



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ
ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Εξελίξεις σε διαγνωστικές και θεραπευτικές
μεθόδους καθώς και νέες χειρουργικές τεχνικές
σε παθήσεις υαλοειδούς-αμφιβληστροειδούς**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΜΠΑΤΣΟΣ
ΟΦΘΑΛΜΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ
ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Εξελίξεις σε διαγνωστικές και θεραπευτικές
μεθόδους καθώς και νέες χειρουργικές τεχνικές
σε παθήσεις υαλοειδούς-αμφιβληστροειδούς**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΜΠΑΤΣΟΣ
ΟΦΘΑΛΜΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα N. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης του κ. Μπάτσου Γεωργίου: 29-3-2016

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 788^α/31-5-2016

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Στεφανιώτου Μαρία, Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Κατσάνος Ανδρέας, Επίκουρος Καθηγητής Οφθαλμολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Limberis Loren, Associate Professor of Engineering, East Carolina University.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 27-6-2016

«Εξελίξεις σε διαγνωστικές και θεραπευτικές μεθόδους καθώς και νέες χειρουργικές τεχνικές σε παθήσεις υαλοειδούς –αμφιβληστροειδούς»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 910^α/21-1-2020

Ασπρούδης Ιωάννης	Καθηγητής Οφθαλμολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γεωργίου Ιωάννης	Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καλογερόπουλος Χρήστος	Καθηγητής Οφθαλμολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κίτσος Γεώργιος	Καθηγητής Οφθαλμολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Στεφανιώτου Μαρία	Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κατσάνος Ανδρέας	Επίκουρος Καθηγητής Οφθαλμολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Limberis Loren	Associate Professor of Engineering East Carolina University U.S.A

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 24-2-2020

Ιωάννινα 26-2-2020

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Στη μητέρα μου, στη σύζυγό μου και στην αδελφή μου

Στη μνήμη του πατέρα μου

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κυρία Στεφανιώτου, Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας, που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω τη διατριβή μου επάνω σε ένα πρωτοποριακό θέμα. Σε όλη τη διάρκεια της διατριβής, με στήριξε ηθικά και με καθοδήγησε ουσιαστικά με κάθε τρόπο, παρέχοντας όλα τα απαραίτητα υλικά. Εκτός από το ερευνητικό πεδίο, μέσα από τις συμβουλές της με βοήθησε να βελτιώσω και τις δεξιότητές μου ως οφθαλμίατρος συνολικά.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Οφθαλμολογίας, κύριο Ανδρέα Κατσάνο. Ο κύριος Κατσάνος με βοήθησε να αναπτύξω σωστή ερευνητική σκέψη μέσω της καθοδήγησής του στη διατύπωση σωστών υποθέσεων, με γνώμονα την τεκμηριωμένη ιατρική.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοτεχνολογίας κο Loren Limberis και την ομάδα του, που μας άνοιξαν το δρόμο της έρευνας σε ένα πρωτοποριακό για την οφθαλμολογία πεδίο. Τα συμπεράσματα της παρούσας διατριβής αποτελούν το εφαλτήριο για περαιτέρω συνεργασία στο χώρο αυτό.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κο Γεώργιο Βαρθολομάτο, υπεύθυνο εργαστηρίου κυτταρομετρίας ροής, για την επιστημονική και υλικοτεχνική υποστήριξη. Μέσω του εργαστηρίου του και της ακρίβειας των μετρήσεών του, έγινε εφικτή η ταυτοποίηση σημαντικών παραγόντων σε μοριακό επίπεδο.

Ξεχωριστά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Ελένη Χριστοδούλου, Οφθαλμίατρο, η οποία συμμετείχε ενεργά σε όλες τις κλινικοεργαστηριακές διεργασίες που ήταν απαραίτητες για την περάτωση της παρούσας διατριβής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μητέρα μου και την αδελφή μου, για τη συμπαράστασή τους σε κάθε μου προσπάθεια.

Πρόλογος

Στην οφθαλμολογία, η διάγνωση και παρακολούθηση των ασθενών με υαλοαμφιβληστροειδικές παθήσεις, παραδοσιακά πραγματοποιείται μέσω της κλινικής εξέτασης και διαφόρων απεικονιστικών μέσων όπως η τομογραφία οπτικής συνοχής. Οι τελευταίες εξελίξεις στη φαρμακοθεραπεία έδωσαν στους οφθαλμιάτρους πολλές θεραπευτικές επιλογές, με νέους θεραπευτικούς παράγοντες και θεραπευτικά πρωτόκολλα. Εντούτοις ορισμένοι ασθενείς δεν ανταποκρίνονται επαρκώς στη θεραπεία και για το λόγο αυτό, σε κάποιες περιπτώσεις απαιτείται χειρουργική παρέμβαση. Επιπροσθέτως παρά την εξέλιξη των χειρουργικών μέσων και τεχνικών, εξακολουθεί να υπάρχει ανάγκη για συνεπικουρική φαρμακευτική αγωγή πριν και μετά την εκάστοτε χειρουργική επέμβαση, δημιουργώντας συχνά διλήμματα στους χειρουργούς του οπισθίου ημιμορίου.

Μια πιθανή αιτία για όλες αυτές τις καταστάσεις, μπορεί να είναι το γεγονός ότι σε πολλές παθήσεις υαλοειδούς-αμφιβληστροειδούς εμπλέκονται παραπάνω από ένας παθογενετικοί μηχανισμοί. Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια ανεύρεσης νέων βιοδεικτών που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην καλύτερη διάγνωση και παρακολούθηση των ασθενών αυτών στοχεύοντας σε πιο εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση.

Ένας από τους σκοπούς της παρούσας διατριβής είναι η ανίχνευση νέων βιοδεικτών και θεραπευτικών στόχων, σε υαλοαμφιβληστροειδικές παθήσεις, με μια σύγχρονη μέθοδο όπως είναι αυτή της κυτταρομετρίας ροής.

Για την επίτευξη εξατομικευμένης θεραπευτικής προσέγγισης με την έννοια του παρακλίνιου εργαστηριακού ελέγχου, point-of-care testing (POCT), χρειάζεται επίσης να ληφθούν υπόψιν ορισμένοι προβληματισμοί. Οι σύγχρονες διαγνωστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση βιοδεικτών (όπως η ELISA), εξακολουθούν να είναι ακριβές και απαιτούν σύνθετο εξοπλισμό καθώς και εξειδικευμένο προσωπικό. Έτσι καθίσταται δύσκολη η εφαρμογή τους στην καθημερινή κλινική πράξη. Επιπροσθέτως, κατά τη μελέτη διαφόρων ιστών του οφθαλμού παρατηρούνται κάποιες δυσκολίες που έχουν να κάνουν με τη

φύση τους. Για παράδειγμα, τα δείγματα υαλοειδούς παρουσιάζουν μια πολυπλοκότητα λόγω του συνδυασμού μικρής ποσότητας διαθέσιμου δείγματος και χαμηλής συγκέντρωσης βιοδεικτών.

Ένας ακόμη σκοπός της διατριβής είναι η διερεύνηση νέων διαγνωστικών μέσων, βασιζόμενων στα απταμερή τα οποία μέχρι στιγμής δεν έχουν κλινική διαγνωστική εφαρμογή στην οφθαλμολογία. Η χρήση διαγνωστικών βιοαισθητήρων βασισμένων στα απταμερή, θα μπορούσε να δώσει λύση στα παραπάνω προβλήματα συνδυάζοντας οικονομία και ευελιξία.

Περιεχόμενα

Πρόλογος	1
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	7
Εισαγωγή.....	8
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ	8
Το υαλοειδές σώμα.....	8
Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας.....	10
Η ωχρά κηλίδα.....	12
ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΥΑΛΟΕΙΔΟΥΣ-ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ.....	12
Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια.....	12
Διαβητικό Οίδημα ωχράς κηλίδας.....	14
Παραγωγική Υαλοαμφιβληστροειδοπάθεια	15
Παράγοντες που εμπλέκονται σε παθήσεις υαλοειδούς αμφιβληστροειδούς .	18
Κυτταροκίνες.....	18
Μόρια προσκόλλησης κυττάρων.....	19
Αυξητικοί παράγοντες	20
Η Λιποκαλίνη 2 (Lipocalin-2).....	21
Μελέτη της Λιποκαλίνης 2 στην οφθαλμολογία.....	23
Κυτταρομετρία.....	24
Κυτταρομετρία Ροής.....	24
Σφαιριδομετρία.....	25
Κυτταρομετρητής Ροής.....	25
Απταμερή	30
Εφαρμογές	30
Διάγνωση.....	30
Απεικόνιση.....	31
Θεραπεία.....	31
Εφαρμογές απταμερών στην οφθαλμολογία	32
Δημιουργία απταμερών.....	33
Σκοπός	50
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	51
Υλικά και μέθοδοι	52
Κυτταρομετρία ροής.....	53
Στατιστική ανάλυση	54
Αποτελέσματα.....	55
Δημογραφικά.....	58
Λιποκαλίνη-2 (LCN2).....	58
Ιντερλευκίνη 6 (IL6)	62
Ιντερλευκίνη 8 (IL8)	65
Ιντερλευκίνη 1β (IL1β).....	68
Ιντερλευκίνη 27 (IL27).....	70
Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης κυττάρων (ICAM)	72
Το μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων (VCAM-1)	75
Η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων (MCP-1)	78
Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNFα).....	80
Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGFA)	82
Δημογραφικά.....	87

Λιποκαλίνη 2 και υπόλοιπες κυτταροκίνες στους διαβητικούς ασθενείς	87
Συζήτηση	93
Προβληματισμοί σχετικά με τη διαγνωστική, θεραπευτική και χειρουργική προσέγγιση ασθενών με παθήσεις υαλοειδούς-αμφιβληστροειδούς.....	95
Πλατφόρμα ALISA	101
Σχεδιασμός απταμερούς Λιποκαλίνης 2.....	102
Συμπεράσματα.....	105
Περίληψη.....	107
Περίληψη στα αγγλικά (Summary).....	109

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

YO	Υαλουρονικό Οξύ
NA	Νευροαμφιβληστροειδής
ME	Μελάγχρουν Επιθήλιο
ELM	External Limiting Membrane, (έξω αφοριστική μεμβράνη)
IL	Ιντερλευκίνη
OPL	Outer Plexiform Layer, (έξω δικτυωτή στιβάδα)
ONL	Outer Nuclear Layer, (έξω πυρηνική στιβάδα)
INL	Inner Nuclear Layer, (έσω πυρηνική στιβάδα)
IPL	Inner Plexiform Layer, (έσω δικτυωτή στιβάδα)
ILM	Inner Limiting Membrane (έσω αφοριστική μεμβράνη)
EMA ή (IRMA)	Ενδοαμφιβληστροειδικές Μικροαγγειακές Ανωμαλίες, (intraretinal microvascular abnormalities)
ΣΔ	Σακχαρώδης διαβήτης
ΔΑ	Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια
ΜΠΔΑ	Μη Παραγωγική Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια
ΠΔΑ	Παραγωγική Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια
ΔΟΩ	Διαβητικό Οίδημα της Ωχράς Κηλίδας
ΠΥΑ	Παραγωγική Υαλοαμφιβληστροειδοπάθεια
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας)
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule-1 (διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης κυττάρων)
VCAM	Vascular Adhesion Molecule (μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων)
MCP-1	Monocyte Chemoattracting Protein 1 (χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων)
PIGF	Placental Growth Factor (πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας)
TNFα	Tumor Necrosis Factor α (Παράγοντας Νέκρωσης όγκων α)
IL	Interleukin (Ιντερλευκίνη)
LCN2 (NGAL)	Λιποκαλίνη-2 (λιποκαλίνη σχετιζόμενη με τη ζελατινάση των ουδετεροφίλων)
FITC	Ισοθειοκυανική Φλουορεσκεΐνη
PE	R-Φυκοερυθρίνη
MRI	Μαγνητική Τομογραφία
US	Υπερηχογραφία
CT	Αξονική Τομογραφία
DOX	Δοξορουμπικίνη
PDGF-β	platelet derived growth factor (αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγων)
HEΩ	Ηλικιακή Εκφύλιση Ωχράς Κηλίδας
PAA (RRD)	Ρηγματογενής Αποκόλληση Αμφιβληστροειδούς (Rhegmatogenous Retinal Detachment)
ΠΔΑ, (PDR)	Παραγωγική Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια (Proliferative Diabetic Retinopathy)

ΣΥΕ (VMT)	Σύνδρομο Υαλοωχρικής Έλξης (Vitreomacular Traction Syndrome)
iEAM, (iERM)	Ιδιοπαθής Επιαμφιβληστροειδική Μembrάνη (idiopathic Epiretinal Membrane)
ΟΠΟΩ, (FTMH)	Οπή Ωχράς Κηλίδας Ολικού Πάχους (Full Thickness Macular Hole)
ΗΚΚ	Ηπατοκυτταρικό Καρκίνωμα (ΗΚΚ).
SELEX	Systematic evolution of Ligands by Exponential Enrichment, συστηματική εξέλιξη των συνδέσμων μέσω εκθετικού εμπλουτισμού
PCR	Polymerase Chain Reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
SPR	Surface Plasmon Resonance, επιφανειακός συντονισμός πλασμονίων
CD	Circular Dichroism, κυκλικός διχρωισμός
OCT	Optical Coherence Tomography τομογραφία οπτικής συνοχής)
ELISA	Enzyme Linked Immobilized Sorbent Assay
ALISA	Aptamer Liked Immobilized Sorbent Assay
MFI	Mean Florescent Intensity , μέση ένταση φθορισμού

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ

Το υαλοειδές σώμα

Το υαλοειδές σώμα αποτελεί μια διαυγή δομή τύπου γέλης περίπου 4mL σε όγκο, καταλαμβάνοντας περίπου το 80% του οφθαλμού και εντοπίζεται στην υαλοειδική κοιλότητα μεταξύ φακού και αμφιβληστροειδούς. Η σύσταση του είναι περίπου 98% ύδωρ και 2% δομικές πρωτεΐνες (1), εξωκυττάρια ουσία και διάφορα άλλα στοιχεία (2).

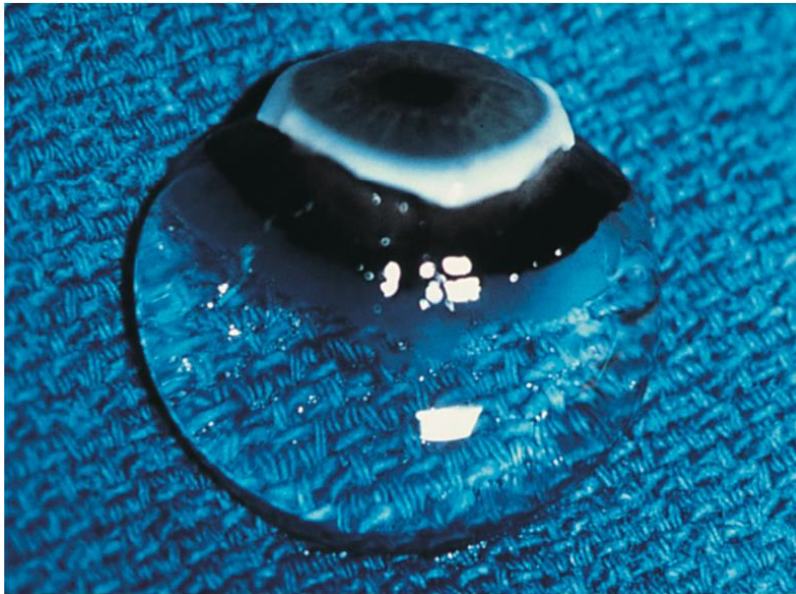
Η κύρια δομική πρωτεΐνη είναι το κολλαγόνο. Σε ποσοστό 75% απαντάται κολλαγόνο τύπου II, σε ποσοστό 15% κολλαγόνο τύπου IX ενώ σε μικρότερο ποσοστό αποτελείται από κολλαγόνο τύπου XVIII (πρόδρομο της ενδοστατίνης, ενός ισχυρού αναστολέα της αγγειογένεσης) (3).

Το υαλουρονικό οξύ (ΥΟ) συντίθεται από τα υαλοκύτταρα (4), το ακτινωτό σώμα και/ή τα κύτταρα του Müller ενώ είναι σε θέση να επηρεάζει τη διάχυση των φαρμάκων (5, 6). Στο ΥΟ μπορεί να οφείλονται διάφορες μηχανικές δυνάμεις (σύσπαση) που ασκούνται στον αμφιβληστροειδή μετά από ιονικές διαταραχές ή μετά αφυδάτωση όπως συμβαίνει στον διαβήτη (7). Η θειική χονδροϊτίνη εξυπηρετεί στη διατήρηση της μοριακής δομής του υαλοειδούς (8). Στις μη κολλαγόνες δομικές πρωτεΐνες συμπεριλαμβάνονται η φιμπριλίνη- ινιδίνη και η οπτισίνη.

Η υαλοαμφιβληστροειδική διεπαφή (vitreoretinal interface) αποτελείται από: 1) τον οπίσθιο φλοιό του υαλοειδούς, 2) την έσω αφοριστική μεμβράνη (internal limiting membrane ILM) βρίσκεται μεταξύ του φλοιού αμφιβληστροειδούς (αποφύσεις κυττάρων Muller), αποτελούμενη από κολλαγόνο τύπου IV(κυρίως έσω) και λαμινίνη (κυρίως έξω) και 3) μια παρεμβάλλουσα εξωκυττάρια ουσία (υαλοειδές με παρακείμενες δομές).

Ο οπίσθιος φλοιός του υαλοειδούς έχει πάχος περίπου 11-1120μm και

αποτελείται κυρίως από στενά διατεταγμένες ίνες κολλαγόνου (9), ενώ απουσιάζει στη περιοχή του οπτικού δίσκου (κατά την αποκόλληση του εμφανίζεται ο δακτύλιος του Weiss) και παράλληλα στην περιοχή της ωχράς είναι πιο λεπτυσμένος. Στο φλοιό του υαλοειδούς βρίσκονται τα υαλοκύτταρα. Αυτά είναι μονοπύρηννα κύτταρα και η υψηλότερη προς χαμηλότερη συγκέντρωση τους είναι στη βάση του υαλοειδούς, στον οπίσθιο πόλο και στον ισημερινό, (10, 11). Τα υαλοκύτταρα συμμετέχουν στη σύνθεση ΥΟ, κολλαγόνου, ενζύμων, ενώ έχουν φαγοκυτταρικές ιδιότητες και εμφανίζουν αντιγονικότητα συμμετέχοντας στις φλεγμονώδεις καταστάσεις (12-14). Ένας δεύτερος κυτταρικός πληθυσμός είναι οι ινοβλάστες (λιγότερο από το 10% του συνολικού πληθυσμού) βρίσκονται στη βάση του υαλοειδούς, κοντά στον οπτικό δίσκο και στις προσεκβολές του ακτινωτού (15). Στην εικόνα 1 φαίνεται η πρόσφυση του υαλοειδούς με το πρόσθιο ημιμόριο (16)



Εικόνα 1. Εκτομηθέν υαλοειδές σώμα, ευρισκόμενο σε πρόσφυση με το πρόσθιο ημιμόριο (15)

Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας

Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας, βρίσκεται στο οπίσθιο ημιμόριο του οφθαλμού μεταξύ του υαλοειδούς και του χοριοειδούς χιτώνα. Αποτελείται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Μπορεί να διαχωρισθεί σε νευροαμφιβληστροειδή (NA) (έσω) και στο μελάγχρουν επιθήλιο (ME) (έξω).

Ο NA ή ιδίως αμφιβληστροειδής αποτελείται από τις εξής στιβάδες από έξω προς τα έσω (17):

α) Η στιβάδα των φωτοϋποδοχέων η οποία δημιουργείται από τα ραβδία και τα κωνία και στο OCT φαίνεται σαν δύο επιμέρους στιβάδες

- Την ελλειψοειδή ζώνη, ευρισκόμενη ακριβώς πάνω από το ME που δημιουργείται από τα έσω και έξω τμήματα των φωτοϋποδοχέων (IS/OS).
- Την έξω αφοριστική μεμβράνη (ELM). Ευρισκόμενη πάνω από την ελλειψοειδή ζώνη. Εκπροσωπεί τις παρυφές των αποφυάδων των κυττάρων του Muller.

β) Έξω πυρηνική στιβάδα (OPL), σχηματιζόμενη από τους πυρήνες των κυττάρων των ραβδίων και των κωνίων. Τα κωνία είναι υπεύθυνα για την οπτική οξύτητα και την αντίληψη των χρωμάτων.

γ) Έξω δικτυωτή στιβάδα (ONL), που δημιουργείται από τις συνάψεις των διπόλων κυττάρων μεταξύ των φωτοϋποδοχέων. Επιπλέον περιλαμβάνει τα οριζόντια διανευρωνικά κύτταρα. Με τα οποία γίνεται προσαρμογή της όρασης σε ακραίες συνθήκες φωτισμού.

δ) Η έσω πυρηνική στιβάδα (INL), περιέχει τους πυρήνες των διπόλων κυττάρων. Τα δίπολα αποτελούν την επικοινωνία μεταξύ φωτοϋποδοχέων και γαγγλιακών κυττάρων.

ε) Η έσω δικτυωτή στιβάδα (IPL), η οποία περιέχει τις συνάψεις μεταξύ διπόλων, γαγγλιακών και αμακρινών κυττάρων (υπεύθυνα για την προσαρμογή της αμφιβληστροειδικής εικόνας).

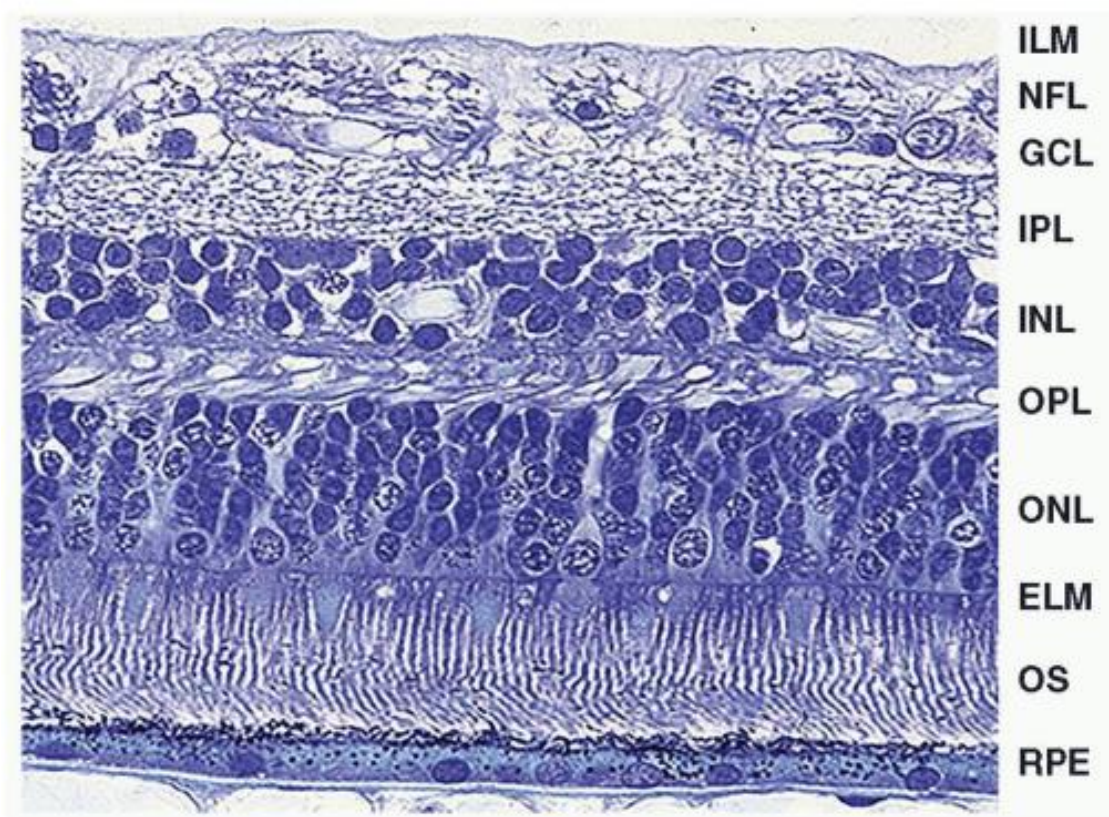
ζ) Η στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων που Περιέχει τα γαγγλιακά κύτταρα τα οποία είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά του νευρικών ώσεων.

η) Η στιβάδα των νευρικών ινών που σχηματίζεται από του νευράξονες των γαγγλιακών κυττάρων

θ) Έσω αφοριστική μεμβράνη (ILM). Μέρος της υαλοαμφιβληστροειδικής διεπαφής που περιεγράφηκε πριν. Αποτελείται από αποφυάδες των κυττάρων του Muller.

Στην εικόνα 2 απεικονίζεται ιστολογικό παρασκεύασμα του αμφιβληστροειδούς (18).

Το ΜΕ αποτελεί ένα μονό στρώμα εξαγωνικών κυττάρων χαρακτηριζόμενα από μεγάλο ποσοστό μελανίνης και κυτοπλασμίνης. Ουσιαστικά εκεί γίνεται η απορρόφηση της φωτεινής ακτινοβολίας, αλλά έχει και άλλες λειτουργίες όπως: η θρέψη των φωτοϋποδοχέων, έλεγχο ομοιόστασης ιόντων, απορρόφηση μεταβολικών παραγώγων, φαγοκυττάρωση φωτοϋποδοχέων, οπτικό κύκλο, έκκριση παραγόντων, ανοσολογική προστασία, έξω αμφιβληστροειδικός φραγμός (19). Μεταξύ του ΜΕ και του χοριοειδούς, βρίσκεται η μεμβράνη του Bruch.



Εικόνα 2. Στιβάδες αμφιβληστροειδούς χιτώνα (ιστολογικά) (RPE:ME OS:στιβάδα φωτουποδοχέων, ELM: έξω αφοριστική μεμβράνη, ONL: έξω πυρηνική στιβάδα, OPL: έξω δικτυωτή στιβάδα, INL: έσω πυρηνική στιβάδα, IPL: έσω δικτυωτή στιβάδα, GCL: στιβάδα γαγλιακών κυττάρων, NFL: στιβάδα νευρικών ινών, ILM (έσω αφοριστική μεμβράνη). (17)

Η ωχρά κηλίδα

Η ωχρά κηλίδα είναι μια ωχροκίτρινη περιοχή διαμέτρου περίπου 5,5-6 χιλ, εντοπιζόμενη κροταφικά της οπτικής θηλής και ανάμεσα στα αγγειακά τόξα του αμφιβληστροειδούς χιτώνα. Στο κέντρο της, μια περιοχή διαμέτρου 1,5χιλ. περιγράφεται ως κεντρικό βοθρίο. Στην περιοχή αυτή, υπάρχει υψηλότερη συγκέντρωση κωνίων ενώ τα ραβδία σχεδόν απουσιάζουν. Αυτή η περιοχή είναι υπεύθυνη για την κεντρική όραση και την αντίληψη των χρωμάτων. Στο κέντρο του βοθρίου, εμφανίζεται ένα εντύπωμα διαμέτρου 0,35 χιλ. Το εντύπωμα αυτό δημιουργείται λόγω της παρεκτόπισης των νευρικών κυττάρων και νευρικών ινών, προκειμένου να διευκολύνεται η διέλευση της φωτεινής ακτινοβολίας.

ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΥΑΛΟΕΙΔΟΥΣ-ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ

Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια

Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΔΑ) αποτελεί την κύρια επιπλοκή του σακχαρώδους διαβήτη (ΣΔ). Κλινικά διαχωρίζεται σε δύο στάδια: μη παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΜΠΔΑ) και παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΠΔΑ). Η ΜΠΔΑ αντιστοιχεί στα πρώιμα στάδια της νόσου όπου κύριο χαρακτηριστικό είναι η αυξημένη διαπερατότητα και των αγγείων του αμφιβληστροειδούς καθώς και η απόφραξη των τριχοειδών ή και αρτηριολίων (που οδηγεί σε ισχαιμία). Στο στάδιο αυτό οι ασθενείς μπορεί να παραμένουν ασυμπτωματικοί και η διάγνωση-σταδιοποίηση γίνεται με βάση τα βυθοσκοπικά ευρήματα που μπορεί να περιλαμβάνουν: μικροανευρύσματα, ενδοαμφιβληστροειδικές μικροαγγειακές ανωμαλίες (ΕΜΑ) ή (ΙΡΜΑ), αιμορραγίες, βαμβακόμορφες αλλοιώσεις, κομβολοειδείς φλέβες και σκληρά εξιδρώματα. Η ΜΠΔΑ μπορεί να ταξινομηθεί σε: ήπια, μέτρια, σοβαρή, πολύ σοβαρή. Στην ΠΔΑ που είναι η εξέλιξη της ΜΠΔΑ, κύριο χαρακτηριστικό είναι η αμφιβληστροειδική νεοαγγείωση. Τα παθολογικά αυτά νεοαγγεία, αρχικά αναπτύσσονται προαμφιβληστροειδικά και στη συνέχεια διαπερνούν την έσω

αφοριστική μεμβράνη και κατευθύνονται προς την υαλοειδική κοιλότητα χρησιμοποιώντας το φλοιό του υαλοειδούς (οπίσθια υαλοειδική μεμβράνη) σαν «σκαλωσιά». Τα νεοαγγεία αυτά μικρό-αιμορραγούν προκαλώντας αιμορραγίες (προαμφιβληστροειδικές ή και ενδοϋαλοειδικές) που έχουν σαν αποτέλεσμα την μείωση της όρασης. Επίσης λόγω της ανάπτυξης ινώδους ιστού (γλοίας) δημιουργούνται ινοαγγειακοί σχηματισμοί που έχουν ελκτικές και συσπαστικές ιδιότητες, όπου σε προχωρημένα στάδια μπορεί να προκληθεί ελκτική αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς (EAA).

