014)	India	Asian	Case-control	PCR-sequencing	44/108
Li (2014)	USA	Caucasian	Case-control	Taqman assay	529/494
Mootha (2014)	USA	Caucasian	Case-control	Taqman assay	120/100
Wieben (2014)	USA	Caucasian	Case-control	PCR-sequencing	68/16

Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι υπήρξε μια ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού *TCF4* rs613872 και του κίνδυνου ανάπτυξης FECD σε όλα τα γενετικά μοντέλα που εξετάστηκαν πίνακας 4.2: (αλληλόμορφο G έναντι T αλληλόμορφο: OR=4,19, 95% CI = 3,53-4,97, GG έναντι GT / TT: OR = 4,27, 95% CI = 2,54-7,19. GG / GT έναντι

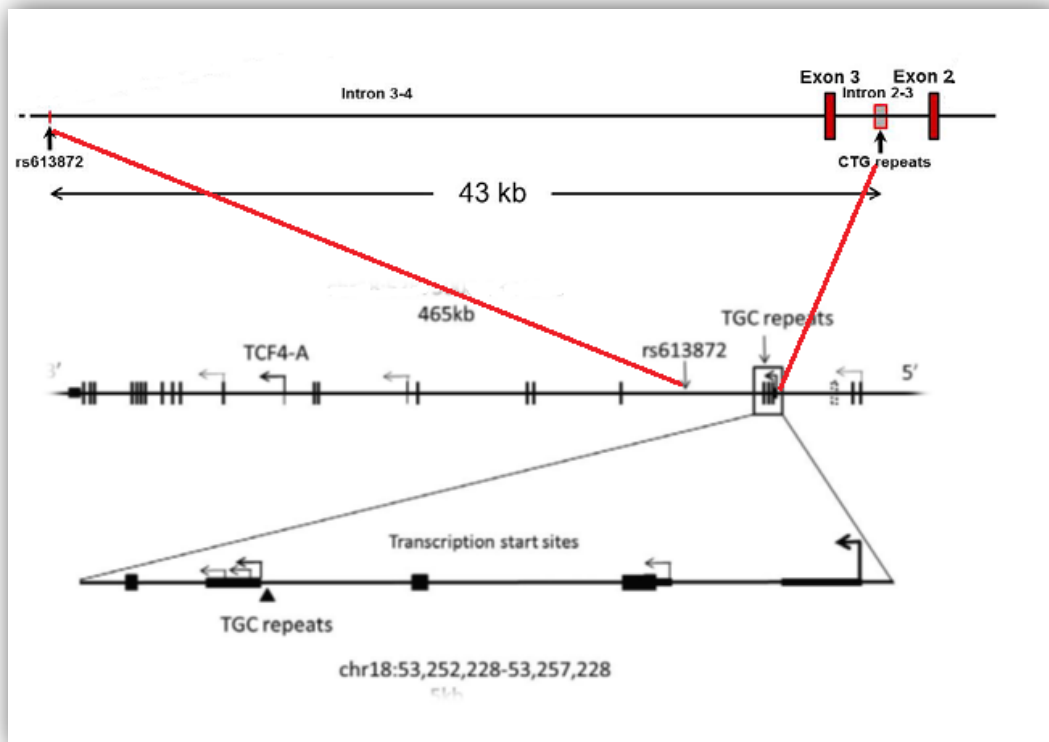
TT: OR = 6,29, 95% CI = 4,23-8,93, GG έναντι TT: OR = 10,64, 95% CI = 5,28-21,41, GT έναντι TT: OR = 6,08, 95% CI = 4.28-8.64) [126].

Πίνακας 4.2: Αποτελέσματα μεταanalύσης για το SNPs rs61387 και κίνδυνος ανάπτυξης FECD [126].

Πολυμορφισμός (συγκρίση)	Αριθμός μελετών	OR (95%CI)	p-value
rs613872			
G vs. T	10	4,19(3,53–4,97)	<0,001
GG vs. GT/TT	6	4,27(2,54–7,19)	<0,001
GG/GT vs. TT	7	6,29(4,23–8,93)	<0,001
GG vs. TT	6	10,64(5,28–21,41)	<0,001
GT vs. TT	6	6,08 (4,28–8,64)	<0,001

Ωστόσο, καθώς το αλληλόμορφο κινδύνου του rs613872 δεν συσχετίστηκε με το φαινότυπο της νόσου σε καμία από τις τρεις οικογένειες που είχαν προηγουμένως χαρτογραφηθεί στον τόπο FCD2, οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η γενετική βάση του FCD2 είναι ανεξάρτητη από το rs613872. Επιπλέον, δεν εντοπίζεται κανένα σπάνιο αλληλόμορφο στις περιοχές κωδικοποίησης του *TCF4* [127].

Ίσως πιο ενδιαφέροντα είναι η μελέτη από τους Wieben et al., οι οποίοι επίσης εξέτασαν το γονίδιο E2-2 στην FECD, αλλά από διαφορετική οπτική γωνία. Μία προηγούμενη μελέτη βρήκε μία ασταθή τριπλή νουκλεοτιδική επανάληψη στο τρίτο ιντρόνιο του *TCF4* σε περίπου 3% του Ευρωπαϊκού πληθυσμού [128]. Τα δεδομένα από τους Wieben et al., δείχνουν ότι αυτή η επέκταση της ιντρονικής τρινουκλεοτιδικής επανάληψης κυτοσίνης-θυμίνης-γουανίνης (CTG)- (CTG18.1) εντός του γονιδίου *TCF4* μπορεί να έχει περισσότερες από 40 επαναλήψεις ενώ απέχει από το rs613872, 43 kb (εικόνα 4.3). Συνολικά, η μελέτη δείχνει ότι η παρουσία > 40 TCG επαναλήψεων στο ιντρόνιο 2 του γονιδίου *TCF4* έχει ευαισθησία 79% και εξειδίκευση 96% για την FECD. Αυτή η επέκταση των τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων (trinucleotide repeat TNR) πιστεύεται ότι αποτελεί έναν σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για τη διαταραχή αφού προσδίδει πάνω από 30 φορές αύξηση του κινδύνου για ανάπτυξη FECD στους Καυκάσιους [24]. Η ύπαρξη της συγκεκριμένης TNR διαπιστώθηκε σε 15 από 29 γενεαλογικά δέντρα Καυκάσιων με FECD με πλήρη διεισδυτικότητα και το στοιχείο αυτό υποστηρίζει την επέκταση της τριπλής επανάληψης ως πιθανή γενετική FECD παραλλαγή [129]. Οι μελετητές έχουν αρχίσει να εξετάζουν μήπως η FECD είναι μία ασθένεια επέκτασης τρινουκλεοτιδίων που σχετίζεται με μη κωδικοποιητικές επαναλήψεις τρινουκλεοτιδίων, παρόμοιες με αυτές της αταξίας του Friedreich, της μυοτονικής δυστροφίας τύπου 1 και του συνδρόμου του εύθραυστου X [117,130].



Εικόνα 4.3: Δομή της περιοχής του *TCF4* γονιδίου στο χρωμόσωμα 18. Εμφανίζεται περιοχή 465 kb. Τα εξόνια του γονιδίου *TCF4* παρουσιάζονται ως κάθετες γραμμές. Η μεταγραφή αυτού του γονιδίου προχωρά από δεξιά προς τα αριστερά. Οι κύριες θέσεις μεταγραφής που ξεκινούν μέσα σε αυτό γονίδιο απεικονίζονται με κυρτά βέλη. Η θέση της περιοχής που δεν έχει συλληφθεί δείχνεται από ένα διακεκομμένο κουτί κοντά στο 5'-άκρο του γονιδίου. Μια εκτεταμένη προβολή της δομής του γονιδίου *TCF4* σε άμεση γειτνίαση με τον TNR παρουσιάζεται κάτω από το διάγραμμα της δομής του γονιδίου. Υπάρχουν τουλάχιστον πέντε θέσεις έναρξης μεταγραφής σε αυτή τη μικρή περιοχή. Οι μη κωδικοποιούσες περιοχές εμφανίζονται ως λεπτά ορθογώνια, ενώ τα εξόνια κωδικοποίησης εμφανίζονται ως ευρύτερα ορθογώνια. Η θέση των επαναλήψεων TGC εμφανίζεται με κεφαλή βέλους [131].

Οι επακόλουθες γενετικές μελέτες αποδεικνύουν ότι η επέκταση της επανάληψης *TCF4* CTG18.1 είναι η κύρια αιτιακή παραλλαγή μεταξύ ομάδων διαφορετικών εθνοτήτων. Σε μια κινεζική κοόρτη της Σιγκαπούρης, η επέκταση στον τόπο CTG18.1 ήταν η μόνη παραλλαγή που προσδιορίστηκε στο γονίδιο *TCF4* σε ασθενείς με FECD υποδηλώνοντας ότι το αναπτυγμένο αλληλόμορφο CTG18.1 ήταν η πρωτογενής και πιθανώς η μοναδική αιτιώδης παραλλαγή σε αυτόν τον γονιδιακό τόπο στον κινεζικό πληθυσμό [132]. Η γενετική ανάλυση FECD ασθενών από την Ινδία βρήκε επίσης μια εξαιρετικά σημαντική σύνδεση αλληλομόρφων CTG18.1 με FECD και μια δευτερεύουσα συσχέτιση με τον πολυμορφισμό απλού νουκλεοτιδίου rs17089887. Η μελέτη διαπίστωσε ότι το κατώτατο όριο της νόσου των 40 επαναλήψεων τρινουκλεοτιδίων εμφανίζεται στο 34% των ασθενών με FECD και στο 5% των ατόμων ελέγχου [133]. Αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι η επέκταση του CTG18.1 είναι πιθανόν να αποτελεί την πιο σημαντική παγκόσμια αιτία της FECD [134-137]. Επιπλέον, η βαρύτητα της νόσου βρέθηκε να είναι μεγαλύτερη σε περιπτώσεις FECD με επέκταση τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων CTG18.1 σε σύγκριση με εκείνες χωρίς επέκταση. Το

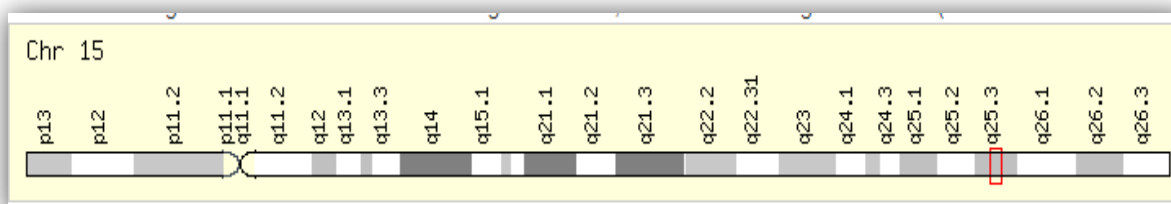
μήκος της επανάληψης τριπλού CTG επίσης συσχετίζεται θετικά με την κλίμακα κατά Krachmer. Έτσι, η παρουσία και το μήκος της TNR στο *TCF4* φαίνεται να έχουν προγνωστικές και κλινικές επιπτώσεις στην νόσο [129].

Παρόλο που όπως αναφέρθηκε η TNR στο *TCF4* παίζει βασικό ρόλο στην ανάπτυξη της FECD, ο μοριακός μηχανισμός της ασθένειας δεν έχει καθοριστεί πλήρως. Έχουν προταθεί πολλοί μηχανισμοί όπως ότι το αλληλόμορφο με την επέκταση θα μπορούσε να παρεμβαίνει στην έναρξη της μεταγραφής και / ή στο μάτισμα του TCF4 στα ενδοθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς και να μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασης των ειδικών TCF4 ισομορφών με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία τους. Πιο πρόσφατες μελέτες δείχνουν τη συσσωμάτωση RNA και την τοξικότητα ως βάση για το θάνατο των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα συσσωρευόμενα μεταγραφόμενα RNA των εκτεταμένων επαναλήψεων μπορούν να διαμορφώσουν σταθερές δομές φουρκέτας που δεσμεύουν και απομονώνουν τις RNA αλληλοεπιδρώσες πρωτεΐνες. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς από ασθενείς με FECD, όπως κύτταρα από ασθενείς με μυτοκινική δυστροφία τύπου 1 (ασθένεια TNR), συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες (CUG) n RNA σε εστίες εντός του πυρήνα. Οι εστίες RNA και η εξάντληση των πρωτεϊνών που δεσμεύονται με RNA ενεργοποιούν την ανώμαλη συρραφή και τελικά διεγείρουν την απόπτωση. Έχει παρατηρηθεί ότι οι πυρηνικές εστίες RNA δεν ανιχνεύθηκαν σε κύτταρα από ασθενείς με FECD που δεν είχαν την επανάληψη επέκτασης επισημαίνοντας τον κεντρικό ρόλο που παίζουν οι πυρηνικές εστίες RNA του CUG στην παθογένεση του FECD με την επέκταση τριπλού επαναλήψεως CTG18.1 στο *TCF4* [138-140]. Η παθογένεση της FECD σε ασθενείς μπορεί να σχετίζεται με την έκθεση του ενδοθηλίου του κερατοειδούς σε ένα περιβάλλον που υπόκειται σε υψηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες. Το οξειδωτικό στρες, όπως ήδη έχουμε αναφέρει εμπλέκεται στην παθογένεση του FECD και η περιοχή των πλούσιων σε γουανίνη επαναλήψεων μπορεί να κάνει αυτό το γονίδιο ιδιαίτερα δεκτικό στις συνέπειες της οξειδωτικής βλάβης και να διαταράξει τη λειτουργία του.

4.1.2 ATP/GTP/Binding Protein Like 1 (AGBL1)

Μια πρόσθετη αιτιώδης μετάλλαξη που οδηγεί στην FECD με καθυστερημένη έναρξη αναγνωρίστηκε πρόσφατα στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 15q 25.3 (εικόνα 4.4), στη θέση του γονιδίου της πρωτεΐνης ATP/GTP/Binding Protein Like 1 (AGBL1). Η AGBL1 κωδικοποιεί μία ισομορφή της κυτοσολικής καρβοξυπεπτιδάσης 4 (CCP4), μιας μεταλλοκαρβοξυπεπτιδάσης που μεσολαβεί στην απογλουταμίνωση των πρωτεϊνών στόχων. Τα ένζυμα CCP καταλύουν τη νευρογλουταμυλίωση, που είναι μια αναστρέψιμη τροποποίηση των μεταφραστικών πρωτεϊνών η οποία παράγει γλουταμικές πλευρικές αλυσίδες στη τομπουλίνη και σε άλλες πρωτεΐνες, μια διαδικασία που έχει αποδειχθεί ότι

είναι απαραίτητη για την επιβίωση των νευρώνων και ότι η έλλειψη ενός τέτοιου ελέγχου οδηγεί σε νευροεκφυλισμό [56].



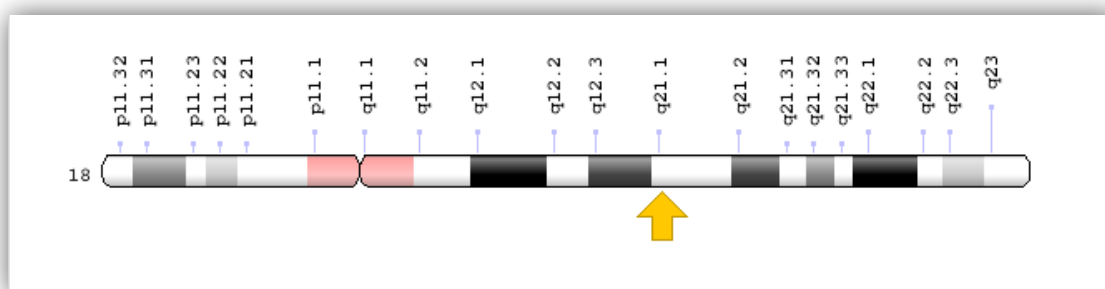
Εικόνα 4.4: Απεικόνιση του γενετικού τόπου 15q25.3 του γονιδίου AGBL1 (<http://ghr.nlm.nih.gov>).

Κατά την μελέτη 3 γενεών σε μία μεγάλη οικογένεια, εξετάστηκαν συνολικά 16 άτομα από τα οποία τα 12 (9 ♀ και 3 ♂), πληρούσαν τα φαινοτυπικά κριτήρια για τη διάγνωση της FECD. Στα 8 από τα νοσούντα άτομα ανιχνεύθηκε μία ετερόζυγη μη νοσηματική μετάλλαξη στη θέση (15q25.3). Στη μετάλλαξη αυτή έχουμε μια μετάπτωση 3082C >T στο γονίδιο, με αποτέλεσμα την αντικατάσταση της αργινίνης και τη δημιουργία κωδικόνιου τερματισμού arg1028-to-ter (R1028X). Κατά τη διερεύνηση αυτού του ευρήματος με αλληλούχιση νέας γενιάς, βρέθηκαν 3 άτομα με επιπλέον παρανοσηματική μετάλλαξη με μετάπτωση c.2969G >C στο γονίδιο, καταλήγοντας σε αντικατάσταση cys990-προς-ser (C990S).

Στη συνέχεια διερευνήθηκε ο ρόλος της AGBL1 και βρέθηκε ότι αλληλοεπιδρά βιοχημικά με την σχετιζόμενη με την FECD πρωτεΐνη TCF4. Τέλος η λειτουργική ανάλυση έδειξε σημαντική αύξηση της AGBL1 με το μεταλλαγμένο R1028X σε σύγκριση με το φυσιολογικό αλληλίο. Ενώ έδειξε σχετική ελάττωση της AGBL1 με το μεταλλαγμένο C990S σε σύγκριση με το φυσιολογικό αλληλίο. Όμως και οι δύο αυτές μεταλλάξεις μειώνουν σημαντικά την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη TCF4, υποδηλώνοντας ότι η αφαίρεση αυτής της αλληλεπίδρασης μπορεί να συμβάλλει στην παθογένεια της FECD. Φυσικά απαιτείται περαιτέρω μελέτη για να προσδιοριστεί εάν οι AGBL1 μεταλλάξεις που έχουν ταυτοποιηθεί σε ασθενείς με FECD έχουν επίσης ως αποτέλεσμα την υπεργλουταμίνωση των μικροσωληναρίων και αν παίζουν κάποιο ρόλο στην επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς [141].

4.1.3 Lipoxygenase homology domain-containing 1 (LOXHD1)

Το lipoxygenase homology domain-containing 1 (*LOXHD1*) γονίδιο που περιέχει ομολογία με λιποξυγενάση κωδικοποιεί μία εξαιρετικά διατηρημένη πρωτεΐνη αποτελούμενη εξ ολοκλήρου από πολυκυτίνη / λιποξυγενάση / άλφα-τοξίνη (PLAT), που πιστεύεται ότι διευκολύνουν τη στόχευση πρωτεϊνών στην πλασματική μεμβράνη. Η θέση του είναι στο χρωμόσωμα 18q21.1 (εικόνα 4.5) και η δυσλειτουργία του είναι γνωστό ότι προκαλεί προοδευτική απώλεια ακοής [55].



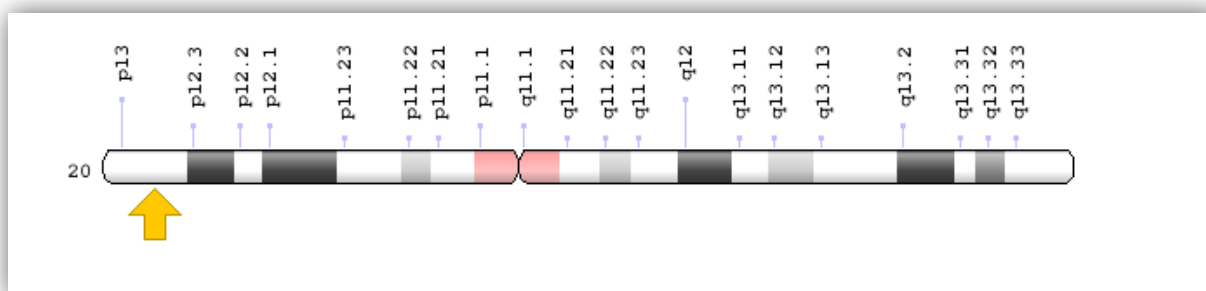
Εικόνα4.5: Απεικόνιση του γενετικού τόπου 18q21.1 του γονιδίου *LOXHD1* (<http://ghr.nlm.nih.gov>).

Οι μεταλλάξεις *LOXHD1* που ανιχνεύθηκαν σε ασθενείς με FECD (τουλάχιστον 15) οδηγούν σε υπερβολική έκφραση στον κερατοειδή χιτώνα. Υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης οδηγούν στο σχηματισμό συσσωματωμάτων τα οποία έχουν υποθεθεί ότι είναι κυτταροτοξικά, οδηγώντας σε απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων και πιθανόν είναι η αιτία που προκαλεί την FECD. Ο προσδιορισμός της σύνθεσης αυτών των συσσωματωμάτων μπορεί να αποκαλύψει σημαντικές ενδείξεις σχετικά με τον παθολογικό μηχανισμό. Επιπλέον, το *LOXHD1* φαίνεται να εκφράζεται σε χαμηλή αφθονία στον κερατοειδή χιτώνα, ενώ τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών στα κύτταρα προκάλεσαν σχηματισμό συσσωματωμάτων, επιδεινωμένα περαιτέρω από την παρουσία μεταλλάξεων. Αυτά τα αποτελέσματα αυξάνουν το ενδεχόμενο οι αυξημένες συγκεντρώσεις *LOXHD1* να έχουν μακροχρόνιες κυτταροτοξικές επιδράσεις [142]. Ακόμα τρισδιάστατη ανακατασκευή της πρωτεΐνης *LOXHD1* προέβλεψε ότι οι περισσότερες μεταλλάξεις εδρεύουν στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, πιθανώς επηρεάζοντας την αλληλεπίδραση της με άλλες πρωτεΐνες [56].

4.1.4 Solute carrier family 4, sodium borate transporter, member 1 (SLC4A11)

Το γονίδιο *SLC4A11* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 20p12 (εικόνα 4.6) και κωδικοποιεί μεμβρανική πρωτεΐνη 891 αμινοξέων, που αναφέρεται ως sodium-borate cotransporter 1 συν-μεταφορέα συζευγμένο με βορικό νάτριο που είναι απαραίτητος για την ομοιοστασία βορικού οξέος, την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των

κυττάρων. Εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο ενδοθήλιο του κερατοειδούς και αποτρέπει σοβαρές μορφολογικές μεταβολές του κερατοειδούς που προκαλούνται από αυξημένες συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου στο στρώμα. Πρόσφατα προτάθηκε ότι το SLC4A11 είναι επίσης ένας συν-μεταφορέας $\text{NH}_3 / 2\text{H}^+$ που παρουσιάζει μοναδικά χαρακτηριστικά [143]. Είναι γνωστό ότι οι μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου έχουν συσχετιστεί με τρεις δυστροφίες του κερατοειδούς, CHED2, δυστροφία του κερατοειδούς με αισθητήρια κώφωση CDPD και FECD. Μετά την ταυτοποίηση SLC4A11 μεταλλάξεων σε άτομα με CHED2, η Vithana και οι συνεργάτες της εξέτασαν το γονίδιο *SLC4A11* σε 89 άτομα με σποραδικό και οικογενειακό FECD, προσδιορίζοντας 4 άτομα με μεταλλάξεις (3 παρανοηματικές και 1 μετατόπιση πλαισίου) [144]. Σε επόμενη μελέτη 192 ατόμων με σποραδικό FECD προσδιορίστηκαν 7 επιπλέον ετερόζυγες μεταλλάξεις στο SLC4A11 που θεωρήθηκαν αιτιολογικές της νόσου [145].

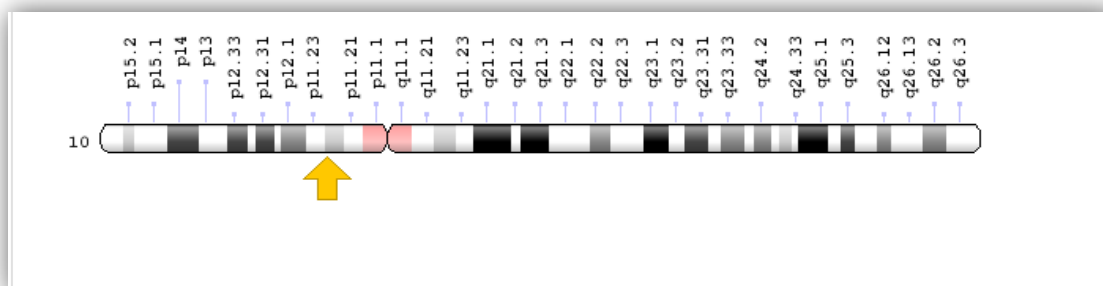


Εικόνα 4.6: Απεικόνιση του γενετικού τόπου 20p12 του γονιδίου *SLC4A11* (<http://ghr.nlm.nih.gov>).

Η ταυτοποίηση του SLC4A11 ως υποψήφιο γονίδιο για συγγενή κληρονομική ενδοθηλιακή δυστροφία η οποία παρουσιάζει παρόμοια ενδοθηλιακά ελαττώματα του κερατοειδούς όπως η FECD και η μειωμένη έκφραση mRNA του SLC4A11 στο ενδοθήλιο των περιπτώσεων FECD πρότειναν ότι αυτό το γονίδιο μπορεί επίσης να εμπλέκεται στην παθογένεση του FECD. Μια σειρά ετερόζυγων μεταλλάξεων του γονιδίου SLC4A11 σχετίζονται με καθυστερημένη έναρξη FECD και οι μεταλλάξεις αυτές δημιουργούν πρωτεΐνη SLC4A11 χαρακτηριζόμενη από κατακράτηση στο ενδοπλασματικό δίκτυο ως αποτέλεσμα της εσφαλμένης αναδίπλωσης. Αυτές οι μεταλλάξεις SLC4A11, όταν εκφράστηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες, είχαν ελαττώματα είτε στην έκφραση της κυτταρικής επιφάνειας είτε στη λειτουργική δραστηριότητα της αντλίας. Οι μεταλλάξεις SLC4A11 συνεισφέρουν στο 11% σποραδικού FECD (5/45) με καθυστερημένη έναρξη σε ομάδα που μελετήθηκε [146].

4.1.5 ZEB1

Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα δακτύλων ψευδαργύρου τύπου E-Box, το οποίο είναι γνωστό και ως TCF8 και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10p11.22 (εικόνα 4.7). Άλλοτε ενεργεί ως ενισχυτής άλλοτε ως καταστολέας. Η κωδικοποιημένη πρωτεΐνη παίζει πιθανώς ρόλο στη μεταγραφική καταστολή της ιντερλευκίνης 2 (IL 2). Καταστέλλει τον υποκινητή της E-Cadherin και επάγει την επιθηλιακή μεσεγχυματική μετάπτωση (EMT) με την πρόσληψη SMARCA4 / BRG1. Ρυθμίζει θετικά τη διαφοροποίηση των νευρώνων, μεσολαβεί στην εναπόθεση κολλαγόνου I, [120] ενώ προάγει την ογκογονικότητα με την καταστολή των ανασταλτικών stem-cells microRNAs [147].



Εικόνα 4.7: Απεικόνιση του γενετικού τόπου 10p11.22 του γονιδίου ZEB1 (<http://ghr.nlm.nih.gov>).

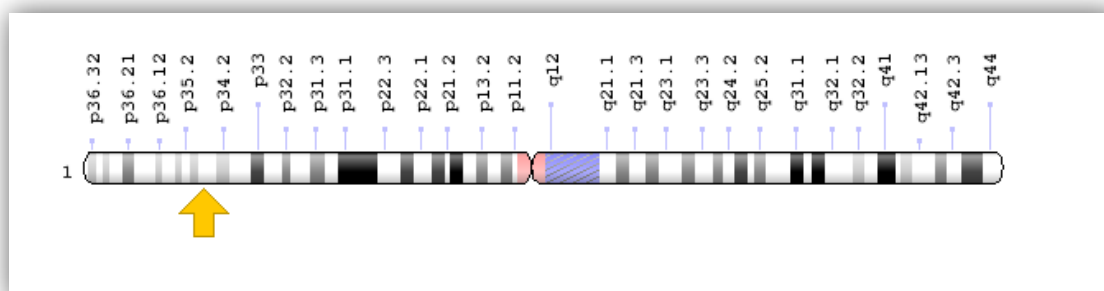
Αναγνωρίστηκε αρχικά ως ένα από τα αιτιώδη γονίδια για την PPCD3, η οποία όπως και η FECD επηρεάζει κυρίως το οπίσθιο τμήμα του κερατοειδούς [148]. Στη συνέχεια μεταλλάξεις του ZEB1 βρέθηκαν να συνδέονται με FECD όταν Mehta et al. εξέτασε 74 μη συγγενικά άτομα, κινέζικης καταγωγής τα οποία είχαν FECD (8 κληρονομικές και 66 σποραδικές περιπτώσεις). Μια νέα μετάλλαξη, p.N696S, ήταν παρούσα μόνο σε μία από τις περιπτώσεις του FECD και δεν υπήρχε σε καμία από τις άλλες περιπτώσεις του FECD ή στα 93 άτομα ελέγχου [149]. Μία δεύτερη μετάλλαξη p.Q840P αποκαλύφθηκε στο ZEB1 από τους Riazuddin et al. σε μια μεγάλη οικογένεια της οποίας η ασθένεια συνδέεται επίσης με τον τόπο FCD4. Τέσσερις επιπλέον παθογόνες ZEB1 μεταλλάξεις (p.N78T, p.P649A, p.Q810P και p.A905T) του ταυτοποιήθηκαν σε 384 μη συγγενικά FECD άτομα με ανάλυση αλληλουχίας σε εξονικές περιοχές του TCF8 [150]. Από αυτές τις πέντε μεταλλάξεις, τρεις εμφανίστηκαν σε θέσεις που διατηρούνται εξαιρετικά εξελικτικά στα σπονδυλωτά (p.Q810P, p.Q840P, και p.A905T) και δύο σε μέτρια διατηρημένες θέσεις. Σε αντίθεση με τις μεταλλάξεις του ZEB1, που σχετίζονται με το PPCD3, οι οποίες είναι μεταλλάξεις πλαισίου μετατόπισης, μη νοηματικές ή μεταλλάξεις αρχικών κωδικονίων και είναι περισσότερο επιβλαβείς [151]. Σημαντικό εύρημα στη μελέτη των Riazuddin et al, αποτελεί η παρατήρηση πως πέντε προσβεβλημένα άτομα είναι ετερόζυγα τόσο για τη μετάλλαξη

p.Q840P όσο και για τον απλότυπο της νόσου σε 9p22.1-p24.1 έχουν σοβαρό φαινότυπο FECD (τροποποιημένη κλίμακα κατά Krachmer 6 και στους δύο οφθαλμούς) και έχουν υποβληθεί σε μεταμοσχεύσεις κερατοειδούς αμφοτερόπλευρα. Τίθεται ο προβληματισμός εάν η μετάλλαξη p.Q840P αλληλοεπιδρά με αιτιώδη μετάλλαξη FCD4 για τη ρύθμιση της σοβαρότητας της νόσου. Η κατανόηση της μοριακής βάσης μιας τέτοιας αλληλεπίδρασης θα είναι σημαντική από την άποψη του μηχανισμού της FECD [150].

4.1.6 Collagen type VIII alpha 2 chain (COL8A2) gene

Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την άλφα 2 αλυσίδα του κολλαγόνου τύπου VIII και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1p34.3 (εικόνα 4.8). Για να κατασκευαστεί το κολλαγόνο τύπου VIII αλληλοεπιδρούν οι δύο ισομορφές του $\alpha 1$ και $\alpha 2$ [152;153]. Η μία υπομονάδα της άλφα 2 (VIII) πρωτεΐνης του κολλαγόνου αλληλοεπιδρά με δύο υπομονάδες άλλης πρωτεΐνης που ονομάζεται κολλαγόνο άλφα 1 (VIII). Αυτές οι τρεις πρωτεΐνες συσπειρώνονται μαζί για να σχηματίσουν ένα μόριο γνωστό ως προκολλαγόνο. Τα μόρια προκολλαγόνου εκκρίνονται από το κύτταρο και υφίστανται επεξεργασία με ένζυμα για την απομάκρυνση επιπλέον τμημάτων πρωτεϊνών από τα άκρα. Αμέσως μετά την επεξεργασία αυτά τα μόρια, οργανώνονται σε μακριές, λεπτές δέσμες ώριμου κολλαγόνου τύπου VIII και δημιουργούν το ιδιαίτερα διατεταγμένο και τρισδιάστατο πλέγμα του κολλαγόνου. Το κολλαγόνο VIII συντίθεται, υποβάλλεται σε επεξεργασία και εκκρίνεται από ενδοθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς και είναι η κύρια πρωτεΐνη της DM [154]. Το κολλαγόνο τύπου VIII συμβάλλει στη συναρμολόγηση και τη δομική ακεραιότητα της εξαγωνικής μήτρας που χρησιμεύει για την υποστήριξη του ενδοθελίου. Επιπλέον, οι μελέτες δείχνουν ότι το κολλαγόνο VIII συμβάλλει επίσης στη διαφοροποίηση των κυττάρων και παίζει ρόλο στον προσδιορισμό του κυτταρικού φαινοτύπου [155]. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονίσουμε ότι το χαρακτηριστικό γνώριμα όλων των κολλαγόνων είναι η τριπλή έλικα που σχηματίζεται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες που εμφανίζουν το αμινοξύ γλυκίνη σε κάθε τρίτη θέση (Gly-X-Y triple helix domain). Η παρουσία αυτών των γλυκινών είναι απαραίτητη για το σχηματισμό της τριπλής έλικας του κολλαγόνου. Αντικατάσταση της γλυκίνης από ένα άλλο αμινοξύ, αλλοιώνει τη δομή της έλικας και ελαττώνει τη σταθερότητά της. Οι θέσεις X και Y στις τριάδες των επαναλήψεων Gly-X-Y καταλαμβάνονται από αμινοξέα που ποικίλουν. Μελέτες πεπτιδίων-μοντέλων αποκάλυψαν ότι η δομή της τριπλής έλικας στο κολλαγόνο των θηλαστικών σταθεροποιείται κυρίως από την 4-υδροξυπρολίνη και την αργινίνη στη θέση Y και από την προλίνη στη θέση X. Οι περιοχές με μη σταθεροποιητικά αμινοξέα στις θέσεις X και Y είναι λιγότερο σταθερές, πιο εύκαμπτες και επιρρεπείς στη διάσπαση από πρωτεάσες. Στην COL8A2 πρωτεΐνη η triple helix domain περιοχή εκτείνεται από το αμινοξύ

77 έως το αμινοξύ 536, και είναι η περιοχή όπου έχουν ανευρεθεί οι περισσότερες μεταλλάξεις [156].



Εικόνα 4.8: Απεικόνιση του γενετικού τόπου 1p34.3 του γονιδίου COL8A2 (<http://ghr.nlm.nih.gov>).

Η πρώτη ανάλυση σύνδεσης σε μια οικογένεια με αυτοσωμική κυρίαρχη μορφή πρώιμης έναρξης FECD δημοσιεύθηκε από Biswas et al. το 2001. Οι ερευνητές ταυτοποίησαν ένα διάστημα 6-7 cM στο χρωμόσωμα 1p34.3-p32 και επέλεξαν το COL8A2 από τα γονίδια που αντιστοιχούσαν σε αυτό το συνδεδεμένο διάστημα ως λειτουργικό υποψήφιο γονίδιο καθώς είναι ένα σημαντικό συστατικό της DM [154, 156]. Ανακαλύφθηκε μία μοναδική παρανοηματική μετάλλαξη στη θέση 1364 της κωδικοποιούσας αλληλουχίας του γονιδίου α2 κολλαγόνου VIII (COL8A2). Αυτή η αλλαγή νουκλεοτιδίου έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση γλουταμίνης από λυσίνη (Q455K) στην τριπλή ελικοειδή περιοχή (triple helix domain) του κολλαγόνου της πρωτεΐνης COL8A2. Αυτή η μετάλλαξη ήταν ο πρώτος χαρακτηρισμός της μοριακής βάσης οποιασδήποτε ενδοθηλιακής δυστροφίας του κερατοειδούς και η πρώτη παθογόνος παραλλαγή του COL8A2 σε ανθρώπους [156].

Μια δεύτερη αυτοσωματική κυρίαρχη μετάλλαξη COL8A2 σε οικογένειες με πρώιμη έναρξη FECD αποκαλύφθηκε το 2005 [157]. Αυτή η μετατόπιση, που βρίσκεται επίσης στην τριπλή ελικοειδή περιοχή του κολλαγόνου της πρωτεΐνης COL8A2, αντικαθιστά τη λευκίνη με τρυπτοφάνη στο αμινοξύ 450 (L450W). Εναποτίθεται μια περίσσεια τόσο των α1 όσο και των α2 πρωτεϊνών κολλαγόνου VIII, αυξάνοντας το πάχος της πρόσθιας ζώνης DM περισσότερο από τρεις φορές από αυτό που βρέθηκε σε φυσιολογικό DM [157]. Η αύξηση της πρωτεΐνης COL8A2 συνοδεύεται από αυξημένα επίπεδα κολλαγόνου IV, φιμπρονεκτίνης και λαμινίνης που συμβάλλουν στην αύξηση του πάχους της μεμβράνης [54,157-160].

Μια τρίτη ετερόζυγη μετάλλαξη, με αποτέλεσμα την αντικατάσταση γλουταμίνης από βαλίνη στο αμινοξύ 455 (Q455V), βρέθηκε σε ασθενείς με κορεατικά γενεαλογικά ευρήματα με FECD και όχι σε φυσιολογικά άτομα. Η αντικατάσταση μιας πολικής γλουταμίνης με μια μη πολική βαλίνη είναι δυνατόν να διαταράξει την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών COL8A2 και COL8A1 στην εξαγωνική δομή του πλέγματος της DM [161].

Οι ασθενείς με αυτές τις μεταλλάξεις αναπτύσσουν συχνά σοβαρά συμπτώματα από τη στιγμή που είναι νεαροί ενήλικες. Οι μεταλλάξεις αυτές επηρεάζουν την τριπλή ελικοειδή δομή του κολλαγόνου VIII που μπορεί να μεταβάλει σημαντικά την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης, διακόπτοντας το πλέγμα κολλαγόνου στη DM. Επιπλέον, ο τύπος κολλαγόνου VIII έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στην τελική κυτταρική διαφοροποίηση του αγγειακού ενδοθηλίου και μια ανώμαλη βασική μεμβράνη μπορεί να εξασθενήσει την τελική διαφοροποίηση του ενδοθηλίου του κερατοειδούς [55]. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί δεν παρουσιάζουν καμιά συσχέτιση αυτών των μεταλλάξεων με την FECD όψιμης έναρξης [162-164].

Μια ομάδα ερευνητών δημιούργησε και ανέλυσε διαγονιδιακά ποντίκια που έφεραν τη μετάλλαξη Col8a2 Q455K. Σε ηλικία 5 και 10 μηνών, τα μεταλλαγμένα ποντίκια άρχισαν να εμφανίζουν χαρακτηριστικά FECD τα οποία ήταν όμοια με αυτά των ανθρώπων. Εμφάνισαν μεταβολές στο μέγεθος των ενδοθηλιακών κυττάρων, απόκλιση αυτών από το κανονικό εξαγωνικό σχήμα τους, μείωση του αριθμού τους και παρουσία guttae στη DM. Σε ανάλυση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (ultrastructural) αποκαλύφθηκε η παρουσία εξαιρετικά διασταλμένου ενδοπλασματικού δικτύου (ER), δείχνοντας την ενεργοποίηση του στρες του ER και την απόκριση μη αναδιπλωμένης πρωτεΐνης (UPR). Περαιτέρω βιοχημικές μελέτες επιβεβαίωσαν την UPR ενεργοποίηση και την απόπτωση στο μεταλλαγμένο ενδοθήλιο του κερατοειδούς. Το συμπέρασμα ήταν ότι η μετάλλαξη Q455K στο COL8A2 προκαλεί FECD μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την αυξημένη ενεργοποίηση UPR και την απόπτωση που προκαλείται εξαιτίας αυτής [165-167].

Τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν και σε μελέτη με διαγονιδιακά ποντίκια που έφεραν τη μετάλλαξη Col8a2 L450W [168]. Τα ποντίκια αυτά εμφάνισαν έναν πιο ήπιο ενδοθηλιακό φαινότυπο κερατοειδούς από εκείνον των ομοζυγωτικών ποντικών Q455K, αλλά παρουσίαζαν τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της FECD. Και οι δύο μεταλλάξεις εμφάνισαν εκτεταμένο τραχύ ER και αυξημένη ρύθμιση των γονιδίων και πρωτεϊνών της οδού UPR. Τέλος τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κερατοειδών από τα μεταλλαγμένα ποντίκια L450W και Q455K εμφάνισαν αυξημένη ρύθμιση της DNA damage-regulated autophagy modulator protein 1 (DRAM1), μιας πρωτεΐνης της λυσοσωμικής μεμβράνης που απαιτείται για την επαγωγή της αυτοφαγίας. Στις μελέτες αυτές υπάρχουν ευρήματα που υποδεικνύουν ότι η αλλοίωση της αυτοφαγίας συμβάλλει στην παθογένεση της FECD πρώιμης έναρξης [167,168].

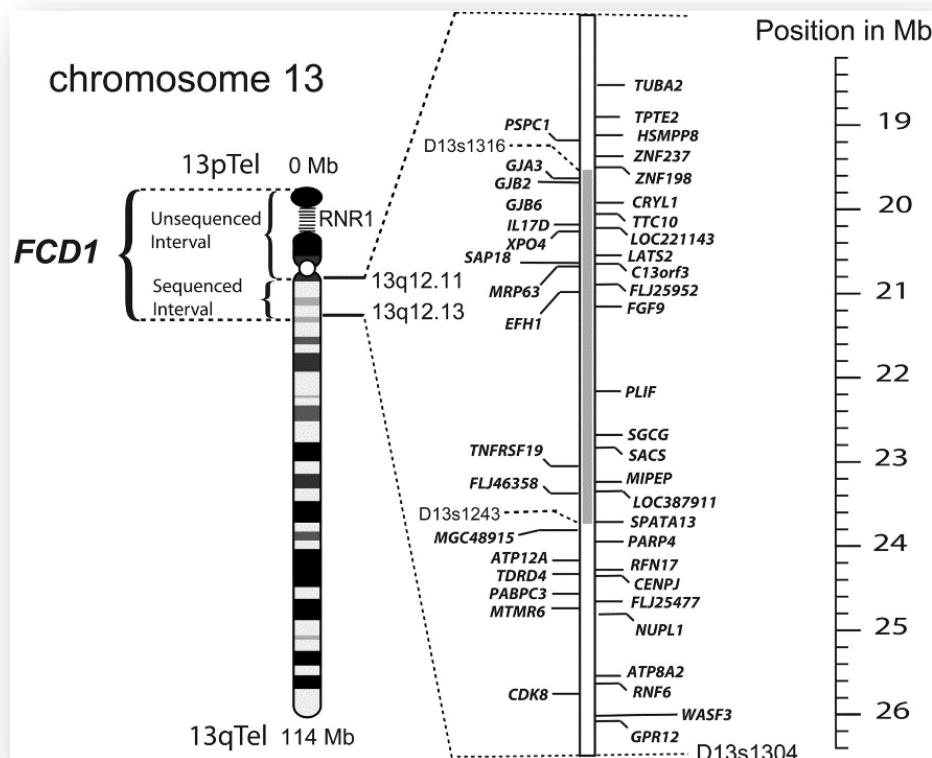
4.2 Γενετικοί τύποι της FECD

Η FECD με καθυστερημένη έναρξη φαίνεται να έχει αυτοσωματική-κυρίαρχη μετάδοση με ατελή διεισδυτικότητα, αν και μόνο το 50% των περιπτώσεων παρουσιάζει

οικογενή συνάθροιση. Υπάρχουν μεγάλα γενεαλογικά δέντρα που αποδεικνύουν αυτό τον τρόπο μετάδοσης αν και τα συγκεκριμένα γονίδια δεν έχουν διασαφηνιστεί πλήρως [55].

4.2.1 FCD1 (FECD-2 OMIM)

Ο πρώτος γενετικός τόπος για την FECD όψιμης έναρξης χαρτογραφήθηκε από τους Sundin et al. στο χρωμόσωμα 13 σε ένα διάστημα 26,4-Mb μεταξύ 13pTel και 13q12.13, και ονομάστηκε FCD1 (εικόνα 4.9) [169]. Η ομάδα μελέτης ήταν ένα μεγάλο γενεαλογικό δένδρο 4 γενεών στο οποίο υπήρχαν 13 προσβεβλημένα άτομα Ευρωπαϊκής καταγωγής και 3 μη προσβεβλημένα. Τηρήθηκε η αναμενόμενη αναλογία φύλου 2:1 με περισσότερα θηλυκά άτομα να εμφανίζουν τη νόσο. Αξιοσημείωτο είναι ότι δύο παιδιά, των οποίων οι γονείς και οι δύο είχαν επηρεαστεί, έδειξαν κλινικά συμπτώματα FECD όψιμης έναρξης σε νεαρή ηλικία (ένα κορίτσι ηλικίας 13 ετών με βαθμό κλίμακας κατά Krachmer 1 και ένα αγόρι ηλικίας 10 ετών, με βαθμό κλίμακας κατά Krachmer 2). Ο FCD1 ακολούθησε ένα τυπικό αυτοσωματικό κυρίαρχο πρότυπο κληρονομικότητας [170]. Οι ασθενείς μελετήθηκαν για 34 μήνες και βρέθηκε πρόοδος της ασθένειας που συνδέεται με FCD1. Ο αριθμός των guttae σε κάθε κερατοειδή παρουσίασε αύξηση κατά μέσο όρο 29%, εμφανίζοντας μια εκθετική αύξηση με την πάροδο του χρόνου, ενώ σημαντική ήταν και η αύξηση της πυκνότητας των guttae στο κατώτερο τεταρτημόριο του κερατοειδούς [166].

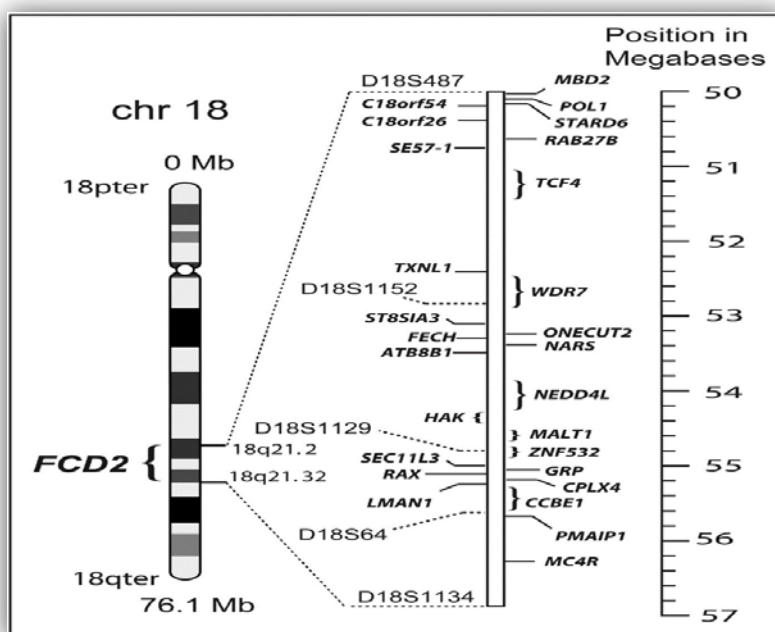


Εικόνα 4.9: Γονίδια στο διάστημα της ασθένειας FCD1 [169].

Διερευνήθηκαν τα γονίδια εντός του βραχίονα της αλληλουχίας q του 13q12.11-13q12.13, (υπάρχουν περισσότερα από 40 γνωστά γονίδια), αλλά κανένα δεν φαίνεται να είναι σημαντικό συστατικό του κερατοειδούς ή της DM. Πιθανές δυσκολίες στην ταυτοποίηση της μετάλλαξης FCD1 είναι ο κυρίαρχος χαρακτήρας της και ο ήπιος φαινότυπος με καθυστερημένη έναρξη. Επιπροσθέτως, η μετάλλαξη θα μπορούσε να είναι σε μια μη κωδικοποιούσα περιοχή η οποία να προκαλεί μέτρια μεταβολή στα επίπεδα mRNA, ενώ άλλη πιθανότητα είναι ότι η μετάλλαξη FCD1 θα μπορούσε να είναι μια διαγραφή γονιδίου, που δεν ανιχνεύεται εύκολα από συμβατική εξέταση εξονίου [12].

4.2.2 FCD2 (FECD-3 OMIM)

Ο δεύτερος γενετικός τύπος για την FECD όψιμης έναρξης χαρτογραφήθηκε πάλι από τους Sundin et al. στο χρωμόσωμα 18 μεταξύ 18q21.2-18q21.32 (εικόνα 4.10), χρησιμοποιώντας ανάλυση σύνδεσης τριών μεγάλων οικογενειών που παρουσίασαν αυτοσωμική κυρίαρχη κληρονομικότητα της FECD όψιμης έναρξης και ονομάστηκε (FCD2). Η ανάλυση σύνδεσης διεξήχθη σε 43 προσβεβλημένα και 33 μη προσβεβλημένα άτομα. Και σε αυτή τη μελέτη οι προσβεβλημένες γυναίκες ήταν περισσότερες από τους άνδρες (27 :19). Ωστόσο, ο απλότυπος που συνδέεται με τη νόσο ήταν διαφορετικός σε κάθε οικογένεια, ενώ το 10% των ατόμων με τον απλότυπο της νόσου δεν επηρεάστηκε κλινικά, υποδηλώνοντας την ετερογένεια αυτού του τύπου και πιθανά έναν σύνθετο τρόπο κληρονομικότητας που σχετίζεται με αυτόν [169].



Εικόνα 4.10: Γονίδια στο διάστημα της ασθένειας FCD2 [170].

Το FCD2 ήταν ο πρώτος τύπος που εντοπίστηκε σε περισσότερες από μία οικογενειακές περιπτώσεις FCD, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή ύπαρξη κοινού τύπου για FCD στο χρωμόσωμα 18. Αν και αυτή η περιοχή του χρωμοσώματος 18 (18q21) είναι ο πιο κοινός τύπος που έχει βρεθεί μέχρι σήμερα και καλύπτει 28 γονίδια τα οποία βρίσκονται υπό έρευνα, η συγκεκριμένη μετάλλαξη που προκαλεί τον φαινότυπο FCD2 παραμένει άγνωστη. Η πορεία της νόσου σε σχέση με την FCD1 φαίνεται να είναι διαφορετική, αφού δείχνει να εξελίσσεται πιο αργά και παρόλο που η κατανομή των guttae είναι παρόμοια παρουσιάζουν ετήσιο ποσοστό αύξησης μόνο 5% [166].

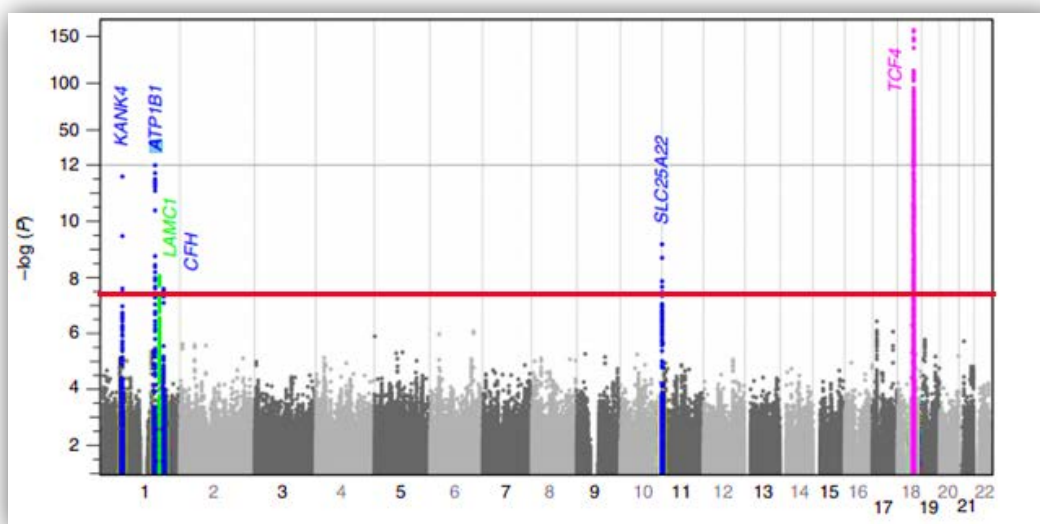
4.2.3 FCD3 (FECD-5 OMIM)

Πιο πρόσφατα, ο τύπος FCD3 εντοπίστηκε σε μία μεγάλη οικογένεια. Καμία από τις γνωστές θέσεις FCD1, FCD2 και COL8A2 ανιχνεύθηκαν σε οποιοδήποτε μέλος της οικογένειας αυτής και η γονιδιακή σάρωση παρήγαγε σύνδεση στο διάστημα 5q33.1-q35.2. Μελετήθηκαν 26 άτομα, από τα οποία δέκα άτομα διαγνώστηκαν με FECD, εκ των οποίων οκτώ ήταν γυναίκες και δύο άνδρες. Ο γενετικός αυτός τύπος εκτείνεται σε 97 γνωστά γονίδια και έχει έναν πιο ήπιο φαινότυπο από άποψη ηλικίας, έναρξης και ρυθμού εξέλιξης σε σύγκριση με τους τύπους FCD1 και FCD2 [171].

4.2.4 FCD4 (FCD-7 OMIM)

Ο τύπος FCD4 αναγνωρίστηκε από τους Riazuddin et al. στην περιοχή 9p22.1-9p24.1. Δεκαεπτά άτομα από γενεαλογικό δένδρο τεσσάρων γενεών μελετήθηκαν σε μια αρχική προσπάθεια εντοπισμού της νόσου. Σε ορισμένα από τα προσβεβλημένα άτομα εντοπίστηκαν αιτιακές μεταλλάξεις στο ZEB1, μεταλλάξεις οι οποίες είχαν προηγουμένως συνδεθεί με PPCD, ενώ ορισμένα άλλα διέθεταν τον απλότυπο FCD4. Είτε ο απλότυπος FCD4 είτε η μετάλλαξη ZEB1 ήταν επαρκής για να προκαλέσει έναν φαινότυπο ασθένειας και τα άτομα που κατείχαν τόσο τον αιτιώδη απλότυπο FCD4 όσο και το προκαλούμενο αλληλόμορφο ZEB1 εμφάνισαν πιο σοβαρή ασθένεια από τα άτομα με μόνο έναν παράγοντα, επιδεικνύοντας αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των δύο παθογόνων αλληλίων [150;172]. Σύμφωνα με τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι τώρα, το FCD1 συνδέεται με την πιο σοβαρή και ταχέως εξελισσόμενη μορφή της νόσου με άτομα που παρουσιάζουν ετήσια αύξηση κατά 24% στον αριθμό των guttae έναντι ετήσιας αύξησης κατά 5% για το FCD2. Το FCD3 προκαλεί την πιο ήπια μορφή της νόσου που εξελίσσεται πιο αργά από τις ασθένειες που συνδέονται με FCD1 και FCD2. Τέλος η συνάθροιση του σπάνιου, FCD4 απλότυπου στο χρωμόσωμα 9p με μεταλλάξεις στο ZEB1 έχει ως αποτέλεσμα σοβαρό FECD με κακή πρόγνωση.

