



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**Β΄ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**  
Διευθυντής: Καθηγητής Παναγιώτης Γ. Θεοδοσιάδης

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ  
ΑΠΟΦΡΑΞΗ ΦΛΕΒΑΣ  
ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ**

**ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΡΑΓΚΟΥΣΗΣ**

Οφθαλμίατρος

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΙΟΥΛΙΟΣ 2024**

Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει ότι αποδέχεται τις γνώμες του συγγραφέα (Νόμος 5343/1932, Άρθρο 202, Παράγραφος 2)

**Ημερομηνία υποβολής αίτησης για ορισμό συμβουλευτικής επιτροπής και εκπόνηση διδακτορικής διατριβής: 09/03/2020**

**Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 20/05/2020**

**Μέλη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:**

1. Ειρήνη Χατζηράλλη (Επιβλέπουσα), Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
2. Παναγιώτης Θεοδοσιάδης, Καθηγητής Οφθαλμολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
3. Ηλίας Γεωργάλας, Καθηγητής Οφθαλμολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Ημερομηνία ορισμού θέματος διδακτορικής διατριβής: 28/07/2020**

**Ημερομηνία 1ης προόδου διδακτορικής διατριβής: 28/05/2021**

**Ημερομηνία 2ης προόδου διδακτορικής διατριβής: 10/06/2022**

**Ημερομηνία 3ης προόδου διδακτορικής διατριβής: 21/07/2023**

**Ημερομηνία ορισμού επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: 26/07/2024**

**Ημερομηνία υποστήριξης διδακτορικής διατριβής: 11/09/2024**

**Μέλη επταμελούς εξεταστικής επιτροπής:**

1. Ειρήνη Χατζηράλλη (Επιβλέπουσα), Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
2. Παναγιώτης Θεοδοσιάδης, Καθηγητής Οφθαλμολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
3. Ηλίας Γεωργάλας, Καθηγητής Οφθαλμολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
4. Παρασκευή Μουτσάτσου-Λαδικού, Καθηγήτρια Κλινικής Βιοχημείας-Ιατρικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
5. Κωνσταντίνος Δρούτσας, Αναπληρωτής Καθηγητής Οφθαλμολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
6. Πέτρος Πέτρου, Επίκουρος Καθηγητής Οφθαλμολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
7. Χρήστος Κρούπης, Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας-Ιατρικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Βαθμός: «ΑΡΙΣΤΑ»**

**Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Καθηγητής Νικόλαος Αρκαδόπουλος**

## ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

"Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον Ιατρό και στον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην πανάκεια και σ' όλους τους Θεούς επικαλούμενος την μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατά τη δύναμη και την κρίση μου αυτό τον όρκο και το συμβόλαιό μου αυτό. Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτή την τέχνη ίσο με τους γονείς μου και να μοιραστώ μαζί μου τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου αν έχει ανάγκη φροντίδας.

Να θεωρώ τους απογόνους του ίσους με τ' αδέρφια μου και να τους διάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο και να μεταδώσω με παραγγελίες, οδηγίες και συμβουλές όλη την υπόλοιπη γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου με δίδαξε και στους άλλους μαθητές που έχουν κάνει γραπτή συμφωνία μαζί μου και σ' αυτούς που έχουν ορκισθεί στον ιατρικό νόμο και σε κανέναν άλλο και να θεραπεύω τους πάσχοντες κατά τη δύναμή μου και την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ή να τους αδικήσω. Και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, έστω κι αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, ούτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή. Ομοίως να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για ν' αποβάλει. Να διατηρήσω δε τη ζωή μου και την τέχνη μου καθαρή και αγνή. Και να μη χειρουργήσω πάσχοντες από λίθους αλλά ν' αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς. Και σ' όποια σπίτια κι αν μπω, να μπω για την ωφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια αδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναίκες και με άνδρες, ελεύθερους και δούλους. Και ό,τι δω ή ακούσω κατά την άσκηση του επαγγέλματός μου, ή κι εκτός, για τη ζωή των ανθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεί, να σιωπήσω και να το τηρήσω μυστικό. Αν τον όρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, είτε ν' απολαύσω για πάντα την εκτίμηση όλων των ανθρώπων για τη ζωή μου και για την τέχνη μου, αν όμως παραβώ και αθετήσω τον όρκο μου να υποστώ τα αντίθετα από αυτά".

Πηγή: Ιστότοπος Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (<https://school.med.uoa.gr/tmima/orkoi/>)



Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

■ ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΔΕΚΛΗ  
ΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΔΕΙΑΝ ΚΑΙ  
ΦΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΔΕ ΤΕΤΟΡΑΣ ΠΟΙ  
ΟΥΜΕΝΟΣ. ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥ  
ΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ. ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ.  
■ ΗΓΗΣΕΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ  
ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΉΔΕ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ  
ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΣΟ  
ΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ  
ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΣΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ  
ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΣΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ  
ΕΥΓΡΑΦΗΣ. ■ ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΩΘΕΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ  
ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΞΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΘΑΙ ΥΙΟΙ  
ΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑ  
ΘΗΤΑΙΣΙ ΕΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΕΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΟ  
ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ. ■ ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ  
ΕΠΩΦΕΛΕΙΝ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ  
ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ ΕΙΡΞΗΝ. ■ ΟΥ ΔΩ  
ΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΣΕΙΣ ΘΑΝΑΤΙΜΟΝ,  
ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΕΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝ ΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ  
ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ■ ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ  
ΟΞΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΩΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ Ε  
ΜΗΝ. ■ ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ  
ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΣΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ■ ΕΞ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ  
ΟΚΟΣΔΕ ΑΝ ΕΣΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ ΩΦΕΛΕΙΝ ΚΑΜΝΟΝ  
ΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ  
ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙ  
ΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥ  
ΛΩΝ. ■ Α ΔΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ Α  
ΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗΣΠΟΤΕ  
ΕΓΚΑΛΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ  
ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ■ ΟΡΚΟΝ ΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙ  
ΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ  
ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΞ ΤΟΝ  
ΔΙΚΕΙ ΧΡΟΝΟΝ, ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝ  
ΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ .....</b>	<b>7</b>
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....</b>	<b>14</b>
<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....</b>	<b>15</b>
<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ .....</b>	<b>17</b>
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>18</b>
<i>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΤΟΠΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΗΣ ΩΧΡΑΣ ΚΗΛΙΔΑΣ.....</i>	<i>19</i>
<i>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΩΣΗ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΧΟΡΙΟΕΙΔΟΥΣ.....</i>	<i>21</i>
<i>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ.....</i>	<i>28</i>
<i>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΦΡΑΞΗ ΦΛΕΒΑΣ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ .....</i>	<i>33</i>
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ – ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ.....	33
ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ .....	35
ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ .....	38
ΑΡΧΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ RVO .....	40
ΟΙΔΗΜΑ ΩΧΡΑΣ ΚΗΛΙΔΑΣ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ .....	41
ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΑΝΤΙ-VEGF .....	43
ΝΕΟΑΓΓΕΙΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ .....	44
<i>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑ .....</i>	<i>47</i>
ΠΑΡΑΟΞΟΝΑΣΗ 1.....	47
ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ Ε .....	48
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ 1 ΠΟΥ ΠΡΟΕΡΧΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ .....	48
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>50</b>
<i>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ .....</i>	<i>51</i>
<i>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ.....</i>	<i>53</i>
<i>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</i>	<i>75</i>
<i>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</i>	<i>89</i>
<i>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</i>	<i>99</i>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>100</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....</b>	<b>115</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>117</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>	<b>119</b>

# **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

## **ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ**

Όνοματεπώνυμο: Αντώνιος Ραγκούσης

Ημερομηνία γέννησης: 22/10/1991

E-mail: tonyragou@gmail.com , tonyragou@med.uoa.gr, antonios.ragkousis@nhs.net

## **ΣΠΟΥΔΕΣ**

Σεπτέμβριος 2010 – Ιούλιος 2016: Πτυχίο Ιατρικής, Ιατρική Σχολή Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Βαθμός Πτυχίου: Άριστα (8.64/10)

Σεπτέμβριος 2017 – Νοέμβριος 2019: Μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Ιατρική απεικόνιση στην Οφθαλμολογία», Ιατρική Σχολή Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης

Βαθμός Πτυχίου: Άριστα (9.47/10)

Λήψη υποτροφίας λόγω της υψηλότερης βαθμολογίας μεταξύ των φοιτητών (πρώτος στην κατάταξη).

## **ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

Σεπτέμβριος 2016 – Ιανουάριος 2017: Μεταπτυχιακός υπότροφος ιατρός του Προγράμματος Μετεκπαιδευτικής Πρακτικής Άσκησης Ιατρών «Ανδρέας Βγενόπουλος» στην Οφθαλμολογική κλινική του νοσοκομείου ΥΓΕΙΑ

Φεβρουάριος 2017 – Σεπτέμβριος 2017: Αγροτικός ιατρός στο Π.Ι. Μώλου – Κ.Υ. Στυλίδας

Σεπτέμβριος 2017 – Αύγουστος 2021: Ειδικευόμενος οφθαλμίατρος στο νοσοκομείο Ερυθρός Σταυρός “Κοργιαλένειο-Μπενάκειο” στην Αθήνα

Αύγουστος 2021 – Ιανουάριος 2022: Αγροτικός ιατρός στο Κ.Υ. Πάρου

Φεβρουάριος 2022 – Φεβρουάριος 2023: Medical Retina Fellow, Liverpool University Hospitals NHS Foundation Trust, Λίβερπουλ, Ηνωμένο Βασίλειο

Μάρτιος 2023 – Δεκέμβριος 2023: Senior Medical Retina Fellow, University Hospital Southampton NHS Foundation Trust, Σαουθάμπτον, Ηνωμένο Βασίλειο

Δεκέμβριος 2023 - σήμερα: Medical Retina Fellow, Moorfields Eye Hospital, NHS Foundation Trust, Λονδίνο, Ηνωμένο Βασίλειο

## **ΑΔΕΙΑ ΑΣΚΗΣΕΩΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ – ΤΙΤΛΟΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ**

Άδεια Άσκησης Ιατρικού Επαγγέλματος: Περιφέρεια Αττικής, Διεύθυνση Δημόσιας Υγείας και Κοινωνικής Μέριμνας Π.Ε. Δυτικού Τομέα Α.Π. 5295/26-07-2026

Τίτλος Ιατρικής Ειδικότητας στην Οφθαλμολογία: Πανελλήνιος Ιατρικός Σύλλογος Α.Π. 2430/05-04-2023

EBO Diploma: European Board of Ophthalmology (EBO) Diploma Examination May 2022

## **ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ ΕΝΤΟΣ PUBMED**

1. Ragkousis A, Kazantzis D, Georgalas I, Theodossiadis P, Kroupis C, Chatziralli I. PON1, APOE and SDF-1 Gene Polymorphisms and Risk of Retinal Vein Occlusion: A Case-Control Study. *Genes*. 2024;15(6):712.
2. Ragkousis A, Kazantzis D, Georgalas I, Theodossiadis P, Kroupis C, Chatziralli I. Association of PON1, APOE and SDF-1 Gene Polymorphisms with Treatment

Response to Intravitreal Anti-VEGF Treatment in Patients with Retinal Vein Occlusion. *Seminars in Ophthalmology*. 2024;39(3):201-208.

3. Ragkousis A, Kozobolis V, Kabanarou S, et al. Vessel Density around Foveal Avascular Zone as a Potential Imaging Biomarker for Detecting Preclinical Diabetic Retinopathy: An Optical Coherence Tomography Angiography Study. *Seminars in Ophthalmology*. 2020 Aug 17;35(5-6):316-323.
4. Ragkousis A, Xirou T, Bontzos G, Gkoumas E, Kontou E. Bilateral Anterior Ischaemic Optic Neuropathy as First Manifestation of Henoch-Schönlein Purpura (IgA Vasculitis). *Mediterranean Journal of Rheumatology*. 2021;32(1):81-85.
5. Mangouritsas G, Koutropoulou N, Ragkousis A, Boutouri E, Diagourtas A. Peripapillary Vessel Density In Unilateral Preperimetric Glaucoma. *Clinical Ophthalmology*. 2019;Volume 13:2511-2519.
6. Bontzos G, Kabanarou SA, Gkizis I, Ragkousis A, Xirou T, Peto T. Retinal neurodegeneration, macular circulation and morphology of the foveal avascular zone in diabetic patients: quantitative cross-sectional study using OCT-A. *Acta Ophthalmologica*. 2021 Nov;99(7):e1135-e1140.
7. Kontou E, Bontzos G, Triantafyllou D, Garnavou-Xirou C, Ragkousis A, Xirou T. Conservative management of streptococcal necrotizing periorbital fasciitis following primary VZV infection. *Il Giornale di Chirurgia*. 2020;41(1):114-117.

## **ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΣΥΝΑΝΤΗΣΕΙΣ**

### **ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. A. Ragkousis, T. Xirou, E. Gkoumas, D. Alonistiotis, P. Bitza, S. Kabanarou, C. Kourvelou, A. Bechli, E. Kontou.  
“Bilateral anterior ischaemic optic neuropathy with macular star as first manifestation of Henoch-Schönlein purpura (IgA vasculitis)” (10<sup>th</sup> Panhellenic

Congress of Ocular Inflammations and Infections, Θεσσαλονίκη, 30 Νοεμβρίου – 2 Δεκεμβρίου 2018)

2. A. Ragkousis, V. Kozobolis, S. Kabanarou, G. Bontzos, G. Mangouritsas, I. Pliopoulos, I. Chatziralli  
“Qualitative and quantitative analysis of retinal vasculature in patients with diabetes mellitus using optical coherence tomography angiography” (15<sup>th</sup> Annual Congress of Greek Retina and Vitreous Society, GVRS, Μέγαρο Μουσικής Αθηνών, Αθήνα, 30 Ιανουαρίου – 01 Φεβρουαρίου 2020)
3. A. Ragkousis, S. Kabanarou, G. Bontzos, G. Mangouritsas, I. Chatziralli  
“Hyperreflective foci in diabetic patients without diabetic retinopathy or with mild non-proliferative diabetic retinopathy” (16<sup>th</sup> Annual Congress of Greek Retina and Vitreous Society, GVRS, Μέγαρο Μουσικής Αθηνών, Αθήνα, 28-30 Ιανουαρίου 2021)
4. Mamareli V., Smoustopoulos G., Ragkousis A., Bontzos G., Gkizis I., Xirou T., Mangouritsas G., Kabanarou S.  
“Long-standing Leber’s hereditary optic neuropathy: A case report on response to idebenone treatment” (16<sup>th</sup> Annual Congress of Greek Retina and Vitreous Society, GVRS, Μέγαρο Μουσικής Αθηνών, Αθήνα, 28-30 Ιανουαρίου 2021)

## **ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. Garvanou-Xirou C, Vasileias D, Boutouri E, Tsamis D, Ragkousis A, Gkizis I, Anastasakis A, Terzidou C, Kabanarou S  
“Diagnosis of pattern dystrophy in a case with multiple sclerosis (MS) on fingolimod (Gilenya) treatment and progressive dyschromatopsia” (EVER 2018 Congress, Νίκαια Γαλλίας, 4-6 Οκτωβρίου 2018)
2. G. Bontzos, A. Ragkousis, D. Triantafyllou, E. Kontou, S. Kabanarou, E. Chatzispasou  
“Retrospective review of patients with ocular inflammation associated with systemic disease” (10th Panhellenic Congress of Ocular Inflammations and Infections, Θεσσαλονίκη, 30 Νοεμβρίου – 2 Δεκεμβρίου 2018)
3. A. Ragkousis, G. Mangouritsas, N. Koutropoulou, E. Boutouri, I. Armenis

- “Peripapillary vessel density in eyes with preperimetric glaucoma” (23<sup>rd</sup> ESCRS Winter Meeting, Αθήνα, 15-17 Φεβρουαρίου 2019)
4. Bontzos, T. Xirou, D. Triantafyllou, A. Ragkousis, E. Kontou  
“Conservative management of streptococcal necrotizing periorbital fasciitis following primary VZV infection” (52<sup>o</sup> Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 6-8 Ιουνίου 2019)
  5. A. Ragkousis, V. Kozobolis, S. Kabanarou, G. Bontzos, G. Mangouritsas, I. Heliopoulos, I. Chatziralli  
“Vessel density in a width of 300 μm around foveal avascular zone (FD-300) as a potential imaging biomarker for detecting preclinical diabetic retinopathy using optical coherence tomography angiography” (EURETINA 2020 Virtual, 2-4 Οκτωβρίου 2020)
  6. G. Bontzos, S.A. Kabanarou, I. Gkizis, A. Ragkousis, T. Xirou, T. Peto  
“Retinal Neurodegeneration, Macular Circulation and Morphology of the Foveal Avascular Zone in Diabetic Patients. Quantitative Cross-Sectional Study Using OCT-A” (30<sup>th</sup> Meeting of the European Association for the Study of Diabetes Eye Complications Study Group, EASDec, Βαρκελώνη, Ισπανία, Virtual Meeting, 5-6 Νοεμβρίου 2020)
  7. A. Ragkousis E. Gkoumas, S. Kyriazi, A. Papadopoulos, N. Koutropoulou, E. Boutouri, G. Mangouritsas  
“Vascular and structural findings in unaffected fellow eyes of patients with unilateral primary open angle glaucoma using optical coherence tomography angiography” (OCT & RETINA Forum 2021, 9-23 Απριλίου 2021)
  8. Ragkousis Antonios, Kroupis Christos, Kazantzis Dimitrios, Georgalas Ilias, Theodossiadis Panagiotis, Chatziralli Irini  
“PON1 L55M SNP as a promising genetic biomarker for predicting response to anti-VEGF treatment” (10<sup>th</sup> EURETINA Winter Meeting, Βίλνιους, Λιθουανία, 11 Μαρτίου 2023)
  9. Ragkousis Antonios, Kroupis Christos, Kazantzis Dimitrios, Georgalas Ilias, Theodossiadis Panagiotis, Chatziralli Irini  
“PON1 Q192R genetic polymorphism associated with the risk of retinal vein occlusion” (24<sup>th</sup> EURETINA Congress, Βαρκελώνη. 19-22 Σεπτεμβρίου 2024)

## ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

1. 12<sup>th</sup> Congress of International Society of Dacryology & Dry Eye, Ζάππειο, Αθήνα, 5-7 Οκτωβρίου 2017
2. Οφθαλμόγραμμα 2017, Νοσοκομείο Ερρίκος Ντυνάν, Αθήνα, 4 Νοεμβρίου 2017
3. 13<sup>th</sup> Annual Congress of Greek Retina and Vitreous Society (GVRS), Αθήνα, 8-10 Φεβρουαρίου 2018
4. 32<sup>nd</sup> International Congress of Hellenic Society of Intraocular Implant and Refractive Surgery (HSIOIRS), Αθήνα, 1-4 Μαρτίου 2018
5. 9<sup>th</sup> Annual Congress on Controversies Ophthalmology: Europe (COPHy EU), Αθήνα, 22-24 Μαρτίου 2018
6. 24<sup>th</sup> Glaucoma congress of Hellenic Glaucoma Society, Αθήνα, 10-12 Μαΐου 2018
7. 18<sup>th</sup> EURETINA congress, Βιέννη, Αυστρία, 20-23 Σεπτεμβρίου 2018
8. 36<sup>th</sup> ESCRS congress, Βιέννη, Αυστρία, 22-26 Σεπτεμβρίου 2018
9. 10<sup>th</sup> Panhellenic Congress of Ocular Inflammations and Infections, Θεσσαλονίκη, 30 Νοεμβρίου – 2 Δεκεμβρίου 2018
10. 14<sup>th</sup> Annual Congress of Greek Retina and Vitreous Society (GVRS), Αθήνα, 24-26 Ιανουαρίου 2019
11. 23<sup>rd</sup> ESCRS Winter Meeting, Αθήνα, 15-17 Φεβρουαρίου 2019
12. 25<sup>th</sup> Glaucoma congress of Hellenic Glaucoma Society, Αθήνα, 11-13 Απριλίου 2019
13. 52<sup>o</sup> Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 6-8 Ιουνίου 2019
14. 1<sup>st</sup> Hellenic Ocular Surface and Dry Eye Society Congress, Αθήνα, 29-30 Νοεμβρίου 2019
15. 15<sup>th</sup> Annual Congress of Greek Retina and Vitreous Society (GVRS), Αθήνα, 30 Ιανουαρίου – 1 Φεβρουαρίου 2020
16. EURETINA 2020 Virtual, 2-4 Οκτωβρίου 2020
17. 16<sup>th</sup> Annual Congress of Greek Retina and Vitreous Society (GVRS) Virtual, 28-30 Ιανουαρίου 2021
18. EURETINA 2021 Virtual, 9-12 Σεπτεμβρίου 2021
19. 11<sup>th</sup> Panhellenic Congress of Ocular Inflammations and Infections Virtual, 3-5 Δεκεμβρίου 2021
20. EURETINA 2022, Αμβούργο, Γερμανία, 1-4 Σεπτεμβρίου 2022
21. FLORetina 2022, Ρώμη, Ιταλία, 8-11 Δεκεμβρίου 2022



22. 10<sup>th</sup> EURETINA Winter Meeting, Βίλνιους, Λιθουανία, 11 Μαρτίου 2023
23. EURETINA 2023, Άμστερνταμ, Ολλανδία, 5-8 Οκτωβρίου 2023
24. American Academy of Ophthalmology (AAO) Annual Meeting 2023, Σαν Φρανσίσκο, ΗΠΑ, 3-6 Νοεμβρίου 2023
25. 28<sup>th</sup> Glaucoma Congress of Greek Glaucoma Society, Αθήνα, 11-13 Απριλίου 2024

## **ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ (COURSES)**

1. ATLS (Advanced Trauma Life Support) Course στο Κέντρο Έρευνας και Εκπαίδευσης «Σουκάκος» του ΠΓΝ ΑΤΤΙΚΟΝ, στις 9-10 Σεπτεμβρίου 2016, με πιστοποίηση από το American College of Surgeons.
2. BLS (Basic Life Support) Course υπό τη διοργάνωση της Ελληνικής Εταιρείας Επείγουσας Προνοσοκομειακής Φροντίδας στη Λαμία, στις 6 Μαΐου 2017, με πιστοποίηση από το European Resuscitation Council.
3. 14<sup>th</sup> EGS European Glaucoma Residents' Course, Λισσαβόνα, Πορτογαλία, 18-19 Σεπτεμβρίου 2020
4. Moorfields Eye Hospital Laser Simulation Course, Λονδίνο, Ηνωμένο Βασίλειο, 8 Ιουνίου 2024
5. Moorfields International Uveitis Symposium, Λονδίνο, Ηνωμένο Βασίλειο, 11- 13 Ιουλίου 2024

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της διδακτορικής διατριβής, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας κα Ειρήνη Χατζηράλλη, που με τίμησε με τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπόνησω την παρούσα διδακτορική διατριβή, και για τη συνεχή της στήριξη, καθοδήγηση και εμπιστοσύνη κατά τη διάρκεια της συλλογής και ανάλυσης των δεδομένων και της συγγραφής της διατριβής. Χωρίς τη βοήθεια της, η παρούσα διατριβή δεν θα είχε πραγματοποιηθεί.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Καθηγητή Κλινικής Βιοχημείας-Ιατρικής Χημείας κ. Χρήστο Κρούπη για την συνεχή του ενθάρρυνση, την καθοδήγησή του και την πολύτιμη βοήθειά του στην οργάνωση και ολοκλήρωση της γονοτύπησης των σημειακών μεταλλάξεων στο εργαστήριο.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στα υπόλοιπα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής τον Καθηγητή Οφθαλμολογίας κ. Παναγιώτη Θεοδοσιάδη και τον Καθηγητή Οφθαλμολογίας κ. Ηλία Γεωργάλα για την παρακολούθηση της προόδου της παρούσας διδακτορικής διατριβής καθώς και για τις χρήσιμες συμβουλές και οδηγίες τους.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον συνάδελφο Δημήτριο Καζαντζή για όλη την βοήθεια στη συλλογή του υλικού της διατριβής.

Τέλος, οφείλω ευγνωμοσύνη στους γονείς μου για την ηθική στήριξη που μου έχουν προσφέρει έως τώρα και εύχομαι η ολοκλήρωση της διατριβής μου να είναι μια μικρή ανταπόδοση για όσα έχουν κάνει και συνεχίζουν να κάνουν για μένα.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η απόφραξη φλέβας του αμφιβληστροειδούς (retinal vein occlusion, RVO) είναι η δεύτερη πιο συχνή αγγειακή διαταραχή του αμφιβληστροειδούς μετά τη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια. Η RVO μπορεί να προκαλέσει σημαντική διαταραχή της όρασης λόγω σχηματισμού οιδήματος ωχράς κηλίδας, ισχαιμίας ή νεοαγγείωσης. Συγκεκριμένα, η ιστική υποξία και η αγγειακή βλάβη προκαλούν φλεγμονή, οξειδωτικό στρες και παραγωγή κυτοκινών με τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (vascular endothelial growth factor, VEGF) να είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας που οδηγεί στην ανάπτυξη οιδήματος της ωχράς κηλίδας μέσω αυξημένης αγγειακής διαπερατότητας.

Η αιτιοπαθογένεση της RVO είναι πολυπαραγοντική και βασίζεται κυρίως στην τριάδα του Virchow, που αποτελείται από αιμοδυναμικές αλλαγές (φλεβική στάση), αγγειακή ενδοθηλιακή βλάβη και υπερπηκτικότητα. Η ηλικία είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου, ωστόσο, η RVO μπορεί να εμφανιστεί και σε νεότερους ασθενείς. Έχουν αναγνωριστεί διάφοροι συστηματικοί παράγοντες κινδύνου όπως η υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία και ο σακχαρώδης διαβήτης που θεωρούνται από τους πιο σημαντικούς. Επιπλέον, τελευταία κάποιες μελέτες έχουν αναδείξει τη συσχέτιση της πάθησης με γονιδιακούς πολυμορφισμούς, που αυξάνουν τον κίνδυνο ενός θρομβωτικού επεισοδίου, με αντικρουόμενα ωστόσο αποτελέσματα.

Οι εγχύσεις ενδοϋαλοειδικών anti-VEGF παραγόντων είναι η «gold standard» θεραπεία του οιδήματος ωχράς κηλίδας στην RVO, λόγω της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας που παρέχουν. Ωστόσο, ένα υπολογίσιμο ποσοστό των ασθενών εμφανίζει «μερική» ή «καμία ανταπόκριση» στους ενδοϋαλοειδικούς παράγοντες anti-VEGF, έχοντας επίσης πολλαπλές υποτροπές του οιδήματος.

Με βάση τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι να διερευνήσει την πιθανή συσχέτιση πέντε μονονουκλεοτιδικών γενετικών πολυμορφισμών (single nucleotide polymorphisms – SNPs) από τρία διαφορετικά γονίδια που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή [*απολιποπρωτεΐνη E (APOE)*, *παραοξονάση 1 (PON1)* και *παράγοντας 1 που προέρχεται από στρωματικά κύτταρα (SDF-1)*] με την απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς σε ελληνικό πληθυσμό. Επιπρόσθετα, να αξιολογηθεί η συσχέτιση του γονότυπου με την ανατομική

και λειτουργική ανταπόκριση στη θεραπεία με ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις anti-VEGF παραγόντων, η οποία δεν είχε μελετηθεί έως τώρα.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

RVO: Retinal vein occlusion, Απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς

CRVO: Central retinal vein occlusion, Απόφραξη κεντρικής φλέβας αμφιβληστροειδούς

BRVO: Branch retinal vein occlusion, Απόφραξη κλάδου φλέβας αμφιβληστροειδούς

HRVO: Hemiretinal vein occlusion, Ημιαμφιβληστροειδική απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς

OCT: Optical coherence tomography, Οπτική τομογραφία συνοχής

OCT-A: Optical coherence tomography-angiography, Αγγειογραφία οπτικής τομογραφίας συνοχής

CMO: Cystoid macular oedema, Κυστικό οίδημα ωχράς κηλίδας

CST: Central subfield thickness, Πάχος κεντρικού υποπεδίου

VEGF: Vascular endothelial growth factor, Αγγειακός αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου

PCR-RLFP: Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism

SNP: Single-nucleotide polymorphism, Μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός

APOE: Apolipoprotein E, Απολιποπρωτεΐνη E

SDF-1: Stromal cell-derived factor 1, Παράγοντας 1 που προέρχεται από τα στρωματικά κύτταρα

PON1: Paraoxonase 1, Παραοξονάση 1

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

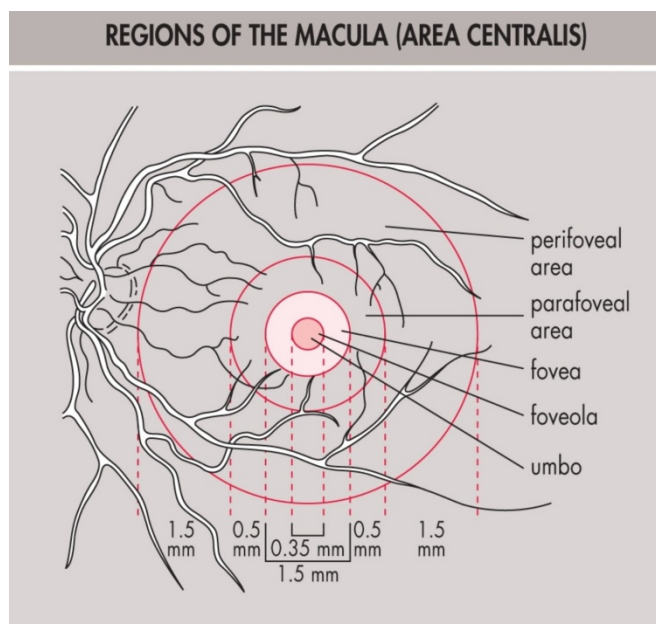
## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΤΟΠΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΗΣ ΩΧΡΑΣ ΚΗΛΙΔΑΣ**

Η ωχρά κηλίδα είναι μία κυκλική έως ωοειδής περιοχή στον οπίσθιο πόλο του οφθαλμού, στην κροταφική πλευρά του οπτικού δίσκου, με διάμετρο περίπου 5.5 mm. Βρίσκεται μεταξύ των δύο κύριων (άνω και κάτω) κροταφικών αγγειακών τόξων του αμφιβληστροειδούς. Ιστολογικά, χαρακτηρίζεται από την παρουσία περισσότερων από ενός στρωμάτων γαγγλιακών κυττάρων και από την υψηλή συγκέντρωση σε λουτεΐνη και ζεαξανθίνη (ξανθοφύλλες που ανήκουν στην κατηγορία των καροτενοειδών χρωστικών) και λιποφουσκίνης. Η ωχρά κηλίδα είναι υπεύθυνη για την υψηλής-ανάλυσης όρασης, την αντίληψη των χρωμάτων και εξυπηρετεί τις κεντρικές 15-20° του οπτικού πεδίου. Η ωχρά κηλίδα χωρίζεται στα εξής τοπογραφικά-ανατομικά σημεία αναφοράς (Εικόνα 1) [1,2]:

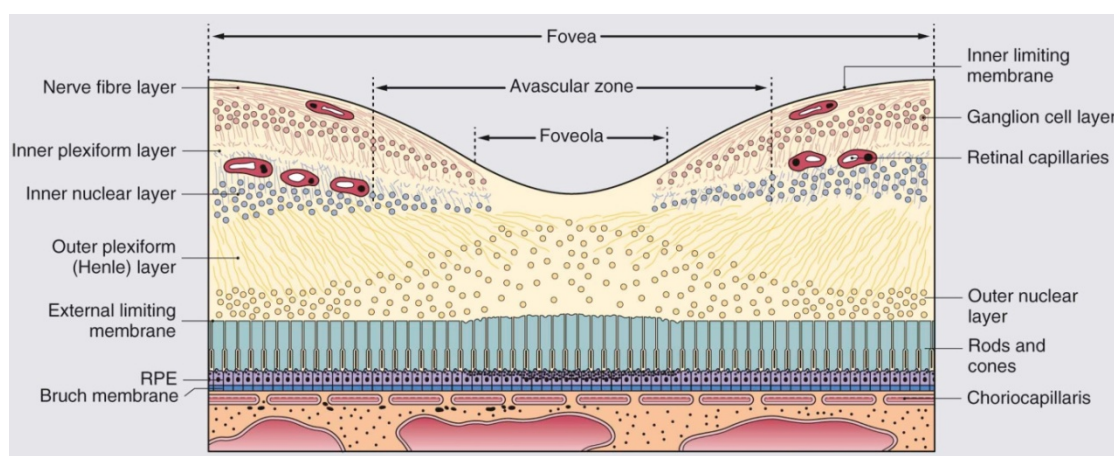
- Ο ομφαλός (umbo) είναι ένα εντύπωμα διαμέτρου 150-200 μm και βρίσκεται στο κέντρο του βοθριδίου. Η υψηλότερη συγκέντρωση κωνίων βρίσκεται στον ομφαλό. Κατά τη βυθοσκόπηση, ο ομφαλός αντιστοιχεί στην μικρή αντανάκλαση φωτός στο κέντρο του βοθρίου.
- Το βοθρίδιο (foveola) διαμορφώνει το κεντρικό έδαφος του βοθρίου, έχει διάμετρο ~ 350 μm και αποτελεί (συμπεριλαμβανομένου του ομφαλού) το λεπτότερο μέρος του αμφιβληστροειδούς με πάχος 150 μm. Το βοθρίδιο αποτελείται από πυκνώς στοιβαγμένα κωνία ενώ λείπουν πλήρως τα γαγγλιακά κύτταρα.
- Η βοθρική ανάγγειος ζώνη (foveal avascular zone, FAZ) περιλαμβάνει το βοθρίδιο και εκτείνεται λίγο πιο πέρα. Η ακριβής διάμετρος ποικίλει ανάμεσα σε υγιή άτομα και συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 400 μm και 500 μm. Η περιοχή αυτή τροφοδοτείται μέσω διάχυσης από τα χοριοτριχοειδή.
- Το βοθρίο (fovea - Εικόνα 2) είναι ένα εντύπωμα στο κέντρο της ωχράς κηλίδας με κλίση 22° και αποτελείται από λεπτό πυθμένα (το βοθρίδιο) και παχύτερα περιθώρια. Η διάμετρος του βοθρίου είναι 1500 μm (παρόμοια με τον οπτικό δίσκο).
- Η παραβοθρική περιοχή (parafovea) είναι ένας δακτύλιος εύρους 0.5 mm που περιβάλλει το βοθρικό χείλος. Στην περιοχή αυτή υπάρχουν 4-6 στρώματα γαγγλιακών κυττάρων και η έσω κοκκώδης στιβάδα περιλαμβάνει 7-11

στρώματα πυρήνων των δίπολων κυττάρων. Η αναλογία κωνία/ραβδία στην παραβοθρική περιοχή είναι 1:1.

- Η περιβοθρική περιοχή (perifovea) είναι ένας δακτύλιος εύρους 1.5 mm εξωτερικά της παραβοθρικής περιοχής. Στην περιοχή αυτή υπάρχουν λιγότερα στρώματα γαγγλιακών κυττάρων και η έσω κοκκώδης στιβάδα περιλαμβάνει 6 στρώματα πυρήνων των δίπολων κυττάρων. Η αναλογία κωνία/ραβδία στην περιβοθρική περιοχή είναι 1:2.



**Εικόνα 1.** Τοπογραφικά-ανατομικά σημεία αναφοράς της ωχράς κηλίδας. Πηγή: Yanoff M, S.Duker J. Ophthalmology. 5th Edition. Elsevier; 2019.



**Εικόνα 2.** Βοθρίο. Πηγή: Bowling B. Kanski's Clinical Ophthalmology. 8th Edition. Elsevier; 2016.



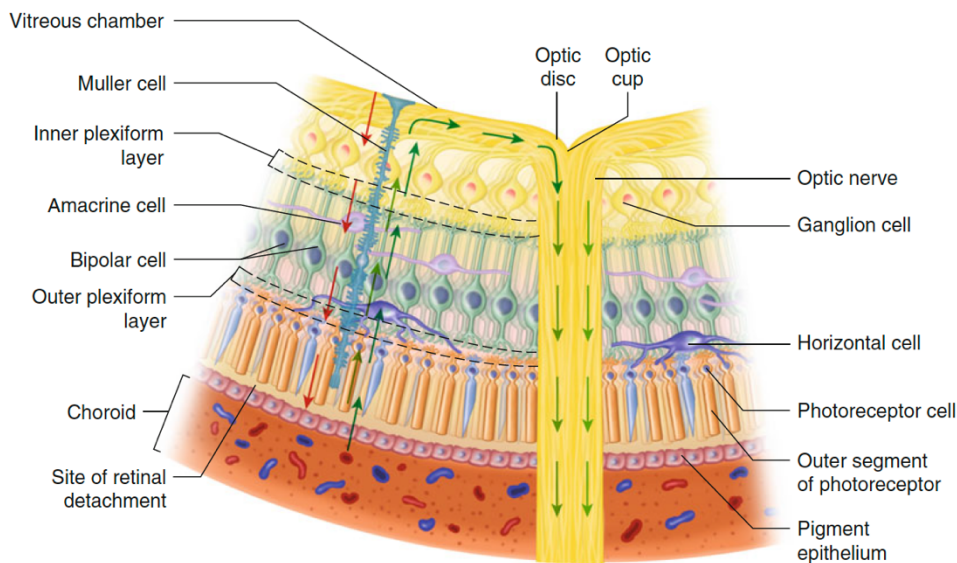
## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΩΣΗ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΧΟΡΙΟΕΙΔΟΥΣ**

Ο αμφιβληστροειδής είναι ο ενδότετος από τους τρεις χιτώνες του οφθαλμού. Αποτελείται από τον νευροαισθητηριακό (ή ιδίως αμφιβληστροειδή) και από ένα εξωτερικό μελαγχρωματικό επιθήλιο, το μελάγχρουν επιθήλιο. Ο αμφιβληστροειδής συνδέεται εξωτερικά με τη μεμβράνη του Bruch και εσωτερικά με το υαλοειδές, ενώ βρίσκεται σε συνέχεια με το οπτικό νεύρο οπισθίως, στο σημείο της εξόδου των αξόνων των γαγγλιακών κυττάρων από τον οφθαλμό (Εικόνα 3).

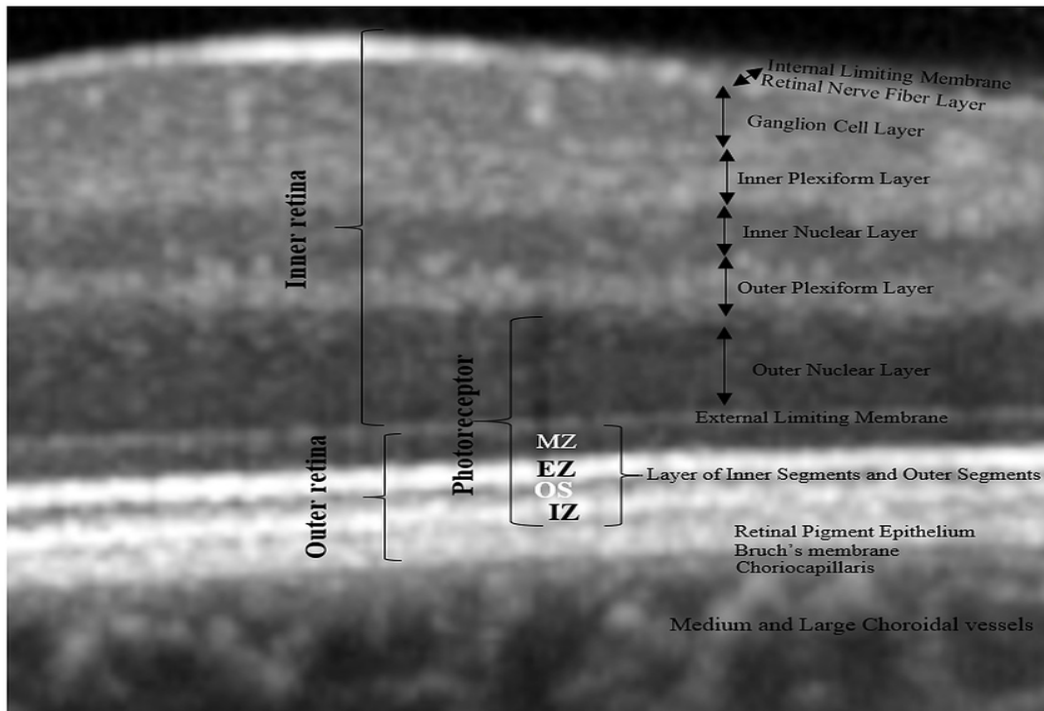
Ο νευροαισθητήριος αμφιβληστροειδής αποτελείται από τις ακόλουθες στιβάδες από έσω προς τα έξω [3,4]:

1. Έσω αφοριστική μεμβράνη (internal limiting membrane). Σχηματίζεται από τις έσω απολήξεις (footplates) των κυττάρων του Müller και προσκολλάται στο οπίσθιο φλοιώδες υαλοειδές.
2. Στιβάδα των νευρικών ινών (nerve fibre layer). Αποτελείται από τους νευράξονες των γαγγλιακών κυττάρων, οι οποίοι περνούν από το ηθμοειδές πέταλο και σχηματίζουν το οπτικό νεύρο.
3. Στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (ganglion cell layer). Αποτελείται από τα κυτταρικά σώματα των γαγγλιακών κυττάρων. Υπάρχουν δύο τύποι γαγγλιακών κυττάρων: α) Τα “midget” γαγγλιακά κύτταρα που βρίσκονται στην περιοχή της ωχράς κηλίδας, των οποίων οι δενδρίτες συνάπτονται με τον άξονα ενός μόνο δίπολου κυττάρου, και β) Τα πολυσυναπτικά γαγγλιακά κύτταρα βρίσκονται κυρίως στην περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς και κάθε κύτταρο εξ αυτών συνάπτεται με έως και εκατό δίπολα κύτταρα.
4. Έσω δικτυωτή στιβάδα (inner plexiform layer). Αποτελείται από τις συνάψεις των νευραξόνων των δίπολων κυττάρων με τους δενδρίτες των γαγγλιακών κυττάρων και τις απολήξεις των αμακρόινων κυττάρων.
5. Έσω κοκκώδης στιβάδα (inner nuclear layer). Αποτελείται από τα κυτταρικά σώματα των δίπολων, των οριζόντιων, των αμακρόινων και των κυττάρων του Müller.
6. Έξω δικτυωτή στιβάδα (outer plexiform layer). Αποτελείται από τις συνάψεις μεταξύ των τελικών απολήξεων των φωτοϋποδοχέων (κωνίων και ραβδίων) και των δενδριτών των δίπολων και οριζόντιων κυττάρων.

7. Έξω κοκκώδης στιβάδα (outer nuclear layer). Αποτελείται από τους πυρήνες των φωτοϋποδοχέων.
8. Έξω αφοριστική μεμβράνη (outer limiting membrane). Σχηματίζεται από μία σειρά ζωνών προσκόλλησης μεταξύ των φωτοϋποδοχέων και των ακτινοειδών αποφυάδων των κυττάρων του Müller.
9. Στιβάδα των ραβδίων και των κωνίων (layer of rods and cones). Περιλαμβάνει το έσω και έξω τμήμα των φωτοϋποδοχέων. Απεικονιστικά με τη βοήθεια της OCT τομογραφίας διακρίνονται 4 επιμέρους τμήματα-ζώνες (Εικόνα 4): α) Μυοειδής ζώνη (myoid zone) που σχηματίζεται από τα έσω τμήματα των φωτοϋποδοχέων, β) Ελλειψοειδής ζώνη (ellipsoid zone) που σχηματίζεται από το πλούσιο σε μιτοχόνδρια έξω μέρος του έσω τμήματος των φωτοϋποδοχέων, γ) Έξω τμήματα των φωτοϋποδοχέων, δ) Interdigitation zone που αντιστοιχεί στο σημείο επαφής των κυλίνδρων του έξω τμήματος των φωτοϋποδοχέων με τις μικρολάχνες του μελαγχρόου επιθηλίου



**Εικόνα 3.** Στιβάδες και κύτταρα του αμφιβληστροειδή. Πηγή: Ansari MW, Nadeem A. Atlas of Ocular Anatomy. Springer 2016 [5]

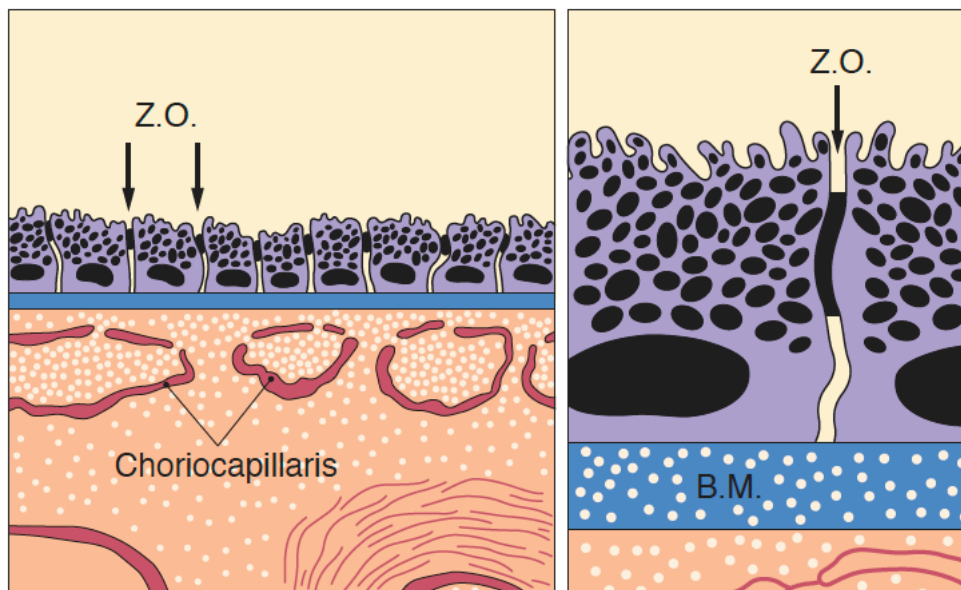


**Εικόνα 4.** Απεικόνιση των στιβάδων του αμφιβληστροειδούς με χρήση της Οπτικής Τομογραφίας Συνοχής. MZ, myoid zone; EZ, ellipsoid zone; OS, outer segments of photoreceptors; IZ, interdigitation zone. Πηγή: Damian I, Roman G, Nicoară SD. Analysis of the Choroid and Its Relationship with the Outer Retina in Patients with Diabetes Mellitus Using Binarization Techniques Based on Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. J Clin Med 2021, Vol 10, Page 210 [6]

Το μελάγχρουν επιθήλιο (retinal pigment epithelium) αποτελείται από μονή στιβάδα κυβοειδών/κιονοειδών κυττάρων και εκτείνεται από τα χείλη του οπτικού νεύρου έως μέχρι την πριονωτή περιφέρεια, όπου συνεχίζεται προς τα εμπρός, μαζί με τη συνέχεια του νευροαισθητήριου αμφιβληστροειδή ως μελαγχρωματικό επιθήλιο του ακτινωτού σώματος. Το βασικό άκρο των κυττάρων βρίσκεται σε επαφή με τη βασική μεμβράνη, η οποία θεωρείται τμήμα της μεμβράνης του Bruch.

Μεταξύ των κυττάρων του μελάγχρου επιθηλίου υπάρχουν συμπλέγματα στενών συνδέσεων (zonula occludentes) που αποτελούν τον έξω αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό. Ο έξω αιματο-αμφιβληστροειδικός φραγμός αποτρέπει την διαρροή υγρού στον υπαμφιβληστροειδικό χώρο. Το μελάγχρουν επιθήλιο έχει επίσης σημαντικό ρόλο στην φαγοκυττάρωση των αποβληθέντων έξω τμημάτων των φωτοϋποδοχέων, απορροφά σημαντικό τμήμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και

υποστηρίζει μεταβολικά τους φωτοϋποδοχείς (είναι σημείο αποθήκευσης ρετινάλης, η οποία είναι απαραίτητη για τη σύνθεση φωτοχρωστικών).



**Εικόνα 5.** Στενές συνδέσεις (zonula occludentes) μεταξύ των κυττάρων του μελαγχρόου επιθηλίου. Πηγή: Bowling B. Kanski's Clinical Ophthalmology. 8th Edition. Elsevier; 2016.

Η αιμάτωση των έσω 2/3 του αμφιβληστροειδούς προέρχεται από την αμφιβληστροειδική κυκλοφορία μέσω της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδούς. Υπάρχουν 2 κύρια επίπεδα τριχοειδικών δικτύων (Εικόνες 6 και 7):

α) το επιπολής (ή έσω) τριχοειδικό πλέγμα, το οποίο βρίσκεται στο επίπεδο των γαγγλιακών κυττάρων και

β) το εν τω βάθει (ή έξω) τριχοειδικό πλέγμα, το οποίο βρίσκεται στο επίπεδο της έσω κοκκώδους στιβάδας. Το εν τω βάθει τριχοειδικό πλέγμα ουσιαστικά περιέχει δύο υποπλέγματα: το ένα βρίσκεται στην πάνω πλευρά της έσω κοκκώδους στιβάδας (γνωστό και ως ενδιάμεσο τριχοειδικό πλέγμα) [7,8] και το άλλο στην κάτω πλευρά της έσω κοκκώδους στιβάδας.

Το έξω 1/3 του αμφιβληστροειδούς (από την έξω κοκκώδη στιβάδα μέχρι το μελάγχρουν επιθήλιο) είναι ανάγγειο και τροφοδοτείται έμμεσα από τα χοριοτριχοειδή.