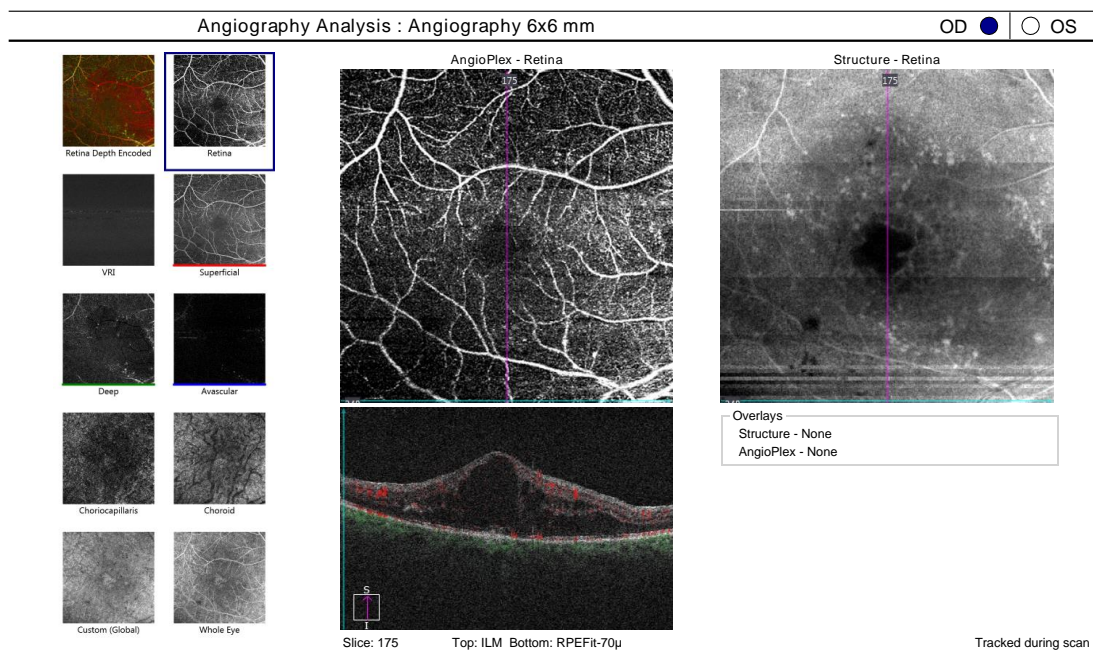
Η αντιμετώπιση, περιλαμβάνει τη διαχείριση των μικροαγγειακών ανωμαλιών συμπεριλαμβανομένης της εφαρμογής laser φωτοπηξίας στον αμφιβληστροειδή και τη χρήση αντιαγγειογενετικών παραγόντων (anti-VEGF) (20, 21). Σε σοβαρές περιπτώσεις ενδοϋαλοειδικής αιμορραγίας, ελκτικής αποκόλλησης αμφιβληστροειδούς με συμμετοχή της ωχράς κηλίδας, η επιλεγμένης ελκτικής με ρηματογενή αποκόλληση κ.α., η αντιμετώπιση είναι χειρουργική με υαλοειδεκτομή (22). Στην εικόνα 3, παρουσιάζεται περιστατικό με ΠΔΑ.



Εικόνα 3. Βυθοσκοπική εικόνα δεξιού οφθαλμού με παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (Οφθαλμολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων).

Διαβητικό Οίδημα ωχράς κηλίδας

Η κύρια αιτία προσβολής της όρασης στους διαβητικούς ασθενείς είναι το διαβητικό οίδημα της ωχράς κηλίδας (ΔΟΩ) με μια ετήσια επίπτωση 2,19%. Αποτελεί εξέλιξη της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας. Εμφανίζεται στην περιοχή της ωχράς κηλίδας ως επακόλουθο διαφόρων αγγειακών αλλαγών και ρήξης των αμφιβληστροειδικών φραγμών λόγω των διαφόρων μεταβολικών διαταραχών που προκαλούνται από την υπεργλυκαιμία (23). Οι αιματοαμφιβληστροειδικοί φραγμοί συνοπτικά είναι οι εξής: ο έξω, αποτελούμενος από τα κύτταρα του ΜΕ και ο έσω αποτελούμενος από τα αγγειακά πλέγματα (ισχυρές μεσοκυττάρια ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων "zonula occludens"). Στη ρήξη τους συντελούν διαδικασίες όπως η υποξία, ισχαιμία, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) καθώς και φλεγμονώδεις παράγοντες. Στη παθοφυσιολογία του οιδήματος εμπλέκεται επίσης και η δυσλειτουργία των κυττάρων του Muller, των περικυττάρων και των κυττάρων της γλοίας. Εκτός από την υπεργλυκαιμία, η υπέρταση και η υψηλή χοληστερίνη είναι σημαντικοί παράγοντες που επίσης συνδέονται με το διαβητικό οίδημα (24). Στην Εικόνα 4, παρουσιάζεται περιστατικό διαβητικού οιδήματος δεξιού οφθαλμού με OCT αγγειογραφία.



Εικόνα 4. OCT αγγειογραφία δεξιού οφθαλμού με διαβητικό οίδημα ωχράς κηλίδας (Οφθαλμολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων)

Κύριος διαμεσολαβητής στην παθογένεια του είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) όπου αποτελεί και τον κύριο θεραπευτικό στόχο. Όμως 30% των ασθενών δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία (25) και για το λόγο αυτό έχουν συσχετισθεί και άλλοι μηχανισμοί όπως οι φλεγμονώδεις διεργασίες (26). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί και εν μέρει από το γεγονός ότι οι ασθενείς με διαβητικό οίδημα της ωχράς ανταποκρίνονται στη θεραπεία με στεροειδή (19, 27).

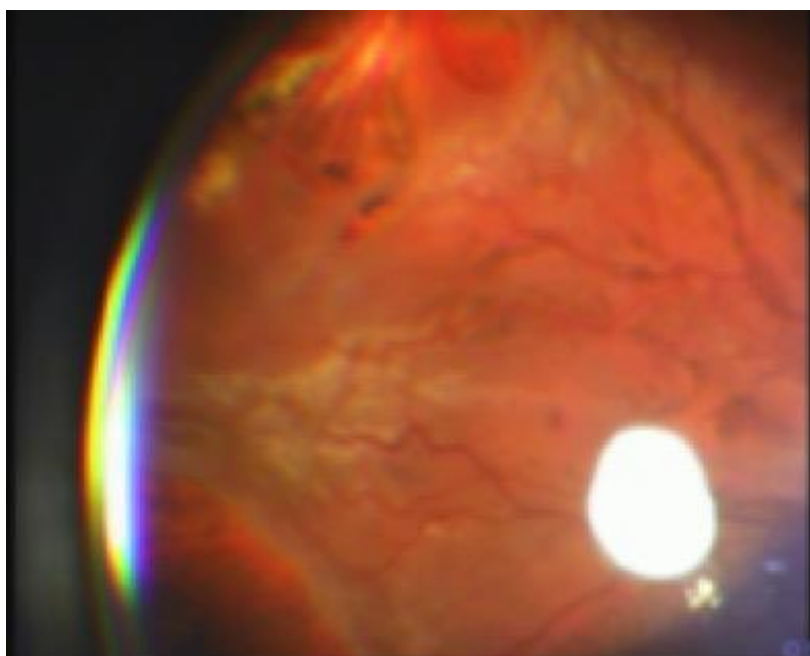
Παραγωγική Υαλοαμφιβληστροειδοπάθεια

Η παραγωγική υαλοαμφιβληστροειδοπάθεια (ΠΥΑ), είναι μια νόσος που χαρακτηρίζεται από μετανάστευση κυττάρων (κυρίως ΜΕ) και υπερπλασία τους στον περι-αμφιβληστροειδικό χώρο, η οποία συνοδεύεται από τη δημιουργία προ- και υπο- αμφιβληστροειδικών μεμβρανών. Αυτές, μαζί με ενδοαμφιβληστροειδικές αλλαγές προκαλούν ελκτικές και συσπαστικές διαταραχές στον αμφιβληστροειδή (28, 29). Εμφανίζεται σε ποσοστό 5-10% των περιπτώσεων ρηγματογενούς αποκόλλησης αμφιβληστροειδούς (ΡΑΑ) και σε ποσοστό 75% των περιπτώσεων υποτροπής τους μετά από επιτυχημένη χειρουργική αποκατάσταση (30). Στους παράγοντες κινδύνου συγκαταλέγονται: προηγούμενη παρουσία ΠΥΑ, παρουσία ραγοειδίτιδας, αφακία, ενδοϋαλοειδική αιμορραγία, αποκόλληση χοριοειδούς, αιμορραγία, προηγούμενη χρήση κρυοθεραπείας (31, 32). Στον πίνακα 1, παρουσιάζεται η αναθεωρημένη ταξινόμηση του βαθμού ΠΥΑ (33). Για την πρόληψη ή και θεραπεία της ΠΥΑ έχουν δοκιμαστεί διάφοροι φαρμακευτικοί παράγοντες σε πειραματικά μοντέλα ή με τυχαίοποιημένες κλινικές μελέτες. Μέχρι σήμερα η θεραπεία της ΠΥΑ παραμένει χειρουργική (34). Στην εικόνα 5 παρουσιάζεται περιστατικό με ΠΥΑ.

Πίνακας 1. Αναθεωρημένη ταξινόμηση της παραγωγικής υαλοαμφιβληστροειδοπάθειας (Updated Retina Society Classification 1991) (33).

Βαθμός και τύπος	Κλινικά σημεία
A	Θολερότητα υαλοειδούς, κοκκία χρωστικής και συγκρίματα χρωστικής στον κατώτερο αμφιβληστροειδή
B	Ρυτίδωση της έσω επιφάνειας του αμφιβληστροειδούς, ρίκνωση-ακαμψία αμφιβληστροειδούς, ελίκωση αγγείων, αναδίπλωση και ανωμαλία του χείλους των ρωγμών και μειωμένη κινητικότητα υαλοειδούς.
CP (οπίσθια) Τύπος	Ολικού πάχους πτυχές αμφιβληστροειδούς οι υπαμφιβληστροειδικές μεμβράνες οπισθίως του ισημερινού (1-12 ώρες)
I. Εστιακά	I. Αστεροειδές πτυχές οπισθίως της βάσης του υαλοειδούς
II. Διάχυτα	II. Συρρέουσες αστεροειδείς πτυχές οπίσθια της βάσης του υαλοειδούς. Το οπτικό νεύρο μπορεί να μην είναι ορατό.
III. Υπαμφιβληστροειδικά	III. Υπερπλασία κάτω από τον αμφιβληστροειδή. Δακτυλιοειδής ταινία κοντά στον οπτικό δίσκο, γραμμοειδείς ταινίες, εικόνα "σκοροφαγωμένου" φύλου
CA (πρόσθια) Τύπος	Ολικού πάχους πτυχές αμφιβληστροειδούς η υπαμφιβληστροειδικές μεμβράνες πρόσθια του ισημερινού (1-12

<p>I. Κυκλοτερής</p> <p>II. Πρόσθια</p>	<p>ωρολογιακές ώρες), πρόσθια μετατόπιση, και συνεραιμένες ταινίες υαλοειδούς</p> <p>I. Προς τα έσω “σύσπαση” του αμφιβληστροειδούς στο οπίσθιο χείλος της βάσης του υαλοειδούς. Μετατόπιση του αμφιβληστροειδούς προς το κέντρο. Έλξη του περιφερικού αμφιβληστροειδή. Ακτινωτές πτυχές του οπισθίου αμφιβληστροειδούς.</p> <p>II. Πρόσθια “σύσπαση” του αμφιβληστροειδούς στη βάση του υαλοειδούς. Αποκόλληση του ακτινωτού και σχηματισμός ,μεμβρανών επί του ακτινωτού. “Έλξη της ίριδας.</p>
---	---



Εικόνα 5. Βυθοσκοπική εικόνα δεξιού οφθαλμού με ΠΥΑ (οφθαλμολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων).

Παράγοντες που εμπλέκονται σε παθήσεις υαλοειδούς αμφιβληστροειδούς

Κυτταροκίνες

Οι κυτταροκίνες είναι οι κύριοι διαμεσολαβητές φλεγμονής και ανοσίας. Μπορεί να έχουν προ και αντι-φλεγμονώδη δράση. Αυτές συντίθενται κυρίως από τα βοηθητικά CD4⁺ T λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Έχουν ανιχνευθεί περίπου 40 και μερικές υποδιαιρούνται σε υποκατηγορίες (a,b) (35-37) . Στην παρούσα διατριβή θα μελετηθούν κυτταροκίνες που με βάση τη βιβλιογραφία θεωρείται εμπλέκονται κυρίως στην ΠΔΑ, ΔΟΩ και ΠΥΑ.

Η ιντερλευκίνη 1β (IL1β) ανήκει στην οικογένεια των ιντερλευκινών IL1 (38). Έχει προ φλεγμονώδη δράση και έχει συσχετιστεί με παθήσεις όπως: Ξηρού τύπου ΗΕΩ (39, 40), υγρού τύπου ΗΕΩ (41-43), γλαύκωμα (44), μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια (45, 46), αμφιβληστροειδοπάθεια της προωρότητας (47-49), διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (50, 51), διαβητικό οίδημα ωχράς (38), αλλά και στην παραγωγική υαλοαμφιβληστροειδοπάθεια (52, 53).

Η Ιντερλευκίνη 6 (IL6) έχει επίδραση στην ανάπτυξη φλεγμονής και αγγειογένεσης σε παθήσεις του επιπεφυκότα, κερατοειδούς, ίριδας, αμφιβληστροειδούς και κόγχου (54). Έχει προ- και αντι- φλεγμονώδεις ιδιότητες (55). Θεωρείται από τους κύριους παράγοντες που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (56), του διαβητικού οιδήματος της ωχράς (57, 58) αλλά και της ΠΥΑ (59). Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια εκλεκτικής αναστολής της IL6 σε παθήσεις που σχετίζονται με αυτή (54, 60) όπως για παράδειγμα στο ανθεκτικό κυστοειδές οίδημα της ωχράς κηλίδας (61).

Η Ιντερλευκίνη 8 (IL8) είναι επίσης μια προ-φλεγμονώδης πρωτεΐνη με παράλληλη αγγειογενετική δράση, που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα της γλοίας στον ισχαιμικό αμφιβληστροειδή (62). Έχει

συσχετιστεί τόσο με τη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (63) όσο και με το διαβητικό οίδημα της ωχράς (64, 65). Μάλιστα η συγκέντρωση της IL8 θεωρείται ότι σχετίζεται άμεσα με τη σοβαρότητα του διαβητικού οιδήματος (66) όσο και στην ανταπόκριση στην anti VEGF θεραπεία (67). Επίσης IL8 φαίνεται ότι διαδραματίζει και σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ΠΥΑ (68).

Η Ιντερλευκίνη 27 (IL27), φαίνεται να έχει τόσο διεγερτική όσο και ανασταλτική δράση στο ανοσολογικό σύστημα (69). Οι τελευταίες μελέτες επικεντρώνονται κυρίως στην αντιφλεγμονώδη δράση της (70, 71). Ωστόσο έχει μελετηθεί σαν προγνωστικός δείκτης για την εξέλιξη της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (72).

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων -α (tumor necrosis factor α) TNFα ανήκει στην οικογένεια των TNFs και παράγεται κυρίως από τα μακροφάγα. Συμμετέχει σε μια σειρά από σημαντικές λειτουργίες των κυττάρων όπως υπερπλασία, επιβίωση, διαφοροποίηση, απόπτωση και θεωρείται ένας από τους κυρίους ενορχηστρωτές κυτταροκινών του καταρράκτη της φλεγμονής. Για το λόγο αυτό η αντι-TNF θεραπεία εφαρμόζεται με επιτυχία σε πολλές φλεγμονώδεις ασθένειες (73) και δοκιμάζεται σε διάφορες παθήσεις του αμφιβληστροειδούς (74). Είναι υπεύθυνος για την απώλεια των συνδέσεων μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων (έσω φραγμός) αλλά και των κυττάρων του ΜΕ (έξω φραγμός) (75). Επίσης εκτός από τη φλεγμονή φαίνεται ότι και αυτός παίζει ρόλο στην αγγειογένεση (76). Έχει συσχετισθεί άμεσα με την ανάπτυξη της ΣΔ αμφιβληστροειδοπάθειας (77), το διαβητικό οίδημα (78) και την ΠΥΑ (79).

Μόρια προσκόλλησης κυττάρων

Το διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης κυττάρων (intracellular Adhesion Molecule-1) ICAM-1, είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Εκφράζεται από τα λευκοκύτταρα, τα επιθηλιακά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα (80). Εκτός από τη φλεγμονή εμπλέκεται στην διαπερατότητα των αγγείων (81). Έχει σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (82) και του διαβητικού οιδήματος (17). Ενδιαφέρον είναι επίσης ότι τα επίπεδα του ICAM-1

στο πλάσμα, μπορεί να συνδέονται με τη σοβαρότητα της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (83). Μάλιστα έχει μελετηθεί ως παράγοντας κινδύνου για ανάπτυξη ΠΥΑ (84).

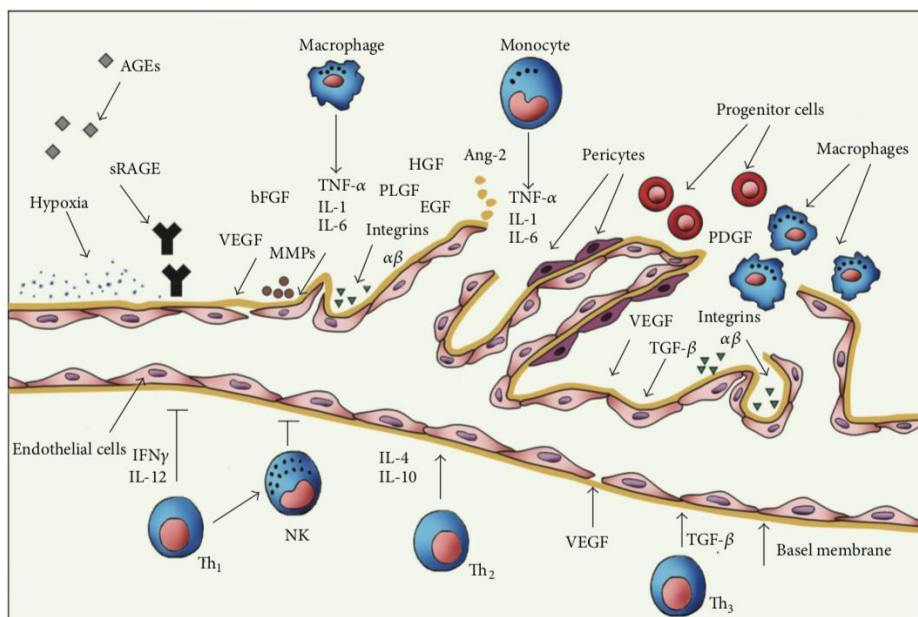
Το μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων (Vascular Adhesion Molecule) VCAM. Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα υπό την επίδραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως ο TNFα (ή άλλες συνθήκες όπως η αύξηση γλυκόζης κ.α.) (85, 86). Σε συνθήκες φλεγμονής μελέτες έδειξαν ότι συμβάλλει στην προαγγειογενετική επίδραση του οξειδωτικού στρες (87). Όπως και ο ICAM εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (82). Τα επίπεδα του VCAM έχουν βρεθεί αυξημένα και στο υαλοειδές ασθενών με ΠΥΑ (88).

Η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων (Monocyte Chemoattracting Protein 1) MCP-1, είναι μια από τις πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση και διείσδυση των μονοκυττάρων. Τόσο η MCP-1 όσο και ο υποδοχέας της (CCR2) έχουν βρεθεί αυξημένοι σε διάφορα νοσήματα. Η μετανάστευση των μονοκυττάρων από την κυκλοφορία, διαμέσου του ενδοθηλίου, στους ιστούς είναι απαραίτητη τόσο για την ανοσολογική ρύθμιση όσο και σαν απάντηση στη φλεγμονή (89). Έχει μελετηθεί η συσχέτισή της με τη ΣΔ αμφιβληστροειδοπάθεια (90) και μάλιστα η αύξηση των επιπέδων της στην υαλοειδική κοιλότητα μετά από δεύτερη υαλοειδεκτομή για την ίδια νόσο, γεγονός που υποδηλώνει το ρόλο της στη φλεγμονή μετά από μια υαλοειδεκτομή (91). Έχει επίσης συσχετισθεί με την ανάπτυξη διαβητικού οιδήματος (90, 92) και με την ΠΥΑ (93).

Αυξητικοί παράγοντες

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor) VEGF, είναι μια γλυκοπρωτεΐνη (45kDa) που ανήκει σε μια ευρεία ομάδα αυξητικών παραγόντων (94) και θεωρείται από τους κύριους παράγοντες επαγωγής της αγγειογένεσης. Παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα, τα CD4 λεμφοκύτταρα, τα κύτταρα του πλάσματος, τα μονοκύτταρα, τα μεγακαρυοκύτταρα αλλά και από καρκινικά κύτταρα (94). Στην ομάδα των

VEGF ανήκουν οι A,B,C,D,E και ο PlGF (πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας placental growth factor). Οι γνωστές του ισομορφές είναι: VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF162, VEGF165, VEGF183, VEGF189 και ο VEGF206 (75). Η έκφραση του επάγεται κυρίως από συνθήκες υποξίας και τη φλεγμονής (95). Ο VEGF εκτός από αγγειογενετική δράση έχει πολύ στενή συσχέτιση με τη φλεγμονή (96-98). Σήμερα είναι ο κύριος θεραπευτικός στόχος για πολλές αγγειακές παθήσεις του αμφιβληστροειδούς και του χοριοειδούς όπως: αμφιβληστροειδοπάθεια της προωρότητας, απόφραξη φλέβας του αμφιβληστροειδούς, διαβητικό οίδημα της ωχράς κηλίδας, νεοαγγειακή ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, μυωπική χοριοειδική νεοαγγείωση, ενδοφθάλμιου όγκους και πρόσφατα για την παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (99, 100). Στην εικόνα 6 παρουσιάζονται σχηματικά διάφοροι παράγοντες που εμπλέκονται στην παθογένεια της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (75).

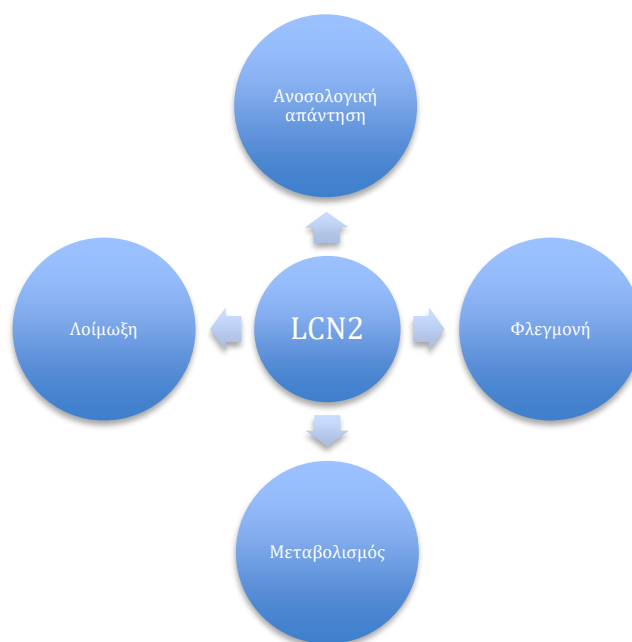


Εικόνα 6. Εμπλεκόμενοι παράγοντες στην ανάπτυξη και εξέλιξη της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (74).

Η Λιποκαλίνη 2 (Lipocalin-2)

Η Λιποκαλίνη-2 LCN2, είναι γνωστή και ως λιποκαλίνη σχετιζόμενη με τη ζελατινάση των ουδετεροφίλων (NGAL), αποτελεί μια γλυκοπρωτεΐνη (αδιποκίνη) που ανήκει σε μια ομάδα μικρών μεταφορέων λιποφιλικών μορίων

στην κυκλοφορία. Το μοριακό της βάρος είναι 25kD και είναι συνδεδεμένη ομοιοπολικά με τη ζελατινάση (matrix metalloproteinase, MMP-9) των ουδετεροφίλων (101, 102). Περιγράφεται ως ένα πλειοτροπικό μόριο το οποίο εμπλέκεται σε πολλές διαδικασίες όπως η μεταβολική ομοίωση, απόπτωση, λοίμωξη, άνοση αντίδραση και φλεγμονή (103). Έχει επίσης συσχετιστεί με άλλες νευροεκφυλιστικές και ογκολογικές παθήσεις (104). Εικόνα 7.



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση των κύριων λειτουργιών της λιποκαλίνης-2 (103).

Τα τελευταία χρόνια, γίνεται προσπάθεια περαιτέρω διερεύνησης των λειτουργιών της και μάλιστα έχει ταυτοποιηθεί ως βιοδείκτης για πολλές παθήσεις όπως: η οξεία νεφρική ανεπάρκεια (105), νεφρίτιδα του λύκου (106), καρδιαγγειακές παθήσεις (107), γαστρεντερικές φλεγμονές (108), πολλαπλή σκλήρυνση (109), ρευματοειδή αρθρίτιδα (110), οξεία παγκρεατίτιδα (111), μεταβολικό σύνδρομο σχετιζόμενο με την παχυσαρκία (112), καθώς και σε ογκολογικές παθήσεις (113).

Μελέτη της Λιποκαλίνης 2 στην οφθαλμολογία

Αυξημένα επίπεδα λιποκαλίνης-2 έχουν βρεθεί στο υδατοειδές υγρό, ασθενών με οξεία πρόσθια ραγοειδίτιδα (acute anterior uveitis - AAU) (114) καθώς και σε ασθενείς με κλαδική απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς (branch retinal vein occlusion - BRVO) (115). Επίσης σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες διατυπώθηκε η ρυθμιστική επίδρασή της σε φλεγμονώδεις και εκφυλιστικές παθήσεις του αμφιβληστροειδούς όπως η Stargardt, η Μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια, και Ηλικιακή Εκφύλιση της Ωχράς Κηλίδας (HEΩ) (116). Σε πειράματα με επίμυες *Abca4^{-/-}Rdh8^{-/-}*, μετά από έκθεση σε φωτεινή ακτινοβολία, διαπιστώθηκε η συμμετοχή της στην οξεία ανταπόκριση σε στρες καθώς και στην άνοση απάντηση των κυττάρων του μελαγχρόου επιθηλίου και του νευροαμφιβληστροειδούς (117). Επίσης, σε άλλα πειραματικά μοντέλα επίμυων (*Cyba1 cKO*) που μιμούνταν την παθολογία της HEΩ βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα λιποκαλίνης στα κύτταρα του μελαγχρόου επιθηλίου ως απάντηση στη χρόνια φλεγμονή (118). Σε μια πιο πρόσφατη εργασία σχετικά με το ρόλο της Λιποκαλίνης στον αμφιβληστροειδή, διατυπώθηκε ότι η Λιποκαλίνη2 ίσως να προστατεύει τον αμφιβληστροειδή από καταστάσεις φλεγμονώδους εκφύλισης μέσω ελέγχου της παραγωγής κυτταροκινών και διατηρώντας τη ζωτικότητα των κυττάρων, αλλά και μέσω εξασθένισης των αποπτωτικών μηχανισμών από τη ρύθμιση των αντιοξειδωτικών ενζύμων (116). Τέλος σε πειραματικά μοντέλα επίμυων (119) παρατηρήθηκε ότι η Λιποκαλίνη μπορεί να περιορίσει τη φλεγμονή στον αμφιβληστροειδή, ειδικότερα στην έξω κοκκώδη στιβάδα (όπου απαντώνται κυρίως κύτταρα Müller), αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της NF-κβ οδού. Μάλιστα στην ίδια εργασία βρέθηκε ότι η ενδοϋαλοειδική έγχυση Λιποκαλίνης-2 μειώνει σημαντικά τη φλεγμονή.

Κυτταρομετρία

Η Κυτταρομετρία είναι μία τεχνολογία με ευρεία εφαρμογή καθώς χρησιμοποιείται για:

- Διάγνωση νοσημάτων
- Καρυστυπική ανάλυση
- Παρακολούθηση ανταπόκρισης σε ογκολογικές θεραπείες
- Κυτταρική κινητική
- Ανάλυση Κυτταρικής λειτουργίας
- Ανίχνευση Εμβρυϊκών κυττάρων
- Ταυτοποίηση καρκινικών κυττάρων
- Κυτταρογενετική
- Θεμελιώδης Κυτταρική Βιολογία

Η τεχνογνωσία αυτή κατέχει εξέχοντα ρόλο στην Αιματολογία. Σημαντικός είναι ο ρόλος της και στην Ανοσολογία, τη Λοιμωξιολογία, την Ογκολογία, την Ουρολογία, τη Μαιευτική και Γυναικολογία, καθώς επίσης και στον τομέα των Μεταμοσχεύσεων.

