



ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**“Διερεύνηση της γενετικής βάσης στην αντιμετώπιση της
ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας”**

ΚΑΛΛΙΟΠΗ ΓΟΥΡΓΟΥΛΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020

“Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του ΕΚΠΑ δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (ν. 5343/1932, άρθρο 202) και το κείμενο της Διδακτορικής Διατριβής δεν αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.”

Μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα καθηγήτρια :

Κλεονίκη Λάμνησου – Αν. Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Μέλη:

Παναγιώτης Θεοδοσιάδης – Καθηγητής Οφθαλμολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Παναγούλα Κόλλια – Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

1. Κλεονίκη Λάμνησου – Αν. Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

2. Παναγιώτης Θεοδοσιάδης – Καθηγητής Οφθαλμολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

3. Παναγούλα Κόλλια – Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

4. Σπυρίδων Ευθυμιόπουλος – Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

5. Δημήτριος Στραβοπόδης – Αν. Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

6. Ειρήνη Χατζηράλλη – Επ. Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

7. Γεώργιος Δεδούσης – Καθηγητής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Περίληψη

Εισαγωγή: Η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας (HEΩ) αποτελεί τη συχνότερη αιτία τύφλωσης σε ασθενείς άνω των 50 ετών στις αναπτυγμένες χώρες. Η HEΩ διακρίνεται σε δύο μορφές: τη μη εξιδρωματική (ξηρή) και την εξιδρωματική (υγρή). Η HEΩ ξηρού τύπου χαρακτηρίζεται από διαταραχές που λαμβάνουν χώρα στο σύμπλεγμα μελάγχρου επιθηλίου - μεμβράνης του Bruch - χοριοειδοτριχοειδών, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αλλοιώσεων, με σημαντικότερες τα drusen. Η HEΩ υγρού τύπου χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη χοριοειδικής νεοαγγείωσης, η οποία επάγεται από τη δράση του Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF). Μελέτες έχουν δείξει τη προληπτική επίδραση των αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής στην καθυστέρηση της εξέλιξης της HEΩ ξηρού τύπου, ενώ για την αντιμετώπιση της HEΩ υγρού τύπου χρησιμοποιούνται ευρέως παράγοντες αντι-VEGF. Η παθογένεια της νόσου δεν είναι πλήρως τεκμηριωμένη, αφού η HEΩ είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια στην οποία εμπλέκονται γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Τα τελευταία χρόνια μελέτες έχουν αναδείξει στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της HEΩ και πολυμορφισμών γονιδίων που σχετίζονται με το σύστημα του συμπληρώματος. Τα κύρια γονίδια στα οποία πολυμορφισμοί έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση της ασθένειας είναι το γονίδιο του παράγοντα του συμπληρώματος H (Complement Factor H, CFH) και το γονίδιο ARMS2. Επιπροσθέτως, πολυμορφισμοί στο γονίδιο του παράγοντα του συμπληρώματος 2 (Complement Factor 2, C2) και στο γονίδιο του παράγοντα του συμπληρώματος B (Complement Factor B, CFB) έχουν συσχετιστεί με προστασία ενάντια στην εμφάνιση της ασθένειας. Νεότερα δεδομένα συσχετίζουν τους πολυμορφισμούς των παραπάνω γονιδίων με την ανταπόκριση των ασθενών στις εφαρμοζόμενες θεραπείες.

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του πιθανού ρόλου πολυμορφισμών γονιδίων, οι οποίοι έχουν συσχετιστεί με την HEΩ, στην ανταπόκριση των ασθενών σε εφαρμοζόμενες θεραπείες, και συγκεκριμένα στη χρήση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής σε ασθενείς με HEΩ ξηρού τύπου καθώς και στη θεραπεία με χορήγηση αντι-VEGF παραγόντων σε ασθενείς με HEΩ υγρού τύπου.

Μέθοδοι: Σε 170 ασθενείς με HEΩ ξηρού τύπου και 52 ασθενείς με HEΩ υγρού τύπου έγινε γονοτύπωση για τους πολυμορφισμούς rs1061170/Y402H στο γονίδιο

CFH, rs10490924/A69S στο γονίδιο ARMS2, rs9332739/E318D και rs547154/IVS10 στο γονίδιο C2, rs4151667/L9H και rs2072633/IVS17 στο γονίδιο CFB. Οι ασθενείς με ΗΕΩ ξηρού τύπου ελάμβαναν καθημερινά 1 συμπλήρωμα διατροφής (Ocuvite Lutein forte®), για χρονικό διάστημα 12 μηνών, ενώ οι ασθενείς με ΗΕΩ υγρού τύπου υποβλήθηκαν σε 3 διαδοχικές μηνιαίες ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ranibizumab (Lucentis®). Η αξιολόγηση της ανταπόκρισης των ασθενών στην εφαρμοζόμενη θεραπεία έγινε μετά από σύγκριση της οπτικής τους οξύτητας και της εικόνας της οπτικής τομογραφίας συνοχής (OCT) κατά την έναρξη και μετά το πέρας της θεραπείας. Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε αυτούς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία και σε αυτούς που δεν ανταποκρίθηκαν, με κριτήριο τις μετρήσεις της οπτικής οξύτητας και την εικόνα του OCT. Όσον αφορά την ΗΕΩ ξηρού τύπου, οι ασθενείς που διατήρησαν ή βελτίωσαν την οπτική τους οξύτητα και στους οποίους δεν παρατηρήθηκε καμία ανατομική αλλαγή του αμφιβληστροειδούς με βάση την εικόνα του OCT μετά το πέρας της θεραπείας, θεωρήθηκε ότι ανταποκρίθηκαν, ενώ όλοι οι άλλοι ότι δεν ανταποκρίθηκαν. Αναφορικά με την ΗΕΩ υγρού τύπου, οι ασθενείς που διατήρησαν ή βελτίωσαν την οπτική τους οξύτητα και στους οποίους δεν παρατηρήθηκε υποαμφιβληστροειδικό ή ενδοαμφιβληστροειδικό υγρό τουλάχιστον έναν μήνα μετά την τρίτη ένεση με βάση την εικόνα του OCT, θεωρήθηκε ότι ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία, ενώ όλοι οι άλλοι ότι δεν ανταποκρίθηκαν. Η ανταπόκριση στη θεραπεία συσχετίστηκε στατιστικά με τους γονοτύπους των ασθενών για κάθε εξεταζόμενο πολυμορφισμό.

Αποτελέσματα: Από τη μελέτη προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs1061170/Y402H στο γονίδιο CFH και της ανταπόκρισης στη λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής στους ασθενείς με ΗΕΩ ξηρού τύπου. Ασθενείς ομόζυγοι ή ετερόζυγοι για τα υψηλού κινδύνου αλληλόμορφα στο CFH είχαν μικρότερη πιθανότητα να ανταποκριθούν συγκριτικά με τους ασθενείς φυσικού τύπου. Αντίθετα, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs10490924/A69S στο γονίδιο ARMS2 και της ανταπόκρισης στη λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής. Η στατιστική ανάλυση των προστατευτικών πολυμορφισμών rs9332739/E318D, rs547154/IVS10, rs4151667/L9H και rs2072633/IVS17 στα γονίδια C2 και CFB ανέδειξε θετική συσχέτιση μεταξύ αυτών και της ανταπόκρισης στη λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής. Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα, ότι οι ασθενείς που είχαν στο γονότυπο τους τουλάχιστον έναν προστατευτικό πολυμορφισμό είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα να ανταποκριθούν και να σταθεροποιήσουν την οπτική τους οξύτητα και την εικόνα του OCT, σε σύγκριση με

τους ασθενείς που δεν έφεραν κανέναν προστατευτικό πολυμορφισμό. Όσον αφορά τους ασθενείς με HEΩ υγρού τύπου, η ανάλυση έδειξε ότι οι ομόζυγοι ασθενείς για τα υψηλού κινδύνου αλληλόμορφα στο γονίδιο CFH είχαν μικρότερη πιθανότητα να ανταποκριθούν στις ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ranibizumab συγκριτικά με τους ετερόζυγους. Επιπροσθέτως, αναφορικά με τον πολυμορφισμό rs10490924/A69S στο γονίδιο ARMS2, οι ασθενείς οι οποίοι έφεραν το αλληλόμορφο υψηλού κινδύνου παρουσίασαν σημαντικά χειρότερα οπτικά αποτελέσματα συγκριτικά με τους ασθενείς φυσικού τύπου. Η ταυτόχρονη παρουσία και των δύο πολυμορφισμών υψηλού κινδύνου στο γονότυπο των ασθενών με HEΩ υγρού τύπου φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και να επιδρά αρνητικά στην ανταπόκριση τους στη θεραπεία. Αντίθετα, από τη στατιστική ανάλυση δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των προστατευτικών πολυμορφισμών στα γονίδια C2 και CFB και της ανταπόκρισης των ασθενών στην αντι-VEGF θεραπεία.

Συμπεράσματα: Στους ασθενείς με HEΩ, η αποτελεσματικότητα της θεραπείας τόσο με χορήγηση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής, όσο και με εγχύσεις με αντι-VEGF παράγοντες, φαίνεται να διαφοροποιείται ανάλογα με το γονότυπο. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι πολυμορφισμοί συγκεκριμένων γονιδίων θα μπορούσαν να αποτελέσουν χρήσιμους βιοδείκτες – παράγοντες πρόβλεψης της ανταπόκρισης στη θεραπεία της νόσου. Ο εντοπισμός τέτοιων βιοδεικτών στους ασθενείς με HEΩ, θα μπορούσε να οδηγήσει σε καλύτερα κλινικά αποτελέσματα με την επιλογή και το σχεδιασμό της βέλτιστης θεραπευτικής στρατηγικής για κάθε μεμονωμένο ασθενή.

Abstract

Introduction: Age related macular degeneration (AMD) is a primary cause of irreversible vision loss in elderly people worldwide with relatively higher prevalence in the developed world. There are two types of AMD: non-exudative (dry) AMD and exudative or neovascular (wet) AMD. Drusen formation and pigmentation changes in the choroid/retinal pigmented epithelium (RPE) layers in the macula characterize the early stage of AMD. Late AMD may be atrophic or neovascular. Neovascular AMD is characterized by choroidal neovascularization (CNV) beneath the fovea which is influenced mainly by the production of vascular endothelial growth factor (VEGF). The role of nutritional supplements, such as vitamins and antioxidants, in the progression to advanced AMD has been the focus of several studies. Intravitreal injections of anti-VEGF agents is currently the most efficient treatment for neovascular AMD. The pathophysiology of AMD is poorly understood due to the fact that, it is a multifactorial disease which is associated with both genetic and environmental components. Over the last years, several studies have shown substantial genetic contributions to AMD pathogenesis and have demonstrated statistically significant associations between AMD and single nucleotide polymorphisms (SNPs) of some genes. Two major AMD-associated SNPs include the Y402H (rs1061170) variant of complement factor H (CFH) and the A69S (rs10490924) variant of age related maculopathy susceptibility 2 (ARMS2). Carriers of the risk alleles of these variants have a significantly increased risk of the disease. Moreover, SNPs in other genes such as complement component 2 (C2) and complement factor B (CFB) seem to act protectively and decrease the risk of AMD. Some recent data correlate SNPs of the above genes with the disease progression and the clinical response to treatment.

Purpose: To determine whether gene polymorphisms which are associated with AMD influence treatments' response and specifically the antioxidant supplementation in dry AMD patients, as well as, the anti-VEGF therapy in neovascular AMD patients.

Methods: 170 patients with dry AMD and 52 neovascular AMD patients were genotyped for the following SNPs: rs1061170/Y402H in CFH gene, rs10490924/A69S in ARMS2 gene, rs9332739/E318D and rs547154/IVS10 in C2 gene, rs4151667/L9H and rs2072633/IVS17 in CFB gene. Dry AMD patients received a daily antioxidant supplement (Ocuvite Lutein forte®) for a period of 12

months, while neovascular AMD patients were treated with three monthly intravitreal injections with a dose of 0.5 mg ranibizumab (Lucentis®). Treatment response was evaluated by comparing visual acuity and optical coherence tomography (OCT) between baseline and the end of the treatment. Patients were classified as responders and non-responders based on OCT and visual acuity measurements. Regarding the dry type of AMD, patients with no change or any improvement in visual acuity and also, no observed anatomical change on OCT compared to baseline, were classified as responders and all the other patients as non-responders. Regarding the wet type of AMD, patients with no change or with an improvement on the Snellen eye chart in visual acuity and also, OCT improvement (no fluid, either subretinal or intraretinal, present at least one month after the third injection) compared to baseline, were classified as responders and all the other patients as non-responders. The proportion of treatment responders was statistically compared to patients' genotypes for each gene. The association between each genotype and the percentage of responders in the two groups of patients was calculated using p-values with corresponding 95% confidence intervals (95% CIs).

Results: A strong association was detected between CFH Y402H variant and response to antioxidants supplements in dry AMD patients. Carriers of one or two CFH risk alleles displayed a lower chance of responding compared to those with no risk allele. However, no association of antioxidants' response and ARMS2/A69S genotype was identified. The statistical analysis of the genetic variants rs9332739/E318D, rs547154/IVS10, rs4151667/L9H and rs2072633/IVS17 (protective SNPs) revealed a positive association between these SNPs and the use of antioxidants. Of interest is the finding that individuals who carried at least one protective SNP were more likely to respond to antioxidants and stabilize their visual acuity and OCT compared with those who lacked any protective SNP. In neovascular AMD patients, the analysis indicated that Y402H homozygous patients were less likely to respond to anti-VEGF therapy compared to heterozygous. Regarding the ARMS2/A69S genotype, carriers of the risk variant experienced significantly worse treatment outcome compared to wild type patients. The simultaneous presence of both CFH and ARMS2 high-risk SNPs in patients' genotype appears to play an important role and to negatively affect response to treatment. On the other hand, the statistical analysis of the genetic variants rs9332739/E318D, rs547154/IVS10, rs4151667/L9H and rs2072633/IVS17 showed no significant association between the protective SNPs and the anti-VEGF treatment outcome.

Conclusion: In AMD patients, the efficacy of the antioxidant supplementation and the anti-VEGF therapy appears to differ by genotype. Our findings suggest that genetic variants could be used as predictors of treatment responsiveness in AMD patients. The detection of such genetic variants, in AMD patients, could lead to improved visual outcomes through genotype-directed therapy.

Πρόλογος – Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος Διδακτορικών Σπουδών του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Γενετικής - Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου του τομέα Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Κλεονίκης Λάμνησου.

Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κ. Κλεονίκη Λάμνησου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη παρούσα διατριβή, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές της, την καθοδήγηση της και τη στήριξη της καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσης μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κ. Παναγιώτη Θεοδοσιάδη, Καθηγητή Β' Πανεπιστημιακής Οφθαλμολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Αττικών, καθώς και την κ. Παναγούλα Κόλλια, Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου του τομέα Γενετικής και Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιολογίας, για τη συμμετοχή τους στη συμβουλευτική επιτροπή.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στη μητέρα μου, Σοφία Σπαή, Διευθύντρια της Οφθαλμολογικής Κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Αττικής «Σισμανόγλειο-Αμαλία Φλέμινγκ» για την εξαιρετικά πολύτιμη βοήθεια της στη συλλογή του δείγματος που μελετήθηκε, καθώς και για την περαιτέρω παρακολούθηση της πορείας των ασθενών, με σκοπό την αξιολόγηση της ανταπόκρισής τους στην εφαρμοζόμενη θεραπεία.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την αδελφή μου Ιωάννα Γουργούλη, ιατρό Μ.Δ. και ειδικευόμενη οφθαλμολογίας στο Γενικό Νοσοκομείο Αττικής «Σισμανόγλειο-Αμαλία Φλέμινγκ» τόσο για τη συμβολή της στη συλλογή του δείγματος των ασθενών, όσο και για την περαιτέρω παρακολούθηση της πορείας τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Σπύρο Ευθυμιόπουλο, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη βοήθειά του και τις συμβουλές του, ιδιαίτερα στην αρχή αυτής της προσπάθειας.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Γιώργο Τσαούση, βιολόγο, Διδάκτωρ του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, για την πολύτιμη συμβολή του στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον πατέρα μου, Αγαμέμνονα Γουργούλη, μαιευτήρα-γυναικολόγο, την αδελφή μου Δανάη-Μαγδαληνή Γουργούλη, πτυχιούχο του τμήματος Διαιτολογίας και Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και φοιτήτρια της Ιατρικής Σχολής Αθηνών και τον σύζυγο μου Δημήτριο Δελητζά, μαθηματικό, για την αμέριστη συμπαράστασή τους και την ηθική υποστήριξη που μου προσέφεραν όλο αυτό το διάστημα.

Αφιερωμένο...

Στους γονείς μου,

Στις αδελφές μου,

Στον σύζυγο μου,

Στον γιό μου

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	21
1.1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΟΦΘΑΛΜΟΥ	23
1.1.1 ΙΝΩΔΗΣ ΧΙΤΩΝΑΣ	24
1.1.2 ΑΓΓΕΙΩΔΗΣ ΧΙΤΩΝΑΣ	24
1.1.3 ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗΣ ΧΙΤΩΝΑΣ	25
1.1.4 ΩΧΡΑ ΚΗΛΙΔΑ	32
1.2. ΗΛΙΚΙΑΚΗ ΕΚΦΥΛΙΣΗ ΤΗΣ ΩΧΡΑΣ ΚΗΛΙΔΑΣ.....	35
1.2.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	36
1.2.2 ΤΥΠΟΙ ΤΗΣ ΗΕΩ.....	36
1.2.2.1 ΞΗΡΗ ΗΕΩ.....	37
1.2.2.2 ΥΓΡΗ ΗΕΩ	39
1.2.3 ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	41
1.3. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΗΕΩ	43
1.3.1 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΟΠΤΙΚΗΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ.....	43
1.3.1.1 ΠΙΝΑΚΕΣ SNELLEN.....	43
1.3.1.2 ETDRS ΟΠΤΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ	44
1.3.2 ΠΛΕΓΜΑ ΤΟΥ AMSLER.....	45
1.3.3 ΒΙΟΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ	46
1.3.4 ΦΛΟΥΟΡΟΑΓΓΕΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	46
1.3.5 ΑΥΤΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ.....	48
1.3.6 ΟΠΤΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΝΟΧΗΣ	49
1.3.7 ΟCΤ-ΑΓΓΕΙΟΓΡΑΦΙΑ	52

1.4. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ	53
1.4.1 ΑΝΤΙ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ	53
1.4.1.1 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΦΙΑ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ	54
1.4.1.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΗΕΩ	55
1.4.2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ.....	56
1.5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΗΕΩ	58
1.5.1 ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΓΗΡΑΝΣΗ	58
1.5.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.....	61
1.5.3 ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗ	62
1.5.4 ΝΕΟΑΓΓΕΙΩΣΗ	63
1.5.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΗΕΩ.....	64
1.5.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΝΟΣΟ	67
1.6. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΗΕΩ	74
1.6.1 ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΣΥΣΧΕΤΙΣΤΕΙ ΜΕ ΤΗΝ ΗΕΩ.....	77
1.6.2 ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ - ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	85
1.7. ΣΚΟΠΟΣ.....	87
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	89
2.1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	91
2.2. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ	91
2.3. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ - ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA	92
2.4. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	94
2.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	99

2.6. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR.....	100
2.7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ DNA (DNA SEQUENCING).....	101
2.8. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	111
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	113
3.1. ΟΜΑΔΑ Α (ΗΕΩ ΞΗΡΟΥ ΤΥΠΟΥ).....	117
3.1.1 ΓΟΝΙΔΙΑ ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ CFH-ARMS2 / ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	117
3.1.2 ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ C2-CFB / ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ...	121
3.2. ΟΜΑΔΑ Β (ΗΕΩ ΥΓΡΟΥ ΤΥΠΟΥ).....	131
3.2.1 ΓΟΝΙΔΙΑ ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ CFH-ARMS2 / ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	131
3.2.2 ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ C2-CFB / ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ...	136
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	145
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	155
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	177
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.....	179
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β.....	187
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	190
ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΗ ΕΡΓΑΣΙΑ.....	197

Κατάλογος Συντομογραφιών

AMD: Age related Macular Degeneration

APOE: Apolipoprotein E

AREDS: Age Related Eye Disease Study

ARMS2: Age Related Maculopathy Susceptibility 2

CFB: Complement Factor B

CFH: Complement Factor H

CFI: Complement Factor I

CI: Confidence Intervals

CX3CR1: CX3 Chemokine Receptor 1

CX3CL1: CX3 Chemokine Ligand 1

C2: Complement component 2

C3: Complement Factor 3

C4BP: C4 Binding Protein

DAF: Decay Accelerating Factor

DHA: DocosaHexaenoic Acid

dNTPs: Deoxynucleotide triphosphates

ddNTPs: Dideoxynucleotide triphosphates

EPA: Eicosapentaenoic Acid

GPCRs: G Protein Coupled Receptors

HLA: Human Leukocyte Antigen

MAC: Membrane Attack Complex

MCP: Membrane Cofactor Protein

MCRPs: membrane Complement Regulator Proteins

OCT: Optical Coherence Tomography

ORs: Odds ratios

PCR: Polymerase Chain Reaction

PEDF: Pigment Epithelium Derived Factor

PIGF: Placenta Growth Factor

RCA: Regulators of Complement Activation

ROI: Reactive Oxygen Intermediates

RPE: Retinal Pigment Epithelium

RPE BM: Retinal Pigment Epithelium Basal Membrane

SCRs: Short Consensus Repeats

SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms

TBE: Tris-borate-EDTA

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

HEΩ: Ηλικιακή Εκφύλιση της Ωχράς Κηλίδας

ΔΜΣ: Δείκτης Μάζας Σώματος

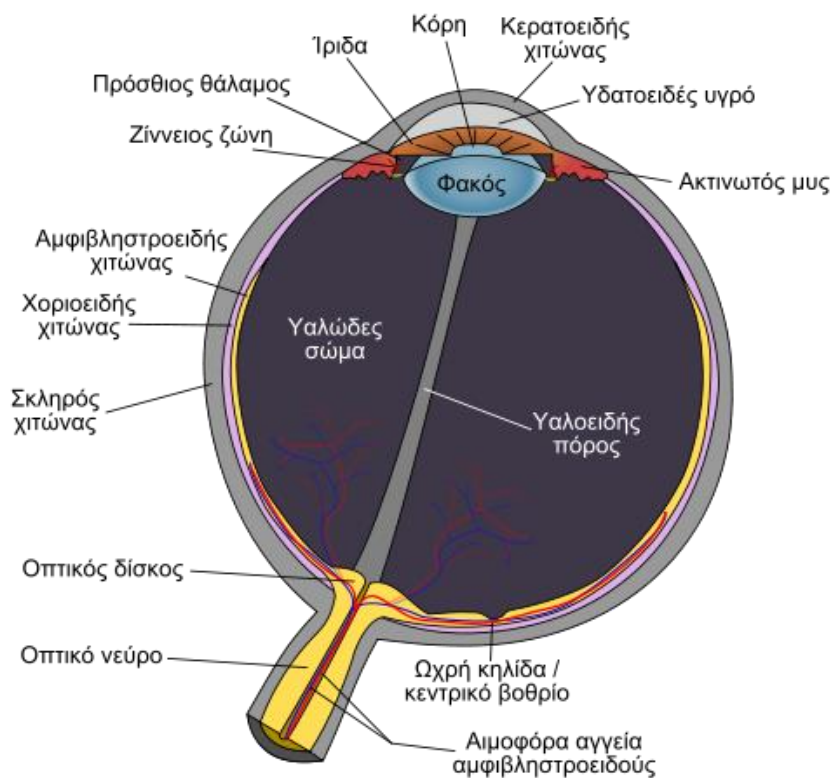
ME: Μελάγχρουν Επιθήλιο

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ANATOMIA ΤΟΥ ΟΦΘΑΛΜΟΥ

Η όραση ολοκληρώνεται μέσα από πολύπλοκες διαδικασίες, στις οποίες ξεχωριστό ρόλο διαδραματίζει ο οφθαλμός. Κάθε οφθαλμός βρίσκεται μέσα στον οφθαλμικό κόγχο, από τον οποίο προστατεύεται. Μέσα στον κόγχο υπάρχουν και τα επικουρικά στοιχεία του οφθαλμού, όπως ο δακρυϊκός αδένας, οι οφθαλμικοί μύες, το οπισθοβολβικό λίπος αγγεία και νεύρα.

Προς τα εμπρός ο οφθαλμικός βολβός καλύπτεται από τα βλέφαρα, άνω και κάτω. Ο οφθαλμικός βολβός αποτελεί κοιλότητα σφαιροειδούς σχήματος και διαμέτρου περίπου 24mm. Το τοίχωμά του αποτελείται από τρεις χιτώνες, τον ινώδη, τον αγγειώδη και τον αμφιβληστροειδή (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1. Σχηματική παράσταση της ανατομίας του οφθαλμού [1]

1.1.1 ΙΝΩΔΗΣ ΧΙΤΩΝΑΣ

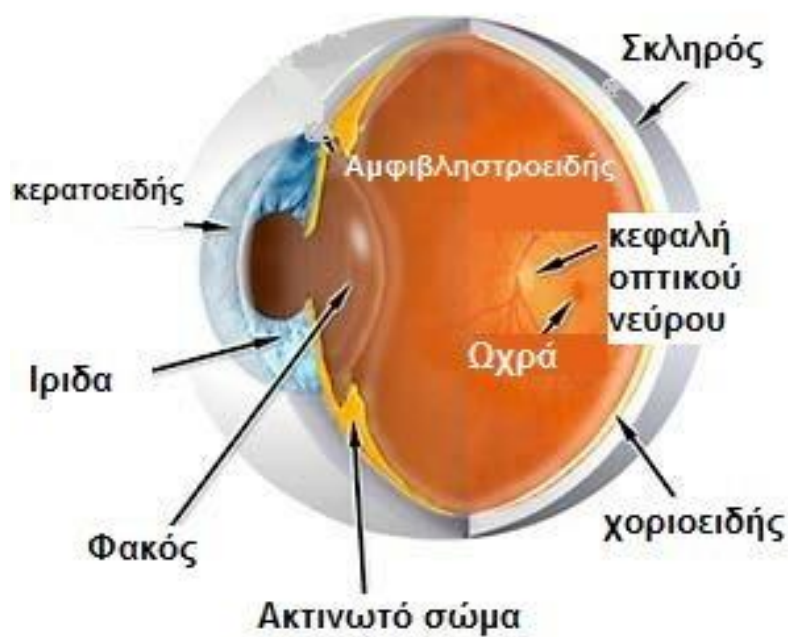
Ο ινώδης χιτώνας προς τα εμπρός είναι διαφανής και ονομάζεται κερατοειδής, ενώ προς τα πίσω είναι αδιαφανής και λέγεται σκληρός χιτώνας (Εικόνα 1.1). Ο κερατοειδής χιτώνας έχει σχήμα στρογγυλό, διαμέτρου περίπου 11mm και είναι ιστός διαφανής. Παίξει τον κυριότερο ρόλο στο διαθλαστικό σύστημα του οφθαλμού. Το πάχος του κερατοειδούς δεν είναι το ίδιο σε όλη του την έκταση. Είναι πιο λεπτός στο κέντρο, περίπου 0,50 mm, ενώ προς την περιφέρεια αυξάνεται περίπου σε 0,70 mm. Ο ινώδης χιτώνας προς τον οπίσθιο πόλο φέρει τρήμα, το σκληραίο τρήμα, μέσω του οποίου διέρχεται το οπτικό νεύρο, η κεντρική αρτηρία και η κεντρική φλέβα του αμφιβληστροειδούς.

1.1.2 ΑΓΓΕΙΩΔΗΣ ΧΙΤΩΝΑΣ

Ο αγγειώδης χιτώνας αποτελείται από την ίριδα, το ακτινωτό σώμα και το χοριοειδή χιτώνα (Εικόνα 1.1). Η ίριδα χωρίζει τον πρόσθιο από τον οπίσθιο θάλαμο του ματιού και στο μέσο της υπάρχει μια οπή, η κόρη. Η κόρη της ίριδος έχει διάμετρο που μεταβάλλεται αντανακλαστικά ανάλογα με το φωτισμό του περιβάλλοντος. Το ακτινωτό σώμα, σε μια κάθετη διατομή, έχει σχήμα τριγωνικό και αποτελείται από τον ακτινωτό μυ και τις ακτινοειδείς προβολές. Οι ακτινοειδείς προβολές περιβάλλουν κυκλοτερώς το φακό και σχηματίζουν τον ακτινωτό κύκλο. Από την περιοχή αυτή εκφύονται οι ίνες της ζιννείου ζώνης, οι οποίες καταφύονται στην περιφέρεια του φακού. Το ακτινωτό σώμα έχει μεγάλη σημασία στη διατήρηση της υπόστασης και της καλής λειτουργίας του οφθαλμικού βολβού. Παράγει το υδατοειδές υγρό ενώ και η συμμετοχή του ακτινωτού μυός στη διαδικασία της προσαρμογής στην κοντινή όραση είναι πρωτεύουσα. Ο χοριοειδής χιτώνας είναι ο αγγειοβριθέστερος χιτώνας του οφθαλμού και αιματώνει τις έξω στιβάδες του αμφιβληστροειδούς. Μεταξύ των δύο χιτώνων υπάρχει η υαλοειδής μεμβράνη ή μεμβράνη του Bruch. Η μεμβράνη αυτή αποτελείται από πέντε στρώματα: τη βασική μεμβράνη του μελαγχρόου επιθηλίου (RPE BM: Retinal Pigment Epithelium Basal Membrane), την έσω κολλαγονική στιβάδα, τη ζώνη των ελαστικών ινών, την έξω κολλαγονική στιβάδα και τη στιβάδα των χοριοτριχοειδών (Εικόνα 1.5).

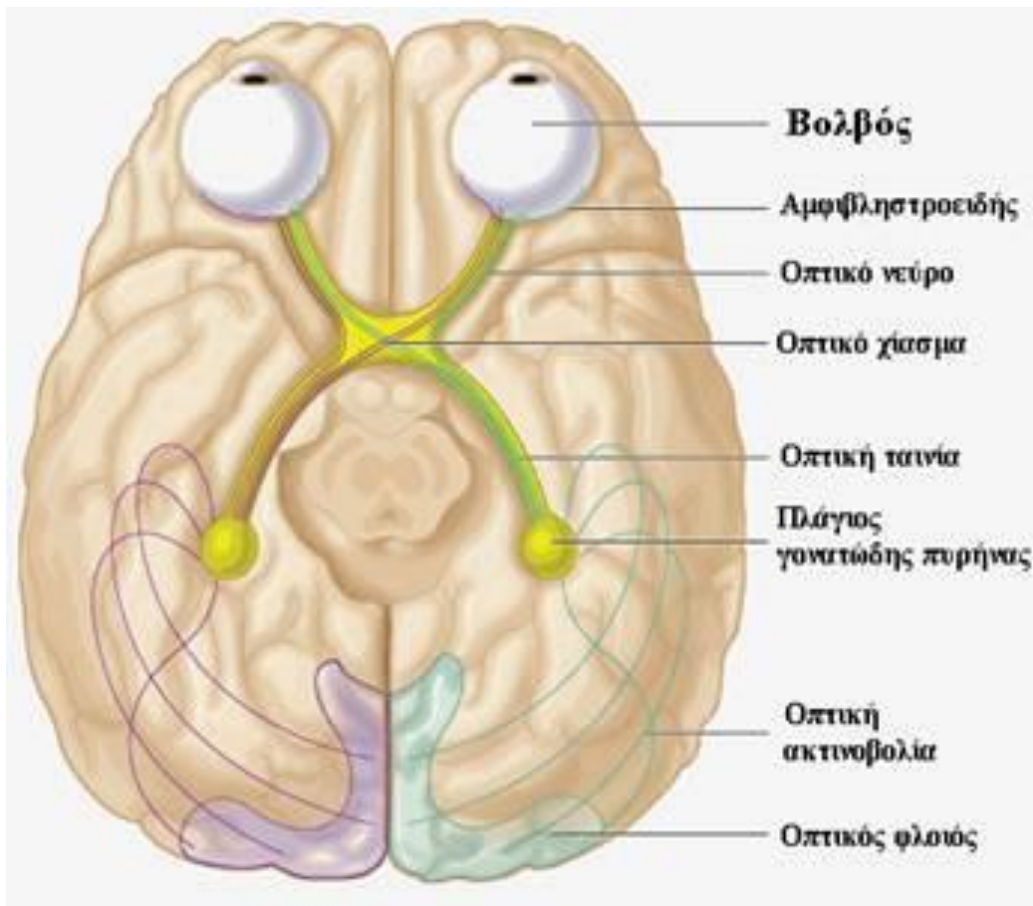
1.1.3 ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗΣ ΧΙΤΩΝΑΣ

Ο αμφιβληστροειδής αποτελεί τον εσωτερικό και σπουδαιότερο χιτώνα του οφθαλμού, όπου επιτελείται η πρώτη φάση της λειτουργίας της όρασης. Αποτελεί τον αισθητηριακό χιτώνα του οφθαλμού, διότι σε αυτόν βρίσκονται οι φωτοϋποδοχείς (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2. Απεικόνιση της θέσης του αμφιβληστροειδούς στον οφθαλμό [2]

Στον χιτώνα αυτό σχηματίζεται το οπτικό είδωλο από το σύστημα του οφθαλμού και λαμβάνει χώρα η φωτοχημική διεργασία με την οποία δημιουργούνται νευρικά ερεθίσματα, τα οποία μεταφέρονται κατά μήκος της οπτικής οδού προς τον εγκέφαλο για ανώτερη φλοιώδη επεξεργασία (Εικόνα 1.3).

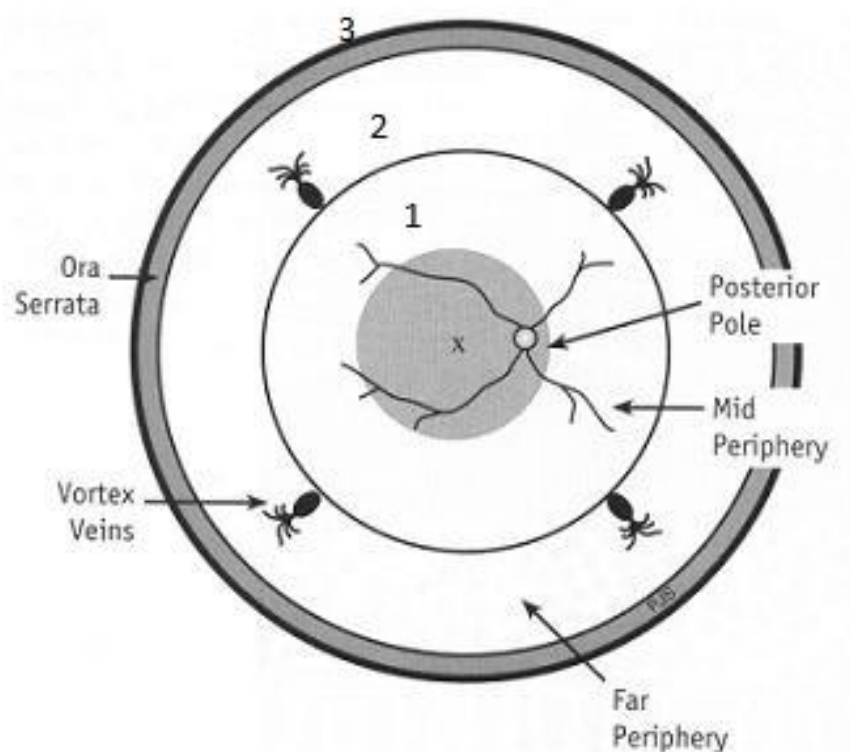


Εικόνα 1.3 Σχηματική απεικόνιση της οπτικής οδού [3]

Ο αμφιβληστροειδής προς τα πίσω συνεχίζεται με το οπτικό νεύρο, ενώ πρόσθια μεταπίπτει στο επιθήλιο του ακτινωτού σώματος και της ίριδας. Η εξωτερική επιφάνεια του αμφιβληστροειδούς είναι σε επαφή με τη μεμβράνη του Bruch του χοριοειδούς, ενώ η εσωτερική του επιφάνεια είναι σε επαφή με το υαλοειδές σώμα. Διακρίνεται σε κεντρική περιοχή και περιφέρεια. Η κεντρική περιοχή του αμφιβληστροειδούς ή οπίσθιος πόλος είναι η περιοχή του αμφιβληστροειδούς, διαμέτρου 5,5 χιλιοστών, που αφορίζεται από το οπτικό νεύρο και τα αγγειακά τόξα. Στο κέντρο του οπίσθιου πόλου εντοπίζεται η ωχρά κηλίδα, η οποία αποτελεί την περιοχή της ευκρινούς όρασης.

Η περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς αποτελείται από ζώνες που περιβάλλουν τον κεντρικό αμφιβληστροειδή (Εικόνα 1.4) και διακρίνεται σε:

- Εγγύς περιφέρεια, η οποία περιβάλλει τον κεντρικό αμφιβληστροειδή κι έχει εύρος 1,5 χιλιοστών
- Μέση περιφέρεια, η οποία έχει εύρος 3 χιλιοστών και περιβάλλει την εγγύς περιφέρεια
- Άπω περιφέρεια, η οποία εκτείνεται από τη μέση περιφέρεια ως την πριονωτή περιφέρεια κι έχει εύρος 10-16 χιλιοστών ανάλογα με το μέγεθος του βολβού.
- Πριονωτή περιφέρεια (*ora serrata*), η οποία είναι μια οδοντωτή ζωνοειδής περιοχή εύρους 1-2 χιλιοστών, με 20-30 οδοντώσεις, που είναι το περιφερικό τελείωμα του αμφιβληστροειδούς.



Εικόνα 1.4. Σχηματική παράσταση της τοπογραφίας του αμφιβληστροειδούς [4].
X: Οπίσθιος πόλος, 1.Εγγύς και μέση περιφέρεια, 2. Άπω περιφέρεια, 3. Πριονωτή περιφέρεια

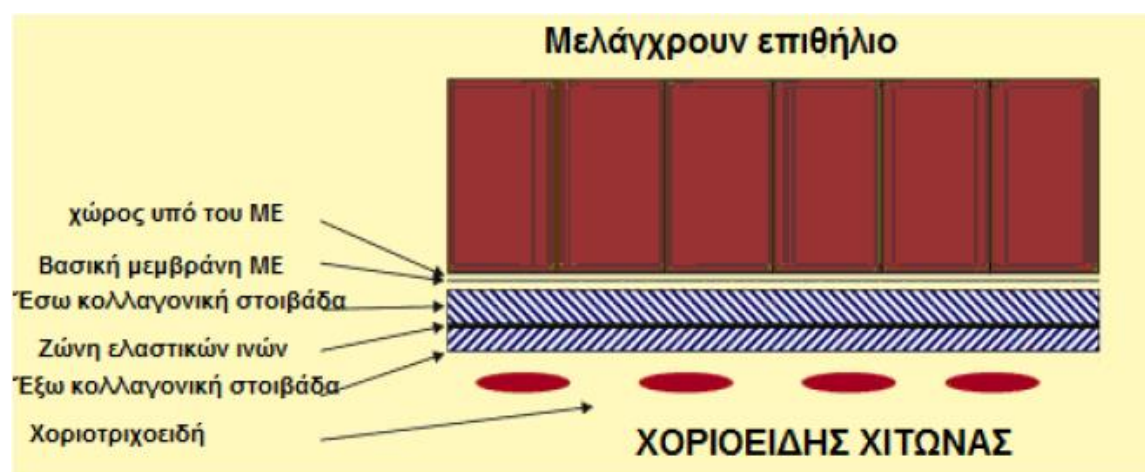
Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας αποτελείται από ένα εσωτερικό νευροαισθητήριο πέταλο, τον ιδίως αμφιβληστροειδή σε επαφή με το υαλοειδές και ένα εξωτερικό μελαγχρωματικό πέταλο, το μελάγχρουν επιθήλιο.

Το μελάγχρουν επιθήλιο (ME, RPE: Retinal Pigment Epithelium) είναι μια μονή στιβάδα εξαγωνικών κυττάρων που περιέχουν ποικίλη ποσότητα μελανίνης, η οποία δίνει κοκκώδη εμφάνιση στο βυθό του ματιού. Η ποσότητα μελανίνης διαφέρει τόσο από άτομο σε άτομο όσο και μεταξύ των διαφόρων περιοχών του ματιού. Το ME εκτείνεται από την οπτική θηλή μέχρι την προιονωτή περιφέρεια και συνεχίζεται ως ME του ακτινωτού σώματος και της ίριδας. Ο δυνητικός χώρος μεταξύ ME και ιδίως αμφιβληστροειδούς ονομάζεται υποαμφιβληστροειδικός χώρος.

Το ME συμμετέχει στη λειτουργία του αμφιβληστροειδούς με πολλούς τρόπους:

- Σχηματίζει τον έξω αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό
- Φαγοκυτταρώνει τα έξω τμήματα των κωνίων και των ραβδίων
- Συμμετέχει στο μεταβολισμό της βιταμίνης A
- Απορροφά την φωτεινή ενέργεια με τα κοκκία μελανίνης και μειώνει τη διάχυση του φωτός, βελτιώνοντας την ευκρίνεια των εικόνων.

Το ME έχει στερεή σύμφυση με την υποκείμενη μεμβράνη του Bruch, ενώ έχει χαλαρή σύνδεση με τον υπερκείμενο αμφιβληστροειδή.



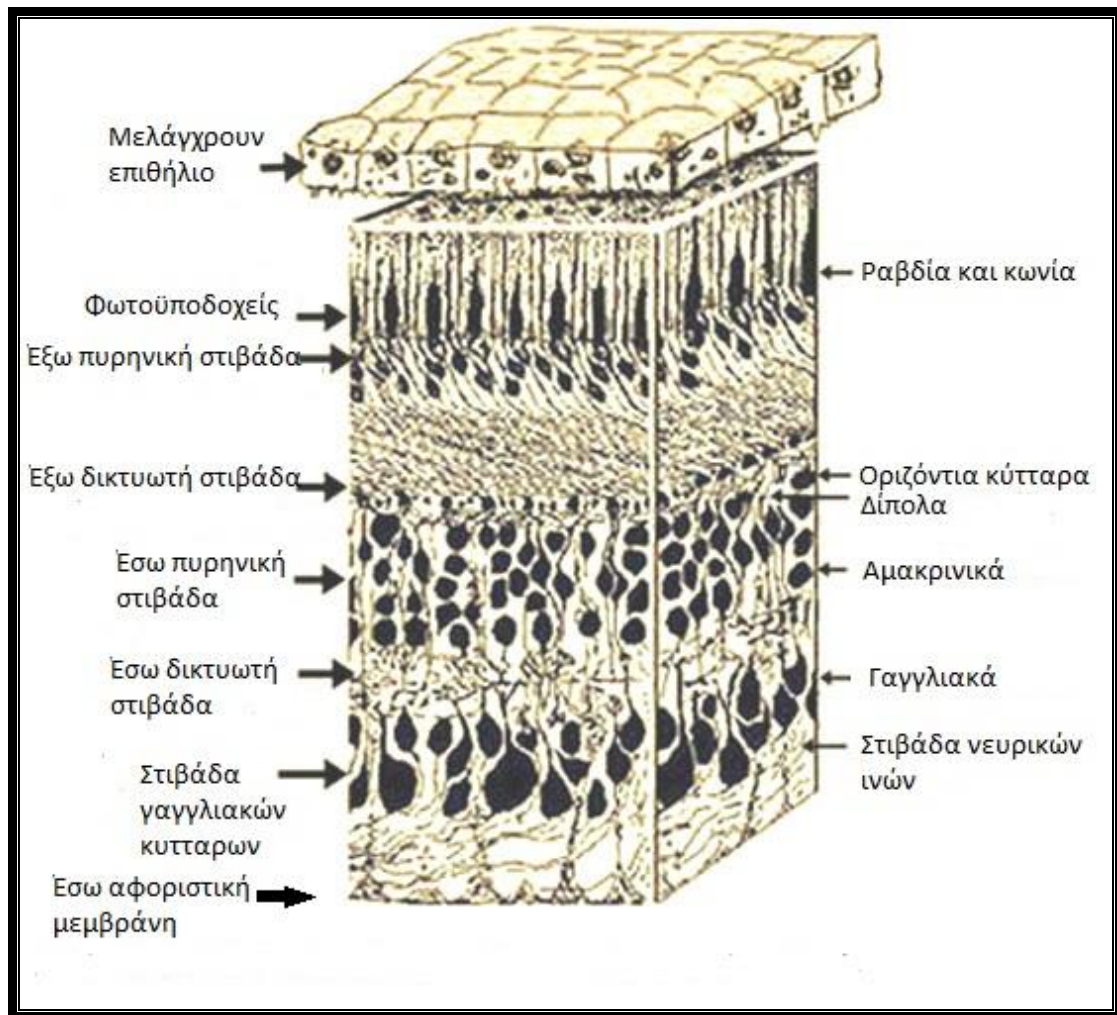
Εικόνα 1.5. Η μεμβράνη του Bruch, οι στιβάδες της και η σχέση με τον χοριοειδή και τον αμφιβληστροειδή χιτώνα [5]

Ο ιδίως αμφιβληστροειδής είναι λεπτός και διαφανής. Το πάχος του είναι μικρότερο στην περιφέρεια, γεγονός σημαντικό για την ύπαρξη και εξέλιξη των περιφερικών εκφυλιστικών αλλοιώσεων του αμφιβληστροειδούς. Ο ιδίως αμφιβληστροειδής αποτελείται από εννέα στιβάδες (Εικόνα 1.6) και συντίθεται από τρεις τύπους ιστού, νευρικό ιστό, γλοία και αγγειακό ιστό.

Ο νευρικός ιστός περιλαμβάνει τα κύτταρα των φωτοϋποδοχέων, τα κωνία και τα ραβδία, που μετατρέπουν το φως σε νευρικές ώσεις, οι οποίες μέσω άλλων κυττάρων (δίπολα, αμακρινικά, γαγγλιακά), φτάνουν στη στιβάδα των νευρικών ινών και από εκεί στο οπτικό νεύρο και κατόπιν στον οπτικό φλοιό. Η γλοία παρέχει στήριξη και τροφή στο νευρικό ιστό. Τα κύτταρα της γλοίας δρουν ως ενισχυτές του φωτεινού ερεθίσματος, ενισχύοντας ή μειώνοντας την έντασή του. Τα σπουδαιότερα στοιχεία αυτής είναι τα κύτταρα του Muller, τα οριζόντια και τα αστροκύτταρα [6].

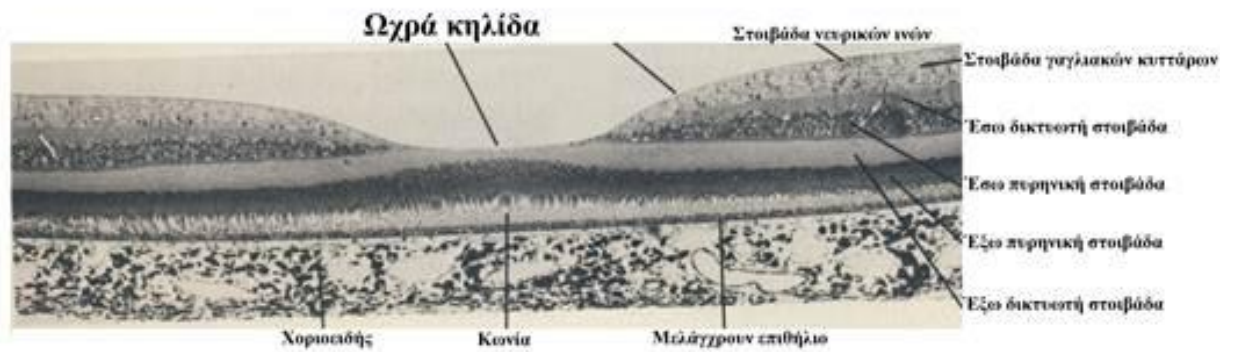
Οι στιβάδες του ιδίως αμφιβληστροειδούς από έξω προς τα μέσα είναι οι εξής:

1. Η στιβάδα των φωτοϋποδοχέων (κωνίων και ραβδίων)
2. Η έξω αφοριστική μεμβράνη (ΕΑΜ)
3. Η έξω κοκκώδης (πυρηνική) στιβάδα (ΕΚΣ)
4. Η έξω δικτυωτή στιβάδα (ΕΔΣ)
5. Η έσω κοκκώδης (πυρηνική) στιβάδα (ΕΚΣ)
6. Η έσω δικτυωτή στιβάδα (ΕΔΣ)
7. Η στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (ΣΓΚ)
8. Η στιβάδα των νευρικών ινών (ΣΝΙ)
9. Η έσω αφοριστική μεμβράνη (ΕΑΜ)



Εικόνα 1.6. Σχηματική αναπαράσταση των στιβάδων του αμφιβληστροειδούς

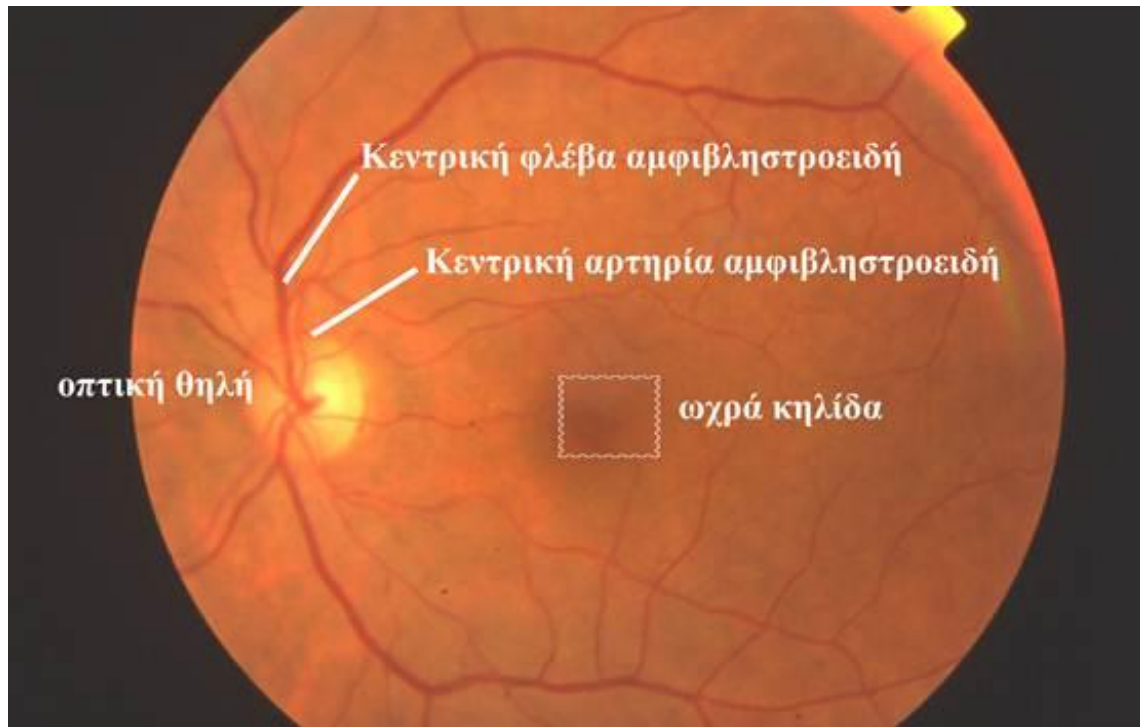
Κάθε αμφιβληστροειδής περιέχει 6.000.000 κωνία και 120.000.000 ραβδία. Στη κεντρική περιοχή λείπουν οι έσω στιβάδες του αμφιβληστροειδούς και υπάρχουν μόνο κωνία (Εικόνα 1.7). Στη περιφέρεια υπερτερούν τα ραβδία. Τα ραβδία είναι υπεύθυνα για την όραση σε χαμηλό φωτισμό και την αντίληψη της κίνησης, ενώ τα κωνία είναι υπεύθυνα για την υψηλής ανάλυσης όραση σε έντονο φωτισμό και την αντίληψη του χρώματος [6].



Εικόνα 1.7. Διατομή της κεντρικής περιοχής του αμφιβληστροειδούς στην οποία φαίνονται οι στιβάδες κυττάρων [3]

Η αιμάτωση προέρχεται από τη κεντρική αμφιβληστροειδική αρτηρία και φλέβα. Η κεντρική αρτηρία είναι ο πρώτος κλάδος της οφθαλμικής και μαζί με την κεντρική φλέβα του αμφιβληστροειδούς εισέρχεται στο οπτικό νεύρο. Η κεντρική φλέβα του αμφιβληστροειδούς εκβάλλει στην άνω οφθαλμική φλέβα. Στην κεφαλή του οπτικού νεύρου η κεντρική αρτηρία και η κεντρική φλέβα διαιρούνται σε τέσσερις κλάδους οι οποίοι είναι τελικοί κλάδοι χωρίς αναστομώσεις. Σε ένα 20% των ατόμων υπάρχει και μία πέμπτη αρτηρία, η θηλωχρική, υπεύθυνη για την αιμάτωση της κεντρικής περιοχής, προερχόμενη από την χοριοειδική κυκλοφορία. Η παρουσία της αρτηρίας αυτής έχει ιδιαίτερη σημασία σε περιπτώσεις απόφραξης της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδούς.

Όλες οι περιοχές του αμφιβληστροειδούς δεν έχουν το ίδιο πυκνή αγγείωση. Η περιοχή γύρω από την οπτική θηλή είναι ιδιαίτερα αγγειοβριθής ενώ η περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς είναι φτωχή σε αγγεία (Εικόνα 1.8). Το κεντρικό βοθρίο δεν έχει καθόλου αγγεία και τρέφεται από τον χοριοειδή [7].



Εικόνα 1.8. Κεντρική αρτηρία και φλέβα του αμφιβληστροειδούς με τους κλάδους τους [3]

1.1.4 ΩΧΡΑ ΚΗΛΙΔΑ

Η ωχρά κηλίδα αποτελεί μια ωοειδή, υποκίτρινη περιοχή στο κέντρο της οπίσθιας μοίρας του αμφιβληστροειδούς. Έχει διάμετρο περί τα 5,5 mm και εντοπίζεται περίπου 3 mm κροταφικά του οπτικού δίσκου. Η υποκίτρινη απόχρωση της ωχράς οφείλεται σε μία κίτρινη καροτινοειδή χρωστική, την ξανθοφύλλη, η οποία είναι παρούσα σε όλες τις στιβάδες του ιδίως αμφιβληστροειδούς από την έξω κοκκώδη και εσωτερικά.

Τοπογραφικά η ωχρά διακρίνεται στις ακόλουθες περιοχές (Εικόνα 1.9):

- Κεντρικό βοθρίο (fovea):

Πρόκειται για κυκλική περιοχή διαμέτρου περίπου 1,5 mm η οποία εντοπίζεται ακριβώς στο κέντρο της ωχράς. Ιστολογικά στην περιοχή αυτή, που είναι υπεύθυνη για την κεντρική όραση και την αντίληψη των χρωμάτων, ο ιδίως αμφιβληστροειδής

είναι λεπτός, τα ραβδία απουσιάζουν τελείως ενώ τα κωνία είναι πολυάριθμα, κυλινδρικά και πιο επιμήκη σε σχέση με εκείνα των άλλων περιοχών του βυθού.