Η κεντρική αρτηρία του αμφιβληστροειδούς είναι ο πρώτος κλάδος της οφθαλμικής αρτηρίας και εισέρχεται στο οπτικό νεύρο περίπου 1-1.5 cm πίσω από τον βολβό. Καθώς διαπερνά το ηθμοειδές πέταλο, η κεντρική αρτηρία του

αμφιβληστροειδούς συνοδεύεται από την κεντρική φλέβα του αμφιβληστροειδούς και συμπαθητικές νευρικές ίνες. Στην περιοχή της οπτικής θηλής η κεντρική αρτηρία του αμφιβληστροειδούς διακλαδίζεται σε άνω και κάτω κλάδο, οι οποίοι διακλαδίζονται περαιτέρω σε κροταφικούς και ρινικούς κλάδους. Καθένας από τους 4 κύριους κλάδους (άνω κροταφικός, άνω ρινικός, κάτω κροταφικός, κάτω ρινικός) είναι τελικό αγγείο και τροφοδοτεί ένα τμήμα του αμφιβληστροειδούς χωρίς να παρουσιάζουν μεταξύ τους αναστομώσεις. Οι μεγάλοι αυτοί αρτηριακοί αμφιβληστροειδικοί κλάδοι “ταξιδεύουν” εντός της στιβάδας των νευρικών ινών κάτω από την έσω αφοριστική μεμβράνη.

Το τοίχωμα των αμφιβληστροειδικών τριχοειδών χαρακτηρίζεται από τα παρακάτω στοιχεία που συνεισφέρουν στο σχηματισμό του έσω αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού (Εικόνα 7), [9]:

- ενδοθηλιακά κύτταρα συνδεδεμένα με στενές συνδέσεις (tight junctions)
- βασική μεμβράνη με ένα βασικό εξωτερικό πέταλο που περιέχει ενδοτοιχωματικά περικύτταρα
- γύρω από το τοίχωμα υπάρχουν νευρογλοιακά κύτταρα: ψευδοποδοειδείς προσεκβολές αστροκυττάρων, περιαγγειακά μακροφάγα και περιαγγειακή μικρογλοία

Το αίμα από τα τριχοειδή συλλέγεται από το φλεβικό σύστημα και καταλήγει στις αμφιβληστροειδικές φλέβες. Οι αμφιβληστροειδικές φλέβες ακολουθούν την πορεία των αρτηριών του αμφιβληστροειδούς (άνω κροταφική, άνω ρινική, κάτω κροταφική, κάτω ρινική) και συνενώνονται στην κεντρική φλέβα του αμφιβληστροειδούς. Στα σημεία διασταύρωσης οι αρτηρίες και οι φλέβες έχουν κοινό έλυτρο και ο αρτηριακός κλάδος εντοπίζεται συνηθέστερα (στο 70-85%) πάνω από τον φλεβικό. Η διάμετρος της κεντρικής φλέβας είναι κατά 25-30% μεγαλύτερη από τη διάμετρο της αντίστοιχης αρτηρίας. Η κεντρική φλέβα του αμφιβληστροειδούς εξέρχεται του βολβού δια του ηθμοειδούς πετάλου και εκβάλλει απευθείας στον σφραγγώδη κόλπο ή την άνω οφθαλμική φλέβα [10].

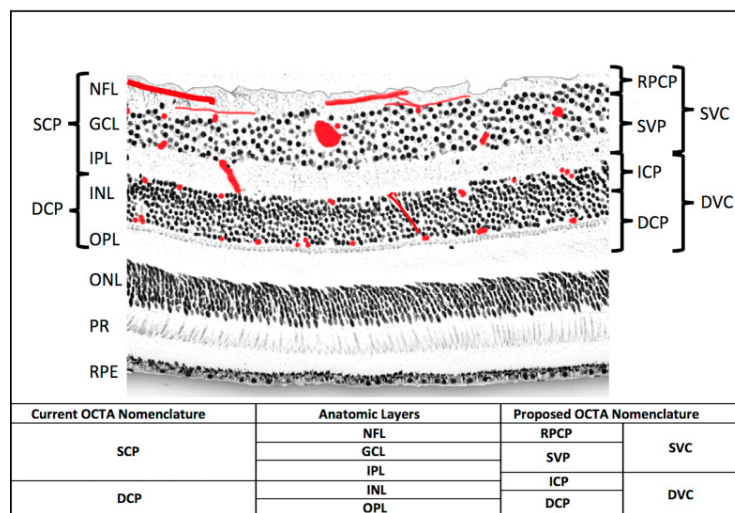
Φυσιολογική ανατομική παραλλαγή αποτελεί η παρουσία της θηλοωχρικής αρτηρίας σε ποσοστό ~25% του πληθυσμού. Η θηλοωχρική αρτηρία αρδεύει τα έσω 2/3 του αμφιβληστροειδούς στην περιοχή του θηλοωχρικού δακτυλίου και προέρχεται

από την χοριοειδική κυκλοφορία είτε από τις οπίσθιες ακτινοειδείς αρτηρίες είτε σπανιότερα απευθείας από κλάδους χοριοειδικών αρτηριών [9,11].

Ο χοριοειδής διαιρείται σε 3 στιβάδες:

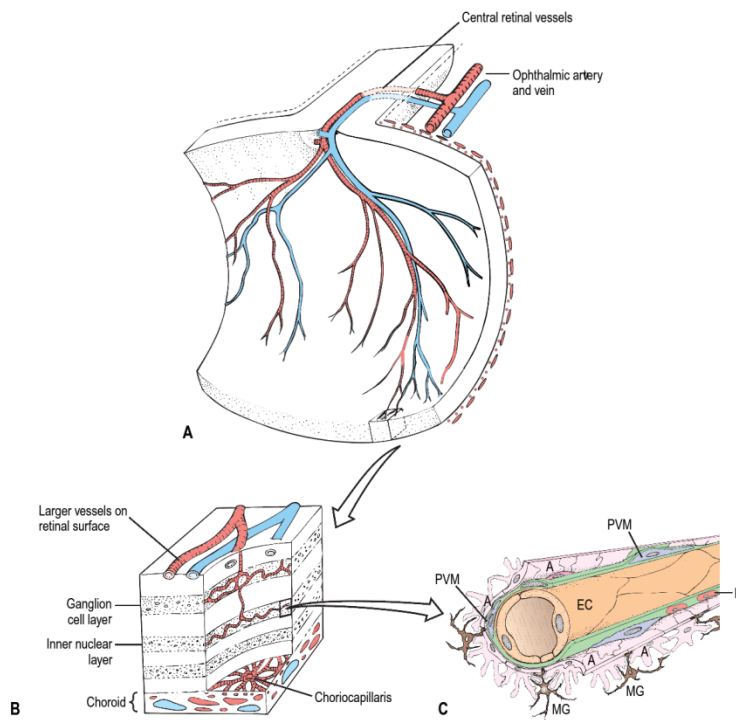
- 1) τη μεμβράνη του Bruch,
- 2) τη χοριοτριχοειδική στιβάδα, η οποία όπως προαναφέρθηκε τροφοδοτεί το έξω 1/3 του αμφιβληστροειδούς και κυρίως τους φωτοϋποδοχείς
- 3) την αγγειώδη στιβάδα. Η αγγειώδης στιβάδα μπορεί να υποδιαιρεθεί στην στιβάδα του Sattler που βρίσκεται έσω και περιλαμβάνει μέσου μεγέθους αρτηρίες και φλέβες και στην στιβάδα του Haller που βρίσκεται έξω και περιλαμβάνει μεγάλες αρτηρίες και φλέβες.

Η αιμάτωση του χοριοειδή προέρχεται από τις οπίσθιες ακτινοειδείς (βραχείες και μακρές) αρτηρίες. Ένας αριθμός παλίνδρομων κλάδων προέρχεται από τις πρόσθιες ακτινοειδείς αρτηρίες. Όλες οι παραπάνω αρτηρίες είναι κλάδοι της οφθαλμικής αρτηρίας. Το φλεβικό αίμα παροχετεύεται μέσω των περιδίνητων φλεβών που είναι συνήθως 4 (μπορεί να είναι έως και 6) και παροχετεύουν κάθε τμήμα του χοριοειδή. Στη συνέχεια, οι περιδίνητες φλέβες διατιτραίνουν το σκληρό και καταλήγουν στις άνω και κάτω οφθαλμικές φλέβες στον κόγχο [9–11].



**Εικόνα 6.** Ανατομική εντόπιση των αμφιβληστροειδικών αγγειακών δικτύων. SVC, superficial vascular complex; DVC, deep vascular complex; RPCP, radial peripapillary capillary plexus; SVP, superficial vascular plexus; ICP, intermediate capillary plexus; SCP, superficial capillary plexus; DCP, deep capillary plexus; NFL, nerve fiber layer; GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; PR, photoreceptors layers; RPE, retinal pigment epithelium. Πηγή: Campbell JP, Zhang M, Hwang TS, Bailey ST, Wilson DJ, Jia Y, et

al. Detailed Vascular Anatomy of the Human Retina by Projection-Resolved Optical Coherence Tomography Angiography. Sci Rep. 2017 Feb;7:42201.



**Εικόνα 7.** A: Κεντρικά αμφιβληστροειδικά αγγεία προερχόμενα από την οφθαλμική αρτηρία. B: Τα επίπεδα των αμφιβληστροειδικών αγγειακών δικτύων. C: Στοιχεία του τοιχώματος των αμφιβληστροειδικών αγγείων. EC, ενδοθηλιακά κύτταρα (endothelial cells); A, αστροκύτταρα (astrocytes); MG, μικρογλοία (microglia); PVM, περιαγγειακά μακροφάγα (perivascular macrophages); P, περικύτταρα (pericytes). Πηγή: Forrester J, Dick A, McMenemy P, Roberts F, Pearlman E. The Eye, Basic Sciences in Practice. 4th ed. Elsevier; 2016.

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ**

Εκτός από τη βυθοσκόπηση, η οποία είναι η βασική εξέταση για το διαγνωστικό έλεγχο (screening) και τη διάγνωση των παθήσεων των αγγειακών αμφιβληστροειδούς, υπάρχουν και άλλες οφθαλμικές απεικονιστικές μέθοδοι που είναι ιδιαιτέρως χρήσιμες για την περαιτέρω διερεύνηση και παρακολούθηση της νόσου. Οι βοηθητικές αυτές απεικονιστικές μέθοδοι περιλαμβάνουν: έγχρωμη φωτογραφία βυθού, φλουοροαγγειογραφία (ΦΑ), οπτική τομογραφία συνοχής (OCT) και αγγειογραφία οπτικής τομογραφίας συνοχής (OCTA).

1. Έγχρωμη φωτογραφία βυθού. Μία τυπική κάμερα βυθού παρέχει μία 30 έως 50 μοιρών εικόνα του οπίσθιου πόλου. Υπάρχουν, επίσης, κάμερες βυθού που μπορούν να κάνουν λήψη ευρύτερης εικόνας έως 200 μοιρών, που εκτείνεται μέχρι τον περιφερικό αμφιβληστροειδή. Μολονότι η φωτογραφία βυθού είναι μία αναπαραγώγιμη απεικονιστική μέθοδος που παρέχει καλή τεκμηρίωση της νόσου, λεπτά ευρήματα, όπως μπορεί να είναι αρκετές φορές το οίδημα ωχράς κηλίδας, χρειάζονται στερεοσκοπική προβολή.
2. Φλουοροαγγειογραφία (ΦΑ). Η ΦΑ είναι μία δισδιάστατη απεικονιστική εξέταση κατά την οποία γίνεται ενδοφλέβια έγχυση μιας χρωστικής, της φλουορεσκεΐνης. Βασίζεται στην ιδιότητα της φλουορεσκεΐνης να διεγείρεται από φως μήκους κύματος 490 nm (blue light spectrum) και να εκπέμπει σε φως μήκους κύματος 530 nm (yellow – green light spectrum). Η φλουορεσκεΐνη δεν μπορεί να περάσει ούτε τον έξω αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό που βρίσκεται μεταξύ των κυττάρων του μελάγχρου επιθηλίου (zonula occludens) ούτε τον έσω αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό που βρίσκεται μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων των αμφιβληστροειδικών τριχοειδών (tight junctions). Η διάσπαση του έσω αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού προκαλεί την διαρροή χρωστικής, η οποία χαρακτηρίζεται από υπερφθορισμό στην ΦΑ. Μέσω της ΦΑ γίνεται η εκτίμηση της ισχαιμίας τόσο στην ωχρά κηλίδα όσο και στην περιφέρεια (περιοχές τριχοειδικής μη διήθησης, capillary non-perfusion areas). Ειδικότερα, η χρησιμότητα της ΦΑ στην ανίχνευση μίας

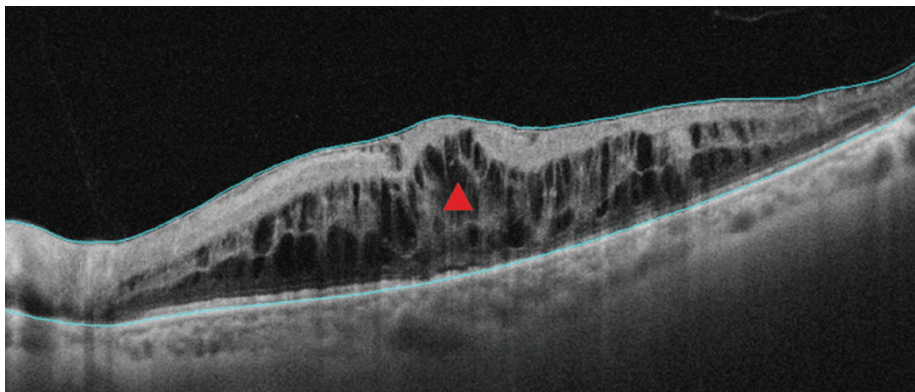


αρχόμενης νεοαγγείωσης, που δεν είναι εύκολα διακριτή στη βυθοσκόπηση ή στη φωτογραφία βυθού, θεωρείται μοναδική. Η ΦΑ μπορεί ακόμα να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση εστιακού και διάχυτου οιδήματος ωχράς κηλίδας, αν και πλέον λιγότερο συχνά λόγω της ευρείας διαθεσιμότητας της OCT. Η ΦΑ δύναται επίσης να βοηθήσει στη διάγνωση του ψευδοφακικού οιδήματος ωχράς κηλίδας (Irvine-Gass syndrome), το οποίο χαρακτηρίζεται από πεταλοειδές μοτίβο υπερφθορισμού σε συνδυασμό με υπερφθορισμό του οπτικού δίσκου.

3. Οπτική τομογραφία συνοχής (optical coherence tomography - OCT). Η OCT είναι μία μη-επεμβατική απεικονιστική μέθοδος, η οποία βασίζεται στην συμβολομετρία χαμηλής συνοχής (low-coherence interferometry) χρησιμοποιώντας φως μήκους κύματος κοντά στο υπέρυθρο. Η συμβολή που δημιουργείται, και οδηγεί στην παραγωγή εικόνας, οφείλεται στη διαφορετική ένταση και χρονική καθυστέρηση του φωτός καθώς συναντά διαφορετική οπτική αντανάκλαση σε βάθος ιστού, και μετράται με τη βοήθεια φωτοανιχνευτή. Τα παλαιότερα μηχανήματα OCT λειτουργούν με την τεχνολογία time domain, ενώ τα πιο σύγχρονα μηχανήματα χρησιμοποιούν τη τεχνολογία spectral domain ή τη νεότερη swept-source τεχνολογία. Τα time domain και spectral domain μηχανήματα OCT έχουν μια ευρυζωνική πηγή φωτός κοντά στα 840 nm. Τα spectral domain OCT υπερτερούν των time domain επειδή έχουν καλύτερη αναλογία σήματος-θορύβου. Αντίθετα, τα swept-source μηχανήματα OCT χρησιμοποιούν μία ρυθμιζόμενη πηγή laser που εκπέμπει σε στενό εύρος ζώνης και το μήκος κύματος αλλάζει με το χρόνο σαρώνοντας ένα ευρύ φάσμα μηκών κύματος με κέντρο τα 1050 nm. Το πλεονέκτημα των swept-source OCT είναι ότι μπορούν να διεισδύσουν σε μεγαλύτερο βάθος ιστού λόγω του μεγαλύτερου μήκους κύματος που χρησιμοποιούν [12]. Η OCT επιτρέπει την ταχεία και υψηλής ανάλυσης εικόνων διατομής του αμφιβληστροειδούς (αξονική ανάλυση της τάξεως των 5 $\mu$ m στο spectral domain OCT και της τάξεως του 1 $\mu$ m στο swept-source OCT). Η OCT αποτελεί πλέον την «gold standard» εξέταση για τη διάγνωση αλλά και παρακολούθηση του οιδήματος ωχράς κηλίδας (Εικόνα 8), επιτρέποντας την ακριβής μέτρηση του πάχους του αμφιβληστροειδούς. Η OCT δύναται επιπλέον να

αποκαλύπτει αλλαγές της υαλοαμφιβληστροειδικής επιφάνειας όπως η υαλοωχρική έλξη και η επαμφιβληστροειδική μεμβράνη.

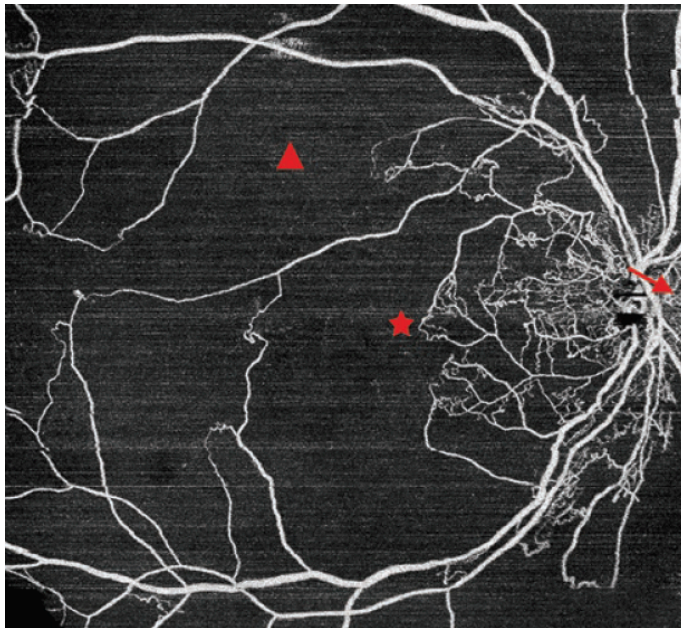
4. Αγγειογραφία οπτικής τομογραφίας συνοχής (optical coherence tomography angiography - OCTA). Η OCTA είναι μία μη-επεμβατική απεικονιστική εξέταση που βασίζεται στην ανίχνευση της κίνησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια προκαλούν περίθλαση στο φως που προσπίπτει στη επιφάνεια τους. Η κίνηση των ερυθροκυττάρων ανιχνεύεται μέσω ενός αλγορίθμου συγκρίνοντας διαδοχικές λήψεις OCT. Δεδομένου ότι τα όλα ανιχνευόμενα κινούμενα αντικείμενα είναι ερυθρά αιμοσφαίρια, επιτυγχάνεται η σκιαγράφηση των αγγείων [13–15]. Η OCTA είναι ταχύτερη από την ΦΑ και επιτρέπει τον διαχωρισμό μεταξύ του επιπολής και του εν τω βάθει δικτύου των τριχοειδικών αγγείων. Η OCTA ωστόσο είναι επιρρεπής σε διάφορα είδη “artifacts” όπως κίνησης, σκιάς και προβολής. Επίσης, εάν η ροή εντός αγγείου είναι πολύ αργή, όπως για παράδειγμα εντός ενός μικροανευρύσματος, μπορεί να μην ανιχνευτεί. Η OCTA, πέρα από την ευρεία πλέον χρήση της για την ανίχνευση χorioειδικής νεοαγγείωσης, χρησιμοποιείται και για την ανίχνευση ισχαιμίας στην ωχρά κηλίδα στα πλαίσια αγγειακών παθήσεων αμφιβληστροειδούς όπως η διαβητική ωχροπάθεια και η απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς (Εικόνες 9 και 10).



**Εικόνα 8.** Οπτική τομογραφία συνοχής σε ασθενή με κυστικό οίδημα ωχράς κηλίδας (κόκκινο τρίγωνο) λόγω απόφραξης κεντρικής φλέβας αμφιβληστροειδούς. Πηγή: Chen Y, Peng X. *Atlas of Swept Source OCT and OCT Angiography*. Springer Nature; 2023.



**Εικόνα 9.** Αγγειογραφία οπτικής τομογραφίας συνοχής σε ασθενή με απόφραξη κεντρικής φλέβας αμφιβληστροειδούς, που απεικονίζει διεύρυνση της ανάγγειου ζώνης (κόκκινο βελάκι) και περιοχές τριχοειδικής μη διήθησης (κόκκινος αστερίσκος). Πηγή: Chen Y, Peng X. *Atlas of Swept Source OCT and OCT Angiography*. Springer Nature; 2023.



**Εικόνα 10.** Αγγειογραφία οπτικής τομογραφίας συνοχής σε ασθενή με ισχαιμική απόφραξη κεντρικής φλέβας αμφιβληστροειδούς, που απεικονίζει εκτεταμένες περιοχές τριχοειδικής μη διήθησης στην ωχρά κηλίδα (κόκκινο τρίγωνο) και σχηματισμό παράπλευρης κυκλοφορίας στην ωχρά κηλίδα

(κόκκινος αστερίσκος) και γύρω από τον οπτικό δίσκο (κόκκινο βελάκι). Πηγή: Chen Y, Peng X. *Atlas of Swept Source OCT and OCT Angiography*. Springer Nature; 2023.

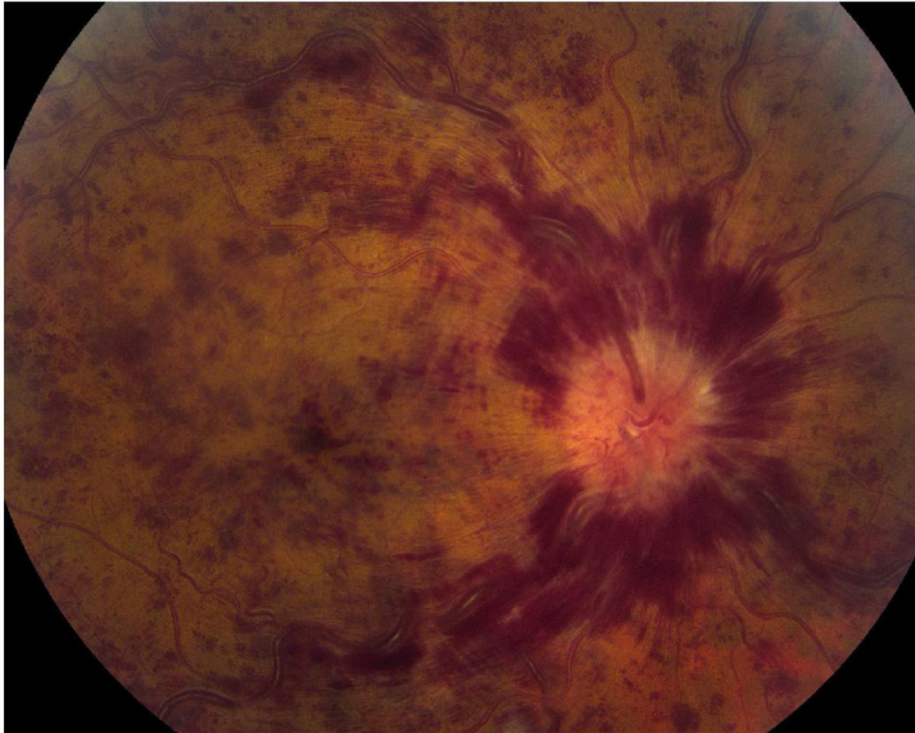
## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΦΡΑΞΗ ΦΛΕΒΑΣ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ**

### **ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ – ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ**

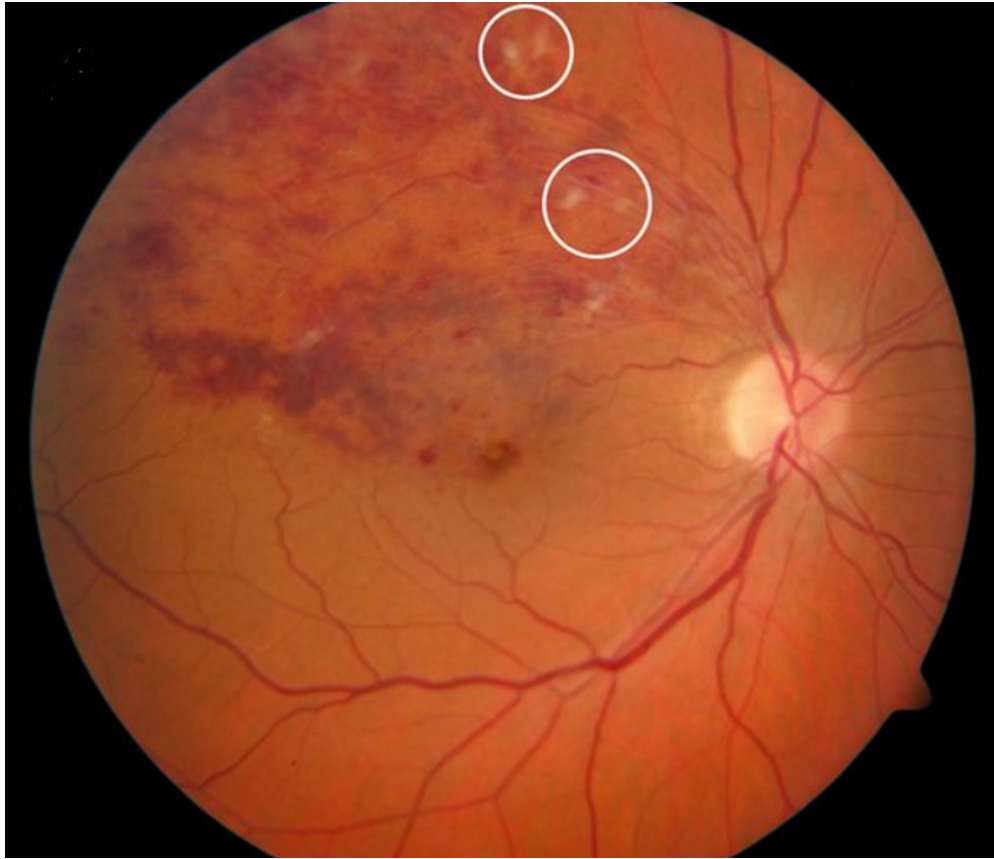
Η απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς (retinal vein occlusion, RVO) αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή αμφιβληστροειδική αγγειακή πάθηση μετά τη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, προσβάλλοντας περισσότερα από 28 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως, με συγκρίσιμο επιπολασμό μεταξύ των αντρών και γυναικών που υπολογίζεται σε 5.2 ανά 1000 άτομα [16]. Υπολογίζεται ότι έως το έτος 2050, ο αριθμός των ασθενών με RVO θα αυξηθεί κατά περισσότερο από 20% [17,18]. Η επίπτωση της νόσου αυξάνεται σημαντικά με την ηλικία.

Η απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς μπορεί να είναι ασυμπτωματική ή να εκδηλωθεί ως αιφνίδια, ετερόπλευρη, ανώδυνη, ποικίλου βαθμού σοβαρότητας απώλεια όρασης. Λιγότερο συχνά, οι ασθενείς ίσως αντιληφθούν κάποια προειδοποιητικά συμπτώματα παροδικής συσκότισης της όρασης πριν από την εμφάνιση εμφανών συμπτωμάτων. Κατά τη βυθοσκόπηση, ενδοαμφιβληστροειδικές αιμορραγίες (κυρίως φλογοειδείς) και διατεταμένα ελικοειδή αμφιβληστροειδικά αγγεία είναι τα κλασσικά ευρήματα στον προσβεβλημένο αμφιβληστροειδή και στις πιο σοβαρές περιπτώσεις βαμβακόμορφες αλλοιώσεις (cotton wool spots) λόγω της ισχαιμίας στη στιβάδα των νευρικών ιών (Εικόνες 11 και 12) [19]. Στην οξεία φάση, το επίπεδο της πτώσης της οπτικής οξύτητας εξαρτάται από το βαθμό σοβαρότητας της ισχαιμίας στην ωχρά κηλίδα και της μεγέθυνσης της ανάγγειου ζώνης, την παρουσία οιδήματος της ωχράς κηλίδας και την παρουσία ενδοαμφιβληστροειδικών αιμορραγιών στο κεντρικό βοθρίο. Στα πιο χρόνια οφθαλμοσκοπικά σημεία της RVO συμπεριλαμβάνονται σκληρά εξιδρώματα, μικροανευρύσματα, τηλεαγγειεκτασίες, σκληρωτικά αγγεία και παράπλευρα αγγεία [20]. Τα παράπλευρα αγγεία σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση, αναπτύσσονται κοντά σε περιοχές με περιορισμένη τριχοειδική διήθηση και μπορεί να αφορούν είτε τον αμφιβληστροειδή είτε τον οπτικό δίσκο [21,22].





**Εικόνα 11.** Απόφραξη κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδούς ενός δεξιού οφθαλμού. Στη φωτογραφία βυθού φαίνονται εκτεταμένες αιμορραγίες, οι οποίες είναι κυρίως φλογοειδείς, και οίδημα του οπτικού δίσκου. Πηγή: Ip M, Hendrick A. Retinal Vein Occlusion Review. *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*. 2019;7(1):40-45.



**Εικόνα 12.** Απόφραξη του άνω κροταφικού φλεβικού κλάδου του αμφιβληστροειδούς ενός δεξιού οφθαλμού. Στη φωτογραφία βυθού διακρίνονται φλογοειδείς και κηλιδώδεις αιμορραγίες, καθώς και βαμβακόμορφες αλλοιώσεις (εντός των άσπρων δακτυλίων). Πηγή: [https://eyewiki.aao.org/Branch\\_Retinal\\_Vein\\_Occlusion](https://eyewiki.aao.org/Branch_Retinal_Vein_Occlusion)

## ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Ανάλογα με την σημείο της απόφραξης, η RVO διακρίνεται σε 3 υποκατηγορίες [4,23]:

- 1) Απόφραξη κεντρικής φλέβας αμφιβληστροειδούς (central retinal vein occlusion, CRVO).
- 2) Απόφραξη κλάδου φλέβας αμφιβληστροειδούς (branch retinal vein occlusion, BRVO)
- 3) Ημιαμφιβληστροειδική / Ημικεντρική/ Ημισφαιρική απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς (hemiretinal / hemicentral / hemispheric vein occlusion, HRVO)

Στην CRVO η απόφραξη συμβαίνει κοντά στο ύψος του ηθμοειδούς πετάλου, όπου, σύμφωνα με την επικρατούσα θεωρία, η πεπαχυσμένη αθηροσκληρωτική κεντρική αρτηρία του αμφιβληστροειδούς πιέζει την κεντρική φλέβα του αμφιβληστροειδούς προκαλώντας τυρβώδη ροή, ενδοθηλιακή βλάβη και τελικά σχηματισμό θρόμβου.

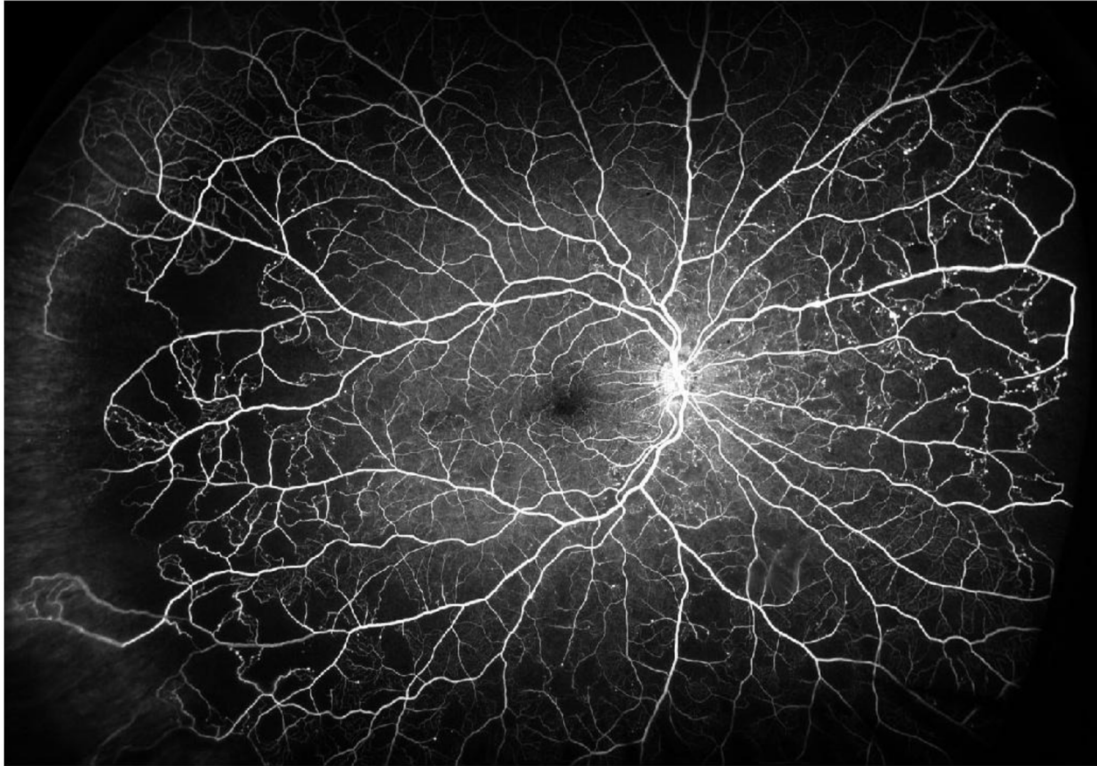
Στην BRVO η απόφραξη συμβαίνει κυρίως στο σημείο αρτηριοφλεβικής συμβολής, όπου η αμφιβληστροειδική αρτηρία μοιράζεται το ίδιο έλυτρο με τη φλέβα και το πεπαχυσμένο αρτηριακό τοίχωμα συμπιέζει την παρακείμενη φλέβα. Το πιο συχνά προσβαλλόμενο τεταρτημόριο είναι το άνω κροταφικό (63%).

Η HRVO μοιράζεται χαρακτηριστικά και από την CRVO και από την BRVO, και θεωρείται ότι σχετίζεται με ανατομική παραλλαγή της κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδούς [4,23–27].

Αξίζει να σημειωθεί ότι η BRVO έχει καλύτερη πρόγνωση σε σύγκριση με το CRVO, αν και είναι πέντε φορές πιο συχνή από τη CRVO [28].

Η CRVO και η BRVO μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω σε ισχαιμικό και μη ισχαιμικό τύπο με βάση την περιοχή την περιοχή της ισχαιμίας (capillary non-perfusion areas) στην φλουροαγγειογραφία. Ο διαχωρισμός σε ισχαιμική και μη ισχαιμική RVO είναι χρήσιμος για την κλινική αντιμετώπιση. Η μελέτη “Central Retinal Vein Occlusion study (CVOS)” όρισε ως ισχαιμική την CRVO όταν υπήρχαν φλουροαγγειογραφικά ευρήματα ισχαιμίας επιφάνειας μεγαλύτερης από 10 οπτικούς δίσκους (>10 disc areas, >10 DA) σε φλουροαγγειογραφία βυθού 7 πεδίων [29]. Αντίστοιχα, η συνολική αυτή περιοχή ισχαιμίας για την ισχαιμική BRVO ορίστηκε ως >5 DA [30]. Ωστόσο, ο ορισμός αυτός της ισχαιμίας >10 DA δεν είναι κατάλληλος για την φλουροαγγειογραφία ευρέως πεδίου (widefield) ή εξαιρετικά ευρέως πεδίου (ultra-widefield) που χρησιμοποιείται πλέον στην καθημερινή κλινική πράξη, λόγω της απεικόνισης σημαντικά μεγαλύτερου πεδίου. Ισχαιμία >10 DA εντοπιζόμενη στον οπίσθιο πόλο, ανεξαρτήτως απεικονιστικής μεθόδου, υποδεικνύει μεγαλύτερο κίνδυνο νεοαγγείωσης. Αντιστοίχως, ισχαιμία επιφάνειας μεγαλύτερης από 75 οπτικούς δίσκους (>75 disc areas, >75 DA) σε ultra-widefield φλουροαγγειογραφία ή ηλικίο ισχαιμικής περιοχής προς απεικονιζόμενη περιοχή >45% έχει βρεθεί να σχετίζεται με εμφάνιση νεοαγγείωσης [31–33].





**Εικόνα 13.** Ultra-widefield φλουοροαγγειογραφία σε δεξί οφθαλμό με απόφραξη κεντρικής φλέβας αμφιβληστροειδούς, όπου διακρίνονται εκτεταμένες περιοχές τριχοειδικής μη διήθησης στην περιφέρεια με μικροανευρύσματα και αμφιβληστροειδική παράπλευρη κυκλοφορία. Πηγή: Ip M, Hendrick A. Retinal Vein Occlusion Review. *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*. 2019;7(1):40-45.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο χαρακτηρισμός μιας RVO σε ισχαιμική ή μη ισχαιμική βασίζεται σε όλο τον αμφιβληστροειδή και διαχωρίζεται από την ισχαιμία στην περιοχή της ωχράς κηλίδας (macular ischaemia).

Είναι επίσης σημαντικό ότι οφθαλμοί με αρχικά μη ισχαιμικό τύπο CRVO μπορούν να μετατραπούν αργότερα σε ισχαιμικό τύπο, σε ποσοστό έως 30% [34–36].

Οι ασθενείς με ισχαιμική CRVO εμφανίζουν τυπικά 1 ή περισσότερα ευρήματα [24,31,37]:

1. Χαμηλή οπτική οξύτητα (44% των οφθαλμών με οπτική οξύτητα <6/60 αναπτύσσει νεοαγγείωση ίριδας) [38,39]
2. Σχετική βλάβη του προσαγωγού σκέλους του κορικού αντανακλαστικού (relative afferent papillary defect, RAPD)
3. Παρουσία πολλαπλών βαμβακόμορφων αλλοιώσεων.
4. Παρουσία πολλαπλών έντονων, πυκνών, εν τω βάθει ενδοαμφιβληστροειδικών αιμορραγιών

5. Σημαντικού βαθμού διάταση και ελίκωση των αμφιβληστροειδικών φλεβών
6. Ισχαιμία >10DA, όπως εξηγείται παραπάνω
7. Διαταραχές στο ηλεκτροαμφιβληστροειδογράφημα: μειωμένο εύρος (amplitude) β κύματος, μειωμένο πηλίκιο β προς α κύματος, παρατεταμένος απόλυτος χρόνος β κύματος (implicit time) [40–43]

## ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Οι ακριβείς μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παθογένεια δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως. Η αιτιολογία της RVO είναι πολυπαραγοντική. Η τριάδα του Virchow που αποτελείται από αλλαγές στην αιματική ροή (φλεβική στάση), τραυματισμό του αγγειακού ενδοθηλίου και υπερπηκτικότητα, παίζει σημαντικό ρόλο για το σχηματισμό του αρχικού θρόμβου [44,45]. Έπειτα, λόγω της απόφραξης, η επακόλουθη αύξηση της ενδοτοιχωματικής πίεσης στα αγγεία προκαλεί διαπίδυση υγρού έξω από τα αγγεία προς τον αμφιβληστροειδικό εξωκυττάριο χώρο (νόμος του Starling) [25,46,47]. Μαζί με το υγρό, γίνεται και εξαγγείωση πρωτεϊνών που συνεπάγεται την αύξηση της διάμεσης κολλοειδοσμηωτικής πίεσης «διαϊωνίζοντας» το αμφιβληστροειδικό οίδημα, το οποίο επηρεάζει την τριχοειδική διήθηση οδηγώντας σε ισχαιμία και προκαλεί φλεγμονή.

Δύο είναι τα κύρια μονοπάτια της παθοφυσιολογίας της RVO (Εικόνα 14):

- 1) Βλάβη του έσω αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού που προωθείται από την απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών [48] (όπως ιντερλευκινών, MCP-1, TNF- $\alpha$ , ICAM) και του αγγειακού αυξητικού παράγοντα του ενδοθηλίου (VEGF), και το οξειδωτικό στρες (αντιδραστικά είδη οξυγόνου)
- 2) Ιστική υποξία που οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή – αυξορρύθμιση (upregulation) προ-αγγειογενετικών παραγόντων και κυρίως του VEGF.

Παρουσιάζεται σημαντικού βαθμού συνέργεια του VEGF με τους παράγοντες φλεγμονής και το οξειδωτικό στρες [49–51]. Ο VEGF διεγείρει τη μετανάστευση και πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών κυττάρων προάγοντας με αυτόν τον τρόπο τη νεοαγγείωση και παράλληλα εμποδίζει την αναπλήρωση των περικυττάρων αυξάνοντας τη διαρροή [52–54].

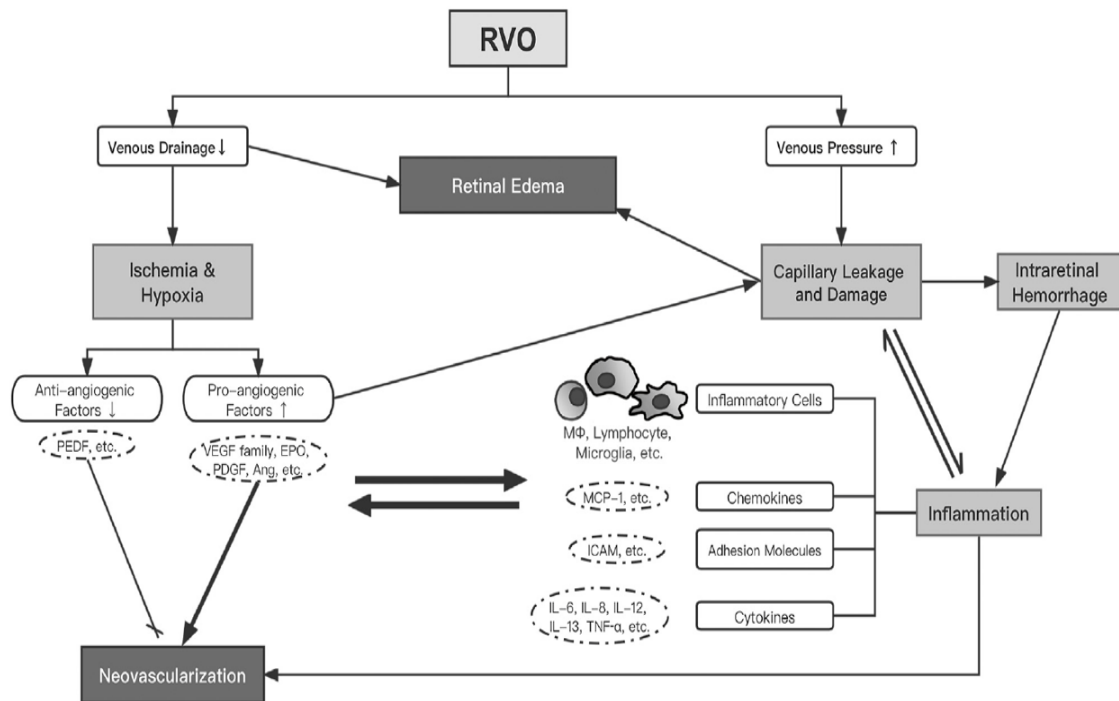
Ογδόντα τοις εκατό (80%) των μικροανευρυσμάτων, τα οποία φαίνεται να είναι μια μικροαγγειακή απάντηση στον VEGF που παράγεται από τον υποξικό ιστό αμφιβληστροειδούς, εντοπίζονται στην έσω κοκκώδη στιβάδα, δηλαδή στο εν τω βάθει τριχοειδικό πλέγμα [55].

Κύριοι (ανεξάρτητοι) παράγοντες κινδύνου [56–58]:

- Ηλικία. Η επίπτωση της RVO αυξάνεται σημαντικά σε άτομα άνω των 50 ετών, ωστόσο, η RVO μπορεί επίσης να εμφανιστεί και σε νεότερους ασθενείς [59]
- Υπέρταση. Θεωρείται ως ο ισχυρότερος παράγοντας κινδύνου γιατί επιταχύνει την αρτηριακή αθηροσκλήρωση που οδηγεί σε μηχανική συμπίεση της παρακείμενης φλέβας
- Σακχαρώδης διαβήτης
- Γλαύκωμα. Λόγω της αυξημένης ενδοφθάλμιας πίεσης υπάρχει περιορισμός της φλεβικής εκροής στο επίπεδο του ηθμοειδούς πετάλου

Υπόλοιποι συστηματικοί παράγοντες κινδύνου [11,25,26,56,59–63]:

- Δυσλιπιδαιμία
- Καρδιαγγειακή νόσος
- Αυξημένος δείκτης μάζας σώματος
- Αυξημένη α2 αιμοσφαιρίνη
- Κάπνισμα
- Διατροφή πτωχή σε φυτικά προϊόντα
- Αυξημένη γλοιότητα αίματος (μυελοϋπερλαστικά σύνδρομα, πολλαπλών μυέλωμα)
- Κατάσταση υπερπηκτικότητας. (η αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C λόγω του παράγοντα V Leiden, η ανεπάρκεια της πρωτεΐνης S, η ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C, η ανεπάρκεια της αντιθρομβίνης III, η ανεπάρκεια του παράγοντα XII, η υπερομοκυστεϊναιμία, το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο, αντισώματα καρδιολιπίνης). Σε μία πρόσφατη μέτα-ανάλυση, οι ασθενείς με αγγειακή απόφραξη αμφιβληστροειδούς εμφάνισαν παρόμοιο επιπολασμό κληρονομικής και επίκτητης θρομβοφιλίας σε σύγκριση με τα υγιή άτομα [64].



**Εικόνα 14.** Το «δίκτυο» των παθοφυσιολογικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην RVO. Πηγή: Wang B, Zhang X, Chen H, Koh A, Zhao C, Chen Y. A Review of Intraocular Biomolecules in Retinal Vein Occlusion: Toward Potential Biomarkers for Companion Diagnostics. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:1269. [47]

## ΑΡΧΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ RVO

Το όφελος της παραγγελίας ιατρικών εξετάσεων κατά τη διάγνωση της RVO είναι η αντιμετώπιση των κοινά συσχετιζόμενων παραγόντων κινδύνου, όπως η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης και η δυσλιπιδαιμία. Η έγκαιρη ανίχνευση αυτών των παραγόντων κινδύνου μπορεί να βελτιώσει την γενική κατάσταση, να αποτρέψει την εξέλιξη ή να αποτρέψει την υποτροπή στον ίδιο ή στον άλλο οφθαλμό και να μειώσει τον κίνδυνο για τη συνολική υγεία.

Σύνοψη των συνιστώμενων ιατρικών ερευνητικών ελέγχων στην οφθαλμολογική κλινική κατά της διάγνωση της RVO:

- Ιατρικό ιστορικό

- Μέτρηση αρτηριακής πίεσης
- Εκτίμηση της γλυκόζης ορού
- Εργαστηριακός έλεγχος για γενική εξέταση αίματος (full blood count, FBC) και ταχύτητα καθίζησης ερυθρών αιμοσφαιρίων (erythrocyte sedimentation rate, ESR)

Ο έλεγχος της αρτηριακής πίεσης, της γλυκόζης ορού, των FBC και ESR, πιθανώς να ανιχνεύσει την ύπαρξη αιτιολογικών παραγόντων κινδύνου που απαιτούν επείγουσα δράση, όπως κακοήγη υπέρταση, μη ελεγχόμενο διαβήτη ή σπάνια αιματολογικές παθήσεις όπως λευχαιμία.

Το ιστορικό, η οφθαλμική εξέταση και τα αρχικά αποτελέσματα των εξετάσεων μπορεί να κατευθύνουν περαιτέρω ερευνητικό έλεγχο. Για παράδειγμα, ένας αυξημένος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων θα μπορούσε να υποδηλώνει λευχαιμία ή μία λεμφοϋπερπλαστική διαταραχή, ενώ μία αυξημένη τιμή ESR μπορεί να αντιπροσωπεύει μια φλεγμονώδη κατάσταση ή μια διαταραχή του αίματος όπως μία παραπρωτεΐνη. Η Βρετανική Αιματολογική Εταιρεία δεν συνιστά εξέταση ρουτίνας θρομβοφιλίας για RVO [65].

Αμφοτερόπλευρα βυθοσκοπικά ευρήματα όπως αμφιβληστροειδικές αιμορραγίες θα πρέπει να αυξήσουν την υποψία μιας υποκείμενης συστηματικής πάθησης.