Κυτταρομετρία Ροής

Η Κυτταρομετρία Ροής είναι η τεχνολογία με την οποία γίνονται ποικίλες μετρήσεις και προσδιορισμοί σε κατάλληλα προετοιμασμένα κύτταρα ή οργανίδια κυττάρων (πυρήνες, χρωμοσώματα κ.λ.π.). Η προετοιμασία των κυττάρων ή οργανιδίων αυτών έγκειται στη σήμανσή τους με φθορίζουσες χρωστικές (120).

Τα υπό έλεγχο σωματίδια, ρέουν με μορφή εναιωρήματος μπροστά από μία φωτεινή ακτίνα LASER, δια μέσου θαλάμου με ταχύτητα αρκετών χιλιάδων ανά δευτερόλεπτο. Η μέτρηση, αναγνώριση και η διαλογή γίνεται με βάση τον εκπεμπόμενο φθορισμό και τη σκέδαση του φωτός. Τα εκπεμπόμενα φωτεινά σήματα από το κάθε κύτταρο ή οργανίδιο αναλύονται, κατευθύνονται στους ανιχνευτές και στη συνέχεια μετατρέπονται σε ηλεκτρικά σήματα. Αυτά τα

σήματα ενισχύονται, μετρούνται και τέλος διοχετεύονται υπό μορφή ψηφιακών ενδείξεων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος με ειδικό λογισμικό τα επεξεργάζεται και τα παρουσιάζει. Στο κάθε κύτταρο ή οργανίδιο μετρούνται το μέγεθος, η κοκκίωση και τα άλλα χαρακτηριστικά της ενδοκυττάριας ή εξωκυττάριας επιφάνειας, που έχουν σημειωθεί με τις φθορίζουσες χρωστικές. Με βάση αυτά τα δεδομένα, τα κύτταρα ή τα σωματίδια ταξινομούνται σε σύνολα και υποσύνολα και στη συνέχεια γίνεται η στατιστική επεξεργασία τους (120).

Όλες οι εφαρμογές, που αναφέρθηκαν παραπάνω, βασίζονται σε μερικές ιδιότητες των κυττάρων και των συστατικών τους, τις οποίες ο κυτταρομετρητής έχει την δυνατότητα να μετρά.

Γενικά, ο κυτταρομετρητής μπορεί να αναλύσει οποιοδήποτε κυτταρικό συστατικό στο οποίο μπορεί να προσδεθεί χρωστική. Εάν η σύνδεση της χρωστικής είναι στοιχειομετρική (δηλαδή η ποσότητα της δέσμευσης της χρωστικής είναι ανάλογη της ποσότητας του κυτταρικού συστατικού), η μέτρηση είναι ποσοτική και υψηλής ακρίβειας.

Σφαιριδομετρία

Μια παραλλαγή της κυτταρομετρίας ροής είναι η Σφαιριδομετρία (CBA: Cytometric bead array) όπου με τη χρήση σφαιριδίων (beads) συγκεκριμένου μεγέθους και διακριτού φθορισμού, και με μία τεχνική ανάλογη με τη sandwich ELISA, είναι δυνατή η μέτρηση της συγκέντρωσης πολλών διαλυτών μορίων ταυτόχρονα (κυτταροκινών, φωσφορυλιωμένων κινασών, πρωτεϊνών, καρκινικών δεικτών κ.λπ.) σε πολύ μικρό όγκο δείγματος (υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών, ορό, προϊόντα λύσης κυττάρων κ.λπ.) (121).

Κυτταρομετρητής Ροής

Ένας Κυτταρομετρητής Ροής αποτελείται από τρία συστήματα

1. Σύστημα Ροής
2. Οπτικό Σύστημα

3. Σύστημα ανίχνευσης, επεξεργασίας και μετατροπής σε ηλεκτρονικό σήμα

1. Σύστημα ροής

Πρόκειται για ένα υδραυλικό σύστημα, που εξαναγκάζει τα κύτταρα ή τα σωματίδια να ρέουν το ένα μετά το άλλο μπροστά από την ακτίνα Laser, απορροφώντας τα από το εναιώρημα εργασίας. Αυτό επιτυγχάνεται με τη εισαγωγή του δείγματος στο κέντρο ενός καναλιού, στο οποίο ρέει ένα αδρανές υγρό (Sheath Fluid). Το κανάλι είναι κατάλληλα σχεδιασμένο προκειμένου το δείγμα να ρέει κατά μήκος του κεντρικού του άξονα, περιβαλλόμενο από το αδρανές υγρό χωρίς να αναμιγνύεται, δηλαδή σαν να βρίσκεται μέσα σε μια θήκη (sheath). Το κανάλι τοποθετείται μέσα στο θάλαμο ροής (flow chamber). Εκεί, ανάλογα με τις υδροδυναμικές ρυθμίσεις, επιτυγχάνεται και η υδροδυναμική εστίαση, έτσι ώστε το κύτταρο ή το σωματίδιο να έρχεται σε επαφή με την ακτίνα Laser με προσέγγιση $+1\mu\text{m}$.

Οι θάλαμοι ροής διακρίνονται σε θαλάμους νηματικής ροής (Luminar Flow) και σε θαλάμους στροβιλώδους ορίου (turbulent boundary), ανάλογα με την υδροδυναμική τους αρχή. Επίσης, οι θάλαμοι ροής διακρίνονται και σε θαλάμους ανάλυσης (analytical chambers), για κυτταρομετρητές μέτρησης της σκέδασης και του φθορισμού, και σε θαλάμους διαλογής (sorting chambers), για αυτούς που διαθέτουν και σύστημα διαλογής κυττάρων ή σωματιδίων.

2. Οπτικό σύστημα

Το σύστημα αυτό συλλέγει τα φωτεινά σήματα που εκπέμπονται από τα κύτταρα ή τα σωματίδια όταν προσπίπτει πάνω τους η φωτεινή δέσμη φωτός της λυχνίας. Στη συνέχεια αναλύεται η συλλεγόμενη ακτινοβολία, η οποία αντιστοιχεί στη σκέδαση του φωτός και στον εκπεμπόμενο φθορισμό καθορισμένης έντασης με βάση το φθοριόχρωμα.

Η σκέδαση του φωτός δημιουργείται όταν το κύτταρο ή το σωματίδιο δέχεται την κάθετη προς τη διεύθυνση ροής δέσμη της λυχνίας. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία απορροφάται κατά ένα μέρος από το κύτταρο και κατά το υπόλοιπο

σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Η ακτινοβολία που σκεδάζεται στην κατεύθυνση της προέκτασης (ευθεία γραμμή) της ακτίνας Laser, με γωνία 1° - 20° , ονομάζεται πρόσθια σκεδαζόμενη ακτινοβολία (Forward Light Scatter, FSC) και είναι ανάλογη προς το μέγεθος του κυττάρου ή του σωματιδίου. Η ακτινοβολία που σκεδάζεται σε κατεύθυνση κάθετη προς τον άξονα της ακτίνας Laser, με γωνία 90° , ονομάζεται κάθετη ή πλάγια σκεδαζόμενη ακτινοβολία (Right Angle Scatter, ή Side Scatter, SSC) και είναι ανάλογη προς την κοκκίωση (granularity) του κυτταροπλάσματος του κυττάρου ή σωματιδίου.

Όταν κατά τη διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος τα κύτταρα ή τα σωματίδια σημανθούν με φθορίζουσες ουσίες, όπως η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη FITC (πράσινο), η τετραμεθυλοροδαμίνη, η R-φυκοερυθρίνη PE (κόκκινο), η περιδινούχος χλωροφίλλη-A-πρωτεΐνη PerCP, Texas Red ή άλλες φθορίζουσες ουσίες προσδεσμένες στα μονοκλωνικά αντισώματα, παράγεται φθορισμός. Τα φθοριοχρώματα αυτά διεγείρονται από την προσπίπτουσα ακτινοβολία (διεγείρουσα) και στη συνέχεια εκπέμπουν ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος της διεγείρουσας, το οποίο είναι χαρακτηριστικό για κάθε φθοριόχρωμα.

Από τα φθοριοχρώματα που αναφέρθηκαν, η FITC παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση και διεγείρεται στα 495 nm, ενώ η PE στα 495 nm και 550 nm. Ακτινοβολία μήκους κύματος 488 nm με Laser αργού διεγείρει και τις δύο χρωστικές και η μεν FITC εκπέμπει μέγιστο φθορισμό FL1 στα 520 nm (πράσινος φθορισμός), η δε PE εκπέμπει μέγιστο φθορισμό FL2 στα 575 nm (κόκκινος φθορισμός). Οι δύο διαφορετικοί φθορισμοί FL1 και FL2 συλλέγονται, αναλύονται και μετρούνται με κατάλληλα συστήματα διχροϊκών κατόπτρων και φίλτρων. Τα διχροϊκά κάτοπτρα είναι τοποθετημένα στην πορεία της φωτεινής δέσμης υπό γωνία 45° , ενώ τα φίλτρα είναι τοποθετημένα κάθετα.

Οι χρωστικές PE, FITC και PerCP μπορούν να συνδεθούν με κατάλληλα μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα, που αναγνωρίζουν τις αντιγονικές καθορίζουσες της κυτταρικής επιφάνειας ή της ενδοκυττάριας επιφάνειας. Με αυτόν τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα της ανίχνευσης των καθοριζουσών στην επιφάνεια του καθενός από τα μετρούμενα κύτταρα, με αποτέλεσμα την

δυνατότητα χαρακτηρισμού και ταξινόμησης του κάθε κυττάρου σε υποπληθυσμούς, σύμφωνα με τους συνδυασμούς που έχουν σχεδιαστεί. Με την ολοκλήρωση των μετρήσεων των φωτεινών σημάτων σκέδασης και φθορισμού, σε κάθε κύτταρο αντιστοιχεί μια τετράδα τιμών (FSC, SSC, FL1, FL2), η οποία μας δίνει τα δεδομένα για το μέγεθος, την κοκκίωση και το βαθμό έκφρασης των δύο αντιγονικών καθοριζουσών.

3. Σύστημα ανίχνευσης, επεξεργασία και μετατροπής σε ηλεκτρονικό σήμα

Στους κυτταρομετρητές χρησιμοποιούνται δύο συστήματα ανίχνευσης των φωτεινών δεδομένων που προέρχονται από την σκέδαση και το φθορισμό: α) οι φωτοдиодοι (PIN diodes) και β) οι φωτοπολλαπλασιαστές (photomultiplier tubes. PMTs). Οι PIN έχουν ευαισθησία στις μετρήσεις FSC και SSC, ενώ παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στον φθορισμό. Οι PMTs, αν και μικρότερου φάσματος, διαθέτουν, συγκρινόμενες με τις PIN, μεγαλύτερη ευαισθησία, όχι μόνο στις μετρήσεις FSC και SSC, αλλά και στον φθορισμό.

Το παλμικό σήμα που παράγεται μένει στην έξοδο για 15-120 μsec. Κατά τη διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος, το οποίο λέγεται νεκρός χρόνος, δεν καταγράφονται άλλα σήματα στο σύστημα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο παρατεταμένος χρόνος να επηρεάζει κυρίως τη διαλογή και σε μικρότερο βαθμό την αναλυτική ικανότητα του κυτταρομετρητή.

Το παλμικό σήμα αναλύεται ως προς το ύψος, το πλάτος και την επιφάνεια, δίνοντας έτσι πληροφορίες για το μέγεθος, την κοκκίωση και τον φθορισμό των κυττάρων ή σωματιδίων. Η επεξεργασία μπορεί να γίνει είτε γραμμικά, είτε λογαριθμικά μετά από χρήση ενισχυτή (amplifier). Με αυτόν τον τρόπο, έχουμε ενίσχυση των ασθενών σημάτων και ταυτόχρονα περιορισμό των ενδείξεων που αντιστοιχούν στα ισχυρά σήματα. Έτσι, όλες οι τιμές λαμβάνονται στην ίδια κλίμακα.

Τα δυαδικά αυτά σήματα μεταβιβάζονται στη μνήμη ηλεκτρονικού υπολογιστή, ώστε να ακολουθήσει η ανάλογη επεξεργασία των δεδομένων.

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι παρουσίασης των αποτελεσμάτων όπως τα Κυτταρογράμματα (Dot Plot), τα οποία σχετίζουν δύο παραμέτρους και χρησιμοποιούνται συχνότερα.

Άλλοι τρόποι είναι:

- κατανομής συχνοτήτων ή Ιστόγραμμα
- ισοϋψών καμπυλών (couter plot)
- ισομετρικών (isometric plot)
- όψης διαμαντιού (diamond view)

Τα διαγράμματα αυτά προσφέρουν στον ερευνητή τη δυνατότητα εντοπισμού και ανάλυσης ακόμη και του μικρότερου παθολογικού ή μη πληθυσμού.

Στη συνέχεια ο ερευνητής, χρησιμοποιώντας τα προγράμματα στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων και τη δυνατότητα οριοθέτησης ορισμένων περιοχών στα κυτταρογράμματα [-gate - «παράθυρο»], έχει τη δυνατότητα να αναλύσει και να εξάγει σημαντικές παρατηρήσεις από την οριοθετημένη περιοχή. Η στατιστική ανάλυση αντιστοιχεί στο συγκεκριμένο υποπληθυσμό. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ο εμπλουτισμός του εξεταζόμενου δείγματος σε κύτταρα ή σωματίδια.

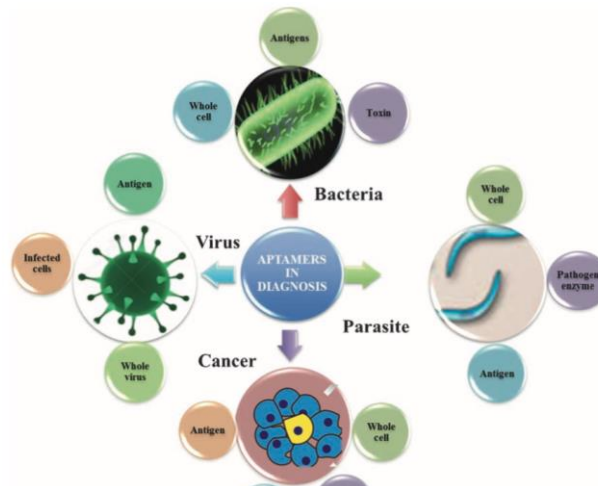
Απταμερή

Εφαρμογές

Τα απταμερή αποτελούν μονήρεις ολιγονουκλεοτιδικές αλυσίδες που έχουν τη δυνατότητα να προσδένονται στο στόχο τους με μεγάλη συγγένεια. Ο όρος απταμερές προέρχεται από τη λατινική λέξη *aptus* (ταιριάζει) και την ελληνική λέξη μέρος. Τα απταμερή έχουν μια ποικιλία εφαρμογών από το πεδίο της διάγνωσης και της απεικόνισης μέχρι τις θεραπευτικές εφαρμογές ως θεραπευτικοί παράγοντες ή συστήματα μεταφοράς φαρμάκων.

Διάγνωση

Διαγνωστικά τα απταμερή έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση βακτηρίων (*S. aureus*, *E. coli* κ.α.), παρασίτων (*Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium Falciparum* κ.α.) αλλά και ιών (Influenza A, HIV-1, HBV, HCV, EBOV, Zika κ.α.). Επίσης τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν διάφοροι βιοαισθητήρες (aptasensors) για την πρόωμη διάγνωση διαφόρων μορφών καρκίνου. Ενδεικτικά αναφέρουμε μερικές μορφές όπως: καρκίνο του στήθους, τραχήλου, πνεύμονα, προστάτη. Αλλά και για την ανίχνευση λευχαιμίας, γλοιοβλαστώματος, μεταστατικού καρκίνου του εντέρου, ηπατοκυτταρικού καρκινώματος κ.α.. Στην εικόνα 8 αναπαριστάνεται η εφαρμογή των απταμερών ως διαγνωστικά μέσα (122).



Εικόνα 8. Εφαρμογή των απταμερών στον διαγνωστικό τομέα (119)

Απεικόνιση

Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια αξιοποίησης των πλεονεκτημάτων των απταμερών και η εφαρμογή τους σε μια ποικιλία απεικονιστικών μεθόδων όπως : μαγνητική τομογραφία (MRI) (στόχος: Thrombin) (123), αξονική τομογραφία (CT) (στόχος: PSMA – prostate specific mambrand antigen) (124), υπερηχογραφία (US - ultrasound) (στόχος: Leucaemia cells) (125), πυρηνική απεικόνιση (SPECT- single photon emission computed tomography, PET – positron emission tomography) (στόχος: Elastase) (126) και άλλα.

Θεραπεία

Μια άλλη σημαντική εφαρμογή των απταμερών περιλαμβάνει τη θεραπεία διαφόρων παθήσεων. Γενικά τα DNA απταμερή που προορίζονται για θεραπευτική χρήση λειτουργούν με δύο τρόπους. Στον πρώτο τρόπο, τα απταμερή μπορούν να αναστέλλουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών μέσω ειδικής σύνδεσης στην πρωτεΐνη στόχο. Στην περίπτωση αυτή λειτουργούν ως ανταγωνιστές. Στον δεύτερο τρόπο μπορούν να δρουν ως αγωνιστές, επάγοντας τη λειτουργία της πρωτεΐνης με την οποία συνδέονται. Ενδεικτικά αναφέρουμε μερικά θεραπευτικά απταμερή όπως το A1411 έναντι Nucleolin (Καρκίνωμα νεφρών, Οξεία μυελογενή λευχαιμία), το ARC1779 έναντι του παράγοντα von

Willebrand (θρομβοεμβολισμό, συγγενής θρομβοτική θρομβοκυτταροπενική πορφύρα, νόσο von Willebrand) και το NU172 έναντι της θρομβίνης (by pass στεφανιαίων αγγείων).

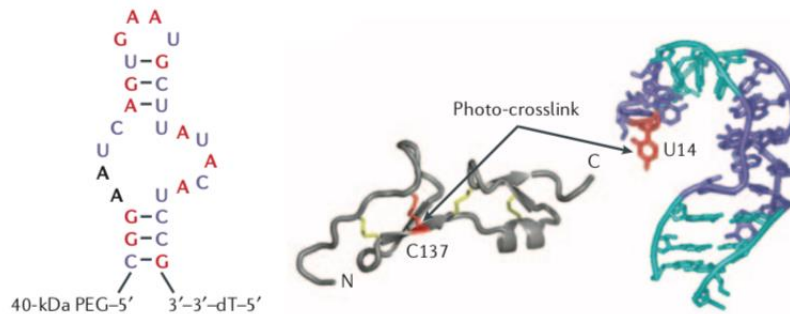
Μια άλλη ενδιαφέρουσα θεραπευτική εφαρμογή τους είναι αυτή του φορέα φαρμάκων. Τα απταμερή λόγω της ιδιότητάς τους να αναγνωρίζουν ειδικά τους στόχους και να τροποποιούνται άμεσα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για στοχευμένη χορήγηση παραγόντων. Αυτό μπορεί να γίνει είτε μέσω άμεσης σύνδεσης του απταμερούς με τα μόρια του φαρμάκου, είτε σε συνδυασμό με νανο-σωματίδια για το σχηματισμό της πλατφόρμας χορήγησης. Στην πρώτη περίπτωση έχουν δοκιμαστεί σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες όπως η δοξορουμπικίνη (DOX) (127). Για τη δεύτερη περίπτωση έχουν δοκιμαστεί νανοσωματίδια χρυσού λόγω της σταθερότητας, εύκολης ζεύξης και της έλλειψης αντιγονικότητας (128). Επίσης έχουν δοκιμαστεί νανοσωματίδια πυριτίου, νανοσωλήνες άνθρακα κ.α. για την αύξηση της ειδικότητας και την παράταση της κυκλοφορίας των μορίων του φαρμάκου (129, 130).

Εφαρμογές απταμερών στην οφθαλμολογία

Μέχρι σήμερα τα απταμερή στην οφθαλμολογία έχουν χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά για θεραπευτική χρήση. Το πρώτο απταμερές που πήρε έγκριση από τον FDA το 2004, για την αντιμετώπιση της νεοαγγειακής εκφύλισης της χωράς κηλίδας, ήταν το Pegaptanib με εμπορική ονομασία Macugen από την Ophthotech όπου προοριζόταν για ενδοϋαλοειδική χρήση. Πρόκειται για ένα RNA απταμερές που είχε τη δυνατότητα να αναστέλλει εκλεκτικά τον VEGF165 (131). Στην εικόνα 9, φαίνεται η δομή και η σύνδεση με το στόχο του pegaptanib (πεγκαπτανίμπη) (131). Αργότερα η χρήση του αντικαταστάθηκε από πιο δραστικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα το Ranibizumab (ρανιμπιζουμάμπη) που αποτελεί ένα τμήμα ανασυνδυασμένου ανθρωποποιημένου μονοκλωνικού αντισώματος έναντι όλων των ισομορφών του VEGF-A (132).

Βέβαια τα πλεονεκτήματα της εκλεκτικής χρήσης του VEGF παραμένουν υπό συζήτηση, αφού ο VEGF φέρεται να έχει και νευροπροστατευτική δράση (133) και η συνεχής του αναστολή μπορεί να μην είναι πάντοτε επιθυμητή (134). Επίσης η συνεχής αναστολή του VEGF μπορεί να έχει και μια ακόμη αρνητική επίδραση

στην ικανότητα του χοριοειδικού πλέγματος να τρέφει τον αμφιβληστροειδή (134). Για το λόγο αυτό έχει προταθεί η χρήση της πεγκαπτανίμης του ως θεραπεία συντήρησης (135-137).



Εικόνα 9. Δομή και σύνδεση με στόχο του Pegaptanib. Αριστερά φαίνεται η ακολουθία και η προβλεπόμενη δευτεροταγής δομή και δεξιά η αλληλεπίδραση με τον VEGF₁₆₅ (128)

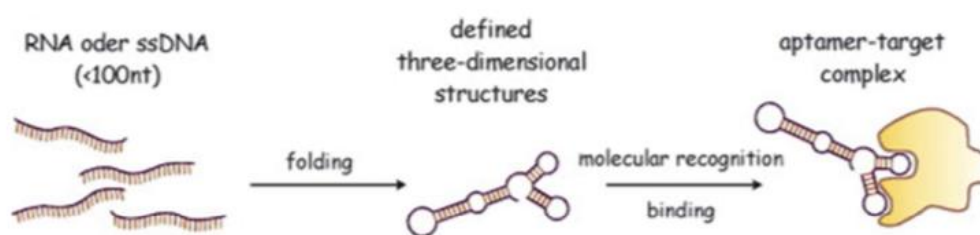
Το Pegpleranib είναι ένα DNA απταμερές έναντι του PDGF-β (platelet derived growth factor – αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγων) με εμπορική ονομασία Fovista από την Ophthotec. Το απταμερές αυτό δοκιμάστηκε σε συνδυασμό με ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις anti-VEGF (Ranibizumab), αλλά απέτυχε στη φάση (III) των κλινικών δοκιμών (138).

Το Avacincaptad pegol, είναι ένα ακόμη RNA απταμερές από την Ophthotec με εμπορική ονομασία Zimura, το οποίο αναστέλλει την πρωτεολυτική ενεργοποίηση το συμπληρώματος C5. Βρίσκεται στη φάση κλινικών δοκιμών για τη συγχορήγηση του με Ranibizumab για την νεοαγγειακή ηλικιακή εκφύλιση ωχράς κηλίδας (HEΩ) (φάση IIa)(139), αλλά και ως μονοθεραπεία για την γεωγραφική ατροφία από ξηρά HEΩ (φάση IIb) (140).

Δημιουργία απταμερών

Όπως αναφέραμε, τα απταμερή αποτελούν μικρές μονήρεις ολιγονουκλεοτιδικές αλυσίδες (DNA ή RNA) οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να συνδέονται με διάφορα μόρια με μεγάλη συγγένεια και ειδικότητα (141). Η σύνδεση ενός απταμερούς με το μόριο στόχο βασίζεται στην τρισδιάστατη δομή (3D-conformation) του ίδιου του απταμερούς. Η τρισδιάστατη δομή ενός απταμερούς, εξαρτάται από την νουκλεοτιδική ακολουθία (142), όπως περίπου και οι πρωτεΐνες παίρνουν την τρισδιάστατη μορφή τους με βάση την ακολουθία των αμινοξέων. Επειδή τα απταμερή δημιουργούνται από νουκλεοτίδια, πρακτικά μπορούν να συνδεθούν

με οποιοδήποτε μόριο στόχο (143). Η εικόνα 10, αναπαριστά τον τρόπο με τον οποίο τα απταμερή αναδιπλώνονται και συνδέονται με τον στόχο τους (144).

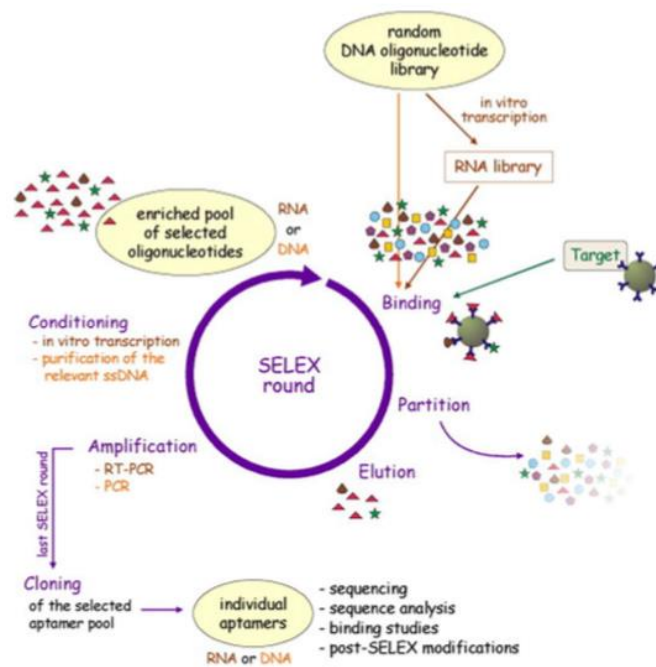


Εικόνα 10. Μονόκλωνη αλυσίδα DNA αναδιπλώνεται στην τρισδιάστατη δομή της και εν συνεχεία αναγνωρίζει το σημείο πρόσδεσης βασιζόμενη στην τρισδιάστατη δομή της, δημιουργώντας το σύμπλεγμα απταμερές-στόχος (136)

Τα απταμερή δημιουργούνται μέσω μιας απλής και φθηνής διαδικασίας που ονομάζεται SELEX.

SELEX

Ο όρος SELEX προέρχεται από το: Systematic evolution of Ligands by Exponential Enrichment (συστηματική εξέλιξη των συνδέσμων μέσω εκθετικού εμπλουτισμού). Η SELEX είναι μια εξελικτική διαδικασία κατά την οποία (σταδιακά) εμφανίζονται και κυριαρχούν στη “δεξαμενή” μονήρεις ακολουθίες DNA οι οποίες έχουν συγκεκριμένη διαμόρφωση και με την ικανότητα να συνδέονται με το μόριο στόχο (145). Αυτές οι ακολουθίες DNA αποκαλούνται απταμερή. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας SELEX είναι η δημιουργία μιας εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης που είναι πλήρης με απταμερή ικανά να συνδέονται με τον βιοδείκτη στόχο με μεγάλη συγγένεια και ειδικότητα. Στην εικόνα 11, αναπαρίσταται διαδικασία της SELEX (144).



Εικόνα 11. Επισκόπηση των βημάτων της SELEX (136)

Δεξαμενή τυχαίων ακολουθιών DNA

Το πρώτο βήμα της SELEX είναι ο σχεδιασμός της δεξαμενής των ακολουθιών DNA. Κατά το σχεδιασμό μια δεξαμενής απταμερών, είναι βασικό να ληφθεί υπόψιν εάν τα σημεία (θέσεις) πρόσδεσης των βιοδεικτών είναι γνωστά. Εάν οι θέσεις πρόσδεσης είναι γνωστές, τότε η δεξαμενή ακολουθιών DNA μπορεί να σχεδιαστεί για τις γνωστές θέσεις πρόσδεσης και να ακολουθήσει η διαδικασία της βελτιστοποίησης. Εάν οι θέσεις πρόσδεσης είναι άγνωστες, τότε οι ακολουθίες DNA μπορούν να σχεδιαστούν για την αναγνώριση των σημείων πρόσδεσης, διαδικασία που είναι γνωστή και ως επιλογή απταμερών (146).

Η διαδικασία επιλογής απταμερών χρησιμοποιεί μια εντελώς τυχαία δεξαμενή. Για το σχεδιασμό μιας εντελώς τυχαίας δεξαμενής, η μόνη παράμετρος που απαιτείται να ληφθεί υπόψιν είναι το μήκος της τυχαίας γονιδιακής αλληλουχίας. Κατά το σχεδιασμό του μήκους της τυχαίας ακολουθίας θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν ζητήματα που αφορούν την πολυπλοκότητα και την αναπαράσταση των πιθανών απταμερών. Για παράδειγμα, αν αναλογιστούμε μια τυχαία ακολουθία μήκους 100 νουκλεοτιδίων, και επειδή μια βάση A, T, G ή C

(A=αδερίνη, T=θυμίνη, G=γουανίνη, C=κυτοσίνη) μπορεί να βρίσκεται σε οποιοδήποτε από τα 100 σημεία, ο πιθανός αριθμός μοναδικών απταμερών είναι $1,6 \times 10^{60}$ (146). Οι τρέχοντες περιορισμοί για τη σύνθεση μιας βιβλιοθήκης περιορίζονται σε 1×10^{15} μόρια που αντιστοιχούν περίπου σε μια τυχαία δεξαμενή απταμερών μήκους 25-νουκλεοτιδίων. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι οποιαδήποτε τυχαία ακολουθία μεγαλύτερη των 25 νουκλεοτιδίων θα οδηγήσει σε εν δυνάμει ακολουθίες που δεν θα μπορούν να αντιπροσωπευθούν (αναπαράσταση) (146). Ωστόσο, λόγω πιθανοτήτων, η δημιουργία μιας ακολουθίας 100 νουκλεοτιδίων πιθανώς να οδηγήσει στη δημιουργία πολυπλοκότερου (πιο σύνθετου) απταμερούς. Τα σύνθετα απταμερή είναι επιθυμητά επειδή έχουν περισσότερες πιθανότητες να προσδεθούν στο στόχο τους.