- Βοθρίδιο (foveola):

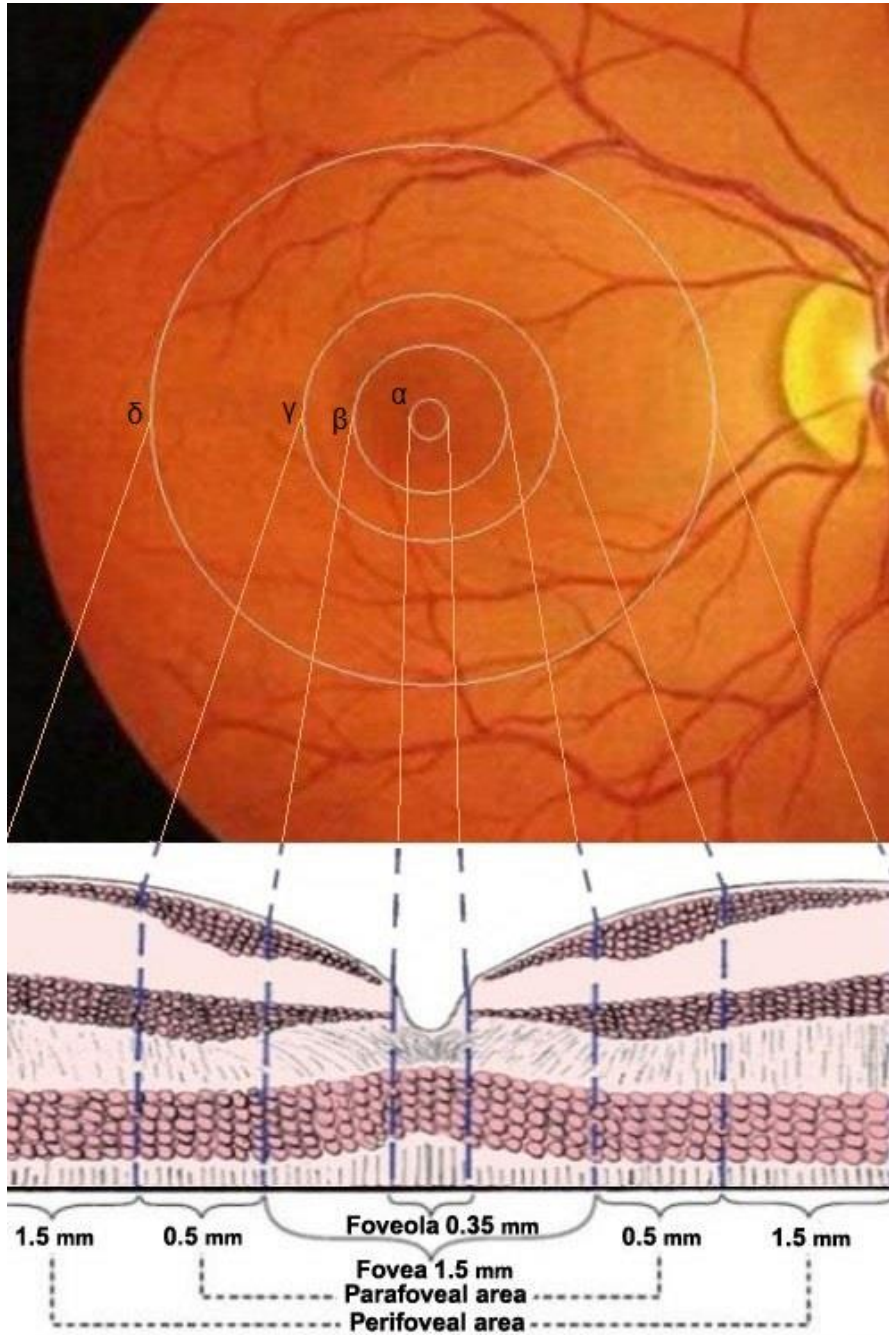
Το βοθρίδιο αποτελεί το κέντρο της κεντρικής περιοχής και έχει διάμετρο 0,3 mm. Είναι το λεπτότερο τμήμα του αμφιβληστροειδούς και στερείται γαγγλιακών κυττάρων. Ολόκληρο το πάχος του αποτελείται μόνο από κωνία με τους πυρήνες τους.

- Παραβοθρική περιοχή (Parafoveal):

Πρόκειται για δακτύλιο πάχους περίπου 0,5 mm, ο οποίος περιβάλλει το κεντρικό βοθρίδιο και του οποίου οι έσω αμφιβληστροειδικές στιβάδες έχουν πολύ μεγάλο αριθμό γαγγλιακών και δίπολων κυττάρων. Στη περιοχή αυτή η αναλογία κωνίων προς ραβδία είναι 1 προς 1.

- Περιβοθρική περιοχή (Perifoveal):

Αποτελεί δακτύλιο πάχους περίπου 1,5 mm, ο οποίος περιβάλλει την παραβοθρική περιοχή. Αντίστοιχα, προς τα περιφερικά όρια της περιοχής αυτής η στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων διατάσσεται πλέον σε ένα μόνο κυτταρικό στρώμα, όπως συμβαίνει και στον υπόλοιπο εκτός της ωχράς αμφιβληστροειδή. Στην περιβοθρική περιοχή η αναλογία κωνίων προς ραβδία είναι 1 προς 2.



Εικόνα 1.9. Σχηματική απεικόνιση των περιοχών του αμφιβληστροειδούς με την αντίστοιχη ιστολογική τους αρχιτεκτονική: α. Βοθρίδιο, β. Κεντρικό βοθρίο, γ. Παραβοθρική περιοχή, δ. Παραβοθρική περιοχή [8]

1.2. ΗΛΙΚΙΑΚΗ ΕΚΦΥΛΙΣΗ ΤΗΣ ΩΧΡΑΣ ΚΗΛΙΔΑΣ

Η πιο συχνή πάθηση που προσβάλλει την ωχρά κηλίδα και κατά επέκταση την κεντρική όραση ονομάζεται Ηλικιακή Εκφύλιση της Ωχράς Κηλίδας (ΗΕΩ). Η ΗΕΩ είναι μια νευροεκφυλιστική νόσος που επηρεάζει τις κεντρικές περιοχές του αμφιβληστροειδούς και χοριοειδούς χιτώνα του οφθαλμού, με αποτέλεσμα την απώλεια της κεντρικής όρασης. Οι οπτικές δομές που εμπλέκονται στην παθογένεια της ΗΕΩ είναι οι φωτοϋποδοχείς, το ΜΕ, η μεμβράνη του Bruch και τα τριχοειδή του χοριοειδούς χιτώνα στην περιοχή της ωχράς. Οι δομές αυτές είναι μεταβολικά αλληλοεξαρτώμενες και υπάρχει σημαντική ανταλλαγή μεταβολικών προϊόντων κατά μήκος της μεμβράνης του Bruch.

Η νόσος αυτή είναι άμεσα σχετιζόμενη με την ηλικία και προσβάλλει κυρίως άτομα άνω των 50 ετών. Η ΗΕΩ διακρίνεται σε δύο μορφές την ξηρή και την υγρή, που εμφανίζουν διαφορετική κλινική εικόνα, σημειολογία και κλινική εξέταση καθώς και σε πρώιμα ή προχωρημένα στάδια ανάλογα με την εξέλιξή της. Η πάθηση μπορεί να προσβάλλει τον έναν ή και τους δύο οφθαλμούς, με αποτέλεσμα η κεντρική όραση να περιορίζεται ενώ η περιφερική όραση να μένει ανέπαφη (Εικόνα 1.10). Τα άτομα που πάσχουν από ΗΕΩ στον έναν οφθαλμό έχουν αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν την πάθηση και στον άλλον, σε διάστημα 3-5 χρόνων [9].



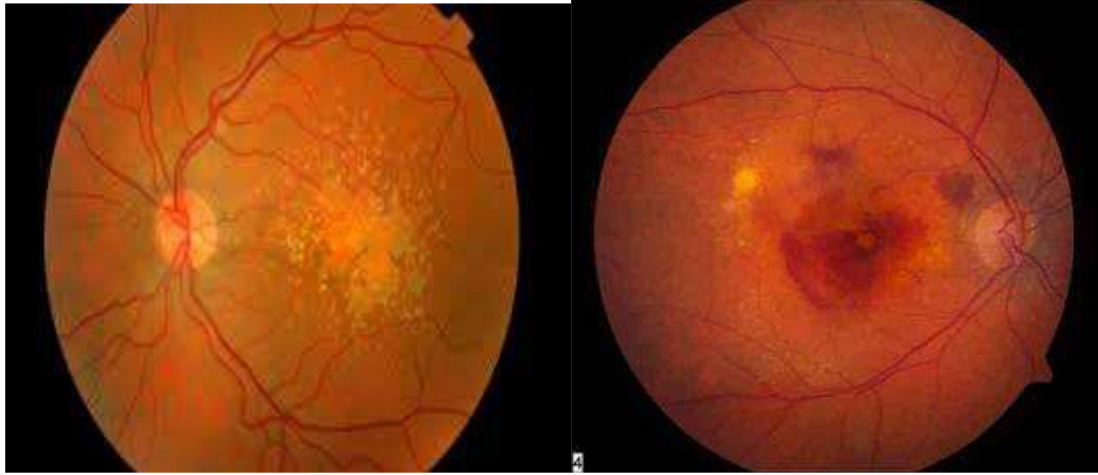
Εικόνα 1.10. Αριστερά: Άτομο με φυσιολογική όραση, Δεξιά: Ασθενής με ΗΕΩ [1]

1.2.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η ΗΕΩ αποτελεί τη συχνότερη αιτία μη αναστρέψιμης απώλειας όρασης σε ασθενείς άνω των 50 ετών στις ανεπτυγμένες χώρες και την τρίτη αιτία τύφλωσης συνολικά σε ολόκληρο τον κόσμο [10], [11]. Υπολογίζεται ότι το 8,7% του παγκόσμιου πληθυσμού πάσχει από ΗΕΩ ενώ προβλέπεται ότι ο αριθμός των ασθενών θα έχει φτάσει τα 196 εκατομμύρια το 2020 και μέχρι το 2040 θα έχει προσεγγίσει τα 288 εκατομμύρια [12]. Μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής επιδημιολογικές έρευνες έχουν δείξει ότι το 13,4% του πληθυσμού άνω των 60 ετών παρουσιάζει ΗΕΩ [13], ενώ προβλέπεται ότι πάνω από τρία εκατομμύρια άτομα άνω των 50 ετών θα εμφανίσουν τη πάθηση τουλάχιστον στον ένα οφθαλμό μέχρι το τέλος του 2020 [14]. Ωστόσο το ποσοστό αυτό παρουσιάζει σημαντική διακύμανση ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή και τη φυλή/εθνικότητα που μελετάται, με την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης να παρατηρείται σε πληθυσμούς Ευρωπαϊκής προέλευσης [15]. Η μελέτη EUREYE, η οποία περιελάμβανε δεδομένα από ερευνητικά κέντρα σε επτά ευρωπαϊκές χώρες έδειξε ότι στα άτομα άνω των 65 ετών ο επιπολασμός της νόσου αγγίζει το 3.32% [16]. Στην Ελλάδα, σύμφωνα με τη μελέτη Thessaloniki Eye Study τα ποσοστά εμφάνισης της νόσου κυμαίνονται γύρω στο 2,5% - 3% σε άτομα ηλικίας 60-65 ετών και άνω και αγγίζει το 10% στους ηλικιωμένους άνω των 80 ετών [17].

1.2.2 ΤΥΠΟΙ ΤΗΣ ΗΕΩ

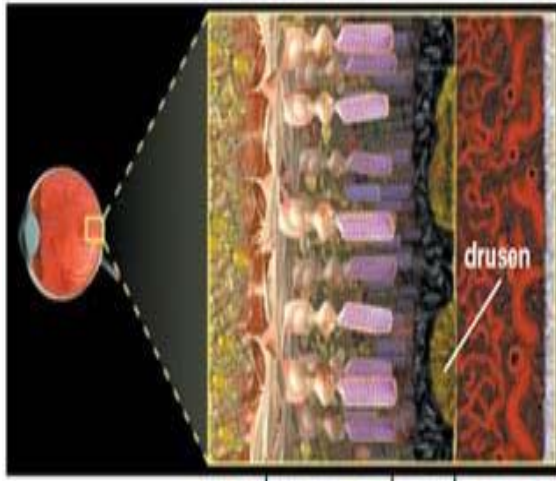
Στη συνηθέστερη κατάταξη η ΗΕΩ διακρίνεται σε δύο τύπους βάσει των αλλοιώσεων που παρατηρούνται στον αμφιβληστροειδή: τη μη εξιδρωματική (ξηρή) μορφή και την εξιδρωματική ή νεοαγγειακή (υγρή) μορφή [18], [19] (Εικόνα 1.11).



Εικόνα 1.11. Τύποι της ΗΕΩ. Ξηρού τύπου ή ατροφική (αριστερά) και υγρού τύπου ή εξιδρωματική (δεξιά) [6]

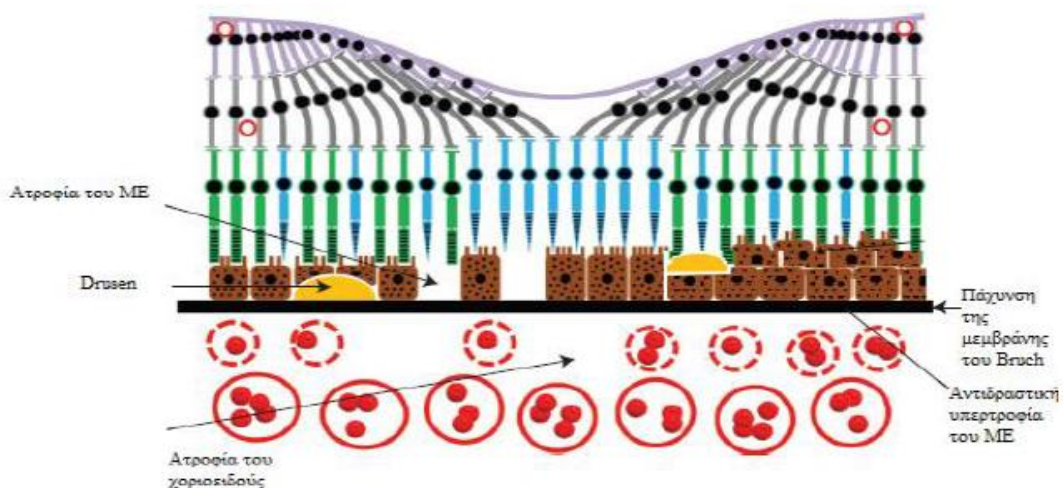
1.2.2.1 ΞΗΡΗ ΗΕΩ

Η ξηρή μορφή είναι ο πιο συχνός τύπος ΗΕΩ κι αφορά περίπου το 85%-90% των ασθενών με ηλικιακή εκφύλιση. Εκδηλώνεται με σταδιακή ήπια έως σοβαρή απώλεια της κεντρικής όρασης σε περίοδο μηνών ή χρόνων. Χαρακτηρίζεται από διαταραχές που λαμβάνουν χώρα στο σύμπλεγμα ΜΕ - μεμβράνης του Bruch - χοριοειδοτριχοειδών, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αλλοιώσεων λόγω της καταστροφής των φωτοϋποδοχέων της ωχράς κηλίδας. Οι σημαντικότερες αλλοιώσεις είναι τα drusen, τα οποία συνιστούν πολύπλοκα συνονθυλεύματα από λιπίδια, πρωτεΐνες και κυτταρικά υπολείμματα στο επίπεδο του ΜΕ κι εντοπίζονται κυρίως κάτω από το ΜΕ του αμφιβληστροειδούς [20]. Εμφανίζονται ως κίτρινα κοκκία και ποικίλλουν σε αριθμό, μέγεθος και σχήμα (Εικόνα 1.12).



Εικόνα 1.12. Σχηματική απεικόνιση της δημιουργίας drusen

Η παρουσία των drusen από παθοφυσιολογικής σκοπιάς φαίνεται να προκαλεί κυτταρικό θάνατο των κυττάρων του ΜΕ και κατά συνέπεια ατροφία του ΜΕ. Η απώλεια των κυττάρων αυτών, δεδομένης και της μεταβολικής και λειτουργικής αλληλεξάρτησής τους με τα εξωτερικά τμήματα των φωτοϋποδοχέων, προκαλεί ατροφία και της στιβάδας των φωτοϋποδοχέων του ιδίως αμφιβληστροειδή και μείωση της κεντρικής όρασης. Παράλληλα παρατηρείται μια αργά εξελισσόμενη ατροφία των χοριοτριχοειδών και πάχυνση της μεμβράνης του Bruch (Εικόνα 1.13).



Εικόνα 1.13. Σχηματική αναπαράσταση των παθολογοανατομικών μεταβολών στην ξηρή μορφή της ΗΕΩ [21]

Τα drusen ανάλογα με το μέγεθός τους διακρίνονται σε μικρά με διάμετρο μικρότερη από 63 μm (σκληρά drusen), σε μεγάλα με διάμετρο μεγαλύτερη από 125 μm (μαλακά drusen) και σε ενδιάμεσα με διάμετρο κυμαινόμενη μεταξύ 63 και 125 μm (σκληρά ή μαλακά drusen). Κλινικά το μέγεθος των drusen εκτιμάται με βάση τη διάμετρο των κύριων φλεβικών κλάδων του αμφιβληστροειδούς στο σημείο όπου αυτοί διέρχονται από τα όρια του οπτικού δίσκου. Στο σημείο αυτό οι φλέβες έχουν διάμετρο 125 μm περίπου [22]. Σε ορισμένους ασθενείς τα drusen περιορίζονται στην περιοχή του κεντρικού βοθρίου, ενώ σε άλλους οι εναποθέσεις περιβάλλουν αλλά περιορίζουν το βοθρίο. Τα drusen σπανίως είναι κλινικά ορατά πριν την ηλικία των 45 ετών, ενώ μετά την ηλικία των 60 ετών αποτελούν σύνηθες φαινόμενο. Με την αύξηση της ηλικίας αυξάνονται σε μέγεθος και αριθμό. Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του μεγέθους των drusen και του κινδύνου ανάπτυξης προχωρημένης ΗΕΩ σε μια περίοδο 5 ετών.

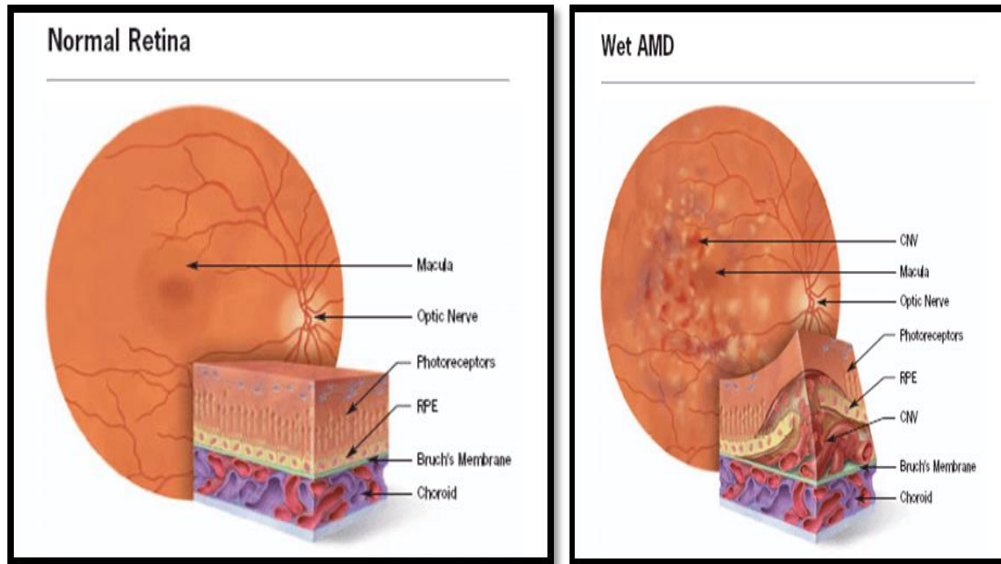
Εκτός από τα drusen, άλλες αλλοιώσεις που μπορεί να εμφανιστούν στην περιοχή της ωχράς είναι οι εστιακές αθροίσεις χρωστικής και οι ατροφικές εστίες του ΜΕ [23], [24]. Η πιο σοβαρή ατροφική αλλοίωση που παρατηρείται στο πλαίσιο της ΗΕΩ είναι η γεωγραφική ατροφία [25], [26]. Με τον όρο αυτό χαρακτηρίζεται μια σαφώς περιγεγραμμένη περιοχή, στρογγυλή ή ωοειδής, αποχρωματισμού ή εμφανούς έλλειψης κυττάρων του ΜΕ. Η γεωγραφική ατροφία του ΜΕ προσβάλλει το 0,6% των ενηλίκων και ευθύνεται για το 12% με 21% της τύφλωσης των ατόμων που πάσχουν από ΗΕΩ [27], [28]. Σε ποσοστό 1%-18% των ασθενών με ξηρή ΗΕΩ η ασθένεια μπορεί να εξελιχθεί στην υγρή μορφή η οποία αποτελεί τον σοβαρότερο κλινικό φαινότυπο.

1.2.2.2 ΥΓΡΗ ΗΕΩ

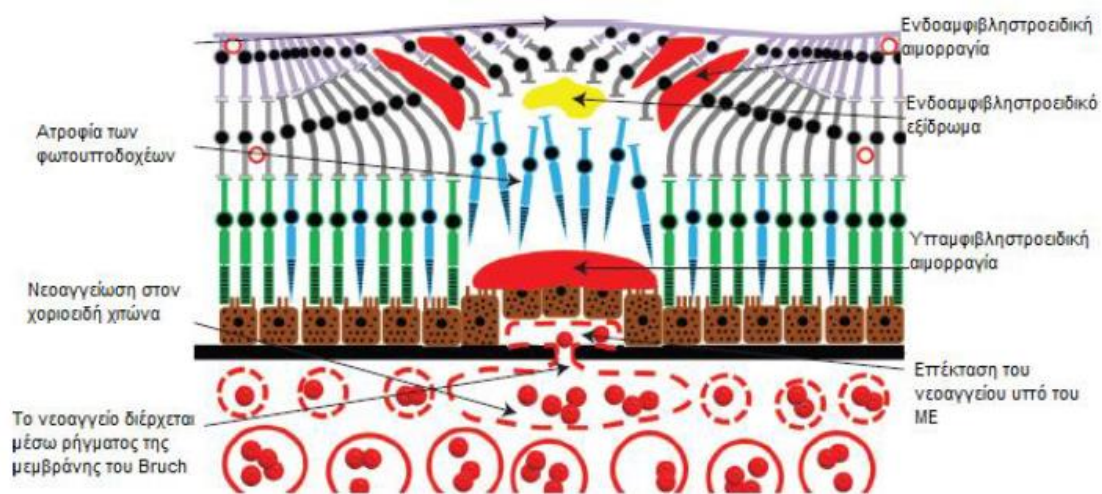
Η υγρή μορφή παρότι είναι λιγότερο συχνή, εξελίσσεται πιο δραματικά με αποτέλεσμα στο 90% των περιπτώσεων οι ασθενείς να εμφανίζουν σοβαρή απώλεια της όρασης. Η διαταραχή της όρασης είναι συχνά αιφνίδια προκαλώντας εκτός από αισθητή απώλεια της κεντρικής όρασης και άλλα συμπτώματα όπως μεταμορφοψία και μικροψία δηλαδή μεταβολές στο σχήμα και το μέγεθος της εικόνας.

Η υγρή ΗΕΩ χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη χοριοειδικής νεοαγγείωσης, δηλαδή ινοαγγειακού ιστού ο οποίος αναπτύσσεται από τα χοριοτριχοειδή, περνά

μέσω ρήξεων της μεμβράνης του Bruch στον υπό ΜΕ χώρο και στη συνέχεια στον υποαμφιβληστροειδικό χώρο. Η αυξημένη διαπερατότητα των νεόπλαστων αυτών αγγείων οδηγεί στη συσσώρευση ορώδους υγρού ή αίματος κάτω από το ΜΕ ή και μέσα στο νευροεπιθήλιο (Εικόνα 1.14, Εικόνα 1.15).



Εικόνα 1.14. Αριστερά: Φυσιολογικός αμφιβληστροειδής χιτώνας. Δεξιά: ΗΕΩ υγρού τύπου. Τα ταχέως αναπτυσσόμενα αγγεία διασπών το ΜΕ και προκαλούν διαρροές και αιμορραγίες [29]

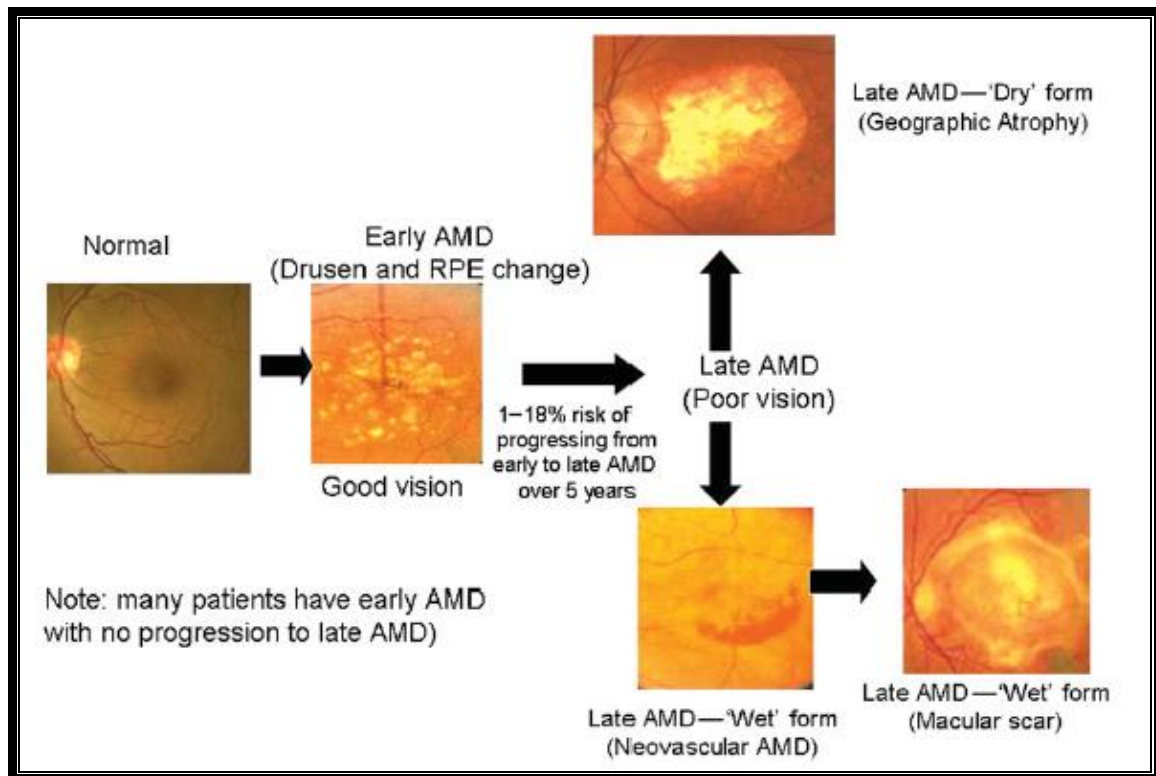


Εικόνα 1.15. Σχηματική αναπαράσταση των παθολογοανατομικών μεταβολών στην υγρή μορφή της ΗΕΩ [21]

Η εξοίδηση ή αποκόλληση του κεντρικού βοθρίου, σύμφωνα με τον παραπάνω μηχανισμό, έχει ως αποτέλεσμα τη δραματική μείωση της κεντρικής όρασης [26], [30]. Επιπλέον, ινώδης μεταπλασία και οργάνωση του υποαμφιβληστροειδικού υλικού μπορεί να επακολουθήσει και να καταλήξει στο σχηματισμό μιας δισκοειδούς ουλής η οποία και συνιστά το τελικό στάδιο της νόσου και συνδέεται με οριστική απώλεια της όρασης. Παρά το γεγονός ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό της τάξεως του 10% αναπτύσσει χοριοειδική νεοαγγείωση, η πλειονότητα εκείνων που εμφανίζουν σοβαρή ελάττωση της όρασης τους παρουσιάζει σημεία της εξιδρωματικής μορφής της νόσου.

1.2.3 ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Αν και υπάρχουν πολλά συστήματα ταξινόμησης για την ΗΕΩ αυτό που χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως είναι το σύστημα που προτάθηκε από τη μελέτη AREDS (Age-Related Eye Disease Study) [31]. Σύμφωνα με αυτό η ασθένεια διακρίνεται σε πρώιμο, ενδιάμεσο και προχωρημένο στάδιο με βάση τη σοβαρότητα της νόσου. Το πρώιμο στάδιο χαρακτηρίζεται από την παρουσία λίγων (<20), μεσαίου μεγέθους drusen ή από την εμφάνιση αλλοιώσεων στην περιοχή του ΜΕ. Η ενδιάμεση ΗΕΩ χαρακτηρίζεται από την παρουσία τουλάχιστον ενός μεγάλου drusen ή γεωγραφικής ατροφίας που δεν εκτείνεται στο κέντρο της ωχράς κηλίδας. Τέλος, η προχωρημένη ΗΕΩ μπορεί να είναι είτε μη εξιδρωματική (ξηρή) είτε εξιδρωματική (υγρή). Η ξηρή ΗΕΩ χαρακτηρίζεται από τη παρουσία drusen και γεωγραφικής ατροφίας που εκτείνεται στο κέντρο της ωχράς κηλίδας, ενώ η υγρή από την ανάπτυξη χοριοειδικής νεοαγγείωσης. (Εικόνα 1.16)



Εικόνα 1.16. Σταδιοποίηση της ΗΕΩ [32]

Στην πρώιμη νόσο, η απώλεια όρασης είναι γενικώς ήπια και συχνά ασυμπτωματική. Εντούτοις στα συμπτώματα περιλαμβάνονται το θάμβος όρασης, σκοτώματα, διαταραχή προσαρμογής στο σκοτάδι, μειωμένη ευαισθησία αντίθεσης καθώς και η ανάγκη αυξημένης έντασης φακού ή βοηθητικού φακού στην ανάγνωση. Οι ασθενείς με προχωρημένη μη εξιδρωματική νόσο εμφανίζουν βαθμιαία απώλεια της όρασης με κεντρικό ή παρακεντρικό σκότωμα συνήθως μετά την παρέλευση μηνών ή και χρόνων. Αντίθετα, οι ασθενείς με προχωρημένη εξιδρωματική νόσο παρουσιάζουν αιφνίδια σημαντική μείωση της όρασης κατά τη διάρκεια ημερών ή εβδομάδων, ως αποτέλεσμα υποαμφιβληστροειδικής αιμορραγίας ή οιδήματος, επακόλουθα της χοριοειδικής νεοαγγείωσης.

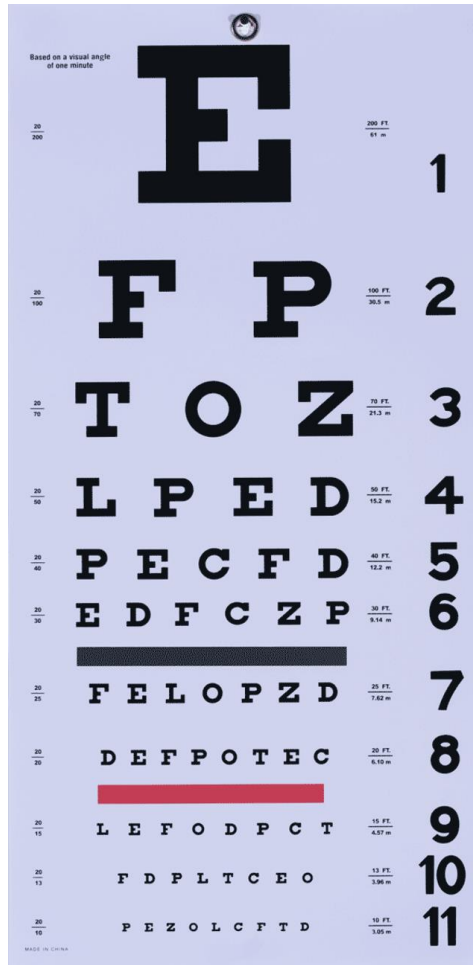
1.3. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΗΕΩ

1.3.1 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΟΠΤΙΚΗΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ

Η μέτρηση της οπτικής οξύτητας αποτελεί μια γρήγορη κι εύκολη πρακτική που προτιμάται από τους οφθαλμιάτρους και συμβάλει στην αξιολόγηση της όρασης του ασθενούς. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των διαθλαστικών σφαλμάτων και της παθοφυσιολογίας του οφθαλμού και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη κατά τον κλινικό έλεγχο της πορείας της θεραπείας της ΗΕΩ, καθώς είναι ένα μέγεθος που μεταβάλλεται άμεσα με βελτίωση ή επιδείνωση της κεντρικής όρασης. Η οπτική οξύτητα αξιολογείται στην κλινική πράξη συνήθως με τη χρήση πινάκων που αποτελούνται από γραμμές μαύρων συμβόλων, αριθμών, ή γραμμάτων (οπτότυπα) σε λευκό υπόβαθρο, που βαθμιαία ελαττώνονται σε μέγεθος. Κάθε οπτότυπο περικλείεται σε ένα τετραγωνικό πλαίσιο, με το μήκος της κάθε του πλευράς να είναι πενταπλάσιο του πάχους των γραμμών που το αποτελούν.

1.3.1.1 ΠΙΝΑΚΕΣ SNELLEN

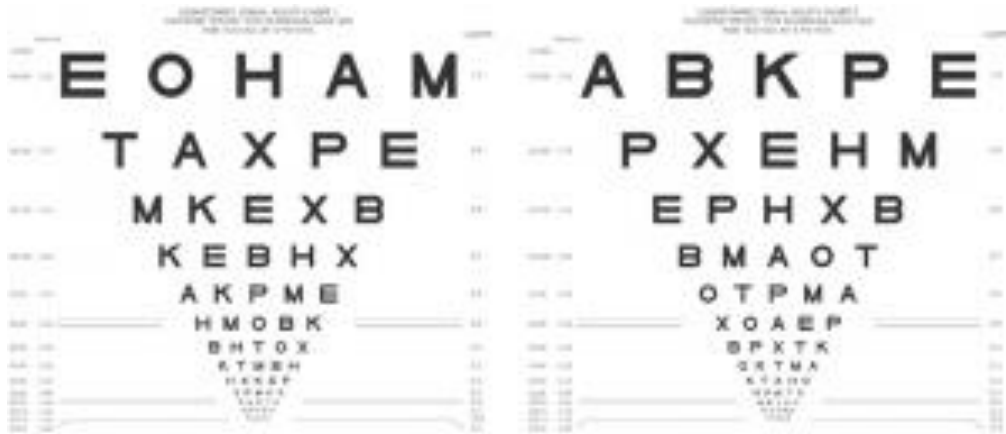
Αν και ορισμένοι πίνακες για την εξέταση της όρασης είχαν δημιουργηθεί πριν από τον Μεσαίωνα, οι πρώτοι βαθμονομημένοι πίνακες για τη μέτρηση της οπτικής οξύτητας κατασκευάστηκαν και δημοσιεύτηκαν το 1862 από τον Herman Snellen. Οι πίνακες ή οπτότυπα του Snellen αποτελούνται από σειρές γραμμάτων ή αριθμών, το μέγεθος των οποίων μειώνεται με γεωμετρική πρόοδο από γραμμή σε γραμμή. Τα οπτότυπα του Snellen τοποθετούνται σε απόσταση 6m από τον εξεταζόμενο. Η αναγνώριση των συμβόλων της πρώτης γραμμής αντιστοιχεί σε οπτική οξύτητα 1/10, της δεύτερης σε 2/10, μέχρι τη δέκατη γραμμή που αντιστοιχεί σε οπτική οξύτητα 10/10, η οποία είναι και η φυσιολογική [33] (Εικόνα 1.17).



Εικόνα 1.17. Πίνακας μέτρησης οπτικής οξύτητας, Οπτότυπο Snellen [1]

1.3.1.2 ETDRS ΟΠΤΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ

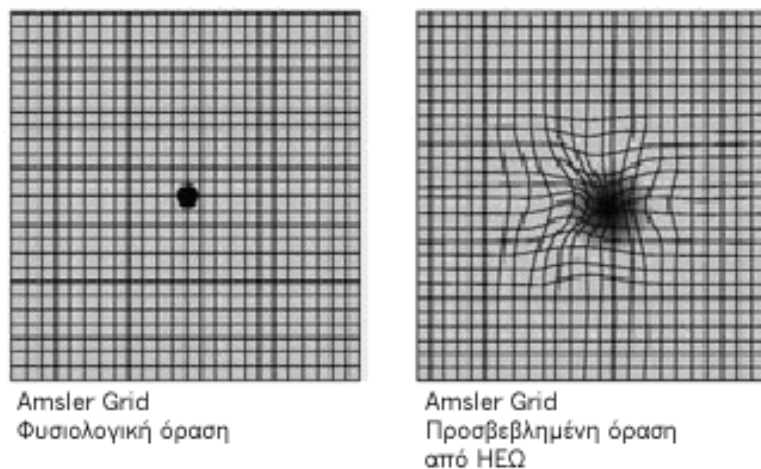
Η μέτρηση της βέλτιστα διορθωμένης οπτικής οξύτητας (best corrected visual acuity, BCVA) αποτελεί την πιο ευρέως διαδεδομένη εξέταση για την εκτίμηση της όρασης του ασθενούς. Τα τελευταία χρόνια ο πίνακας ETDRS χρησιμοποιείται για την μέτρηση της οπτικής οξύτητας τόσο στις διάφορες κλινικές μελέτες αλλά και στην καθημερινή κλινική πράξη. Ο πίνακας ETDRS περιλαμβάνει τον ίδιο αριθμό γραμμάτων σε κάθε σειρά του (πέντε γράμματα) και χαρακτηρίζεται από λογαριθμική αύξηση του μεγέθους των γραμμάτων κάθε σειράς [34] (Εικόνα 1.18). Ο ασθενής πρέπει να διαβάσει όλα τα γράμματα ξεκινώντας από την πάνω σειρά και η βαθμολόγηση της οπτικής οξύτητας γίνεται ανά γράμμα που διαβάζει ο ασθενής.



Εικόνα 1.18. Οι τροποποιημένοι ETDRS πίνακες οπτικής οξύτητας που αναπτύχθηκαν στο Πανεπιστήμιο Κρήτης. Ο πίνακας 1 (αριστερά) χρησιμοποιείται για τον δεξιό οφθαλμό και ο πίνακας 2 (δεξιά) για τον αριστερό οφθαλμό [35]

1.3.2 ΠΛΕΓΜΑ ΤΟΥ AMSLER

Η σχάρα ή πλέγμα του Amsler [36] αποτελεί μια αξιόπιστη εξέταση για την ποιοτική εκτίμηση της οπτικής οξύτητας και του κεντρικού οπτικού πεδίου και βοηθά τον ασθενή στον πρώιμο εντοπισμό ακόμα και ήπιων διαταραχών της κεντρικής όρασης. Ο ασθενής με νεοαγγειακή ΗΕΩ κατά την χρήση του πλέγματος Amsler εμφανίζει μεταμορφοψία, όπου οι οριζόντιες και οι κάθετες γραμμές του πλέγματος φαίνονται διακεκομμένες ή κυματιστές (Εικόνα 1.19).



Εικόνα 1.19. Αριστερά: Πλέγμα του Amsler. Δεξιά: Παραμόρφωση των γραμμών του πλέγματος του Amsler σε ασθενή με νεοαγγειακή μορφή ΗΕΩ [1]

Επίσης μπορεί να παρατηρηθεί και απώλεια τμήματος ή τμημάτων του πλέγματος Amsler καθώς και ανικανότητα εστίασης του ασθενή στην κεντρική κουκίδα του πλέγματος. Η τακτική και συστηματική χρήση του πλέγματος Amsler βοηθά στην έγκαιρη διάγνωση της ΗΕΩ.

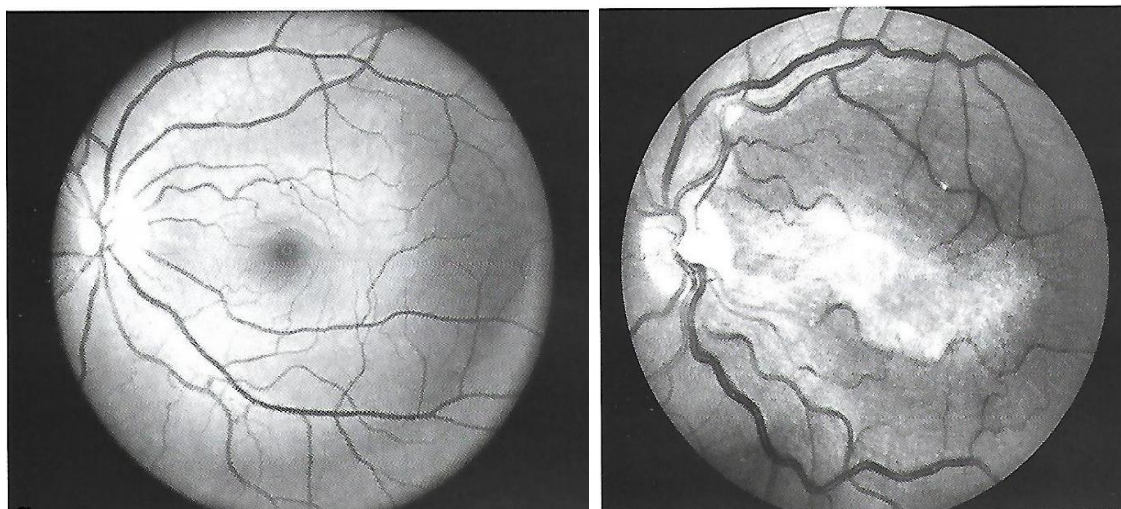
1.3.3 ΒΙΟΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ

Βιομικροσκόπηση καλείται η εξέταση του οφθαλμού με τη βοήθεια κατάλληλου μικροσκοπίου και εστιακού πλάγιου φωτισμού. Τα δύο αυτά συστήματα βρίσκονται ενσωματωμένα στη σχισμοειδή λυχνία. Για τη βιομικροσκόπηση του οπίσθιου ημιμορίου του οφθαλμού απαιτούνται ειδικοί φακοί που τοποθετούνται μεταξύ της σχισμοειδούς λυχνίας και του εξεταζόμενου ματιού. Σε ασθενείς με νεοαγγειακή ΗΕΩ, κατά την βιομικροσκόπηση παρατηρείται στην ωχρά μια περιοχή υπέγερσης, χωρίς όμως να προκύπτει με ακρίβεια αν πρόκειται για υποαμφιβληστροειδικό υγρό ή αποκόλληση του ΜΕ.

1.3.4 ΦΛΟΥΟΡΟΑΓΓΕΙΟΓΡΑΦΙΑ

Η φλουοροαγγειογραφία συγκαταλέγεται μεταξύ των βασικών εξεταστικών μεθόδων των παθήσεων του βυθού του οφθαλμού γιατί έχει τη δυνατότητα να διερευνά σε ανατομικό επίπεδο τη φύση μιας αλλοίωσης, καθώς και το βαθμό και την έκταση μιας αγγειακής διαταραχής. Η φλουοροαγγειογραφία βασίζεται στη δυνατότητα φωτογράφισης του φθορισμού, τον οποίο εκπέμπουν τα μόρια της φλουορεσκεΐνης κατά τη δίοδο τους από τα αγγεία του βυθού του οφθαλμού. Η φωτογράφιση του φθορισμού είναι εφικτή με τη βοήθεια ειδικής φωτογραφικής μηχανής του βυθού, η οποία έχει τη δυνατότητα να λαμβάνει μια φωτογραφία ανά 1'' ή 2'' και δύο φίλτρων. Το πρώτο φίλτρο, φίλτρο διεγέρσεως, παρεμβάλλεται μεταξύ φωτεινής πηγής και οφθαλμού και επιτρέπει τη δίοδο μόνο στο κυανό φως που θα διεγείρει τα μόρια της φλουορεσκεΐνης. Το δεύτερο φίλτρο, φίλτρο φραγμού, τοποθετείται μεταξύ οφθαλμού και φωτογραφικής μηχανής και απορροφά όλα τα μήκη κύματος πλην εκείνων του κιτρινοπράσινου φωτός που θα φωτογραφηθεί. Στη μηχανή αυτή εκτός των φίλτρων φραγμού και διεγέρσεως, τα οποία

χρησιμοποιούνται για την αγγειογραφία, είναι ενσωματωμένο και ένα πράσινο φίλτρο για τη λήψη ασπρόμαυρων φωτογραφιών με ανέρυθρο φως (Εικόνα 1.20).



Εικόνα 1.20. Ασπρόμαυρη φωτογραφία αμφιβληστροειδούς με ανέρυθρο φως.

Αριστερά: Ασπρόμαυρη φωτογραφία φυσιολογικού βυθού αριστερού οφθαλμού. Η μικρή κηλίδα στο μέσον του κεντρικού βοθρίου οφείλεται σε τεχνικό σφάλμα.

Δεξιά: Ασπρόμαυρη φωτογραφία βυθού αριστερού οφθαλμού με παθολογικό εύρημα (επαμφιβληστροειδική μεμβράνη της ωχράς). Στην περίπτωση αυτή η ασπρόμαυρη εικόνα υπερτερεί της αντίστοιχης έγχρωμης [8]

Με την απομάκρυνση των φίλτρων αυτών από το φωτογραφικό πεδίο, επιτυγχάνεται η έγχρωμη φωτογράφιση του βυθού. Τέλος, με τη φωτογραφική μηχανή του βυθού είναι δυνατή η στερεοφωτογράφιση του βυθού και η φωτογράφιση του προσθίου τμήματος του οφθαλμού. Σήμερα, η ψηφιακή αγγειογραφία με τη χρήση συστήματος ηλεκτρονικού υπολογιστή έχει τη δυνατότητα ψηφιακής απεικόνισης του βυθού με υψηλή ανάλυση.

Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται η αγγειογραφία με πράσινη ινδοκυανίνη (ICG) ως μέθοδος μελέτης της κυκλοφορίας του χοριοειδούς και των διαταραχών της [19]. Η πράσινη ινδοκυανίνη είναι χρωστική υψηλού μοριακού βάρους, η οποία όταν διεγείρεται, εκπέμπει στο υπέρυθρο φάσμα. Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μικρότερη απορρόφηση φθορισμού από τις αιμορραγίες, το ορώδες υγρό, τα λιπιδαιμικά εξιδρώματα και τις χρωστικές του αμφιβληστροειδούς σε σύγκριση με εκείνη της φλουορεσκεΐνης. Με τον τρόπο αυτό, η ικανοποιητική απεικόνιση της

κυκλοφορίας του χοριοειδούς επιτρέπει σε μεγάλο βαθμό, τη μελέτη των υποαμφιβληστροειδικών παθήσεων. Το ΜΕ απορροφά μόνο το 1/3 του φθορισμού, τον οποίον εκπέμπει η πράσινη ινδοκυανίνη στο υπέρυθρο φάσμα, σε αντίθεση με τα 2/3 του φθορισμού της φλουορεσκεΐνης, ο οποίος απορροφάται στην περιοχή του κυανού-πράσινου του ορατού φάσματος. Η πράσινη ινδοκυανίνη συνδέεται σε ποσοστό 98% με τις πρωτεΐνες του ορού, σε σύγκριση με τη φλουορεσκεΐνη, η οποία συνδέεται σε ποσοστό 85%. Η σύνδεση αυτή της ινδοκυανίνης, σε συνδυασμό με το υψηλό μοριακό της βάρος, έχει ως συνέπεια τη μικρότερη εξαγγείωσή της από τα χοριοτριχοειδή, με αποτέλεσμα να καθίσταται δυνατή η απεικόνιση των μεγάλων χοριοειδικών αγγείων ιδίως κατά τις αρχικές φάσεις της εξέτασης. Οι μεγάλες εξελίξεις στον τομέα της υψηλής ψηφιακής ανάλυσης επέτρεψαν τη λήψη καθαρών εικόνων με αποτέλεσμα η αγγειογραφία με ινδοκυανίνη να διαδοθεί στην κλινική πράξη και να συντελέσει στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των χοριοαμφιβληστροειδικών παθήσεων.

1.3.5 ΑΥΤΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Αυτοφθορισμός είναι η δυνατότητα που παρουσιάζουν ορισμένοι βιολογικοί σχηματισμοί να φθορίζουν είτε αυτόματα είτε κατόπιν επίδρασης ακόμα και απλού φωτός. Τα μόρια των σχηματισμών αυτών περιέχουν τις λεγόμενες αυτοφθορίζουσες ουσίες που είναι και υπεύθυνες για το φαινόμενο του αυτοφθορισμού.

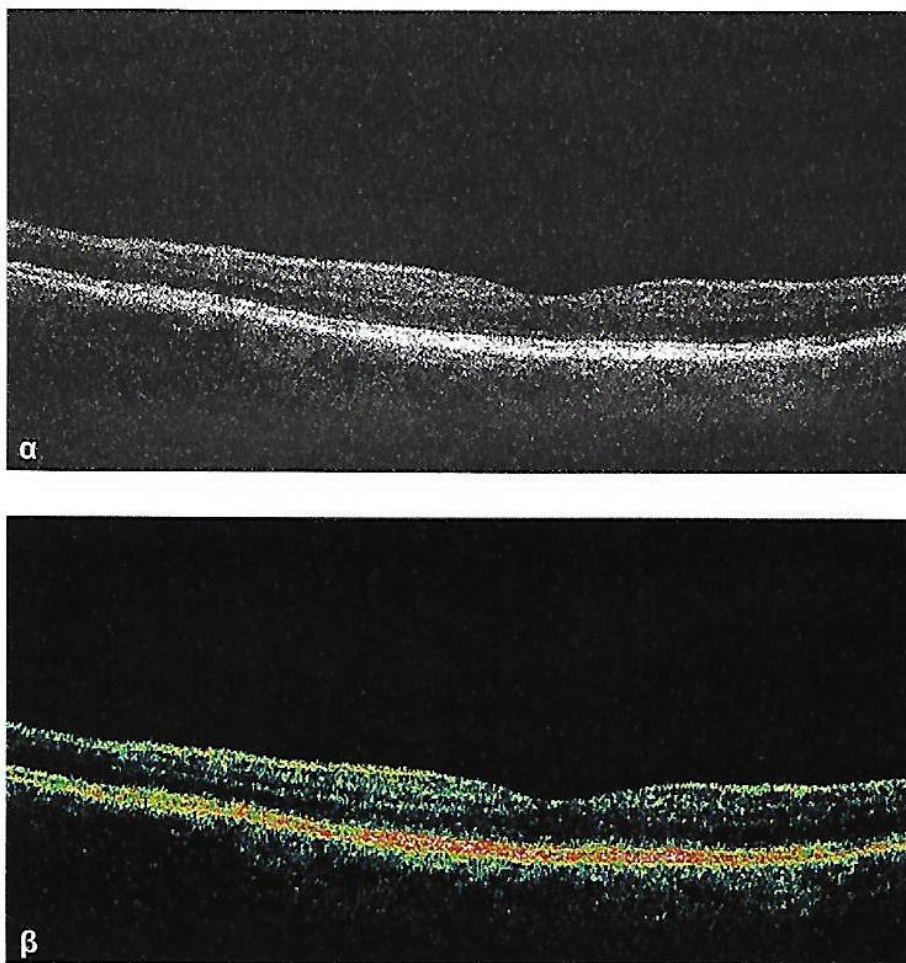
Ο αυτοφθορισμός του βυθού είναι μια μέθοδος απεικόνισης *in vivo* της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας των φυσιολογικά ή παθολογικά συσσωρευμένων φθορίζουσών ουσιών μετά από διέγερση με μπλε φως. Ο κύριος αυτοφθορίζων σχηματισμός στο βυθό που ελέγχεται είναι το ΜΕ. Τα κύτταρα του ΜΕ μεταβολίζουν μια ουσία, τη λιποφουσκίνη, η οποία παράγεται σαν παραπροϊόν του βιοχημικού κύκλου βιοσύνθεσης των φωτοευαίσθητων ουσιών οψίνης και ροδοψίνης. Οι ουσίες αυτές παίρνουν μέρος στη διαδικασία μετατροπής του φωτεινού ερεθίσματος σε ηλεκτρικό σήμα στον εγκέφαλο. Όταν τα κύτταρα αυτά δυσλειτουργούν, τότε η λιποφουσκίνη συσσωρεύεται σε αυτά και προκαλεί τοξική βλάβη και εν συνεχεία κυτταρικό θάνατο. Κατά την ειδική εξέταση του αυτοφθορισμού του βυθού η συσσώρευση της λιποφουσκίνης φαίνεται σαν μια περιοχή αυξημένου σήματος ενώ τα κύτταρα τα οποία έχουν οδηγηθεί σε κυτταρικό θάνατο απεικονίζονται ως σκοτεινές περιοχές στον αυτοφθορισμό. Ο αυτοφθορισμός του βυθού επιτρέπει την

αξιολόγηση της ακεραιότητας και του μεταβολισμού του ΜΕ σε ασθενείς με εξιδρωματική ΗΕΩ. Επίσης, επιτρέπει και τη σύγκριση με τα αποτελέσματα της φλουοροαγγειογραφίας.

1.3.6 ΟΠΤΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΝΟΧΗΣ

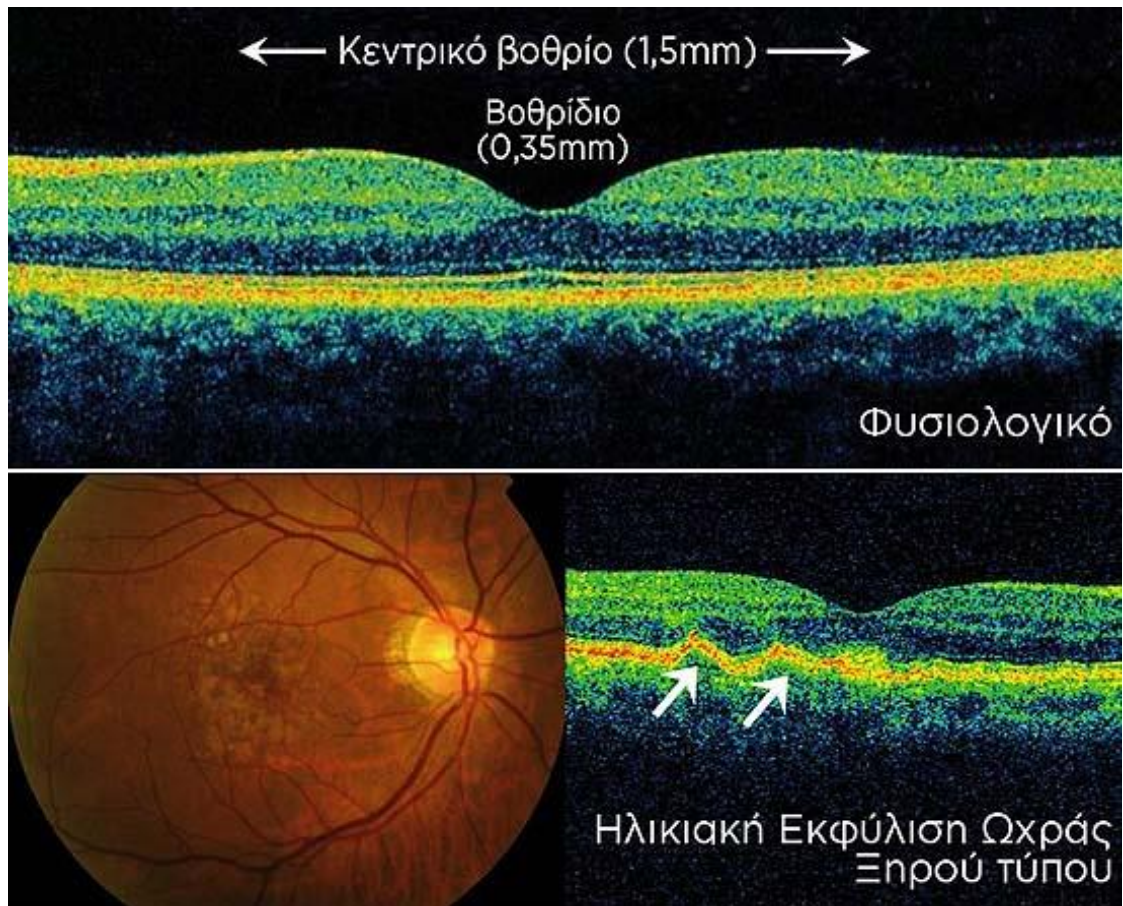
Η οπτική τομογραφία συνοχής (Optical Coherence Tomography, OCT) είναι μια διαγνωστική απεικονιστική μέθοδος, η οποία παρέχει εικόνες υψηλής ευκρίνειας του προσθίου τμήματος του οφθαλμού και του αμφιβληστροειδούς. Η εικόνα, η οποία προκύπτει από την οπτική τομογραφία, βασίζεται στη χρονική καθυστέρηση και στην ένταση της ανακλώμενης δέσμης φωτός από τις διάφορες στιβάδες του υπό εξέταση ιστού.

Η καταγραφή της έντασης του ανακλώμενου σήματος στις λήψεις της οπτικής τομογραφίας γίνεται είτε σε μια κλίμακα του γκρι είτε, για τη διευκόλυνση ανάγνωσης των διατμηματικών τομών, σε μια κλίμακα ψευδούς χρώματος, η οποία αντιπροσωπεύει το βαθμό στον οποίο το φως επιστρέφει από τις διαφορετικές στιβάδες του αμφιβληστροειδούς (Εικόνα 1.21). Έτσι, τα ανοικτά χρώματα, όπως το κόκκινο και το άσπρο, αντιστοιχούν σε περιοχές με έντονη ανακλαστικότητα, ενώ τα πιο σκούρα χρώματα, όπως το μπλε ή το μαύρο, απεικονίζουν περιοχές με χαμηλή ανακλαστικότητα. Στις εικόνες αυτές το έσω και το έξω όριο του ιδίως αμφιβληστροειδούς απεικονίζονται με ευκρίνεια ως περιοχές αυξημένης ανακλαστικότητας, με αποτέλεσμα να μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια και το πάχος του αμφιβληστροειδούς με εφαρμογή ανάλογου αλγορίθμου.