Στην εικόνα που ακολουθεί (εικόνα 4.11) περιγράφεται μια πιο πρόσφατη μελέτη συσχέτισης με το γονιδίωμα (GWAS) Καυκάσιας καταγωγής, η οποία συνοδεύτηκε από μετά-ανάλυση για συνολικά 2.075 FECD περιπτώσεις και 3.342 υγιείς μάρτυρες. Βρέθηκαν τρεις νέες συσχετίσεις που ικανοποιούν το p -value $< 5 \times 10^{-8}$: KANK4 (KN motif- and ankyrin repeat domain-containing protein 4), rs79742895, LAMC1 (laminin gamma 1), rs3768617 και LINC00970 / ATP1B1 (Na⁺/ K⁺ transporting ATPase, beta-1 polypeptide), rs1200114. Οι πρωτεΐνες αυτές διαδραματίζουν ρόλο στο ενδοθήλιο του κερατοειδούς καθώς ρυθμίζουν τη μεταφορά υγρών (ATP1B1), διατηρούν το σωστό πάχος στη μεμβράνη DM (LAMC1) και τέλος διατηρούν την επαφή κυττάρου προς κύτταρο και την ακεραιότητα του ιστού (KANK4). Επίσης επαναβεβαιώνεται μια συντριπτική επίδραση του καθιερωμένου τύπου *TCF4* ($p = 10^{-200}$, OR 4,94, 95% C.I. 4,45-5,48). Είναι ενδιαφέρον ότι ανιχνεύτηκε σε αυτή τη μελέτη διαφορετική φυλετική συσχέτιση στο LAMC1 rs3768617 με μεγαλύτερο κίνδυνο στις γυναίκες [στις γυναίκες (OR 1,52, 95% C.I. 1,32,-1,72) σε σχέση με τους άνδρες (OR 1,16, 95% C.I. 0,98,- 1,34)] και *TCF4* rs784257 με μεγαλύτερο κίνδυνο για τους άνδρες [στους άνδρες (OR 7,56, 95% C.I. 5,96-9,57) σε σχέση με τις γυναίκες (OR 5,06, 95% C.I. 4,29-5,96)] [173].



Εικόνα 4.11: Αποτελέσματα από GWAS για FECD. Η κόκκινη οριζόντια γραμμή σηματοδοτεί το κατώφλι στατιστικής σημαντικότητας ($5 \cdot 10^{-8}$) του γονιδιώματος και οι κάθετες γκριζες γραμμές τα όρια των χρωμοσωμάτων [173].

Στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 4.3), παρουσιάζονται συνοπτικά οι γενετικοί τόποι και τα γονίδια στην FECD. Είναι φανερό ότι η νόσος καθορίζεται από παραλλαγές σε πολλά γονίδια, για τα οποία είναι άγνωστο εάν δρουν σε συνέργεια ή είναι ανεξάρτητα [120].

Πίνακας 4.3: Γονίδια και γενετικοί τόποι για FECD.

Φαινότυπος FECD	OMIM* Φαινοτύπου	Γενετικοί τόποι FECD	Χρωμόσωμα	Αναγνωρισμένα γονίδια	OMIM Γονιδίου	Άλλες ασθένειες που προκαλούνται από μεταλλάξεις στα ίδια γονίδια	Βιβλιογραφία
FECD-1	136800		1p34.3	<i>COL8A2</i>	120252		[156]
FECD-2	610158	FCD1	13pTel– 13q12.13	Κανένα			[169]
FECD-3	613267	FCD2	18q21.2– 18q21.32	<i>TCF4</i> <i>LOXHD1</i>	602272 613072	Αυτοσωμική υπολειπόμενη αισθητική απώλεια ακοής	[127]
FECD-4	613268		20p13	<i>SLC4A11</i>	610206	Συγγενής κληρονομική ενδοθηλιακή δυστροφία και δυστροφία του κερατοειδούς με αισθητήρια κώφωση (Harboyan syndrome)	[144]
FECD-5	613269	FCD3	5q33.1– 5q35.2	Κανένα			[171]
FECD-6	613270		10p11.22	<i>ZEB1(TCF8)</i>	189909	Οπίσθια πολυμορφική δυστροφία του κερατοειδούς	[149]
FECD-7	613271	FCD4	9p22.1- 9p24.1				[150]
FECD-8	615523		15q25.3	<i>AGBL1</i>	615496		[141]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο : ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Το πρόβλημα στην εξεύρεση κατάλληλης ιατρικής θεραπείας είναι ότι η παθοφυσιολογία της FECD είναι μόνο εν μέρει κατανοητή. Οι μέθοδοι πρώιμης θεραπείας δεν είναι ειδικές για την FECD και συνήθως εφαρμόζονται θεραπείες για την ανακούφιση των συμπτωμάτων ανάλογα με το στάδιο της νόσου (πίνακας 5.1). Όταν η ιατρική διαχείριση δεν είναι πλέον επαρκής, η μεταμόσχευση κερατοειδούς γίνεται η μόνη διαθέσιμη επιλογή (εικόνα 5.1). Φυσικά μέσα από τη συνεχιζόμενη έρευνα για την επιδημιολογία, τη γενετική και την παθοφυσιολογία που διέπουν την FECD, επετεύχθησαν σημαντικοί ρυθμοί τον περασμένο αιώνα στην κατανόηση αυτής της ενδοθηλιακής δυστροφίας του κερατοειδούς. Αυτές οι ανακαλύψεις ανοίγουν το δρόμο για νέες οδούς παρακολούθησης της εξέλιξης της νόσου και της θεραπείας [174].



Εικόνα 5.1: Γυναίκα 53 ετών με Fuchs και στους δύο οφθαλμούς. Η εικόνα απεικονίζει Α. Αποκατάσταση της όρασης στον ένα οφθαλμό μετά από DSEK. Β. Η όραση όπως είναι στο μη χειρουργημένο οφθαλμό [175].

5.1 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η συμπτωματική θεραπεία εφαρμόζεται με σκοπό την μείωση του επιθηλιακού και του στρωματικού οιδήματος που έχει αναπτυχθεί στον κερατοειδή. Προσπαθούμε να προκαλέσουμε τεχνητή αύξηση της ωσμωτικότητας του δακρυϊκού φιλμ με υπερτονικά αλατούχα διαλύματα και αλοιφές [63]. Η κλινική εμπειρία δείχνει ότι με αυτό τον τρόπο μειώνεται το επιθηλιακό οίδημα. Για να μειωθεί το στρωματικό οίδημα, ο άνθρωπος κερατοειδής θα χρειαζόταν να έρθει σε επαφή με ένα υγρό τέτοιας υπερτονικότητας ώστε η θεραπεία θα γινόταν πολύ οδυνηρή και καταστροφική. Οι τοξικές επιδράσεις των

υπεροσμωτικών διαλυμάτων στην οφθαλμική επιφάνεια αυξάνονται σημαντικά αν χρησιμοποιείται χλωριούχο βενζαλκόνιο ως συντηρητικό [176].

Για περισσότερο από 40 χρόνια χρησιμοποιείται ένα διάλυμα χλωριούχου νατρίου 5%. Ακόμα συστήνεται και η χρήση στεγνωτήρα μαλλιών, κυρίως το πρωί όπου η όραση είναι χειρότερη, για τη διευκόλυνση της αφυδάτωσης του κερατοειδούς [112]. Η χρήση θεραπευτικών μαλακών φακών επαφής μπορεί να βοηθήσει στην ανακούφιση του πόνου από επαναλαμβανόμενες επιθηλιακές διαβρώσεις, μειώνοντας τον ακανόνιστο αστιγματισμό σε περιπτώσεις που έχουν προχωρήσει σε φυσαλιδώδη κερατοπάθεια. Οι ενδοοφθαλμικοί παράγοντες μείωσης της πίεσης, μπορεί να μειώσουν το οίδημα του κερατοειδούς σε ασθενείς με αυξημένη ή ακόμα και κανονική ενδοφθάλμια πίεση [58].

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.1: Θεραπεία της FECD ανά στάδιο.

ΣΤΑΔΙΑ	ΘΕΡΑΠΕΙΑ
Στάδιο I	Η θεραπεία δεν είναι απαραίτητη
Στάδιο II	Μπορούν να χρησιμοποιηθούν τοπικοί υπεροσμωτικοί παράγοντες (διάλυμα 5% NaCl) ή στεγνωτήρας μαλλιών για τη διευκόλυνση της αφυδάτωσης του κερατοειδούς
Στάδιο III	Μαλακοί φακοί επαφής με νερό μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανακούφιση του πόνου που προκαλείται από επαναλαμβανόμενες διαβρώσεις
Στάδιο IV	Χειρουργική αντιμετώπιση

5.2 ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Έχει παρέλθει περισσότερο από ένας αιώνας από την πραγματοποίηση της πρώτης επιτυχούς διαμπερούς κερατοπλαστικής από τον Dr. Eduard Zirm, το έτος 1905 [177], αλλά και περισσότερο από μια δεκαπενταετία από την πραγματοποίηση της πρώτης μεταμόσχευσης ενδοθηλίου κερατοειδούς από τον Dr. Gerrit Melles, το έτος 1999 [178]. Είναι κοινή διαπίστωση ότι η μεταμόσχευση κερατοειδούς έχει εξελιχθεί ραγδαία τα τελευταία 15 χρόνια (εικόνα 5.2). Η ανάπτυξη νέων τεχνικών τμηματικής μεταμόσχευσης κερατοειδούς έχει αποφέρει αποτελέσματα ισοδύναμα ή και ανώτερα από αυτά της διαμπερούς κερατοπλαστικής, αναφορικά με τη μετεγχειρητική οπτική οξύτητα, και μάλιστα με μειωμένο κίνδυνο επιπλοκών. Σαν αποτέλεσμα, η διαμπερής κερατοπλαστική, που αποτέλεσε την κυρίαρχη επέμβαση για την αντιμετώπιση της τύφλωσης λόγω θόλωσης του

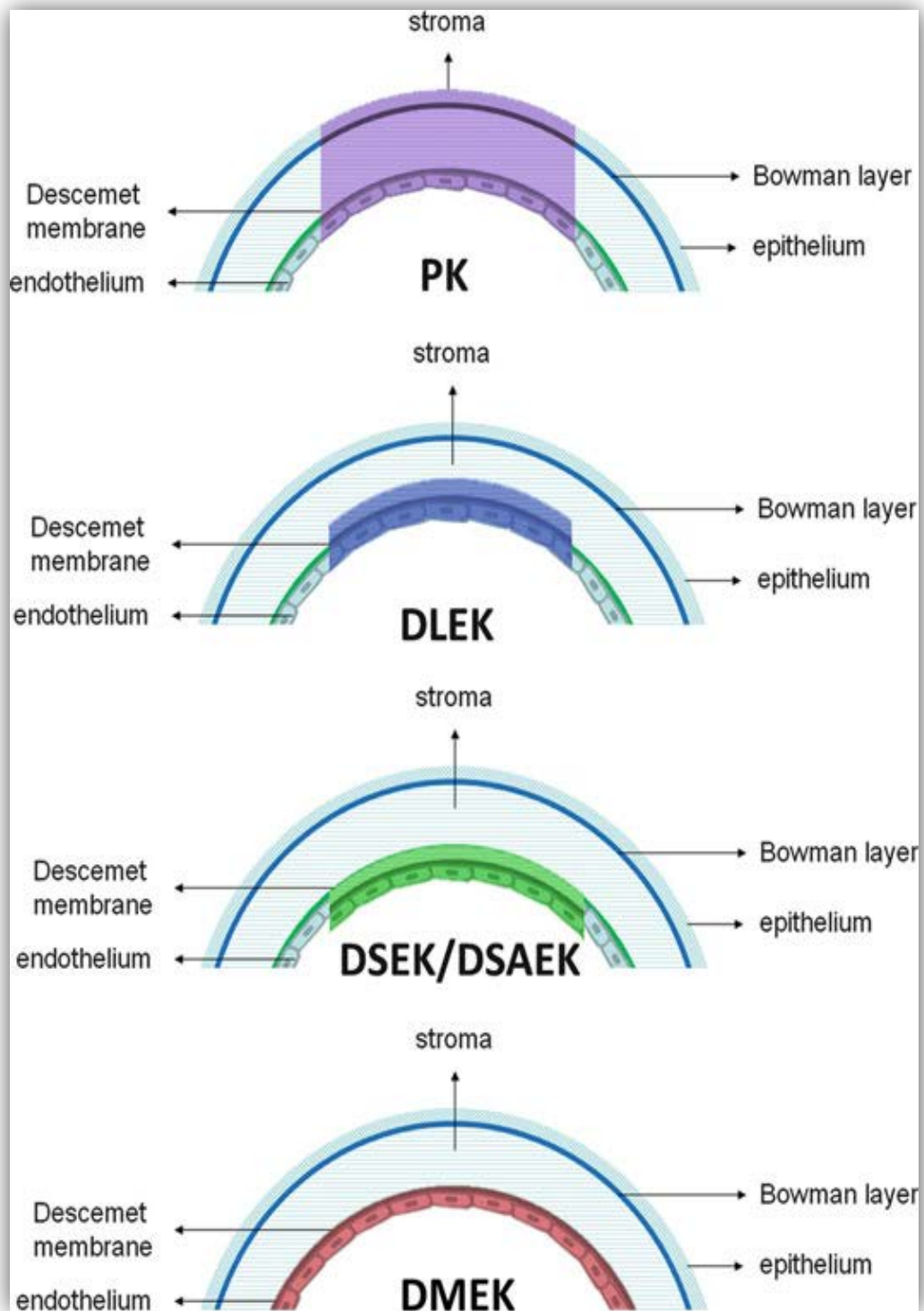
κερατοειδούς στην διάρκεια του προηγούμενου αιώνα, έχει παραχωρήσει σε σημαντικό ποσοστό – τουλάχιστον στα εξειδικευμένα κέντρα – τη θέση της στις τμηματικές μεταμοσχεύσεις, η λογική των οποίων έγκειται στην εκλεκτική αντικατάσταση μόνο εκείνων των στιβάδων του κερατοειδούς που πάσχουν [179]. Ιδιαίτερος στον τομέα των μεταμοσχεύσεων ενδοθηλίου έχει σημειωθεί εντυπωσιακή πρόοδος με αντίστοιχα αξιοσημείωτη στροφή και στην αντιμετώπιση των παθήσεων του ενδοθηλίου του κερατοειδούς [180].

Η επικράτηση των μεταμοσχεύσεων ενδοθηλίου και συγκεκριμένα της Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty και της Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty, εφόσον καταστούν τεχνικά πιο προσιτές, είναι πολύ πιθανό να συνεχιστεί και τα επόμενα χρόνια. Τέλος, η κυτταρική θεραπεία φαίνεται πως είναι το, ίσως όχι και τόσο μακρινό, μέλλον.

5.2.1 Διαμπερήs Κερατοπλαστική (Penetrating Keratoplasty – PK)

Για δεκαετίες η επέμβαση επιλογής ήταν η διαμπερήs κερατοπλαστική ή μεταμόσχευση κερατοειδούς ολικού πάχους, όπου αφαιρείται ολόκληρο το κεντρικό μέρος του πάσχοντος κερατοειδούς με ειδικά αυτοματοποιημένα τρυπάνια και αντικαθίσταται με το αντίστοιχο μέρος του μοσχεύματος. Στη συνέχεια γίνεται συρραφή του μοσχεύματος στον κερατοειδή του λήπτη με τη χρήση πολύ λεπτών ραμμάτων. Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1990, η PK ήταν η μόνη επιλογή θεραπείας για την FECD τελικού σταδίου με προοδευτικό οίδημα του κερατοειδούς, ουλές και σημαντική υποβάθμιση της οπτικής οξύτητας. Η επιτυχία της επέμβασης αυτής έχει γενικά αξιολογηθεί θετικά λόγω της μακράς επιβίωσης των μοσχευμάτων αλλά και λόγω των φτωχών αποτελεσμάτων μέχρι πριν από λίγο καιρό της εναλλακτικής μερικού πάχους κερατοπλαστικής (αργή αποκατάσταση της οπτικής οξύτητας, αυξημένες τεχνικές απαιτήσεις, και αυξημένος χρόνος της χειρουργικής επέμβασης).

Παρόλα αυτά οι επιπλοκές της επέμβασης PK (ανοσολογική απόρριψη μοσχεύματος, διαθλαστικά σφάλματα μετά την αφαίρεση ραμμάτων κ.α.), καθώς και η περιττή αντικατάσταση υγιούς πρόσθιου κερατοειδούς ιστού κατά τη θεραπεία ενδοθηλιακών διαταραχών του κερατοειδούς, όπως η FECD, οδήγησαν στην αναζήτηση νέων τεχνικών [181]. Λίγο πριν από την αλλαγή της χιλιετίας, ξεκίνησε ένα συναρπαστικό σπριντ στην ανάπτυξη τεχνικών ενδοθηλιακής κερατοπλαστικής. Κάθε βελτίωση της τεχνικής της ενδοθηλιακής κερατοπλαστικής ήταν μια διαδικασία λιγότερο επεμβατική, με λεπτότερα μοσχεύματα, καταστέλλοντας πολλές επιπλοκές που σχετίζονταν με την PK και αποκτώντας ένα απροσδόκητο επίπεδο κλινικής έκβασης που μόλις πριν από μια δεκαετία, δεν θα μπορούσε να θεωρηθεί πιθανό (εικόνα 5.2) [182-185].



Εικόνα 5.2: Σχηματικό διάγραμμα των ενδοθηλιακών κερατοπλαστικών τεχνικών [186].

5.2.3 Εν τω βάθει τμηματική ενδοθηλιακή κερατοπλαστική (Deep Lamellar Endothelial Keratoplasty – DLEK)

Ο Gerrit Melles και η ομάδα του έθεσαν τα θεμέλια της σύγχρονης μεταμόσχευσης ενδοθηλίου, το 1998 παρουσιάζοντας μία καινούρια χειρουργική τεχνική μεταμόσχευσης του οπίσθιου κερατοειδικού ιστού, αφήνοντας τον υπόλοιπο πρόσθιο κερατοειδή ανέπαφο, την οποία και ονόμασαν «οπίσθια τμηματική κερατοπλαστική» (posterior lamellar keratoplasty – PLK) [187]. Η ίδια ομάδα πραγματοποίησε την πρώτη μεταμόσχευση ενδοθηλίου με τη μέθοδο PLK σε έναν ασθενή με ψευδοφακική φυσαλιδώδη κερατοπάθεια, το 1999 [178]. Το έτος 2000, ο Mark Terry υιοθέτησε την τεχνική και την εφάρμοσε για πρώτη φορά στις ΗΠΑ, ενώ της έδωσε καινούριο όνομα: «εν τω βάθει τμηματική κερατοπλαστική ενδοθηλίου» (deep lamellar endothelial keratoplasty – DLEK) [188].

Η τεχνική αυτή αποσκοπεί στην αποκατάσταση του παθολογικού ενδοθηλίου μαζί με την δεσκεμετείο μεμβράνη, διατηρώντας τις πρόσθιες στοιβάδες του κερατοειδούς. Το μόσχευμα (ενδοθήλιο, μεμβράνη Descemet, και ένα τμήμα στρώματος) διαμέτρου 8,00 mm, διπλώνεται έτσι ώστε να μπορεί να εισέλθει στον πρόσθιο θάλαμο διαμέσου της 5,00 mm τομής. Μια μικρή 3 mm (πλάτος) φυσαλίδα αέρα αφήνεται έτσι ώστε να βοηθήσει στην σταθεροποίηση του μοσχεύματος την πρώτη μετεγχειρητική ημέρα. Απαιτείται τοποθέτηση ασθενούς σε ύπτια θέση τις πρώτες ώρες [189].

Τα πλεονεκτήματα είναι σαφή: φυσιολογική τοπογραφία κερατοειδούς, γρηγορότερη επούλωση της τομής, γρηγορότερη αποκατάσταση της οπτικής οξύτητας, σταθερότερη τεκτονική δομή του κερατοειδούς. Αναμφίβολα, στα αρχικά στάδια εκμάθησης υπάρχει μια σχετική δυσκολία, λόγω των λεπτεπίλεπτων χειρισμών προς αποφυγή τραυματισμού του μοσχεύματος (ενδοθηλίου) και ασφαλή τοποθέτησή του στον πρόσθιο θάλαμο [188].

5.2.4 Κερατοπλαστική ενδοθηλίου με απογύμνωση της δεσκεμετείου (Descemet Stripping/Automated Endothelial Keratoplasty - DSEK/DSAEK)

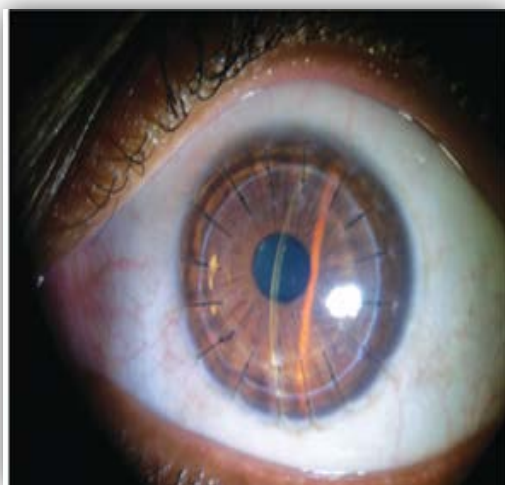
Στα επόμενα έτη, 2002 – 2004, ο Melles τροποποίησε και βελτίωσε την τεχνική του [189], [190], και το έτος 2005, οι Mark Gorovoy και Francis Price παρουσίασαν την εξέλιξη της DLEK, την «κερατοπλαστική ενδοθηλίου με απογύμνωση της δεσκεμετείου» (descemet's stripping with endothelial keratoplasty – DSEK). Το έτος 2006, ο Gorovoy εξέλιξε την τεχνική της DSEK χρησιμοποιώντας αυτόματο μικροκερατόμο για την παρασκευή του μοσχεύματος και έτσι προέκυψε η «κερατοπλαστική ενδοθηλίου με αυτοματοποιημένη απογύμνωση της δεσκεμετείου» (descemet's stripping automated endothelial keratoplasty – DSAEK) (εικόνα 5.3) [191].

Στις τεχνικές αυτές έχουμε την επιλεκτική απομάκρυνση ("απογύμνωση") της δεσκεμετείου μεμβράνης και του ενδοθηλίου του πάσχοντος κερατοειδούς. Αυτό το βήμα είναι γνωστό ως δεσκεμετόρηξη (descemetorhexis). Στη συνέχεια έχουμε την τοποθέτηση

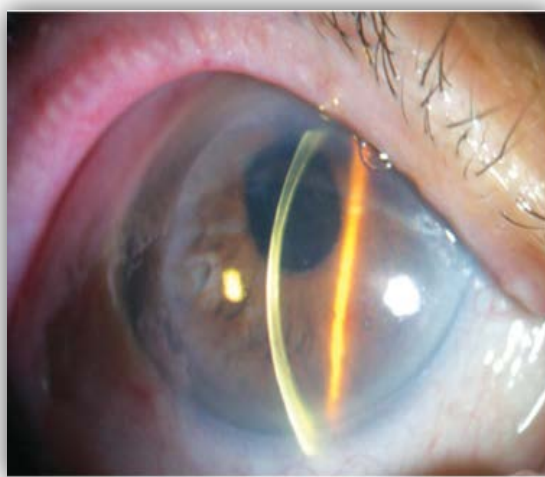
ενός μοσχεύματος στο οπίσθιο στρώμα, παρόμοιο με αυτό που χρησιμοποιείται στο PLK / DLEK. Η διευκόλυνση της παρασκευής του ιστού του δότη με τη χρήση μικροκερατόμου επέτρεψε στις τράπεζες οφθαλμών να παρασκευάζουν άριστης ποιότητας μόσχευμα, το οποίο καθιστούσε αυτή την τεχνική ενδοθηλιακής κερατοπλαστικής γρήγορα προσβάσιμη παγκοσμίως.

Οι νέες αυτές τεχνικές μείωσαν τις επιπλοκές που σχετίζονται με την PK (εικόνα 5.3). Πρώτον μειώθηκε σημαντικά ο κίνδυνος ενδοχειρουργικής αιμορραγίας και λοιμώξεων. Δεύτερον εξαλείφθηκαν οι επιπλοκές εξαιτίας της χρήσης ραμμάτων, ενώ το ανέπαφο πρόσθιο τμήμα του κερατοειδούς εκμηδένισε τα απρόβλεπτα μετεγχειρητικά διαθλαστικά σφάλματα. Τρίτον η έλλειψη μεγάλης διεισδυτικής πληγής μείωσε την απονεύρωση του κερατοειδούς και τέλος ελαχιστοποιήθηκε ο κίνδυνος απόρριψης μοσχεύματος. Αλλά όπου υπάρχει φως υπάρχουν και σκιές. Έτσι τα μειονεκτήματα των τεχνικών DSEK / DSAEK είναι ότι η παρασκευή ιστού δότη αποτελεί μια δαπανηρή τεχνική και η οπτική οξύτητα μπορεί να ποικίλει και να παραμένει μειωμένη παρά την τεχνικά επιτυχημένη χειρουργική επέμβαση λόγω ανωμαλιών πάχους του οπίσθιου στρώματος του δότη ή της θολερότητας του στρωματικού περιβάλλοντος που προκαλεί οπτικές εκτροπές [192].

A.



B.



Εικόνα 5.3: A. Εικόνα ένα μήνα μετά από PK B. Εικόνα DSAEK [184].

5.2.5 Κερατοπλαστική δεσκεμετείου μεμβράνης – ενδοθηλίου (Descemet's membrane endothelial keratoplasty – DMEK)

Το 2006, οι Melles και συνεργάτες εισήγαγαν επίσης την επόμενη βελτίωση της ενδοθηλιακής κερατοπλαστικής η οποία εξάλειψε πλήρως το οπίσθιο στρώμα από το μόσχευμα δότη και επέτρεψε μεταμόσχευση απομονωμένου τμήματος της μεμβράνης του ενδοθηλίου και της Descemet. Η τεχνική αυτή ονομάστηκε Κερατοπλαστική δεσκεμετείου μεμβράνης – ενδοθηλίου (Descemet's membrane endothelial keratoplasty – DMEK) [193]. Επομένως, το DMEK είναι η μόνη τεχνική που προσπαθεί να διατηρήσει πλήρως την ανατομία του κερατοειδούς του λήπτη με αποτέλεσμα να έχουμε άριστα οπτικά αποτελέσματα [194]. Έκτοτε έχουν πραγματοποιηθεί διάφορα βήματα εξέλιξης που αφορούν είτε τροποποίηση των υπαρχόντων τεχνικών είτε εφαρμογή νέων τεχνικών για την τμηματική μεταμόσχευση ενδοθηλίου.

Ως μια προσπάθεια να διευκολυνθεί η χειρουργική επέμβαση με τη μεταμόσχευση DMEK, παρουσιάστηκαν τροποποιημένες τεχνικές όπως η DMEK-S. Κατά την τεχνική αυτή το μόσχευμα αποτελείται μόνο από μεμβράνη Descemet και ενδοθήλιο στο κεντρικό οπτικό τμήμα, και υποστηριζόμενο από μια περιφερειακή στρωματική στεφάνη εμφανίζει αυξημένη σταθερότητα της μεμβράνης στο εσωτερικό του πρόσθιου θαλάμου [195]. Μια άλλη τροποποίηση της τυποποιημένης τεχνικής DMEK, (hemi-DMEK), βασίστηκε στην ιδέα να μειωθεί η έλλειψη ιστών. Δύο ημικυκλικά μοσχεύματα για δύο λήπτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν από μία μη καθαρή μεμβράνη Descemet πλήρους διαμέτρου. Παρά την αναντιστοιχία σχήματος μεταξύ της κυκλικής απογύμνωσης του κερατοειδούς και του ημικυκλικού hemi-DMEK, παρατηρήθηκε κάθαρση του κερατοειδούς σε ολόκληρο τον κερατοειδή χιτώνα, ακόμη και πάνω από αρχικά γυμνά στρωματικά τμήματα (απογυμνωμένα από Descemet μεμβράνη) [196].

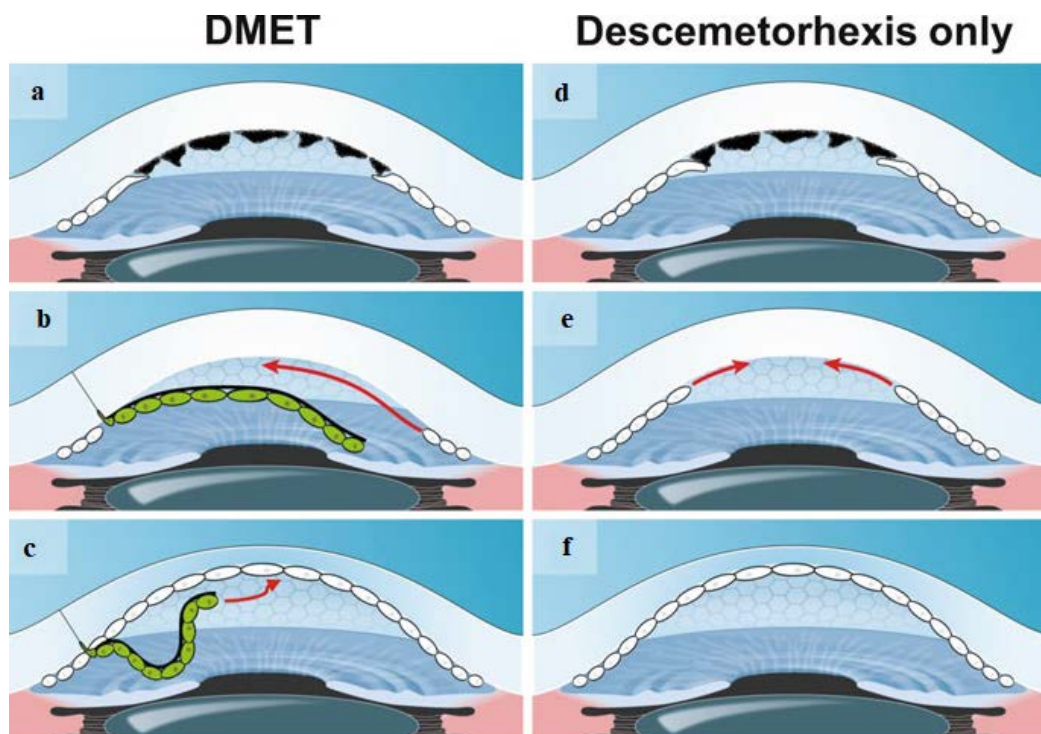
5.2.6 Ενδοθηλιακή Μεταφορά Δεσκεμετείου μεμβράνης (Descemet membrane endothelial transfer – DMET)

Το σημείο εκκίνησης μιας νέας έννοιας "μη κερατοπλαστικής" εισήγαγαν οι Melles με την τροποποιημένη τεχνική της ενδοθηλιακής μεταφοράς δεσκεμετείου μεμβράνης (DMET) [197]. Μετά από δεσκεμετόρηση, εγχέεται ένας κύλινδρος Descemet στον πρόσθιο θάλαμο και ασφαλίζεται στην κύρια τομή (εικόνα 5.4). Η σύλληψη της ιδέας της νέας αυτής τεχνικής έλαβε χώρα το 2012, μετά την παρατήρηση μίας περίπτωσης διαύγασης του κερατοειδούς σε ασθενή που είχε υποβληθεί σε DMEK λόγω δυστροφίας Fuchs και στην οποία παρατηρήθηκε σχεδόν πλήρης παρεκτόπιση του μοσχεύματος μέσα στις πρώτες μετεγχειρητικές ώρες (παρέμενε μία ελάχιστη περιοχή επαφής μεταξύ μοσχεύματος και δέκτη στην περιφέρεια του κερατοειδούς, στην 12η ώρα) [197]. Η ασθενής εξέφρασε την επιθυμία να μην υποβληθεί σε διορθωτική επέμβαση και έτσι τέθηκε υπό τακτική παρακολούθηση με

βιομικροσκόπηση, μέτρηση ενδοθηλιακών κυττάρων και παχυμετρία κερατοειδούς. Τελικά, μέσα σε 6 μήνες, επήλθε πλήρης διαύγαση του κερατοειδούς, με φυσιολογικό κεντρικό πάχος (494 μm) και τελική βέλτιστα διορθωμένη οπτική οξύτητα 20/200 (συνυπήρχε ξηρού τύπου ηλικιακή εκφύλιση ωχράς κηλίδας), βελτιωμένη σε σχέση με την αρχική οπτική οξύτητα (μέτρηση δακτύλων). Ενδοθηλιακά κύτταρα ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά με την βοήθεια της ενδοθηλιομέτρησης 2 μήνες μετά την επέμβαση και η τελική πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων ήταν 830 κύτταρα/ mm^2 , ενώ στους 6 μήνες μετεγχειρητικής παρακολούθησης, το μόσχευμα δεν μετακινήθηκε από την θέση του. Μετά από αυτή την παρατήρηση, γεννήθηκε η ιδέα μίας νέας τεχνικής που ονομάστηκε δοκιμαστικά DMET (Descemet membrane endothelial transfer) και η οποία αποτελεί μία απλοποιημένη μέθοδο μεταμόσχευσης ενδοθηλίου με κεντρικό πυρήνα την απλή μεταφορά ενδοθηλιακών κυττάρων στον πρόσθιο θάλαμο του λήπτη πάνω σε έναν φορέα και εμφανή πλεονεκτήματα την πλήρη αποκατάσταση της ανατομίας και της φυσιολογίας του κερατοειδούς σε συνδυασμό με πολύ μικρή καμπύλη εκμάθησης και ελάχιστο κίνδυνο επιπλοκών (ειδικά της παρεκτόπισης του μοσχεύματος). Ωστόσο, η νέα μέθοδος εμφανίζει δύο προφανή μειονεκτήματα: α) η διαύγαση του κερατοειδούς απαιτεί μεγάλο χρονικό διάστημα (3 – 6 μήνες) και β) η πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων στους 6 μήνες μετεγχειρητικά είναι πολύ μειωμένη (500– 800 κύτταρα/ mm^2), χωρίς βέβαια να είναι απόλυτο ότι η μετρούμενη πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων στο κέντρο του κερατοειδούς αντικατοπτρίζει τον συνολικό αριθμό κυττάρων που είναι διαθέσιμα για την επιβίωση της μεταμόσχευσης και μπορεί να βρίσκονται εναποθεθειμένα στο μόσχευμα [197-198].

Σχετικά με τον τρόπο που λειτουργεί η DMET και οδηγεί στην διαύγαση του κερατοειδούς, υπάρχουν δύο θεωρίες που μάλλον αλληλοσυμπληρώνονται. Η πρώτη θεωρία βασίζεται στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στο στρώμα του λήπτη, χωρίς ωστόσο να είναι απόλυτα ξεκάθαρη η προέλευση των ενδοθηλιακών κυττάρων (δότης ή λήπτης) [199]. Η δεύτερη θεωρία βασίζεται στην δυνατότητα πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων, χωρίς – και σε αυτήν την περίπτωση – να είναι ξεκάθαρο εάν αφορά τα κύτταρα του δότη ή του λήπτη. Έχει αποδειχτεί ότι υπάρχουν ενδοθηλιακά κύτταρα με χαρακτηριστικά βλαστοκυττάρων που έχουν την δυνατότητα να πολλαπλασιάζονται, εκκινώντας από την άκρα περιφέρεια του κερατοειδούς. Επίσης, έχει αποδειχθεί η δυνατότητα πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων που προέρχονται από κερατοειδείς με δυστροφία Fuchs [200]. Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με την κλινική παρατήρηση περιπτώσεων αυτόματης διαύγασης του κερατοειδούς μετά από αφαίρεση της δεσκαμετείου (descemetorhesis only) χωρίς μεταμόσχευση ενδοθηλίου [190] καθιστούν πολύ πιθανή την συμμετοχή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων στην επιτυχία της DMET (εικόνα 5.4).

Η τεχνική αυτή μας έδωσε μια βαθύτερη κατανόηση των διαδικασιών που εμπλέκονται στην επούλωση των παθήσεων των ενδοθηλιακών κυττάρων, που μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω εξελίξεις όσον αφορά τη θεραπεία της FECD δημιουργώντας προϋποθέσεις για εναλλακτικές προσεγγίσεις, όπως ενέσεις κυττάρων ή θεραπείες φαρμάκων [201]



Εικόνα 5.4: Μηχανισμοί πίσω από DMET και "descemetorhexis only" στη θεραπεία της FECD. Όσον αφορά το DMET, πιστεύεται ότι το μόσχευμα-δότης μπορεί να προκαλέσει ενδοθηλιακή μετανάστευση. Με τη βοήθεια της δεσκεμετόρηξης, τα guttae απομακρύνονται και παύουν να λειτουργούν ως εμπόδια στη μετανάστευση των περιφερικών ενδοθηλιακών κυττάρων (a). Όταν εισάγεται ένας ελεύθερος ιστός-δότης (πράσινο) συνδεδεμένος στην τομή, οι κλινικές παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι προκαλείται η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων του λήπτη (b). Κατά συνέπεια, το γυμνό στρώμα καλύπτεται από τον λήπτη και σε κάποιο βαθμό από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του δότη που αποκαθιστούν τη διαφάνεια του κερατοειδούς (c). Σχετικά με "descemetorhexis only", στα πρώιμα στάδια της νόσου όταν τα guttae δεν έχουν προχωρήσει ακόμα στην απομακρυσμένη περιφέρεια και εξασκολουθούν να υπάρχουν επαρκή περιφερικά ενδοθηλιακά κύτταρα, μια δεσκεμετόρηξη, χωρίς την εισαγωγή ιστού δότη θα μπορούσε να είναι επαρκής για να προκαλέσει ενδοθηλιακή μετανάστευση λήπτη (d - f) [196].

5.3 Μελλοντικές θεραπείες

Τα τελευταία χρόνια σημειώθηκαν σημαντικά βήματα προόδου όσον αφορά την κατανόησή μας για τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς στους οποίους βασίζεται η FECD και έχουν επισημανθεί πιθανώς νέοι στόχοι φαρμακολογικής θεραπείας.

Μία οδός φαρμακολογικής θεραπείας έχει ως στόχο την αναστολή της οδού σηματοδότησης Rho / ROCK χρησιμοποιώντας τον αναστολέα ROCK Y-27632. Η οδός Rho / ROCK έχει αποδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής μετανάστευσης. Τόσο τα in vitro όσο και

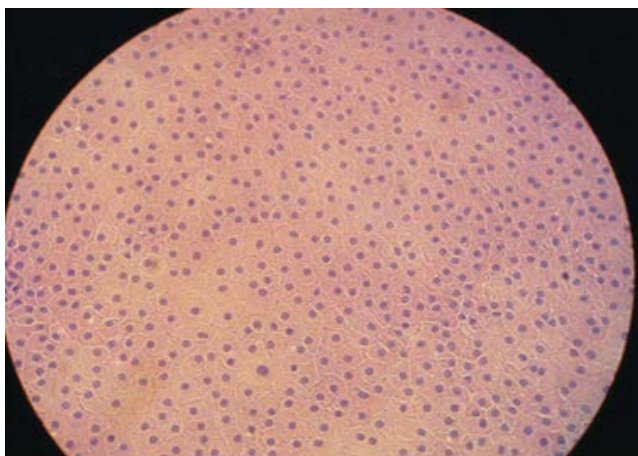
τα in vivo πειράματα χρησιμοποιώντας Y-27632 έχουν δείξει ότι η αναστολή της οδού σηματοδότησης Rho / ROCK μπορεί να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς και την επούλωση των πληγών [202]. Η χρήση αναστολέων ROCK σε μορφή οφθαλμικών σταγόνων φαίνεται η πιο πολλά υποσχόμενη και είναι η μόνη που έχει χρησιμοποιηθεί σε ανθρώπινες κλινικές δοκιμές [202, 203].

Πιο συγκεκριμένα, σε δημοσίευση περιστατικού (case report) που πραγματοποιήθηκε το 2013, ανακοινώθηκε ότι οι οφθαλμικές σταγόνες Y-27632 χρησιμοποιήθηκαν σε έναν Ιάπωνα ασθενή ηλικίας 52 ετών, ο οποίος έπασχε από δυστροφία Fuchs άμφω και είχε παραπεμφθεί για να υποβληθεί σε DSAEK. Ο ασθενής, αντί για μεταμόσχευση ενδοθηλίου, υπεβλήθη σε θεραπεία με εκλεκτικό αναστολέα ROCK. Η προεγχειρητική οπτική οξύτητα ήταν 20/63 και το κεντρικό πάχος κερατοειδούς ήταν 703μm. Αρχικά, αφαιρέθηκε το ενδοθήλιο του κερατοειδούς από την κεντρική περιοχή και, στη συνέχεια, ο ασθενής τέθηκε σε αγωγή με οφθαλμικές σταγόνες Y-27632 έξι φορές την ημέρα. Η διαύγεια του κερατοειδούς επανήλθε στις δύο εβδομάδες μετά την θεραπεία, οπότε και η οπτική οξύτητα βελτιώθηκε στα 20/20. Έξι μήνες μετά, το κεντρικό πάχος κερατοειδούς ήταν 568μm, η οπτική οξύτητα είχε ανέλθει στα 20/16 και η πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων στον κεντρικό κερατοειδή ήταν 1549 ± 90 κύτταρα/mm³. Η ίδια καλή οπτική οξύτητα (20/16) διατηρήθηκε μέχρι το τέλος της παρακολούθησης (2 έτη).

Το λίθιο είναι ενεργοποιητής της κανονικής οδού σηματοδότησης Wnt. Εργασία του Kim et al. έδειξε ότι το λίθιο αυξάνει την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς και την αυτοφαγία σε ένα μοντέλο ποντικού COL8A2 Q455K της FECD [29]. Επιπλέον, η προκατεργασία των καλλιιεργημένων φυσιολογικών ενδοθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς βοοειδούς με λίθιο σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες βρέθηκε ότι αυξάνει σημαντικά την κυτταρική βιωσιμότητα μετά από επώαση με οξειδωτικό στρες και παράγοντες καταπόνησης ER, όπως υπεροξειδίου του υδρογόνου και thapsigargin, αντίστοιχα [204]. Μαζί, αυτά τα δεδομένα παρείχαν in vitro και in vivo στοιχεία για τη χρήση του λιθίου ως πιθανή φαρμακολογική θεραπεία για το FECD.

Μια άλλη ενδιαφέρουσα ένωση είναι η N-ακετυλοκυστεΐνη (NAC), η οποία είναι ένα αντιοξειδωτικό που περιέχει θειόλη. Η συστηματική χορήγηση του NAC σε μοντέλο ποντικού Col8a2 L450W με FECD έδειξε ότι αυξάνει την ενδοθηλιακή επιβίωση του κερατοειδούς με μια σχετική αύξηση στους δείκτες των αντιοξειδωτικών κυττάρων και με μείωση των δεικτών έντασης ER σε σύγκριση με τους χωρίς θεραπεία L450W ποντικούς [205]. Η προεπεξεργασία των ενδοθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς των βοοειδών με NAC οδήγησε σε υψηλότερη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από επώαση με οξειδωτικούς και ER παράγοντες καταπόνησης σε σύγκριση με τα κύτταρα που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με μάρτυρα [205].

Αν και τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται *in vivo*, αρκετές ομάδες έχουν δείξει την πολλαπλασιαστική ικανότητα ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς *in vitro*. Πρόσφατες εργασίες που αποδεικνύουν την ικανότητα καλλιέργειας ανθρωπίνων ενδοθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς σε διάφορα υποστρώματα, όπως η μεμβράνη του Descemet και η αμνιακή μεμβράνη, δείχνουν υποσχόμενους τομείς μελλοντικής έρευνας. Πρόσθετες προσεγγίσεις βασισμένες σε κύτταρα θα μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν την κατανόησή μας για τους μηχανισμούς της διακοπής κυτταρικού κύκλου στο ανθρώπινο ενδοθήλιο του κερατοειδούς ώστε να διεγείρουν την κυτταρική διαίρεση *in vivo*. Έτσι, η χρήση των καλλιεργημένων κυττάρων είτε ως μονή στιβάδα (εικόνα 5.5) είτε μετά από έγχυση στον πρόσθιο θάλαμο είναι πιθανό να αποτελέσει κλινική πραγματικότητα στο εγγύς μέλλον [206].



Εικόνα 5.5: Κυτταροκαλλιέργεια 4 εβδομάδων από ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα [184].

Τέλος η FECD αντιπροσωπεύει μια ελκυστική ασθένεια για προσεγγίσεις με βάση τη γονιδιακή θεραπεία. Με την ταυτοποίηση της επέκτασης τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων CTG (> 50 επαναλήψεις) στο γονίδιο *TCF4* σε 79% των ασθενών με FECD [207], και τις μετέπειτα μελέτες που συνδέουν την επέκταση TNR σε FECD με συσσωμάτωση RNA και κυτταροτοξικότητα [138;208], καθώς και με τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *COL8A2* που έχουν ήδη αποδειχθεί ότι προκαλούν FECD, και πιθανώς θα εντοπιστούν στο μέλλον και πρόσθετες αιτιώδεις μεταλλάξεις σε διαφορετικά γονίδια, ανοίγει ο δρόμος για τη γονιδιακή θεραπεία ή ακόμα πιο στοχευόμενα για CRISP-R gene editing. Η γενετική τροποποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς έχει ήδη επιτευχθεί και οι μεταλλάξεις FECD θα μπορούσαν θεωρητικά να διορθωθούν στα ενδοθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς ως πιθανή θεραπεία για αυτή τη νόσο [209].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο: ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ DNA ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ

6.1 Εισαγωγή

Μέσω της Μοριακής Διαγνωστικής μπορούν να αναλυθούν τμήματα DNA, για ανίχνευση πολυμορφισμών, ή μεταλλάξεων στην αλληλουχία τους ή/και επιγενετικών τροποποιήσεων.

A) Οι μέθοδοι που συχνότερα χρησιμοποιούνται για την εύρεση γνωστών μεταλλάξεων είναι οι εξής:

- ✚ αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR) και παραλλαγές της i) PCR Αντίστροφης Μεταγραφάσης (Reverse Transcription PCR - RT-PCR) για ελαττώματα ματίσματος, ii) Πολλαπλή PCR (Multiplex PCR), iii) Nested PCR, iv) ARMS (Amplification-Refractory Mutation System) PCR ή Αλληλοειδική ενίσχυση (Allele-Specific PCR - AS-PCR), v) PCR πραγματικού χρόνου (Real Time qPCR), vi) Ανάλυση πολυμορφισμών μέσω μήκους θραύσματος (PCR-RFLP -Restriction fragment length polymorphism)

και σε πολυπαραγοντικές αναλύσεις:

- ✚ DNA μικροσυστοιχίες (DNA Microarrays), όπως η αλληλοειδική υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτίδιου σε DNA chip (Allelic Specific Oligonucleotide - ASO)
- ✚ DNA Αλληλούχιση (DNA Sequencing) (Gold Standard τεχνική)
- ✚ Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) (για την σάρωση μεγάλων γενωμικών αναδιατάξεων)

B) Οι αναλύσεις που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση άγνωστων μεταλλάξεων είναι οι εξής και αποτελούν τις λεγόμενες μεθόδους σάρωσης (μέθοδοι διαλογής):

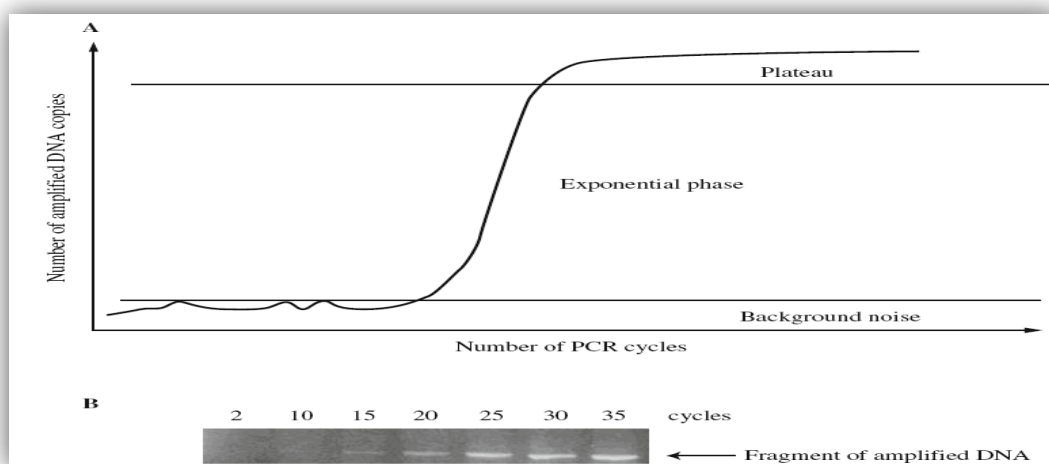
- ✚ Ανάλυση διαμόρφωσης μονόκλωνου πολυμορφισμού (Single Strand Conformational Polymorphism - SSCP)
- ✚ Ηλεκτροφόρηση σε βαθμιδωτή μετουσιωτική γέλη (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE)
- ✚ Ηλεκτροφόρηση γέλης σε βαθμιδωτή θερμοκρασία (Temperature gradient gel electrophoresis - TGGE)
- ✚ Ανάλυση τήξης υψηλού διαχωρισμού (High Resolution Melting Analysis - HRMA)
- ✚ Ανάλυση ετερόδιπλη (Heteroduplex Analysis -HET)

- ✚ RNase A μέθοδος διάσπασης (RNase A Cleavage Method)
- ✚ Μέθοδος χημικής διάσπασης (Chemical Cleavage Method -CCM)
- ✚ Ενζυματική διάσπαση αναντιστοιχίας (Enzyme Mismatch Cleavage -EMC)
- ✚ Δοκιμή πρόωρου τερματισμού πρωτεΐνης (Protein Truncation Test -PTT)
- ✚ Συστήματα Αλληλούχισης Νέας Γενιάς (Next Generation Sequencing -NGS), συμπεριλαμβανομένων της παράλληλης μαζικής αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing -WGS), ή όλων των εξωνίων του γονιδιώματος (Whole Exome Sequencing -WES), της αλληλούχισης μεταγραφώματος, της αλληλούχισης μεθυλώματος, κλπ [210-211].

6.2 Τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν

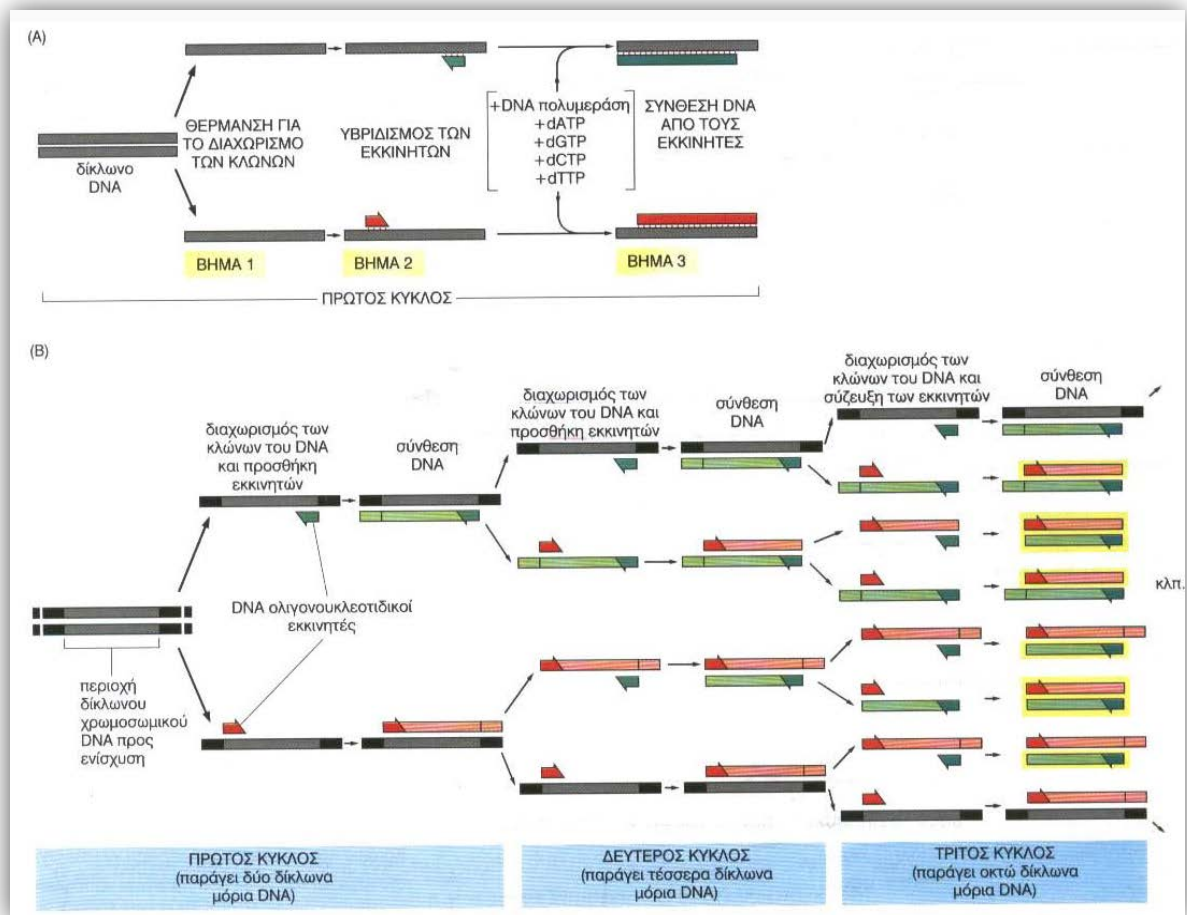
6.2.1 PCR

Η PCR πραγματοποιείται με στόχο τον πολλαπλασιασμό ορισμένης αλληλουχίας ενός υποστρώματος γενωμικού DNA. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης είναι απαραίτητοι δύο ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που οριοθετούν την προς ενίσχυση περιοχή, τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs - deoxy nucleotide triphosphates), μια θερμοανθεκτική πολυμεράση, ιόντα μαγνησίου και ρυθμιστικό διάλυμα. Από κινητικής άποψης, μια αντίδραση PCR μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από τρεις φάσεις: την πρώιμη φάση «υποβάθρου» ή φάση «θορύβου» (background phase), την εκθετική φάση (exponential growth phase) ή λογαριθμική φάση (log phase) και τη φάση κορεσμού (plateau) (εικόνα 6.1).



Εικόνα 6.1: Η κινητική της αντίδρασης PCR. Α) Γραφική παράσταση του αριθμού των DNA αντιγράφων ως προς τον αριθμό των PCR κύκλων, όπου διακρίνονται η φάση θορύβου, η λογαριθμική φάση και η φάση plateau. Β) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR που προκύπτουν μετά από διαφορετικό αριθμό κύκλων PCR [212].

Η PCR πραγματοποιείται με διαδοχικές αλλαγές της θερμοκρασίας (θερμικούς κύκλους). Αρχικά εφαρμόζεται υψηλή θερμοκρασία για το διαχωρισμό των δίκλωνων μορίων (denaturation-melting), στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώνεται ώστε να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές στις συμπληρωματικές του αλληλουχίες (annealing) και τελικά η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 72°C, την ιδανική θερμοκρασία για την αντιγραφή από τη χρησιμοποιούμενη πολυμεράση (extension-elongation). Η θερμοκρασία και η διάρκεια της αποδιάταξης (denaturation) εξαρτάται από το μήκος και την αλληλουχία του υποστρώματος, καθώς και από το όργανο και τα τριχοειδή που χρησιμοποιούνται, ενώ η θερμοκρασία του υβριδισμού (annealing) πρέπει να είναι λίγους βαθμούς χαμηλότερη από τη θερμοκρασία τήξης των δύο εκκινητών (οι οποίοι σχεδιάζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες τήξης), έτσι ώστε να σχηματίζονται σταθερά σύμπλοκα εκκινητών-αλληλουχιών στόχων αλλά όχι άλλα μη ειδικά σύμπλοκα (εικόνα 6.2) [212-214].



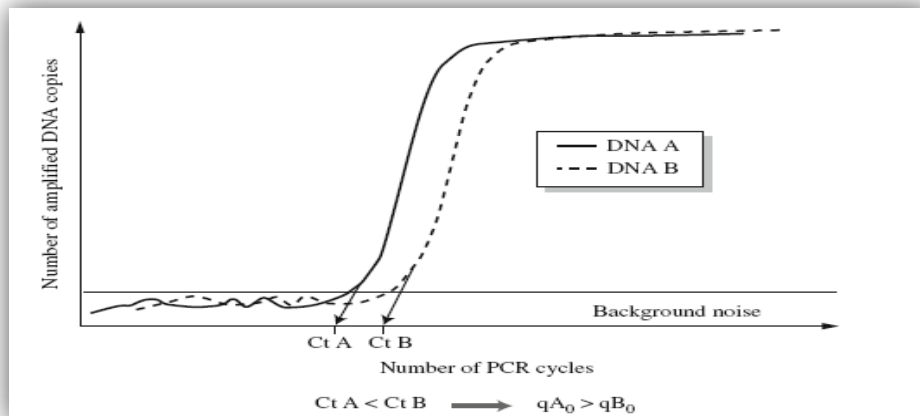
Εικόνα 6.2: Σχηματική παράσταση της PC. (<http://panacea.med.uoa.gr/extra/1575.jpg>).