Για παράδειγμα παραθέτουμε ένα σενάριο σύγκρισης μιας τυχαίας ακολουθίας 20 νουκλεοτιδίων και μιας με 80 νουκλεοτίδια. Η δεξαμενή με τις αλληλουχίες των 20 νουκλεοτιδίων θα έχει καλή αντιπροσώπευση, αλλά τα απταμερή θα είναι λιγότερο σύνθετα. Ενώ η δεξαμενή με τις αλληλουχίες των 80 νουκλεοτιδίων θα έχει σύνθετα απταμερή αλλά πολλά από αυτά δεν θα αντιπροσωπεύονται. Η δεξαμενή των απταμερών θα πρέπει να σχεδιαστεί ώστε να υπάρχει ισορροπία μεταξύ πολυπλοκότητας και αντιπροσώπευσης των απταμερών. Γενικά, δεξαμενές με μεγαλύτερες νουκλεοτιδικές αλυσίδες είναι επιθυμητές ώστε να διασφαλιστεί ότι θα δημιουργηθούν σύνθετα απταμερή ικανά για πρόσδεση στο στόχο.

Εκκινητές (primers)

Αφού προσδιοριστεί το μήκος των απταμερών, σχεδιάζονται οι εκκινητές. Οι εκκινητές είναι μικρά τμήματα μονόκλωνου DNA ή RNA τα οποία θα προσδεθούν στα άκρα 5' και 3' μιας τυχαίας ακολουθίας DNA. Κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η ακολουθία τους και το μήκος τους. Η ακολουθία των εκκινητών είναι αυτή που θα τους επιτρέψει να συνδεθούν με τα απταμερή και στη συνέχεια να εισαχθούν σε ένα φορέα (vector) για τον πολλαπλασιασμό με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction) (PCR) και υποκλωνοποίηση (sub-cloning). Η ακολουθία θα

παραμένει σταθερή αφού οι εκκινητές θα χρησιμοποιηθούν στη διαδικασία SELEX για PCR, υποκλωνοποίηση και πρωτοδιάταξη. Επίσης πρέπει να ληφθεί υπόψη η σύσταση των νουκλεοτιδίων του εκκινητή. Πρέπει να αποφευχθούν τριπλέτες νουκλεοτιδίων στη σειρά (π.χ. GGG) και το επιθυμητό θα ήταν, σε ένα ποσοστό 40-60% να εμπεριέχεται CG (147). Εάν δεν τηρηθούν αυτές οι προϋποθέσεις τότε μπορεί να εμφανιστούν ανεπιθύμητες διαμορφώσεις εκκινητών. Το μήκος των εκκινητών θα πρέπει να είναι περίπου 20 νουκλεοτίδια αφού αυτό επιτρέπει στους εκκινητές να παράγονται σε μεγάλες ποσότητες (146). Επίσης είναι σημαντικό κατά το σχεδιασμό των εκκινητών να ληφθούν υπόψη τα διμερή. Τα διμερή των εκκινητών αποτελούν κομμάτια ακολουθίας τα οποία μπορεί να συνδεθούν με άλλους εκκινητές στην ίδια ακολουθία και να δημιουργήσουν τεχνουργήματα (artifacts) στην PCR. Εάν οι εκκινητές, έχουν οποιαδήποτε ανεπιθύμητη δομική διαμόρφωση στην αρχή της διαδικασίας πολλαπλασιασμού της PCR, τότε τα τεχνουργήματα αυτά θα μεταφερθούν σε ολόκληρη την διαδικασία της PCR, παράγοντας έτσι λανθασμένα κομμάτια DNA. Αυτό μπορεί εν δυνάμει να καταστρέψει ολόκληρη τη διαδικασία SELEX, αφού θα παράγονται ανεπιθύμητα απταμερή αντί αυτών που επρόκειτο να αλληλοεπιδράσουν με το στόχο. Οπότε ο σχεδιασμός των εκκινητών θα πρέπει να αποκλείει την πρόκληση οποιασδήποτε ανεπιθύμητης δομικής ανωμαλίας.

Επώαση

Κατά τη φάση επώασης στη διαδικασία της SELEX, τα σχεδιασμένα απταμερή με τυχαία κεντρικά τμήματα προέρχονται από μία εμπορική βιβλιοθήκη oligομερών παράγοντας μια βιβλιοθήκη DNA. Η βιβλιοθήκη RNA προστίθεται σε ένα δείγμα που εμπεριέχει το μόριο στόχο, όπου εκεί κάποια oligομερή θα προσδεθούν με το μόριο στόχο. Οι αρχικοί γύροι επιλογής απαιτούν μεγάλους χρόνους επώασης και λιγότερο αυστηρές συνθήκες. Ο λόγος που γίνεται αυτό, είναι επειδή στους πρώτους γύρους όλοι οι σύνδεσμοι πρέπει να ταυτοποιηθούν. Οι μετέπειτα γύροι πραγματοποιούνται υπό αυστηρότερες συνθήκες, σχετικά με την μεταβολή των ιδιοτήτων του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), τον όγκο της αντίδρασης και το χρόνο επώασης. Η μεταβολή των

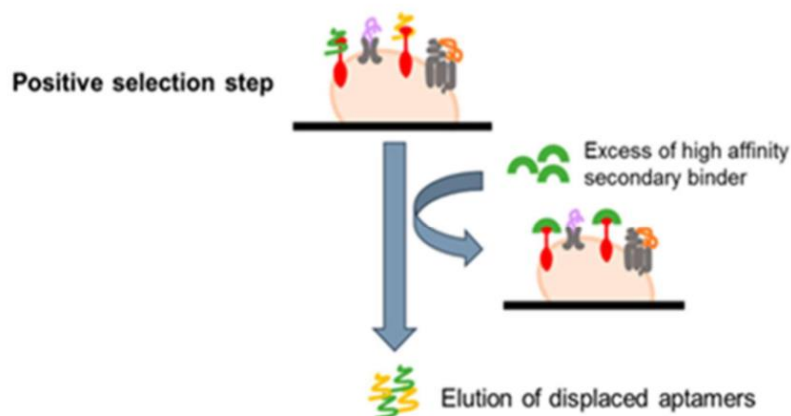
συνθηκών επώασης, επιτρέπει την επιλογή των απταμερών με την μεγαλύτερη συγγένεια και εκλεκτικότητα (148). Στους πρώτους γύρους, τα απταμερή με εκλεκτικότητα προς το μόριο στόχο θα αναγνωριστούν και έτσι κάνοντας τις συνθήκες αυστηρότερες στους επόμενους γύρους, θα ευνοηθούν τα απταμερή με τη μεγαλύτερη συγγένεια (149). Η επιλογή απταμερών με τη μεγαλύτερη συγγένεια, μπορεί να επιτευχθεί μέσω της μείωσης της συγκέντρωσης του μορίου στόχου στο ρυθμιστικό διάλυμα. Οι μεταβολές στο pH, στη θερμοκρασία και σε άλλους παράγοντες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιλογή των απταμερών των οποίων η λειτουργία θα συμπίπτει με τις συνθήκες στις οποίες θα λειτουργεί ο βιοαισθητήρας. Η φάση επώασης είναι η σημαντικότερη για την ανάπτυξη των απταμερών.

Έκλουση (Elution)

Η διαδικασία έκλουσης στην SELEX αντιστοιχεί στο διαχωρισμό των απταμερών από τον στόχο. Το απταμερές είναι συνδεδεμένο με το στόχο με δεσμούς υδρογόνου, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και αλληλεπιδράσεις Van Der Waals (150). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές θα πρέπει να διασπαστούν προκειμένου να διαχωριστεί το απταμερές από το στόχο και μετά από τη συλλογή του να προχωρήσει σε γύρους εμπλουτισμού (enrichment) στη SELEX. Υπάρχουν ορισμένες εναλλακτικές επιλογές για τον διαχωρισμό του απταμερούς από το στόχο όπως η θέρμανση, η υψηλή συγκέντρωση των μορίων στόχων και χαοτροπικοί παράγοντες για την αποδόμηση πρωτεϊνών (151). Το μόριο θα θερμανθεί σε συγκεκριμένη θερμοκρασία προκειμένου να σπάσουν οι δεσμοί που συγκρατούν το απταμερές με το στόχο και η οποία αποδομεί το DNA. Μετά την αποδόμηση του DNA ο στόχος διαχωρίζεται από το απταμερές. Το απταμερές μπορεί να ανασυντεθεί και να "επανα-αναδιπλωθεί" μέσω ψύξης. Η θέρμανση είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος για έκλουση και αντιστοιχεί στο 16% των πειραμάτων με SELEX (145).

Μια άλλη επιλογή για το διαχωρισμό των δεσμών απταμερούς-στόχου είναι η χρήση μορίων υψηλής συγγένειας, όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία ανταγωνίζονται τα συνδεδεμένα απταμερή και τα εκτοπίζουν. Η μέθοδος αυτή περιορίζεται για χρήση σε γνωστούς δείκτες και από τη διαθεσιμότητα σε

μόρια υψηλής συγγένειας (152). Η έκλουση με τη χρήση στόχου-ανταγωνιστή χρησιμοποιείται επίσης συχνά, σε ποσοστό 11% των πειραμάτων SELEX (145). Η εικόνα 12, παριστάνει αυτή τη διαδικασία έκλουσης με τη χρήση μορίων ανταγωνιστών (152).



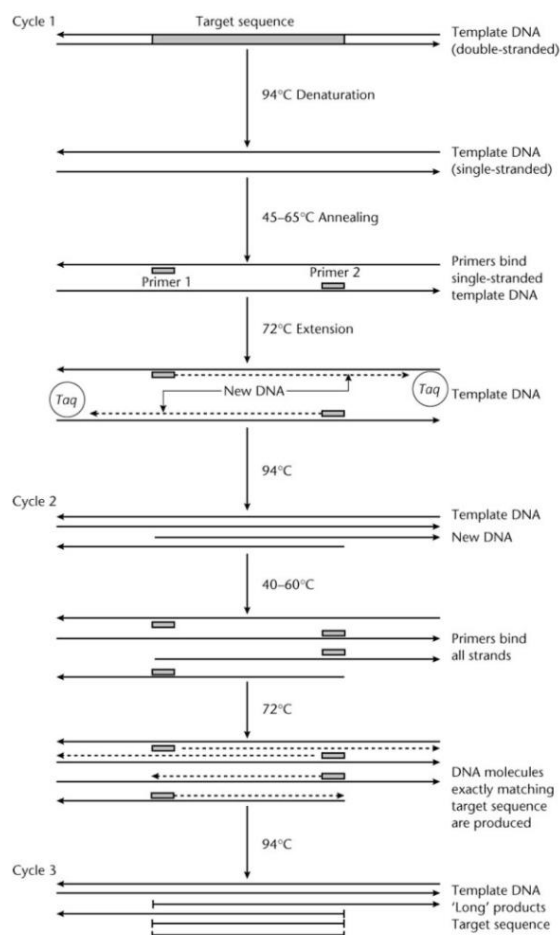
Εικόνα 12. Προσθήκη περίσσειας δευτερογενούς μορίου υψηλής συγγένειας, μετά το στάδιο της επιλογής προκειμένου να εκτοπιστούν τα απταμερή μέσω ανταγωνισμού (140).

Σε μια άλλη μέθοδο, για τη διαδικασία της έκλουσης χρησιμοποιούνται χαοτροπικοί παράγοντες, όπως η ουρία, προκειμένου να αποδομηθεί η πρωτεΐνη του μορίου στόχου (151). Οι χαοτροπικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται στο 11% των πειραμάτων SELEX (145).

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Μετά την ανάκτηση του απταμερούς με τη μέθοδο της έκλουσης, πραγματοποιείται αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction – PCR) για τον πολλαπλασιασμό της ακολουθίας σύνδεσης (151). Η PCR, χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό των στοχοποιημένων ακολουθιών DNA, μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων σύνθεσης DNA (153). Η PCR θα δημιουργήσει αντίγραφα για τους μοναδικούς συνδέτες σε κάθε γύρο (151). Σε κάθε γύρο, το ποσό του DNA στόχου αυξάνεται μέχρι να γίνει το επικρατές μόριο DNA στην αντίδραση. Η PCR περιλαμβάνει τρεις καταστάσεις: αποδόμηση, ανόπτηση εκκινητών (annealing) και επέκταση (extention). Αυτές πραγματοποιούνται σε διαφορετικές θερμοκρασίες και θα οδηγήσουν στην

ακολουθία DNA στόχο. Κατά την αποδόμηση, η θερμοκρασία αυξάνεται πάνω από τους 90°C οπότε προκαλείται αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας. Αυτό επιτρέπει, στα μόρια DNA να διαχωριστούν σε μονήρεις αλυσίδες οι οποίες μπορούν να αντιγραφούν από την DNA πολυμεράση. Κατά την επέκταση, η θερμοκρασία είναι εκείνη κατά την οποία η DNA πολυμεράση είναι περισσότερο ενεργή. Η DNA πολυμεράση αντιγράφει την επικρατούσα ακολουθία DNA στόχου χρησιμοποιώντας το πρότυπο της μονήρους αλυσίδας DNA (153). Η εικόνα 13, αναπαριστά τη διαδικασία της PCR.

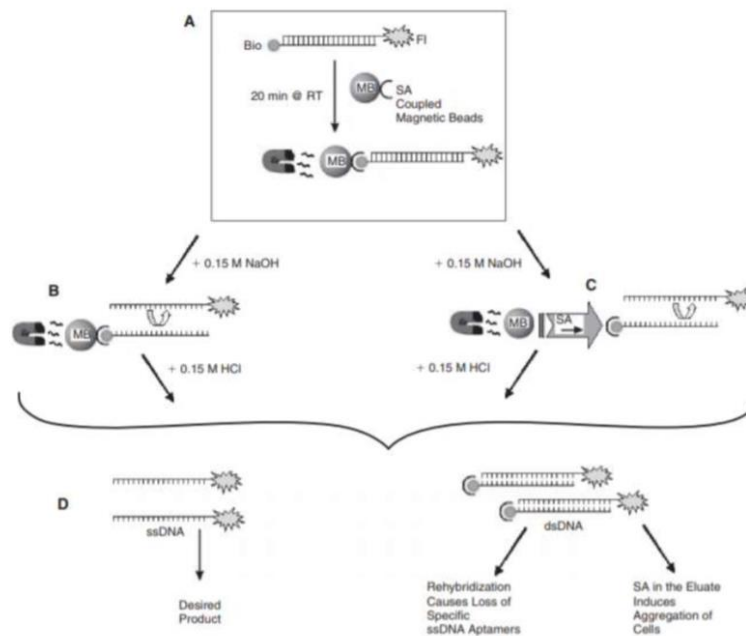


Εικόνα 13. Η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), η οποία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους επώασης σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες. Στο παράδειγμα αυτό χρησιμοποιείται η Taq DNA πολυμεράση (141).

Οι κύκλοι PCR επαναλαμβάνονται συνολικά 20-40 φορές για την ενίσχυση της ακολουθίας DNA στόχου. Από τη στιγμή που η PCR δημιουργεί διπλές έλικες DNA, αυτές θα πρέπει να μετατραπούν σε μονές, αφού τα απταμερή χρησιμοποιούν μονόκλωνο DNA (153).

Από δίκλωνο σε μονόκλωνο DNA

Υπάρχουν ορισμένες μέθοδοι για το σχηματισμό μονόκλωνου DNA από δίκλωνο. Μια μέθοδος περιλαμβάνει τον μαγνητικό διαχωρισμό με τη χρήση σφαιριδίων (beads) επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη. Η δίκλωνη αλυσίδα DNA κινητοποιείται μέσα στα μαγνητικά σφαιρίδια και διαχωρίζονται μέσω αλκαλικής μετουσίωσης (154). Στην εικόνα 14, παρουσιάζεται η διαδικασία δημιουργίας μονόκλωνου DNA από δίκλωνο με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη (155).

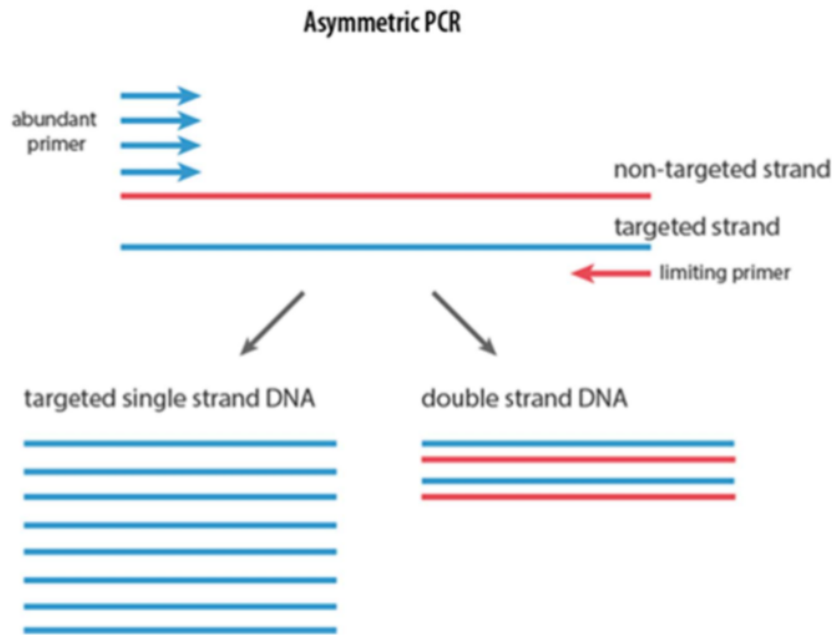


Εικόνα 14. Η διαδικασία διαχωρισμού διπλής έλικας DNA με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη (142).

Στην εικόνα 14 στο βήμα A παρουσιάζεται η διπλή έλικα DNA από PCR με την προσθήκη βιοτίνης (Bio) και φλουοροσεΐνης (FL) στα άκρα των εκκινητών. Αυτή η έλικα DNA είναι συζευγμένη με σφαιρίδια επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη τα οποία επιτρέπουν στην άλυσσο του DNA να μετουσιώνεται μέσω αλκαλικής μετουσίωσης. Στο βήμα B, αφού πραγματοποιηθεί ο μαγνητισμός, ο βιοτινυλιωμένος κλώνος παραμένει ακινητοποιημένος, ενώ το μονόκλωνο DNA που έχει σημανθεί με φλουοροσεΐνη απελευθερώνεται προς έκλουση. Στο βήμα C, η στρεπταβιδίνη απελευθερώνεται από τα μαγνητικά σφαιρίδια με τη βοήθεια

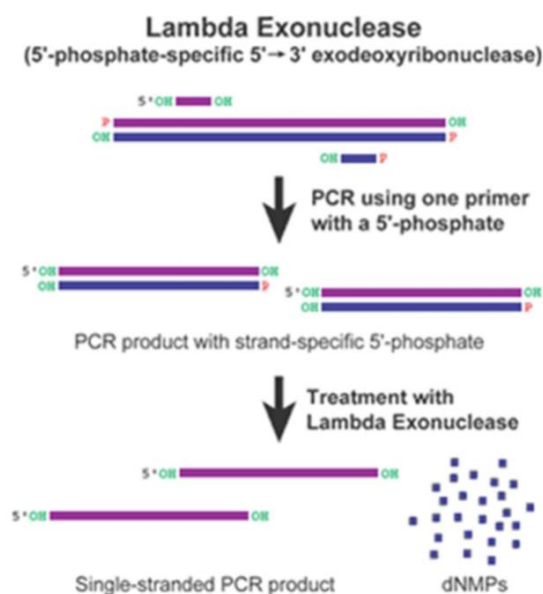
αλκάλεως επιτρέποντας έτσι και στις δύο αλυσούς να βρίσκονται στην έκλουση. Στο βήμα D, μετά την ουδετεροποίηση με HCL, η έκλουση έχει ένα μείγμα μονόκλωνου DNA σημασμένου με βιοτίνη και φλουοροσεΐνη και ένα δίκλωνο DNA καθώς και στρεπταβιδίνη. Πρέπει να αποφευχθεί η επαν-ϋβριδοποίηση, διαφορετικά οι κλώνοι των συγκεκριμένων απταμερών θα χαθούν (155).

Μια άλλη μέθοδος για τη μετατροπή δίκλωνου DNA σε μονόκλωνο είναι η χρήση ασύμμετρης PCR. Η ασύμμετρη PCR ενισχύει τη μια αλυσίδα του πρότυπου DNA περισσότερο από την άλλη (156). Αυτό γίνεται χρησιμοποιώντας άνισο γραμμομοριακό λόγο (molar ratio) εμπρόσθιων και αντιστρόφων εκκινητών (156). Η στοχοποιημένη αλυσίδα DNA θα έχει περιορισμένο ποσοστό εκκινητών ενώ ή μη στοχοποιημένη θα έχει περίσσεια εκκινητών. Στους πρώτους 10-15 κύκλους ασύμμετρης PCR, θα παραχθεί δίκλωνο DNA, αλλά από τη στιγμή που θα χρησιμοποιηθεί όλη η ποσότητα των εκκινητών που είχαν προστεθεί σε περιορισμένη ποσότητα, θα ξεκινήσει η παραγωγή μονόκλωνου DNA. Το ιδανικό σημείο για την έναρξη δημιουργίας μονόκλωνου DNA θα μπορούσε να είναι, μερικούς κύκλους πριν η αντίδραση φτάσει στο σημείο όπου ο αριθμός των ενζύμων που είναι παρόντα θα περιορίσουν την αύξηση των αντιγραμμένων ακολουθιών (157). Η εικόνα 15, παρουσιάζει τη διαδικασία με την οποία η ασύμμετρη PCR δημιουργεί μονόκλωνο DNA από δίκλωνο.



Εικόνα 15. Ασύμμετρη PCR προστίθεται περίσσεια εκκινητών για τη στοχοποίηση μιας αλύσου και την ενίσχυσή της (142)

Μια άλλη μέθοδος περιλαμβάνει τη χρήση εξωνουκλεασών. Η χρήση εξωνουκλεασών μπορεί να γίνει μετά την PCR και θα πρέπει να τροποποιηθούν οι εκκινητές ώστε να παρέχεται μια 5' φωσφορυλίωση. Η εξωνουκλεάση είναι εξαιρετικά μεταποιητική με κατεύθυνση 5' προς 3' όταν χρησιμοποιεί ένζυμα (εξωδεοξυριβονουκλεάση) για να διασπάσει επιλεκτικά τον 5'-φωσφορυλιωμένο κλώνο (158). Ο μη φωσφορυλιωμένος κλώνος αποδομείται (159). Η εικόνα 16, παρουσιάζει τη χρήση των εξωνουκλεασών.



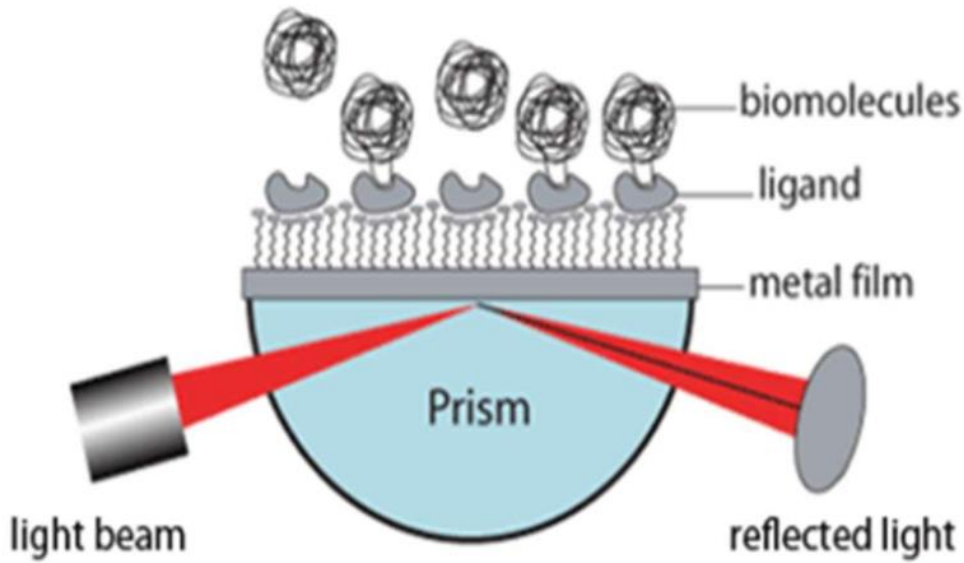
Εικόνα 16. Η εξωνουκλεάση “χωνεύει” επιλεκτικά τον κλώνο ενός προϊόντος PCR που παράγεται χρησιμοποιώντας έναν εκκινητή PCR με ένα 5-φωσφορικό άλας (144).

Αφού αποκτηθεί το μονόκλωνο DNA, το επόμενο στάδιο της διαδικασίας SELEX περιλαμβάνει την αύξηση της εκλεκτικής πίεσης. Σε αυτή τη διαδικασία οι ισχυρότεροι δεσμευτές θα διατηρηθούν και στον επόμενο γύρο, ενώ οι ασθενέστεροι δεσμευτές απομακρύνονται (160). Αυτό συμβαίνει επειδή η δέσμευση είναι προσωρινή και τα μόρια αποσυνδέονται κάποια στιγμή. Επομένως, τα απταμερή με τον μεγαλύτερο χρόνο πρόσδεσης λόγω της υψηλότερης συγγένειας θα έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα επιλογής στον επόμενο γύρο, καθώς θα παραμείνουν συνδεδεμένα περισσότερο χρόνο από τα απταμερή με χαμηλότερη συγγένεια. Η αύξηση της εκλεκτικής πίεσης μέσω της μείωσης της συγκέντρωσης του στόχου, θα μειώσει τις αναλογίες μεταξύ του στόχου και των απταμερών. Επομένως μόνο οι ισχυρότεροι συνδέτες (συνδέτες υψηλής συγγένειας) θα διατηρηθούν στον επόμενο κύκλο SELEX (161). Η αύξηση της εκλεκτικής πίεσης αλλάζει επίσης τις συνθήκες δέσμευσης, συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας, του pH, των ιοντικών αντοχών και της συγκέντρωσης του μορίου στόχου (148). Τα μόρια στόχοι που επιβιώνουν, υποβάλλονται εν συνεχεία σε έναν επιπλέον κύκλο PCR και η διαδικασία SELEX επαναλαμβάνεται όσες φορές χρειάζεται προκειμένου να ενισχυθεί ο

εμπλουτισμός της δεξαμενής των νουκλεοτιδίων μέχρι την απόκτηση της επιθυμητής δεξαμενής.