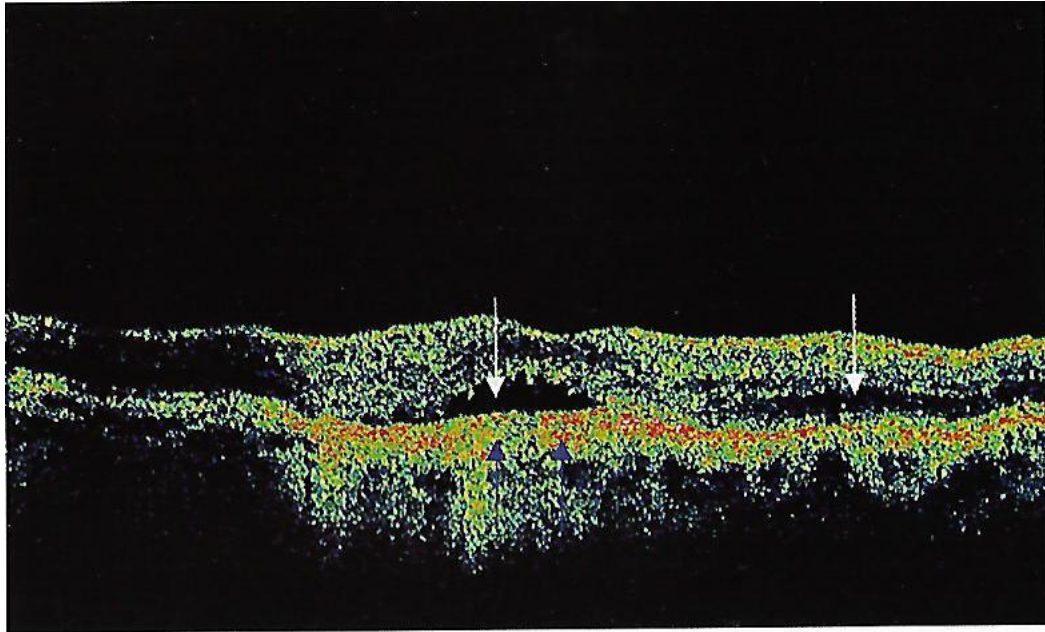


Εικόνα 1.21. Διατμηματική τομή φυσιολογικής ωχράς σε γκρι κλίμακα (α) και σε ψευδοχρωματική κλίμακα (β) [8]

Στην οπτική τομογραφία συνοχής η εικόνα της ΗΕΩ ποικίλλει ανάλογα με τα οφθαλμοσκοπικά ευρήματα [37]. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα drusen (εικόνα 1.22), η γεωγραφική ατροφία, η νεοαγγείωση του χοριοειδούς (εικόνα 1.23), η υπαμφιβληστροειδική αιμορραγία και η δισκοειδής ουλή της ωχράς, η οποία αποτελεί το τελικό στάδιο της νεοαγγειώσεως του χοριοειδούς. Η χρήση της οπτικής τομογραφίας συνοχής είναι πολύ σημαντική για την παρακολούθηση των ασθενών, μετά την έναρξη της θεραπείας με αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες καθώς είναι σε θέση να διαπιστώσει εάν η νεοαγγείωση κατέστη ανενεργός ή παρέμεινε ενεργός.



Εικόνα 1.22. Πάνω: OCT φυσιολογικής ωχράς. Κάτω: Εναποθέσεις στην περιοχή της ωχράς (drusen) όπως φαίνονται στην απλή φωτογραφία βυθού και στο OCT (βέλη) [38]



Εικόνα 1.23. Απεικόνιση OCT κλασικής νεοαγγειακής μεμβράνης επί εδάφους ΗΕΩ. Στην οπτική τομογραφία απεικονίζεται μια περιοχή εντοπισμένης πάχυνσης στο επίπεδο της σιβάδας του ΜΕ/χοριοτριχοειδών με αυξημένη αντανακλαστικότητα (μπλε βέλη). Συνυπάρχει υποαμφιβληστροειδικό υγρό και πολλαπλές περιοχές οιδήματος αμφιβληστροειδούς (άσπρα βέλη) [8]

1.3.7 OCT-ΑΓΓΕΙΟΓΡΑΦΙΑ

Στην OCT-αγγειογραφία (OCT-A) ή αγγειο-OCT επιτυγχάνεται η απεικόνιση όλου του αγγειακού δικτύου του αμφιβληστροειδούς, καθώς και των τριχοειδών αγγείων του χοριοειδούς. Αποτελεί την πιο σύγχρονη απεικονιστική μέθοδο εξέτασης της ύπαρξης εκφύλισης, χωρίς το φόβο των ανεπιθύμητων παρενεργειών από τη χρήση σκιαγραφικών ουσιών [39].

1.4. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Τα δεδομένα που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα δεν έχουν αναδείξει κάποια ευρέως αποτελεσματική θεραπευτική ή προληπτική αντιμετώπιση. Οι βασικοί σταθμοί στη θεραπεία της εξιδρωματικής ΗΕΩ ήταν η ανάπτυξη και μελέτη των τεχνικών φωτοπηξίας με θερμικό laser της χοριοειδικής νεοαγγείωσης [40] και η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) [41]. Εντούτοις αυτές οι θεραπευτικές προσεγγίσεις δεν είναι εξίσου αποτελεσματικές σε όλους τους ασθενείς και συνήθως έχουν βραχυπρόθεσμα αποτελέσματα [42]. Η κυριότερη πρόοδος στη θεραπεία της ΗΕΩ υγρού τύπου έχει επιτευχθεί με την ανάπτυξη αντι-αγγειογενετικών παραγόντων και ιδίως με τη χρήση των αντι-VEGF παραγόντων (Vascular Endothelial Growth Factor-Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας), οι οποίοι όχι μόνο διατηρούν αλλά και βελτιώνουν την οπτική οξύτητα, με αναστολή της νεοαγγείωσης και του οιδήματος της φλεγμονώδους διεργασίας.

Όσον αφορά τη μη εξιδρωματική μορφή της νόσου (ξηρή ΗΕΩ), δεν υπάρχει αποδεδειγμένη θεραπεία και οι μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα αποσκοπούν στην προσπάθεια πρόληψης ή και αναστολής της εξέλιξης των πρώιμων σταδίων της σε σοβαρότερες καταστάσεις όπως είναι η γεωγραφική ατροφία και η νεοαγγείωση του χοριοειδούς. Δεδομένα από τη μελέτη AREDS (Age-Related Eye Disease Study) έχουν δείξει την προληπτική επίδραση των αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής στην καθυστέρηση της εξέλιξης της ΗΕΩ ξηρού τύπου [43].

1.4.1 ΑΝΤΙ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

Η χρήση των αντι-αγγειογενετικών παραγόντων στην αντιμετώπιση της οφθαλμικής νεοαγγείωσης έχει σήμερα αντικαταστήσει στην πλειοψηφία των περιπτώσεων τη φωτοπηξία και τη φωτοδυναμική θεραπεία. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής περιλαμβάνονται τα ενθαρρυντικά θεραπευτικά αποτελέσματα, το μικρό ποσοστό επιπλοκών και η απλή διαδικασία της χορήγησης των αντι-αγγειογενετικών παραγόντων ενδοϋαλοειδικά.

1.4.1.1 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του οφθαλμού σπάνια πολλαπλασιάζονται. Σε παθολογικές καταστάσεις, η αγγειογένεση στον οφθαλμό αποτελεί σοβαρή επιπλοκή και χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη νεόπλαστων τριχοειδών αγγείων από προϋπάρχοντα αγγεία. Η αυξημένη διαπερατότητα του τοιχώματος των νεοαγγείων και η ινώδης εξαλλαγή τους στο υαλοειδοαμφιβληστροειδικό επίπεδο ευθύνονται για τις οφθαλμικές επιπλοκές, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε τύφλωση. Η ανάπτυξη φυσιολογικών αλλά και παθολογικών αγγείων εξαρτάται από την ισορροπία, η οποία υφίσταται μεταξύ των παραγόντων που προκαλούν αγγειογένεση, όπως είναι ο Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός παράγοντας ή VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) και των παραγόντων εκείνων οι οποίοι αναστέλλουν τη δράση τους, όπως είναι η θρομβοσπονδίνη-1 και ο ανασταλτικός παράγων, ο προερχόμενος εκ του ME ή PEDF (Pigment Epithelium Derived Factor). Διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ αυτών των παραγόντων μπορεί να οδηγήσει σε αγγειογένεση.

Ο πιο γνωστός αγγειογενετικός παράγοντας είναι ο VEGF και διακρίνεται σε 6 ισομερή: 121, 145, 165, 183, 189 και 206. Το ισομερές VEGF-165 απαντάται σε μεγαλύτερες ποσότητες στην οφθαλμική νεοαγγείωση σε σύγκριση με τα υπόλοιπα ισομερή και θεωρείται μείζονος σημασίας για την παθολογική αγγειογένεση αλλά και για την αγγειογένεση κατά την ανάπτυξη. Η υποξική ισχαιμία αυξάνει την έκφραση του γονιδίου του VEGF. Ο παράγων αυτός αποτελεί αγγειογενετική πρωτεΐνη, η οποία προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων και αγγειογένεση *in vivo* [44]. Ο VEGF χρησιμοποιεί κυρίως δύο μεμβρανικούς ενδοθηλιακούς υποδοχείς τυροσινικής κινάσης για να ασκήσει τη δράση του στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, τους VEGFR-1 και VEGFR-2. Ο VEGF και οι υποδοχείς του εκφράζονται φυσιολογικά στον υγιή οφθαλμό [45]. Οι υποδοχείς του βρίσκονται κυρίως στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις του VEGF υπάρχουν και στο ME. Ο VEGF φαίνεται να έχει προστατευτικό ρόλο αφού συμβάλλει στη διατήρηση επαρκούς αιματικής ροής στο ME και στους φωτοϋποδοχείς [46], ενώ αποτελεί τροφικό παράγοντα για τα χοριοτριχοειδή και είναι απαραίτητος για τη διατήρηση των πόρων των χοριοτριχοειδών.

Ο VEGF στις παθολογικές καταστάσεις του οφθαλμού σχετίζεται με τη νεοαγγειακή μορφή της HEΩ, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι η παραγωγή του αυξάνεται

υπέρμετρα σε υποξικές συνθήκες. Μελέτες έχουν δείξει ότι, κάτω από συνθήκες υποξίας τόσο τα κύτταρα των αγγείων του αμφιβληστροειδούς όσο και ορισμένα κύτταρα του ιδίως αμφιβληστροειδούς (κύτταρα του Muller) και του ME είναι σε θέση να παράγουν αυξημένες ποσότητες VEGF [47]. Επίσης, πειραματική μελέτη σε οφθαλμούς θηλαστικών έδειξε ότι η αναστολή της παραγωγής του VEGF παρεμποδίζει την ανάπτυξη νεοαγγείωσης, ενώ αντίθετα η χορήγησή του συμβάλλει στην ανάπτυξη νεοαγγείωσης στην ίριδα και στον αμφιβληστροειδή [48]. Σύμφωνα με τα παραπάνω ο VEGF είναι απαραίτητος παράγοντας για την πρόκληση αμφιβληστροειδικής νεοαγγείωσης μετά από ισχαιμία. Όσον αφορά τη νεοαγγείωση του χοριοειδούς στην HEΩ υγρού τύπου, ιστοπαθολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι στην περίπτωση αυτή υπάρχει ελάττωση του αριθμού των τριχοειδών του χοριοειδούς καθώς και μειωμένη παροχή αίματος. Το γεγονός αυτό προκαλεί σχετική ισχαιμία και στις έξω στιβάδες του αμφιβληστροειδούς, οι οποίες έχουν αυξημένο μεταβολισμό πριν την εμφάνιση της χοριοειδικής νεοαγγείωσης.

1.4.1.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ HEΩ

Η αναστολή της χοριοειδικής νεοαγγείωσης με τους αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες, και κυρίως με τους παράγοντες αντι-VEGF, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την αντιμετώπιση της HEΩ υγρού τύπου. Συνήθως οι αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες χορηγούνται με ενδοφθάλμιες ενέσεις στο υαλώδες σώμα του οφθαλμού, αλλά έχουν δοκιμαστεί και δοκιμάζονται και άλλες οδοί χορήγησης (συστημική ή τοπική έγχυση με σταγόνες ή τοπική μεταφορά μέσω ενός ιού-γονιδιακή θεραπεία). Το Pegaptanib (Macugen®; Pfizer/Eyetech Pharmaceuticals) ήταν ο πρώτος αντι-VEGF παράγοντας, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ενδοϋαλοειδικά στη χοριοειδική νεοαγγείωση. Η ουσία αυτή αναστέλλει μόνο τον παράγοντα VEGF-165 και τα αποτελέσματα της χορήγησης της στην πάθηση αυτή βασίζονται στη μελέτη V.I.S.I.O.N. [49]. Ωστόσο δε βελτιώνει την όραση παρά μόνο μπορεί να τη σταθεροποιήσει και για το λόγο αυτό δε χρησιμοποιείται πλέον σήμερα. Οι αντι-VEGF παράγοντες που χρησιμοποιούνται είναι το Ranibizumab (Lucentis®; Novartis, Basel, Switzerland, and Genentech Inc., South San Francisco, USA) και το Bevacizumab (Avastin®; Genentech, South San Francisco, USA). Το ranibizumab είναι ο παράγοντας που φαίνεται να έχει τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, μιας και έχει αποδειχτεί ότι σταθεροποιεί και βελτιώνει την όραση και χορηγείται

ενδοϋαλοειδικά μια φορά το μήνα (0.5 mg). Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με ranibizumab βασίζεται στη μελέτη M.A.R.I.N.A. [50]. Το ranibizumab αποτελεί μονοκλωνικό τμήμα του αντισώματος bevacizumab και αναστέλλει τη δράση όλων των ισομερών του VEGF-A. Το bevacizumab είναι ένα μόριο μεγάλου μοριακού βάρους και διαθέτει δύο επιτόπους σύνδεσης αντιγόνων, σε σύγκριση με το ranibizumab που διαθέτει έναν, και ο χρόνος ημίσειας ζωής του είναι 17-21 ημέρες. Το bevacizumab χρησιμοποιήθηκε αρχικά ενδοφλεβίως για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία. Παρόλο που η χρήση του στον οφθαλμό δεν έχει εγκριθεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA), εντούτοις αποτελεί χαμηλού κόστους υποκατάστατο του ranibizumab στη θεραπεία της ΗΕΩ υγρού τύπου και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται από την οφθαλμική κοινότητα αν και στα χαρακτηριστικά χρήσης του σκευάσματος αναφέρεται ότι η σύνθεσή του δεν ενδείκνυται για ενδοϋαλοειδική χρήση.

Το 2011 εγκρίθηκε από τον FDA για την θεραπεία της ΗΕΩ υγρού τύπου ένας άλλος αντι-VEGF παράγοντας, το Aflibercept (Eylea®; Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, USA), ενώ στην Ευρώπη πήρε έγκριση το 2012. Έχει διαφορετικό τρόπο δράσης από το bevacizumab και το ranibizumab. Αποκλείει όλες τις ισομορφές του VEGF-A, καθώς και τους αυξητικούς παράγοντες του πλακούντα PlGF-1 και PlGF-2 (Placenta Growth Factor, PlGF) που προάγουν τη νεοαγγείωση. Εμφανίζει υψηλότερη συγγένεια δέσμευσης με τον VEGF σε σύγκριση με άλλους αντι-VEGF παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων και των bevacizumab και ranibizumab, με συνέπεια τη μεγαλύτερη διάρκεια δράσης του. Τα τελευταία χρόνια το aflibercept χρησιμοποιείται ευρέως από την οφθαλμική κοινότητα με πολύ καλά αποτελέσματα.

1.4.2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Παρά το γεγονός ότι η ξηρή μορφή της νόσου αντιπροσωπεύει πάνω από το 85% των περιστατικών με ΗΕΩ δεν υπάρχει κάποια αποδεδειγμένη θεραπευτική αντιμετώπιση. Τα διατροφικά συμπληρώματα με υψηλές δόσεις αντιοξειδωτικών, έχουν δείξει ότι λειτουργούν προστατευτικά ενάντια στην εξέλιξη της ΗΕΩ λόγω της μείωσης του οξειδωτικού στρες και αποτελούν επί του παρόντος τη μόνη διαθέσιμη επιλογή θεραπείας για τα αρχικά στάδια της νόσου [51], [52].

Πολυάριθμες έρευνες έχουν διερευνήσει το ρόλο των συμπληρωμάτων διατροφής, όπως οι βιταμίνες και τα αντιοξειδωτικά, στην μείωση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου σε ασθενείς με πολλαπλούς παράγοντες κινδύνου καθώς και στην εξέλιξη της πρόωρης σε προχωρημένη μορφή. Οι μελέτες AREDS και AREDS 2 αποτελούν τις πιο πλήρεις και πιο γνωστές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα. Η μελέτη ορόσημο AREDS απέδειξε ότι η λήψη συμπληρωμάτων διατροφής που περιέχουν βιταμίνη C, βιταμίνη D, β-καροτένιο, ψευδάργυρο και χαλκό μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εξέλιξης από μέτρια σε προχωρημένου σταδίου HEΩ κατά 25% για περισσότερο από 5 χρόνια και να οδηγήσει σε μείωση 19% στον κίνδυνο μέτριας απώλειας της όρασης [43]. Επιπλέον, αναφέρεται ότι από τα 1,3 εκατομμύρια άτομα που εκτιμάται ότι θα αναπτύξουν προχωρημένη HEΩ, οι 300.000 θα μπορούσαν να την αποφύγουν, εάν λαμβάνουν συμπληρώματα τύπου της μελέτης AREDS [53].

Η ωχρά κηλίδα συμπυκνώνει μοναδικά τρία καροτενοειδή: την λουτεΐνη, την ζεαξανθίνη και την μέσο-ζεαξανθίνη, των οποίων η συγκέντρωση μειώνεται με την ηλικία [54]. Επιδημιολογικές μελέτες και μεγάλης κλίμακας κλινικές δοκιμές, όπως η AREDS 2, επικέντρωσαν την προσοχή στα οφέλη της οφθαλμικής υγείας και λειτουργίας που επιφέρουν αυτά τα τρία ξανθοφιλικά καροτενοειδή. Σύμφωνα με τα τελευταία δεδομένα, τα καροτενοειδή που βρίσκονται φυσιολογικά στην ωχρά κηλίδα βοηθούν στην προστασία του αμφιβληστροειδούς και του ME από βλάβες που προκαλούνται από το φως και παρέχουν προστασία από τις επιζήμιες φωτο-οξειδωτικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την πορεία της λιποφουσκινογένεσης, επιδρώντας έτσι στην ανάπτυξη της HEΩ. Επιπλέον, το πολυακόρεστο ωμέγα-3 λιπαρό οξύ δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DocosaHexaenoic Acid, DHA) βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα εξωτερικά τμήματα των φωτούποδοχέων, που συνεχώς απορρίπτονται και ανακυκλώνονται υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ανεπάρκεια του DHA επομένως θα μπορούσε να προκαλέσει βλάβη στη λειτουργία του αμφιβληστροειδούς και να επάγει την HEΩ. Η κλινική μελέτη AREDS 2 σχεδιάστηκε προκειμένου να ελέγξει εάν η προσθήκη λουτεΐνης και ζεαξανθίνης ή/και ωμέγα-3 λιπαρών οξέων θα μπορούσε να βελτιώσει την αρχική σύνθεση AREDS [55]. Η μελέτη τελικά έδειξε ότι η προσθήκη λουτεΐνης και ζεαξανθίνης, DHA και EPA (Eicosapentaenoic Acid), ή και των δύο, στη σύνθεση του συμπληρώματος AREDS δεν οδηγεί σε επιπλέον μείωση της προόδου σε προχωρημένη HEΩ.

1.5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΗΕΩ

Παρά την εντατική βασική και κλινική έρευνα η παθογένεια της ΗΕΩ δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί αφού πρόκειται για μια πολύπλοκη ασθένεια στην εμφάνιση της οποίας εμπλέκονται τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Μεταξύ των παραγόντων κινδύνου για την εμφάνιση της ασθένειας, εκτός από την ισχυρή ηλικιακή εξάρτηση της ασθένειας, περιλαμβάνονται το οικογενειακό ιστορικό, οι μολυσματικοί παράγοντες, το κάπνισμα, η διαίτα, ο υψηλός δείκτης μάζας σώματος, τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα, η εγχείρηση καταρράκτη, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η υπέρταση και η έκθεση στον ήλιο. Εκτός από την γενετική προδιάθεση τέσσερις τουλάχιστον διαδικασίες εμπλέκονται στην εκδήλωση της ασθένειας: η διαδικασία της γήρανσης – λιποφουσκινογένεση, ο σχηματισμός drusen, η τοπική φλεγμονή και η νεοαγγείωση (στην περίπτωση της υγρής μορφής).

Μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταβολικών, λειτουργικών, γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων φαίνεται ότι δημιουργεί το υπόστρωμα για πολλαπλές μορφολογικές αλλαγές στην περιοχή της ωχράς κηλίδας και μπορεί να επηρεάσει σε διαφορετικό βαθμό την επιδεκτικότητα ενός ατόμου στην ασθένεια. Συγκεκριμένα, οι σχετιζόμενες με την γήρανση αλλοιώσεις, σε συνδυασμό με επιπρόσθετες παθολογοανατομικές μεταβολές, όπως εναπόθεση λιποφουσκίνης, πάχυνση της μεμβράνης του Bruch και ελάττωση της χοριοειδικής ροής μπορεί να αποτελούν την έναρξη εμφάνισης της νόσου. Επιπλέον, η επίδραση του οξειδωτικού στρες είναι δυνατό να επιταχύνει τη βλάβη του ΜΕ και πιθανά των χοριοτριχοειδών οδηγώντας σε χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση στη μεμβράνη του Bruch και στον χοριοειδή. Η βλάβη αυτή, οδηγεί στη συλλογή ανώμαλης εξωκυττάριας ουσίας, επηρεάζοντας τη φυσιολογική διήθηση των διατροφικών ουσιών προς τον αμφιβληστροειδή και το ΜΕ και προάγοντας την συνολική βλάβη. Μεταβολές στην σχέση μεταξύ ΜΕ-χοριοτριχοειδικής κυκλοφορίας οδηγούν σε ατροφία του αμφιβληστροειδή, του ΜΕ και των χοριοτριχοειδών ή και σε ανάπτυξη χοριοειδικών νεοαγγείων.

1.5.1 ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΓΗΡΑΝΣΗ

Το χαρακτηριστικό κλινικό γνώρισμα της ΗΕΩ αποτελεί η παρουσία των υαλοειδών αποθέσεων (drusen) και των διαταραχών του ΜΕ. Ιστολογικά οι

παραπάνω διαταραχές έχουν συσχετισθεί με εναποθέσεις υλικού που καλούνται βασικές γραμμοειδείς και στιβαδωτές εναποθέσεις (basal laminar and linear deposits). Οι βασικές γραμμοειδείς εναποθέσεις αντιπροσωπεύουν συσσώρευση υλικού μεταξύ της βασικής πλευράς του ME και της υποκείμενης βασικής μεμβράνης. Με την πάροδο του χρόνου, οι εναποθέσεις αυτές μεγαλώνουν και τελικά συνενώνονται και γίνονται συνεχείς. Επιπλέον, οι βασικές γραμμοειδείς εναποθέσεις αντιπροσωπεύουν συσσώρευση υλικού μεταξύ της βασικής μεμβράνης του ME και της έσω κολλαγονικής ζώνης της μεμβράνης του Bruch. Ο συνδυασμός αυτών των εναποθέσεων αποτελούν τις πιο πρώιμες διαταραχές της ΗΕΩ. Η κλινική εκδήλωση των προχωρημένων σταδίων των παθολογικών αυτών αλλαγών διαπιστώνονται σαν υαλοειδείς εναποθέσεις, drusen, από τον νευροαισθητήριο αμφιβληστροειδή. Η εξέλιξη της ΗΕΩ συνοδεύεται από πολλαπλές μορφολογικές διαταραχές που λαμβάνουν χώρα στην ωχρά κηλίδα. Η εξιδρωματική μορφή της νόσου περιλαμβάνει πολλές μορφολογικές μεταβολές του χοριοειδούς χιτώνα και της μεμβράνης του Bruch ενώ αντίθετα οι αλλαγές αυτές δεν παρατηρούνται στην ξηρά μορφή της νόσου.

Η συγκρότηση των εναποθέσεων οδηγεί στο μηχανισμό ανάπτυξης της νόσου. Ειδικότερα οι εναποθέσεις αυτές αποτελούνται από λιπίδια, πρωτεΐνες, κυτταρικές δομές του ME καθώς και από δενδριτικά κύτταρα του χοριοειδούς. Σύμφωνα με τους Hageman και συνεργάτες [23], ο σχηματισμός των υαλοειδικών εναποθέσεων ξεκινά με την διαταραχή του ME από διάφορους παράγοντες όπως γενετικές μεταλλάξεις και οξειδωτικές βλάβες από ακτινοβολία (φως) καθώς και συστηματικούς παράγοντες όπως το κάπνισμα, η ισχαιμία και η συσσώρευση λιποφουσκίνης. Τα παραπάνω έχουν σαν αποτέλεσμα τον θάνατο των κυττάρων του ME και την απελευθέρωση διεγερτικών μορίων όπως κυτταροκινών που προσελκύουν δενδριτικά κύτταρα από την χοριοειδική κυκλοφορία. Τα δενδριτικά κύτταρα ωριμάζουν, διαφοροποιούνται και τελικά σχηματίζουν τον πυρήνα των ενδοϋαλοειδικών εναποθέσεων. Περαιτέρω ενίσχυση της τοπικής αυτής φλεγμονώδους απάντησης μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος με αποτέλεσμα την πρωτεόλυση της εξωκυττάριας ουσίας και την προσέλκυση μακροφάγων. Οι επιπλέον μορφολογικές αλλαγές που σχετίζονται με την γήρανση περιλαμβάνουν την συσσώρευση λιποφουσκίνης στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ME και την πάχυνση της μεμβράνης του Bruch.

Με την πάροδο της ηλικίας, η δομή, η μοριακή σύσταση καθώς και οι ιδιότητες της μεμβράνης του Bruch μεταβάλλονται. Η μεμβράνη του Bruch όπως προαναφέρθηκε, αντιπροσωπεύει ένα σύνολο στιβάδων που περιλαμβάνουν, τη

βασική μεμβράνη του ME, την έξω στιβάδα κολλαγόνων ινών, την στιβάδα ελαστικών ινών, την έσω στιβάδα κολλαγόνων ινών και την βασική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων των χοριοτριχοειδών. Γενικά παρατηρείται αύξηση του πάχους της μεμβράνης και μείωση της ικανότητας “φιλτραρίσματος” των διερχόμενων βιομορίων λόγω της μοριακής και δομικής αναδιαμόρφωσης. Επίσης, έχει παρατηρηθεί συσσώρευση λιπιδίων στη μεμβράνη του Bruch, τα οποία είναι κυτταρικής προέλευσης και προέρχονται κυρίως από το ME. Η παρουσία των λιπιδίων είναι εντονότερη στην ωχρά κηλίδα συγκριτικά με την περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς [56]. Η συσσώρευση ιδίως των ουδέτερων λιπών έχει σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη διακίνηση νερού, ιόντων και μακρομορίων μεταξύ ME και συστηματικής κυκλοφορίας [56], [57]. Η εναπόθεση λιπιδίων έχει προταθεί ως παθοφυσιολογική εξήγηση της αποκόλλησης του ME. Η αδυναμία διέλευσης του ύδατος διαμέσου της μεμβράνης οδηγεί στη συσσώρευσή του στον υποαμφιβληστροειδικό χώρο και την αποκόλληση των κυττάρων του ME από τη βασική τους μεμβράνη [57].

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που θεωρείται ότι παίζει κυρίαρχο ρόλο στην παθογένεια της HEΩ αποτελεί η βλάβη σε κύτταρα του ME. Η βλάβη μπορεί να προέρχεται από διάφορους παράγοντες όπως το οξειδωτικό στρες από το περιβάλλον, συστηματικοί παράγοντες καθώς και ανοσολογικοί παράγοντες κινδύνου. Η βλάβη στα κύτταρα του ME εκκινεί ένα καταρράκτη γεγονότων που οδηγεί στη δημιουργία των υαλοειδικών εναποθέσεων. Η ατροφία των κυττάρων του ME αποτελεί σταθερό παθολογοανατομικό εύρημα σε ασθενείς με HEΩ και κατ’ επέκταση, οι αλλαγές που υφίσταται το ME κατά τη γήρανση και τη πρόοδο της νόσου έχουν μελετηθεί εκτενώς. Οι κυριότερες μεταβολές αφορούν τη μείωση των κοκκίων της μελανίνης, την αύξηση της περιεκτικότητας σε ολικά λιπίδια και ουδέτερα λίπη καθώς και την παρουσία εγκλείστων και κοκκίων λιποφουσκίνης [58], [59]. Τα κύτταρα του ME φαγοκυτταρώνουν τα γηρασμένα άκρα των κωνίων και των ραβδίων και τα αποδομούν λυσοσωμικά. Η διαδικασία αυτή μερικές φορές δεν είναι πλήρης, με αποτέλεσμα με την πάροδο της ηλικίας τη συσσώρευση των μη αποδομημένων τελικών προϊόντων και την εμφάνιση λυσοσωμικών εγκλείστων και λιποφουσκίνης. Τα κοκκία της λιποφουσκίνης συνιστούν άχρηστες κυτταρικές εναποθέσεις αποτελούμενες από αποπίπτοντα κύτταρα του ME και από λυσοφαγοσώματα των μεμβρανών των φωτοϋποδοχέων. Η συσσώρευση προϊόντων του μεταβολισμού των φωτοϋποδοχέων αποτελούν την κύρια πηγή λιποφουσκίνης στο ME, η συγκέντρωση της οποίας οδηγεί στην απελευθέρωση οξειδωτικών προϊόντων με αποτέλεσμα την δυσλειτουργία της μεμβράνης του Bruch [60], [61]. Αν και οι μηχανισμοί και η

βαρύτητα της βλάβης που προκαλείται από τη λιποφουσκίνη δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί, είναι βέβαιο ότι η λιποφουσκίνη αποτελεί βασικό συστατικό ενός ατροφικού και υπολειπουμένου ΜΕ που συνδέεται στενά με την εμφάνιση και την εξέλιξη της ΗΕΩ.

Παρά το γεγονός, ότι οι πιο σημαντικές κλινικές και ιστοπαθολογικές βλάβες της ΗΕΩ εντοπίζονται στο ΜΕ και στη μεμβράνη του Bruch, η απώλεια των φωτοϋποδοχέων αυξανόμενη της ηλικίας, καθώς και στα πλαίσια της ΗΕΩ, είναι καλά τεκμηριωμένη [62], [63]. Ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί η αυξημένη ευαλωτότητα των ραβδίων σε σχέση με τα κωνία κατά τη γήρανση και την ΗΕΩ. Συγκεκριμένα, ο ολικός αριθμός των κωνίων στο κεντρικό βοθρίο παραμένει σε σταθερά επίπεδα σε όλη τη διάρκεια της ενήλικης ζωής εν αντιθέσει με τον αριθμό των ραβδίων στην ωχρά κηλίδα των ιδίων οφθαλμών που μειώνεται έως και 30%, με την πιο μεγάλη απώλεια να καταγράφεται στην παραβοθρική περιοχή. Στα πρώιμα στάδια της ΗΕΩ, ο αριθμός των κωνίων δε μεταβάλλεται στο κεντρικό βοθρίο, ενώ η παραβοθρική περιοχή χαρακτηρίζεται από δυσμορφία των κωνίων και μικρό αριθμό ραβδίων. Στην υγρή μορφή της ΗΕΩ, η εκλεκτική απώλεια των ραβδίων επιδεινώνεται με αποτέλεσμα σχεδόν όλοι οι φωτοϋποδοχείς στην περιοχή της ωχράς να είναι κωνία [62], [63]. Η εξήγηση που προτείνεται εμπλέκει διαταραχές στη διαθεσιμότητα των ρετινοειδών στους φωτοϋποδοχείς και συγκεκριμένα της βιταμίνης Α και του παραγώγου της 11-cis-ρετινάλης. Συνοπτικά, η εκφύλιση των φωτοϋποδοχέων αποτελεί άμεσο επακόλουθο της γήρανσης, λαμβάνει διαστάσεις προτού η ΗΕΩ φτάσει σε προχωρημένο στάδιο στο επίπεδο του ΜΕ και κορυφώνεται στα όψιμα στάδια της νόσου.

1.5.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

Πλήθος μελετών έχουν διερευνήσει το ρόλο του οξειδωτικού στρες στην εκδήλωση και πρόοδο της νόσου. Η περιοχή της ωχράς κηλίδας είναι ιδιαίτερα εκτεθειμένη στις συνέπειες του οξειδωτικού στρες λόγω της υψηλής πίεσης του οξυγόνου, της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και κατά συνέπεια στο φωτοοξειδωτικό στρες, καθώς και του γεγονότος ότι τα χρωμοφόρα που βρίσκονται στον αμφιβληστροειδή και το ΜΕ, όπως η μελανίνη, η λιποφουσκίνη και η ροδοψίνη, δύνανται να προκαλέσουν φωτοχημική βλάβη, ενώ η ίδια η φαγοκυττάρωση των ακραίων τμημάτων των φωτοϋποδοχέων αποτελεί πηγή αντιδραστικών ενδιάμεσων

οξυγόνου (ROI, Reactive Oxygen Intermediates) [46]. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει είτε σε κυτταρικό θάνατο είτε σε λειτουργικές διαταραχές που τελικά καταλήγουν στην ανεπάρκεια του ιστού και κατά επέκταση του οργάνου. Η παθογένεια αυτής της δυσλειτουργίας μπορεί να προκύψει από διάφορες αιτιολογίες μεταξύ των οποίων τη διαταραχή της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και του μεταβολισμού της εξωκυττάριας ουσίας. Η διαταραχή της κυτταρικής μεμβράνης περιλαμβάνει τη διεργασία κατά την οποία ένα κύτταρο απορρίπτει ένα τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταροπλάσματος, προκειμένου να απομακρύνει κατεστραμμένα κυτταρικά οργανίδια δίχως να επέρχεται κυτταρικός θάνατος [64]. Η διαταραχή στην παραγωγή και τη διάσπαση της εξωκυττάριας ουσίας αποτελεί επίσης έναν πιθανό αιτιολογικό παράγοντα στην παθογένεση της νόσου. Η εξωκυττάρια ουσία απαιτεί συνεχή παραγωγή του κολλαγόνου και των συστατικών της με έναν ιδιαίτερο αυστηρό τρόπο, τέτοιο ώστε μια μικρή μεταβολή στην παραπάνω διαδικασία να οδηγεί σε σημαντικές διαταραχές της. Τα παραπάνω έχουν αποδειχτεί από μελέτες *in vitro*, οι οποίες καταδεικνύουν τη διαταραχή της λειτουργίας του ME από το οξειδωτικό στρες και την παθολογική αύξηση της εξωκυττάριας ουσίας από την συσσώρευση κολλαγόνου και τη μεταβολή της δραστηριότητας των μεταλλοπρωτεϊνών, μιας οικογένειας πρωτεολυτικών ενζύμων που προκαλούν αναδιάταξη της εξωκυττάριας ουσίας [65]. Η εξωκυττάρια ουσία είναι σημαντική για την αναδιοργάνωση των αγγείων. Οι αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών ρυθμίζουν την πρωτεολυτική αυτή δραστηριότητα και μια διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ των δύο συστημάτων είναι εμφανής στην εξιδρωματική HEΩ [66]. Το εναρκτήριο γεγονός αποτελεί πιθανόν ο συνδυασμός γενετικών παραγόντων, οξειδωτικού στρες και υποξίας που οδηγούν σε αύξηση των επιπέδων των προαγγειογενετικών μορίων με αποτέλεσμα τη διάσπαση της εξωκυττάριας ουσίας και προκαλώντας της αναδιοργάνωση των αγγείων και της νεοαγγείωσης, υπό των έλεγχο των αγγειογενετικών παραγόντων.

1.5.3 ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

Η φλεγμονή φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των drusen και της HEΩ. Κυτταρικά υπολείμματα του ME εγκλωβίζονται στη βασική στιβάδα αυτού και στη μεμβράνη του Bruch προκαλώντας μια χρόνια φλεγμονώδη απάντηση που μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό των drusen [67]. Η φλεγμονώδης

απάντηση στην οξειδωτική βλάβη αποτελεί επίσης ένα πεδίο σημαντικής έρευνας για την παθογένεια της εξιδρωματικής ΗΕΩ. Είναι γνωστό ότι οι νεοαγγειακές μεμβράνες αποτελούνται από διάφορα κυτταρικά συστατικά συμπεριλαμβανομένων φλεγμονωδών κυττάρων, των οποίων σημαντικό αριθμό αποτελούν τα μακροφάγα [68]. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η εξάλειψη των μακροφάγων σε γενετικά τροποποιημένα πειραματόζωα οδηγεί σε μείωση της έκτασης των νεοαγγειακών βλαβών [69]. Επιπροσθέτως, ασθενείς με ενεργοποιημένα μακροφάγα, γεγονός που διαπιστώθηκε από τα αυξημένα επίπεδα mRNA του TNF α , παρουσίασαν πενταπλάσια επίπτωση νεοαγγείωσης λόγω της νόσου [70]. Επίσης πολλά από τα μακροφάγα στις νεοαγγειακές βλάβες έχει δείχτει ότι συντίθενται από μικρογλοία του μυελού των οστών και όχι από εξειδικευμένα μικρογλοιακά κύτταρα των ιστών. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει το ρόλο των κυτταρικών παραγόντων που προέρχονται από το μυελό των οστών και συμβάλλει στη δημιουργία της νεοαγγείωσης.

1.5.4 ΝΕΟΑΓΓΕΙΩΣΗ

Μια ποικιλία αιτιολογικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων της κληρονομικότητας, της γήρανσης, της οξειδωτικής βλάβης και της απάντησης σε αυτήν προκαλούν μεταβολές στο τοπικό μικροπεριβάλλον του αμφιβληστροειδούς. Ολοένα και περισσότερες μελέτες αποδεικνύουν ότι ο συνδυασμός των παραπάνω μεταβολών, οδηγεί σε νεοαγγείωση που τυπικά λαμβάνει χώρα στον χοριοειδή και εξελίσσεται προς τον αμφιβληστροειδή. Όπως προκύπτει σε όλες τις μορφές νεοαγγείωσης, τα νεοαγγεία δημιουργούνται είτε από προϋπάρχοντα τριχοειδή αγγεία ή δημιουργούνται de novo από κυκλοφορούντα κύτταρα του μυελού των οστών [71]. Η αγγειογένεση αποτελεί ένα από τα πιο εκτεταμένα πεδία έρευνας. Αν και υπάρχουν πολλοί αιτιολογικοί παράγοντες, η αύξηση της έκφρασης των αγγειογενετικών παραγόντων αποτελεί τη σημαντικότερη αιτία και το ME είναι από τους κυριότερους ρυθμιστές της δραστηριότητας αυτής. Πιο συγκεκριμένα, προαγγειογενετικές ουσίες αποτελούν το ερέθισμα για την ενεργοποίηση και τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων των χοριοτριχοειδών. Ο VEGF-A είναι γνωστό ότι αποτελεί έναν παράγοντα κλειδί στην διαδικασία αυτή [72]. Ωστόσο πρόκειται για πολύπλοκες διεργασίες που ρυθμίζονται τόσο από τις προαγγειογενετικές ουσίες όσο και από τις αντι-αγγειογενετικές ουσίες, με κύρια τον παράγοντα PEDGF [73].

Στην θεωρία της αγγειογένεσης, προαγγειογενετικοί παράγοντες μέσω μιας πολύπλοκης διεργασίας ρυθμίζουν την πρωτεόλυση της εξωκυττάριας ουσίας προωθώντας τη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη δημιουργία τριχοειδικών εκμαγείων. Αντίθετα, η αγγειογένεση de novo αναφέρεται στον σχηματισμό αγγείων από κυκλοφορούντα πρόδρομα αγγειογενετικά κύτταρα (vascular progenitor cells) που μεταναστεύουν στην περιοχή όπου θα διαφοροποιηθούν σε ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα και θα λάβει χώρα η νεοαγγείωση. Το ερέθισμα για την προσέλκυση των κυττάρων αυτών αποτελεί το οξειδωτικό στρες, η υποξία ή η υπερέκφραση αγγειογενετικών μορίων [74]. Η κύρια διαφορά μεταξύ των δύο θεωριών είναι ότι στη μία προέχει η κυκλοφορία των πρόδρομων αγγειακών κυττάρων ενώ στην άλλη ο πολλαπλασιασμός των υπαρχόντων ενδοθηλιακών κυττάρων.

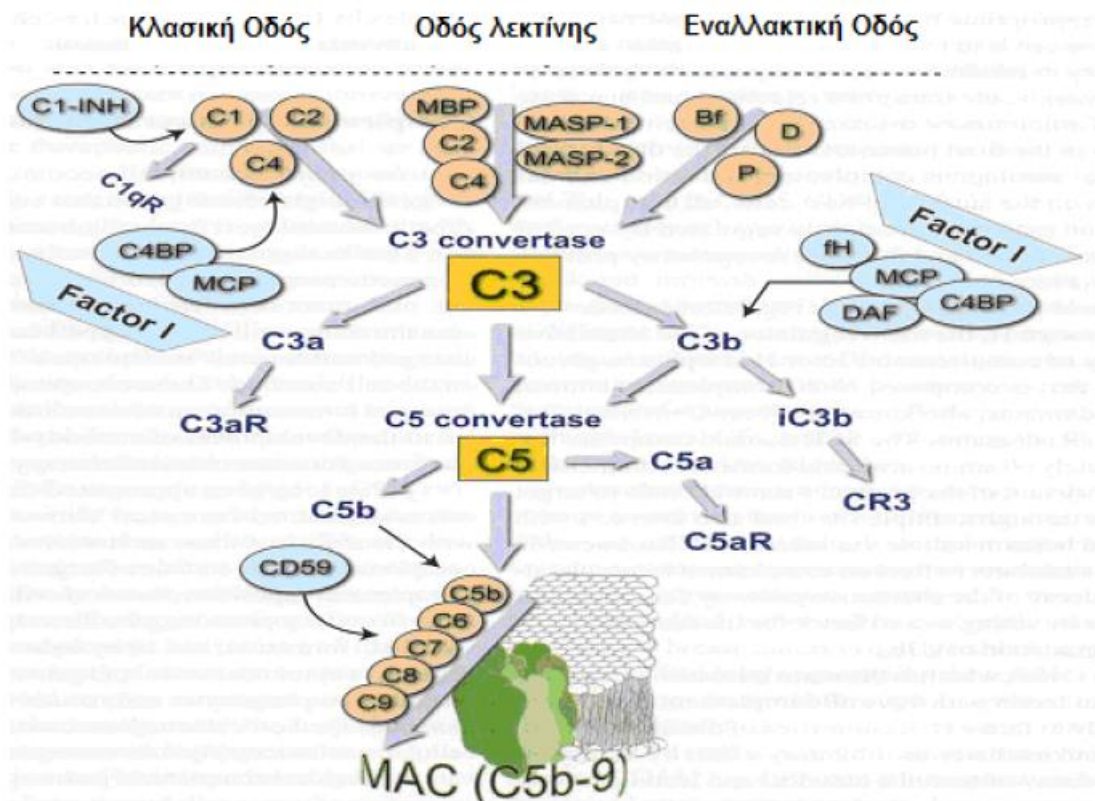
1.5.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΗΕΩ

Το σύστημα του συμπληρώματος αποτελεί έναν από τους βασικότερους μηχανισμούς μη ειδικής άμυνας, ο οποίος εμπλέκεται στην αντιμετώπιση των λοιμωδών παραγόντων. Αποτελείται από 35 περίπου διαλυτές και μεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες παράγονται κυρίως από το ήπαρ. Οι πρωτεΐνες αυτές εκκρίνονται στον ορό του αίματος σε αδρανή μορφή και με τον τρόπο αυτό προστατεύεται ο οργανισμός από την καταστροφή των δικών του κυττάρων. Οι περισσότερες από αυτές είναι πρωτεάσες και αποκτούν ενεργότητα μετά από μερική πρωτεολυτική διάσπαση από άλλες πρωτεάσες.

Το συμπλήρωμα διαθέτει τρεις οδούς ενεργοποίησης που πυροδοτούνται από διαφορετικά αίτια: την κλασσική, η οποία ενεργοποιείται από την πρόσδεση ορισμένων ισοτύπων αντισωμάτων σε αντιγόνα, την εναλλακτική, η οποία ενεργοποιείται από παράγοντες της κυτταρικής επιφάνειας των μικροοργανισμών απουσία αντισωμάτων και τη λεκτινική, η οποία ενεργοποιείται από την πρόσδεση μιας λεκτίνης του πλάσματος σε κατάλοιπα μαννόζης της επιφάνειας των μικροβίων. Και οι τρεις αυτές οδοί ενεργοποιούν τη λυτική οδό, η οποία μέσω του μεμβρανολυτικού συμπλέγματος (MAC: Membrane Attack Complex) οδηγεί στη λύση των παθογόνων μικροοργανισμών.

Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος έχει ως συνέπεια την έκλυση ενός καταρράκτη βιοχημικών αντιδράσεων, όπου ένα κλάσμα της αλυσίδας ενεργοποιεί άλλα κλάσματα. Τα ενεργοποιημένα κλάσματα ασκούν διάφορες δράσεις. Οι πρωταρχικές βιολογικές δράσεις του συμπληρώματος είναι η προώθηση της φαγοκυττάρωσης των μικροβίων, των κυτταρικών υπολειμμάτων και των ανοσοσυμπλόκων, η διέγερση της αντίδρασης φλεγμονής και η επαγωγή της λύσης των μικροβιακών κυττάρων. Επιπλέον, ορισμένα προϊόντα της πρωτεόλυσης των συστατικών του ενζυμικού καταρράκτη οδηγούν στην ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων. Η ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες για τον οργανισμό. Για το λόγο αυτό, στον ορό του αίματος και στη μεμβράνη των κυττάρων του οργανισμού υπάρχουν ουσίες πρωτεϊνικής φύσης, που αναστέλλουν την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, παίζοντας το ρόλο ρυθμιστή (mCRPs, membrane Complement Regulator Proteins).

Σε αυτές περιλαμβάνονται ο αναστολέας του C1 (C1-INH), η συνδέουσα το C4 πρωτεΐνη (C4BP, C4 Binding Protein), ο υποδοχέας 1 του συμπληρώματος (CR-1 ή CD35), ο παράγοντας H (CFH, Complement Factor H), ο παράγοντας I (CFI, Complement Factor I), ο επιταχυντικός παράγων αποδομήσεως (DAF ή CD55, Decay Accelerating Factor), η προτεκτίνη (CD59) και η πρωτεΐνη συνυποδοχέας μεμβράνης (MCP ή CD46, Membrane Cofactor Protein) [75]. Η ρύθμιση του συμπληρώματος περιλαμβάνει την αναστολή ή αποσταθεροποίηση των ενεργών συμπλόκων ή την κινητοποίηση των διαδικασιών πρωτεολυτικής διάσπασης των ενεργοποιημένων συστατικών. Τα κύρια σημεία ρύθμισης είναι η έναρξη της ενεργοποίησης, ο σχηματισμός των κονβερτασών C3 και C5 και ο σχηματισμός του τελικού λυτικού συμπλόκου (Εικόνα 1.24).



Εικόνα 1.24. Το σύστημα του συμπληρώματος ενεργοποιείται από τρεις οδούς με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία του μεμβρανολυτικού συμπλέγματος. Στην εικόνα απεικονίζεται επίσης η δράση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών [75]

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας ολοένα και περισσότερες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχουν αποδείξει την εμπλοκή του συστήματος του συμπληρώματος στην παθογένεια της ΗΕΩ. Στον φυσιολογικό αμφιβληστροειδή το συμπλήρωμα είναι παρόν κι εμφανίζει χαμηλή ενεργότητα, προστατεύοντας έναντι παθογόνων αλλά και καταστέλλοντας την Τ-κυτταρική απόκριση. Η γενική υπόθεση εμπλοκής του συμπληρώματος στην παθογένεια της ΗΕΩ είναι ότι η διαδικασία καταστροφής του ΜΕ λόγω της φυσιολογικής γήρανσης και του οξειδωτικού στρες επιταχύνεται από την ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος. Επιπλέον, τα drusen αφού δημιουργηθούν συνεισφέρουν περαιτέρω στην ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού του συστήματος. Η τοπική αύξηση των ενεργοποιημένων συστατικών του συμπληρώματος C3b, C3a/C5a C5b-C9 επιτείνει την ιστική βλάβη προωθώντας την φλεγμονή και την εκφύλιση του ΜΕ [23].

Επιπλέον γενετικές μελέτες αποκάλυψαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της ΗΕΩ και πολυμορφισμών αρκετών γονιδίων που σχετίζονται με το

σύστημα του συμπληρώματος [76]. Συνεπώς, οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί σε γονίδια των συστατικών του συμπληρώματος και των ρυθμιστικών πρωτεϊνών επηρεάζουν την επιδεκτικότητα στην ΗΕΩ εξηγώντας τον ρόλο της φλεγμονής και της γενετικής προδιάθεσης στην παθογένεια της ασθένειας. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες HLA (Human Leukocyte Antigen), CFB (Complement Factor B), C2 (Complement Component 2) και CFH (Complement Factor H) παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον και είναι συνακόλουθα με αυτήν την υπόθεση [77], [78], [79], [80], [81].

1.5.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΝΟΣΟ

A. ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΟΙ ΚΑΙ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

- Ηλικία

Ο πιο καλά τεκμηριωμένος από πληθώρα επιδημιολογικών μελετών ανά τον κόσμο και μη αναστρέψιμος παράγοντας κινδύνου για την ΗΕΩ είναι η ηλικία [14], [16], [82], [83], [84]. Η αύξηση στην ηλικία σχετίζεται με κατακόρυφη αύξηση στα περιστατικά, τη συχνότητα και την εξέλιξη της ΗΕΩ. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι η ΗΕΩ εμφανίζεται συνήθως μετά την ηλικία των 50 ετών και τείνει να οξύνεται μετά την ηλικία των 65 ετών. Για το πρώιμο στάδιο της νόσου έχει αναφερθεί αύξηση στη συχνότητα από 8% σε άτομα ηλικίας 43-54 σε 30% σε άτομα ηλικίας άνω των 75 ετών. Παρομοίως, η συχνότητα της προχωρημένης ΗΕΩ αυξάνεται από 0,1% στα άτομα ηλικίας 43-54 σε 7,1% στα άτομα ηλικίας άνω των 75 ετών.

- Φύλο

Όσον αφορά το φύλο, οι γυναίκες φαίνεται να είναι ελαφρώς πιο επιρρεπείς στη νόσο [85]. Ωστόσο, το μεγαλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης στις γυναίκες θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη. Εξαιτίας του γεγονότος, ότι οι γυναίκες ζουν κατά μέσο όρο περισσότερα έτη από τους άνδρες, με αποτέλεσμα να διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για εκδήλωση ΗΕΩ, η επίδραση του συγχυτικού παράγοντα της ηλικίας στον παράγοντα φύλο δε μπορεί να αποκλειστεί [86] και απαιτούνται περισσότερες έρευνες για επιβεβαίωση.

- Φυλή

Αναφορικά με τη φυλή, είναι δύσκολο να μελετηθεί ως ανεξάρτητος παράγοντας καθώς περιλαμβάνει πληθώρα γενετικών, πολιτισμικών και περιβαλλοντικών διαφορών που μπορούν να δράσουν ως συγχυτικοί παράγοντες στη μεμονωμένη μελέτη της. Παρά το γεγονός αυτό, πλήθος επιδημιολογικών μελετών έχουν δείξει ότι η συχνότητα της ΗΕΩ ποικίλει σημαντικά στις διάφορες περιοχές και πληθυσμιακές ομάδες ανά τον κόσμο. Έχει παρατηρηθεί ότι η συχνότητα της πρώιμης ΗΕΩ στη μαύρη φυλή είναι γενικά συγκρίσιμη με αυτή στη λευκή φυλή ενώ η υγρού τύπου ΗΕΩ και τα προχωρημένα στάδια της νόσου είναι λιγότερο συχνά στη μαύρη φυλή [42]. Συγχρόνως, σύμφωνα με στατιστικά δεδομένα η ΗΕΩ αποτελεί την πρώτη αιτία τύφλωσης μόνο στη λευκή φυλή [86]. Μια πιθανή εξήγηση για αυτή τη διαφοροποίηση είναι τα υψηλά επίπεδα μελανίνης, που εμφανίζει η μαύρη φυλή στον χοριοειδή χιτώνα και φαίνεται να δρουν προστατευτικά στα επιθηλιακά κύτταρα του ΜΕ, στους φωτοϋποδοχείς και στη μεμβράνη του Bruch. Η προστατευτική δράση οφείλεται στην ιδιότητα της μελανίνης να απορροφά τις ακτίνες του φωτός, αποτρέποντας έτσι την οξειδωση [87] καθώς και τη συσσώρευση λιποφουσκίνης στο ΜΕ. Χαμηλότερη συχνότητα της προχωρημένης ΗΕΩ διαπιστώνεται και στους ασιατικούς πληθυσμούς, όπως και στα άτομα ισπανικής καταγωγής σε σχέση με τη λευκή φυλή, η οποία όμως είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με τη μαύρη φυλή [19].

- Κοινωνική τάξη

Πολυάριθμες έρευνες έχουν μελετήσει την κοινωνική τάξη και σε αυτήν έχουν συμπεριληφθεί το μορφωτικό επίπεδο, το εισόδημα, το επάγγελμα και οι συνήθειες. Τα συμπεράσματα που έχουν προκύψει είναι συγκεκριμένα, καθώς έχει παρατηρηθεί μικρή ή καμία συσχέτιση με τη νόσο [86], [88], μειωμένος κίνδυνος εμφάνισης της νόσου σε άτομα υψηλότερης κοινωνικής τάξης [13], [86], [89] και μειωμένος κίνδυνος εξέλιξης της νόσου σε γεωγραφική ατροφία με αύξηση των ετών σπουδών [90].

B. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

- Κάπνισμα

Πλήθος διαφορετικών ερευνών έχουν δείξει ότι το κάπνισμα αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους παράγοντες κινδύνου τόσο για την εμφάνιση της ΗΕΩ όσο και για την εξέλιξή της [90], [91]. Οι καπνιστές πέρα από τον αυξημένο κίνδυνο

εμφάνισης ΗΕΩ, εμφανίζουν σε σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα ΗΕΩ υγρού τύπου σε σχέση με τους μη καπνιστές [90], ενώ έχουν συσχετιστεί θετικά με την εμφάνιση προχωρημένης ΗΕΩ ξηρού τύπου καθώς και με αυξημένο κίνδυνο αμφοτερόπλευρης εμφάνισης της νόσου [92], [93]. Η σχέση αυτή φαίνεται να είναι δόσοεξαρτώμενη και ο κίνδυνος παραμένει ακόμα και 15-20 έτη μετά τη διακοπή του καπνίσματος καθώς οι πρώην καπνιστές έχουν επίσης αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΗΕΩ υγρού τύπου [94]. Το κάπνισμα φαίνεται να επηρεάζει τις χρωστικές της ωχράς κηλίδας αυξάνοντας το οξειδωτικό στρες, ενώ συγχρόνως εμποδίζει τη μικροκυκλοφορία στον χοριοειδή χιτώνα επηρεάζοντας μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παθογένεια της ωχράς κηλίδας. Υπάρχουν δύο πιθανοί παθογενετικοί μηχανισμοί με τους οποίους το κάπνισμα μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη της νόσου και περιλαμβάνουν: α) μείωση της HDL και αύξηση της συγκολλητικότητας των αιμοπεταλίων και του ινωδογόνου με αποτέλεσμα την αύξηση του οξειδωτικού στρες και της οξείδωσης των λιπιδίων και β) μείωση των αντιοξειδωτικών παραγόντων στο πλάσμα του αίματος [95].

- Καρδιαγγειακά νοσήματα

Πολυάριθμες έρευνες έχουν συσχετίσει την ΗΕΩ με τις κλινικές εκδηλώσεις των καρδιαγγειακών νοσημάτων [96]. Ασθενείς που εμφάνιζαν αθηρωματικές βλάβες και καρωτιδική στένωση είχαν 4.5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης προχωρημένης ΗΕΩ. Επιπροσθέτως, ασθενείς που εμφάνιζαν αθηρωματικές πλάκες στον αμφιβληστροειδή και χοριοειδή χιτώνα είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης ΗΕΩ σε σχέση με το γενικό πληθυσμό, όπως και επιζήσαντες από καρδιαγγειακό επεισόδιο, οι οποίοι φαίνεται επίσης να εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο για την ανάπτυξη της νόσου.

- Δείκτης Μάζας Σώματος

Ο υψηλός Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) εκτός από παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση ΗΕΩ, φαίνεται να επηρεάζει και την εξέλιξη της νόσου, με τους ασθενείς που βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο ΗΕΩ και έχουν υψηλό ΔΜΣ να εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο εξέλιξης της νόσου, σε σχέση με τους ασθενείς φυσιολογικού βάρους [97]. Ο υψηλός ΔΜΣ έχει επίσης συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης υγρής μορφής ΗΕΩ [90]. Η παχυσαρκία και η μειωμένη φυσική δραστηριότητα φαίνεται να συσχετίζονται θετικά με την εξέλιξη της νόσου και συγκεκριμένα με την εμφάνιση ΗΕΩ υγρού τύπου, ενώ δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση γεωγραφικής ατροφίας σε όλες τις έρευνες

[90], [98]. Η φυσική δραστηριότητα με συχνότητα τρεις φορές ανά εβδομάδα μειώνει τον κίνδυνο εξέλιξης της ΗΕΩ κατά 25% συγκριτικά με την έλλειψη φυσικής δραστηριότητας [97].