## **ΟΙΔΗΜΑ ΩΧΡΑΣ ΚΗΛΙΔΑΣ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

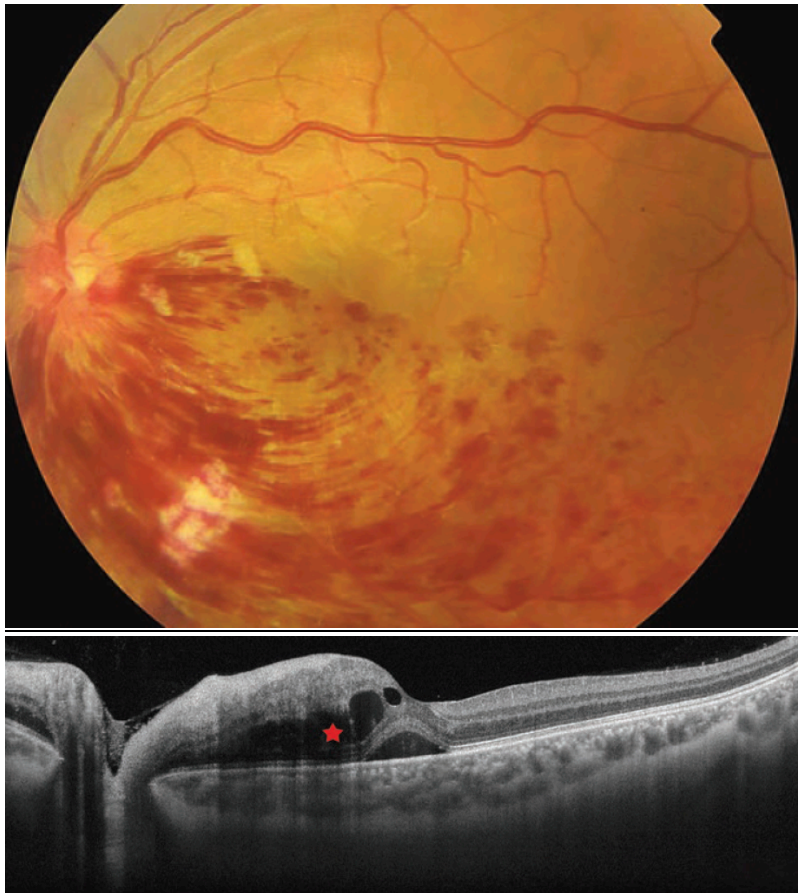
Το κυστεοειδές οίδημα της ωχράς κηλίδας (cystoid macular oedema, CMO) προκαλεί πτώση της οπτικής οξύτητας του ασθενή λόγω συσσώρευσης υγρού εντός των στιβάδων του αμφιβληστροειδούς. Η απεικονιστική εξέταση εκλογής για το CMO είναι η OCT, όπου το CMO απεικονίζεται ως χαμηλής ανακλαστικότητας ενδοαμφιβληστροειδικούς κυστικούς χώρους, που κυρίως βρίσκονται στην έξω δικτυωτή στιβάδα του αμφιβληστροειδούς (Εικόνα 15). Λόγω της απόφραξης της φλέβας, μια σχετική αύξηση της υδροστατικής πίεσης εντός των αγγείων έναντι του αμφιβληστροειδικού ιστού και μια σχετική αύξηση της κολλοειδοσμοτικής πίεσης στον αμφιβληστροειδικό ιστό έναντι των αγγείων, είναι οι δύο δυνάμεις (δυνάμεις του Starling) που προκαλούν εξαγγείωση υγρού. Ο VEGF και οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες παίζουν επίσης καθοριστικό ρόλο μέσω της αυξημένης διαπερατότητας των αγγείων λόγω της διάσπασης του έσω αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού

[66,67]. Μερικές φορές παρατηρείται υγρό και στον υπαμφιβληστροειδικό χώρο (subretinal fluid, SRF), του οποίου η παθοφυσιολογία δεν είναι πλήρως κατανοητή. Προηγούμενες μελέτες έχουν προτείνει ότι το SRF στην RVO μπορεί προέρχεται από την κίνηση ενδοαμφιβληστροειδικού προς τον υπαμφιβληστροειδικό χώρο [68–71]. Κάποιες φορές το οίδημα υποχωρεί αυτόματα, ωστόσο, όταν παράλληλα με τη διάγνωση υπάρχει πτώση της οπτικής οξύτητας, προτείνεται συνήθως έναρξη θεραπείας [31].

#### Θεραπεία:

- 1) Ενδοϋαλοειδικοί anti-VEGF παράγοντες: Οι ενδοϋαλοειδικές ενέσεις με anti-VEGF παράγοντες αναστέλλουν τον VEGF παράγοντα, στοχεύοντας έτσι τον υποκείμενο παθογενετικό μηχανισμό. Αυτή τη στιγμή δύο είναι οι εγκεκριμένοι παράγοντες: το ranibizumab (ρανιμπιζουμάμπη) και το aflibercept (αφλιβερσέπτη), βάσει των μελετών BRAVO, VIBRANT για τη BRVO και CRUISE, COPERNICUS, GALILEO για τη CRVO [72–76]. Το ranibizumab είναι ένα τμήμα ανασυνδυασμένου ανθρωποποιημένου μονοκλωνικού αντισώματος IgG1 (του λείπει η περιοχή Fc) που δρα κατά του ανθρώπινου αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα A (VEGF-A) [77]. Το aflibercept είναι μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σύντηξης αποτελούμενη από συνδυαστικές μοίρες του VEGF προερχόμενες από τα εξωκυττάρια τμήματα των ανθρώπινων υποδοχέων VEGF 1 και 2 ενωμένα με την Fc μοίρα της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης (IgG1) [78]. Η μελέτη LEAVO, σε ασθενείς με CRVO, έδειξε ότι το ranibizumab δεν ήταν κατώτερο του aflibercept, αλλά μικρότερος αριθμός ενέσεων χρειάστηκε στην ομάδα του aflibercept [79].
- 2) Δίκην δικτύου (grid) laser: Αποτελούσε την κύρια θεραπεία του οιδήματος της ωχράς κηλίδας λόγω BRVO πριν την έλευση των anti-VEGF παραγόντων [80]. Η μελέτη VIBRANT έδειξε την ανωτερότητα του aflibercept [72].
- 3) Ενδοϋαλοειδικά κορτικοστεροειδή: Η διάρκεια δράσης τους είναι μεγαλύτερη από τις anti-VEGF ενέσεις, ωστόσο σχετίζονται με αυξημένα ποσοστά δευτερογενούς καταρράκτη και αυξημένης ενδοφθάλμιας πίεσης [81–83]. Το ένθεμα δεξαμεθαζόνης (Ozurdex) έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης σε ποσοστό 20-25 %. Η κορύφωση της αύξησης της ενδοφθάλμιας πίεσης συμβαίνει κοντά στις 8 εβδομάδες μετά την ένθεση του Ozurdex. Ένας αρχικός έλεγχος της ενδοφθάλμιας πίεσης χρειάζεται 4

εβδομάδες μετά την ένθεση. Το θεραπευτικό αποτέλεσμα έχει διάρκεια κατά μέσο όρο 4-5 μήνες [84–86].



**Εικόνα 15.** Ασθενής με ημιαμφιβληστροειδική απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς. Πάνω μέρος: Φωτογραφία βυθού με φλογοειδείς αιμορραγίες και βαμβακόμορφες αλλοιώσεις. Κάτω μέρος: Οπτική τομογραφία συνοχής με κυστικό οίδημα ωχράς κηλίδας (κόκκινος αστερίσκος) και υπαμφιβληστροειδικό υγρό. Πηγή: Chen Y, Peng X. *Atlas of Swept Source OCT and OCT Angiography*. Springer Nature; 2023.

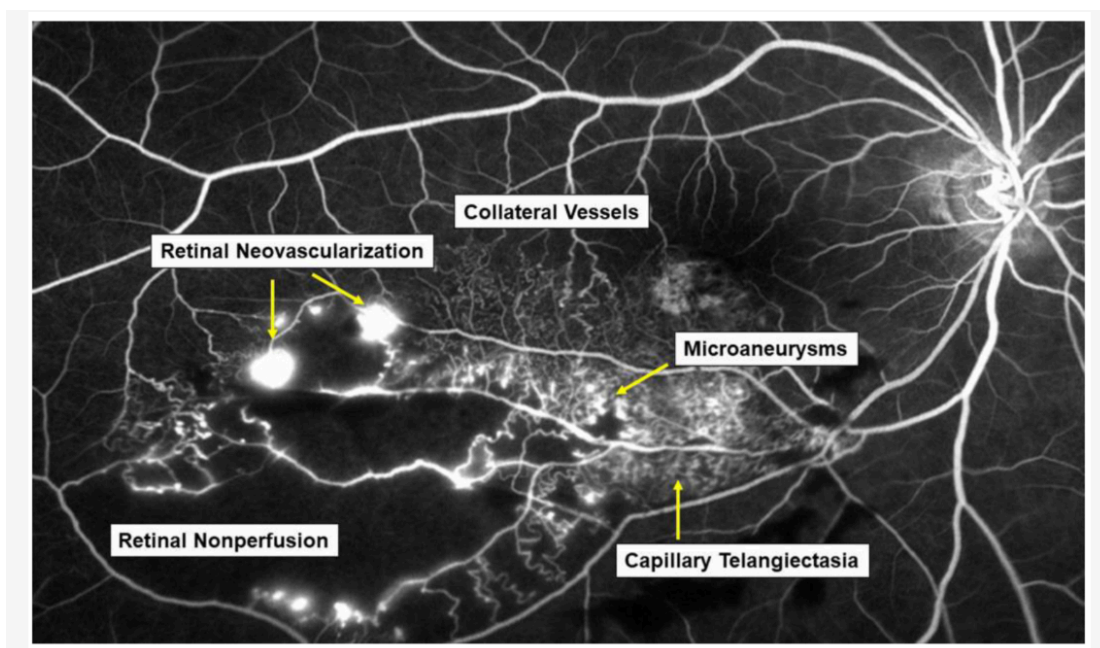
## ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ANTI-VEGF

Οι εγχύσεις ενδοϋαλοειδικών anti-VEGF παραγόντων είναι η «gold standard» θεραπεία του CMO στην RVO, λόγω της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας που παρέχουν [87]. Ωστόσο, ένα υπολογίσιμο ποσοστό των ασθενών εμφανίζει «μερική» ή «καμία ανταπόκριση» στους ενδοϋαλοειδικούς παράγοντες anti-VEGF, έχοντας επίσης πολλαπλές υποτροπές του οιδήματος. Στη μελέτη SCORE 2, το 8,6% και το 22,5% των

ασθενών με CRVO που έλαβαν αρχικά ενδοϋαλοειδικές ενέσεις aflibercept ή bevacizumab, αντίστοιχα, παρουσίασαν «κακή ανταπόκριση» τον 6ο μήνα μετά την έναρξη της θεραπείας [88]. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε διάφορες κλινικές μελέτες, το ποσοστό των ασθενών με «φτωχή» απόκριση στη θεραπεία ήταν χαμηλότερο το 12ο μήνα μετά την έναρξη της anti-VEGF θεραπείας [89,90]. Επιπλέον έχει φανεί ότι οι οφθαλμοί με RVO, που επιδεικνύουν «καλή» απόκριση στη θεραπεία εντός του πρώτου τριμήνου από την έναρξη των anti-VEGF εγχύσεων, συνεχίζουν να έχουν ευνοϊκά θεραπευτικά αποτελέσματα για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους, σε σύγκριση με τους οφθαλμούς που ανταποκρίνονται «φτωχά» κατά την αρχική περίοδο των 3 μηνών [91].

## ΝΕΟΑΓΓΕΙΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

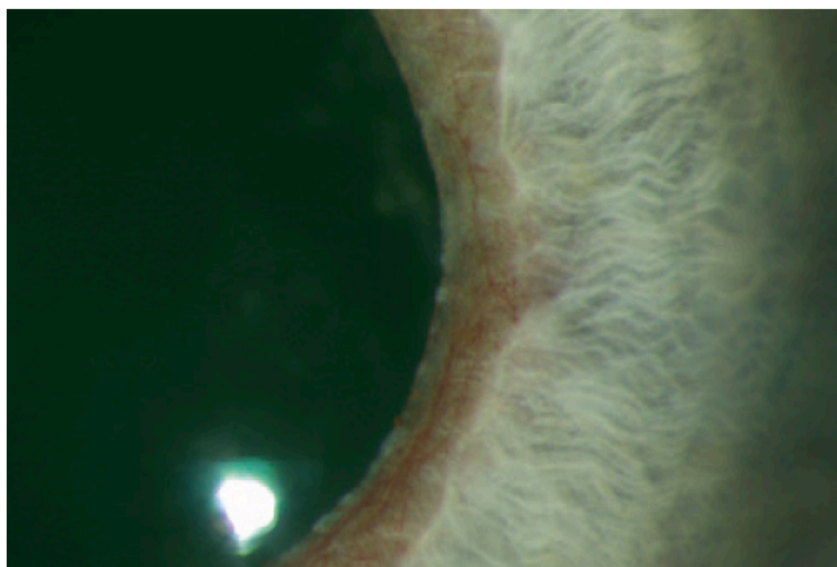
Σε ασθενείς με BRVO, η νεοαγγείωση συμβαίνει κυρίως σε υγιές κομμάτι του αμφιβληστροειδή στα «σύνορα» με μία προσβεβλημένη-ισχαιμική περιοχή (Εικόνα 16), λιγότερο συχνά στον οπτικό δίσκο και σε σπάνιες περιπτώσεις στο πρόσθιο ημιμόριο του οφθαλμού. Η νεοαγγείωση του αμφιβληστροειδούς, αν αφηθεί χωρίς θεραπεία, μπορεί να οδηγήσει σε ενδοϋαλοειδική αιμορραγία ή/και ελκτική αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς.





**Εικόνα 16.** Φλουοροαγγειογραφία σε ισχαιμική BRVO με αμφιβληστροειδική νεοαγγείωση. Retinal neovascularization = αμφιβληστροειδική νεοαγγείωση, collateral vessels = παράπλευρα αγγεία, retinal nonperfusion = περιοχή τριχοειδικής μη διήθησης, microaneurysms = μικροανευρύσματα, capillary telangiectasia = τριχοειδική τηλεαγγειεκτασία. Πηγή: Hirano Y, Suzuki N, Tomiyasu T, et al. Multimodal Imaging of Microvascular Abnormalities in Retinal Vein Occlusion. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(3):405. [92]

Αντίθετα, σε ασθενείς με CRVO η νεοαγγείωση εμφανίζεται κατά κύριο λόγο στο πρόσθιο ημιμόριο του οφθαλμού, στην ίριδα ή/και στη γωνία. Στις περισσότερες εκ των περιπτώσεων η νεοαγγείωση εμφανίζεται πρώτα κοντά στο κορικό χείλος της ίριδας (Εικόνα 17). Περίπου το 23% των οφθαλμών με ισχαιμική CRVO αναπτύσσουν νεοαγγείωση της ίριδας σε διάστημα 15 μηνών. Στη μελέτη CVOS, το 44% των οφθαλμών που παρουσίασαν όραση χειρότερη από 20/200 λόγω ισχαιμικής CRVO, ανέπτυξαν στη συνέχεια νεοαγγείωση της ίριδας [39]. Το 50% των περιπτώσεων νεοαγγείωσης ίριδας συμβαίνει μεταξύ των μηνών 2 και 4 («γλαύκωμα των 100 ημερών»).



**Εικόνα 17.** Νεοαγγείωση της ίριδας κοντά στο κορικό χείλος. Πηγή: Sheyman A, Fawzi AA. Retinal Vascular Disease; Springer Nature Singapore; (Retina Atlas) [93]

Για τους παραπάνω λόγους, προτείνεται η παρακολούθηση των ασθενών με ισχαιμική CRVO κάθε μήνα για τους πρώτους 6 μήνες και μετέπειτα κάθε 3 μήνες για ένα χρόνο. Μετά τον πρώτο χρόνο το διάστημα μεταξύ των επισκέψεων του ασθενή μπορεί να επεκταθεί αλλά ο ασθενής θα πρέπει να συνεχίσει να παρακολουθείται για τουλάχιστον 3 χρόνια. Οι ασθενείς με ισχαιμική BRVO θα πρέπει να

παρακολουθούνται κάθε 3 μήνες για έως και 2 χρόνια. Για ασθενείς με μη ισχαιμική CRVO προτείνεται η παρακολούθηση κάθε 3 μήνες για τους πρώτους 6 μήνες, και για τουλάχιστον συνολικά 18 μήνες από τη διάγνωση, λόγω του κινδύνου μετατροπής σε ισχαιμική μορφή [31].

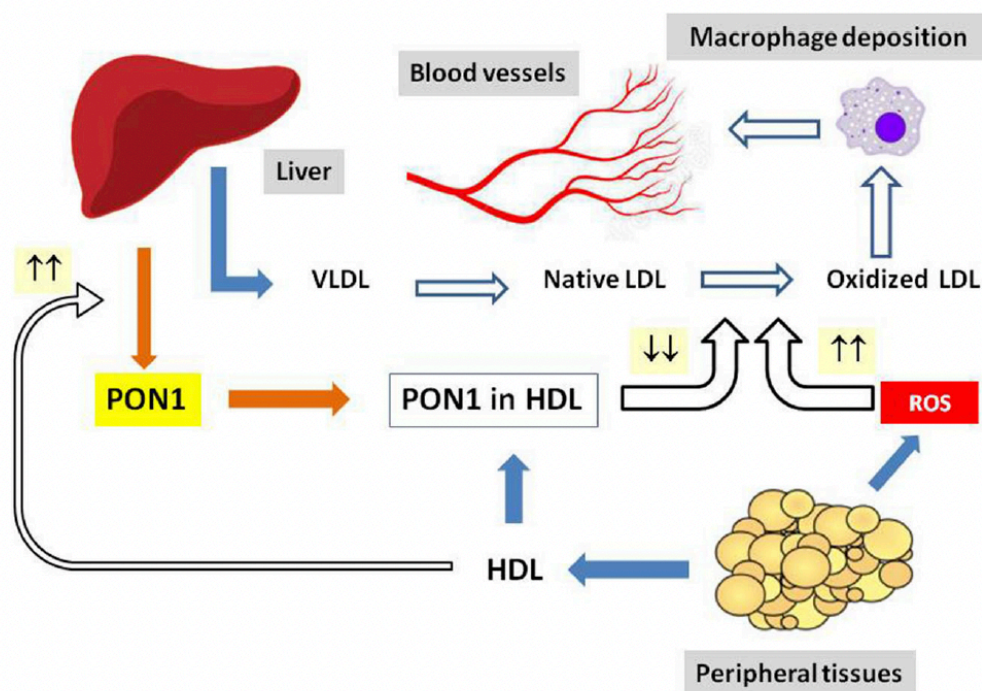
Θεραπεία: Η θεραπευτική αντιμετώπιση της οφθαλμικής νεοαγγείωσης είναι η laser φωτοπηξία. Η φωτεινή ενέργεια απορροφάται από τη μελανίνη του μελαγχρόου επιθηλίου. Ο μηχανισμός δράσης αποδίδεται στην μείωση της κατανάλωσης οξυγόνου λόγω της καταστροφής των φωτοϋποδοχέων από το laser. Το οξυγόνο, που κανονικά διαχέεται από τη χοριοτριχοειδή προς τον αμφιβληστροειδή, μπορεί τώρα να διαχέεται, μέσω των ουλών του laser, χωρίς να καταναλώνεται στα μιτοχόνδρια των φωτοϋποδοχέων. Αυτή η ροή οξυγόνου φτάνει στον έσω αμφιβληστροειδή και ανακουφίζει την υποξία του αμφιβληστροειδούς. Η ανακούφιση από την υποξία μειώνει την παραγωγή αυξητικών παραγόντων όπως ο VEGF και η νεοαγγείωση μειώνεται ή διακόπτεται. Επίσης, με την ανακούφιση της υποξίας, επιτυγχάνεται αγγειοσύσπαση η οποία μειώνει την υδροστατική πίεση στα τριχοειδή αγγεία και τα φλεβίδια και μειώνει το σχηματισμό οιδήματος σύμφωνα με το νόμο του Starling [94].

Σε ισχαιμική BRVO με νεοαγγείωση, γίνεται τμηματικό (sectoral) laser στην περιοχή της ισχαιμίας καθοδηγούμενο από τη ΦΑ. Σε ισχαιμική CRVO με νεοαγγείωση, πρέπει να γίνεται εκτεταμένο παναμφιβληστροειδικό laser (panretinal photocoagulation laser, PRP). Θα πρέπει επίσης να γίνεται θεραπεία με anti-VEGF ενέσεις με το πιο πρώιμο σημάδι νεοαγγείωσης της ίριδας ή της γωνίας σε συνδυασμό με παναμφιβληστροειδική φωτοπηξία είτε την ίδια ημέρα (πριν από την anti-VEGF ένεση) είτε εντός 1-2 εβδομάδων [31,95,96].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑ

### ΠΑΡΑΟΞΟΝΑΣΗ 1

Η παραοξονάση 1 του ανθρώπινου ορού (paraoxonase 1, PON1) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη εξαρτώμενη από το ασβέστιο, 43 kDa και 354 αμινοξέων, η οποία συντίθεται κυρίως στο ήπαρ και εκκρίνεται στο αίμα, όπου βρίσκεται ισχυρά συνδεδεμένη με λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (high-density lipoprotein, HDL). Η PON1 συμμετέχει ενζυματικά στο μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης. Η PON1 προάγει επίσης τις αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL, μειώνοντας την υπεροξείδωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (low-density lipoprotein, LDL), τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) και την προαθηρογόνο οξειδωμένη -LDL (ox-LDL), η οποία είναι ένας ισχυρός επαγωγέας αφρωδών κυττάρων [97–99]. Στην Εικόνα 18 απεικονίζεται σχηματικά ο ρόλος της PON1.



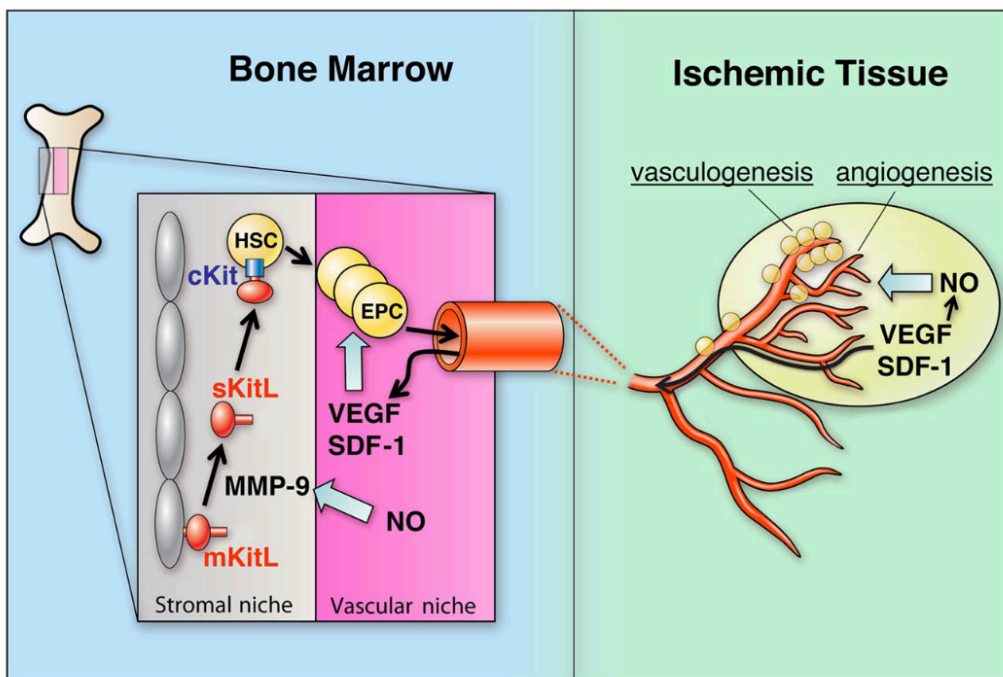
**Εικόνα 18.** Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του ενζύμου παραοξονάση-1 (PON1) ως προς την προαγωγή της δράσης της HDL και τη μείωση του οξειδωτικού στρες. Πηγή: Moya C, Májnez S. Paraoxonases: metabolic role and pharmacological projection. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2018;391(4):349-359. [100]

## **ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ Ε**

Η απολιποπρωτεΐνη Ε (ΑΡΟΕ) έχει γνωστές αντι-αθηρογόνες και αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Συγκεκριμένα, συνδέεται με τον υποδοχέα λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL), συμβάλλοντας έτσι στην κάθαρση των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών από την κυκλοφορία και στη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στο πλάσμα [101–103]. Επίσης, η ΑΡΟΕ καταστέλλει την ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος και την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών από αφρώδη κύτταρα [104].

## **ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ 1 ΠΟΥ ΠΡΟΕΡΧΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

Ο παράγοντας 1 που προέρχεται από στρωματικά κύτταρα (stromal cell-derived factor 1, SDF-1) είναι μια ομοιοστατική χυμοκίνη, μέρος της υποοικογένειας του μοτίβου C-X-C (επίσης γνωστή ως CXCL12). Η υποξία και η ενδοθηλιακή βλάβη επάγουν τη γονιδιακή έκφραση SDF-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγώντας σε φλεγμονή, απελευθέρωση VEGF (μέσω ενός βρόγχου θετικής ανάδρασης) και επακόλουθη διάσπαση του αίματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού. Μία άλλη βασική λειτουργία του SDF-1 είναι ο ρυθμιστικός ρόλος του στην κινητοποίηση ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων που προέρχονται από αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα κατά τη διαδικασία αποκατάστασης του αγγειακού ενδοθηλίου και του σχηματισμού νέων αγγείων (νεοαγγείωση) (Εικόνα 19) [105–107].



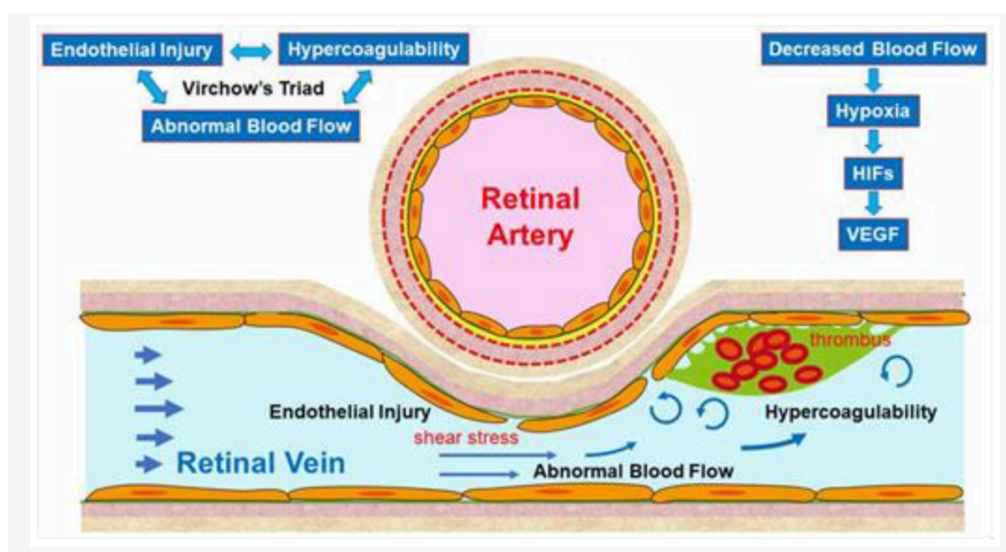
**Εικόνα 19.** Τα σήματα που προκύπτουν από υποξικούς/ισχαιμικούς περιφερικούς ιστούς, οδηγούν αύξηση στις συγκεντρώσεις του VEGF και του SDF-1 στο αίμα, και διεγείρουν την κινητοποίηση ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων (haematopoietic stem cells, HSC) που προέρχονται από αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (endothelial progenitor cells, EPC). Πηγή: Balligand JL, Feron O, Dessy C. eNOS activation by physical forces: From short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev* 2009 Apr;89(2):481–534. [108]

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η απόφραξη της φλέβας του αμφιβληστροειδούς είναι η δεύτερη σε συχνότητα αγγειακή πάθηση του αμφιβληστροειδούς μετά τη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, με επιπολασμό που υπολογίζεται σε 5.2 ανά 1000 άτομα και ο οποίος εκτιμάται ότι θα αυξηθεί έως το 2050 κατά 20% [16–18].

Η αιτιοπαθογένεια της απόφραξης της φλέβας του αμφιβληστροειδούς είναι πολυπαραγοντική, ωστόσο, οι ακριβείς παθογενετικοί μηχανισμοί παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Σύμφωνα με την επικρατούσα θεωρία, η συμπίεση και η μηχανική στένωση της αμφιβληστροειδικής φλέβας από μία αθηρωματική αρτηρία μαζί τη φλεγμονή που προκαλείται από τη φλεβική στάση είναι τα κύρια παθογενετικά γεγονότα (Εικόνα 20). Η τριάδα του Virchow που αποτελείται από φλεβική στάση, τραυματισμό του αγγειακού ενδοθηλίου και κατάσταση υπερπηκτικότητας, παίζει σημαντικό ρόλο για το σχηματισμό του αρχικού θρόμβου [26,92,109].



**Εικόνα 20.** Αιτιοπαθογένεια της απόφραξης φλέβας του αμφιβληστροειδούς. Πηγή: Hirano Y, Suzuki N, Tomiyasu T, Kurobe R, Yasuda Y, Esaki Y, et al. Multimodal Imaging of Microvascular Abnormalities in Retinal Vein Occlusion. J Clin Med. 2021 Jan 21;10(3):405 [92]

Έχουν αναγνωριστεί διάφοροι συστηματικοί παράγοντες κινδύνου, που οδηγούν σε απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς, είτε κεντρική, είτε κλαδική. Τέτοιοι παράγοντες είναι η αρτηριακή υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, η δυσλιπιδαιμία, καρδιαγγειακές παθήσεις, θρομβοφιλικές διαταραχές και οφθαλμικές καταστάσεις, όπως το γλαύκωμα [25,26,56,59,110]. Επιπλέον, τελευταία κάποιες μελέτες έχουν αναδείξει τη συσχέτιση της πάθησης με γονιδιακούς πολυμορφισμούς, που αυξάνουν τον κίνδυνο ενός θρομβωτικού επεισοδίου, με αντικρουόμενα ωστόσο αποτελέσματα [64,111–120]. Κάποιοι άλλοι ερευνητές στόχευσαν να αξιολογήσουν τη συσχέτιση της RVO με γενετικούς πολυμορφισμούς που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση και τη φλεγμονή [121–129].

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι να διερευνήσει την πιθανή συσχέτιση πέντε μονονουκλεοτιδικών γενετικών πολυμορφισμών (single nucleotide polymorphisms – SNPs) από τρία διαφορετικά γονίδια που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή [*απολιποπρωτεΐνη E (APOE)*, *παραοξονάση 1 (PON1)* και *παράγοντας 1 που προέρχεται από στρωματικά κύτταρα (SDF-1)*] με την απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς σε ελληνικό πληθυσμό. Επιπρόσθετα, να αξιολογηθεί η συσχέτιση του γονότυπου με την ανατομική και λειτουργική ανταπόκριση στην ενδοϋαλοειδική θεραπεία με anti-VEGF παράγοντες, η οποία δεν είχε μελετηθεί έως τώρα.

Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί: *APOE* rs429358 και rs7412 (που ο συνδυασμός τους δίνει τους 3 απλότυπους- αλληλόμορφα E2, E3, E4), *PON1* rs854560 (ή αλλιώς L55M) και rs662 (ή αλλιώς Q192R), και ο πολυμορφισμός *SDF-1* rs1801157 [ή αλλιώς *SDF1-3'G(801)A*].



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή αποτελείται από δύο μέρη: 1) προοπτική μελέτη της ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία, και 2) μελέτη ασθενών-μαρτύρων.

Οι ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν σε αυτή τη διδακτορική διατριβή ήταν 50 διαδοχικοί ασθενείς με πρωτοδιαγνωζόμενη RVO και δευτερογενές οίδημα ωχράς κηλίδας στην περιοχή του κεντρικού βοθρίου. Οι ασθενείς, οι οποίοι δεν είχαν λάβει έως τότε κάποια θεραπεία, παρουσιάστηκαν και θεραπεύτηκαν με ενδοϋαλοειδικές ενέσεις anti-VEGF στο Αττικό Νοσοκομείο, στη Β' Πανεπιστημιακή Οφθαλμολογική κλινική του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η διάγνωση της RVO έγινε κλινικά με βάση την παρουσία αιμορραγιών του αμφιβληστροειδούς, διάταση των φλεβών του αμφιβληστροειδούς, ελίκωση των αγγείων του αμφιβληστροειδούς, φλογοειδείς, στικτές και κηλιδώδεις αιμορραγίες του αμφιβληστροειδούς, με ή χωρίς συμφόρηση του οπτικού δίσκου, με ή χωρίς βαμβακόμορφες αλλοιώσεις. Η διάγνωση επιβεβαιώθηκε με φλουοροαγγειογραφία βυθού (fundus fluorescein angiography, FFA) και spectral domain οπτική τομογραφία συνοχής (SD-OCT). Ασθενείς με άλλες αμφιβληστροειδικές παθήσεις εκτός RVO, γλαύκωμα με ενδοφθάλμια πίεση (intraocular pressure, IOP) μεγαλύτερη από 30 mmHg, οφθαλμική φλεγμονή, πάθηση του κερατοειδούς, τραύμα, ιστορικό οφθαλμολογικού χειρουργείου τους προηγούμενους 6 μήνες, καθώς και εκείνοι με ανεπαρκή/μη αξιολογήσιμη (π.χ. λόγω θολεροτήτων των διαθλαστικών μέσων) απεικόνιση, αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Στη διδακτορική διατριβή συμπεριλήφθηκαν επίσης 50 υγιείς μάρτυρες (age- και sex- matched) ως ομάδα ελέγχου. Τα άτομα της ομάδας ελέγχου επισκέφθηκαν τα Εξωτερικά Ιατρεία της Β' Πανεπιστημιακής Οφθαλμολογικής Κλινικής για οφθαλμολογικό έλεγχο ρουτίνας. Όλοι οι συμμετέχοντες ήταν ελληνικής καταγωγής και δεν είχαν κάποια συγγένεια μεταξύ τους. Τα δημογραφικά στοιχεία των συμμετεχόντων (ηλικία και φύλο) και το ιατρικό τους ιστορικό καταγράφηκαν.

Τα άτομα θεωρήθηκε ότι έχουν αρτηριακή υπέρταση όταν υπήρχε ιστορικό αντιυπερτασικής φαρμακευτικής αγωγής ή επαναλαμβανόμενες, σε 2 ή περισσότερες περιπτώσεις, μετρήσεις της αρτηριακής τους πίεσης σε κατάσταση ηρεμίας  $\geq 140/90$  mmHg. Ο σακχαρώδης διαβήτης και η δυσλιπιδαιμία θεωρήθηκε ότι υπάρχουν σε άτομα που βρίσκονταν υπό θεραπεία με αντιδιαβητικά φάρμακα και φάρμακα που

μειώνουν τη χοληστερόλη (όπως στατίνες), αντίστοιχα.

Το ερευνητικό πρωτόκολλο της μελέτης ήταν σύμφωνο με τις αρχές της Συμφωνίας του Ελσίνκι και έλαβε έγκριση από το επιστημονικό συμβούλιο (Αριθμός Πρωτοκόλλου 290/2020). Έγινε λήψη έντυπης συγκατάθεσης από όλους τους συμμετέχοντες, μετά από ενημέρωσή τους, πριν να συμπεριληφθούν στη μελέτη.

Κατά την πρώτη επίσκεψη και διάγνωση τους όλοι οι συμμετέχοντες υπεβλήθησαν σε πλήρη οφθαλμολογική εξέταση συμπεριλαμβανομένης της μέτρησης της καλύτερα διορθωμένης οπτικής οξύτητας (best corrected visual acuity, BCVA) σε πίνακες κατά Snellen (έγινε μετατροπή σε κλίμακα logMAR για τη στατιστική ανάλυση), εξέταση στη σχισμοειδή λυχνία, μέτρηση της ενδοφθάλμιας πίεσης χρησιμοποιώντας Goldmann τονόμετρο επιπέδωσης, βυθοσκόπηση μετά από μυδρίαση, SD-OCT και FFA με τη χρήση του μηχανήματος Spectralis (Spectralis HRA+OCT, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany). Το τυπικό πρωτόκολλο λήψης SD-OCT αποτελούνταν από έξι ακτινικές σαρώσεις 3 mm με ίσους γωνιακούς προσανατολισμούς στο κέντρο του βοθρίου και έναν κύβο 20x20°, με κέντρο πάνω στο βοθρίο και 49 οριζόντιες γραμμές raster, σε ίσες αποστάσεις 120 μm μεταξύ τους. Το μέσο πάχος του αμφιβληστροειδούς ενός κύκλου διαμέτρου 1 mm με κέντρο πάνω από το βοθρίο, σύμφωνα με τα υποπεδία πλέγματος της Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS grid subfields), το οποίο ονομάζεται πάχος κεντρικού υποπεδίου (central subfield thickness, CST), καταγράφηκε μετά από κάθε λήψη SD-OCT. Επιπλέον, η ισχαιμία της ωχράς κηλίδας αξιολογήθηκε με τη διενέργεια FFA, παρατηρώντας αν υπάρχει διαταραχή ή/και αύξηση του μεγέθους της ανάγγειας ζώνης του βοθρίου (FAZ).

Όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ενδοϋαλοειδικές ενέσεις anti-VEGF, είτε 0.5mg/0.05 ml ranibizumab είτε 2.0mg/0.05 ml aflibercept, ακολουθώντας ένα πρωτόκολλο τουλάχιστον 3 μηνιαίων ενέσεων και στη συνέχεια pro re nata (PRN) μέχρι τον μήνα 12 από την έναρξη της θεραπείας. Η μέση διάρκεια του χρόνου από τη διάγνωση της RVO έως την έναρξη της θεραπείας για το οίδημα ωχράς κηλίδας ήταν μία εβδομάδα. Κριτήρια για τη συνέχιση της θεραπείας με ενέσεις ήταν: η μείωση της BCVA κατά τουλάχιστον 1 γραμμή Snellen (που ισοδυναμεί με διαφορά 0,1 logMAR) ή/και μείωση του  $CST \leq 10\%$  σε σύγκριση με την προηγούμενη επίσκεψη ή  $CST \geq 320$  μm. Όλοι οι συμμετέχοντες παρακολουθούνταν κάθε μήνα για 12 μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας. Σε κάθε επίσκεψη παρακολούθησης, οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε μέτρηση BCVA και SD-OCT, ενώ FFA πραγματοποιούνταν κατά την κρίση του

ιατρού. Τον 12ο μήνα, αξιολογήθηκε η ανατομική και λειτουργική ανταπόκριση στην θεραπεία με ενδοϋαλοειδικούς παράγοντες anti-VEGF. Η διαφορά στη BCVA ( $\Delta$ BCVA) μεταξύ της αρχικής BCVA κατά τη διάγνωση (BCVA0) και της BCVA το μήνα 12 (BCVA12), καθώς και η διαφορά στο CST ( $\Delta$ CST) μεταξύ του CST κατά τη διάγνωση (CST0) και του CST το μήνα 12 (CST12) υπολογίστηκε για κάθε ασθενή.

Πέντε μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (single nucleotide polymorphisms, SNPs) τριών διαφορετικών γονιδίων, συγκεκριμένα *APOE* rs429358 και rs7412, *PON1* rs854560 και rs662, και *SDF-1* rs1801157, επιλέχθηκαν για να συμπεριληφθούν στη μελέτη, μετά από μια σχολαστική ανασκόπηση βιβλιογραφίας πάνω στη γενετική της απόφραξη της φλέβας του αμφιβληστροειδούς, λόγω της στενής τους σύνδεσης με τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες. Ελήφθησαν δείγματα αίματος και από τους 100 συμμετέχοντες στη μελέτη μέσω περιφερικής φλεβικής παρακέντησης, τα οποία συλλέχθηκαν σε σωλήνες αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA tubes). Το πρωτόκολλο της γονοτυπικής ανάλυσης περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

## **Απομόνωση γενωμικού DNA**

Η απομόνωση γενωμικού DNA με τη χρήση προκατασκευασμένων αντιδραστηρίων (kit) απομόνωσης που βασίζονται σε στήλες συνιστά μια απλή και ταχεία διαδικασία που εμπίπτει στις μεθόδους απομόνωσης DNA στερεής φάσης. Η μέθοδος επιτρέπει την ταυτόχρονη επεξεργασία ικανοποιητικού αριθμού δειγμάτων buffy / whole blood από ποικιλία ιστών, με ταχύτητα και αξιοπιστία ανώτερη μεθόδων υγρής φάσης. Η δυνατότητα χρήσης πιάτων 96 πηγαδιών, αλλά και αυτοματοποιημένων πλατφορμών επιτρέπει την εφαρμογή της μεθόδου σε μεγάλους αριθμούς κλινικών δειγμάτων.

Η απομόνωση DNA με τη χρήση στηλών φυγοκέντρωσης βασίζεται στην ειδική σύνθεση της μεμβράνης της στήλης, που εμπεριέχει οξείδιο του πυριτίου (silica gel). Το οξείδιο του πυριτίου μπορεί να προσδέσει το DNA κατά αντιστρεπτό τρόπο ανάλογα με την ιονική σύνθεση του περιβάλλοντος. Μετά την κυτταρική λύση και αποδόμηση των πρωτεϊνών, το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη αλκοόλης. Κατόπιν το διάλυμα διηθείται δια μέσου της μεμβράνης της στήλης με την εφαρμογή φυγοκέντρωσης και το DNA κατακρατείται από το οξείδιο του πυριτίου, ενώ οι πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις διαπερνούν τη στήλη. Το προσδεδεμένο DNA εκπλένεται και τέλος εκλούεται με υγρό ελεύθερο νουκλεάσης ή με χαμηλής ιονικής ισχύος διάλυμα. Με τον τρόπο αυτό, προκύπτει με ικανοποιητική απόδοση DNA προς χρήση στην PCR ή σε άλλες ενζυματικές αντιδράσεις.

## **Απομόνωση DNA με Macherey-Nagel kit**

Εξοπλισμός και αντιδραστήρια για Macherey-Nagel kit

- Στήλες Nucleo Spin blood (Macherey-Nagel, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα B3
- Ρυθμιστικό διάλυμα BW (Wash buffer)
- Ρυθμιστικό διάλυμα B5 (Wash buffer) (αραίωση με προσθήκη απόλυτης αιθανόλης)
- Ρυθμιστικό διάλυμα BE (Elution buffer)
- Πρωτεϊνάση K (Macherey-Nagel, Γερμανία) (διάλυση με ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεϊνάσης PB)
- Αιθανόλη απόλυτη (96-100%)

- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate-Buffered Saline) (στις περιπτώσεις <200 μl δείγματος)
- Σωληνάρια φυγοκέντρησης 1,5 ml
- Ακρορύγχη με φίλτρο
- Πιπέτες (Thermo Fisher, USA)
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus, ThermoFisher, USA)
- Συσκευή Vortex (Fisher, USA)

#### Πειραματική διαδικασία

1. Στον πυθμένα ενός σωληναρίου erpendorf 1,5 ml τοποθετούμε 25 μl πρωτεΐνάση K.
2. Προσθέτουμε 200 μl buffy / whole blood.
3. Προσθέτουμε 200 μl ρυθμιστικό διάλυμα B3 και αναδεύουμε έντονα για 10 sec.
4. Επιάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και στους 70° για 15 min.
5. Προσθέτουμε 210 μl αιθανόλη 96-100% (αφού το περιεχόμενο του σωληναρίου κρυώσει) και αναδεύουμε έντονα για 15 sec.
6. Μεταφέρουμε προσεκτικά το προηγούμενο μείγμα σε μια NucleoSpin στήλη, η οποία είναι τοποθετημένη πάνω σε ένα σωληνάριο των 2 ml, χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης. Κλείνουμε το καπάκι της στήλης και φυγοκεντρούμε για 1 min στα 11000xg. Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωληνάριο των 2 ml (παρέχεται από το kit) και πετάμε το σωληνάριο που περιέχει το υγρό.
7. Ανοίγουμε προσεκτικά το καπάκι της στήλης και προσθέτουμε 500 μl ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας BW χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης. Κλείνουμε το καπάκι και φυγοκεντρούμε για 1 min στα 11000xg. Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωληνάριο των 2 ml και πετάμε το σωληνάριο που περιέχει το υγρό.
8. Ανοίγουμε προσεκτικά το καπάκι της στήλης και προσθέτουμε 600 μl αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας B5 χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης. Κλείνουμε το καπάκι και φυγοκεντρούμε για 1 min στα 11000xg. Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωληνάριο των 2 ml και πετάμε το σωληνάριο που περιέχει το υγρό.

9. Χωρίς την προσθήκη περαιτέρω διαλύματος φυγοκεντρούμε σε μέγιστη ταχύτητα για λίγα δευτερόλεπτα. Ο σκοπός αυτού του βήματος είναι η απομάκρυνση της περίσσειας αιθανόλης, που μπορεί να επιτευχθεί και με φυγοκέντρηση για 3 min στο προηγούμενο βήμα (βήμα 8).
10. Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωληνάριο erpendorf των 1,5 ml (δεν παρέχεται από το kit) και πετάμε το σωληνάριο με το λίγο υγρό που περιέχει. Ανοίγουμε προσεκτικά το καπάκι της στήλης και προσθέτουμε 100 μl διαλύματος έκλουσης BE, προθερμασμένο στους 70°. Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και τελική φυγοκέντρηση για 1 min στα 11000xg. Το αποκτηθέν DNA φυλάσσεται στους -20° C.

### Συμβατική PCR Αντίδραση

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

- Δυο συνθετικοί νουκλεοτιδικοί εκκινητές (~20 νουκλεοτίδια ο καθένας), συμπληρωματικοί περιοχών σε αντίθετες πλευρές των δύο αλυσίδων έτσι ώστε να περικλείεται ανάμεσα τους το DNA-στόχος. Οι εκκινητές αυτοί μετά την υβριδοποίηση με το DNA στόχο έχουν τα 3' -OH άκρα αντικριστά μεταξύ τους.
- Μια αλληλουχία-στόχος, δείγματος DNA, που βρίσκεται μεταξύ του ζεύγους των εκκινητών και μπορεί να έχει μήκος 100-35000 bp.
- Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, ώστε να αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για να εντοπίσουν οι εκκινητές τις συμπληρωματικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων του DNA.
- Τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs).

Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Τα μονόκλιωνα μόρια μπορούν να παραχθούν με απλό τρόπο από δίκλιωνα μόρια του DNA, όταν θερμαίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες, οπότε αποχωρίζονται. Η DNA πολυμεράση απαιτεί επίσης την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Επομένως το σημείο έναρξης της σύνθεσης του DNA μπορεί να καθοριστεί με την χρήση ενός

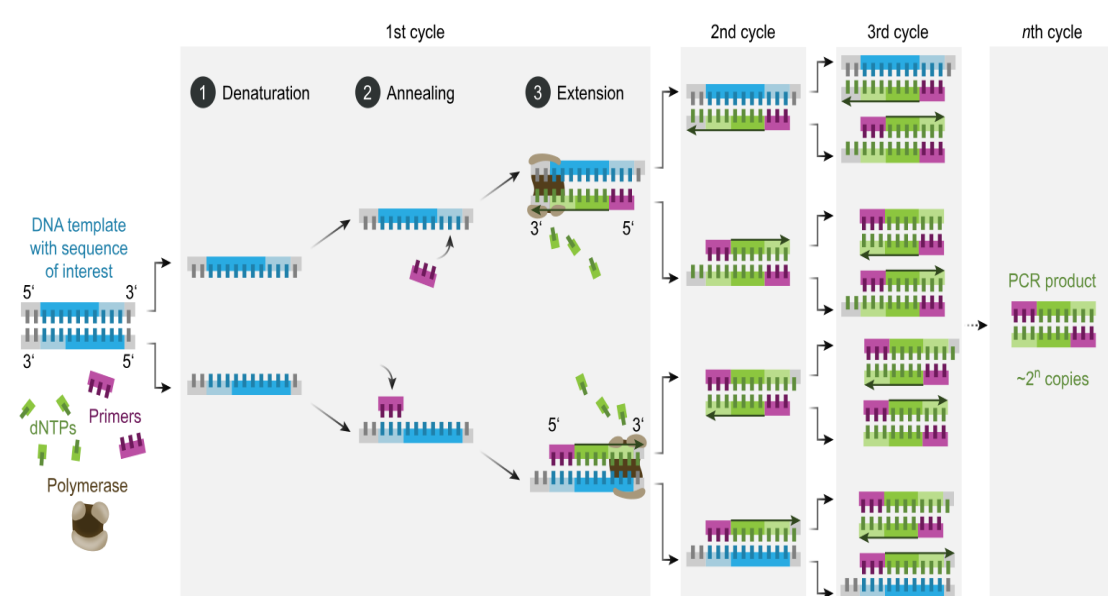
ολιγονουκλεοτιδίου εναρκτήριου μορίου (εκκινητή, primer), που συνδέεται με την μήτρα σε αυτό ακριβώς το σημείο. Έτσι με την κατάλληλη επιλογή εκκινητών μπορούμε να κατευθύνουμε τη DNA πολυμεράση να συνθέσει συγκεκριμένη περιοχή του DNA.

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

1<sup>ο</sup> βήμα: **Αποδιάταξη**. Το πρώτο στάδιο είναι η θερμική αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας στόχου, που επιτυγχάνεται αυξάνοντας τη θερμοκρασία στο σωληνάριο αντίδρασης στους 95 °C. Στο στάδιο αυτό στο σωληνάριο αντίδρασης περιέχονται: τα dNTPs, η θερμοανθεκτική πολυμεράση και το ζεύγος εκκινητών σε περίσσεια. Η θερμοκρασία διατηρείται εκεί για ένα περίπου λεπτό.

2<sup>ο</sup> βήμα: **Υβριδοποίηση**. Στο δεύτερο στάδιο, της υβριδοποίησης, η θερμοκρασία του μίγματος σταδιακά κατεβαίνει περίπου στους 45-65 °C (η θερμοκρασία αυτή ποικίλει ανάλογα με τις ακολουθίες). Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου οι εκκινητές σχηματίζουν ζεύγη βάσεων με τις συμπληρωματικές περιοχές του DNA στόχου.

3<sup>ο</sup> βήμα: **Επέκταση**. Στο τρίτο στάδιο, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72 °C, όπου είναι βέλτιστη θερμοκρασία για την καταλυτική δράση της πολυμεράσης. Ο χρόνος επώασης ποικίλει ανάλογα με το μήκος του τμήματος στόχου. Η σύνθεση του DNA αρχίζει στο 3' – OH άκρο κάθε εκκινητή.



Εικόνα 21. Σχηματική παράσταση της PCR αντίδρασης.