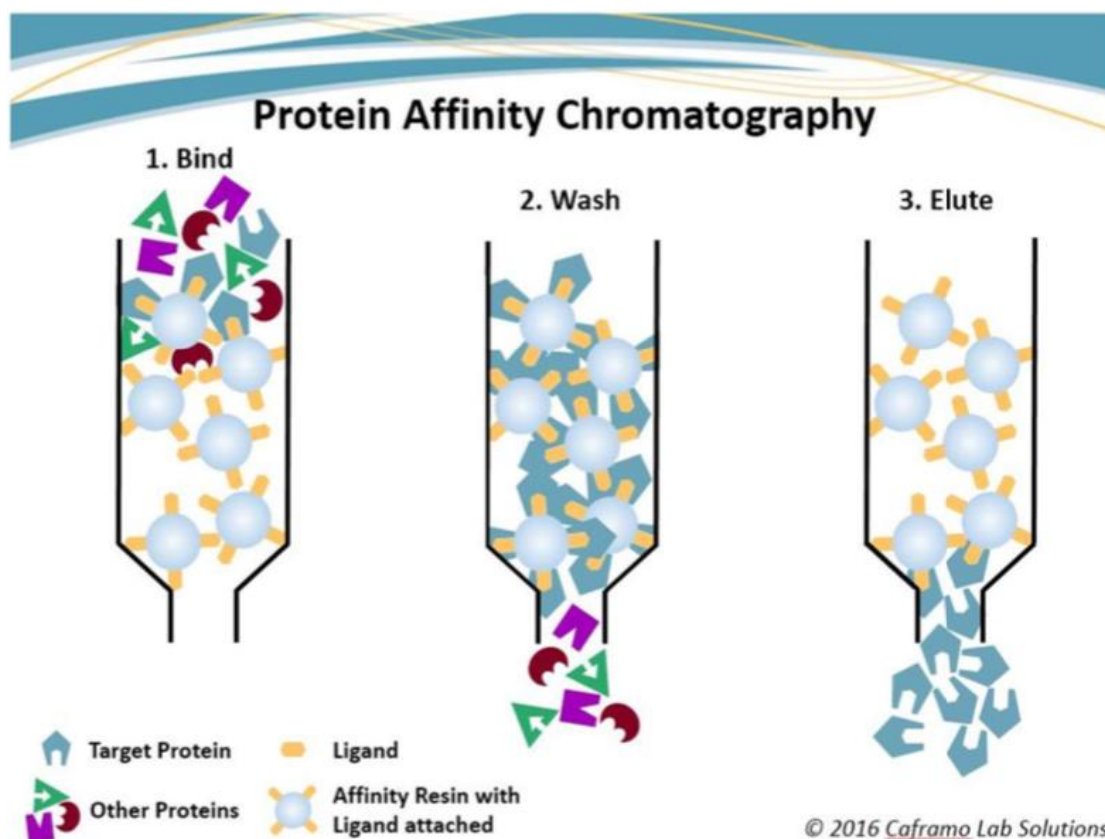
Χαρακτηρισμός σταθερών συγγένειας

Τα επιλεγμένα απταμερή αναλύονται τώρα για το χαρακτηρισμό τους. Τα απταμερή επιλέγονται με βάση τη συγγένεια πρόσδεσής τους, η οποία μετράται με τη σταθερά K_D ή K_d . Η σταθερά K_D , είναι η σταθερή συγκέντρωση ενός απταμερούς που τιτλοφορείται από μια αυξανόμενη συγκέντρωση του άλλου στοιχείου ώστε να παραχθεί ισόθερμο σύζευξης. Ο προσδιορισμός του χαρακτηρισμού των απταμερών είναι θεμελιώδης για τις ανάγκες του βιοαισθητήρα σε απταμερή. Για το βιοαισθητήρα, θα επιλεγούν τα απταμερή με μεγάλη συνδεσμική συγγένεια προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία και η εκλεκτικότητα με λίγο θόρυβο (162). Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για τον υπολογισμό της συγγένειας σύνδεσης των απταμερών όπως η φασματομετρία απορρόφησης στο υπεριώδες/ορατό φως (UV-vis), επιφανειακός συντονισμός πλασμονίων (surface plasmon resonance SPR), κυκλικός διχρωισμός (circular dichroism), χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography) και η PCR προσδιορισμού πρόσδεσης υψηλής ποσοτικής συγγένειας. Η φασματομετρία απορρόφησης στο υπεριώδες/ορατό (UV-vis), είναι μια μέθοδος η οποία απαιτεί μια μεταβολή στην ένταση ή στο μήκος κύματος απορρόφησης του απταμερούς. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να πραγματοποιηθεί μελέτη τήξης για τον προσδιορισμό της K_d . Ο επιφανειακός συντονισμός πλασμονίων (SPR) είναι μια μέθοδος κατά την οποία γίνεται σύζευξη του στόχου με ένα chip από όπου ρέουν διάφορες συγκεντρώσεις του μη συζευγμένου συνδέτη (ligand). Κατά το σχηματισμό του απταμερούς στόχου μπορούν να μετρηθούν μεταβολές στο δείκτη διάθλασης. Η ακινητοποίηση του απταμερούς οδηγεί σε μια λιγότερο ευαίσθητη μέτρηση, καθώς ο μικρότερος στόχος προκαλεί μικρή αλλαγή στην επιφάνεια (163). Στην εικόνα 17, αναπαρίσταται ο συντονισμός επιφανειακού πλασμονίου, τα βιομόρια στην περίπτωση αυτή θα είναι τα απταμερή (164).



Εικόνα 17. Μια δέσμη φωτός προσπίπτει σε μια μεταλλική επιφάνεια (φιλμ) μέσω ενός πρίσματος και η ανακλώμενη δέσμη συλλέγεται και αναλύεται (146).

Στον κυκλικό διχρωισμό (CD) υπάρχει διαφορά απορρόφησης του αριστερού και του δεξιού πολώμενου φωτός. Κατά τη δέσμευση του απταμερούς με το στόχο, το φάσμα του (CD) μπορεί να αλλάξει, αλλά για να έχει αυτή η μέθοδος καλή ευαισθησία απαιτείται σημαντική μεταβολή στη διαμόρφωση κατά τη σύνδεση με το στόχο. Στη χρωματογραφία συγγένειας είτε ο στόχος είτε το απταμερές ακινητοποιούνται ομοιοπολικά σε μια σταθερή φάση. Το άλλο συστατικό επωάζεται με το υπόστρωμα και υπολογίζεται η ποσότητα σύνδεσης (163). Η εικόνα 18, αναπαριστά τη χρωματογραφία συγγένειας (164).



Εικόνα 18. Διαδικασία της χρωματογραφίας συγγένειας για μια πρωτεΐνη (146).

Η PCR προσδιορισμού πρόσδεσης υψηλής ποσοτικής συγγένειας είναι μια μέθοδος κατά την οποία ένα απταμερές διπλής λειτουργίας, επωάζεται με το στόχο. Στη συνέχεια η συγκέντρωση του απταμερούς που απελευθερώνεται από αυτή τη διαδικασία, μετράται με πραγματικού χρόνου (real time) PCR (163).

Μέθοδοι σήμανσης

Ηλεκτροχημική

Η ηλεκτροχημική αντίδραση (οξειδοαναγωγή) που διενεργείται, παράγει ένα ηλεκτρικό σήμα ανάλογο της συγκέντρωσης του βιοδείκτη. Ένα απταμερές ακινητοποιείται στην επιφάνεια ενός ηλεκτρόδιου, π.χ. από χρυσό. Ο στόχος συνδέεται στο ακινητοποιημένο απταμερές. Στη συνέχεια ένα δεύτερο απταμερές συνδέεται στο στόχο και δημιουργεί μια μορφολογία “σάντουιτς”. Αυτό το δεύτερο απταμερές τροποποιείται για να παρουσιάζει ένα ηλεκτροενεργό παράγοντα, π.χ. ένα μόριο οξειδοαναγωγής, νανοσωματίδιο ή μία κβαντική κουκίδα, το οποίο μετά αντιδρά με το ηλεκτρόδιο για να παράγει ένα ηλεκτρικό

σήμα. Εναλλακτικά στο απταμερές μπορεί να υπάρχει ένα προσδεμένο ένζυμο το οποίο είναι ικανό να παράγει ένα ηλεκτροενεργό μόριο για τη μέτρηση του σήματος. Το τελευταίο σύστημα οξειδοαναγωγή που βασίζεται σε ένζυμο χρησιμοποιείται πιο συχνά.

Φθορισμού

Στο σήμα φθορισμού η διαδικασία είναι όμοια με την προηγούμενη με τη διαφορά ότι το δεύτερο απταμερές σημαίνεται με ένα φθορίζον μόριο. Το επίπεδο φθορισμού, το οποίο μετράται με τη χρήση ενός φθοριομέτρου, θα είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση του βιοδείκτη.

Ακίνητοποίηση απταμερών

Υπάρχουν πολύ διαφορετικοί τρόποι ακίνητοποίησης των απταμερών στην επιφάνεια. Οι πιο αποτελεσματικές μέθοδοι είναι εκείνες που παρέχουν ειδική ακίνητοποίηση που διατηρεί τον προσανατολισμό ώστε η θέση πρόσδεσης να βρίσκεται μακριά από την επιφάνεια και εντός του διαλύματος για να προσδεθεί σε αυτήν ο βιοδείκτης (στόχος). Αυτό γίνεται μέσω μιας ομοιοπολικής απευθείας σύνδεσης του απταμερούς με την επιφάνεια ή συνδέοντας μία αλληλουχία του απταμερούς η οποία μπορεί να συνδεθεί με ένα άλλο ακίνητοποιημένο μόριο DNA μέσω υβριδισμού (σύνδεση βάσεων Watson-Crick). Ένας τρόπος είναι η πρόσδεση στο απταμερές ενός συνδέτη με μία θειόλη η οποία στη συνέχεια προσδένεται σε μία επιφάνεια χρυσού. Άλλοι τρόποι αφορούν την πρόσδεση του απταμερούς με μία ενδιάμεση σύνδεση στην επιφάνεια μέσω ομοιοπολικού δεσμού.

Τέλος, ένας ακόμη τρόπος είναι η χρήση "βιο-επίστρωσης" (bio-coating). Σε αυτή την περίπτωση μία συνήθης μέθοδος είναι αυτή της σύνδεσης αβιδίνης-βιοτίνης. Το απταμερές συνδέεται με τη βιοτίνη και αλληλεπιδρά στην επιφάνεια που είναι καλυμμένη με αβιδίνη. Πρόκειται για μία εύκολη μέθοδο η οποία είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη και λειτουργεί καλά σε μία πλατφόρμα βιοαισθητήρων τύπου ALISA.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η ανίχνευση νέων βιοδεικτών αλλά και θεραπευτικών στόχων, σε υαλοαμφιβληστροειδικές παθήσεις, με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής. Επιπλέον η παρούσα διατριβή επικεντρώνεται στη δυνατότητα εφαρμογής των απταμερών ως διαγνωστικά μέσα (βιοαισθητήρες) σε υαλοαμφιβληστροειδικές παθήσεις.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά και μέθοδοι

Αρχικά εξετάστηκαν 92 ασθενείς στο τμήμα υαλοειδούς της οφθαλμολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η εξέταση περιελάμβανε: λήψη ατομικού και οφθαλμολογικού ιστορικού, μέτρηση καλύτερα διορθούμενης οπτικής οξύτητας, βιομικροσκόπηση, τονομέτρηση καθώς και βυθοσκόπηση. Επίσης πραγματοποιήθηκαν και άλλες εξετάσεις όπως τομογραφία οπτικής συνοχής, β-υπερηχογραφία, φλουροαγγειογραφία και αυτοφθορισμός ανάλογα με την υποκείμενη νόσο. Από τους ασθενείς που εξετάστηκαν οι 54 πληρούσαν τα κριτήρια και προχώρησαν στη μελέτη. Πιο συγκεκριμένα στα κριτήρια αποκλεισμού ήταν το ιστορικό ενδοφθάλμιας φλεγμονής, οφθαλμικού τραύματος ή οφθαλμολογικού χειρουργείου, εκτός της φακοθρυψίας. Επίσης αποκλείστηκαν όλοι οι ασθενείς που έπασχαν από κάποια σοβαρή συστηματική νόσο, ή φλεγμονή (κακοήθεια, αυτοάνοση νόσο), συμπεριλαμβανομένου και του σακχαρώδους διαβήτη, από τον οποίο έπασχαν μόνο οι ασθενείς των ομάδων με παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και διαβητικό οίδημα ωχράς κηλίδας.

Αρχικά έγινε συλλογή δειγμάτων υαλοειδούς από 24 (n=24) ασθενείς που έπασχαν από ρηματογενή αποκόλληση αμφιβληστροειδούς (ΡΑΑ), καθώς και από 10 ασθενείς (n=10), οι οποίοι θεωρήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Στην ομάδα ελέγχου, οι ασθενείς, έπασχαν από διάφορες παθήσεις της υαλοωχρικής επιφάνειας όπως: σύνδρομο υαλοωχρικής έλξης (ΣΥΕ) (VMT) (n=2), ιδιοπαθής επιαμφιβληστροειδική μεμβράνη (iEAM) (iERM) (n=6) και σπή ωχράς κηλίδας ολικού πάχους (ΟΠΟΩ) (FTMH) (n=2). Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε συλλογή δειγμάτων και από 20 διαβητικούς ασθενείς. Οι 11 από αυτούς είχαν παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΠΔΑ) ή (PDR) (n=11) και οι 9 διαβητικό οίδημα ωχράς κηλίδας (ΔΟΩ) ή (DME) (n=9). Επιπλέον στην ομάδα των ασθενών που έπασχαν από ΡΑΑ εκτιμήθηκαν και κάποια κλινικά χαρακτηριστικά βάση των οποίων διαχωρίστηκαν σε επιμέρους υποομάδες. Τα χαρακτηριστικά αυτά ήταν η παρουσία κρυσταλλοειδούς φακού ή ενδοφακού (2 υπό-ομάδες: έμφακοι, ψευδοφακικοί ασθενείς), τεταρτημόρια αποκόλλησης (2 υπό-ομάδες: 1-2, 3-4 τεταρτημόρια), διάρκεια των συμπτωμάτων (3 υπό-ομάδες: <10, 10-30, >30 ημέρες) και με βάση την ταξινόμηση ΠΥΑ (εφόσον υπήρχε) (4 υποομάδες: απουσία, σταδίου Α, σταδίου Β, σταδίου C). Η ταξινόμηση της ΠΥΑ έγινε με βάση

την επικαιροποιημένη ταξινόμηση (Retina Society Classification 1991) (33, 165, 166).

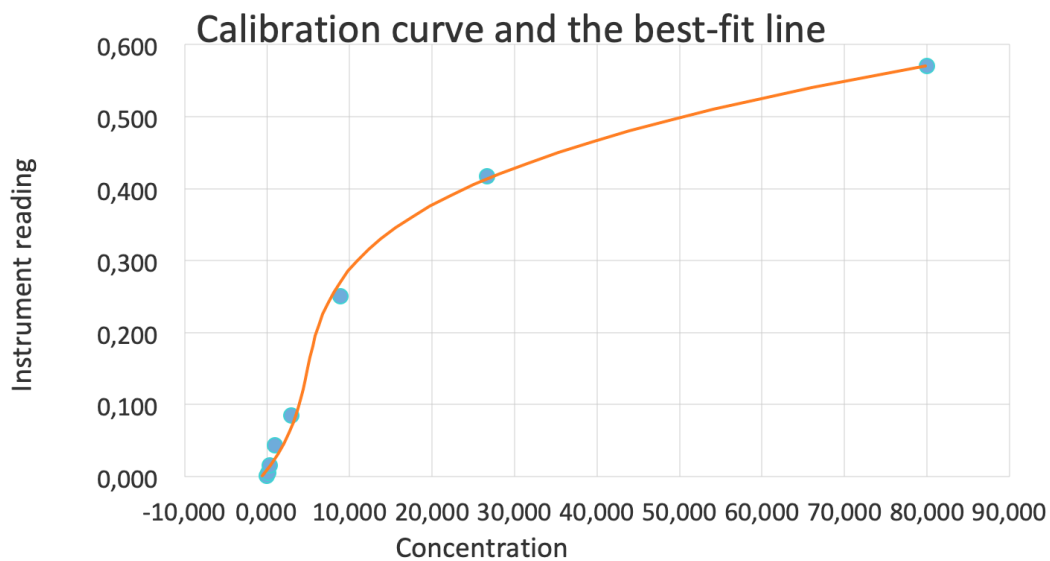
Από όλους τους ασθενείς έγινε λήψη έγγραφου εντύπου συγκατάθεσης. Η μελέτη αυτή έλαβε την έγκριση του επιστημονικού συμβουλίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και είναι εναρμονισμένη με τη διακήρυξη του Ελσίνκι.

Όλοι οι ασθενείς χειρουργήθηκαν από τον ίδιο χειρουργό. Υπεβλήθησαν σε pars plana υαλοειδεκτομή 25G με το σύστημα Constellation® (ALCON). Σε κάθε περιστατικό, περίπου 0,5ml δείγματος υαλοειδούς (κεντρικό υαλοειδές-core) λαμβανόταν κατά την έναρξη της υαλοειδεκτομής, ακριβώς πριν το άνοιγμα της έγχυσης. Εν συνεχεία τα δείγματα αποθηκεύονταν στους -80 °C.

Κυτταρομετρία ροής

Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση AimPlex multiplex assay σε κυτταρομετρητή FACSCalibur (Becton-Dickinson). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό CellQuest software (Becton-Dickinson). Η τεχνολογία πολλαπλής ανάλυσης AimPlex λειτουργεί με τη χρήση πολλαπλών πληθυσμών σφαιριδίων που διαφοροποιούνται ως προς το μέγεθος και τα επίπεδα έντασης φθορισμού. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να μετρηθούν πολλαπλά μόρια ταυτόχρονα στην ίδια αντίδραση. Οι πληθυσμοί των σφαιριδίων στην αντίδραση καθορίζονται από τον κυτταρομετρητή ο οποίος είναι εφοδιασμένος με laser. Η σφαιριδομετρία βασίζεται στην ίδια αρχή με αυτή της sandwich ELISA. Ο κάθε πληθυσμός σφαιριδίων φέρει ένα συγκεκριμένο αντίσωμα πρόσδεσης το οποίο μπορεί να συνδεθεί με το ζητούμενο αναλύτη, στην περίπτωσή μας την ζητούμενη κυτταροκίνη του δείγματος. Η ποσοτική μέτρηση της συνδεδεμένης κυτταροκίνης γίνεται μέσω ενός βιοτινυλιωμένου αντισώματος έναντι ενός δεύτερου επιτόπου της κυτταροκίνης. Ακολουθεί η επεξεργασία με στρεπταβιδίνη συζευγμένη με R-φυκοερυθρίνη. Η ένταση του φθορισμού της R-φυκοερυθρίνης στα σφαιρίδια υπολογίζεται με τον κυτταρομετρητή ροής. Οι συγκεντρώσεις των κυτταροκινών των δειγμάτων υπολογίζονται σε πικογραμμάρια ανά मिलीτρο (pg/ml) συγκρίνοντας το σήμα του φθορισμού με

αυτό της πρότυπης καμπύλης η οποία αντιστοιχεί σε διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης του αναλύτη, εν προκειμένω της κυτταροκίνης. Στην εικόνα 19, παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη για τη λιποκαλίνη-2 (NGAL). Η διαδικασία της δοκιμασίας αποτελείται από το βήμα την επώασης των σφαιριδίων που φέρουν τα αντισώματα με το αντιγόνο για 60 λεπτά, το βήμα της επώασης με βιοτινυλιωμένο αντίσωμα για 30 λεπτά και το βήμα επώασης με στρεπταβιδίνη φυκοερυθρίνη για 20 λεπτά (167)



Εικόνα 19. Πρότυπη καμπύλη. Ο οριζόντιος άξονας αναπαριστά τη συγκέντρωση της NGAL σε pg/ml και ο κάθετος άξονας τη μέση ένταση φθορισμού (MFI).

Στατιστική ανάλυση

Οι κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως απόλυτες (n) και σχετικές (%) συχνότητες, ενώ οι ποσοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέση τιμή, τυπική απόκλιση, διάμεσος, ελάχιστη τιμή, μέγιστη τιμή και ενδο-τεταρτημοριακό εύρος. Ο έλεγχος των Kolmogorov-Smirnov και τα διαγράμματα κανονικότητας χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της κανονικής κατανομής των ποσοτικών μεταβλητών. Για τις συσχετίσεις μεταξύ των μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Mann-Whitney και ο συντελεστής συσχέτισης Spearman καθώς οι ποσοτικές μεταβλητές δεν ακολουθούσαν την κανονική

κατανομή. Για την περίπτωση του φύλου χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος χ^2 και στην περίπτωση της ηλικίας ο έλεγχος t.

Για να εφαρμοστεί η πολυμεταβλητή γραμμική παλινδρόμηση πραγματοποιήθηκε ο λογαριθμικός μετασχηματισμός των μετρούμενων παραγόντων, έτσι ώστε να ακολουθούν πλέον την κανονική κατανομή. Παρουσιάζονται τα από-λογαριθμισμένα αποτελέσματα για την απλούστερη κατανόηση. Στην περίπτωση που η εξαρτημένη μεταβλητή ήταν ποσοτική μεταβλητή που ακολουθούσε την κανονική κατανομή, και >2 ανεξάρτητες μεταβλητές προέκυψαν στατιστικά σημαντικές στο επίπεδο του 0,2 ($p < 0,2$) στη διμεταβλητή ανάλυση, εφαρμόστηκε πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση (multivariate linear regression). Στην περίπτωση αυτή, εφαρμόστηκε η μέθοδος της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης με την προς τα πίσω διαγραφή των μεταβλητών (backward stepwise linear regression). Αναφορικά με την πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση, παρουσιάζονται οι συντελεστές b (coefficients beta), τα αντίστοιχα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης και οι τιμές p.

Το αμφίπλευρο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ίσο με 0,05. Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το IBM SPSS 21.0 (Statistical Package for Social Sciences).

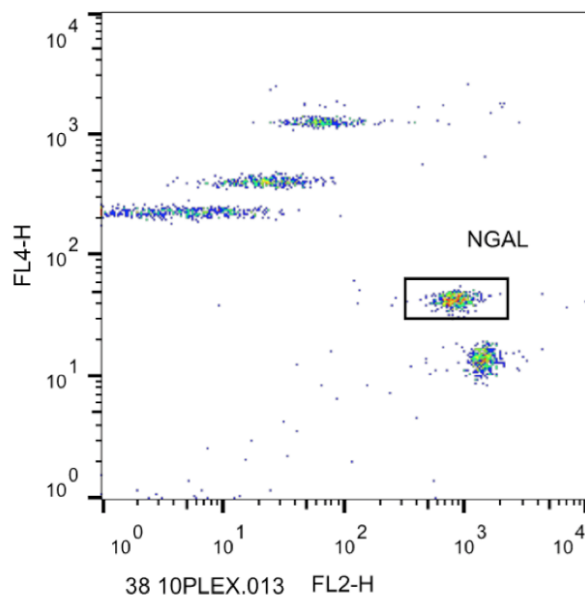
Αποτελέσματα

Στον πίνακα 2, παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των μετρούμενων παραγόντων. Στην εικόνα 20 παρουσιάζεται ένα παράδειγμα μέτρησης της λιποκαλίνης2 (NGAL) σε ένα περιστατικό με PAA και στην εικόνα 21 ένα παράδειγμα από περιστατικό οπής ολικού πάχους, που αντιστοιχούσε στην ομάδα ελέγχου αντίστοιχα. Κάθε κυτταρόγραμμα (dot plot) έχει δύο παραμέτρους, στον οριζόντιο άξονα η (FL2) αντιστοιχεί στην μέση ένταση φθορισμού (MFI) που σχετίζεται με τη συγκέντρωση της NGAL (πλαίσιο) και στον κάθετο άξονα, η (FL4) αντιστοιχεί την ένταση φθορισμού που προσδιορίζει τη θέση της κάθε κυτταροκίνης του kit ώστε να είναι δυνατός ο μεταξύ τους διαχωρισμός.

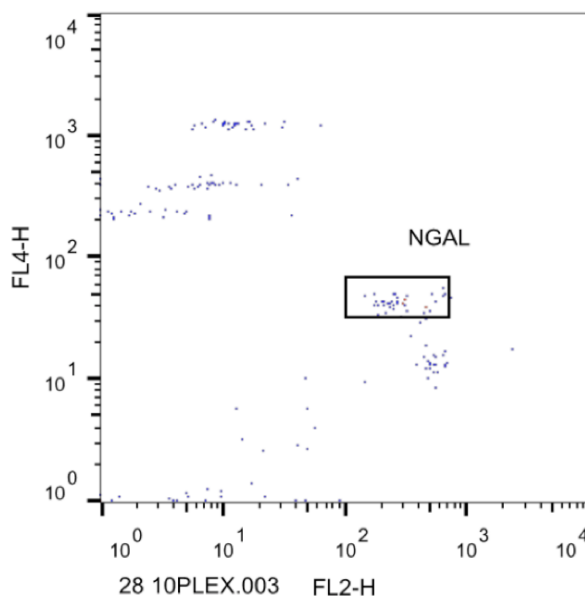
Πίνακας 2. Συνοπτικός πίνακας τα δημογραφικά στοιχεία, κλινικά χαρακτηριστικά και τις μετρήσεις στα δείγματα υαλοειδούς των υπό μελέτη ασθενών.

ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΟ	ΝΟΣΟΣ	ΦΑΚΟΣ	ΤΕΤΑΡΤΗ ΜΟΡΙΑ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	PVR	NGAL	IL6	IL8	IL1b	IL27	ICAM	VCAM	MCP1	TNFa	VEGFa
62	ΘΗΛΥ	ΕΑΜ					4803,80	55,80	726,90	9,00	62,60	250,40	755,40	982,60	18,30	1411,00
74	ΘΗΛΥ	ΕΑΜ					4518,70	114,40	692,90	8,80	75,70	223,70	1159,40	1138,80	24,80	393,60
63	ΘΗΛΥ	ΕΑΜ					2986,20	224,10	88,20	5,00	31,20	264,00	634,40	960,30	14,80	31,30
72	ΘΗΛΥ	ΕΑΜ					3592,60	106,30	68,00	6,10	29,10	70,00	366,00	712,70	12,60	27,10
71	ΘΗΛΥ	ΟΠΟΩ					3921,80	9,40	110,00	5,00	18,70	50,00	336,50	436,20	10,40	32,30
51	ΘΗΛΥ	ΟΠΟΩ					735,10	13,50	3,87	6,00	18,60	55,00	264,00	298,30	10,00	35,60
84	ΘΗΛΥ	ΣΥΑ					2743,50	15,40	59,00	5,40	21,50	60,00	351,20	773,20	11,10	27,10
73	ΑΡΡΕΝ	ΕΑΜ					4576,60	89,50	136,50	8,40	39,70	243,00	634,40	976,50	15,00	461,10
77	ΑΡΡΕΝ	ΕΑΜ					1678,00	1,27	11,60	3,80	18,10	50,00	170,40	51,70	9,20	11,00
72	ΑΡΡΕΝ	ΣΥΑ					200,00	11,50	6,00	3,30	10,70	70,00	295,20	11,00	10,00	47,80
67	ΑΡΡΕΝ	ΡΑΑ	ΕΜΦΑΚΟΣ	1-2	<10 ημ.	ΧΩΡΙΣ	5561,50	496,50	742,70	6,10	20,00	767,00	266,00	905,50	11,60	35,10
59	ΘΗΛΥ	ΡΑΑ	ΨΕΥΔΟΦΑΚΙ ΚΟΣ	3-4	10-30 ημ.	B	10763,20	231,70	142,00	5,70	32,50	1208,00	3299,40	1191,60	14,00	20,40
62	ΑΡΡΕΝ	ΡΑΑ	ΨΕΥΔΟΦΑΚΙ ΚΟΣ	3-4	10-30 ημ.	C	19213,70	1172,60	668,00	4,40	30,80	690,60	6656,00	1547,80	13,30	175,40
64	ΑΡΡΕΝ	ΡΑΑ	ΨΕΥΔΟΦΑΚΙ ΚΟΣ	3-4	10-30 ημ.	C	70833,50	484,00	447,50	5,80	55,20	985,10	15510,40	1189,40	10,10	50,20
53	ΘΗΛΥ	ΡΑΑ	ΨΕΥΔΟΦΑΚΙ ΚΟΣ	3-4	10-30 ημ.	B	7907,90	1326,40	781,80	6,00	23,40	655,20	5537,50	1805,30	13,30	49,20
61	ΑΡΡΕΝ	ΡΑΑ	ΕΜΦΑΚΟΣ	3-4	10-30 ημ.	B	6283,90	276,00	1781,50	7,20	23,80	1213,90	3063,70	2797,90	13,60	52,10
61	ΘΥΛΗ	ΡΑΑ	ΨΕΥΔΟΦΑΚΙ ΚΟΣ	3-4	10-30 ημ.	B	9862,80	1708,40	217,70	6,70	25,90	684,20	5890,80	1052,20	11,00	23,90
NA	ΑΡΡΕΝ	ΡΑΑ	ΨΕΥΔΟΦΑΚΙ ΚΟΣ	3-4	10-30 ημ.	A	5495,20	501,50	226,60	5,00	30,00	1547,70	8362,60	1681,70	10,20	26,10
NA	ΘΗΛΥ	ΡΑΑ	ΕΜΦΑΚΟΣ	1-2	<10 ημ.	ΧΩΡΙΣ	3010,20	411,90	81,40	5,40	30,00	1617,40	345,30	1356,30	13,80	36,50
77	ΑΡΡΕΝ	ΡΑΑ	ΨΕΥΔΟΦΑΚΙ ΚΟΣ	1-2	<10 ημ.	ΧΩΡΙΣ	2520,40	59,00	60,20	5,40	23,10	757,50	3417,20	1003,00	12,30	40,80
42	ΑΡΡΕΝ	ΡΑΑ	ΕΜΦΑΚΟΣ	1-2	<10 ημ.	ΧΩΡΙΣ	2311,10	30,20	114,40	5,30	23,60	415,90	203,70	484,20	13,50	21,80
65	ΑΡΡΕΝ	ΡΑΑ	ΕΜΦΑΚΟΣ	1-2	<10 ημ.	ΧΩΡΙΣ	4479,60	104,50	128,70	8,10	34,50	541,50	495,80	1395,30	12,20	52,60
70	ΑΡΡΕΝ	ΡΑΑ	ΕΜΦΑΚΟΣ	3-4	<10 ημ.	A	4841,30	178,60	208,00	4,80	25,90	528,40	746,50	1232,50	12,60	58,20
52	ΑΡΡΕΝ	ΡΑΑ	ΨΕΥΔΟΦΑΚΙ ΚΟΣ	3-4	10-30 ημ.	B	6055,10	383,50	277,70	9,70	37,00	1570,00	8127,20	1336,00	13,90	38,90
57	ΑΡΡΕΝ	ΡΑΑ	ΕΜΦΑΚΟΣ	3-4	<10 ημ.	A	4916,50	3429,60	174,00	6,00	23,10	864,50	1124,00	2506,40	13,10	21,20
81	ΘΗΛΥ	ΡΑΑ	ΕΜΦΑΚΟΣ	3-4	10-30 ημ.	B	10005,20	231,70	307,00	7,00	54,20	1240,40	2686,50	1336,00	14,30	61,00
48	ΘΗΛΥ	ΡΑΑ	ΕΜΦΑΚΟΣ	3-4	10-30 ημ.	B	9387,36	98,80	157,40	4,98	32,30	763,80	3299,30	862,70	17,30	142,10
86	ΑΡΡΕΝ	ΡΑΑ	ΨΕΥΔΟΦΑΚΙ ΚΟΣ	3-4	>10 ημ.	C	259625,10	5194,80	904,60	7,80	119,80	3680,20	23700,70	7977,50	25,50	336,10
82	ΑΡΡΕΝ	ΡΑΑ	ΨΕΥΔΟΦΑΚΙ ΚΟΣ	3-4	>10 ημ.	C	50124,00	163,90	203,50	7,20	4,36	1414,60	5154,80	1416,70	12,20	32,70
63	ΑΡΡΕΝ	ΡΑΑ	ΕΜΦΑΚΟΣ	1-2	<10 ημ.	ΧΩΡΙΣ	4653,00	18,40	113,20	5,30	15,40	1037,00	637,40	1318,50	10,95	24,30
35	ΘΗΛΥ	ΡΑΑ	ΕΜΦΑΚΟΣ	1-2	<10 ημ.	ΧΩΡΙΣ	3921,80	45,90	185,00	5,70	35,00	228,00	298,10	719,20	16,40	193,30
80	ΑΡΡΕΝ	ΡΑΑ	ΨΕΥΔΟΦΑΚΙ ΚΟΣ	3-4	>10 ημ.	C	35759,00	245,20	733,70	5,70	27,60	1208,00	10774,60	1877,50	11,30	36,50
72	ΑΡΡΕΝ	ΡΑΑ	ΨΕΥΔΟΦΑΚΙ ΚΟΣ	3-4	>10 ημ.	C	15486,60	653,10	226,50	5,00	19,60	1293,10	8539,10	1474,70	11,50	21,00
74	ΑΡΡΕΝ	ΡΑΑ	ΕΜΦΑΚΟΣ	3-4	>10 ημ.	C	10527,60	509,10	226,50	7,20	31,90	1457,40	1687,30	1348,70	16,60	34,60
87	ΘΗΛΥ	ΔΟΩ					5948,20	314,00	210,00	4,10	24,20	90,00	1315,70	492,10	12,80	33,70
68	ΘΗΛΥ	ΔΟΩ					11960,00	70,10	181,60	5,30	26,30	260,60	1076,90	921,70	14,30	280,50
63	ΑΡΡΕΝ	ΔΟΩ					7112,80	28,40	70,40	3,80	18,10	60,00	342,40	343,40	10,60	15,60
68	ΘΗΛΥ	ΔΟΩ					12622,00	106,60	115,50	5,10	30,30	173,00	861,60	775,36	13,20	142,10
80	ΑΡΡΕΝ	ΔΟΩ					17042,40	370,40	1027,10	8,00	56,30	703,30	1923,10	1751,00	20,10	1209,20
68	ΑΡΡΕΝ	ΔΟΩ					6534,70	147,30	319,00	7,50	41,60	332,00	764,20	1270,00	18,10	340,80