- Διατροφικές Συνήθειες

Ορισμένες διατροφικές συνήθειες μπορεί να αποτελέσουν ισχυρούς παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της ΗΕΩ. Το ενδιαφέρον στις πιθανές διαιτητικές συσχετίσεις της ΗΕΩ είναι αυξημένο μιας και αποτελεί ένα δυνητικά αναστρέψιμο παράγοντα κινδύνου. Η αυξημένη κατανάλωση τροφών πλούσιων σε λιπαρά οξέα φαίνεται να έχει θετική επίδραση τόσο στην εμφάνιση όσο και στην εξέλιξη της νόσου [92]. Το διαιτητικό λίπος, συσχετίζεται με την ΗΕΩ, ανεξάρτητα από το σωματικό βάρος και την παχυσαρκία, και μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο ανάπτυξης ΗΕΩ με δύο μηχανισμούς [93], [99], [100], [101]. Καταρχάς, υψηλή ποσότητα προσλαμβανόμενου λίπους αυξάνει τα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα, ενισχύει το οξειδωτικό στρες και οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης αθηρωματικής νόσου, η οποία επηρεάζει αρνητικά την κυκλοφορία στον χοριοειδή χιτώνα [102]. Εναλλακτικά, η κατανάλωση λίπους πιθανώς να αυξάνει την εναπόθεση του στην μεμβράνη του Bruch, εμποδίζοντας την θρέψη του χιτώνα και την απομάκρυνση των άχρηστων ουσιών από το ΜΕ [86]. Έρευνες υποστηρίζουν πως ορισμένα μόνο είδη λιπαρών οξέων και όχι η συνολική διαιτητική πρόσληψη λίπους συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ΗΕΩ. Συγκεκριμένα, υψηλή κατανάλωση φυτικού λίπους, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων καθώς και λινολεϊκού οξέος συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΗΕΩ και εξέλιξής της σε υγρή μορφή [103], [104]. Υψηλή κατανάλωση κορεσμένου λίπους φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης πρώιμων σταδίων ΗΕΩ, ενώ η κατανάλωση trans ακόρεστων λιπαρών οξέων πέρα από την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου αυξάνει και τις πιθανότητες εξέλιξής της σε προχωρημένο στάδιο [102]. Αντίθετα, διατροφή πλούσια σε ψάρια, έχει συσχετιστεί με ελάττωση του κινδύνου για προχωρημένη νόσο, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε ω-3 λιπαρά οξέα [103], [104], [105]. Η διαιτητική χοληστερόλη φαίνεται, επίσης να συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προχωρημένου σταδίου ΗΕΩ [105].

Η κατανάλωση δίαιτας υψηλού γλυκαιμικού δείκτη φαίνεται να συσχετίζεται θετικά με την εμφάνιση ΗΕΩ. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι δίαιτες που βασίζονται σε τρόφιμα υψηλού γλυκαιμικού δείκτη δεν είναι πλούσιες σε φρούτα και λαχανικά που περιέχουν τις απαραίτητες για την υγεία του αμφιβληστροειδούς αντιοξειδωτικές ουσίες. Αντιθέτως, η τήρηση δίαιτας χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη

φαίνεται να σχετίζεται με συνειδητοποιημένες διατροφικές επιλογές, όπως η κατανάλωση ψαριών, φρούτων και λαχανικών και η αποφυγή του λίπους. Με αυτό τον τρόπο διακρίνεται μια έμμεση προστατευτική δράση από την εμφάνιση ΗΕΩ [100].

- Κατανάλωση αλκοόλ

Η συσχέτιση αλκοόλ με τη νόσο έχει οδηγήσει σε αντικρουόμενα αποτελέσματα, με κάποιες έρευνες να εκφράζουν θετική [106], άλλες αρνητική [107] και άλλες μη στατιστικά σημαντική συσχέτιση [108]. Οι περισσότερες έρευνες δείχνουν ότι υπάρχει μια μη γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στην πρόσληψη αλκοόλ και τον κίνδυνο ανάπτυξης ΗΕΩ. Ειδικότερα, η μικρή κατανάλωση αλκοόλ (1 ή 2 ποτά ανά ημέρα) οδηγεί σε μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης ΗΕΩ (προστατευτική δράση) ενώ η μεγάλη κατανάλωση (5 ή περισσότερα ποτά ανά ημέρα) οδηγεί σε μεγαλύτερο κίνδυνο (επιβαρυντική δράση) συγκριτικά με την πλήρη αποχή από το αλκοόλ [109].

- Αρτηριακή υπέρταση

Η ανεύρεση συσχέτισης μεταξύ αρτηριακής υπέρτασης και ΗΕΩ έχει απασχολήσει αρκετούς ερευνητές. Φαίνεται ότι υπάρχει μικρή συσχέτιση μεταξύ ΗΕΩ και κλινικής υπέρτασης [110]. Ασθενείς με ΗΕΩ εμφάνιζαν υψηλότερη τιμή διαστολικής αρτηριακής πίεσης σε σχέση με το γενικό πληθυσμό, ενώ βρέθηκε επίσης συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης συστολικής αρτηριακής πίεσης με την ΗΕΩ [111]. Ωστόσο, σε πολλές έρευνες τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά, με αποτέλεσμα η υψηλή αρτηριακή πίεση να μην φαίνεται να έχει άμεση ισχυρή επίδραση στην ανάπτυξη ΗΕΩ, παρά τις ενδείξεις, ότι οι υπερτασικοί ασθενείς έχουν περισσότερες πιθανότητες να αναπτύξουν ΗΕΩ, σε σχέση με τους μη υπερτασικούς.

- Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 φαίνεται να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση ΗΕΩ υγρού τύπου σε ασθενείς που βρίσκονται σε αρκετά προχωρημένο στάδιο της νόσου [90]. Η εκφύλιση των αγγείων του αμφιβληστροειδούς είναι συχνή επιπλοκή του σακχαρώδους διαβήτη. Αυξημένα επίπεδα γλυκόζης του αίματος φαίνεται να συσχετίζονται θετικά με την εμφάνιση ΗΕΩ, ακόμα και σε μη διαβητικούς ασθενείς [92], [102].

- Φαρμακευτική αγωγή

Σχετικά με τη λήψη φαρμακευτικής αγωγής, υπάρχουν διάφορες κατηγορίες φαρμάκων που έχουν συσχετιστεί με τη νόσο. Έρευνες έχουν δείξει, ότι ασθενείς σε προχωρημένο στάδιο ΗΕΩ, οι οποίοι λάμβαναν αντιφλεγμονώδη φάρμακα, διέτρεχαν μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης γεωγραφικής ατροφίας σε σχέση με ασθενείς του ίδιου σταδίου, οι οποίοι δε λάμβαναν αντιφλεγμονώδη αγωγή [90]. Ακόμα, υπάρχουν μελέτες σχετικά με την επίδραση της ασπιρίνης στην εμφάνιση της νόσου με αντιφατικά αποτελέσματα. Κάποιες από αυτές έχουν συσχετίσει τη συστηματική λήψη ασπιρίνης με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΗΕΩ [112], [113], [114], [115], άλλες υποστηρίζουν ότι η λήψη ασπιρίνης έχει προστατευτική δράση [116], [117], ενώ από κάποιες άλλες μελέτες δεν προκύπτει καμία σημαντική επίδραση [118], [119], [120]. Επιπροσθέτως, έχει παρατηρηθεί θετική συσχέτιση μεταξύ της χρήσης αγγειοδιασταλτικών φαρμάκων, κυρίως νιτρογλυκερίνης, με την εμφάνιση ΗΕΩ, καθώς και μεταξύ της λήψης β-αναστολέων και της εμφάνισης ΗΕΩ υγρού τύπου, χωρίς όμως να υπάρχουν σαφή ευρήματα [86], [110]. Τέλος, αν και αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει τη σχέση μεταξύ υπολιπιδαιμικής φαρμακευτικής αγωγής και συγκεκριμένα στατινών και ΗΕΩ τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Ειδικότερα, ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η λήψη στατινών για διάστημα μεγαλύτερο του ενός έτους συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΗΕΩ υγρού τύπου [121], ενώ άλλοι υποστηρίζουν ότι υπάρχει μειωμένος κίνδυνος χοριοειδικής νεοαγγείωσης σε ασθενείς με ΗΕΩ που λαμβάνουν φάρμακα για χοληστερίνη όπως στατίνες [117], [122], [123].

- Ορμονικοί παράγοντες

Υπάρχουν ενδείξεις προστατευτικής δράσης των οιστρογόνων στην εμφάνιση ΗΕΩ, η οποία όμως χρήζει περαιτέρω διερεύνησης [124]. Πιο συγκεκριμένα, οι γυναίκες που εμφανίζουν εμμηνόπαυση σε μικρή ηλικία φαίνεται να διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης ΗΕΩ, συγκριτικά με αυτές που εμφανίζουν διακοπή έμμηνου ρύσεως σε μεγαλύτερη ηλικία. Επίσης, γυναίκες που δεν βρίσκονται σε θεραπεία αποκατάστασης οιστρογόνων έχουν αυξημένο κίνδυνο ΗΕΩ και εξέλιξής της σε γεωγραφική ατροφία σε σχέση με αυτές που βρίσκονται υπό την αντίστοιχη αγωγή [90].

- Έκθεση στο ηλιακό φως

Το οξειδωτικό στρες αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ΗΕΩ. Η έκθεση στο ηλιακό φως αυξάνει το οξειδωτικό

στρες στην περιοχή του αμφιβληστροειδούς με αποτέλεσμα οι φωτούποδοχείς να εκτίθενται σε φως και οξυγόνο, τα οποία δημιουργούν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που αντιδρούν με τα λιπαρά οξέα στις κυτταρικές μεμβράνες, καταστρέφοντας τη δομή και τη λειτουργία τους [87], [89]. Η έκθεση στο ηλιακό φως μπορεί να προκαλέσει σοβαρές βλάβες στα κύτταρα του ΜΕ και να καταστρέψει τον αμφιβληστροειδή χιτώνα. Το ορατό φως είναι αυτό που ενοχοποιείται σε μεγαλύτερο βαθμό για την εμπλοκή του στην ΗΕΩ, σε σχέση με το υπεριώδες. Ωστόσο, είναι αρκετά δύσκολο να μετρηθεί η εφ' όρου ζωής έκθεση στο φως ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη ΗΕΩ.

- Άλλοι παράγοντες

Παράγοντες όπως η προηγηθείσα χειρουργική επέμβαση καταρράκτη και το κυανό χρώμα ίριδας έχουν προταθεί αλλά η επίδρασή τους παραμένει λιγότερο βέβαιη. Το ιστορικό χειρουργείου καταρράκτη σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη προχωρημένης ΗΕΩ, πιθανώς λόγω των φλεγμονωδών αλλαγών και την έλλειψη προστασίας από την υπεριώδη ακτινοβολία λόγω της έλλειψης του καταρρακτικού φακού [125]. Αναφορικά με το χρώμα της ίριδας, ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι οι σκουρόχρωμες ίριδες είναι πιο προστατευτικές σε σχέση με τις ανοιχτόχρωμες, αφού η οφθαλμική μελανίνη φαίνεται να δρα προστατευτικά έναντι της συσσώρευσης λιποφουσκίνης στο ΜΕ και της οξειδωτικής βλάβης που μπορεί να προκαλέσει η ηλιακή ακτινοβολία [126], [127].

Γ. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

- Κληρονομικότητα

Το οικογενειακό ιστορικό είναι σημαντικό αφού υπάρχει αυξημένος κίνδυνος για εμφάνιση της νόσου σε ασθενείς με θετικό οικογενειακό ιστορικό. Ο κίνδυνος για ΗΕΩ είναι μέχρι και 3 φορές μεγαλύτερος για συγγενείς πρώτου βαθμού. Πολυμορφισμοί πολλών γονιδίων έχουν προταθεί ως παράγοντες κινδύνου ή προφύλαξης για την ΗΕΩ, όπως το γονίδιο CFH του παράγοντα συμπληρώματος Η, που βοηθά στην προστασία των κυττάρων έναντι βλαβών διαμεσολαβούμενων από το συμπλήρωμα, καθώς και το γονίδιο ARMS2 στο χρωμόσωμα 10. Γονίδια που σχετίζονται με το μεταβολισμό των λιπιδίων θεωρούνται επίσης σημαντικά.

1.6. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΗΕΩ

Πολυάριθμες έρευνες έχουν δείξει τη συσχέτιση της ΗΕΩ με γενετικούς παράγοντες. Η γενετική βάση για την ΗΕΩ περιγράφηκε για πρώτη φορά 40 χρόνια πριν, όταν παρατηρήθηκε ένας ξεκάθαρα υψηλός βαθμός συμφωνίας στους μονοζυγωτικούς διδύμους σε σχέση με τους διζυγωματικούς [128]. Από τότε έγιναν πολλές μελέτες, τόσο με διδύμους [129], [130], όσο και σε οικογένειες [131], [132], στις οποίες έγινε σύγκριση της συχνότητας εμφάνισης της ΗΕΩ σε συγγενείς πασχόντων σε σχέση με τους συγγενείς ατόμων ελέγχου. Τα αποτελέσματα όλων αυτών των ερευνών έδειξαν ξεκάθαρα ότι υπάρχει γενετική συνιστώσα για την ΗΕΩ κι ανέδειξαν τη συνεισφορά του γενετικού υποβάθρου στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Μετέπειτα μελέτες έδειξαν ότι περίπου το 20% των ασθενών με ΗΕΩ έχουν θετικό οικογενειακό ιστορικό.

Την τελευταία δεκαετία έρευνες που έχουν γίνει, έχουν βοηθήσει στην εύρεση υποψηφίων γονιδίων που σχετίζονται με την ασθένεια και προσδίδουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της [133], με κύρια το γονίδιο CFH [78], [79], [80], [134] και το γονίδιο LOC387715 ή ARMS2 [135], [136], [137]. Γενετικοί πολυμορφισμοί αυτών των γονιδίων, δηλαδή διαφορετικές παραλλαγές τους στον πληθυσμό σε ποσοστό μεγαλύτερο από 1% λόγω της ύπαρξης σημειακών μεταλλάξεων (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) σε μία ή περισσότερες θέσεις των γονιδίων, έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΗΕΩ, αφού απαντώνται σε μεγαλύτερο ποσοστό στους ασθενείς. Επιπλέον, έχουν διερευνηθεί πολυμορφισμοί γονιδίων που φαίνεται να έχουν προστατευτική δράση και μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ΗΕΩ, αφού απαντώνται σε μικρότερο ποσοστό στους ασθενείς σε σχέση με το γενικό πληθυσμό, όπως τα γονίδια C2 (Complement Factor 2) και CFB (Complement Factor B). Η ανάλυση των SNPs αποτελεί ελκυστικό εργαλείο στην εξερεύνηση της γενετικής συνιστώσας σύνθετων ασθενειών όπως η ΗΕΩ, γιατί οι πολυμορφισμοί αυτοί μπορούν εύκολα να βρεθούν και να χαρακτηριστούν, βρίσκονται σε αφθονία, και είναι σε μεγάλο βαθμό σταθεροί [138].

Συνολικά, τα δεδομένα προτείνουν ότι οι πολυμορφισμοί στα γονίδια CFH, CFB και C2, τα οποία κωδικοποιούν παράγοντες του συμπληρώματος, μπορεί να εξηγούν περίπου το 75% των περιπτώσεων ΗΕΩ [19]. Εκτός από αυτά, ένας μεγάλος αριθμός άλλων υποψηφίων γονιδίων έχει μελετηθεί για πιθανή εμπλοκή τους στην ΗΕΩ, με βάση το ρόλο τους σε σηματοδοτικά και βιοχημικά μονοπάτια και

τη συμμετοχή τους σε φλεγμονώδεις ή ανοσολογικές διεργασίες. Τα γονίδια για τα οποία έχει βρεθεί στατιστικά σημαντική συσχέτιση συνοψίζονται στον πίνακα 1.1.

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΘΕΣΗ	ΠΛΗΡΗΣ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
ABCR	1p22.1-21	ATP-binding cassette, subfamily A, member 4	Μεταφέρει συμπλέγματα all-trans ρετινάλης φωσφατιδυλαιθανολαμίνης διαμέσου της μεμβράνης των δίσκων
CFH	1q32	Complement Factor H	Παράγοντας του συμπληρώματος
CX3CR1	3p21	Chemokine CX3C motif receptor 1	Υποδοχέας χημειοκινών, συμμετέχει στη χημειοταξία μακροφάγων και μικρογλοίας
TLR3	4q35	Toll like receptor 3	Υποδοχέας τύπου Toll-Αναγνώριση παθογόνων και ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας
CFI	4q25	Complement Factor I	Παράγοντας του συμπληρώματος
BF	6p21.3	Factor B	Παράγοντας της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος
C2	6p21.3	Complement factor 2	Κλάσμα της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος
VEGF	6p12	Vascular Endothelial Growth Factor	Αυξητικός παράγων του αγγειακού ενδοθηλίου-προάγει τη νεοαγγειογένεση
TLR4	9q32-q33	Toll like Receptor 4	Υποδοχέας τύπου Toll-Αναγνώριση παθογόνων και ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας

ARMS2	10q26	Age Related Macular Susceptibility 2	Άγνωστη λειτουργία, εντόπιση στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου
HTRA1	10q26	High-temperature requirement factor A1	Πρωτεάση σερίνης που ενεργοποιείται από το κυτταρικό στρες
ERCC6	10q11.23	Excision-repair cross-complementing group 6	Πρωτεΐνη επιδιόρθωσης DNA
SERPING1	11q11-q13.1	Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	Αναστολέας του C1 κλάσματος του συμπληρώματος
C3	19p13.3-p13.2	Complement factor 3	Κλάσμα του συμπληρώματος
APOE	19q13	Apolipoprotein E	Λιποπρωτεΐνη με σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της χοληστερόλης

Πίνακας 1.1. Γονίδια που συσχετίζονται με την εμφάνιση ΗΕΩ

Είναι φανερό ότι μεταξύ των γονιδίων που εμπλέκονται με την εμφάνιση της νόσου, υπάρχουν αρκετά που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του εξωκυττάρου στρώματος καθώς και πρωτεΐνες που σχετίζονται με το μεταβολισμό των λιπιδίων. Το γεγονός αυτό εξηγείται, καθώς η συσσώρευση των λιπιδίων είναι ένα από τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά στην παθολογοανατομική εικόνα της νόσου, ενώ η διαταραχή της δομής του εξωκυττάρου στρώματος συνιστά προαπαιτούμενο για την επέκταση της νεοαγγείωσης από τον χοριοειδή χιτώνα στο ΜΕ και τον αμφιβληστροειδή [133].

1.6.1 ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΣΥΣΧΕΤΙΣΤΕΙ ΜΕ ΤΗΝ ΗΕΩ

- **Γονίδιο CFH (Complement Factor H)**

Η πρώτη σημαντική επιτυχία στην προσπάθεια σύνδεσης γονιδίων με την ΗΕΩ ήταν η ανακάλυψη ενός SNP στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον παράγοντα του συμπληρώματος Η (CFH), το οποίο ανήκει στην οικογένεια γονιδίων RCA (Regulators of Complement Activation), αποτελείται από 23 εξώνια κι εδράζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 1 στον γενετικό τόπο 1q31.3 [139], [140], [141], [142]. Ο CFH είναι μια διαλυτή γλυκοπρωτεΐνη 155kDa και αποτελείται από 20 επαναλαμβανόμενες μονάδες 60 αμινοξέων που καλούνται short consensus repeats (SCRs) διατεταγμένες κατά τρόπο συνεχή. Οι SCRs έχουν μια χαρακτηριστική δομή αποτελούμενη από καλά διατηρημένα αμινοξέα και ανευρίσκονται και σε άλλους παράγοντες του συμπληρώματος. Ο CFH βρίσκεται σε σχετική αφθονία στο πλάσμα του αίματος και είναι η κύρια ρυθμιστική πρωτεΐνη της εναλλακτικής οδού του συστήματος του συμπληρώματος. Ο CFH λειτουργεί ως αναστολέας του συμπληρώματος τόσο στην υγρή φάση (πλάσμα), όσο και πάνω στις κυτταρικές επιφάνειες, προστατεύοντας τα υγιή κύτταρα του ξενιστή.

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι ένας κοινός πολυμορφισμός και συγκεκριμένα μια μετάπτωση από T σε C στη νουκλεοτιδική θέση 1277 (εξώνιο 9) του γονιδίου του CFH (T1277C), η οποία οδηγεί στη μη συνώνυμη αντικατάσταση του αμινοξέος τυροσίνη από ιστιδίνη στη θέση 402 του πολυπεπτιδίου (rs1061170 [Y402H]), συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση ΗΕΩ [143], [144], [145]. Η αλλαγή αυτής της ιστιδίνης στον CFH προκαλεί την ελάττωση της δράσης του, ενώ παράλληλα αυξάνεται η δράση του συμπληρώματος με αποτέλεσμα την καταστροφή των αγγείων. Από τις έρευνες αυτές προκύπτει επίσης ότι η κληρονομηση του αλληλομόρφου C, το οποίο αποτελεί το υψηλού κινδύνου αλληλόμορφο που συνδέεται με την ασθένεια, συνεισφέρει στην εκδήλωση του 50-57,3% όλων των περιπτώσεων. Σύμφωνα με ερευνητικά δεδομένα, οι ετεροζυγώτες για τον πολυμορφισμό αυτόν (γονότυπος TC) έχουν 4.6 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να εκδηλώσουν ΗΕΩ και οι ομοζυγώτες (γονότυπος CC) 7.4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης ΗΕΩ σε σύγκριση με αυτούς που δε φέρουν το συγκεκριμένο πολυμορφισμό (γονότυπος TT) [80]. Ο κίνδυνος αυτός αυξάνεται σημαντικά όταν υπάρχουν και άλλοι παράγοντες προδιάθεσης όπως η παχυσαρκία και το κάπνισμα.

Η παρουσία της μετάλλαξης στη θέση 402 έχει και θεραπευτικές προεκτάσεις. Συγκεκριμένα, οι ομοζυγώτες ασθενείς για τον πολυμορφισμό αυτόν φαίνεται να ανταποκρίνονται ασθενέστερα σε εφαρμοζόμενες θεραπείες όπως στη χορήγηση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων καθώς και στη χρήση αντι-VEGF παραγόντων για τη θεραπεία της εξιδρωματικής μορφής της νόσου. Ο πολυμορφισμός Y402H στο γονίδιο του CFH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόγνωση, πρόληψη και θεραπεία της HEΩ. Η παρατηρούμενη ενεργοποίηση του συμπληρώματος στα πλαίσια της HEΩ, η έκφραση του CFH από τα κύτταρα του ME και τους φωτοϋποδοχείς, η παρουσία του στα drusen και στη μεμβράνη του Bruch καθώς και οι μορφολογικές μελέτες της επίδρασης της μετάλλαξης στη θέση 402 στη δομή της πρωτεΐνης, θέτουν τις βάσεις για τη διερεύνηση μιας αιτιολογικής βάσης μεταξύ του πολυμορφισμού και της νόσου.

- **Γονίδιο LOC387715 ή ARMS2**

Η συσχέτιση του γονιδίου LOC387715 ή ARMS2 με την HEΩ, ιδιαίτερα με τα προχωρημένα στάδια της νόσου, έχει αποδειχτεί από έναν μεγάλο αριθμό ανεξάρτητων μελετών [136], [137]. Πιο συγκεκριμένα, ο SNP που ανακαλύφθηκε και συσχετίστηκε με την εκδήλωση της HEΩ αφορά στον γενετικό τόπο 10q26 όπου εδράζεται το γονίδιο ARMS2. Το γονίδιο ARMS2 αποτελείται από δύο εξώνια και παράγει ένα μετάγραφο μήκους 818bp το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 107 αμινοξέων άγνωστης λειτουργίας. Η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον πλακούντα ενώ έχει εντοπιστεί και στον αμφιβληστροειδή.

Μια μετάπτωση από G σε T στη νουκλεοτιδική θέση 270 του γονιδίου ARMS2 (G270T) που οδηγεί σε μη συνώνυμη αμινοξική αντικατάσταση της αλανίνης στη θέση 69 του πολυπεπτιδίου από σερίνη (rs10490924 [A69S]) έχει συσχετιστεί με την HEΩ [136]. Ο πολυμορφισμός αυτός βρέθηκε να ενέχεται στην εμφάνιση της ασθένειας στο 36%-57% των ασθενών που μελετήθηκαν [146], [147]. Ειδικότερα, το T270 αλληλόμορφο συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της ασθένειας κατά 2,5-7,5 φορές ανάλογα με την παρουσία ενός ή δύο αλληλομόρφων στο γονότυπο των ασθενών [136], [147]. Η συσχέτιση της ασθένειας με τον γενετικό τόπο 10q26 και το γονίδιο ARMS2 παρουσιάζει αξιοσημείωτη επαναληψιμότητα σε πληθυσμούς διαφορετικών εθνικοτήτων.

Ωστόσο μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν αποδείξεις σε πρωτεϊνικό επίπεδο για την εμπλοκή της πρωτεΐνης ARMS2 στην ασθένεια. Ο περιορισμός της έκφρασης του

γονιδίου στον αμφιβληστροειδή προτείνει έναν ιστοειδικό ρόλο της πρωτεΐνης. Μελέτες στον ανθρώπινο αμφιβληστροειδή κατέδειξαν ότι η ARMS2 πρωτεΐνη εντοπίζεται στην ελλειψοειδή περιοχή των εσώτερων τμημάτων των φωτοϋποδοχέων και συνεντοπίζεται με το μιτοχονδριακό δείκτη αντι-MTCO₂, υποδηλώνοντας μιτοχονδριακή εντόπιση. Η θέση της φαίνεται να είναι στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων [148], [149]. Η παθοφυσιολογική σχέση του πολυμορφισμού rs10490924 [A69S] με την ασθένεια προτείνεται με βάση την εμπλοκή της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων στο γερασμένο αμφιβληστροειδή. Ιστολογικά έχει παρατηρηθεί ότι στον αμφιβληστροειδή ασθενών με HEΩ, ο αριθμός και το μέγεθος των μιτοχονδρίων είναι μειωμένα και υπάρχει ελαττωμένη ποσότητα στρώματος καθώς και ελλείψεις στο μιτοχονδριακό DNA. Με δεδομένο ότι η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων αποτελεί σημαντική πηγή ανιόντων του υπεροξειδίου, καθώς και το ότι το οξειδωτικό στρες ενοχοποιείται για την παθογένεση της HEΩ, ερευνητικές ομάδες έχουν προτείνει ότι η αντικατάσταση της αλανίνης στη θέση 69 του πολυπεπτιδίου ARMS2 από σερίνη πιθανώς διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην εξαρτώμενη από το οξειδωτικό στρες βλάβη των φωτοϋποδοχέων. Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα στοιχεία, η αντικατάσταση αυτή δε φαίνεται να έχει επίδραση στην έκφραση, σταθερότητα ή εντόπιση της πρωτεΐνης αλλά το πιθανότερο είναι ότι προκαλεί κάποια δομικής ή λειτουργικής φύσεως μεταβολή που χρίζει περαιτέρω πειραματικής διερεύνησης [148], [149], [150].

Αξίζει να σημειωθεί όσον αφορά τη σχέση γονοτύπου-φαινοτύπου, ότι πολλές μελέτες συσχετίζουν τον πολυμορφισμό A69S με προχωρημένη νόσο και ιδιαίτερα με χοριοειδική νεοαγγείωση [141]. Και αυτός ο πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί και με άλλους παράγοντες προδιάθεσης όπως το κάπνισμα. Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει ότι οι καπνιστές που φέρουν αυτόν τον πολυμορφισμό στο γονίδιο ARMS2 έχουν 22 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν την ασθένεια σε σχέση με άτομα που φέρουν τον πολυμορφισμό αλλά δεν καπνίζουν. Τα άτομα που φέρουν τον πολυμορφισμό rs1061170 [Y402H] στο γονίδιο CFH μαζί με τον πολυμορφισμό rs10490924 [A69S] έχουν ακόμη μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν την ασθένεια σε σχέση με άτομα που φέρουν μόνο τον ένα από τους δύο πολυμορφισμούς. Μάλιστα αν στην εξίσωση προστεθεί και το κάπνισμα υπολογίζεται ότι οι πολυμορφισμοί στα γονίδια CFH και ARMS2 και το κάπνισμα εξηγούν το 61% του αποδιδόμενου κινδύνου για την εκδήλωση της HEΩ.

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

Πολυμορφισμοί που συσχετίζονται με την ασθένεια κι ενισχύουν το ρόλο του συστήματος του συμπληρώματος στην παθογένεια της ΗΕΩ έχουν βρεθεί και σε άλλα γονίδια που κωδικοποιούν ρυθμιστικές πρωτεΐνες και συστατικά του συμπληρώματος, όπως το γονίδιο του παράγοντα του συμπληρώματος 2 (C2) και το γονίδιο του παράγοντα του συμπληρώματος Β (CFB). Τα γονίδια αυτά εδράζονται στο χρωμόσωμα 6p κι απέχουν μεταξύ τους 500 kb ενώ και τα δύο κωδικοποιούν πρόδρομα μόρια της C3 κονβεργτάσης. Οι πρωτεΐνες C2 και CFB είναι δομικά παρόμοιες κι έχουν τμήματα με δραστηριότητα πρωτεάσης σερίνης και τρία πρωτεϊνικά ρυθμιστικά τμήματα του συμπληρώματος [81] ενώ και οι δύο πρωτεΐνες εκκρίνονται τοπικά στον οφθαλμό. Οι Gold και συνεργάτες [81], εντόπισαν τις πρωτεΐνες C2 και CFB στο νευροεπιθήλιο του αμφιβληστροειδούς, στο ME και στο χοριοειδή ενώ η πρωτεΐνη του CFB βρίσκεται επίσης στα drusen και στη βασική μεμβράνη. Η έκκριση του CFB από τα κύτταρα του ME αυξάνεται με την ηλικία πιθανά λόγω απάντησης σε αυξημένη ανάγκη για ενεργοποίηση του συμπληρώματος.

Αρχικές μελέτες των Gold και συνεργατών του [81], έδειξαν ότι SNPs στα γονίδια του C2 και του CFB ίσως σχετίζονται με την ΗΕΩ παρέχοντας ένα προστατευτικό αποτέλεσμα. Πιο συγκεκριμένα, οι ερευνητές έδειξαν ότι οι πολυμορφισμοί rs641153 [R32Q] και rs4151667 [L9H] στο γονίδιο CFB και ο πολυμορφισμός rs9332739 [E318D] στο γονίδιο C2 δρουν προστατευτικά και μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της ΗΕΩ. Ο παράγοντας CFB συμμετέχει στην ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος και ο πολυμορφισμός rs641153 [R32Q] έχει βρεθεί να ελαττώνει την ενεργοποιητική του δραστηριότητα. Μάλιστα, η επίδραση του πολυμορφισμού rs641153 [R32Q] στο γονίδιο CFB είναι σημαντική ακόμα και αν υπάρχει ο πολυμορφισμός rs1061170 [Y402H] στο γονίδιο CFB, ο πολυμορφισμός rs10490924 [A69S] στο γονίδιο ARMS2 και τα άτομα είναι καπνιστές. Περαιτέρω έρευνες επαλήθευσαν αυτά τα ευρήματα [142], [151], [152], [153]. Επιπλέον οι πολυμορφισμοί rs547154 [IVS10] και rs2072633 [IVS17] που βρίσκονται σε εσώνια των γονιδίων C2 και CFB φαίνεται επίσης να έχουν προστατευτική δράση.

- **Γονίδιο C3 (Complement Factor 3)**

Ο παράγοντας του συμπληρώματος 3 είναι η πρωτεΐνη του συμπληρώματος με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο αίμα, η οποία αυξάνεται κατακόρυφα σε περίπτωση οξείας φλεγμονής. Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από 1663 αμινοξέα και περιλαμβάνει αρκετά σημεία πρόσδεσης για υποδοχείς και ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Η βιολογική σημασία αυτής της πρωτεΐνης είναι μεγάλη, καθώς η διάσπασή της στα C3a και C3b είναι κομβικό σημείο για τις τρεις οδούς του συμπληρώματος. Ο παράγων C3 και το προϊόν ενεργοποίησης του C3a έχουν εντοπιστεί στα *drusen*, στον αμφιβληστροειδή, στη βασική μεμβράνη καθώς και στον χοριοειδή [154]. Ο παράγων C3 εκφράζεται και συντίθεται τοπικά στα κύτταρα του ΜΕ, στο νευροεπιθήλιο και στο χοριοειδικό ιστό ενώ έχει παρατηρηθεί ότι η έκφραση του C3 αυξάνεται στον γηράσκοντα αμφιβληστροειδή και φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της υγρής μορφής της ΗΕΩ [155].

Πολυμορφισμοί στο γονίδιο του C3 έχουν συσχετιστεί με την ΗΕΩ. Οι Yates και συνεργάτες ανακάλυψαν μια συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs2230199 και της ΗΕΩ [156]. Ο πολυμορφισμός αυτός εντοπίζεται σε τμήμα του εξωνίου του γονιδίου C3 στο χρωμόσωμα 19, στη θέση 6718376 και εκφράζεται με μεταστροφή μιας βάσης κυτοσίνης σε γουανίνη στη θέση 7276 του γονιδίου, που οδηγεί σε μη συνώνυμη αμινοξική αντικατάσταση της αργινίνης από γλυκίνη στη θέση 80 της ώριμης πρωτεΐνης (rs2230199 [R80G]) ή στη θέση 102 της προ-πρωτεΐνης (rs2230199 [R120G]). Μελέτες που ακολούθησαν, επαλήθευσαν αυτή τη συσχέτιση [142], [151], [157], [158]. Όσον αφορά τη φαρμακογενετική επίδραση του πολυμορφισμού rs2230199 [R120G] στην ΗΕΩ, δεν προέκυψε καμία συσχέτιση με τη χρήση αντιοξειδωτικών σκευασμάτων και ψευδαργύρου καθώς και με τη χρήση αντι-VEGF παραγόντων για τη θεραπεία της εξιδρωματικής μορφής της νόσου.

- **Παράγοντας VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)**

Ένας άλλος παράγοντας, τον οποίο οι μοριακές μελέτες που έχουν γίνει, εμπλέκουν με την παθογένεια της ΗΕΩ και πιο συγκεκριμένα με την εξιδρωματική μορφή της ΗΕΩ είναι ο VEGF [159], [160], [161], [162]. Ο VEGF είναι μια κυτοκίνη, η οποία αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της αγγειογένεσης και νεοαγγειογένεσης με άμεσους και έμμεσους μηχανισμούς [163]. Πιο συγκεκριμένα, αφενός, ο VEGF διεγείρει άμεσα τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων που βρίσκονται κοντά σε μικροαγγεία καθώς ενισχύει τη μιτωτική τους δραστηριότητα και παράλληλα

συμμετέχει στη μετανάστευσή τους και την αλλαγή της γενετικής τους έκφρασης. Αφετέρου, ο VEGF καθιστά αυτά τα ενδοθηλιακά κύτταρα υπερδιαπερατά, με αποτέλεσμα να διαχέονται πρωτεΐνες του πλάσματος στον εξωαγγειακό χώρο, γεγονός που δημιουργεί αλλαγές στη μεσοκυττάρια ουσία, οι οποίες ευνοούν την αγγειογένεση [164]. Είναι χαρακτηριστικό ότι ασθενείς που παρουσιάζουν την εξιδρωματική μορφή της ΗΕΩ εμφανίζουν στο υαλοειδές υγρό του οφθαλμού τους υψηλά επίπεδα του VEGF.

Η οικογένεια των γονιδίων που κωδικοποιούν τον VEGF απαρτίζεται από τα γονίδια VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D και τα γονίδια για τον πλακουντιακό αυξητικό παράγοντα (PIGF). Ο VEGF-A (ή απλά VEGF) είναι ο καλύτερα μελετημένος παράγοντας, η δράση του είναι η πλέον σχετιζόμενη με την αγγειογένεση και αποτελεί τον στόχο των περισσότερων σύγχρονων αντι-VEGF θεραπειών. Το γονίδιο του VEGF δομείται από 8 εξώνια ανάμεσα στα οποία υπάρχουν 7 εσώνια [165]. Από το εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου μπορούν να προκύψουν εννιά πρωτεϊνικές ισομορφές με διαφορετικό αριθμό αμινοξέων η καθεμία: VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF162, VEGF165, VEGF165b, VEGF183, VEGF189 και VEGF206 (οι αριθμοί στις ισομορφές αντιστοιχούν στον αριθμό των αμινοξέων που περιέχουν οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται). Οι VEGF121 και VEGF165 είναι οι δυο κύριες ισομορφές που απαντώνται στον αμφιβληστροειδή, ενώ ο VEGF165 αποτελεί την περισσότερο εκφραζόμενη ισομορφή με πρωτεύοντα ρόλο στην αγγειογένεση. Υπάρχουν δύο ισομορφές του VEGF165, η VEGF165a και η VEGF165b, οι οποίες μπορούν να προκύψουν από περαιτέρω μάτισμα. Η ισομορφή VEGF165a φαίνεται να επάγει την αγγειογένεση, σε αντίθεση με την VEGF165b η οποία φαίνεται να την αναστέλλει. Ο μηχανισμός με τον οποίο ελέγχεται αυτό το μάτισμα παραμένει ακόμα άγνωστος αλλά χάρη στην ισορροπία μεταξύ των δυο αυτών ισομορφών φαίνεται να επιτυγχάνεται η αγγειακή ομοιόσταση [166]. Αυξημένα επίπεδα του VEGF έχουν ανευρεθεί σε μεμβράνες με νεοαγγείωση, οι οποίες αφαιρέθηκαν χειρουργικά από οφθαλμούς ασθενών που έπασχαν από εξιδρωματική ΗΕΩ [162]. Τα αυξημένα αυτά επίπεδα έχουν συνδεθεί με την ύπαρξη πολυμορφισμών, που έχουν ανιχνευτεί μέσα στην αλληλουχία του υποκινητή ή της 5' αμετάφραστης περιοχής του γονιδίου του VEGF και οι οποίοι επηρεάζουν την έκφραση του VEGF. Μελέτες που έχουν γίνει, έχουν προσδιορίσει διαφορετικούς SNPs, τους οποίους έχουν συνδέσει με την εκδήλωση της ΗΕΩ. Πιο συγκεκριμένα, ο Churchill και οι συνεργάτες του [159], εντόπισαν οκτώ SNPs στον υποκινητή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -460 και -116, έναν SNP στην 5' αμετάφραστη περιοχή (405) και

πέντε SNPs στα εσώνια του γονιδίου του VEGF και ανέφεραν ότι ο γονότυπος 674CC παρουσίαζε αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης της ΗΕΩ.

- **Γονίδιο APOE (Apolipoprotein E)**

Η μελέτη των Klaver και των συνεργατών του [167], ήταν η πρώτη που ανέδειξε τη συσχέτιση της ΗΕΩ με το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης E (apolipoprotein E, APOE). Πρόκειται για μια πολυμορφική πρωτεΐνη, που αποτελεί σημαντικό ρυθμιστικό παράγοντα στον μεταβολισμό των λιπιδίων του κεντρικού νευρικού συστήματος [168] και μάλιστα φαίνεται ότι ο πολυμορφισμός της συσχετίζεται με νευροεκφυλιστικές παθήσεις [169]. Το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης E, μεγέθους 3957 bp, εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 19q13.2 και αποτελείται από 4 εξώνια και 3 εσώνια. Το γονίδιο της APOE έχει τρία αλληλόμορφα, τα e2, e3 και e4 κάθε ένα από τα οποία κωδικοποιεί τις πρωτεϊνικές ισομορφές E2, E3 και E4 αντίστοιχα. Η E3 αφορά την κυρίαρχη ισομορφή από την οποία με δύο σημειακές αλλαγές στις θέσεις 112 και 158 (7903T>C και 8041C>T αντίστοιχα) προέκυψαν οι άλλες δύο. Το e2 αλληλόμορφο φέρει μια αντικατάσταση κυτοσίνης από θυμίνη που οδηγεί στην παρουσία μιας κυστεΐνης αντί μιας αργινίνης στη θέση 158 της πρωτεΐνης. Στο e4 αλληλόμορφο αντικαθίσταται μια θυμίνη από μια κυτοσίνη με αποτέλεσμα σε πρωτεϊνικό επίπεδο να ανευρίσκεται μια αργινίνη αντί για μια κυστεΐνη στη θέση 112 [170]. Έρευνες έδειξαν ότι η μορφή E4 της απολιποπρωτεΐνης συσχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εκδήλωσης ΗΕΩ, ενώ αντίθετα η μορφή E2 με αυξημένο κίνδυνο [167], [171]. Θεωρείται λοιπόν, ότι το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης E μπορεί να παίξει είτε προστατευτικό είτε προδιαθεσικό ρόλο στην εμφάνιση της ΗΕΩ.

- **Γονίδιο CX3CR1(CX3 Chemokine Receptor 1)**

Ένα ακόμα γονίδιο το οποίο έχει συσχετιστεί με την ΗΕΩ είναι το γονίδιο CX3CR1(CX3 Chemokine Receptor 1), το οποίο κωδικοποιεί τον υποδοχέα της χημειοκίνης CX3CL1 (CX3 Chemokine Ligand 1), μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης που εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια. Οι χημειοκίνες είναι μικρές (συνήθως 8-10 kDa) χημειοελκτικές κυτοκίνες, που συνθέτονται στον τόπο της φλεγμονής και αποτελούν βασικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες για τη στρατολόγηση και κυκλοφορία των λευκοκυττάρων [172]. Το γονίδιο για τον CX3CR1 εντοπίζεται στον άνθρωπο στη χρωμοσωμική περιοχή 3p21.3 και αποτελείται από δύο εξώνια. Κωδικοποιεί για μια

πρωτεΐνη μοριακού βάρους 40.396 Da, τον υποδοχέα CX3CR1, που αποτελείται από 355 αμινοξέα και ανήκει στην οικογένεια των GPCRs (G Protein Coupled Receptors). Ο υποδοχέας CX3CR1 εκφράζεται στα μικρογλοιακά κύτταρα, στα μακροφάγα, στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στους φωτοϋποδοχείς του αμφιβληστροειδούς [173]. Ο CX3CR1 μεσολαβεί στη μετανάστευση και προσκόλληση των κυττάρων αυτών μετά τη σύνδεσή του με τη χημειοκίνη CX3CL1 [174]. Έχει αποδειχτεί ότι όλα τα μικρογλοιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς εκφράζουν τον υποδοχέα CX3CR1, στο γονίδιο του οποίου έχουν αναγνωρισθεί δύο SNPs, που επηρεάζουν τα κωδικόνια 249 (rs3732379) και 280 (rs3732378) αντίστοιχα και οι οποίοι έχουν συνδεθεί με μειωμένη υποαμφιβληστροειδική κυτταρική μετανάστευση, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο κίνδυνος για εκδήλωση της ΗΕΩ [174]. Αυτοί οι πολυμορφισμοί προκαλούν αμινοξικές αλλαγές, στη θέση 249 από βαλίνη σε ισολευκίνη (V249I) και στη θέση 280 από θρεονίνη σε μεθειονίνη (T280M). Η λειτουργική ανάλυση έχει δείξει ότι στα λευκοκύτταρα από άτομα ομόζυγα I249/M280 υπάρχει σημαντική μείωση στον αριθμό των θέσεων πρόσδεσης του υποδοχέα με την CX3CL1 σε σχέση με τα κύτταρα με γονότυπο V249/T280 [175]. Τα ίδια αποτελέσματα αλλά μόνο για το αλληλόμορφο I249 επιβεβαίωσε και επόμενη μελέτη [176]. Και στις δύο αυτές μελέτες, το αλληλόμορφο I249 βρέθηκε επίσης να εκφράζεται πολύ λιγότερο σε σχέση με το V249. Επιπλέον, σε επόμενη μελέτη βρέθηκε ότι τα κύτταρα με γονότυπο I249/M280 δείχνουν γενικευμένη εξασθενημένη λειτουργία του CX3CR1, δηλαδή μειωμένη χημειόταξη αλλά και CX3CL1-επαγόμενη προσκόλληση, εξαιτίας σημαντικής μείωσης στην κινητική της πρόσδεσης με την CX3CL1 (μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης) [177]. Η μειωμένη έκφραση του υποδοχέα CX3CR1 οδηγεί σε μακροφάγα τα οποία δύνανται να επάγουν τη φλεγμονή (proinflammatory phenotype) συγκριτικά με μακροφάγα με υψηλή έκφραση του CX3CR1, τα οποία καταστέλλουν τη φλεγμονή (antiinflammatory phenotype). Είναι λογικό λοιπόν, ότι η συσσώρευση στον υποαμφιβληστροειδικό χώρο μικρογλοιακών κυττάρων με μειωμένη λειτουργία του CX3CR1 υποδοχέα, μπορεί να προκαλέσει φλεγμονώδη αντίδραση με αποτέλεσμα τη στρατολόγηση και άλλων φλεγμονωδών κυττάρων γεγονός που ευνοεί την ανάπτυξη χοριοειδικής νεοαγγείωσης και κατά επέκταση της ΗΕΩ. Η πρώτη μελέτη συσχέτισης των δύο αυτών πολυμορφισμών στο γονίδιο του CX3CR1 με την ΗΕΩ πραγματοποιήθηκε από τους Tuo και συνεργάτες [178], οι οποίοι παρατήρησαν αυξημένη συχνότητα των πολυμορφικών αλληλομόρφων I249 και M280 στους ασθενείς με ΗΕΩ, σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου που συμπεριέλαβαν στη μελέτη τους, επιβεβαιώνοντας την εμπλοκή αυτών των πολυμορφισμών στην παθογένεια της ΗΕΩ.

- **Γονίδιο ABCR**

Τέλος, η παρουσία φαινοτυπικών ομοιοτήτων μεταξύ της ΗΕΩ και της νόσου του Stargardt οδήγησε πολλούς ερευνητές στη συσχέτιση του κύριου γονιδίου, το οποίο ευθύνεται για την πλειονότητα των περιπτώσεων της νόσου του Stargardt, του ABCR γονιδίου, με την εμφάνιση της ΗΕΩ. Μελέτες έχουν συνδέσει δύο SNPs που έχουν ανιχνευτεί στο ABCR γονίδιο, τους D2177N και G1961E, με την εμφάνιση της ΗΕΩ [179], [180]. Παρόλα αυτά, η συσχέτιση μεταξύ του γονιδίου ABCR και της ΗΕΩ δεν έχει επιβεβαιωθεί από άλλες μελέτες [181], [182], [183].

Το γονίδιο ABCR, το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μεταφοράς που βρίσκεται στους φωτοϋποδοχείς και η οποία χρησιμοποιεί ATP για να μεταφέρει τη βιταμίνη Α εντός των φωτοϋποδοχέων. Η διαδικασία αυτή αποτελεί τμήμα ενός ευρύτερου μηχανισμού που ανανεώνει μια συγκεκριμένη στερεοχημική μορφή της βιταμίνης Α, την 11-cis retinal. Κατά την απορρόφηση του φωτός, η 11-cis retinal μετατρέπεται σε all-trans retinal, η οποία απελευθερώνεται και στη συνέχεια τροποποιείται χημικά για να μεταφερθεί σε ένα κύτταρο του ΜΕ. Σε βλάβες της πρωτεΐνης ABCR επιβραδύνεται η τροποποίηση της all-trans retinal, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της ουσίας, η οποία αντιδρά με λιπίδια της μεμβράνης των φωτοϋποδοχέων, σχηματίζοντας μια σταθερή ουσία, την Α2Ε, που δεν αποδομείται [184]. Όταν φαγοκυτταρώνεται από τα κύτταρα του ΜΕ, συσσωρεύεται με τη μορφή λιποφουσκίνης κι επιπλέον καθιστά τα κύτταρα αυτά πιο ευαίσθητα στις βλαπτικές επιδράσεις του φωτός. Συνεπώς, είναι πολύ πιθανό, τουλάχιστον κάποιες περιπτώσεις της νόσου, να επηρεάζονται από μεταβολές του γονιδίου ABCR.

1.6.2 ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ - ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η φαρμακογενετική εξέταση της ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία της ΗΕΩ έχει αποτελέσει αντικείμενο έντονης μελέτης τα τελευταία χρόνια, αφού θα μπορούσε να επιτρέψει την εφαρμογή μιας προσαρμοσμένης θεραπευτικής στρατηγικής βασισμένης στους ασθενείς και να οδηγήσει σε καλύτερα κλινικά αποτελέσματα.

Πρόσφατα δεδομένα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και αναδεικνύουν φαρμακογενετικές συσχετίσεις ανάμεσα σε πολυμορφισμούς των γονιδίων CFH,

ARMS2, C2 και CFB και την ανταπόκριση στις εφαρμοζόμενες θεραπείες. Πιο συγκεκριμένα, έρευνες τόσο των Brantley και των συνεργατών του [185], καθώς και Lee και των συνεργατών του [186], έχουν συσχετίσει τον πολυμορφισμό Y402H του γονιδίου CFH με την ανταπόκριση στην θεραπεία ΗΕΩ υγρού τύπου μετά από εγχύσεις αντι-VEGF παραγόντων. Επιπροσθέτως, έρευνα των Kang και των συνεργατών του [187], έδειξε ότι υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού A69S του γονιδίου ARMS2 με την ανταπόκριση στην θεραπεία ΗΕΩ υγρού τύπου μετά από εγχύσεις αντι-VEGF παραγόντων.

Όσον αφορά στη θεραπεία ΗΕΩ ξηρού τύπου, οι έρευνες των Klein και των συνεργατών του [188], των Awή και των συνεργατών του [189], [190], καθώς και των Lee και των συνεργατών του [191], οδήγησαν στη συσχέτιση των δύο παραπάνω πολυμορφισμών με την ανταπόκριση των ασθενών στη λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής. Αντίθετα, σε μελέτη των Francis και των συνεργατών του, δεν αναδείχτηκαν φαρμακογενετικές συσχετίσεις ανάμεσα σε πολυμορφισμούς των γονιδίων C2 και CFB και τη χρήση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής [158].

Φαρμακογενετικές προσεγγίσεις σαν αυτές που αναφέρθηκαν παραπάνω έχουν μεγάλη κλινική σημασία, καθώς θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην πρόβλεψη του θεραπευτικού αποτελέσματος με βάση το γονότυπο του ασθενούς.

1.7. ΣΚΟΠΟΣ

Είναι ευρέως αποδεκτό, ότι η ΗΕΩ είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια στην εμφάνιση της οποίας ενέχονται τόσο αλληλεπιδράσεις περιβάλλοντος-γονιδίων όσο και γονιδίων-γονιδίων. Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης της ΗΕΩ, σε συνδυασμό με τις σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία των ασθενών και την αδυναμία πλήρους θεραπευτικής αποκατάστασης της όρασης, καθιστά αναγκαία τη διερεύνηση της γενετικής της βάσης. Η αναγνώριση γονιδίων και γενετικών πολυμορφισμών μπορεί να συμβάλει στη διαλεύκανση της μοριακής παθογένειας της ασθένειας με σκοπό την ανάπτυξη νέων προληπτικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων. Επιπλέον, οι γενετικοί πολυμορφισμοί θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως γενετικοί δείκτες για την πρόβλεψη της προόδου της νόσου στους ασθενείς.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση του πιθανού ρόλου πολυμορφισμών γονιδίων, οι οποίοι έχουν συσχετιστεί με την ΗΕΩ, στην ανταπόκριση των ασθενών σε εφαρμοζόμενες θεραπείες, και συγκεκριμένα στη χρήση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής σε ασθενείς με ΗΕΩ ξηρού τύπου, καθώς και στη θεραπεία με χορήγηση αντι-VEGF παραγόντων σε ασθενείς με ΗΕΩ υγρού τύπου. Με τη διερεύνηση και τον προσδιορισμό τέτοιων γενετικών πολυμορφισμών, θα μπορούσε να επιτευχθεί η πρόβλεψη της έκβασης της ασθένειας, καθώς και η ταυτοποίηση των ασθενών που θα μπορούσαν να επωφεληθούν από την εφαρμοζόμενη θεραπεία.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα εργασία είναι μελέτη γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμών γονιδίων που εμπλέκονται στην παθογένεια της ΗΕΩ και ανταπόκρισης στην εφαρμοζόμενη θεραπεία. Στη μελέτη αυτή συμμετείχαν 222 ασθενείς με ΗΕΩ. Όλοι οι συμμετέχοντες ήταν Καυκάσιος φυλής με Ελληνική εθνική καταγωγή. Καταγράφηκαν οι δημογραφικές πληροφορίες και το πλήρες ιατρικό ιστορικό του κάθε ασθενούς. Όλοι οι ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν, παρουσίαζαν ξεκάθαρα σημεία ΗΕΩ χωρίς τη συνύπαρξη άλλων νόσων του αμφιβληστροειδούς ή της ωχράς και ήταν μεταξύ 55 και 85 ετών. Τα κριτήρια εισόδου των ασθενών στη μελέτη ήταν η ηλικία άνω των 55 ετών, η παρουσία σε έναν τουλάχιστον οφθαλμό drusen (μεγέθους άνω των 63μm), με ή χωρίς αλλοιώσεις στην περιοχή του ΜΕ, ή η ανάπτυξη χοριοειδικής νεοαγγείωσης χαρακτηριζόμενη από την παρουσία υποαμφιβληστροειδικού ή ενδοαμφιβληστροειδικού υγρού χωρίς προηγούμενο ιστορικό θεραπείας. Από τη παρούσα μελέτη αποκλείστηκαν ασθενείς με ΗΕΩ που είχαν ιστορικό προηγούμενης θεραπείας, ασθενείς που παρουσίαζαν και άλλη οφθαλμική νόσο όπως γλαύκωμα, καθώς και οποιαδήποτε οφθαλμολογική νόσο που επηρέαζε τον ευκρινή έλεγχο του βυθού και τη διενέργεια ικανοποιητικής ποιότητας OCT σαρώσεων, όπως παρουσία καταρράκτη. Επίσης, αποκλείστηκαν ασθενείς με αρρυθμιστο διαβήτη ή αρρυθμιστη αρτηριακή πίεση καθώς και ασθενείς με σοβαρή συστηματική νόσο όπως καρκίνο ή αυτοάνοσο νόσημα. Η μεθοδολογία εκτέλεσης του πρωτοκόλλου και διαχείρισης των προσωπικών δεδομένων και των δεδομένων της κλινικής εξέτασης των συμμετεχόντων ήταν σύμφωνη με τις αρχές της συνθήκης του Helsinki. Άπαντες οι ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη υπέγραψαν ειδική φόρμα συγκατάθεσης και αποδοχής συμμετοχής στη μελέτη.

2.2. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ

Κατά την αρχική παρουσίαση, οι ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη, υποβλήθηκαν σε τυπική οφθαλμολογική εξέταση που περιελάμβανε τη μέτρηση της οπτικής τους οξύτητας καθώς και τη διενέργεια OCT με τη χρήση του συστήματος (SD)-OCT Optovue.

Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με τον τύπο ΗΕΩ από τον οποίο έπασχαν. Η ομάδα Α περιελάμβανε 170 ασθενείς που διαγνώστηκαν με τον ξηρό τύπο της νόσου και είχαν τουλάχιστον στον ένα οφθαλμό είτε ένα ενδιάμεσου μεγέθους (63-124μm) μαλακό drusen χωρίς αλλοιώσεις στην περιοχή του ΜΕ, είτε ένα μεγάλο μεγέθους (>125 μm) drusen με ή χωρίς αλλοιώσεις στην περιοχή του ΜΕ (πρώιμη ή ενδιάμεση ΗΕΩ). Η ομάδα Β αποτελείτο από 52 ασθενείς που διαγνώστηκαν με τη προχωρημένη μορφή της νόσου και συγκεκριμένα με ΗΕΩ υγρού τύπου, χαρακτηριζόμενη από την παρουσία υποαμφιβληστροειδικού ή ενδοαμφιβληστροειδικού υγρού, τουλάχιστον στον ένα οφθαλμό. Σε περιπτώσεις ασθενών με ΗΕΩ και στους δύο οφθαλμούς τόσο στην ομάδα Α όσο και στην ομάδα Β, μόνο ο οφθαλμός που παρουσίαζε τη χειρότερη οπτική οξύτητα συμπεριλήφθηκε στη μελέτη.

Σε κάθε ομάδα εφαρμόστηκε διαφορετική θεραπευτική αγωγή. Ειδικότερα, οι ασθενείς της ομάδας Α ελάμβαναν καθημερινά 1 συμπλήρωμα διατροφής (Ocuvite Lutein forte®), με σύσταση 6 mg λουτεΐνης, 0.5 mg ζεαξανθίνης, 60 mg βιταμίνης C, 8.8 mg βιταμίνης E, 5 mg ψευδαργύρου και 20 μg σεληνίου, για χρονικό διάστημα 12 μηνών, ενώ οι ασθενείς της ομάδας Β υποβλήθηκαν σε 3 διαδοχικές μηνιαίες ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ranibizumab (Lucentis®). Μία δόση των 0.5 mg από τον παράγοντα ranibizumab σε 0.05 mL διαλύματος εγχύθηκε ενδοϋαλοειδικά κάτω από στείρες συνθήκες. Οι μετρήσεις της οπτικής οξύτητας και η διενέργεια του OCT επαναλήφθηκαν στους ασθενείς της ομάδας Α μετά το πέρας των 12 μηνών συνεχιζόμενης λήψης αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων, ενώ στους ασθενείς της ομάδας Β ένα μήνα μετά την 3^η ενδοϋαλοειδική έγχυση. Σε κανέναν ασθενή δε διενεργήθηκε εγχείρηση καταρράκτη κατά τη διάρκεια του διαστήματος παρακολούθησης.