6.2.2 Real Time PCR

Στην PCR πραγματικού χρόνου, τα δεδομένα συλλέγονται κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης του DNA και όχι σε ένα μόνο τελικό σημείο, όπως με τη συμβατική PCR. Η τεχνική χρησιμοποιεί φθορίζοντα μόρια που ιχνηθετούν τα προϊόντα της PCR και οργανολογία που καταγράφει συνεχώς το φθορισμό κατά την πρόοδο της αντίδρασης. Η φάση του θορύβου διαρκεί έως ότου το σήμα του προϊόντος της PCR είναι μεγαλύτερο από το σήμα του υποβάθρου του συστήματος. Η φάση της εκθετικής ανάπτυξης ξεκινά μόλις συσσωρευτεί επαρκής ποσότητα προϊόντος, έτσι ώστε να είναι ανιχνεύσιμο πάνω από το θόρυβο και ολοκληρώνεται όταν η απόδοση της αντίδρασης μειωθεί, καθώς η αντίδραση εισέρχεται στη φάση κορεσμού [212-213].

Ο κορεσμός οφείλεται στην εξάντληση κάποιου κρίσιμου παράγοντα που μπορεί να είναι οι εκκινητές, οι φθορίζοντες ιχνηθέτες ή τα dNTPs [214]. Τα δεδομένα που συλλέγονται δίνουν πληροφορίες για την ταυτότητα, ποσότητα και αλληλουχία των ενισχυόμενων τμημάτων DNA [213,215]. Ο μειωμένος κίνδυνος επιμολύνσεων, η ευκολία στη διαχείριση των δειγμάτων, ο περιορισμός των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, η ελάττωση του συνολικού όγκου αντίδρασης και η μεγάλη ευαισθησία, ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου έχουν συντελέσει στην αύξηση της χρήσης της τόσο στην έρευνα όσο και σε κλινικά εργαστήρια [213,216].

Πρέπει να σημειωθεί ότι σε ένα τυπικό πείραμα real-time PCR οι καμπύλες όλων των δειγμάτων φθάνουν στο ίδιο επίπεδο κορεσμού και έτσι οι μετρήσεις τελικού σημείου δε δίνουν καμία πληροφορία για την αρχική ποσότητα των μορίων στόχων στο δείγμα. Η διάκριση μπορεί να γίνει ωστόσο στη λογαριθμική φάση, κατά την οποία η πρώτη σημαντική αύξηση του μετρούμενου φθορισμού συσχετίζεται με την αρχική ποσότητα του εκμαγείου-στόχου. Με άλλα λόγια ο κύκλος όπου κάθε αντίδραση δίνει πρώτη φορά σήμα μεγαλύτερο του σήματος υποβάθρου (κύκλος ουδός-Ct:Cycle threshold ή αλλιώς Cq:Quantification Cycle) εξαρτάται από την ποσότητα του DNA-στόχου που υπήρχε στο δείγμα στην αρχή της αντίδρασης. Όσο λιγότερα μόρια περιέχει αρχικά το δείγμα, τόσο περισσότεροι κύκλοι απαιτούνται για την ανίχνευση του σήματος, δηλαδή τόσο μεγαλύτερη είναι η τιμή Ct [212-214] (εικόνα 6.3).



Εικόνα 6.3: Γραφική παράσταση του αριθμού των DNA αντιγράφων ως προς τον αριθμό των PCR κύκλων για δύο δείγματα A και B με διαφορετική αρχική ποσότητα μορίων DNA. Η αρχική ποσότητα μορίων DNA του δείγματος A (qA_0) είναι μεγαλύτερη από την αυτή του δείγματος B (qB_0) και η υπέρβαση του θορύβου επιτυγχάνεται συντομότερα για το δείγμα A από ότι για το δείγμα B. Με άλλα λόγια, το Ct του δείγματος A είναι μικρότερο από το Ct του δείγματος B. Εικόνα από [212].

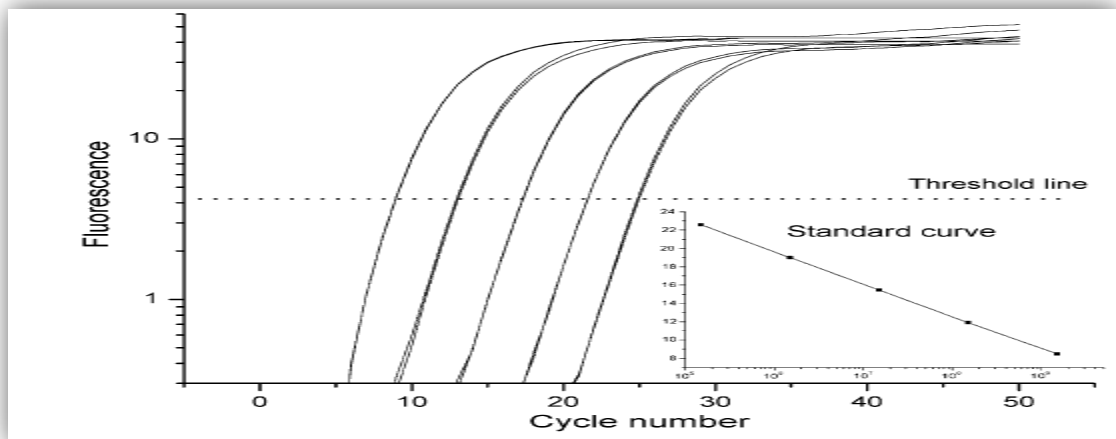
Αυτή η εξάρτηση μεταξύ του Ct και του αριθμού των μορίων που αρχικά υπήρχαν στο δείγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό άγνωστων δειγμάτων. Για δύο δείγματα A και B ο λόγος μεταξύ του αριθμού των μορίων του υποστρώματος στα αρχικά δείγματα $[N_0]A$ και $[N_0]B$ δίνεται από τη σχέση:

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

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

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

όπου k η κλίση της ευθείας και $CT(1)$ η τιμή Ct για αραιωμένο δείγμα που περιέχει 1 αντίγραφο της αλληλουχίας στόχου (εικόνα 6.4) [214].



Εικόνα 6.4: Παράδειγμα σχεδιασμού της καμπύλης βαθμονόμησης (standard curve) με χρήση προτύπων δειγμάτων γνωστής αρχικής συγκέντρωσης. Τα δείγματα ενισχύονται και κατασκευάζεται γραφική παράσταση των C_t ως προς τον αρχικό αριθμό μορίων DNA [214].

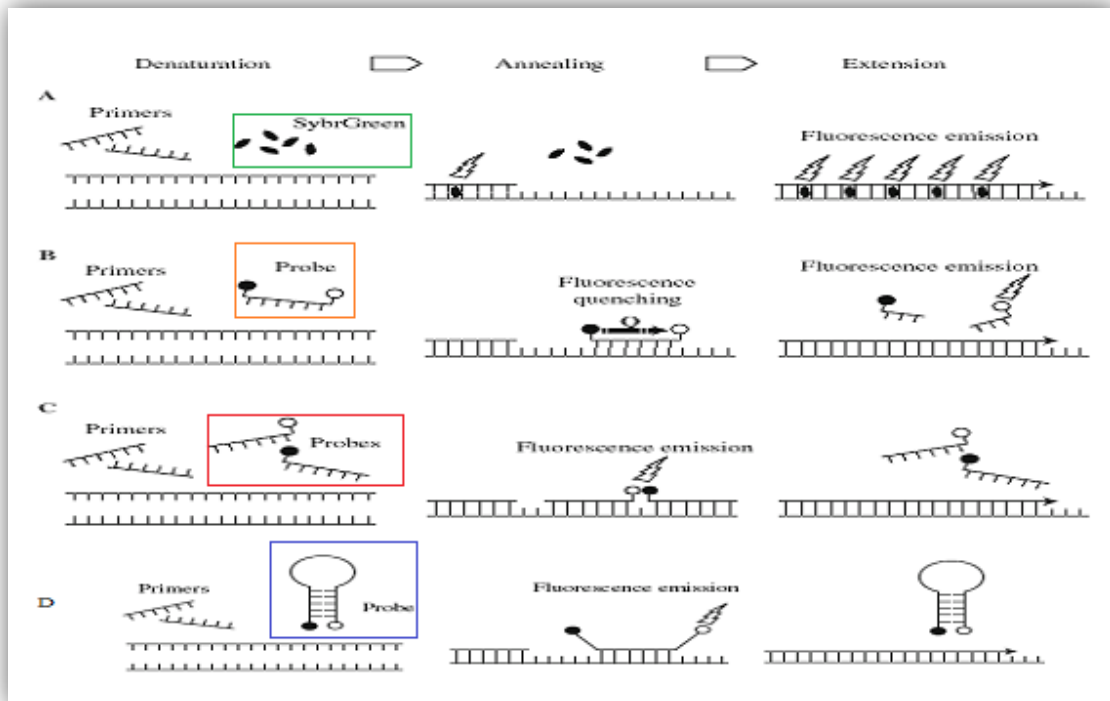
Από την κλίση της καμπύλης υπολογίζεται η απόδοση με τη σχέση:

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

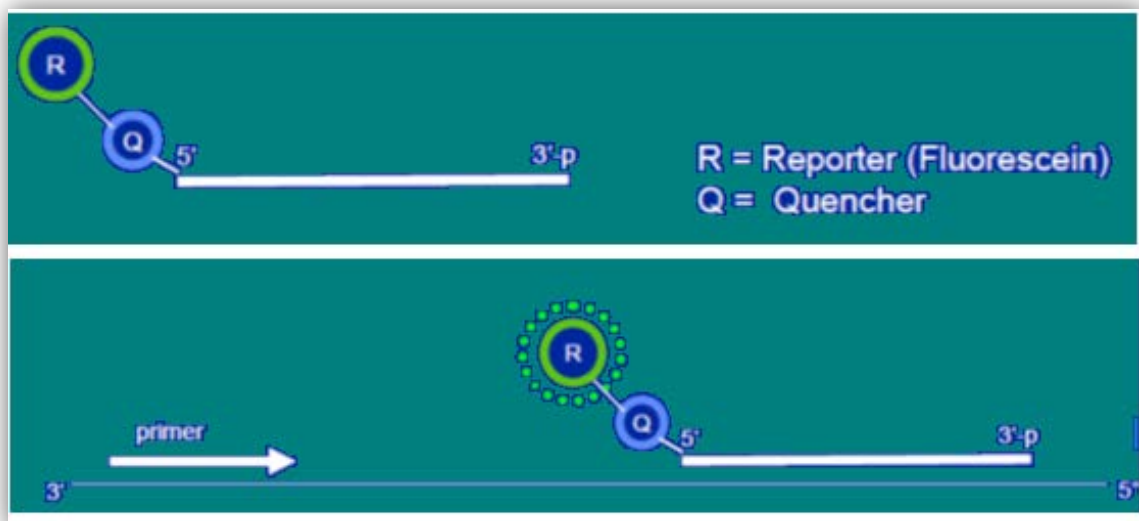
Με βάση το διάγραμμα βαθμονόμησης μπορεί να υπολογισθεί η αρχική συγκέντρωση κάθε άγνωστου δείγματος. Ωστόσο πρέπει να αναφερθεί ότι η απόδοση της αντίδρασης στα βιολογικά δείγματα μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά από την παρουσία ποικίλων ουσιών-αναστολέων της PCR, κάτι που δεν λαμβάνεται υπόψιν στη σχεδίαση της καμπύλης αναφοράς. Έτσι, τόσο η προετοιμασία όσο και ο προσδιορισμός των δειγμάτων πρέπει να είναι όσο το δυνατόν καλύτερα χαρακτηρισμένοι και βελτιστοποιημένοι [213,214].

Το μεγαλύτερο μέρος της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων γίνεται με υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το εκάστοτε όργανο της PCR σε πραγματικό χρόνο, με τη βοήθεια ειδικών λογισμικών, που επιτρέπουν τη γρήγορη και αξιόπιστη παρουσίαση τους [213].

Μια σημαντική παράμετρος της real-time PCR που δεν εξετάστηκε μέχρι στιγμής είναι η φύση και οι ιδιότητες των φθορίζόντων μορίων ιχνηθετών. Μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά τέτοια μόρια που εμπίπτουν σε μια από τις ακόλουθες κατηγορίες: χρωστικές που προσδέονται στη διπλή έλικα του DNA (όπως η SYBR Green), ανιχνευτές υβριδισμού DNA (hybridization probes), ανιχνευτές DNA διπλής χρωστικής (τύπου TaqMan), «μοριακοί φάροι» (molecular beacons), μόρια «σκορπιού» (εικόνα 6.5) και απλοί ανιχνευτές (simple probes) (εικόνα 6.6) [212,213].



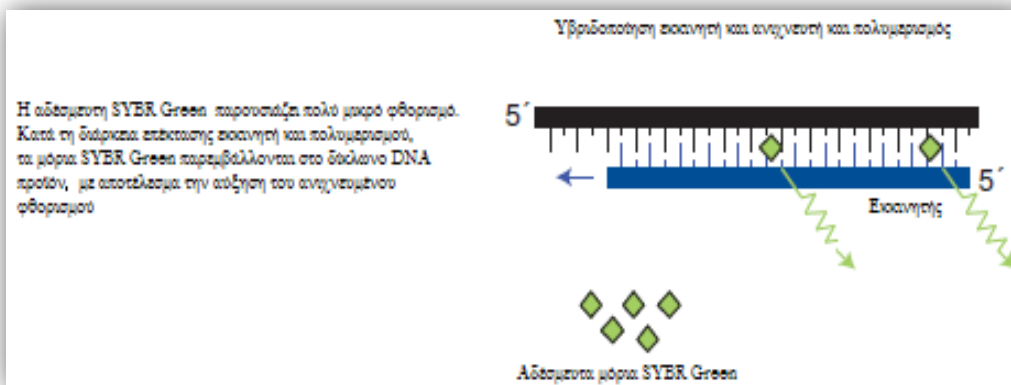
Εικόνα 6.5: Διαφορετικοί τύποι φοριζόντων μορίων ιχνηθετών που χρησιμοποιούνται σε αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου. A) SYBR Green, B) ανιχνευτές τύπου Taqman, C) ανιχνευτές υβριδισμού, D) μοριακοί φάροι [212].



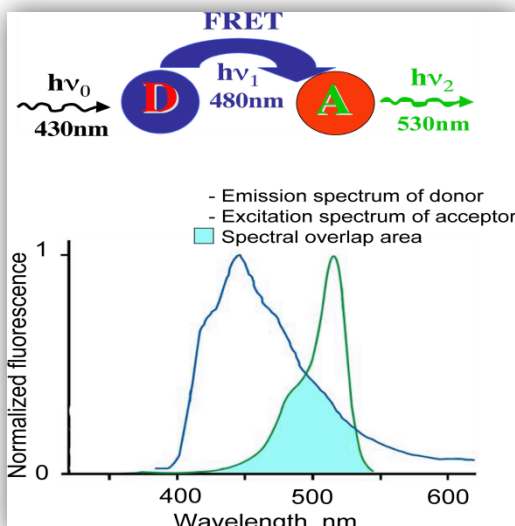
Εικόνα 6.6: Σχεδιασμός simple Probe με αποσβέστη (quencher) και φοριζουσα ουσία (π.χ. fluorescein, διέγερση στα 494 nm και μέγιστη εκπομπή στα 521 nm.), που όταν προσδεθεί στην αλληλουχία στόχο φθορίζει.

Όλα τα προαναφερθέντα συστήματα ανίχνευσης εκτός των χρωστικών που προσδένονται στη διπλή έλικα (εικόνα. 6.7), βασίζονται στο φαινόμενο μεταφοράς ενέργειας με φορισμό (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer). Το φαινόμενο αυτό συνίσταται στη μεταφορά ενέργειας από ένα ηλεκτρονικά διεγερμένο μόριο, το

φθορισμοφόρο δότη, σε ένα γειτονικό μόριο αποδέκτη, με αποτέλεσμα το μόριο δότης να επιστρέφει στη βασική μη διεγερμένη του κατάσταση. Το φαινόμενο FRET μπορεί να συμβεί μόνο όταν τα δύο μόρια (δότης και δέκτης) βρεθούν σε μια συγκεκριμένη απόσταση, που ονομάζεται ακτίνα Förster, στην οποία η απόδοση της μεταφοράς ενέργειας είναι 50% και εξαρτάται από τις φασματοσκοπικές ιδιότητες των μορίων. Όταν το κατάλληλο ζεύγος δότη-δέκτη βρεθεί στην απαιτούμενη απόσταση, λόγω του φαινομένου FRET το μόριο δότης δεν εκπέμπει φθορισμό. Εάν το μόριο δέκτης είναι επίσης φθορίζον, εκπέμπει φθορισμό στο χαρακτηριστικό για αυτό μήκος κύματος, οπότε και μπορεί να ανιχνευθεί. Η κύρια προϋπόθεση για να συμβεί κάτι τέτοιο είναι η ενέργεια που χάνει το μόριο δότης επιστρέφοντας στη βασική κατάσταση να ταυτίζεται με την ενέργεια που απαιτείται για τη διέγερση του μορίου δέκτη. Με άλλα λόγια το φάσμα απορρόφησης του μορίου δέκτη πρέπει να επικαλύπτει το φάσμα εκπομπής του μορίου δότη [213] (εικόνα 6.8).

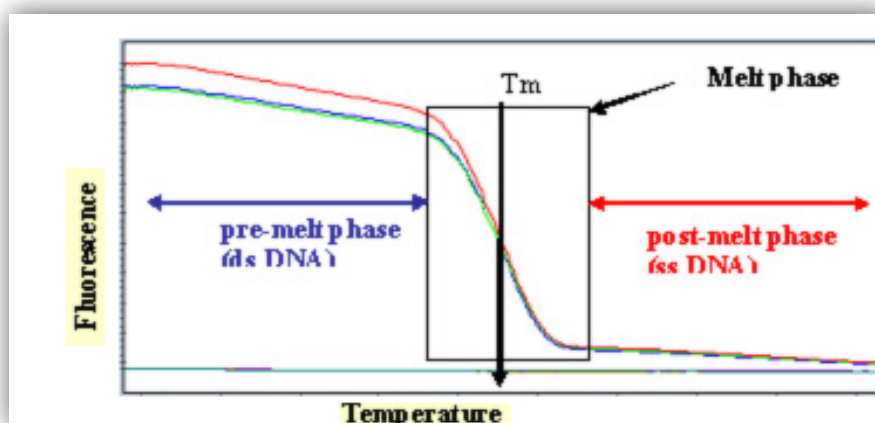


Εικόνα 6.7: Τρόπος φθορισμού χρωστικών που προσδέονται στη διπλή έλικα του DNA, όπως η SYBR Green. Η ένταση του σήματος σε κάθε βήμα της αντίδρασης αυξάνει καθώς αυξάνει και η συγκέντρωση του προϊόντος. Εικόνα από [217].

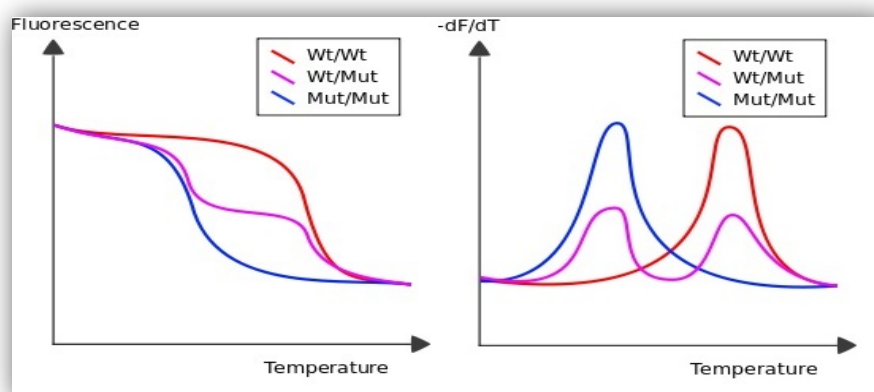


Εικόνα 6.8: Φαινόμενο FRET. Εικόνα από [218].

Με τη real-time PCR, εκτός από την ποσοτική ανάλυση του προϊόντος της PCR, γίνεται και ποιοτική ανάλυση (γονοτύπηση) με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve analysis), κατά την οποία οι ενισχυμένες αλληλουχίες μπορούν να χαρακτηριστούν με βάση το σημείο τήξης τους (T_m). Το T_m είναι η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA παραμένει δίκλωνο και το 50% γίνεται μονόκλωνο, είναι συνάρτηση του μήκους και της σύνθεσης των βάσεων του προϊόντος και χαρακτηρίζει την κάθε αλληλουχία [215,219] (εικόνα 6.9).



Εικόνα 6.9: Γραφική παράσταση της έντασης φθορισμού ως προς τη θερμοκρασία σε πειράματα ανάλυσης καμπύλης τήξης. Με την αύξηση της θερμοκρασίας τα δίκλιωνα μόρια αποδιάτασσονται με αποτέλεσμα τη μείωση της καταγραφόμενης έντασης φθορισμού. Χαρακτηριστική για κάθε αλληλουχία είναι η θερμοκρασία τήξης T_m , στην οποία το 50% των μορίων DNA παραμένει δίκλωνο και το 50% γίνεται μονόκλωνο.



Εικόνα 6.10: Γράφημα φθορισμού, ύστερα από σταδιακή αποδιάταξη του δίκλωνου προϊόντος με αύξηση της θερμοκρασίας και γράφημα αρνητικής πρώτης παραγώγου προς θερμοκρασία, με κορυφές (peaks) που αντιστοιχούν σε ξεχωριστό γονότυπο (<http://www.elveflow.com>).

Οι ειδικοί για αλληλουχία ανιχνευτές δεσμεύονται στην αλληλουχία-στόχο του DNA. Με την αύξηση της θερμοκρασίας (συνήθως κατά 0,2 °C/sec, ανάλογα με το όργανο που χρησιμοποιείται), η αποδιάταξη αυτών από την αλληλουχία στόχο οδηγεί στην μείωση του

εκπεμπόμενου φθορισμού. Η θερμική αποσταθεροποίηση λόγω κάποιας μετάλλαξης αντανακλάται στην T_m (εικόνα 6.10).

6.2.3 PCR - RFLP

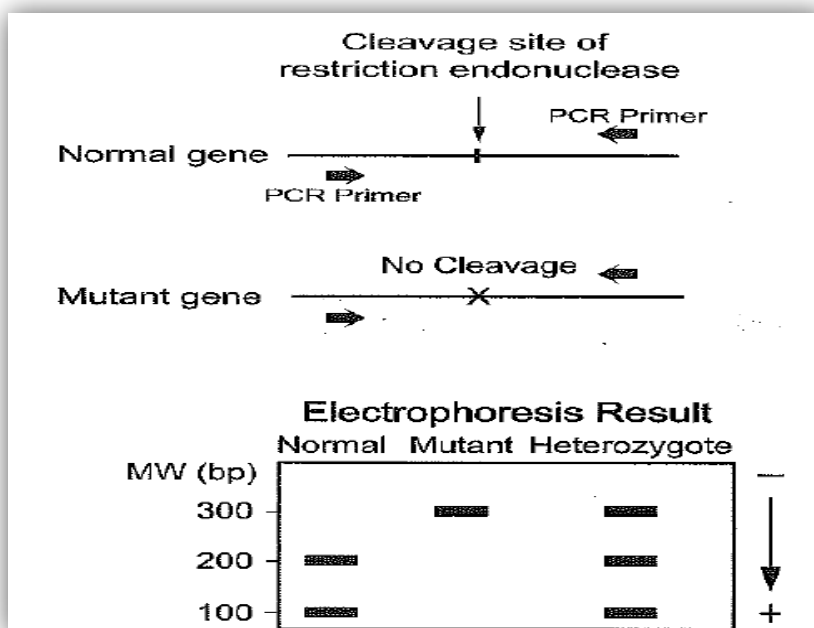
Η μέθοδος PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism) αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια:

- την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου με συμβατική PCR
- την πέψη των PCR προϊόντων με ειδικό ένζυμο περιορισμού και
- την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης

Η μέθοδος PCR-RFLP χρησιμοποιείται για τη γονοτύπηση γνωστών σημειακών μεταλλάξεων και βασίζεται στην ιδιότητα των περιοριστικών ενζύμων να πέπτουν το DNA αφού αναγνωρίσουν την ειδική για κάθε ένζυμο αλληλουχία. 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.

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. Η πέψη του μορίου του DNA εξαρτάται με άλλα λόγια από την ταυτότητα της νουκλεοτιδικής βάσης που βρίσκεται στη θέση αυτή. Εάν λόγου χάριν η μετάλλαξη μεταβάλλει την αλληλουχία αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου, τότε το μόριο που φέρει τη μετάλλαξη δε θα κοπεί. Αντίθετα το φυσιολογικό μόριο DNA, όπου η αλληλουχία αναγνώρισης είναι ακέραιη, θα κοπεί σε δύο μικρότερα τμήματα. Στην περίπτωση της ετεροζυγωτίας θα προκύψει ένα ακέραιο μόριο DNA που θα φέρει τη μετάλλαξη και δύο μικρότερα τμήματα από την πέψη του φυσιολογικού αλληλίου. Με την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης και το διαχωρισμό τους ανάλογα με το μοριακό τους βάρος προσδιορίζεται εύκολα εάν το δείγμα DNA ανήκει σε ομοζυγώτη, ετεροζυγώτη ή φυσιολογικό για τη μετάλλαξη άτομο. Ο ομοζυγώτης μεταλλαγμένος θα φέρει μια ζώνη μεγάλου μοριακού βάρους ίσου με το μοριακό βάρος της ενισχυθείσας αλληλουχίας. Ο ομοζυγώτης φυσιολογικός θα εμφανίζει δύο ζώνες που αντιστοιχούν στα τμήματα που προκύπτουν από την πέψη του DNA και ο ετεροζυγώτης τρεις ζώνες που αντιστοιχούν στο

ακέραιο μόριο DNA και στα δύο τμήματα που προκύπτουν από την ενζυμική πέψη (εικόνα 6.10).



Εικόνα 6.11: 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. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα το φυσιολογικό γονίδιο αναγνωρίζεται και «κόβεται» από το ένζυμο, ενώ η μετάλλαξη διαταράσσει την αλληλουχία αναγνώρισης και δεν επιτρέπει την πέψη. Στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης που ακολουθεί ο ομοζυγώτης φυσιολογικός φέρει δύο ζώνες που προκύπτουν από την πέψη του PCR προϊόντος σε δύο τμήματα, ο ομοζυγώτης μεταλλαγμένος φέρει μία ζώνη που αντιστοιχεί στο άπεπτο PCR προϊόν και ο ετεροζυγώτης φέρει τρεις ζώνες, μία στο μέγεθος του άπεπτου PCR προϊόντος και 2 στο μέγεθος των 2 τμημάτων που προκύπτουν από την ενζυμική πέψη του PCR προϊόντος [215].

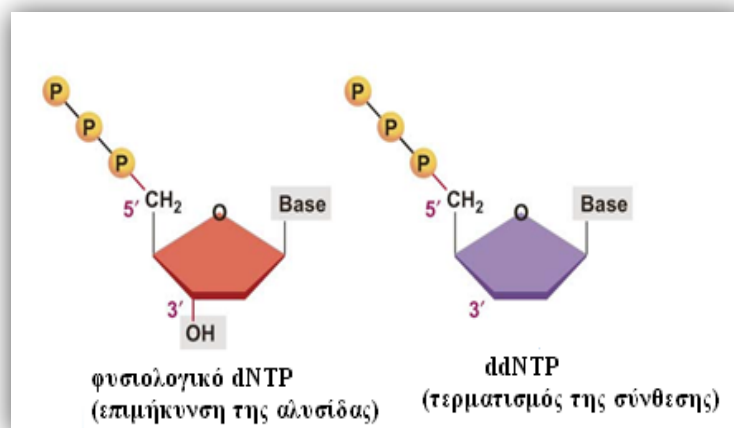
6.2.4 Αλληλούχιση DNA – (DNA Sequencing)

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. Η χημική μέθοδος αλληλούχισης κατά Maxam εκμεταλλεύεται την ιδιότητα ορισμένων χημικών ενώσεων, όπως η υδραζίνη, το διμεθυλοθειικό οξύ ή το φορμικό οξύ να μπορούν να τροποποιήσουν τις βάσεις του DNA εντός του μορίου αυτού. Το DNA που αναλύεται επισημαίνεται με κάποιο ραδιοϊσότοπο σε ένα από τα 3',5' άκρα του και στη συνέχεια τροποποιείται με τη βοήθεια των προαναφερόμενων χημικών ενώσεων σε τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις, σε κάθε μια από τις οποίες χρησιμοποιείται ένα μόνο από τα εν λόγω αντιδραστήρια. Ακολούθως προστίθεται

το αντιδραστήριο πιπεριδίνη που καταλύει τη διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού στο σημείο της τροποποιημένης βάσης [220]. Αργότερα το ίδιο έτος προτάθηκε από τον Sanger και τους συνεργάτες του μια ενζυμική μέθοδος για την ανάγνωση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων.

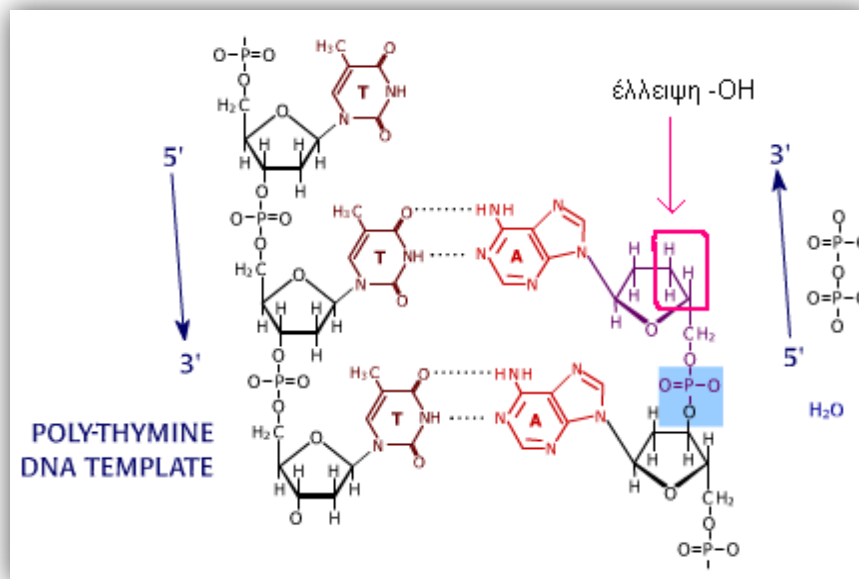
6.2.4.1 Η ενζυμική μέθοδος κατά Sanger

Η ενζυμική μέθοδος κατά Sanger ή η μέθοδος των διδεόξυ αντιδράσεων βασίστηκε σε προηγούμενη εργασία του Arthur Kornberg 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 dNTP ενώνεται με το άτομο άνθρακα στο 3' άκρο στο τέλος της αλυσίδας. Οι ομάδες υδροξυλίου σε κάθε θέση σχηματίζουν εστερικούς δεσμούς με ένα κεντρικό άτομο φωσφόρου και η αλυσίδα επιμηκώνεται. Το «κλειδί» στη μέθοδο του Sanger είναι η ιδιαίτερη χημεία των ddNTPs. Όπως γίνεται με ένα dNTP, 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 [221].



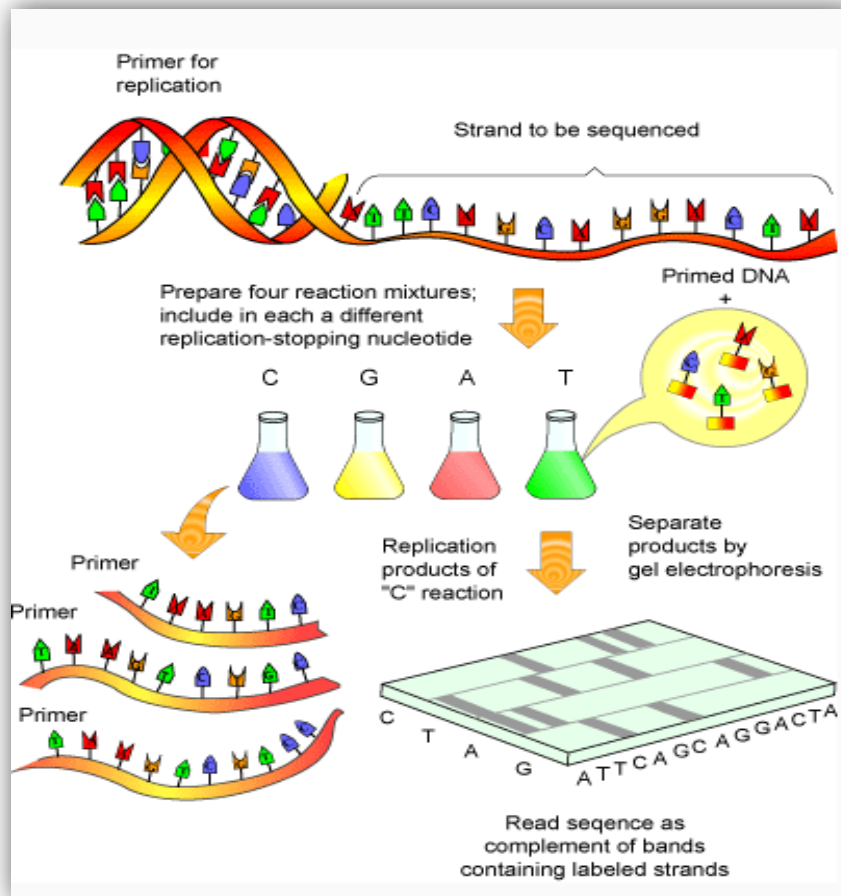
Εικόνα 6.13: Δομή dNTP και ddNTP.

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



Εικόνα 6.14: 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) ή σημασμένο με φθορίζουσα χρωστική. 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) ή σε ειδικά τριχοειδή και η αλληλουχία του DNA μπορεί να διαβαστεί απ' ευθείας. 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 6.15: Αρχή ενζυμικής μεθόδου DNA sequencing κατά Sanger (www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006).

6.2.4.2: Αυτοματοποίηση του DNA Sequencing

Ένα άλλο σημαντικό σταθμό του DNA Sequencing αποτέλεσε 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 πηκτική πολυακρυλαμίδιου, 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:

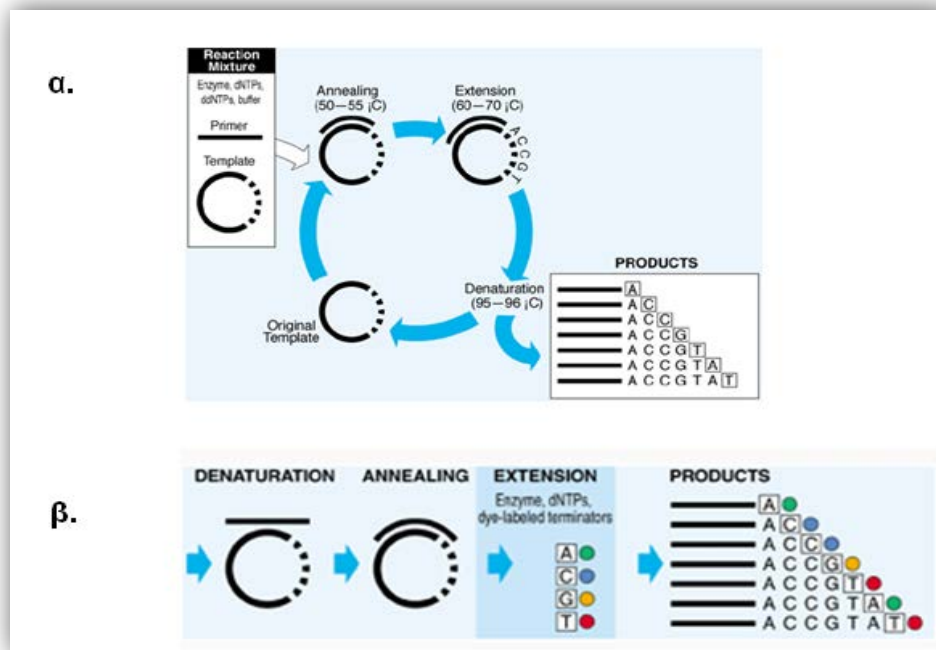
1. Έχει επικρατήσει η μέθοδος των θερμικών κύκλων (cycle sequencing). Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο χρησιμοποιείται:

- ❖ Ταq πολυμεράση
- ❖ Ένας μόνο εκκινητής
- ❖ Διδεόξυ νουκλεοτίδια
- ❖ Και αντίδραση cycle sequencing για 20- 35 κύκλους (ανάλογα με το μέγεθος της αναλυόμενης περιοχής)

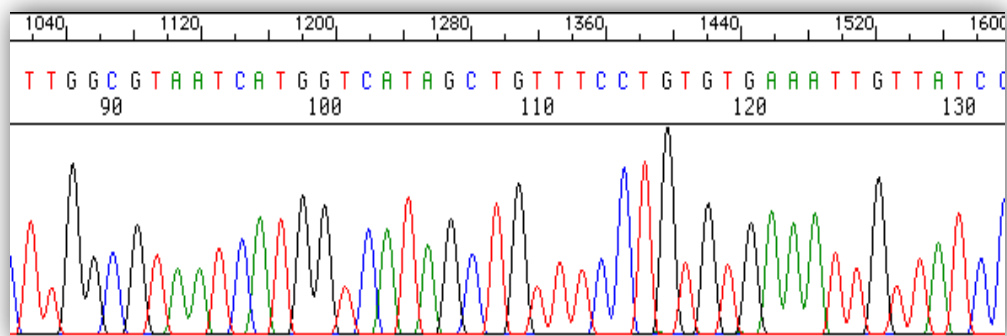
2. Υπάρχει πλέον η δυνατότητα είτε να επισημανθούν τα ddNTPs με τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές σε μία μόνο αντίδραση (dye terminators) είτε να επισημανθεί ο εκκινητής με τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες και να γίνουν τέσσερις αντιδράσεις (dye primers).

3. Αποφεύγεται η χρήση γέλης πολυακρυλαμίδιου 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. Εφόσον 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 6.16: α. Μέθοδος θερμικών κύκλων β. Μέθοδος DNA Sequencing με χρήση Dye Terminators ddNTPs (<http://www3.appliedbiosystems.com/cms>).



Εικόνα 6.17: Γράφημα από DNA Sequencing.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της εργασίας

Η παθοφυσιολογία που αποτελεί τη βάση της κλασσικής μορφής FECD με καθυστερημένη έναρξη παραμένει άγνωστη [88,222], αν και η γενετική προδιάθεση έχει αναφερθεί ως ο πιο αξιόπιστος παράγοντας κινδύνου για τη νόσο [57]. Όπως σε πολλές άλλες κοινές πολύπλοκες ασθένειες, αναγνωρίζεται ευρέως ότι η γενετική προδιάθεση στην FECD προσδιορίζεται από παραλλαγές σε πολλά γονίδια. Δεν είναι γνωστό εάν αυτά τα γονίδια δρουν συνεργατικά ή ανεξάρτητα. Παραλλαγές σε δύο γονίδια, *COL8A2* και *TCF4* έχουν δείξει σταθερή συσχέτιση με την FECD. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *COL8A2* προκαλούν μερικές περιπτώσεις πρώιμης έναρξης FECD [161]. Η πρώιμη έναρξη της FECD είναι σπάνια [156] και τυπικά κληρονομείται ως αυτοσωματική κυρίαρχη ασθένεια με υψηλή διεισδυτικότητα και σχεδόν ομοιόμορφη έκφραση. Η συχνότερη FECD όψιμης έναρξης μπορεί να είναι είτε οικογενής, είτε σποραδική, με εμφάνιση συνήθως μετά την ηλικία των 40 ετών [51]. Η οικογενής FECD όψιμης έναρξης δείχνει μια αυτοσωματική κυρίαρχη κληρονομικότητα με υψηλή διεισδυτικότητα αλλά μεταβλητή έκφραση [150]. Κοινές παραλλαγές που δεν κωδικοποιούν, στο *TCF4* δείχνουν ισχυρή συσχέτιση με την ασθένεια. Πρόσφατα σε πολλές μελέτες αναφέρθηκε ότι ο πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) στο *TCF4* (rs613872) που υπάρχει στο ιντρόνιο 3 συσχετίζεται σημαντικά με FECD όψιμης έναρξης [116,118,122,150].

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δύο συσχετιζόμενα γονίδια με την FECD. Τα γονίδια *COL8A2*, και *TCF4* SNP rs613872 με διαλογή Ελλήνων ασθενών με FECD και υγιών, μία μελέτη που πραγματοποιείται για πρώτη φορά στον ελληνικό πληθυσμό.

Σκοπός της εργασίας ήταν:

α) η ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου για την γονοτύπηση του πολυμορφισμού rs613872 του *TCF4* γονιδίου με τη χρήση πραγματικού χρόνου PCR και ανάλυση καμπυλών τήξης. Σύγκριση με τη μέθοδο αναφοράς DNA Sequencing.

β) η ανάπτυξη μιας μεθόδου DNA Sequencing κατά Sanger για την ανίχνευση των μεταλλάξεων L450W και Q455K στο *COL8A2* γονίδιο.

γ) η εφαρμογή των μεθόδων αυτών σε κλινικά δείγματα ασθενών με ενδοθηλιακή δυστροφία κερατοειδούς Fuchs όψιμης έναρξης και σε δείγματα μαρτύρων, μετά από έγγραφη συναίνεσή τους και απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα.

δ) η επιβεβαίωση της συσχέτισης του πολυμορφισμού rs613872 του γονιδίου *TCF4* με την ενδοθηλιακή δυστροφία κερατοειδούς Fuchs όψιμης έναρξης στον ελληνικό πληθυσμό.

ε) η επιβεβαίωση της έλλειψης συσχέτισης των μεταλλάξεων L450W και Q455K στο γονίδιο *COL8A2* με την ενδοθηλιακή δυστροφία κερατοειδούς Fuchs πρώιμης έναρξης και η διερεύνηση τυχόν άλλων αλλαγών που μπορούν να συσχετίζονται.

στ) η στατιστική ανάλυση των δεδομένων γονοτύπησης με την ασθένεια και τα κλινικά δεδομένα των ασθενών.

Η ανάλυση των πολυμορφισμών με πραγματικού χρόνου PCR και ανάλυση καμπυλών τήξης συνιστά μέθοδο που παρέχει ταχύτητα, ακρίβεια και προσφέρεται για ευρείας κλίμακας κλινική εφαρμογή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

7.1 ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη διεξήχθη υπό την καθοδήγηση του Χ. Κρούπη, επίκουρου καθηγητή Ιατρικής Σχολής Αθηνών στο εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «Αττικόν», στα πλαίσια μεταπτυχιακής ειδίκευσης του Π.Μ.Σ. "Κλινική Βιοχημεία και Μοριακή Διαγνωστική". Στη μελέτη εντάχθηκαν 58 υγιείς εθελοντές και 22 Έλληνες ασθενείς με ενδοθηλιακή δυστροφία κερατοειδούς του Fuchs. Τα δείγματα περιφερικού αίματος συνελέγησαν σε σωληνάρια με αντιπηκτικό EDTA στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Γ. Γεννηματάς» στην Α΄ Πανεπιστημιακή Κλινική του ΕΚΠΑ (Αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Μ. Μόσχου – Λέκτορας κ. Κ. Δρούτσας) την περίοδο 2016-2017 και αποθηκεύτηκαν στους -20°C έως την απομόνωση του DNA. Όλοι οι συμμετέχοντες, κατόπιν αρχικής ενημέρωσης και ενυπόγραφης συγκατάθεσης, αξιολογήθηκαν οφθαλμολογικά και συλλέχθηκε το ιατρικό ιστορικό τους.

Η εκτίμηση των ασθενών περιλάμβανε μέτρηση της οπτικής οξύτητας, παρουσία guttata, μέτρηση πάχους κερατοειδούς, ταξινόμηση με τροποποιημένα κριτήρια κατά Krachmer ≥ 2 και υπάρχουν πληροφορίες αναφορικά με το φύλο και την ηλικία. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τους υγιείς μάρτυρες ίδιας ηλικιακής κατανομής και αναλογίας σε φύλο. Υπογραμμίζεται ότι στη μελέτη συμπεριελήφθησαν υγιείς μάρτυρες στους οποίους η απουσία νόσου πιστοποιήθηκε με οφθαλμολογικό έλεγχο, όμοιο με αυτόν που εφαρμόστηκε και στην ομάδα των ασθενών (clinically relevant controls). Η απομόνωση γενωμικού DNA έγινε σε όλα τα δείγματα από ολικό αίμα (whole blood)

Τα δεδομένα παρουσιάζονται στους ακόλουθους πίνακες 7.1 και 7.2.

Πίνακας 7.1: Ομάδα υγιών μαρτύρων.

A/A	ΟΝΟΜΑ (αρχικά)	ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΟ
C1	A.Φ	87	Θ
C2	B.Σ	68	A
C3	Ω.Σ	72	Θ
C4	Φ.Ι	68	A
C5	Z.N	72	A
C6	Z.X	75	Θ
C7	K.X	79	Θ
C8	K.Δ	68	A
C9	M.Σ	67	Θ
C10	Δ.Ε	68	Θ
C11	X.A	72	Θ
C12	K.T	69	Θ
C13	K.Σ	82	A
C14	A.X	72	Θ
C15	T.M	73	A
C16	Δ.Σ	73	Θ
C17	Δ.Ι	72	A
C18	K.A	67	A
C19	K.A	72	A
C20	A.A	74	Θ
C21	K.Σ	73	Θ
C22	M.Σ	74	Θ
C23	K.Σ	71	Θ
C24	K.Ι	73	A
C25	K.A	70	A
C26	M.E	74	A
C27	N.B	74	Θ
C28	Σ.A	72	Θ

C29	M.Γ	74	Θ
C30	B.Σ	74	A
C31	X.K	52	A
C32	A.Δ	42	Θ
C33	X.Φ	27	Θ
C34	Z.Σ	73	Θ
C35	Σ.Θ	74	Θ
C36	Π.E	71	Θ
C37	B.Σ	74	A
C38	Φ.N	74	A
C39	N.B	84	Θ
C40	Π.X	73	Θ
C41	Σ.X	84	Θ
C42	Δ.E	83	A
C43	T.B	75	Θ
C44	K.Σ	82	A
C45	M.A	78	Θ
C46	Σ.K	81	A
C47	Π.E	75	Θ
C48	Π.X	76	Θ
C49	Δ.Z	77	Θ
C50	Ψ.Π	84	A
C51	K.E	77	Θ
C52	Δ.Γ	79	A
C53	Σ.E	79	Θ
C54	M.K	81	A
C55	Γ.N	84	A
C56	A.N	84	A
C57	Π.Δ	87	A
C58	Π.E	76	Θ

Πίνακας 7.2: Ομάδα FECD ασθενών.

A/A	ΟΝΟΜΑ (αρχικά)	ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΟ
F1	Π.Σ	74	Θ
F2	Π.Ε	73	Θ
F3	Τ.Φ	73	Θ
F4	Δ.Ε	83	Θ
F5	Κ.Κ	61	Α
F6	Γ.Ε	56	Θ
F7	Μ.Σ	70	Α
F8	Κ.Φ	76	Θ
F9	Φ.Α	78	Θ
F10	Π.Ε	72	Θ
F11	Π.Α	71	Θ
F12	Τ.Γ	73	Α
F13	Χ.Κ	78	Α
F14	Μ.Χ	80	Θ
F15	Ζ.Ε	69	Θ
F16	Μ.Π	77	Α
F17	Τ.Ι	72	Α
F18	Κ.Θ	73	Α
F19	Κ.Ι	74	Α
F20	Σ.Θ	79	Θ
F21	Χ.Α	51	Θ
F22	Α.Π	68	Θ

7.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα

7.2.1 Εισαγωγή

Η απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα με τη χρήση τυποποιημένου σετ αντιδραστηρίων (kit) απομόνωσης που βασίζονται σε στήλες συνιστά μια απλή και ταχεία διαδικασία που εμπίπτει στις μεθόδους απομόνωσης DNA στερεής φάσης. Η μέθοδος επιτρέπει την ταυτόχρονη επεξεργασία ικανοποιητικού αριθμού δειγμάτων buffy/ή ολικού αίματος και ποικιλίας ιστών με ταχύτητα και αξιοπιστία ανώτερη μεθόδων υγρής φάσης. Η δυνατότητα χρήσης πλακιδίων 96 βοθρίων, αλλά και αυτοματοποιημένων πλατφορμών επιτρέπει την εφαρμογή της μεθόδου σε μεγάλους αριθμούς κλινικών δειγμάτων.

7.2.2 Αρχή της μεθόδου

Η απομόνωση DNA με τη χρήση στηλών φυγοκέντρησης (spin-columns) QIAamp (QIAGEN, Γερμανία) βασίζεται στην ειδική σύνθεση της μεμβράνης της στήλης, που εμπεριέχει οξειδίο του πυριτίου (silica gel). Το οξειδίο του πυριτίου μπορεί να προσδέσει το DNA κατά αντιστρεπτό τρόπο ανάλογα με την ιονική σύνθεση του περιβάλλοντος. Μετά την κυτταρική λύση και αποικοδόμηση 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 από το οξειδίο του πυριτίου, ενώ οι πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις διαπερνούν τη στήλη. Το προσδεδεμένο DNA εκπλένεται και τέλος εκλούεται με νερό ελεύθερο νουκλεάσης ή με χαμηλής ιονικής ισχύος ρυθμιστικό διάλυμα. Με τον τρόπο αυτό, προκύπτει με ικανοποιητική απόδοση DNA προς χρήση στην PCR ή σε άλλες καθοδικές (downstream) ενζυματικές αντιδράσεις.

7.2.3 Αντιδραστήρια απομόνωσης DNA

- Στήλες QIAamp (Qiagen Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα AL
- Ρυθμιστικό διάλυμα AW1 (αραίωση με προσθήκη απόλυτης αιθανόλης)
- Ρυθμιστικό διάλυμα AW2 (αραίωση με προσθήκη απόλυτης αιθανόλης)
- Ρυθμιστικό διάλυμα AE
- Πρωτεάση (Qiagen, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS

- Αιθανόλη απόλυτη

Αναλώσιμα και εξοπλισμός

- Σωληνάρια φυγοκέντρησης 1,5 ml
- Ακρορύγχη με φίλτρο
- Πιπέτες (Thermo, Fisher USA)
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus, Thermo Fisher, USA)
- Συσκευή Vortex (Fisher, USA)

7.2.4 Πειραματική διαδικασία απομόνωσης DNA

1. Στον πυθμένα ενός σωληναρίου erpendorf 1,5 ml τοποθετούμε 20 μl πρωτεάση
2. Προσθέτουμε 200 μl whole blood.
3. Προσθέτουμε 200 μl ρυθμιστικό διάλυμα AL και αναδεύουμε έντονα για 15 sec.
4. Επωάζουμε στους 56°C για τουλάχιστον 10 min.
5. Φυγοκεντρούμε πολύ σύντομα για να απομακρυνθούν τα σταγονίδια από το καπάκι του σωληναρίου.
6. Προσθέτουμε 210 μl απόλυτη αιθανόλη και αναδεύουμε έντονα για 15 sec. Φυγοκεντρούμε πάλι πολύ σύντομα.
7. Μεταφέρουμε προσεκτικά το μείγμα σε μια QIAamp στήλη, η οποία είναι τοποθετημένη πάνω σε ένα σωληνάριο των 2 ml, χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης. Κλείνουμε το καπάκι της στήλης και φυγοκεντρούμε για 1 min στα 12000xg. Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα νέο καθαρό σωληνάριο των 2 ml (παρέχεται από το kit) και πετάμε το παλιό σωληνάριο που περιέχει το εκλούμενο υγρό.
8. Ανοίγουμε προσεκτικά το καπάκι της στήλης και προσθέτουμε 500 μl ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας AW1 χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης. Κλείνουμε το καπάκι και φυγοκεντρούμε για 1 min στα 12000xg. Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα νέο καθαρό σωληνάριο των 2 ml και πετάμε το σωληνάριο που περιέχει το εκλούμενο υγρό.
9. Ανοίγουμε προσεκτικά το καπάκι της στήλης και προσθέτουμε 500 μl ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας AW2 χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης. Κλείνουμε το καπάκι και φυγοκεντρούμε για 3 min στα 12000xg.

10. Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωληνάριο erpendorf των 1,5 ml (δεν παρέχεται από το kit) και πετάμε το σωληνάριο με το εκλουόμενο υγρό που περιέχει. Ανοίγουμε προσεκτικά το καπάκι της στήλης και προσθέτουμε 150-200 μ l απεσταγμένο νερό. Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και τελική φυγοκέντρηση για 1 min στα 12000xg. Το αποκτηθέν DNA φυλάσσεται στους -20° C.

7.3 Ποσοτικός προσδιορισμός DNA με το φθορισμόμετρο Qubit

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA έγινε με το όργανο Qubit 1.0 (Invitrogen, Thermo Fisher USA) (εικόνα 7.1).



Εικόνα 7.1: Το φθορισμόμετρο Qubit της Invitrogen.

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 εάν 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 μ g/ μ L. Αντίθετα, το Nanodrop υπερέρχει στο ότι δεν απαιτεί τη χρήση κυψελίδων, πρότυπων δειγμάτων και κατάλληλου αντιδραστηρίου, ενώ μπορεί να μετράει υψηλές συγκεντρώσεις χωρίς να χρειάζεται αραιώση.

Αντιδραστήρια / Αναλώσιμα / Εξοπλισμός

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

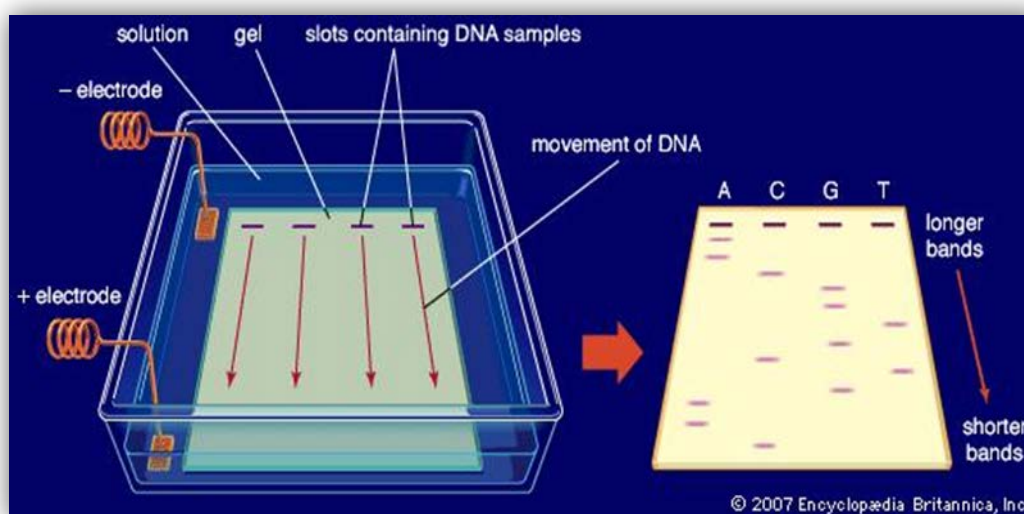
Πειραματική πορεία

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. Επώζονται για 2 min
7. Μετράται ο φθορισμός των προτύπων και άγνωστων δειγμάτων με το φθορισμόμετρο Qubit 1.0

7.4 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) (εικόνα 7.2). Η ταχύτητα μετακίνησης των μορίων DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογαρίθμου του αριθμού των βάσεων τους (\log_{10}).

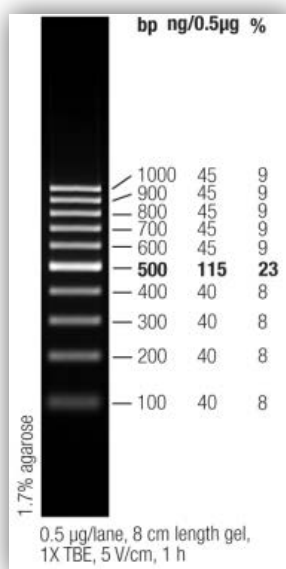
Κατ' αυτόν τον τρόπο, τα μικρότερα μόρια DNA μετακινούνται στην πηκτή πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα και έτσι επιταχύνεται ο διαχωρισμός μορίων διαφορετικού μεγέθους. Επειδή η πηκτή εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μεγέθους διαχωρίζονται σε «ζώνες». Η συγκέντρωση της αγαρόζης που χρησιμοποιείται σε κάθε εφαρμογή εκφράζεται σε %w/v και εξαρτάται από τη διαχωριστική ικανότητα (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 7.2: Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφόρησης (www.britannica.com).