75	APPEN	ΔΟΩ	5126,40	126,20	532,80	25,2 0	100,40	935,90	2200,20	1094,00	29,40	1273,4 0
58	APPEN	ΠΔΑ	2115,80	175,20	4750,40	9,70	49,50	432,60	646,20	1149,70	20,00	388,40
63	APPEN	ΠΔΑ	8264,80	323,50	922,50	7,20	53,20	301,50	1283,30	1286,80	17,00	205,50
73	ΘΗΛΥ	ΠΔΑ	6469,80	121,00	1363,00	16,9 0	96,70	830,00	1404,20	1267,60	35,30	2274,8 0
73	ΘΗΛΥ	ΠΔΑ	6167,00	108,40	419,10	7,80	53,20	159,30	605,00	1145,30	18,70	919,50
75	ΘΗΛΥ	ΠΔΑ	5264,90	31,70	448,56	8,70	47,20	183,10	743,60	595,30	26,80	137,40
33	APPEN	ΠΔΑ	6601,10	93,10	658,00	8,40	50,70	117,20	537,10	966,30	20,50	521,60
86	ΘΗΛΥ	ΠΔΑ	4339,60	138,50	2222,70	9,20	49,90	267,50	914,70	663,30	22,70	554,10
62	ΘΗΛΥ	ΠΔΑ	4277,70	146,30	431,10	8,30	51,40	795,50	1041,50	1341,00	20,00	1062,2 0
65	APPEN	ΠΔΑ	3717,70	144,30	1410,70	7,50	69,40	512,00	1286,20	1316,10	22,80	149,60
57	APPEN	ΔΟΩ	5473,50	84,70	421,30	10,0 0	56,30	412,50	799,60	734,50	21,50	947,10
72	APPEN	ΠΔΑ	3861,40	211,80	56,20	6,90	24,60	90,00	516,40	626,20	12,70	34,20
56	ΘΗΛΥ	ΠΔΑ	4785,00	92,40	534,00	7,70	36,00	250,40	776,00	1480,40	16,50	346,90
69	APPEN	ΔΟΩ	5409,30	46,70	271,20	5,50	29,20	127,30	498,80	697,10	12,96	628,40



Εικόνα 20. Συνοπτικός πίνακας τα δημογραφικά στοιχεία, κλινικά χαρακτηριστικά και τις μετρήσεις στα δείγματα υαλοειδούς των υπό μελέτη ασθενών.



Εικόνα 21. Κυτταρόγραμμα (dot-plot) μετρήσεων δείγματος υαλοειδούς από περιστατικό με σπή ωχράς ολικού πάχους (ομάδα ελέγχου). Η λιποκαλίνη2 φαίνεται στο πλαίσιο (NGAL).

Δημογραφικά

Ο μελετώμενος πληθυσμός περιλάμβανε 24 ασθενείς με ρηματογενή αποκόλληση αμφιβληστροειδούς (ΡΑΑ) και μια ομάδα ελέγχου 10 ατόμων. Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την ηλικία ($p=0,2$) και το φύλο ($p=0,054$) μεταξύ ασθενών και της ομάδας ελέγχου. Αναλυτικότερα, η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 64,1 έτη (τυπική απόκλιση, $TA=13,2$), ενώ η μέση ηλικία της ομάδας ελέγχου ήταν 69,9 έτη ($TA=9,1$). Η μικρότερη ηλικία των ασθενών ήταν 35 έτη και η μεγαλύτερη ήταν 85 έτη, ενώ για την ομάδα ελέγχου ήταν 51 και 84 έτη αντιστοίχως. Επιπλέον, το 85% ($n=17$) των ασθενών ήταν άνδρες και το 50% ($n=7$) στην ομάδα ελέγχου ήταν άνδρες.

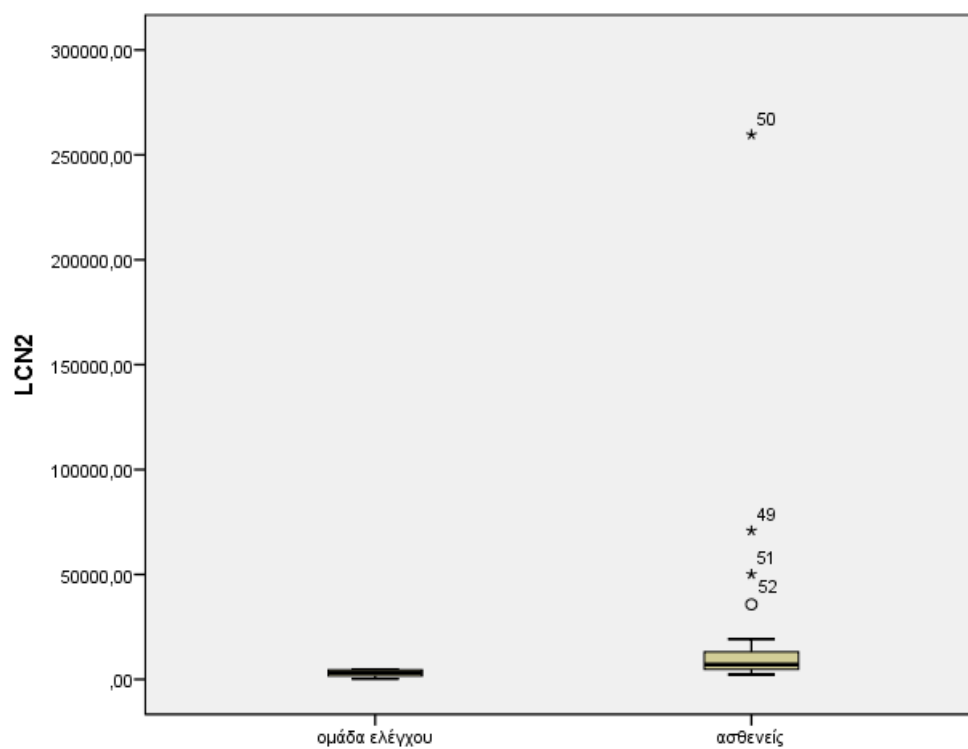
Λιποκαλίνη-2 (LCN2)

Η Λιποκαλίνη-2 (LCN2) στους ασθενείς με ΡΑΑ και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες των ασθενών (ΡΑΑ) παρουσιάζεται στον πίνακα 3. Η ανάλυση ευαισθησίας αφορά την αφαίρεση ορισμένων ακραίων τιμών από την ανάλυση και ενισχύει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, καθώς δεν μεταβλήθηκαν μετά από την αφαίρεση των ακραίων τιμών από την ανάλυση.

Η διάμεση LCN2 ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς (7.095 pg/ml) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (3.289 pg/ml), ($p < 0,001$), (γράφημα 1).

Στη συνέχεια η ανάλυση αφορούσε μόνο στους ασθενείς (γράφημα 2) και βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ LCN2 και βαθμού ΠΥΑ (PVR) ($r_s = 0,94$, $p < 0,001$). Η διάμεση LCN2 στην ομάδα PVR C ήταν 35.759 pg/ml, στην ομάδα PVR B ήταν 9.387 pg/ml, στην ομάδα PVR A ήταν 4.916 pg/ml και στην ομάδα χωρίς PVR ήταν 3,921 pg/ml. Η διάμεση LCN2 ήταν μεγαλύτερη στους ψευδοφακικούς (13.124 pg/ml) σε σχέση με τους έμφακους (4.879 pg/ml), ($p = 0,007$). Οι ασθενείς με 3-4 τεταρτημόρια προσβολής, είχαν μεγαλύτερη διάμεση LCN2 (10.005 pg/ml), σε σχέση με τους ασθενείς με 1-2 τεταρτημόρια (3.921 pg/ml) ($p < 0,001$). Βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ LCN2 και διάρκειας των συμπτωμάτων ($r_s = 0,87$, $p < 0,001$). Η διάμεση LCN2 στους ασθενείς με συμπτώματα για >30 ημέρες ήταν 35.759 pg/ml, στους ασθενείς με συμπτώματα 10 έως 30 ημέρες ήταν 9.625 pg/ml και στους ασθενείς με συμπτώματα <10 ημέρες ήταν 4.479 pg/ml.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε πολυμεταβλητή γραμμική παλινδρόμηση στην οποία βρέθηκε ότι μόνο ο βαθμός PVR σχετίζονταν ανεξάρτητα με την LCN2. Πιο συγκεκριμένα, αυξημένη βαθμός PVR σχετίζονταν με αυξημένη LCN2 (συντελεστής $b = 2,97$, 95% διάστημα εμπιστοσύνης = 1.89 έως 4.67, $p < 0,001$, $R^2 = 66\%$). Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια έπειτα και από την ανάλυση ευαισθησίας (συντελεστής $b = 1,57$, 95% διάστημα εμπιστοσύνης = 1,41 έως 1,76, $p < 0,001$, $R^2 = 79\%$).



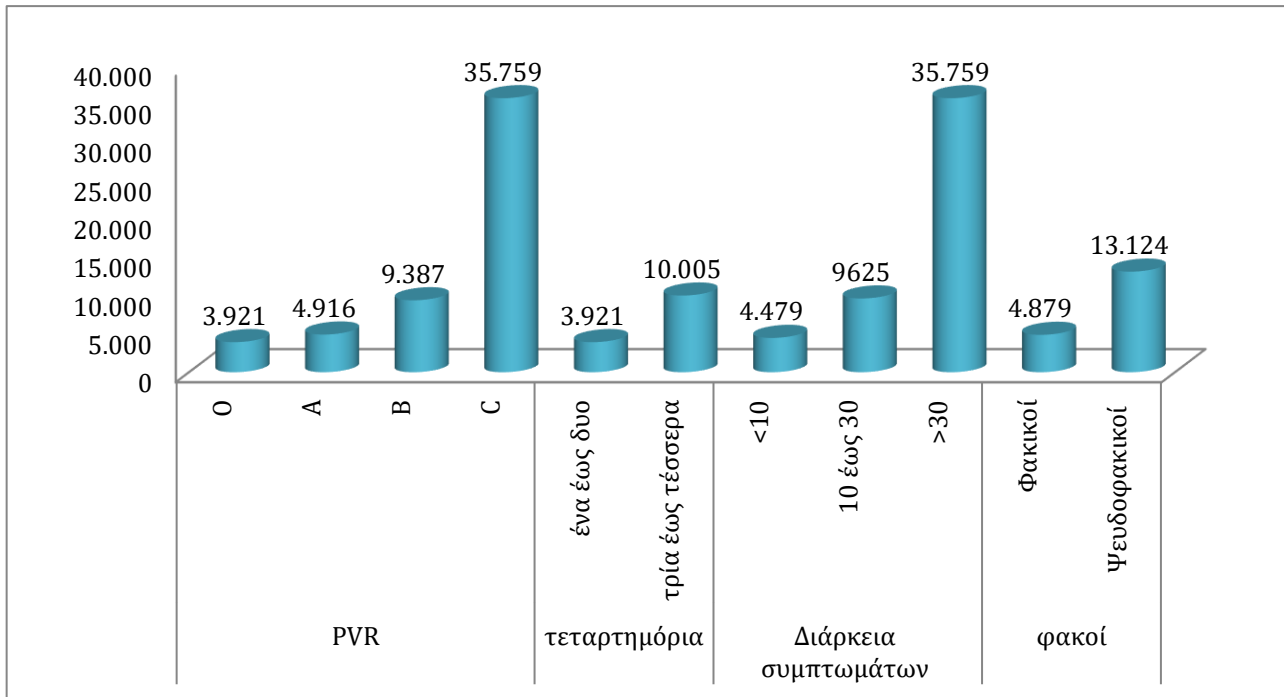
Γράφημα 1. Διάγραμμα πλαισίου της LCN2 για τους ασθενείς με ΡΑΑ και την ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 3. Η LCN2 στους ασθενείς με PAA και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες κλινικών χαρακτηριστικών.

	LCN2							Τιμή p	Τιμή p (ανάλυση ευαισθησίας)
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	N		
Ομάδα ελέγχου	2.975	1.634	3.289	200	4.803	3.090	10	<0,001^α	0,001^α
Ασθενείς με ΠΥΑ (σύνολο)	23.481	52.926	7.095	2.311	259.625	9.605	24		
Επιμέρους κατηγορίες των ασθενών									
Κατάσταση φακού								0,007^α	0,082 ^α
Έμφακοι	5.824	2.720	4.879	2.311	10.527	4.550	12		
Ψευδοφακικοί	41.137	71.899	13.124	2.520	259.625	40.014	12		
PVR σταδιοποίηση								<0,001^β	<0,001^β
Απουσία PVR	3.779	1.209	3.921	2.311	5.561	2.132	7		
PVR A	5.084	358	4.916	4.541	5.495	Μη υπολογίσιμο	3		
PVR B	8.609	1.879	9.387	6.055	10.763	3.721	7		
PVR C	65.938	88.032	35.759	10.527	259.625	55.346	7		
Τεταρτημόρια Προσβολής								<0,001^α	<0,001^α
1-2	3.779	1.209	3.921	2.311	5.561	2.132	7		
3-4	31.593	61.534	10.005	4841	259.625	21.316	17		
Διάρκεια συμπτωμάτων (ημέρες)								<0,001^β	<0,001^β
<10	4.023	1.155	4.479	2.311	5.561	2.113	9		
10-30	15.580	19.802	9625	5495	70.883	6.649	10		
>30	74.304	104.81	35.759	10.527	259.625	141.867	5		

^α έλεγχος των Mann-Whitney

^β συντελεστής συσχέτισης Spearman



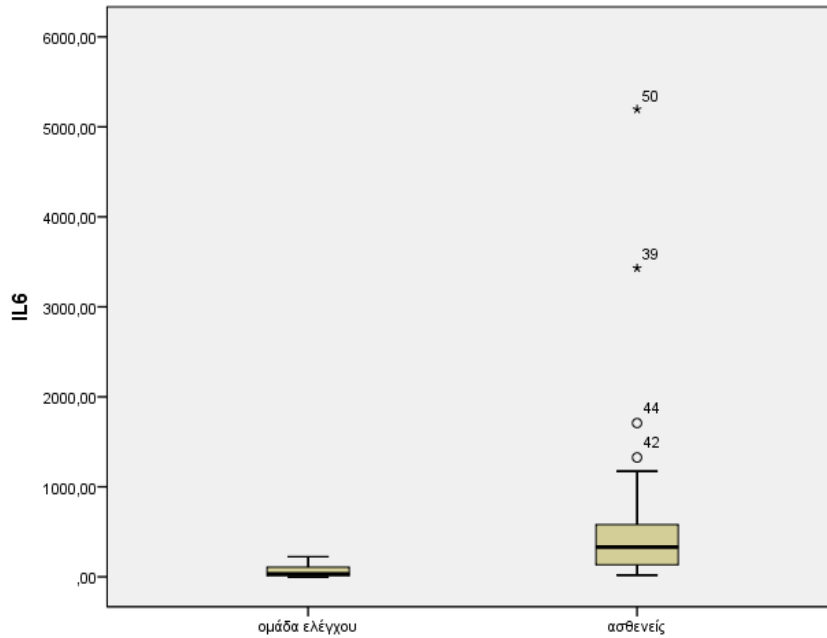
Γράφημα 2. Η LCN2 στους ασθενείς με PAA βάση διαφόρων κλινικών χαρακτηριστικών.

Ιντερλευκίνη 6 (IL6)

Η IL6 στους ασθενείς με PAA και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες βάση κλινικών χαρακτηριστικών παρουσιάζεται στον πίνακα 4. Η ανάλυση ευαισθησίας αφορά την αφαίρεση ορισμένων ακραίων τιμών από την ανάλυση και ενισχύει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, καθώς δεν μεταβλήθηκαν μετά από την αφαίρεση των ακραίων τιμών από την ανάλυση. Η διάμεση IL6 ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς με PAA (329,8 pg/ml) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (35,6 pg/ml), ($p < 0,001$), (γράφημα 3).

Στη συνέχεια η ανάλυση αφορούσε μόνο στους ασθενείς με PAA και βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ IL6 και βαθμού PVR ($r_s = 0,5$, $p = 0,01$). Η διάμεση IL6 στην ομάδα PVR C ήταν 509 pg/ml, στην ομάδα PVR B ήταν 276 pg/ml, στην ομάδα PVR A ήταν 502 pg/ml και στην ομάδα χωρίς PVR ήταν 59 pg/ml. Οι ασθενείς με προσβολή 3-4 τεταρτημορίων, είχαν μεγαλύτερη διάμεση IL6 (484 pg/ml), σε σχέση με τους ασθενείς με 1-2 τεταρτημόρια (59 pg/ml) ($p < 0,001$). Βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ IL6 και διάρκειας των συμπτωμάτων ($r_s = 0,47$, $p = 0,04$). Η διάμεση IL6 στους ασθενείς με συμπτώματα για >30 ημέρες ήταν 509 pg/ml, στους ασθενείς με συμπτώματα 10 έως 30 ημέρες ήταν 434 pg/ml και

στους ασθενείς με συμπτώματα <10 ημέρες ήταν 105 pg/ml. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε πολυμεταβλητή γραμμική παλινδρόμηση στην οποία δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική σχέση.



Γράφημα 3. Διάγραμμα πλαισίου της IL6 για τους ασθενείς με ΡΑΑ και την ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 4. Η IL6 στους ασθενείς με ΡΑΑ, στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες βάση κλινικών χαρακτηριστικών.

	IL6							Τιμή p	Τιμή p (ανάλυση ευαισθησίας)
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	N		
Ομάδα ελέγχου	64,1	70,9	35,6	1,3	224,1	97,4	10	<0,001^α	<0,001^α
Ασθενείς με ΠΥΑ (σύνολο)	748,1	1205,7	329,8	18,4	5194,8	498	24		
Επιμέρους κατηγορίες των ασθενών									
Κατάσταση φακού								0,06 ^α	0,1 ^α
Έμφρακτοι	486	944	205	18,4	3429	416	12		
Ψευδοφακικοί	1010	1413	493	59	5194	1053	12		
PVR σταδιοποίηση								0,01^β	0,01^β
Απουσία PVR	167	200	59	18,4	497	382	7		
PVR A	1367	1791	502	179	3429	Μη υπολογίσιμο	3		
PVR B	608	636	276	99	1708	1095	7		
PVR C	1203	1790	509	164	5194	927	7		
Τεταρτημόρια Προσβολής								0,008^α	0,03^α
1-2	167	200	59	18,4	497	382	7		
3-4	988	1366	484	99	5194	1018	17		
Διάρκεια συμπτωμάτων (ημέρες)								0,04^β	0,02^β
<10	531	1100	105	18,4	3429	416	9		
10-30	642	554	434	99	1708	980	10		
>30	1353	2156	509	164	5194	2719	5		

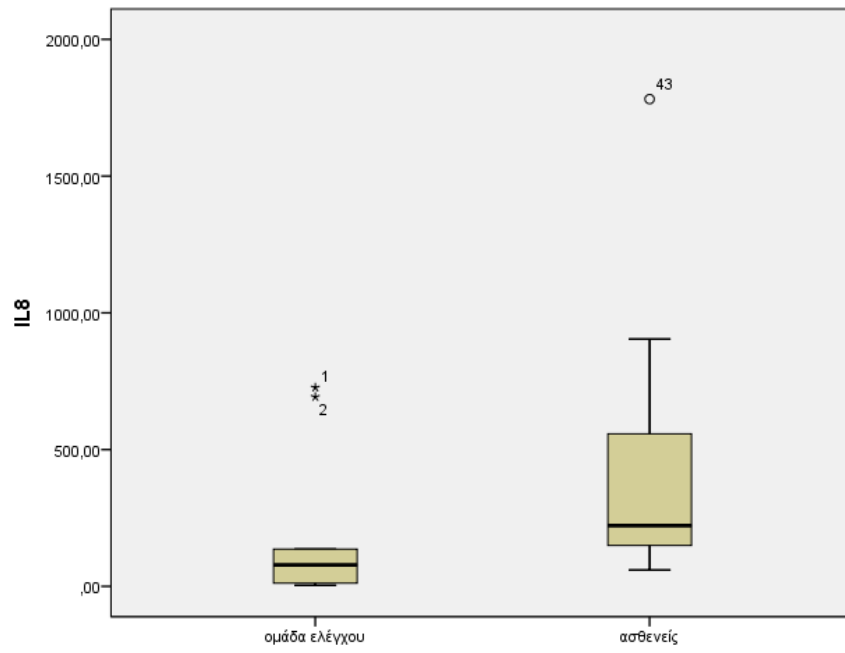
^α έλεγχος των Mann-Whitney

^β συντελεστής συσχέτισης Spearman

Ιντερλευκίνη 8 (IL8)

Η IL8 στους ασθενείς με PAA και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες βάση κλινικών χαρακτηριστικών παρουσιάζεται στον πίνακα 5. Η ανάλυση ευαισθησίας αφορά την αφαίρεση ορισμένων ακραίων τιμών από την ανάλυση και ενισχύει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, καθώς δεν μεταβλήθηκαν μετά από την αφαίρεση των ακραίων τιμών από την ανάλυση. Η διάμεση IL8 ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς (222 pg/ml) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (78 pg/ml), ($p=0,005$), (γράφημα 4).

Στη συνέχεια η ανάλυση αφορούσε μόνο στους ασθενείς με PAA και βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ IL8 βαθμού PVR ($r_s=0,6$, $p=0,003$). Η διάμεση IL8 στην ομάδα PVR C ήταν 448 pg/ml, στην ομάδα PVR B ήταν 278 pg/ml, στην ομάδα PVR A ήταν 208 pg/ml και στην ομάδα χωρίς PVR ήταν 114 pg/ml. Οι ασθενείς με 3-4 τεταρτημόρια προσβολής, είχαν μεγαλύτερη διάμεση IL8 (224 pg/ml), σε σχέση με τους ασθενείς με 1-2 τεταρτημόρια (114 pg/ml) ($p=0,007$). Βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ IL8 και διάρκειας των συμπτωμάτων ($r_s=0,6$, $p=0,005$). Η διάμεση IL8 στους ασθενείς με συμπτώματα για >30 ημέρες ήταν 227 pg/ml, στους ασθενείς με συμπτώματα 10 έως 30 ημέρες ήταν 292 pg/ml και στους ασθενείς με συμπτώματα <10 ημέρες ήταν 129 pg/ml. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε πολυμεταβλητή γραμμική παλινδρόμηση στην οποία δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική σχέση.



Γράφημα 4. Διάγραμμα πλαισίου της IL8 για τους ασθενείς με ΡΑΑ και την ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 5. Η IL8 στους ασθενείς με ΡΑΑ και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες βάση κλινικών χαρακτηριστικών.

	IL8							Τιμή p	Τιμή p (ανάλυση ευαισθησίας)
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	N		
Ομάδα ελέγχου	190	278	78	3,9	727	266	10	0,005^α	<0,001^α
Ασθενείς με ΠΥΑ (σύνολο)	380	390	222	60	1781	467	24		
Επιμέρους κατηγορίες των ασθενών									
Κατάσταση φακού								0,1 ^α	0,1 ^α
Έμφακοι	352	483	180	81,4	1782	169	12		
Ψευδοφακικοί	407	289	252	60	905	510	12		
PVR σταδιοποίηση								0,003^β	0,002^β
Απουσία PVR	204	241	114	60	743	104	7		
PVR A	203	27	208	174	227	Μη υπολογίσιμο	3		
PVR B	524	596	278	142	1782	624	7		
PVR C	487	285	448	204	905	507	7		
Τεταρτημόρια Προσβολής								0,007^α	0,009^α
1-2	204	241	114	60	743	103	7		
3-4	452	422	227	142	1782	495	17		
Διάρκεια συμπτωμάτων (ημέρες)								0,005^β	0,005^β
<10	201	209	129	60	682	99	9		
10-30	501	499	292	142	1781	494	10		
>30	459	334	227	203	905	604	5		

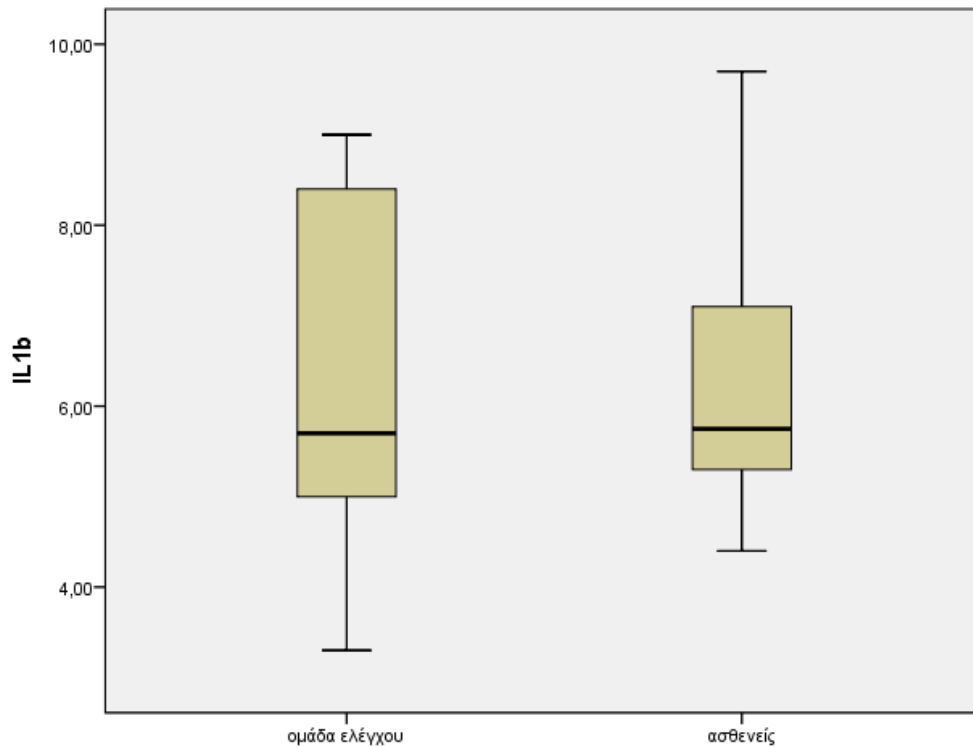
^α έλεγχος των Mann-Whitney

^β συντελεστής συσχέτισης Spearman

Ιντερλευκίνη 1β (IL1β)

Η IL1β στους ασθενείς με PAA και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες βάση κλινικών χαρακτηριστικών πίνακα 6. Η ανάλυση ευαισθησίας δεν πραγματοποιήθηκε, καθώς δεν υπήρχαν ακραίες τιμές. Η διάμεση IL1β στους ασθενείς (5,8 pg/ml) δεν διέφερε σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (5,7 pg/ml), ($p=0,8$), (γράφημα 5).

Στη συνέχεια η ανάλυση αφορούσε μόνο στους ασθενείς με PAA και δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ IL1β και κατάστασης φακού, βαθμού PVR, τεταρτημορίων προσβολής καθώς και διάρκειας των συμπτωμάτων.



Γράφημα 5. Διάγραμμα πλαισίου της IL1β για τους ασθενείς με PAA και την ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 6. Η IL1β στους ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες των ασθενών.