2.3. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ – ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η συλλογή και η ανάλυση των δειγμάτων αίματος από το σύνολο των 222 ασθενών διήρκησε πάνω από 3 έτη. Περίπου 4 mL περιφερικού αίματος συλλέχθηκαν από κάθε ασθενή σε δοκιμαστικούς σωλήνες με EDTA. Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA έγινε από λευκοκύτταρα με τη χρήση αυτόματου συστήματος απομόνωσης DNA (iPrep, Invitrogen) καθώς και του εμπορικά

διαθέσιμου συστήματος αντιδραστηρίων (κιτ) iPrep PureLink gDNA Blood Kit (Εικόνα 2.1).

Τα βήματα της απομόνωσης με χρήση αυτόματου συστήματος τυπικά περιλαμβάνουν:

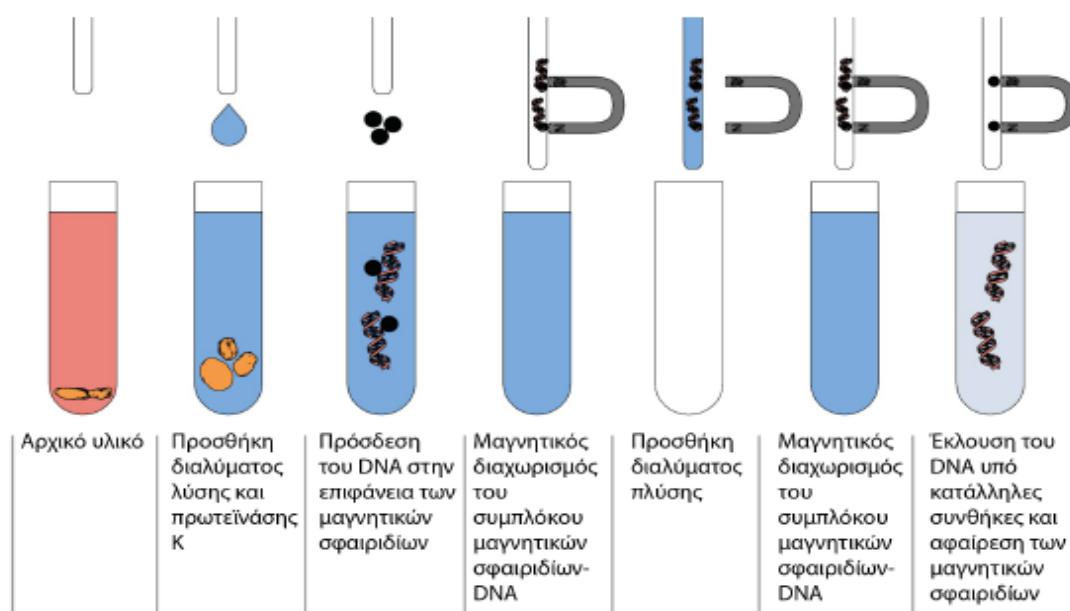
1. Τοποθέτηση του δείγματος σε κατάλληλο σωληνάριο στην τράπεζα εργασίας μέσα στο μηχάνημα.
2. Ανάδευση του φυσιγγίου με τα προδιανεμημένα αντιδραστήρια και τοποθέτησή του στην κατάλληλη εσοχή. Κάθε σωληνάριο του φυσιγγίου περιέχει ένα διαφορετικό αντιδραστήριο, όπως μαγνητικά σωματίδια, διάλυμα λύσης, διάλυμα πλύσης ή διάλυμα έκλουσης (εικόνα)
3. Επιλογή του επιθυμητού προγράμματος απομόνωσης ανάλογα με τον τύπο του δείγματος.
4. Παραλαβή των σωληναρίων με το καθαρό DNA σε σύντομο χρονικό διάστημα.



Εικόνα 2.1. Κασέτα με προδιανεμημένα αντιδραστήρια. Η κασέτα περιέχει όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια για τη διαδικασία απομόνωσης του DNA και χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με αυτόματα συστήματα απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων [192]

Η διαδικασία απομόνωσης αποτελείται από λύση του δείγματος παρουσία χαοτροπικών αλάτων και απορρυπαντικού, εφαρμογή μαγνητικού πεδίου και

δέσμευση των μορίων DNA σε μαγνητικά σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου, απομάκρυνση των μη δεσμευμένων κυτταρικών στοιχείων, διαδοχικές πλύσεις για απομάκρυνση των αλάτων και άλλων αναστολέων και τέλος έκλυση του καθαρού DNA σε ελαφρά αλκαλικό διάλυμα χαμηλής αλατότητας (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2. Στάδια απομόνωσης DNA με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων [192]

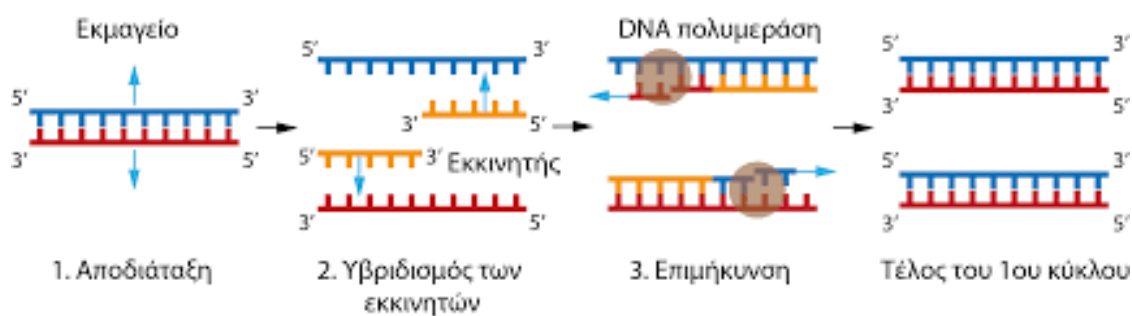
2.4. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) αναπτύχθηκε από τον Karry Mullis στα μέσα της δεκαετίας του 1980 κι έφερε μια νέα επανάσταση στον τομέα της γονιδιακής ανάλυσης. Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων ακολουθιών του γενετικού υλικού *in vitro* και αποτελεί πλέον ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία της σύγχρονης μοριακής βιολογίας, με αναρίθμητες εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο. Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής αντίδρασης PCR, το επιθυμητό τμήμα του γενετικού υλικού μπορεί να πολλαπλασιαστεί έως και ένα τρισεκατομμύριο φορές με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός εξαιρετικά μεγάλου αριθμού αντιγράφων της συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η PCR βασίζεται στην ιδιότητα των DNA

πολυμερασών να συνθέτουν συμπληρωματική αλυσίδα με κατεύθυνση 5' → 3' χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα μονόκλωνο DNA.

Πειραματικά ο πολλαπλασιασμός επιτυγχάνεται με τη χρήση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων – εκκινήτων που εμφανίζουν απόλυτη συμπληρωματικότητα με τις συγκεκριμένες περιοχές του DNA. Η αντιγραφή και των δύο αλυσίδων του DNA επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός ζεύγους εκκινήτων συμπληρωματικών προς τις δύο αλυσίδες αντίστοιχα. Οι εκκινήτες έχουν μέγεθος 18-30 βάσεις συνήθως και το τμήμα του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί οριοθετείται δεξιά και αριστερά αυτών. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται είναι θερμοανθεκτική για να παραμένει ενεργή στις υψηλές θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται κατά την αποδιάταξη του DNA. Προέρχεται από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και ονομάζεται Taq πολυμεράση. Στο μείγμα της αντίδρασης προστίθενται επίσης τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) και ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο περιέχει μεταξύ των άλλων ιόντα Mg^{+2} , τα οποία δρουν ως απαραίτητοι ενεργοποιητές του ενζύμου.

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά: (Εικόνα 2.3)



Εικόνα 2.3. Σχηματική παράσταση των σταδίων της PCR [192]

1. Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται (αποδιατάσσονται) με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C για περίπου 30 sec έως 1 min.
2. Υβριδισμός εκκινήτων: Με μείωση της θερμοκρασίας στους 50-65° C για περίπου 30 sec έως 1 min, οι εκκινήτες προσδένονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο αποδιαταγμένο DNA.

3. **Επιμήκυνση:** Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72° C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας dNTPs και χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000 bp ανά λεπτό.

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 40 φορές με αποτέλεσμα από το αρχικό μόριο DNA να σχηματίζονται δισεκατομμύρια μόρια. Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Ο θερμικός κυκλοποιητής προγραμματίζεται ώστε να πραγματοποιούνται οι απαραίτητες μεταβολές της θερμοκρασίας και το μείγμα της αντίδρασης να παραμένει στην κατάλληλη θερμοκρασία για όσο χρόνο χρειάζεται.

Στην παρούσα μελέτη, με εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης στο DNA των ασθενών, έγινε η ενίσχυση των τμημάτων των γονιδίων CFH, ARMS2, CFB και C2 που περιλαμβάνουν έξι πολυμορφισμούς. Οι πολυμορφισμοί αυτοί παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1.

Γονίδιο	Πολυμορφισμός
CFH	rs1061170 [Y402H]
ARMS2	rs10490924 [A69S]
C2	rs9332739 [E318D]
C2	rs547154 [IVS10]
CFB	rs4151667 [L9H]
CFB	rs2072633 [IVS17]

Πίνακας 2.1. Πολυμορφισμοί γονιδίων οι οποίοι διερευνήθηκαν στους ασθενείς

Οι αντιδράσεις PCR για την ενίσχυση όλων των πολυμορφικών τμημάτων των γονιδίων πραγματοποιήθηκαν με τον θερμικό κυκλοποιητή T Professional (Biometra) (Εικόνα 2.4).



Εικόνα 2.4. Θερμικός κυκλοποιητής T Professional [193]

Οι συνθήκες PCR που ακολουθήθηκαν δίνονται στον πίνακα 2.2.

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ	ΚΥΚΛΟΙ	ΣΤΑΔΙΟ
94°C	5 λεπτά	1	Αρχική Αποδιάταξη
94°C	45 δευτερόλεπτα	35	Αποδιάταξη
58°C	45 δευτερόλεπτα	35	Υβριδισμός
72°C	45 δευτερόλεπτα	35	Επιμήκυνση
72°C	5 λεπτά	1	Τελική Επιμήκυνση

Πίνακας 2.2. Συνθήκες PCR

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε σε όλες τις αντιδράσεις PCR δίνεται στον πίνακα 2.3. Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αντιδραστηρίων KAPA Taq HotStart PCR Kit, KAPABIOSYSTEMS.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ(μl)	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Ρυθμιστικό διάλυμα 5X Taq Buffer	5	1X
MgCl ₂	0.75	1.5 mM
Μείγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων	3	0.3 mM
Primer Forward	1.75	0.7 μM
Primer Reverse	1.75	0.7 μM
Taq πολυμεράση	0.25	1.25 U/ μl
DNA	2	80 ng
Αποσταγμένο νερό	10.5	-
Συνολικός όγκος	25	-

Πίνακας 2.3. Πρωτόκολλο αντίδρασης

Για την ενίσχυση των πολυμορφικών τμημάτων των γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω ζεύγη εκκινητών (Πίνακας 2.4).

<u>Amplicon</u>	<u>Forward Primer (5'-3')</u>	<u>Reverse Primer (5'-3')</u>
CFH rs1061170	GATCGAAGAAAGGAGAGCACA TAAGTG	TACTTACTGACACGGATGCATCT GG
ARMS2 rs10490924	ATGGTAACTGAGGCGGAGGG GAAA	TGGTTAAAATGCAAGCTGCAGG
C2 rs9332739	GATCTTCAGCTTTGAGATCAAT GTG	CGTTGAAACTACCCCAGACTCG
C2 rs547154	ACCTCTGGAATCCAAGCCCTG C	ACAGGAGTCTGGTGATTTCCCTC TT
CFB rs4151667	ACCAGGTCTAGGTCTGGAGTT TCA	GGAAGGTTACCCTCGCTTA
CFB rs2072633	CAGCACTTGAAAGAGGTTGAT GTGA	AAGCAGGAAAGCTCAATGCATG T

Πίνακας 2.4. Αλληλουχία εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR

2.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης επιτρέπει το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την απομόνωση τμημάτων DNA που συντίθενται κατά την PCR. Η βασική αρχή της μεθόδου βασίζεται στο ότι μόρια DNA υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου λόγω του αρνητικού φορτίου των φωσφορικών τους ομάδων, μετακινούνται προς το θετικό πόλο. Τα δίκλινα γραμμικά τμήματα DNA κινούνται σε ένα πήκτωμα αγαρόζης και διανύουν απόσταση η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού

λογάριθμοι (\log_{10}) του μοριακού τους βάρους ή του αριθμού των βάσεων τους. Έτσι τα μικρότερα μόρια DNA μετακινούνται στο πήκτωμα πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα. Επειδή το πήκτωμα εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μοριακού βάρους διαχωρίζονται σε ζώνες. Η συγκέντρωση της αγαρόζης που χρησιμοποιείται σε κάθε εφαρμογή εκφράζεται σε % w/v και εξαρτάται από την ικανότητα διάκρισης που επιδιώκεται. Το πήκτωμα αγαρόζης είναι διαπερατό για χρωστικές, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να παρεμβάλλονται στη διπλή έλικα και να σχηματίζουν φθορίζον σύμπλοκο με το DNA, καθιστώντας ορατές τις ζώνες των διαχωρισμένων μορίων.

Η ανάλυση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% (w/v). Το πήκτωμα παρασκευάζεται με 0,75 g αγαρόζης σε 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,5X TBE (Tris-borate-EDTA). Κατόπιν θερμάνσεως σε φούρνο μικροκυμάτων για 4 λεπτά μέχρι πλήρους διαλυτοποίησης της αγαρόζης προστίθεται 4 ml χρωστικής GelRed (Nucleid Acid Gel Stain, 10,000X in water). Κατάλληλος όγκος δείγματος (5-10 μl) αναμειγνύεται με χρωστική πλήρωσης (gel-loading dye) σε αναλογία 6:1. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος 0,5X TBE, υπό σταθερή τάση 100V για 20 λεπτά. Παράλληλα με τα δείγματα γίνεται ηλεκτροφόρηση του δείκτη μοριακών βαρών DNA (molecular weight marker) για τον προσδιορισμό του μεγέθους των PCR προϊόντων. Οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές ύστερα από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

2.6. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

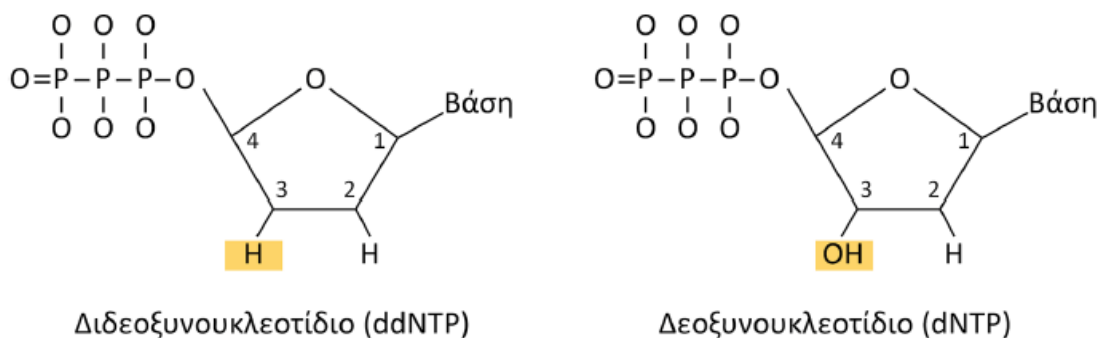
Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR από υπολείμματα εκκινητών, δεοξυριβονουκλεοτιδίων, μη ειδικών PCR προϊόντων μικρού μοριακού μεγέθους και ρυθμιστικού διαλύματος, πραγματοποιήθηκε με το σύστημα αντιδραστηρίων PureLink PCR Purification Kit της εταιρείας Invitrogen, το οποίο στηρίζεται στη χρήση στηλών. Η διαδικασία έγινε σε θερμοκρασία δωματίου και περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Προσθήκη H₂O στο προϊόν της PCR μέχρι τελικού όγκου 50 μl.
- Προσθήκη 200 μl διαλύματος πρόσδεσης PureLink Binding Buffer, στο οποίο έχει προστεθεί ισοπροπανόλη. Ακολουθεί καλή ανάδευση.

- Μεταφορά αυτού του μίγματος στη στήλη PureLink Spin Column.
- Φυγοκέντρηση της στήλης, σε θερμοκρασία δωματίου, σε ταχύτητα 10.000×g, για 1 min.
- Απόρριψη του διηθήματος.
- Φόρτωση στη στήλη 650 μl διαλύματος πλύσης Wash Buffer, στο οποίο έχει προστεθεί εξαρχής αιθανόλη.
- Φυγοκέντρηση της στήλης, σε θερμοκρασία δωματίου, σε ταχύτητα 10.000×g, για 1 min. Το διήθημα απορρίπτεται.
- Η φυγοκέντρηση της στήλης επαναλαμβάνεται σε μέγιστη ταχύτητα, σε θερμοκρασία δωματίου για να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του Wash Buffer.
- Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό 1.7 ml PureLink Elution Tube.
- Προσθήκη 50 μl από το διάλυμα έκλουσης Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) στη στήλη. Επώαση για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση της στήλης για 2 min, σε μέγιστη ταχύτητα.
- Το διήθημα περιέχει, πλέον, το καθαρό προϊόν και φυλάσσεται στους -20° C.

2.7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ DNA (DNA SEQUENCING)

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA είναι η ενζυμική μέθοδος «τερματισμού της επιμήκυνσης αλυσίδας» (“chain termination”), που επινόησε ο Frederick Sanger το 1977. Η βασική αρχή της μεθόδου αυτής στηρίζεται στη χρήση νουκλεοτιδικών αναλόγων, των τριφωσφορικών 2',3'-διδεοξυνουκλεοτιδίων (Dideoxynucleotide triphosphates, ddNTPs), τα οποία προκαλούν τερματισμό της επιμήκυνσης της αλυσίδας του DNA. Κάθε ddNTP περιλαμβάνει ένα μόριο ριβόζης που φέρει μία τριφωσφορική ομάδα στην 5' θέση και τη βάση στην 1' θέση, όπως και τα κανονικά dNTPs που χρησιμοποιούνται κατά την αντιγραφή του DNA. Το σάκχαρο όμως, δε διαθέτει OH στην 3' θέση και έτσι ονομάζεται διδεοξυριβόζη (Εικόνα 2.5).



Εικόνα 2.5. Τα τριφωσφορικά 2',3'-διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) φέρουν υδρογόνο αντί υδροξυλίου στη θέση 3' της δεοξυριβόζης, με αποτέλεσμα να μην επιτρέπουν τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού με το επόμενο νουκλεοτίδιο και κατά συνέπεια να οδηγούν στον τερματισμό της επιμήκυνσης της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας [192]

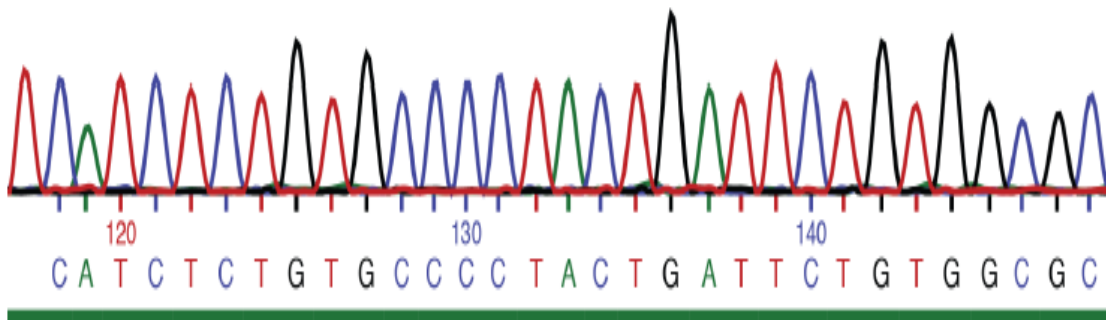
Αυτά τα πρόδρομα μόρια ενσωματώνονται φυσιολογικά κατά την αντιγραφή σε μία αναπτυσσόμενη αλυσίδα DNA, όμως προκαλούν τον τερματισμό της αντίδρασης, διότι δεν υπάρχει δυνατότητα προσθήκης επόμενου καταλοίπου, εφόσον δεν διαθέτουν την 3'-OH ομάδα που είναι απαραίτητη για τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού. Αν κατά την *in vitro* αντιγραφή ενός μορίου, προστεθεί στο μίγμα της αντίδρασης μία μικρή ποσότητα ενός συγκεκριμένου ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) μαζί με τα τέσσερα dNTPs που είναι απαραίτητα για τη σύνθεση του DNA από την DNA πολυμεράση, θα προκύψουν πολλές διαφορετικές αλυσίδες που θα έχουν τερματιστεί ειδικά στο σημείο όπου θα έχει ενσωματωθεί σε αυτές ένα ddNTP.

Για την εύρεση της αλληλουχίας ενός μορίου πραγματοποιούνται τέσσερις αντιδράσεις, η καθεμία με διαφορετικό ddNTP. Οι αλυσίδες DNA που προκύπτουν από κάθε αντίδραση διαχωρίζονται μεταξύ τους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ανιχνεύονται μέσω αυτοραδιογραφίας, οπότε καθίσταται δυνατή η ανάγνωση της αλληλουχίας. Μάλιστα, οι Leroy Hood, Michael Hunkapiller και Lloyd Smith, ανέπτυξαν μία εναλλακτική μέθοδο, η οποία αντικατέστησε τη χρήση ραδιενέργειας. Χρησιμοποίησαν φθορίζουσες χρωστικές για να σημάνουν τα ddNTPs, έτσι ώστε καθένα από τα τέσσερα ddNTPs να σημαίνεται με χρωστική διαφορετικού χρώματος. Οι φθορίζουσες χρωστικές συνδέονται στα ddNTPs με τρόπο που δεν εμποδίζει την DNA πολυμεράση να πραγματοποιήσει την διαδικασία της αντιγραφής. Έτσι στις σύγχρονες μεθόδους αλληλούχισης τα προϊόντα

εντοπίζονται συνήθως με ανίχνευση του φθορισμού που εκπέμπουν οι χρωστικές, οι οποίες είναι συζευγμένες με τα ddNTPs. Με τη χρήση διαφορετικής χρωστικής για κάθε ddNTP, η διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μία μόνο αντίδραση και η ανάλυση να γίνει σε μία μόνο στήλη του πηκτώματος. Τα τμήματα DNA διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Στα τέλη της δεκαετίας του 1990, άρχισαν να κατασκευάζονται πλήρως αυτοματοποιημένες συσκευές αλληλούχισης, οι οποίες βασίζονται στη χρήση τριχοειδών σωληναρίων μικρής διαμέτρου, αντί του κλασσικού πηκτώματος πολυακρυλαμίδης για την ανάλυση των αντιδράσεων.

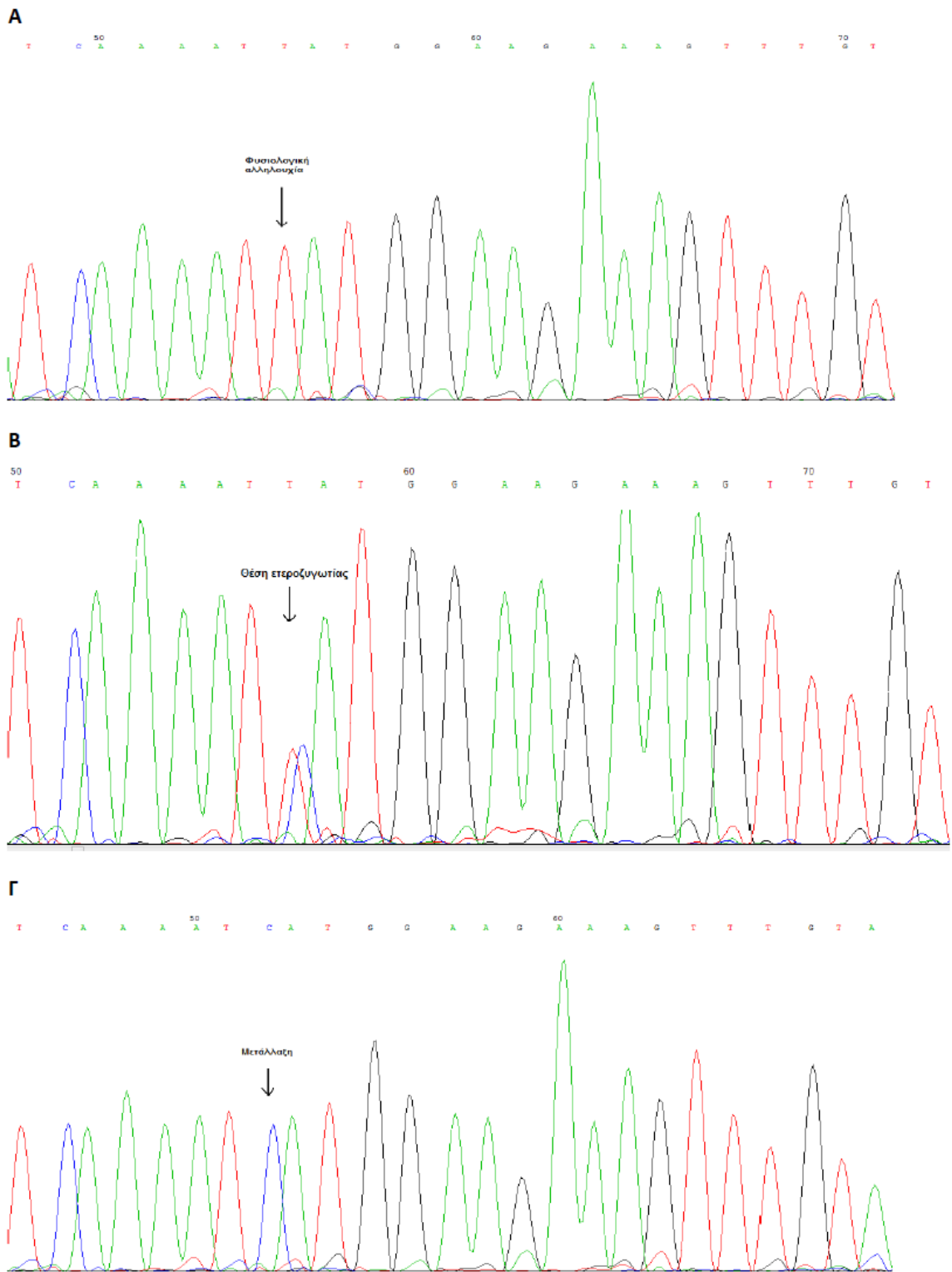
Στην παρούσα μελέτη, για τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των καθαρισμένων PCR προϊόντων, εφαρμόστηκε η ενζυμική μέθοδος αλληλούχισης κατά Sanger. Στη συγκεκριμένη περίπτωση εκτός από τα συμβατικά νουκλεοτίδια προστίθενται στο μείγμα ddNTPs ανάλογά τους, σημασμένα με τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες, καθεμιά από τις οποίες εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος κι έτσι είναι δυνατή η ταυτοποίηση του τελευταίου νουκλεοτιδίου κάθε νεοσυντιθέμενης αλυσίδας. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος γενετικός αναλυτής ABI 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA). Για την αντίδραση της ανάγνωσης της αλληλουχίας χρησιμοποιήθηκαν 50 ng καθαρισμένου PCR προϊόντος, τα οποία αναμείχθηκαν με έτοιμο μίγμα αντίδρασης Big Dye Termination Ready Reaction Mix, version 3.1 (Applied Biosystems, USA), το οποίο περιείχε Taq πολυμεράση, dNTPs και ddNTPs. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10 μl παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος αλληλούχισης (sequencing buffer: Tris-HCl 200 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 9) με την προσθήκη του κατάλληλου εκκινήτη.

Μετά το τέλος των αντιδράσεων ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων της αντίδρασης αλληλούχισης από την περίσσεια των ddNTPs που δεν ενσωματώθηκαν. Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των προϊόντων πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου POP-7 (Applied Biosystems, USA) εντός τριχοειδούς σωλήνα. Τα μόρια κατά την έξοδό τους από το τριχοειδές διέρχονται από δέσμη laser, ώστε να διεγερθούν οι φθορίζουσες ουσίες, ενώ το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας φθορισμού ανιχνεύεται από ειδική καταγραφική συσκευή (CCD camera). Το αποτέλεσμα της διαδικασίας είναι το χρωματογράφημα, το οποίο αποτελείται από τις διαδοχικές βάσεις του τμήματος DNA, οι οποίες εμφανίζονται με τέσσερα διαφορετικά χρώματα (Εικόνα 2.6).

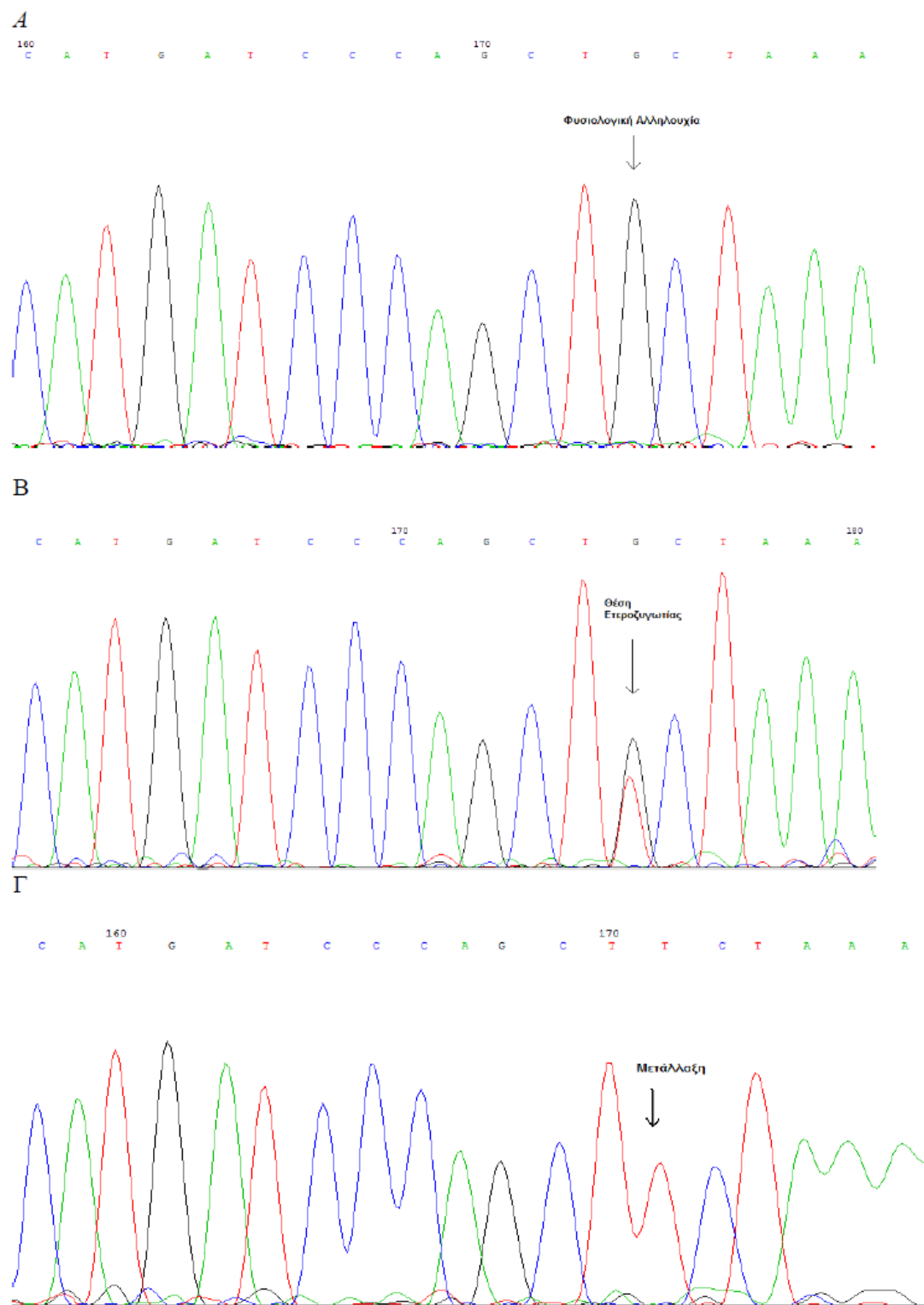


Εικόνα 2.6. Χρωματογράφημα αλληλούχησης κατά Sanger με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή αυτόματου αναλυτή. Κάθε βάση αναπαριστάται με μια καμπύλη που προκύπτει ως συνάρτηση της έντασης του σήματος φθορισμού και του χρόνου ηλεκτροφόρησης. Καθένα από τα τέσσερα χρώματα (κόκκινο, πράσινο, μπλε και μαύρο) αντιστοιχεί σε διαφορετική βάση του DNA (αδερίνη, γουανίνη, θυμίνη και κυτοσίνη) [192]

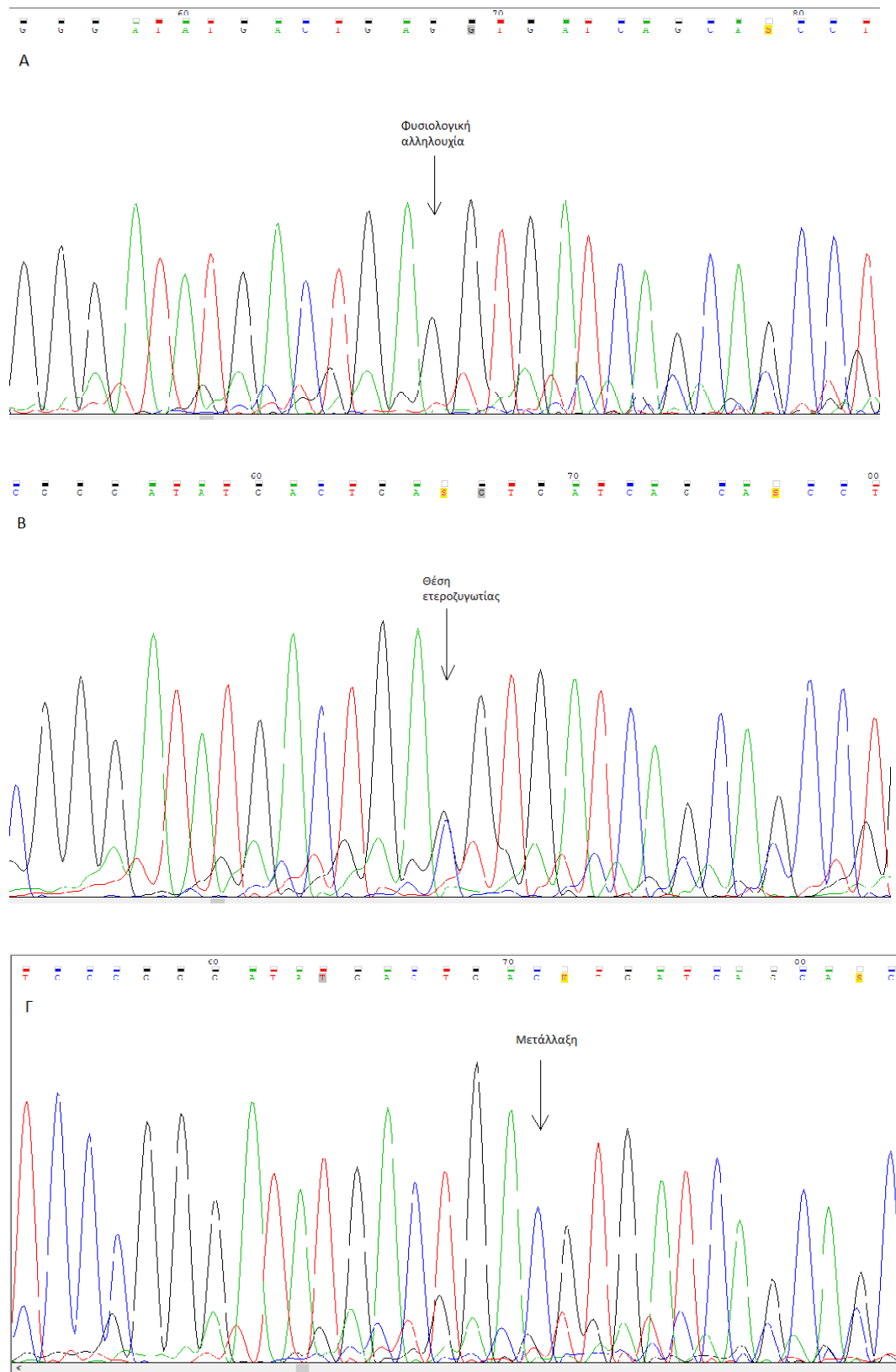
Υπάρχουν πολλές εφαρμογές λογισμικού που βοηθούν στην επεξεργασία και ανάλυση των αλληλουχιών DNA κι επιτρέπουν τη σύγκριση της προσδιορισθείσας αλληλουχίας με άλλες γνωστές αλληλουχίες DNA, οι οποίες έχουν καταχωρηθεί σε ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων. Στην παρούσα εργασία για τη σύγκριση των προσδιορισθέντων αλληλουχιών με ομόλογες αλληλουχίες, με σκοπό την ανίχνευση των πολυμορφισμών, έγινε χρήση του προγράμματος NCBI-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από την αλληλούχηση κατά Sanger για τους πολυμορφισμούς υψηλού κινδύνου Y402H και A69S στα γονίδια CFH και ARMS2 αντίστοιχα, καθώς και για τους πολυμορφισμούς με προστατευτική δράση, E318D και IVS10 στο γονίδιο C2, και L9H και IVS17 στο γονίδιο CFB, παρουσιάζονται στις εικόνες 2.7 - 2.12 που ακολουθούν.



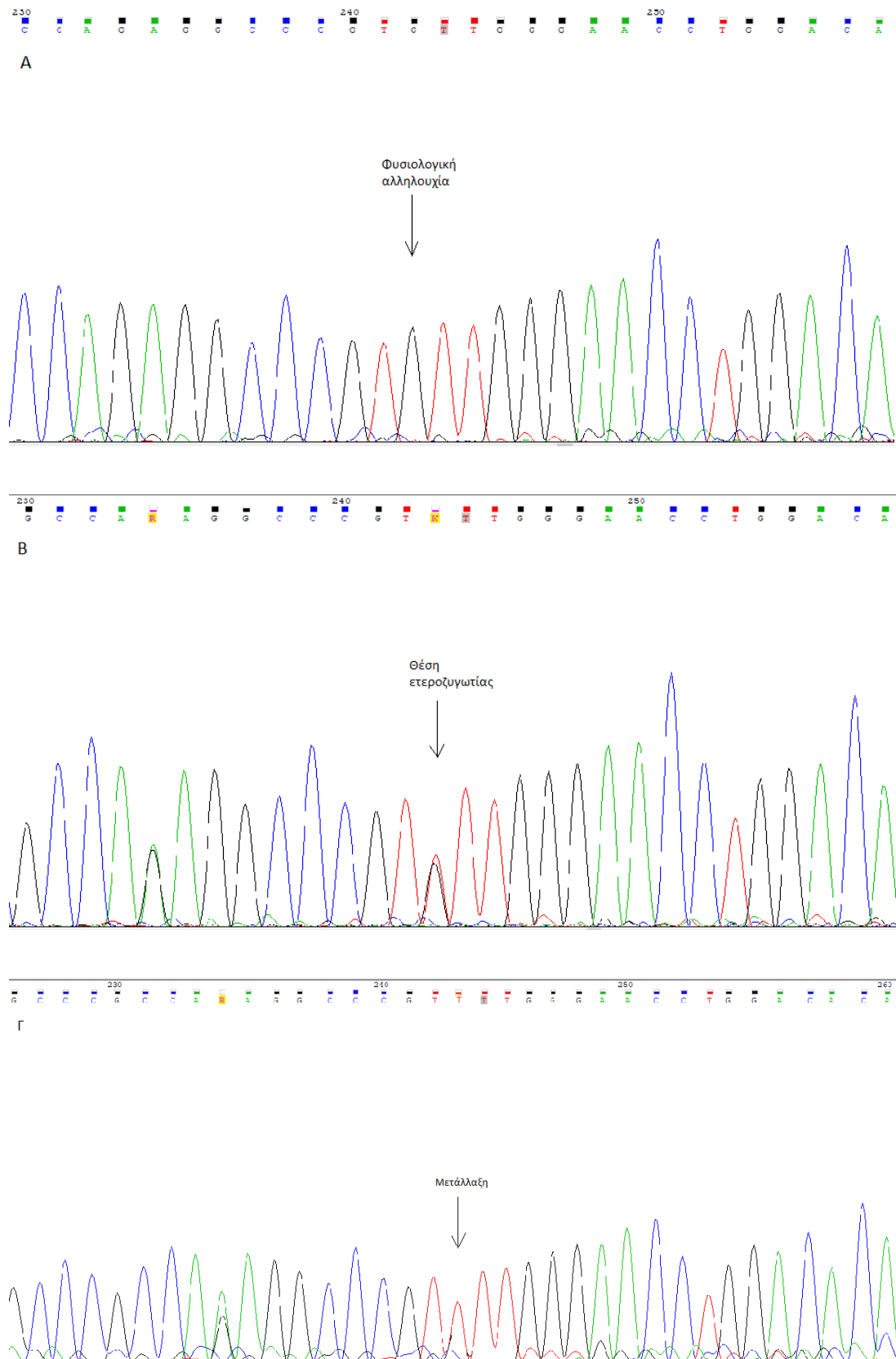
Εικόνα 2.7. Χρωματογράφημα αλληλούχησης κατά Sanger για Α) ομοζυγώτη φυσιολογικό ΤΤ, Β) ετεροζυγώτη C/T και Γ) ομοζυγώτη μεταλλαγμένο CC για τον πολυμορφισμό Y402H στο γονίδιο CFH



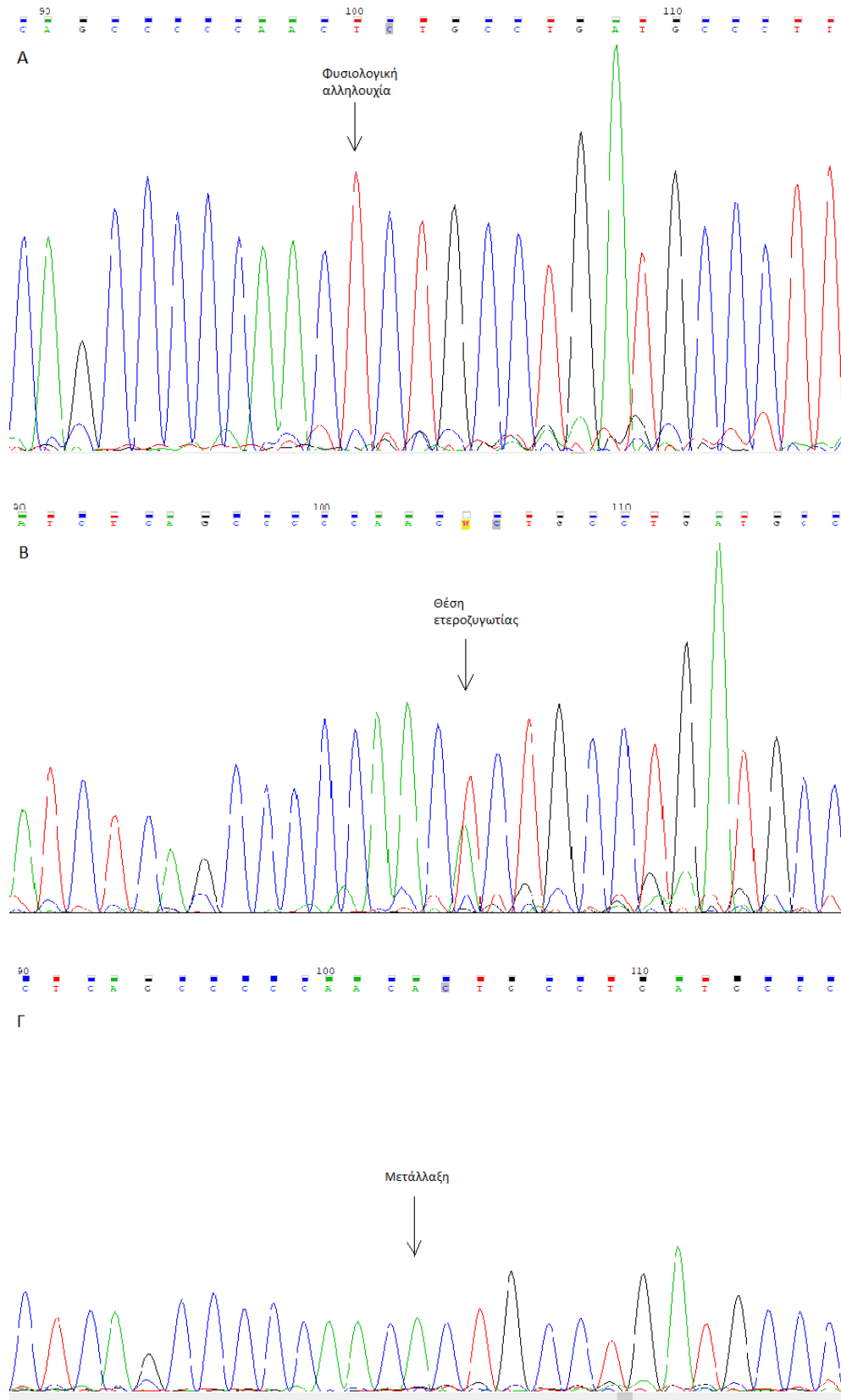
Εικόνα 2.8. Χρωματογράφημα αλληλούχησης κατά Sanger για A) ομοζυγώτη φυσιολογικό GG, B) ετεροζυγώτη G/T και Γ) ομοζυγώτη μεταλλαγμένο TT για τον πολυμορφισμό A69S στο γονίδιο ARMS2



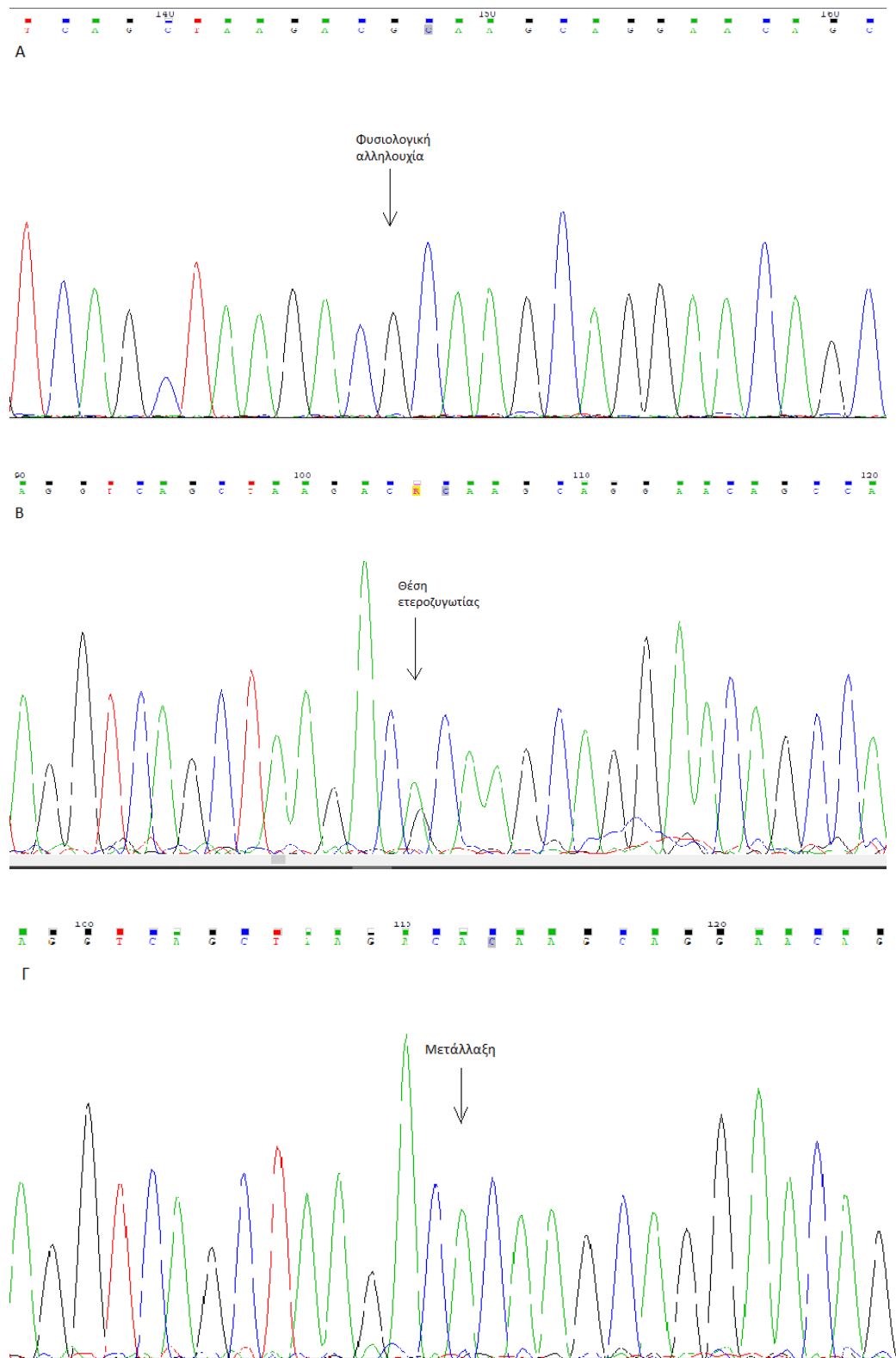
Εικόνα 2.9. Χρωματογράφημα αλληλούχησης κατά Sanger για Α) ομοζυγώτη φυσιολογικό GG, Β) ετεροζυγώτη G/C και Γ) ομοζυγώτη μεταλλαγμένο CC για τον πολυμορφισμό E318D στο γονίδιο C2



Εικόνα 2.10. Χρωματογράφημα αλληλούχησης κατά Sanger για Α) ομοζυγώτη φυσιολογικό GG, Β) ετεροζυγώτη G/T και Γ) ομοζυγώτη μεταλλαγμένο TT για τον πολυμορφισμό IVS10 στο γονίδιο C2



Εικόνα 2.11. Χρωματογράφημα αλληλούχησης κατά Sanger για A) ομοζυγώτη φυσιολογικό GG, B) ετεροζυγώτη G/A και Γ) ομοζυγώτη μεταλλαγμένο AA για τον πολυμορφισμό L9H στο γονίδιο CFB



Εικόνα 2.12. Χρωματογράφημα αλληλούχησης κατά Sanger για Α) ομοζυγώτη φυσιολογικό GG, Β) ετεροζυγώτη G/A και Γ) ομοζυγώτη μεταλλαγμένο AA για τον πολυμορφισμό IVS17 στο γονίδιο CFB

2.8. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η αξιολόγηση της ανταπόκρισης των ασθενών στην εφαρμοζόμενη θεραπεία έγινε μετά από σύγκριση της οπτικής τους οξύτητας και του OCT κατά την έναρξη και μετά το πέρας της θεραπείας. Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε αυτούς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία και σε αυτούς που δεν ανταποκρίθηκαν, με κριτήριο τις μετρήσεις της οπτικής οξύτητας και την εικόνα του OCT. Όσον αφορά την ομάδα Α (ξηρού τύπου ΗΕΩ), οι ασθενείς που διατήρησαν ή βελτίωσαν την οπτική τους οξύτητα και στους οποίους δεν παρατηρήθηκε καμία ανατομική αλλαγή του αμφιβληστροειδούς με βάση την εικόνα του OCT μετά το πέρας της θεραπείας, θεωρήθηκε ότι ανταποκρίθηκαν, ενώ όλοι οι άλλοι ότι δεν ανταποκρίθηκαν. Αναφορικά με την ομάδα Β (υγρού τύπου ΗΕΩ), οι ασθενείς που διατήρησαν ή βελτίωσαν την οπτική τους οξύτητα και στους οποίους δεν παρατηρήθηκε υποαμφιβληστροειδικό ή ενδοαμφιβληστροειδικό υγρό τουλάχιστον έναν μήνα μετά την τρίτη ένεση με βάση την εικόνα του OCT, θεωρήθηκε ότι ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία, ενώ όλοι οι άλλοι ότι δεν ανταποκρίθηκαν.

Η ανταπόκριση στη θεραπεία συσχετίστηκε στατιστικά με τους γονοτύπους των ασθενών για κάθε εξεταζόμενο πολυμορφισμό. Ο έλεγχος στατιστικής συσχέτισης των πολυμορφισμών με την ανταπόκριση στη θεραπεία στις δύο ομάδες των ασθενών πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό κριτήριο χ^2_{N-1} ("N-1" Chi-squared test) [194], από το οποίο προέκυψε η τιμή P (p-value) και τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης 95% [confidence intervals (95%CIs)]. Το κριτικό επίπεδο σημαντικότητας καθορίστηκε ως τιμή P κάτω από 0.05 (p-value <0.05). Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS (version 20. IBM SPSS STATISTICS).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο πληθυσμός της μελέτης μας περιλάμβανε 222 άτομα. Από αυτά τα 170, ήταν ασθενείς με ΗΕΩ ξηρού τύπου (Ομάδα Α) και τα 52 ήταν ασθενείς με ΗΕΩ υγρού τύπου (Ομάδα Β). Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού μελέτης παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1.

ΟΜΑΔΑ Α: ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΗΕΩ ΞΗΡΟΥ ΤΥΠΟΥ	
ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ	ΣΥΝΟΛΟ
Αριθμός ασθενών	170
Μέσος όρος ηλικίας (έτη)	73
Άνδρες/Γυναίκες	53/117
Ανταποκριθέντες/Μη ανταποκριθέντες	100/70
Ποσοστό ανταπόκρισης (%)	58.8
ΟΜΑΔΑ Β: ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΗΕΩ ΥΓΡΟΥ ΤΥΠΟΥ	
ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ	ΣΥΝΟΛΟ
Αριθμός ασθενών	52
Μέσος όρος ηλικίας (έτη)	76
Άνδρες/Γυναίκες	19/33
Ανταποκριθέντες/Μη ανταποκριθέντες	34/18
Ποσοστό ανταπόκρισης (%)	65

Πίνακας 3.1. Δημογραφικά χαρακτηριστικά πληθυσμού μελέτης

Σε όλους τους ασθενείς, με εφαρμογή της PCR και της αλληλούχισης κατά Sanger, πραγματοποιήθηκε με επιτυχία ο προσδιορισμός του γονοτύπου τους για τους πολυμορφισμούς rs1061170 [Y402H] (γονίδιο CFH), rs10490924 [A69S] (γονίδιο ARMS2), rs9332739 [E318D] και rs547154 [IVS10] (γονίδιο C2), rs4151667 [L9H] και rs2072633 [IVS17] (γονίδιο CFB).

Οι πολυμορφισμοί στα γονίδια CFH και ARMS2 έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση της ΗΕΩ αφού απαντώνται σε μεγαλύτερο ποσοστό στους ασθενείς (πολυμορφισμοί υψηλού κινδύνου), ενώ οι πολυμορφισμοί στα γονίδια C2 και CFB φαίνεται να έχουν προστατευτική δράση αφού απαντώνται σε μικρότερο ποσοστό στους ασθενείς σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (προστατευτικοί πολυμορφισμοί).

Με τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που ακολούθησε, διερευνήθηκε η συσχέτιση του γονοτύπου με την ανταπόκριση στη θεραπεία, που εφαρμόστηκε σε κάθε ομάδα ασθενών.

3.1. ΟΜΑΔΑ Α (ΗΕΩ ΞΗΡΟΥ ΤΥΠΟΥ)

3.1.1 ΓΟΝΙΔΙΑ ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ CFH-ARMS2 / ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

- **Πολυμορφισμός rs1061170 [Y402H] (CFH gene)**

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό CFH Y402H (rs1061170), το 30.6% των ασθενών είχαν γονότυπο TT (φυσικού τύπου), το 51.2% των ασθενών είχαν γονότυπο TC (ετεροζυγώτες) και το 18.2% γονότυπο CC (ομοζυγώτες) (πίνακας 3.2).

Γονότυπος CFH Y402H	Αριθμός ατόμων	Γονοτυπικές συχνότητες
TT	52	0.306
TC	87	0.512
CC	31	0.182
Σύνολο	170	1

Πίνακας 3.2. Γονοτυπικές συχνότητες ασθενών για τον πολυμορφισμό rs1061170

Στον πίνακα 3.3. που ακολουθεί παρουσιάζεται η στατιστική ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της ανταπόκρισης στη χορήγηση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής και της κάθε γονοτυπικής ομάδας ασθενών για τον πολυμορφισμό CFH rs1061170.