## Οργανολογία

Για την εκτέλεση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής: Eppendorf 5331 Gradient MasterCycler, ο οποίος ανταποκρίνεται στις καθημερινές απαιτήσεις του εργαστηρίου με την ταχύτητα και την ευελιξία που παρέχει. Το όργανο αυτό διαθέτει υποδοχείς είτε για σωληνάρια PCR των 0,2 mL (χωρητικότητα 96 θέσεων) είτε των 0,5 mL (χωρητικότητα 77 θέσεων) είτε για μια πλάκα μικροτιλοδότησης. Ο συγκεκριμένος θερμικός κυκλοποιητής προγραμματίζει μέσω ψηφιακού πληκτρολογίου και έκθεσης εικόνας σε LCD οθόνη. Επίσης μπορεί χάρη στα θερμικά στοιχεία peltier που διαθέτει να υποβάλλει τα δείγματα σε ταχύτερες ανυψώσεις θερμοκρασίας ( $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ ) ή και μειώσεις ( $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ ) και σε κύκλους αλλαγής θερμοκρασίας μεταξύ  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  και  $99\text{ }^{\circ}\text{C}$  με ακρίβεια  $\pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ο μέγιστος αριθμός κύκλων που μπορεί να προγραμματίσει είναι 99 κύκλοι. Ο συγκεκριμένος θερμικός κυκλοποιητής έχει δυνατότητα αποθήκευσης 100 προγραμμάτων καθώς και 1 υποδοχή για κάρτα η οποία έχει τη δυνατότητα αποθήκευσης 10 προγραμμάτων. Ο Eppendorf 5331 Gradient απλοποιεί τη διαδικασία της PCR αυξάνοντας τις δυνατότητες και τη ταχύτητα της διαδικασίας, εκτελώντας test ταυτόχρονα σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Η λειτουργία αυτή επιτρέπει τη βαθμιαία θερμοκρασιακή διαφορά έως  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  κατά μήκος της θερμικής πλάκας (μέση τιμή  $\pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Έτσι πολλές αντιδράσεις σε διαφορετικές θερμοκρασίες μπορούν να ολοκληρωθούν την ίδια χρονική στιγμή.





**Εικόνα 22.** Σχηματική παράσταση του θερμικού κυκλοποιητή Eppendorf 5331 Gradient MasterCycler.

### **Συνθήκες PCR για τους υποκινητές των γονιδίων *PON1*, *SDF-1 (CXCL12)***

Για το γονίδιο *PON1* μελετήθηκαν δύο πολυμορφισμοί, ο L55M στο εξόνιο 3 (rs854560) και ο Q192R στο εξόνιο 6 (rs662), που προκύπτουν από την αντικατάσταση (substitution) της λευκίνης (L) από τη μεθειονίνη (M) στη θέση 55 και του γλουταμινικού οξέος (Q) από την αργινίνη (R) στη θέση 192, αντίστοιχα. Οι εκκινητές του *PON1* για τη PCR ελήφθησαν από τα άρθρα των Cozzi et al. και Zama et al. αντίστοιχα [130,131].

Για το γονίδιο *SDF-1 (CXCL12)* μελετήθηκε ο πολυμορφισμός 3'G(801)A (rs1801157), που αντιπροσωπεύει μία μετάπτωση (transition) G→A στη θέση 801, που εντοπίζεται στην 3' αμετάφραστη περιοχή (UTR). Οι εκκινητές της υπό μελέτη περιοχής ελήφθησαν από το άρθρο Szigeti et al. [132]

Τέλος, για την *APOE* γονοτύπηση των δειγμάτων έγινε λήψη πληροφοριών από το άρθρο των Hixson et al. [133] Ανάγκη για γονοτύπηση προκύπτει λόγω της ύπαρξης ισομορφών που διαφέρουν μεταξύ τους σε δύο αντικαταστάσεις αμινοξέων στα κατάλοιπα 112 και 158 που προκύπτουν από T→C ή C→T σημειακή μετάλλαξη στο εξόνιο 4, οδηγώντας στην παρουσία είτε κυστεΐνης είτε αργινίνης: E2 (Cys112, Cys158), E3 (Cys112, Arg158) και E4 (Arg112, Arg158). Το σύνολο των εκκινητών παρασκευάστηκε από την Eurofin Genomics. Παρασκευάστηκαν για τον κάθε εκκινητή διαλύματα παρακαταθήκης 100 pmole/μL (stock). Εν συνεχεία αποθηκεύτηκαν διαλύματα εργασίας 20 pmole/μL (work) έπειτα από αραιώση με υπερκάρθαρο νερό. Στους παρακάτω

πίνακες καταγράφονται οι ακολουθίες των εκκινητών για τις αντιδράσεις PCR καθώς και οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR για όλα τα γονίδια.

**Πίνακας 1.** Ακολουθίες εκκινητών

Gene/ Αριθμός Εξονίου	Εκκινητής πρόσθιος (5'→3')	Εκκινητής ανάστροφος (5'→3')	PCR Tm (°C)	PCR προϊόν (bp)
<b>PON1 EX3</b>	GCTCTAGTCCATCAATTAAAAACAAA	TGGGTATACAGAAAGCCTAAGTGA	56	394
<b>PON1 EX6</b>	TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG	CACGCTAAACCCAAAATACATCTC	56	98
<b>SDF1 EX10</b>	CAGTCAACCTGGGCAAAGCC	AGCTTTGGTCCTGAGAGTCC	50	302
<b>APOE EX4</b>	ACAGAATTGCCCCGGCCTGGTACAC	TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA	60	244

**Πίνακας 2.** Πειραματικό πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR για τα γονίδια *PON1*, *CXCL12* με χρήση GoTaq G2 HotStart σε τελικό όγκο διαλύματος 25μl.

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	10	-
Πρόσθιος εκκινητής (pmol/μl)	0,5	0,8 pmol/μl
Ανάστροφος εκκινητής (pmol/μl)	0,5	0,8 pmol/μl
Ταq πολυμεράση GoTaq HotStart Green Master Mix Promega (2X)	12,5	1X
DNA	1,5	-
Συνολικός όγκος	25	-

**Πίνακας 3.** Πειραματικό πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR για το *APOE* γονίδιο με χρήση Qiagen HotStarTaq Plus (2X) σε τελικό όγκο διαλύματος 17,5μl.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	-	4	-
Πρόσθιος εκκινητής	20 pmol/μl	0,75	0,8 pmol/μl

Ανάστροφος εκκινήτης	20 pmol/μl	0,75	0,8 pmol/μl
Qiagen HotStarTaq Plus mix (2X)	2X	8,75	1X
DMSO	-	1,75	10%
DNA	-	1,5	-
Συνολικός όγκος	-	17,5	-

**Πίνακας 4.** Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ενίσχυσης με συμβατική PCR του *PONI* γονιδίου

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	94°C	4 min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C	60 sec	40 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινήτων στο DNA	56°C	60 sec	
Επέκταση των εκκινήτων	72°C	60 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	5 min	-

**Πίνακας 5.** Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ενίσχυσης με συμβατική PCR του *CXCL12* γονιδίου

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	94°C	4 min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C	60 sec	34 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινήτων στο DNA	50°C	60 sec	
Επέκταση των εκκινήτων	72°C	60 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	5 min	-

**Πίνακας 6.** Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ενίσχυσης με συμβατική PCR του *APOE* γονιδίου σε τελικό όγκο διαλύματος 25 μl

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	95°C	5min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C (95°C)	1 min	
Υβριδισμός των εκκινήτων στο DNA	60°C	1 min	

Επέκταση των εκκινητών	72°C (70°C)	1 min	35 κύκλοι
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	5 min	-

### Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε γέλη αγαρόζης

Η κυριότερη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την απομόνωση τμημάτων DNA, που συντίθεται κατά την μέθοδο PCR, είναι η ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης (agarose gel electrophoresis). Η τεχνική αυτή είναι απλή, γρήγορη και στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA σε ουδέτερο pH είναι αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων του. Έτσι τα διάφορα μόρια DNA μετακινούνται, κατά την ηλεκτροφόρηση προς το θετικό ηλεκτρόδιο, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου ( $\log_{10}$ ) του αριθμού των βάσεων τους. Κατ' αυτόν τον τρόπο, τα μικρότερα μόρια DNA μετακινούνται μέσα στην γέλη πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα κι έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μορίων διαφορετικού μεγέθους. Επειδή η γέλη εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μεγέθους διαχωρίζονται σε ζώνες. Οι ζώνες αυτές καθίστανται ορατές κατόπιν σχηματισμού συμπλόκων παρεμβολής του DNA με μόρια, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται στην διπλή έλικα και να σχηματίζει φθορίζον σύμπλοκο με το DNA. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε έπειτα από την ολοκλήρωση των PCR αντιδράσεων για την ταυτοποίηση ύπαρξης των ενισχυμένων προϊόντων των δειγμάτων και άρα την παρουσία επιτυχών πρωτοκόλλων.

### Αντιδραστήρια / Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα 5X TBE (τρις-βορικό-EDTA) [54g Tris PanReac Applichem (Sigma #A2264), 27,5 g βορικό οξύ (Sigma # B6768) και 20 ml EDTA 0,5 M pH 8,0 σε 1 L].
- Βρωμιούχο αιθίδιο (500μg/ml), [Sigma,012K8934]
- Αγαρόζη (Nippon Genetic A602, UK), 100g
- Δείκτης μοριακών βαρών ΦX 174-Hae III, (NEB, ΗΠΑ, N3026S)
- Δείκτης μοριακών βαρών PCR Marker, 30 μg (NEB, ΗΠΑ, N3234S)
- Χρωστική 6X (loading dye) με κυανό της βρωμοφαινόλης (BPB) και φικόλη
- Πιπέτες (Thermo, Γερμανία) των 20μl και των 100μl.
- Ρύγχη των 20μl χωρίς φίλτρο
- Ηλεκτροφορητική συσκευή Peqlab (μικρή) και Scie-Plus HV-13 Midi, Αγγλία
- Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης EPS5301 (Amersham,Αγγλία).

- Τράπεζα ακτινοβολίας UV (Vilbert Loumart, Γαλλία)

### **Πειραματική πορεία**

Παρασκευάζεται γέλη αγαρόζης 1,5% (w/v) προσθέτοντας 0,75 g αγαρόζης σε 50 ml αραιωμένου διαλύματος 0,5X TBE και 50 ml βρωμιούχο αιθίδιο. Στην συνέχεια 10 ml προϊόντος PCR αναμιγνύεται με 2 μl διαλύματος χρωστικής (όπου αυτό είναι απαραίτητο, όταν δηλαδή δεν έχει χρησιμοποιηθεί το Promega HotStart Green Master Mix πολυμεράσης) και τοποθετούνται στα πηγαδάκια του πηκτώματος αγαρόζης. Η ηλεκτροφορητική συσκευή ρυθμίζεται στα 100 V, για 30 min οπότε το αρνητικά φορτισμένο DNA κινείται προς την άνοδο. Παράλληλα με τα δείγματα γίνεται ηλεκτροφόρηση δείγματος δείκτη μοριακών βαρών DNA για τον υπολογισμό του μεγέθους των προϊόντων PCR. Οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές λόγω της εκπομπής ακτινοβολίας φθορισμού από το βρωμιούχο αιθίδιο ύστερα από επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας UV στα 312 nm.

### **PCR – RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism)**

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

1. Την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου με συμβατική PCR (και τον έλεγχο με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης).
2. Την πέψη των PCR προϊόντων με ειδικό ένζυμο περιορισμού.
3. Την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης και ανάλυση των ζωνών.

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

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

στη συνέχεια με περιοριστικό ένζυμο που αναγνωρίζει τη θέση της μετάλλαξης, οπότε η πέψη του μορίου του DNA εξαρτάται από την ταυτότητα της νουκλεοτιδικής βάσης που βρίσκεται στη θέση αυτή. Με την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης και τον διαχωρισμό τους ανάλογα με το μοριακό τους βάρος προσδιορίζεται εύκολα αν το δείγμα ανήκει σε ομοζυγώτη, ετεροζυγώτη ή φυσιολογικό για τη μετάλλαξη άτομο.

### Ενζυματική πέψη των PCR προϊόντων

Ύστερα από ενίσχυση του *APOE* γονιδίου έγινε ενζυματική πέψη των προϊόντων της συμβατικής PCR με το περιοριστικό ένζυμο *HhaI* (New England BioLabs).

5' ... G C G ↓ C ... 3'

3' ... C ↑ G C G ... 5'

Η επώαση έγινε με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 4 ώρες και πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 22,5 μl, το οποίο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 7.** Πειραματικό πρωτόκολλο ενζυμικής πέψης των *APOE* PCR προϊόντων.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
Ένζυμο <i>HhaI</i>	10 U/μl	0,5	5 U/μl
M Buffer	-	2	-
H <sub>2</sub> O	-	2,5	-
PCR προϊόν	-	17,5	-

Ύστερα από ενίσχυση του *PON1* γονιδίου για τον L55M πολυμορφισμό έγινε ενζυματική πέψη των προϊόντων της συμβατικής PCR με το περιοριστικό ένζυμο *NlaIII* (New England BioLabs).

5' ... C A T G ↓ ... 3'

3' ... ↑ G T A C ... 5'

Η επώαση έγινε με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 3 ώρες και πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 15 μl, το οποίο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα :

**Πίνακας 8.** Πειραματικό πρωτόκολλο ενζυμικής πέψης των L55M PCR προϊόντων.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
Ένζυμο <i>NlaIII</i>	10 U/μl	0,5	5 U/μl
CutSmart Buffer 10X	-	1,5	-
PCR προϊόν	-	13	-

Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε και για τον πολυμορφισμό Q192R, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *AlwI* (New England BioLabs)

5' ... G G A T C N N N N ↓ ... 3'

3' ... C C T A G N N N N ↑ ... 5'

Η επώαση έγινε και εδώ με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 3 ώρες με πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 15 μl, το οποίο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 9.** Πειραματικό πρωτόκολλο ενζυμικής πέψης των Q192R PCR προϊόντων.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
Ένζυμο <i>AlwI</i>	10 U/μl	0,5	5 U/μl
CutSmart Buffer 10X	-	1,5	-
PCR προϊόν	-	13	-

Τέλος, για το γονίδιο *CXCL12*, χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο *MspI* (New England BioLabs).

5' ... C ↓ C G G ... 3'

3' ... G G C ↑ C... 5'

Η επώαση έγινε με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 3 ώρες και πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 15 μl, το οποίο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα :

**Πίνακας 10.** Πειραματικό πρωτόκολλο ενζυμικής πέψης των *CXCL12* PCR προϊόντων.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
Ένζυμο <i>HhaI</i>	20 U/μl	0,5	10 U/μl
M Buffer	-	1,5	-
PCR προϊόν	-	13	-

Μετά την επώαση τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης υψηλής διακριτικής ικανότητας 4% w/v, για ευκρινή διαχωρισμό ζωνών που διαφέρουν μόλις μερικά bp, όπως περιγράφεται παρακάτω.

### **Ηλεκτροφόρηση PCR-RFLP προϊόντων σε 4% πηκτή αгарόζης υψηλής διακριτικής ικανότητας**

#### Αντιδραστήρια / Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα 5X TBE (τρις-βορικό-EDTA) [54 g Trizma Base (Sigma #201-064-4), 27,5 g βορικό οξύ (Sigma #036K0210) και 20 ml EDTA 0,5 M pH 8,0 σε 1 lt].
- Βρωμιούχο αιθίδιο (500 μg/ml)
- Αγαρόζη Seakem LE (Lonza, Ελβετία) και αγαρόζη Αγαρόζη Nusieve GTG (Lonza, Ελβετία), 25 g
- Δείκτης μοριακών βαρών ΦX174 DNA Marker Hae III Digest, 100 bp ladder (New England BioLabs)
- Δείκτης μοριακών βαρών PCR Marker, 30 μg (NEB, ΗΠΑ, N3234S)
- Χρωστική πλήρωσης 6X (gel loading dye) με κυανό της βρωμοφαινόλης (BPB) και φικόλη
- Πιπέτες (Thermo, Γερμανία) των 20 μl και των 100 μl.
- Μεγάλου και μικρού μεγέθους «κασσέτα», χτένια 1 mm -1,5 mm (16 και 10 θέσεων, αντίστοιχα)
- Ρύγχη των 20μl χωρίς φίλτρο
- Ηλεκτροφορητική συσκευή Peqlab (μικρή) και HU-15 (Sci-Plas, Αγγλία)
- Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης EPS5301
- Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (Vilbert Loumart, Γαλλία)

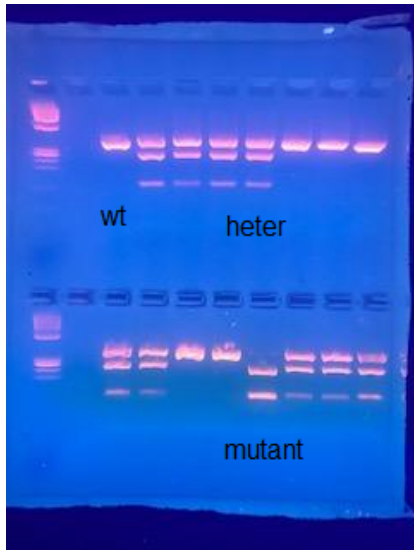
#### Πειραματική πορεία



Η πειραματική πορεία της ηλεκτροφόρησης έχει προαναφερθεί. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ακολουθούνται τα ίδια βήματα με μόνη διαφορά την αρχική παρασκευή πηκτής αгарόζης (βήμα 1): Παρασκευή πηκτής αгарόζης υψηλής διακριτικής ικανότητας 4% w/v με 1,5g αгарόζης Seakem (Lonza, Ελβετία) και 0,5g αгарόζης NuSieve (Lonza, Ελβετία) σε 50 ml TBE 0,5X (=> μικρού μεγέθους gel) ή με 1,0g αгарόζης Seakem και 3,0g αгарόζης NuSieve σε 100 ml TBE 0,5X (=> μεγάλου μεγέθους gel). Ακολουθεί ενυδάτωση της αгарόζης, μέσω ανάδευσης για περίπου 10 min. Κατόπιν θερμάνσεως, μέχρι την πλήρη διάλυση της αгарόζης, προστίθενται 50 μl ή 100 μl βρωμιούχου αιθιδίου, αντίστοιχα (στον υψηλό διαχωρισμό προτιμήθηκε η συγκεκριμένη χρωστική για τους λόγους που έχουν προαναφερθεί). Στην περίπτωση πηκτής υψηλής διαχωριστικής ικανότητας, ο χρόνος της ηλεκτροφόρησης υπό σταθερή τάση 120V είναι συνήθως 30 - 45 λεπτά, για ευκρινέστερη παρατήρηση των ζωνών.

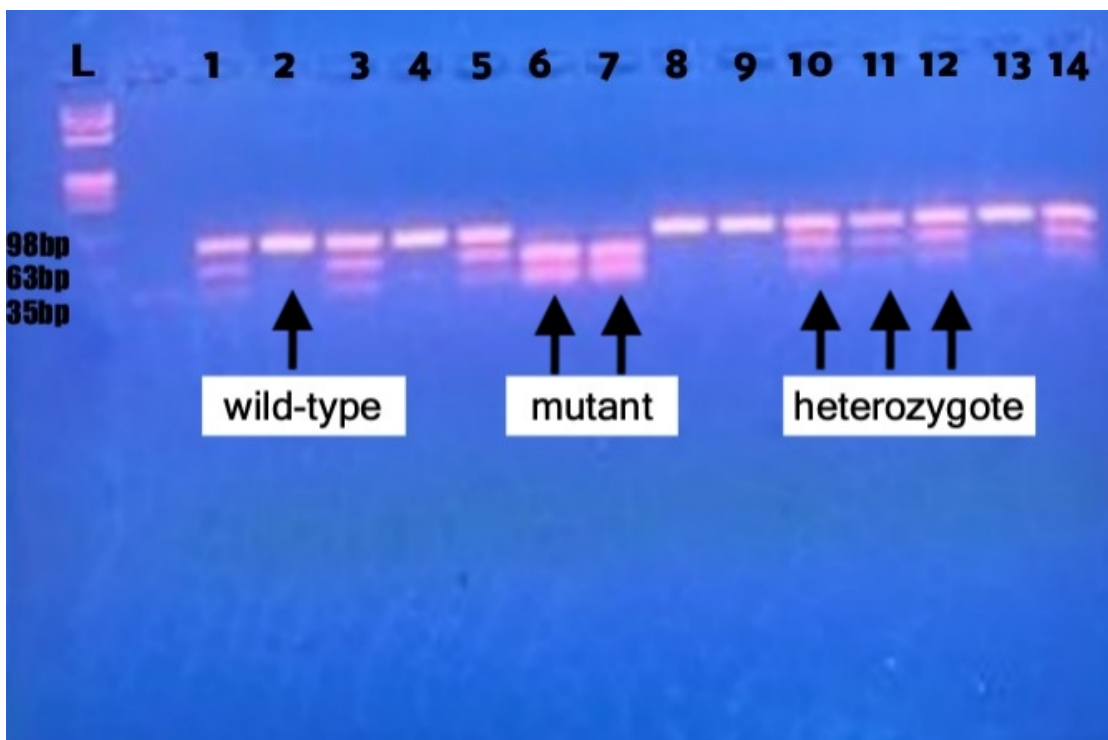
#### **Αξιολόγηση αποτελεσμάτων**

Σχετικά με το L55M SNP, το περιοριστικό ένζυμο NlaIII κόβει σε ένα σημείο που δημιουργείται από την αντικατάσταση μιας A από T λόγω του συγκεκριμένου πολυμορφισμού. Ως αποτέλεσμα αναμένονται μπάντες στα 394 bp που οφείλονται στο άκοπο προϊόν, δηλαδή δείγματα αγρίου τύπου (wt), μπάντες στα 124bp και 245 bp παρουσία δυο μεταλλαγμένων αλληλομόρφων και τέλος τρεις μπάντες στα 124, 245, 394 bp παρουσία ενός μεταλλαγμένου αλληλομόρφου δηλαδή ετερόζυγα δείγματα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 23.



**Εικόνα 23.** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε γέλη αгарόζης για το γονίδιο *PONI* L55M. Wt = wild-type (LL γονότυπος), heter = ετεροζυγωτία (LM γονότυπος), mutant = MM γονότυπος

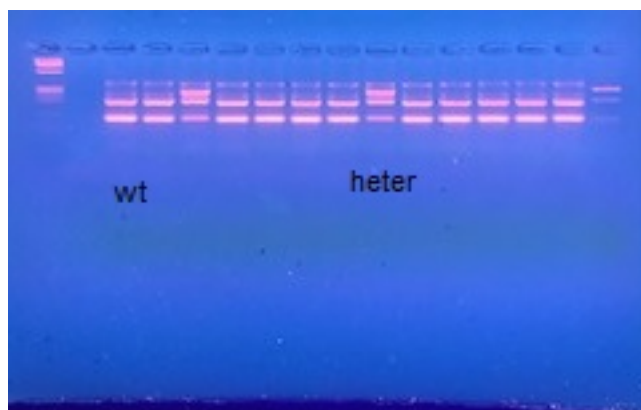
Αντίστοιχα, για τον Q192R πολυμορφισμό το ένζυμο AlwI κόβει σε μια θέση που δημιουργείται παρουσία του συγκεκριμένου πολυμορφισμού. Έτσι αναμένονται το ολόκληρο προϊόν στα 98 bp που χαρακτηρίζει τα wt δείγματα, μπάντες στα 35 και 63bp που αντιστοιχούν σε μεταλλαγμένα δείγματα, ενώ τέλος οι τρεις μπάντες αναμένονται για τα ετερόζυγα δείγματα (Εικόνα 24).



**Εικόνα 24.** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε γέλη αгарόζης για τον πολυμορφισμό *PONI* Q192R. Στήλες 2, 4, 8, 9, 13—wild-type QQ γονότυπος, Στήλες 6, 7—mutant RR γονότυπος, Στήλες 1, 3, 5, 10,

11, 12, 14—ετεροζυγωτία με QR γονότυπο. Το μέγεθος των μπαντών είναι γραμμένο με μαύρα γράμματα στα αριστερά της εικόνας.

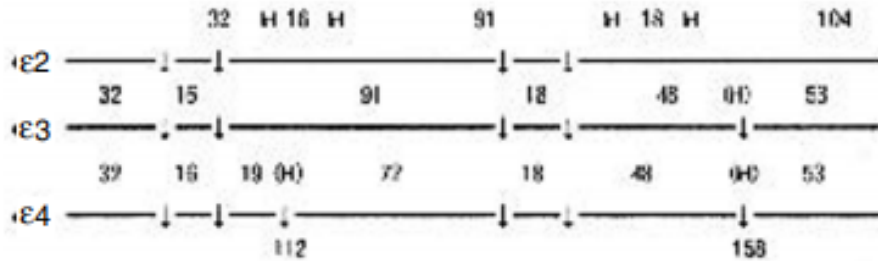
Στο *CXCL12* (*SDF-1*) το ένζυμο *MspI* κόβει τα αγρίου τύπου αλληλόμορφα, επομένως αναμένονται δύο μπάντες στα 100 και 200 bp, ενώ το μεταλλαγμένο αλληλίο παραμένει άκοπο και εμφανίζεται στα 302 bp. Τέλος, η ετεροζυγωτία εμφανίζεται με την παρουσία και των τριών μπαντών στο gel (Εικόνα 25).



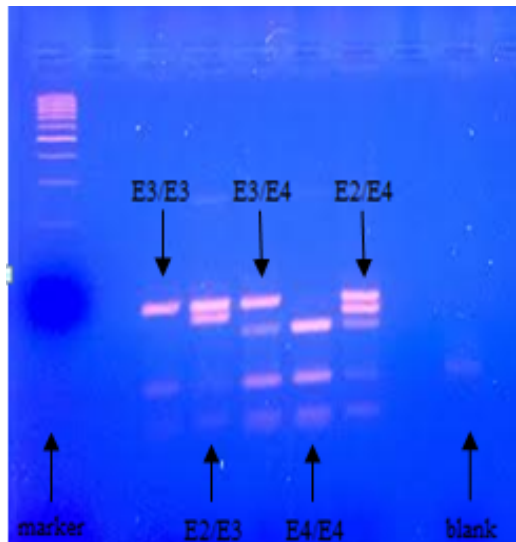
**Εικόνα 25.** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε γέλη αгарόζης για το γονίδιο *SDF1-3'G(801)A*. Wt = wild-type (GG γονότυπος), heter = ετεροζυγωτία (GA γονότυπος)

Τέλος, το γονίδιο της *ApoE* διακρίνεται σε τρεις ισομορφές (E2, E3, E4 αλληλόμορφα) που προκύπτουν από διαφορετικές αντικαταστάσεις αμινοξέων στα κωδικόνια 112 (rs429358, κυστεΐνη σε αργινίνη) και 158 (rs7412, αργινίνη σε κυστεΐνη). Η εικόνα που παρουσιάζεται στο gel προκύπτει από την αναγνώριση και κοπή των πολυμορφικών θέσεων του γονιδίου από το ένζυμο *HhaI* (Εικόνα 26). Το αλληλόμορφο E2 χαρακτηρίζεται από την παρουσία των μπαντών 104 και 91 bp, το E3

από τις ζώνες 91, 53 και 48 bp ενώ το E4 από τις ζώνες 72, 53 και 48 bp. Καθένας από τους ετερόζυγους τύπους παρουσιάζεται με μικτές ζώνες ομοζυγωτών (Εικόνα 27).



**Εικόνα 26:** Χάρτης περιορισμού των τριών κύριων αλληλόμορφων, E2, E3 και E4 του γονιδίου *APOE*. Τα H και (H) σημαίνουν θέσεις κοπής και παραλλαγμένες θέσεις του HhaI, αντίστοιχα. Οι αριθμοί μεταξύ των σημείων κοπής υποδεικνύουν το μέγεθος του θραύσματος σε ζεύγη βάσεων. Πηγή: Oh, M., Chung EK, E., Shin, Y. et al. The apolipoprotein E genotyping using the PCR-RFLP was useful to linkage analysis of Alzheimer's disease families. *Exp Mol Med* **29**, 161–164 (1997) [134]



**Εικόνα 27.** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε γέλη αгарόζης για το γονίδιο *APOE*.

## ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό Statistical Package for Social Sciences (SPSS) εκδόσεις 28.0.2.0 και 29.0.2.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, ΗΠΑ), καθώς και το διαδικτυακό εργαλείο SNPStats (<https://www.snpstats.net/start.htm>) [135]. Οι τιμές  $P \leq 0,05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

Οι ποσοτικές παράμετροι παρουσιάστηκαν ως μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση (standard deviation, SD), ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές εκφράστηκαν ως συχνότητα και ποσοστό. Τα τεστ κανονικότητας Kolmogorov-Smirnov και Shapiro-Wilk εφαρμόστηκαν για την αξιολόγηση της κανονικής κατανομής των δεδομένων. Τόσο η αξιολόγηση της ισορροπίας/ισοζυγίου Hardy-Weinberg (HWE), όσο και ο υπολογισμός των συχνοτήτων των αλληλόμορφων και των γονότυπων των πολυμορφισμών που μελετήθηκαν, πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το διαδικτυακό εργαλείο SNPStats. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων, όσον αφορά τις ποσοτικές μεταβλητές, προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας την ανάλυση διακύμανσης μιας κατεύθυνσης (one-way analysis of variance, ANOVA), με Bonferroni και Tukey HSD post hoc διόρθωση για προσαρμογή για πολλαπλές συγκρίσεις. Για συγκρίσεις (των μέσων τιμών των συνεχών μεταβλητών) μεταξύ δύο ομάδων χρησιμοποιήθηκε το independent-samples t-test. Για μεταβλητές, των οποίων τα δεδομένα δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκαν τα τεστ Kruskal-Wallis και Mann-Whitney, κατά περίπτωση. Το chi-square ( $\chi^2$ ) test χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση κατηγορικών μεταβλητών μεταξύ των δύο ομάδων.

Η μείωση του CST μετά από ενδοϋαλοειδικές ενέσεις anti-VEGF ( $\Delta$ CST) εξετάστηκε για πιθανή συσχέτιση με το κεντρικό πάχος του αμφιβληστροειδούς πριν την έναρξη των ενέσεων (CST0), την ηλικία, το φύλο, την υπέρταση, το σακχαρώδη διαβήτη, τη διάρκεια του σακχαρώδους διαβήτη, τη δυσλιπιδαιμία, το κάπνισμα και το γονότυπο *PON1* LL εκτελώντας μονομεταβλητή και πολυμεταβλητή ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης (univariate and multivariate linear regression analysis).

Ο λόγος σχετικών πιθανοτήτων (odds ratio, OR) με το 95% διάστημα εμπιστοσύνης (95% confidence interval, CI) υπολογίστηκε για τα εξής γενετικά μοντέλα κληρονομικότητας: συν-επικρατές (co-dominant), επικρατές (dominant), υπολειπόμενο (recessive), υπερεπικρατές (overdominant) και log-additive, με σκοπό την αξιολόγηση της συμβολής των επιλεγμένων πολυμορφισμών στον κίνδυνο

εμφάνισης RVO. Πραγματοποιήθηκαν τόσο crude (μονομεταβλητές) όσο και multivariate (πολυμεταβλητές) αναλύσεις, προσαρμοσμένες/διορθωμένες για την ηλικία, την υπέρταση και τον σακχαρώδη διαβήτη. Η ανάλυση απλότυπου για τα δύο SNPs του γονιδίου *PONI*, Q192R και L55M, πραγματοποιήθηκε επίσης χρησιμοποιώντας το SNPStats.

Για το γονίδιο *APOE*, λόγω του μοναδικού χαρακτηριστικού του ότι έχει 3 αλληλόμορφα-απλότυπους, για την εκτίμηση του OR και του CI για τους φορείς αλληλόμορφων E2 και E4 σε σύγκριση με την ομοζυγωτία E3E3 (το E3E3 ορίστηκε ως ομάδα αναφοράς) χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση δυαδικής λογιστικής παλινδρόμησης του SPSS, προσαρμόζοντας/διορθώνοντας ως προς την ηλικία, την υπέρταση και τον διαβήτη. Ο γονότυπος E2E4 συμπεριλήφθηκε στην ομάδα των φορέων E2. Πραγματοποιήθηκε, επίσης, ανάλυση συσχέτισης δυαδικής λογιστικής παλινδρόμησης (binary logistic regression association analysis) για κάθε ξεχωριστό γονότυπο *APOE*.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Η μέση ηλικία των 50 ασθενών (27 άνδρες, 23 γυναίκες), τη στιγμή της διάγνωσής τους, ήταν  $67.3 \pm 9.5$  έτη. 35 ασθενείς (70%) διαγνώστηκαν με CRVO και 15 ασθενείς (30%) είχαν BRVO.

Ο Πίνακας 11 περιέχει τις συχνότητες των αλληλόμορφων και των γονότυπων των πολυμορφισμών που μελετήθηκαν. Οι συχνότητες των γονότυπων όλων των πολυμορφισμών που μελετήθηκαν ήταν σύμφωνες με τις προσδοκίες HWE ( $p > 0.05$ ).

**Πίνακας 11.** Συχνότητες των αλληλόμορφων και των γονότυπων των υπό μελέτη πολυμορφισμών, στους ασθενείς με απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς.

	<i>PONI L55M</i>		<i>PONI Q192R</i>		<i>APOE</i>		<i>SDF1-3'G(801)A</i>	
Αλληλόμορφο	L	65 (65%)	Q	72 (72%)	E3	90 (90%)	G	73 (73%)
	M	35 (35%)	R	28 (28%)	E4	6 (6%)	A	27 (27%)
					E2	4 (4%)		
Γονότυπος	LL	19 (38%)	QQ	26 (52%)	E3E3	40 (80%)	GG	25 (50%)
	LM	27 (54%)	QR	20 (40%)	E2E3	4 (8%)	GA	23 (46%)
					E3E4	6 (12%)		
MM	4 (8%)	RR	4 (8%)	E2E4	0 (0%)	AA	2 (4%)	
Φορείς αλληλόμορφων (είτε ομοζυγώτες είτε ετεροζυγώτες)	LL + LM	46 (92%)	QQ + QR	46 (92%)			GG + GA	48 (96%)
	MM + LM	31 (62%)	RR + QR	30 (60%)			AA + GA	25 (50%)

Ο Πίνακας 12 απεικονίζει τα δημογραφικά και κλινικά δεδομένα ανά γονότυπο. Με τη χρήση της ANOVA, βρέθηκε μια στατιστικά σημαντική διαφορά στο ΔCST μεταξύ των γονότυπων του πολυμορφισμού *PONI L55M* ( $p=0.026$ ). Υπήρξε επίσης μια στατιστικά σημαντική διαφορά στη ΔCST μεταξύ του γονότυπου LL και του γονότυπου MM ( $p=0.05$ ) στη σύγκριση κατά ζεύγη Tukey HSD post hoc. Δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στην BCVA κατά τη διάγνωση (BCVA0) και τον μήνα 12 (BCVA12), στη ΔBCVA, καθώς και στο CST κατά τη διάγνωση (CST0) και στο CST τον μήνα 12 (CST12), μεταξύ των διαφορετικών γονότυπων όλων των πολυμορφισμών που μελετήθηκαν.

**Πίνακας 12.** Δημογραφικά και κλινικά δεδομένα ανά γονότυπο.

	<i>PONI L55M</i>				<i>PONI Q192R</i>				<i>APOE</i>				<i>SDF1-3'G(801)A</i>			
	LL	LM	MM	p-value	QQ	QR	RR	p-value	E3E3	E2E3	E3E4	p-value	GG	GA	AA	p-value
Ηλικία (Ετη)	68.8 ± 9.9	66.4 ± 9.6	65.5 ± 6.6	0.667*	66.4 ± 9.5	66.4 ± 8.7	77.3 ± 9.5	0.086*	67.4 ± 9.5	65.8 ± 10.1	67.3 ± 10.7	0.948*	66.2 ± 9.1	69.5 ± 9.3	54.5 ± 6.4	0.069*
Αριθμός ενέσεων	6.3 ± 1.1	5.7 ± 1.5	6.5 ± 1.3	0.238†	6.0 ± 1.3	6.0 ± 1.5	5.3 ± 1.3	0.515†	6.0 ± 1.4	5.8 ± 1.7	6.2 ± 1.2	0.885†	5.9 ± 1.4	6.0 ± 1.3	6.5 ± 2.1	0.818†
BCVA0 (logMAR)	0.76 ± 0.29	0.68 ± 0.30	0.83 ± 0.39	0.382†	0.74 ± 0.34	0.72 ± 0.28	0.63 ± 0.15	0.890†	0.75 ± 0.29	0.63 ± 0.29	0.58 ± 0.36	0.272†	0.75 ± 0.31	0.70 ± 0.30	0.70 ± 0.42	0.873†
BCVA12 (logMAR)	0.42 ± 0.31	0.46 ± 0.37	0.61 ± 0.45	0.630†	0.46 ± 0.38	0.48 ± 0.33	0.28 ± 0.29	0.407†	0.47 ± 0.36	0.40 ± 0.41	0.36 ± 0.33	0.866†	0.46 ± 0.37	0.44 ± 0.33	0.58 ± 0.60	0.911†
ΔBCVA (logMAR)	0.34 ± 0.28	0.22 ± 0.18	0.21 ± 0.15	0.261†	0.28 ± 0.23	0.24 ± 0.22	0.35 ± 0.26	0.623†	0.28 ± 0.24	0.23 ± 0.17	0.23 ± 0.08	0.860†	0.29 ± 0.22	0.25 ± 0.23	0.13 ± 0.18	0.456†
CST0 (μm)	485.7 ± 50.7	456.0 ± 69.9	479.5 ± 112.9	0.328*	474.6 ± 78.5	466.4 ± 54.2	447.8 ± 55.4	0.745*	468.6 ± 60.6	494.0 ± 121.0	456.5 ± 79.1	0.692*	475.2 ± 74.7	460.4 ± 60.8	495.0 ± 50.9	0.649*
CST12 (μm)	384.1 ± 65.5	383.6 ± 78.1	439.3 ± 126.5	0.666†	392.4 ± 86.8	390.9 ± 68.5	347.5 ± 58.8	0.416†	390.0 ± 74.3	388.8 ± 137.5	376.3 ± 67.0	0.718†	390.4 ± 87.3	383.7 ± 67.8	413.5 ± 96.9	0.838†
ΔCST (μm)	101.6 ± 56.8	72.4 ± 39.4	40.3 ± 19.3	<b>0.026*</b>	82.2 ± 54.1	75.5 ± 40.3	100.3 ± 58.4	0.648*	78.7 ± 51.7	105.3 ± 21.3	80.2 ± 40.6	0.591*	84.9 ± 50.1	76.7 ± 49.2	81.5 ± 46.0	0.848*

\*P-value υπολογισμένη χρησιμοποιώντας την ANOVA μεταξύ των διαφορετικών γονότυπων. †P-value υπολογισμένη χρησιμοποιώντας το Kruskal-Wallis τεστ μεταξύ των διαφορετικών γονότυπων. BCVA: best-corrected visual acuity. CST: central subfield thickness. Δ: διαφορά. Το bold φόντο σημαίνει παρουσία στατιστικής σημαντικότητας



Επιπλέον, εξετάσαμε εάν η παρουσία οποιουδήποτε εκ των αλληλόμορφων των μελετηθέντων πολυμορφισμών σχετίζεται σημαντικά με καλύτερα αποτελέσματα θεραπείας, όπως φαίνεται στον Πίνακα 13. Συγκεκριμένα, το t-test μεταξύ του γονότυπου LL και των γονότυπων MM + LM αποκάλυψε ότι η παρουσία του αλληλόμορφου M (γονότυποι MM + LM) του *PONI L55M* συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά ( $p=0.032$ ) με χειρότερη ανατομική απόκριση στη θεραπεία σε σύγκριση με τους μη φορείς (LL ομοζυγώτες). Η ΔCST ήταν  $68.3 \pm 38.8$   $\mu\text{m}$  για τους M φορείς και  $101.6 \pm 56.8$   $\mu\text{m}$  για τους ομοζυγώτες LL. Δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά για τους υπόλοιπους πολυμορφισμούς.

**Πίνακας 13.** Δημογραφικά και κλινικά δεδομένα βασισμένα στην παρουσία ή όχι οποιουδήποτε εκ των αλληλόμορφων των μελετηθέντων πολυμορφισμών.

	L55M						Q192R						APOE						SDF1-3'G(801)A								
	LL	MM + LM	p-value	MM	LL + LM	p-value	QQ	RR + QR	p-value	RR	QQ + QR	p-value	E3E3	E2E3 + E3E4	p-value	E2E3	E3E3 + E3E4	p-value	E3E4	E3E3 + E2E3	p-value	GG	AA + GA	p-value	AA	GG + GA	p-value
Ηλικία (έτη)	68.8±9.9	66.3±9.2	0.376*	65.5±6.6	67.4±9.7	0.702*	66.4±9.5	68.2±9.5	0.501*	77.3±9.5	66.4±9.0	0.059*	67.4±9.5	66.7±9.9	0.836*	65.8±10.1	67.39±9.50	0.743*	67.3±10.7	67.3±9.4	0.984*	66.2±9.1	68.3±9.9	0.217*	54.5±6.4	67.8±9.2	0.050*
Αριθμός ενέσεων	6.3±1.1	5.8±1.5	0.205 <sup>§</sup>	6.5±1.3	5.9±1.3	0.457 <sup>§</sup>	6.0±1.3	5.9±1.4	0.743 <sup>§</sup>	5.3±1.3	6.0±1.3	0.272 <sup>§</sup>	6.0±1.4	6.0±1.3	1.00 <sup>§</sup>	5.8±1.7	6.00±1.31	0.717 <sup>§</sup>	6.2±1.2	6.0±1.4	0.738 <sup>§</sup>	5.9±1.4	6.1±1.3	0.634 <sup>§</sup>	6.5±2.1	6.0±1.3	0.653 <sup>§</sup>
BCVA0 (logMAR)	0.76±0.29	0.70±0.31	0.321 <sup>§</sup>	0.83±0.39	0.71±0.30	0.500 <sup>§</sup>	0.74±0.34	0.71±0.26	0.827 <sup>§</sup>	0.63±0.31	0.73±0.31	0.666 <sup>§</sup>	0.75±0.29	0.60±0.32	0.125 <sup>§</sup>	0.63±0.29	0.73±0.30	0.500 <sup>§</sup>	0.58±0.36	0.74±0.29	0.189 <sup>§</sup>	0.75±0.31	0.70±0.30	0.606 <sup>§</sup>	0.70±0.42	0.72±0.30	0.864 <sup>§</sup>
BCVA12 (logMAR)	0.42±0.31	0.48±0.38	0.839 <sup>§</sup>	0.61±0.45	0.44±0.35	0.357 <sup>§</sup>	0.46±0.38	0.45±0.33	0.694 <sup>§</sup>	0.28±0.29	0.47±0.36	0.200 <sup>§</sup>	0.47±0.36	0.38±0.34	0.607 <sup>§</sup>	0.40±0.41	0.46±0.35	0.823 <sup>§</sup>	0.36±0.33	0.47±0.36	0.673 <sup>§</sup>	0.46±0.37	0.45±0.34	0.731 <sup>§</sup>	0.58±0.60	0.4±0.35	0.754 <sup>§</sup>
ABCVA (logMAR)	0.34±0.28	0.22±0.17	0.102 <sup>§</sup>	0.21±0.15	0.27±0.23	0.796 <sup>§</sup>	0.28±0.23	0.26±0.22	0.921 <sup>§</sup>	0.35±0.22	0.26±0.22	0.396 <sup>§</sup>	0.28±0.24	0.23±0.11	0.607 <sup>§</sup>	0.23±0.17	0.27±0.23	0.850 <sup>§</sup>	0.23±0.08	0.27±0.24	0.652 <sup>§</sup>	0.29±0.22	0.24±0.23	0.349 <sup>§</sup>	0.13±0.18	0.27±0.23	0.367 <sup>§</sup>
CST0 (μm)	485.7±50.7	459.1±74.6	0.177*	479.5±112.9	468.3±63.8	0.753*	474.6±78.5	463.3±53.6	0.557*	447.8±55.4	471.0±68.4	0.512*	468.6±60.6	471.5±93.4	0.904*	494.0±121.0	467.0±62.4	0.447*	456.5±79.1	470.9±66.3	0.627*	475.2±74.7	463.1±59.9	0.265*	495.0±50.9	468.1±68.1	0.585*
CST12 (μm)	384.1±65.5	390.8±85.2	0.865 <sup>§</sup>	439.3±126.5	383.8±72.4	0.436 <sup>§</sup>	392.4±86.8	383.7±67.8	0.977 <sup>§</sup>	347.5±58.8	391.8±78.6	0.213 <sup>§</sup>	390.0±74.3	381.3±94.0	0.574 <sup>§</sup>	388.8±137.5	388.2±72.8	0.436 <sup>§</sup>	376.3±67.0	389.8±79.5	1.00 <sup>§</sup>	390.4±87.3	386.1±68.4	0.884 <sup>§</sup>	413.5±96.9	387.2±77.8	0.589 <sup>§</sup>
ΔCST (μm)	101.6±56.8	68.3±38.8	0.032*	40.3±19.3	84.5±49.0	0.081*	82.2±54.1	79.6±43.3	0.726*	100.3±58.4	79.3±48.2	0.415*	78.7±51.7	90.2±35.2	0.508*	105.3±21.3	78.9±50.0	0.084*	80.2±40.6	81.1±50.1	0.967*	84.9±50.1	77.0±48.0	0.575*	81.5±46.0	80.9±49.3	0.987*

\*P-value υπολογισμένη χρησιμοποιώντας το independent-samples t-test μεταξύ των δύο γκρουπ της κάθε σύγκρισης. <sup>§</sup>P-value υπολογισμένη χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney test μεταξύ των δύο γκρουπ της κάθε σύγκρισης

BCVA: best-corrected visual acuity. CST: central subfield thickness. Δ: διαφορά

Το bold φόντο σημαίνει παρουσία στατιστικής σημαντικότητας

Πραγματοποιήθηκαν μονομεταβλητές αναλύσεις γραμμικής παλινδρόμησης (univariate linear regression analyses) για την αξιολόγηση της συσχέτισης των διαφόρων παραμέτρων με τη ΔCST, μετά από ένα έτος ενέσεων anti-VEGF (Πίνακας 14). Ο γονότυπος LL ήταν η μόνη στατιστικά σημαντική μεταβλητή ( $p=0.017$ ), όπως αποκαλύφθηκε από τη μονομεταβλητή ανάλυση.

**Πίνακας 14.** Μονομεταβλητές Αναλύσεις Γραμμικής Παλινδρόμησης (Univariate Linear Regression Analyses): ρόλος/επίδραση της κάθε μεταβλητής στην αλλαγή στο CST (ΔCST) μετά από ένα χρόνο ενδοϋαλοειδικών ενέσεων anti-VEGF.

Μεταβλητές	Unstandardised Coefficients		Standardised Beta (β) Coefficient	p-value
	Beta (β)	Standard error		
L55M: LL VS (LM + MM)	-16.671	6.754	-0.336	<b>0.017</b>
Ηλικία	0.521	0.740	0.101	0.485
Φύλο	2.651	13.960	0.027	0.850
CST0	0.096	0.104	0.133	0.358
Υπέρταση	25.183	13.735	0.256	0.073
Διαβήτης	-21.350	13.870	-0.217	0.130
Διάρκεια διαβήτη	-0.211	0.928	-0.033	0.821
Δυσλιπιδαιμία	-0.497	14.022	-0.005	0.972
Κάπνισμα	-0.065	16.803	-0.001	0.997

CST: central subfield thickness

CST0: central subfield thickness at month 0 (κεντρικό πάχος αμφιβληστροειδούς κατά τη διάγνωση)

Δ: διαφορά

Το bold φόντο σημαίνει παρουσία στατιστικής σημαντικότητας

Πραγματοποιήθηκε επίσης πολυμεταβλητή ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης (multivariate linear regression analysis). Υιοθετήθηκε ένα κριτήριο διαλογής  $p < 0.2$  στις μονομεταβλητές αναλύσεις, για να καθοριστεί ποιες μεταβλητές θα συμπεριληφθούν στο μοντέλο της πολυμεταβλητής γραμμικής παλινδρόμησης. Στη συνέχεια, διεξήχθη πολυμεταβλητή ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης του γονότυπου LL έναντι της ανατομικής απόκρισης, προσαρμοσμένη/διορθωμένη ως προς

την υπέρταση και το διαβήτη (Πίνακας 15). Το μοντέλο ήταν στατιστικά σημαντικό ( $p=0.034$ ). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο γονότυπος LL του *PONI L55M* παρουσίασε μεγαλύτερη μείωση του CST μετά τη θεραπεία σε σύγκριση με τους γονότυπους LM + MM ( $\beta=-0.318$ ,  $p=0.035$ ). Ως εκ τούτου, η παρουσία του αλληλόμορφου M φάνηκε να είναι ένας σημαντικός προγνωστικός παράγοντας για χειρότερη ανατομική απόκριση μετά από ενδοϋαλοειδική θεραπεία με εγχύσεις anti-VEGF παραγόντων. Οι συμμεταβλητές υπέρταση και διαβήτης δεν έδειξαν καμία στατιστική σημαντικότητα στο μοντέλο παλινδρόμησης.

**Πίνακας 15.** Τελικό βήμα της stepwise multivariate linear regression ανάλυσης που υποδεικνύει στατιστικά σημαντικούς προγνωστικούς παράγοντες ως προς την αλλαγή στο CST ( $\Delta$ CST) μετά από ένα χρόνο ενδοϋαλοειδικών ενέσεων anti-VEGF.