	IL1β							Τιμή
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	N	p
Ομάδα ελέγχου	6,1	1,2	5,7	3,3	9	3,8	10	0,8 ^α
Ασθενείς με ΠΥΑ (σύνολο)	6,1	1,2	5,8	4,4	9,7	1,9	24	
Επιμέρους κατηγορίες των ασθενών								
Κατάσταση φακού								0,9 ^α
Έμφακοι	6,1	1	5,9	4,8	8,1	1,9	12	
Ψευδοφακικοί	6,2	1,5	5,8	4,4	9,7	1,9	12	
PVR σταδιοποίηση								0,4 ^β
Απουσία PVR	5,9	1,0	5,4	5,3	8,1	0,8	7	
PVR A	5,3	0,6	5	4,8	6	Μη υπολογίσιμο	3	
PVR B	6,8	1,5	,7	5	9,7	1,5	7	
PVR C	6,2	1,2	5,8	4,4	7,8	2,2	7	
Τεταρτημόρια Προσβολής								0,6 ^α
1-2	5,9	1	5,4	5,3	8,1	0,8	7	
3-4	6,2	1,3	6	4,4	9,7	2,2	17	
Διάρκεια συμπτωμάτων (ημέρες)								0,3 ^β
<10	5,8	1	5,4	4,8	8,1	0,8	9	
10-30	6,2	1,5	5,9	4,4	9,7	1,9	10	
>30	6,6	1,2	7,2	5	7,8	2,2	5	

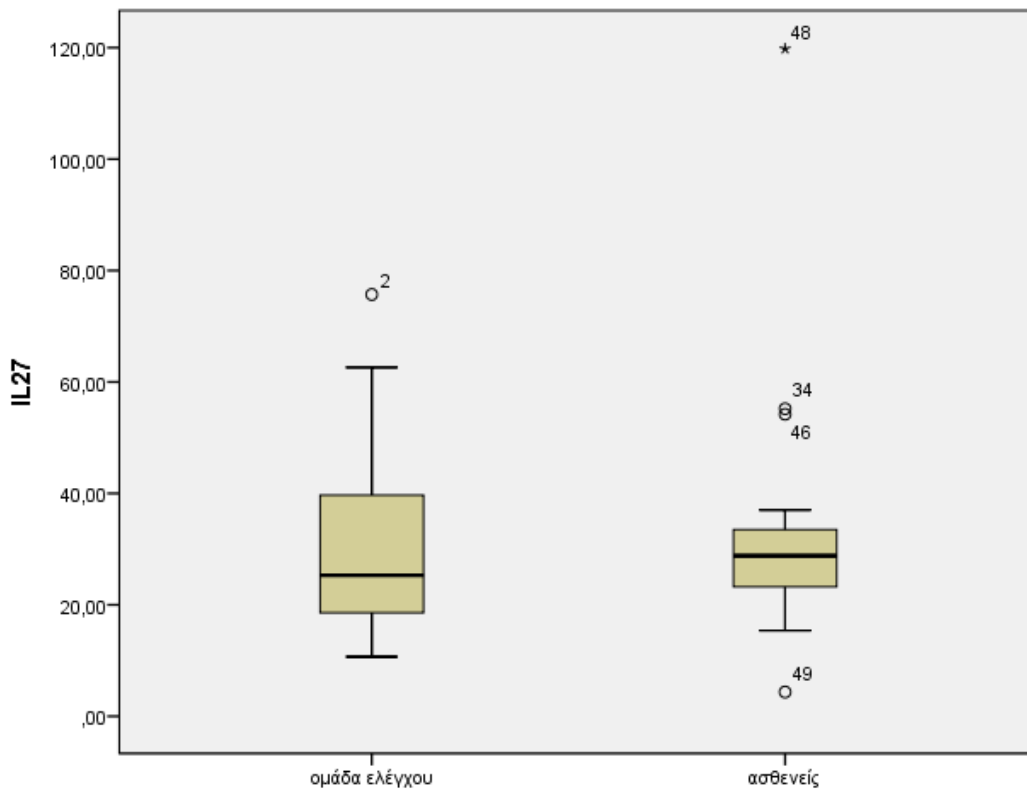
^α έλεγχος των Mann-Whitney

^β συντελεστής συσχέτισης Spearman

Ιντερλευκίνη 27 (IL27)

Η IL27 στους ασθενείς με PAA και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες βάση κλινικών χαρακτηριστικών, παρουσιάζεται στον πίνακα 7. Η ανάλυση ευαισθησίας αφορά την αφαίρεση ορισμένων ακραίων τιμών από την ανάλυση και ενισχύει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, καθώς δεν μεταβλήθηκαν μετά από την αφαίρεση των ακραίων τιμών από την ανάλυση. Η διάμεση IL27 στους ασθενείς με PAA (28,8 pg/ml) δεν διέφερε σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (25,3 pg/ml), ($p=0,6$), (γράφημα 6).

Στη συνέχεια η ανάλυση αφορούσε μόνο στους ασθενείς με PAA και δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ IL27 και κατάστασης φακού, βαθμού PVR, τεταρτημορίων προσβολής και διάρκειας των συμπτωμάτων.



Γράφημα 6. Διάγραμμα πλαισίου της IL27 για τους ασθενείς με PAA και την ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 7. Η IL27 στους ασθενείς με ΡΑΑ και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες βάση κλινικών χαρακτηριστικών.

	IL27							Τιμή p	Τιμή p (ανάλυση ευαισθησίας)
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	N		
Ομάδα ελέγχου	32,6	21,1	25,3	10,7	75,7	27	10	0,8 ^α	0,4 ^α
Ασθενείς με ΠΥΑ (σύνολο)	32,5	21,5	28,8	4,4	119,8	10,8	24		
Επιμέρους κατηγορίες των ασθενών									
Κατάσταση φακού								0,6 ^α	0,9 ^α
Έμφακοι	29,1	9,9	28	15	54	11	12		
Ψευδοφακικοί	35,8	29	29	4,4	120	13	12		
PVR σταδιοποίηση								0,8 ^β	0,5 ^β
Απουσία PVR	25,9	7,4	24	15,4	35	15	7		
PVR A	26,3	3,5	26	23	30	Μη υπολογίσιμο	3		
PVR B	33	10,7	32,3	23,4	54,2	13,2	7		
PVR C	41,3	37,8	30,8	4,4	120	35,6	7		
Τεταρτημόρια Προσβολής								0,3 ^α	0,5 ^α
1-2	25,9	7,4	24	15,4	35	15	7		
3-4	35,1	24,8	30	4,4	120	11,1	17		
Διάρκεια συμπτωμάτων (ημέρες)								0,4 ^β	0,5 ^β
<10	25,6	6,5	23,6	15,4	35	10,6	9		
10-30	34,5	11,4	32	23,4	55,2	16	10		
>30	40,7	45,5	28	4,4	120	64	5		

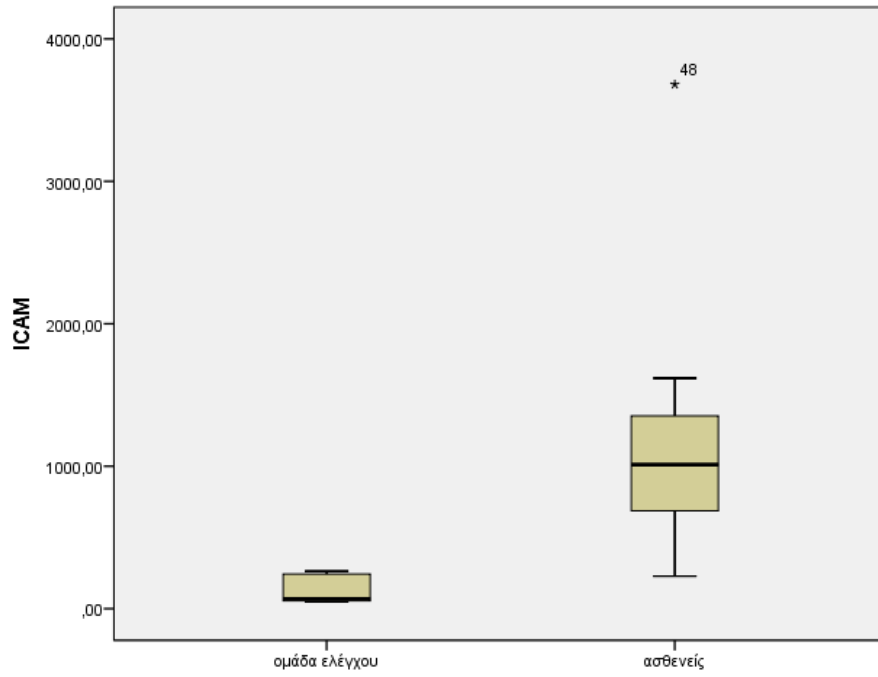
^α έλεγχος των Mann-Whitney

^β συντελεστής συσχέτισης Spearman

Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης κυττάρων (ICAM)

Το ICAM στους ασθενείς με PAA και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες βάση κλινικών χαρακτηριστικών παρουσιάζεται στον πίνακα 8. Η ανάλυση ευαισθησίας αφορά την αφαίρεση ορισμένων ακραίων τιμών από την ανάλυση και ενισχύει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, καθώς δεν μεταβλήθηκαν μετά από την αφαίρεση των ακραίων τιμών από την ανάλυση. Η διάμεση ICAM ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς (1011 pg/ml) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (70 pg/ml), ($p < 0,001$), (γράφημα 7).

Στη συνέχεια η ανάλυση αφορούσε μόνο στους ασθενείς με PAA και βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ ICAM και βαθμού PVR ($r_s = 0,4$, $p = 0,04$). Η διάμεση ICAM στην ομάδα PVR C ήταν 1293 pg/ml, στην ομάδα PVR B ήταν 1208 pg/ml, στην ομάδα PVR A ήταν 865 pg/ml και στην ομάδα χωρίς PVR ήταν 757 pg/ml. Βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ ICAM και διάρκειας των συμπτωμάτων ($r_s = 0,6$, $p = 0,004$). Η διάμεση ICAM στους ασθενείς με συμπτώματα για >30 ημέρες ήταν 1414 pg/ml, στους ασθενείς με συμπτώματα 10 έως 30 ημέρες ήταν 1096 pg/ml και στους ασθενείς με συμπτώματα <10 ημέρες ήταν 758 pg/ml. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε πολυμεταβλητή γραμμική παλινδρόμηση στην οποία βρέθηκε ότι μόνο η διάρκεια των συμπτωμάτων σχετίζονταν ανεξάρτητα με το ICAM στους ασθενείς με PAA. Πιο συγκεκριμένα, αυξημένη διάρκεια των συμπτωμάτων σχετίζονταν με αυξημένο ICAM (συντελεστής $b = 501$, 95% διάστημα εμπιστοσύνης = 178 έως 825, $p < 0,001$, $R^2 = 29\%$). Τα αποτελέσματα ήταν ίδια έπειτα και από την ανάλυση ευαισθησίας.



Γράφημα 7. Διάγραμμα πλαισίου της ICAM για τους ασθενείς με ΡΑΑ και την ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 8. Το ICAM στους ασθενείς με ΡΑΑ και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες των ασθενών.

	ICAM							Τιμή p	Τιμή p (ανάλυση ευαισθησίας)
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	N		
Ομάδα ελέγχου	134	97	70	50	264	191	10	<0,001 ^α	<0,001 ^α
Ασθενείς με ΠΥΑ (σύνολο)	1098	675	1011	228	3680	698	24		
Επιμέρους κατηγορίες των ασθενών									
Κατάσταση φακού								0,2 ^α	0,2 ^α
Έμφακοι	889	431	816	228	1617	702	12		
Ψευδοφακικοί	1308	820	1208	655	3680	807	12		
PVR σταδιοποίηση								0,04^β	0,04^β
Απουσία PVR	766	458	757	228	1617	621	7		
PVR A	980	519	865	528	1547	Μη υπολογίσιμο	3		
PVR B	1047	349	1208	655	1570	556	7		
PVR C	1532	983	1293	691	3680	472	7		
Τεταρτημόρια Προσβολής								0,09 ^α	0,09 ^α
1-2	766	458	758	228	1617	621	7		
3-4	1235	713	1208	528	3680	709	17		
Διάρκεια συμπτωμάτων (ημέρες)								0,004^β	0,004^β
<10	751	407	758	228	1617	479	9		
10-30	1056	351	1096	655	1570	628	10		
>30	1811	1049	1414	1208	3680	1318	5		

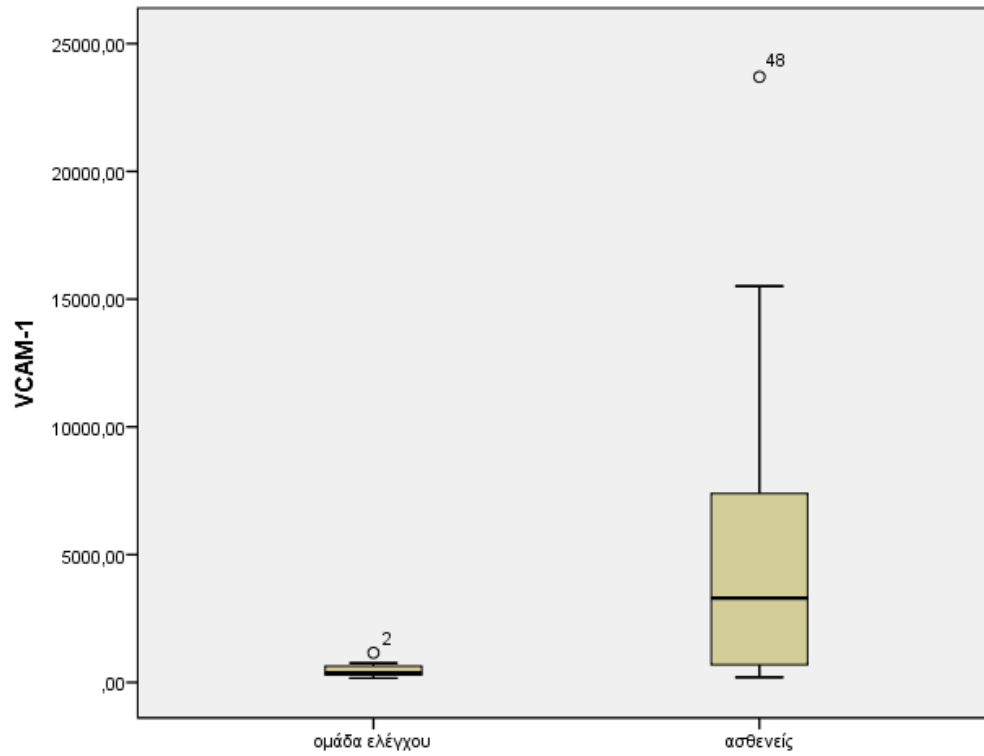
^α έλεγχος των Mann-Whitney

^β συντελεστής συσχέτισης Spearman

Το μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων (VCAM-1)

Το VCAM-1 στους ασθενείς με ΡΑΑ και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες βάση κλινικών χαρακτηριστικών παρουσιάζεται στον πίνακα 9. Η ανάλυση ευαισθησίας αφορά την αφαίρεση ορισμένων ακραίων τιμών από την ανάλυση και ενισχύει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, καθώς δεν μεταβλήθηκαν μετά από την αφαίρεση των ακραίων τιμών από την ανάλυση. Η διάμεση VCAM-1 ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς με ΡΑΑ (3299 pg/ml) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (359 pg/ml), ($p=0,002$), (γράφημα 8).

Στη συνέχεια η ανάλυση αφορούσε μόνο στους ασθενείς με ΡΑΑ και βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ VCAM-1 και βαθμού PVR ($r_s=0,8$, $p<0,001$). Η διάμεση VCAM-1 στην ομάδα PVR C ήταν 8539 pg/ml, στην ομάδα PVR B ήταν 3299 pg/ml, στην ομάδα PVR A ήταν 1124 pg/ml και στην ομάδα χωρίς PVR ήταν 345 pg/ml. Βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ VCAM-1 και διάρκειας των συμπτωμάτων ($r_s=0,8$, $p<0,001$). Η διάμεση VCAM-1 στους ασθενείς με συμπτώματα για >30 ημέρες ήταν 8539 pg/ml, στους ασθενείς με συμπτώματα 10 έως 30 ημέρες ήταν 5714 pg/ml και στους ασθενείς με συμπτώματα <10 ημέρες ήταν 496 pg/ml. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε πολυμεταβλητή γραμμική παλινδρόμηση στην οποία βρέθηκε ότι μόνο ο βαθμός PVR σχετίζονταν ανεξάρτητα με το VCAM-1 στους ασθενείς με ΡΑΑ. Πιο συγκεκριμένα, αυξημένος βαθμός PVR σχετίζονταν με αυξημένα επίπεδα VCAM-1 (συντελεστής $b=297$, 95% διάστημα εμπιστοσύνης = 1403 έως 4530, $p=0,001$, $R^2=39\%$). Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια έπειτα και από την ανάλυση ευαισθησίας (συντελεστής $b=2291$, 95% διάστημα εμπιστοσύνης = 1183 έως 3399, $p<0,001$, $R^2=44\%$).



Γράφημα 8. Διάγραμμα πλαισίου του VCAM-1 για τους ασθενείς με ΡΑΑ και την ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 9. Το VCAM-1 στους ασθενείς με ΡΑΑ και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες βάση κλινικών χαρακτηριστικών.

	VCAM-1							Τιμή p	Τιμή p (ανάλυση ευαισθησίας)
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	N		
Ομάδα ελέγχου	497	300	359	170	1159	377	10	0,002^α	0,002^α
Ασθενείς με ΠΥΑ (σύνολο)	4992	5598	3299	204	23700	7094	24		
Επιμέρους κατηγορίες των ασθενών									
Κατάσταση φακού								<0,001^α	<0,001^α
Έμφρακτοι	1238	1157	692	204	3299	2126	12		
Ψευδοφακικοί	8747	5782	7391	3299	23700	4965	12		
PVR σταδιοποίηση								<0,001^β	<0,001^β
Απουσία PVR	809	1159	345	203	3417	371	7		
PVR A	3411	4292	1124	746	8362	Μη υπολογίσιμο	3		
PVR B	4557	2015	3299	2686	8127	2827	7		
PVR C	10288	7348	8539	187	23700	10355	7		
Τεταρτημόρια Προσβολής								0,001^α	0,001^α
1-2	809	1159	345	203	3417	371	7		
3-4	6715	5809	5537	747	23700	5575	17		
Διάρκεια συμπτωμάτων (ημέρες)								<0,001^β	<0,001^β
<10	837	1010	496	203	3417	653	9		
10-30	6243	3870	5714	2686	15510	12823	10		
>30	9971	8411	8539	1687	23700	13816	5		

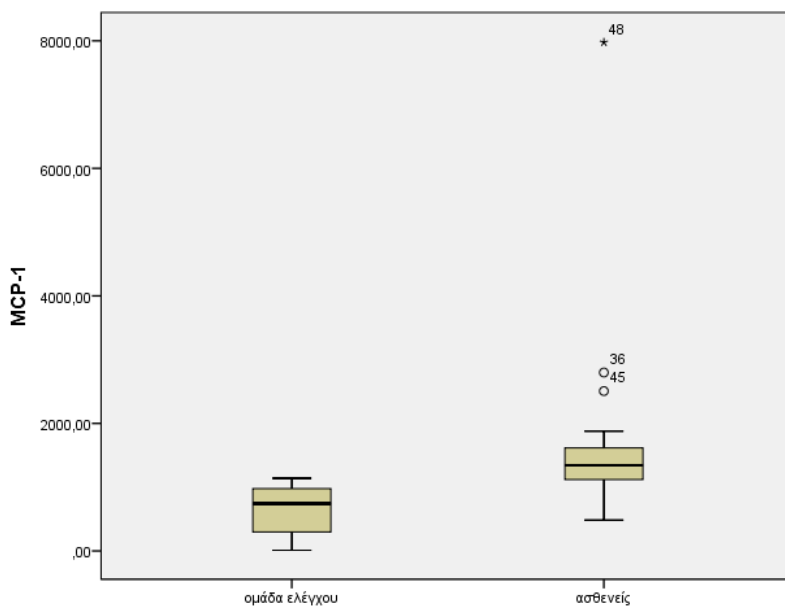
^α έλεγχος των Mann-Whitney

^β συντελεστής συσχέτισης Spearman

Η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων (MCP-1)

Η MCP-1 στους ασθενείς με PAA και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες βάση κλινικών χαρακτηριστικών παρουσιάζεται στον πίνακα 10. Η ανάλυση ευαισθησίας αφορά την αφαίρεση ορισμένων ακραίων τιμών από την ανάλυση και ενισχύει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, καθώς δεν μεταβλήθηκαν μετά από την αφαίρεση των ακραίων τιμών από την ανάλυση. Η διάμεση MCP-1 ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς (1342 pg/ml) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (743 pg/ml), ($p < 0,001$), (γράφημα 9).

Στη συνέχεια η ανάλυση αφορούσε μόνο στους ασθενείς και βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ MCP-1 και βαθμού PVR ($r_s = 0,5$, $p = 0,03$). Η διάμεση MCP-1 στην ομάδα PVR C ήταν 1474 pg/ml, στην ομάδα PVR B ήταν 1336 pg/ml, στην ομάδα PVR A ήταν 1681 pg/ml και στην ομάδα χωρίς PVR ήταν 1003 pg/ml. Βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ MCP-1 και διάρκειας των συμπτωμάτων ($r_s = 0,5$, $p = 0,03$). Η διάμεση MCP-1 στους ασθενείς με συμπτώματα για >30 ημέρες ήταν 1475 pg/ml, στους ασθενείς με συμπτώματα 10 έως 30 ημέρες ήταν 1336 pg/ml και στους ασθενείς με συμπτώματα <10 ημέρες ήταν 1232 pg/ml. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε πολυμεταβλητή γραμμική παλινδρόμηση στην οποία δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική σχέση.



Γράφημα 9. Διάγραμμα πλαισίου της MCP-1 για τους ασθενείς με PAA και την ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 10. Η MCP-1 στους ασθενείς με PAA και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες βάση κλινικών χαρακτηριστικών.

	MCP-1							Τιμή p	Τιμή p (ανάλυση ευαισθησίας)
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	N		
Ομάδα ελέγχου	634	409	743	11	1139	741	10	<0,001 ^α	<0,001 ^α
Ασθενείς με ΠΥΑ (σύνολο)	1659	1438	1342	484	7977	562	24		
Επιμέρους κατηγορίες των ασθενών									
Κατάσταση φακού								0,2 ^α	0,1 ^α
Έμφακοι	1355	676	1327	484	2797	512	12		
Ψευδοφακικοί	1962	1914	1445	1003	7977	585	12		
PVR σταδιοποίηση								0,03 ^β	0,03 ^β
Απουσία PVR	1026	350	1003	484	1395	637	7		
PVR A	1807	646	1681	1232	2506	Μη υπολογίσιμο	3		
PVR B	1483	650	1336	862	2798	753	7		
PVR C	2404	2466	1474	1189	7977	529	7		
Τεταρτημόρια Προσβολής								0,02 ^α	0,05 ^α
1-2	1026	350	1003	484	911	637	7		
3-4	1920	1637	1417	863	7978	630	17		
Διάρκεια συμπτωμάτων (ημέρες)								0,03 ^β	0,01 ^β
<10	1214	575	1232	484	2506	563	9		
10-30	1480	544	1336	863	2798	558	10		
>30	2819	2891	1475	1348	7978	3544	5		

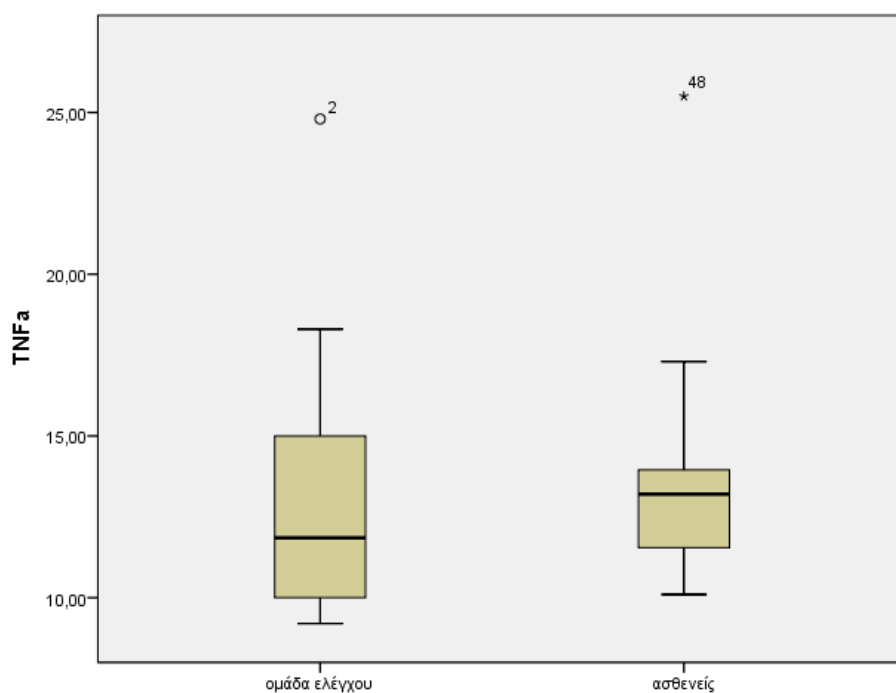
^α έλεγχος των Mann-Whitney

^β συντελεστής συσχέτισης Spearman

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNFα)

Ο TNFα στους ασθενείς με PAA και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες των ασθενών παρουσιάζεται στον πίνακα 11. Η ανάλυση ευαισθησίας αφορά την αφαίρεση ορισμένων ακραίων τιμών από την ανάλυση και ενισχύει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, καθώς δεν μεταβλήθηκαν μετά από την αφαίρεση των ακραίων τιμών από την ανάλυση. Η διάμεση TNFα δεν διέφερε στους ασθενείς με PAA (13,2 pg/ml) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (11,9 pg/ml), ($p=0,5$), (γράφημα 10).

Στη συνέχεια η ανάλυση αφορούσε μόνο στους ασθενείς με PAA και δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική σχέση.



Γράφημα 10. Διάγραμμα πλαισίου της TNFα για τους ασθενείς με PAA και την ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 11. Ο TNFa στους ασθενείς με ΡΑΑ και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες βάση κλινικών χαρακτηριστικών.

	TNFa							Τιμή p	Τιμή p (ανάλυση ευαισθησίας)
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	N		
Ομάδα ελέγχου	13,6	4,9	11,9	9,2	24,8	5,8	10	0,5 ^α	0,5 ^α
Ασθενείς με ΠΥΑ (σύνολο)	13,5	3,2	13,2	10,1	25,5	2,5	24		
Επιμέρους κατηγορίες των ασθενών									
Κατάσταση φακού								0,1 ^α	0,1 ^α
Έμφακοι	13,8	2	13,6	11	17,3	3,6	12		
Ψευδοφακικοί	13,2	4,1	12,2	10,1	25,5	2,7	12		
PVR σταδιοποίηση								0,7 ^β	0,7 ^β
Απουσία PVR	13	1,8	12,3	11	16,4	2,2	7		
PVR A	12	1,6	12,6	10,2	13,1	Μη υπολογίσιμο	3		
PVR B	13,9	1,9	13,9	11	17,3	1	7		
PVR C	14,4	5,3	12,2	10,1	25,5	5,3	7		
Τεταρτημόρια Προσβολής								0,7 ^α	0,7 ^α
1-2	13	1,8	12,3	11	16,4	2,2	7		
3-4	13,8	3,6	13,3	10,1	25,5	2,8	17		
Διάρκεια συμπτωμάτων (ημέρες)								0,7 ^β	0,7 ^β
<10	13	1,6	12,6	11	16,4	1,8	9		
10-30	13,1	2,2	13,5	10,1	17,3	3,3	10		
>30	15,4	6	12,2	11,3	25,5	9,7	5		

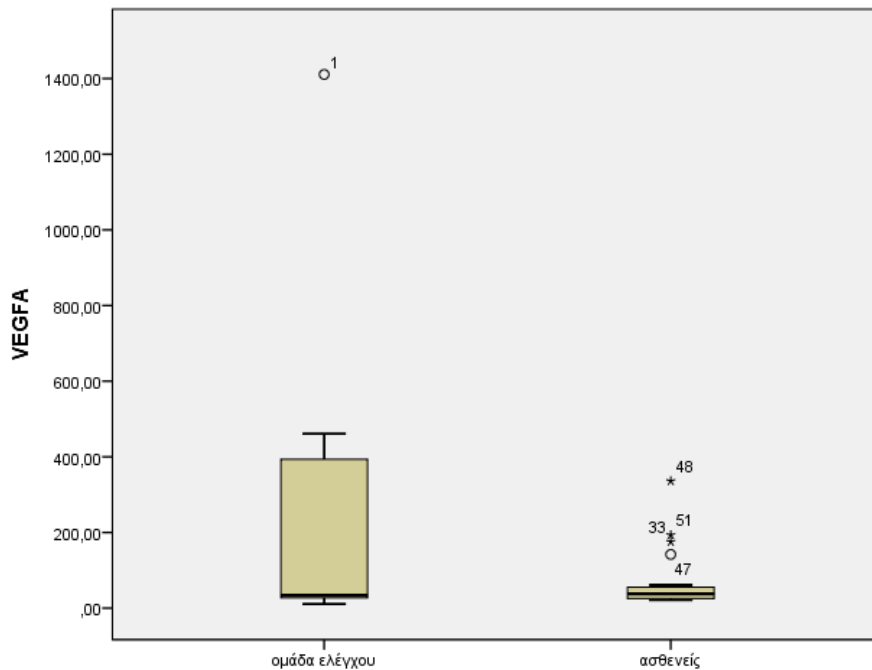
^α έλεγχος των Mann-Whitney

^β συντελεστής συσχέτισης Spearman

Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGFA)

Ο VEGFA στους ασθενείς με PAA και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες βάση κλινικών χαρακτηριστικών παρουσιάζεται στον πίνακα 12. Η ανάλυση ευαισθησίας αφορά την αφαίρεση ορισμένων ακραίων τιμών από την ανάλυση και ενισχύει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, καθώς δεν μεταβλήθηκαν μετά από την αφαίρεση των ακραίων τιμών από την ανάλυση. Η διάμεση VEGFA δεν διέφερε στους ασθενείς με PAA (38 pg/ml) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (34 pg/ml), ($p=0,9$), (γράφημα 11).