Locus / SNP	Genotype	Number of patients (%responders)	P-value	95% CI
CFH rs1061170	WT	52 (75.0%)	P = 0.0046	7.4194% to 36.5317%
	HET/HOM	118 (51.7%)		
	WT	52 (75.0%)	P = 0.0692	-1.1722% to 29.5442%
	HET	87 (59.8%)		
	WT	52 (75.0%)	P < 0.0001	24.0287% to 62.2030%
	HOM	31 (29.0%)		
	HET	87 (59.8%)	P = 0.0033	10.3380% to 46.9488%
	HOM	31 (29.0%)		

Πίνακας 3.3. Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης της ανταπόκρισης στη θεραπεία με τη κάθε γονοτυπική ομάδα ασθενών για τον πολυμορφισμό CFH rs1061170. Η σύγκριση του ποσοστού ανταπόκρισης έγινε ανάμεσα στην ομάδα ασθενών φυσικού τύπου (WT) και στην ομάδα ασθενών που ήταν ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες (HET/HOM), μόνο ετεροζυγώτες (HET) και μόνο ομοζυγώτες (HOM)

Από τη στατιστική ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της κάθε γονοτυπικής ομάδας ασθενών για το γονίδιο CFH και της ανταπόκρισης στη λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής, προέκυψε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Το 75.0% των ασθενών που ανταποκρίθηκαν, δεν έφεραν το υψηλού κινδύνου αλληλόμορφο C (γονότυπος TT - φυσικού τύπου). Τα γκρουπ των ασθενών με γονότυπους TC (ετεροζυγώτες) και CC (ομοζυγώτες) είχαν σημαντικά μικρότερη πιθανότητα να ανταποκριθούν σε σύγκριση με τους ασθενείς φυσικού τύπου ($p=0.005$, 95% CI: 7.419-36.532). Επιπροσθέτως, ασθενείς ομόζυγοι για τα υψηλού κινδύνου αλληλόμορφα στο CFH (γονότυπος CC) παρουσίασαν σημαντικά χειρότερα οπτικά αποτελέσματα και είχαν μικρότερη πιθανότητα να ανταποκριθούν και να σταθεροποιήσουν την οπτική τους οξύτητα συγκριτικά με τους ασθενείς φυσικού

τύπου (γονότυπος ΤΤ) ($p < 0.001$, 95% CI: 24.029-62.203) και τους ετερόζυγους ασθενείς (γονότυπος ΤC) ($p = 0.003$, 95% CI: 10.338-46.949).

- **Πολυμορφισμός rs10490924 [A69S] (ARMS2 gene)**

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό ARMS2 A69S (rs10490924), το 54.1% των ασθενών είχαν γονότυπο GG (φυσικού τύπου), το 38.8% των ασθενών είχαν γονότυπο GT και το 7.1% γονότυπο ΤΤ (πίνακας 3.4).

Γονότυπος ARMS2 A69S	Αριθμός ατόμων	Γονοτυπικές συχνότητες
GG	92	0.541
GT	66	0.388
ΤΤ	12	0.071
Σύνολο	170	1

Πίνακας 3.4. Γονοτυπικές συχνότητες ασθενών για τον πολυμορφισμό rs10490924

Στον πίνακα 3.5. που ακολουθεί παρουσιάζεται η στατιστική ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της ανταπόκρισης στη χορήγηση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής και της κάθε γονοτυπικής ομάδας ασθενών για τον πολυμορφισμό ARMS2 rs10490924.

Locus / SNP	Genotype	Number of patients (%responders)	P-value	95% CI
ARMS2 rs10490924	WT	92 (62.0%)	P = 0.3638	-7.7742% to 21.2852%
	HET/HOM	78 (55.1%)		
	WT	92 (62.0%)	P = 0.7136	-12.1384% to 18.0836%
	HET	66 (59.1%)		
	WT	92 (62.0%)	P = 0.0588	-0.7358% to 50.2901%
	HOM	12 (33.3%)		
	HET	66 (59.1%)	P = 0.1005	-4.3201% to 48.2164%
	HOM	12 (33.3%)		

Πίνακας 3.5. Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης της ανταπόκρισης στη θεραπεία με τη κάθε γονοτυπική ομάδα ασθενών για τον πολυμορφισμό ARMS2 rs10490924. Η σύγκριση του ποσοστού ανταπόκρισης έγινε ανάμεσα στην ομάδα ασθενών φυσικού τύπου (WT) και στην ομάδα ασθενών που ήταν ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες (HET/HOM), μόνο ετεροζυγώτες (HET) και μόνο ομοζυγώτες (HOM)

Η μελέτη μας δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού στο γονίδιο ARMS2 και της ανταπόκρισης στη θεραπεία αφού από τη στατιστική ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της κάθε γονοτυπικής ομάδας ασθενών για το γονίδιο ARMS2 και της ανταπόκρισης στη λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.

3.1.2 ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ C2-CFB / ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Στους ασθενείς στους οποίους ανιχνεύεται είτε ο πολυμορφισμός Y402H του γονιδίου CFH, είτε ο πολυμορφισμός A69S του γονιδίου ARMS2, είτε και οι δύο, γίνεται διερεύνηση των τεσσάρων ακόμα προστατευτικών πολυμορφισμών στο γονίδιο CFB και στο γονίδιο C2. Το σύνολο που εξετάστηκε για τους πολυμορφισμούς αυτούς είναι 142 ασθενείς. Σχετικά με τους προστατευτικούς πολυμορφισμούς στα γονίδια C2 και CFB, προέκυψε σημαντικά στατιστική συσχέτιση μεταξύ αυτών των πολυμορφισμών και της ανταπόκρισης στη θεραπεία.

- **Πολυμορφισμός rs9332739 [E318D]/C2**

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό C2 [E318D] (rs9332739), το 93.0% των ασθενών είχαν γονότυπο GG (φυσικού τύπου), το 6.3% των ασθενών είχαν γονότυπο GC και το 0.7% γονότυπο CC (πίνακας 3.6).

Γονότυπος [E318D]/C2	Αριθμός ατόμων	Γονοτυπικές συχνότητες
GG	132	0.930
GC	9	0.063
CC	1	0.007
Σύνολο	142	1

Πίνακας 3.6. Γονοτυπικές συχνότητες ασθενών για τον πολυμορφισμό rs9332739

Στον πίνακα 3.7. που ακολουθεί παρουσιάζεται η στατιστική ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της ανταπόκρισης στη χορήγηση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής και της κάθε γονοτυπικής ομάδας ασθενών για τον πολυμορφισμό C2 rs9332739.

Locus / SNP	Genotype	Number of patients (%responders)	P-value	95% CI
C2 rs9332739	WT	132 (52.3%)	P = 0.0035	18.7223% to 56.1646%
	HET/HOM	10 (100.0%)		
	WT	132 (52.3%)	P = 0.0055	16.6462% to 56.1646%
	HET	9 (100.0%)		
	WT	132 (52.3%)	P = 0.3430	-32.0816% to 56.1646%
	HOM	1 (100.0%)		

Πίνακας 3.7. Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης της ανταπόκρισης στη θεραπεία με τη κάθε γονοτυπική ομάδα ασθενών για τον πολυμορφισμό C2 rs9332739. Η σύγκριση του ποσοστού ανταπόκρισης έγινε ανάμεσα στην ομάδα ασθενών φυσικού τύπου (WT) και στην ομάδα ασθενών που ήταν ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες (HET/HOM), μόνο ετεροζυγώτες (HET) και μόνο ομοζυγώτες (HOM)

Από τη στατιστική ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ του πολυμορφισμού C2 rs9332739 και της ανταπόκρισης στη λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής, προέκυψε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p=0.004$, 95% CI: 18.722-56.165). Όσοι από τους ασθενείς έφεραν το προστατευτικό C αλληλόμορφο (γονότυποι GC και CC), σταθεροποίησαν την οπτική τους οξύτητα και την εικόνα του OCT ανταποκρινόμενοι στη θεραπεία.

- Πολυμορφισμός rs547154[IVS10]/C2

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό C2 [IVS10] (rs547154), το 95.1% των ασθενών είχαν γονότυπο GG (φυσικού τύπου), και το 4.9% των ασθενών είχαν γονότυπο GT (πίνακας 3.8).

Γονότυπος [IVS10]/C2	Αριθμός ατόμων	Γονοτυπικές συχνότητες
GG	135	0.951
GT	7	0.049
TT	0	0
Σύνολο	142	1

Πίνακας 3.8. Γονοτυπικές συχνότητες ασθενών για τον πολυμορφισμό rs547154

Στον πίνακα 3.9. που ακολουθεί παρουσιάζεται η στατιστική ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της ανταπόκρισης στη χορήγηση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής και της κάθε γονοτυπικής ομάδας ασθενών για τον πολυμορφισμό C2 rs547154.

Locus / SNP	Genotype	Number of patients (%responders)	P-value	95% CI
C2 rs547154	WT	135 (54.1%)	P = 0.1020	-6.3188% to 46.0273%
	HET	7 (85.7%)		

Πίνακας 3.9. Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης της ανταπόκρισης στη θεραπεία με τη κάθε γονοτυπική ομάδα ασθενών για τον πολυμορφισμό C2 rs547154. Η σύγκριση του ποσοστού ανταπόκρισης έγινε ανάμεσα στην ομάδα ασθενών φυσικού τύπου (WT) και στην ομάδα ασθενών που ήταν ετεροζυγώτες (HET)

Από την παρούσα μελέτη, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού αυτού και της ανταπόκρισης στη θεραπεία ($p = 0.102$).

- **Πολυμορφισμός rs4151667 [L9H]/CFB**

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό CFB [L9H] (rs4151667), το 93.0% των ασθενών είχαν γονότυπο ΤΤ (φυσικού τύπου), το 6.3% των ασθενών είχαν γονότυπο ΤΑ και το 0.7% γονότυπο ΑΑ (πίνακας 3.10).

Γονότυπος [L9H]/CFB	Αριθμός ατόμων	Γονοτυπικές συχνότητες
ΤΤ	132	0.930
ΤΑ	9	0.063
ΑΑ	1	0.007
Σύνολο	142	1

Πίνακας 3.10. Γονοτυπικές συχνότητες ασθενών για τον πολυμορφισμό rs4151667

Στον πίνακα 3.11. που ακολουθεί παρουσιάζεται η στατιστική ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της ανταπόκρισης στη χορήγηση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής και της κάθε γονοτυπικής ομάδας ασθενών για τον πολυμορφισμό CFB rs4151667.

Locus / SNP	Genotype	Number of patients (%responders)	P-value	95% CI
CFB rs4151667	WT	132 (52.3%)	P = 0.0035	18.7223% to 56.1646%
	HET/HOM	10 (100.0%)		
	WT	132 (52.3%)	P = 0.0055	16.6462% to 56.1646%
	HET	9 (100.0%)		
	WT	132 (52.3%)	P = 0.3430	-32.0816% to 56.1646%
	HOM	1 (100.0%)		

Πίνακας 3.11. Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης της ανταπόκρισης στη θεραπεία με τη κάθε γονοτυπική ομάδα ασθενών για τον πολυμορφισμό CFB rs4151667. Η σύγκριση του ποσοστού ανταπόκρισης έγινε ανάμεσα στην ομάδα ασθενών φυσικού τύπου (WT) και στην ομάδα ασθενών που ήταν ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες (HET/HOM), μόνο ετεροζυγώτες (HET) και μόνο ομοζυγώτες (HOM)

Από τη στατιστική ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ του πολυμορφισμού αυτού και της ανταπόκρισης στη λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής, προέκυψε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p=0.004$, 95% CI: 18.722-56.165). Όσοι από τους ασθενείς έφεραν το προστατευτικό A αλληλόμορφο (γονότυποι TA και AA), σταθεροποίησαν την οπτική τους οξύτητα και την εικόνα του OCT ανταποκρινόμενοι στη θεραπεία.

- **Πολυμορφισμός rs2072633[IVS17]/CFB**

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό CFB [IVS17] (rs2072633), το 79.6% των ασθενών είχαν γονότυπο GG (φυσικού τύπου), το 19.0% των ασθενών είχαν γονότυπο GA και το 1.4% γονότυπο AA (πίνακας 3.12).

Γονότυπος [IVS17]/CFB	Αριθμός ατόμων	Γονοτυπικές συχνότητες
GG	113	0.796
GA	27	0.190
AA	2	0.014
Σύνολο	142	1

Πίνακας 3.12. Γονοτυπικές συχνότητες ασθενών για τον πολυμορφισμό rs2072633

Στον πίνακα 3.13. που ακολουθεί παρουσιάζεται η στατιστική ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της ανταπόκρισης στη χορήγηση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής και της κάθε γονοτυπικής ομάδας ασθενών για τον πολυμορφισμό CFB rs2072633.

Locus / SNP	Genotype	Number of patients (%responders)	P-value	95% CI
CFB rs2072633	WT	113 (47.8%)	P = 0.0002	19.3083% to 50.6311%
	HET/HOM	29 (86.2%)		
	WT	113 (47.8%)	P = 0.0005	17.5183% to 50.0418%
	HET	27 (85.2%)		
	WT	113 (47.8%)	P = 0.1449	-14.1927% to 61.1853%
	HOM	2 (100.0%)		
	HET	27 (85.2%)	P = 0.5648	-51.5605% to 32.4614%
	HOM	2 (100.0%)		

Πίνακας 3.13. Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης της ανταπόκρισης στη θεραπεία με τη κάθε γονοτυπική ομάδα ασθενών για τον πολυμορφισμό CFB rs2072633. Η σύγκριση του ποσοστού ανταπόκρισης έγινε ανάμεσα στην ομάδα ασθενών φυσικού τύπου (WT) και στην ομάδα ασθενών που ήταν ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες (HET/HOM), μόνο ετεροζυγώτες (HET) και μόνο ομοζυγώτες (HOM)

Από τη στατιστική ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ του πολυμορφισμού αυτού και της ανταπόκρισης των ασθενών στη λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής προέκυψε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, αφού ασθενείς που έφεραν το προστατευτικό A αλληλόμορφο (γονότυποι GA και AA) είχαν σημαντικά μεγαλύτερη πιθανότητα να ανταποκριθούν στη λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής συγκριτικά με τους ασθενείς φυσικού τύπου με γονότυπο GG ($p < 0.001$, 95% CI: 19.308-50.631).

Γενικότερα, η παρουσία τουλάχιστον ενός από τους προστατευτικούς πολυμορφισμούς στο γονότυπο των ασθενών φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ανταπόκριση στη θεραπεία. Ασθενείς που έφεραν τουλάχιστον έναν από τους προστατευτικούς πολυμορφισμούς στα γονίδια C2 ή CFB, είχαν σημαντικά μεγαλύτερη πιθανότητα να ανταποκριθούν στη λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής και να σταθεροποιήσουν την οπτική τους οξύτητα και την εικόνα του OCT συγκριτικά με τους ασθενείς που δεν έφεραν κανέναν προστατευτικό πολυμορφισμό ($p < 0.001$, 95% CI: 27.519-55.894). Το 88.9% των ασθενών που έφερε τουλάχιστον έναν από τους προστατευτικούς πολυμορφισμούς στα γονίδια C2 ή CFB ανταποκρίθηκε στη θεραπεία (πίνακας 3.14).

Locus / SNP	Genotype	Number of patients (%responders)	P-value	95% CI
C2/CFB At least 1 protective SNP	WT	106 (44.3%)	P < 0.0001	27.5192% to 55.8942%
	HET/HOM	36 (88.9%)		

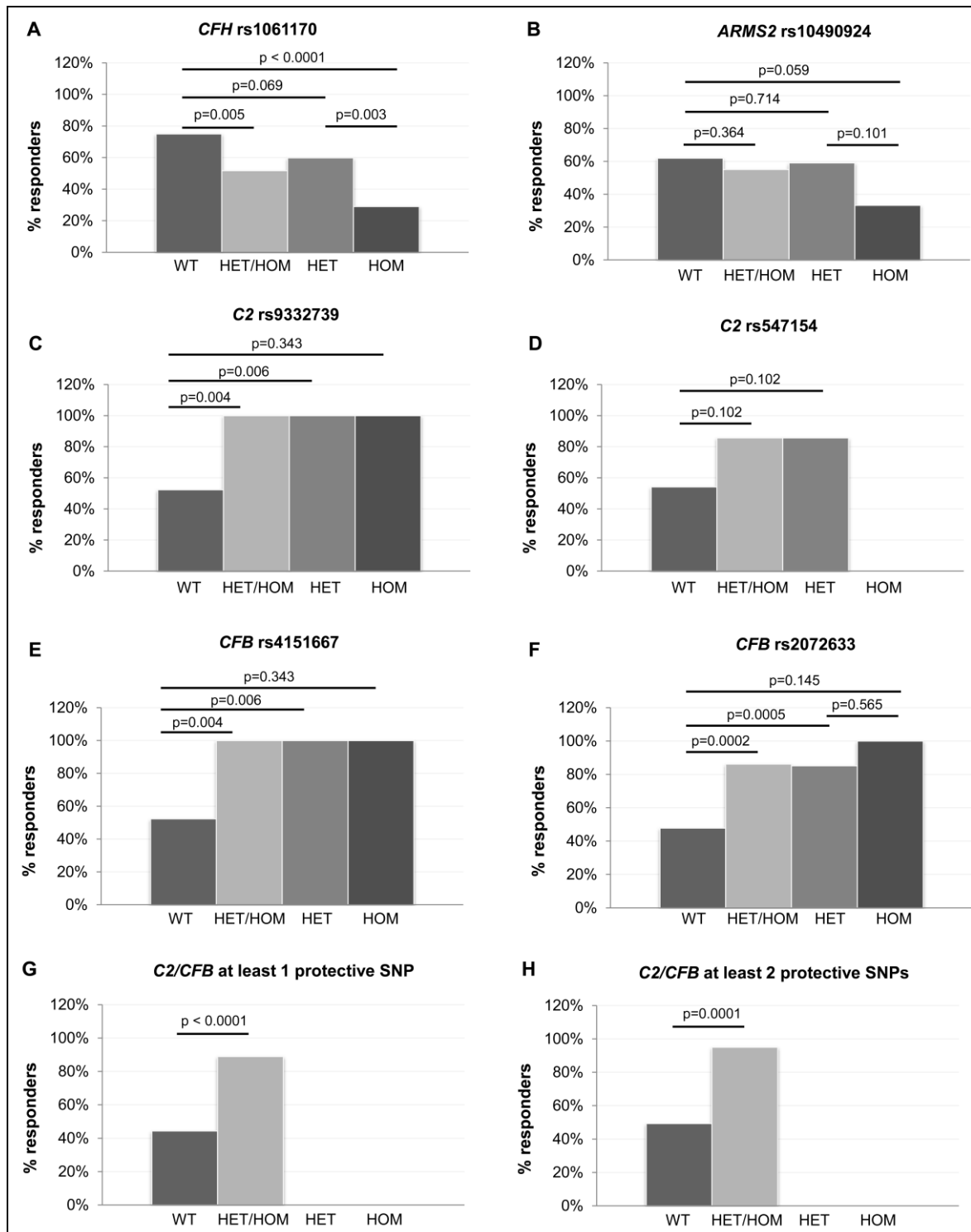
Πίνακας 3.14. Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης της ανταπόκρισης στη θεραπεία με τη κάθε γονοτυπική ομάδα ασθενών που έφερε τουλάχιστον 1 προστατευτικό πολυμορφισμό στα γονίδια C2 ή CFB. Η σύγκριση του ποσοστού ανταπόκρισης έγινε ανάμεσα στην ομάδα ασθενών φυσικού τύπου (WT) και στην ομάδα ασθενών που ήταν ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες (HET/HOM)

Η πιθανότητα για θετικό αποτέλεσμα αυξάνεται σημαντικά όταν οι ασθενείς φέρουν τουλάχιστον 2 προστατευτικούς πολυμορφισμούς. Ασθενείς που έφεραν τουλάχιστον δύο από τους προστατευτικούς πολυμορφισμούς στα γονίδια C2 ή CFB, είχαν σημαντικά μεγαλύτερη πιθανότητα να ανταποκριθούν στη λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής συγκριτικά με τους ασθενείς που δεν έφεραν κανέναν προστατευτικό πολυμορφισμό ($p < 0.001$, 95% CI: 25.229-55.432). Το 95.0% των ασθενών που έφερε τουλάχιστον δύο από τους προστατευτικούς πολυμορφισμούς στα γονίδια C2 ή CFB ανταποκρίθηκε στη θεραπεία (πίνακας 3.15).

Locus / SNP	Genotype	Number of patients (%responders)	P-value	95% CI
C2/CFB At least 2 protective SNPs	WT	122 (49.2%)	P = 0.0001	25.2289% to 55.4321%
	HET/HOM	20 (95.0%)		

Πίνακας 3.15. Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης της ανταπόκρισης στη θεραπεία με τη κάθε γονοτυπική ομάδα ασθενών που έφερε τουλάχιστον 2 προστατευτικούς πολυμορφισμούς στα γονίδια C2 ή CFB. Η σύγκριση του ποσοστού ανταπόκρισης έγινε ανάμεσα στην ομάδα ασθενών φυσικού τύπου (WT) και στην ομάδα ασθενών που ήταν ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες (HET/HOM)

Συνοψίζοντας για την ομάδα A, τα συνολικά αποτελέσματα που αφορούν τη συσχέτιση των γονοτύπων των ασθενών με την ανταπόκριση στη λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής παρουσιάζονται στο γράφημα 3.1.



Γράφημα 3.1. Ποσοστό ανταπόκρισης στη λήψη αντιοξειδωτικών σκευασμάτων σε σχέση με τη γονοτυπική ομάδα των ασθενών για κάθε εξεταζόμενο πολυμορφισμό. Η σύγκριση του ποσοστού ανταπόκρισης έγινε ανάμεσα στην ομάδα ασθενών φυσικού τύπου (WT) και στην ομάδα ασθενών που ήταν ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες (HET/HOM), μόνο ετεροζυγώτες (HET) και μόνο ομοζυγώτες (HOM)

3.2.ΟΜΑΔΑ Β (ΗΕΩ ΥΓΡΟΥ ΤΥΠΟΥ)

3.2.1 ΓΟΝΙΔΙΑ ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ CFH-ARMS2 / ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

- **Πολυμορφισμός rs1061170 [Y402H] (CFH gene)**

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό CFH Y402H (rs1061170), το 13.5% των ασθενών με ΗΕΩ υγρού τύπου είχαν γονότυπο ΤΤ (φυσικού τύπου), το 61.5% είχαν γονότυπο ΤC και το 25% γονότυπο CС (πίνακας 3.16).

Γονότυπος CFH Y402H	Αριθμός ατόμων	Γονοτυπικές συχνότητες
ΤΤ	7	0.135
ΤC	32	0.615
СC	13	0.250
Σύνολο	52	1

Πίνακας 3.16. Γονοτυπικές συχνότητες ασθενών για τον πολυμορφισμό rs1061170

Στον πίνακα 3.17. που ακολουθεί παρουσιάζεται η στατιστική ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της ανταπόκρισης στις εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ranibizumab και της κάθε γονοτυπικής ομάδας ασθενών για τον πολυμορφισμό CFH rs1061170.

Locus / SNP	Genotype	Number of patients (%responders)	P-value	95% CI
CFH rs1061170	WT	7 (57.1%)	P = 0.6228	-21.1390% to 43.8439%
	HET/HOM	45 (66.7%)		
	WT	7 (57.1%)	P = 0.2554	-10.8882% to 54.8719%
	HET	32 (78.1%)		
	WT	7 (57.1%)	P = 0.4370	-22.7028% to 52.7026%
	HOM	13 (38.5%)		
	HET	32 (78.1%)	P = 0.0116	8.5914% to 63.0319%
	HOM	13 (38.5%)		

Πίνακας 3.17. Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης της ανταπόκρισης στη θεραπεία με τη κάθε γονοτυπική ομάδα ασθενών για τον πολυμορφισμό CFH rs1061170. Η σύγκριση του ποσοστού ανταπόκρισης έγινε ανάμεσα στην ομάδα ασθενών φυσικού τύπου (WT) και στην ομάδα ασθενών που ήταν ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες (HET/HOM), μόνο ετεροζυγώτες (HET) και μόνο ομοζυγώτες (HOM)

Από τη στατιστική ανάλυση, προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού αυτού στο γονίδιο CFH και της ανταπόκρισης στις ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ranibizumab. Οι ομόζυγοι ασθενείς για τα υψηλού κινδύνου αλληλόμορφα στο CFH (γονότυπος CC) εμφάνισαν σημαντικά χειρότερα αποτελέσματα θεραπείας σε σχέση με τους ετερόζυγους ασθενείς (γονότυπος TC) ($p=0.012$, 95% CI: 8.591-63.032). Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανταπόκριση στη θεραπεία για τον γονότυπο TT έναντι του γονοτύπου TC ($p=0.255$).

- **Πολυμορφισμός rs10490924 [A69S] (ARMS2 gene)**

Σχετικά με τον πολυμορφισμό ARMS2 A69S (rs10490924), το 46.2% των ασθενών με ΗΕΩ υγρού τύπου είχαν γονότυπο GG (φυσικού τύπου), το 48% είχαν γονότυπο GT και το 5.8% γονότυπο TT (πίνακας 3.18).

Γονότυπος ARMS2 A69S	Αριθμός ατόμων	Γονοτυπικές συχνότητες
GG	24	0.462
GT	25	0.480
TT	3	0.058
Σύνολο	52	1

Πίνακας 3.18. Γονοτυπικές συχνότητες ασθενών για τον πολυμορφισμό rs10490924

Στον πίνακα 3.19. που ακολουθεί παρουσιάζεται η στατιστική ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της ανταπόκρισης στις εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ranibizumab και της κάθε γονοτυπικής ομάδας ασθενών για τον πολυμορφισμό ARMS2 rs10490924.

Locus / SNP	Genotype	Number of patients (%responders)	P-value	95% CI
ARMS2 rs10490924	WT	24 (87.5%)	P = 0.0021	15.4511% to 59.8586%
	HET/HOM	28 (46.4%)		
	WT	24 (87.5%)	P = 0.0076	9.7072% to 55.7193%
	HET	25 (52.0%)		
	WT	24 (87.5%)	P = 0.0007	28.3799% to 95.6557%
	HOM	3 (0.0%)		
	HET	25 (52.0%)	P = 0.0938	-7.1193% to 69.9687%
	HOM	3 (0.0%)		

Πίνακας 3.19. Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης της ανταπόκρισης στη θεραπεία με τη κάθε γονοτυπική ομάδα ασθενών για τον πολυμορφισμό ARMS2 rs10490924. Η σύγκριση του ποσοστού ανταπόκρισης έγινε ανάμεσα στην ομάδα ασθενών φυσικού τύπου (WT) και στην ομάδα ασθενών που ήταν ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες (HET/HOM), μόνο ετεροζυγώτες (HET) και μόνο ομοζυγώτες (HOM)

Από την ανάλυση, προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού αυτού στο γονίδιο ARMS2 και της ανταπόκρισης στις ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ranibizumab. Το 87.5% των ασθενών που ανταποκρίθηκαν δεν έφεραν το υψηλού κινδύνου T αλληλόμορφο (γονότυπος GG). Τα γκρουπ των ασθενών με γονοτύπους GT και TT είχαν μικρότερη πιθανότητα να ανταποκριθούν σε σύγκριση με τους ασθενείς φυσικού τύπου ($p=0.002$, 95% CI: 15.451-59.859). Ασθενείς ομόζυγοι για τα υψηλού κινδύνου αλληλόμορφα στο ARMS2 (γονότυπος TT) παρουσίασαν σημαντικά χειρότερα οπτικά αποτελέσματα και είχαν μικρότερη πιθανότητα να ανταποκριθούν συγκριτικά με τους ασθενείς φυσικού τύπου ($p<0.001$, 95% CI: 28.380-95.656).

Εξετάζοντας την παρουσία ταυτόχρονα και των δύο πολυμορφισμών υψηλού κινδύνου στα γονίδια CFH και ARMS2 στο γονότυπο των ασθενών σε σχέση με την ανταπόκριση τους στη θεραπεία, προκύπτει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Ασθενείς οι οποίοι έφεραν και τους δύο πολυμορφισμούς υψηλού κινδύνου στο γονότυπό τους είχαν σημαντικά μικρότερη πιθανότητα να ανταποκριθούν στις εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ranibizumab συγκριτικά με τους ασθενείς που έφεραν μόνο έναν πολυμορφισμό υψηλού κινδύνου είτε στο γονίδιο CFH είτε στο γονίδιο ARMS2 ($p=0.029$, 95% CI: 3.304-51.912) (πίνακας 3.20).

Locus / SNP	Genotype	Number of patients (%responders)	P-value	95% CI
Both SNPs CFH and ARMS2	HET/HOM	23 (47.8%)	P = 0.0292	3.3041% to 51.9120%
Only 1 SNP/ CFH or ARMS2	HET/HOM	27 (77.8%)		
Only 1 SNP/ CFH	HET/HOM	22 (86.4%)	P = 0.0066	11.0866% to 59.1931%
Both SNPs CFH and ARMS2	HET/HOM	23 (47.8%)		
Only 1 SNP/ ARMS2	HET/HOM	5 (40.0%)	P = 0.7556	-33.5406% to 41.9552%
Both SNPs CFH and ARMS2	HET/HOM	23 (47.8%)		

Πίνακας 3.20. Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης της ανταπόκρισης στη θεραπεία μεταξύ ασθενών που έφεραν και τους δύο πολυμορφισμούς υψηλού κινδύνου με ασθενείς που έφεραν μόνο έναν πολυμορφισμό υψηλού κινδύνου στα γονίδια CFH ή ARMS2. Η σύγκριση του ποσοστού ανταπόκρισης έγινε ανάμεσα στις γονοτυπικές ομάδες ασθενών που ήταν ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες (HET/HOM) για τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς

3.2.2 ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ C2-CFB / ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Στους ασθενείς στους οποίους ανιχνεύεται είτε ο πολυμορφισμός Y402H του γονιδίου CFH, είτε ο πολυμορφισμός A69S του γονιδίου ARMS2, είτε και οι δύο, γίνεται διερεύνηση των τεσσάρων ακόμα προστατευτικών πολυμορφισμών στο γονίδιο CFB και στο γονίδιο C2. Το σύνολο που εξετάστηκε για τους πολυμορφισμούς αυτούς είναι 50 ασθενείς. Από την παρούσα μελέτη, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των προστατευτικών πολυμορφισμών στα γονίδια C2 και CFB και της ανταπόκρισης στις εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ranibizumab.

- **Πολυμορφισμός rs9332739 [E318D]/C2**

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό C2 [E318D] (rs9332739), το 98.0% των ασθενών είχαν γονότυπο GG (φυσικού τύπου) και το 2.0% των ασθενών είχαν γονότυπο GC (πίνακας 3.21).

Γονότυπος [E318D]/C2	Αριθμός ατόμων	Γονοτυπικές συχνότητες
GG	49	0.980
GC	1	0.020
CC	0	0
Σύνολο	50	1

Πίνακας 3.21. Γονοτυπικές συχνότητες ασθενών για τον πολυμορφισμό rs9332739

Στον πίνακα 3.22. που ακολουθεί παρουσιάζεται η στατιστική ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της ανταπόκρισης στις εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ranibizumab και της κάθε γονοτυπικής ομάδας ασθενών για τον πολυμορφισμό C2 rs9332739.

Locus / SNP	Genotype	Number of patients (%responders)	P-value	95% CI
C2 rs9332739	WT	49 (63.3%)	P = 0.4536	-43.5571% to 50.6984%
	HET	1 (100.0%)		

Πίνακας 3.22. Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης της ανταπόκρισης στη θεραπεία με τη κάθε γονοτυπική ομάδα ασθενών για τον πολυμορφισμό C2 rs9332739. Η σύγκριση του ποσοστού ανταπόκρισης έγινε ανάμεσα στην ομάδα ασθενών φυσικού τύπου (WT) και στην ομάδα ασθενών που ήταν ετεροζυγώτες (HET)

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs9332739 στο γονίδιο C2 και της ανταπόκρισης στις ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ($p=0.454$).

- **Πολυμορφισμός rs547154[IVS10]/C2**

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό C2 [IVS10] (rs547154), το 94.0% των ασθενών είχαν γονότυπο GG (φυσικού τύπου) και το 6.0% των ασθενών είχαν γονότυπο GT (πίνακας 3.23).

Γονότυπος [IVS10]/C2	Αριθμός ατόμων	Γονοτυπικές συχνότητες
GG	47	0.940
GT	3	0.060
TT	0	0
Σύνολο	50	1

Πίνακας 3.23. Γονοτυπικές συχνότητες ασθενών για τον πολυμορφισμό rs547154

Στον πίνακα 3.24. που ακολουθεί παρουσιάζεται η στατιστική ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της ανταπόκρισης στις εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ranibizumab και της κάθε γονοτυπικής ομάδας ασθενών για τον πολυμορφισμό C2 rs547154.

Locus / SNP	Genotype	Number of patients (%responders)	P-value	95% CI
C2 rs547154	WT	47 (61.7%)	P = 0.1847	-19.2259% to 52.5755%
	HET	3 (100.0%)		

Πίνακας 3.24. Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης της ανταπόκρισης στη θεραπεία με τη κάθε γονοτυπική ομάδα ασθενών για τον πολυμορφισμό C2 rs547154. Η σύγκριση του ποσοστού ανταπόκρισης έγινε ανάμεσα στην ομάδα ασθενών φυσικού τύπου (WT) και στην ομάδα ασθενών που ήταν ετεροζυγώτες (HET)

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs547154 στο γονίδιο C2 και της ανταπόκρισης στις ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ($p=0.185$).

- Πολυμορφισμός rs4151667 [L9H]/CFB

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό CFB [L9H] (rs4151667), το 98.0% των ασθενών είχαν γονότυπο ΤΤ (φυσικού τύπου) και το 2.0% των ασθενών είχαν γονότυπο ΤΑ (πίνακας 3.25).

Γονότυπος [L9H]/CFB	Αριθμός ατόμων	Γονοτυπικές συχνότητες
ΤΤ	49	0.980
ΤΑ	1	0.020
ΑΑ	0	0
Σύνολο	50	1

Πίνακας 3.25. Γονοτυπικές συχνότητες ασθενών για τον πολυμορφισμό rs4151667

Στον πίνακα 3.26. που ακολουθεί παρουσιάζεται η στατιστική ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της ανταπόκρισης στις εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ranibizumab και της κάθε γονοτυπικής ομάδας ασθενών για τον πολυμορφισμό CFB rs4151667.

Locus / SNP	Genotype	Number of patients (%responders)	P-value	95% CI
CFB rs4151667	WT	49 (63.3%)	P = 0.4536	-43.5571% to 50.6984%
	HET	1 (100.0%)		

Πίνακας 3.26. Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης της ανταπόκρισης στη θεραπεία με τη κάθε γονοτυπική ομάδα ασθενών για τον πολυμορφισμό CFB rs4151667. Η σύγκριση του ποσοστού ανταπόκρισης έγινε ανάμεσα στην ομάδα ασθενών φυσικού τύπου (WT) και στην ομάδα ασθενών που ήταν ετεροζυγώτες (HET)

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs4151667 στο γονίδιο CFB και της ανταπόκρισης στις ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ($p=0.454$).

- **Πολυμορφισμός rs2072633[IVS17]/CFB**

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό CFB [IVS17] (rs2072633), το 86.0% των ασθενών είχαν γονότυπο GG (φυσικού τύπου), το 8.0% των ασθενών είχαν γονότυπο GA και το 6.0% γονότυπο AA (πίνακας 3.27).

Γονότυπος [IVS17]/CFB	Αριθμός ατόμων	Γονοτυπικές συχνότητες
GG	43	0.860
GA	4	0.080
AA	3	0.060
Σύνολο	50	1

Πίνακας 3.27. Γονοτυπικές συχνότητες ασθενών για τον πολυμορφισμό rs2072633

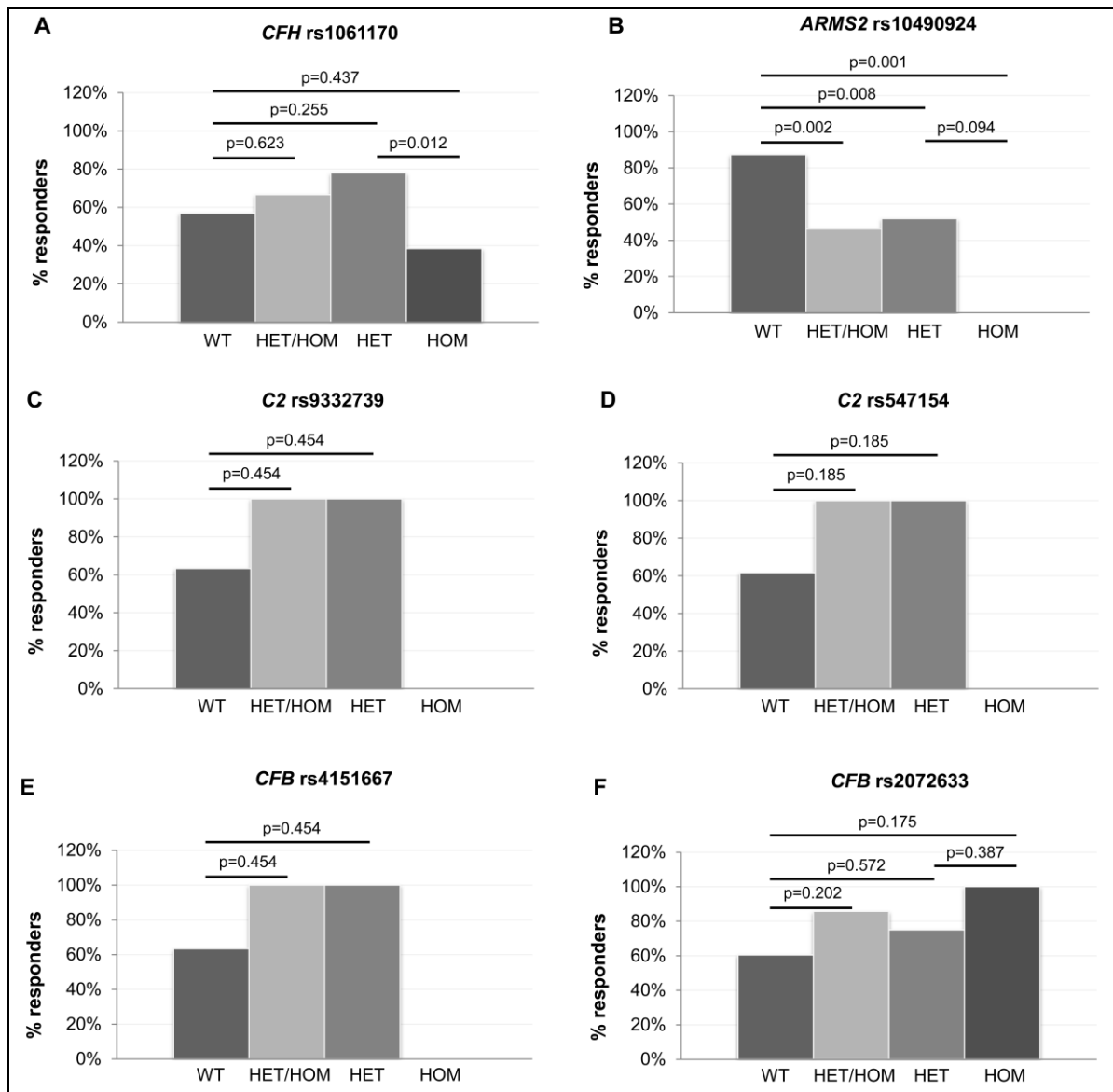
Στον πίνακα 3.28. που ακολουθεί παρουσιάζεται η στατιστική ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της ανταπόκρισης στις εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ranibizumab και της κάθε γονοτυπικής ομάδας ασθενών για τον πολυμορφισμό CFB rs2072633.

Locus / SNP	Genotype	Number of patients (%responders)	P-value	95% CI
CFB rs2072633	WT	43 (60.5%)	P = 0.2022	-14.0975% to 44.1515%
	HET/HOM	7 (85.7%)		
	WT	43 (60.5%)	P = 0.5723	-32.3245% to 39.7877%
	HET	4 (75.0%)		
	WT	43 (60.5%)	P = 0.1752	-18.1723% to 54.3870%
	HOM	3 (100.0%)		
	HET	4 (75.0%)	P = 0.3865	-34.7548% to 69.9358%
	HOM	3 (100.0%)		

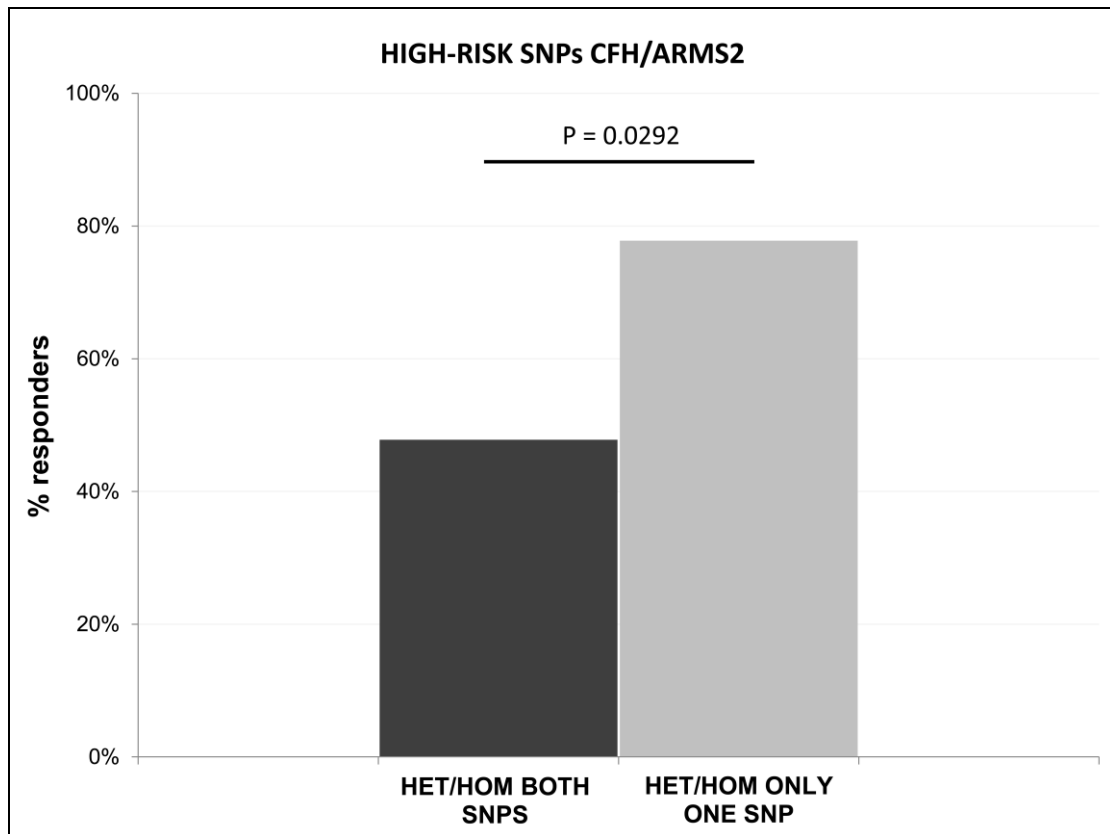
Πίνακας 3.28. Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης της ανταπόκρισης στη θεραπεία με τη κάθε γονοτυπική ομάδα ασθενών για τον πολυμορφισμό CFB rs2072633. Η σύγκριση του ποσοστού ανταπόκρισης έγινε ανάμεσα στην ομάδα ασθενών φυσικού τύπου (WT) και στην ομάδα ασθενών που ήταν ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες (HET/HOM), μόνο ετεροζυγώτες (HET) και μόνο ομοζυγώτες (HOM)

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs2072633 στο γονίδιο CFB και της ανταπόκρισης στις ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ($p=0.202$).

Συνοψίζοντας για την ομάδα Β, τα συνολικά αποτελέσματα που αφορούν τη συσχέτιση των γονοτύπων των ασθενών με την ανταπόκριση στις εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ranibizumab παρουσιάζονται στα γραφήματα 3.2. και 3.3.



Γράφημα 3.2. Ποσοστό ανταπόκρισης στις εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ranibizumab σε σχέση με τη γονοτυπική ομάδα των ασθενών για κάθε εξεταζόμενο πολυμορφισμό. Η σύγκριση του ποσοστού ανταπόκρισης έγινε ανάμεσα στην ομάδα ασθενών φυσικού τύπου (WT) και στην ομάδα ασθενών που ήταν ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες (HET/HOM), μόνο ετεροζυγώτες (HET) και μόνο ομοζυγώτες (HOM)



Γράφημα 3.3. Ποσοστό ανταπόκρισης στην αντι-VEGF θεραπεία ασθενών που έφεραν και τους δύο πολυμορφισμούς υψηλού κινδύνου στα γονίδια CFH και ARMS2 και ασθενών που έφεραν μόνο έναν πολυμορφισμό υψηλού κινδύνου στα γονίδια CFH ή ARMS2. Η σύγκριση του ποσοστού ανταπόκρισης έγινε ανάμεσα στις γονοτυπικές ομάδες ασθενών που ήταν ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες (HET/HOM) για τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό να διερευνήσει τη συσχέτιση πολυμορφισμών γονιδίων, που εμπλέκονται στην παθογένεια της ΗΕΩ, με την ανταπόκριση στη θεραπεία, σε δείγμα 222 Ελλήνων ασθενών. Εξετάστηκαν πολυμορφισμοί τόσο σε γονίδια που έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση της νόσου, όπως το CFH και το ARMS2, όσο και σε γονίδια που έχουν συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο, καθώς παρέχουν προστασία έναντι στην εμφάνιση της νόσου, όπως το C2 και το CFB. Τα αποτελέσματα της μελέτης ανέδειξαν συσχετίσεις ανάμεσα στην ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία και στο γονότυπο τους. Στους ασθενείς που έπασχαν από ΗΕΩ ξηρού τύπου, η θεραπεία περιλάμβανε τη λήψη του αντιοξειδωτικού σκευάσματος Ocuvite Lutein forte® (1 δισκίο/ημέρα), σκεύασμα του οποίου η χρήση είναι πολύ διαδεδομένη στην Ελλάδα. Ένα πολύ ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης μας είναι ότι παρά το γεγονός ότι χορηγήθηκε πολύ μικρότερη δοσολογία αντιοξειδωτικών στους ασθενείς σε ημερήσια βάση, συγκριτικά με τη δοσολογία της κλινικής μελέτης AREDS 2 (10 mg λουτεΐνης, 2 mg ζεαξανθίνης, 500 mg βιταμίνης C, 400 IU βιταμίνης E, 80 mg ψευδαργύρου, 2 mg χαλκού and 20 μg σεληνίου) [55], αποδείχτηκε ωφέλιμη για ορισμένες γονοτυπικές ομάδες ασθενών. Επίσης, από τη μελέτη προκύπτει στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό CFH/Y402H και στην ανταπόκριση στη λήψη αντιοξειδωτικών. Το πιο σημαντικό όμως και πρωτότυπο εύρημα της μελέτης μας αποτελεί η θετική συσχέτιση των προστατευτικών πολυμορφισμών στα γονίδια C2 και CFB με την ανταπόκριση στη λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής. Όσον αφορά τους ασθενείς με ΗΕΩ υγρού τύπου στους οποίους έγιναν οι ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ranibizumab, τα αποτελέσματά μας αναδεικνύουν συσχέτιση μεταξύ της ανταπόκρισης στη θεραπεία και τους πολυμορφισμούς στα γονίδια CFH και ARMS2.

Η ΗΕΩ αποτελεί ένα από τα κύρια αίτια απώλειας της όρασης στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Παρά το γεγονός ότι είναι μια πολύπλοκη ασθένεια, είναι ευρέως αποδεκτό ότι η γενετική διαδραματίζει βασικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου. Τα τελευταία χρόνια οι έρευνες που έχουν γίνει, έχουν δείξει ότι το σύστημα του συμπληρώματος ενέχεται σημαντικά στην παθογένεια της ΗΕΩ. Οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα στην κυκλοφορία του αίματος και σε τοπικές εναποθέσεις (drusen) στον αμφιβληστροειδή. Πληθώρα γενετικών μελετών έχουν αποκαλύψει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ΗΕΩ και πολυμορφισμών γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι του συμπληρώματος.

Ο παράγοντας του συμπληρώματος Η (CFH) είναι μια διαλυτή γλυκοπρωτεΐνη, η οποία προστατεύει τα κύτταρα από τη φλεγμονώδη βλάβη, ρυθμίζοντας την εναλλακτική οδό του συστήματος του συμπληρώματος και δρώντας ως συμπαράγοντας του παράγοντα Ι με σκοπό την επιτάχυνση της αποδόμησης της C3 κονβερτάσης. Η πρόσδεσή του στην κυτταρική επιφάνεια επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπίδρασης με πολυανιονικά μόρια όπως το σιαλικό και οι γλυκοζαμινογλυκάνες. Το μόριο φέρει επίσης περιοχές πρόσδεσης για την ηπαρίνη και τη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP). Μέχρι στιγμής, αρκετοί SNPs του γονιδίου του CFH έχουν συσχετιστεί είτε με αύξηση είτε με μείωση του κινδύνου εμφάνισης της ασθένειας. Από αυτούς, μια μετάπτωση από Τ σε C στη νουκλεοτιδική θέση 1277 του γονιδίου, η οποία οδηγεί στη μη συνώνυμη αντικατάσταση του αμινοξέος τυροσίνη από ιστιδίνη στη θέση 402 του πολυπεπτιδίου (CFH Y402H SNP) φαίνεται να οδηγεί στην απορύθμιση του παράγοντα CFH αφού επηρεάζει τη δέσμευσή του τόσο με την ηπαρίνη όσο και με τη CRP. Η παρουσία ιστιδίνης επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσης στους υδατάνθρακες της κυτταρικής επιφάνειας και κατά συνέπεια την ικανότητα προστασίας των κυττάρων και τον περιορισμό της φλεγμονής, προτείνοντας έναν άλλο μηχανισμό παθογένεσης που συνδέει πολυμορφισμό και νόσο. Ο πολυμορφισμός αυτός έχει μελετηθεί εκτενώς στους καυκάσιους πληθυσμούς και φαίνεται ότι εμπλέκεται στην παθογένεση και εξέλιξη της ΗΕΩ αφού μπορεί να θεωρηθεί ως γενετικός δείκτης αυξημένου κινδύνου εμφάνισης της ασθένειας. Εκτός από την εμπλοκή του στην παθογένεση της νόσου, γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο πολυμορφισμός αυτός αποτελεί προγνωστικό παράγοντα της ανταπόκρισης σε εφαρμοζόμενες θεραπείες σε ασθενείς καυκάσιων πληθυσμών, όπως την ανταπόκριση στη λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής καθώς και στις ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις με αντι-VEGF παράγοντες, με κύριο τον παράγοντα ranibizumab.

Στην παρούσα μελέτη, όσον αφορά τους ασθενείς με ΗΕΩ ξηρού τύπου, η αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής φαίνεται να διαφοροποιείται ανάλογα με το γονότυπο των ασθενών. Τα δεδομένα έδειξαν ότι, ασθενείς που φέρουν τον γονότυπο TT για τον πολυμορφισμό rs1061170/Y402H ήταν πιο πιθανό να επιτύχουν θετικό αποτέλεσμα και να σταθεροποιήσουν την οπτική τους οξύτητα και την εικόνα του OCT, ενώ αντίθετα οι ασθενείς με γονοτύπους TC και CC εμφάνισαν μεγαλύτερη πιθανότητα να μην ανταποκριθούν στη λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής. Ασθενείς ομόζυγοι για τα υψηλού κινδύνου αλληλόμορφα στο CFH (γονότυπος CC) παρουσίασαν σημαντικά χειρότερα οπτικά αποτελέσματα συγκριτικά με τους ασθενείς φυσικού τύπου

($p < 0.001$, 95% CI: 24.029-62.203) και τους ετερόζυγους ασθενείς ($p = 0.003$, 95% CI: 10.338-46.949).

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, από τα οποία έχει προκύψει συσχέτιση μεταξύ του παράγοντα CFH και της χρήσης αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής σε ασθενείς με HEΩ. Η συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs1061170/Y402H και της αποτελεσματικότητας των συμπληρωμάτων AREDS, προτάθηκε αρχικά από τους Klein και συνεργάτες [188], οι οποίοι στη μελέτη τους βρήκαν ενδείξεις αλληλεπίδρασης μεταξύ του γονοτύπου CFH και της λήψης αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής και ψευδαργύρου, όσον αφορά την πρόοδο της νόσου από την πρώιμη στην προχωρημένη μορφή. Σύμφωνα με τους ερευνητές, οι ομόζυγοι ασθενείς για τα υψηλού κινδύνου αλληλόμορφα με πρώιμη μορφή HEΩ, φαίνεται ότι ανταποκρίνονται ασθενέστερα στη λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων και ψευδαργύρου και εμφανίζουν μικρότερη μείωση (11%), σε σχέση με τους λαμβάνοντες placebo, στο ποσοστό εξέλιξης σε όπιμη νόσο, από ότι οι ομόζυγοι για τα φυσιολογικά αλληλόμορφα (μείωση 68%). Πέντε χρόνια αργότερα, οι Awh και συνεργάτες [189], στη μελέτη τους η οποία περιλάμβανε μια υποομάδα ασθενών από τη δοκιμή AREDS, αναφέρθηκαν σε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα αποτελέσματα με βάση τους γονοτύπους των ασθενών για τα γονίδια CFH και ARMS2. Οι ερευνητές συνέστησαν τη θεραπεία με χορήγηση ψευδαργύρου σε ασθενείς οι οποίοι δεν είχαν υψηλού κινδύνου αλληλόμορφα στο CFH (γονότυπος TT) και ένα ή δύο υψηλού κινδύνου αλληλόμορφα στο ARMS2 (γονότυποι GT και TT). Επίσης, συνέστησαν τη θεραπεία με χορήγηση αντιοξειδωτικών σκευασμάτων σε ασθενείς που έφεραν ένα ή δύο υψηλού κινδύνου αλληλόμορφα στο CFH (γονότυποι CT και CC) και κανένα υψηλού κινδύνου αλληλόμορφο στο ARMS2 (γονότυπος GG). Σε μια άλλη ανάλυση από την ίδια δοκιμή AREDS, οι Awh και συνεργάτες [190], περιέγραψαν τέσσερις διαφορετικούς συνδυασμούς γενετικών πολυμορφισμών υψηλού κινδύνου με βάση τα αλληλόμορφα στα γονίδια CFH και ARMS2 και βασιζόμενοι σε αυτά τα αποτελέσματα πρότειναν τη χορήγηση συμπληρωμάτων διατροφής στους ασθενείς ανάλογα με τον γονότυπό τους. Αντίθετα, οι Chew και συνεργάτες [195], σε μια εκ νέου ανάλυση των δεδομένων της μελέτης AREDS απέτυχαν να εντοπίσουν συσχέτιση μεταξύ του γενετικού υποβάθρου και της χορήγησης συμπληρωμάτων διατροφής σε ασθενείς με HEΩ.

Όσον αφορά τους ασθενείς με HEΩ υγρού τύπου, από τη συγκεκριμένη μελέτη προκύπτει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού CFH Y402H και της ανταπόκρισης στις ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις με τον αντι-VEGF

παράγοντα ranibizumab. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι ασθενείς με γονότυπο CC είχαν σημαντικά μικρότερη πιθανότητα να ανταποκριθούν στη θεραπεία σε σύγκριση με τους ασθενείς με γονότυπο TC ($p=0.012$, 95% CI: 8.591-63.032), ωστόσο δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανταπόκριση στη θεραπεία σε ασθενείς με γονότυπο TT έναντι αυτών με γονότυπο TC.

Η επίδραση του πολυμορφισμού CFH Y402H σε κλινικά αποτελέσματα ασθενών μετά από θεραπεία με αντι-VEGF παράγοντες έχει αναφερθεί από αρκετές μελέτες, οι οποίες διαπίστωσαν μικρή ανταπόκριση στις ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις που σχετίζεται με τα αλληλόμορφα υψηλού κινδύνου στο CFH, με χειρότερα αποτελέσματα σε ομόζυγους ασθενείς σε σύγκριση με ετερόζυγους και ασθενείς φυσικού τύπου. Οι Brantley και συνεργάτες [185] ανέφεραν ότι ασθενείς με γονότυπο CC παρουσίασαν πολύ μικρότερη βελτίωση στην οπτική τους οξύτητα συγκριτικά με ασθενείς με γονότυπο TC και TT μετά από ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα bevacizumab. Επιπροσθέτως, οι Lee και συνεργάτες [186], στη μελέτη τους σε ασθενείς με εξιδρωματική ΗΕΩ στους οποίους χορηγήθηκε ranibizumab, ανέφεραν ότι ο γονότυπος για το γονίδιο CFH δεν επηρέασε το οπτικό αποτέλεσμα μετά τη θεραπεία, αλλά οι ασθενείς με γονότυπο CC ήταν πιο πιθανό να χρειαστούν επανέγχυση συγκριτικά με εκείνους με γονότυπο TT και ότι σε περίοδο μεγαλύτερη των εννέα μηνών υπήρχε η τάση να χρειάζονται περισσότερες συνολικές ενέσεις σε σύγκριση με ασθενείς με γονότυπο TT. Σε άλλη μελέτη, οι Kloeckener – Gruissem και συνεργάτες [196], διερεύνησαν γενετικούς παράγοντες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ανταπόκριση ενός ασθενούς στη θεραπεία με ranibizumab. Τα δεδομένα τους έδειξαν ότι ο γονότυπος για το γονίδιο CFH επηρεάζει την ανταπόκριση στην ενδοϋαλοειδική θεραπεία με ranibizumab και ότι οι ασθενείς με γονότυπο CT είναι πιο πιθανό να παρουσιάσουν θετικό αποτέλεσμα. Ενώ οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν ότι ο πολυμορφισμός rs1061170/Y402H στο γονίδιο CFH επηρεάζει το αποτέλεσμα της θεραπείας με αντι-VEGF παράγοντες, μερικές μελέτες δεν έχουν αποδείξει αυτή τη συσχέτιση. Οι Orlin και συνεργάτες [197], στη μελέτη τους δεν ανέφεραν καμία συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου για το γονίδιο CFH και της ανταπόκρισης στη θεραπεία με αντι-VEGF παράγοντες.