Μεταβλητές	Unstandardised Coefficients		Standardised Beta ( $\beta$ ) Coefficient	p-value
	Beta ( $\beta$ )	Standard error		
L55M: LL VS (LM + MM)	-15.779	7.266	-0.318	<b>0.035</b>
Υπέρταση	23.086	14.082	0.235	0.108
Διαβήτης	-1.558	15.252	-0.016	0.919

CST: central subfield thickness.  $\Delta$ : διαφορά

Το bold φόντο σημαίνει παρουσία στατιστικής σημαντικότητας

## 2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ-ΜΑΡΤΥΡΩΝ

Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη συνοψίζονται στον Πίνακα 16. Συνολικά 100 άτομα συμπεριλήφθηκαν: 50 ασθενείς με RVO (54% άνδρες, 46% γυναίκες) με μέση ηλικία  $67.26 \pm 9.45$  έτη και 50 μάρτυρες (56% άνδρες, 44% γυναίκες) με μέση ηλικία  $69.84 \pm 13.18$  έτη. Οι δύο ομάδες αντιστοιχούσαν σε ηλικία και φύλο (age- and sex- matched). Μεταξύ των ασθενών με RVO, 35 από αυτούς (70%) διαγνώστηκαν με CRVO και 15 (30%) είχαν BRVO. Οι συχνότητες της υπέρτασης και του διαβήτη ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα RVO σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ( $p=0.003$  και  $p<0.001$ , αντίστοιχα).

**Πίνακας 16.** Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των μαρτύρων σε σύγκριση με τους ασθενείς με απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς (RVO)

	<b>Μάρτυρες</b>	<b>RVO ασθενείς</b>	<b>P-value</b>
Ηλικία (μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση, σε έτη)	69.84 $\pm$ 13.18	67.26 $\pm$ 9.45	0.263*
Φύλο, Άντρες/Γυναίκες (N, %)	28 (56%)/22 (44%)	27 (54%) / 23 (46%)	0.841 <sup>§</sup>
Υπέρταση (N, %)	15 (30%)	30 (60%)	<b>0.003</b> <sup>§</sup>
Σακχαρώδης διαβήτης (N, %)	3 (6%)	20 (40%)	<b>&lt;0.001</b> <sup>§</sup>

\*P-value υπολογισμένη χρησιμοποιώντας το independent samples t-test. <sup>§</sup>P-value υπολογισμένη χρησιμοποιώντας το Chi-square ( $\chi^2$ ) test

Το bold φόντο σημαίνει παρουσία στατιστικής σημαντικότητας

Οι συχνότητες των αλληλόμορφων και γονότυπων, στους ασθενείς με RVO και στους μάρτυρες, για όλους τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν, φαίνονται στον Πίνακα 17. Όλα τα επιλεγμένα SNPs τηρούσαν τις προσδοκίες HWE ( $p>0,05$ ).

**Πίνακας 17.** Κατανομή των αλληλόμορφων και των γονότυπων των πολυμορφισμών *PONI* L55M, *PONI* Q192R, *SDF1*-3'G(801)A και *APOE* στους RVO ασθενείς και στους μάρτυρες.

<b>PONI L55M</b>		<b>Μάρτυρες, N (%)</b>	<b>RVO ασθενείς, N (%)</b>
Αλληλόμορφο	L	62 (62%)	65 (65%)
	M	38 (38%)	35 (35%)
Γονότυπος	LL	21 (42%)	19 (38%)
	LM	20 (40%)	27 (54%)
	MM	9 (18%)	4 (8%)
Φορείς αλληλόμορφων (είτε ομοζυγώτες είτε ετεροζυγώτες)	LL + LM	41 (82%)	46 (92%)
	LM + MM	29 (58%)	31 (62%)
<b>PONI Q192R</b>		<b>Μάρτυρες</b>	<b>RVO ασθενείς</b>
Αλληλόμορφο	Q	79 (79%)	72 (72%)
	R	21 (21%)	28 (28%)
Γονότυπος	QQ	33 (66%)	26 (52%)
	QR	13 (26%)	20 (40%)
	RR	4 (8%)	4 (8%)
Φορείς αλληλόμορφων (είτε ομοζυγώτες είτε ετεροζυγώτες)	QQ+QR	46 (92%)	46 (92%)
	QR + RR	17 (34%)	24 (48%)
<b>SDF1-3'G(801)A</b>		<b>Μάρτυρες</b>	<b>RVO ασθενείς</b>
Αλληλόμορφο	G	69 (69%)	73 (73%)
	A	31 (31%)	27 (27%)
Γονότυπος	GG	22 (44%)	25 (50%)
	GA	25 (50%)	23 (46%)
	AA	3 (6%)	2 (4%)
Φορείς αλληλόμορφων (είτε ομοζυγώτες είτε ετεροζυγώτες)	GG+GA	47 (94%)	48 (96%)
	GA+AA	28 (56%)	25 (50%)
<b>APOE</b>		<b>Μάρτυρες</b>	<b>RVO ασθενείς</b>
Αλληλόμορφο	E3	84 (84%)	90 (90%)
	E4	10 (10%)	6 (6%)
	E2	6 (6%)	4 (4%)
Γονότυπος	E3E3	36 (72%)	40 (80%)
	E2E3	5 (10%)	4 (8%)
	E3E4	7 (14)	6 (12%)
	E2E4	1 (2%)	0 (0%)
	E4E4	1 (2%)	0 (0%)
	E2E2	0 (0%)	0 (0%)
Φορείς αλληλόμορφων (είτε ομοζυγώτες είτε ετεροζυγώτες)	E2 carriers (E2E2, E2E3, E2E4)	6 (12%)	4 (8%)
	E4 carriers (E4E4, E3E4)	8 (16%)	6 (12%)

Η ανάλυση συσχέτισης μεταξύ των επιλεγμένων πολυμορφισμών και του κινδύνου RVO αποκάλυψε μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας RVO και της ομάδας ελέγχου στο dominant γενετικό μοντέλο (γενετικό μοντέλο επικρατούς κληρονομικότητας) για τον πολυμορφισμό *PONI* Q192R rs662. Συγκεκριμένα, μετά την προσαρμογή/διόρθωση ως προς την ηλικία και την υπέρταση, το dominant μοντέλο έδειξε ότι το αλληλόμορφο R (γονότυποι QR και RR) συσχετίζεται στατιστικά σημαντικά με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης RVO σε σύγκριση με τον γονότυπο QQ (OR = 2.51; 95% CI = 1.02 – 6.14 , p=0,04). Η στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος για το αλληλόμορφο R του *PONI* Q192R διατηρήθηκε μετά και τη συμπερίληψη του σακχαρώδη διαβήτη στην πολυμεταβλητή ανάλυση, μαζί με την ηλικία και την υπέρταση (OR = 2.83; 95% CI = 1.01 – 7.97, p=0.042). Το αποτέλεσμα της μονομεταβλητής (crude) ανάλυσης συσχέτισης για το *PONI* Q192R δεν ήταν στατιστικά σημαντικό.

Οι υπόλοιποι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν δεν φάνηκε να συνδέονται με τον κίνδυνο εμφάνισης RVO καθώς κανένα από τα γενετικά μοντέλα της ανάλυσης συσχέτισης δεν έδειξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών με RVO και των μαρτύρων.

Τα αποτελέσματα των crude και πολυμεταβλητών αναλύσεων, συμπεριλαμβανομένων των ORs, 95% CIs και p-value, όλων των γενετικών μοντέλων (co-dominant, dominant, recessive, overdominant and log-additive) για τους πολυμορφισμούς *PONI* L55M, *PONI* Q192R και *SDFI*-3'G(801)A, παρουσιάζονται στους Πίνακες 18, 19 και 20, αντίστοιχα.

**Πίνακας 18.** Crude (μονομεταβλητή) και multivariate (πολυμεταβλητή) ανάλυση συσχέτισης μεταξύ *PONI* L55M πολυμορφισμού και κινδύνου για απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς (RVO).

<i>PONI</i> L55M		Συχνότητες		Crude ανάλυση		Προσαρμογή/διόρθωση για ηλικία + υπέρταση		Προσαρμογή/διόρθωση για ηλικία + υπέρταση + διαβήτης	
Μοντέλο ανάλυσης	Γονότυπος	Μάρτυρες	RVO ασθενείς	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value

Codominant	LL	21 (42%)	19 (38%)	1.00	0.21	1.00	0.3	1.00	0.24
	LM	20 (40%)	27 (54%)	1.49 (0.64-3.48)		1.31 (0.53-3.23)		0.82 (0.29-2.33)	
	MM	9 (18%)	4 (8%)	0.49 (0.13-1.86)		0.45 (0.11-1.87)		0.25 (0.05-1.38)	
Dominant	LL	21 (42%)	19 (38%)	1.00	0.68	1.00	0.91	1.00	0.4
	LM+MM	29 (58%)	31 (62%)	1.18 (0.53-2.63)		1.05 (0.45-2.47)		0.65 (0.24-1.77)	
Recessive	LL+LM	41 (82%)	46 (92%)	1.00	0.13	1.00	0.15	1.00	0.1
	MM	9 (18%)	4 (8%)	0.40 (0.11-1.38)		0.39 (0.10-1.48)		0.28 (0.06-1.38)	
Overdominant	LL+MM	30 (60%)	23 (46%)	1.00	0.16	1.00	0.29	1.00	0.81
	LM	20 (40%)	27 (54%)	1.76 (0.80-3.89)		1.58 (0.68-3.66)		1.13 (0.43-2.95)	
Log-additive	-	-	-	0.88 (0.49-1.57)	0.66	0.82 (0.44-1.53)	0.54	0.59 (0.28-1.25)	0.16



**Πίνακας 19.** Crude (μονομεταβλητή) και multivariate (πολυμεταβλητή) ανάλυση συσχέτισης μεταξύ *PONI* Q192R πολυμορφισμού και κινδύνου για απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς (RVO).

<i>PONI</i> Q192R		Συχνότητες		Crude ανάλυση		Προσαρμογή/διόρθωση για ηλικία + υπέρταση		Προσαρμογή/διόρθωση για ηλικία + υπέρταση + διαβήτη	
Μοντέλο ανάλυσης	Γονότυπος	Μάρτυρες	RVO ασθενείς	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value
Codominant	QQ	33 (66%)	26 (52%)	1.00	0.31	1.00	0.12	1.00	0.13
	QR	13 (26%)	20 (40%)	1.95 (0.82-4.65)		2.61 (1.01-6.75)		2.87 (0.96-8.60)	
	RR	4 (8%)	4 (8%)	1.27 (0.29-5.57)		2.11 (0.42-10.60)		2.69 (0.42-17.30)	
Dominant	QQ	33 (66%)	26 (52%)	1.00	0.15	1.00	0.04	1.00	0.042
	QR+RR	17 (34%)	24 (48%)	1.79 (0.80-4.01)		<b>2.51 (1.02-6.14)</b>		<b>2.83 (1.01-7.97)</b>	
Recessive	QQ+QR	46 (92%)	46 (92%)	1.00	1	1.00	0.65	1.00	0.53
	RR	4 (8%)	4 (8%)	1.00 (0.24-4.24)		1.43 (0.30-6.67)		1.79 (0.30-10.66)	
Overdominant	QQ+RR	37 (74%)	30 (60%)	1.00	0.14	1.00	0.062	1.00	0.08
	QR	13 (26%)	20 (40%)	1.90 (0.81-4.41)		2.36 (0.94-5.89)		2.52 (0.88-7.23)	

				4.43 )					
Log-additive	-	-	-	1.41 (0.7 6- 2.63 )	0.27	1.84 (0.93- 3.67)	0.075	2.05 (0.94- 4.48)	0.067

Το bold φόντο σημαίνει παρουσία στατιστικής σημαντικότητας

**Πίνακας 20.** Crude (μονομεταβλητή) και multivariate (πολυμεταβλητή) ανάλυση συσχέτισης μεταξύ *SDF1-3'G(801)A* πολυμορφισμού και κινδύνου για απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς (RVO).

<i>SDF1-3'G(801)A</i>		Συχνότητες		Crude ανάλυση		Προσαρμογή/διόρθωση για ηλικία + υπέρταση		Προσαρμογή/διόρθωση για ηλικία + υπέρταση + διαβήτη	
Μοντέλο ανάλυσης	Γονότυπος	Μάρτυρες	RVO ασθενείς	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value
Codominant	GG	22 (44%)	25 (50%)	1.00	0.79	1.00	0.8	1.00	0.74
	GA	25 (50%)	23 (46%)	0.81 (0.3 6- 1.81 )		1.05 (0.44- 2.51)		0.96 (0.35- 2.63)	
	AA	3 (6%)	2 (4%)	0.59 (0.0 9- 3.84 )		0.53 (0.07- 3.91)		0.42 (0.04- 3.96)	
Dominant	GG	22 (44%)	25 (50%)	1.00	0.55	1.00	0.96	1.00	0.79
	GA+AA	28 (56%)	25 (50%)	0.79 (0.3 6- 1.73 )		0.98 (0.42- 2.27)		0.88 (0.33- 2.31)	
Recessive	GG+GA	47 (94%)	48 (96%)	1.00	0.65	1.00	0.51	1.00	0.44

	AA	3 (6%)	2 (4%)	0.65 (0.1 0- 4.08 )		0.52 (0.07- 3.68)		0.42 (0.05- 3.85)	
Overdominant	GG+AA	25 (50%)	27 (54%)	1.00	0.69	1.00	0.81	1.00	0.93
	GA	25 (50%)	23 (46%)	0.85 (0.3 9- 1.87 )		1.11 (0.47- 2.61)		1.05 (0.39- 2.78)	
Log-additive	-	-	-	0.79 (0.4 0- 1.55 )	0.49	0.90 (0.44- 1.83)	0.77	0.81 (0.36- 1.82)	0.61

Επιπλέον, η ανάλυση απλότυπου για τα δύο SNPs του γονιδίου *PONI*, L55M και Q192R, δεν ανίχνευσε καμία συσχέτιση με τον κίνδυνο RVO (Πίνακας 21).

**Πίνακας 21.** Ανάλυση απλότυπου των *PONI* L55M και Q192R SNPs για συσχέτιση με απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς (RVO).

Απλότυπος και υπολογισμός συχνότητας						Συσχέτιση απλότυπου με RVO					
						Crude ανάλυση		Προσαρμογή/διόρθωση για ηλικία + υπέρταση		Προσαρμογή/διόρθωση για ηλικία + υπέρταση + διαβήτης	
L	Q	Σύνολο	Μάρτυρες	RVO ασθενείς	Αθροιστική συχνότητα	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value
L	Q	0.40	0.42	0.39	0.40	1.00	-	1.00	-	1.00	-
M	Q	0.35	0.37	0.33	0.76	1.02 (0.51 - 2.03)	0.96	1.06 (0.50 - 2.25)	0.89	0.76 (0.32 - 1.78)	0.53
L	R	0.23	0.20	0.26	0.99	1.42 (0.64 - 3.14)	0.39	1.82 (0.76 - 4.38)	0.18	1.88 (0.72 - 4.90)	0.2
M	R	0.01	0.01	0.02	1	1.53 (0.08 - 30.50)	0.78	2.96 (0.16 - 54.11)	0.47	1.02 (0.05 - 22.96)	0.99

Όσον αφορά το γονίδιο *APOE*, για τη διερεύνηση της πιθανής επίδρασής του στην RVO, χωρίσαμε τους γονότυπους στις ακόλουθες υποομάδες γονότυπου: ομάδα ομοζυγωτών E3E3, ομάδα φορέων E2 (E2E2, E2E3, E2E4) και ομάδα φορέων E4 (E4E4, E3E4). Δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις μεταξύ αυτών των υποομάδων γονότυπου και της RVO στην ανάλυση δυαδικής λογιστικής παλινδρόμησης μετά την προσαρμογή/διόρθωση ως προς την ηλικία, την υπέρταση και τον διαβήτη (Πίνακας 22). Δεν βρέθηκε επίσης κάποια συσχέτιση με την RVO όταν κάθε γονότυπος *APOE* εξετάστηκε χωριστά χρησιμοποιώντας ανάλυση δυαδικής λογιστικής παλινδρόμησης.

**Πίνακας 22.** Δυαδική λογιστική παλινδρόμηση (binary logistic regression analysis) για συσχέτιση μεταξύ των ομάδων γονότυπων για το *APOE* και της απόφραξης φλέβας του αμφιβληστροειδούς (RVO).

<i>APOE</i>	Crude ανάλυση		Προσαρμογή/διόρθωση για ηλικία + υπέρταση		Προσαρμογή/διόρθωση για ηλικία + υπέρταση + διαβήτη	
	OR (95% CI) <sup>†</sup>	P-value	OR (95% CI) <sup>†</sup>	P-value	OR (95% CI) <sup>†</sup>	P-value
Ομάδες γονότυπων						
E3E3	Reference	-	Reference	-	Reference	-
E2 φορείς	0.60 (0.16- 2.30)	0.456	0.45 (0.11- 1.90)	0.275	0.49 (0.09- 2.80)	0.424
E4 φορείς	0.68 (0.21- 2.13)	0.503	0.53 (0.15- 1.90)	0.323	0.65 (0.17- 2.59)	0.545

<sup>†</sup> Εκτίμηση του OR χρησιμοποιώντας την δυαδική λογιστική παλινδρόμηση

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η ηλικία, η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης και το γλαύκωμα ανοιχτής γωνίας είναι ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη RVO, είτε αυτή είναι CRVO είτε BRVO [56]. Η BRVO έχει επίσης συνδεθεί με αρκετούς συστηματικούς παράγοντες κινδύνου, όπως δυσλιπιδαιμία, καρδιαγγειακή νόσος, αυξημένος δείκτης μάζας σώματος, αυξημένα επίπεδα ορού της πρωτεΐνης άλφα 2 σφαιρίνης που σχετίζεται με τη φλεγμονή και κατάσταση υπερπηκτικότητας. Εκτός από τον δείκτη μάζας σώματος, ο οποίος σχετίζεται στενά με την έλλειψη σωματικής δραστηριότητας, άλλοι παράγοντες του τρόπου ζωής, όπως το κάπνισμα και η διατροφή, φαίνεται να παίζουν ρόλο στην RVO. Η μεσογειακή και η φυτική διαίτα έχουν αποδειχθεί ότι μειώνουν τον κίνδυνο για RVO λόγω των αποδεδειγμένων αντιφλεγμονωδών και αντιπηκτικών τους επιδράσεων [60]. Η υπέρταση θεωρείται ως ο ισχυρότερος παράγοντας κινδύνου γιατί επιταχύνει την αρτηριακή αθηροσκλήρωση που οδηγεί σε μηχανική συμπίεση της παρακείμενης φλέβας. Αυτή η αλληλουχία γεγονότων προκαλεί μηχανική στένωση του αυλού των φλεβών με λεπτό τοίχωμα, ανώμαλη ροή αίματος και ενδοθηλιακή βλάβη, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενδοαυλικού θρόμβου και την απόφραξη [61,136]. Το οξειδωτικό στρες παίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της RVO, πυροδοτώντας την έκφραση ποικίλων μορίων προσκόλλησης, όπως το μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) και το μόριο ενδοκυτταρικής προσκόλλησης-1 (intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1), χυμοκίνες όπως χυμοελκυστική πρωτεΐνη μονοκυττάρων-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) και κυταροκίνες, όπως η ιντερλευκίνη-6 (interleukin 6, IL-6), η ιντερλευκίνη-8 (interleukin 8, IL-8) και ο VEGF [26,47,48,137–141]. Επιπλέον, η HDL χοληστερόλη, η οποία έχει αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση, έχει αναφερθεί ότι είναι χαμηλή σε ασθενείς με RVO [142], ενώ η αναλογία μονοκυττάρων/HDL έχει βρεθεί ότι είναι αυξημένη και έχει προταθεί ως νέος βιοδείκτης που υποδεικνύει φλεγμονή και οξειδωτικό στρες σε ασθενείς με BRVO [143]. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παθογένεση του RVO παραμένουν ασαφείς. Οι τρεις παράγοντες της τριάδας του Virchow, που αποτελούνται από αλλαγές στη ροή του αίματος (φλεβική στάση), αγγειακό ενδοθηλιακό τραυματισμό και υπερπηκτικότητα, εμπλέκονται στη θρομβογένεση, οδηγώντας σε RVO [59].

Πολυάριθμες μελέτες έχουν προσπαθήσει να διερευνήσουν τον πιθανό ρόλο των γενετικών πολυμορφισμών που σχετίζονται με τον θρομβοεμβολικό κίνδυνο στην RVO. Έχουν μελετηθεί αρκετοί πολυμορφισμοί γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της οδού πήξης του αίματος, συμπεριλαμβανομένης της 5,10-μεθυλένο-τετραϋδροφολικής αναγωγάσης (5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, *MTHFR*) C677T και A1298C, του παράγοντα *V Leiden* G1691A, του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1 (*plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1*) 4G/5G, του παράγοντα II (επίσης γνωστός ως προθρομβίνη) G20210A και της υπομονάδας I του συμπλέγματος εποξειδικής αναγωγάσης της βιταμίνης K (*vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, VKORC1*) G1639A, με αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με τη συσχέτιση αυτών των θρομβοφιλικών μεταλλάξεων και της RVO [64,111–114]. Σε μια πρόσφατη μετα-ανάλυση, οι Romiti et al. [64] δεν παρατήρησαν διαφορετικούς επιπολασμούς των θρομβοφιλικών γενετικών παραλλαγών των πολυμορφισμών του παράγοντα *V Leiden* G1691A, της προθρομβίνης G20210A, της *MTHFR* C677T και του *PAI-1* 4G/5G μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών με αγγειακή απόφραξη αμφιβληστροειδούς, υποδηλώνοντας ότι ο έλεγχος για τους συγκεκριμένους γενετικούς πολυμορφισμούς σε ασθενείς με απόφραξη φλέβας ή απόφραξη αρτηρίας του αμφιβληστροειδούς δε φαίνεται να είναι κλινικά χρήσιμος.

Ο πολυμορφισμός *MTHFR* C677T είναι ο πιο μελετημένος γενετικός πολυμορφισμός όσον αφορά τον πιθανό του ρόλο ως παράγοντα κινδύνου για RVO. Το γονίδιο *MTHFR* είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του βασικού ρυθμιστικού ενζύμου *MTHFR* του οποίου η δραστηριότητα καθορίζει τα επίπεδα ομοκυστεΐνης στο πλάσμα. Αρκετές μελέτες ασθενών-μαρτύρων ανέφεραν συσχέτιση μεταξύ του γονότυπου *MTHFR* 677TT και της RVO [144–148], ενώ ορισμένες άλλες μελέτες και μετα-αναλύσεις δεν αποκάλυψαν καμία συσχέτιση [64,115–120].

Κάποιοι άλλοι ερευνητές στόχευσαν να αξιολογήσουν τη συσχέτιση γενετικών πολυμορφισμών που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα τύπου I της αγγιοτενσίνης II (*angiotensin II type I receptor, AGTR1*) A1166C, του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγιοτενσίνης I (*angiotensin I – converting enzyme, ACE*) ένθεση ή έλλειψη (insertion/deletion), της γλυκοπρωτεΐνης αιμοπεταλίων Ia/IIa (*platelet glycoprotein Ia/IIa, GpIa/IIa*) C807T/G873A, της μεταλλοπρωτεϊνάσης 2 θεμέλιας ουσίας (*matrix metalloproteinase 2, MMP2*) 1306C/T, των αναστολέων ιστού της μεταλλοπρωτεϊνάσης 2 θεμέλιας ουσίας (*tissue inhibitors of matrix metalloproteinase 2, TIMP2*) G418C and της αδιπονεκτίνης +276 G/T with RVO [121–

126]. Οι Demir et al. [126] και οι Christodoulou et al. [121] πρότειναν ότι οι φορείς του αλληλόμορφου *αδιπνεκτίνης* +276 T και του αλληλόμορφου *AGTR1* 1166C είναι πιθανό να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για RVO. Ο πολυμορφισμός *MMP2* 1306C/T βρέθηκε ότι προδιαθέτει για ισχαιμία μεταξύ ασθενών με RVO [127]. Οι μελέτες οι οποίες διερεύνησαν τα υπόλοιπα προαναφερθέντα SNPs που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση παρήγαγαν αντιφατικά αποτελέσματα.

Υπάρχουν επίσης μελέτες που επέλεξαν SNPs από γονίδια που σχετίζονται με τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες, παρόμοια με τη δική μας προσέγγιση για την επιλογή γονιδίων προς μελέτη, και αξιολόγησαν την πιθανή επίδρασή τους στην εμφάνιση RVO. Η οξυγενάση της αίμης -1 είναι ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο που αναστέλλει τις προφλεγμονώδεις αποκρίσεις. Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της οξυγενάσης της αίμης-1 -413A>T και της RVO [129]. Οι Maier et al. μελέτησαν πολλαπλά SNPs από διαφορετικές κυταροκίνες, συμπεριλαμβανομένης της *ιντερλευκίνης 1β (IL-1β)* -511C>T, του *ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL1 (IL1 receptor antagonist, IL1RN)* 1018T>C, της *IL4* -584C>T, της *IL6* -174G>C, της *IL8* -251A>T, της *IL10* -592C>A, της *IL18* 183A>G, της *χυμοκίνης συνδέτη 5 μοτίβου C-C (C-C motif chemokine ligand 5, CCL5)* -403G>A, της *χυμοτακτικής πρωτεΐνης μονοκυττάρων (monocyte chemoattractant protein MCP-1/ CCL2)* -2518A>G and του παράγοντα νέκρωσης όγκων *α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)* -308G>A, ωστόσο, κανένας από αυτούς δεν φάνηκε να εμπλέκεται στην RVO [128].

Επιπλέον, προηγούμενες μελέτες έχουν εντοπίσει μια συσχέτιση μεταξύ των διαφόρων SNPs και της ανταπόκρισης στη θεραπεία στην θεραπεία με ενδοϋαλοειδικές ενέσεις anti-VEGF σε άλλες ασθένειες του αμφιβληστροειδούς, όπως η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, η πολυποειδής χοριοειδική αγγειοπάθεια και το διαβητικό οίδημα της ωχράς κηλίδας [149–151]. Ωστόσο, η επίδραση του γενετικού υποβάθρου ως προς την ανταπόκριση στη θεραπεία σε ενδοϋαλοειδικούς παράγοντες anti-VEGF σε ασθενείς με οίδημα ωχράς κηλίδας λόγω RVO δεν έχει μελετηθεί μέχρι στιγμής. Από όσο γνωρίζουμε, η τρέχουσα μελέτη είναι η πρώτη που διερευνά τη φαρμακογονιδιοματική σχετικά με την ανταπόκριση στη θεραπεία σε ενδοϋαλοειδικούς παράγοντες anti-VEGF σε ασθενείς με RVO.

Η απολιποπρωτεΐνη E (APOE) έχει αντι-αθηρογόνο δράση χρησιμεύοντας ως συνδέτης για τον υποδοχέα λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL), διευκολύνοντας έτσι την κάθαρση των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών από την κυκλοφορία και τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στο πλάσμα [101]. Η

APOE έχει επίσης γνωστές αντιφλεγμονώδεις δράσεις καταστέλλοντας την ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος και την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών από αφρώδη κύτταρα [104].

Είναι γνωστό ότι το αλληλόμορφο *APOE* E4 σχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα APOE στο πλάσμα και με αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακή νόσο. Εκτός από την αθηρογόνο φύση του, το αλληλόμορφο E4 είναι επίσης και γνωστός ισχυρός γενετικός παράγοντας κινδύνου για τη νόσο Alzheimer καθώς τα χαμηλά επίπεδα APOE στο πλάσμα έχουν ως αποτέλεσμα μειωμένη κάθαρση του β-αμυλοειδούς του εγκεφάλου [152]. Επιπλέον, το αλληλόμορφο E4 έχει εμπλακεί σε RVO και μη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια [153,154].

Αντίθετα, είναι ενδιαφέρον ότι το αλληλόμορφο E4 έχει βρεθεί ότι έχει έναν προστατευτικό ρόλο σε καθέναν από τους υποτύπους της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας (age-related macular degeneration, AMD), ο οποίος μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το APOE είναι ένα άφθονο συστατικό των αμφιβληστροειδικών drusen, που εκφράζεται τοπικά από κύτταρα Müller και το μελάγχρουν επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς [155,156].

Τα αυξημένα επίπεδα APOE έχουν συσχετιστεί θετικά με τα επίπεδα VEGF [157–159], ενώ το αλληλόμορφο *APOE* E4 έχει συσχετιστεί με καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα σε ασθενείς με ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας [160].

Στη μελέτη μας, δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του αλληλόμορφου E4 και της RVO, κάτι που ευθυγραμμίζεται με τα ευρήματα των Salomon et al. [144]. Δε βρέθηκε επίσης κάποια συσχέτιση του *APOE* με την ανταπόκριση στη θεραπεία.

Ο παράγοντας 1 που προέρχεται από στρωματικά κύτταρα (SDF-1) είναι μια ομοιοστατική χυμοκίνη. Η επαγόμενη από την υποξία γονιδιακή έκφραση και η αυξορρύθμιση του SDF-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγεί σε φλεγμονή και επακόλουθη διάσπαση του αίματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού καθώς και προαγωγή της αγγειογένεσης. Η δέσμευση του SDF-1 στον υποδοχέα του CXCR4 διεγείρει την απελευθέρωση του VEGF που με τη σειρά του προκαλεί περαιτέρω έκφραση του SDF-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός βρόχου θετικής ανάδρασης. Η οδός SDF-1/CXCR4 παίζει τον κυρίαρχο ρόλο στην κινητοποίηση ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων που προέρχονται από αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα στη διαδικασία της νεοαγγείωσης του αμφιβληστροειδούς σε ισχαιμικές ασθένειες του αμφιβληστροειδούς [105,106].



Οι Ki-I et al. [161] τεκμηρίωσαν ότι τα επίπεδα υαλοειδούς SDF-1 ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με RVO που είχε επιπλακεί με νεοαγγείωση σε σύγκριση με ασθενείς με RVO χωρίς νεοαγγείωση και με μάρτυρες. Από την άλλη πλευρά, οι Zeng et al. [162] βρήκαν συγκρίσιμες συγκεντρώσεις υαλοειδούς CXCL12 μεταξύ των ασθενών με RVO και των μαρτύρων. Οι Szigeti et al. ανέφερε ότι το αλληλόμορφο *SDF1-3'(801)A* προδιαθέτει στην ανάπτυξη οφθαλμικής νεοαγγείωσης ως επιπλοκή της RVO [132].

Από όσο γνωρίζουμε, η μελέτη μας είναι η πρώτη που διερεύνησε πιθανή συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού *SDF1-3'G(801)A* και του κινδύνου εμφάνισης RVO, ωστόσο, δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση. Επίσης, δε βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική επίδραση του πολυμορφισμού *SDF1-3'G(801)A* στην ανταπόκριση στη θεραπεία με ενδοϋαλοειδικούς παράγοντες anti-VEGF σε ασθενείς με RVO.

Η παραοξονάση 1 (PON1) είναι ένα πολυλειτουργικό ένζυμο εξαρτώμενο από το ασβέστιο, ισχυρά συνδεδεμένο με λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL), το οποίο προάγει τις αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL. Το PON1 είναι ένα ετερόκλητο ένζυμο με διαφορετικές δράσεις καθώς μπορεί να υδρολύσει διάφορα υποστρώματα. Έχει δραστηριότητα παραοξονάσης, που έχει την ικανότητα να υδρολύει τα παραοξόνια, καθώς και δραστηριότητες λακτονάσης και αρυλεστεράσης που αναστέλλουν την υπεροξειδωση της LDL. Η αντι-αθηρογόνος λειτουργία του PON1 βασίζεται, επομένως, στις δραστηριότητές λακτονάσης και αρυλεστεράσης μειώνοντας την προαθηρογόνο οξειδωμένη -LDL (ox-LDL), καθώς η ox-LDL εμπλέκεται άμεσα στον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων [97,98].

Ο Q192R είναι το πιο ευρέως μελετημένο *PON1* SNP, καθώς ασκεί μια εξαρτώμενη από το υπόστρωμα επίδραση στη δραστηριότητα-δραστηριότητα του ενζύμου της παραοξονάσης. Συγκεκριμένα, το αλλόζυμο Q192 έχει υψηλότερες αντι-αθηροσκληρωτικές δράσεις λακτονάσης και αρυλεστεράσης από το ισοένζυμο 192R, ενώ το αντίθετο ισχύει για τη δράση της παραοξονάσης καθώς το 192R είναι πιο αποτελεσματικό στην υδρόλυση του παραοξονίου σε σύγκριση με το Q192. Από την άλλη πλευρά, το L55M θεωρείται ότι επηρεάζει τις συγκεντρώσεις PON1 αλλά όχι άμεσα την ενζυματική δραστηριότητα. Το αλλόζυμο L55 σχετίζεται με αυξημένες συγκεντρώσεις PON1 στον ορό σε σύγκριση με το 55M λόγω της μεγαλύτερης σταθερότητας και αντοχής του στην πρωτεόλυση [163–165].

Οι Angayarkanni et al. [166] διαπίστωσαν ότι η δραστηριότητα της PON1-αρυλεστεράσης ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους ασθενείς με CRVO σε σχέση με

την ομάδα ελέγχου, φανερώνοντας την εμπλοκή του οξειδωτικού στρες και της ox-LDL στην CRVO. Οι Ortak et al. [167] πρότειναν μια προστατευτική επίδραση του γονότυπου LL του πολυμορφισμού L55M στην παθογένεση της RVO, ενώ δεν βρήκαν κάποιου είδους επίδραση του πολυμορφισμού Q192R στην RVO.

Το νέο εύρημα της μελέτης μας ήταν ότι η παρουσία του αλληλόμορφου M (LM + MM γονότυποι) του πολυμορφισμού *PON1* L55M συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με χειρότερα ανατομικά αποτελέσματα μετά από 12 μήνες ενδοϋαλοειδικής θεραπείας με παράγοντες anti-VEGF σε ασθενείς με RVO, ενώ ο γονότυπος LL παρείχε ευνοϊκή ανταπόκριση όσον αφορά την ανατομική βελτίωση της CST. Ωστόσο, δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού *PON1* L55M και των λειτουργικών θεραπευτικών αποτελεσμάτων ένα χρόνο μετά την έναρξη των ενδοϋαλοειδικών ενέσεων anti-VEGF.

Το άλλο εύρημα της παρούσας μελέτης, ότι οι φορείς αλληλόμορφων *PON1* 192R συσχετίστηκαν με στατιστικά σημαντικά αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης RVO σε σύγκριση με τους ομοζυγώτες QQ, είναι σύμφωνο με την προηγούμενη αναφορά των Murata et al. [168] ότι το αλληλόμορφο *PON1* 192R συσχετίστηκε σημαντικά με την CRVO. Συγκεκριμένα, στη μελέτη μας, ο λόγος σχετικών πιθανοτήτων (odds ratio, OR) για τους φορείς αλληλόμορφων *PON1* 192R ήταν 2.51 μετά την προσαρμογή/διόρθωση ως προς την ηλικία και την υπέρταση και 2.83 μετά την προσαρμογή/διόρθωση ως προς την ηλικία, την υπέρταση και τον σακχαρώδη διαβήτη. Με άλλα λόγια, οι φορείς αλληλόμορφων *PON1* 192R βρέθηκαν να έχουν 2.51 φορές και 2.81 φορές, αντίστοιχα, τον κίνδυνο εμφάνισης RVO σε σύγκριση με τους ομοζυγώτες QQ (151% και 181% αύξηση του κινδύνου, αντίστοιχα).

Τα ευρήματα της μελέτης μας και των σχετικών μελετών ασθενών-μαρτύρων για το ρόλο των γονιδίων *APOE*, *SDF-1* και *PON1* ή των κωδικοποιημένων πρωτεϊνών τους στην απόφραξη της φλέβας του αμφιβληστροειδούς συνοψίζονται στον Πίνακα 23.

**Πίνακας 23.** Σύνοψη των ευρημάτων της ασθενών-μαρτύρων μελέτης μας και των σχετικών μελετών ασθενών-μαρτύρων για το ρόλο των γονιδίων *APOE*, *SDF-1* και *PON1* ή των κωδικοποιημένων πρωτεϊνών τους στην απόφραξη της φλέβας του αμφιβληστροειδούς.

Μελέτη	Χώρα	Γενετικός πολυμορφισμός/κωδικοποιημένη πρωτεΐνη	Σχεδιασμός και σκοπός της μελέτης	Μέγεθος δείγματος	Αποτελέσματα
Mrad et al.[153]	Τυνησία	<i>APOE</i> E2, E3, E4 (SNPs: rs429358 και rs7412)	Συσχέτιση μεταξύ των κύριων αλληλόμορφων <i>APOE</i> (E2, E3, E4) και RVO	88 RVO ασθενείς, 100 μάρτυρες	Το αλληλόμορφο E4 σχετίζεται σημαντικά με την RVO (OR = 3.8, CI = 2.1 - 6.8), ενώ το αλληλόμορφο E3 είναι προστατευτικό έναντι της νόσου (OR = 0,32, CI = 0.19 - 0.53). Καμία συσχέτιση μεταξύ του αλληλόμορφου E2 και της RVO
Salomon et al.[144]	Ισραήλ	<i>APOE</i> E2, E3, E4	Συσχέτιση μεταξύ των κύριων αλληλόμορφων <i>APOE</i> (E2, E3, E4) και RVO	94 RVO ασθενείς, 92 μάρτυρες	Η ομοζυγωτία ή η ετεροζυγωτία για το αλληλόμορφο E4 δεν αποτελούν παράγοντα κινδύνου για RVO (OR = 1.32, CI = 0.61 - 2.84)
Szigeti et al.[132]	Ουγγαρία	<i>SDF1</i> -3'G(801)A πολυμορφισμός	Ρόλος του πολυμορφισμού <i>SDF1</i> -3'G(801)A στην ανάπτυξη οφθαλμικής νεοαγγείωσης (είτε του προσθίου είτε του οπισθίου	130 RVO ασθενείς, 125 μάρτυρες	Το αλληλόμορφο <i>SDF1</i> -3'(801)A προδιαθέτει στην ανάπτυξη νεοαγγείωσης ως επιπλοκή

			τμήματος του οφθαλμού) ως επιπλοκή της RVO		της RVO (OR = 2.69, CI = 1.47 - 4.93)
Ki-I et al.[161]	Ιαπωνία	Επίπεδα SDF-1 κυτταροκίνης (παράγοντας 1 που προέρχεται από στρωματικά κύτταρα) στο υαλοειδές	Σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων SDF-1 στο υαλοειδές και της νεοαγγείωσης της ίριδας ή/και της γωνίας	20 ασθενείς , 9 μάρτυρες	Τα επίπεδα υαλοειδούς SDF-1 ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με RVO επιλεγμένους με νεοαγγείωση σε σύγκριση με ασθενείς με RVO χωρίς νεοαγγείωση και με μάρτυρες
Zeng et al.[162]	Κίνα	Επίπεδα CXCL12 (C-X-C μοτίβου χυμοκίνη 12, επίσης γνωστή ως SDF-1) στο υαλοειδές	Συσχέτιση μεταξύ επιπέδων χυμοκινών στο υαλοειδές σώμα και ισχαιμικής RVO	25 ασθενείς , 20 μάρτυρες	Τα επίπεδα υαλοειδούς CXCL12 μεταξύ της ομάδας RVO και της ομάδας ελέγχου ήταν συγκρίσιμα
Murata et al.[168]	Ιαπωνία	<i>PONI</i> Q192R πολυμορφισμός	Ρόλος του πολυμορφισμού <i>PONI</i> Q192R ως παράγοντας κινδύνου για CRVO	42 CRVO ασθενείς , 45 μάρτυρες	Το αλληλόμορφο <i>PONI</i> 192R σχετίζεται σημαντικά με την CRVO
Ortak et al.[167]	Τουρκία	<i>PONI</i> Q192R και <i>PONI</i> L55M πολυμορφισμοί	Συσχέτιση των πολυμορφισμών <i>PONI</i> Q192R και <i>PONI</i> L55M με την RVO	120 RVO ασθενείς , 84 μάρτυρες	Ο γονότυπος <i>PONI</i> 55LL βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντικά λιγότερο συχνός στους ασθενείς με RVO σε

					σύγκριση με τους μάρτυρες. Δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού <i>PON1</i> Q192R και της RVO
Angayarkanni et al.[166]	Ινδία	PON1 στον ορό	Συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας PON1 αρυλεστεράσης (PON1-ARE) και της RVO	10 CRVO ασθενείς, 20 μάρτυρες	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Η δραστηριότητα PON1-ARE ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους CRVO ασθενείς σε σύγκριση με τους μάρτυρες</li> <li>•Αρνητική συσχέτιση μεταξύ PON1-ARE και επιπέδων ομοκυστεΐνης πλάσματος</li> </ul>
Ragkousis et al. [169] (στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής)	Ελλάδα	<i>APOE</i> (E2, E3, E4), <i>SDF1</i> -3'G(801)A πολυμορφισμός, <i>PON1</i> Q192R και <i>PON1</i> L55M πολυμορφισμοί	Συσχέτιση των πολυμορφισμών <i>PON1</i> , <i>APOE</i> και <i>SDF1</i> με τον κίνδυνο για RVO	50 RVO ασθενείς, 50 μάρτυρες	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Το αλληλόμορφο <i>PON1</i> 192R σχετίζεται σημαντικά με την RVO (OR = 2.83, CI = 1.01 – 7.97)</li> <li>•Καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την RVO δεν βρέθηκε για τους πολυμορφισμούς <i>APOE</i>,</li> </ul>

					<i>SDF1-3'G(801)A</i> και <i>PONI L55M</i>
--	--	--	--	--	--

Οι παρατηρούμενες αποκλίσεις στα αναφερόμενα αποτελέσματα μεταξύ των μελετών που διερευνούν τη σχέση μεταξύ RVO και αρκετών διαφορετικών γενετικών πολυμορφισμών θα μπορούσαν να αποδοθούν στη σημαντική ετερογένεια των μελετών. Αυτή η ετερογένεια περιγράφεται από εθνοτικές διαφορές, περιβαλλοντικούς παράγοντες, καθώς και συγχυτικές μεταβλητές, όπως η ηλικία και άλλοι κλινικοί παράγοντες κινδύνου. Ως εκ τούτου, η προσέγγισή μας για την προσαρμογή/διόρθωση των αποτελεσμάτων μας ως προς τα κλινικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένης της ηλικίας, της υπέρτασης και του διαβήτη, καθώς και για τον αποκλεισμό ατόμων με γλαύκωμα μπορεί να θεωρηθεί ότι ενισχύει τη μελέτη μας. Πιθανός περιορισμός της μελέτης μας ήταν το σχετικά μικρό μέγεθος δείγματος. Επιπλέον, δεν πραγματοποιήθηκε ξεχωριστή ανάλυση ασθενών με CRVO και BRVO λόγω του μεγέθους του δείγματος, αν και οι δύο τύποι RVO έχουν διαφορές στην παθοφυσιολογία και πρόγνωση. Τα ευρήματα της μελέτης μας μπορεί να μην είναι εφαρμόσιμα σε άλλες εθνοτικές ομάδες, επειδή όλοι οι συμμετέχοντες στη μελέτη μας ήταν Έλληνες και ο επιπολασμός των γενετικών παραλλαγών μπορεί να ποικίλλει μεταξύ πληθυσμών διαφορετικής καταγωγής. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί ενδοϋαλοειδικοί anti-VEGF παράγοντες, ranibizumab και aflibercept. Ωστόσο, η πρόσφατα δημοσιευμένη τυχαίοποιημένη μελέτη LEAVO σε 463 συμμετέχοντες έδειξε ότι το aflibercept δεν ήταν κατώτερο από το ranibizumab σε ασθενείς με οίδημα της ωχράς κηλίδας λόγω CRVO [32,79]. Όμως, πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η μελέτη αποτελεί μία μελέτη πραγματικών δεδομένων (real-life study) που συμπεριλαμβάνει ασθενείς που δεν είχαν προηγουμένως δεχτεί θεραπεία, ενώ η ανταπόκριση στη θεραπεία αξιολογήθηκε αντικειμενικά με τη μέτρηση της αλλαγής στο CST. Τέλος, εξετάστηκε για πρώτη φορά η πιθανή συσχέτιση μεταξύ SNPs και της ανταπόκρισης στη θεραπεία σε ενδοϋαλοειδικούς παράγοντες anti-VEGF σε ασθενείς με RVO.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Συμπερασματικά, το νέο εύρημα αυτής της διδακτορικής διατριβής είναι ότι η παρουσία του αλληλόμορφου M του *PONI* L55M SNP συσχετίστηκε με στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη μείωση της CST μετά από ενδοϋαλοειδική θεραπεία με anti-VEGF παράγοντες σε ασθενείς με οίδημα ωχράς κηλίδας λόγω RVO, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο *PONI* L55M πολυμορφισμός μπορεί να χρησιμεύσει ως ένας υποσχόμενος γενετικός βιοδείκτης για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης σε ενδοϋαλοειδικούς παράγοντες anti-VEGF. Επίσης, βρέθηκε ότι το αλληλόμορφο R του *PONI* Q192R πολυμορφισμού είναι πιθανό να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την RVO. Οι πολυμορφισμοί *APOE* και *SDF1*-3'G(801)A δε βρέθηκε ούτε να συσχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης RVO ούτε να έχουν κάποια επίδραση στην ανταπόκριση στη θεραπεία.

Αυτή είναι η πρώτη φορά που ένας γενετικός πολυμορφισμός βρέθηκε να έχει επίδραση στην ανταπόκριση στη θεραπεία με ενδοϋαλοειδικούς anti-VEGF παράγοντες σε ασθενείς με RVO. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος για να επιβεβαιώσουν τα αποτελέσματά μας και να διερευνήσουν τη συσχέτιση μεταξύ άλλων πολυμορφισμών και της ανταπόκρισης στη θεραπεία, αλλά και τη σχέση του εκάστοτε πολυμορφισμού με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Τέτοιες μελέτες όχι μόνο θα επέτρεπαν την καλύτερη κατανόηση του αντίκτυπου των γενετικών παραλλαγών στην παθογένεση της νόσου, αλλά μπορεί επίσης να εντοπίσουν νέους θεραπευτικούς στόχους και πιθανώς να οδηγήσουν σε εξατομικευμένη θεραπεία μετά από γενετικό έλεγχο των ασθενών.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Yanoff M, S.Duker J. *Ophthalmology*. 5th ed. Elsevier; 2019.
2. Bowling B. *Kanski's Clinical Ophthalmology*. 8th ed. Elsevier; 2016.
3. Khurana A, Khurana B, Khurana AK. *Comprehensive Ophthalmology 7th Edition*. Jaypee; 2019.
4. American Academy of Ophthalmology. *Basic and Clinical Science Course, Section 12: Retina and Vitreous 2020-2021*. American Academy of Ophthalmology; 2020.
5. Ansari MW, Nadeem A. *Atlas of Ocular Anatomy*. Springer; 2016
6. Damian I, Roman G, Nicoară SD. Analysis of the Choroid and Its Relationship with the Outer Retina in Patients with Diabetes Mellitus Using Binarization Techniques Based on Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(2):210.
7. Campbell JP, Zhang M, Hwang TS, et al. Detailed Vascular Anatomy of the Human Retina by Projection-Resolved Optical Coherence Tomography Angiography. *Sci Rep*. 2017;7:42201.
8. Onishi AC, Nesper PL, Roberts PK, et al. Importance of Considering the Middle Capillary Plexus on OCT Angiography in Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59(5):2167-2176.
9. Forrester J, Dick A, McMenamin P, Roberts F, Pearlman E. *The Eye, Basic Sciences in Practice*. 4th ed. Elsevier; 2016.
10. Snell RS, Lemp MA, Grunther Ira. *Clinical anatomy of the eye*. Wiley-Blackwell; 1998.
11. Λαδάς ΙΔ. *Αγγειακές Παθήσεις Του Αμφιβληστροειδούς*. Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης; 2005.
12. Fujimoto J, Swanson E. The Development, Commercialization, and Impact of Optical Coherence Tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(9):OCT1.
13. Zhang A, Zhang Q, Chen CL, Wang RK. Methods and algorithms for optical coherence tomography-based angiography: a review and comparison. *J Biomed Opt*. 2015;20(10):100901.



14. Jia Y, Tan O, Tokayer J, et al. Split-spectrum amplitude-decorrelation angiography with optical coherence tomography. *Opt Express*. 2012;20(4):4710-4725.
15. Jia Y, Bailey ST, Hwang TS, et al. Quantitative optical coherence tomography angiography of vascular abnormalities in the living human eye. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(18):E2395-402.
16. Laouri M, Chen E, Looman M, Gallagher M. The burden of disease of retinal vein occlusion: review of the literature. *Eye*. 2011;25(8):981-988.
17. Li JQ, Terheyden JH, Welchowski T, et al. Prevalence of Retinal Vein Occlusion in Europe: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ophthalmologica*. 2019;241(4):183-189.
18. Song P, Xu Y, Zha M, Zhang Y, Rudan I. Global epidemiology of retinal vein occlusion: a systematic review and meta-analysis of prevalence, incidence, and risk factors. *J Glob Health*. 2019;9(1).
19. Ip M, Hendrick A. Retinal Vein Occlusion Review. *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*. 2019;7(1):40-45.
20. Tomiyasu T, Hirano Y, Yoshida M, et al. Microaneurysms cause refractory macular edema in branch retinal vein occlusion. *Sci Rep*. 2016;6.
21. Hayreh SS. Central Retinal Vein Occlusion. *Encyclopedia of the Eye*. Elsevier; 2010:238-249.
22. Cochran ML, Mahabadi N, Czyz CN. Branch Retinal Vein Occlusion. *StatPearls*. Published online August 8, 2023. Accessed June 16, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535370/>
23. Rehak M, Wiedemann P. Retinal vein thrombosis: Pathogenesis and management. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010;8(9):1886-1894.
24. Romano F, Lamanna F, Gabrielle PH, et al. Update on Retinal Vein Occlusion. *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*. 2023;12(2):196-210.
25. Karia N. Retinal vein occlusion: pathophysiology and treatment options. *Clin Ophthalmol*. 2010;4(1):809.
26. Tang Y, Cheng Y, Wang S, Wang Y, Liu P, Wu H. Review: The Development of Risk Factors and Cytokines in Retinal Vein Occlusion. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:1728.
27. Nicholson L, Talks SJ, Amoaku W, Talks K, Sivaprasad S. Retinal vein occlusion (RVO) guideline: executive summary. *Eye*. 2022;36(5):909-912.