Αντιδραστήρια / Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα 5X TBE (τρις-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 DNA PCR marker (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder) (εικόνα 7.3).
- Χρωστική 6X (loading dye) με κυανό της βρωμοφαινόλης (BPB) και φικόλη
- Πιπέτες των 20 µl και 100 µl
- Ρύγχι 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)



Εικόνα 7.3: Gene Ruler 100 bp DNA Ladder.

Πειραματική πορεία

- 1. Παρασκευή πηκτής αγαρόζης 2%w/v
Για το διαχωρισμό των προϊόντων συμβατικής και Real-Time PCR, για τον έλεγχο επιτυχούς σχεδιασμού εκκινητών και αποδοτικών πρωτοκόλλων, έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v. Η πηκτή παρασκευάζεται με 0,57 g αγαρόζης σε 40 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5X (=> μικρού μεγέθους gel) ή με 1,43 g αγαρόζης σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5X (=> μεγάλου μεγέθους gel). Ακολουθεί ενυδάτωση της αγαρόζης, μέσω ανάδευσης για περίπου 10 min. Κατόπιν θερμάνσεως, μέχρι την πλήρη διάλυση της αγαρόζης, προστίθενται 40 μl ή 100 μl βρωμιούχου αιθιδίου / 4 μl ή 10 μl GelRed (Biotium) / 2-3 μl ή 4-6 μl Midori Green Advance DNA Stain (Bulldog Bio), ανάλογα με το μέγεθος του gel. Η χρήση των δύο τελευταίων χρωστικών μπορεί να αποτελεί ασφαλή εναλλακτική έναντι του μεταλλαξιογόνου βρωμιούχου αιθιδίου, αλλά συνοδεύεται από προβλήματα όπως οι "διάχυτες" ζώνες που δυσκολεύουν την ακριβή παρατήρηση (GelRed) ή η εξασθένιση του φθορισμού υπό την έκθεση της πηκτής στην UV ακτινοβολία (Midori Green Advance DNA Stain).
- 2. Το υγρής μορφής gel τοποθετείται σε ειδική διαμόρφωση ("κασέτα"), παράλληλα με τις δομές ("χτένια") που θα δημιουργήσουν τις μελλοντικές θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων ("πηγαδάκια"), και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min ή έως πήξεως.
- 3. Κατάλληλος όγκος δείγματος (5-10 μl) αναμιγνύεται με χρωστική πλήρωσης (gel loading dye), εάν αυτό απαιτείται, σε αναλογία 6:1. Τα δείγματα τοποθετούνται προσεχτικά στα πηγαδάκια του πηκτώματος αγαρόζης. Παράλληλα με τα δείγματα φορτώνεται πάντα και δείκτης μοριακών βαρών DNA (PCR marker –NEB ή 100 bp ladder - Thermo Fisher Scientific), για τον προσδιορισμό του μεγέθους των PCR προϊόντων αλλά και για την εξακρίβωση επιτυχούς ηλεκτροφορητικής διαδικασίας.
- 4. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE 0,5X (0,5X: διάλυμα αραιωμένο κατά 0,5 φορές) (2M Tris, 1 M βορικό οξύ, 50 mM EDTA), υπό σταθερή τάση 130 V για 20-30 min.
- 5. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές με την επίδραση UV ακτινοβολίας μήκους κύματος 312 nm, λόγω της εκπομπής ακτινοβολίας φθορισμού από την προσδεσμένη στο DNA χρωστική.

7.5 Εκκινητές

7.5.1 Σχεδιασμός εκκινητών

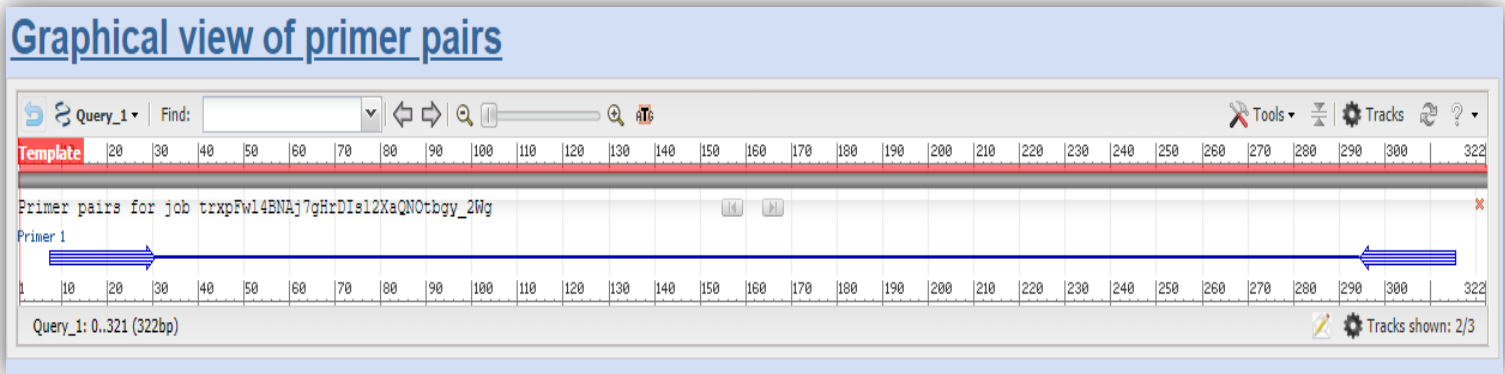
Για τη γονοτύπηση των 22 ασθενών FECD και των 58 υγείων, μέσω Real-Time PCR στο LightCycler, έγινε αρχικά σχεδιασμός εκκινητών (πρόσθιος - forward, F και ανάστροφος - reverse, R).

Βασικοί κανόνες για τον σχεδιασμό PCR εκκινητών:

1. Μήκος εκκινητών: 18 - 22 νουκλεοτίδια (nt)
2. Θερμοκρασία τήξης εκκινητών (T_m): 52 - 60°C
3. Θερμοκρασία υβριδισμού εκκινητών (T_a): $T_a = T_m$ έως ($T_m - 5^\circ\text{C}$), $T_a = 3,3 \times T_m$ (εκκινητή) + 0,7 $\times T_m$ (προϊόντος) - 14,9
4. Περιεκτικότητα σε GC (GC%): 40 - 60%
5. Αποφυγή ύπαρξης ≥ 3 G's - C's στις 5 τελευταίες βάσεις του 3' άκρου των εκκινητών
6. Αποφυγή δευτερογενών δομών (π.χ. δομή φουρκέτας, αυτοδιμερή, ετεροδιμερή)
7. Αποφυγή επανάληψης δινουκλεοτιδίων ή ίδιας βάσης ($\leq 3 - 4$)
8. Αποφυγή συμπληρωματικότητας με άλλα υποστρώματα της αντίδρασης
9. Εξασφάλιση μοναδικότητας υβριδισμού στην επιθυμητή αλληλουχία
10. Μήκος προϊόντος: κλασσική PCR: έως 3 Kb, Real-Time PCR: <400bp και ιδανικά ~100 bp

Για την αξιολόγηση των παραπάνω συνθηκών και την επιτυχή επιλογή εκκινητών και ανιχνευτών αξιοποιήθηκαν αφενός τα διαδικτυακά εργαλεία GenBank, Gene και Blast της NCBI (National Center of Biotechnological Information) και αφετέρου το λογισμικό CLC Sequence Viewer, που επιτρέπει την καλύτερη οπτικοποίηση, σχεδιασμό και αξιολόγηση των αλληλουχιών.

✚ Σχεδιασμός Real-Time PCR εκκινήτων για το γονίδιο *TCF4*



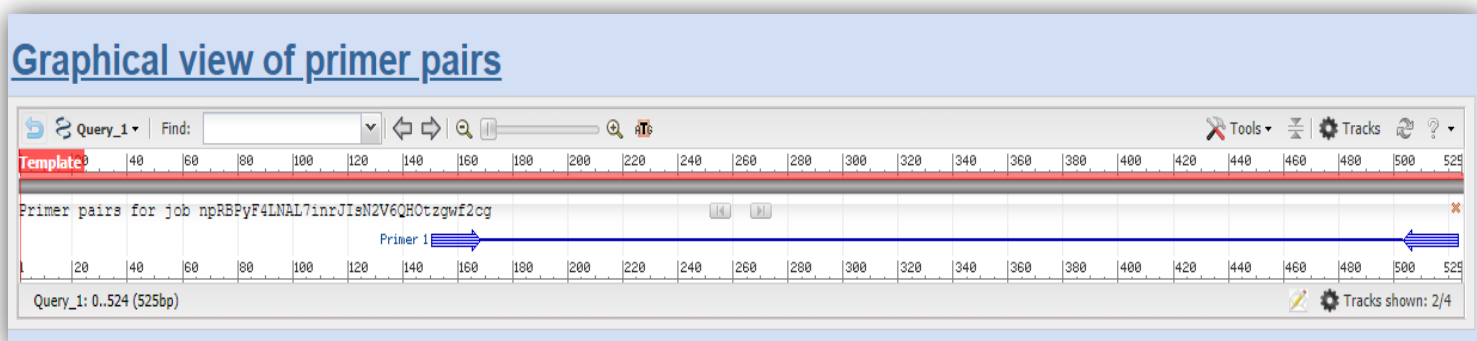
Εικόνα 7.4: Υβριδισμός ζεύγους rs613872 εκκινήτων στο γονίδιο *TCF4*.

Πίνακας 7.3: Χαρακτηριστικά ζεύγους rs613872 εκκινήτων στο γονίδιο *TCF4*.

Ζεύγος εκκινήτων	Αλληλουχία (5' → 3')	Μήκος	Αρχή	Τέλος	Tm	GC %
Πρόσθιος εκκινήτης	CTGCGCTCAGGGTATATAGCTGC	23	8	30	60,62	52,17
Ανάστροφος εκκινήτης	ATGGAAAACAAATCTCCAGG	21	315	295	56,09	42,86
Μήκος προϊόντος	306					

Οι εκκινήτες για το *TCF4* γονίδιο παρασκευάστηκαν από την TIB Molbiol και παρελήφθησαν σε λυοφιλιωμένη μορφή. Ενυδατώθηκαν και οι δύο με 50 μl απεσταγμένο νερό προς συγκέντρωση 100 pmol/μl (stock solution). Παρασκευάστηκαν από αυτά working solution συγκέντρωσης 20 pmol/μl (40 μl H₂O +10 μl από stock solution).

✚ Σχεδιασμός Real-Time PCR εκκινητών για το γονίδιο COL8A2



Εικόνα 7.5: Υβριδισμός ζεύγους εκκινητών στο γονίδιο COL8A2..

Πίνακας 7.4: Χαρακτηριστικά ζεύγους εκκινητών στο γονίδιο COL8A2.

Ζεύγος εκκινητών	Αλληλουχία (5' ⇌ 3')	Μήκος	Αρχή	Τέλος	Tm	GC %
Πρόσθιος εκκινητής	GACCCCTGGACCAACTG	18	151	168	59,24	66,67
Ανάστροφος εκκινητής	GCGATGCCAGTCTCATCGAA	20	523	504	60,53	55,00
Μήκος προϊόντος	375					

Οι εκκινητές για το γονίδιο *COL8A2* παρασκευάστηκαν από την Eurofins Genomics και παρελήφθησαν σε λυοφιλοποιημένη μορφή. Ενυδατώθηκαν με απεσταγμένο νερό προς συγκέντρωση 100 pmol/μl ως εξής: Πρόσθιος εκκινητής προσθήκη 723 μl H₂O / Ανάστροφος εκκινητής 668 μl H₂O (stock solution). Παρασκευάστηκαν από αυτά working solution συγκέντρωσης 20 pmol/μl (40 μl H₂O +10 μl από stock solution).

7.5.2 Επαλήθευση εκκινητών.

Η επαλήθευση των Real-Time εκκινητών και εύρεση κατάλληλων πειραματικών συνθηκών για αξιόπιστη ποσοτική ενίσχυση με το σωστό μέγεθος PCR προϊόντος και χωρίς παραπροϊόντα έγινε, αρχικά, μέσω συμβατικής PCR δειγμάτων ελέγχου καθώς και ηλεκτροφόρησης των PCR προϊόντων και στη συνέχεια, μέσω PCR-RFLP.

7.5.2.1 Οργανολογία

Για την εκτέλεση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε θερμικός κυκλοποιητής: Primus 25 PCR engine της MWG Biotech, Γερμανίας (εικόνα 7.2).



Εικόνα 7.6: Σχηματική παράσταση του θερμικού κυκλοποιητή Primus 25 της MWG (www.coleparmer.com).

Το όργανο αυτό διαθέτει υποδοχείς για σωληνάρια PCR των 0,2 ml και μπορεί χάρη στα θερμικά Peltier στοιχεία που διαθέτει να υποβάλλει τα δείγματα σε ταχείς κύκλους εναλλαγής θερμοκρασίας μεταξύ 4° 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) που προλαμβάνει την εξάτμιση των δειγμάτων σε υψηλές θερμοκρασίες, και η ταχύτητα της ανόδου θερμοκρασίας (ramp time) είναι 4° C/sec, ενώ της ψύξης 2° C/sec.

7.5.2.2 Συμβατική PCR και PCR-RFLP για το *TCF4* γονίδιο

Ο πολυμορφισμός rs613872 στο γονίδιο *TCF4*, που είναι προς μελέτη αφορά μια μεταστροφή T → G (g.97923 C > A). Για τις ανάγκες της γονοτύπησης ενισχύθηκε περιοχή 306 bp του γονιδίου *TCF4* στη χρωμοσωμική περιοχή 18q21.2 (GenBank accession number : NG_011716.2) με τη χρήση εκκινητών με αλληλουχία που έχει καταγραφεί στον πίνακα 7.3.

Για την ενίσχυση της επιθυμητής περιοχής η PCR έγινε χρήση του ενζύμου MyTaq™ Red Mix της εταιρείας Bioline. Το mix αυτό είναι έτοιμο προς χρήση διάλυμα, το οποίο περιλαμβάνει την My Taq DNA πολυμεράση, dNTPs, MgCl₂ και ρυθμιστικό διάλυμα σε βέλτιστες συγκεντρώσεις, για ικανοποιητική ενίσχυση. Στο mix αυτό προστίθεται DNA και εκκινητές. Το My Taq Red Mix περιέχει μια κόκκινη χρωστική ουσία η οποία επιτρέπει την άμεση φόρτωση των δειγμάτων στη γέλη αγαρόζης και καθιστά δυνατή την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης χωρίς την ανάγκη προσθήκης ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης. Το 1^ο πειραματικό πρωτόκολλο της PCR αντίδρασης σε τελικό όγκο 20 μl αναγράφεται στον πίνακα 7.5. Σε κάθε πείραμα μαζί με τα δείγματα προς μελέτη συμπεριλήφθηκε και ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου για την αντίδραση της PCR (τυφλό δείγμα – blank) το οποίο δεν περιείχε DNA.

Πίνακας 7.5: 1^ο Πειραματικό πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	-	8	-
Πρόσθιος εκκινητής	20 pmol/μl	0,4	0,4 pmol/μl
Ανάστροφος εκκινητής	20 pmol/μl	0,4	0,4 pmol/μl
Red Mix	2X	10	1X
DNA		1,2	

Δοκιμάστηκε και 2^ο πειραματικό πρωτόκολλο συμβατικής PCR σε τελικό όγκο 20 μl με την προσθήκη DMSO και το οποίο αναγράφεται στον πίνακα 7.6

Πίνακας 7.6: 2^ο Πειραματικό πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR με DMSO.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	-	6	-
Πρόσθιος εκκινητής	20 pmol/μl	0,4	0,4 pmol/μl
Ανάστροφος εκκινητής	20 pmol/μl	0,4	0,4 pmol/μl
DMSO		2	
Red Mix	2X	10	1X
DNA		1,2	

Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο ήταν κοινό και για τα 2 πειραματικά πρωτόκολλα - συμβατικές PCR και αναγράφεται στον πίνακα 7.7.

Πίνακας 7.7: 1^ο Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	95°C	6min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	30 sec	40 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	55°C	30 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	30 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	7 min	-

Επίσης δοκιμάστηκαν και τα ακόλουθα 2 θερμοκρασιακά πρωτόκολλα (πίνακες 7.8 και 7.9).

Πίνακας 7.8: 2^ο Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	95°C	6min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	30 sec	40 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	57°C	30 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	30 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	7 min	-

Πίνακας 7.9: 3^ο Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	95°C	6min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	30 sec	40 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	59°C	30 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	30 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	7 min	-

Η ενίσχυση της επιθυμητής περιοχής του *TCF4* δοκιμάστηκε και με συμβατική PCR με τη χρήση του ενζύμου Go Taq® DNA Polymerase της εταιρείας Promega (πίνακες 7.10, 7.11, 7.12). Το ένζυμο αυτό είναι μια Taq DNA πολυμεράση που έχει προπαρασκευαστεί με προσθήκη 50% γλυκερόλης. Σε αντίθεση με το MyTaq™ Red Mix της εταιρείας Bioline, χρειάζεται ξεχωριστή προσθήκη dNTPs, MgCl₂ και buffer (με ήδη υπάρχον MgCl₂ σε συγκέντρωση 7,5 mM για την τελική συγκέντρωση των 1,5 mM σε αντίδραση 1X. Η μη χρήση του 5X Green Go Taq Reaction Buffer έκανε απαραίτητη τη μετέπειτα προσθήκη χρωστικής ώστε να είναι εφικτή η παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης.

Το πειραματικό πρωτόκολλο της PCR αντίδρασης με Promega πολυμεράση σε τελικό όγκο 20 µl αναγράφεται στον πίνακα 7.10. Το ίδιο πειραματικό πρωτόκολλο δοκιμάστηκε και με προσθήκη DMSO και αναγράφεται στον πίνακα 7.11.

Πίνακας 7.10: Πειραματικό πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR με Promega πολυμεράση.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (µl)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	-	9,5	-
Buffer- Colorless	5X	4	1X
MgCl ₂	25 mM	1,5	1,875 mM
dNTPs	2 mM	2	0.2 mM
GoTaq	5 U/µl	0,2	0,05 U/µl
Πρόσθιος εκκινητής	20 pmol/µl	0,4	0,4 pmol/µl
Ανάστροφος εκκινητής	20 pmol/µl	0,4	0,4 pmol/µl
DNA		2,0	

Πίνακας 7.11: Πειραματικό πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR με Promega πολυμεράση και DMSO.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	-	9,5	-
DMSO		2	
Buffer	5X	4	1X
MgCl ₂	25 mM	1,5	1,875 mM
dNTPs	2 mM	2	0,2 mM
GoTaq	5 U/μl	0,2	0,05 U/μl
Πρόσθιος εκκινητής	20 pmol/μl	0,5	0,4 pmol/μl
Ανάστροφος εκκινητής	20 pmol/μl	0,5	0,4 pmol/μl
DNA		2,0	

Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο ήταν κοινό και για τα 2 πειραματικά πρωτόκολλα - συμβατικές PCR και αναγράφεται στον πίνακα 7.12.

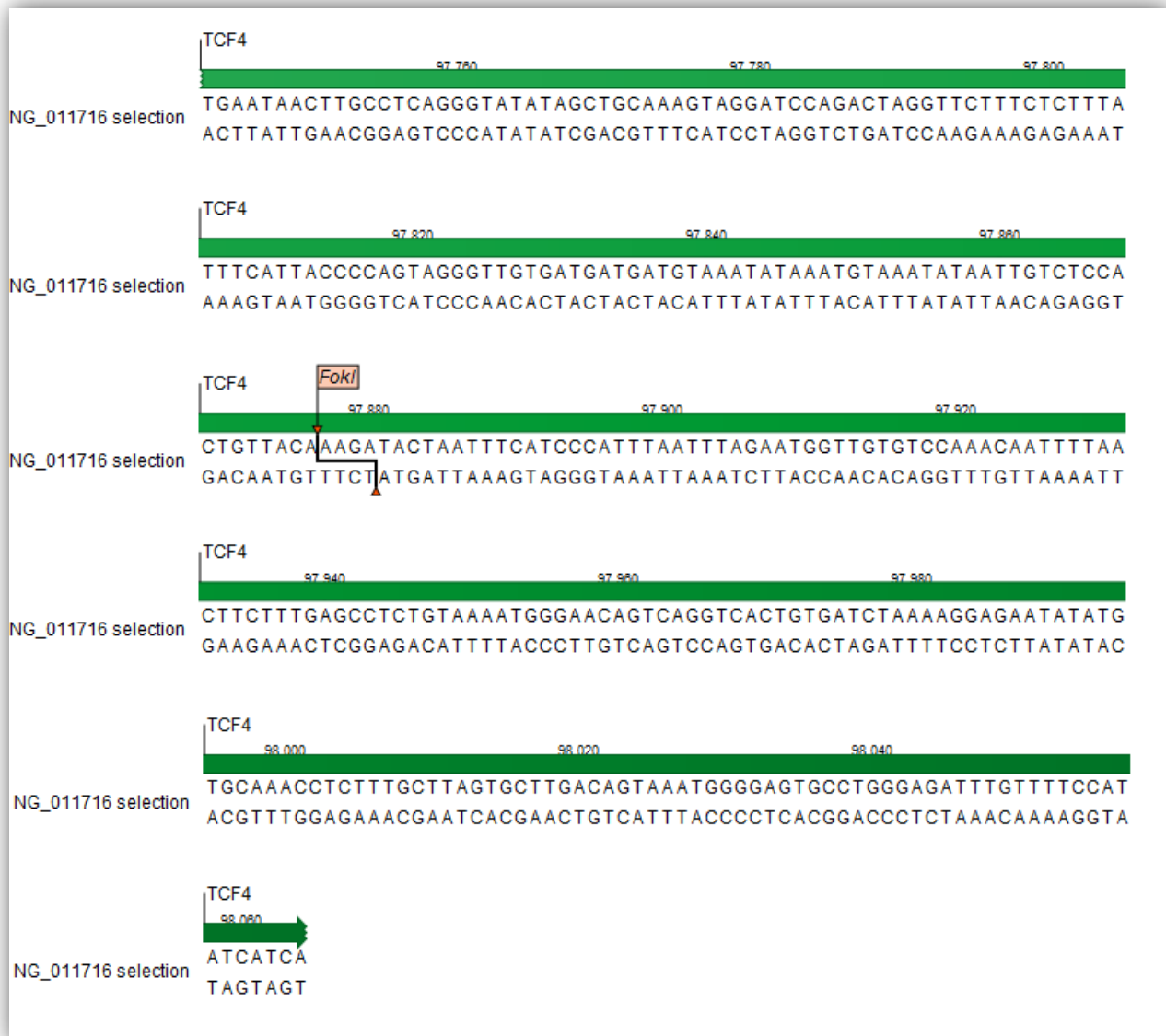
Πίνακας 7.12: Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	95°C	6min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	30 sec	40 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	59°C	30 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	30 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	7 min	-

Όλα τα προϊόντα των συμβατικών PCR που πραγματοποιήθηκαν ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 2% w/v για την επιβεβαίωση απόκτησης των επιθυμητών PCR προϊόντων. Ο χρόνος της ηλεκτροφόρησης ήταν 40 λεπτά.

7.5.2.2.1 Πέψη των PCR προϊόντων για το *TCF4* γονίδιο.

Για την ενζυματική πέψη των προϊόντων της PCR έγινε χρήση του περιοριστικού ενζύμου FokI της NEB – New England Biolabs. Το αναμενόμενο σήμα πέψης επί της ενισχυμένης *TCF4* περιοχής εντοπίζεται με το λογισμικό (CLC Sequence Viewer 6 – Qiagen Bioinformatics).



Εικόνα 7.7 : Η θέση τομής της περιοριστικής ενδονουκλεάσης Fok I επί της ενισχυμένης περιοχής του γονιδίου *TCF4*.

Το ένζυμο αυτό προέρχεται από το *Flavobacterium okeanokoites* και δρα βέλτιστα σε θερμοκρασία 37°C. Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου σε δίκλωνο DNA αναγράφεται στην εικόνα 7.8.



Εικόνα 7.8: Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου *FokI*.

Η επώαση γίνεται με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 1 1/2 ώρες και πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 20 μl, το οποίο φαίνεται στον πίνακα 7.13 και περιμένουμε να κόψει το προϊόν σε 2 κομμάτια 127 και 188 bp αντίστοιχα.

Πίνακας 7.13: Πρωτόκολλο ενζυμικής πέψης του ενισχυμένου γονιδιακού τμήματος του *TCF4*.

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος (μl)
Ένζυμο FOK1 (5 U/μl) αραιωμένο με γλυκερίνη σε αναλογία 1/2 (2,5 U/μl)	0,3
Buffer cutsmart	2
H ₂ O	2,7
PCR προϊόν	15

Μετά την επώαση τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v. Ο χρόνος της ηλεκτροφόρησης ήταν 40 λεπτά.

7.5.2.3 Συμβατική PCR και PCR-RFLP για το COL8A2 γονίδιο

Στο γονίδιο COL8A2 υπάρχουν δύο πολυμορφισμοί που είναι προς εξέταση. Ο rs80358192 που αφορά μια μεταστροφή (g.31753T>G)[L450W]. Ο επόμενος πολυμορφισμός rs80358191 αφορά μια μεταστροφή (g.31767C>A)[Q455K]. Για τις ανάγκες της γονοτύπησης ενισχύθηκε μια περιοχή 373 bp του γονιδίου COL8A2 στη χρωμοσωμική περιοχή 1p34.3 (GenBank accession number : NG_016245.2), με τη χρήση εκκινητών με αλληλουχία που φαίνεται στον πίνακα 7.14.

Πίνακας 7.14: Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος του COL8A2 γονιδίου.

Πρόσθιος εκκινητής, COL8A2F	3'gacccctggaccaactg5'
Ανάστροφος εκκινητής, COL8A2R	3'gcgatgccagtctcatcgaa5'

Για την ενίσχυση της επιθυμητής περιοχής η PCR έγινε χρήση του ενζύμου MyTaq™ Red Mix της εταιρείας Bioline με την προσθήκη και χωρίς την προσθήκη DMSO. Το πρωτόκολλο της PCR αντίδρασης σε τελικό όγκο 20 μl αναγράφεται στον πίνακα 7.15 και 7.16. Σε κάθε πείραμα μαζί με τα δείγματα προς μελέτη συμπεριλήφθηκε και ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου για την αντίδραση της PCR (τυφλό δείγμα – blank) το οποίο δεν περιείχε DNA.

Πίνακας 7.15: 1^ο Πειραματικό πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	-	8	-
Πρόσθιος εκκινητής	20 pmol/μl	0,4	0,4 pmol/μl
Ανάστροφος εκκινητής	20 pmol/μl	0,4	0,4 pmol/μl
Red Mix	2X	10	1X
DNA		1,2	

Πίνακας 7.16: 2^ο Πειραματικό πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR και χρήση DMSO.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	-	6	-
Πρόσθιος εκκινητής	20 pmol/μl	0,4	0,4 pmol/μl
Ανάστροφος εκκινητής	20 pmol/μl	0,4	0,4 pmol/μl
DMSO		2	
Red Mix	2X	10	1X
DNA		1,2	

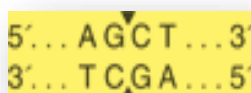
Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε και στα δύο πειραματικά πρωτόκολλα φαίνεται στον πίνακα 7.17.

Πίνακας 7.17: Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	95°C	5min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	30 sec	40 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	55°C	1min	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	1min	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	5 min	

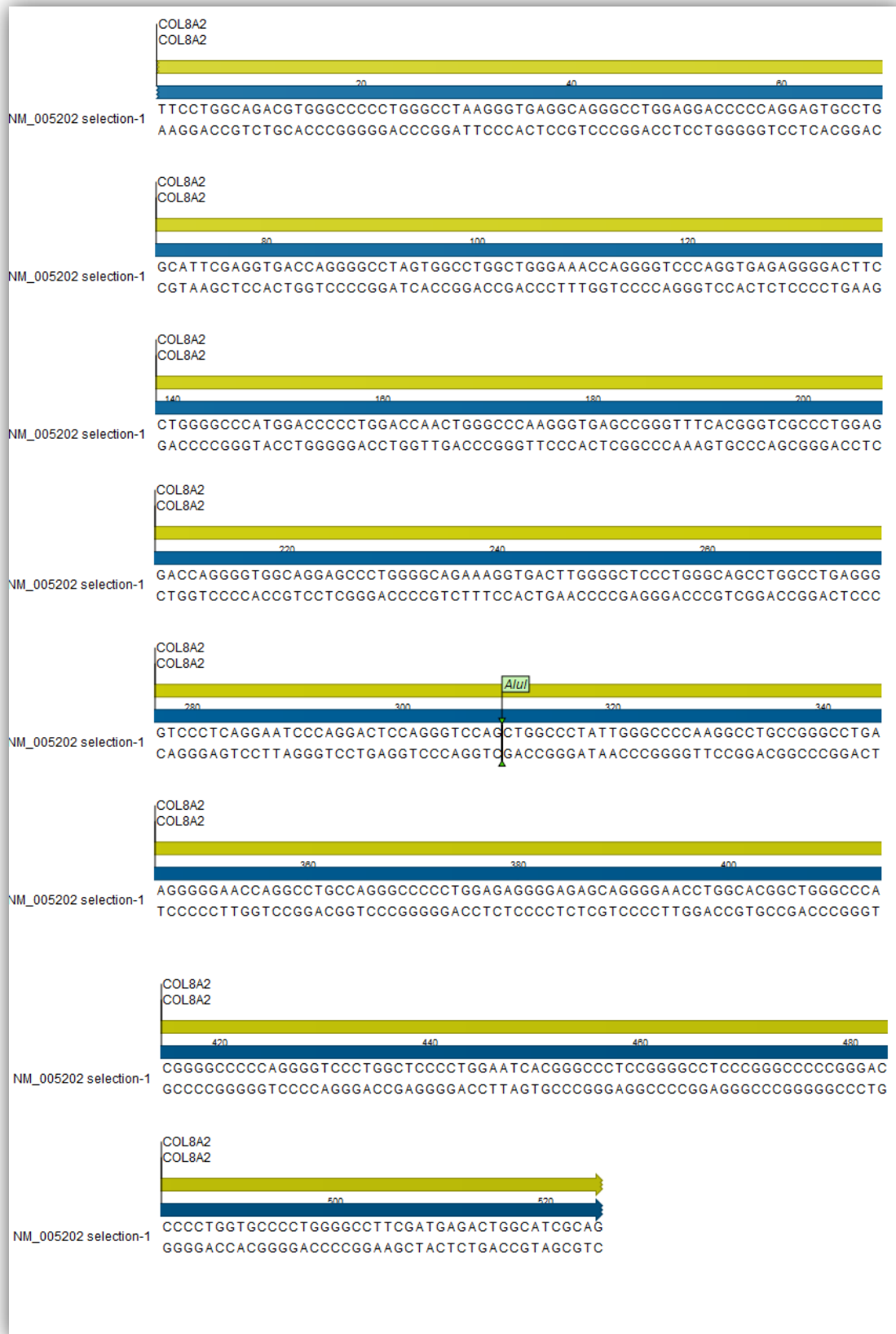
7.5.2.3.1 Πέψη των PCR προϊόντων για το γονίδιο COL8A2.

Για την ενζυματική πέψη των προϊόντων της PCR έγινε χρήση του περιοριστικού ενζύμου AluI της NEB – New England Biolabs. Το ένζυμο αυτό προέρχεται από το *Arthrobacter luteus* και δρα βέλτιστα σε θερμοκρασία 37°C. Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου σε δίκλωνο DNA αναγράφεται στην εικόνα 7.9.



Εικόνα 7.9: Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου AluI

Το αναμενόμενο σήμα πέψης εντοπίζεται με το λογισμικό (CLC Sequence Viewer 6 – Qiagen Bioinformatics).



Εικόνα 7.10: Η θέση τομής της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *Allu1* επί του ενισχυμένου τμήματος του COL8A2 γονιδίου.

Η επώαση γίνεται με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 1 1/2 ώρες και πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 20 μl, το οποίο φαίνεται στον πίνακα 7.18 περιμένουμε να κόψει το προϊόν σε 2 κομμάτια 159 και 216 bp αντίστοιχα.

Πίνακας 7.18: Πρωτόκολλο ενζυμικής πέψης του γονιδιακού τμήματος του *COL8A2*.

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος (μl)
Ένζυμο <i>AluI</i> (10U/μL)	0,5
Buffer cutsmart	2
H ₂ O	2,5
PCR προϊόν	15

Όλα τα προϊόντα των συμβατικών PCR που πραγματοποιήθηκαν όπως και τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 2% w/v για την επιβεβαίωση απόκτησης των επιθυμητών PCR προϊόντων. Ο χρόνος της ηλεκτροφόρησης ήταν 40 λεπτά.

7.6 Ανάπτυξη μεθοδολογίας Real-Time PCR και ανάλυση καμπυλών τήξης για το *TCF4* γονίδιο.

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 6, η ανάλυση καμπυλών τήξης μετά από ενίσχυση με PCR πραγματικού χρόνου αποτελεί μία αξιόπιστη μέθοδο γονοτύπησης πολυμορφισμών μονού νουκλεοτιδίου που εκμεταλλεύεται τη μεταβολή στη θερμοκρασία τήξης ενός δίκλωνου μορίου DNA, όταν στην αλληλουχία υπάρχει κάποιο λάθος ζευγάρωμα βάσεων (mismatch). Στην παρούσα μελέτη η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση πολυμορφισμού στο *TCF4* γονίδιο.

7.6.1 Οργανολογία – LightCycler

Οι αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου και η ανάλυση καμπυλών τήξης πραγματοποιήθηκαν με το θερμικό κυκλοποιητή LightCycler 1.5 (εικόνα 7.11) της εταιρείας Roche Applied Science. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε υάλινα τριχοειδή (capillaries) τα οποία τοποθετούνται σε ένα περιστρεφόμενο δίσκο (carousel) χωρητικότητας 32 δειγμάτων (εικόνα 7.11).

A.



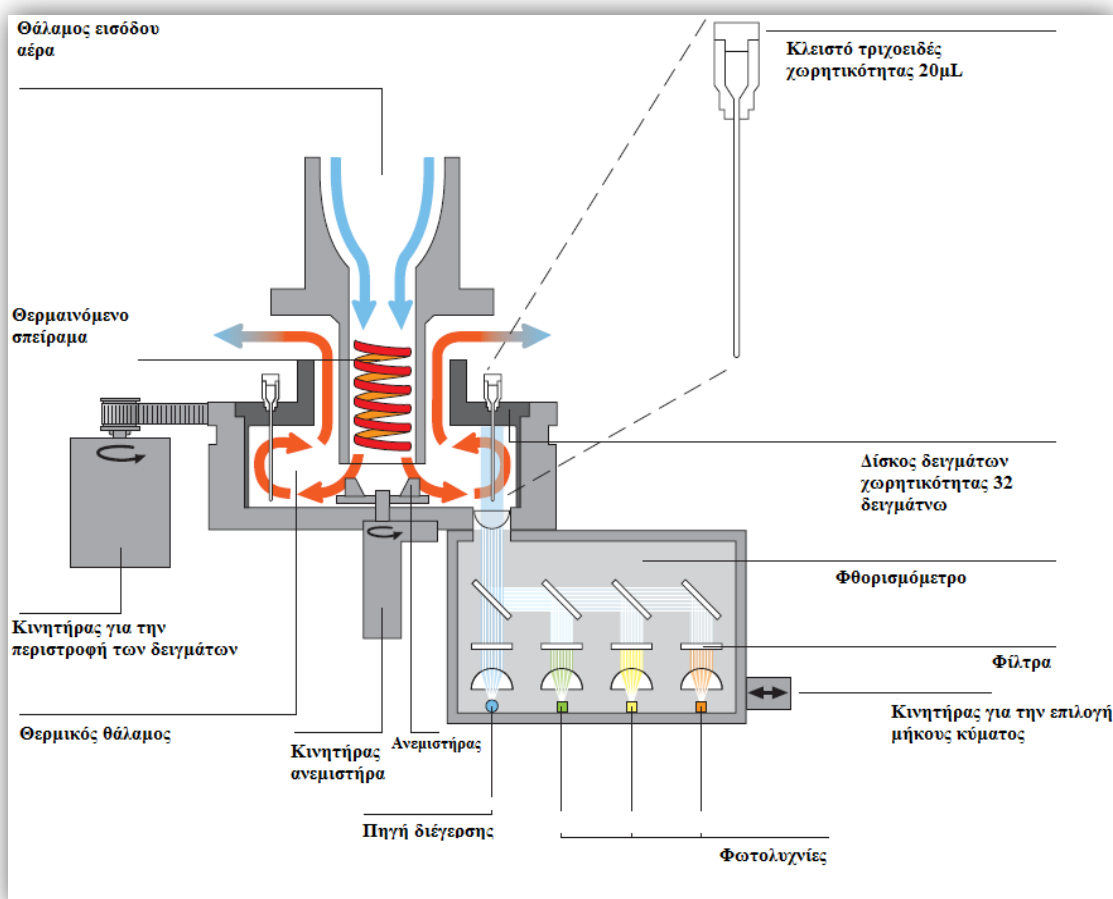
B.



Εικόνα 7.11: A) Το όργανο LightCycler 1.5 B) Η καρουζέλα με χωρητικότητα 32 τριχοειδών.

Σε αντίθεση με τους συμβατικούς θερμικούς κυκλοποιητές που επιτυγχάνουν τη θέρμανση και ψύξη των δειγμάτων με θερμικά block ή με αξιοποίηση του θερμοηλεκτρικού φαινομένου Peltier, στο LightCycler οι θερμοκρασιακές αλλαγές

επέρχονται με μεγάλη ταχύτητα μέσω ροής αέρα διαμέσου των εξαιρετικά λεπτών υάλινων τριχοειδών. Ο αέρας θερμαίνεται από ένα θερμικό σπείραμα με $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ ακρίβεια στην επιτυγχανόμενη θερμοκρασία, ενώ ένας ανεμιστήρας ανακατανέμει τη ροή του αέρα εντός του θερμικού θαλάμου, ώστε να εξασφαλίζονται ταυτόσημες συνθήκες για όλα τα τριχοειδή του περιστρεφόμενου δίσκου (εικόνα 7.12). Τα τριχοειδή, με χωρητικότητα 20 μL , διαθέτουν υψηλό λόγο επιφάνειας προς όγκο, επιτρέποντας γρήγορη εξισορρόπηση της θερμοκρασίας μεταξύ αέρα και δείγματος. Έτσι επιτυγχάνονται γρήγοροι ρυθμοί μεταβολής της θερμοκρασίας που φτάνουν μέχρι και τους 20°C ανά δευτερόλεπτο και επιτρέπουν την τέλεση μιας PCR αντίδρασης 30-40 κύκλων σε σύντομο χρονικό διάστημα 20-30 λεπτών.



Εικόνα 7.12: Σχηματική παράσταση της οργάνολογίας του LightCycler.

Η οπτική μονάδα του LightCycler ανιχνεύει το φθορισμό ανά προγραμματισμένα χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR και κατά συνεχή τρόπο κατά την ανάλυση καμπύλων τήξης. Οι οπτικές ιδιότητες των τριχοειδών τα καθιστούν κατάλληλα για χρήση σαν «κυβέτες» για τις φθορισμομετρικές μετρήσεις. Η οπτική μονάδα διαθέτει τρία κανάλια ανίχνευσης που μετρούν το εκπεμπόμενο φως σε τρία

διαφορετικά μήκη κύματος (530 nm, 640 nm και 710 nm) καθώς και μία δίοδο εκπομπής φωτός (LED: Light Emitting Diode) που δρα ως πηγή διέγερσης. Έτσι οι κυριότερες φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται για την επισήμανση των ανιχνευτών DNA στο όργανο LightCycler είναι η φλουοροσκεΐνη, η LightCycler-Red 640 (LC-Red 640) και η LightCycler-Red 705 (LC-Red 705) με μέγιστα απορρόφησης και εκπομπής που σημειώνονται στον πίνακα 7.19 και αντιστοιχούν στα κανάλια ανίχνευσης F1, F2 και F3:

Πίνακας 7.19: Μέγιστο απορρόφησης και εκπομπής των χρωστικών που χρησιμοποιούνται στο όργανο LightCycler.

	Φλουοροσκεΐνη	LC-Red 640	LC-Red 705
Μέγιστο απορρόφησης	493 nm	625 nm	685 nm
Μέγιστο εκπομπής	525 nm	640 nm	705 nm

Κατά τη μέτρηση του σήματος φθορισμού, ιώδες φως μήκους κύματος 470 nm εκπέμπεται από την πηγή διέγερσης και εστιάζεται στην άκρη του τριχοειδούς, διεγείροντας τα φθορισμοφόρα της αντίδρασης. Κατόπιν ο παραγόμενος φθορισμός κατευθύνεται εκ νέου προς την οπτική μονάδα, όπου μια σειρά φίλτρων και κατόπτρων διαχωρίζει τη φωτεινή ακτινοβολία σε διαφορετικά μήκη κύματος που μετρώνται από τα τρία κανάλια. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων ένας κατάλληλος κινητήρας περιστρέφει κυκλικά το δίσκο με τα δείγματα, έτσι ώστε το άκρο κάθε τριχοειδούς να τοποθετείται ακριβώς στο εστιακό σημείο της φθορισμομετρικής οπτικής. Η βέλτιστη θέση για τη μέτρηση καθορίζεται για κάθε τριχοειδές σε μια «διαδικασία αναζήτησης» (“seek process”) που προηγείται κάθε PCR αντίδρασης.

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

7.6.2 Σχεδιασμός ανιχνευτών

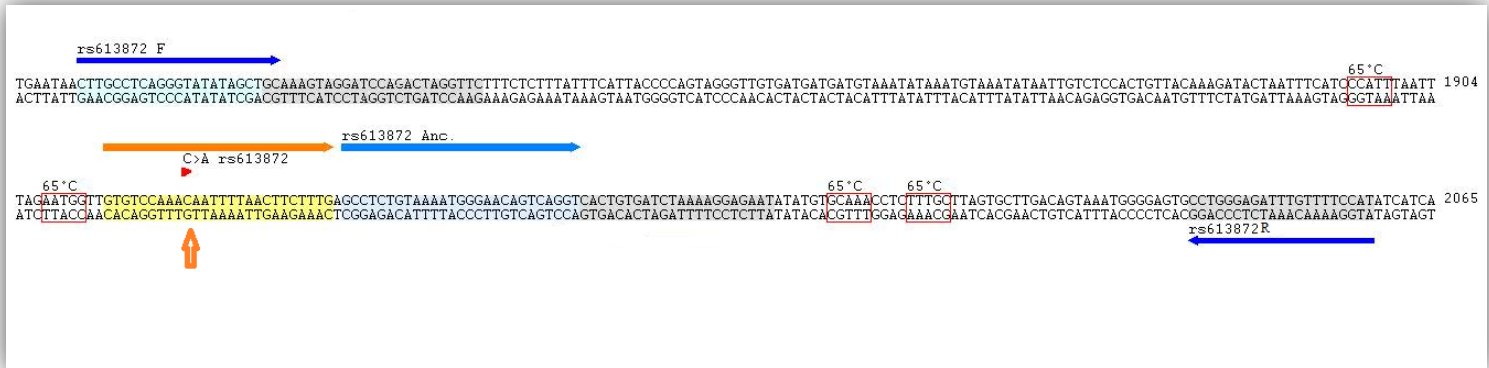
Οι προδιαγραφές που θα πρέπει να τηρούν οι ανιχνευτές υβριδοποίησης πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη κατά τη σχεδίαση ενός πειράματος. Συγκεκριμένα :

- οι ανιχνευτές πρέπει να υβριδίζονται στον ίδιο κλώνο του PCR προϊόντος σε απόσταση 1-5 βάσεων μεταξύ τους
- οι ανιχνευτές δεν πρέπει να περιέχουν επαναλαμβανόμενες, μονότονες ή συμπληρωματικές με τον εαυτό τους αλληλουχίες, συμπλέγματα από βάσεις G και C στα άκρα τους και αλληλουχίες πλούσιες σε βάσεις πουρίνης.
- οι ανιχνευτές δεν θα πρέπει να υβριδίζονται με τους εκκινητές
- οι ανιχνευτές συνιστάται να έχουν σημεία τήξης 5-10°C ψηλότερα από τους εκκινητές.
- το σημείο τήξης του ανιχνευτή που καλύπτει τη μετάλλαξη (mutation probe) επιδιώκεται να είναι 5 °C χαμηλότερο από αυτό του έτερου ανιχνευτή (ανιχνευτής πρόσδεσης – anchor probe).
- η αλληλουχία-στόχος των ανιχνευτών είναι προτιμότερο να είναι μια «ισορροπημένη» περιοχή, να περιλαμβάνει δηλαδή ίσες αναλογίες των τεσσάρων βάσεων και να μην είναι συμπληρωματική με τον εαυτό της, μονότονη ή επαναλαμβανόμενη.

Για την αξιολόγηση των παραπάνω συνθηκών και την επιτυχή επιλογή των ανιχνευτών αξιοποιήθηκαν αφενός τα διαδικτυακά εργαλεία GenBank, Gene και Blast της NCBI (National Center of Biotechnological Information) και αφετέρου το λογισμικό CLC Sequence Viewer (CLCbio, Δανία), που επιτρέπει την καλύτερη οπτικοποίηση, σχεδιασμό και αξιολόγηση των αλληλουχιών.

7.6.2.1 Σχεδιασμός ανιχνευτών για το *TCF4* γονίδιο.

Στην εικόνα 7.13 βλέπουμε το ζεύγος rs613872 ανιχνευτών που σχεδιάστηκαν για το γονίδιο *TCF4*.



Εικόνα 7.13: Υβριδισμός ζεύγος rs613872 ανιχνευτών για το *TCF4* γονίδιο.

Πίνακας 7.20: Χαρακτηριστικά rs613872 ανιχνευτών για το γονίδιο *TCF4*.

Ανιχνευτές	Αλληλουχία	Tm (°C)	Θέση στη GeneBank αλληλουχία NG_011716.2
Ανιχνευτής rs613872[C]	GTGTCCAAACAAATTTAACTTCTTTG--FL	56.2	1915-1940
Ανιχνευτής rs613872[Anc]	GCCTCTGTAAAATGGGAACAGTCAGGT--PH	64.0	1942-1968

Οι ανιχνευτές παρασκευάστηκαν από την TIB Molbiol και προστέθηκαν σε αυτούς 330 μ l H₂O προς τελική συγκέντρωση 3 μ M (stock solution). Από εκεί κατασκευάστηκε ισομερίδια 50 μ l που χρησιμοποιήθηκαν ως working solution για να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις του αρχικού διαλύματος.

7.6.3 Πρωτόκολλο Real-time PCR και ανάλυση καμπυλών τήξης για το *TCF4* γονίδιο.

Ο πολυμορφισμός που εξετάστηκε συνιστά μία μετάπτωση T ⇒G (g.97923C >A) στο ιντρόνιο 3 του γονιδίου *TCF4*. Για τις ανάγκες της γονοτύπησης ενισχύθηκε με real time PCR γενωμικό τμήμα 306 bp στο οποίο προσδένονται ειδικοί ανιχνευτές υβριδισμού (hybrilization dual probes). Το τμήμα αυτό εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 18q21.2 (GenBank accession number: NG_011716.2). Οι αλληλουχίες και οι θερμοκρασίες τήξης (Tm) των ανιχνευτών και εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν τελικά στην real-time PCR για το *TCF4* παρουσιάζονται στον πίνακα 7.21.

Πίνακας 7.21: Οι αλληλουχίες και οι θερμοκρασίες τήξης (Tm) των ανιχνευτών και εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην real-time PCR για το *TCF4* γονίδιο.

Εκκινητής/ Ανιχνευτής	Αλληλουχία	Tm (°C)	Θέση στη GeneBank αλληλουχία NG_011716.2
Πρόσθιος εκκινητής rs613872F	CTTgCCTCAgggTATATAgCTgC	57,9	1751-1773
Ανάστροφος εκκινητής rs613872R	ATggAAAACAAATCTCCCAgg	56.2	2058-2038
Ανιχνευτής rs613872[C]	gTgTCCAAA C AATTTTAACTTCTTT g--FL	56.2	1915-1940
Ανιχνευτής rs613872[Anc]	gCCTCTgTAAAATgggAACAgTCAg gT--PH	64.0	1942-1968

Οι ανιχνευτές είναι επισημασμένοι με φθορίζουσες χρωστικές και προσδένονται σε διάταξη κεφαλή - ουρά στο PCR προϊόν σε απόσταση ενός νουκλεοτιδίου (εικόνα 7.13) ώστε κατά τον υβριδισμό να εκδηλώνεται φαινόμενο FRET και να εκπέμπεται ακτινοβολία. Συγκεκριμένα κατά το στάδιο του υβριδισμού (annealing) το όργανο διεγείρει με ακτινοβολία μήκους κύματος 470 nm τη χρωστική φλουορεσκεΐνη του ανιχνευτή δότη. Η φλουορεσκεΐνη εκπέμπει στη συνέχεια ακτινοβολία που απορροφάται

από την παρακείμενη φθορίζουσα χρωστική LC640 του ανιχνευτή, η οποία και φθορίζει στα 640 nm. Το σήμα του φθορισμού μετράται από το όργανο και καταγράφεται σε διάγραμμα σε συνάρτηση με τους κύκλους της αντίδρασης. Η αντίδραση έγινε με μίγμα πολυμεράσης και μαγνησίου από το kit LightCycler Faststart DNA Master HybProbe της Roche Applied Science (Roche mix παρασκευάστηκε μεταφέροντας 60 μl από vial 1b στο vial 1a). Το τελικό πρωτόκολλο σε τελικό όγκο 10 μl και το τελικό θερμοκρασιακό πρόγραμμα της ενίσχυσης φαίνονται στους πίνακες 7.22 και 7.23. Σε κάθε πείραμα μαζί με τα δείγματα προς μελέτη συμπεριλήφθηκε ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου για την αντίδραση της Real-time PCR το οποίο δεν περιείχε DNA (blank).

Πίνακας 7.22: Τελικό πρωτόκολλο real-time PCR για το *TCF4* γονίδιο.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	-	4.2	-
MgCl ₂	25mM	0.8	3mM
Πρόσθιος εκκινητής rs613872F	20pmol/μl	0.3	0,6pmol/μl
Ανάστροφος εκκινητής rs613872R	20pmol/μl	0.3	0,6pmol/μl
Ανιχνευτής rs613872[C]	3mM	0,8	2,4mM
Ανιχνευτής rs613872[Anc]	3mM	0,8	2,4mM
Roche Mix	10X	1	1X

Πίνακας 7.23: Τελικό θερμοκρασιακό πρόγραμμα real-time PCR για το *TCF4* γονίδιο.

Στάδια PCR	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια	Επανάληψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	95°C	10 min	45 κύκλοι
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	10 sec	
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	59°C	20 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	20 sec	

Μετά την ενίσχυση ακολουθεί πρόγραμμα τήξης κατά το οποίο η θερμοκρασία μετά από αρχική αποδιάταξη στους 95°C, μειωνόταν στους 43°C και σταδιακά αυξανόταν με παράλληλη συνεχή καταγραφή της έντασης του φθορισμού. Η καμπύλη τήξης, η οποία και σχεδιάζόταν αυτόματα από το όργανο, προέκυπτε από την αρνητική πρώτη παράγωγο της συνάρτησης μεταβολής της έντασης του φθορισμού προς τη θερμοκρασία. Ο πίνακας 7.24 συνοψίζει το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της δοκιμασίας τήξης.

Πίνακας 7.24: Τελικό θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυση καμπυλών τήξης για το *TCF4* γονίδιο.

Στάδια ανάλυσης τήξης	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια (min)	Ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας.
1°	95°C	1 min	20°C /sec
2°	43°C	1 min	20°C /sec
3°	80°C	continuing	0.4°C /sec

7.6.4 Καμπύλη βαθμονόμησης

Εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν από τα πειράματα βελτιστοποίησης και οι οποίες αναφέρονται στους πίνακες 7.23, 7.24 και 7.25, έγινε έλεγχος των αναλυτικών χαρακτηριστικών της μεθόδου της Real-time PCR. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με τις πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης που κατασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις 1:10 δείγματος ομοζυγώτη μεταλλαγμένου, επιβεβαιωμένου με DNA sequencing, γνωστής συγκέντρωσης.

Έλεγχος πιστότητας

Συγκεκριμένα μελετήθηκε η επαναληψιμότητα εντός της ίδιας σειράς και η αναπαραγωγιμότητα μεταξύ σειρών, των μεθόδων και υπολογίστηκε η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση και το CV(%).

Έλεγχος γραμμικότητας – απόδοσης

Πραγματοποιήθηκε η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης και προσδιορίστηκε η γραμμικότητα (χάραξη της ευθείας των ελαχίστων τετραγώνων) και η απόδοση της μεθόδου.

Η απόδοση μιας αναλυτικής μεθόδου δίνεται από τον τύπο: $E = 10^{-1/\text{κλίση της ευθείας}}$

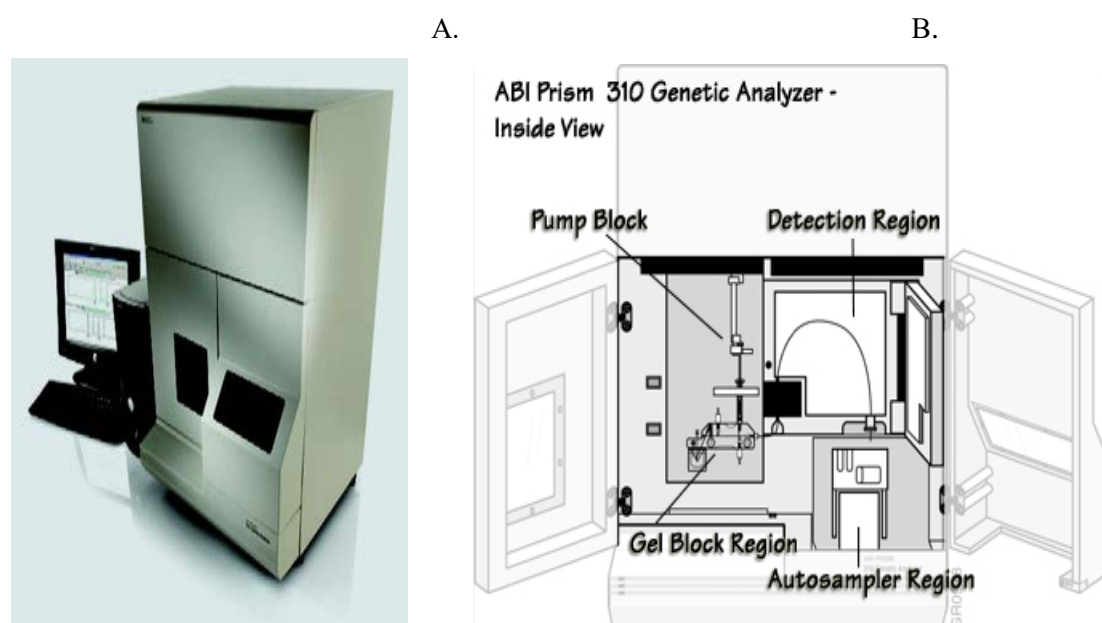
Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection – LOD)

Το όριο ανίχνευσης μιας μεθόδου είναι η ελάχιστη συγκέντρωση μιας παραμέτρου που μπορεί να ανιχνευθεί «αξιόπιστα» από τη μέθοδο αυτή (στο 95% των προσπαθειών).

7.7. Πιστοποίηση PCR προϊόντων: ανάλυση της DNA αλληλουχίας

7.7.1 Οργανολογία

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με το όργανο ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (εικόνα 7.14). Ο γενετικός αναλυτής αυτός είναι ένα αυτοματοποιημένο όργανο για την ανάλυση κλασμάτων DNA τα οποία είναι επισημασμένα με φθορίζουσες ουσίες, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές.



Εικόνα 7.14.: Ο γενετικός αναλυτής ABI Prism 310 A) Εξωτερική άποψη B) Εσωτερική άποψη.