Ο πολυμορφισμός rs10490924 στο γονίδιο ARMS2 είναι ο δεύτερος μείζον πολυμορφισμός που έχει συσχετιστεί σημαντικά με την ανάπτυξη ΗΕΩ. Μια μετάπτωση από G σε T στη νουκλεοτιδική θέση 270 του γονιδίου που οδηγεί σε μη συνώνυμη αμινοξική αντικατάσταση της αλανίνης στη θέση 69 του πολυπεπτιδίου από σερίνη (ARMS2 A69S SNP) έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΗΕΩ στα άτομα που τη φέρουν. Ο ρόλος του γονιδίου ARMS2 στην παθογένεια της

HEΩ παραμένει επί του παρόντος άγνωστος, αλλά η συσχέτιση του γονιδίου με την ανάπτυξη της νόσου έχει περιγραφεί σε πληθώρα ανεξάρτητων μελετών. Το γονίδιο ARMS2 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στον πλακουντιακό ιστό αλλά μέχρι πρόσφατα έχουν αποδοθεί σε αυτό μόνο περιορισμένες βιολογικές ιδιότητες. Περαιτέρω αναλύσεις πιστοποίησαν έκφραση και στον αμφιβληστροειδή καθώς και σε ποικιλία άλλων ιστών και οργάνων.

Από τη μελέτη μας δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του πολυμορφισμού rs10490924 στο γονίδιο ARMS2 και της ανταπόκρισης στη λήψη αντιοξειδωτικών σκευασμάτων διατροφής. Αντίθετα, προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού αυτού και της ανταπόκρισης στις εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ranibizumab. Όσον αφορά τους ασθενείς με HEΩ υγρού τύπου, οι ομάδες των ασθενών με γονότυπους GT και TT εμφάνισαν λιγότερες πιθανότητες ανταπόκρισης συγκριτικά με τους ασθενείς φυσικού τύπου ($p=0.002$, 95% CI: 15.451-59.859). Η μελέτη μας έδειξε επίσης, ότι οι ομόζυγοι ασθενείς για τα υψηλού κινδύνου αλληλόμορφα στο γονίδιο ARMS2 (γονότυπος TT) εμφάνισαν σημαντικά χειρότερα οπτικά αποτελέσματα και είχαν μικρότερη πιθανότητα ανταπόκρισης στη θεραπεία με τον αντι-VEGF παράγοντα σε σύγκριση με τους ασθενείς φυσικού τύπου ($p<0.001$, 95% CI: 28.380-95.656).

Τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών αναφορικά με την συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία είναι αντικρουόμενα. Σε συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας, μελέτη από τους Terpe και συνεργάτες [198], αποκάλυψε γενετική συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου ARMS2 και της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας του παράγοντα ranibizumab. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή, ασθενείς με γονότυπο TT παρουσίασαν μικρή ανταπόκριση στις ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις με τον παράγοντα ranibizumab. Επιπλέον, από τη μελέτη των Kitchens και συνεργατών του [199], προέκυψε συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου TT για το γονίδιο ARMS2 και μιας φτωχής ανταπόκρισης των ασθενών στις ενέσεις με τους αντι-VEGF παράγοντες ranibizumab και bevacizumab με βάση την εικόνα του OCT. Από την άλλη μεριά, οι Brantley και συνεργάτες [185], καθώς και οι Orlin και συνεργάτες [197], στις μελέτες τους δεν ανέφεραν συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs10490924 στο γονίδιο ARMS2 και της ανταπόκρισης στη θεραπεία με αντι-VEGF παράγοντες.

Εξετάζοντας την παρουσία ταυτόχρονα και των δύο πολυμορφισμών υψηλού κινδύνου στα γονίδια CFH και ARMS2 στο γονότυπο των ασθενών με HEΩ υγρού τύπου, για να διαπιστώσουμε κατά πόσο η συνύπαρξη αυτών των πολυμορφισμών

μπορεί να επηρεάσει την ανταπόκρισή τους στην αντι-VEGF θεραπεία, καταλήγουμε σε ένα ενδιαφέρον εύρημα. Ασθενείς οι οποίοι έφεραν και τους δύο πολυμορφισμούς υψηλού κινδύνου στο γονότυπό τους είχαν σημαντικά μικρότερη πιθανότητα να ανταποκριθούν στις ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις με τον αντι-VEGF παράγοντα ranibizumab συγκριτικά με τους ασθενείς που έφεραν μόνο έναν πολυμορφισμό υψηλού κινδύνου είτε στο γονίδιο CFH είτε στο γονίδιο ARMS2 ($p=0.029$, 95% CI: 3.304-51.912). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η ταυτόχρονη παρουσία των δύο πολυμορφισμών υψηλού κινδύνου στο γονότυπο των ασθενών, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και επιδρά αρνητικά στην ανταπόκριση τους στη θεραπεία.

Η εμπλοκή και άλλων γονιδίων στην παθογένεση της HEΩ, όπως τα γονίδια C2 και CFB έχει αποδειχτεί από προηγούμενες μελέτες. Πιο συγκεκριμένα, οι Gold και συνεργάτες [81] έδειξαν ότι πολυμορφισμοί που εμφανίζονται τόσο στο γονίδιο CFB, όσο και στο γονίδιο C2, σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης HEΩ και θεωρούνται προστατευτικοί. Οι ερευνητές αναφέρθηκαν σε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών rs9332739 [E318D] και rs547154 [IVS10] στο γονίδιο C2 καθώς και των πολυμορφισμών rs4151667 [L9H] και rs2072633 [IVS17] στο γονίδιο CFB με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης HEΩ.

Ωστόσο, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη από την οποία προκύπτει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των προστατευτικών πολυμορφισμών στα γονίδια C2 και CFB και της ανταπόκρισης στη λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής σε ασθενείς που πάσχουν από HEΩ ξηρού τύπου. Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα, ότι η παρουσία αυτών των προστατευτικών πολυμορφισμών στο γονότυπο, προδιαθέτει τους ασθενείς που τους φέρουν σε καλή ανταπόκριση στην εφαρμοζόμενη θεραπεία. Εξετάζοντας την παρουσία τουλάχιστον ενός προστατευτικού πολυμορφισμού στο γονότυπο των ασθενών, η ανάλυση έδειξε ότι οι ασθενείς που είχαν στο γονότυπο τους τουλάχιστον έναν προστατευτικό πολυμορφισμό ήταν πιο πιθανό να ανταποκριθούν στη λήψη αντιοξειδωτικών σκευασμάτων και να σταθεροποιήσουν την οπτική τους οξύτητα και την εικόνα του OCT, σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν έφεραν κανέναν προστατευτικό πολυμορφισμό ($p<0.001$, 95% CI: 27.519-55.894). Η πιθανότητα για θετική έκβαση της θεραπείας ήταν σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς που έφεραν τουλάχιστον δύο προστατευτικούς πολυμορφισμούς, σε σύγκριση με εκείνους που δεν έφεραν κανέναν προστατευτικό πολυμορφισμό ($p<0.001$, 95% CI: 25.229-55.432). Από την άλλη πλευρά, από τη στατιστική ανάλυση δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των προστατευτικών πολυμορφισμών και της

ανταπόκρισης στην αντι-VEGF θεραπεία με τον παράγοντα ranibizumab, σε ασθενείς με ΗΕΩ υγρού τύπου.

Παρά τον προσεκτικό σχεδιασμό της μελέτης, υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί που πρέπει να αναφερθούν. Καταρχάς, ο μικρός αριθμός του δείγματος στους ασθενείς με ΗΕΩ υγρού τύπου αποτελεί έναν από τους βασικότερους περιορισμούς. Αυτός ο τύπος της νόσου είναι πιο σπάνιος και αφορά το 10% των ασθενών με ΗΕΩ, με αποτέλεσμα στο χρονικό πλαίσιο διεξαγωγής της έρευνας να μη καταστεί δυνατή η συγκέντρωση μεγαλύτερου αριθμού ασθενών. Επίσης, η ΗΕΩ είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια στην οποία εμπλέκονται εκτός από τους γενετικούς παράγοντες και πολλοί περιβαλλοντικοί, όπως το κάπνισμα, οι διατροφικές συνήθειες, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και ο δείκτης μάζας σώματος, παράγοντες οι οποίοι δε συμπεριλήφθηκαν στο σχεδιασμό της μελέτης και δεν εξετάστηκαν. Παρόλα αυτά, η συγκεκριμένη εργασία αποτελεί μια μελέτη γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμών γονιδίων που εμπλέκονται στην παθογένεια της ΗΕΩ και ανταπόκρισης στην θεραπεία, από την οποία αναδεικνύονται σημαντικές συσχετίσεις.

Συμπερασματικά, όπως προκύπτει και από τα ευρήματά μας, οι γενετικοί πολυμορφισμοί γονιδίων που εμπλέκονται στην εμφάνιση και πρόοδο της ΗΕΩ, θα μπορούσαν να αποτελέσουν χρήσιμους παράγοντες πρόβλεψης της ανταπόκρισης στη θεραπεία σε ασθενείς που πάσχουν από τον ξηρό ή τον υγρό τύπο της νόσου. Η γνώση του γενετικού υποβάθρου των ασθενών θα μπορούσε να συντελέσει στην ταυτοποίηση των ασθενών που είναι πιθανό να επωφεληθούν από την εφαρμοζόμενη θεραπεία και να οδηγήσει στην επιλογή και στο σχεδιασμό της βέλτιστης θεραπευτικής στρατηγικής για κάθε μεμονωμένο ασθενή. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω προοπτικές μελέτες που θα συμπεριλαμβάνουν ένα μεγάλο αριθμό ασθενών, για την ενίσχυση κι επιβεβαίωση αυτών των ευρημάτων καθώς και την αξιολόγηση της πιθανής αξίας των προσαρμοσμένων θεραπειών.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. www.wikipedia.org.
2. www.ophtalmica.gr.
3. www.eyepathology.gr.
4. Richard Snell ML. *Clinical Anatomy of the Eye*. Blackwell Science.
5. Luthert PJ. Mini-symposium: Ocular Pathology Pathogenesis of age-related macular degeneration. 2011.
6. Μόσχος Μ. *Εισαγωγή στην Οφθαλμολογία*. Ιατρικές Εκδόσεις Ζήτα.
7. Kanski J. *Κλινική Οφθαλμολογία*. Εκδόσεις Παρισιάνος.
8. Παπαστρατηγάκης Β. *Εγχειρίδιο Παθήσεων της ωχράς*. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας.
9. Kanski J. *Νόσοι της Ωχράς*. Εκδόσεις Παρισιάνος.
10. Bourne RR, Jonas JB, Flaxman SR, et al. Prevalence and causes of vision loss in high-income countries and in Eastern and Central Europe: 1990-2010. *The British journal of ophthalmology*. May 2014;98(5):629-638.
11. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the World Health Organization*. Nov 2004;82(11):844-851.
12. Wong WL, Su X, Li X, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Global health*. Feb 2014;2(2):e106-116.
13. Klein R, Chou CF, Klein BE, Zhang X, Meuer SM, Saaddine JB. Prevalence of age-related macular degeneration in the US population. *Archives of ophthalmology*. Jan 2011;129(1):75-80.
14. Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Archives of ophthalmology*. Apr 2004;122(4):564-572.
15. Klein R, Klein BE, Cruickshanks KJ. The prevalence of age-related maculopathy by geographic region and ethnicity. *Progress in retinal and eye research*. May 1999;18(3):371-389.

16. Augood CA, Vingerling JR, de Jong PT, et al. Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye Study (EUREYE). *Archives of ophthalmology*. Apr 2006;124(4):529-535.
17. Topouzis F, Coleman AL, Harris A, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in Greece: the Thessaloniki Eye Study. *American journal of ophthalmology*. Dec 2006;142(6):1076-1079.
18. Agosta E, Lazzeri S, Orlandi P, et al. Pharmacogenetics of antiangiogenic and antineovascular therapies of age-related macular degeneration. *Pharmacogenomics*. Jul 2012;13(9):1037-1053.
19. Jager RD, Mieler WF, Miller JW. Age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*. Jun 12 2008;358(24):2606-2617.
20. Anderson DH, Talaga KC, Rivest AJ, Barron E, Hageman GS, Johnson LV. Characterization of beta amyloid assemblies in drusen: the deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Experimental eye research*. Feb 2004;78(2):243-256.
21. Khandhadia S, Lotery A. Oxidation and age-related macular degeneration: insights from molecular biology. *Expert reviews in molecular medicine*. Oct 20 2010;12:e34.
22. Bressler NM, Bressler SB, West SK, Fine SL, Taylor HR. The grading and prevalence of macular degeneration in Chesapeake Bay watermen. *Archives of ophthalmology*. Jun 1989;107(6):847-852.
23. Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, Johnson LV, Anderson DH, Mullins RF. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Progress in retinal and eye research*. Nov 2001;20(6):705-732.
24. Al-Hussaini H, Schneiders M, Lundh P, Jeffery G. Drusen are associated with local and distant disruptions to human retinal pigment epithelium cells. *Experimental eye research*. Mar 2009;88(3):610-612.
25. Stone EM. Macular degeneration. *Annual review of medicine*. 2007;58:477-490.
26. Bhutto I, Luttly G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's

- membrane/choriocapillaris complex. *Molecular aspects of medicine*. Aug 2012;33(4):295-317.
27. Hyman LG, Lilienfeld AM, Ferris FL, 3rd, Fine SL. Senile macular degeneration: a case-control study. *American journal of epidemiology*. Aug 1983;118(2):213-227.
 28. Leibowitz HM, Krueger DE, Maunder LR, et al. The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975. *Survey of ophthalmology*. May-Jun 1980;24(Suppl):335-610.
 29. www.mdfoundation.com.au.
 30. Adamis AP, Shima DT, Yeo KT, et al. Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. Jun 15 1993;193(2):631-638.
 31. Age-Related Eye Disease Study Research G. The Age-Related Eye Disease Study system for classifying age-related macular degeneration from stereoscopic color fundus photographs: the Age-Related Eye Disease Study Report Number 6. *American journal of ophthalmology*. Nov 2001;132(5):668-681.
 32. Cook HL, Patel PJ, Tufail A. Age-related macular degeneration: diagnosis and management. *British medical bulletin*. 2008;85:127-149.
 33. Sue S. Test distance vision using a Snellen chart. *Community eye health*. Sep 2007;20(63):52.
 34. Ferris FL, 3rd, Kassoff A, Bresnick GH, Bailey I. New visual acuity charts for clinical research. *American journal of ophthalmology*. Jul 1982;94(1):91-96.
 35. www.ivo.gr.
 36. Mattice E, Wolfe CP. Using the Amsler grid. *Journal of ophthalmic nursing & technology*. Jan-Feb 1986;5(1):34.
 37. Hee MR, Baumal CR, Puliafito CA, et al. Optical coherence tomography of age-related macular degeneration and choroidal neovascularization. *Ophthalmology*. Aug 1996;103(8):1260-1270.
 38. www.athenseyehospital.gr.

39. Hwang TS, Jia Y, Gao SS, et al. Optical Coherence Tomography Angiography Features of Diabetic Retinopathy. *Retina*. Nov 2015;35(11):2371-2376.
40. Laser photocoagulation of subfoveal recurrent neovascular lesions in age-related macular degeneration. Results of a randomized clinical trial. Macular Photocoagulation Study Group. *Archives of ophthalmology*. Sep 1991;109(9):1232-1241.
41. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: one-year results of 2 randomized clinical trials--TAP report. Treatment of age-related macular degeneration with photodynamic therapy (TAP) Study Group. *Archives of ophthalmology*. Oct 1999;117(10):1329-1345.
42. Haddad S, Chen CA, Santangelo SL, Seddon JM. The genetics of age-related macular degeneration: a review of progress to date. *Survey of ophthalmology*. Jul-Aug 2006;51(4):316-363.
43. Age-Related Eye Disease Study Research G. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Archives of ophthalmology*. Oct 2001;119(10):1417-1436.
44. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. Dec 08 1989;246(4935):1306-1309.
45. Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Progress in retinal and eye research*. Jan 2003;22(1):1-29.
46. Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, Ianchulev S, Adamis AP. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Survey of ophthalmology*. May-Jun 2003;48(3):257-293.
47. Lopez PF, Sippy BD, Lambert HM, Thach AB, Hinton DR. Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Investigative ophthalmology & visual science*. Apr 1996;37(5):855-868.

48. Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Chatzistefanou K, Ferrara N, Adamis AP. Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. *Archives of ophthalmology*. Aug 1996;114(8):964-970.
49. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET, Jr., Feinsod M, Guyer DR, Group VISiONCT. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*. Dec 30 2004;351(27):2805-2816.
50. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*. Oct 5 2006;355(14):1419-1431.
51. van Leeuwen R, Boekhoorn S, Vingerling JR, et al. Dietary intake of antioxidants and risk of age-related macular degeneration. *Jama*. Dec 28 2005;294(24):3101-3107.
52. Ho L, van Leeuwen R, Witteman JC, et al. Reducing the genetic risk of age-related macular degeneration with dietary antioxidants, zinc, and omega-3 fatty acids: the Rotterdam study. *Archives of ophthalmology*. Jun 2011;129(6):758-766.
53. Bressler NM, Bressler SB, Congdon NG, et al. Potential public health impact of Age-Related Eye Disease Study results: AREDS report no. 11. *Archives of ophthalmology*. Nov 2003;121(11):1621-1624.
54. Bernstein PS, Zhao DY, Wintch SW, Ermakov IV, McClane RW, Gellermann W. Resonance Raman measurement of macular carotenoids in normal subjects and in age-related macular degeneration patients. *Ophthalmology*. Oct 2002;109(10):1780-1787.
55. Age-Related Eye Disease Study 2 Research G. Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *Jama*. May 15 2013;309(19):2005-2015.
56. Booij JC, Baas DC, Beisekeeva J, Gorgels TG, Bergen AA. The dynamic nature of Bruch's membrane. *Progress in retinal and eye research*. Jan 2010;29(1):1-18.
57. Bird AC. Therapeutic targets in age-related macular disease. *The Journal of clinical investigation*. Sep 2010;120(9):3033-3041.

58. Chen H, Liu B, Lukas TJ, Neufeld AH. The aged retinal pigment epithelium/choroid: a potential substratum for the pathogenesis of age-related macular degeneration. *PLoS one*. Jun 4 2008;3(6):e2339.
59. Ehrlich R, Harris A, Kheradiya NS, Winston DM, Ciulla TA, Wirostko B. Age-related macular degeneration and the aging eye. *Clinical interventions in aging*. 2008;3(3):473-482.
60. Finnemann SC, Leung LW, Rodriguez-Boulan E. The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Mar 19 2002;99(6):3842-3847.
61. Moore DJ, Clover GM. The effect of age on the macromolecular permeability of human Bruch's membrane. *Investigative ophthalmology & visual science*. Nov 2001;42(12):2970-2975.
62. Jackson GR, Owsley C, Curcio CA. Photoreceptor degeneration and dysfunction in aging and age-related maculopathy. *Ageing research reviews*. Jun 2002;1(3):381-396.
63. Curcio CA. Photoreceptor topography in ageing and age-related maculopathy. *Eye*. Jun 2001;15(Pt 3):376-383.
64. Marin-Castano ME, Csaky KG, Cousins SW. Nonlethal oxidant injury to human retinal pigment epithelium cells causes cell membrane blebbing but decreased MMP-2 activity. *Investigative ophthalmology & visual science*. Sep 2005;46(9):3331-3340.
65. Marin-Castano ME, Striker GE, Alcazar O, Catanuto P, Espinosa-Heidmann DG, Cousins SW. Repetitive nonlethal oxidant injury to retinal pigment epithelium decreased extracellular matrix turnover in vitro and induced sub-RPE deposits in vivo. *Investigative ophthalmology & visual science*. Sep 2006;47(9):4098-4112.
66. Takahashi T, Nakamura T, Hayashi A, et al. Inhibition of experimental choroidal neovascularization by overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in retinal pigment epithelium cells. *American journal of ophthalmology*. Dec 2000;130(6):774-781.

67. Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *American journal of ophthalmology*. Sep 2002;134(3):411-431.
68. Grossniklaus HE, Ling JX, Wallace TM, et al. Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Molecular vision*. Apr 21 2002;8:119-126.
69. Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Hernandez EP, Monroy D, Csaky KG, Cousins SW. Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*. Aug 2003;44(8):3586-3592.
70. Cousins SW, Espinosa-Heidmann DG, Csaky KG. Monocyte activation in patients with age-related macular degeneration: a biomarker of risk for choroidal neovascularization? *Archives of ophthalmology*. Jul 2004;122(7):1013-1018.
71. Sengupta N, Caballero S, Mames RN, Butler JM, Scott EW, Grant MB. The role of adult bone marrow-derived stem cells in choroidal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*. Nov 2003;44(11):4908-4913.
72. Campochiaro PA. Retinal and choroidal neovascularization. *Journal of cellular physiology*. Sep 2000;184(3):301-310.
73. Lu M, Adamis AP. Molecular biology of choroidal neovascularization. *Ophthalmology clinics of North America*. Sep 2006;19(3):323-334.
74. Lutun A, Carmeliet G, Carmeliet P. Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends in cardiovascular medicine*. Feb 2002;12(2):88-96.
75. Mastellos DC. Targeting innate immune pathways in cancer immunotherapy: state of the art. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology*. Sep 2009;14 Suppl 1:S123-130.
76. Gorin MB. Genetic insights into age-related macular degeneration: controversies addressing risk, causality, and therapeutics. *Molecular aspects of medicine*. Aug 2012;33(4):467-486.
77. Goverdhan SV, Howell MW, Mullins RF, et al. Association of HLA class I and class II polymorphisms with age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*. May 2005;46(5):1726-1734.

78. Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science*. Apr 15 2005;308(5720):419-421.
79. Edwards AO, Ritter R, 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science*. Apr 15 2005;308(5720):421-424.
80. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. Apr 15 2005;308(5720):385-389.
81. Gold B, Merriam JE, Zernant J, et al. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nature genetics*. Apr 2006;38(4):458-462.
82. Klein R, Klein BE, Linton KL. Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. Jun 1992;99(6):933-943.
83. Wang JJ, Foran S, Mitchell P. Age-specific prevalence and causes of bilateral and unilateral visual impairment in older Australians: the Blue Mountains Eye Study. *Clinical & experimental ophthalmology*. Aug 2000;28(4):268-273.
84. Augood C, Fletcher A, Bentham G, et al. Methods for a population-based study of the prevalence of and risk factors for age-related maculopathy and macular degeneration in elderly European populations: the EUREYE study. *Ophthalmic epidemiology*. Apr 2004;11(2):117-129.
85. Colak ES, Majkic-Singh NT, Stankovic SS, et al. Gender Associated Lipid and Apolipoprotein Profile in Patients with Age-Related Macular Degeneration. *Ejifcc*. Mar 2011;22(1):16-23.
86. Evans JR. Risk factors for age-related macular degeneration. *Progress in retinal and eye research*. Mar 2001;20(2):227-253.
87. Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Survey of ophthalmology*. Sep-Oct 2000;45(2):115-134.
88. Klein R, Klein BE, Tomany SC, Meuer SM, Huang GH. Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: The Beaver Dam eye study. *Ophthalmology*. Oct 2002;109(10):1767-1779.
89. Seddon JM, Reynolds R, Yu Y, Daly MJ, Rosner B. Risk models for progression to advanced age-related macular degeneration using

- demographic, environmental, genetic, and ocular factors. *Ophthalmology*. Nov 2011;118(11):2203-2211.
90. Clemons TE, Milton RC, Klein R, Seddon JM, Ferris FL, 3rd, Age-Related Eye Disease Study Research G. Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19. *Ophthalmology*. Apr 2005;112(4):533-539.
 91. Seddon JM, Reynolds R, Shah HR, Rosner B. Smoking, dietary betaine, methionine, and vitamin D in monozygotic twins with discordant macular degeneration: epigenetic implications. *Ophthalmology*. Jul 2011;118(7):1386-1394.
 92. Mares JA, Volland RP, Sondel SA, et al. Healthy lifestyles related to subsequent prevalence of age-related macular degeneration. *Archives of ophthalmology*. Apr 2011;129(4):470-480.
 93. Tan JS, Wang JJ, Flood V, Mitchell P. Dietary fatty acids and the 10-year incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Archives of ophthalmology*. May 2009;127(5):656-665.
 94. Klaver CC, Assink JJ, van Leeuwen R, et al. Incidence and progression rates of age-related maculopathy: the Rotterdam Study. *Investigative ophthalmology & visual science*. Sep 2001;42(10):2237-2241.
 95. Woodell A, Rohrer B. A mechanistic review of cigarette smoke and age-related macular degeneration. *Advances in experimental medicine and biology*. 2014;801:301-307.
 96. Klein R, Klein BE, Tomany SC, Cruickshanks KJ. The association of cardiovascular disease with the long-term incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam eye study. *Ophthalmology*. Apr 2003;110(4):636-643.
 97. Seddon JM, Cote J, Davis N, Rosner B. Progression of age-related macular degeneration: association with body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio. *Archives of ophthalmology*. Jun 2003;121(6):785-792.
 98. Pennington KL, DeAngelis MM. Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD): associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors. *Eye and vision*. 2016;3:34.

99. Mitchell P, Wang JJ, Foran S, Smith W. Five-year incidence of age-related maculopathy lesions: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. Jun 2002;109(6):1092-1097.
100. Mares JA, Moeller SM. Diet and age-related macular degeneration: expanding our view. *The American journal of clinical nutrition*. Apr 2006;83(4):733-734.
101. Tan JS, Wang JJ, Flood V, Rochtchina E, Smith W, Mitchell P. Dietary antioxidants and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. Feb 2008;115(2):334-341.
102. Seddon JM, Cote J, Rosner B. Progression of age-related macular degeneration: association with dietary fat, transunsaturated fat, nuts, and fish intake. *Archives of ophthalmology*. Dec 2003;121(12):1728-1737.
103. Cho E, Hung S, Willett WC, et al. Prospective study of dietary fat and the risk of age-related macular degeneration. *The American journal of clinical nutrition*. Feb 2001;73(2):209-218.
104. Seddon JM, Rosner B, Sperduto RD, et al. Dietary fat and risk for advanced age-related macular degeneration. *Archives of ophthalmology*. Aug 2001;119(8):1191-1199.
105. Smith W, Mitchell P, Leeder SR. Dietary fat and fish intake and age-related maculopathy. *Archives of ophthalmology*. Mar 2000;118(3):401-404.
106. Cho E, Hankinson SE, Willett WC, et al. Prospective study of alcohol consumption and the risk of age-related macular degeneration. *Archives of ophthalmology*. May 2000;118(5):681-688.
107. Moss SE, Klein R, Klein BE, Jensen SC, Meuer SM. Alcohol consumption and the 5-year incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam eye study. *Ophthalmology*. May 1998;105(5):789-794.
108. Ajani UA, Christen WG, Manson JE, et al. A prospective study of alcohol consumption and the risk of age-related macular degeneration. *Annals of epidemiology*. Apr 1999;9(3):172-177.
109. Klein R, Klein BE, Tomany SC, Moss SE. Ten-year incidence of age-related maculopathy and smoking and drinking: the Beaver Dam Eye Study. *American journal of epidemiology*. Oct 1 2002;156(7):589-598.

110. Hyman L, Schachat AP, He Q, Leske MC. Hypertension, cardiovascular disease, and age-related macular degeneration. Age-Related Macular Degeneration Risk Factors Study Group. *Archives of ophthalmology*. Mar 2000;118(3):351-358.
111. van Leeuwen R, Ikram MK, Vingerling JR, Witteman JC, Hofman A, de Jong PT. Blood pressure, atherosclerosis, and the incidence of age-related maculopathy: the Rotterdam Study. *Investigative ophthalmology & visual science*. Sep 2003;44(9):3771-3777.
112. de Jong PT, Chakravarthy U, Rahu M, et al. Associations between aspirin use and aging macula disorder: the European Eye Study. *Ophthalmology*. Jan 2012;119(1):112-118.
113. Cheung N, Tay WT, Cheung GC, Wang JJ, Mitchell P, Wong TY. Is aspirin intake associated with early age-related macular degeneration? The Singapore Indian Eye Study. *The British journal of ophthalmology*. Jun 2013;97(6):785-788.
114. Liew G, Mitchell P, Wong TY, Rochtchina E, Wang JJ. The association of aspirin use with age-related macular degeneration. *JAMA internal medicine*. Feb 25 2013;173(4):258-264.
115. Klein BE, Howard KP, Gangnon RE, Dreyer JO, Lee KE, Klein R. Long-term use of aspirin and age-related macular degeneration. *Jama*. Dec 19 2012;308(23):2469-2478.
116. Christen WG, Glynn RJ, Ajani UA, et al. Age-related maculopathy in a randomized trial of low-dose aspirin among US physicians. *Archives of ophthalmology*. Aug 2001;119(8):1143-1149.
117. Wilson HL, Schwartz DM, Bhatt HR, McCulloch CE, Duncan JL. Statin and aspirin therapy are associated with decreased rates of choroidal neovascularization among patients with age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology*. Apr 2004;137(4):615-624.
118. Christen WG, Glynn RJ, Chew EY, Buring JE. Low-dose aspirin and medical record-confirmed age-related macular degeneration in a randomized trial of women. *Ophthalmology*. Dec 2009;116(12):2386-2392.
119. Douglas IJ, Cook C, Chakravarthy U, Hubbard R, Fletcher AE, Smeeth L. A case-control study of drug risk factors for age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. Jun 2007;114(6):1164-1169.

120. Wang JJ, Mitchell P, Smith W, Gillies M, Billson F, Blue Mountains Eye S. Systemic use of anti-inflammatory medications and age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmic epidemiology*. Feb 2003;10(1):37-48.
121. VanderBeek BL, Zacks DN, Talwar N, Nan B, Stein JD. Role of statins in the development and progression of age-related macular degeneration. *Retina*. Feb 2013;33(2):414-422.
122. Hall NF, Gale CR, Syddall H, Phillips DI, Martyn CN. Risk of macular degeneration in users of statins: cross sectional study. *Bmj*. Aug 18 2001;323(7309):375-376.
123. Barbosa DT, Mendes TS, Cintron-Colon HR, et al. Age-related macular degeneration and protective effect of HMG Co-A reductase inhibitors (statins): results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2008. *Eye*. Apr 2014;28(4):472-480.
124. Snow KK, Cote J, Yang W, Davis NJ, Seddon JM. Association between reproductive and hormonal factors and age-related maculopathy in postmenopausal women. *American journal of ophthalmology*. Dec 2002;134(6):842-848.
125. Freeman EE, Munoz B, West SK, Tielsch JM, Schein OD. Is there an association between cataract surgery and age-related macular degeneration? Data from three population-based studies. *American journal of ophthalmology*. Jun 2003;135(6):849-856.
126. Sundelin SP, Nilsson SE, Brunk UT. Lipofuscin-formation in cultured retinal pigment epithelial cells is related to their melanin content. *Free radical biology & medicine*. Jan 1 2001;30(1):74-81.
127. Kayatz P, Thumann G, Luther TT, et al. Oxidation causes melanin fluorescence. *Investigative ophthalmology & visual science*. Jan 2001;42(1):241-246.
128. Gass JD. Drusen and disciform macular detachment and degeneration. *Archives of ophthalmology*. Sep 1973;90(3):206-217.
129. Seddon JM, Cote J, Page WF, Aggen SH, Neale MC. The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. *Archives of ophthalmology*. Mar 2005;123(3):321-327.

130. Hammond CJ, Webster AR, Snieder H, Bird AC, Gilbert CE, Spector TD. Genetic influence on early age-related maculopathy: a twin study. *Ophthalmology*. Apr 2002;109(4):730-736.
131. Seddon JM, Ajani UA, Mitchell BD. Familial aggregation of age-related maculopathy. *American journal of ophthalmology*. Feb 1997;123(2):199-206.
132. Klaver CC, Wolfs RC, Assink JJ, van Duijn CM, Hofman A, de Jong PT. Genetic risk of age-related maculopathy. Population-based familial aggregation study. *Archives of ophthalmology*. Dec 1998;116(12):1646-1651.
133. Ting AY, Lee TK, MacDonald IM. Genetics of age-related macular degeneration. *Current opinion in ophthalmology*. Sep 2009;20(5):369-376.
134. Zarepari S, Branham KE, Li M, et al. Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration. *American journal of human genetics*. Jul 2005;77(1):149-153.
135. Dewan A, Liu M, Hartman S, et al. HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science*. Nov 10 2006;314(5801):989-992.
136. Rivera A, Fisher SA, Fritsche LG, et al. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Human molecular genetics*. Nov 1 2005;14(21):3227-3236.
137. Kanda A, Chen W, Othman M, et al. A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Oct 9 2007;104(41):16227-16232.
138. Tuo J, Bojanowski CM, Chan CC. Genetic factors of age-related macular degeneration. *Progress in retinal and eye research*. Mar 2004;23(2):229-249.
139. Li M, Atmaca-Sonmez P, Othman M, et al. CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration. *Nature genetics*. Sep 2006;38(9):1049-1054.
140. DeAngelis MM, Ji F, Kim IK, et al. Cigarette smoking, CFH, APOE, ELOVL4, and risk of neovascular age-related macular degeneration. *Archives of ophthalmology*. Jan 2007;125(1):49-54.

141. Shuler RK, Jr., Hauser MA, Caldwell J, et al. Neovascular age-related macular degeneration and its association with LOC387715 and complement factor H polymorphism. *Archives of ophthalmology*. Jan 2007;125(1):63-67.
142. Maller J, George S, Purcell S, et al. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nature genetics*. Sep 2006;38(9):1055-1059.
143. Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. May 17 2005;102(20):7227-7232.
144. Hughes AE, Orr N, Esfandiary H, Diaz-Torres M, Goodship T, Chakravarthy U. A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration. *Nature genetics*. Oct 2006;38(10):1173-1177.
145. Postel EA, Agarwal A, Caldwell J, et al. Complement factor H increases risk for atrophic age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. Sep 2006;113(9):1504-1507.
146. Jakobsdottir J, Conley YP, Weeks DE, Mah TS, Ferrell RE, Gorin MB. Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26. *American journal of human genetics*. Sep 2005;77(3):389-407.
147. Ross RJ, Bojanowski CM, Wang JJ, et al. The LOC387715 polymorphism and age-related macular degeneration: replication in three case-control samples. *Investigative ophthalmology & visual science*. Mar 2007;48(3):1128-1132.
148. Kokotas H, Grigoriadou M, Petersen MB. Age-related macular degeneration: genetic and clinical findings. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. Apr 2011;49(4):601-616.
149. Ding X, Patel M, Chan CC. Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Progress in retinal and eye research*. Jan 2009;28(1):1-18.
150. Tong Y, Liao J, Zhang Y, Zhou J, Zhang H, Mao M. LOC387715/HTRA1 gene polymorphisms and susceptibility to age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis. *Molecular vision*. Oct 5 2010;16:1958-1981.

151. Seddon JM, Reynolds R, Maller J, Fagerness JA, Daly MJ, Rosner B. Prediction model for prevalence and incidence of advanced age-related macular degeneration based on genetic, demographic, and environmental variables. *Investigative ophthalmology & visual science*. May 2009;50(5):2044-2053.
152. Sun C, Zhao M, Li X. CFB/C2 gene polymorphisms and risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Current eye research*. Apr 2012;37(4):259-271.
153. Thakkinstian A, McEvoy M, Chakravarthy U, et al. The association between complement component 2/complement factor B polymorphisms and age-related macular degeneration: a HuGE review and meta-analysis. *American journal of epidemiology*. Sep 1 2012;176(5):361-372.
154. Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, et al. Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Feb 14 2006;103(7):2328-2333.
155. Rutar M, Valter K, Natoli R, Provis JM. Synthesis and propagation of complement C3 by microglia/monocytes in the aging retina. *PloS one*. 2014;9(4):e93343.
156. Yates JR, Sepp T, Matharu BK, et al. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*. Aug 9 2007;357(6):553-561.
157. Spencer KL, Olson LM, Anderson BM, et al. C3 R102G polymorphism increases risk of age-related macular degeneration. *Human molecular genetics*. Jun 15 2008;17(12):1821-1824.
158. Francis PJ, Hamon SC, Ott J, Weleber RG, Klein ML. Polymorphisms in C2, CFB and C3 are associated with progression to advanced age related macular degeneration associated with visual loss. *Journal of medical genetics*. May 2009;46(5):300-307.
159. Churchill AJ, Carter JG, Lovell HC, et al. VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. *Human molecular genetics*. Oct 1 2006;15(19):2955-2961.
160. Haines JL, Schnetz-Boutaud N, Schmidt S, et al. Functional candidate genes in age-related macular degeneration: significant association with VEGF,

- VLDLR, and LRP6. *Investigative ophthalmology & visual science*. Jan 2006;47(1):329-335.
161. Eyetech Study G. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. *Ophthalmology*. May 2003;110(5):979-986.
 162. Reddy VM, Zamora RL, Kaplan HJ. Distribution of growth factors in subfoveal neovascular membranes in age-related macular degeneration and presumed ocular histoplasmosis syndrome. *American journal of ophthalmology*. Sep 1995;120(3):291-301.
 163. Brown LF, Detmar M, Claffey K, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *Exs*. 1997;79:233-269.
 164. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. Jun 2003;9(6):669-676.
 165. Pasqualetti G, Danesi R, Del Tacca M, Bocci G. Vascular endothelial growth factor pharmacogenetics: a new perspective for anti-angiogenic therapy. *Pharmacogenomics*. Jan 2007;8(1):49-66.
 166. Konopatskaya O, Churchill AJ, Harper SJ, Bates DO, Gardiner TA. VEGF165b, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice. *Molecular vision*. May 26 2006;12:626-632.
 167. Klaver CC, Kliffen M, van Duijn CM, et al. Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration. *American journal of human genetics*. Jul 1998;63(1):200-206.
 168. Souied EH, Benlian P, Amouyel P, et al. The epsilon4 allele of the apolipoprotein E gene as a potential protective factor for exudative age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology*. Mar 1998;125(3):353-359.
 169. Swaroop A, Branham KE, Chen W, Abecasis G. Genetic susceptibility to age-related macular degeneration: a paradigm for dissecting complex disease traits. *Human molecular genetics*. Oct 15 2007;16 Spec No. 2:R174-182.
 170. Zivelin A, Rosenberg N, Peretz H, Amit Y, Kornbrot N, Seligsohn U. Improved method for genotyping apolipoprotein E polymorphisms by a PCR-based

- assay simultaneously utilizing two distinct restriction enzymes. *Clinical chemistry*. Sep 1997;43(9):1657-1659.
171. Baird PN, Guida E, Chu DT, Vu HT, Guymer RH. The epsilon2 and epsilon4 alleles of the apolipoprotein gene are associated with age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*. May 2004;45(5):1311-1315.
 172. Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. Aug 1 1997;90(3):909-928.
 173. Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature neuroscience*. Jul 2006;9(7):917-924.
 174. Combadiere C, Feumi C, Raoul W, et al. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *The Journal of clinical investigation*. Oct 2007;117(10):2920-2928.
 175. Faure S, Meyer L, Costagliola D, et al. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science*. Mar 24 2000;287(5461):2274-2277.
 176. Moatti D, Faure S, Fumeron F, et al. Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood*. Apr 1 2001;97(7):1925-1928.
 177. McDermott DH, Fong AM, Yang Q, et al. Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *The Journal of clinical investigation*. Apr 2003;111(8):1241-1250.
 178. Tuo J, Smith BC, Bojanowski CM, et al. The involvement of sequence variation and expression of CX3CR1 in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Aug 2004;18(11):1297-1299.
 179. Allikmets R, Shroyer NF, Singh N, et al. Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science*. Sep 19 1997;277(5333):1805-1807.
 180. Allikmets R. Further evidence for an association of ABCR alleles with age-related macular degeneration. The International ABCR Screening Consortium. *American journal of human genetics*. Aug 2000;67(2):487-491.

181. Stone EM, Webster AR, Vandenberg K, et al. Allelic variation in ABCR associated with Stargardt disease but not age-related macular degeneration. *Nature genetics*. Dec 1998;20(4):328-329.
182. Fuse N, Suzuki T, Wada Y, et al. Molecular genetic analysis of ABCR gene in Japanese dry form age-related macular degeneration. *Japanese journal of ophthalmology*. May-Jun 2000;44(3):245-249.
183. Schmidt S, Postel EA, Agarwal A, et al. Detailed analysis of allelic variation in the ABCA4 gene in age-related maculopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. Jul 2003;44(7):2868-2875.
184. Radu RA, Mata NL, Bagla A, Travis GH. Light exposure stimulates formation of A2E oxiranes in a mouse model of Stargardt's macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Apr 20 2004;101(16):5928-5933.
185. Brantley MA, Jr., Fang AM, King JM, Tewari A, Kymes SM, Shiels A. Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to intravitreal bevacizumab. *Ophthalmology*. Dec 2007;114(12):2168-2173.
186. Lee AY, Raya AK, Kymes SM, Shiels A, Brantley MA, Jr. Pharmacogenetics of complement factor H (Y402H) and treatment of exudative age-related macular degeneration with ranibizumab. *The British journal of ophthalmology*. May 2009;93(5):610-613.
187. Kang HK, Yoon MH, Lee DH, Chin HS. Pharmacogenetic influence of LOC387715/HTRA1 on the efficacy of bevacizumab treatment for age-related macular degeneration in a Korean population. *Korean journal of ophthalmology : KJO*. Dec 2012;26(6):414-422.
188. Klein ML, Francis PJ, Rosner B, et al. CFH and LOC387715/ARMS2 genotypes and treatment with antioxidants and zinc for age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. Jun 2008;115(6):1019-1025.
189. Awh CC, Lane AM, Hawken S, Zanke B, Kim IK. CFH and ARMS2 genetic polymorphisms predict response to antioxidants and zinc in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. Nov 2013;120(11):2317-2323.
190. Awh CC, Hawken S, Zanke BW. Treatment response to antioxidants and zinc based on CFH and ARMS2 genetic risk allele number in the Age-Related Eye Disease Study. *Ophthalmology*. Jan 2015;122(1):162-169.

191. Lee AY, Brantley MA, Jr. CFH and LOC387715/ARMS2 genotypes and antioxidants and zinc therapy for age-related macular degeneration. *Pharmacogenomics*. Oct 2008;9(10):1547-1550.
192. Γεώργιος Παπανικολάου ΔΠ, Ευθυμία Κατσαρέλη, Θεοδώρα Κατσίδα, Χαραλαμπία Τσαρουχά, Μαρία Τζέτη, Κωνσταντίνος Λιλάκος, Λεωνίδας Δούκισσας. *Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενετικής του Ανθρώπου-Στον υπολογιστή και στον πάγκο*. Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών; 2015.
193. www.corelifesciences.com.
194. Campbell, I., Chi-squared and Fisher-Irwin tests of two-by-two tables with small sample recommendations. *Stat Med*. 2007;26(19): p. 3661-3675.
195. Chew EY, Klein ML, Clemons TE, et al. No clinically significant association between CFH and ARMS2 genotypes and response to nutritional supplements: AREDS report number 38. *Ophthalmology*. Nov 2014;121(11):2173-2180.
196. Kloeckener-Gruissem B, Barthelmes D, Labs S, et al. Genetic association with response to intravitreal ranibizumab in patients with neovascular AMD. *Investigative ophthalmology & visual science*. Jul 1 2011;52(7):4694-4702.
197. Orlin A, Hadley D, Chang W, et al. Association between high-risk disease loci and response to anti-vascular endothelial growth factor treatment for wet age-related macular degeneration. *Retina*. Jan 2012;32(1):4-9.
198. Teper SJ, Nowinska A, Pilat J, Palucha A, Wylegala E. Involvement of genetic factors in the response to a variable-dosing ranibizumab treatment regimen for age-related macular degeneration. *Molecular vision*. Dec 7 2010;16:2598-2604.
199. Kitchens JW, Kassem N, Wood W, et al. A pharmacogenetics study to predict outcome in patients receiving anti-VEGF therapy in age related macular degeneration. *Clinical ophthalmology*. 2013;7:1987-1993.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα Α: Πίνακας με τα συνολικά δεδομένα για την ομάδα ασθενών Α – ΗΕΩ
ξηρού τύπου

SAMPLE NUMBER	AGE	GENDER	RESPONSE AFTER TREATMENT	CRITERIA OF RESPONSE	Y402H/ CFH	A69S/ LOC387715	E318D/ C2	IVS10/ C2	L9H/ CFB	IVS17/ CFB
1	57	FEMALE	YES	V.A IMPROVEMENT- NO OCT CHANGE	YES	YES	NO	NO	NO	NO
2	78	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	NO	NO	NO
3	76	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-
4	69	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	YES	NO	YES	NO
5	72	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	YES	NO	YES
6	68	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-
7	77	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	YES	NO	NO	NO	NO
8	79	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	NO	NO	NO	NO
9	79	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	YES(hom)	NO	NO	NO	YES
10	68	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	NO	NO	NO
11	64	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	NO	NO	YES
12	81	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	NO
13	75	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	NO	NO	NO	NO
14	76	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES(hom)	NO	NO	YES	NO	YES
15	75	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES(hom)	YES	NO	NO	NO	YES
16	71	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	YES	NO	YES
17	68	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	YES	NO	NO	NO	NO
18	67	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	YES	NO	NO	NO	NO
19	69	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-

20	76	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	YES	NO	NO	NO	NO
21	77	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	YES	NO	YES	NO
22	72	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-
23	55	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	NO	NO	NO	NO
24	65	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	NO	NO	NO	YES
25	73	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	NO	NO	NO	YES
26	84	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	NO	NO	NO	YES
27	82	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	NO	NO	NO
28	68	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	YES	NO	YES	NO
29	69	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	NO	NO	NO	NO
30	75	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-
31	73	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-
32	72	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES(hom)	NO	YES	NO	YES	NO
33	70	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-
34	79	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	YES	NO	YES
35	78	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-
36	79	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	YES	NO	NO	NO	YES
37	68	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-
38	67	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	NO	NO	NO	NO
39	60	MALE	YES	V.A IMPROVEMENT- NO OCT CHANGE	YES	YES(hom)	NO	YES	NO	YES(hom)
40	63	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	NO	NO	NO
41	81	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	YES(hom)

42	84	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	NO	NO	NO	NO
43	79	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	NO	NO	NO	NO	NO
44	77	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-	-
45	78	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-	-
46	69	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	NO	NO
47	85	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	YES(hom)	NO	YES(hom)	YES(hom)	NO
48	75	MALE	NO	V.A DETERIORATION	YES(hom)	YES	NO	NO	NO	NO	NO
49	71	FEMALE	NO	OCT CHANGE	YES(hom)	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	NO
50	78	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-	-
51	82	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	YES	NO	YES	YES	NO
52	70	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	YES	NO	YES	YES	YES
53	67	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	YES	NO	YES	YES	YES
54	63	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	NO	YES	NO	NO	YES
55	67	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	YES	NO	YES	YES	NO
56	78	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	YES	NO	NO	NO	NO	NO
57	79	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	NO	NO	NO	YES
58	79	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-	-
59	72	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-	-
60	81	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	NO	NO	NO	NO
61	59	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	NO	NO	NO	NO
62	66	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	YES	NO	NO	NO	NO	NO
63	64	FEMALE	NO	OCT CHANGE	YES	NO	NO	NO	NO	NO	NO

64	77	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- OCT CHANGE	NO	YES(hom)	NO	NO	NO	NO
65	79	MALE	NO	V.A DETERIORATION	NO	NO	-	-	-	-
66	68	MALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	NO	NO	NO	NO	NO
67	74	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- OCT CHANGE	YES	NO	NO	NO	NO	NO
68	79	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- OCT CHANGE	NO	NO	-	-	-	-
69	84	FEMALE	NO	OCT CHANGE	NO	NO	-	-	-	-
70	77	FEMALE	NO	OCT CHANGE	YES	NO	NO	YES	NO	YES
71	69	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	YES	NO	NO	NO	NO
72	79	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- OCT CHANGE	NO	NO	-	-	-	-
73	74	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	NO	NO	NO	NO	NO
74	71	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	NO	NO	-	-	-	-
75	70	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	NO	NO	NO	NO	NO
76	82	FEMALE	NO	OCT CHANGE	YES	NO	NO	NO	NO	NO
77	70	MALE	NO	OCT CHANGE	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	NO
78	77	FEMALE	NO	OCT CHANGE	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	NO
79	68	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	NO	NO	NO	NO	NO
80	69	MALE	NO	V.A DETERIORATION	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	NO
81	75	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	NO	NO	NO	NO	NO
82	78	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- OCT CHANGE	YES(hom)	YES	NO	NO	NO	NO
83	79	FEMALE	NO	OCT CHANGE	NO	YES	NO	NO	NO	NO
84	78	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- OCT CHANGE	YES(hom)	YES	NO	NO	NO	YES
85	73	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	YES	NO	NO	NO	NO

86	82	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	YES	NO	NO	NO	NO
87	67	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- OCT CHANGE	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	YES
88	78	MALE	NO	V.A DETERIORATION- OCT CHANGE	YES(hom)	YES	NO	NO	NO	NO
89	74	MALE	NO	OCT CHANGE	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	NO
90	81	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- OCT CHANGE	YES	YES	NO	NO	NO	NO
91	69	MALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	NO	NO	NO	NO	NO
92	72	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	YES(hom)	YES	NO	NO	NO	NO
93	77	MALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	YES	NO	NO	NO	NO
94	70	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	YES	NO	NO	NO	NO
95	80	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	NO	NO	NO	NO	NO
96	68	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	YES(hom)	YES	NO	NO	NO	NO
97	63	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- OCT CHANGE	NO	NO	-	-	-	-
98	69	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- OCT CHANGE	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	NO
99	66	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	YES	NO	NO	NO	NO
100	61	MALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	NO	NO	NO	NO	NO
101	71	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-
102	75	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	NO	NO	-	-	-	-
103	77	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	YES	NO	NO	NO	NO
104	62	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	YES	NO	NO	NO	NO

105	69	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	YES	NO	NO	NO	YES
106	79	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-
107	61	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION-OCT CHANGE	YES	NO	NO	NO	NO	NO
108	74	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-
109	59	FEMALE	YES	V.A IMPROVEMENT-NO OCT CHANGE	NO	NO	-	-	-	-
110	73	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	NO	NO	NO	NO
111	79	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	NO	NO	NO	NO
112	66	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	NO	NO	NO	NO	NO
113	76	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	NO	NO	NO	YES
114	68	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION-OCT CHANGE	YES	YES	NO	NO	NO	NO
115	65	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES(hom)	YES	NO	NO	NO	NO
116	76	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	NO
117	74	MALE	NO	V.A DETERIORATION	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	NO
118	76	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION-OCT CHANGE	YES	NO	NO	NO	NO	NO
119	78	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	NO	NO	NO	NO
120	84	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION-OCT CHANGE	YES	YES(hom)	NO	NO	NO	NO
121	76	FEMALE	NO	OCT CHANGE	NO	YES	NO	NO	NO	NO
122	77	MALE	NO	V.A DETERIORATION-OCT CHANGE	NO	NO	NO	NO	NO	NO
123	80	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	YES(hom)	NO	NO	NO	NO
124	83	MALE	NO	V.A DETERIORATION	YES(hom)	YES	NO	NO	NO	NO
125	80	MALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	NO	NO	NO	NO	NO

126	83	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	NO
127	69	FEMALE	NO	OCT CHANGE	YES(hom)	YES	NO	NO	NO	NO
128	76	MALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	YES	NO	NO	NO	NO
129	79	MALE	NO	V.A DETERIORATION-OCT CHANGE	NO	YES(hom)	NO	NO	NO	NO
130	83	MALE	NO	V.A DETERIORATION-OCT CHANGE	YES	YES	NO	NO	NO	NO
131	81	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES(hom)	NO	NO	NO	NO
132	68	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-
133	79	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	NO	NO	NO
134	78	MALE	NO	V.A DETERIORATION-OCT CHANGE	YES(hom)	YES	NO	NO	NO	NO
135	84	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION-OCT CHANGE	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	NO
136	69	FEMALE	YES	V.A IMPROVEMENT-NO OCT CHANGE	YES	NO	NO	NO	NO	YES
137	79	FEMALE	NO	OCT CHANGE	YES	YES	NO	NO	NO	NO
138	84	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	NO
139	85	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	YES	NO	NO	NO	NO
140	71	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	NO	NO	NO	NO
141	73	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	YES	NO	NO	NO	NO
142	78	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	NO	NO	YES
143	82	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	YES	NO	NO	NO	NO
144	79	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	NO	NO	NO
145	76	MALE	NO	OCT CHANGE	YES(hom)	YES(hom)	NO	NO	NO	NO
146	78	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-
147	56	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	YES	NO	NO	NO	NO

148	68	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	YES	NO	NO	NO	NO
149	79	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	NO	NO	NO
150	72	FEMALE	YES	V.A IMPROVEMENT- NO OCT CHANGE	YES	NO	NO	NO	NO	NO
151	61	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	NO	NO	NO	NO	NO
152	64	MALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	NO	NO	NO	NO	NO
153	73	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	YES	NO	YES	YES
154	55	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	YES	NO	NO	NO	NO
155	58	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	NO	NO	NO
156	75	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	NO	NO	NO
157	69	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	NO	NO	NO	NO
158	77	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	NO	NO	NO	YES
159	70	MALE	YES	V.A IMPROVEMENT- NO OCT CHANGE	YES	YES	NO	NO	NO	YES
160	73	FEMALE	NO	OCT CHANGE	YES	YES	NO	NO	NO	NO
161	75	FEMALE	YES	V.A IMPROVEMENT- NO OCT CHANGE	YES	YES(hom)	NO	NO	NO	NO
162	80	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	NO	NO	NO
163	82	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- OCT CHANGE	NO	YES(hom)	NO	NO	NO	NO
164	68	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	NO	-	-	-	-
165	61	FEMALE	NO	OCT CHANGE	YES(hom)	YES(hom)	NO	NO	NO	YES
166	78	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	NO	NO	NO
167	71	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	NO	YES	NO	NO	NO	YES
168	74	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- OCT CHANGE	YES(hom)	YES	NO	NO	NO	NO
169	67	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	YES	NO	NO	NO	NO
170	77	MALE	YES	NO CHANGE IN V.A AND OCT	YES	NO	NO	NO	NO	NO

Παράρτημα Β: Πίνακας με τα συνολικά δεδομένα για την ομάδα ασθενών Β – ΗΕΩ υγρού τύπου

SAMPLE NUMBER	AGE	GENDER	RESPONSE AFTER TREATMENT	CRITERIA OF RESPONSE	Y402H/ CFH	A69S/ ARMS2	E318D/ C2	IVS10/ C2	L9H/ CFB	IVS17/ CFB
1	76	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT-NO FLUID	YES(hom)	YES	NO	YES	NO	YES
2	78	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT-NO FLUID	NO	NO	-	-	-	-
3	77	MALE	YES	V.A IMPROVENT-NO FLUID	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	NO
4	68	MALE	YES	V.A IMPROVENT-NO FLUID	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	NO
5	69	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT-NO FLUID	YES	YES	NO	YES	NO	YES(hom)
6	78	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT-NO FLUID	YES	YES	NO	NO	NO	NO
7	79	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT-NO FLUID	YES	NO	NO	NO	NO	NO
8	73	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT-NO FLUID	YES	NO	NO	NO	NO	NO
9	79	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT-NO FLUID	YES	NO	NO	NO	NO	NO
10	67	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT-NO FLUID	YES	YES	NO	NO	NO	NO
11	79	MALE	YES	V.A IMPROVENT-NO FLUID	YES	NO	NO	YES	NO	YES(hom)
12	77	MALE	YES	V.A IMPROVENT-NO FLUID	YES	NO	NO	NO	NO	YES(hom)
13	78	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT-NO FLUID	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	YES
14	85	MALE	YES	V.A IMPROVENT-NO FLUID	YES	YES	NO	NO	NO	NO
15	78	MALE	YES	V.A IMPROVENT-NO FLUID	NO	NO	-	-	-	-
16	83	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT-NO FLUID	YES	YES	NO	NO	NO	NO

17	80	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT- NO FLUID	YES	NO	NO	NO	NO	NO
18	79	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT- NO FLUID	YES	YES	NO	NO	NO	NO
19	72	FEMALE	NO	FLUID	YES	YES(hom)	NO	NO	NO	NO
20	84	FEMALE	NO	FLUID	YES	YES	NO	NO	NO	YES
21	78	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- FLUID	NO	YES	NO	NO	NO	NO
22	76	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- FLUID	YES	YES	NO	NO	NO	NO
23	69	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- FLUID	YES	NO	NO	NO	NO	NO
24	70	MALE	NO	V.A DETERIORATION- FLUID	YES	NO	NO	NO	NO	NO
25	72	MALE	NO	V.A DETERIORATION	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	NO
26	68	MALE	NO	V.A DETERIORATION- FLUID	NO	YES	NO	NO	NO	NO
27	74	MALE	NO	V.A DETERIORATION	YES	YES	NO	NO	NO	NO
28	68	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- FLUID	YES(hom)	YES(hom)	NO	NO	NO	NO
29	69	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A-NO FLUID	NO	YES	NO	NO	NO	NO
30	78	MALE	NO	V.A DETERIORATION	YES(hom)	YES	NO	NO	NO	NO
31	72	MALE	YES	V.A IMPROVENT- NO FLUID	YES	NO	YES	NO	YES	NO
32	80	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- FLUID	YES(hom)	YES	NO	NO	NO	NO
33	81	MALE	YES	V.A IMPROVENT- NO FLUID	YES	YES	NO	NO	NO	NO
34	67	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- FLUID	NO	YES(hom)	NO	NO	NO	NO

35	77	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT- NO FLUID	YES	NO	NO	NO	NO	NO
36	76	MALE	YES	V.A IMPROVENT- NO FLUID	YES	YES	NO	NO	NO	NO
37	69	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT- NO FLUID	YES	NO	NO	NO	NO	NO
38	66	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT- NO FLUID	YES	NO	NO	NO	NO	NO
39	78	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT- NO FLUID	YES	NO	NO	NO	NO	NO
40	77	MALE	YES	V.A IMPROVENT- NO FLUID	YES	YES	NO	NO	NO	NO
41	70	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT- NO FLUID	YES	YES	NO	NO	NO	NO
42	82	MALE	YES	V.A IMPROVENT- NO FLUID	YES	NO	NO	NO	NO	NO
43	83	MALE	NO	V.A DETERIORATION- FLUID	YES(hom)	YES	NO	NO	NO	NO
44	79	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT- NO FLUID	YES	NO	NO	NO	NO	NO
45	77	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A-NO FLUID	YES	NO	NO	NO	NO	NO
46	76	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT- NO FLUID	YES	NO	NO	NO	NO	NO
47	72	FEMALE	YES	V.A IMPROVENT- NO FLUID	NO	YES	NO	NO	NO	NO
48	81	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- FLUID	YES	YES	NO	NO	NO	NO
49	80	FEMALE	YES	NO CHANGE IN V.A-NO FLUID	YES(hom)	NO	NO	NO	NO	YES
50	77	MALE	NO	V.A DETERIORATION- FLUID	YES(hom)	YES	NO	NO	NO	NO
51	73	FEMALE	NO	V.A DETERIORATION- FLUID	YES(hom)	YES	NO	NO	NO	NO
52	77	MALE	NO	FLUID	YES(hom)	YES	NO	NO	NO	NO

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

1.ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Επώνυμο	ΓΟΥΡΓΟΥΛΗ
Όνομα	ΚΑΛΛΙΟΠΗ
Πατρώνυμο	ΑΓΑΜΕΜΝΩΝ
Ημερομηνία Γέννησης	11/07/1984
Υπηκοότητα	ΕΛΛΗΝΙΚΗ
Τόπος Κατοικίας	ΓΛΥΦΑΔΑ ΑΤΤΙΚΗΣ
Οικογενειακή Κατάσταση	ΕΓΓΑΜΗ ΜΕ 1 ΤΕΚΝΟ
E-mail	kgourgouli@gmail.com

2.ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

- 2014 - σήμερα
Υποψήφια Διδάκτωρ Τμήματος Βιολογίας, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 2009 - 2011
Μεταπτυχιακός Τίτλος Σπουδών “ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ”, Τομέας Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 2002 - 2008
Πτυχίο Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 1999 - 2002
Ιδιωτικό Ενιαίο Λύκειο – Ελληνογαλλική Σχολή Ουρσουλινών

3. ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

- ΑΓΓΛΙΚΑ: Άριστη γνώση

Κάτοχος Proficiency - University of Cambridge

Κάτοχος Proficiency - University of Michigan

- ΓΑΛΛΙΚΑ: Άριστη γνώση

Κάτοχος Sorbonne II

Επάρκεια διδασκαλίας της γαλλικής γλώσσας

4. ΧΡΗΣΗ Η/Υ

Άριστη γνώση χειρισμού Η/Υ

- Κάτοχος ECDL Core Certificate, Μάιος 2009
- Σεπτέμβριος 2004-Δεκέμβριος 2004:

Λειτουργικό σύστημα: MS Office 2000 (MS Word 2000, MS Excel 2000, MS Access 2000, MS Power Point2000, MS Outlook 2000), Φορέας: Εργαστήριο Ελεύθερων Σπουδών DIDACTA.

5. ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ / ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

A. Παρουσιάσεις

- 18 - 20 Μαΐου 2017:

50^ο Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο, Ρόδος

Προφορική ανακοίνωση: «Διερεύνηση της γενετικής βάσης στην αντιμετώπιση της ηλικιακής εκφύλισης ωχράς κηλίδας ξηρού τύπου»

Γουργούλη Κ., Γουργούλη Ι., Σπαή Σ., Θεοδοσιάδης Π., Λάμνησου Κ.

B. Παρακολούθηση

- 6 - 9 Ιουνίου 2019: 52^ο Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο, Αθήνα
- 31 Μαΐου - 3 Ιουνίου 2018: 51^ο Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη
- 18 - 20 Μαΐου 2017: 50^ο Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο, Ρόδος
- 25 - 27 Νοεμβρίου 2016: 67^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Ιωάννινα
- 15 - 17 Ιανουαρίου 2015: 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Υαλοειδούς Αμφιβληστροειδούς, Αθήνα
- 28 - 31 Μαΐου 2014: 47^ο Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη
- 18/4/2013: 60 χρόνια DNA, Επετειακή Ημερίδα, Ίδρυμα Ευγενίδου
- 9 - 11 Δεκεμβρίου 2011: 62^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Αθήνα
- 18 Οκτωβρίου – 17 Δεκεμβρίου 2010 : Α΄ Φάση Εισαγωγικής Επιμόρφωσης για αναπληρωτές εκπαιδευτικούς, 2^ο ΠΕΚ Αθήνας
- 21 - 23 Οκτωβρίου 2010: '1st International Diabetes and Obesity Forum', Athens-Greece
- 14 - 16 Μαΐου 2009: 31^ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών επιστημών, Πάτρα
- 28 Ιουνίου - 3 Ιουλίου 2008: 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference – Biochemistry of Cell Regulation, Athens – Greece

- 22 - 24 Μαΐου 2008: 30^ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών επιστημών, Θεσσαλονίκη
- 9 - 11 Μαΐου 2008 : 14ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος, 2ο Διεθνές Forum Φοιτητών Ιατρικής & Νέων Ιατρών Ελλάδος, Αθήνα
- 17 - 19 Μαΐου 2007 : 29^ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών επιστημών, Καβάλα
- 18 - 20 Μαΐου 2006 : 28^ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών επιστημών, Ιωάννινα

6. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

- Ιανουάριος 2020: International Ophthalmology
Gourgouli, K., Gourgouli, I., Tsaousis, G. *et al.* Investigation of genetic base in the treatment of age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol* (2020) doi:10.1007/s10792-019-01274-7

7. ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

A. Σε Δημόσια Σχολεία Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης

- Σεπτέμβριος 2019 - σήμερα: Αναπληρώτρια Εκπαιδευτικός στο 3^ο ΓΕΛ Ηλιούπολης
- Σεπτέμβριος 2018 - Ιούνιος 2019: Αναπληρώτρια Εκπαιδευτικός στο 3^ο ΓΕΛ Ηλιούπολης
- Σεπτέμβριος 2017 - Ιούνιος 2018: Αναπληρώτρια Εκπαιδευτικός στο 3^ο ΓΕΛ Αχαρνών, στο ΓΕΛ Αγίου Στεφάνου και στο ΓΕΛ Διονύσου

- Σεπτέμβριος 2016 - Ιούνιος 2017: Αναπληρώτρια Εκπαιδευτικός στο 1^ο ΓΕΛ Γαλασίου και στο 2^ο ΓΕΛ Γαλασίου
- Σεπτέμβριος 2015 - Ιούνιος 2016: Αναπληρώτρια Εκπαιδευτικός στο 3^ο ΓΕΛ Αχαρνών
- Σεπτέμβριος 2014 - Ιούνιος 2015: Αναπληρώτρια Εκπαιδευτικός στο 4^ο Γυμνάσιο Δάφνης και στο 3^ο ΓΕΛ Δάφνης
- Σεπτέμβριος 2012 - Ιούνιος 2013: Αναπληρώτρια Εκπαιδευτικός στο 3^ο ΓΕΛ Δάφνης και στο ΓΕΛ Καρέα
- Οκτώβριος 2011 - Ιούνιος 2012: Αναπληρώτρια Εκπαιδευτικός στο 2^ο Γυμνάσιο Μελισσίων
- Οκτώβριος 2010 - Ιούνιος 2011: Αναπληρώτρια Εκπαιδευτικός στο 1^ο Γυμνάσιο Σκάλας Ωρωπού και στο ΓΕΛ Σκάλας Ωρωπού
- Νοέμβριος 2009 - Ιούνιος 2010: Ωρομίσθια Εκπαιδευτικός στο 2^ο Γυμνάσιο Αγίων Αναργύρων και στο 2^ο ΓΕΛ Καματερού

B. Σε Εργαστήρια

- Απρίλιος 2009 - Ιούλιος 2011: Στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία» στο εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών
- Μάιος 2008 - Ιούνιος 2008: Στα πλαίσια πρακτικής άσκησης στο εργαστήριο Εξωσωματικής Γονιμοποίησης του μαιευτηρίου 'ΜΗΤΕΡΑ'
- Οκτώβριος 2006 - Ιούλιος 2007: Στα πλαίσια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας στο Τμήμα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας, Εργαστήριο Κυτταρογενετικής – Νοσοκομείο 'ΜΗΤΕΡΑ'

8. ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

1. Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας στα πλαίσια του προγράμματος σπουδών του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού Και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με τίτλο:

«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ ΣΕ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΑΠΟΒΟΛΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕ ΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟ QF-PCR»

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Κ. Λάμνησου, Επίκουρη Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Αθηνών.

2. Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία» της Ιατρικής Σχολής Αθηνών με τίτλο:

«ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΤΡΙΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ IGF-I ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ»

Επιβλέπων Καθηγητής: Μ. Κουτσιλιέρης, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών.

3. Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στα πλαίσια του προγράμματος Διδακτορικών Σπουδών του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, με θέμα:

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΚΗΣ ΕΚΦΥΛΙΣΗΣ ΤΗΣ ΩΧΡΑΣ ΚΗΛΙΔΑΣ»

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Κ. Λάμνησου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής - Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου.

9. ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ / ΕΘΕΛΟΝΤΙΣΜΟΣ

- Επίτυχία στον διαγωνισμό εκπαιδευτικών του ΑΣΕΠ κατά το έτος 2008
- Ιούνιος 2012: Ενισχυτική διδασκαλία- Εθελοντική προσφορά στον μαθητή, 2^ο Γυμνάσιο Μελισσίων
- Οκτώβριος 1999: Αριστείο Προόδου κατά το σχολικό έτος 1998-1999
- Οκτώβριος 1997: Αριστείο Προόδου κατά το σχολικό έτος 1996-1997



Investigation of genetic base in the treatment of age-related macular degeneration

Kalliopi Gourgouli · Ioanna Gourgouli · Georgios Tsaousis · Sofia Spai · Maria Niskopoulou · Spiros Efthimiopoulos · Klea Lamnissou

Received: 3 August 2019 / Accepted: 30 December 2019
© Springer Nature B.V. 2020

Abstract

Purpose To determine whether gene polymorphisms which are associated with age-related macular degeneration (AMD) influence treatments' response and specifically the antioxidant supplementation in dry AMD patients, as well as the anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) therapy in neovascular AMD patients.

Methods A total of 170 patients with dry AMD and 52 neovascular AMD patients were genotyped for the following single nucleotide polymorphisms (SNPs):

rs1061170/Y402H in CFH gene, rs10490924/A69S in ARMS2 gene, rs9332739/E318D and rs547154/TVS10 in C2 gene, and rs4151667/L9H and rs2072633/TVS17 in CFB gene. Treatment response was evaluated by comparing visual acuity and optical coherence tomography between baseline and at the end of the treatment. **Results** The CFH/Y402H variant was associated with the response to antioxidants in dry AMD patients. Carriers of one or two CFH risk alleles displayed a lower chance of responding compared to those with no risk allele. No association of antioxidants' response and ARMS2/A69S genotype was identified. The analysis of the C2 and CFB genetic variants (protective SNPs) revealed that antioxidant supplementation was much more effective in protective SNP carriers. In neovascular AMD patients, the analysis indicated that Y402H homozygous patients were less likely to respond to anti-VEGF therapy compared to heterozygous. Regarding the ARMS2/A69S genotype, carriers of the risk variant experienced significantly worse treatment outcome compared to wild-type patients. **Conclusion** In AMD patients, the efficacy of the antioxidant supplementation and the anti-VEGF therapy appears to differ by genotype. The detection of genetic variants, associated with treatment responsiveness, could lead to improved visual outcomes through genotype-directed therapy.

K. Gourgouli (✉) · K. Lamnissou
Division of Genetics and Biotechnology, Department of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis, Ilissia, 15701 Athens, Greece
e-mail: kgourgouli@gmail.com

I. Gourgouli · S. Spai
Department of Ophthalmology, Sismanoglio General Hospital of Attica, Athens, Greece

G. Tsaousis
Division of Cell Biology and Biophysics, Department of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

M. Niskopoulou
Consultant Ophthalmic Surgeon, Agias Paraskevis 118, Chalandri, 15232 Athens, Greece

S. Efthimiopoulos
Division of Animal and Human Physiology, Department of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Keywords Age-related macular degeneration · Antioxidants · Ranibizumab · Single nucleotide polymorphisms · Treatment response

Introduction

Age-related macular degeneration (AMD) is a primary cause of blindness in individuals over 50 years worldwide with relatively higher prevalence in the developed world [1]. There are two types of AMD: non-exudative (dry) AMD and exudative or neovascular (wet) AMD [2]. Drusen formation and pigmentation changes in the choroid/retinal pigmented epithelium (RPE) layers in the macula characterize the early stage of AMD [2]. Late AMD may be atrophic or neovascular. Neovascular AMD is characterized by choroidal neovascularization (CNV) beneath the fovea which is influenced mainly by the production of vascular endothelial growth factor (VEGF) [3]. The role of nutritional supplements, such as vitamins and antioxidants, in the progression to advanced AMD has been the focus of several studies [4]. Intravitreal injection of the anti-VEGF agents, ranibizumab, bevacizumab, and aflibercept is currently the most efficient treatment for neovascular AMD [5, 6].

The pathophysiology of AMD is poorly understood due to the fact that, it is a multifactorial disease which is associated with both genetic and environmental components [7]. Advanced age and smoking have been demonstrated to be the major non-genetic risk factors, although traits as hypertension or cardiovascular disease, chronic inflammation, sunlight exposure, cataract surgery, high body mass index, and high-fat diet have also been found to affect AMD risk [8]. Over the last years, several studies have shown substantial genetic contributions to AMD pathogenesis [9–11]. In particular, genetic studies have demonstrated statistically significant associations between AMD and single nucleotide polymorphisms (SNPs) of some genes [12, 13]. Two major AMD-associated SNPs include the Y402H (rs1061170) variant of complement factor H (CFH) [14–16] and the A69S (rs10490924) variant of age-related maculopathy susceptibility 2 (ARMS2), previously known as LOC387715 [17, 18]. Carriers of the risk variants have a significantly increased risk of the disease [19]. CFH and ARMS2 have also been investigated to influence responses to AMD treatments [20–24]. According to recent studies, SNPs rs9332739/E318D and rs547154/IVS10 in complement component 2 (C2) gene, as well as rs4151667/L9H and rs2072633/IVS17 in complement factor B (CFB) gene, seem to

act protectively and decrease the risk of AMD [25–27]. Some data correlate the above SNPs with the disease progression and the clinical response to treatment [28].

Our study aimed to detect genetic polymorphisms which could predict treatment outcomes and could lead to a better response to applied treatments, and specifically to the use of antioxidant supplements, in dry AMD patients and to the anti-VEGF therapy, in patients with the exudative type of the disease.

Materials and methods

Patients, clinical examination, and treatment

Two hundred twenty-two Caucasian patients aged 55–85 years were recruited for the study after a complete ophthalmic examination. Recruitment and analysis continued over a period of 4 years. Inclusion criteria were age of 55 years or more and the presence of treatment-naïve AMD. Patients with cataract or glaucoma were excluded. Furthermore, we excluded patients with prior ocular surgery (except cataract surgery), patients with uncontrolled diabetes or uncontrolled systemic arterial hypertension, and patients with a major systemic disease such as cancer or autoimmune disease. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

At baseline visit, patients underwent a standard ophthalmic examination, including visual acuity measurement, using the Snellen eye examination chart, clinical examination, and macular optical coherence tomography (OCT) with the (SD)-OCT Optovue. Patients were divided into two groups according to the type of AMD: Group A consisting of 170 dry AMD patients who had at least one eye with either medium-sized (63–124 μm), soft drusen without pigment irregularities, or large (> 125 μm) drusen with or without pigment irregularities (early or intermediate AMD) and group B consisting of 52 patients with advanced neovascular AMD, characterized by the presence of subretinal or intraretinal fluid in at least one eye. In cases of bilateral AMD, the eye with the worse visual acuity was included in the study in both groups. Therapeutic treatment was applied to each group. More specifically, group A patients received a daily supplement consisting of 6 mg lutein and 0.5 mg

zeaxanthin, both provided as ester, 60 mg vitamin C, 8.8 mg vitamin E, 5 mg zinc, and 20 µg selenium (OcuVite Lutein forte) for a period of 12 months, while group B patients were treated with 3 monthly intravitreal injections with a dose of 0.5 mg/0.05 mL ranibizumab. Snellen visual acuity measurements and OCT scans were repeated at 12 months following continuous supplementation for group A and at 1 month after the third injection for group B. No patient received cataract surgery by the end of the follow-up period.

DNA preparation and genotyping

Genomic DNA was extracted from leukocytes with a nucleoid acid isolation device (iPrep, Invitrogen) and the iPrep PureLink gDNA Blood Kit. Patients were genotyped for the following six SNPs: rs1061170/Y402H in CFH gene, rs10490924/A69S in ARMS2 gene, rs9332739/E318D and rs547154/IVS10 in C2 gene, and rs4151667/L9H and rs2072633/IVS17 in CFB gene. Polymorphic sites were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with specific primers (Table 1) using a DNA thermocycler (T professional, Biometra). PCR amplification took place in a 25 µL mixture containing 5 µL 5X buffer, 80 ng DNA, 0.7 µM primers, 0.3 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, and 1.25 U DNA polymerase (KAPA Taq HotStart PCR Kit, KAPABIOSYSTEMS). Samples were denatured at 94 °C for 5 min followed by 35 cycles under the following conditions: denature at 94 °C for 45 s, annealing at 58 °C for 45 s, and extension at 72 °C for 45 s. The final extension step was lengthened to 5 min. PCR products were electrophoresed on 1.5% (w/v) agarose gels and visualized under ultraviolet light. Genotyping of the variants was performed with direct automated sequencing with the

BigDyeTerminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) using an automatic ABI 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Data analysis

Treatment response was evaluated by comparing visual acuity and OCT anatomical changes for group A and group B between baseline and at the end of the follow-up period. Patients were classified as responders and non-responders based on OCT and visual acuity measurements. For group A, patients with no change or any improvement in visual acuity and also no observed anatomical change on OCT compared to baseline were classified as responders and all the patients with either deterioration in visual acuity and/or anatomical change as non-responders. For group B, patients with no change or with an improvement on the Snellen eye chart in visual acuity and also OCT improvement (no fluid, either subretinal or intraretinal, present at least one month after the third injection) compared to baseline were classified as responders and all the other patients as non-responders.

Statistical analysis

The proportion of treatment responders was statistically compared to patients' genotypes for each gene. The association between each genotype and the percentage of responders in the two groups of patients was calculated using p-values with corresponding 95% confidence intervals (95% CIs). Statistics were performed with SPSS (version 20, IBM SPSS STATISTICS). The p values were based on "N-1" chi squared test [29]. A p value < 0.05 was considered to be statistically significant.

Table 1 Oligonucleotide sequences for PCR amplification of AMD-related variants

Amplicon	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
CFH rs1061170	GATCGAAGAAAGGAGAGCACATAAGTG	TACTTACTGACACGGATGCATCTGG
ARMS2 rs10490924	ATGGTAACTGAGGCGGAGGGGAAA	TGGTTAAAAATGCAAGCTGCAGG
C2 rs9332739	GATCTTCAGCTTTGAGATCAATGTG	CGTTGAAACTACCCAGACTCG
C2 rs547154	ACCTCTGGAATCCAAGCCCTGC	ACAGGAGTCTGGTGATTTCCCTCTT
CFB rs4151667	ACCAGGTCTAGGTCTGGAGTTTCA	GGAAGGTTACCCCTCGCTTA
CFB rs2072633	CAGCACTTGAAGAGGTTGATGTGA	AAGCAGGAAAGCTCAATGCATGT

Results

A total of 222 patients who met the inclusion/exclusion criteria were enrolled in the study. A total of 170 of them were diagnosed with the dry type of the disease (group A), and 52 were neovascular AMD patients (group B). The demographic characteristics of patients are shown in Table 2. In group A, 58.8% of the patients were classified as responders based on visual acuity and OCT parameters. Responders were characterized by visual acuity stabilization or improvement and no significant anatomical deterioration in OCT scans, including increase in detected drusen and presence of new retinal pigment epithelial detachments. In group B, 65.0% of the patients were classified as responders. In this group of patients, responders were characterized by visual acuity stabilization or improvement and no fluid, either subretinal or intraretinal, present at least 1 month after the third injection in OCT scans.

Group A—dry AMD

The total results of group A are presented in Fig. 1 and Table 3. Analyzing the association between CFH Y402H variant and the percentage of responders to the use of antioxidants supplements, a strong association was detected. About 75.0% of the patients who responded did not carry the risk allele C (wild-type-genotype TT). The patient group TC (heterozygous) and CC (homozygous) displayed a lower chance of responding compared to wild-type patients ($p = 0.005$, 95% CI 7.419–36.532). Furthermore,

Fig. 1 Percentage of responders to antioxidant supplementation across each genotype—dry AMD patients. *Notes* In each plot, the percentage of responders is compared between the wild-type (WT) and patients heterozygous or homozygous (HET/HOM), heterozygous only (HET), and homozygous only variants (HOM)

patients with two risk alleles at CFH experienced significantly worse visual outcomes and had a lower chance of responding compared to wild-type ($p < 0.001$, 95% CI 24.029–62.203) or heterozygous patients ($p = 0.003$, 95% CI 10.338–46.949). However, this study showed no statistical significant difference between ARMS2 A69S genotype and the percentage of responders to antioxidants ($p = 0.364$).

Regarding the protective SNPs in C2 and CFB genes, a significant association was indicated between these SNPs and treatment responsiveness (Table 3). The protective genotype of rs9332739/E318D variant in C2 gene was associated with treatment response ($p = 0.004$). All of the patients who stabilized their visual acuity and OCT carried the C variant (genotype GC and CC). The comparison between the protective genotype of rs547154/IVS10 in C2 gene with the percentage of responders revealed no statistically significant difference ($p = 0.102$). The genetic variants rs4151667/L9H and rs2072633/IVS17 in CFB gene predisposed patients to a good response. The protective genotype of rs4151667/L9H variant (genotype TA and AA) was associated with a positive treatment response ($p = 0.004$, 95% CI 18.722–56.165) compared to wild-type patients (genotype TT). The comparison of the genotype and the percentage of responders at SNP rs2072633/IVS17 revealed a statistically significant difference between wild-type patients (genotype GG) and patients who carried the A variant (genotype GA and AA) ($p < 0.001$, 95% CI 19.308–50.631). Examining the presence of at least one protective SNP either in C2 or CFB gene in patients' genotype, the analysis showed that individuals who carried at least one protective SNP were more likely to respond and stabilize their visual acuity and OCT compared with those who lacked any protective SNP ($p < 0.001$, 95% CI 27.519–55.894). The probability for a better treatment result was significantly higher in patients who carried at least two protective SNPs. Individuals who carried the genotype combination of two protective SNPs were more likely to experience a positive outcome

Table 2 Demographic variables of AMD patients

Variables	Total
<i>Dry AMD patients</i>	
Number of patients	170
Mean age (years)	73
Male/female	53/117
Responders/non-responders	100/70
<i>Neovascular AMD patients</i>	
Number of patients	52
Mean age (years)	76
Male/female	19/33
Responders/non-responders	34/18

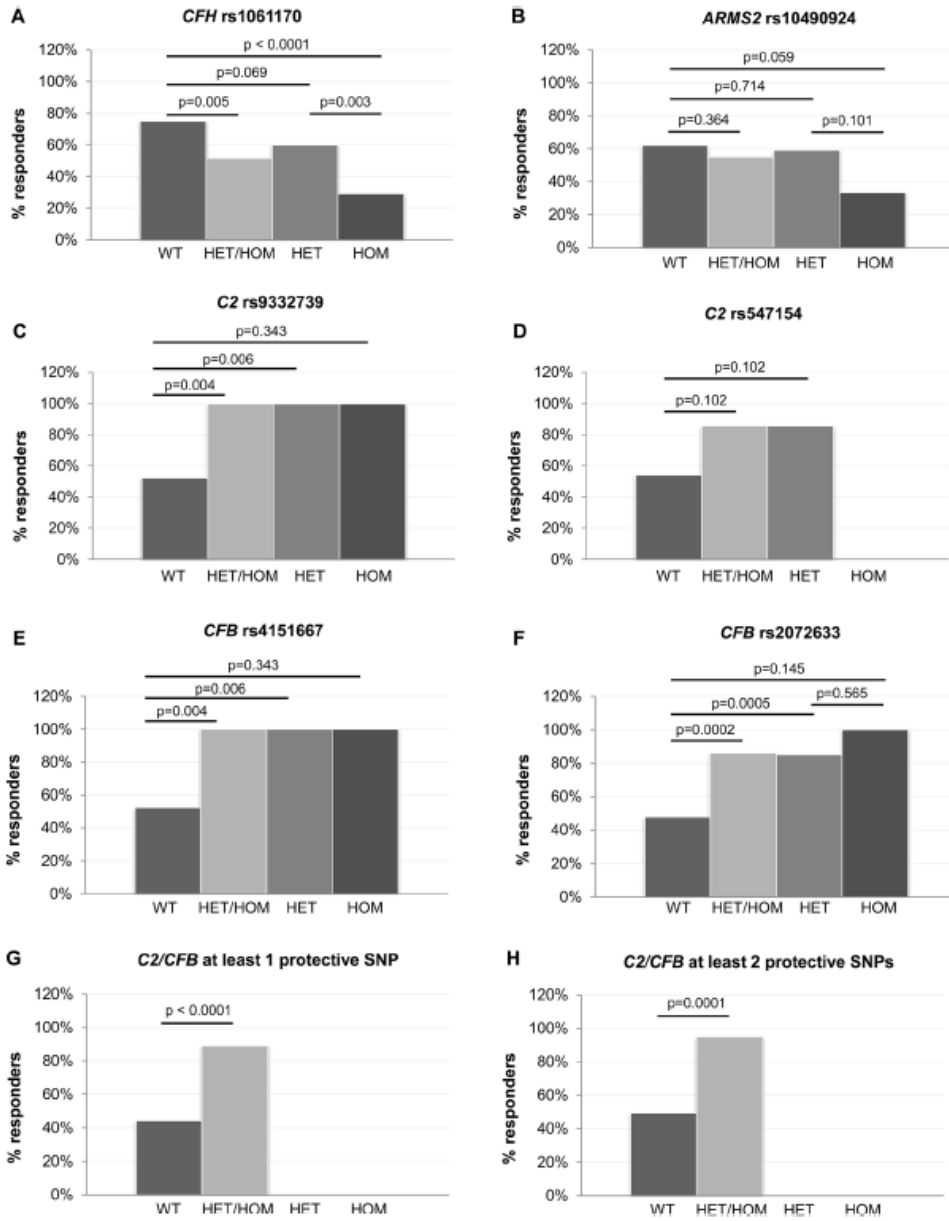


Table 3 Genotype compared to the proportion of responders to antioxidants—dry AMD

Locus/SNP	Genotype	Number of patients (%responders)	<i>p</i> value	95% CI
CFH rs1061170	WT	52 (75.0%)	0.0046	7.4194 to 36.5317%
	HET/HOM	118 (51.7%)		
	WT	52 (75.0%)	0.0692	– 1.1722 to 29.5442%
	HET	87 (59.8%)		
	WT	52 (75.0%)	< 0.0001	24.0287 to 62.2030%
	HOM	31 (29.0%)		
ARMS2 rs10490924	HET	87 (59.8%)	0.0033	10.3380 to 46.9488%
	HOM	31 (29.0%)		
	WT	92 (62.0%)	0.3638	– 7.7742 to 21.2852%
	HET/HOM	78 (55.1%)		
	WT	92 (62.0%)	0.7136	– 12.1384 to 18.0836%
	HET	66 (59.1%)		
C2 rs9332739	WT	92 (62.0%)	0.0588	– 0.7358 to 50.2901%
	HOM	12 (33.3%)		
	HET	66 (59.1%)	0.1005	– 4.3201 to 48.2164%
	HOM	12 (33.3%)		
	WT	132 (52.3%)	0.0035	18.7223 to 56.1646%
	HET/HOM	10 (100.0%)		
C2 rs547154	WT	132 (52.3%)	0.0055	16.6462 to 56.1646%
	HET	9 (100.0%)		
	WT	132 (52.3%)	0.3430	– 32.0816 to 56.1646%
	HOM	1 (100.0%)		
CFB rs4151667	WT	135 (54.1%)	0.1020	– 6.3188 to 46.0273%
	HET	7 (85.7%)		
CFB rs2072633	WT	132 (52.3%)	0.0035	18.7223 to 56.1646%
	HET/HOM	10 (100.0%)		
	WT	132 (52.3%)	0.0055	16.6462 to 56.1646%
	HET	9 (100.0%)		
CFB rs2072633	WT	132 (52.3%)	0.3430	– 32.0816 to 56.1646%
	HOM	1 (100.0%)		
	WT	113 (47.8%)	0.0002	19.3083 to 50.6311%
	HET/HOM	29 (86.2%)		
	WT	113 (47.8%)	0.0005	17.5183 to 50.0418%
	HET	27 (85.2%)		
C2/CFB At least 1 protective SNP	WT	113 (47.8%)	0.1449	– 14.1927 to 61.1853%
	HOM	2 (100.0%)		
	HET	27 (85.2%)	0.5648	– 51.5605 to 32.4614%
	HOM	2 (100.0%)		
	WT	106 (44.3%)	< 0.0001	27.5192 to 55.8942%
	HET/HOM	36 (88.9%)		
C2/CFB At least 2 protective SNPs	WT	122 (49.2%)	0.0001	25.2289 to 55.4321%
	HET/HOM	20 (95.0%)		

Statistical analysis: Association of the percentage of responders across each genotype. The percentage of responders was compared between the WT and the HET/HOM, HET, and HOM patients. In the two last lines, we examined the presence of at least one and at least two protective SNPs in patients' genotype

CI confidence interval, *SNP* single nucleotide polymorphism, *WT* wild type, *HET/HOM* heterozygous or homozygous, *HET* heterozygous, *HOM* homozygous

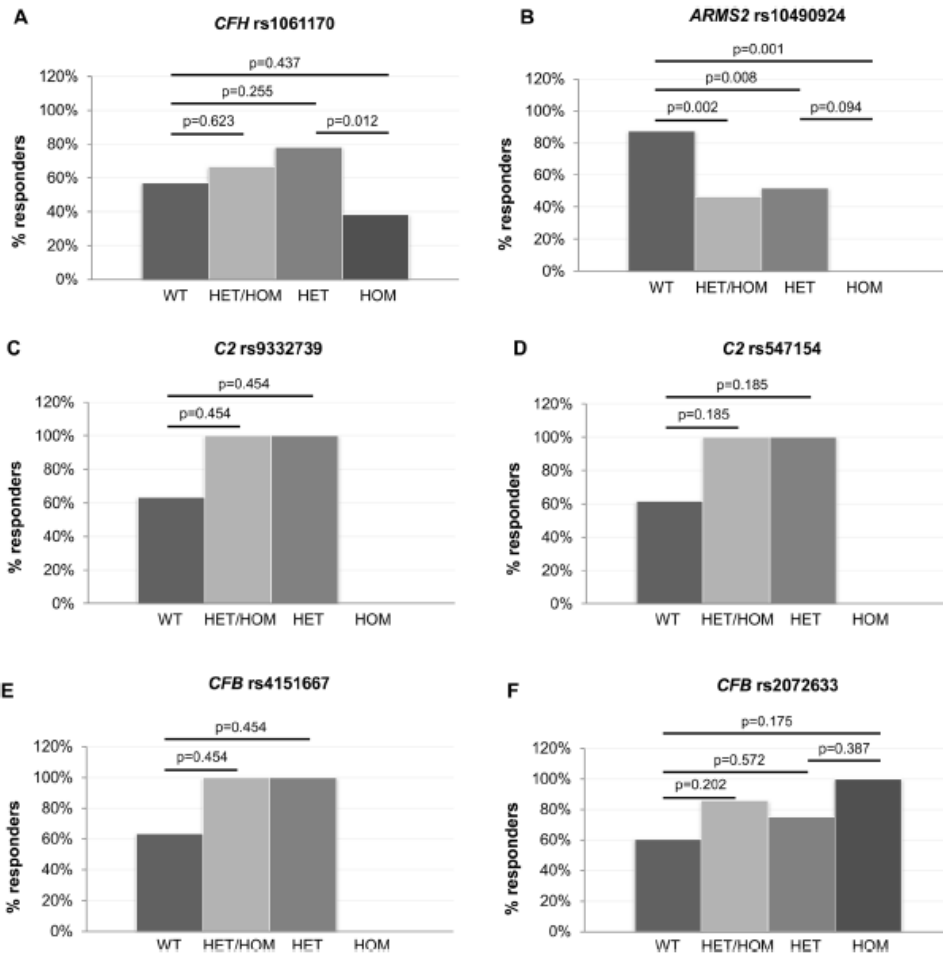


Fig. 2 Percentage of responders to anti-VEGF therapy across each genotype—neovascular AMD patients. *Notes* In each plot, the percentage of responders is compared between the wild-type

(WT) and patients heterozygous or homozygous (HET/HOM), heterozygous only (HET), and homozygous only variants (HOM)

compared with those who did not carry any protective SNP ($p < 0.001$, 95% CI 25.229–55.432).

Group B—exudative AMD

The total results of group B are presented in Fig. 2 and Table 4. The analysis of neovascular AMD patients

revealed a significant association between CFH Y402H genotype and treatment response to anti-VEGF agent ranibizumab. Homozygous patients (genotype CC) demonstrated significantly worse treatment outcome in comparison with heterozygous patients (genotype TC) ($p = 0.012$, 95% CI 8.591–63.032). No significant difference in treatment

Table 4 Genotype compared to the proportion of responders to anti-VEGF therapy—exudative AMD

Locus/SNP	Genotype	Number of patients (%responders)	<i>p</i> value	95% CI
CFH rs1061170	WT	7 (57.1%)	0.6228	– 21.1390 to 43.8439%
	HET/HOM	45 (66.7%)		
	WT	7 (57.1%)	0.2554	– 10.8882 to 54.8719%
	HET	32 (78.1%)		
	WT	7 (57.1%)	0.4370	– 22.7028 to 52.7026%
	HOM	13 (38.5%)		
	HET	32 (78.1%)	0.0116	8.5914 to 63.0319%
	HOM	13 (38.5%)		
ARMS2 rs10490924	WT	24 (87.5%)	0.0021	15.4511 to 59.8586%
	HET/HOM	28 (46.4%)	0.0076	9.7072 to 55.7193%
	WT	24 (87.5%)		
	HET	25 (52.0%)	0.0007	28.3799 to 95.6557%
	WT	24 (87.5%)		
	HOM	3 (0.0%)	0.0938	– 7.1193 to 69.9687%
	HET	25 (52.0%)		
	HOM	3 (0.0%)		
C2 rs9332739	WT	49 (63.3%)	0.4536	– 43.5571 to 50.6984%
	HET	1 (100.0%)		
C2 rs547154	WT	47 (61.7%)	0.1847	– 19.2259 to 52.5755%
	HET	3 (100.0%)		
CFB rs4151667	WT	49 (63.3%)	0.4536	– 43.5571 to 50.6984%
	HET	1 (100.0%)		
CFB rs2072633	WT	43 (60.5%)	0.2022	– 14.0975 to 44.1515%
	HET/HOM	7 (85.7%)		
	WT	43 (60.5%)	0.5723	– 32.3245 to 39.7877%
	HET	4 (75.0%)		
	WT	43 (60.5%)	0.1752	– 18.1723 to 54.3870%
	HOM	3 (100.0%)		
	HET	4 (75.0%)	0.3865	– 34.7548 to 69.9358%
	HOM	3 (100.0%)		

Statistical analysis: Association of the percentage of responders across each genotype. The percentage of responders was compared between the WT and the HET/HOM, HET, and HOM patients

CI confidence interval, SNP single nucleotide polymorphism, WT wild type, HET/HOM heterozygous or homozygous, HET heterozygous, HOM homozygous

response was found for TT genotype versus TC genotype ($p = 0.255$). The study showed an association between ARMS2 A69S variant and anti-VEGF treatment response. About 87.5% of the patients who responded did not carry the variant T (wild-type-genotype GG). The patient group GT and TT displayed a lower chance of responding compared to wild-type patients ($p = 0.002$, 95% CI 15.451–59.859). Patients with two risk alleles at

ARMS2 experienced significantly worse visual outcomes and had a lower chance of responding compared to wild-type patients ($p < 0.001$, 95% CI 28.380–95.656). However, no significant interaction was observed between the protective SNPs and the treatment response. The statistical analysis of the genetic variants rs9332739/E318D, rs547154/IVS10, rs4151667/L9H, and rs2072633/IVS17 showed no

significant association with the treatment outcome for neovascular AMD patients (Table 4).

Discussion

The present study was designed in order to investigate the association between AMD-relevant genetic polymorphisms and treatments' response in a cohort of Greek patients. We examined not only AMD high-risk genes such as CFH and ARMS2, but also genes which have been associated with a decreased risk of the disease, such as C2 and CFB. Our study demonstrated that different genotypes resulted in different treatments' responses on dry and neovascular AMD patients. In dry AMD, treatment success with the antioxidants was influenced by patients' genotype. Dry AMD patients were treated with the OcuVite Lutein forte antioxidant supplement, as one of the most readily available in Greece, where the study took place. There is a much higher concentration in the standard AREDS2 formula which consists of 10 mg lutein, 2 mg zeaxanthin, 500 mg vitamin C, 400 IU vitamin E, 80 mg zinc, 2 mg copper, and 20 µg selenium [30]. There is, however, the impressive result in our study of a lower strength antioxidant formulation being beneficial for some genotypes. Consistent with other studies, we found a significant association between the CFH/Y402H variant and the response to antioxidants. The most important novel finding of the study is that the protective SNPs in C2 and CFB genes were positively associated with the treatment success, and SNP protective carriers had a high likelihood of responding to antioxidant supplementation. Regarding neovascular AMD patients, the efficacy of the anti-VEGF therapy with ranibizumab injections was associated with the CFH and ARMS2 variants. Patients who carried the CFH/Y402H CC genotype were more likely to be non-responders compared to those carrying the CT genotype. Finally, our data confirm that carriers of the ARMS2/A69S risk variant experienced significantly worse treatment outcome compared to wild-type patients.

There is increasing evidence that the development and progression of AMD is strongly related to the genetic background. Different studies have revealed the implication of several polymorphisms in complement pathway-associated genes and AMD [31]. Strong statistical evidence that CFH is involved in AMD

pathogenesis and progression has been provided by genetic and molecular studies [32]. In addition to the association between genotypes and disease pathogenesis [33], many reports have associated CFH/Y402H variant with the prediction of treatments response, such as the antioxidant supplementation [34] and the anti-VEGF treatment [35, 36].

In the present study, focusing on the dry type of AMD patients, the efficacy of antioxidants supplements appears to differ by genotype. Our data demonstrated that wild-type patients were more likely to achieve a more favorable visual outcome in comparison with heterozygous and homozygous patients. Patients who carried two risk alleles at CFH were significantly associated with poor treatment response and had a lower chance of responding compared to wild-type ($p < 0.001$, 95% CI 24.029–62.203) or heterozygous patients ($p = 0.003$, 95% CI 10.338–46.949). Our results are in accordance with previous studies, which have supported a genetic interaction with the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) formulation and progression of AMD. The association between CFH genotype and effectiveness of AREDS supplements was first suggested by Klein et al. [34], who demonstrated an interaction between CFH variant and antioxidant supplementation. Five years later, Awh et al. [21], in their study with a group of patients from the AREDS trial, reported significant differences in outcome depending on CFH and ARMS2 genotypes. In another analysis, Awh et al. [37] referred to four combinations of risk variants, based on CFH and ARMS2 alleles, and they recommended the administration of genotype-directed nutritional supplements to AMD patients. On the other hand, first Chew et al. [38] and then Assel et al. [39], in a reanalysis of AREDS data, failed to associate the genetic profile of AMD patients with nutritional supplementation.

Regarding the wet type of AMD patients, our study showed a statistically significant association between CFH/Y402H genotype and response to intravitreal injections of the anti-VEGF agent ranibizumab. Our analysis indicated that individuals who carried the CC genotype had a lower chance to respond to treatment compared with those who had the TC genotype ($p = 0.012$, 95% CI 8.591–63.032). However, no significant difference in treatment response was found for TT genotype versus TC genotype. Numerous independent studies have demonstrated the association

of CFH/Y402H variant with clinical outcome after anti-VEGF treatment. More specifically, Brantley et al. [20] reported that patients who were homozygous for the risk allele C demonstrated less visual acuity improvement with intravitreal injections of the anti-VEGF agent bevacizumab compared to heterozygous and wild-type patients. Furthermore, a study from Lee et al. [35], which included neovascular patients who underwent ranibizumab injections, demonstrated an association between CFH genotype and the number of required injections. In another study, Klockener-Gruissem et al. [40] showed a relationship between CFH variant and the response to intravitreal ranibizumab therapy and they reported that carriers of the CT genotype were more likely to experience a positive outcome. Contrary to most studies, which have associated CFH risk variants with treatment outcome, a number of studies have not detected this association. Orlin et al. [41] reported no association between CFH genotype and anti-VEGF treatment response.

The role of the ARMS2 gene in AMD pathogenesis is unknown at present but the association of ARMS2 gene with AMD susceptibility has now been replicated in numerous studies. Our study did not reveal a statistically significant association between ARMS2/A69S variant and response to antioxidants, although it showed a statistically significant association between ARMS2/A69S genotype and anti-VEGF treatment response. Regarding the wet type of AMD patients, the patient group GT and TT displayed a lower chance of responding compared to wild-type patients ($p = 0.002$, 95% CI 15.451–59.859). Our data demonstrated also that homozygous patients experienced significantly worse visual outcomes and had a lower chance of responding compared to wild-type patients ($p < 0.001$, 95% CI 28.380–95.656). In congruence with our results, Teper et al. [42] in their study revealed a genetic association between ARMS2 genotype and ranibizumab efficacy. Patients homozygous for the A69S variant showed a poor response to ranibizumab injections. Additionally, Kitchens et al. [43] demonstrated an association between ARMS2/A69S TT genotype and a poor response to anti-VEGF agents bevacizumab or ranibizumab based on OCT. On the other hand, Brantley et al. [20] and Orlin et al. [41] in their studies reported no association between ARMS2 polymorphism and anti-VEGF treatment.

The involvement of other genes in AMD pathogenesis such as C2 and CFB genes has been shown by

previous studies [25, 27, 44]. Gold et al. [27] demonstrated that variation in both CFB and C2 genes is associated with a reduced risk for AMD. More specifically, a strong association between the SNPs in C2 gene (rs9332739/E318D and rs547154/IVS10) and in CFB gene (rs4151667/L9H and rs2072633/IVS17) with a decreased AMD risk has been reported. However, the present study is the first to show a significant association between the protective SNPs (rs9332739/E318D in C2 gene, rs4151667/L9H and rs2072633/IVS17 in CFB gene) and treatment response to antioxidants supplements in patients suffering from the dry type of AMD. Of interest is the finding that the genetic variants rs9332739/E318D in C2 gene, as well as rs4151667/L9H and rs2072633/IVS17 in CFB gene, predisposed patients to a good response. Examining the presence of at least one protective SNP in patients' genotype, the analysis showed that individuals who carried at least one protective SNP were more likely to respond to antioxidants and stabilize their visual acuity and OCT compared with those who lacked any protective SNP ($p < 0.001$, 95% CI 27.519–55.894). Furthermore, patients who carried at least two protective SNPs had a significantly increased chance for positive treatment outcome compared with those who did not carry any protective SNP ($p < 0.001$, 95% CI 25.229–55.432). On the other hand, the statistical analysis of the genetic variants rs9332739/E318D, rs547154/IVS10, rs4151667/L9H, and rs2072633/IVS17 showed no significant association between the protective SNPs and the anti-VEGF treatment outcome in patients with the exudative type of AMD.

Potential limitations of the current study should be mentioned before making conclusion. First of all, there is a limited number in neovascular AMD patients. An additional limitation in the methodology of this study is that some confounding factors such as smoking, dietary habits, and systemic diseases were not analyzed. AMD is a complex disease, and there are many confounding factors that may affect the treatment outcomes other than the genetic background. Nevertheless, our study is a real-life study in a cohort of Greek patients, which demonstrated significant associations between genetic variants and treatment outcomes.

In conclusion, our findings suggest that genetic variants could be used as predictors of treatment responsiveness in AMD patients. Genetic information

would be useful for identifying patients who may benefit from the applied treatment and for finding out the best suited and most efficient treatment for each individual. However, further studies would be needed to validate these findings and evaluate the potential value of customized treatments.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in these patients were in accordance with the Ethics Code of the National and Kapodistrian University of Athens (NKUA) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

1. Bourne RR, Jonas JB, Flaxman SR, Keeffe J, Leasher J, Naidoo K, Parodi MB, Pesudovs K, Price H, White RA, Wong TY, Resnikoff S, Taylor HR, Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease S (2014) Prevalence and causes of vision loss in high-income countries and in Eastern and Central Europe: 1990–2010. *Br J Ophthalmol* 98(5):629–638. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2013-304033>
2. Jager RD, Mieler WF, Miller JW (2008) Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 358(24):2606–2617. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0801537>
3. Grisanti S, Tatar O (2008) The role of vascular endothelial growth factor and other endogenous interplayers in age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 27(4):372–390. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.05.002>
4. Age-Related Eye Disease Study Research G (2001) A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol* 119(10):1417–1436
5. Brown DM, Michels M, Kaiser PK, Heier JS, Sy JP, Ianchulev T, Group AS (2009) Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology* 116(1):57–65. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2008.10.018>
6. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, Kim RY, Group MS (2006) Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 355(14):1419–1431. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa054481>
7. Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY (2012) Age-related macular degeneration. *Lancet*

- 379(9827):1728–1738. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60282-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60282-7)
8. Al-Zamil WM, Yassin SA (2017) Recent developments in age-related macular degeneration: a review. *Clin Interv Aging* 12:1313–1330. <https://doi.org/10.2147/CIA.S143508>
9. Seddon JM, Ajani UA, Mitchell BD (1997) Familial aggregation of age-related maculopathy. *Am J Ophthalmol* 123(2):199–206
10. Seddon JM, Cote J, Page WF, Aggen SH, Neale MC (2005) The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. *Arch Ophthalmol* 123(3):321–327. <https://doi.org/10.1001/archophth.123.3.321>
11. Hammond CJ, Webster AR, Snieder H, Bird AC, Gilbert CE, Spector TD (2002) Genetic influence on early age-related maculopathy: a twin study. *Ophthalmology* 109(4):730–736
12. Seddon JM, Francis PJ, George S, Schultz DW, Rosner B, Klein ML (2007) Association of CFH Y402H and LOC387715 A69S with progression of age-related macular degeneration. *JAMA* 297(16):1793–1800. <https://doi.org/10.1001/jama.297.16.1793>
13. Shuler RK Jr, Hauser MA, Caldwell J, Gallins P, Schmidt S, Scott WK, Agarwal A, Haines JL, Pericak-Vance MA, Postel EA (2007) Neovascular age-related macular degeneration and its association with LOC387715 and complement factor H polymorphism. *Arch Ophthalmol* 125(1):63–67. <https://doi.org/10.1001/archophth.125.1.63>
14. Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA (2005) Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 308(5720):421–424. <https://doi.org/10.1126/science.1110189>
15. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, SanGiovanni JP, Mane SM, Mayne ST, Bracken MB, Ferris FL, Ott J, Barnstable C, Hoh J (2005) Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308(5720):385–389. <https://doi.org/10.1126/science.1109557>
16. Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, Spencer KL, Kwan SY, Nouredine M, Gilbert JR, Schnetz-Boutaud N, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance MA (2005) Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 308(5720):419–421. <https://doi.org/10.1126/science.1110359>
17. Rivera A, Fisher SA, Fritsche LG, Keilhauer CN, Lichtner P, Meitinger T, Weber BH (2005) Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum Mol Genet* 14(21):3227–3236. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi353>
18. Kanda A, Chen W, Othman M, Branham KE, Brooks M, Khanna R, He S, Lyons R, Abecasis GR, Swaroop A (2007) A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(41):16227–16232. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703933104>

19. Andreoli MT, Morrison MA, Kim BJ, Chen L, Adams SM, Miller JW, DeAngelis MM, Kim IK (2009) Comprehensive analysis of complement factor H and LOC387715/ARMS2/HTRA1 variants with respect to phenotype in advanced age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 148(6):869–874. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2009.07.002>
20. Brantley MA Jr, Fang AM, King JM, Tewari A, Kymes SM, Shiels A (2007) Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to intravitreal bevacizumab. *Ophthalmology* 114(12):2168–2173. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2007.09.008>
21. Awh CC, Lane AM, Hawken S, Zanke B, Kim IK (2013) CFH and ARMS2 genetic polymorphisms predict response to antioxidants and zinc in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 120(11):2317–2323. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.07.039>
22. Bardak H, Bardak Y, Ercalik Y, Turkseven Kumral E, Imamoglu S, Gunay M, Ozbas H, Bagci O (2016) Effect of ARMS2 gene polymorphism on intravitreal ranibizumab treatment for neovascular age-related macular degeneration. *Genet Mol Res*. <https://doi.org/10.4238/gmr15049164>
23. Seddon JM, Silver RE, Rosner B (2016) Response to AREDS supplements according to genetic factors: survival analysis approach using the eye as the unit of analysis. *Br J Ophthalmol* 100(12):1731–1737. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2016-308624>
24. Chaudhary V, Brent M, Lam WC, Devenyi R, Teichman J, Mak M, Barbosa J, Kaur H, Carter R, Farrokhyar F (2016) Genetic risk evaluation in wet age-related macular degeneration treatment response. *Ophthalmol J Int* 236(2):88–94. <https://doi.org/10.1159/000446819>
25. Spencer KL, Hauser MA, Olson LM, Schmidt S, Scott WK, Gallins P, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance MA, Haines JL (2007) Protective effect of complement factor B and complement component 2 variants in age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* 16(16):1986–1992. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm146>
26. Maller J, George S, Purcell S, Fagerness J, Altshuler D, Daly MJ, Seddon JM (2006) Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet* 38(9):1055–1059. <https://doi.org/10.1038/ng1873>
27. Gold B, Merriam JE, Zernant J, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs K, Cramer K, Neel J, Bergeron J, Banile GR, Smith RT, Group AMDGCS, Hageman GS, Dean M, Allikmets R (2006) Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet* 38(4):458–462. <https://doi.org/10.1038/ng1750>
28. Francis PJ, Hamon SC, Ott J, Weleber RG, Klein ML (2009) Polymorphisms in C2, CFB and C3 are associated with progression to advanced age related macular degeneration associated with visual loss. *J Med Genet* 46(5):300–307. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.062737>
29. Campbell I (2007) Chi squared and Fisher-Irwin tests of two-by-two tables with small sample recommendations. *Stat Med* 26(19):3661–3675. <https://doi.org/10.1002/sim.2832>
30. Age-Related Eye Disease Study 2 Research G (2013) Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *JAMA* 309(19):2005–2015. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.4997>
31. Gorin MB (2012) Genetic insights into age-related macular degeneration: controversies addressing risk, causality, and therapeutics. *Mol Aspects Med* 33(4):467–486. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.04.004>
32. Garcia M, Alvarez L, Nogacka AM, Gonzalez-Iglesias H, Escribano J, Fernandez-Vega B, Fernandez-Vega A, Fernandez-Vega L, Coca-Prados M (2015) CFH polymorphisms in a Northern Spanish population with neovascular and dry forms of age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol* 93(8):e658–e666. <https://doi.org/10.1111/aos.12790>
33. Leveziel N, Puche N, Richard F, Somner JE, Zerbib J, Bastuji-Garin S, Cohen SY, Korobelnik JF, Sahel J, Soubrane G, Benlian P, Souied EH (2010) Genotypic influences on severity of exudative age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(5):2620–2625. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4423>
34. Klein ML, Francis PJ, Rosner B, Reynolds R, Hamon SC, Schultz DW, Ott J, Seddon JM (2008) CFH and LOC387715/ARMS2 genotypes and treatment with antioxidants and zinc for age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 115(6):1019–1025. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2008.01.036>
35. Lee AY, Raya AK, Kymes SM, Shiels A, Brantley MA Jr (2009) Pharmacogenetics of complement factor H (Y402H) and treatment of exudative age-related macular degeneration with ranibizumab. *Br J Ophthalmol* 93(5):610–613. <https://doi.org/10.1136/bjo.2008.150995>
36. Dedania VS, Grob S, Zhang K, Bakri SJ (2015) Pharmacogenomics of response to anti-VEGF therapy in exudative age-related macular degeneration. *Retina* 35(3):381–391. <https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000000466>
37. Awh CC, Hawken S, Zanke BW (2015) Treatment response to antioxidants and zinc based on CFH and ARMS2 genetic risk allele number in the Age-Related Eye Disease Study. *Ophthalmology* 122(1):162–169. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2014.07.049>
38. Chew EY, Klein ML, Clemons TE, Agron E, Ratnapriya R, Edwards AO, Fritsche LG, Swaroop A, Abecasis GR, Age-Related Eye Disease Study Research G (2014) No clinically significant association between CFH and ARMS2 genotypes and response to nutritional supplements: AREDS report number 38. *Ophthalmology* 121(11):2173–2180. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2014.05.008>
39. Assel MJ, Li F, Wang Y, Allen AS, Baggerly KA, Vickers AJ (2018) Genetic polymorphisms of CFH and ARMS2 do not predict response to antioxidants and zinc in patients with age-related macular degeneration: independent statistical evaluations of data from the Age-Related Eye Disease Study. *Ophthalmology* 125(3):391–397. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.09.008>
40. Kloekener-Gruissem B, Barthelmes D, Labs S, Schindler C, Kurz-Levin M, Michels S, Fleischhauer J, Berger W, Sutter F, Menghini M (2011) Genetic association with response to intravitreal ranibizumab in patients with neovascular AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(7):4694–4702. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6080>

41. Orlin A, Hadley D, Chang W, Ho AC, Brown G, Kaiser RS, Regillo CD, Godshalk AN, Lier A, Kaderli B, Stambolian D (2012) Association between high-risk disease loci and response to anti-vascular endothelial growth factor treatment for wet age-related macular degeneration. *Retina* 32(1):4–9. <https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e31822a2c7c>
42. Teper SJ, Nowinska A, Pilat J, Palucha A, Wylegala E (2010) Involvement of genetic factors in the response to a variable-dosing ranibizumab treatment regimen for age-related macular degeneration. *Mol Vis* 16:2598–2604
43. Kitchens JW, Kassem N, Wood W, Stone TW, Isernhagen R, Wood E, Hancock BA, Radovich M, Waymire J, Li L, Schneider BP (2013) A pharmacogenetics study to predict outcome in patients receiving anti-VEGF therapy in age related macular degeneration. *Clin Ophthalmol* 7:1987–1993. <https://doi.org/10.2147/OPTH.S39635>
44. Kaur I, Katta S, Reddy RK, Narayanan R, Mathai A, Majji AB, Chakrabarti S (2010) The involvement of complement factor B and complement component C2 in an Indian cohort with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(1):59–63. <https://doi.org/10.1167/iov.09-4135>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.