28. Giocanti-Aurégan A, Donati S, Hoerauf H, et al. Real-World Management of Macular Edema Secondary to Retinal Vein Occlusion with Intravitreal Aflibercept: 24-month Results from the AURIGA Observational Study. *Ophthalmol Ther.* 2024;13(1):179-203.
29. Clarkson JG. Central Vein Occlusion Study: photographic protocol and early natural history. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1994;92:203-13; discussion 213-5.
30. Rosenberg NR. Argon laser scatter photocoagulation for prevention of neovascularization and vitreous hemorrhage in branch vein occlusion. A randomized clinical trial. Branch Vein Occlusion Study Group. *Arch Ophthalmol.* 1986;104(1):34-41.
31. Retinal Vein Occlusion (RVO) Guidelines | The Royal College of Ophthalmologists. Accessed June 16, 2024. <https://www.rcophth.ac.uk/resources-listing/retinal-vein-occlusion-rvo-guidelines/>
32. Nicholson L, Vazquez-Alfageme C, Patrao N V., et al. Retinal Nonperfusion in the Posterior Pole Is Associated With Increased Risk of Neovascularization in Central Retinal Vein Occlusion. *Am J Ophthalmol.* 2017;182:118-125.
33. Tsui I, Kaines A, Havunjian MA, et al. Ischemic index and neovascularization in central retinal vein occlusion. *Retina.* 2011;31(1):105-110.
34. Minturn J, Brown GC. Progression of nonischemic central retinal vein obstruction to the ischemic variant. *Ophthalmology.* 1986;93(9):1158-1162.
35. Hayreh SS, Rojas P, Podhajsky P, Montague P, Woolson RF. Ocular neovascularization with retinal vascular occlusion-III. Incidence of ocular neovascularization with retinal vein occlusion. *Ophthalmology.* 1983;90(5):488-506.
36. Quinlan PM, Elman MJ, Bhatt AK, Mardesich P, Enger C. The natural course of central retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol.* 1990;110(2):118-123.
37. Schmidt-Erfurth U, Garcia-Arumi J, Gerendas BS, et al. Guidelines for the Management of Retinal Vein Occlusion by the European Society of Retina Specialists (EURETINA). *Ophthalmologica.* 2019;242(3):123-162.
38. Hayreh SS. The CVOS Group M and N reports. *Ophthalmology.* 1996;103(3).
39. Clarkson JC. Natural history and clinical management of central retinal vein occlusion. The Central Vein Occlusion Study Group. *Arch Ophthalmol.* 1997;115(4):486-491.

40. Kaye SB, Harding SP. Early electroretinography in unilateral central retinal vein occlusion as a predictor of rubeosis iridis. *Arch Ophthalmol.* 1988;106(3):353-356.
41. Breton ME, Quinn GE, Keene SS, Dahmen JC, Brucker AJ. Electroretinogram parameters at presentation as predictors of rubeosis in central retinal vein occlusion patients. *Ophthalmology.* 1989;96(9):1343-1352.
42. Hayreh SS, Klugman MR, Podhajsky P, Kolder HE. Electroretinography in central retinal vein occlusion. Correlation of electroretinographic changes with pupillary abnormalities. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1989;227(6):549-561.
43. Sabates R, Hirose T, Mcmeel JW. Electroretinography in the prognosis and classification of central retinal vein occlusion. *Arch Ophthalmol.* 1983;101(2):232-235.
44. Berger AR, Cruess AF, Altomare F, et al. Optimal Treatment of Retinal Vein Occlusion: Canadian Expert Consensus. *Ophthalmologica.* 2015;234(1):6-25.
45. Ehlers JP, Fekrat S. Retinal vein occlusion: beyond the acute event. *Surv Ophthalmol.* 2011;56(4):281-299.
46. Browning DJ. Retinal vein occlusions: Evidence-based management. *Retinal Vein Occlusions: Evidence-Based Management.* Springer; 2012:1-387.
47. Wang B, Zhang X, Chen H, Koh A, Zhao C, Chen Y. A Review of Intraocular Biomolecules in Retinal Vein Occlusion: Toward Potential Biomarkers for Companion Diagnostics. *Front Pharmacol.* 2022;13:1269.
48. Minaker SA, Mason RH, Bamakrid M, Lee Y, Muni RH. Changes in Aqueous and Vitreous Inflammatory Cytokine Levels in Retinal Vein Occlusion: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Vitreoretin Dis.* 2019;4(1):36-64.
49. Vinores SA, Derevjanik NL, Ozaki H, Okamoto N, Campochiaro PA. Cellular mechanisms of blood-retinal barrier dysfunction in macular edema. *Doc Ophthalmol.* 1999;97(3-4):217-228.
50. Greenberg JI, Shields DJ, Barillas SG, et al. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature.* 2008;456(7223):809-814.
51. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9(6):669-676.

52. McAllister IL, Vijayasekaran S, Chen SD, Yu DY. Effect of triamcinolone acetonide on vascular endothelial growth factor and occludin levels in branch retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol.* 2009;147(5).
53. Edelman JL, Lutz D, Castro MR. Corticosteroids inhibit VEGF-induced vascular leakage in a rabbit model of blood-retinal and blood-aqueous barrier breakdown. *Exp Eye Res.* 2005;80(2):249-258.
54. Barnes PJ. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol.* 2006;148(3):245-254.
55. Moore J, Bagley S, Ireland G, McLeod D, Boulton ME. Three dimensional analysis of microaneurysms in the human diabetic retina. *J Anat.* 1999;194 ( Pt 1)(Pt 1):89-100.
56. Penman AD, Crowder KW, Watkins WM. Risk Factors for Branch and Central Retinal Vein Occlusion: The Eye Disease Case-Control Study. *50 Studies Every Ophthalmologist Should Know.* Published online May 2020:115-120.
57. Risk factors for branch retinal vein occlusion. The Eye Disease Case-Control Study Group. *Am J Ophthalmol.* 1993;116:286-296.
58. Risk Factors for Central Retinal Vein Occlusion. The Eye Disease Case-Control Study Group. *Archives of Ophthalmology.* 1996;114(5):545-554.
59. Zhang XT, Zhong YF, Xue YQ, et al. Clinical Features of Central Retinal Vein Occlusion in Young Patients. *Ophthalmol Ther.* 2022;11(4):1409-1422.
60. Lendzioszek M, Mrugacz M, Bryl A, Poppe E, Zorena K. Prevention and Treatment of Retinal Vein Occlusion: The Role of Diet—A Review. *Nutrients.* 2023;15(14):3237.
61. Hashimoto Y, Kaneko H, Okada A, et al. Association between Retinal Vein Occlusion and Life's Simple 7 Cardiovascular Health Metrics: A Large Claims Database Study. *Ophthalmol Retina.* 2022;6(8):684-692.
62. Marcinkowska A, Cisiecki S, Rozalski M. Platelet and Thrombophilia-Related Risk Factors of Retinal Vein Occlusion. *J Clin Med.* 2021;10(14):3080.
63. Ørskov M, Vorum H, Bjerregaard Larsen T, et al. A review of risk factors for retinal vein occlusions. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2022;20(9):761-772.
64. Romiti GF, Corica B, Borgi M, et al. Inherited and acquired thrombophilia in adults with retinal vascular occlusion: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2020;18(12):3249-3266.

65. Tait C, Baglin T, Watson H, et al. Guidelines on the investigation and management of venous thrombosis at unusual sites. *Br J Haematol*. 2012;159(1):28-38.
66. Haydinger CD, Ferreira LB, Williams KA, Smith JR. Mechanisms of macular edema. *Front Med (Lausanne)*. 2023;10.
67. Daruich A, Matet A, Moulin A, et al. Mechanisms of macular edema: Beyond the surface. *Prog Retin Eye Res*. 2018;63:20-68.
68. Jee D, Park S, Kwon JW. Subretinal fluid in macular edema secondary to branch retinal vein occlusion. *Scientific Reports*. 2024;14(1):1-6.
69. Yamaguchi Y, Otani T, Kishi S. Serous macular detachment in branch retinal vein occlusion. *Retina*. 2006;26(9):1029-1033.
70. Otani T, Yamaguchi Y, Kishi S. Movement of intraretinal fluid from distant branch retinal vein occlusion to the submacular space. *Clinical Ophthalmology*. 2013;7(1):81-86.
71. Noma H, Funatsu H, Mimura T. Vascular Endothelial Growth Factor and Interleukin-6 are Correlated With Serous Retinal Detachment in Central Retinal Vein Occlusion. *Curr Eye Res*. 2012;37(1):62-67.
72. Clark WL, Boyer DS, Heier JS, et al. Intravitreal Aflibercept for Macular Edema Following Branch Retinal Vein Occlusion. *Ophthalmology*. 2016;123(2):330-336.
73. Korobelnik JF, Holz FG, Roeder J, et al. Intravitreal Aflibercept Injection for Macular Edema Resulting from Central Retinal Vein Occlusion: One-Year Results of the Phase 3 GALILEO Study. *Ophthalmology*. 2014;121(1):202-208.
74. Heier JS, Clark WL, Boyer DS, et al. Intravitreal aflibercept injection for macular edema due to central retinal vein occlusion: two-year results from the COPERNICUS study. *Ophthalmology*. 2014;121(7).
75. Brown DM, Campochiaro PA, Singh RP, et al. Ranibizumab for Macular Edema following Central Retinal Vein Occlusion: Six-Month Primary End Point Results of a Phase III Study. *Ophthalmology*. 2010;117(6):1124-1133.e1.
76. Campochiaro PA, Heier JS, Feiner L, et al. Ranibizumab for macular edema following branch retinal vein occlusion: six-month primary end point results of a phase III study. *Ophthalmology*. 2010;117(6).
77. Γαληνός - Δραστική ουσία - Ρανιμπιζουμάμπη - Γενικά. Accessed June 26, 2024. <https://www.galinos.gr/web/drugs/main/substances/ranibizumab>

78. Γαληνός - Δραστική ουσία - Αφλιβερσέπτη - Γενικά. Accessed June 26, 2024. <https://www.galinos.gr/web/drugs/main/substances/aflibercept>
79. Hykin P, Prevost AT, Vasconcelos JC, et al. Clinical Effectiveness of Intravitreal Therapy With Ranibizumab vs Aflibercept vs Bevacizumab for Macular Edema Secondary to Central Retinal Vein Occlusion: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Ophthalmol.* 2019;137(11):1256-1264.
80. Argon Laser Photocoagulation for Macular Edema in Branch Vein Occlusion. *Am J Ophthalmol.* 1984;98(3):271-282.
81. Haller JA, Bandello F, Belfort R, et al. Randomized, sham-controlled trial of dexamethasone intravitreal implant in patients with macular edema due to retinal vein occlusion. *Ophthalmology.* 2010;117(6).
82. Scott IU, Ip MS, VanVeldhuisen PC, et al. A Randomized Trial Comparing the Efficacy and Safety of Intravitreal Triamcinolone With Standard Care to Treat Vision Loss Associated With Macular Edema Secondary to Branch Retinal Vein Occlusion: The Standard Care vs Corticosteroid for Retinal Vein Occlusion (SCORE) Study Report 6. *Archives of ophthalmology.* 2009;127(9):1115.
83. Chatziralli I, Nicholson L, Sivaprasad S, Hykin P. Intravitreal steroid and anti-vascular endothelial growth agents for the management of retinal vein occlusion: evidence from randomized trials. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(12):1685-1697.
84. Garweg JG, Zandi S. Retinal vein occlusion and the use of a dexamethasone intravitreal implant (Ozurdex®) in its treatment. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.* 2016;254(7):1257-1265.
85. Chin EK, Almeida DRP, Velez G, et al. Ocular Hypertension after Intravitreal Dexamethasone (Ozurdex) Sustained-Release Implant. *Retina.* 2017;37(7):1345.
86. Lynds R, He YG, Whitson JT. The effect of dexamethasone intravitreal implant on intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(7):1983-1983.
87. Hunter A, Williams M. Long-term outcomes for patients treated for macular oedema secondary to retinal vein occlusion: a systematic review. *BMJ Open Ophthalmol.* 2022;7(1):e001010.
88. Ip MS, Oden NL, Scott IU, et al. Month 12 Outcomes After Treatment Change at Month 6 Among Poor Responders to Aflibercept or Bevacizumab in Eyes With Macular Edema Secondary to Central or Hemiretinal Vein Occlusion: A

- Secondary Analysis of the SCORE2 Study. *JAMA Ophthalmol.* 2019;137(3):281-287.
89. Chatziralli I, Kazantzis D, Kroupis C, et al. The impact of laboratory findings and optical coherence tomography biomarkers on response to intravitreal anti-VEGF treatment in patients with retinal vein occlusion. *Int Ophthalmol.* 2022;42(11):3449-3457.
  90. Ozkaya A, Tulu B, Garip R. Aflibercept in macular edema secondary to retinal vein occlusion: A real life study. *Saudi Journal of Ophthalmology.* 2017;31(4):211-215.
  91. Kailar RS, Kuo BL, Perkins SW, Singh RP. Long-Term Outcomes in Early vs. Limited Response to Anti-VEGF Treatment for Retinal Vein Occlusion. *Ophthalmology Retina* . 2023;0(0).
  92. Hirano Y, Suzuki N, Tomiyasu T, et al. Multimodal Imaging of Microvascular Abnormalities in Retinal Vein Occlusion. *Journal of Clinical Medicine.* 2021;10(3):405.
  93. Sheyman A, Fawzi AA, eds. *Retinal Vascular Disease*. Springer Nature Singapore; 2020.
  94. Stefánsson E. The therapeutic effects of retinal laser treatment and vitrectomy. A theory based on oxygen and vascular physiology. *Acta Ophthalmol Scand.* 2001;79(5):435-440.
  95. Lüke J, Nassar K, Lüke M, Grisanti S. Ranibizumab as adjuvant in the treatment of rubeosis iridis and neovascular glaucoma--results from a prospective interventional case series. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2013;251(10):2403-2413.
  96. Davidorf FH, Mouser JG, Derick RJ. Rapid improvement of rubeosis iridis from a single bevacizumab (Avastin) injection. *Retina.* 2006;26(3):354-356.
  97. Eren E, Yilmaz N, Aydin O. Functionally defective high-density lipoprotein and paraoxonase: a couple for endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Cholesterol.* 2013;2013.
  98. Mackness M, Mackness B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene.* 2015;567(1):12.
  99. Kotur-Stevuljević J, Vekić J, Stefanović A, et al. Paraoxonase 1 and atherosclerosis-related diseases. *Biofactors.* 2020;46(2):193-205.

100. Moya C, Máñez S. Paraoxonases: metabolic role and pharmacological projection. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2018;391(4):349-359.
101. Marais AD. Apolipoprotein E and Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2021;23(7):1-11.
102. Curtiss LK, Boisvert WA. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11(3):243-251.
103. Greenow K, Pearce NJ, Ramji DP. The key role of apolipoprotein e in atherosclerosis. *J Mol Med.* 2005;83(5):329-342.
104. Puthia M, Marzinek JK, Petruk G, Bergdahl GE, Bond PJ, Petrlova J. Antibacterial and Anti-Inflammatory Effects of Apolipoprotein E. *Biomedicines.* 2022;10(6):1430.
105. Silva RL e, Shen J, Hackett SF, et al. The SDF-1/CXCR4 ligand/receptor pair is an important contributor to several types of ocular neovascularization. *The FASEB Journal.* 2007;21(12):3219-3230.
106. Sadri F, Rezaei Z, Fereidouni M. The significance of the SDF-1/CXCR4 signaling pathway in the normal development. *Mol Biol Rep.* 2022;49(4):3307-3320.
107. Li JH, Li Y, Huang D, Yao M. Role of Stromal Cell-Derived Factor-1 in Endothelial Progenitor Cell-Mediated Vascular Repair and Regeneration. *Tissue Eng Regen Med.* 2021;18(5):747-758.
108. Balligand JL, Feron O, Dessy C. eNOS activation by physical forces: From short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev.* 2009;89(2):481-534.
109. Kazantzis D, Machairoudia G, Kroupis C, Theodossiadis G, Theodossiadis P, Chatziralli I. Complete Blood Count-Derived Inflammation Indices and Retinal Vein Occlusion: A Case–Control Study. *Ophthalmol Ther.* 2022;11(3):1241-1249.
110. Kolar P. Risk Factors for Central and Branch Retinal Vein Occlusion: A Meta-Analysis of Published Clinical Data. *J Ophthalmol.* 2014;2014(1):724780.
111. Rehak M, Rehak J, Müller M, et al. The prevalence of activated protein C (APC) resistance and factor V Leiden is significantly higher in patients with retinal vein occlusion without general risk factors. Case-control study and meta-analysis. *Thromb Haemost.* 2008;99(5):925-929.



112. Yioti GG, Panagiotou OA, Vartholomatos GA, et al. Genetic polymorphisms associated with retinal vein occlusion: a Greek case-control study and meta-analysis. *Ophthalmic Genet.* 2013;34(3):130-139.
113. Weger M, Steinbrugger I, Renner W, et al. Role of the Vitamin K Epoxide Reductase Complex Subunit 1 (VKORC1) -1639G>A Gene Polymorphism in Patients with Retinal Vein Occlusion. *Curr Eye Res.* 2013;38(12):1278-1282.
114. Ortak H, Sogut E, Demir H, Ardagil A, Benli I, Sahin S. Predictive value of the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 G-1639A and C1173T single nucleotide polymorphisms in retinal vein occlusion. *Clin Exp Ophthalmol.* 2012;40(7):743-748.
115. McGimpsey SJ, Woodside J V., Cardwell C, Cahill M, Chakravarthy U. Homocysteine, Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism, and Risk of Retinal Vein Occlusion: A Meta-analysis. *Ophthalmology.* 2009;116(9):1778-1787.e1.
116. Li D, Zhou M, Peng X, Sun H. Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, and risk of retinal vein occlusion: An updated meta-analysis. *BMC Ophthalmol.* 2014;14(1):1-11.
117. Cahill MT, Stinnett SS, Fekrat S. Meta-analysis of plasma homocysteine, serum folate, serum vitamin B12, and thermolabile MTHFR genotype as risk factors for retinal vascular occlusive disease. *Am J Ophthalmol.* 2003;136(6):1136-1150.
118. Janssen MCH, den Heijer M, Cruysberg JRM, Wollersheim H, Bredie SJH. Retinal vein occlusion: a form of venous thrombosis or a complication of atherosclerosis? A meta-analysis of thrombophilic factors. *Thromb Haemost.* 2005;93(6):1021-1026.
119. Mrad M, Wathek C, Saleh M Ben, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (A1298C and C677T) polymorphisms with retinal vein occlusion in Tunisian patients. *Transfusion and Apheresis Science.* 2014;50(2):283-287.
120. Giannaki K, Politou M, Rouvas A, et al. Retinal vein occlusion. *Blood Coagulation & Fibrinolysis.* 2013;24(3):279-283.
121. Christodoulou A, Bagli E, Gazouli M, Moschos MM, Kitsos G. Genetic polymorphisms associated with the prevalence of retinal vein occlusion in a Greek population. *Int Ophthalmol.* 2019;39(11):2637-2648.

122. Kutluturk I, Karagoz A, Bezgin T, et al. Relationship between angiotensin I-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism and retinal vein occlusion. *Thromb J*. 2014;12:17.
123. Gadelha T, Biancardi AL, Forster M, Spector N. 807C/T polymorphism in platelet glycoprotein Ia gene is not associated with retinal vein occlusion. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2007;245(11):1739-1740.
124. Dodson PM, Haynes J, Starczynski J, et al. The platelet glycoprotein Ia/IIa gene polymorphism C807T/G873A: a novel risk factor for retinal vein occlusion. *Eye*. 2003;17(6):772-777.
125. Ortak H, Demir S, Ates O, Sogut E, Alim S, Benli I. Association of MMP2-1306C/T and TIMP2G-418C polymorphisms in retinal vein occlusion. *Exp Eye Res*. 2013;113:151-155.
126. Demir S, Ortak H, Benli I, et al. GENETIC ASSOCIATION BETWEEN ARTERIAL STIFFNESS-RELATED GENE POLYMORPHISMS IN BRVO AND CRVO PATIENTS IN A TURKISH POPULATION. *Retina*. 2015;35(10):2043-2051.
127. Christodoulou A, Bagli E, Gazouli M, Moschos MM, Kitsos G. Association of MMP2-1306C/T Polymorphism with Ischemic Retinal Vein Occlusion. *Arch Med Res*. 2020;51(7):710-713.
128. Maier R, Steinbrugger I, Haas A, et al. Role of Inflammation-Related Gene Polymorphisms in Patients with Central Retinal Vein Occlusion. *Ophthalmology*. 2011;118(6):1125-1129.
129. Posch-Pertl L, List W, Michelitsch M, et al. Heme oxygenase-1 gene rs2071746 polymorphism in retinal vein occlusion. *Ophthalmic Genetics*. 2022;43(5):627-632.
130. Cozzi L, Campolo J, Parolini M, et al. Paraoxonase 1 L55M, Q192R and paraoxonase 2 S311C alleles in atherothrombosis. *Mol Cell Biochem*. 2013;374(1-2):233-238.
131. Zama T, Murata M, Matsubara Y, et al. A <sup>192</sup> Arg Variant of the Human Paraoxonase (*HUMPONA*) Gene Polymorphism Is Associated With an Increased Risk for Coronary Artery Disease in the Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(12):3565-3569.

132. Szigeti A, Ecsedy M, Schneider M, et al. Stromal Cell-Derived Factor 1 Polymorphism in Retinal Vein Occlusion. Wallace GR, ed. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166544-e0166544.
133. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res*. 1990;31(3):545-548.
134. Oh MJ, Chung EK, Shin YM, Lee KO, Park YS. The apolipoprotein E genotyping using the PCR-RFLP was useful to linkage analysis of Alzheimer's disease families. *Experimental & Molecular Medicine*. 1997;29(3):161-164.
135. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22(15):1928-1929.
136. Lee JH, Kim SH, Kim EA. Influence of Smoking and Controlled Medical Conditions on the Risks of Branch Retinal Vein Occlusion in South Korea: A Population-Based Study. *Ophthalmic Epidemiology*. 2024 Mar 20:1-8.
137. Yao J, Chen Z, Yang Q, et al. Proteomic analysis of aqueous humor from patients with branch retinal vein occlusion-induced macular edema. *Int J Mol Med*. 2013;32(6):1421-1434.
138. Chan TC, Wilkinson Berka JL, Deliyanti D, et al. The role of reactive oxygen species in the pathogenesis and treatment of retinal diseases. *Exp Eye Res*. 2020;201:108255.
139. Noma H, Yasuda K, Shimura M. Cytokines and the Pathogenesis of Macular Edema in Branch Retinal Vein Occlusion. *J Ophthalmol*. 2019:5185128.
140. Altinisik M, Koytak A, Elbay A, Toklu E, Sezer T, Kocyigit A. Oxidant-Antioxidant Balance in the Aqueous Humor of Patients with Retinal Vein Occlusion. *Semin Ophthalmol*. 2018;33(5):675-682.
141. Posch-Pertl L, Weger M, Pinter-Hausberger S, et al. SERUM LEVELS OF ANTIBODIES AGAINST OXIDATION-SPECIFIC EPITOPES ARE DECREASED IN PATIENTS WITH RETINAL VEIN OCCLUSION. *Retina*. 2021;41(6):1193-1201.
142. Kim J, Lim DH, Han K, et al. Retinal Vein Occlusion is Associated with Low Blood High-Density Lipoprotein Cholesterol: A Nationwide Cohort Study. *Am J Ophthalmol*. 2019;205:35-42.
143. Şatırtav G, Mirza E, Oltulu R, Mirza GD, Kerimoğlu H. Assessment of Monocyte/HDL Ratio in Branch Retinal Vein Occlusion. *Ocul Immunol Inflamm*. 2020;28(3):463-467.

144. Salomon O, Moisseiev J, Rosenberg N, et al. Analysis of genetic polymorphisms related to thrombosis and other risk factors in patients with retinal vein occlusion. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 1998;9(7):617-622.
145. Marcucci R, Giusti B, Betti I, et al. Genetic determinants of fasting and post-methionine hyperhomocysteinemia in patients with retinal vein occlusion. *Thromb Res*. 2003;110(1):7-12.
146. Risse F, Frank RD, Weinberger AWA. Thrombophilia in patients with retinal vein occlusion: a retrospective analysis. *Ophthalmologica*. 2014;232(1):46-52.
147. Russo P Dello, Damante G, Pasca S, Turello M, Barillari G. Thrombophilic Mutations as Risk Factor for Retinal Vein Occlusion: A Case–Control Study. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2014;21(4):373-377.
148. Ferrazi P, Di Micco P, Quaglia I, et al. Homocysteine, MTHFR C677T gene polymorphism, folic acid and vitamin B 12 in patients with retinal vein occlusion. *Thromb J*. 2005;3.
149. Cobos E, Recalde S, Anter J, et al. Association between CFH, CFB, ARMS2, SERPINF1, VEGFR1 and VEGF polymorphisms and anatomical and functional response to ranibizumab treatment in neovascular age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol*. 2018;96(2):e201-e212.
150. Díaz-Villamarín X, Blánquez-Martínez D, Pozo-Agundo A, et al. Genetic Variants Affecting Anti-VEGF Drug Response in Polypoidal Choroidal Vasculopathy Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Genes*. 2020;11(11):1335.
151. Gurung RL, Fitzgerald LM, Liu E, et al. Identifying Genetic Biomarkers Predicting Response to Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Injections in Diabetic Macular Edema. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(7):4042.
152. Rasmussen KL, Tybjærg-Hansen A, Nordestgaard BG, Frikke-Schmidt R. Plasma levels of apolipoprotein E, APOE genotype, and all-cause and cause-specific mortality in 105 949 individuals from a white general population cohort. *Eur Heart J*. 2019;40(33):2813-2824.
153. Mrad M, Fekih-Mrissa N, Wathek C, et al. Role of the Apolipoprotein E Polymorphisms in the Development of Retinal Vein Occlusion in a Tunisian Population: A Case–Control Study. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2017;23(6):645-651.

154. Liew G, Shankar A, Jie JW, et al. Apolipoprotein E Gene Polymorphisms and Retinal Vascular Signs: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Archives of Ophthalmology*. 2007;125(6):813-818.
155. Hu ML, Quinn J, Xue K. Interactions between Apolipoprotein E Metabolism and Retinal Inflammation in Age-Related Macular Degeneration. *Life*. 2021;11(7):635.
156. Xiyang M, Wenbo W, Wangyi F, Qinghuai L. Association of Apolipoprotein E Polymorphisms with Age-related Macular Degeneration Subtypes: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *Arch Med Res*. 2017;48(4):370-377.
157. Antes R, Salomon-Zimri S, Beck S, et al. VEGF Mediates ApoE4-Induced Neovascularization and Synaptic Pathology in the Choroid and Retina. *Curr Alzheimer Res*. 2015;12(4):323-334.
158. Masuda T, Shimazawa M, Hashimoto Y, et al. Apolipoprotein E2 and E3, but Not E4, Promote Retinal Pathologic Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(2):1208-1217.
159. Provias J, Jeynes B. Correlation Analysis of Capillary APOE, VEGF and eNOS Expression in Alzheimer Brains. *Curr Alzheimer Res*. 2012;8(2):197-202.
160. Bakbak B, Ozturk BT, Zamani AG, et al. Association of Apolipoprotein E Polymorphism with Intravitreal Ranibizumab Treatment Outcomes in Age-Related Macular Degeneration. *Curr Eye Res*. 2015;41(6):862-866.
161. Ki-I Y, Arimura N, Noda Y, et al. Stromal-Derived Factor-1 and Inflammatory Cytokines in Retinal Vein Occlusion. *Curr Eye Res*. 2007;32(12):1065-1072.
162. Zeng Y, Cao D, Yu H, et al. Comprehensive analysis of vitreous chemokines involved in ischemic retinal vein occlusion. *Mol Vis*. 2019;25:756.
163. Kunachowicz D, Ściskalska M, Kepinska M. Modulatory Effect of Lifestyle-Related, Environmental and Genetic Factors on Paraoxonase-1 Activity: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2023;20(4):2813.
164. Durrington PN, Bashir B, Soran H. Paraoxonase 1 and atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*. 2023;10:1065967.
165. Valencia C SY, Isaza M CA, Henao B J, Beltrán A L, Loango N, Landázuri P. Arylesterase activity of paraoxonase 1 (PON1) on HDL3 and HDL2: Relationship with Q192R, C-108T, and L55M polymorphisms. *Biochem Biophys Rep*. 2021;26:100971.

166. Angayarkanni N, Barathi S, Seethalakshmi T, et al. Serum PON1 arylesterase activity in relation to hyperhomocysteinaemia and oxidative stress in young adult central retinal venous occlusion patients. *Eye*. 2008;22(7):969-974.
167. Ortak H, Söğüt E, Ateş O, et al. Protective effect of paraoxonase 1 gene variant L55M in retinal vein occlusion. *Mol Vis*. 2013;19:486-xxx.
168. Murata M, Nakagawa M, Takahashi S. Molecular Variant of the Human Paraoxonase/Arylesterase Gene Is Associated with Central Retinal Vein Occlusion in the Japanese Population. *Ophthalmologica*. 1998;212(4):257-259.
169. Ragkousis A, Kazantzis D, Georgalas I, Theodossiadis P, Kroupis C, Chatziralli I. PON1, APOE and SDF-1 Gene Polymorphisms and Risk of Retinal Vein Occlusion: A Case-Control Study. *Genes*. 2024;15(6):712.

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

## Σκοπός

Πολυάριθμες μελέτες έχουν προσπαθήσει να αξιολογήσουν τον πιθανό ρόλο γονιδίων που σχετίζονται με τη θρομβοφιλία στην απόφραξη της φλέβας του αμφιβληστροειδούς (retinal vein occlusion, RVO). Ωστόσο, υπάρχει περιορισμένη έρευνα γύρω από γονίδια που σχετίζονται με διαφορετικούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς εμπλεκόμενους στην RVO. Λόγω της ισχυρής συμβολής του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής στην παθογένεση της RVO, ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να διερευνήσει τη συσχέτιση κάποιων πολυμορφισμών από τρία διαφορετικά γονίδια [*απολιποπρωτεΐνη E (apolipoprotein E, APOE)*, *παραοξονάση 1 (paraoxonase 1, PON1)* και *παράγοντας 1 που προέρχεται από τα στρωματικά κύτταρα (stromal cell-derived factor 1, SDF-1)*], τα οποία σχετίζονται με τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες, με τον κίνδυνο εμφάνισης RVO στον ελληνικό πληθυσμό. Ένας άλλος σκοπός αυτής της διδακτορικής διατριβής ήταν να προσδιοριστεί εάν οι συγκεκριμένοι γενετικοί πολυμορφισμοί επηρεάζουν την ανταπόκριση στη θεραπεία με ενδοϋαλοειδικούς anti-VEGF παράγοντες σε ασθενείς με οίδημα της ωχράς κηλίδας λόγω απόφραξης φλέβας αμφιβληστροειδούς.

## Μέθοδοι

Οι συμμετέχοντες σε αυτή τη διδακτορική διατριβή ήταν 50 ασθενείς με RVO και οίδημα της ωχράς κηλίδας λόγω της RVO (ομάδα RVO) και 50 υγιείς εθελοντές (ομάδα ελέγχου). Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ενδοϋαλοειδικές ενέσεις ranibizumab ή aflibercept και παρακολούθηθηκαν για 12 μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας. Συλλέχθηκαν δείγματα αίματος σε σωλήνες EDTA και απομονώθηκε γενωμικό DNA. Πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση των πολυμορφισμών rs854560 (L55M) και rs662 (Q192R) για το γονίδιο *PON1*, rs429358 και rs7412 για το γονίδιο *APOE* και rs1801157 [SDF1-3'G(801)A] για το γονίδιο *SDF-1* στο εργαστήριο χρησιμοποιώντας τη μέθοδο polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).

## Αποτελέσματα

Το γενετικό μοντέλο επικρατούς κληρονομικότητας της ανάλυσης συσχέτισης πολυμορφισμού-νόσου για το μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό *PON1* Q192R αποκάλυψε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας RVO και της ομάδας ελέγχου. Συγκεκριμένα, μετά από προσαρμογή για την ηλικία και την

υπέρταση, το αλληλόμορφο *PON1* 192 R (γονότυποι QR + RR) βρέθηκε να σχετίζεται με στατιστικά σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο RVO σε σύγκριση με τον γονότυπο QQ (OR = 2.51, 95% CI = 1.02-6.14,  $p = 0.04$ ). Τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα διατηρήθηκαν μετά τη συμπερίληψη του διαβήτη στο πολυπαραγοντικό μοντέλο μαζί με την ηλικία και την υπέρταση (OR = 2.83, 95% CI = 1.01-7.97,  $p = 0.042$ ). Δεν αποκαλύφθηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των άλλων πολυμορφισμών που μελετήθηκαν και του κινδύνου RVO. Η ανάλυση απλότυπου για τους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς του γονιδίου *PON1*, L55M και Q192R, δεν αποκάλυψε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Αναφορικά με την ανταπόκριση στη θεραπεία, οι ασθενείς με γονότυπο LL του πολυμορφισμού *PON1* L55M είχαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη μείωση στο πάχος του κεντρικού υποπεδίου (central subfield thickness, CST) στην οπτική τομογραφία συνοχής (optical coherence tomography, OCT) τον 12ο μήνα μετά την έναρξη της ενδοϋαλοειδικής θεραπείας με anti-VEGF παράγοντες ( $101.63 \pm 56.80$   $\mu\text{m}$  για το γονότυπο LL έναντι  $72.44 \pm 39.41$   $\mu\text{m}$  για το γονότυπο LM έναντι  $40.25 \pm 19.33$   $\mu\text{m}$  για το γονότυπο MM,  $p = 0.026$ ). Οι ασθενείς με το αλληλόμορφο M του *PON1* L55M συσχετίστηκαν στατιστικά σημαντικά με χαμηλότερη μείωση του CST σε σύγκριση με τους μη φορείς ( $68.29 \pm 38.77$   $\mu\text{m}$  για τους γονότυπους LM + MM έναντι  $101.63 \pm 56.80$   $\mu\text{m}$  για το γονότυπο LL,  $p = 0.032$ ).

### **Συμπεράσματα**

Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι το αλληλόμορφο R του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού *PON1* Q192R είναι πιθανό να παίζει ρόλο ως παράγοντας κινδύνου για απόφραξη φλέβας του αμφιβληστροειδούς. Το νέο εύρημα αυτής της μελέτης-διδασκαρικής διατριβής είναι ότι η παρουσία του αλληλόμορφου M του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού *PON1* L55M συσχετίστηκε με στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη μείωση του CST μετά από ενδοϋαλοειδική θεραπεία anti-VEGF σε ασθενείς με οίδημα ωχράς κηλίδας λόγω RVO, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο πολυμορφισμός *PON1* L55M μπορεί να χρησιμεύσει ως ένας υποσχόμενος γενετικός βιοδείκτης για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στην ενδοϋαλοειδική anti-VEGF θεραπεία σε ασθενείς με οίδημα ωχράς κηλίδας λόγω RVO.



# ABSTRACT

## **Purpose**

Numerous studies have tried to evaluate the potential role of thrombophilia-related genes in retinal vein occlusion (RVO); however, there is limited research on genes related to different pathophysiological mechanisms involved in RVO. In view of the strong contribution of oxidative stress and inflammation to the pathogenesis of RVO, the purpose of the present study was to investigate the association of inflammation- and oxidative-stress-related polymorphisms from three different genes [*apolipoprotein E (APOE)*, *paraoxonase 1 (PON1)* and *stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)*] and the risk of RVO in a Greek population. Another purpose of this study was to determine whether these specific genetic polymorphisms affect the response to intravitreal anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) treatment in patients with macular oedema secondary to retinal vein occlusion (RVO).

## **Methods**

Participants in this case-control study were 50 RVO patients with macular oedema secondary to RVO (RVO group) and 50 healthy volunteers (control group). The patients were treated with intravitreal ranibizumab or aflibercept and were followed-up for 12 months after initiation of treatment. Blood samples were collected on EDTA tubes and genomic DNA was extracted. Genotyping of rs854560 (L55M) and rs662 (Q192R) for the *PON1* gene, rs429358 and rs7412 for the *APOE* gene and rs1801157 [*SDF1*-3'G(801)A] for *SDF-1* gene was performed using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method.

## **Results**

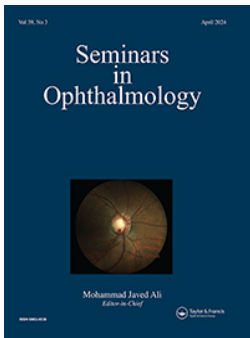
The dominant genetic model of the association analysis for the *PON1* Q192R single nucleotide polymorphism (SNP) revealed that there was a statistically significant difference between the RVO group and the control group. Specifically, after adjusting for age and hypertension, the *PON1* 192 R allele (QR + RR) was found to be associated with a statistically significantly higher risk of RVO compared to the QQ genotype (OR = 2.51; 95% CI = 1.02-6.14, p = 0.04). The statistically significant results were maintained after including diabetes in the multivariate model in addition to age and hypertension (OR = 2.83; 95% CI = 1.01-7.97, p = 0.042). No statistically significant association was revealed between the other studied polymorphisms and the risk of

RVO. Haplotype analysis for *PONI* SNPs, L55M and Q192R, revealed no statistically significant correlation. With reference to treatment response, patients with the LL genotype of the *PONI* L55M SNP had statistically significantly higher reduction in central subfield thickness (CST) at month 12 after initiation of intravitreal anti-VEGF treatment ( $101.63 \pm 56.80 \mu\text{m}$  in LL vs.  $72.44 \pm 39.41 \mu\text{m}$  in LM vs.  $40.25 \pm 19.33 \mu\text{m}$  in MM,  $p = 0.026$ ). Patients with the M allele of the *PONI* L55M SNP were statistically significantly associated with lower reduction in CST compared to non-carriers ( $68.29 \pm 38.77 \mu\text{m}$  in LM + MM vs.  $101.63 \pm 56.80 \mu\text{m}$  in LL,  $p = 0.032$ ).

### **Conclusions**

These findings suggest that the R allele of the *PONI* Q192R SNP is likely to play a role as a risk factor for retinal vein occlusion. The novel finding of this study is that the presence of M allele of *PONI* L55M SNP was associated with significantly lower reduction in CST after intravitreal anti-VEGF treatment in patients with macular oedema due to RVO, suggesting that *PONI* L55M SNP may serve as a promising genetic biomarker for predicting response to intravitreal anti-VEGF treatment in patients with macular oedema due to RVO.

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**



## Association of *PON1*, *APOE* and *SDF-1* Gene Polymorphisms with Treatment Response to Intravitreal Anti-VEGF Treatment in Patients with Retinal Vein Occlusion

Antonios Ragkousis, Dimitrios Kazantzis, Ilias Georgalas, Panagiotis Theodossiadis, Christos Kroupis & Irimi Chatziralli

To cite this article: Antonios Ragkousis, Dimitrios Kazantzis, Ilias Georgalas, Panagiotis Theodossiadis, Christos Kroupis & Irimi Chatziralli (2024) Association of *PON1*, *APOE* and *SDF-1* Gene Polymorphisms with Treatment Response to Intravitreal Anti-VEGF Treatment in Patients with Retinal Vein Occlusion, *Seminars in Ophthalmology*, 39:3, 201-208, DOI: [10.1080/08820538.2023.2283028](https://doi.org/10.1080/08820538.2023.2283028)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/08820538.2023.2283028>



Published online: 24 Nov 2023.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 248







View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



## Association of *PON1*, *APOE* and *SDF-1* Gene Polymorphisms with Treatment Response to Intravitreal Anti-VEGF Treatment in Patients with Retinal Vein Occlusion

Antonios Ragkousis <sup>a</sup>, Dimitrios Kazantzis<sup>a</sup>, Ilias Georgalas <sup>b</sup>, Panagiotis Theodossiadis<sup>a</sup>, Christos Kroupis <sup>c#</sup>, and Irini Chatziralli <sup>a#</sup>

<sup>a</sup>2nd Department of Ophthalmology, Attikon University Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece; <sup>b</sup>1st Department of Ophthalmology, “G. Gennimatas” General Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece; <sup>c</sup>Department of Clinical Biochemistry, Attikon University Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

### ABSTRACT

**Purpose:** The purpose of this study was to determine whether specific genetic polymorphisms affect the response to intravitreal anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) treatment in patients with macular oedema secondary to retinal vein occlusion (RVO).

**Methods:** Participants in this prospective study were 50 patients with macular oedema secondary to RVO, who were treated with intravitreal ranibizumab or aflibercept, and were followed-up for 12 months after initiation of treatment. Five single nucleotide polymorphisms (SNPs) from three different genes (*APOE*, *PON1*, *SDF-1*) were examined as potential predictors for treatment response to intravitreal anti-VEGF agents.

**Results:** Patients with the LL genotype of the *PON1* L55M SNP had significantly higher reduction in central subfield thickness (CST) at month 12 after initiation of intravitreal anti-VEGF treatment ( $101.63 \pm 56.80 \mu\text{m}$  in LL vs.  $72.44 \pm 39.41 \mu\text{m}$  in LM vs.  $40.25 \pm 19.33 \mu\text{m}$  in MM,  $p = .026$ ). Patients with the M allele of the *PON1* L55M SNP were significantly associated with lower reduction in CST compared to non-carriers ( $68.29 \pm 38.77 \mu\text{m}$  in LM + MM vs.  $101.63 \pm 56.80 \mu\text{m}$  in LL,  $p = .032$ ).

**Conclusion:** *PON1* L55M SNP may serve as a promising genetic biomarker for predicting response to intravitreal anti-VEGF treatment in patients with macular oedema due to RVO.

### ARTICLE HISTORY

Received 27 June 2023  
Revised 1 November 2023  
Accepted 9 November 2023

### KEYWORDS

Anti-VEGF; Gene; *PON1*;  
Retinal vein occlusion;  
Treatment response

## INTRODUCTION

Retinal vein occlusion (RVO) is the second most common retinal vascular disorder in adults, following diabetic retinopathy, and its incidence increases with age.<sup>1</sup> The pathogenesis of RVO is multifactorial and is mainly based on Virchow's triad, consisting of haemodynamic changes (venous stasis), vascular endothelial damage and hypercoagulability.<sup>2</sup> Hypertension, dyslipidaemia and diabetes mellitus are considered as primary systemic risk factors, while haematological disorders, such as myeloproliferative syndromes, and abnormalities in the coagulation system may also play a role in the pathophysiology of RVO.<sup>2</sup> In addition, genetic factors may be implicated in the pathogenesis of RVO, although studies investigating several polymorphisms as risk factors for RVO provide conflicting results in different populations.<sup>3–6</sup>

Depending on the site of occlusion, RVO can be broadly classified as central retinal vein occlusion (CRVO), branch retinal vein occlusion (BRVO) or hemiretinal vein occlusion (HRVO).<sup>7</sup> RVO can cause significant visual impairment due to complications, which mainly include macular oedema and ischaemia.<sup>7</sup> Specifically, tissue hypoxia and vascular damage induce inflammation, oxidative stress and production of cytokines with vascular endothelial growth factor (VEGF) to be the most prominent, leading to macular oedema development due

to vascular hyper-permeability and promoting the development of neovascularisation.<sup>8</sup>

Intravitreal anti-VEGF injections are the “gold standard” in the treatment of macular oedema secondary to RVO, since their efficacy and safety have been established in pivotal clinical trials.<sup>9</sup> However, considerable number of patients show “partial” or “no response” to intravitreal anti-VEGF agents, also having multiple recurrences. In the SCORE 2 study, 8.6% and 22.5% of patients with CRVO originally treated with intravitreal aflibercept or bevacizumab, respectively, showed “poor response” at month 6 after initiation of treatment.<sup>10</sup> It is worth mentioning that in real-life studies, the percentage of poor responders was lower at month 12 after the start of anti-VEGF treatment.<sup>11,12</sup> Furthermore, it has been reported that RVO eyes with good response within the first 3 months of anti-VEGF treatment continue to respond better over longer periods, compared to eyes who respond poorly in the initial 3-month period.<sup>13</sup>

In light of the above, the purpose of this study was to investigate 5 genetic polymorphisms from 3 different genes related to inflammation and oxidative stress (i.e., *APOE*, *PON1*, *SDF-1*), as potential genetic biomarkers to predict treatment response to intravitreal anti-VEGF agents in Greek patients with macular oedema secondary to RVO.

## MATERIALS AND METHODS

Participants in this prospective study were 50 consecutive patients with treatment-naïve RVO and secondary centre-involving macular oedema, who were presented and treated with intravitreal anti-VEGF injections at the 2<sup>nd</sup> Department of Ophthalmology, Attikon University Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece, between 1<sup>st</sup> September 2019 and 1<sup>st</sup> September 2021. Diagnosis of RVO was made clinically on the basis of the presence of retinal haemorrhages, retinal vein dilatation, tortuosity, flame-shaped and dot-blot haemorrhages, with or without optic disc hyperaemia, while confirmed by fundus fluorescein angiography (FFA) and spectral domain-optical coherence tomography (SD-OCT). Patients with other retinal diseases than RVO, uncontrolled glaucoma with intraocular pressure (IOP) >30 mmHg, ocular inflammation, corneal disease, trauma and any previous intraocular surgery within the last 6 months, as well as those with inadequate or unassessable imaging, were excluded from the study. The study protocol was in adherence to the tenets of Helsinki Declaration and was approved by the Institutional Review Board of Attikon University Hospital (Reference number: 699/2019 and 290/2020). Written informed consent was obtained from all participants before entering the study.

Demographic data of patients (age, gender) were recorded. At baseline, all participants underwent a comprehensive ophthalmic examination, including best-corrected visual acuity (BCVA) measurement on Snellen charts (converted to logMAR scale for statistical analysis), slit-lamp biomicroscopy, IOP measurement by Goldmann applanation tonometry, dilated funduscopy, SD-OCT and FFA using Spectralis (Spectralis HRA+OCT, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany). The SD-OCT standard acquisition protocol consisted of six 3-mm radial scans with equally spaced angular orientations centred on the foveola and a 20 × 20° Cube, centred over the fovea, with 49 horizontal, equally spaced 120 µm apart, raster lines. The average retinal thickness of a 1-mm diameter circle centred over the foveola, according to the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study grid subfields, which is called central subfield thickness (CST), was recorded after each SD-OCT acquisition. Moreover, macular ischaemia was evaluated on FFA and defined as disruption and enlargement of foveal avascular zone (FAZ).

All patients were treated with intravitreal anti-VEGF injections, either 0.5 mg/0.05 ml ranibizumab or 2.0 mg/0.05 ml aflibercept, following a protocol of at least 3 monthly injections and thereafter pro re nata (PRN) until month 12 after initiation of treatment. The mean duration from diagnosis of RVO to treatment onset was 1 week. Re-treatment was performed if BCVA decreased by at least 1 Snellen line (equivalent to a difference of 0.1 logMAR) and/or reduction in CST ≤ 10% compared to the previous visit or CST ≥ 320 µm. All participants were followed-up every month for 12 months after treatment initiation. At each follow-up visit, patients underwent BCVA measurement and SD-OCT, while FFA was performed at the physician's discretion. At month 12, treatment response to intravitreal anti-VEGF agents was assessed. The difference in BCVA ( $\Delta$ BCVA) between the initial BCVA at presentation

(BCVA0) and the BCVA at month 12 (BCVA12), as well as the difference in CST ( $\Delta$ CST) between the CST at baseline (CST0) and the CST at month 12 (CST12), was calculated for each patient.

### Genotyping

Blood samples were collected at the time of diagnosis via puncture from the median cubital vein of the study participants, on EDTA tubes, and stored at -20°C until DNA extraction. DNA was extracted from whole blood using NucleoSpin blood mini kit (Macherey-Nagel) following the instructions provided by the manufacturer. The genetic analysis was performed at the Department of Clinical Biochemistry and Molecular Diagnostics, Attikon University Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece.

*APOE* genotyping was determined by performing Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP), using sequence-specific primers, as previously described.<sup>14</sup> The primers used were upstream primer F: 5'-ACAGAATTCGCCCGCCTGGTACAC-3' and downstream primer R: 5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3'. After amplification, the resulting 244 base pair (bp) product was digested by the restriction enzyme HhaI (New England BioLabs) and after agarose 4% gel electrophoresis, the DNA fragments were visualised by ultraviolet fluorescence after staining with ethidium bromide. *APOE* gene has 2 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in exon 4 that give rise to 3 *APOE* haplotypes, known as E2, E3 and E4 alleles, that result from two amino acid changes at positions 112 (rs429358) and 158 (rs7412) in exon 4 (cysteine to arginine and arginine to cysteine, respectively). Each one of these *APOE* allele has different HhaI cleavage sites (GCGC), which lead to unique combinations of HhaI fragment sizes.<sup>14</sup> Heterozygotic combinations contain mixed fragments from both sets of fragments from each *APOE* allele.