Για την πραγματοποίηση της αλληλούχισης, τα σωληνάρια τοποθετούνται σε δίσκο δειγμάτων (autosampler tray). Ο δίσκος αυτός εν συνεχεία φέρνει κάθε δείγμα σε επαφή με το ηλεκτρόδιο-κάθοδο και το ένα άκρο ενός υάλινου τριχοειδούς που περιέχει πολυμερές. Το ηλεκτρόδιο-άνοδος και το άλλο άκρο του τριχοειδούς είναι βυθισμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer). Καθώς ρεύμα ρέει από την κάθοδο προς την άνοδο, μέρος του δείγματος εισέρχεται στο τριχοειδές, σε μια διαδικασία που καλείται ηλεκτροκινητική έγχυση. Το δείγμα δημιουργεί μια στενή ζώνη μέσα στο τριχοειδές κατά τη διάρκεια της έγχυσης. Το άκρο του τριχοειδούς που βρίσκεται προς την κάθοδο εισέρχεται κατόπιν στο ρυθμιστικό διάλυμα. Ηλεκτρικό ρεύμα εφαρμόζεται εκ νέου, ώστε να συνεχισθεί η ηλεκτροφόρηση. Όταν τα νουκλεοτίδια φθάσουν στο παράθυρο ανίχνευσης μια πηγή laser διεγείρει τις φθορίζουσες χρωστικές ουσίες και ο φθορισμός καταγράφεται κάθε δευτερόλεπτο από μια ψυχή, διπλού

φορτίου κάμερα (charge- coupled device- CCD) με συγκεκριμένου μήκους κύματος ζώνες (εικονικά φίλτρα) και αποθηκεύεται ως ψηφιακό σήμα στον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος για περαιτέρω επεξεργασία. Το Sequence Analysis Software ερμηνεύει τέλως τα αποτελέσματα, αναγνωρίζοντας τις βάσεις από την ένταση του φθορισμού σε κάθε σημείο.

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 γι' 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» εστιασμένα στα 540, στα 570, στα 595, και στα 625 nm. Οι θέσεις των παραθύρων σε κάθε ομάδα εικονικού φίλτρου έχει βελτιστοποιηθεί ώστε να παρέχει το μέγιστο δυνατό διαχωρισμό μεταξύ των κέντρων ανίχνευσης για τις διαφορετικές χρωστικές ενώ διατηρεί καλή ένταση σήματος.

Το Data Collection Software κωδικοποιεί την ένταση και το χρώμα από τις τέσσερις περιοχές συγκέντρωσης του φωτός. Αυτές εμφανίζονται σαν μπλε, πράσινες, μαύρες και κόκκινες κορυφές στα μη επεξεργασμένα δεδομένα. Το Sequence Analysis Software χρησιμοποιεί τα ίδια τέσσερα χρώματα για τα αναλυμένα δεδομένα από όλους τους συνδυασμούς των φίλτρων και των χρωστικών. Η έκθεση των χρωμάτων αναπαριστά τη σχετική, όχι την πραγματική, ανίχνευση των μηκών κύματος. Για σταθερότητα, το λογισμικό συμβολίζει πάντα στα αναλυόμενα δεδομένα το A με πράσινο, το C με μπλε το G με μαύρο και το T με κόκκινο στη ηλεκτροφορογράφημα.

7.7.2 Συνολική πειραματική πορεία

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

- Ενίσχυση του τμήματος DNA με συμβατική PCR
- Καθαρισμός των PCR προϊόντων
- Εφαρμογή της μεθόδου θερμικών κύκλων (Cycle Sequencing) στα κεκαθαμένα PCR προϊόντα

- Καθαρισμός των προϊόντων του Cycle Sequencing και προετοιμασία για εισαγωγή στο ABI Prism 310 Genetic Analyzer
- Αλληλούχιση και λήψη των δεδομένων

7.7.2.1 Ενίσχυση με συμβατική PCR

Η αρχική ενίσχυση με συμβατική PCR των γονιδίων *TCF4* και *COL8A2*, στο όργανο Primus, έγινε με τα πρωτόκολλα και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που αναφέρονται στους πίνακες 7.8 και 7.9, κεφάλαιο 7.5.2.2 για το *TCF4* γονίδιο και στους πίνακες 7.16 και 7.17 κεφάλαιο 7.5.2.3 για το *COL8A2* γονίδιο (2^ο πειραματικό μοντέλο).

7.7.2.2 Καθαρισμός των PCR προϊόντων

Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων έγινε με το προτυποποιημένο σετ αντιδραστηρίων Gel Extraction / PCR clean-up Kit της Macherey-Nagel (Γερμανία). 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 (NTI) το οποίο εξασφαλίζει τις απαραίτητες συνθήκες (υψηλές συγκεντρώσεις άλατος και κατάλληλο pH). Οι προσμίξεις (όπως περίσσεια εκκινητών, άλατα, ένζυμα, μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια, αγαρόζη, χρωστικές, βρωμιούχο αιθίδιο) διαπερνούν την στήλη και απομακρύνονται με εκπλύσεις. Η κάθε στήλη παρέχει αποτελεσματική πρόσδεση PCR προϊόντων μεγέθους μεγαλύτερου των 70 bp. Το DNA μετά την ολοκλήρωση των εκπλύσεων, εκλύεται με 15-30 μl από το διάλυμα έκλουσης (NE).

Αντιδραστήρια / Υλικά

- Στήλες PCR clean-up
- Διάλυμα πρόσδεσης NTI (Binding Buffer)
- Διάλυμα εκπλύσεων (Washing Buffer)
- Διάλυμα έκλουσης NE (Elution Buffer)
- Στείρο νερό (BIOSEP A.E, Ελλάδα)
- Πιπέτες (Thermo, Fisher USA) των 10 μl, 100 μl, 200 μl και 1000 μl
- Ρύγχη των 10 μl, 200 μl και 1000 μl
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus, Thermo Fisher, USA)
- Συσκευή Vortex (Fisher, USA)

- Σωληνάρια τύπου erpendorfs των 1,5 ml
- Σωληνάρια συλλογής των 2 ml (Collection Tubes)

Πειραματική πορεία

1. Προσθέτουμε δις απεσταγμένο ύδωρ στο δείγμα μέχρι τελικού όγκου 50 μl.
2. Σε κάθε δείγμα (των 50 μl) προσθέτουμε 100 μL διάλυμα πρόσδεσης NTI, αναδεύουμε έντονα και φυγοκεντρούμε σύντομα.
3. Εισάγουμε μια στήλη PCR clean-up σε ένα σωληνάριο συλλογής. Μεταφέρουμε το δείγμα του δεύτερου βήματος στο επάνω μέρος της στήλης και φυγοκεντρούμε για 30 sec στα 11000xg.
4. Πετάμε το διήθημα και τοποθετούμε την στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο.
5. Προσθέτουμε 700 μl διάλυμα εκπλύσεων στη στήλη και φυγοκεντρούμε για 30 sec στα 11000xg.
6. Πετάμε το διήθημα και τοποθετούμε την στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο.
7. Προσθέτουμε 700 μl διάλυμα εκπλύσεων στη στήλη και φυγοκεντρούμε για 30 sec στα 8000xg.
8. Πετάμε το διήθημα και τοποθετούμε την στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο και φυγοκεντρούμε στα 11000xg για ένα επιπλέον λεπτό, για την αποξήρανση της μεμβράνης πυριτίου.
9. Πετάμε το σωληνάριο συλλογής με το διήθημα και τοποθετούμε την στήλη σε ένα καθαρό erpendorf των 1.5 ml.
10. Για την έκλυση του DNA, προστίθενται 15-30 μl διαλύματος έκλυσης NE. Ύστερα από διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min, φυγοκεντρούμε στα 11000xg για 1 min. Τα αποκτηθέντα προϊόντα διατηρούνται στους 4°C.

7.7.2.3 Αντίδραση θερμικών κύκλων (Cycle Sequencing).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η αντίδραση των θερμικών κύκλων είναι παρόμοια με αυτή της PCR. Τα περισσότερα συστατικά που χρησιμοποιούνται είναι τα ίδια με αυτά της PCR και ακολουθείται η ίδια διαδικασία με θερμικούς κύκλους. Μια διαφορά είναι ότι μόνο ένας εκκινητής χρησιμοποιείται σε κάθε αντίδραση cycle sequencing (είτε ο πρόσθιος είτε ο ανάστροφος), με αποτέλεσμα η ενίσχυση του προϊόντος να είναι γραμμική και όχι εκθετική. Μια άλλη διαφορά είναι ότι τα ddNTPs που χρησιμοποιούνται 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 7.26 καταγράφονται τα συστατικά της αντίδρασης cycle sequencing και στον πίνακα 7.27 το ακολουθούμενο θερμοκρασιακό πρόγραμμα.

Πίνακας 7.26: 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 7.27: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα Cycle Sequencing.

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

7.7.2.4 Καθαρισμός των προϊόντων του Cycle Sequencing

Ο καθαρισμός των προϊόντων του Cycle Sequencing έγινε, κυρίως, 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, νουκλεοτιδία, 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
- Ρύγχη των 200 μl και 1000 μl
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus, Thermo Fisher, USA)
- Στείρο νερό (BIOΣΕΡ Α.Ε, Ελλάδα)
- Συσκευή Vortex (Fisher, USA)
- Σωληνάρια τύπου eppendorfs των 1,5 ml
- Στήλες NucleoSEQ (Macherey-Nagel, Γερμανία)

Πειραματική πορεία

1. Φυγοκέντρηση των στηλών NucleoSEQ για 30 sec στα 750xg για να συλλεχθεί στον πυθμένα, η πηκτή που βρίσκεται σε σκόνη μέσα στις στήλες.
2. Προσθήκη 600 μl στείρου νερού και έντονη ανακίνηση ώστε να ενυδατωθεί το gel. Αφαιρούνται οι φυσαλίδες κάνοντας vortex.
3. Επώαση τουλάχιστον 30 min ή ολονύκτια. 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. Αφαιρούμε το πώμα που βρίσκεται στον πυθμένα της στήλης και τοποθετούμε τη στήλη μέσα στο δοχείο συλλογής.
4. Φυγοκέντρηση για 2 min στα 750xg για να αφαιρεθεί το διάλυμα αποθήκευσης που περισεύει. Πετάμε το δοχείο συλλογής με το διάλυμα και τοποθετούμε τη στήλη σε σωληνάριο τύπου eppendorfs των 1,5 ml.

5. Ανοίγουμε το καπάκι της στήλης. Προσεκτικά φορτώνουμε το δείγμα στο κέντρο του gel χωρίς να διαταράξουμε την επιφάνειά του. Βάζοντας 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 μ l.

6. Φυγοκέντρωση της στήλης για 4 – 6 min στα 750xg. Πετάμε τη στήλη, ξηραίνουμε το δείγμα ή το χρησιμοποιούμε απευθείας.

7.7.2.5 Προετοιμασία δειγμάτων για το Sequencing

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

Αντιδραστήρια / Υλικά/ Εξοπλισμός

- Επωαστήρας σωληναρίων (Grant, Αγγλία)
- Πιπέτες (Thermo, Fisher USA) των 100 μ l
- Αποστειρωμένο νερό (BIOΣΕΡ Α.Ε, Ελλάδα)
- Συσκευή Vortex (Fisher, USA)
- Σωληνάρια τύπου erpedorfs των 1,5 ml
- Πολυμερές POP6 (Applied Biosystems, USA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10X (Applied Biosystems, USA)
- Φορμαμίδιο (Applied Biosystems, USA)
- Σωληνάρια αντίδρασης 0,5 ml (Applied Biosystems, USA)
- Τριχοειδές 47 mm (Applied Biosystems, USA)
- Γενετικός Αναλυτής ABI 310 (Applied Biosystems, USA)

Πειραματική πορεία

1. Τοποθετούμε σε ένα σωληνάριο τύπου Eppendorf των 1,5 ml, 10 μ l από το καθαρό cycle sequencing προϊόν και 10 (ή 15) μ l φορμαμίδιο.

2. Επωάζουμε στους 95°C για 2 min και στην συνέχεια στους 4°C για άλλα 2 min.

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

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν από την αλληλούχιση των προϊόντων της PCR, αναλύθηκαν περαιτέρω με το πρόγραμμα Chromas Lite (Technelysium Pty, Αυστραλία) και

συγκρίθηκαν μέσω του διαδικτυακού εργαλείου BLAST του NCBI με τις θεωρητικά αναμενόμενες προκειμένου να επιβεβαιωθούν.

7.8 Στατιστική επεξεργασία

Αρχικά με το πρόγραμμα SPSS vs 23 (IBM, ΗΠΑ) πραγματοποιήθηκε περιγραφική στατιστική ανάλυση (εύρος, μέσος όρος, διάμεσος, ελάχιστο, μέγιστο) κατανομή ή ποσοστά των μεταβλητών της ηλικίας και του φύλου τόσο στο σύνολο των δειγμάτων (υγιείς μάρτυρες και ασθενείς), αλλά και ξεχωριστά για την κάθε ομάδα. Ακολούθησε ο έλεγχος κανονικότητας της ποσοτικής μεταβλητής της ηλικίας 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 Λογαριθμική Παλινδρόμηση (Binary Logistic Regression) με στόχο την εύρεση ενός μοντέλου που θα προβλέπει το νόσημα με βάση τον *TCF4* γονότυπο και τους παράγοντες του φύλου και της ηλικίας. Ορίστηκαν τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας (p-value) και η στάθμη εμπιστοσύνης στο 0,05.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για τη συσχέτιση της νόσου με τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν με ειδικό λογισμικό SNPStats [223]. 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 κληρονομία.

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 αλληλίο θεωρείται αλληλίο 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 (H_e) και ένα για τον ομοζυγώτη μεταλλαγμένο (V_a). Ο τύπος που περιγράφει το μοντέλο είναι:

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

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 (D_o) ως προς τους φυσιολογικούς. Με βάση την εξίσωση:

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

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:

$$AIC = -2\log L + 2\#parameters$$

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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

8.1 Αποτελέσματα γονοτύπησης.

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της γονοτύπησης για τις ομάδες των υγιών και των ασθενών παρουσιάζονται στους πίνακες 8.1 και 8.2 αντίστοιχα. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων για το κάθε γονίδιο δίδεται ξεχωριστά στη συνέχεια:

Πίνακας 8.1: Αποτελέσματα γονοτύπησης *TCF4* και *COL8A2* γονιδίου για την ομάδα των υγιών μαρτύρων.

A/A	ΟΝΟΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΟ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ
				TCF4	COL8A2
C1	A.Φ	87	Θ	WT	WT
C2	B.Σ	68	A	HETERO + dbSNPrs117826375 NM_001083962.1:c.145+42316G>A	WT
C3	Ω.Σ	72	Θ	WT	WT
C4	Φ.Ι	68	A	WT	WT
C5	Z.N	72	A	WT	WT
C6	Z.X	75	Θ	WT	WT
C7	K.X	79	Θ	HETERO	WT
C8	K.Δ	68	A	WT	WT
C9	M.Σ	67	Θ	WT	WT
C10	Δ.Ε	68	Θ	HETERO	WT
C11	X.A	72	Θ	WT	WT
C12	K.T	69	Θ	WT	WT
C13	K.Σ	82	A	WT	WT
C14	A.X	72	Θ	HETERO	WT
C15	T.M	73	A	HETERO	WT
C16	Δ.Σ	73	Θ	WT	WT
C17	Δ.Ι	72	A	HETERO	WT
C18	K.A	67	A	HETERO	WT
C19	K.A	72	A	HETERO	WT
C20	A.A	74	Θ	WT	WT
C21	K.Σ	73	Θ	WT	WT
C22	M.Σ	74	Θ	HETERO	WT
C23	K.Σ	71	Θ	WT	WT
C24	K.Ι	73	A	HETERO	WT

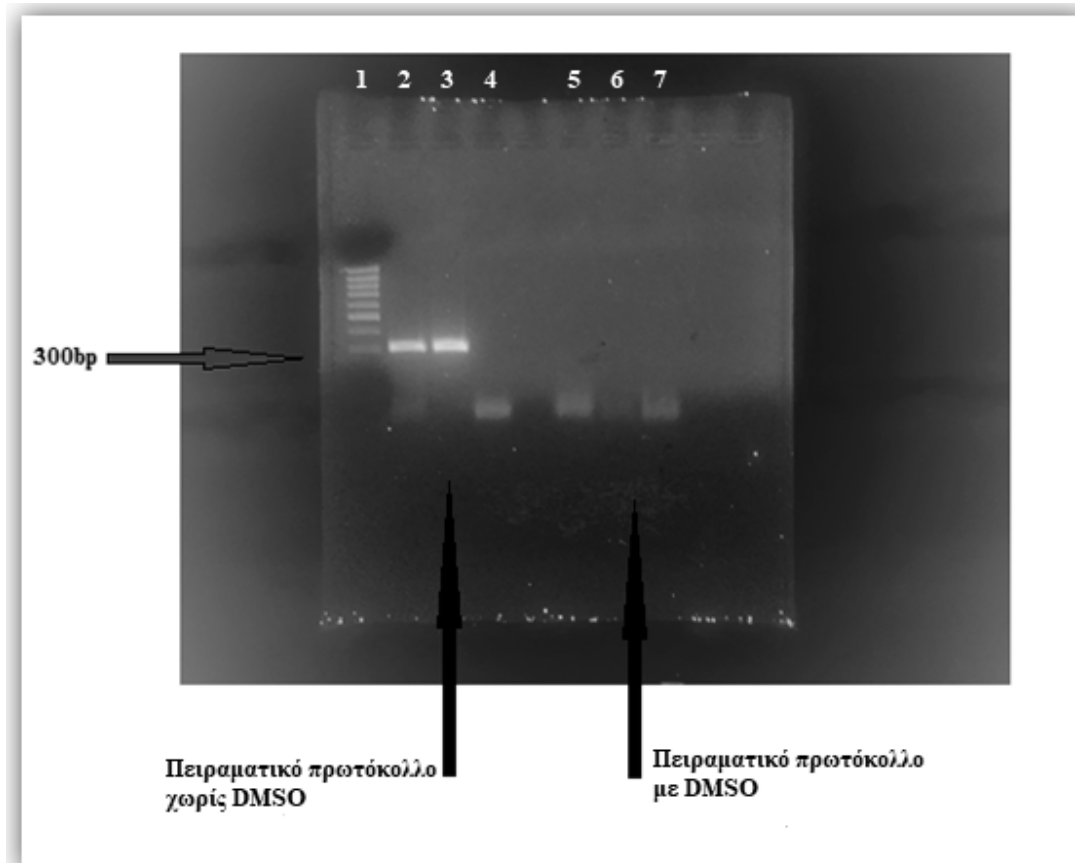
C25	K.A	70	A	HETERO	WT
C26	M.E	74	A	HETERO	WT
C27	N.B	74	Θ	WT	WT
C28	Σ.A	72	Θ	WT	WT
C29	M.Γ	74	Θ	WT	WT
C30	B.Σ	74	A	HETERO	WT
C31	X.K	52	A	WT	WT
C32	A.Δ	42	Θ	WT	WT
C33	X.Φ	27	Θ	WT	WT
C34	Z.Σ	73	Θ	WT	WT
C35	Σ.Θ	74	Θ	WT	WT
C36	Π.E	71	Θ	WT	WT
C37	B.Σ	74	A	WT	WT
C38	Φ.N	74	A	WT	WT
C39	N.B	84	Θ	WT	WT
C40	Π.X	73	Θ	WT	WT
C41	Σ.X	84	Θ	HETERO	WT
C42	Δ.E	83	A	WT	WT
C43	T.B	75	Θ	WT	WT
C44	K.Σ	82	A	WT	WT
C45	M.A	78	Θ	WT	WT
C46	Σ.K	81	A	WT	WT
C47	Π.E	75	Θ	WT	WT
C48	Π.X	76	Θ	HETERO	WT
C49	Δ.Z	77	Θ	WT	WT
C50	Ψ.Π	84	A	WT	WT
C51	K.E	77	Θ	WT	WT
C52	Δ.Γ	79	A	HETERO	WT
C53	Σ.E	79	Θ	WT	WT
C54	M.K	81	A	HETERO	WT
C55	Γ.N	84	A	WT	WT
C56	A.N	84	A	HETERO	WT
C57	Π.Δ	87	A	HETERO	WT
C58	Π.E	76	Θ	HETERO	WT

Πίνακας 8.2: Αποτελέσματα γονοτύπησης *TCF4* και *COL8A2* γονιδίου για την ομάδα των FECD ασθενών.

A/A	ΟΝΟΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΟ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ TCF4	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ COL8A2
F1	Π.Σ	74	Θ	WT	WT
F2	Π.Ε	73	Θ	HOMOZYGOTE dbSNP rs613872 NM_001083962.1:c.145+42.209C>A	WT
F3	Τ.Φ	73	Θ	WT	WT
F4	Δ.Ε	83	Θ	HETERO	WT
F5	Κ.Κ	61	Α	HETERO	WT dbSNP rs35495320 NM_005202.3:c1487G>A→G495G
F6	Γ.Ε	56	Θ	WT	WT
F7	Μ.Σ	70	Α	HETERO	WT
F8	Κ.Φ	76	Θ	HOMOZYGOTE dbSNP rs613872 NM_001083962.1:c.145+42.209C>A	WT
F9	Φ.Α	78	Θ	WT	WT
F10	Π.Ε	72	Θ	HETERO	WT
F11	Π.Α	71	Θ	HOMOZYGOTE dbSNP rs613872 NM_001083962.1:c.145+42.209C>A	WT
F12	Τ.Γ	73	Α	HOMOZYGOTE dbSNP rs613872 NM_001083962.1:c.145+42.209C>A	WT
F13	Χ.Κ	78	Α	HETERO	WT +NM_005202.3:c1491G>A→A497T +dbSNP rs560539803 NM_005202.3:c1526C>A→P508P
F14	Μ.Χ	80	Θ	WT	WT
F15	Ζ.Ε	69	Θ	HETERO	WT
F16	Μ.Π	77	Α	HOMOZYGOTE dbSNP rs613872 NM_001083962.1:c.145+42.209C>A	WT
F17	Τ.Ι	72	Α	WT	WT
F18	Κ.Θ	73	Α	HETERO	WT
F19	Κ.Ι	74	Α	HETERO	WT
F20	Σ.Θ	79	Θ	HOMOZYGOTE dbSNP rs613872 NM_001083962.1:c.145+42.209C>A	WT
F21	Χ.Α	51	Θ	WT	WT
F22	Α.Π	68	Θ	HETERO	WT

8.2 Αποτελέσματα συμβατικής PCR για το *TCF4* γονίδιο

Η συμβατική PCR με τα πρωτόκολλα που αναγράφονται στους πίνακες 7.5 και 7.6 και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που αναγράφεται στον πίνακα 7.7, οδήγησε στην ενίσχυση προϊόντος 307 bp και επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2%.

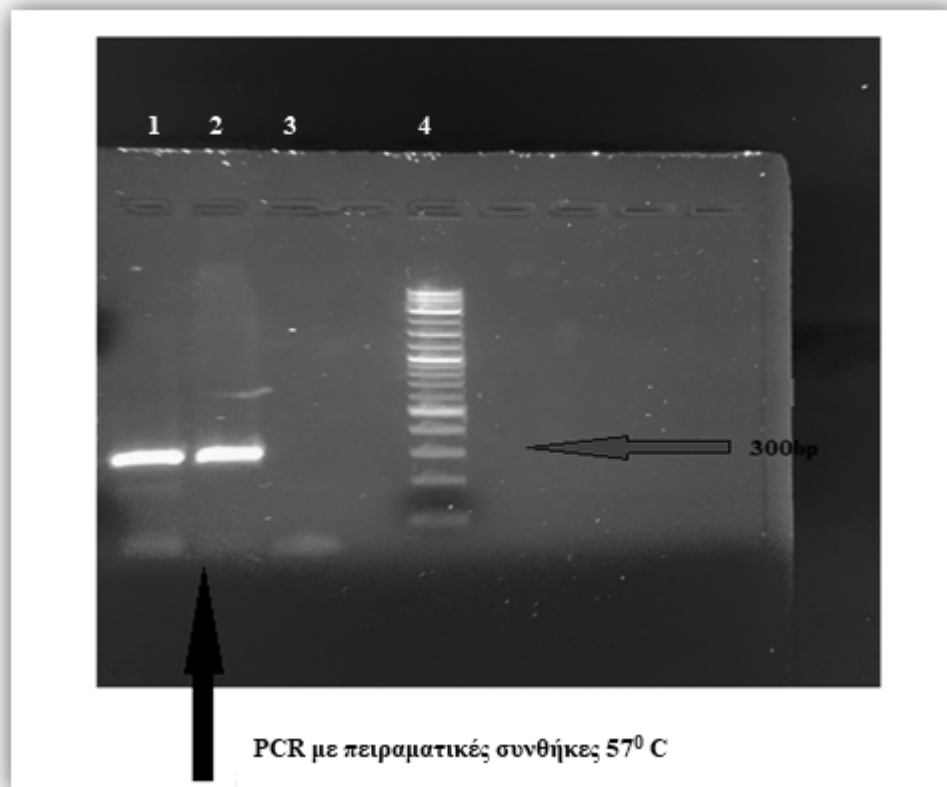


Εικόνα 8.1: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πειραματικού πρωτοκόλλου PCR με και χωρίς DMSO (στη θέση 1 τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους και στις θέσεις 4 και 7 τυφλό δείγμα)

Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Επιβεβαιώθηκε η ενίσχυση της περιοχής 306 bp του γονιδίου *TCF4*. Ενώ το πρωτόκολλο της PCR όπου χρησιμοποιήθηκε DMSO δεν λειτούργησε. Συνεπώς επιλέγεται το πειραματικό πρωτόκολλο χωρίς τη χρήση DMSO και αλλάζοντας το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο (αύξηση της θερμοκρασίας στους 57⁰ C) με στόχο την εξάλειψη των παραπροϊόντων (πίνακας 7.8).

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% w/v διάρκειας 40 λεπτών, για την επιβεβαίωση απόκτησης των επιθυμητών PCR προϊόντων (εικόνα 8.2).

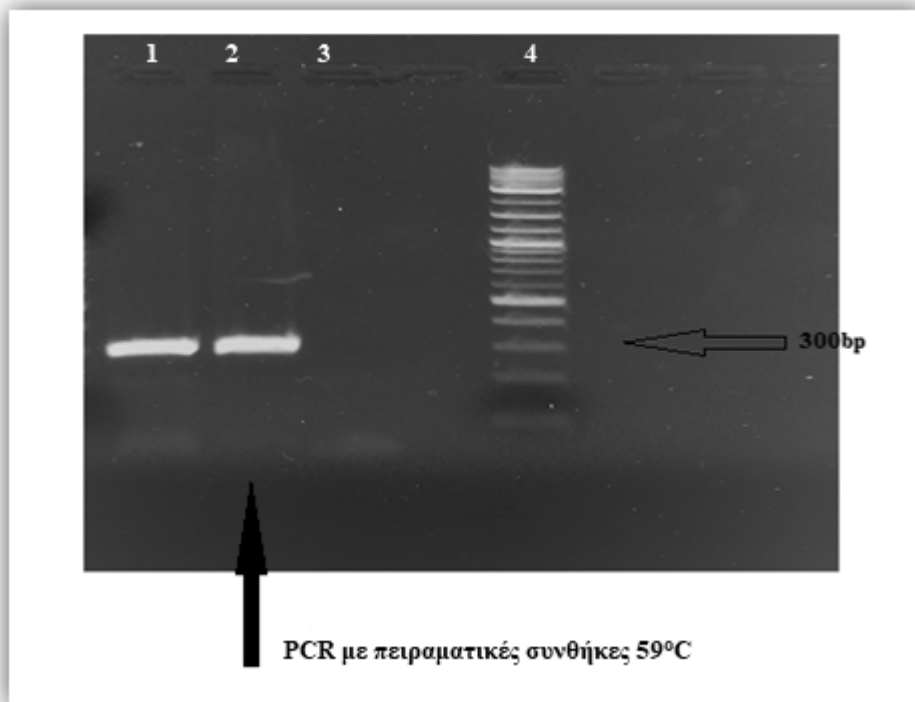


Εικόνα 8.2: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με πειραματικές συνθήκες 57° C ((στη θέση 4 τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους και στη θέση 3 τυφλό δείγμα).

Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Επιβεβαιώθηκε η ενίσχυση της περιοχής 306 bp του γονιδίου *TCF4*. Συνεχίζουμε διατηρώντας το πειραματικό πρωτόκολλο χωρίς τη χρήση DMSO και αλλάζοντας το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο (αύξηση της θερμοκρασίας στους 59°C) με στόχο την εξάλειψη των παραπροϊόντων (πίνακας 7.5, πίνακας 7.9).

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v διάρκειας 40 λεπτών, για την επιβεβαίωση απόκτησης επαρκών επιθυμητών PCR προϊόντων χωρίς παραπροϊόντα (εικόνα 8.3).

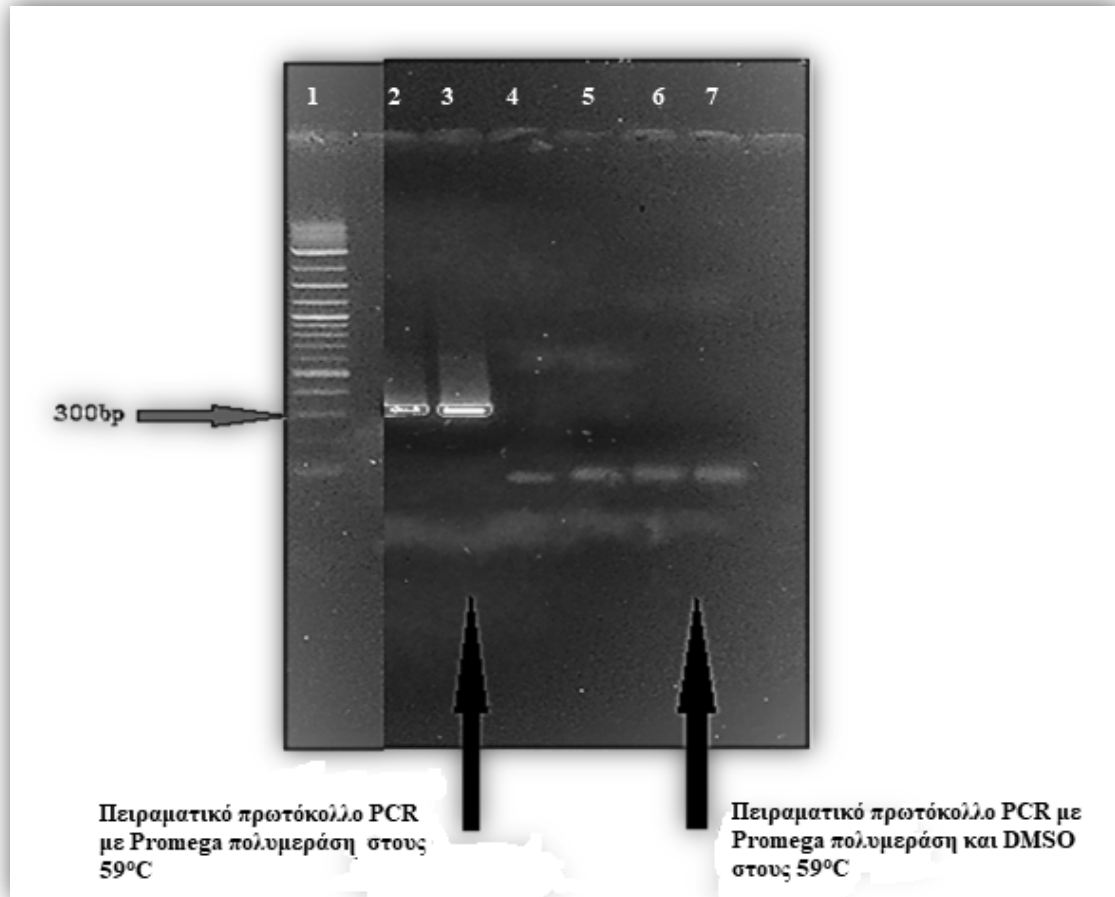


Εικόνα 8.3: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με πειραματικές συνθήκες 59° C ((στη θέση 4 τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους και στη θέση 3 τυφλό δείγμα).

Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Επιβεβαιώθηκε η ενίσχυση της περιοχής 306 bp του γονιδίου *TCF4*. Εξάλειψη των παραπροϊόντων. Το 3^ο πειραματικό μοντέλο επιλέχθηκε ως το βέλτιστο μοντέλο για την εκτέλεση της συμβατικής PCR για το γονίδιο *TCF4* (πίνακας 7.5 και πίνακας 7.9).

Η ενίσχυση της επιθυμητής περιοχής του *TCF4* δοκιμάστηκε και με συμβατική PCR με τη χρήση του ενζύμου Go Taq® DNA Polymerase της εταιρείας Promega (πίνακες 7.11, 7.12, 7.15). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v, διάρκειας 40 λεπτών, για την επιβεβαίωση απόκτησης των επιθυμητών PCR προϊόντων (εικόνα 8.4).



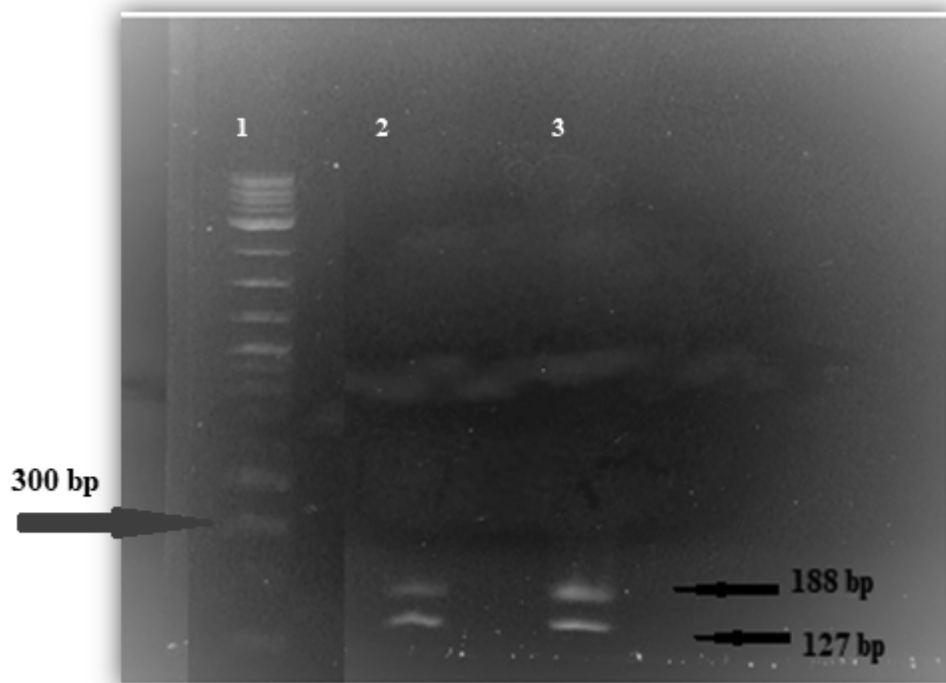
Εικόνα 8.4: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πειραματικού πρωτοκόλλου PCR με Promega πολυμεράση και με και χωρίς DMSO (στη θέση 1 τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους και στις θέσεις 4 και 7 τυφλό δείγμα).

Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Επιβεβαιώθηκε η ενίσχυση της περιοχής 306 bp του γονιδίου *TCF4*. Ενώ το πρωτόκολλο της PCR όπου χρησιμοποιήθηκε DMSO και με αυτό το ένζυμο δεν λειτούργησε. Θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και το πειραματικό πρωτόκολλο που αναγράφεται στους πίνακες 7.10 και 7.11 ως βέλτιστο.

8.3 Αποτελέσματα πέψης των προϊόντων PCR για το *TCF4* γονίδιο

Μετά την επώαση με το περιοριστικό ένζυμο *FokI* τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v για 40 λεπτά (εικόνα 8.5).



Εικόνα 8.5: Εικόνα ηλεκτροφόρησης της ενζυμικής πέψης των PCR προϊόντων με το ένζυμο *FokI* (στη θέση 1 τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους).

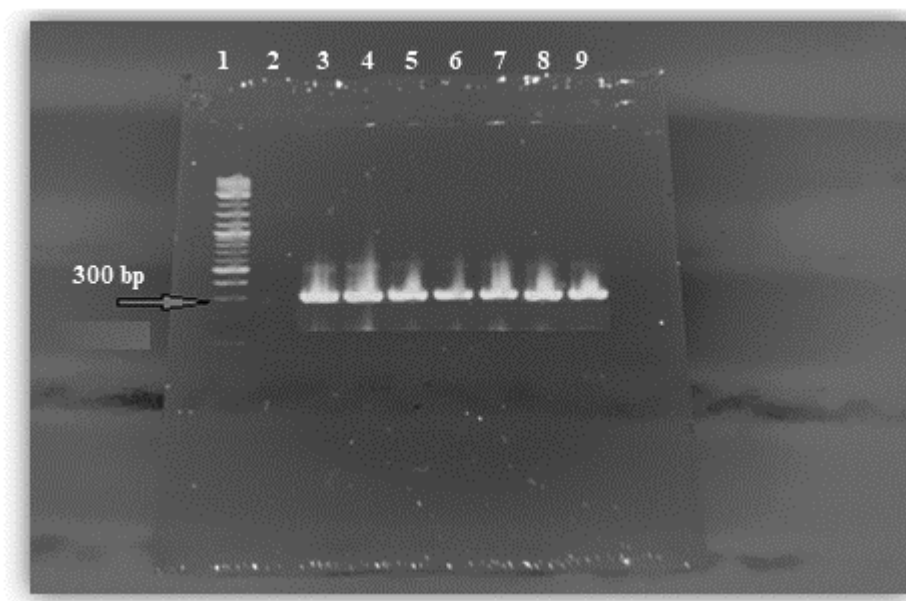
Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Επιβεβαιώθηκε η ενζυματική πέψη των προϊόντων της PCR με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου *FokI* και το προϊόν μας των 306 bp «κόπηκε» σε 2 κομμάτια 184 bp και 127 bp αντίστοιχα όπως αναμένετο.

8.4 Αποτελέσματα γονοτύπησης για τον πολυμορφισμό rs613872 στο *TCF4* γονίδιο

8.4.1 Γονοτύπηση με Real-Time PCR –ανάλυσης καμπυλών τήξης

TCF4 γονοτύπηση έγινε με την μέθοδο Real-Time PCR – ανάλυσης καμπυλών τήξης στους 22 ασθενείς Fuchs και τους 58 υγιείς μάρτυρες, με το βέλτιστο τελικό πρωτόκολλο και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που αναφέρθηκε (πίνακες 7.22, 7.23, 7.24). Επιτεύχθηκε ενίσχυση του επιθυμητού γονιδιακού τμήματος 306 bp, όπως επιβεβαιώθηκε και με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% (εικόνα 8.6).



*Εικόνα 8.6: Επιβεβαίωση της ενίσχυσης του επιθυμητού *TCF4* προϊόντος για τη μεθοδολογία LightCycler.*

8.4.2 Βελτιστοποίηση real-time PCR μεθόδου για το *TCF4* γονίδιο.

Στην παρούσα μελέτη έγιναν πειράματα βελτιστοποίησης των αναλυτικών παραμέτρων της Real-time PCR για το *TCF4* γονίδιο που περιλαμβάνουν τα αντιδραστήρια και τις πειραματικές συνθήκες. Η βελτιστοποίηση της μεθόδου έγινε με τη βοήθεια καμπύλης βαθμονόμησης και ρύθμιση των βασικότερων παραμέτρων κάθε σταδίου. Σε κάθε πείραμα βελτιστοποίησης, όλες οι παράμετροι πλην της ελεγχόμενης διατηρούνταν σταθερές και επιλέγονταν κάθε φορά η τιμή της υπό εξέταση παραμέτρου η οποία προωθούσε τη βελτιστοποίηση της μεθόδου. Στο επόμενο πείραμα γινόταν χρήση των βέλτιστων τιμών που είχαν προκύψει από τα προηγούμενα πειράματα και διερεύνηση

της βέλτιστης τιμής μιας άλλης παραμέτρου. Η επιλογή γινόταν πάντα συγκριτικά εντός του ίδιου πειράματος. Κριτήρια για την αποδοχή της βέλτιστης τιμής των παραμέτρων του πειράματος ήταν:

- Η μείωση του αριθμού των κύκλων στα σημεία τομής (Cq) και η αύξηση της έντασης φθορισμού για τα πρότυπα διαλύματα της καμπύλης βαθμονόμησης (βλέπε 7.6.4).
- Η προσέγγιση στη ιδανική απόδοση $E = 2,00$ μέσω της κλίσης της καμπύλης

Η ακολουθούμενη τακτική έχει ως κύριο πλεονέκτημα την ελαχιστοποίηση των απαιτούμενων πειραμάτων προς την επίτευξη της βελτιστοποίησης των αναλυτικών παραμέτρων, όμως μειονεκτεί διότι δεν εξετάζει την πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ των αναλυτικών παραμέτρων.

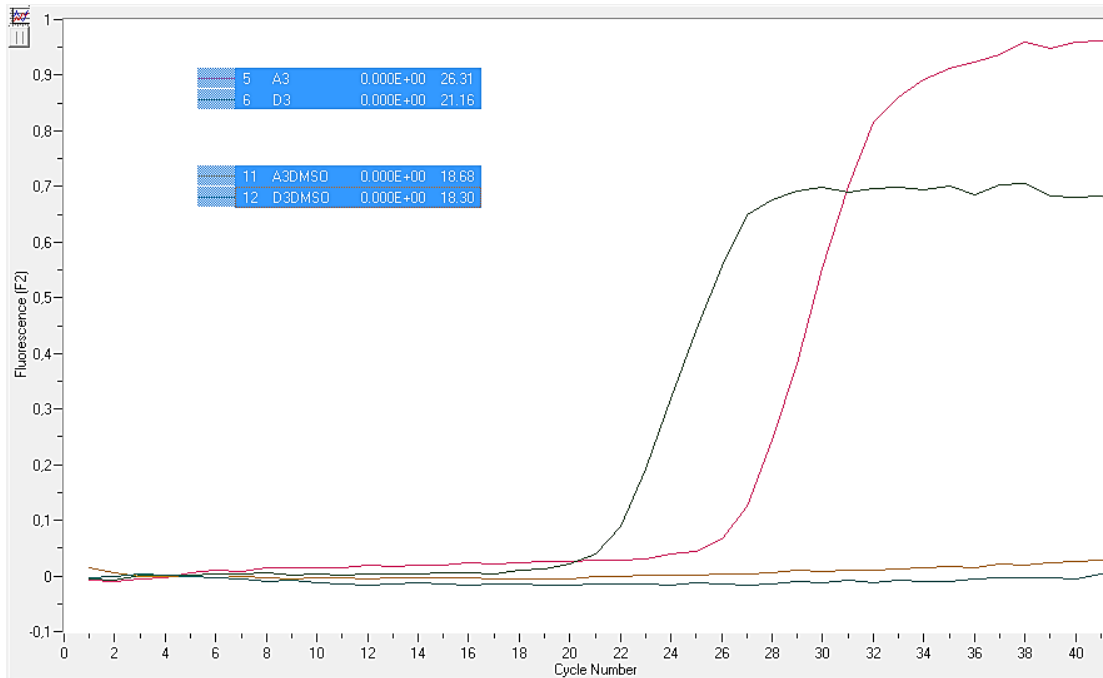
Οι αναλυτικές παράμετροι στις οποίες έγιναν προσπάθειες βελτιστοποίησης ήταν:

- ✓ Η θερμοκρασία υβριδισμού της αντίδρασης
- ✓ Η τελική συγκέντρωση των εκκινητών
- ✓ Η τελική συγκέντρωση των ανιχνευτών
- ✓ Η τελική συγκέντρωση των ιόντων $MgCl_2$
- ✓ Ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης της Real-time PCR

8.4.2.1 Προσπάθειες βελτιστοποίησης της μεθόδου για το *TCF4* γονίδιο.

1. Βελτιστοποίηση της παραγωγής των PCR προϊόντων με τη χρήση DMSO

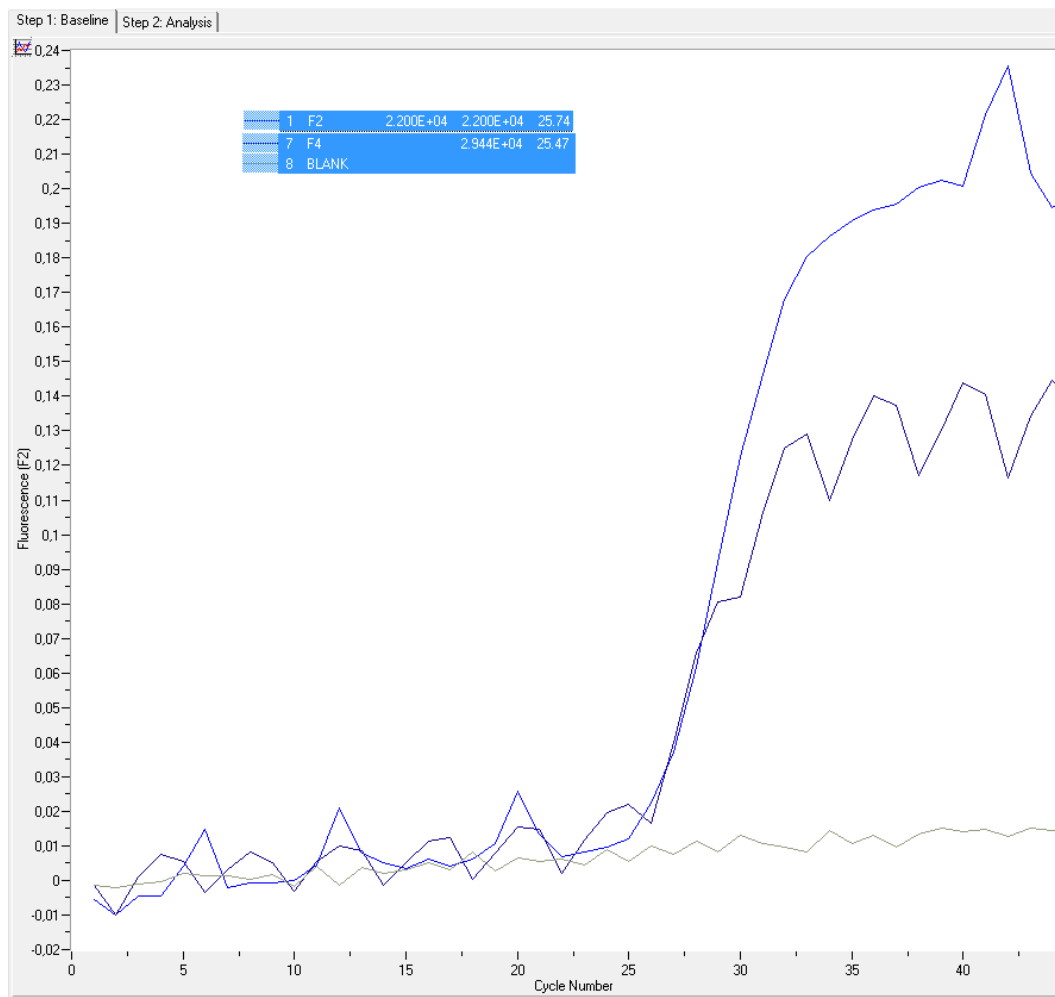
Δοκιμάστηκε real-time PCR στις ίδιες συνθήκες με και χωρίς DMSO. Προσθήκη DMSO (πρέπει να είναι 10% στον ολικό όγκο της αντίδρασης άρα προσθέτουμε 1μl σε ολικό όγκο 10 μl) στο πρωτόκολλο της real-time PCR. Παρόλο που το DMSO αποτελεί σταθεροποιητικό παράγοντα, παρατηρήθηκε ότι το συγκεκριμένο πρωτόκολλο δεν επωφελήθηκε από την δράση του DMSO (εικόνα 8.7).



Εικόνα 8.7: Real-time PCR για TCF4 γονίδιο με και χωρίς DMSO.

2. Βελτιστοποίηση της τελικής συγκέντρωσης ανιχνευτών και εκκινητών.

Εφαρμογή ανάστροφης PCR με αύξηση της συγκέντρωσης του ανάστροφου εκκινητή rs613872R (asymmetric PCR). Η προσθήκη περίσσειας του ανάστροφου εκκινητή έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση περίσσειας της συμπληρωματικής του αλυσίδας, στην οποία και προσδένονται οι ανιχνευτές υβριδοποίησης. Κατ'έπείταση το σήμα φθορισμού που θα προέκυπτε στο στάδιο του υβριδισμού καθώς και η αναλυτική ευαισθησία θα ήταν ισχυρότερα. Όμως όπως παρατηρήθηκε η προσθήκη του ανάστροφου εκκινητή δεν βοήθησε την εξέλιξη της αντίδρασης (εικόνα 8.8).



Εικόνα 8.8: Εφαρμογή ανάστροφης PCR με αύξηση της συγκέντρωσης του ανάστροφου εκκινητή *rs613872R*.

Παράλληλα προκειμένου οι μεθοδολογίες να γίνουν οικονομικά πιο προσιτές, δοκιμάστηκαν διαφορετικές τελικές συγκεντρώσεις ανιχνευτών και εκκινητών σε διαφορετικά πειράματα. Η τελική βέλτιστη συγκέντρωση των εκκινητών καθορίστηκε στα 0,6 pmol/μl και των ανιχνευτών στα 0,24 mM.

3. Βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών της αντίδρασης.

Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών καθορίστηκε στους 59°C, ενώ πραγματοποιήθηκε σύγκριση με θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών στους 55°C, 57°C και 61°C, με σκοπό την ελάττωση της δημιουργίας παραπροϊόντων.

4. Μείωση του χρόνου της επέκταση των εκκινητών

Ο χρόνος επέκτασης των εκκινητών μειώθηκε από τα 30sec στα 20 sec για τον περιορισμό της λανθασμένης υβριδοποίησης των εκκινητών.

5. Αύξηση του αριθμού των κύκλων της Real-time PCR

Οι κύκλοι της Real-time PCR αυξήθηκαν από 40 στους 45 κύκλους, με σκοπό την αύξηση της ποσότητας του προϊόντος που θα παραχθεί και την βελτιστοποίηση του melting της αντίδρασης.

6. Αλλαγές της θερμοκρασίας τήξης

Η θερμοκρασία κατά το δεύτερο στάδιο της τήξης δοκιμάστηκε στους 40°C, 43°C και 45°C, όπου βρέθηκε ότι η ιδανικότερη θερμοκρασία ήταν αυτή των 43°C. Παράλληλα ο ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας κατά την τήξη δοκιμάστηκε στους 0,2, 0,4 και 0,6 °C/ sec, προτού επιλεγθεί τελικά το 0,4°C/ sec.

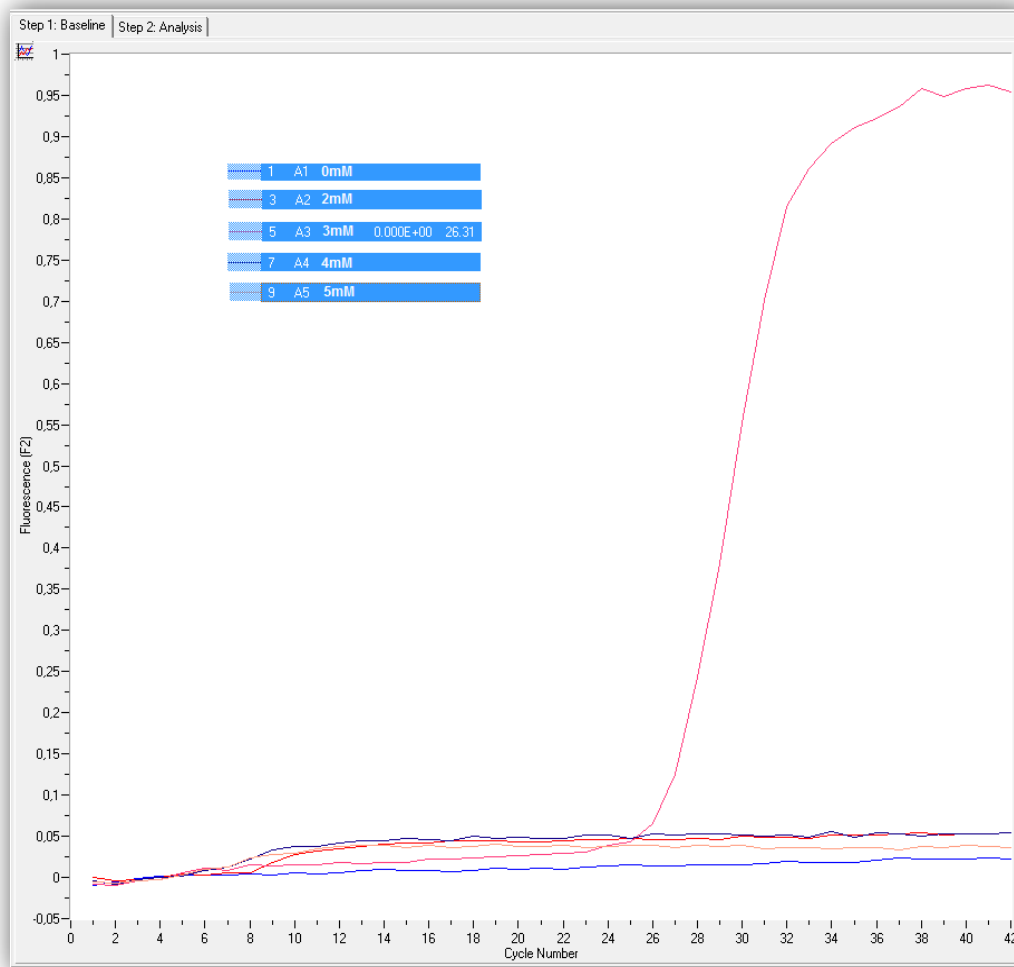
7. Βελτιστοποίηση της τελικής συγκέντρωσης των ιόντων MgCl₂

Τα ιόντα MgCl₂ είναι απαραίτητα στην αντίδραση της PCR γιατί βοηθούν στη δράση της πολυμεράσης. Έτσι για την μελέτη της επίδρασης της τελικής συγκέντρωσης των ιόντων MgCl₂ στην αντίδραση κατασκευάστηκε καμπύλη μαγνησίου στην οποία εξετάστηκε η ενίσχυση με προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων ιόντων μαγνησίου. Οι τελικές συγκεντρώσεις μαγνησίου στα 5 δείγματα της καμπύλης δίνονται στον πίνακα 8.3:

Πίνακας 8.3: Συγκεντρώσεις μαγνησίου στα δείγματα της καμπύλης.

MgCl ₂	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
1. MgCl ₂	25 mM	0	1,5 mM
2. MgCl ₂	25 mM	0,4	2 mM
3. MgCl ₂	25 mM	0,8	3 mM
4. MgCl ₂	25 mM	1,2	4 mM
5. MgCl ₂	25 mM	1,6	5 mM

Από τα αποτελέσματα (εικόνα 8.9) προέκυψε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση μαγνησίου ήταν αυτή των 3 mM, η οποία και προτιμήθηκε για το τελικό πρωτόκολλο.

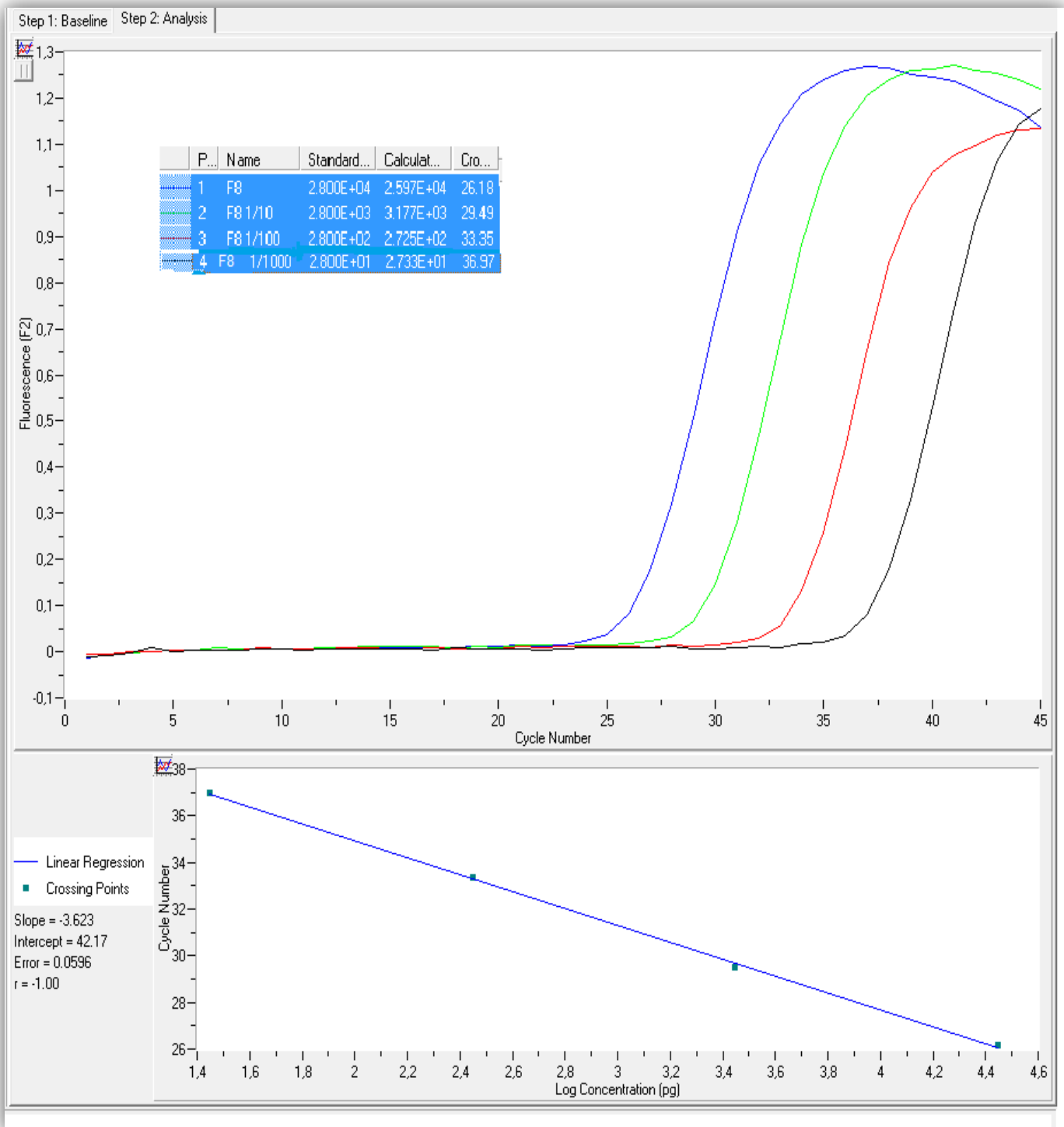


Εικόνα 8.9: Καμπύλη μαγνησίου για το TCF4 γονίδιο. Το ίδιο δείγμα ενισχύθηκε στην ίδια αντίδραση πεντάκις με διαφορετική σε κάθε περίπτωση τελική συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου (0, 2mM, 3mM, 4mM, 5mM). Βέλτιστη συγκέντρωση 3mM.

8. Βελτιστοποίηση απόδοσης real-time PCR αντίδρασης

Αναλυτικότερα, για το σχεδιασμό καμπύλης αναφοράς και την εύρεση της απόδοσης (E) της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις του δείγματος (F8) ομοζυγώτη μεταλλαγμένου, επιβεβαιωμένου με DNA sequencing. Η αρχική συγκέντρωση του δείγματος σε DNA, η οποία μετρήθηκε με το φθορισμόμετρο Qubit ήταν 28 ng/μL.

Η κλίση της καμπύλης αναφοράς βρέθηκε $-3,623$ και η εξ αυτής υπολογιζόμενη απόδοση ήταν $E = 1,89$ (εικόνα 8.10).



Εικόνα 8.10: Καμπύλη αναφοράς για την αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου για το TCF4 γονίδιο. Στο πάνω μέρος της εικόνας φαίνεται η ενίσχυση γνωστού δείγματος ομοζυγώτη μεταλλαγμένου (F8) και των διαδοχικών αραιώσεων του (F8 1/10, F8 1/100, F8 1/1000). Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνεται η καμπύλη αναφοράς με κλίση $-3,623$ και σημείο τομής επί του καθέτου άξονα $42,17$.

Το όριο ανίχνευσης (LOD: Limit Of Detection) θεωρήθηκε η αραίωση 1/1000 (28 pg/μL), καθώς ανιχνεύθηκε και στις 3 προσπάθειες που έγιναν (ενώ η επόμενη αραίωση δεν έδωσε προϊόν).

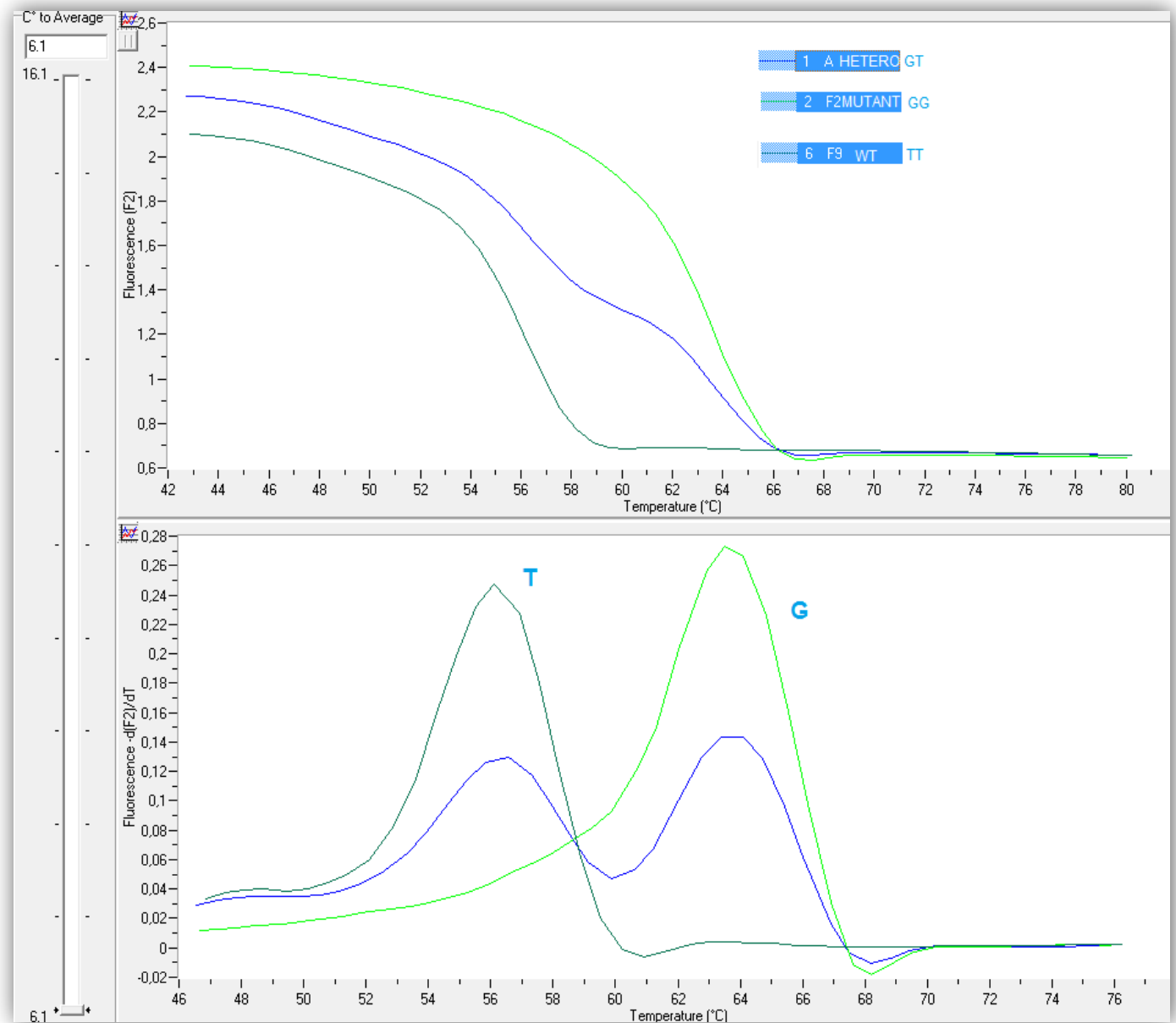
Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με ενίσχυση δείγματος γνωστής συγκέντρωσης (28 ng/μL) εις τριπλούν στην ίδια αντίδραση (within run precision). Η μέση τιμή (x), η τυπική απόκλιση (SD) και ο συντελεστής διακύμανσης (CV) των Cq (Cycle quantification) για την μελετώμενη συγκέντρωση δίνονται στον πίνακα 8.4.

Πίνακας 8.4: Μέση τιμή (x), η τυπική απόκλιση (SD) και ο συντελεστής διακύμανσης (CV) των Cq για τα δείγματα συγκέντρωσης 28 ng/μL τα οποία ενισχύθηκαν εις τριπλούν στη ίδια αντίδραση.

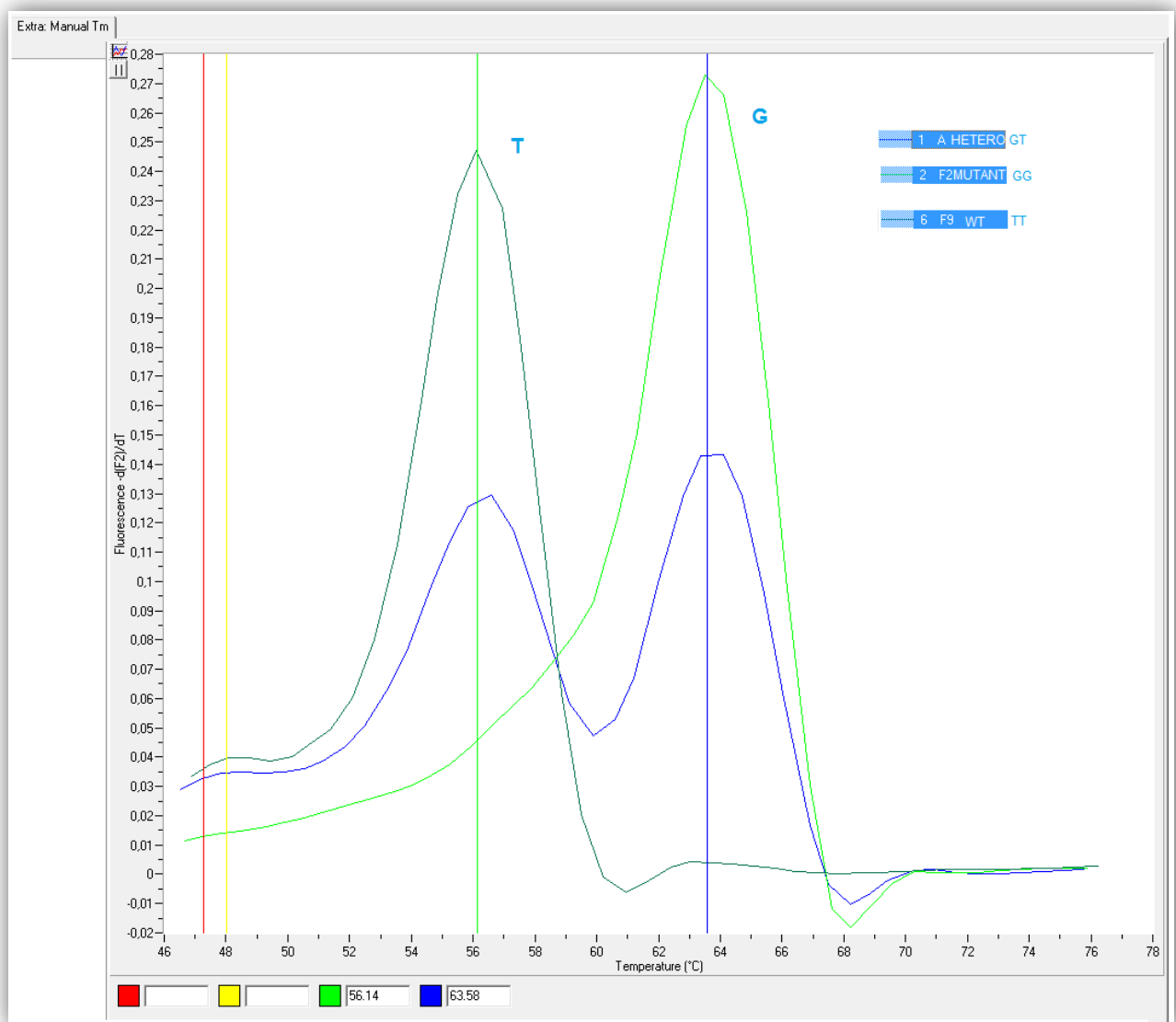
x	26,35
SD	0,5
CV(%)	1.9

Η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με ενίσχυση δείγματος συγκέντρωσης (28 ng/μL) σε διαφορετικές αντιδράσεις (between run precision) σε χρονικό διάστημα οκτώ εργαστηριακών ημερών (μία μέτρηση την ημέρα). Η αναπαραγωγιμότητα είναι πολύ ικανοποιητική με μέσο Cq=25,84, SD=0,30 και CV= 1,2% (n=8).

Η ανάλυση καμπυλών τήξης παρουσίασε σαφείς κορυφές για το φυσιολογικό (T) και το μεταλλαγμένο (G) αλληλίο στους 57,20°C (SD:0,99, CV:1,7% για n=10) και 63,75°C (SD=0,80, CV=1,25% για n=8) αντίστοιχα (εικόνες 8.11, 8.12). Η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ των δυο κορυφών (ΔT_m), ήταν κατά μέσο όρο 7,39°C (SD=0,18, CV=2,44% για n=6). Οι κορυφές της καμπύλης στις δύο θερμοκρασίες τήξης των ετεροζυγωτών ήταν σχεδόν ισοϋψείς με λόγο επιφανείας υπό της καμπύλης G/T 0,982 (SD= 0,078, CV=7,9% για n=10).

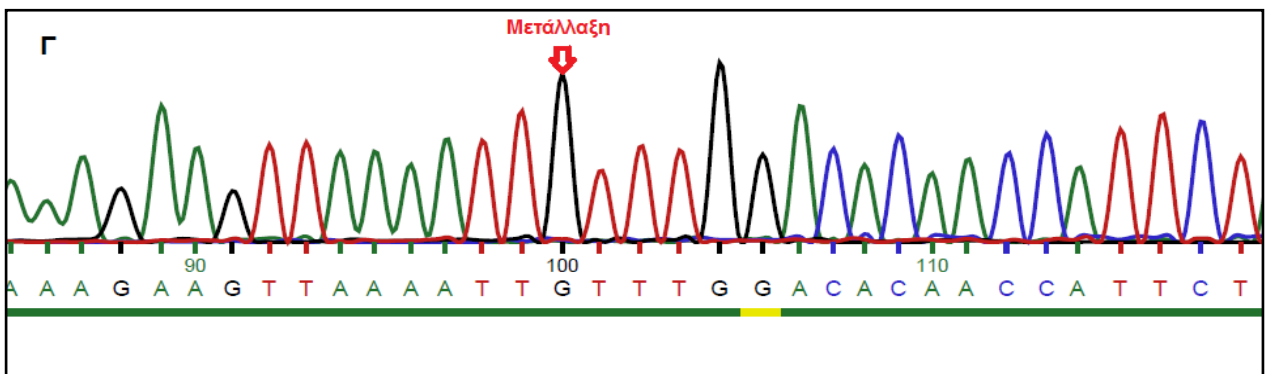
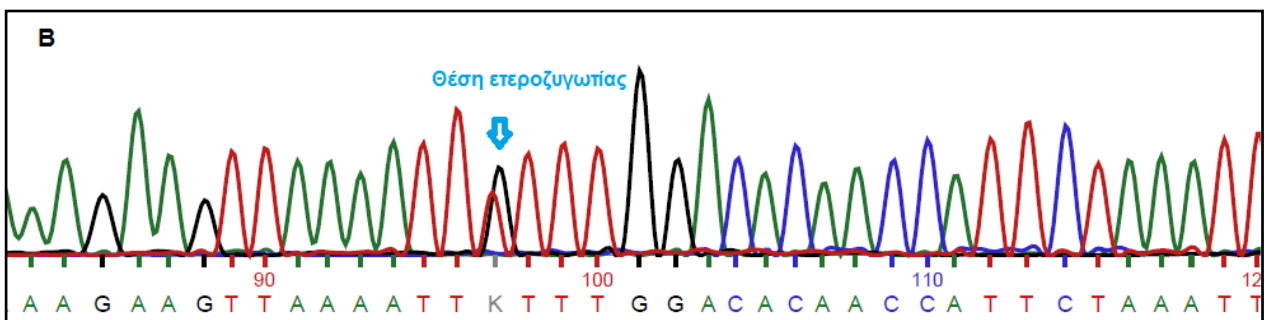
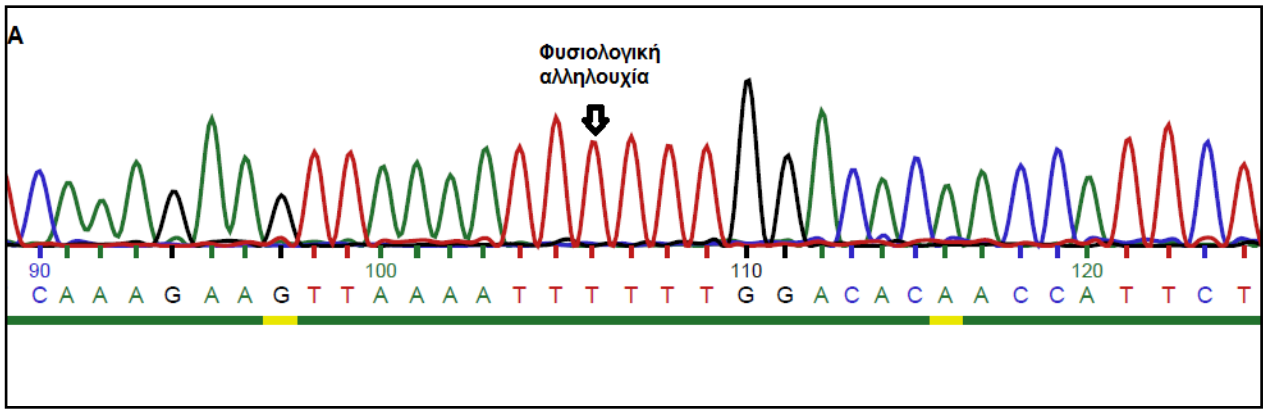


Εικόνα 8.11: Ανάλυση καμπυλών τήξης για ένα ομοζυγώτη μεταλλαγμένο (GG λαχανί χρώμα), έναν ετεροζυγώτη (GT μπλε χρώμα) κι ένα φυσιολογικό (TT πράσινο χρώμα) για τον πολυμορφισμό rs613872 του γονιδίου TCF4.



Εικόνα 8.12: Θερμοκρασίες τήξης για το φυσιολογικό T αλληλίο ($56,14^{\circ}\text{C}$, πράσινη γραμμή) και για το μεταλλαγμένο G αλληλίο ($63,58^{\circ}\text{C}$, μπλε γραμμή) στο γονίδιο TCF4.

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με τη μέθοδο αναφοράς της αλληλούχισης DNA (εικόνα 8.13), με διαδικασία που αναλύεται στο κεφάλαιο 7.7.

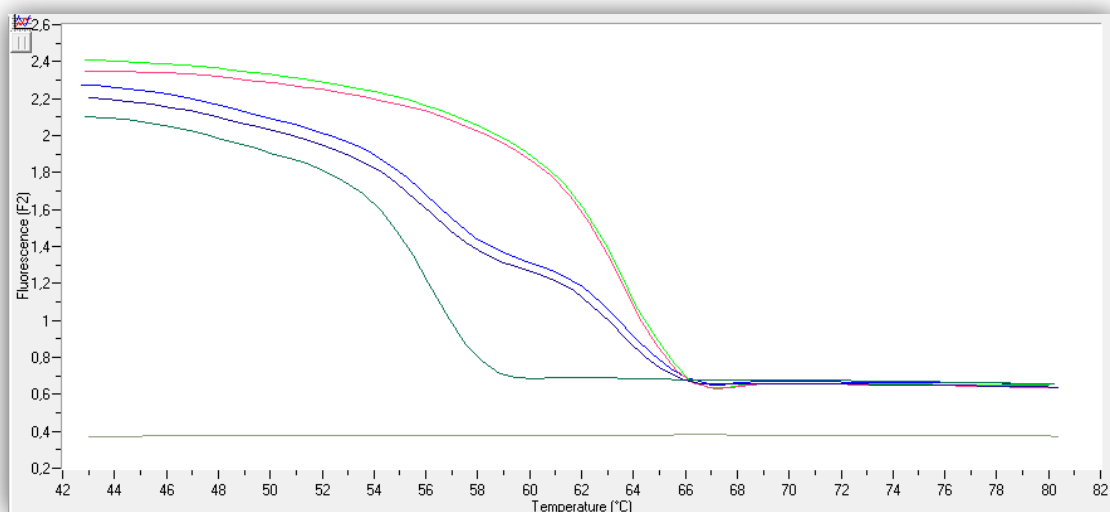


Εικόνα 8.13: Ηλεκτροφορογραφήματα DNA Sequencing για A) ομοζυγώτη φυσιολογικό TT (wild type), B) ετεροζυγώτη GT και Γ) ομοζυγώτη μεταλλαγμένο GG για τον πολυμορφισμό rs613872 του TCF4 γονιδίου.

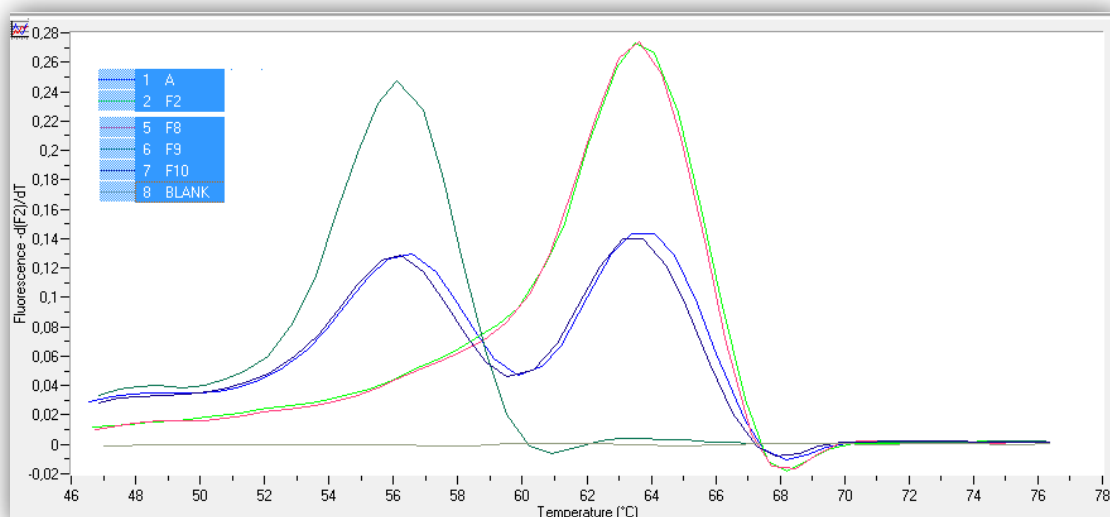
8.4.2.2 Παραδείγματα αποτελεσμάτων ανάλυσης καμπυλών τήξης σε κλινικά δείγματα.

Η ανάλυση καμπυλών τήξης παρουσίασε σαφείς κορυφές για τον ομοζυγώτη φυσιολογικό, τον ετεροζυγώτη και τον ομοζυγώτη φυσιολογικό. Παράδειγμα αποτελεσμάτων ανάλυσης καμπύλης τήξης σε κλινικά δείγματα ακολουθεί παρακάτω:

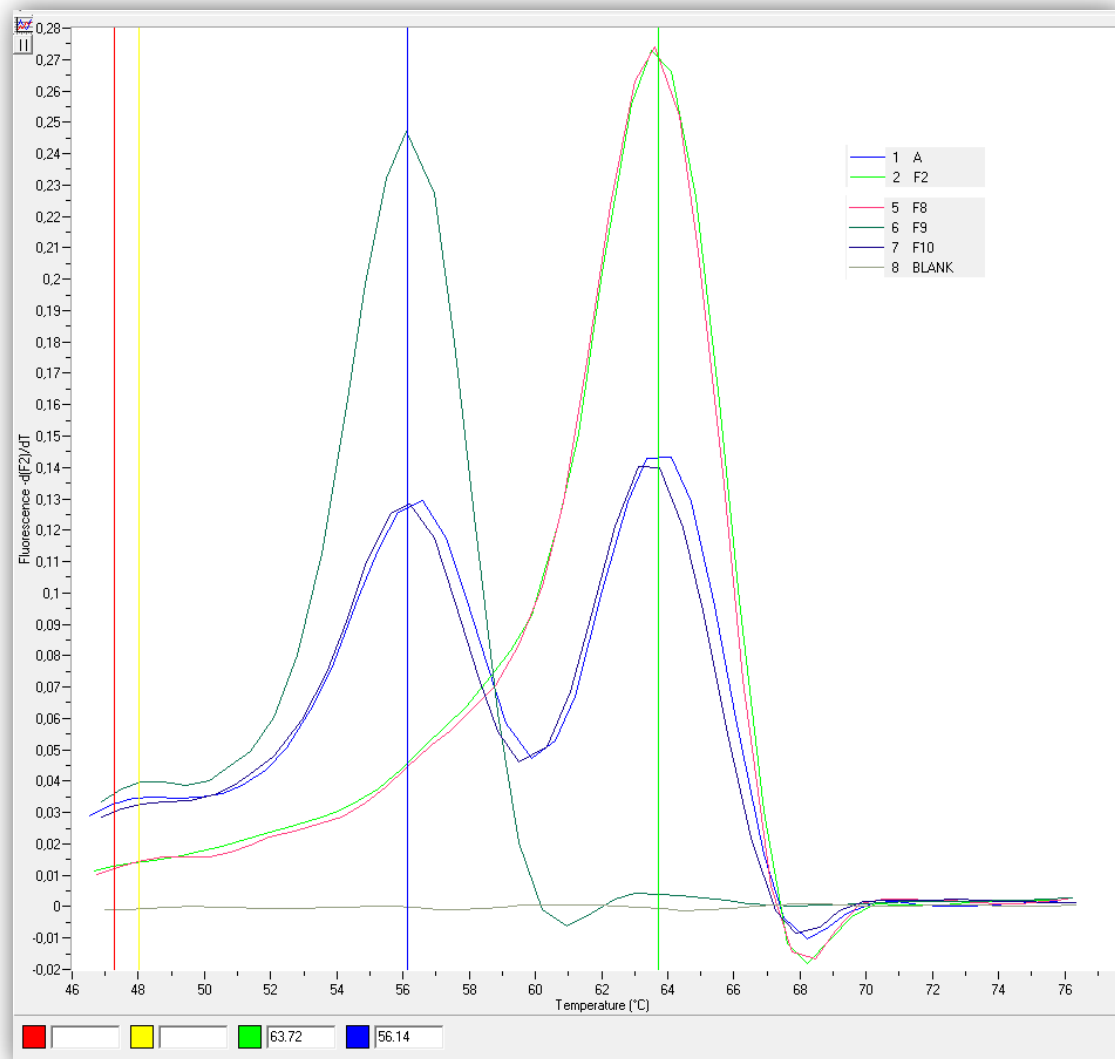
A



B



Γ



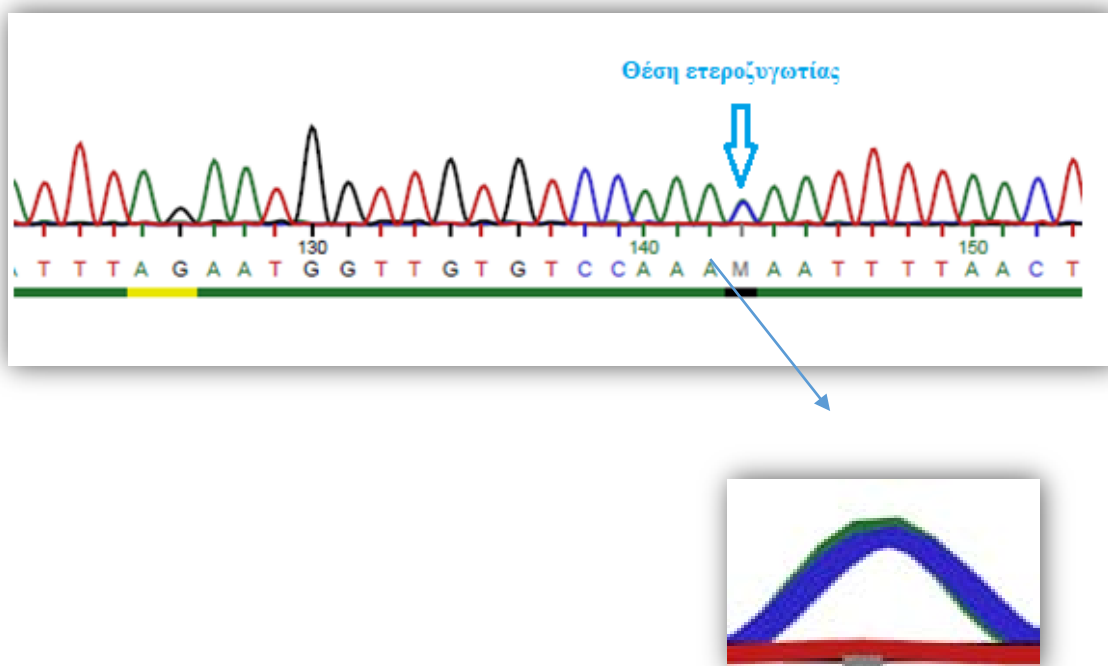
Εικόνα:8.14: A- B. Ανάλυση καμπυλών τήξης για δύο ομοζυγώτες μεταλλαγμένους GG (F2 & F8) (λαχανί και ροζ χρώμα αντίστοιχα), δύο ετεροζυγώτες GT (A & F10) (μπλε και γαλάζιο χρώμα αντίστοιχα) και έναν ομοζυγώτη φυσιολογικό (F9) TT (πράσινο χρώμα) για τον πολυμορφισμό rs613872 στο TCF4 γονίδιο. **Γ.** Θερμοκρασίες τήξης για το φυσιολογικό αλληλίο T (56,14°C, μπλε γραμμή) και για το μεταλλαγμένο αλληλίο G (63.72°C, λαχανί γραμμή) στο TCF4 γονίδιο.

8.4.2.3 Παραδείγματα επιβεβαίωσης ορθότητας Real – Time PCR αποτελεσμάτων με DNA Sequencing σε κλινικά δείγματα

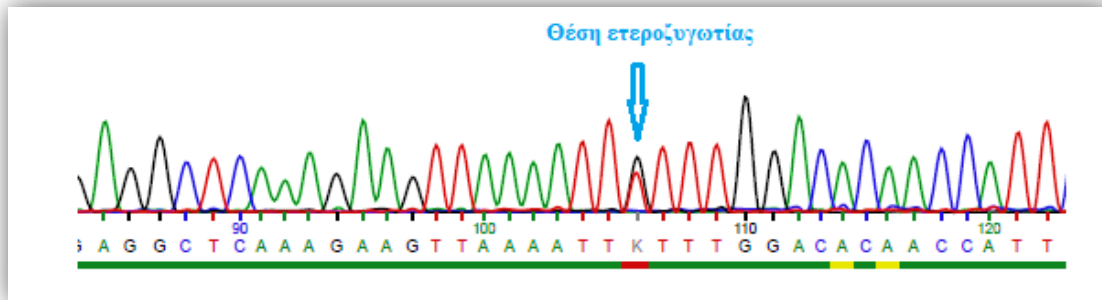
Για την εξασφάλιση της ορθότητας των αποτελεσμάτων της μεθόδου Real-Time PCR –ανάλυσης καμπυλών τήξης στο LightCycler ήταν απαραίτητη η επαλήθευσή τους και με τη μέθοδο αναφοράς DNA Sequencing. Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε για το *TCF4* γονίδιο σε κάποια από τα δείγματα και ορισμένα από αυτά επιβεβαιώθηκαν με τη χρήση τόσο του πρόσθιου όσο και του ανάστροφου εκκινητή.

Παραδείγματα αποτελεσμάτων του DNA Sequencing αναλύονται στη συνέχεια. Στην εικόνα 8.2 φαίνονται τα ηλεκτροφορογραφήματα DNA Sequencing δείγματος (C2) ετεροζυγώτη για τον πολυμορφισμό rs613872 του γονιδίου *TCF4* με χρήση πρόσθιου και ανάστροφου εκκινητή (εικόνα 8.15). Στο συγκεκριμένο δείγμα ανιχνεύθηκε στην ίδια γενωμική περιοχή σημειακός πολυμορφισμός dbSNP rs117826375 NM_001083962.1:c.145+42316G>A (ιντρονική περιοχή).

A



B



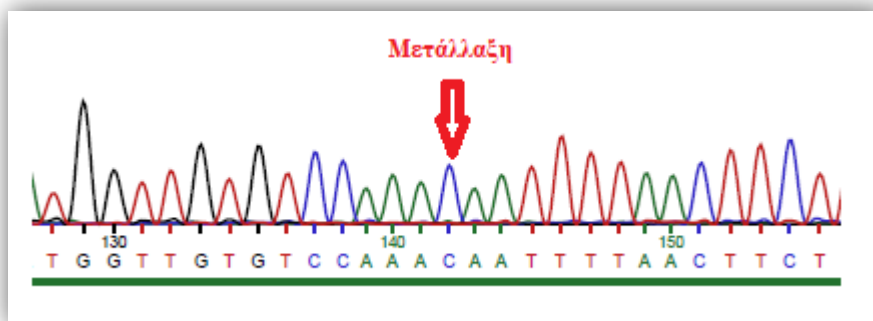
Γ



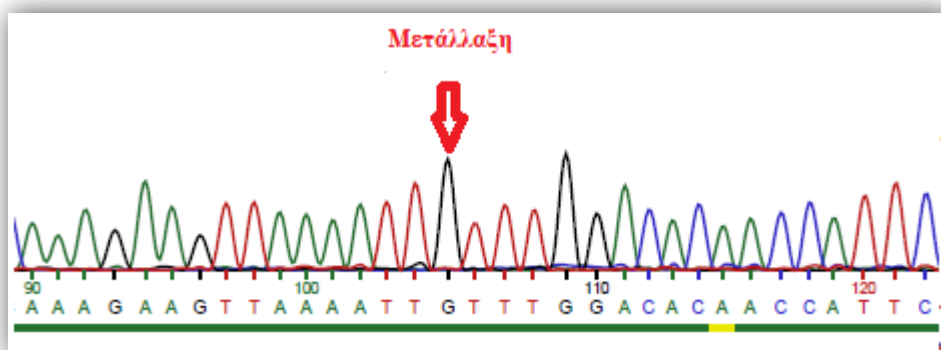
Εικόνα 8.15: Ηλεκτροφορογράφημα DNA Sequencing για ετεροζυγότη (C2) **A.** με πρόσθιο εκκινητή **B.** με ανάστροφο εκκινητή **Γ.** ανιχνεύθηκε στο ίδιο δείγμα και σημειακός πολυμορφισμός rs117826375 G>A.

Στην εικόνα 8.16 φαίνονται τα ηλεκτροφορογραφήματα DNA Sequencing δείγματος (F2) ομοζυγώτη μεταλλαγμένου για τον πολυμορφισμό rs613872 του γονιδίου *TCF4* με χρήση πρόσθιου και ανάστροφου εκκινητή.

A



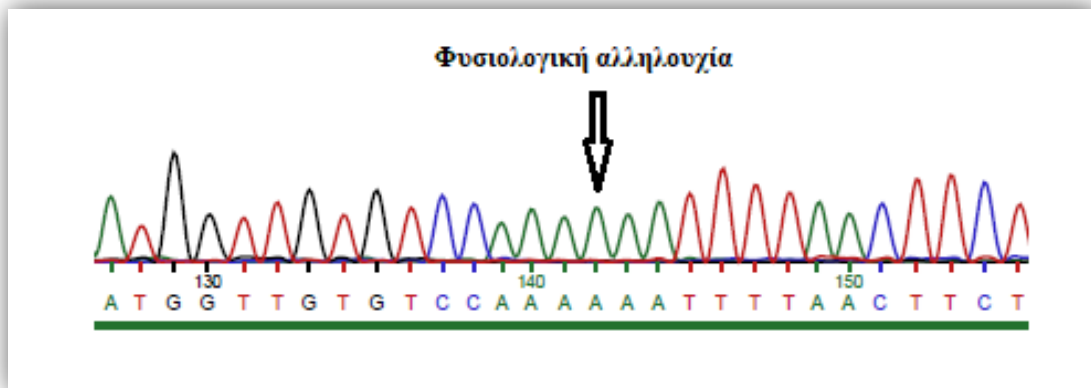
B



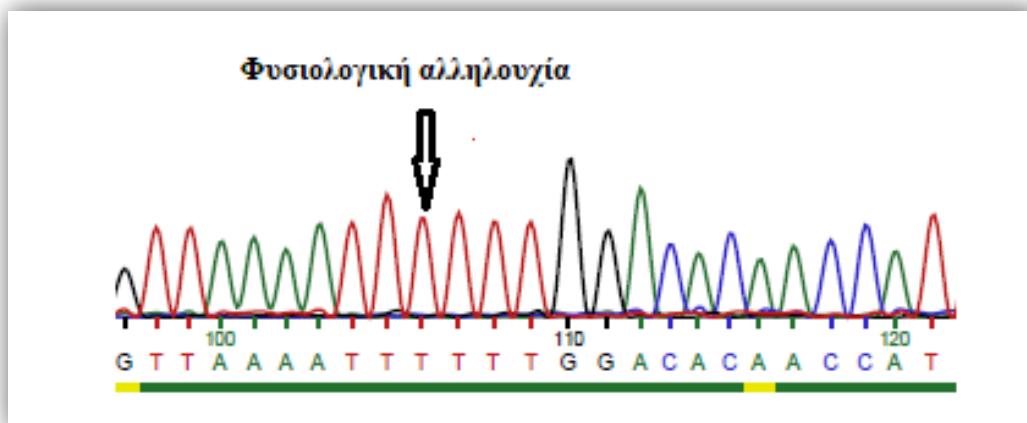
Εικόνα 8.16: Ηλεκτροφορογράφημα DNA Sequencing για ομόζυγο μεταλλαγμένο (F2). **A.** με πρόσθιο εκκινητή **B.** με ανάστροφο εκκινητή.

Στην εικόνα 8.17 φαίνονται τα ηλεκτροφορογραφήματα DNA Sequencing δείγματος (C1) ομοζυγώτη φυσιολογικού για τον πολυμορφισμό rs613872 του γονιδίου *TCF4* με χρήση πρόσθιου και ανάστροφου εκκινητή.

A.



B.

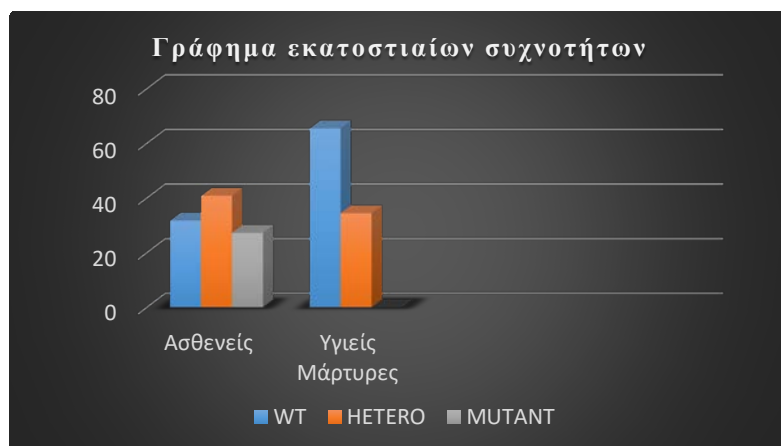


Εικόνα 8.17: Ηλεκτροφορογράφημα DNA Sequencing για ομόζυγο φυσιολογικό (C1). A. με πρόσθιο εκκινητή B. με ανάστροφο εκκινητή.

Εκ των 22 ασθενών, 7 (31,81%) βρέθηκαν φυσιολογικοί, 9 (40,90%) ετεροζυγώτες και 6 (27,27%) ομοζυγώτες μεταλλαγμένοι για τον πολυμορφισμό rs613872. Μεταξύ των 58 υγιών μαρτύρων περιλαμβάνονταν 38 (65,52%) φυσιολογικοί και 20 (34,48%) ετεροζυγώτες, ενώ δεν ανιχνεύθηκε κανείς ομοζυγώτης μεταλλαγμένος. Επομένως 68,18% των ασθενών και 34,48% των υγιών έφεραν τουλάχιστον ένα μεταλλαγμένο αλληλίο. Το G αλληλίο αυξήθηκε από 17,24 στους υγιείς στο 47,43% στους ασθενείς (εικόνα 8.18, 8.19).

Πίνακας 8.5: Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των τριών γονοτύπων και των δύο αλληλίων για τον rs613872 πολυμορφισμό του *TCF4* γονιδίου, σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ		ΥΓΙΕΙΣ		ΣΥΝΟΛΟ	
	ΑΠΟΛΥΤΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ	ΑΝΑΛΟΓΙΑ	ΑΠΟΛΥΤΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ	ΑΝΑΛΟΓΙΑ	ΑΠΟΛΥΤΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ	ΑΝΑΛΟΓΙΑ
TT (WT)	7	31,81	38	65,52	45	56,25
GT (Hetero)	9	40,90	20	34,48	29	36,25
GG (Mutant)	6	27,27	0	0	6	0,01
T αλληλίο	23	52,27	96	82,76	119	74,37
G αλληλίο	21	47,73	20	17,24	41	25,62



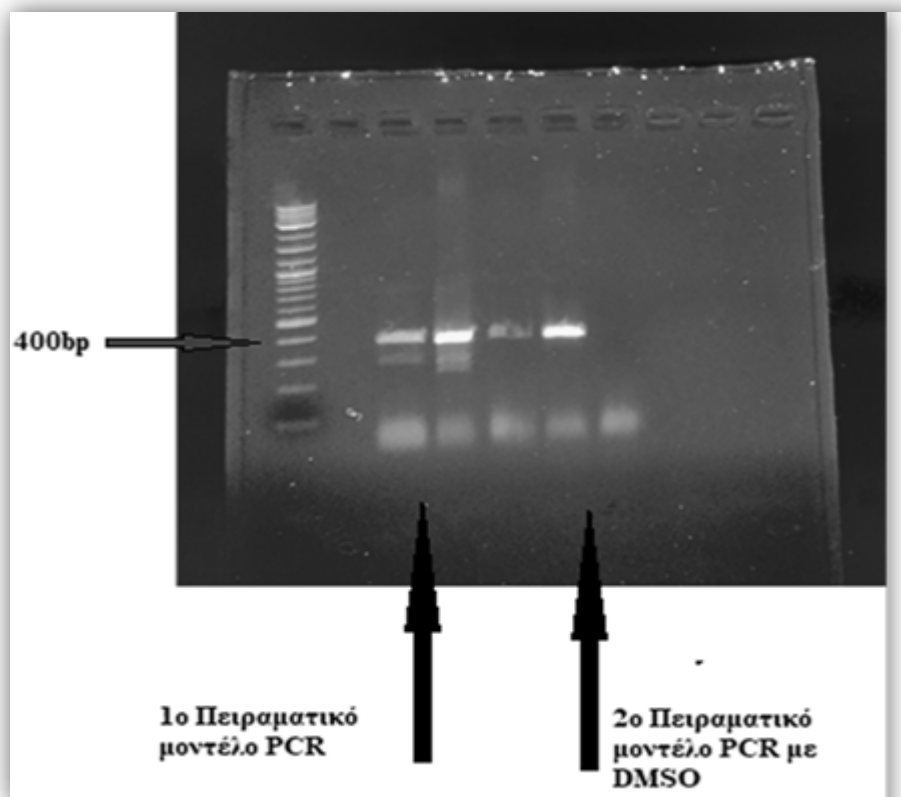
Εικόνα 8.18: Συχνότητες WT, HETERO, και MUTANT για τους γονότυπους του rs613872 του TCF4 γονιδίου στις ομάδες υγιών μαρτύρων και ασθενών.



Εικόνα 8.19: Συχνότητες παρουσίας ενός τουλάχιστον μεταλλαγμένου αλληλίου για τους γονότυπους του rs613872 του TCF4 γονιδίου στις ομάδες υγιών μαρτύρων και ασθενών.

8.5 Αποτελέσματα συμβατικής PCR για το COL8A2 γονίδιο

Η συμβατική PCR με τα πρωτόκολλα που αναγράφονται στους πίνακες 7.15 και 7.16 και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που αναγράφεται στον πίνακα 7.17, οδήγησε στην ενίσχυση προϊόντος 375 bp και επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%.



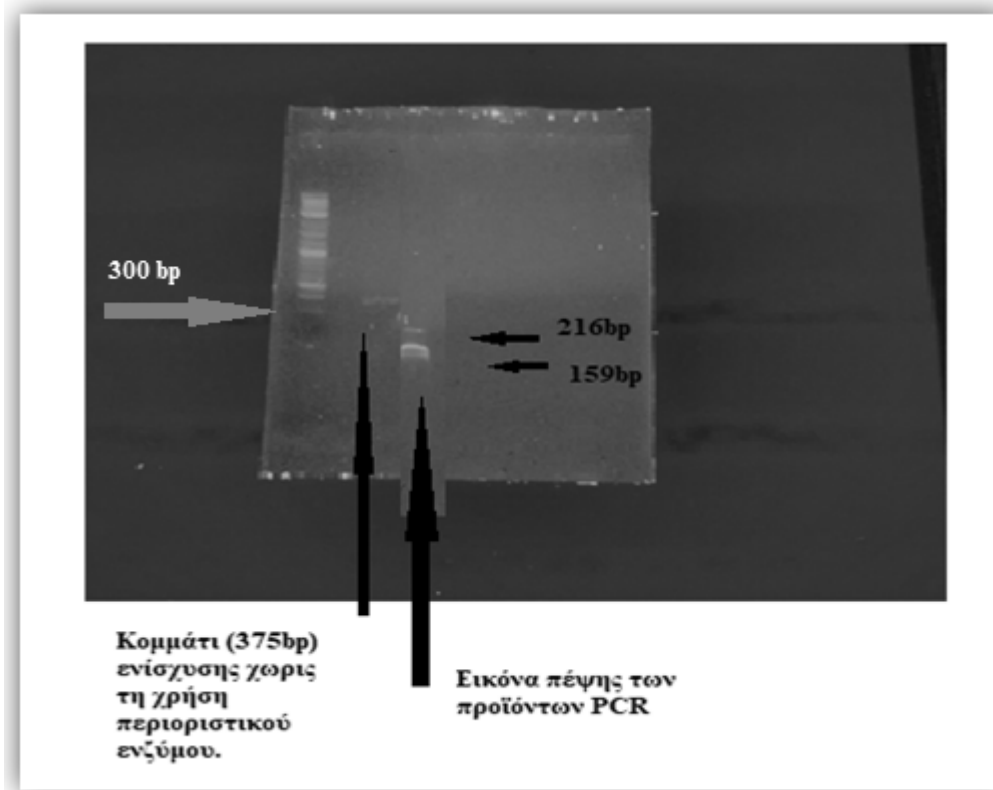
Εικόνα 8.20: Εικόνα ηλεκτροφόρησης 1ο και 2ο πειραματικού μοντέλου PCR για την επιβεβαίωση των εκκινητών για το COL8A2 γονίδιο.

Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Επιβεβαιώθηκε η ενίσχυση της περιοχής 375 bp του γονιδίου COL8A2. Ενώ το πρωτόκολλο της PCR όπου δεν χρησιμοποιήθηκε DMSO απέδωσε αυξημένα παραπροϊόντα. Το 2^ο πειραματικό μοντέλο παρουσία DMSO επιλέχθηκε ως το βέλτιστο μοντέλο για την εκτέλεση της PCR (πίνακας 7.17).

8.6 Αποτελέσματα πέψης των προϊόντων PCR για το COL8A2 γονίδιο

Μετά την επώαση με το περιοριστικό ένζυμο AluI τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v για 40 λεπτά (εικόνα 8.21).



Εικόνα 8.21: Εικόνα ηλεκτροφόρησης της ενζυμικής πέψης των PCR προϊόντων (ένζυμο AluI).

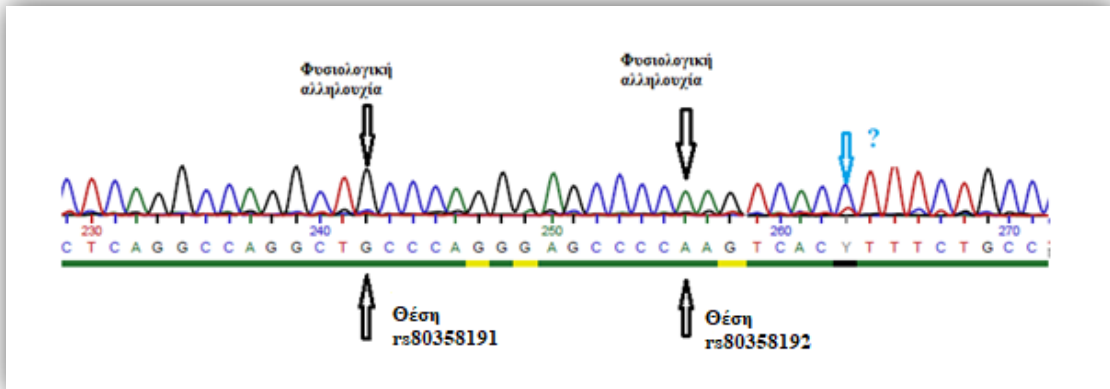
Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Επιβεβαιώθηκε η ενζυματική πέψη των προϊόντων της PCR με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου AluI και το προϊόν μας των 375 bp «κόπηκε» σε 2 κομμάτια 159 bp και 216 bp αντίστοιχα όπως αναμένετο.

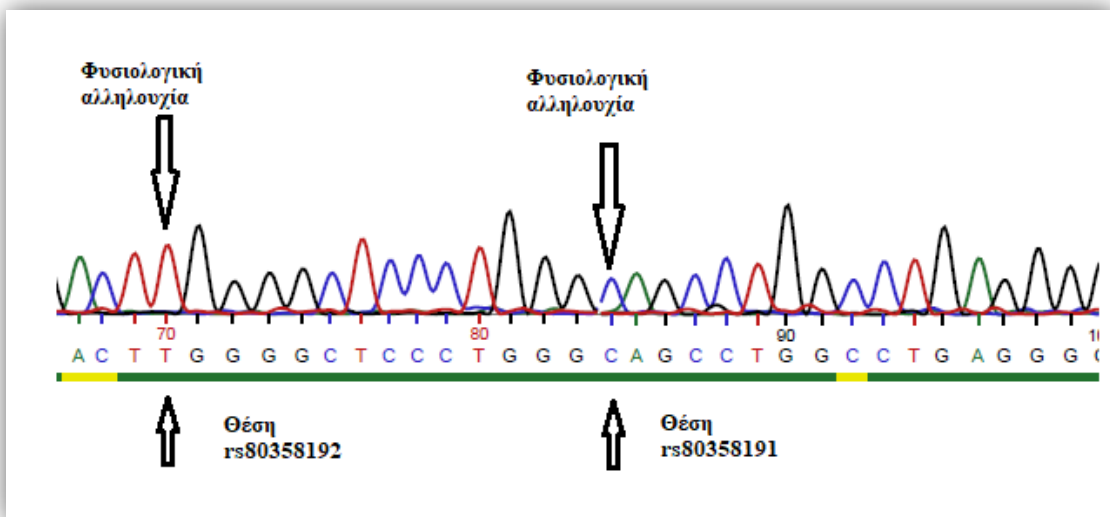
8.7 Αποτελέσματα γονοτύπησης για τους πολυμορφισμούς rs80358192 και rs80358191 για το γονίδιο COL8A2 και σάρωση γενωμικής περιοχής με DNA Sequencing.

Στη μελέτη αυτή η ανίχνευση των συγκεκριμένων πολυμορφισμών COL8A2 του γονιδίου πραγματοποιήθηκε με DNA Sequencing. Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε για το COL8A2 γονίδιο σε όλα τα δείγματα της μελέτης και ορισμένα από αυτά επιβεβαιώθηκαν με τη χρήση και πρόσθιου αλλά και ανάστροφου εκκινητή. Παραδείγματα αποτελεσμάτων του DNA Sequencing αναλύονται στη συνέχεια.

Στις εικόνες 8.22 και 8.23 φαίνονται τα ηλεκτροφορογραφήματα DNA Sequencing δειγμάτων (F1&F7) ομόζυγων φυσιολογικών για τους πολυμορφισμούς rs80358192 και rs80358191 του γονιδίου COL8A2 με χρήση ανάστροφου και πρόσθιου εκκινητή αντίστοιχα.



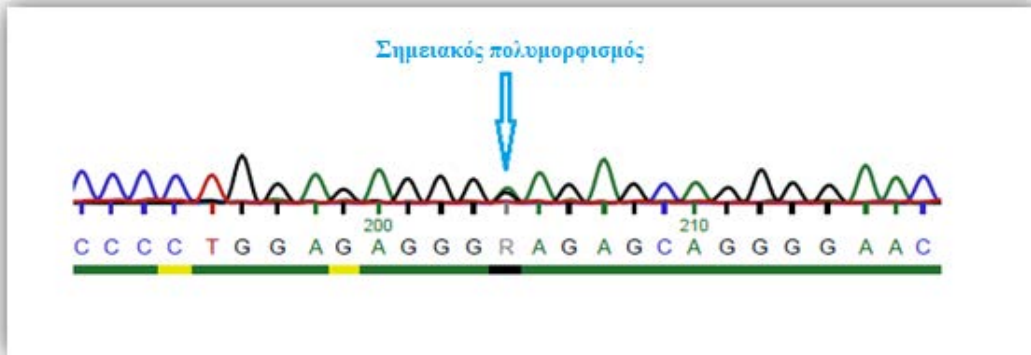
Εικόνα 8.22: Ηλεκτροφορογράφημα DNA Sequencing σε δείγμα ασθενούς (F1 ομόζυγον φυσιολογικού για τους πολυμορφισμούς rs80358192 και rs80358191 του COL8A2 γονιδίου με χρήση ανάστροφου εκκινητή.



Εικόνα 8.23: Ηλεκτροφορογράφημα DNA Sequencing σε δείγμα ασθενούς (F7 ομόζυγον φυσιολογικού για τους πολυμορφισμούς rs80358192 και rs80358191 του γονιδίου COL8A2 με χρήση πρόσθιου εκκινητή.

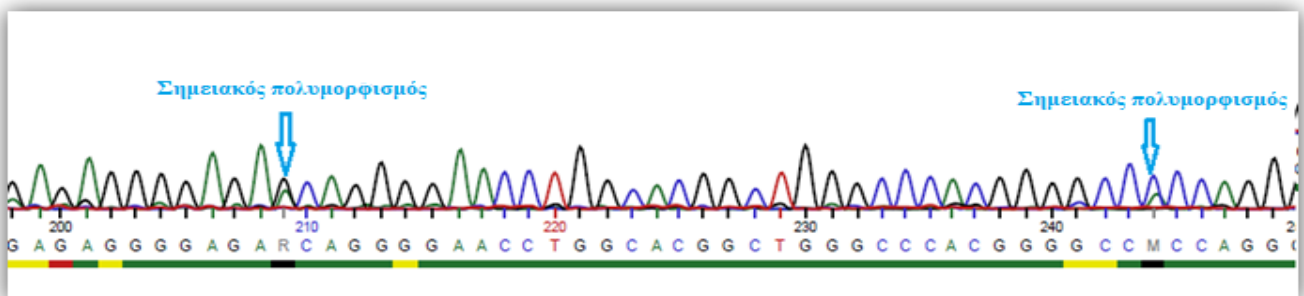
Σε δύο δείγματα ασθενών Fuchs (F5 & F13) ανιχνεύθηκαν επιπρόσθετα δύο σημειακοί πολυμορφισμοί:

- dbSNP rs35495320 NM_005202.3:c1487G>A→G495G (F5) (εικόνα 8.24) σε ετεροζυγωτία σε άντρα ασθενή Fuchs 61 ετών *TCF4* ετεροζυγώτη. Η συγκεκριμένη σιωπηρή μετάλλαξη ανευρίσκεται στον παγκόσμιο πληθυσμό με MAF: 0,1815.