For *SDFI-1* gene, also known as *CXCL12*, the *SDFI-3'*G(801)A polymorphism rs1801157 [a common polymorphism in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of exon 10, which contains a G→A transition at position 801] was also determined by performing PCR-RFLP as previously described.<sup>15</sup> The primers used were upstream primer F: 5'-GAGTCAACCTGGGCAAAGCC-3' and downstream primer R: 5'-AGCTTTGGTCCTGAGAGTCC-3'. The amplified 302 bp PCR products were cleaved by MspI restriction enzyme (New England BioLabs) and then electrophoresed on 4% agarose gel stained with ethidium bromide. *SDFI-3'*(801)G allele corresponds to two fragments of 202 bp and 100 bp, whereas the presence of *SDFI-3'*(801)A allele leads to one uncut 202 bp band because the G to A substitution results in loss of the restriction site. The presence of all three bands of 100, 200 and 302 bp indicates the heterozygous *SDFI-3'*(801)GA genotype.

L55M in exon 3 (rs854560) and Q192R in exon 6 (rs662) are the most studied polymorphisms for *PONI* gene. To identify *PONI* L55M (leucine to methionine substitution at position 55 in exon 3) SNP and Q192R (glutamine to arginine substitution at position 192 in exon 6), PCR-RFLP was used. The following primers were used for the amplifications of L55M as described

by Cozzi et al.<sup>16</sup>: 5'-GCTCTAGTCCATCAATTTAAAAACAAA-3' (upstream) and 5'-TGGGTATACAGAAAGCCTAAGTGA-3' (downstream), and the following for Q192R as described by Zama et al.<sup>17</sup>: 5'-TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG-3' (upstream) and 5'-CACGCTAAACCCAAATACATCTC-3' (downstream). After electrophoresis on 4% agarose gel, the PCR products were digested by NlaIII restriction enzyme and by AlwI restriction enzyme, for the L55M and Q192R polymorphisms, respectively. For L55M SNP, samples illustrating uncut 394 bp fragments were assigned as *PON1*L55LL (wild-type) genotype, samples revealing 124 bp and 245 bp bands were assigned as MM homozygous mutant and samples exhibiting all three 124 bp, 245 bp and 394 bands were assigned as LM heterozygous genotype. Similarly, for Q192R SNP, QQ (wild-type) corresponded to only one uncut 98 bp fragment, RR homozygous mutant corresponded to combination of 35 bp and 63 bp fragments and QR heterozygous genotype was identified by the presence of all three 35 bp, 63 bp and 98 bp fragments, after electrophoretic separation.

### Statistical Analysis

Quantitative parameters were presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD), while categorical variables were expressed as frequency and percentage. The Kolmogorov–Smirnov and the Shapiro–Wilk normality tests were applied for data distribution assessment. Both the evaluation of the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and the estimation of allele and genotype frequencies of the studied polymorphisms were performed using the SNPStats web tool. The differences between groups regarding quantitative variables were determined using one-way analysis of variance (ANOVA), with Bonferroni and Tukey HSD post hoc correction to adjust for multiple comparisons. For comparisons (of the means of continuous variables) between two groups, independent-samples t-test was used. For variables, whose data do not follow the normal distribution, Kruskal–Wallis test and Mann–Whitney were done, as appropriate.

The reduction of CST following anti-VEGF intravitreal injections ( $\Delta$ CST) was analysed for possible association with CST0, age, gender, hypertension, diabetes mellitus, diabetes mellitus duration, dyslipidaemia, smoking and *PON1* LL genotype performing univariate and multivariate linear regression analyses.

Statistical analysis was performed using Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software version 28.0.1.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). P-values  $\leq 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

The mean age of the 50 patients (27 male, 23 female) was 67.3  $\pm$  9.5 years at the baseline. Thirty-five patients (70%) were diagnosed with CRVO and 15 patients (30%) had BRVO.

Table 1 shows the frequencies of the alleles and the genotypes of the studied SNPs. Genotype frequencies of all studied SNPs conformed to the HWE expectations ( $p > .05$ ).

Table 2 depicts the demographic and clinical data based on specific SNPs. There was a statistically significant difference among the genotypes for *PON1* L55M polymorphism regarding the difference in CST ( $p = .026$ ). There was also a statistically significant difference in the difference in CST in the Tukey HSD post hoc pairwise comparison between the LL genotype and the MM genotype ( $p = .05$ ). No statistically significant difference was found in BCVA at baseline, at month 12 and in the difference in BCVA, as well as in CST at baseline and CST at month 12 among the different genotypes of all the studied SNPs.

In addition, we examined if the presence of any of the alleles of the studied SNPs is significantly associated with better treatment outcomes, as shown in Table 3. Specifically, t-test between LL genotype and MM + LM genotypes revealed that the presence of the M allele (MM + LM genotypes) of *PON1* L55M was statistically significantly associated ( $p = .032$ ) with poorer anatomical response to treatment compared to non-carriers (LL homozygotes). The difference in CST was 68.3  $\pm$  38.8  $\mu$ m for the M carriers and 101.6  $\pm$  56.8  $\mu$ m for the LL homozygotes. No statistically significant difference was noticed for other SNPs.

Univariate linear regression analyses were performed to assess the association of baseline factors with  $\Delta$ CST after 1 year of anti-VEGF injections (Table 4). LL genotype was the only statistically significant variable ( $p = .017$ ) using the univariate analysis.

Multivariate linear regression analysis was also performed; a screening criterion of  $p < .2$  at the univariate analyses was adopted to determine which variables would be included in the multivariate linear regression analysis model. Subsequently, multivariate linear regression analysis of LL genotype over anatomical response, adjusted for hypertension and diabetes was performed (Table 5); the model was statistically significant ( $p = .034$ ). The results showed that the LL genotype of *PON1* L55M presented higher reduction in CST after treatment compared to LM + MM genotypes ( $\beta = -0.318$ ,  $p = .035$ ). Therefore, the presence of M allele is a significant predictor for poorer anatomical response after intravitreal anti-VEGF treatment. Covariates hypertension and diabetes did not demonstrate any statistical significance at the regression model.

**Table 1.** Frequencies of the alleles and the genotypes of the studied single nucleotide polymorphisms.

	PON1 L55M		PON1 Q192R		APOE		SDF1-3'G(801)A	
Allele	L	65 (65%)	Q	72 (72%)	E3	90 (90%)	G	73 (73%)
	M	35 (35%)	R	28 (28%)	E4	6 (6%)	A	27 (27%)
Genotype	LL	19 (38%)	QQ	26 (52%)	E2	4 (4%)	GG	25 (50%)
	LM	27 (54%)	QR	20 (40%)	E3E3	40 (80%)	GA	23 (46%)
	MM	4 (8%)	RR	4 (8%)	E2E3	4 (8%)	AA	2 (4%)
	MM + LM	46 (92%)	RR + QR	46 (92%)	E3E4	6 (12%)	AA + GA	48 (96%)
Allele carriers (either homozygote or heterozygote)	MM + LM	31 (62%)	RR + QR	30 (60%)	E2E4	0 (0%)	AA + GA	25 (50%)

Table 2. Demographic and clinical data based on genetic analysis.

	PONI L55M				PONI Q192R				APOE				SDF1-3'G(801)A			
	LL	LM	MM	p-value	QQ	QR	RR	p-value	E3E3	E3E4	E4E4	p-value	GG	GA	AA	p-value
Age (years)	68.8 ± 9.9	66.4 ± 9.6	65.5 ± 6.6	0.667*	66.4 ± 9.5	66.4 ± 8.7	77.3 ± 9.5	0.086*	67.4 ± 9.5	65.8 ± 10.1	67.3 ± 10.7	0.948*	66.2 ± 9.1	69.5 ± 9.3	54.5 ± 6.4	0.069*
Number of injections	6.3 ± 1.1	5.7 ± 1.5	6.5 ± 1.3	0.238†	6.0 ± 1.3	6.0 ± 1.5	5.3 ± 1.3	0.515†	6.0 ± 1.4	5.8 ± 1.7	6.2 ± 1.2	0.885†	5.9 ± 1.4	6.0 ± 1.3	6.5 ± 2.1	0.818†
BCVA0 (logMAR)	0.76 ± 0.29	0.68 ± 0.30	0.83 ± 0.39	0.382†	0.74 ± 0.34	0.72 ± 0.28	0.63 ± 0.15	0.890†	0.75 ± 0.29	0.63 ± 0.29	0.58 ± 0.36	0.272†	0.75 ± 0.31	0.70 ± 0.30	0.70 ± 0.42	0.873†
BCVA12 (logMAR)	0.42 ± 0.31	0.46 ± 0.37	0.61 ± 0.45	0.630†	0.46 ± 0.38	0.48 ± 0.33	0.28 ± 0.29	0.407†	0.47 ± 0.36	0.40 ± 0.41	0.36 ± 0.33	0.866†	0.46 ± 0.37	0.44 ± 0.33	0.58 ± 0.60	0.911†
ΔBCVA (logMAR)	0.34 ± 0.28	0.22 ± 0.18	0.21 ± 0.15	0.261†	0.28 ± 0.23	0.24 ± 0.22	0.35 ± 0.26	0.623†	0.28 ± 0.24	0.23 ± 0.17	0.23 ± 0.08	0.860†	0.29 ± 0.22	0.25 ± 0.23	0.13 ± 0.18	0.456†
CST0 (μm)	485.7 ± 50.7	456.0 ± 69.9	479.5 ± 112.9	0.328*	474.6 ± 78.5	466.4 ± 54.2	447.8 ± 55.4	0.745*	468.6 ± 60.6	494.0 ± 121.0	456.5 ± 79.1	0.692*	475.2 ± 74.7	460.4 ± 60.8	495.0 ± 50.9	0.649*
CST12 (μm)	384.1 ± 65.5	383.6 ± 78.1	439.3 ± 126.5	0.666†	392.4 ± 86.8	390.9 ± 68.5	347.5 ± 58.8	0.416†	390.0 ± 74.3	388.8 ± 137.5	376.3 ± 67.0	0.718†	390.4 ± 87.3	383.7 ± 67.8	413.5 ± 96.9	0.838†
ΔCST (μm)	101.6 ± 56.8	72.4 ± 39.4	40.3 ± 19.3	<b>0.026</b> *	82.2 ± 54.1	75.5 ± 40.3	100.3 ± 58.4	0.648*	78.7 ± 51.7	105.3 ± 21.3	80.2 ± 40.6	0.591*	84.9 ± 50.1	76.7 ± 49.2	81.5 ± 46.0	0.848*

\*p-value of the ANOVA test among the different genotypes; †p-value of the Kruskal–Wallis test among the different genotypes, BCVA: best-corrected visual acuity; CST: central subfield thickness; Δ: difference. The bold notes the presence of statistically significant difference.



**Table 3.** Demographic and clinical data of the study sample based on the presence of alleles of the studied SNPs.

	PONI L55M				PONI Q192R									
	LL	MM + LM	p-value	MM	LL + LM	p-value	RR + QR	p-value	RR	QQ + QR	p-value			
Age (years)	68.8 ± 9.9	66.3 ± 9.2	0.376*	65.5 ± 6.6	67.4 ± 9.7	0.702*	68.2 ± 9.5	0.501*	77.3 ± 9.5	66.4 ± 9.0	0.059*			
Number of injections	6.3 ± 1.1	5.8 ± 1.5	0.205 <sup>§</sup>	6.5 ± 1.3	5.9 ± 1.3	0.457 <sup>§</sup>	5.9 ± 1.4	0.743 <sup>§</sup>	5.3 ± 1.3	6.0 ± 1.3	0.272 <sup>§</sup>			
BCVA0 (logMAR)	0.76 ± 0.29	0.70 ± 0.31	0.321 <sup>§</sup>	0.83 ± 0.39	0.71 ± 0.30	0.500 <sup>§</sup>	0.71 ± 0.26	0.827 <sup>§</sup>	0.63 ± 0.15	0.73 ± 0.31	0.666 <sup>§</sup>			
BCVA12 (logMAR)	0.42 ± 0.31	0.48 ± 0.38	0.839 <sup>§</sup>	0.61 ± 0.45	0.44 ± 0.35	0.357 <sup>§</sup>	0.45 ± 0.33	0.694 <sup>§</sup>	0.28 ± 0.29	0.47 ± 0.36	0.200 <sup>§</sup>			
ΔBCVA (logMAR)	0.34 ± 0.28	0.22 ± 0.17	0.102 <sup>§</sup>	0.21 ± 0.15	0.27 ± 0.23	0.796 <sup>§</sup>	0.26 ± 0.22	0.921 <sup>§</sup>	0.35 ± 0.26	0.26 ± 0.22	0.396 <sup>§</sup>			
CST0 (μm)	485.7 ± 50.7	459.1 ± 74.6	0.177*	479.5 ± 112.9	468.3 ± 63.8	0.753*	463.3 ± 53.6	0.557*	447.8 ± 55.4	471.0 ± 68.4	0.512*			
CST12 (μm)	384.1 ± 65.5	390.8 ± 85.2	0.865 <sup>§</sup>	439.3 ± 126.5	383.8 ± 72.4	0.436 <sup>§</sup>	383.7 ± 67.8	0.977 <sup>§</sup>	347.5 ± 58.8	391.8 ± 78.6	0.213 <sup>§</sup>			
ΔCST (μm)	101.6 ± 56.8	68.3 ± 38.8	<b>0.032*</b>	40.3 ± 19.3	84.5 ± 49.0	0.081*	79.6 ± 43.3	0.726*	100.3 ± 58.4	79.3 ± 48.2	0.415*			
	APOE													
	E3E3			E3E3 + E3E4			E3E4			SDF1-3'G(80T)A				
	E2E3 + E3E4	p-value	E2E3	E3E3 + E3E4	p-value	E3E4	E3E3 + E2E3	p-value	GG	AA + GA	p-value	AA	GG + GA	p-value
Age (years)	67.4 ± 9.5	66.7 ± 9.9	0.836*	65.8 ± 10.1	67.39 ± 9.50	0.743*	67.3 ± 10.7	0.984*	66.2 ± 9.1	68.3 ± 9.9	0.217*	54.5 ± 6.4	67.8 ± 9.2	<b>0.050*</b>
Number of injections	6.0 ± 1.4	6.0 ± 1.3	1.00 <sup>§</sup>	5.8 ± 1.7	6.00 ± 1.31	0.717 <sup>§</sup>	6.2 ± 1.2	0.738 <sup>§</sup>	5.9 ± 1.4	6.1 ± 1.3	0.634 <sup>§</sup>	6.5 ± 2.1	6.0 ± 1.3	0.653 <sup>§</sup>
BCVA0 (logMAR)	0.75 ± 0.29	0.60 ± 0.32	0.125 <sup>§</sup>	0.63 ± 0.29	0.73 ± 0.30	0.500 <sup>§</sup>	0.58 ± 0.36	0.189 <sup>§</sup>	0.75 ± 0.31	0.70 ± 0.30	0.606 <sup>§</sup>	0.70 ± 0.42	0.72 ± 0.30	0.864 <sup>§</sup>
BCVA12 (logMAR)	0.47 ± 0.36	0.38 ± 0.34	0.607 <sup>§</sup>	0.40 ± 0.41	0.46 ± 0.35	0.823 <sup>§</sup>	0.36 ± 0.33	0.673 <sup>§</sup>	0.46 ± 0.37	0.45 ± 0.34	0.731 <sup>§</sup>	0.58 ± 0.60	0.4 ± 0.35	0.754 <sup>§</sup>
ΔBCVA (logMAR)	0.28 ± 0.24	0.23 ± 0.11	0.607 <sup>§</sup>	0.23 ± 0.17	0.27 ± 0.23	0.850 <sup>§</sup>	0.23 ± 0.08	0.652 <sup>§</sup>	0.29 ± 0.22	0.24 ± 0.23	0.349 <sup>§</sup>	0.13 ± 0.18	0.27 ± 0.23	0.367 <sup>§</sup>
CST0 (μm)	468.6 ± 60.6	471.5 ± 93.4	0.904*	494.0 ± 121.0	467.0 ± 62.4	0.447*	456.5 ± 79.1	0.627*	475.2 ± 74.7	463.1 ± 59.9	0.265*	495.0 ± 50.9	468.1 ± 68.1	0.585*
CST12 (μm)	390.0 ± 74.3	381.3 ± 94.0	0.574 <sup>§</sup>	388.8 ± 137.5	388.2 ± 72.8	0.436 <sup>§</sup>	376.3 ± 67.0	389.8 ± 79.5	390.4 ± 87.3	386.1 ± 68.4	0.884 <sup>§</sup>	413.5 ± 96.9	387.2 ± 77.8	0.589 <sup>§</sup>
ΔCST (μm)	78.7 ± 51.7	90.2 ± 35.2	0.508*	105.3 ± 21.3	78.9 ± 50.0	0.084*	80.2 ± 40.6	81.1 ± 50.1	84.9 ± 50.1	77.0 ± 48.0	0.575*	81.5 ± 46.0	80.9 ± 49.3	0.987*

\*p-value of the independent-samples t-test between the two groups of each comparison; <sup>§</sup>p-value of the Mann-Whitney test between the two groups of each comparison.  
 BCVA: best-corrected visual acuity; CST: central subfield thickness; Δ: difference.  
 The bold notes the presence of statistically significant difference.

**Table 4.** Univariate linear regression analyses: role/effect of each variable on change in CST ( $\Delta$ CST) after 1 year of anti-VEGF injections.

Variables	Unstandardised Coefficients		Standardised Beta ( $\beta$ ) Coefficient	p-value
	Beta ( $\beta$ )	Standard error		
L55M: LL VS (LM + MM)	-16.671	6.754	-0.336	<b>0.017</b>
Age	0.521	0.740	0.101	0.485
Gender	2.651	13.960	0.027	0.850
CRT0	0.096	0.104	0.133	0.358
Hypertension	25.183	13.735	0.256	0.073
Diabetes	-21.350	13.870	-0.217	0.130
Diabetes Duration	-0.211	0.928	-0.033	0.821
Dyslipidaemia	-0.497	14.022	-0.005	0.972
Smoking	-0.065	16.803	-0.001	0.997

CST: central subfield thickness;  $\Delta$ : difference.

The bold notes the presence of statistically significant difference.

**Table 5.** Final step of stepwise (multivariate) linear regression analysis showing significant predictors of change in CST ( $\Delta$ CST) after 1 year of anti-VEGF injections.

Variables	Unstandardised Coefficients		Standardised Beta ( $\beta$ ) Coefficient	p-value
	Beta ( $\beta$ )	Standard error		
L55M: LL VS (LM + MM)	-15.779	7.266	-0.318	<b>0.035</b>
Hypertension	23.086	14.082	0.235	0.108
Diabetes	-1.558	15.252	-0.016	0.919

CST: central subfield thickness;  $\Delta$ : difference.

The bold notes the presence of statistically significant difference.

## DISCUSSION

Several studies have examined the potential association between different SNPs and the risk of RVO. In addition, previous studies have identified an association between various SNPs and treatment response to intravitreal anti-VEGF therapy in other retinal diseases, such as age-related macular degeneration, polypoidal choroidal vasculopathy and diabetic macular oedema.<sup>18–20</sup> However, the effect of genetic background on treatment response to intravitreal anti-VEGF agents in RVO has not been studied so far. To our knowledge, the current study is the first to investigate pharmacogenomics on treatment response to intravitreal anti-VEGF agents in patients with RVO. Specifically, we evaluated the impact of 5 genetic polymorphisms in three different genes (*APOE*, *PON1* and *SDF-1*) on the anatomical and functional outcomes after intravitreal anti-VEGF treatment in patients with RVO.

*APOE* haplotypes and *PON1* L55M/Q192R polymorphisms have been previously reported as factors affecting predisposition to RVO,<sup>6,21</sup> whereas *SDF1-3'G(801)A* polymorphism has been associated to increased risk of neovascularisation in RVO patients.<sup>15,22</sup> Apolipoprotein E (*APOE*) is a multifunctional plasma protein with inflammatory effect, which is involved in lipid metabolism and vascular function.<sup>23</sup> Elevated levels of *APOE* have been positively correlated with VEGF levels, while *APOE* E4 allele has been associated with better treatment outcomes in patients with age-related macular degeneration.<sup>24</sup> On the other hand, stromal cell-derived factor 1 (*SDF-1*) is a chemokine, that forms a regulatory loop with VEGF, promoting retinal angiogenesis.<sup>15</sup> Vitreous *SDF-1* levels have been found to be elevated in eyes with RVO compared to controls and especially in eyes with iris neovascularisation secondary to RVO.<sup>15,22</sup> In our study, genetic polymorphisms on *APOE* and *SDF-1* genes failed to demonstrate any statistically significant effect on treatment response to intravitreal anti-VEGF agents in patients with RVO.

The principal finding of our study was that the presence of M allele (LM + MM) of *PON1* L55M polymorphism was statistically significantly associated with worse anatomical outcomes after 12 months of intravitreal anti-VEGF treatment in RVO patients, while LL genotype provided a favorable response in terms of anatomical improvement in CST. However, no correlation was found between the *PON1* L55M polymorphism and the functional outcomes 1 year after initiation of intravitreal anti-VEGF injections.

Human serum paraoxonase-1 (*PON1*) is a 43-kDa, 354-aa calcium-dependent glycoprotein, which is mainly synthesised in the liver and is being secreted into the blood, where it is predominantly bound to high-density lipoprotein (HDL). *PON1* has multiple antioxidant and anti-inflammatory properties, decreasing the peroxidation of low-density lipoprotein (LDL) and reducing reactive oxygen species (ROS).<sup>16,25</sup> Both homocysteine and *PON1* have also been implicated in vascular diseases with endothelial dysfunction.<sup>26</sup> Oxidative stress plays a pivotal role in RVO pathogenesis, triggering the expression of a variety of adhesion molecules, such as vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), chemokines like monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and cytokines, such as interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and VEGF.<sup>27</sup> Moreover, HDL cholesterol, which has anti-inflammatory and anti-oxidative effect, has been reported to be low in patients with RVO,<sup>28</sup> while monocyte/HDL ratio has been found to be elevated and has been proposed as a novel biomarker indicating inflammation and oxidative stress in BRVO patients.<sup>29</sup>

The association between *PON1* polymorphisms and the risk of exhibiting RVO has been previously investigated. Ortak et al. reported that LL genotype has a protective role in the pathogenesis of RVO,<sup>21</sup> while Murata et al. showed an association of Q192R allele and higher risk of CRVO.<sup>30</sup> Our finding that individuals carrying M allele presented worse anatomical response to intravitreal anti-VEGF treatment compared to

non-carriers indicates that *PON1*'s antioxidant activity is lower in the presence of M allele in patients with RVO. This observation is in line with previous studies, which have proven the association of 55 L allele and 192 R allele with higher paraoxonase enzymatic activity and serum concentration,<sup>31–33</sup> especially due to greater 55 L allele's stability to proteolysis.<sup>34</sup>

Potential limitation of the study was the relatively small study sample, which prevails a separate analysis between patients with CRVO and BRVO, although the two clinical entities have different pathophysiology and prognosis. In addition, two different intravitreal anti-VEGF agents were used i.e., ranibizumab and aflibercept. Nevertheless, the recently published randomised LEAVO study on 463 participants has shown that aflibercept was non-inferior to ranibizumab in patients with macular oedema due to CRVO.<sup>35</sup> However, it should be noted that this is a real-life study including treatment naïve patients, while the response to treatment was assessed objectively by measuring the change in CST. Finally, the potential association between SNPs and treatment response to intravitreal anti-VEGF agents in patients with RVO was firstly examined.

In conclusion, the novel finding of this study is that the presence of M allele of *PON1* L55M SNP was associated with significantly lower reduction in CST after intravitreal anti-VEGF treatment in patients with macular oedema due to RVO, suggesting that L55M SNP may serve as a promising genetic biomarker for predicting response to intravitreal anti-VEGF agents. This is the first time that a genetic polymorphism is implicated in affecting the treatment response in RVO patients. Further studies with larger sample are needed to justify our results and explore the association between other SNPs and treatment response. Such studies would not only allow a better understanding of the impact of genetic variants on the pathogenesis of the disease but may also identify new therapeutic targets and probably lead to individualised treatment following genetic screening of patients at baseline.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## Funding

The author(s) reported that there is no funding associated with the work featured in this article.

## ORCID

Antonios Ragkousis  <http://orcid.org/0000-0001-7133-8357>  
 Ilias Georgalas  <http://orcid.org/0000-0002-6171-5865>  
 Christos Kroupis  <http://orcid.org/0000-0002-5876-2599>  
 Irini Chatziralli  <http://orcid.org/0000-0001-8523-1024>

## REFERENCES

- Song P, Xu Y, Zha M, et al. Global epidemiology of retinal vein occlusion: a systematic review and meta-analysis of prevalence, incidence, and risk factors. *J Glob Health*. 2019;9(1):010427. doi:10.7189/jogh.09.010427.
- Ørskov M, Vorum H, Bjerregaard Larsen T, et al. A review of risk factors for retinal vein occlusions. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2022;20(9):761–772. doi:10.1080/14779072.2022.2112667.
- Marques M, Alves F, Leitão M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms as risk factors for retinal venous occlusive disease: a literature review. *Eur J Ophthalmol*. 2021;31(3):884–891. doi:10.1177/11206721211000647.
- Christodoulou A, Bagli E, Gazouli M, et al. Genetic polymorphisms associated with the prevalence of retinal vein occlusion in a Greek population. *Int Ophthalmol*. 2019;39(11):2637–2648. doi:10.1007/s10792-019-01113-9.
- De Polo L, Maltese PE, Rigoni E, et al. Genetic polymorphisms and retinal vein occlusion in an Italian population. *Genet Mol Res*. 2015;14(4):13337–13341. doi:10.4238/2015.October.26.30.
- Mrad M, Fekih-Mrissa N, Wathek C, et al. Role of the apolipoprotein E polymorphisms in the development of retinal vein occlusion in a Tunisian population: a case-control study. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2017;23(6):645–651. doi:10.1177/1076029616629212.
- Scott IU, Campochiaro PA, Newman NJ, Bioussé V. Retinal vascular occlusions. *Lancet*. 2020;396(10266):1927–1940. doi:10.1016/S0140-6736(20)31559-2.
- Tang Y, Cheng Y, Wang S, et al. Review: the development of risk factors and cytokines in retinal vein occlusion. *Front Med*. 2022;9:910600. doi:10.3389/fmed.2022.910600.
- Hunter A, Williams M. Long-term outcomes for patients treated for macular oedema secondary to retinal vein occlusion: a systematic review. *BMJ Open Ophthalmol*. 2022;7(1):e001010. doi:10.1136/bmjophth-2022-001010.
- Ip MS, Oden NL, Scott IU, et al. Month 12 outcomes after treatment change at month 6 among poor responders to aflibercept or bevacizumab in eyes with Macular Edema Secondary to central or hemiretinal vein occlusion: a Secondary analysis of the SCORE2 study. *JAMA Ophthalmol*. 2019;137(3):281–287. doi:10.1001/jamaophthalmol.2018.6111.
- Chatziralli I, Kazantzis D, Kroupis C, et al. The impact of laboratory findings and optical coherence tomography biomarkers on response to intravitreal anti-VEGF treatment in patients with retinal vein occlusion. *Int Ophthalmol*. 2022;42(11):3449–3457. doi:10.1007/s10792-022-02344-z.
- Ozkaya A, Tulu B, Garip R. Aflibercept in macular edema secondary to retinal vein occlusion: A real life study. *Saudi J Ophthalmol*. 2017;31(4):211–215. doi:10.1016/j.sjopt.2017.09.009.
- Kailar RS, Kuo BL, Perkins SW, Singh RP. Long-term outcomes in early vs. Limited Response To Anti-VEGF Treatment For Retinal Vein Occlusion: *Ophthalmology Retina* 2023. in press. doi:10.1016/j.oret.2023.08.005.
- Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res*. 1990;31(3):545–548. doi:10.1016/S0022-2275(20)43176-1.
- Szigeti A, Ecsedy M, Schneider M, Wallace GR, et al. Stromal cell-derived factor 1 polymorphism in retinal vein occlusion. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166544. doi:10.1371/journal.pone.0166544.
- Cozzi L, Campolo J, Parolini M, et al. Paraoxonase 1 L55M, Q192R and paraoxonase 2 S311C alleles in atherosclerosis. *Mol Cell Biochem*. 2013;374(1–2):233–238. doi:10.1007/s11010-012-1525-2.
- Zama T, Murata M, Matsubara Y, et al. A <sup>192</sup> arg variant of the human paraoxonase (*HUMAPONA*) gene polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in the Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(12):3565–3569. doi:10.1161/01.ATV.17.12.3565.
- Cobos E, Recalde S, Anter J, et al. Association between CFH, CFB, ARMS2, SERPINF1, VEGFR1 and VEGF polymorphisms and anatomical and functional response to ranibizumab treatment in neovascular age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol*. 2018;96(2):e201–e212. doi:10.1111/aos.13519.
- Díaz-Villamarín X, Blánquez-Martínez D, Pozo-Agundo A, et al. Genetic variants affecting anti-VEGF drug response in polypoidal choroidal vasculopathy patients: a systematic review and meta-analysis. *Genes (Basel)*. 2020;11(11):1335. doi:10.3390/genes11111335.

20. Gurung RL, FitzGerald LM, Liu E, et al. Identifying genetic biomarkers predicting response to anti-vascular endothelial growth factor injections in diabetic macular edema. *Int J Mol Sci.* 2022;23(7):4042. doi:10.3390/ijms23074042.
21. Ortak H, Söğüt E, Ateş O, et al. Protective effect of paraoxonase 1 gene variant L55M in retinal vein occlusion. *Mol Vis.* 2013;19:486–xxx.
22. Ki-I Y, Arimura N, Noda Y, et al. Stromal-derived factor-1 and inflammatory cytokines in retinal vein occlusion. *Curr Eye Res.* 2007;32(12):1065–1072. doi:10.1080/02713680701758727.
23. Marais AD. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology.* 2019;51(2):165–176. doi:10.1016/j.pathol.2018.11.002.
24. Bakbak B, Ozturk BT, Zamani AG, et al. Association of Apolipoprotein E Polymorphism with intravitreal ranibizumab treatment outcomes in age-related macular degeneration. *Curr Eye Res.* 2016;41(6):862–866. doi:10.3109/02713683.2015.1067325.
25. Eren E, Yilmaz N, Aydin O. Functionally defective high-density lipoprotein and paraoxonase: a couple for endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Cholesterol.* 2013;2013:1–10. doi:10.1155/2013/792090.
26. Eren E, Ellidag HY, Aydin O, Homocysteine YN. Paraoxonase-1 and Vascular Endothelial Dysfunction: Omnibus viis Romam Pervenitur. *J Clin Diagn Res.* 2014;8:CE01–04. doi:10.7860/JCDR/2014/7827.4773.
27. Wang B, Zhang X, Chen H, et al. A review of intraocular biomolecules in retinal vein occlusion: toward potential biomarkers for Companion Diagnostics. *Front Pharmacol.* 2022;13:859951. doi:10.3389/fphar.2022.859951.
28. Kim J, Lim DH, Han K, et al. Retinal vein occlusion is associated with low blood high-density lipoprotein cholesterol: a nationwide cohort study. *Am J Ophthalmol.* 2019;205:35–42. doi:10.1016/j.ajo.2019.04.001.
29. Şatırtav G, Mirza E, Oltulu R, et al. Assessment of Monocyte/HDL ratio in branch retinal vein occlusion. *Ocul Immunol Inflamm.* 2020;28(3):463–467. doi:10.1080/09273948.2019.1569244.
30. Murata M, Nakagawa M, Takahashi S. Molecular variant of the human paraoxonase/arylesterase gene is associated with central retinal vein occlusion in the Japanese population. *Ophthalmologica.* 1998;212(4):257–259. doi:10.1159/000027303.
31. Fridman O, Gariglio L, Riviere S, et al. Paraoxonase 1 gene polymorphisms and enzyme activities in coronary artery disease and its relationship to serum lipids and glycemia. *Archivos de Cardiología de México.* 2016;86(4):350–357. doi:10.1016/j.acmx.2016.08.001.
32. Zanini BM, Burkert L, Dos Santos FG, et al. The effect of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms T(-107)C and L55M and diet composition on serum PON1 activity in women. *Arch Endocrinol Metab.* 2021;65:787–793. doi:10.20945/2359-3997000000416.
33. Hashemi MM, Mousavi E, Arab-Bafrani Z, et al. The most effective polymorphisms of paraoxonase-1 gene on enzyme activity and concentration of paraoxonase-1 protein in type 2 diabetes mellitus patients and non-diabetic individuals: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;152:135–145. doi:10.1016/j.diabres.2019.05.007.
34. Wu C, Wu D, Lin M, Zhong Y. The associations between Paraoxonase 1 L55M/Q192R Genetic Polymorphisms and the Susceptibilities of Diabetic Macroangiopathy and Diabetic microangiopathy: a meta-analysis. *Diabetes Ther.* 2018;9(4):1669–1688. doi:10.1007/s13300-018-0466-5.
35. Hykin P, Prevost AT, Vasconcelos JC, et al. Clinical Effectiveness of Intravitreal Therapy With Ranibizumab vs Aflibercept vs Bevacizumab for Macular Edema Secondary to Central Retinal Vein Occlusion: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Ophthalmol.* 2019;137(11):1256–1264. doi:10.1001/jamaophthalmol.2019.3305.



*genes*



Article

---

# *PON1*, *APOE* and *SDF-1* Gene Polymorphisms and Risk of Retinal Vein Occlusion: A Case-Control Study

---

Antonios Ragkousis, Dimitrios Kazantzis, Ilias Georgalas, Panagiotis Theodossiadis, Christos Kroupis and Irini Chatziralli

Special Issue

Genetic Research of Retinal Diseases

Edited by  
Dr. Ling Zhu



<https://doi.org/10.3390/genes15060712>



## Article

# PON1, APOE and SDF-1 Gene Polymorphisms and Risk of Retinal Vein Occlusion: A Case-Control Study

Antonios Ragkousis <sup>1,\*</sup>, Dimitrios Kazantzis <sup>1</sup>, Ilias Georgalas <sup>2</sup>, Panagiotis Theodossiadis <sup>1</sup>, Christos Kroupis <sup>3,†</sup> and Irini Chatziralli <sup>1,†</sup>

- <sup>1</sup> 2nd Department of Ophthalmology, Attikon University Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, 12462 Athens, Greece; dkaza91@yahoo.gr (D.K.); patheo@med.uoa.gr (P.T.); eirchat@yahoo.gr (I.C.)  
<sup>2</sup> 1st Department of Ophthalmology, "G. Gennimatas" General Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, 11527 Athens, Greece; igeorgalas@yahoo.com  
<sup>3</sup> Department of Clinical Biochemistry, Attikon University Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, 12462 Athens, Greece; ckroupis@med.uoa.gr  
\* Correspondence: tonyragou@gmail.com; Tel.: +30-6947843263  
† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Numerous studies have tried to evaluate the potential role of thrombophilia-related genes in retinal vein occlusion (RVO); however, there is limited research on genes related to different pathophysiological mechanisms involved in RVO. In view of the strong contribution of oxidative stress and inflammation to the pathogenesis of RVO, the purpose of the present study was to investigate the association of inflammation- and oxidative-stress-related polymorphisms from three different genes [*apolipoprotein E (APOE)*, *paraoxonase 1 (PON1)* and *stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)*] and the risk of RVO in a Greek population. Participants in this case-control study were 50 RVO patients (RVO group) and 50 healthy volunteers (control group). Blood samples were collected on EDTA tubes and genomic DNA was extracted. Genotyping of rs854560 (L55M) and rs662 (Q192R) for the *PON1* gene, rs429358 and rs7412 for the *APOE* gene and rs1801157 [*SDF1-3'G(801)A*] for *SDF-1* gene was performed using the polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. Multiple genetic models (codominant, dominant, recessive, overdominant and log-additive) and haplotype analyses were performed using the SNPStats web tool to assess the correlation between the genetic polymorphisms and the risk of RVO. Binary logistic regression analysis was used for the association analysis between *APOE* gene variants and RVO. Given the multifactorial nature of the disease, our statistical analysis was adjusted for the most important systemic risk factors (age, hypertension and diabetes mellitus). The dominant genetic model for the *PON1* Q192R single nucleotide polymorphism (SNP) of the association analysis revealed that there was a statistically significant difference between the RVO group and the control group. Specifically, after adjusting for age and hypertension, the *PON1* 192 R allele (QR + RR) was found to be associated with a statistically significantly higher risk of RVO compared to the QQ genotype (OR = 2.51; 95% CI = 1.02–6.14,  $p = 0.04$ ). The statistically significant results were maintained after including diabetes in the multivariate model in addition to age and hypertension (OR = 2.83; 95% CI = 1.01–7.97,  $p = 0.042$ ). No statistically significant association was revealed between the other studied polymorphisms and the risk of RVO. Haplotype analysis for *PON1* SNPs, L55M and Q192R, revealed no statistically significant correlation. In conclusion, *PON1* 192 R allele carriers (QR + RR) were associated with a statistically significantly increased risk of RVO compared to the QQ homozygotes. These findings suggest that the R allele of the *PON1* Q192R is likely to play a role as a risk factor for retinal vein occlusion.



**Citation:** Ragkousis, A.; Kazantzis, D.; Georgalas, I.; Theodossiadis, P.; Kroupis, C.; Chatziralli, I. *PON1*, *APOE* and *SDF-1* Gene Polymorphisms and Risk of Retinal Vein Occlusion: A Case-Control Study. *Genes* **2024**, *15*, 712. <https://doi.org/10.3390/genes15060712>

Academic Editor: Rui Chen

Received: 22 April 2024

Revised: 25 May 2024

Accepted: 27 May 2024

Published: 30 May 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Keywords:** PON1; APOE; SDF-1; retinal vein occlusion; genetic polymorphisms; oxidative stress; inflammation

## 1. Introduction

Retinal vein occlusion (RVO), either central RVO (CRVO) or branch RVO (BRVO), is the second most common retinal vascular disorder after diabetic retinopathy, affecting more than 28 million people worldwide with a comparable prevalence between females and males. It is estimated that by 2050, the number of affected individuals in Europe will rise by more than 20% [1,2]. Age is a major risk factor as the incidence increases significantly in people over 50 years old; however, RVO can also occur in younger patients [3]. Depending on the anatomical location of the occlusion and the involvement or not of the macula, the presenting clinical symptoms vary from asymptomatic to unilateral painless visual loss. It is worth noting that BRVO causes less visual impairment and has a better prognosis compared to CRVO, although it is five-fold more prevalent than CRVO [4]. RVO can be further classified as ischemic and nonischemic depending on the extent of capillary nonperfusion areas [5].

The aetiopathogenesis of RVO is multifactorial; however, the exact pathogenetic mechanism remains elusive. It has been suggested that compression and mechanical stenosis of the retinal vein caused by an atherosclerotic artery and local inflammation induced by venous stasis are the predominant pathogenetic events in most cases [6,7]. Systemic hypertension, diabetes mellitus and open-angle glaucoma have been found to be strong independent risk factors associated with all types of RVO. Other systemic risk factors, including cardiovascular disease, hyperlipidemia, an increased body mass index and higher serum levels of the inflammation-related  $\alpha$ 2 globulin were also implicated in BRVO. In addition, hematological disorders that lead to hyperviscosity may predispose a person to RVO [3,5,6,8].

Both CRVO and BRVO can cause significant visual impairment secondary to macular edema or retinal ischemia, while ocular neovascularisation can be a devastating complication, especially in the case of anterior segment involvement (neovascular glaucoma). There are two main pathophysiological pathways in RVO: (1) inner blood–retinal barrier damage promoted by the release of inflammatory cytokines and the oxidative stress-generated reactive oxygen species; and (2) tissue hypoxia due to vessel closure, resulting in increased expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) [6,7,9,10].

So far, genetic research on RVO has been focused on thrombophilia-related genes, which encode proteins that are involved in the coagulation pathway, with the results being controversial [11]. Based on the lack of clear association, current clinical practice guidelines do not include thrombophilia screening in the routine diagnostic workup of patients presenting with vein occlusion. The identification of novel genetic susceptibility loci for RVO may contribute to a deeper understanding of the disease and provide new diagnostic strategies and therapeutic targets.

In light of the above-described pathophysiology of RVO and the crucial role of oxidative stress and inflammation, the purpose of this pilot study was to investigate the potential association of five genetic polymorphisms from three distinct genes relevant to oxidative stress and inflammation [*apolipoprotein E (APOE)*, *paraoxonase 1 (PON1)* and *stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)*] with RVO.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Subjects

The population of our case-control study consisted of 50 consecutive patients diagnosed with RVO and 50 healthy controls recruited at the 2nd Department of Ophthalmology of the National and Kapodistrian University of Athens, at Attikon University Hospital, in Athens. All participants were native Greek and unrelated (no consanguinity). The study protocol was in adherence to the ethical principles of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board of Attikon University Hospital (Reference number 290/2020). Clinical diagnosis of RVO was based on retinal examination findings of flame-shaped and dot-blot hemorrhages, retinal vein dilatation and tortuosity, with or without cotton wool spots and optic disc hyperemia. Spectral-domain optical coherence

tomography (SD-OCT) as well as Fundus fluorescein angiography (FFA) were used for confirmation of the diagnosis.

A comprehensive eye examination, which included best-corrected visual acuity measurement, Goldmann applanation tonometry, slit lamp biomicroscopy, gonioscopy, funduscopy following dilation of the pupils and SD-OCT of the macula, was conducted for all the study subjects.

Exclusion criteria were uncontrolled glaucoma with intraocular pressure greater than 30 mmHg, ocular inflammation, ocular trauma, prior intraocular surgical operation performed within the previous six months, corneal disease, inadequate fundal view due to media opacities and any other ocular disease affecting the retina or the optic nerve.

Demographic data (age, sex) and the medical history of the study participants were recorded. The diagnosis of systemic arterial hypertension included a history of antihypertensive medication or repeated, on 2 or more occasions, resting blood pressure measurement readings  $\geq 140/90$  mmHg. Diabetes mellitus was considered present in individuals who were under treatment with antidiabetic agents.

## 2.2. Genotyping

Five single nucleotide polymorphisms (SNPs) of three different genes, namely *APOE* rs429358 and rs7412, *PON1* rs854560 and rs662 and *SDF-1* rs1801157, were selected to be included in the study after a meticulous literature review on RVO genetics because of their relationship with inflammation and oxidative stress.

Blood specimens, obtained from all the 100 study participants by peripheral venous puncture, were collected into ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes. Genomic DNA was isolated from whole blood using a Macherey-Nagel NucleoSpin blood mini kit following the manufacturer's instructions and stored at  $-20$  °C. The genotyping for all the selected SNPs was determined using the polymerase chain reaction—restriction fragment length polymorphism (PCR—RFLP) method with sequence-specific primers. The Eppendorf 5331 Gradient MasterCycler Thermal Cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) was the laboratory instrument used for the PCR. A 2X Promega GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), which contained a thermostable hot-start polymerase, deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs),  $MgCl_2$  and reaction buffers, was used for the PCR for the *PON1* and *SDF-1* polymorphisms in a total volume of 25  $\mu$ L. A 2X QIAGEN HotStarTaq Plus Master Mix Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), which contained DNA polymerase, QIAGEN PCR Buffer,  $MgCl_2$  and dNTPs, was used for *APOE* in a total volume of 17.5  $\mu$ L. After amplification, digestion of the PCR products by restriction enzymes and agarose gel electrophoresis 4%, the DNA fragments were stained with ethidium bromide to be visualized by ultraviolet fluorescence. Incubation of the restriction digestion reactions in a water bath at 37 °C for 4 h for *APOE* polymorphisms and for 3 h for *PON1* and *SDF-1* polymorphisms was performed to provide optimal conditions for enzyme activity; 10X CutSmart Buffer was used for *PON1* polymorphisms and M Buffer was used for *APOE* and *SDF-1* polymorphisms.

The genotyping analysis was performed at the laboratory of the Department of Clinical Biochemistry and Molecular Diagnostics of the National and Kapodistrian University of Athens, at Attikon University Hospital, in Athens.

The two *APOE* SNPs, rs429358 and rs7412, derived from two amino acid substitutions at positions 112 (cysteine to arginine) and 158 (arginine to cysteine) in exon 4, respectively. The combination of these two *APOE* SNPs gives rise to three *APOE* haplotypes, which are widely referred to as alleles, namely E2, E3 and E4. The primers used for *APOE* genotyping were upstream primer F: 5'-ACAGAATTCCGCCCCGGCCTGGTACAC-3' and downstream primer R: 5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3'. PCR thermal cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles including denaturation at 95 °C for 1 min, primers annealing at 60 °C for 1 min and subsequent extension at 72 °C for 1 min; a final extension of 5 min duration at 72 °C was also performed. After amplification, the 244 base pair (bp) PCR product was cleaved by the HhaI restriction



enzyme (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), resulting in unique combinations of HhaI fragment sizes for each one of the *APOE* E2, E3 and E4 alleles. Specifically, E2 was characterized by the presence of 91 bp and 83 bp fragments, E3 by 91 bp, 48 bp and 35 bp fragments and E4 by 72 bp, 48 bp and 35 bp fragments [12].

The *SDF-1* rs1801157 polymorphism contains a G to A transition at position 801 in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of exon 10 and, for this reason, it is also written as *SDF1-3'G(801)A*. The sequences of the primers were the following: 5'-GAGTCAACCTGGGCAAA GCC-3' (upstream primer) and 5'-AGCTTTGGTCCTGAGAGTCC-3' (downstream primer). The PCR cycling conditions were the following: initial denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 34 cycles including denaturation at 94 °C for 1 min, primers annealing at 50 °C for 1 min and subsequent extension at 72 °C for 1 min; a final extension at 72 °C for 5 min was also performed. The MspI restriction enzyme (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) was used to digest the amplified 302 bp PCR products. The presence of *SDF1-3'(801)G* allele results in 202 bp and 100 bp bands, whereas the *SDF1-3'(801)A* allele gives one uncut 302 bp band as there is no restriction site after the G to A substitution. The heterozygous *SDF1-3'(801)GA* genotype was revealed by the presence of all three 100, 202 and 302 bp bands [13].

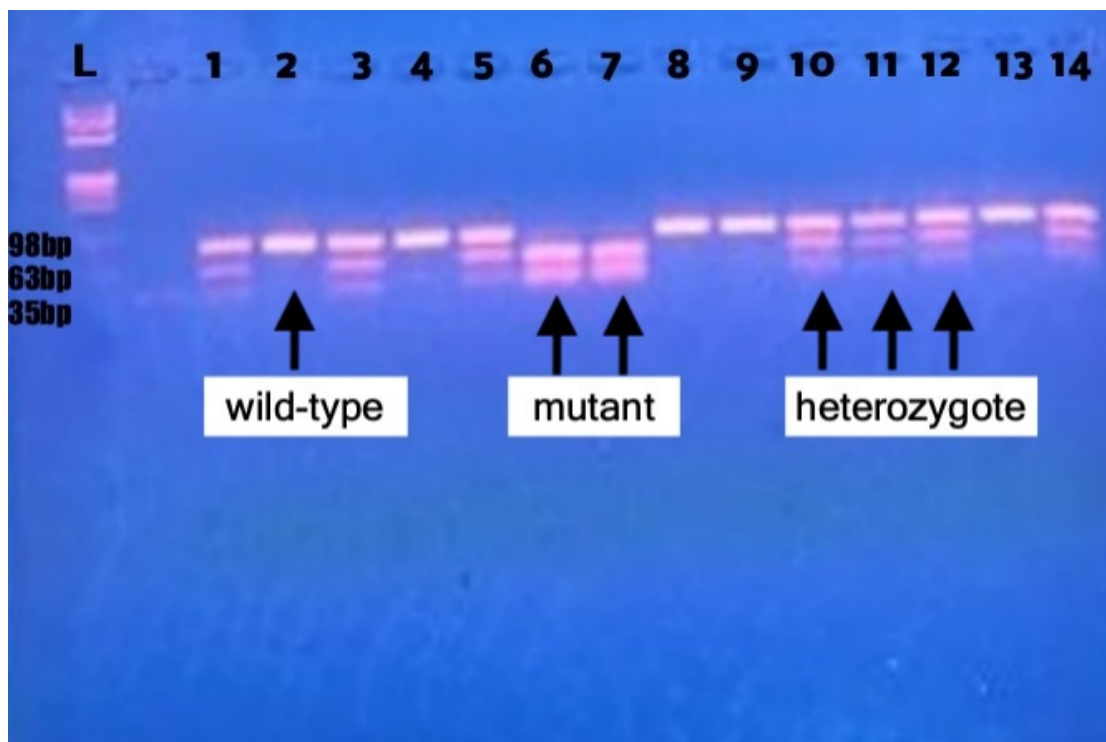
For the *PON1* gene, the rs854560 SNP was a leucine → methionine substitution at position 55 of exon 3 (abbreviated as L55M) and the rs662 SNP was a glutamine → arginine substitution at position 192 of exon 6 (abbreviated as Q192R).

The primers used for L55M were the following: 5'-GCTCTAGTCCATCAATTTAAAAC AAA-3' (forward) and 5'-TGGGTATACAGAAAGCCTAAGTGA-3' (reverse). For Q192R, the forward primer was 5'-TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG-3' and the reverse was 5'-CACGCTAAACCCAAATACATCTC-3'. The PCR thermocycling steps for *PON1* polymorphisms were as follows: initial denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 40 cycles including denaturation at 94 °C for 1 min, primers annealing at 56 °C for 1 min and subsequent extension at 72 °C for 1 min; a final extension stage of 5 min duration at 72 °C was also performed. The NlaIII and AlwI restriction enzymes (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) were used to cleave the PCR products for the L55M and Q192R polymorphisms, respectively. Regarding the L55M SNP, PCR-RFLP electrophoresis results displaying an uncut 394 bp band were classified as homozygous LL genotype (wild-type), results illustrating 124 bp and 245 bp fragments were classified as homozygous MM genotype and results displaying all three 124 bp, 245 bp and 394 fragments were classified as heterozygous LM genotype [14]. For the Q192R genotyping, the homozygous QQ genotype (wild-type) was identified by the presence of a single uncut 98 bp band and the homozygous RR genotype corresponded to a combination of 35 bp and 63 bp fragments; the display of all three 35 bp, 63 bp and 98 bp fragments indicated the heterozygous QR genotype [15]. Figure 1 shows the PCR-RFLP assay (4% agarose gel electrophoresis) of the *PON1* Q192R polymorphism.