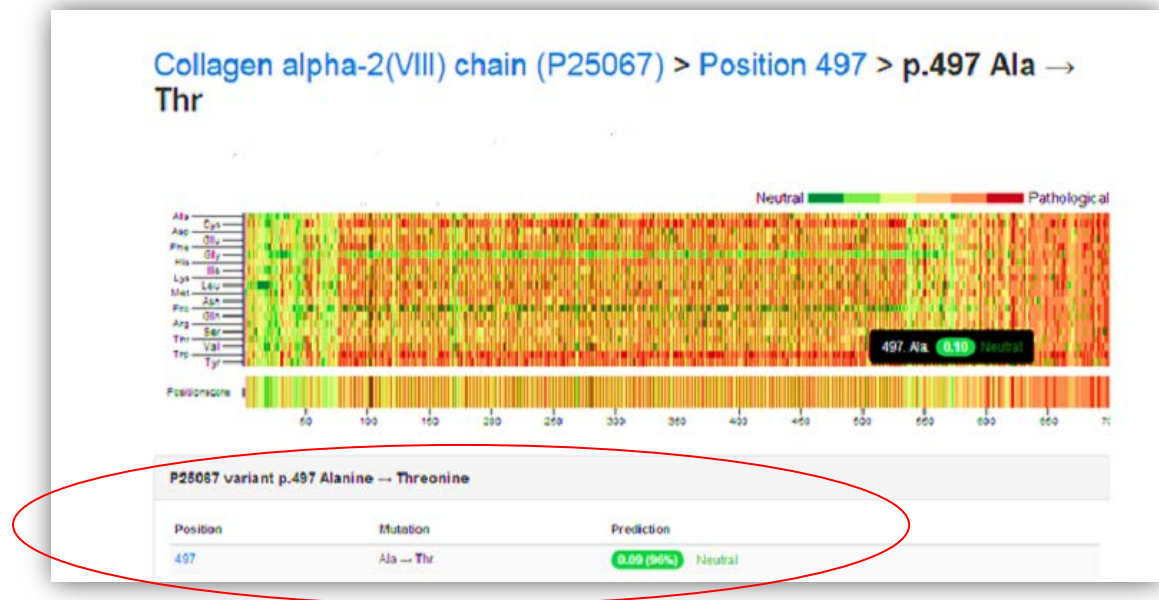


Εικόνα 8.24: Ηλεκτροφορογράφημα DNA Sequencing σε δείγμα ασθενούς (F5) ομόζυγου φυσιολογικού για τους πολυμορφισμούς rs80358192 και rs80358191 με σημειακή μετάλλαξη.

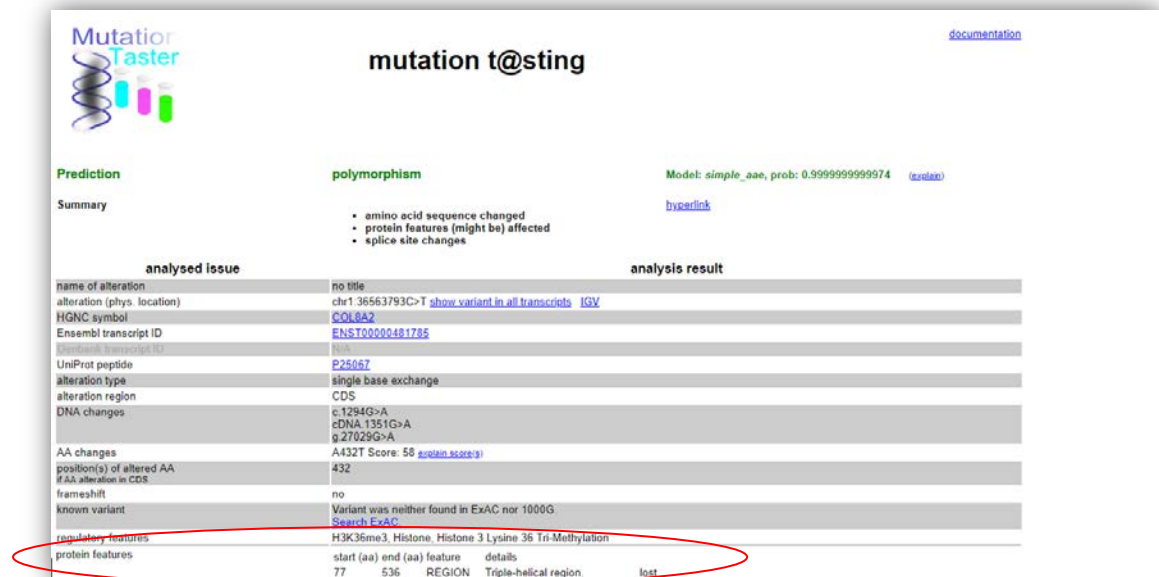
- ✚ NM_005202.3:c1491G>A→A497T (F13) (εικόνα 8.25) σε ετεροζυγωτία σε άνδρα ασθενή Fuchs 78 ετών *TCF4* ετεροζυγώτη. Αυτή η αλλαγή αμινοξέος από αλανίνη σε θρεονίνη αναζητήθηκε σε βάσεις δεδομένων (PMut, Mutation@sting, Provean) (εικόνες 8.26, 8.27, 8.28) για να βρεθεί κατά πόσο είναι δυνατόν να προκαλεί αλλαγές στη δομή της πρωτεΐνης. Η αλλαγή αυτή θεωρείται σύμφωνα με τις βάσεις δεδομένων φυσιολογική.
- ✚ dbSNP rs560539803 NM_005202.3:c1526C>A→p.P508P (F13) (εικόνα 8.25) σε άνδρα ασθενή Fuchs 78 ετών *TCF4* ετεροζυγώτη. Η συγκεκριμένη σιωπηρή μετάλλαξη ανευρίσκεται στον παγκόσμιο πληθυσμό με MAF: 0,0004.



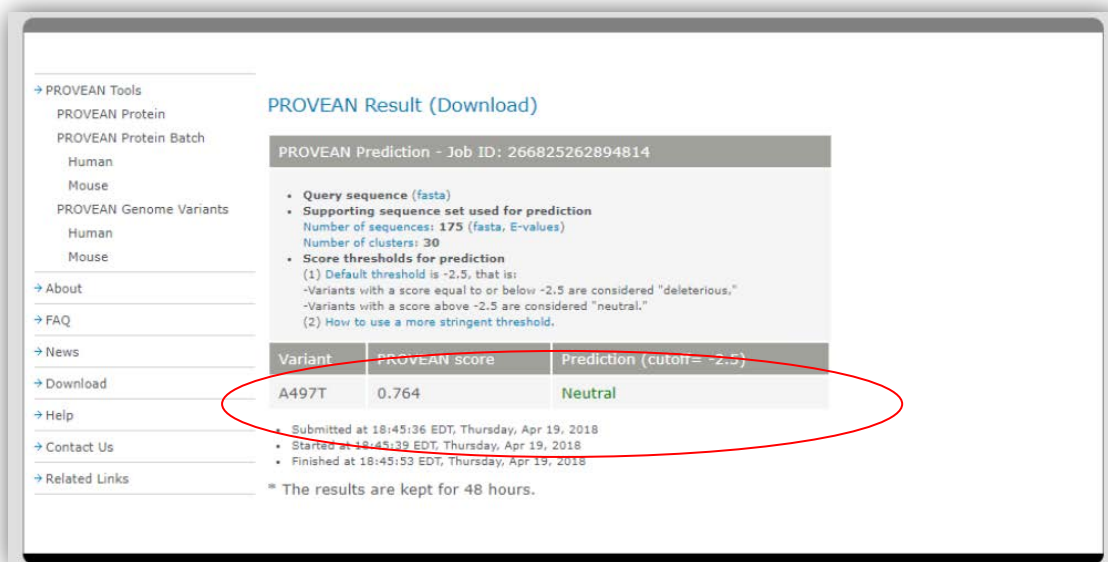
Εικόνα 8.25: Ηλεκτροφορογράφημα DNA Sequencing σε δείγμα ασθενούς (F13) ομόζυγου φυσιολογικού για τους πολυμορφισμούς rs80358192 και rs80358191 με δύο σημειακούς πολυμορφισμούς.



Εικόνα 8.26: Πρόβλεψη (96% φυσιολογική) από τη βάση δεδομένων PMut για τη σημειακή μετάλλαξη $G>A \rightarrow A497T$.

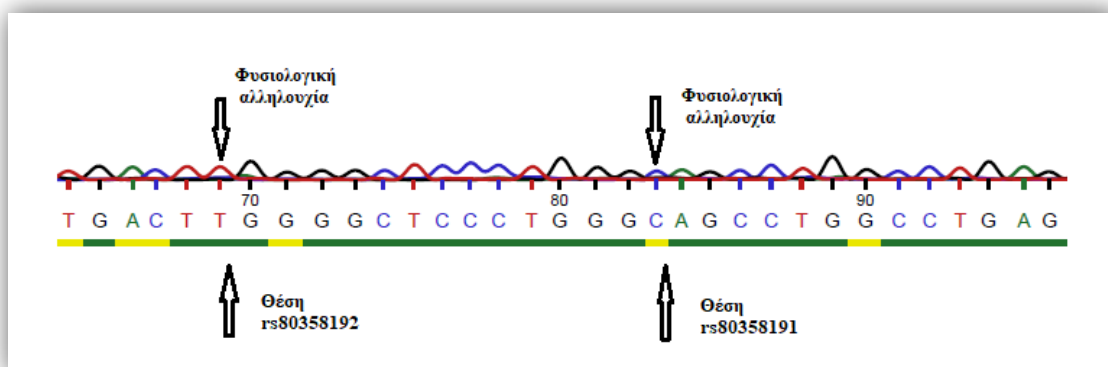


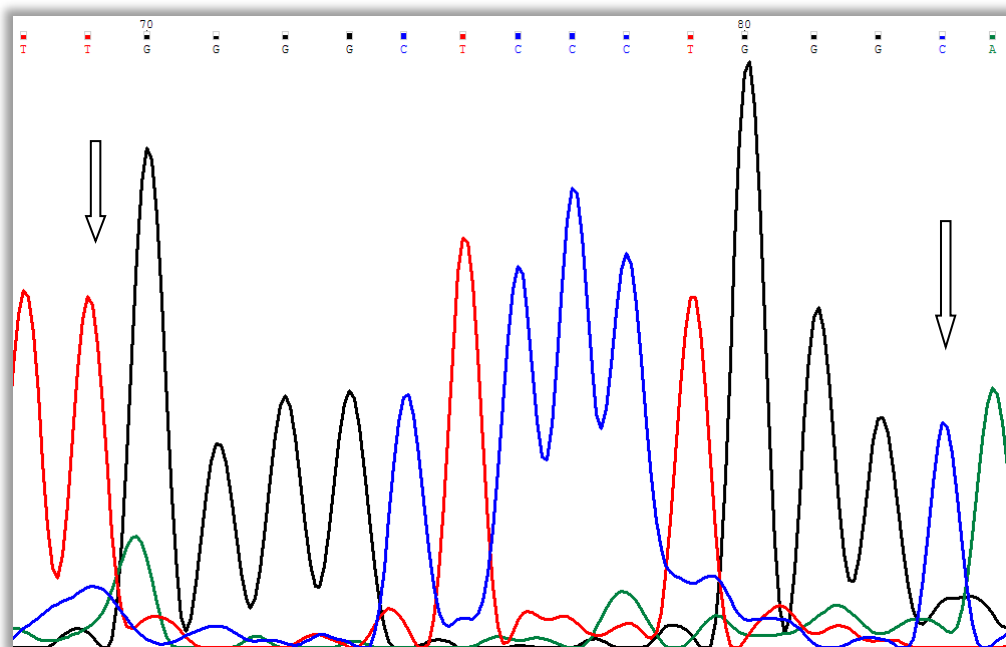
Εικόνα 8.27: Αναζήτηση στη βάση δεδομένων mutation t@sting για τη σημειακή μετάλλαξη $G>A \rightarrow A497T$.



Εικόνα 8.28: Αναζήτηση στη βάση δεδομένων Provean για τη σημειακή μετάλλαξη $G>A \rightarrow A497T$.

Σε ορισμένα δείγματα τα ηλεκτροφορογραφήματα του DNA Sequencing ήταν μικρότερης έντασης πιθανόν λόγω μικρότερης ποσότητας σε DNA δείγματος, ήταν όμως αρκετά ευανάγνωστα και δεν επηρέασαν την ανάγνωση των αποτελεσμάτων μας. Ένα τέτοιο δείγμα ήταν το F6, που απεικονίζεται στην εικόνα 8.29.





Εικόνα 8.29: Ηλεκτροφορογράφημα DNA Sequencing μικρής έντασης, σε δείγμα ασθενούς (F6 ομόζυγου φυσιολογικού για τους πολυμορφισμούς rs80358192 και rs80358191 του γονιδίου COL8A2 με χρήση ανάστροφου εκκινητή.

Όλα τα δείγματα (22 ασθενών και 58 υγιών μαρτύρων), βρέθηκαν να είναι ομόζυγα φυσιολογικά και για τους δύο πολυμορφισμούς rs80358192 και rs80358191 για το COL8A2 γονίδιο, γεγονός που ήταν αναμενόμενο σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία αναφορικά με FECD ασθενείς όψιμης έναρξης.

8.8 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

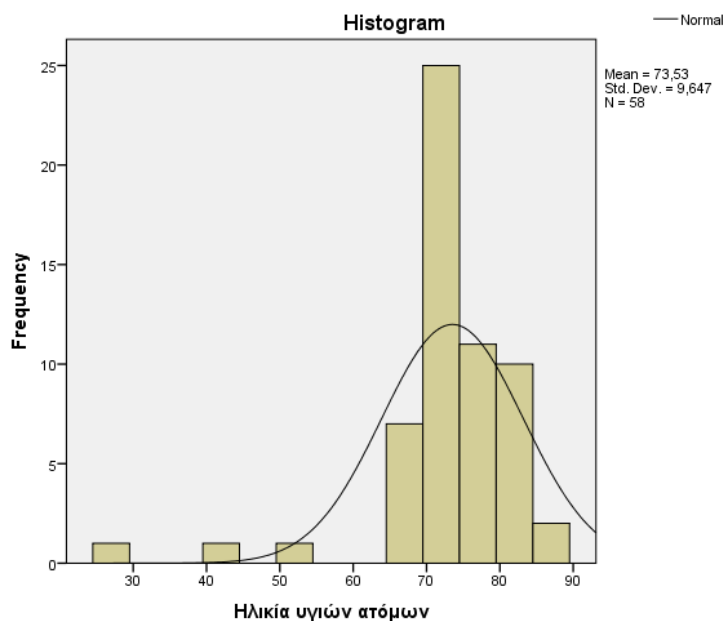
8.8.1 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων με το στατιστικό πακέτο SPSS

Αρχικά πραγματοποιήθηκε περιγραφική στατιστική ανάλυση (εύρος, μέσος όρος, διάμεσος, ελάχιστο, μέγιστο) της ηλικίας στο σύνολο των FECD δειγμάτων και υγιών μαρτύρων και ακολούθησε ο έλεγχος κανονικότητας της, μέσω δοκιμασίας Kolmogorov-Smirnov και Shapiro-Wilk με την αποδοχή ότι $p > 0,05$ αντανάκλα κανονική κατανομή.

8.8.1.1 Περιγραφική στατιστική ανάλυση ηλικιών και έλεγχος κανονικότητας κατανομής τους.

Πίνακας 8.6: Περιγραφική στατιστική ανάλυση ηλικιών υγιών ατόμων ($n=58$) και έλεγχος κανονικότητας κατανομής τους.

Descriptives								
			Statistic	Std. Error				
Ηλικία υγιών ατόμων	Mean		73,53	1,267				
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	71,00					
		Upper Bound	76,07					
	5% Trimmed Mean		74,70					
	Median		74,00					
	Variance		93,060					
	Std. Deviation		9,647					
	Minimum		27					
	Maximum		87					
	Range		60					
	Interquartile Range		7					
	Skewness		-2,618	,314				
	Kurtosis		10,464	,618				
Tests of Normality								
			Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk			
			Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ηλικία υγιών ατόμων			,213	58	,000	,746	58	,000
a. Lilliefors Significance Correction								



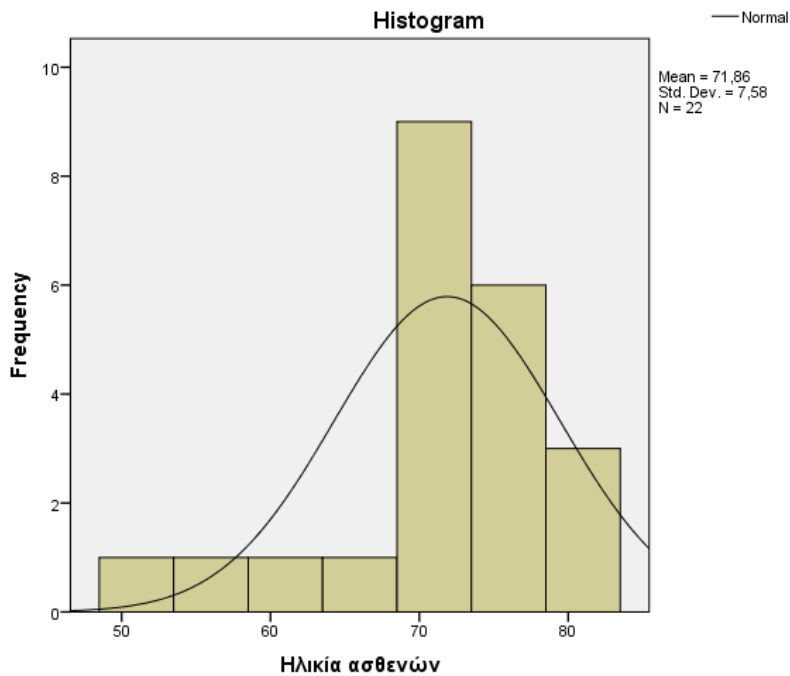
Εφόσον τα δεδομένα είναι περισσότερα από 50, λαμβάνουμε υπόψιν τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov και όχι τη δοκιμασία Shapiro-Wilk με το επιθυμητό να είναι ($p > 0,05$). Συνεπώς παρατηρούμε με βάση τον πίνακα η μεταβλητή ηλικία δεν ακολουθεί κανονική κατανομή και άρα θα χρησιμοποιηθεί μη – παραμετρική δοκιμασία για την ανάλυσή της.

Πίνακας 8.7: Περιγραφική στατιστική ανάλυση ηλικιών FECD ασθενών ατόμων ($n=22$) και έλεγχος κανονικότητας κατανομής τους.

Descriptives				
		Statistic	Std. Error	
Ηλικία ασθενών	Mean	71,86	1,616	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	68,50	
		Upper Bound	75,22	
	5% Trimmed Mean	72,39		
	Median	73,00		
	Variance	57,457		
	Std. Deviation	7,580		
	Minimum	51		
	Maximum	83		
	Range	32		
	Interquartile Range	8		
	Skewness	-1,379	,491	
	Kurtosis	2,151	,953	

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ηλικία ασθενών	,189	22	,040	,876	22	,010

a. Lilliefors Significance Correction

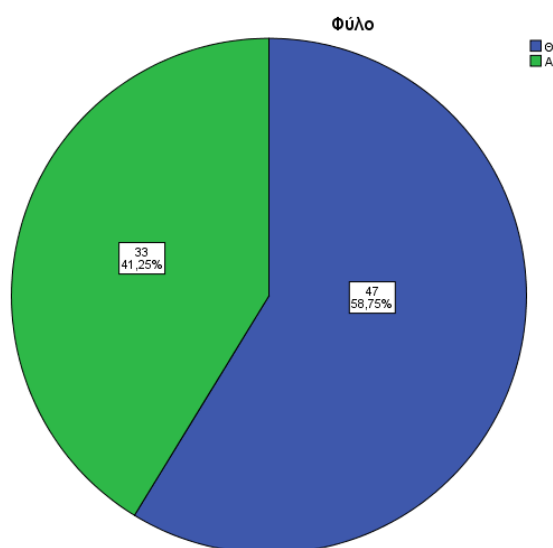


Εφόσον τα δεδομένα είναι λιγότερα από 50, λαμβάνουμε υπόψιν τη δοκιμασία Shapiro-Wilk και όχι τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov με το επιθυμητό να είναι ($p > 0,05$). Συνεπώς παρατηρούμε με βάση τον πίνακα η μεταβλητή ηλικία δεν ακολουθεί κανονική κατανομή και άρα θα χρησιμοποιηθεί μη – παραμετρική δοκιμασία για την ανάλυσή της.

8.8.1.2 Περιγραφική στατιστική ανάλυση ως προς το φύλο υγιών και ασθενών

Πίνακας 8.8: Περιγραφική στατιστική ανάλυση ως προς το φύλο για το σύνολο των υγιών μαρτύρων και FECD ασθενών ατόμων (n=80).

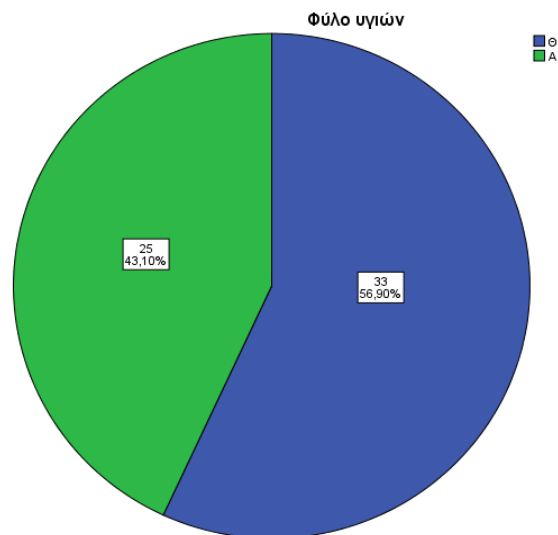
Φύλο					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Θ	47	58,8	58,8	58,8
	A	33	41,3	41,3	100,0
	Total	80	100,0	100,0	



Στο σύνολο των συμμετεχόντων (n=80) το 58,8% (47) είναι γυναίκες και το 41,3% (33) είναι άνδρες.

Πίνακας 8.9: Περιγραφική στατιστική ανάλυση ως προς το φύλο υγιών μαρτύρων (n=58).

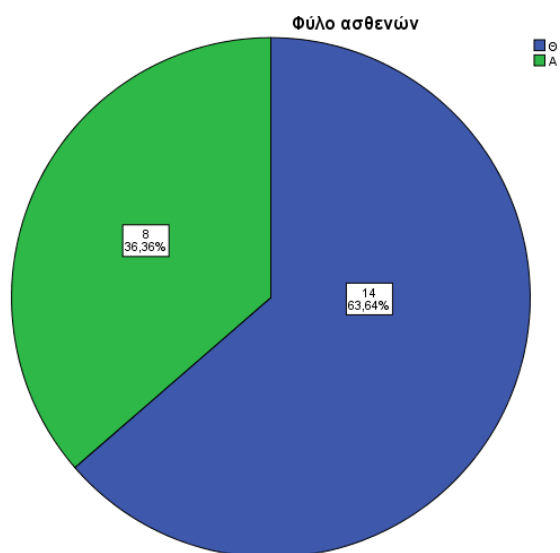
Φύλο υγιών					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Θ	33	56,9	56,9	56,9
	A	25	43,1	43,1	100,0
	Total	58	100,0	100,0	



Στους υγιείς (n=58) το 56,9% (33) είναι γυναίκες και το 43,1 (25) είναι άνδρες.

Πίνακας 8.10: Περιγραφική στατιστική ανάλυση ως προς το φύλο ασθενών FECD (n=22)

Φύλο ασθενών					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Θ	14	24,1	63,6	63,6
	A	8	13,8	36,4	100,0
	Total	22	37,9	100,0	
Missing	System	36	62,1		
Total		58	100,0		



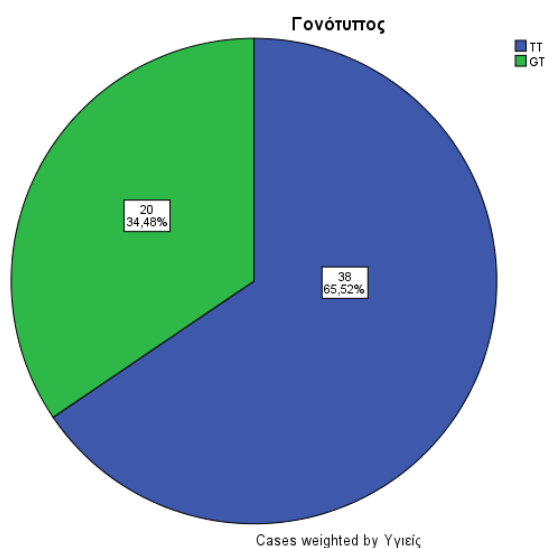
Στους ασθενείς (n=22) το 63,6% (14) είναι γυναίκες και το 36,4% (8) είναι άνδρες.

8.8.1.3 Περιγραφική στατιστική ανάλυση ως προς το γονότυπο υγιών και ασθενών

Στη συνέχεια έγινε περιγραφική στατιστική στις συχνότητες των τριών γονοτύπων για τον rs613872 πολυμορφισμό του *TCF4* γονιδίου, σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Πίνακας 8.11: Περιγραφική στατιστική ανάλυση ως προς συχνότητες των τριών γονοτύπων για τον rs613872 πολυμορφισμό του *TCF4* γονιδίου σε υγιείς (n=58).

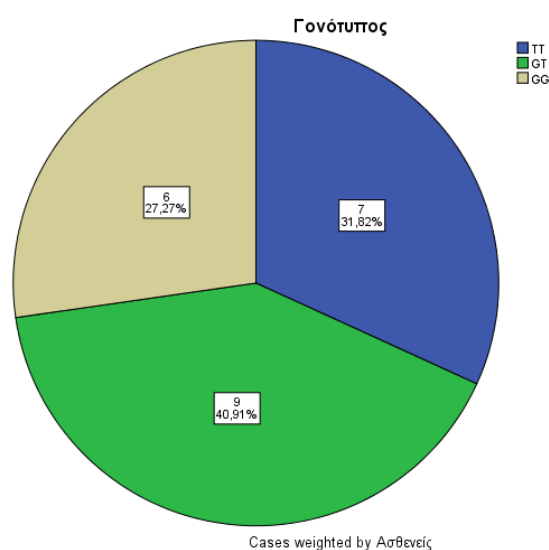
Γονότυπος υγιών					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	TT	38	65,5	65,5	65,5
	GT	20	34,5	34,5	100,0
	Total	58	100,0	100,0	



Στους υγιείς (n=58), βρέθηκαν 38 (65,5%) φυσιολογικοί TT και 20 (34,5%) ετεροζυγώτες GT.

Πίνακας 8.12: Περιγραφική στατιστική ανάλυση ως προς συχνότητες των τριών γονοτύπων για τον rs613872 πολυμορφισμό του *TCF4* γονιδίου σε FECD ασθενείς (n=22).

Γονότυπος FECD ασθενών					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	TT	7	31,8	31,8	31,8
	GT	9	40,9	40,9	72,7
	GG	6	27,3	27,3	100,0
	Total	22	100,0	100,0	



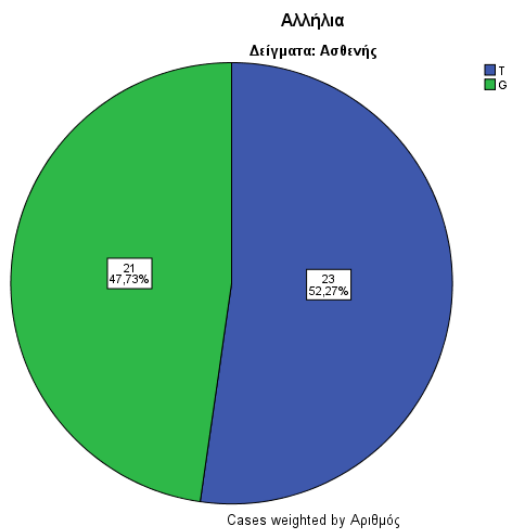
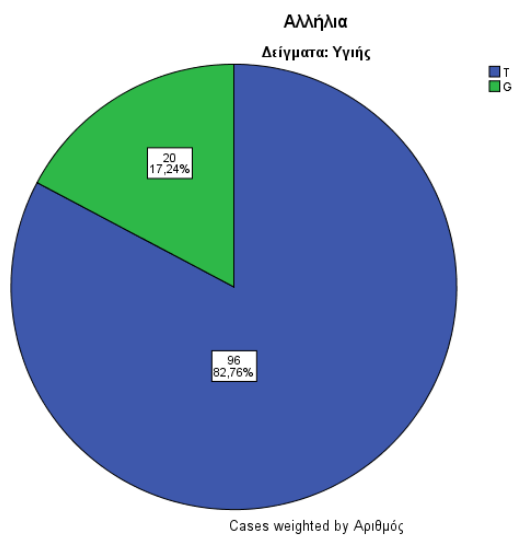
Στους ασθενείς (n=22) βρέθηκαν 7 (31,8%) φυσιολογικοί TT, 9 (40,9%) ετεροζυγώτες GT και 6 (27,3%) ομοζυγώτες μεταλλαγμένοι GG.

8.8.1.4 Περιγραφική στατιστική ανάλυση ως προς τα αλληλία υγιών και ασθενών και συνολικά.

Στη συνέχεια έγινε περιγραφική στατιστική στις συχνότητες των δύο αλληλίων για τον rs613872 πολυμορφισμό του *TCF4* γονιδίου, σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Πίνακας 8.13: Περιγραφική στατιστική ανάλυση ως προς συχνότητες των δύο αλληλίων για τον rs613872 πολυμορφισμό του *TCF4* γονιδίου σε FECD ασθενείς (n=44) και σε υγιείς (n=116).

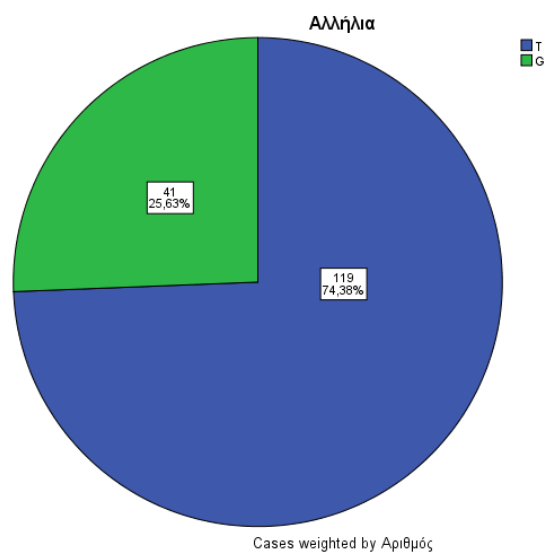
Αλληλία						
Δείγματα			Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Υγιής	Valid	T	96	82,8	82,8	82,8
		G	20	17,2	17,2	100,0
		Total	116	100,0	100,0	
Ασθενής	Valid	T	23	52,3	52,3	52,3
		G	21	47,7	47,7	100,0
		Total	44	100,0	100,0	



Το G αλληλίο αυξήθηκε από 17,24% στους υγιείς σε 47,43 στους ασθενείς.

Πίνακας 8.14: Περιγραφική στατιστική ανάλυση ως προς τη συχνότητα του G αλληλίου

Αλληλία					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	T	119	74,4	74,4	74,4
	G	41	25,6	25,6	100,0
	Total	160	100,0	100,0	



Το G αλληλίο ανευρίσκεται στους συμμετέχοντες σε ποσοστό 25,6%.

8.8.1.5 Διαφορά κατανομής φύλου μεταξύ υγιών και ασθενών.

Επιχειρήθηκε στατιστικός έλεγχος χ^2 συσχέτισης της συχνότητας κατανομής φύλου σε υγιείς μάρτυρες και σε ασθενείς FECD.

Πίνακας 8.14: Πίνακας που περιγράφει τη συχνότητα του φύλου (n=80) σε υγιείς και ασθενείς.

Φύλο * Νόσος Crosstabulation					
			Νόσος		Total
			Νόσος	Υγιείς	
Φύλο	Θ	Count	14	33	47
		% within Φύλο	29,8%	70,2%	100,0%
	Α	Count	8	25	33
		% within Φύλο	24,2%	75,8%	100,0%
Total		Count	22	58	80
		% within Φύλο	27,5%	72,5%	100,0%

Πίνακας 8.15: Έλεγχος χ^2 για τη διαφορά κατανομής φύλου σε υγιείς και ασθενείς FECD.

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	,299 ^a	1	,585		
Continuity Correction ^b	,086	1	,770		
Likelihood Ratio	,302	1	,583		
Fisher's Exact Test				,621	,388
Linear-by-Linear Association	,295	1	,587		
N of Valid Cases	80				
a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 9,08.					
b. Computed only for a 2x2 table					

Συνεπώς δεν υπάρχει διαφορά στην κατανομή του φύλου ανάμεσα σε υγιείς και ασθενείς ($p > 0,05$).

8.8.1.6 Διαφορά ηλικίας μεταξύ υγιών και ασθενών

Επιχειρήθηκε αρχικά Mann – Whitney δοκιμασία διαφοράς ηλικίας σε ασθενείς και υγιείς καθώς οι ηλικίες στις δύο ομάδες δεν ακολουθούν κανονική κατανομή

Πίνακας 8.16: Πίνακας δοκιμασίας Mann – Whitney διαφοράς ηλικίας σε ασθενείς και υγιείς.

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Ηλικία is the same across categories of Νόσος.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,284	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Συνεπώς δεν έχουν διαφορά ηλικίας οι ομάδες υγιών και ασθενών της μελέτης ($p > 0,05$).

Επίσης επιχειρήθηκε το πιο αυστηρό για έλεγχο t-test διαφοράς ηλικίας σε ασθενείς και υγιείς, χωρίς να προκύψει διαφορετικό αποτέλεσμα.

Πίνακας 8.17: Πίνακας που περιγράφει τη μέση τιμή των ηλικιών σε υγιείς και ασθενείς.

Group Statistics					
	Νόσος	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Ηλικία	Νόσος	22	71,86	7,580	1,616
	Υγιείς	58	73,53	9,647	1,267

Πίνακας 8.18: Πίνακας ελέγχου t-test για διαφορά ηλικίας σε ασθενείς και υγιείς.

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Ηλικία	Equal variances assumed	,048	,828	-,730	78	,467	-1,671	2,288	-6,225	2,884
	Equal variances not assumed			-,814	48,048	,420	-1,671	2,053	-5,799	2,458

8.8.1.7 Συσχέτιση της ηλικίας μεταξύ ατόμων που φέρουν το G αλληλίο και ατόμων που δεν το φέρουν.

Επιχειρήθηκε Mann – Whitney δοκιμασία διαφοράς ηλικίας σε συμμετέχοντες που φέρουν ή δεν φέρουν το G αλληλίο καθώς οι ηλικίες στις δύο ομάδες δεν ακολουθούν κανονική κατανομή.

Πίνακας 8.19: Πίνακας δοκιμασίας Mann – Whitney διαφοράς ηλικίας σε συμμετέχοντες που φέρουν ή δεν φέρουν το G αλληλίο.

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Ηλικία is the same across categories of Παρουσία G Αλληλίου.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,803	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Δεν υπάρχει διαφορά ηλικίας μεταξύ των συμμετεχόντων που φέρουν ή δεν φέρουν το αλληλίο (το αλληλίο δεν προσφέρει κάποιο πλεονέκτημα σε κάποια ηλικιακή ομάδα π.χ νεότερους ή ηλικιωμένους).

8.8.1.8 Συσχέτιση ηλικίας με τους γονότυπους.

Ελέγχθηκε η συσχέτιση της ηλικίας με τους τρεις γονότυπους του πολυμορφισμού στο *TCF4* γονίδιο. Ο μέσος όρος ηλικίας των ατόμων της μελέτης ήταν 74 έτη. Οι συμμετέχοντες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: μικρότερους ή μεγαλύτερους των 74 ετών. Ωστόσο δεν βρέθηκε στατιστική διαφορά που να φανερώνει συσχέτιση.

Πίνακας 8.20: Πίνακας συχνοτήτων γονοτύπων των 2 ηλικιακών ομάδων της μελέτης.

agegroup * Γονότυποι Crosstabulation						
		Γονότυποι			Total	
		GG	TT	GT		
agegroup	younger	Count	3	21	15	39
		% within Γονότυποι	50,0%	46,7%	51,7%	48,8%
	older	Count	3	24	14	41
		% within Γονότυποι	50,0%	53,3%	48,3%	51,2%
Total		Count	6	45	29	80
		% within Γονότυποι	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Πίνακας 8.21: Έλεγχος χ^2 για τη συσχέτιση της συχνότητας των γονοτύπων σε σχέση με τις δύο ηλικιακές ομάδες της μελέτης.

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	,185 ^a	2	,912
Likelihood Ratio	,185	2	,912
Linear-by-Linear Association	,086	1	,769
N of Valid Cases	80		

a. 2 cells (33,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,93.

8.8.1.9 Διωνυμική Λογαριθμιστική Παλινδρόμηση (Binary Logistic Regression)

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η δυνατότητα πρόβλεψης του νοσήματος με βάση τις ανεξάρτητες μεταβλητές: φύλο, ηλικία και τους τρεις γονότυπους ή το αλληλίο κινδύνου G του πολυμορφισμού rs613872. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 8.22: Συσχέτιση της νόσου με την ηλικία το φύλο και την παρουσία του G αλληλίου.

Variables in the Equation									
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
Step 1 ^a	Ηλικία	,032	,029	1,239	1	,266	1,032	,976	1,092
	Φύλο	,808	,594	1,848	1	,174	2,243	,700	7,191
	G_Αλληλίο	1,788	,606	8,704	1	,003	5,976	1,822	19,600
	Constant	-2,530	2,170	1,360	1	,244	,080		

a. Variable(s) entered on step 1: Ηλικία, Φύλο, G_Αλληλίο.

Πίνακας 8.23: Συσχέτιση της νόσου με την ηλικία το φύλο και τους τρεις γονότυπος της νόσου.

Variables in the Equation									
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
Step 1 ^a	Ηλικία	,017	,027	,419	1	,518	1,017	,966	1,072
	Φύλο	,056	,545	,011	1	,918	1,058	,363	3,082
	Γονότυποι	,572	,446	1,644	1	,200	1,772	,739	4,248
	Constant	-1,011	1,984	,260	1	,610	,364		

a. Variable(s) entered on step 1: Ηλικία, Φύλο, Γονότυποι.

Η παρουσία G αλληλίου είναι ο μόνος ισχυρός και ανεξάρτητος προβλεπτικός παράγοντας κινδύνου με $p=0,003$ και OR 5,98 (95% CI 1,82-19,60).

8.8.2 Στατιστική ανάλυση για το rs613872 του *TCF4* γονιδίου με SNPstats

Ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg, ο έλεγχος χ^2 και οι σχετικοί κίνδυνοι, τα όρια εμπιστοσύνης και οι τιμές AIC για κάθε μοντέλο κληρονομής των αλληλίων για το *TCF4* γονίδιο υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα SNPStats και παρατίθενται παρακάτω συμπεριλαμβανομένου και της παραμέτρου του φύλου:

Πίνακας 8.30: Τεστ Hardy-Weinberg για το *TCF4* γονίδιο (status 0: υγιείς, status 1: ασθενείς).

SNP exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=80)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	45	29	6	119	41	0.77
STATUS=0	38	20	0	96	20	0.19
STATUS=1	7	9	6	23	21	0.41

Καθώς $p > 0,05$, η κατανομή αλληλίων ακολουθεί τον κανόνα Hardy-Weinberg και τα αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης είναι συνεπώς έγκυρα.

Πίνακας 8.31: Συχνότητα G αλληλίου κινδύνου σε υγιείς και ασθενείς.

SNP allele frequencies (n=80)						
Allele	All subjects		FECD=0		FECD=1	
	Count	Proportio n	Count	Proportio n	Count	Proportio n
T	119	0.74	96	0.83	23	0.52
G	41	0.26	20	0.17	21	0.48

Το G αλληλίο αυξήθηκε από 17,24 στους υγιείς στο 47,43% στους ασθενείς

Πίνακας 8.32: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για το rs613872 του *TCF4* γονιδίου και οι υπολογιζόμενοι ORs (status 0: υγιείς, status 1: ασθενείς).

Model	Genotype	STATUS=0	STATUS=1	OR (95% CI)	P-value	AIC
Codominant	T/T	38 (65.5%)	7 (31.8%)	1.00	1e-04	80.8
	G/T	20 (34.5%)	9 (40.9%)	2.44 (0.79-7.54)		
	G/G	0 (0%)	6 (27.3%)	NA (0.00-NA)		
Dominant	T/T	38 (65.5%)	7 (31.8%)	1.00	0.0065	90.7
	G/T-G/G	20 (34.5%)	15 (68.2%)	4.07 (1.43-11.61)		
Recessive	T/T-G/T	58 (100%)	16 (72.7%)	1.00	<0.0001	81.3
	G/G	0 (0%)	6 (27.3%)	NA (0.00-NA)		
Overdominant	T/T-G/G	38 (65.5%)	13 (59.1%)	1.00	0.6	97.8
	G/T	20 (34.5%)	9 (40.9%)	1.32 (0.48-3.60)		
Log-additive	---	---	---	4.82 (1.98-11.73)	1e-04	83.5

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα για τον πολυμορφισμό rs613872 πιστοποιείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη νόσο: ενδεικτικά οι ομοζυγώτες μεταλλαγμένοι εμφανίζουν ποσοστό 27,3% στους ασθενείς και 0% στους υγιείς μάρτυρες. Το *TCF4* αλληλίο κινδύνου G προσδίδει OR 4,07 (CI 1,43-11,61), σύμφωνα με το επικρατές μοντέλο και OR 4,82 (CI 1,98-11,73), σύμφωνα με το log-additive (αθροιστικό) μοντέλο.

Πίνακας 8.33: Συσχέτιση του φύλου με την ασθένεια

SNP and SEX cross-classification interaction table (n=80, crude analysis)						
	F			M		
	STATUS=0	STATUS=1	OR (95% CI)	STATUS=0	STATUS=1	OR (95% CI)
T/T	26	6	1.00	12	1	0.36 (0.04-3.34)
G/T	6	4	2.89 (0.62-13.55)	14	5	1.55 (0.40-5.99)
G/G	0	4	---	0	2	---

Interaction p-value: 0.96

SEX within SNP (n=80, crude analysis)				
		STATUS=0	STATUS=1	OR (95% CI)
T/T		STATUS=0	STATUS=1	OR (95% CI)
	F	26	6	1.00
	M	12	1	0.36 (0.04-3.34)
G/T		STATUS=0	STATUS=1	OR (95% CI)
	F	6	4	1.00
	M	14	5	0.54 (0.11-2.72)
G/G		STATUS=0	STATUS=1	OR (95% CI)
	F	0	4	1.00
	M	0	2	1.00

Test for interaction in the trend: 0.65

SNP within SEX (n=80, crude analysis)				
F		STATUS=0	STATUS=1	OR (95% CI)
	T/T	26	6	1.00
	G/T	6	4	2.89 (0.62-13.55)
	G/G	0	4	---
M		STATUS=0	STATUS=1	OR (95% CI)
	T/T	12	1	1,00
	G/T	14	5	4.29 (0,44-41,96)
	G/G	0	2	---
Test for interaction in the trend: 0.96				

Όπως παρατηρούμε από τους πίνακες, ο πολυμορφισμός φαίνεται να λειτουργεί περισσότερο δυσμενώς για τους άνδρες καθώς αποτελεί το 56% των αλληλίων ανδρών με FECD (9/16) ενώ στις γυναίκες αποτελεί το 43% των αλληλίων γυναικών με FECD (14/28). Με βάση το τρίτο μέρος του Πίνακα 8.32, επηρεάζει σε μεγαλύτερο ποσοστό τους άνδρες που εμφανίζουν έστω και ένα μεταλλαγμένο αλληλίο με το OR (95% CI) να είναι 4,29 (0,44-41,96) σε σχέση με το 2,89 στις γυναίκες, δε φθάνει όμως σε επίπεδο σημαντικότητας στο σχετικά μικρό σε μέγεθος μελετώμενο πληθυσμό (συνεπώς υπάρχει ισχυρότερο trend στους άνδρες).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο : ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

9.1 Συμπεράσματα – Συζήτηση – Μελλοντικές κατευθύνσεις

Η ενδοθηλιακή δυστροφία του κερατοειδούς του Fuchs (FECD, Fuchs endothelial corneal dystrophy, OMIM 136800) αποτελεί μία προοδευτικά εξελισσόμενη, κληρονομική, αμφοτερόπλευρη διαταραχή του ενδοθηλίου του κερατοειδούς, που περιεγράφηκε αρχικά το 1910 από τον Αυστριακό οφθαλμίατρο Ernest Fuchs και έως σήμερα φέρει το όνομα του. Χαρακτηρίζεται από την απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων με ταυτόχρονη μεταβολή της μορφολογίας τους, την πάχυνση της μεμβράνης Descemet (DM) και το σχηματισμό εστιακών εναποθέσεων που ονομάζονται guttae. Σε τελικό στάδιο παρουσιάζεται ανάπτυξη οιδήματος στο στρώμα του κερατοειδούς εξαιτίας της απώλειας των ικανοτήτων αντλίας και φραγμού του ενδοθηλίου και σχηματισμός επιθηλιακών φυσαλίδων (bullae) με συνέπεια τη σημαντική μείωση της οπτικής οξύτητας, θολή όραση η οποία σταδιακά εξελίσσεται και μπορεί να οδηγήσει ακόμα και σε τύφλωση [51]. Υπάρχουν δύο παραλλαγές της FECD με βάση το χρόνο έναρξης της νόσου: α) η σπάνια FECD πρώιμης έναρξης (early-onset FECD) και β) η FECD όψιμης έναρξης (late-onset FECD) [55]. Ο επιπολασμός της FECD είναι δύσκολο να εκτιμηθεί δεδομένης της καθυστερημένης εμφάνισης της νόσου, της αργής εξέλιξής της και της έλλειψης συμπτωμάτων στα αρχικά στάδια. Αν και δεν έχουν διεξαχθεί επίσημες επιδημιολογικές μελέτες για την εκτίμηση του επιπολασμού ή της επίπτωσης αυτής της ασθένειας, έχει αναφερθεί ότι, στις Ηνωμένες Πολιτείες, η FECD πλήττει περίπου το 4% του πληθυσμού ηλικίας άνω των σαράντα, καθιστώντας την περισσότερο κοινή γενετική διαταραχή του ενδοθηλίου του κερατοειδούς. Είναι λιγότερο συχνή στους Ασιατικούς πληθυσμούς και στους πληθυσμούς της Μέσης Ανατολής ενώ αποτελεί κύρια ένδειξη για μεταμόσχευση κερατοειδούς ή για κερατοπλαστική παγκοσμίως [12].

Η FECD είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια του κερατοειδούς η παθογένεια της οποίας δεν είναι πλήρως κατανοητή. Πολλοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για να περιγράψουν την παθοφυσιολογία της νόσου, συμπεριλαμβανομένου του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου λόγω οξειδωτικού stress, της δυσλειτουργίας του μηχανισμού δράσης UPR (Unfolded Protein Response), της EMT (Epithelial–Mesenchymal Transition) και της δυσλειτουργίας του φραγμού ή της αντλίας του ενδοθηλίου. Επίσης η συσσώρευση πρωτεϊνών είναι μια πρόσθετη πτυχή της παθοφυσιολογίας της FECD, η οποία παρατηρείται ως πάχυνση της μεμβράνης του Descemet. Η πάχυνση έχει προταθεί ότι περιλαμβάνει αυξημένη έκκριση κολλαγόνου τύπου VIII από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, μελέτες FECD έδειξαν αυξημένη ποσότητα TGPBIp εντός της μεμβράνης Descemet και του ενδοθηλίου και ειδικά

η TGFBIp μαζί με την clusterin έχει αποδειχθεί ότι ανευρίσκονται στο εσωτερικό των guttae [83].

Μολονότι η ακριβής αιτιολογία της FED παραμένει ασαφής, γενετικοί παράγοντες έχουν προταθεί ως σημαντικοί παράγοντες κινδύνου. Η FECD όψιμης έναρξης σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο *COL8A2* (1p34.3, OMIM 120252). Ενώ μέχρι σήμερα, τέσσερα διαφορετικά γονίδια *ZEB1* ή *TCF8* (10p11.22, OMIM 189909), *AGBL1* (15q25.3, OMIM 615496), *LOXHD1* (18q21.1, OMIM 613072) και *SLC4A11* (20p13, OMIM 610206) καθώς και τέσσερις αιτιώδεις γενετικούς τόπους στα χρωμοσώματα 5q33.1-q35.2 (FCD3), 9p22.1-p24.1 (FCD4), 13pter-q12.13 (FCD1) και 18q21.2-q21.32 (FCD2), έχουν εμπλακεί στην παθογένεση της FECD όψιμης έναρξης [166]. Περαιτέρω, έχουν ταυτοποιηθεί στη γενωμική περιοχή FCD2 ένας σημειακός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP) rs613872, στο ιντρόνιο 3 του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα 4 (*TCF4*, OMIM 602272) και μία επέκταση επαναλαμβανόμενης επαναλήψεως τρινουκλεοτιδίων TGC (rs193922902) εντός του ιντρονίου 2. Η συχνότητα του πολυμορφισμού (SNP) rs613872 συσχετίζεται σημαντικά με το FECD, αυξάνοντας την πιθανότητα εμφάνισης FECD κατά 30 φορές σε ομόζυγα άτομα, και η συχνότητά του παραλληλίζεται με τον FECD επιπολασμό παγκοσμίως (επικράτηση της νόσου σε ΗΠΑ και Ευρώπη). Αντίστοιχα ο πολυμορφισμός (SNP) rs193922902 έχει πρόσφατα αναγνωριστεί ότι συνδέεται ισχυρά με την FECD και ένα μήκος επαναλήψεως >40 καθορίστηκε ότι παίζει παθογόνο ρόλο στην πλειονότητα των περιπτώσεων FECD και θεωρείται ότι αποτελεί έναν ισχυρό παράγοντα κινδύνου της εμφάνισης της νόσου [131].

Πολλοί παράγοντες συμβάλλουν στην έλλειψη της γνώσης του μηχανισμού δημιουργίας της FECD. Οι περισσότερες από τις μελέτες που πραγματοποιούνται για τη διερεύνηση της παθογένειας της νόσου γίνονται σε κερατοειδείς τελικού σταδίου, που αφαιρούνται κατά τη διάρκεια των μεταμοσχεύσεων. Επίσης η εξέλιξη της νόσου διαρκεί έως και 20 έτη, χωρίς να είναι εύκολο να μελετηθεί το χρονικό πλαίσιο της εξέλιξης της νόσου. Για παράδειγμα ποιος είναι ο ρόλος της συσσώρευσης πρωτεϊνών στη μη φυσιολογική DM και του σχηματισμού των guttae στη δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων και κατ'επέκταση στην επιβίωσή τους; Ποια η σημασία της FL (Fibrillar Layer) στιβάδας στη DM; Η έλλειψη γνώσεων των μηχανισμών της παθογένειας της FECD συμβάλλει στην απουσία αποτελεσματικής θεραπείας της νόσου. Η χειρουργική θεραπεία δεν είναι πάντα η αποτελεσματικότερη λύση. Η μεταμόσχευση κερατοειδούς έχει εξελιχθεί ραγδαία τα τελευταία 15 χρόνια και η αρχική τεχνική της διαμπερούς κερατοπλαστικής (Penetrating Keratoplasty – PK) έχει σχεδόν αντικατασταθεί. Νέες τεχνικές κερατοπλαστικών πραγματοποιούνται όπως είναι: Εν τω βάθει τμηματική ενδοθηλιακή κερατοπλαστική (Deep Lamellar Endothelial Keratoplasty – DLEK), Κερατοπλαστική ενδοθηλίου με απογύμνωση της δεσκαμετείου (Descemet Stripping/Automated Endothelial Keratoplasty - DSEK/DSEK), Κερατοπλαστική δεσκαμετείου μεμβράνης – ενδοθηλίου (Descemet's membrane endothelial keratoplasty –

DMEK) και μεταφορά Δεσκεμετείου- Ενδοθηλιακής μεμβράνης (Descemet membrane endothelial transfer – DMET). Παρόλα αυτά η κερατοπλαστική ενδοθηλίου με απογύμνωση της δεσκεμετείου, που είναι η πιο διαδεδομένη, εμφανίζει ένα μέσο ποσοστό οξείας απόρριψης του ενδοθηλιακού μοσχεύματος 10%, [224] ενώ υπάρχει πιθανότητα 17% χρόνιας απόρριψης του ενδοθηλιακού μοσχεύματος του κερατοειδούς ακόμα και μέσα στην τετραετία για τους ασθενείς με FECD [225]. Η απόρριψη μοσχεύματος σε αυτούς τους ασθενείς είναι γνωστό ότι έχει ως αποτέλεσμα σημαντική απώλεια των ήδη μειωμένων ενδοθηλιακών τους κυττάρων. Παράλληλα προσοχή χρειάζονται και οι ασθενείς που βρίσκονται σε προωμότερα στάδια καθώς το οίδημα του κερατοειδούς που σχετίζεται με την FECD, μπορεί να επιδεινωθεί μετά από π.χ. χειρουργική επέμβαση καταρράκτη ή κάποια άλλη επέμβαση διαθλαστικής χειρουργικής. Οι επεμβάσεις αυτές εάν είναι αναγκαίο προχωρούν με αυξημένη επαγρύπνηση από τη χειρουργική ομάδα, για τους ασθενείς που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο για FECD. Έτσι η ικανότητα διάγνωσης της FECD πριν αναπτυχθούν τα συμπτώματα και η γνώση των βιολογικών οδών που οδηγούν στη διαταραχή αυτή είναι σημαντική για τα περίπου 10 εκατομμύρια ασθενών που υποβάλλονται σε διαθλαστική ή χειρουργική επέμβαση καταρράκτη κάθε χρόνο σε παγκόσμιο επίπεδο [116]. Στο πλαίσιο αυτό ερευνητές εστιάζουν στην κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών γνωστών πολυμορφισμών και μεταλλάξεων που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της ασθένειας και στοχεύουν στην ανακάλυψη νέων που προδιαθέτουν για την εμφάνιση της νόσου με στόχο να προσδιοριστούν ομάδες αυξημένου κινδύνου εμφάνισης της ασθένειας που χρήζουν τακτικής παρακολούθησης ως ένα μέτρο έγκαιρης διάγνωσης της νόσου στα πρώιμα στάδια. Εκτός αυτού ο προσδιορισμός τέτοιων γενετικών πολυμορφισμών θα συμβάλει στην ανακάλυψη νέων στοχευμένων μέσων θεραπείας και εφαρμογής τους με βάση ενός εξατομικευμένου γενετικού προφίλ των ασθενών μέσω φαρμακογενωμικών μελετών.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη μεθοδολογιών για τη διερεύνηση και αξιολόγηση του επιπολασμού του γνωστού πολυμορφισμού rs613872 στο *TCF4* γονίδιο και των μεταλλάξεων L450W και Q455K στο *COL8A2* γονίδιο ως προς τη συσχέτισή τους με την FECD ασθένεια όψιμης έναρξης στον ελληνικό πληθυσμό.

Ο πολυμορφισμός rs613872 (g.97923C>A) του *TCF4* γονιδίου εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή στο 18q21, στο ιντρόνιο 3 του *TCF4* γονιδίου το οποίο κωδικοποιεί ένα μέλος της οικογένειας E-πρωτεϊνών (E2-2) που συσχετίζεται σημαντικά με το FECD. Οι μελετητές υποθέτουν ότι η μεταβολή αυτή στην ιντρονική περιοχή μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης παρά σε απώλεια της λειτουργία της, η οποία έχει ως αποτέλεσμα το Pitt-Hopkins syndrome (PTHS) διαταραχή που χαρακτηρίζεται από διανοητική αναπηρία, αναπτυξιακή καθυστέρηση, επιληπτικές κρίσεις και επεισοδιακό υπεραερισμό. Το rs613872 θεωρείται ένας ρυθμιστικός τόπος και όχι μια παραλλαγή

κωδικοποίησης, ωστόσο η πραγματική αιτία συσχέτισής του με το νόσημα δεν έχει ακόμα αποδειχθεί [116].

Το *COL8A2* γονίδιο εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 1p34.3 και έχει αναγνωριστεί ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό συνδέονται με την FECD πρώιμης έναρξης. Συγκεκριμένα η παρανοηματική μετάλλαξη στη θέση 1364 της κωδικοποιούσας αλληλουχίας του *COL8A2* γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση γλουταμίνης από λυσίνη (Q455K) στην τριπλή ελικοειδή περιοχή της πρωτεΐνης COL8A2. Η αντικατάσταση αυτή συνεπάγεται την αλλαγή της εξαιρετικά συντηρημένης γλουταμίνης με μια αρνητικά φορτισμένη λυσίνη, κάτι που μπορεί να μεταβάλει την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Αυτή η μετάλλαξη που δημοσιεύθηκε για πρώτη φορά το 2001 ήταν ο πρώτος χαρακτηρισμός της μοριακής βάσης οποιασδήποτε ενδοθηλιακής δυστροφίας του κερατοειδούς και η πρώτη παθολόγος παραλλαγή του *COL8A2* γονιδίου σε ανθρώπους. Η δεύτερη αυτοσωματική κυρίαρχη μετάλλαξη του γονιδίου *COL8A2* που συνδέεται με πρώιμης έναρξης FECD αποκαλύφθηκε το 2005. Αυτή η αλλαγή, αντικαθιστά τη λευκίνη με τρυπτοφάνη στο αμινοξύ 450 (L450W) και βρίσκεται επίσης στην τριπλή ελικοειδή περιοχή του κολλαγόνου της πρωτεΐνης COL8A2. Οι ασθενείς με αυτές τις μεταλλάξεις αναπτύσσουν συχνά σοβαρά συμπτώματα από τη στιγμή που είναι νεαροί ενήλικες. Οι μεταλλάξεις αυτές επηρεάζουν την τριπλή ελικοειδή δομή του κολλαγόνου VIII που μπορεί να μεταβάλει σημαντικά την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης, διακόπτοντας το πλέγμα κολλαγόνου στη DM [156].

Για το σκοπό της μελέτης εξετάστηκαν δείγματα περιφερικού αίματος 22 Ελλήνων ασθενών FECD όψιμης έναρξης (κριτήριο Krachmer ≥ 2), (63,6% γυναίκες και 36,4% άνδρες με Μ.Ο. ηλικίας τα 72 έτη και εύρος 51-83 έτη) και 58 υγιών μαρτύρων (56,9% γυναίκες και 43,1% άνδρες με Μ.Ο. ηλικίας τα 74 έτη και εύρος 27-87 έτη) ανάλογης ηλικιακής κατανομής (Mann Whitney-test, $p > 0,05$) και κατανομής φύλου (χ^2 test, $p > 0,05$) οι οποίοι και επελέγησαν στο σύνολό τους κατόπιν ενημέρωσης, έγγραφης συγκατάθεσης και οφθαλμολογικής αξιολόγησης. Για τη γονοτύπηση του πολυμορφισμού rs613872 του *TCF4* γονιδίου αναπτύχθηκε μεθοδολογία με PCR πραγματικού χρόνου με δύο ανιχνευτές υβριδισμού για τη συμπληρωματική αλυσίδα και επακόλουθα ανάλυση καμπυλών τήξης. Η μεθοδολογία αυτή αναπτύχθηκε στο όργανο LightCycler της Roche με ικανοποιητικό τρόπο, ήταν ταχεία και αξιόπιστη, επιδεικνύοντας καλή απόδοση ($E=1,89$) μεγάλη πιστότητα (αναπαραγωγιμότητα Cq βαθμονομητή between run precision με $CV \leq 1,2\%$), ικανοποιητικό όριο ανίχνευσης LOD (Limit Of Detection) 28 pg/μL, και αξιοπιστία στη γονοτύπηση (Tm T αλληλίου 57,20 °C και G αλληλίου 63,75 °C, $CV=1,7\%$ και $CV=1,25\%$ αντίστοιχα, $\Delta Tm=7,39$). Οι κορυφές της καμπύλης στις δύο θερμοκρασίες τήξης των ετεροζυγωτών ήταν σχεδόν ισοϋψείς με λόγο επιφανείας υπό των καμπυλών G/T 0,982 με $CV=7,9\%$. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν για επιλεγμένα δείγματα με τη μέθοδο αναφοράς DNA Sequencing και υπήρξε 100% συμφωνία. Για τη μελέτη των μεταλλάξεων L450W και Q455K

στο *COL8A2* γονίδιο και τη διερεύνηση τυχόν άλλων αλλαγών που μπορούν να συσχετίζονται με την FECD, αναπτύχθηκε μέθοδος DNA Sequencing κατά Sanger σε πιο ευρεία περιοχή (375 bp) με την οποία εξετάστηκαν όλα τα δείγματα της μελέτης.

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

Όσον αφορά τον rs613872 πολυμορφισμό του *TCF4* γονιδίου, η κατανομή γονοτύπων ήταν σύμφωνη με ισορροπία κατά Hardy-Weinberg ($p > 0,005$). Από τους 22 ασθενείς, 7 (31,81%) βρέθηκαν φυσιολογικοί TT ομοζυγώτες, 9 (40,90%) ετεροζυγώτες GT και 6 (27,27%) ομοζυγώτες μεταλλαγμένοι GG. Μεταξύ των 58 υγιών μαρτύρων περιλαμβάνονταν 38 (65,52%) φυσιολογικοί TT ομοζυγώτες και 20 (34,48%) ετεροζυγώτες GT, ενώ δεν ανιχνεύθηκε κανείς ομοζυγώτης μεταλλαγμένος GG. Η παρουσία του μεταλλαγμένου αλληλίου κινδύνου G αυξήθηκε από 17,24% στους υγιείς σε 47,73% στους ασθενείς. Προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση για τον πολυμορφισμό rs613872 του *TCF4* γονιδίου με την FECD με OR 4,07 (95% CI 1,43-11,61), σύμφωνα με το επικρατές μοντέλο και OR 4,82 (95% CI 1,98-11,73), σύμφωνα με το log-additive μοντέλο. Με διωνυμική λογαριθμιστική ανάλυση, στην εξέταση όλων των διαθέσιμων κλινικών δεδομένων μαζί (ηλικία, φύλο, γονότυπος, παρουσία G αλληλίου κινδύνου), η παρουσία του G αλληλίου παραμένει ισχυρός και ανεξάρτητος προβλεπτικός παράγοντας κινδύνου με $p = 0,003$ και OR 5,98 (95% CI 1,82-19,60). Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με μελέτες που ανευρίσκονται στη διεθνή βιβλιογραφία που και αυτές επιβεβαιώνουν τη συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με την ασθένεια. Συσχέτιση του αλληλίου κινδύνου G με την ηλικία δε διαπιστώθηκε στα υπό εξέταση δείγματα. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν για επιλεγμένα δείγματα με τη μέθοδο αναφοράς DNA Sequencing και σε δείγμα υγιούς μάρτυρα φυσιολογικού για rs613872, ανευρέθηκε στην ίδια γενωμική περιοχή ο σημειακός πολυμορφισμός dbSNP rs117826375 NM_001083962.1:c.145+42316G>A (ιντρονική περιοχή). Τέλος αναφορικά με το φύλο, ο υπό εξέταση rs613872 πολυμορφισμός φαίνεται να λειτουργεί περισσότερο δυσμενώς για τους άνδρες, αφού επηρεάζει σε μεγαλύτερο ποσοστό αυτούς που εμφανίζουν έστω και ένα μεταλλαγμένο αλληλίο με OR 4,29 (95% CI 0,44-41,96), δε φθάνει όμως σε επίπεδο σημαντικότητας στο σχετικά μικρό μελετώμενο πληθυσμό. (Δηλαδή υπάρχει ισχυρότερο trend στους άνδρες). Το εύρημα συνάδει και με την τελευταία και μεγαλύτερη GWAS μελέτη στο FECD νόσημα (OR 7,56 στους άνδρες ενώ 5,06 στις γυναίκες) [173].

Όλα τα δείγματα (22 ασθενών και 58 υγιών μαρτύρων), βρέθηκαν να είναι ομόζυγα φυσιολογικά και για τους δύο πολυμορφισμούς rs80358192 (g.31753) T>G [L450W] και rs80358191 (g.31767) C >A [Q455K] για το *COL8A2* γονίδιο. Συνεπώς επιβεβαιώθηκαν τα δεδομένα που υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία ότι οι μεταλλάξεις L450W και Q455K στο

γονίδιο *COL8A2* δε συσχετίζονται με την FECD όψιμης έναρξης, αλλά μόνο με την FECD πρώιμης έναρξης. Ωστόσο είχε νόημα η σάρωση μιας ευρύτερης περιοχής για την ανίχνευση υπομορφικών μεταλλάξεων που μπορεί να έχουν κάποια επίδραση για FECD όψιμης έναρξης. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το DNA Sequencing ανιχνεύθηκαν σε δύο δείγματα ασθενών Fuchs (F5 & F13) επιπρόσθετα τρεις σημειακοί πολυμορφισμοί: 1) dbSNP rs35495320 NM_005202.3:c1487G>A→p.G495G (F5) σε ετεροζυγωτία σε άντρα ασθενή Fuchs 61 ετών TCF4 ετεροζυγώτη. Η συγκεκριμένη σιωπηρή μετάλλαξη ανευρίσκεται στον παγκόσμιο πληθυσμό με MAF: 0,1815. 2) NM_005202.3:c1491G>A→p.A497T (F13) σε ετεροζυγωτία σε άντρα ασθενή Fuchs 78 ετών TCF4 ετεροζυγώτη. Αυτή η αλλαγή αμινοξέος από αλανίνη σε θρεονίνη αναζητήθηκε σε βάσεις δεδομένων (PMut, Mutation@sting, Proven) για να βρεθεί κατά πόσο είναι δυνατόν να προκαλεί σημαντικές αλλαγές στη δομή και λειτουργία της πρωτεΐνης. Η αλλαγή αυτή θεωρήθηκε σύμφωνα με τις βάσεις δεδομένων ανεκτή. 3) στον ίδιο ασθενή ανευρέθηκε ακόμα η σιωπηλή dbSNP rs560539803 NM_005202.3:c1526C>A→p.P508P σε ετεροζυγωτία. Η συγκεκριμένη σιωπηλή μετάλλαξη ανευρίσκεται στον παγκόσμιο πληθυσμό με MAF: 0,0004. Αν και οι πολυμορφισμοί αυτοί δεν φαίνεται να οδηγούν σε σημαντική αλλαγή στη δομή της πρωτεΐνης πρέπει να τονίσουμε ότι ανιχνεύθηκαν στην περιοχή triple – helix- domain του κολλαγόνου, που καθορίζει τη σταθεροποίηση της δομής της τριπλής του έλικας. Αλλαγές σε αμινοξέα αυτής της περιοχής ελαττώνουν τη σταθερότητα της τριπλής έλικας η οποία γίνεται έτσι πιο εύκαμπτη και επιρρεπής στη διάσπαση από γενικές πρωτεάσες [156].

Ενδιαφέρουσα θα είναι η προοπτική επέκτασης της μελέτης σε περισσότερα δείγματα ασθενών με την ίδια κατανομή σε ηλικία και φύλο, καθώς και η μελέτη στο υπόλοιπο τμήμα του *TCF4* γονιδίου και ιδιαίτερα στο τμήμα όπου παρατηρείται η επέκταση της ιντρονικής τρινουκλεοτιδικής επανάληψης κυτοσίνης-θυμίνης-γουανίνης (CTG)-(CTG18.1) η οποία θεωρείται ότι αποτελεί έναν σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για την νόσο αφού προσδίδει πάνω από 30 φορές αύξηση του κινδύνου για ανάπτυξη FECD στους Καυκάσιους. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι δύο πολυμορφισμοί ανευρίσκονται σε μέτρια ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium $r^2=0,47$). Συνεπώς θα υπάρχουν FECD ασθενείς που θα έχουν τον ένα μόνο από τους δύο πολυμορφισμούς. Παράλληλα η ταυτοποίηση και των άλλων εμπλεκόμενων γονιδίων θα βοηθούσε στη μελέτη του υπόβαθρου της ασθένειας και κομβικό ρόλο σε αυτή τη μελέτη παίζει η ανάπτυξη καινοτόμων τεχνολογιών όπως η αλληλούχιση της επόμενης γενεάς (Next Generation Sequencing) σε DNA από περιφερικό αίμα. Μια μελλοντική ανάπτυξη NGS για το FECD νόσημα θα περιελάμβανε όλα τα προαναφερθέντα γονίδια καθώς και νέα ευρήματα συσχετίσεων από τελευταία μελέτη όπως τα: KANK4 (KN motif- and ankyrin repeat domain-containing protein 4), rs79742895, LAMC1 (laminin gamma 1), rs3768617, ATP1B1 (Na⁺/ K⁺ transporting ATPase, beta-1

polypeptide), rs1200114 [173]. Ακόμα μια μεγάλη πρόκληση για τη μελέτη θα ήταν η συλλογή δειγμάτων FECD πρώιμης έναρξης και η μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονται σε αυτή, αφού για πολλούς ερευνητές οι δύο νόσοι ακολουθούν κοινά μονοπάτια στη παθοφυσιολογία τους. Τέλος είναι απαραίτητη η συλλογή περισσότερων κλινικών δεδομένων και η συσχέτισή τους με τα γενετικά δεδομένα που θα βοηθήσουν να οδηγηθούμε σε πιο ασφαλή συμπεράσματα για την πρόβλεψη, πρόγνωση και βαρύτητα της νόσου.

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 FECD 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 εξεταζόμενων, 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.

Μελέτες επίστασης, λειτουργικές μελέτες σε επίπεδο πρωτεϊνών, αλλά και η διερεύνηση της σχέσης γονότυπου – κλινικών δεδομένων – περιβαλλοντικών παραγόντων, μπορούν να αποκωδικοποιήσουν την πλήρη αλληλουχία γεγονότων που οδηγούν από τη γενετική ευαλωτότητα στην εκδήλωση της παθολογίας. Παράδειγμα το οξειδωτικό στρες ευθύνεται τόσο για την εμφάνιση όσο και για την εξέλιξη της FECD και επομένως αποτελεί στόχο για την πρόληψη και τη θεραπεία της ασθένειας.

Ακόμα, μεγάλο ενδιαφέρον θα είχε η εκπόνηση μελλοντικά προοπτικών μελετών εφαρμογής θεραπευτικών μέτρων με βάση το γονότυπο. Κάτι τέτοιο θα έθετε τις βάσεις για την επιλογή της πλέον κατάλληλης και λιγότερο επικίνδυνης για κάθε ασθενή αντιμετώπισης στα πλαίσια παρεμβάσεων εξατομικευμένης ιατρικής, μέσω πρωτοποριακών νέων μεθόδων όπως είναι η γενετική τροποποίηση (gene editing). Η γενετική τροποποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς έχει ήδη επιτευχθεί και οι ανιχνευόμενες μεταλλάξεις FECD θα μπορούσαν θεωρητικά να διορθωθούν στα ενδοθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς ως πιθανή θεραπεία για αυτή τη νόσο.

Τα τελευταία χρόνια είναι εντυπωσιακή η πρόοδος που έχει σημειωθεί στην κατανόηση της FECD. Πρέπει επίσης να είμαστε ενθουσιασμένοι με τις προκλήσεις και ευκαιρίες που βρίσκονται μπροστά μας. Η FECD είναι ένα σαφές παράδειγμα μιας νόσου που μπορεί να ωφεληθεί πλήρως από τη σχέση της σύγχρονης κλινικής θεραπείας, της βασικής έρευνας της επιστήμης και της πρόληψης των ασθενειών. Δεδομένου του συνεχώς αυξανόμενου ρυθμού προόδου σε αυτούς τους τομείς, η παθοφυσιολογία της νόσου θα

γίνεται πιο κατανοητή και ο σχεδιασμός στοχευμένων, μη χειρουργικών θεραπειών για την επιβράδυνση ή την αναστολή της εξέλιξης της νόσου θα είναι εφικτός στο εγγύς μέλλον.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Fuchs E. Dystrophia epithelialis corneae. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1910;76: 478-508.
- [2] Koeppe L. Klinische Beobachtungen mit der Nernstspaltlampe und dem Hornhautmikroskop. Albrecht Von Graefes Arch Ophthalmol 1916;91: 375-9.
- [3] Vogt A. Weiere Ergebnisse der Spaltlampenmikroskopie des vordern Bulbusabschnittes. Arch Ophthalmol 1921; 63-113.
- [4] Krachmer JH, Purcell JJ, Jr., Young CW, Bucher KD. Corneal endothelial dystrophy. A study of 64 families. Arch Ophthalmol 1978;96: 2036-9.
- [5] Graves B. Report to the lang clinical research committee, royal london ophthalmic hospital: a bilateral chronic affection of the endothelial face of the cornea of elderly persons with an account of the technical and clinical principles of its slit-lamp observation. Br J Ophthalmol 1924;8: 502-44.
- [6] Friedenwald H, Friedenwald JS. Epithelial dystrophy of the cornea. Br J Ophthalmol 1925;9: 14-20.
- [7] Clegg JG. Disease of the cornea. Re- marks on dystrophies of the cornea and glaucoma with special reference to a familial variety of the former. Trans Ophthalmol Soc UK 1915;35: 245-56.
- [8] Stocker FW. The endothelium of the cornea and its clinical implications. Trans Am Ophthalmol Soc 1953;51: 669-786.
- [9] Jun AS. One hundred years of Fuchs' dystrophy. Ophthalmology 2010;117: 859-60.
- [10] Eghrari AO, McGlumphy EJ, Iliff BW, et al. Prevalence and severity of fuchs corneal dystrophy in Tangier Island. Am J Ophthalmol 2012;153: 1067-72.
- [11] Afshari NA, Pittard AB, Siddiqui A, Klintworth GK. Clinical study of Fuchs corneal endothelial dystrophy leading to penetrating keratoplasty: a 30-year experience. Arch Ophthalmol 2006;124: 777-80.
- [12] Elhalis H, Azizi B, Jurkunas UV. Fuchs endothelial corneal dystrophy. Ocul Surf 2010;8: 173-84.
- [13] Goar EL. Dystrophy of the Corneal Endothelium (Cornea Guttata), with Report of a Histologic Examination. Trans Am Ophthalmol Soc 1933;31: 48-59.
- [14] Lorenzetti DW, Uotila MH, Parikh N, Kaufman HE. Central cornea guttata. Incidence in the general population. Am J Ophthalmol 1967;64: 1155-8.
- [15] Zoega GM, Arnarsson A, Sasaki H, Soderberg PG, Jonasson F. The 7-year cumulative incidence of cornea guttata and morphological changes in the corneal endothelium in the Reykjavik Eye Study. Acta Ophthalmol 2013;91: 212-8.

- [16] Higa A, Sakai H, Sawaguchi S, et al. Prevalence of and risk factors for cornea guttata in a population-based study in a southwestern island of Japan: the Kumejima study. *Arch Ophthalmol* 2011;129: 332-6.
- [17] Santo RM, Yamaguchi T, Kanai A, Okisaka S, Nakajima A. Clinical and histopathologic features of corneal dystrophies in Japan. *Ophthalmology* 1995;102: 557-67.
- [18] Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF. Comparison of the corneal endothelium in an American and a Japanese population. *Arch Ophthalmol* 1985;103: 68-70.
- [19] Minear MA, Li YJ, Rimmmer J, et al. Genetic screen of African Americans with Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Mol Vis* 2013;19: 2508-16.
- [20] Eghrari AO, Gottsch JD. Fuchs' corneal dystrophy. *Expert Rev Ophthalmol* 2010;5: 147-59.
- [21] Siganos CS, Tsiklis NS, Miltsakakis DG, et al. Changing indications for penetrating keratoplasty in Greece, 1982-2006: a multicenter study. *Cornea* 2010;29: 372-4.
- [22] Gain P, Jullienne R, He Z, et al. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol* 2016;134: 167-73.
- [23] Park CY, Lee JK, Gore PK, Lim CY, Chuck RS. Keratoplasty in the United States: A 10-Year Review from 2005 through 2014. *Ophthalmology* 2015;122: 2432-42.
- [24] Zhang X, Igo RP, Jr., Fondran J, et al. Association of smoking and other risk factors with Fuchs' endothelial corneal dystrophy severity and corneal thickness. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54: 5829-35.
- [25] Jurkunas UV, Bitar MS, Funaki T, Azizi B. Evidence of oxidative stress in the pathogenesis of fuchs endothelial corneal dystrophy. *Am J Pathol* 2010;177: 2278-89.
- [26] Kitagawa K, Kojima M, Sasaki H, et al. Prevalence of primary cornea guttata and morphology of corneal endothelium in aging Japanese and Singaporean subjects. *Ophthalmic Res* 2002;34: 135-8.
- [27] Knupp C, Pinali C, Lewis PN, et al. The architecture of the cornea and structural basis of its transparency. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2009;78: 25-49.
- [28] Beebe DC. Maintaining transparency: a review of the developmental physiology and pathophysiology of two avascular tissues. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19: 125-33.
- [29] Dupps WJ, Jr., Wilson SE. Biomechanics and wound healing in the cornea. *Exp Eye Res* 2006;83: 709-20.
- [30] DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg* 2011;37: 588-98.
- [31] Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology* 2013;120: 1778-85.
- [32] Στάγκος Ν.Τ. Κλινική Οφθαλμολογία.: Οφθαλμολογική Κλινική Α.Π.Θ.: University Studio Press, Θεσσαλονίκη., 2002.

- [33] Newsome DA, Gross J, Hassell JR. Human corneal stroma contains three distinct collagens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;22: 376-81.
- [34] Hjortdal JO. Regional elastic performance of the human cornea. *J Biomech* 1996;29: 931-42.
- [35] Van den Bogerd B, Dhubhghaill SN, Koppen C, Tassignon MJ, Zakaria N. A review of the evidence for in vivo corneal endothelial regeneration. *Surv Ophthalmol* 2017.
- [36] Ali M, Raghunathan V, Li JY, Murphy CJ, Thomasy SM. Biomechanical relationships between the corneal endothelium and Descemet's membrane. *Exp Eye Res* 2016;152: 57-70.
- [37] Fischbarg J. *The biology of the eye* 4th Edition. 4th ed.: Elsevier, Amsterdam, 2006.
- [38] Hugh Davson. *The cornea. Physiology of the eye.*: Elsevier; 1980, p. 105-30.
- [39] O'Neal MR, Polse KA. In vivo assessment of mechanisms controlling corneal hydration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26: 849-56.
- [40] Bourassa S, Benjamin WJ, Boltz RL. Effect of humidity on the deswelling function of the human cornea. *Curr Eye Res* 1991;10: 493-500.
- [41] Edelhauser HF. The balance between corneal transparency and edema: the Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47: 1754-67.
- [42] Sugrue SP, Zieske JD. ZO1 in corneal epithelium: association to the zonula occludens and adherens junctions. *Exp Eye Res* 1997;64: 11-20.
- [43] Dawson D, Ubels JL, Edelhauser H. *Cornea and Sclera*. 2011.
- [44] Bonanno JA. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp Eye Res* 2012;95: 2-7.
- [45] Waring GO, III, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology* 1982;89: 531-90.
- [46] Knop E, Edward J, Holland, Mark J, Mannis (eds): *Ocular Surface Disease* GAΦMedical and Surgical Management. 242 ed. 2004.
- [47] Weiss JS, Moller HU, Lisch W, et al. The IC3D classification of the corneal dystrophies. *Cornea* 2008;27 Suppl 2: S1-83.
- [48] Schmedt T, Silva MM, Ziaei A, Jurkunas U. Molecular bases of corneal endothelial dystrophies. *Exp Eye Res* 2012;95: 24-34.
- [49] Musch DC, Niziol LM, Stein JD, Kamyar RM, Sugar A. Prevalence of corneal dystrophies in the United States: estimates from claims data. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52: 6959-63.
- [50] Moller HU, Weiss JS. IC3D classification of corneal dystrophies. *Dev Ophthalmol* 2011;48: 1-8.
- [51] Weiss JS, Moller HU, Aldave AJ, et al. IC3D classification of corneal dystrophies--edition 2. *Cornea* 2015;34: 117-59.

- [52] Gipson IK. Age-related changes and diseases of the ocular surface and cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54: ORSF48-ORSF53.
- [53] Gottsch JD, Sundin OH, Liu SH, et al. Inheritance of a novel COL8A2 mutation defines a distinct early-onset subtype of fuchs corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46: 1934-9.
- [54] Zhang C, Bell WR, Sundin OH, et al. Immunohistochemistry and electron microscopy of early-onset fuchs corneal dystrophy in three cases with the same L450W COL8A2 mutation. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2006;104: 85-97.
- [55] Hamill CE, Schmedt T, Jurkunas U. Fuchs endothelial cornea dystrophy: a review of the genetics behind disease development. *Semin Ophthalmol* 2013;28: 281-6.
- [56] Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD. Fuchs Corneal Dystrophy. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015;134: 79-97.
- [57] Louttit MD, Kopplin LJ, Igo RP, Jr., et al. A multicenter study to map genes for Fuchs endothelial corneal dystrophy: baseline characteristics and heritability. *Cornea* 2012;31: 26-35.
- [58] Adamis AP, Filatov V, Tripathi BJ, Tripathi RC. Fuchs' endothelial dystrophy of the cornea. *Surv Ophthalmol* 1993;38: 149-68.
- [59] Oh KT, Weil LJ, Oh DM, Mathers WD. Corneal thickness in Fuchs' dystrophy with and without epithelial oedema. *Eye (Lond)* 1998;12 (Pt 2): 282-4.
- [60] Repp DJ, Hodge DO, Baratz KH, McLaren JW, Patel SV. Fuchs' endothelial corneal dystrophy: subjective grading versus objective grading based on the central-to-peripheral thickness ratio. *Ophthalmology* 2013;120: 687-94.
- [61] Laing RA, Leibowitz HM, Oak SS, et al. Endothelial mosaic in Fuchs' dystrophy. A qualitative evaluation with the specular microscope. *Arch Ophthalmol* 1981;99: 80-3.
- [62] Kitagawa K, Fujisawa A, Mizuno T, Sasaki K. Twenty-three cases of primary cornea guttata. *Jpn J Ophthalmol* 2001;45: 93-8.
- [63] Suh LH, Vaughn Emerson M. Fuchs Endothelial Dystrophy: Pathogenesis and Management. In: Reinhard T, Larkin F, Eds. *Cornea and External Eye Disease*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008, p. 1-13.
- [64] Chiou AG, Kaufman SC, Beuerman RW, et al. Confocal microscopy in cornea guttata and Fuchs' endothelial dystrophy. *Br J Ophthalmol* 1999;83: 185-9.
- [65] Giasson CJ, Solomon LD, Polse KA. Morphometry of corneal endothelium in patients with corneal guttata. *Ophthalmology* 2007;114: 1469-75.
- [66] Zoega GM, Fujisawa A, Sasaki H, et al. Prevalence and risk factors for cornea guttata in the Reykjavik Eye Study. *Ophthalmology* 2006;113: 565-9.
- [67] McLaren JW, Bachman LA, Kane KM, Patel SV. Objective assessment of the corneal endothelium in Fuchs' endothelial dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55: 1184-90.

- [68] Alomar TS, Al-Aqaba M, Gray T, Lowe J, Dua HS. Histological and confocal microscopy changes in chronic corneal edema: implications for endothelial transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52: 8193-207.
- [69] Kopplin LJ, Przepyszny K, Schmotzer B, et al. Relationship of Fuchs endothelial corneal dystrophy severity to central corneal thickness. *Arch Ophthalmol* 2012;130: 433-9.
- [70] McLaren JW, Nau CB, Erie JC, Bourne WM. Corneal thickness measurement by confocal microscopy, ultrasound, and scanning slit methods. *Am J Ophthalmol* 2004;137: 1011-20.
- [71] Shousha MA, Perez VL, Wang J, et al. Use of ultra-high-resolution optical coherence tomography to detect in vivo characteristics of Descemet's membrane in Fuchs' dystrophy. *Ophthalmology* 2010;117: 1220-7.
- [72] Hara M, Morishige N, Chikama T, Nishida T. Comparison of confocal biomicroscopy and noncontact specular microscopy for evaluation of the corneal endothelium. *Cornea* 2003;22: 512-5.
- [73] Bucher F, Adler W, Lehmann HC, et al. Corneal nerve alterations in different stages of Fuchs' endothelial corneal dystrophy: an in vivo confocal microscopy study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2014;252: 1119-26.
- [74] Schrems-Hoesl LM, Schrems WA, Cruzat A, et al. Cellular and subbasal nerve alterations in early stage Fuchs' endothelial corneal dystrophy: an in vivo confocal microscopy study. *Eye (Lond)* 2013;27: 42-9.
- [75] Ahuja Y, Baratz KH, McLaren JW, Bourne WM, Patel SV. Decreased corneal sensitivity and abnormal corneal nerves in Fuchs endothelial dystrophy. *Cornea* 2012;31: 1257-63.
- [76] Amin SR, Baratz KH, McLaren JW, Patel SV. Corneal abnormalities early in the course of Fuchs' endothelial dystrophy. *Ophthalmology* 2014;121: 2325-33.
- [77] Wacker K, McLaren JW, Amin SR, Baratz KH, Patel SV. Corneal High-Order Aberrations and Backscatter in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. *Ophthalmology* 2015;122: 1645-52.
- [78] Wacker K, McLaren JW, Kane KM, Baratz KH, Patel SV. Corneal Hydration Control in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57: 5060-5.
- [79] Ljubimov AV, Atilano SR, Garner MH, et al. Extracellular matrix and Na⁺,K⁺-ATPase in human corneas following cataract surgery: comparison with bullous keratopathy and Fuchs' dystrophy corneas. *Cornea* 2002;21: 74-80.
- [80] Hernandez-Quintela E, Mayer F, Dighiero P, et al. Confocal microscopy of cystic disorders of the corneal epithelium. *Ophthalmology* 1998;105: 631-6.
- [81] Vedana G, Villarreal G, Jr., Jun AS. Fuchs endothelial corneal dystrophy: current perspectives. *Clin Ophthalmol* 2016;10: 321-30.
- [82] Patel SV, McLaren JW. In vivo confocal microscopy of Fuchs endothelial dystrophy before and after endothelial keratoplasty. *JAMA Ophthalmol* 2013;131: 611-8.

- [83] Zhang J, Patel DV. The pathophysiology of Fuchs' endothelial dystrophy--a review of molecular and cellular insights. *Exp Eye Res* 2015;130: 97-105.
- [84] Hecker LA, McLaren JW, Bachman LA, Patel SV. Anterior keratocyte depletion in fuchs endothelial dystrophy. *Arch Ophthalmol* 2011;129: 555-61.
- [85] You L, Kruse FE, Volcker HE. Neurotrophic factors in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41: 692-702.
- [86] Wacker K, Baratz KH, Maguire LJ, McLaren JW, Patel SV. Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty for Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy: Five-Year Results of a Prospective Study. *Ophthalmology* 2016;123: 154-60.
- [87] Son HS, Villarreal G, Jr., Meng H, Eberhart CG, Jun AS. On the origin of 'guttae'. *Br J Ophthalmol* 2014;98: 1308-10.
- [88] Gottsch JD, Sundin OH, Rencs EV, et al. Analysis and documentation of progression of Fuchs corneal dystrophy with retroillumination photography. *Cornea* 2006;25: 485-9.
- [89] Oie Y, Watanabe S, Nishida K. Evaluation of Visual Quality in Patients With Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Cornea* 2016;35 Suppl 1: S55-S58.
- [90] Watanabe S, Oie Y, Fujimoto H, et al. Relationship between Corneal Guttae and Quality of Vision in Patients with Mild Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. *Ophthalmology* 2015;122: 2103-9.
- [91] Bergmanson JP, Sheldon TM, Goosey JD. Fuchs' endothelial dystrophy: a fresh look at an aging disease. *Ophthalmic Physiol Opt* 1999;19: 210-22.
- [92] Klintworth GK. Corneal dystrophies. *Orphanet J Rare Dis* 2009;4: 7.
- [93] Johnson DH, Bourne WM, Campbell RJ. The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas. *Arch Ophthalmol* 1982;100: 1942-7.
- [94] Patel DV, McGhee CN. Contemporary in vivo confocal microscopy of the living human cornea using white light and laser scanning techniques: a major review. *Clin Exp Ophthalmol* 2007;35: 71-88.
- [95] Bourne WM, Johnson DH, Campbell RJ. The ultrastructure of Descemet's membrane. III. Fuchs' dystrophy. *Arch Ophthalmol* 1982;100: 1952-5.
- [96] Yuen HK, Rassier CE, Jardeleza MS, et al. A morphologic study of Fuchs dystrophy and bullous keratopathy. *Cornea* 2005;24: 319-27.
- [97] Xia D, Zhang S, Nielsen E, et al. The Ultrastructures and Mechanical Properties of the Descemet's Membrane in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Sci Rep* 2016;6: 23096.
- [98] Fujimoto H, Maeda N, Soma T, et al. Quantitative regional differences in corneal endothelial abnormalities in the central and peripheral zones in Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55: 5090-8.

- [99] Engler C, Kelliher C, Spitze AR, et al. Unfolded protein response in fuchs endothelial corneal dystrophy: a unifying pathogenic pathway? *Am J Ophthalmol* 2010;149: 194-202.
- [100] Hidayat AA, Cockerham GC. Epithelial metaplasia of the corneal endothelium in Fuchs endothelial dystrophy. *Cornea* 2006;25: 956-9.
- [101] Borderie VM, Baudrimont M, Vallee A, et al. Corneal endothelial cell apoptosis in patients with Fuchs' dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41: 2501-5.
- [102] Szentmary N, Szende B, Suveges I. Epithelial cell, keratocyte, and endothelial cell apoptosis in Fuchs' dystrophy and in pseudophakic bullous keratopathy. *Eur J Ophthalmol* 2005;15: 17-22.
- [103] Li QJ, Ashraf MF, Shen DF, et al. The role of apoptosis in the pathogenesis of Fuchs endothelial dystrophy of the cornea. *Arch Ophthalmol* 2001;119: 1597-604.
- [104] Azizi B, Ziaei A, Fuchsluger T, et al. p53-regulated increase in oxidative-stress--induced apoptosis in Fuchs endothelial corneal dystrophy: a native tissue model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52: 9291-7.
- [105] Wojcik KA, Kaminska A, Blasiak J, Szaflik J, Szaflik JP. Oxidative stress in the pathogenesis of keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Int J Mol Sci* 2013;14: 19294-308.
- [106] Cejkova J, Cejka C. The role of oxidative stress in corneal diseases and injuries. *Histol Histopathol* 2015;30: 893-900.
- [107] Czarny P, Kasprzak E, Wielgorski M, et al. DNA damage and repair in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Mol Biol Rep* 2013;40: 2977-83.
- [108] Jurkunas UV, Bitar MS, Rawe I, et al. Increased clusterin expression in Fuchs' endothelial dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49: 2946-55.
- [109] Jurkunas UV, Bitar M, Rawe I. Colocalization of increased transforming growth factor-beta-induced protein (TGFBIP) and Clusterin in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50: 1129-36.
- [110] Jalimarada SS, Ogando DG, Bonanno JA. Loss of ion transporters and increased unfolded protein response in Fuchs' dystrophy. *Mol Vis* 2014;20: 1668-79.
- [111] Burns RR, Bourne WM, Brubaker RF. Endothelial function in patients with cornea guttata. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;20: 77-85.
- [112] Wilson SE, Bourne WM, O'Brien PC, Brubaker RF. Endothelial function and aqueous humor flow rate in patients with Fuchs' dystrophy. *Am J Ophthalmol* 1988;106: 270-8.
- [113] Aboobakar IF, Allingham RR. Developments in Ocular Genetics: 2013 Annual Review. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)* 2014;3: 181-93.
- [114] Forrest MP, Waite AJ, Martin-Rendon E, Blake DJ. Knockdown of human TCF4 affects multiple signaling pathways involved in cell survival, epithelial to mesenchymal transition and neuronal differentiation. *PLoS One* 2013;8: e73169.

- [115] Forrest MP, Hill MJ, Quantock AJ, Martin-Rendon E, Blake DJ. The emerging roles of TCF4 in disease and development. *Trends Mol Med* 2014;20: 322-31.
- [116] Baratz KH, Tosakulwong N, Ryu E, et al. E2-2 protein and Fuchs's corneal dystrophy. *N Engl J Med* 2010;363: 1016-24.
- [117] Aldave AJ, Han J, Frausto RF. Genetics of the corneal endothelial dystrophies: an evidence-based review. *Clin Genet* 2013;84: 109-19.
- [118] Li YJ, Minear MA, Rimmler J, et al. Replication of TCF4 through association and linkage studies in late-onset Fuchs endothelial corneal dystrophy. *PLoS One* 2011;6: e18044.
- [119] Sepp M, Kannike K, Eesmaa A, Urb M, Timmusk T. Functional diversity of human basic helix-loop-helix transcription factor TCF4 isoforms generated by alternative 5' exon usage and splicing. *PLoS One* 2011;6: e22138.
- [120] Igo RP, Jr., Kopplin LJ, Joseph P, et al. Differing roles for TCF4 and COL8A2 in central corneal thickness and fuchs endothelial corneal dystrophy. *PLoS One* 2012;7: e46742.
- [121] Lau LC, Ma L, Young AL, et al. Association of common variants in TCF4 and PTPRG with Fuchs' corneal dystrophy: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014;9: e109142.
- [122] Kuot A, Hewitt AW, Griggs K, et al. Association of TCF4 and CLU polymorphisms with Fuchs' endothelial dystrophy and implication of CLU and TGFBI proteins in the disease process. *Eur J Hum Genet* 2012;20: 632-8.
- [123] Gupta R, Kumawat BL, Paliwal P, et al. Association of ZEB1 and TCF4 rs613872 changes with late onset Fuchs endothelial corneal dystrophy in patients from northern India. *Mol Vis* 2015;21: 1252-60.
- [124] Tang H, Zhang W, Yan XM, et al. Analysis of SLC4A11, ZEB1, LOXHD1, COL8A2 and TCF4 gene sequences in a multi-generational family with late-onset Fuchs corneal dystrophy. *Int J Mol Med* 2016;37: 1487-500.
- [125] Stamler JF, Roos BR, Wagoner MD, et al. Confirmation of the association between the TCF4 risk allele and Fuchs endothelial corneal dystrophy in patients from the Midwestern United States. *Ophthalmic Genet* 2013;34: 32-4.
- [126] Li D, Peng X, Sun H. Association of TCF4 polymorphisms and Fuchs' endothelial dystrophy: a meta-analysis. *BMC Ophthalmol* 2015;15: 61.
- [127] Riazuddin SA, McGlumphy EJ, Yeo WS, et al. Replication of the TCF4 intronic variant in late-onset Fuchs corneal dystrophy and evidence of independence from the FCD2 locus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52: 2825-9.
- [128] Breschel TS, McInnis MG, Margolis RL, et al. A novel, heritable, expanding CTG repeat in an intron of the SEF2-1 gene on chromosome 18q21.1. *Hum Mol Genet* 1997;6: 1855-63.
- [129] Soliman AZ, Xing C, Radwan SH, Gong X, Mootha VV. Correlation of Severity of Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy With Triplet Repeat Expansion in TCF4. *JAMA Ophthalmol* 2015;133: 1386-91.

- [130] McMurray CT. Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nat Rev Genet* 2010;11: 786-99.
- [131] Wieben ED, Aleff RA, Eckloff BW, et al. Comprehensive assessment of genetic variants within TCF4 in Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55: 6101-7.
- [132] Xing C, Gong X, Hussain I, et al. Transethnic replication of association of CTG18.1 repeat expansion of TCF4 gene with Fuchs' corneal dystrophy in Chinese implies common causal variant. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55: 7073-8.
- [133] Nanda GG, Padhy B, Samal S, Das S, Alone DP. Genetic association of TCF4 intronic polymorphisms, CTG18.1 and rs17089887, with Fuchs' endothelial corneal dystrophy in an Indian population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55: 7674-80.
- [134] Eghrari AO, Vasanth S, Wang J, et al. CTG18.1 Expansion in TCF4 Increases Likelihood of Transplantation in Fuchs Corneal Dystrophy. *Cornea* 2017;36: 40-3.
- [135] Foja S, Luther M, Hoffmann K, Rupprecht A, Gruenauer-Kloevekorn C. CTG18.1 repeat expansion may reduce TCF4 gene expression in corneal endothelial cells of German patients with Fuchs' dystrophy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2017;255: 1621-31.
- [136] Luther M, Grunauer-Kloevekorn C, Weidle E, et al. [TGC Repeats in Intron 2 of the TCF4 Gene have a Good Predictive Power Regarding to Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy]. *Klin Monbl Augenheilkd* 2016;233: 187-94.
- [137] Vasanth S, Eghrari AO, Gapsis BC, et al. Expansion of CTG18.1 Trinucleotide Repeat in TCF4 Is a Potent Driver of Fuchs' Corneal Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56: 4531-6.
- [138] Mootha VV, Hussain I, Cunnusamy K, et al. TCF4 Triplet Repeat Expansion and Nuclear RNA Foci in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56: 2003-11.
- [139] Kuot A, Hewitt AW, Snibson GR, et al. TGC repeat expansion in the TCF4 gene increases the risk of Fuchs' endothelial corneal dystrophy in Australian cases. *PLoS One* 2017;12: e0183719.
- [140] Sundin OH. Genetics of Fuchs Corneal Dystrophy Comes of Age: Sweet Repeats. *JAMA Ophthalmol* 2015;133: 1392.
- [141] Riazuddin SA, Vasanth S, Katsanis N, Gottsch JD. Mutations in *AGBL1* cause dominant late-onset Fuchs corneal dystrophy and alter protein-protein interaction with TCF4. *Am J Hum Genet* 2013;93: 758-64.
- [142] Riazuddin SA, Parker DS, McGlumphy EJ, et al. Mutations in *LOXHD1*, a recessive-deafness locus, cause dominant late-onset Fuchs corneal dystrophy. *Am J Hum Genet* 2012;90: 533-9.
- [143] Zhang W, Ogando DG, Bonanno JA, Obukhov AG. Human *SLC4A11* Is a Novel NH₃/H⁺ Co-transporter. *J Biol Chem* 2015;290: 16894-905.
- [144] Vithana EN, Morgan PE, Ramprasad V, et al. *SLC4A11* mutations in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Hum Mol Genet* 2008;17: 656-66.

- [145] Riazuddin SA, Vithana EN, Seet LF, et al. Missense mutations in the sodium borate cotransporter SLC4A11 cause late-onset Fuchs corneal dystrophy. *Hum Mutat* 2010;31: 1261-8.
- [146] Soumitra N, Loganathan SK, Madhavan D, et al. Biosynthetic and functional defects in newly identified SLC4A11 mutants and absence of COL8A2 mutations in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *J Hum Genet* 2014;59: 444-53.
- [147] Zhang P, Sun Y, Ma L. ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle* 2015;14: 481-7.
- [148] Krafchak CM, Pawar H, Moroi SE, et al. Mutations in TCF8 cause posterior polymorphous corneal dystrophy and ectopic expression of COL4A3 by corneal endothelial cells. *Am J Hum Genet* 2005;77: 694-708.
- [149] Mehta JS, Vithana EN, Tan DT, et al. Analysis of the posterior polymorphous corneal dystrophy 3 gene, TCF8, in late-onset Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49: 184-8.
- [150] Riazuddin SA, Zaghoul NA, Al-Saif A, et al. Missense mutations in TCF8 cause late-onset Fuchs corneal dystrophy and interact with FCD4 on chromosome 9p. *Am J Hum Genet* 2010;86: 45-53.
- [151] Lechner J, Dash DP, Muszynska D, et al. Mutational spectrum of the ZEB1 gene in corneal dystrophies supports a genotype-phenotype correlation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54: 3215-23.
- [152] Greenhill NS, Ruger BM, Hasan Q, Davis PF. The alpha1(VIII) and alpha2(VIII) collagen chains form two distinct homotrimeric proteins in vivo. *Matrix Biol* 2000;19: 19-28.
- [153] Illidge C, Kielty C, Shuttleworth A. Type VIII collagen: heterotrimeric chain association. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33: 521-9.
- [154] Kapoor R, Sakai LY, Funk S, et al. Type VIII collagen has a restricted distribution in specialized extracellular matrices. *J Cell Biol* 1988;107: 721-30.
- [155] Shuttleworth CA. Type VIII collagen. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29: 1145-8.
- [156] Biswas S, Munier FL, Yardley J, et al. Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the alpha2 chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy. *Hum Mol Genet* 2001;10: 2415-23.
- [157] Gottsch JD, Zhang C, Sundin OH, et al. Fuchs corneal dystrophy: aberrant collagen distribution in an L450W mutant of the COL8A2 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46: 4504-11.
- [158] Matthaei M, Hu J, Meng H, et al. Endothelial cell whole genome expression analysis in a mouse model of early-onset Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54: 1931-40.
- [159] Liskova P, Prescott Q, Bhattacharya SS, Tuft SJ. British family with early-onset Fuchs' endothelial corneal dystrophy associated with p.L450W mutation in the COL8A2 gene. *Br J Ophthalmol* 2007;91: 1717-8.

- [160] Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD. Distinct Clinical Phenotype of Corneal Dystrophy Predicts the p.(Leu450Trp) Substitution in COL8A2. *Cornea* 2016;35: 587-91.
- [161] Mok JW, Kim HS, Joo CK. Q455V mutation in COL8A2 is associated with Fuchs' corneal dystrophy in Korean patients. *Eye (Lond)* 2009;23: 895-903.
- [162] Kobayashi A, Fujiki K, Murakami A, et al. Analysis of COL8A2 gene mutation in Japanese patients with Fuchs' endothelial dystrophy and posterior polymorphous dystrophy. *Jpn J Ophthalmol* 2004;48: 195-8.
- [163] Aldave AJ, Rayner SA, Salem AK, et al. No pathogenic mutations identified in the COL8A1 and COL8A2 genes in familial Fuchs corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47: 3787-90.
- [164] Afshari NA, Li YJ, Pericak-Vance MA, Gregory S, Klintworth GK. Genome-wide linkage scan in fuchs endothelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50: 1093-7.
- [165] Jun AS, Meng H, Ramanan N, et al. An alpha 2 collagen VIII transgenic knock-in mouse model of Fuchs endothelial corneal dystrophy shows early endothelial cell unfolded protein response and apoptosis. *Hum Mol Genet* 2012;21: 384-93.
- [166] Iloff BW, Riazuddin SA, Gottsch JD. The genetics of Fuchs' corneal dystrophy. *Expert Rev Ophthalmol* 2012;7: 363-75.
- [167] Kelliher C, Chakravarti S, Vij N, et al. A cellular model for the investigation of Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Exp Eye Res* 2011;93: 880-8.
- [168] Meng H, Matthaie M, Ramanan N, et al. L450W and Q455K Col8a2 knock-in mouse models of Fuchs endothelial corneal dystrophy show distinct phenotypes and evidence for altered autophagy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54: 1887-97.
- [169] Sundin OH, Jun AS, Broman KW, et al. Linkage of late-onset Fuchs corneal dystrophy to a novel locus at 13pTel-13q12.13. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47: 140-5.
- [170] Sundin OH, Broman KW, Chang HH, et al. A common locus for late-onset Fuchs corneal dystrophy maps to 18q21.2-q21.32. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47: 3919-26.
- [171] Riazuddin SA, Eghrari AO, Al-Saif A, et al. Linkage of a mild late-onset phenotype of Fuchs corneal dystrophy to a novel locus at 5q33.1-q35.2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50: 5667-71.
- [172] Eghrari AO, Garrett BS, Mumtaz AA, et al. Retroillumination Photography Analysis Enhances Clinical Definition of Severe Fuchs Corneal Dystrophy. *Cornea* 2015;34: 1623-6.
- [173] Afshari NA, Igo RP, Jr., Morris NJ, et al. Genome-wide association study identifies three novel loci in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Nat Commun* 2017;8: 14898.
- [174] Goldberg RA, Raza S, Walford E, Feuer WJ, Goldberg JL. Fuchs endothelial corneal dystrophy: clinical characteristics of surgical and nonsurgical patients. *Clin Ophthalmol* 2014;8: 1761-6.

- [175] Vianna LM, Leatherman J, Jun AS. Vision with Fuchs endothelial dystrophy. *JAMA Ophthalmol* 2015;133: e145353.
- [176] Clouzeau C, Godefroy D, Riancho L, et al. Hyperosmolarity potentiates toxic effects of benzalkonium chloride on conjunctival epithelial cells in vitro. *Mol Vis* 2012;18: 851-63.
- [177] Tan DT, Dart JK, Holland EJ, Kinoshita S. Corneal transplantation. *Lancet* 2012;379: 1749-61.
- [178] Melles GR, Lander F, Beekhuis WH, Remeijer L, Binder PS. Posterior lamellar keratoplasty for a case of pseudophakic bullous keratopathy. *Am J Ophthalmol* 1999;127: 340-1.
- [179] de Sanctis U, Alovise C, Bauchiero L, et al. Changing trends in corneal graft surgery: a ten-year review. *Int J Ophthalmol* 2016;9: 48-52.
- [180] Fernandez MM, Afshari NA. Endothelial Keratoplasty: From DLEK to DMEK. *Middle East Afr J Ophthalmol* 2010;17: 5-8.
- [181] Cursiefen C, Kuchle M, Naumann GO. Changing indications for penetrating keratoplasty: histopathology of 1,250 corneal buttons. *Cornea* 1998;17: 468-70.
- [182] Melles GR. Posterior lamellar keratoplasty: DLEK to DSEK to DMEK. *Cornea* 2006;25: 879-81.
- [183] Bhandari V, Reddy JK, Relekar K, Prabhu V. Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty versus Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty in the Fellow Eye for Fuchs Endothelial Dystrophy: A Retrospective Study. *Biomed Res Int* 2015;2015: 750567.
- [184] Grottone GT, Pereira NC, Gomes JA. Endothelial keratoplasty: evolution and horizons. *Arq Bras Oftalmol* 2012;75: 439-46.
- [185] Guell JL, El Husseiny MA, Manero F, Gris O, Elies D. Historical Review and Update of Surgical Treatment for Corneal Endothelial Diseases. *Ophthalmol Ther* 2014;3: 1-15.
- [186] van Dijk K, Baydoun L, Konder R, Melles G. Article: Contact Lenses After Keratoplasty What to expect and what to look for with contact lens management in post-keratoplasty corneas. 29 ed. 2014.
- [187] Melles GR, Eggink FA, Lander F, et al. A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty. *Cornea* 1998;17: 618-26.
- [188] Terry MA, Ousley PJ. Deep lamellar endothelial keratoplasty visual acuity, astigmatism, and endothelial survival in a large prospective series. *Ophthalmology* 2005;112: 1541-8.
- [189] Melles GR, Lander F, Nieuwendaal C. Sutureless, posterior lamellar keratoplasty: a case report of a modified technique. *Cornea* 2002;21: 325-7.
- [190] Melles GR, Wijdh RH, Nieuwendaal CP. A technique to excise the descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis). *Cornea* 2004;23: 286-8.

- [191] Gorovoy MS. Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea* 2006;25: 886-9.
- [192] Nielsen E, Ivarsen A, Kristensen S, Hjortdal J. Fuchs' endothelial corneal dystrophy: a controlled prospective study on visual recovery after endothelial keratoplasty. *Acta Ophthalmol* 2016;94: 780-7.
- [193] Melles GR, Ong TS, Ververs B, van der Wees J. Preliminary clinical results of Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2008;145: 222-7.
- [194] Droutsas K, Lazaridis A, Papaconstantinou D, et al. Visual Outcomes After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Versus Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty-Comparison of Specific Matched Pairs. *Cornea* 2016;35: 765-71.
- [195] Studeny P, Farkas A, Vokrojova M, Liskova P, Jirsova K. Descemet membrane endothelial keratoplasty with a stromal rim (DMEK-S). *Br J Ophthalmol* 2010;94: 909-14.
- [196] Bruinsma M, Tong CM, Melles GR. What does the future hold for the treatment of Fuchs endothelial dystrophy; will 'keratoplasty' still be a valid procedure? *Eye (Lond)* 2013;27: 1115-22.
- [197] Dirisamer M, Ham L, Dapena I, van DK, Melles GR. Descemet membrane endothelial transfer: "free-floating" donor Descemet implantation as a potential alternative to "keratoplasty". *Cornea* 2012;31: 194-7.
- [198] Birbal RS, Parker J, Dirisamer M, et al. Descemet Membrane Endothelial Transfer: Ultimate Outcome. *Cornea* 2017.
- [199] Shah RD, Randleman JB, Grossniklaus HE. Spontaneous corneal clearing after Descemet's stripping without endothelial replacement. *Ophthalmology* 2012;119: 256-60.
- [200] Zaniolo K, Bostan C, Rochette DO, et al. Culture of human corneal endothelial cells isolated from corneas with Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Exp Eye Res* 2012;94: 22-31.
- [201] Borkar DS, Veldman P, Colby KA. Treatment of Fuchs Endothelial Dystrophy by Descemet Stripping Without Endothelial Keratoplasty. *Cornea* 2016;35: 1267-73.
- [202] Koizumi N, Okumura N, Ueno M, Kinoshita S. New therapeutic modality for corneal endothelial disease using Rho-associated kinase inhibitor eye drops. *Cornea* 2014;33 Suppl 11: S25-S31.
- [203] Koizumi N, Okumura N, Ueno M, et al. Rho-associated kinase inhibitor eye drop treatment as a possible medical treatment for Fuchs corneal dystrophy. *Cornea* 2013;32: 1167-70.
- [204] Kim EC, Meng H, Jun AS. Lithium treatment increases endothelial cell survival and autophagy in a mouse model of Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Br J Ophthalmol* 2013;97: 1068-73.

- [205] Kim EC, Meng H, Jun AS. N-Acetylcysteine increases corneal endothelial cell survival in a mouse model of Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Exp Eye Res* 2014;127: 20-5.
- [206] Zavala J, Lopez Jaime GR, Rodriguez Barrientos CA, Valdez-Garcia J. Corneal endothelium: developmental strategies for regeneration. *Eye (Lond)* 2013;27: 579-88.
- [207] Wieben ED, Aleff RA, Tosakulwong N, et al. A common trinucleotide repeat expansion within the transcription factor 4 (TCF4, E2-2) gene predicts Fuchs corneal dystrophy. *PLoS One* 2012;7: e49083.
- [208] Du J, Aleff RA, Soragni E, et al. RNA toxicity and missplicing in the common eye disease fuchs endothelial corneal dystrophy. *J Biol Chem* 2015;290: 5979-90.
- [209] Jun AS, Larkin DF. Prospects for gene therapy in corneal disease. *Eye (Lond)* 2003;17: 906-11.
- [210] Mahdieh N, Rabbani B. An overview of mutation detection methods in genetic disorders. *Iran J Pediatr* 2013;23: 375-88.
- [211] Nollau P, Wagener C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. IFCC Scientific Division, Committee on Molecular Biology Techniques. *Clin Chem* 1997;43: 1114-28.
- [212] Evrard A, Boulle N, Lutfalla G. Real-time PCR. *Nanoscience.*: Sprienger Berlin; 2009.
- [213] Lianidou E, Τεχνικές μοριακής διάγνωστικής. Πανεπιστήμιο Αθηνών. Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα ειδίκευσης στην Κλινική Βιοχημεία - Μοριακή διαγνωστική. 2015.
- [214] Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27: 95-125.
- [215] Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. St. Louis, Mo.: Elsevier Saunders, 2006.
- [216] Kaltenboeck B, Wang C. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Adv Clin Chem* 2005;40: 219-59.
- [217] Arya M, Shergill IS, Williamson M, et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2005;5: 209-19.
- [218] Bregestovski P, Waseem T, Mukhtarov M. Genetically encoded optical sensors for monitoring of intracellular chloride and chloride-selective channel activity. *Front Mol Neurosci* 2009;2: 15.
- [219] Lyon E, Wittwer CT. LightCycler technology in molecular diagnostics. *J Mol Diagn* 2009;11: 93-101.
- [220] Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. 1977. *Biotechnology* 1992;24: 99-103.
- [221] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74: 5463-7.
- [222] Wilson SE, Bourne WM. Fuchs' dystrophy. *Cornea* 1988;7: 2-18.

- [223] Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006;22: 1928-9.
- [224] Lee WB, Jacobs DS, Musch DC, et al. Descemet's stripping endothelial keratoplasty: safety and outcomes: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 2009;116: 1818-30.
- [225] Li JY, Terry MA, Goshe J, Shamie N, Davis-Boozer D. Graft rejection after Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty: graft survival and endothelial cell loss. *Ophthalmology* 2012;119: 90-4.