### 2.3. Statistical Analysis

The statistical analysis of the data was conducted using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software version 29.0.2.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) and the SNPStats web tool (<https://www.snpstats.net/start.htm>, accessed on 25 March 2024) [16].

The Shapiro–Wilk and Kolmogorov–Smirnov normality tests were used to determine whether age, the only quantitative parameter, was distributed normally. Age was expressed as mean ± standard deviation. Categorical variables were presented as frequency and percentage. An independent samples *t*-test was used for age comparison between the control and RVO groups. A Chi-square ( $\chi^2$ ) test was used to compare categorical variables between the two groups.



**Figure 1.** PCR-RFLP assays of *paraoxonase 1* (*PON1*) Q192R after digestion of the amplified DNA by the AlwI restriction enzyme. Lanes 2, 4, 8, 9, 13—wild-type QQ genotype; Lanes 6, 7—mutant RR genotype; Lanes 1, 3, 5, 10, 11, 12, 14—heterozygous QR genotype. Lane L represents the  $\phi$ X174 (*phi*X174) Hae III digest DNA molecular weight marker ladder. The size of the restriction fragments is written with black letters on the left side of the figure.

The Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and the allele and genotype frequencies were obtained using SNPStats. An odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (CI) was calculated for the codominant, dominant, recessive, overdominant and log-additive genetic models to assess the contribution of the selected polymorphisms to the risk of RVO; both crude and multivariate analyses, adjusting for age, hypertension and diabetes mellitus, were performed. Haplotype analysis for the two *PON1* gene SNPs, Q192R and L55M, was also performed using SNPStats.

For the *APOE* gene, because of its unique characteristic of having 3 alleles-haplotypes, binary logistic regression analysis of SPSS, covarying for age, hypertension and diabetes, was used to estimate odds ratio and confidence interval for both E2 and E4 allele carriers compared to E3E3 homozygosity (E3E3 was set as referent group); the E2E4 genotype was included in the E2 carriers' group. Binary logistic regression association analysis for each separate *APOE* genotype was also performed.

### 3. Results

The demographic and clinical characteristics of the study subjects are summarised in Table 1. A total of 100 subjects were included in our case-control study: 50 RVO patients (54% males, 46% females) with a mean age of  $67.26 \pm 9.45$  years and 50 controls (56% males, 44% females) with a mean age of  $69.84 \pm 13.18$  years. The two groups were age- and sex-matched. Among the RVO patients, 35 of them (70%) were diagnosed with CRVO and 15 (30%) had BRVO. The frequencies of hypertension and diabetes were statistically significantly higher in the RVO group compared to the control group ( $p = 0.003$  and  $p < 0.001$ , respectively).

**Table 1.** Demographic and clinical characteristics of the patients with retinal vein occlusion (RVO) versus control volunteers.

	Control Group	RVO Group	<i>p</i>
Age (mean ± standard deviation, years)	69.84 ± 13.18	67.26 ± 9.45	0.263 *
Sex, Males/Females (N, %)	28 (56%)/22 (44%)	27 (54%)/23 (46%)	0.841 §
Hypertension (N, %)	15 (30%)	30 (60%)	0.003 §
Diabetes mellitus (N, %)	3 (6%)	20 (40%)	<0.001 §

\* *p*-value calculated using independent samples *t*-test; § *p*-value calculated using the Chi-square ( $\chi^2$ ) test. The bold font denotes the presence of statistical significance.

The allele and genotype frequencies in the RVO patients and the control group for all the studied polymorphisms are shown in Table 2. All the selected SNPs conformed to the HWE expectations ( $p > 0.05$ ).

The association analysis between the selected polymorphisms and the RVO risk revealed a statistically significant difference between the RVO group and the control group in the dominant genetic model for *PON1* Q192R rs662 polymorphism. Specifically, after adjusting for age and hypertension, the dominant model showed that the R allele (QR and RR genotypes) was statistically significantly associated with increased risk of RVO development compared to the QQ genotype (OR = 2.51; 95% CI = 1.02–6.14,  $p = 0.04$ ). The statistical significance of the result for the R allele of *PON1* Q192R was maintained after including diabetes mellitus in the multivariate analysis in addition to age and hypertension (OR = 2.83; 95% CI = 1.01–7.97,  $p = 0.042$ ). The result of the univariate (crude) association analysis for *PON1* Q192R was not statistically significant.

The other studied SNPs did not appear to be linked with susceptibility to RVO as none of the genetic models of the association analysis demonstrated any statistically significant difference between the RVO patients and the control group.

The crude and multivariate analyses results, including ORs, 95% CIs and *p*-values, of all the genetic models (codominant, dominant, recessive, overdominant and log-additive) for *PON1* L55M, *PON1* Q192R and *SDF1*-3'G(801)A are presented in Tables 3–5, respectively.

Additionally, haplotype analysis for the two SNPs of the *PON1* gene, L55M and Q192R, did not detect any association of any haplotype with the RVO risk (Table 6).

With reference to the *APOE* gene, to investigate its potential effect on RVO, we divided the genotypes into the following genotype subgroups: homozygous E3E3, E2 carriers group (E2E2, E2E3, E2E4) and E4 carriers group (E4E4, E3E4). No correlations between these genotype subgroups and RVO were observed in the binary logistic regression analysis after adjusting for age, hypertension and diabetes (Table 7). Also, no association with RVO was found when each *APOE* genotype was examined separately using binary logistic regression analysis.

**Table 2.** Allelic and genotypic distribution of *PON1* L55M, *PON1* Q192R, *SDF1*-3'G(801)A and *APOE* in RVO patients and control group.

<i>PON1</i> L55M		Control Subjects, N (%)	RVO Patients, N (%)
Allele	L	62 (62%)	65 (65%)
	M	38 (38%)	35 (35%)
Genotype	LL	21 (42%)	19 (38%)
	LM	20 (40%)	27 (54%)
	MM	9 (18%)	4 (8%)
Allele carriers (either homozygote or heterozygote)	LL + LM	41 (82%)	46 (92%)
	LM + MM	29 (58%)	31 (62%)

Table 2. Cont.

<i>PON1</i> Q192R		Control Subjects	RVO Patients
Allele	Q	79 (79%)	72 (72%)
	R	21 (21%)	28 (28%)
Genotype	QQ	33 (66%)	26 (52%)
	QR	13 (26%)	20 (40%)
	RR	4 (8%)	4 (8%)
Allele carriers (either homozygote or heterozygote)	QQ + QR	46 (92%)	46 (92%)
	QR + RR	17 (34%)	24 (48%)
<i>SDF1-3'G(801)A</i>		Control Subjects	RVO Patients
Allele	G	69 (69%)	73 (73%)
	A	31 (31%)	27 (27%)
Genotype	GG	22 (44%)	25 (50%)
	GA	25 (50%)	23 (46%)
	AA	3 (6%)	2 (4%)
Allele carriers (either homozygote or heterozygote)	GG + GA	47 (94%)	48 (96%)
	GA + AA	28 (56%)	25 (50%)
<i>APOE</i>		Control Subjects	RVO Patients
Allele	E3	84 (84%)	90 (90%)
	E4	10 (10%)	6 (6%)
	E2	6 (6%)	4 (4%)
Genotype	E3E3	36 (72%)	40 (80%)
	E2E3	5 (10%)	4 (8%)
	E3E4	7 (14)	6 (12%)
	E2E4	1 (2%)	0 (0%)
	E4E4	1 (2%)	0 (0%)
	E2E2	0 (0%)	0 (0%)
	Allele carriers (either homozygote or heterozygote)	E2 carriers (E2E2, E2E3, E2E4)	6 (12%)
E4 carriers (E4E4, E3E4)		8 (16%)	6 (12%)

Table 3. Crude and multivariate association analysis between *PON1* L55M and RVO risk.

<i>PON1</i> L55M		Frequencies		Crude Analysis		Adjusted for Age + Hypertension		Adjusted for Age + Hypertension + Diabetes	
Model	Genotype	Control Group	RVO Group	OR (95% CI)	<i>p</i> -Value	OR (95% CI)	<i>p</i> -Value	OR (95% CI)	<i>p</i> -Value
Codominant	LL	21 (42%)	19 (38%)	1.00		1.00		1.00	
	LM	20 (40%)	27 (54%)	1.49 (0.64–3.48)	0.21	1.31 (0.53–3.23)	0.3	0.82 (0.29–2.33)	0.24
	MM	9 (18%)	4 (8%)	0.49 (0.13–1.86)		0.45 (0.11–1.87)		0.25 (0.05–1.38)	
Dominant	LL	21 (42%)	19 (38%)	1.00	0.68	1.00	0.91	1.00	0.4
	LM + MM	29 (58%)	31 (62%)	1.18 (0.53–2.63)		1.05 (0.45–2.47)		0.65 (0.24–1.77)	

Table 3. Cont.

PON1 L55M		Frequencies		Crude Analysis		Adjusted for Age + Hypertension		Adjusted for Age + Hypertension + Diabetes	
Model	Genotype	Control Group	RVO Group	OR (95% CI)	p-Value	OR (95% CI)	p-Value	OR (95% CI)	p-Value
Recessive	LL + LM	41 (82%)	46 (92%)	1.00	0.13	1.00	0.15	1.00	0.1
	MM	9 (18%)	4 (8%)	0.40 (0.11–1.38)		0.39 (0.10–1.48)		0.28 (0.06–1.38)	
Overdominant	LL + MM	30 (60%)	23 (46%)	1.00	0.16	1.00	0.29	1.00	0.81
	LM	20 (40%)	27 (54%)	1.76 (0.80–3.89)		1.58 (0.68–3.66)		1.13 (0.43–2.95)	
Log-additive	-	-	-	0.88 (0.49–1.57)	0.66	0.82 (0.44–1.53)	0.54	0.59 (0.28–1.25)	0.16

Table 4. Crude and multivariate association analysis between PON1 Q192R and RVO risk.

PON1 Q192R		Frequencies		Crude Analysis		Adjusted for Age + Hypertension		Adjusted for Age + Hypertension + Diabetes	
Model	Genotype	Control Group	RVO Group	OR (95% CI)	p-Value	OR (95% CI)	p-Value	OR (95% CI)	p-Value
Codominant	QQ	33 (66%)	26 (52%)	1.00	0.31	1.00	0.12	1.00	0.13
	QR	13 (26%)	20 (40%)	1.95 (0.82–4.65)		2.61 (1.01–6.75)		2.87 (0.96–8.60)	
	RR	4 (8%)	4 (8%)	1.27 (0.29–5.57)		2.11 (0.42–10.60)		2.69 (0.42–17.30)	
Dominant	QQ	33 (66%)	26 (52%)	1.00	0.15	1.00	<b>0.04</b>	1.00	<b>0.042</b>
	QR + RR	17 (34%)	24 (48%)	1.79 (0.80–4.01)		<b>2.51 (1.02–6.14)</b>		<b>2.83 (1.01–7.97)</b>	
Recessive	QQ + QR	46 (92%)	46 (92%)	1.00	1	1.00	0.65	1.00	0.53
	RR	4 (8%)	4 (8%)	1.00 (0.24–4.24)		1.43 (0.30–6.67)		1.79 (0.30–10.66)	
Overdominant	QQ + RR	37 (74%)	30 (60%)	1.00	0.14	1.00	0.062	1.00	0.08
	QR	13 (26%)	20 (40%)	1.90 (0.81–4.43)		2.36 (0.94–5.89)		2.52 (0.88–7.23)	
Log-additive	-	-	-	1.41 (0.76–2.63)	0.27	1.84 (0.93–3.67)	0.075	2.05 (0.94–4.48)	0.067

The bold font denotes the presence of statistical significance.

Table 5. Crude and multivariate association analysis between SDF1-3'G(801)A and RVO risk.

SDF1-3'G(801)A		Frequencies		Crude Analysis		Adjusted for Age + Hypertension		Adjusted for Age + Hypertension + Diabetes	
Model	Genotype	Control Group	RVO Group	OR (95% CI)	p-Value	OR (95% CI)	p-Value	OR (95% CI)	p-Value
Codominant	GG	22 (44%)	25 (50%)	1.00	0.79	1.00	0.8	1.00	0.74
	GA	25 (50%)	23 (46%)	0.81 (0.36–1.81)		1.05 (0.44–2.51)		0.96 (0.35–2.63)	
	AA	3 (6%)	2 (4%)	0.59 (0.09–3.84)		0.53 (0.07–3.91)		0.42 (0.04–3.96)	
Dominant	GG	22 (44%)	25 (50%)	1.00	0.55	1.00	0.96	1.00	0.79
	GA + AA	28 (56%)	25 (50%)	0.79 (0.36–1.73)		0.98 (0.42–2.27)		0.88 (0.33–2.31)	
Recessive	GG + GA	47 (94%)	48 (96%)	1.00	0.65	1.00	0.51	1.00	0.44
	AA	3 (6%)	2 (4%)	0.65 (0.10–4.08)		0.52 (0.07–3.68)		0.42 (0.05–3.85)	
Overdominant	GG + AA	25 (50%)	27 (54%)	1.00	0.69	1.00	0.81	1.00	0.93
	GA	25 (50%)	23 (46%)	0.85 (0.39–1.87)		1.11 (0.47–2.61)		1.05 (0.39–2.78)	
Log-additive	-	-	-	0.79 (0.40–1.55)	0.49	0.90 (0.44–1.83)	0.77	0.81 (0.36–1.82)	0.61

**Table 6.** Haplotype analysis of *PON1* L55M and Q192R SNPs for association with RVO.

Haplotype and Frequencies Estimation						Haplotype Association with RVO					
						Crude Analysis		Adjusted for Age + Hypertension		Adjusted for Age + Hypertension + Diabetes	
L55M	Q192R	Total	Control Group	RVO Group	Cumulative Frequency	OR (95% CI)	<i>p</i> -Value	OR (95% CI)	<i>p</i> -Value	OR (95% CI)	<i>p</i> -Value
L	Q	0.40	0.42	0.39	0.40	1.00	-	1.00	-	1.00	-
M	Q	0.35	0.37	0.33	0.76	1.02 (0.51–2.03)	0.96	1.06 (0.50–2.25)	0.89	0.76 (0.32–1.78)	0.53
L	R	0.23	0.20	0.26	0.99	1.42 (0.64–3.14)	0.39	1.82 (0.76–4.38)	0.18	1.88 (0.72–4.90)	0.2
M	R	0.01	0.01	0.02	1	1.53 (0.08–30.50)	0.78	2.96 (0.16–54.11)	0.47	1.02 (0.05–22.96)	0.99

**Table 7.** Binary logistic regression analysis for association between *APOE* genotype groups and RVO.

APOE Genotype Group	Crude Analysis		Adjusted for Age + Hypertension		Adjusted for Age + Hypertension + Diabetes	
	OR (95% CI) <sup>†</sup>	<i>p</i> -Value	OR (95% CI) <sup>†</sup>	<i>p</i> -Value	OR (95% CI) <sup>†</sup>	<i>p</i> -Value
E3E3	Reference	-	Reference	-	Reference	-
E2 carriers	0.60 (0.16–2.30)	0.456	0.45 (0.11–1.90)	0.275	0.49 (0.09–2.80)	0.424
E4 carriers	0.68 (0.21–2.13)	0.503	0.53 (0.15–1.90)	0.323	0.65 (0.17–2.59)	0.545

<sup>†</sup> Odds ratio estimate from binary logistic regression analysis.

#### 4. Discussion

It is well established that age, hypertension, diabetes mellitus and open-angle glaucoma are independent risk factors for the development of RVO, either CRVO or BRVO [8]. BRVO has also been linked to several systemic risk factors, including hyperlipidemia, cardiovascular disease, elevated body mass index, elevated serum levels of the inflammation-related protein  $\alpha$ 2 globulin and hypercoagulable state. Apart from the body mass index, which is closely related to lack of physical activity, other lifestyle factors such as smoking and diet seem to play a role in RVO. Mediterranean and plant-based diets have been shown to reduce the risk for RVO due to their proven anti-inflammatory and anticoagulant effects [17]. Hypertension is considered as the strongest risk factor because it accelerates arterial stiffness (atherosclerosis), leading to mechanical compression of the adjacent vein. This cascade of events causes mechanical lumen narrowing of the thin-walled veins, abnormal blood flow and endothelial damage, resulting in the formation of an endoluminal thrombus and occlusion [18,19]. However, the exact mechanisms involved in the pathogenesis of RVO remain unclear. The three factors of Virchow's triad, consisting of alterations in blood flow (venous stasis), vascular endothelial injury and hypercoagulable state, are implicated in thrombogenesis, leading to the RVO [3].

Numerous studies have tried to investigate the potential role of genetic polymorphisms associated with thromboembolic risk in RVO. Several polymorphisms of genes that encode proteins of the coagulation pathway have been studied, including *5,1-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T* and *A1298C*, *factor V Leiden G1691A*, *plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) 4G/5G*, *factor II* (also known as *prothrombin*) *G20210A* and *vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) G1639A*, showing conflicting results about the association between these thrombophilic mutations and RVO [20–24]. In a recent meta-analysis, Romiti et al. [24] did not observe different prevalences of *factor V Leiden G1691A*, *prothrombin G20210A*, *MTHFR C677T* and *PAI-1 4G/5G* thrombophilic genetic variants between healthy subjects and patients with retinal vascular occlusion, suggesting that screening for these genetic polymorphisms in patients with retinal vein occlusion or retinal artery occlusion is not clinically useful.

*MTHFR C677T* is the most studied genetic polymorphism regarding its potential role as a risk factor for RVO. The *MTHFR* gene is responsible for the production of the



key regulatory enzyme MTHFR, whose activity determines the plasma homocysteine levels. Several case-control studies reported an association between the *MTHFR* 677TT genotype and RVO [25–29], while some other studies and meta-analyses did not reveal any association [24,30–35].

Some other researchers aimed to evaluate the association of atherosclerosis-related genetic polymorphisms including *angiotensin II type 1 receptor (AGTR1)* A1166C, *angiotensin I-converting enzyme (ACE)* insertion/deletion, *platelet glycoprotein Ia/IIa (GpIa/IIa)* C807T/G873A, *matrix metalloproteinase 2 (MMP2)* 1306C/T, *tissue inhibitors of matrix metalloproteinase 2 (TIMP2)* G418C and *adiponectin* +276 G/T with RVO [36–41]. Both Demir et al. [41] and Christodoulou et al. [36] suggested that *adiponectin* +276 T allele carriers and *AGTR1* C allele carriers are likely to be at increased risk for RVO. *MMP2* 1306C/T was found to predispose to ischemia among patients with RVO [42]. The studies investigating the rest of the abovementioned atherosclerosis-related SNPs demonstrated contradictory results.

There are also studies that selected SNPs from genes relevant to inflammation and oxidative stress, similarly to our gene selection approach and assessed their possible effect on the development of RVO. Heme oxygenase-1 is an important antioxidant enzyme that inhibits proinflammatory responses; no association was found between *heme oxygenase-1* –413A>T and RVO [43]. Maier et al. studied multiple SNPs from different cytokines, including *interleukin (IL)1 $\beta$*  –511C>T, *IL1 receptor antagonist (IL1RN)* 1018T>C, *IL4* –584C>T, *IL6* –174G>C, *IL8* –251A>T, *IL10* –592C>A, *IL18* 183A>G, *C-C motif chemokine ligand 5 (CCL5)* –403G>A, *monocyte chemoattractant protein (MCP)-1/CCL2* –2518A>G and *tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$*  –308G>A; however, none of them were implicated in the development of RVO [44].

Apolipoprotein E (APOE) has an antiatherogenic function by serving as a ligand for the low-density lipoprotein (LDL) receptor, thus facilitating the clearance of triglyceride-rich lipoproteins from circulation and the reduction of plasma cholesterol levels [45]. APOE also has known anti-inflammatory effects by suppressing the activation of the classical complement cascade and the release of proinflammatory cytokines from foam cells [46].

It is known that the APOE E4 allele is associated with lower plasma APOE levels and with an increased risk for cardiovascular disease. Apart from its atherogenic nature, the E4 allele is also a known strong genetic risk factor for Alzheimer's disease as the low plasma APOE levels result in decreased brain b-amyloid clearance [47]. Additionally, the E4 allele has been implicated in RVO and nondiabetic retinopathy [48,49].

On the contrary, it is interesting that the E4 allele is linked with a protective role in each of the age-related macular degeneration (AMD) subtypes, which can be explained by the fact that APOE is an abundant constituent of retinal drusen, being expressed locally by Müller cells and retinal pigment epithelium (RPE) [50,51].

In our study, no correlation was found between the E4 allele and the development of RVO, which aligns with the findings of Salomon et al. [25].

Stromal-cell-derived factor 1 (SDF-1) is a homeostatic chemokine, part of the C-X-C motif subfamily (also known as CXCL12). Hypoxia-induced gene expression and upregulation of SDF-1 in endothelial cells lead to inflammation and a subsequent blood–retina barrier breakdown as well as the promotion of angiogenesis. The binding of SDF-1 to its receptor CXCR4 stimulates the release of VEGF, which in turn provokes further expression of SDF-1 in endothelial cells, resulting in a positive feedback loop. The SDF-1/CXCR4 pathway plays the predominant role in the mobilization of hematopoietic stem-cell-derived endothelial progenitor cells in the process of retinal neovascularisation in retinal ischemic diseases [52,53].

Ki-I et al. [54] documented that SDF-1 vitreous levels were statistically significantly higher in patients with RVO complicated with neovascularisation compared to RVO patients without neovascularisation and controls. On the other hand, Zeng et al. [55] found comparable CXCL12 vitreous concentrations between the RVO patients and control subjects. Szigeti et al. reported that the *SDF1-3'*(801)A allele predisposes people to the development of ocular neovascularisation as a complication of RVO [13].

To our knowledge, our study is the first to investigate the potential association between the *SDF1-3'G(801)A* polymorphism and the development of RVO; however, no correlation was found.

Paraoxonase 1 (PON1) is a multifunctional calcium-dependent enzyme, strongly bound to high-density lipoprotein (HDL), which promotes the anti-inflammatory and antioxidant properties of HDL. PON1 is a promiscuous enzyme with different activities as it can hydrolyze various substrates; it has paraoxonase activity, having the ability to hydrolyze paraoxon as well as lactonase, and arylesterase activities that inhibit LDL peroxidation. The antiatherogenic function of PON1 is, therefore, based on its lactonase and arylesterase activities by reducing the proatherogenic oxidized LDL (ox-LDL), as ox-LDL is directly involved in foam cell formation [56,57].

Q192R is the most widely studied PON1 SNP, as it exerts a substrate-dependent effect on the activity. The Q192 allozyme has higher lactonase and arylesterase antiatherosclerotic activities than the 192R isoenzyme, whereas the opposite applies for paraoxonase activity as 192R is more effective in hydrolyzing paraoxon than Q192. On the other hand, L55M is regarded to influence the PON1 concentrations but not the enzymatic activity directly. The L55 allozyme is associated with increased serum PON1 concentrations compared to the 55M due to its greater stability and resistance to proteolysis [58–60].

Angayarkanni et al. [61] found that PON1-arylesterase activity was significantly lower in CRVO patients than in the control group, thus implicating oxidative stress and ox-LDL in CRVO. Ortak et al. [62] suggested a protective effect of the LL genotype of L55M polymorphism on the pathogenesis of RVO, while they did not find any effect of Q192R on RVO.

In this study, L55M did not show a correlation with the development of RVO; however, it is noteworthy that in one of our recent studies, we reported that the LL genotype provides better treatment response to intravitreal injections of anti-VEGF drugs [63].

The finding of the present study, that the *PON1* 192 R allele carriers were associated with a statistically significantly increased risk of RVO compared to the QQ homozygotes, is in line with the previous report of Murata et al. [64] that the *PON1* 192R allele was significantly associated with CRVO. Specifically, in our study, the odds ratio for the *PON1* 192 R allele carriers was 2.51 after adjusting for age and hypertension and 2.83 after adjusting for age, hypertension and diabetes mellitus; in other words, the *PON1* 192 R allele carriers were found to have 2.51 times and 2.81 times, respectively, the risk of RVO compared to QQ homozygotes (a 151% and 181% increase in risk, respectively).

The findings of our case-control study and of the relevant case-control studies for the role of the *APOE*, *SDF-1* and *PON1* genes or their encoded proteins in retinal vein occlusion are summarized in Table 8.

**Table 8.** Summary of the findings of our case-control study and of the relevant case-control studies for the role of *APOE*, *SDF-1* and *PON1* genes or their encoded proteins in retinal vein occlusion.

Study	Country	Gene Polymorphism/Encoded Protein	Design and Purpose of the Study	Sample Size	Results
Mrad et al. [48]	Tunisia	<i>APOE</i> E2, E3, E4 (SNPs: rs429358 and rs7412)	Association between <i>APOE</i> main allelic types (E2, E3, E4) and RVO	88 RVO patients, 100 control subjects	E4 allele significantly associated with RVO (Odds ratio = 3.8, CI = 2.1–6.8), whereas E3 is protective against the disease (odds ratio = 0.32, CI = 0.19–0.53). No association between E2 allele and RVO
Salomon et al. [25]	Israel	<i>APOE</i> E2, E3, E4	Association between <i>APOE</i> main allelic types (E2, E3, E4) and RVO	94 RVO patients, 92 control subjects	Homo- or Heterozygosity for E4 allele is not a risk factor for RVO (odds ratio = 1.32, CI = 0.61–2.84)



Table 8. Cont.

Study	Country	Gene Polymorphism/Encoded Protein	Design and Purpose of the Study	Sample Size	Results
Szigeti et al. [13]	Hungary	<i>SDF1-3'G(801)A</i> polymorphism	Role of <i>SDF1-3'G(801)A</i> polymorphism in the development of ocular neovascularisation (either anterior or posterior segment) as complication in RVO	130 RVO patients, 125 control subjects	<i>SDF1-3'(801)A</i> allele predisposes to the development of neovascularisation as complication of RVO (Odds ratio = 2.69, CI = 1.47–4.93)
Ki-I et al. [54]	Japan	SDF-1 (stromal cell-derived factor 1 cytokine) levels in vitreous	Relationship between SDF-1 vitreous concentration and iris and/or angle neovascularisation	20 RVO patients, 9 control subjects	SDF-1 vitreous levels were statistically significantly higher in RVO patients complicated with neovascularisation than RVO patients without neovascularisation and controls
Zeng et al. [55]	China	CXCL12 (C-X-C motif chemokine 12, also known as SDF-1) levels in vitreous	Correlation between chemokines vitreous levels and ischemic RVO	25 RVO patients, 20 control subjects	CXCL12 vitreous levels were comparable between the RVO group and control group
Murata et al. [64]	Japan	<i>PON1</i> Q192R polymorphism	Role of <i>PON1</i> Q192R polymorphism as risk factor for CRVO	42 CRVO patients, 45 control subjects	<i>PON1</i> 192R allele significantly associated with CRVO
Ortak et al. [62]	Turkey	<i>PON1</i> Q192R and <i>PON1</i> L55M polymorphisms	Association of <i>PON1</i> Q192R and <i>PON1</i> L55M polymorphisms with RVO	120 RVO patients, 84 control subjects	<i>PON1</i> 55LL was found statistically significantly lower in RVO patients compared to control subjects; no association was found between <i>PON1</i> Q192R and RVO
Angayarkanni et al. [61]	India	Serum <i>PON1</i>	Correlation between <i>PON1</i> arylesterase ( <i>PON1</i> -ARE) activity and RVO	10 CRVO patients, 20 control subjects	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>PON1</i>-ARE activity was significantly lower in CRVO patients than in the control group.</li> <li>• There was a negative correlation between serum <i>PON1</i>-ARE and plasma homocysteine levels</li> </ul>
Present study	Greece	<i>APOE</i> (E2, E3, E4), <i>SDF1-3'G(801)A</i> polymorphism, <i>PON1</i> Q192R and <i>PON1</i> L55M polymorphisms	Association of <i>PON1</i> , <i>APOE</i> and <i>SDF-1</i> gene polymorphisms with risk of retinal vein occlusion	50 RVO patients and 50 control subjects	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>PON1</i> 192R allele significantly associated with RVO (OR = 2.83, CI = 1.01–7.97)</li> <li>• No statistically significant association with RVO was found for <i>APOE</i>, <i>SDF1-3'G(801)A</i> and <i>PON1</i> L55M</li> </ul>

The observed discrepancies in the reported results among studies investigating the relationship between RVO and several different genetic polymorphisms could be attributed to the considerable heterogeneity among studies. This heterogeneity is described by ethnic

differences and environmental factors, as well as confounding variables, such as age and other clinical risk factors. Therefore, our approach to adjusting our results for clinical characteristics, including age, hypertension and diabetes, as well to excluding people with glaucoma can be considered as a strength of our study. A potential limitation of our study was the relatively small sample size. Additionally, separate analysis of CRVO and BRVO patients was not performed because of the sample size, although the two types of RVO have differences in their pathophysiology. Finally, the findings of our study might not be applicable to other ethnic groups because all the participants in our study were Greek and the prevalence of genetic variants can vary among populations of different ancestries.

## 5. Conclusions

In conclusion, the findings of our pilot case-control study suggest that the R allele of the *PON1* Q192R is likely to be a risk factor for RVO. No evidence of an association between *PON1* L55M, *APOE* and *SDF1*-3'G(801)A was found. Given the multifactorial nature of the disease, future large-scale studies and meta-analyses, which will take into consideration systemic risk factors and variations among ethnic groups, are required to verify the role of *PON1* Q192R SNP in the susceptibility to RVO and explore potential effects of other SNPs on the pathogenesis of RVO. Such studies would not only further elucidate the pathophysiological mechanisms that are implicated in RVO but may also impact clinical practice by determining the suitability of introducing complementary genetic screening as a preventive measure in high-risk patients.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.R. and I.C.; methodology, A.R. and I.C.; formal analysis, A.R., C.K. and I.C.; investigation, A.R., D.K., C.K. and I.C.; resources, C.K.; writing—original draft preparation, A.R.; writing—review and editing, D.K., I.G., P.T., C.K. and I.C.; visualization, A.R. and I.C.; supervision, I.C.; project administration, A.R., C.K. and I.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** No external funding was received for this research.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board of Attikon University Hospital (Reference number 290/2020) on 16 June 2020.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Data will be available upon request.

**Conflicts of Interest:** The authors have no conflict of interest to declare.

## References

1. Li, J.Q.; Terheyden, J.H.; Welchowski, T.; Schmid, M.; Letow, J.; Wolpers, C.; Holz, F.G.; Finger, R.P. Prevalence of Retinal Vein Occlusion in Europe: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ophthalmologica* **2019**, *241*, 183–189. [[CrossRef](#)]
2. Song, P.; Xu, Y.; Zha, M.; Zhang, Y.; Rudan, I. Global epidemiology of retinal vein occlusion: A systematic review and meta-analysis of prevalence, incidence, and risk factors. *J. Glob. Heal.* **2019**, *9*, 010427. [[CrossRef](#)]
3. Zhang, X.-T.; Zhong, Y.-F.; Xue, Y.-Q.; Li, S.-Q.; Wang, B.-Y.; Zhang, G.-Q.; Hidasa, I.; Zhang, H. Clinical Features of Central Retinal Vein Occlusion in Young Patients. *Ophthalmol. Ther.* **2022**, *11*, 1409–1422. [[CrossRef](#)]
4. Giocanti-Aurégan, A.; Donati, S.; Hoerauf, H.; Allmeier, H.; Rittenhouse, K.D.; Machewitz, T.; Yang, C.-H.; On behalf of the AURIGA Study Investigators. Real-World Management of Macular Edema Secondary to Retinal Vein Occlusion with Intravitreal Aflibercept: 24-month Results from the AURIGA Observational Study. *Ophthalmol. Ther.* **2024**, *13*, 179–203. [[CrossRef](#)]
5. Karia, N. Retinal vein occlusion: Pathophysiology and treatment options. *Clin. Ophthalmol.* **2010**, *4*, 809–816. [[CrossRef](#)]
6. Tang, Y.; Cheng, Y.; Wang, S.; Wang, Y.; Liu, P.; Wu, H. Review: The Development of Risk Factors and Cytokines in Retinal Vein Occlusion. *Front. Med.* **2022**, *9*, 910600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Berger, A.R.; Cruess, A.F.; Altomare, F.; Chaudhary, V.; Colleaux, K.; Greve, M.; Kherani, A.; Mandelcorn, E.D.; Parsons, H.; Rhéaume, M.-A.; et al. Optimal Treatment of Retinal Vein Occlusion: Canadian Expert Consensus. *Ophthalmologica* **2015**, *234*, 6–25. [[CrossRef](#)]

8. Penman, A.D.; Crowder, K.W.; Watkins, W.M. Risk Factors for Branch and Central Retinal Vein Occlusion: The Eye Disease Case-Control Study. In *50 Studies Every Ophthalmologist Should Know*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2020; pp. 115–120. [[CrossRef](#)]
9. Chan, T.C.; Berka, J.L.W.; Deliyanti, D.; Hunter, D.; Fung, A.; Liew, G.; White, A. The role of reactive oxygen species in the pathogenesis and treatment of retinal diseases. *Exp. Eye Res.* **2020**, *201*, 108255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Cehofski, L.J.; Honoré, B.; Vorum, H. A Review: Proteomics in Retinal Artery Occlusion, Retinal Vein Occlusion, Diabetic Retinopathy and Acquired Macular Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Romanitan, M.O.; Popa-Cherecheanu, M.; Vasile, V.A.; Stanca, S.; Iancu, G.; Zemba, M.; Branisteanu, D.; Iancu, R.; Pirvulescu, R.A. Highlights on Genetic Polymorphism Associated with Thromboembolic Risk; Implications in Ophthalmic and Autoimmune Disorders—A Review. *Diagnostics* **2023**, *13*, 1267. [[CrossRef](#)]
12. Hixson, J.; Vernier, D. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J. Lipid Res.* **1990**, *31*, 545–548. [[CrossRef](#)]
13. Szigeti, A.; Ecsedy, M.; Schneider, M.; Lénárt, L.; Lesch, B.; Nagy, Z.Z.; Fekete, A.; Récsán, Z. Stromal Cell-Derived Factor 1 Polymorphism in Retinal Vein Occlusion. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0166544. [[CrossRef](#)]
14. Cozzi, L.; Campolo, J.; Parolini, M.; De Maria, R.; Patrosso, M.C.; Marocchi, A.; Parodi, O.; Penco, S. Paraoxonase 1 L55M, Q192R and paraoxonase 2 S311C alleles in atherothrombosis. *Mol. Cell. Biochem.* **2013**, *374*, 233–238. [[CrossRef](#)]
15. Zama, T.; Murata, M.; Matsubara, Y.; Kawano, K.; Aoki, N.; Yoshino, H.; Watanabe, G.; Ishikawa, K.; Ikeda, Y. A <sup>192</sup> Arg Variant of the Human Paraoxonase (*HUMPONA*) Gene Polymorphism Is Associated with an Increased Risk for Coronary Artery Disease in the Japanese. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **1997**, *17*, 3565–3569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Solé, X.; Guinó, E.; Valls, J.; Iniesta, R.; Moreno, V. SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 1928–1929. [[CrossRef](#)]
17. Lendzioszek, M.; Mrugacz, M.; Bryl, A.; Poppe, E.; Zorena, K. Prevention and Treatment of Retinal Vein Occlusion: The Role of Diet—A Review. *Nutrients* **2023**, *15*, 3237. [[CrossRef](#)]
18. Lee, J.H.; Kim, S.H.; Kim, E. Influence of Smoking and Controlled Medical Conditions on the Risks of Branch Retinal Vein Occlusion in South Korea: A Population-Based Study. *Ophthalmic Epidemiol.* **2024**, *Online ahead of print*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Hashimoto, Y.; Kaneko, H.; Okada, A.; Matsui, H.; Yasunaga, H.; Aihara, M.; Obata, R. Association between Retinal Vein Occlusion and Life's Simple 7 Cardiovascular Health Metrics: A Large Claims Database Study. *Ophthalmol. Retin.* **2022**, *6*, 684–692. [[CrossRef](#)]
20. Rehak, M.; Rehak, J.; Müller, M.; Faude, S.; Faude, F.; Siegemund, A.; Krcova, V.; Slavik, L.; Hasenclever, D.; Scholz, M.; et al. The prevalence of activated protein C (APC) resistance and factor V Leiden is significantly higher in patients with retinal vein occlusion without general risk factors. Case-control study and meta-analysis. *Thromb. Haemost.* **2008**, *99*, 925–929. [[CrossRef](#)]
21. Yioti, G.G.; Panagiotou, O.A.; Vartholomatos, G.A.; Kolaitis, N.I.; Pappa, C.N.; Evangelou, E.; Stefanidou, M.I. Genetic polymorphisms associated with retinal vein occlusion: A Greek case-control study and meta-analysis. *Ophthalmic Genet.* **2013**, *34*, 130–139. [[CrossRef](#)]
22. Weger, M.; Steinbrugger, I.; Renner, W.; Pöschl, E.M.; Brockmann, T.; Rabensteiner, D.F.; El-Shabrawi, Y.; Haas, A. Role of the Vitamin K Epoxide Reductase Complex Subunit 1 (VKORC1) –1639G>A Gene Polymorphism in Patients with Retinal Vein Occlusion. *Curr. Eye Res.* **2013**, *38*, 1278–1282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ortak, H.; Söğüt, E.; Demir, H.; Ardagil, A.; Benli, I.; Sahin, S. Predictive value of the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 G-1639A and C1173T single nucleotide polymorphisms in retinal vein occlusion. *Clin. Exp. Ophthalmol.* **2012**, *40*, 743–748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Romiti, G.F.; Corica, B.; Borgi, M.; Visioli, G.; Pacella, E.; Cangemi, R.; Proietti, M.; Basili, S.; Raparelli, V. Inherited and acquired thrombophilia in adults with retinal vascular occlusion: A systematic review and meta-analysis. *J. Thromb. Haemost.* **2020**, *18*, 3249–3266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Salomon, O.; Moisseiev, J.; Rosenberg, N.; Vidne, O.; Yassur, I.; Zivelin, A.; Treister, G.; Steinberg, D.M.; Seligsohn, U. Analysis of genetic polymorphisms related to thrombosis and other risk factors in patients with retinal vein occlusion. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **1998**, *9*, 617–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Marcucci, R.; Giusti, B.; Betti, I.; Evangelisti, L.; Fedi, S.; Sodi, A.; Cappelli, S.; Menchini, U.; Abbate, R.; Prisco, D. Genetic determinants of fasting and post-methionine hyperhomocysteinemia in patients with retinal vein occlusion. *Thromb. Res.* **2003**, *110*, 7–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Risse, F.; Frank, R.D.; Weinberger, A.W. Thrombophilia in patients with retinal vein occlusion: A retrospective analysis. *Ophthalmologica* **2014**, *232*, 46–52. [[CrossRef](#)]
28. Russo, P.D.; Damante, G.; Pasca, S.; Turello, M.; Barillari, G. Thrombophilic Mutations as Risk Factor for Retinal Vein Occlusion: A Case-Control Study. *Clin. Appl. Thromb.* **2014**, *21*, 373–377. [[CrossRef](#)]
29. Ferrazzi, P.; Di Micco, P.; Quaglia, I.; Rossi, L.S.; Bellatorre, A.G.; Gaspari, G.; Rota, L.L.; Lodigiani, C. Homocysteine, MTHFR C677T gene polymorphism, folic acid and vitamin B 12 in patients with retinal vein occlusion. *Thromb. J.* **2005**, *3*, 13. [[CrossRef](#)]
30. McGimpsey, S.J.; Woodside, J.V.; Cardwell, C.; Cahill, M.; Chakravarthy, U. Homocysteine, Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism, and Risk of Retinal Vein Occlusion: A Meta-analysis. *Ophthalmology* **2009**, *116*, 1778–1787.e1. [[CrossRef](#)]
31. Li, D.; Zhou, M.; Peng, X.; Sun, H. Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, and risk of retinal vein occlusion: An updated meta-analysis. *BMC Ophthalmol.* **2014**, *14*, 147. [[CrossRef](#)]

32. Cahill, M.T.; Stinnett, S.S.; Fekrat, S. Meta-analysis of plasma homocysteine, serum folate, serum vitamin B12, and thermolabile MTHFR genotype as risk factors for retinal vascular occlusive disease. *Am. J. Ophthalmol.* **2003**, *136*, 1136–1150. [[CrossRef](#)]
33. Heijer, M.D.; Cruysberg, J.; Wollersheim, H.; Bredie, S.; Janssen, M. Retinal vein occlusion: A form of venous thrombosis or a complication of atherosclerosis? A meta-analysis of thrombophilic factors. *Thromb. Haemost.* **2005**, *93*, 1021–1026. [[CrossRef](#)]
34. Mrad, M.; Wathek, C.; Ben Saleh, M.; Baatour, M.; Rannen, R.; Lamine, K.; Gabsi, S.; Gritli, N.; Fekih-Mrissa, N. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (A1298C and C677T) polymorphisms with retinal vein occlusion in Tunisian patients. *Transfus. Apher. Sci.* **2014**, *50*, 283–287. [[CrossRef](#)]
35. Giannaki, K.; Politou, M.; Rouvas, A.; Merkouri, E.; Travlou, A.; Theodosiadis, P.; Gialeraki, A. Retinal vein occlusion. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **2013**, *24*, 279–283. [[CrossRef](#)]
36. Christodoulou, A.; Bagli, E.; Gazouli, M.; Moschos, M.M.; Kitsos, G. Genetic polymorphisms associated with the prevalence of retinal vein occlusion in a Greek population. *Int. Ophthalmol.* **2019**, *39*, 2637–2648. [[CrossRef](#)]
37. Kutluturk, I.; Karagöz, A.; Bezgin, T.; Oduncu, V.; Elveran, A.; Doğan, C.; Elbay, A.; Kirma, C.; Özertürk, Y. Relationship between angiotensin I-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism and retinal vein occlusion. *Thromb. J.* **2014**, *12*, 17. [[CrossRef](#)]
38. Gadelha, T.; Biancardi, A.L.; Forster, M.; Spector, N. 807C/T polymorphism in platelet glycoprotein Ia gene is not associated with retinal vein occlusion. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2007**, *245*, 1739–1740. [[CrossRef](#)]
39. Dodson, P.M.; Haynes, J.; Starczynski, J.; Farmer, J.; Shigdar, S.; Fegan, G.; Johnson, R.J.; Fegan, C. The platelet glycoprotein Ia/IIa gene polymorphism C807T/G873A: A novel risk factor for retinal vein occlusion. *Eye* **2003**, *17*, 772–777. [[CrossRef](#)]
40. Ortak, H.; Demir, S.; Ateş, O.; Söğüt, E.; Alim, S.; Benli, I. Association of MMP2-1306C/T and TIMP2G-418C polymorphisms in retinal vein occlusion. *Exp. Eye Res.* **2013**, *113*, 151–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Demir, S.; Ortak, H.; Benli, I.; Alim, S.; Bütün, I.; Güneş, A.; Ateş, Ö. Genetic Association between Arterial Stiffness-Related Gene Polymorphisms in Brvo and Crvo Patients in a Turkish Population. *Retina* **2015**, *35*, 2043–2051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Christodoulou, A.; Bagli, E.; Gazouli, M.; Moschos, M.M.; Kitsos, G. Association of MMP2-1306C/T Polymorphism with Ischemic Retinal Vein Occlusion. *Arch. Med. Res.* **2020**, *51*, 710–713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Posch-Pertl, L.; List, W.; Michelitsch, M.; Pinter-Hausberger, S.; Berisha, B.; Posch, F.; Kloeckl, L.; Renner, W.; Weger, M. Heme oxygenase-1 gene rs2071746 polymorphism in retinal vein occlusion. *Ophthalmic Genet.* **2022**, *43*, 627–632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Maier, R.; Steinbrugger, I.; Haas, A.; Selimovic, M.; Renner, W.; El-Shabrawi, Y.; Werner, C.; Wedrich, A.; Schmut, O.; Weger, M. Role of Inflammation-Related Gene Polymorphisms in Patients with Central Retinal Vein Occlusion. *Ophthalmology* **2011**, *118*, 1125–1129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Marais, A.D. Apolipoprotein E and Atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2021**, *23*, 34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Puthia, M.; Marzinek, J.K.; Petruk, G.; Bergdahl, G.E.; Bond, P.J.; Petrlova, J. Antibacterial and Anti-Inflammatory Effects of Apolipoprotein E. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Rasmussen, K.L.; Tybjaerg-Hansen, A.; Nordestgaard, B.G.; Frikke-Schmidt, R. Plasma levels of apolipoprotein E, APOE genotype, and all-cause and cause-specific mortality in 105 949 individuals from a white general population cohort. *Eur. Hear. J.* **2019**, *40*, 2813–2824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Mrad, M.; Fekih-Mrissa, N.; Wathek, C.; Sayeh, A.; Maalej, A.; Rannen, R.; Nsiri, B. Role of the Apolipoprotein E Polymorphisms in the Development of Retinal Vein Occlusion in a Tunisian Population: A Case–Control Study. *Clin. Appl. Thromb.* **2017**, *23*, 645–651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Liew, G.; Shankar, A.; Wang, J.J.; Klein, R.; Bray, M.S.; Couper, D.J.; Sharrett, A.R.; Wong, T.Y. Apolipoprotein E Gene Polymorphisms and Retinal Vascular Signs: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arch. Ophthalmol.* **2007**, *125*, 813–818. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Hu, M.L.; Quinn, J.; Xue, K. Interactions between Apolipoprotein E Metabolism and Retinal Inflammation in Age-Related Macular Degeneration. *Life* **2021**, *11*, 635. [[CrossRef](#)]
51. Xiyang, M.; Wenbo, W.; Wangyi, F.; Qinghuai, L. Association of Apolipoprotein E Polymorphisms with Age-related Macular Degeneration Subtypes: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *Arch. Med. Res.* **2017**, *48*, 370–377. [[CrossRef](#)]
52. e Silva, R.L.; Shen, J.; Hackett, S.F.; Kachi, S.; Akiyama, H.; Kiuchi, K.; Yokoi, K.; Hatara, M.C.; Lauer, T.; Aslam, S.; et al. The SDF-1/CXCR4 ligand/receptor pair is an important contributor to several types of ocular neovascularization. *FASEB J.* **2007**, *21*, 3219–3230. [[CrossRef](#)]
53. Sadri, F.; Rezaei, Z.; Fereidouni, M. The significance of the SDF-1/CXCR4 signaling pathway in the normal development. *Mol. Biol. Rep.* **2022**, *49*, 3307–3320. [[PubMed](#)]
54. Ki-I, Y.; Arimura, N.; Noda, Y.; Yamakiri, K.; Doi, N.; Hashiguchi, T.; Maruyama, I.; Shimura, M.; Sakamoto, T. Stromal-Derived Factor-1 and Inflammatory Cytokines in Retinal Vein Occlusion. *Curr. Eye Res.* **2007**, *32*, 1065–1072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Zeng, Y.; Cao, D.; Yu, H.; Zhuang, X.; Yang, D.; Hu, Y.; He, M.; Zhang, L. Comprehensive analysis of vitreous chemokines involved in ischemic retinal vein occlusion. *Mol. Vis.* **2022**, *25*, 756.
56. Eren, E.; Yilmaz, N.; Aydin, O. Functionally defective high-density lipoprotein and paraoxonase: A couple for endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Cholesterol* **2013**, *2013*, 792090. [[CrossRef](#)]
57. Mackness, M.; Mackness, B. Human Paraonase-1 (PON1): Gene Structure and Expression, Promiscuous Activities and Multiple Physiological Roles. *Gene* **2015**, *567*, 12. [[CrossRef](#)]

58. Kunachowicz, D.; Ściskalska, M.; Kepinska, M. Modulatory Effect of Lifestyle-Related, Environmental and Genetic Factors on Paraoxonase-1 Activity: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Heal.* **2023**, *20*, 2813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Durrington, P.N.; Bashir, B.; Soran, H. Paraoxonase 1 and atherosclerosis. *Front. Cardiovasc. Med.* **2023**, *10*, 1065967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Valencia, C.S.; Isaza, M.C.; Henao, B.J.; Beltrán, A.L.; Loango, N.; Landázuri, P. Arylesterase activity of paraoxonase 1 (PON1) on HDL3 and HDL2: Relationship with Q192R, C-108T, and L55M polymorphisms. *Biochem. Biophys. Rep.* **2021**, *26*, 100971. [[CrossRef](#)]
61. Angayarkanni, N.; Barathi, S.; Seethalakshmi, T.; Punitham, R.; Sivaramakrishna, R.; Suganeswari, G.; Tarun, S. Serum PON1 arylesterase activity in relation to hyperhomocysteinaemia and oxidative stress in young adult central retinal venous occlusion patients. *Eye* **2008**, *22*, 969–974. [[CrossRef](#)]
62. Ortak, H.; Söğüt, E.; Ateş, O.; Erkorkmaz, U.; Benli, I.; Akbas, A.; Demir, S.; Özyurt, H. Protective effect of paraoxonase 1 gene variant L55M in retinal vein occlusion. *Mol. Vis.* **2013**, *19*, 486. [[PubMed](#)]
63. Ragkousis, A.; Kazantzis, D.; Georgalas, I.; Theodossiadis, P.; Kroupis, C.; Chatziralli, I. Association of *PON1*, *APOE* and *SDF-1* Gene Polymorphisms with Treatment Response to Intravitreal Anti-VEGF Treatment in Patients with Retinal Vein Occlusion. *Semin. Ophthalmol.* **2024**, *39*, 201–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Murata, M.; Nakagawa, M.; Takahashi, S. Molecular Variant of the Human Paraoxonase/Arylesterase Gene Is Associated with Central Retinal Vein Occlusion in the Japanese Population. *Ophthalmologica* **1998**, *212*, 257–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.