Στη συνέχεια η ανάλυση αφορούσε μόνο στους ασθενείς με PAA και δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική σχέση.



Γράφημα 11. Διάγραμμα πλαισίου της VEGFA για τους ασθενείς με PAA και την ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 12. Ο VEGFA στους ασθενείς με PAA και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και σε διάφορες επιμέρους κατηγορίες βάση κλινικών χαρακτηριστικών.

	VEGFA							Τιμή p	Τιμή p (ανάλυση ευαισθησίας)
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	N		
Ομάδα ελέγχου	248	442	34	11	1411	384	10	0,9 ^α	0,9 ^α
Ασθενείς με ΠΥΑ (σύνολο)	66	75	38	20	336	32	24		
Επιμέρους κατηγορίες των ασθενών									
Κατάσταση φακού								0,5 ^α	0,5 ^α
Έμφακοι	61	53	44	21	193	33	12		
Ψευδοφακικοί	71	93	37	20	336	26	12		
PVR σταδιοποίηση								0,7 ^β	0,7 ^β
Απουσία PVR	58	60	37	22	193	28	7		
PVR A	35	20	26	21	58	Μη υπολογίσιμο	3		
PVR B	55	41	49	20	142	37	7		
PVR C	98	118	37	21	336	143	7		
Τεταρτημόρια Προσβολής								0,9 ^α	0,9 ^α
1-2	58	61	37	22	193	28	7		
3-4	69	81	39	20	33	35	17		
Διάρκεια συμπτωμάτων (ημέρες)								0,9 ^β	0,9 ^β
<10	54	54	37	21	193	33	9		
10-30	64	52	50	20	175	56	10		
>30	92	137	35	21	336	160	5		

^α έλεγχος των Mann-Whitney

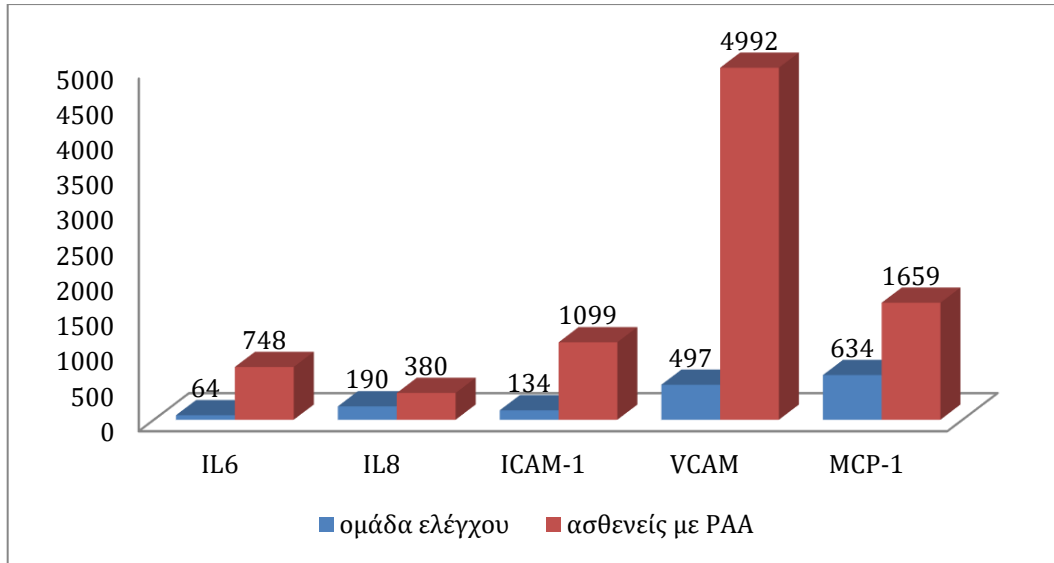
^β συντελεστής συσχέτισης Spearman

Στον πίνακα 13 παρουσιάζονται οι συσχετίσεις ανάμεσα στην LCN2 και τους υπόλοιπους παράγοντες. Η αύξηση της LCN2 σχετίζονταν με αύξηση των IL6, IL8, ICAM, VCAM-1 και MCP-1.

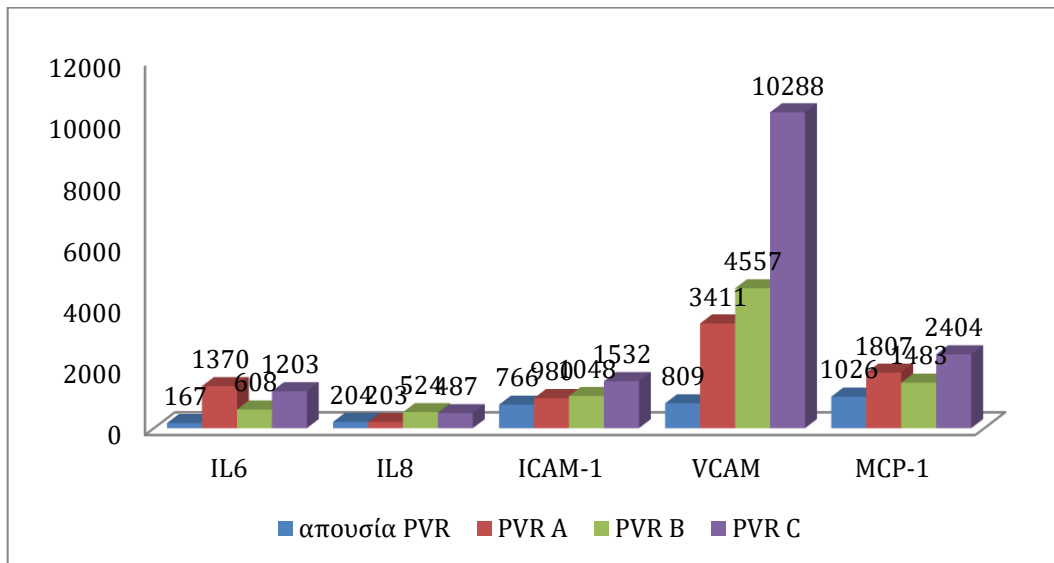
Πίνακας 13. Οι συσχετίσεις ανάμεσα στην LCN2 και τους υπόλοιπους παράγοντες.

	LCN2	
	Συντελεστής συσχέτισης Spearman	Τιμή p
IL6	0,7	<0,001
IL8	0,8	<0,001
IL1b	0,3	0,1
IL27	0,3	0,1
ICAM	0,7	<0,001
VCAM-1	0,8	<0,001
MCP-1	0,7	<0,001
TNFa	0,2	0,2
VEGFA	0,2	0,4

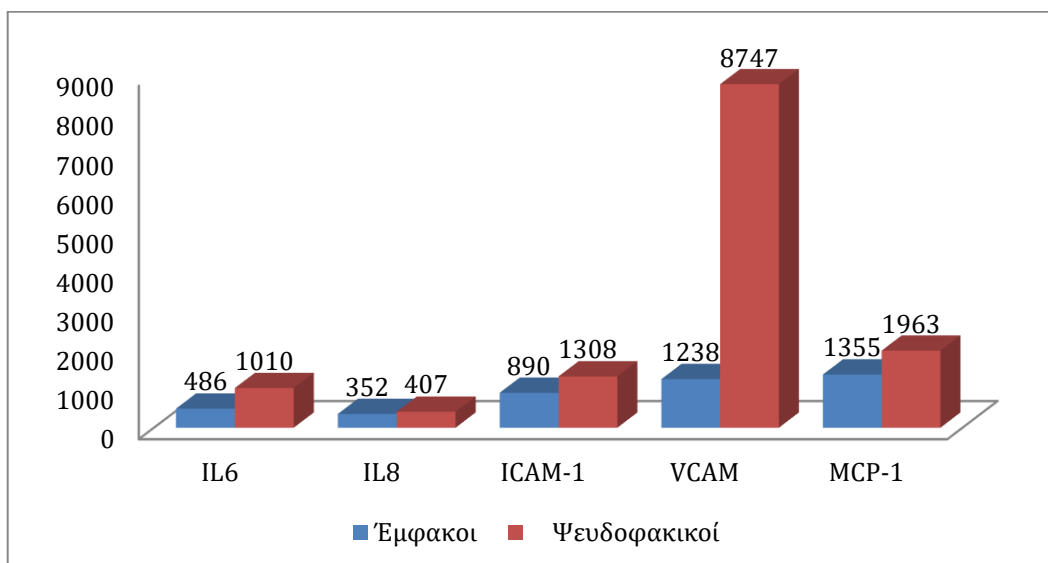
Στο γράφημα 12 παριστάνονται οι συγκεντρώσεις των IL6,IL8,ICAM-1,VCAM και MCP-1 στους ασθενείς με ΡΑΑ και στην ομάδα ελέγχου. Στα γραφήματα 13,14,15 και 16 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των παραγόντων αυτών στις υποομάδες των ασθενών με ΡΑΑ βάση κλινικών χαρακτηριστικών όπως βαθμός ΡVΡ, κατάσταση φακού, διάρκεια συμπτωμάτων και τεταρτημόρια προσβολής αντίστοιχα



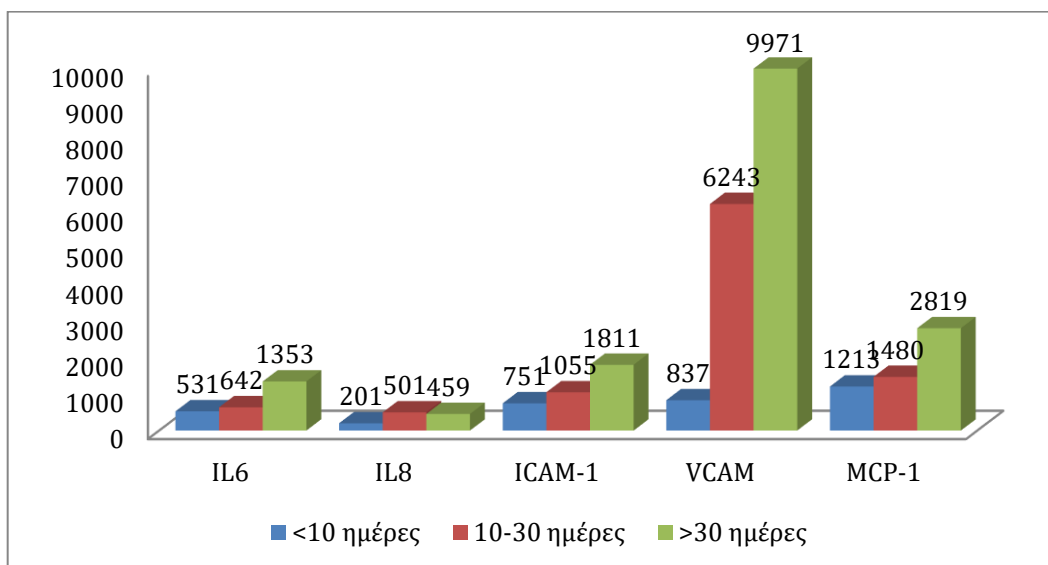
Γράφημα 12. Συγκεντρώσεις των IL6,IL8,ICAM-1,VCAM και MCP-1 στους ασθενείς με ΡΑΑ και στην ομάδα ελέγχου.



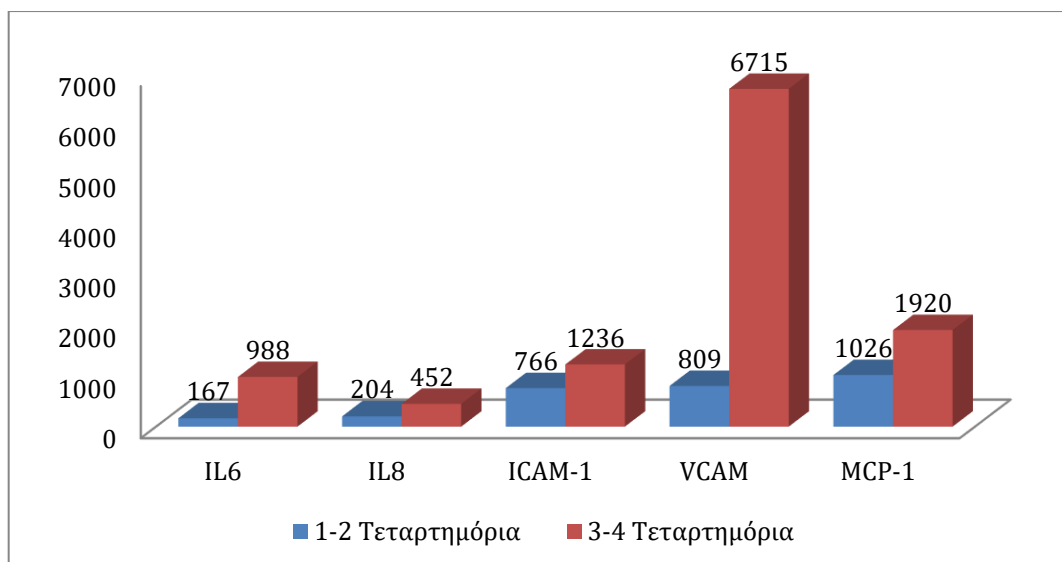
Γράφημα 13. Συγκεντρώσεις των IL6, IL8, ICAM-1,VCAM και MCP-1 στους ασθενείς με ΡΑΑ βάση του βαθμού PVR.



Γράφημα 14. Συγκεντρώσεις των IL6,IL8,ICAM-1,VCAM και MCP-1 στους ασθενείς με ΡΑΑ βάση της κατάστασης του φακού (έμφακοι, ψευδοφακικοί).



Γράφημα 15. Συγκεντρώσεις των IL6, IL8, ICAM-1,VCAM και MCP-1 στους ασθενείς με ΡΑΑ με βάση τη διάρκεια των συμπτωμάτων σε ημέρες.



Γράφημα 16. Συγκεντρώσεις των IL6, IL8, ICAM-1, VCAM και MCP-1 στους ασθενείς με PAA βάσει των τεταρτημορίων προσβολής.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν συσχετίσεις για τους 20 διαβητικούς ασθενείς.

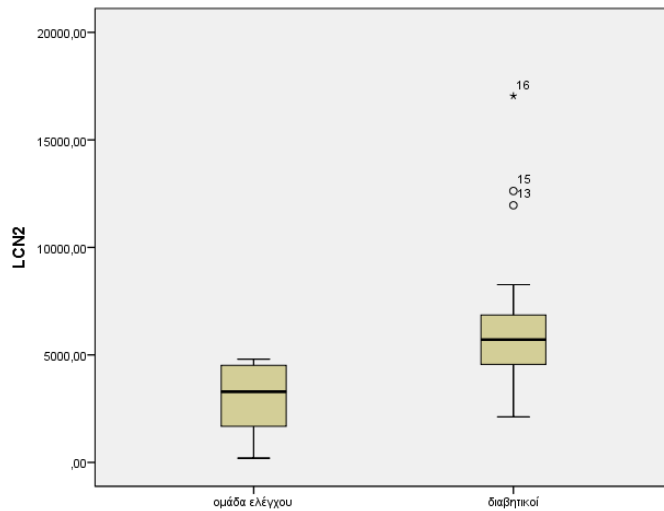
Δημογραφικά

Ο μελετώμενος πληθυσμός περιλάμβανε 20 διαβητικούς ασθενείς (9 με διαβητικό οίδημα DME και 11 με παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια PDR). Ενώ χρησιμοποιήθηκε η ίδια ομάδα ελέγχου των 10 ατόμων. Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την ηλικία ($p=0,6$) και το φύλο ($p=0,3$) μεταξύ ασθενών και της ομάδας ελέγχου. Αναλυτικότερα, η μέση ηλικία των διαβητικών ήταν 67,6 έτη (TA=11,9), ενώ η μέση ηλικία της ομάδας ελέγχου ήταν 69,9 έτη (TA=9,1). Η μικρότερη ηλικία των διαβητικών ήταν 33 έτη και η μεγαλύτερη ήταν 87 έτη, ενώ για την ομάδα ελέγχου ήταν 51 και 84 έτη αντιστοίχως. Επιπλέον, το 55% ($n=11$) των διαβητικών ήταν άνδρες και το 30% ($n=3$) στην ομάδα ελέγχου ήταν άνδρες.

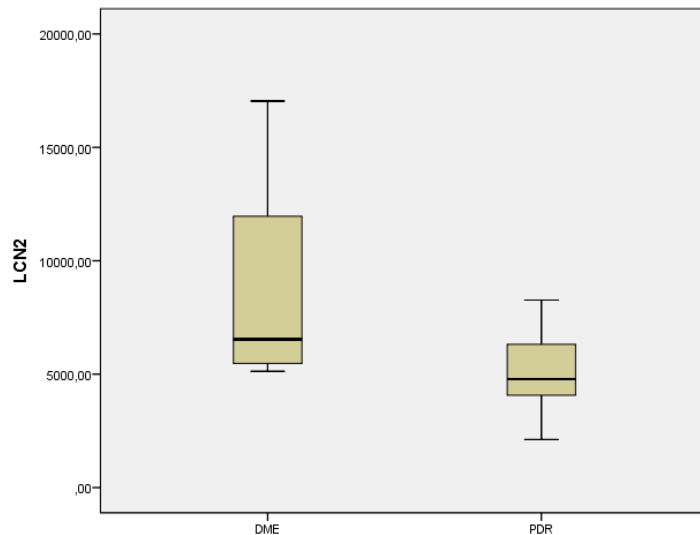
Λιποκαλίνη 2 και υπόλοιπες κυτταροκίνες στους διαβητικούς ασθενείς

Η LCN2 στους διαβητικούς και στην ομάδα ελέγχου παρουσιάζεται στον πίνακα 14. Η ανάλυση ευαισθησίας αφορά την αφαίρεση ορισμένων ακραίων

τιμών από την ανάλυση και ενισχύει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, καθώς δεν μεταβλήθηκαν μετά από την αφαίρεση των ακραίων τιμών από την ανάλυση. Η διάμεση LCN2 ήταν μεγαλύτερη στους διαβητικούς (6654 pg/ml) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (2975 pg/ml), ($p < 0,001$), (γράφημα 17). Η διάμεση LCN2 ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς με διαβητικό οίδημα DME (8582 pg/ml) σε σχέση με τους ασθενείς με παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια PDR (5079 pg/ml), ($p = 0,03$), (γράφημα 18).



Γράφημα 17. Διάγραμμα πλαισίου της LCN2 για τους διαβητικούς και την ομάδα ελέγχου.



Γράφημα 18. Διάγραμμα πλαισίου της LCN2 για τους διαβητικούς με ΔΟΩ (DME) και ΠΔΑ (PDR).

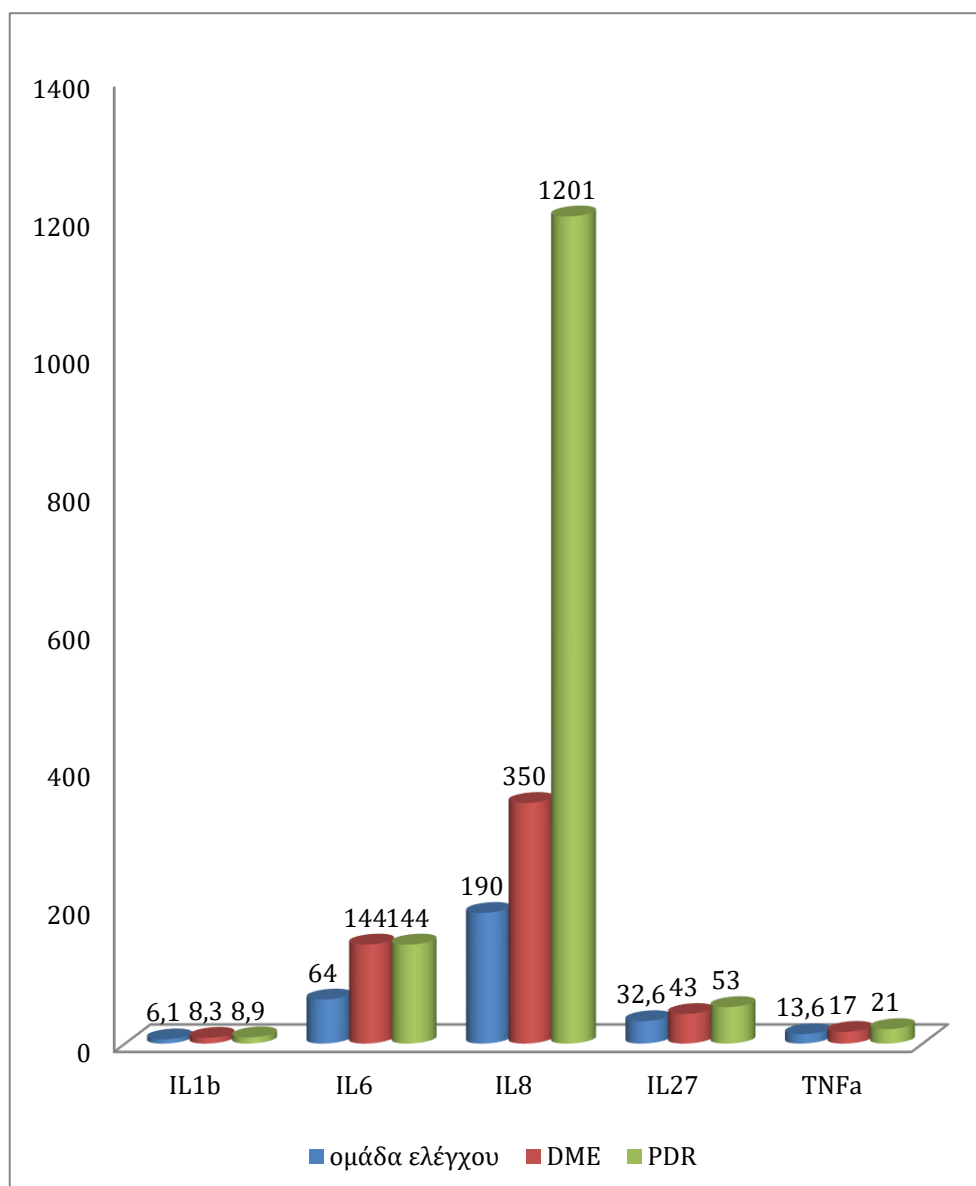
Πίνακας 14. Η LCN2 στους διαβητικούς και στην ομάδα ελέγχου.

	LCN2							Τιμή p	Τιμή p (ανάλυση ευαισθησίας)
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	N		
Ομάδα ελέγχου	2975	1633	3289	200	4803	3090	10	<0,001^α	0,002^α
Διαβητικοί (σύνολο)	6654	3509	5711	2116	17.042	2533	24		
Επιμέρους κατηγορίες των διαβητικών									
ΔΟΩ (DME)	8582	4246	6534	5126	17.042	6850		0,03^α	0,03^α
ΠΔΑ (PDR)	5079	2703	4786	2116	8264	2608	12		

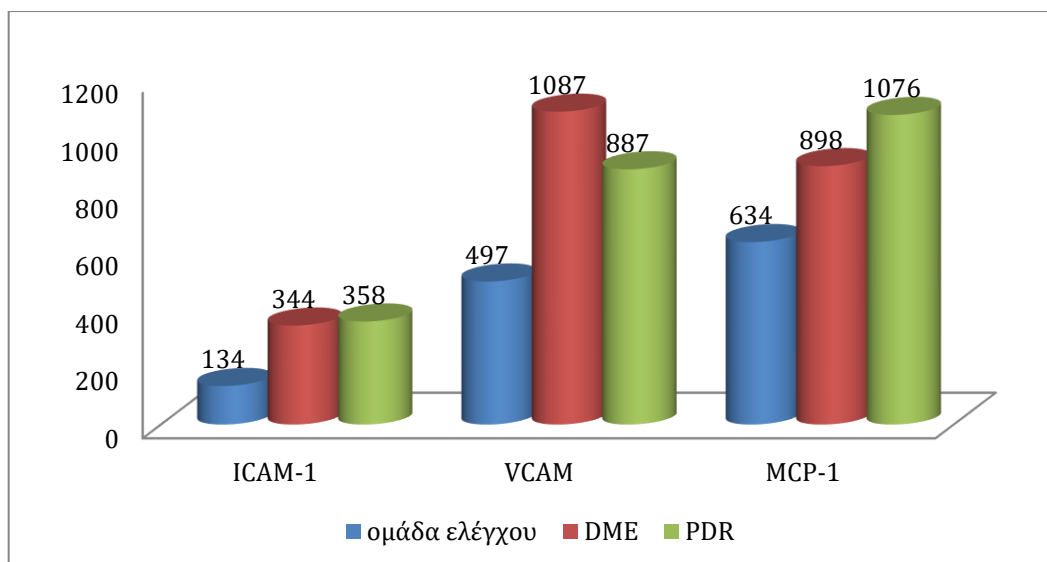
^α έλεγχος των Mann-Whitney

Οι διάμεσες τιμές των IL1b, IL6, IL8, TNFα, ICAM-1, VCAM, MCP-1 και VEGFA ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες στους PDR σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (p=0.02, p=0.01, p=0.01, p=0.004, p=0.01, p=0.01, p=0.02, p=0.04 and p=0.03 αντίστοιχα). Μετά από σύγκριση των ασθενών με ΔΟΩ και την ομάδα ελέγχου, οι διάμεσες τιμές IL8, ICAM-1 και VCAM ήταν υψηλότερες στην ομάδα των ασθενών με ΔΟΩ (p=0.04, p=0.04 και p=0.01 αντίστοιχα).

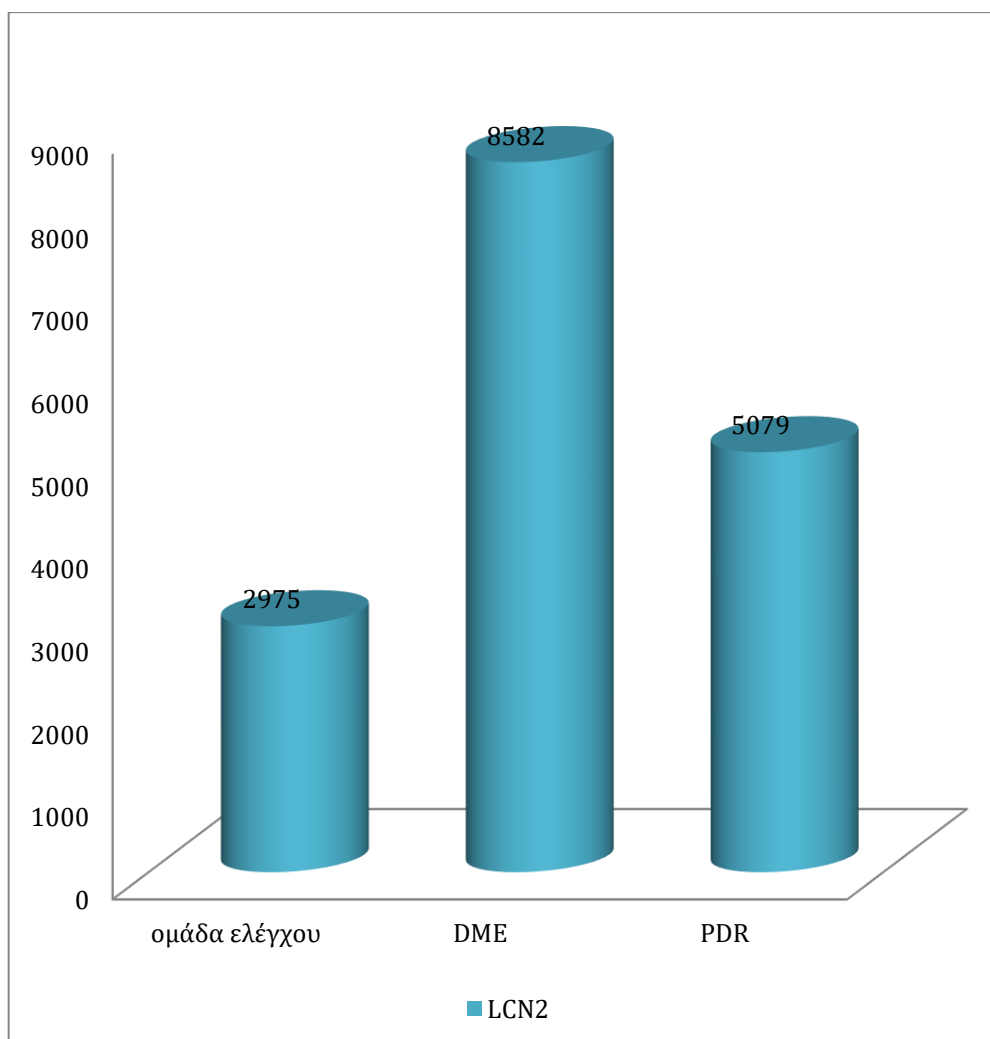
Στο γράφημα 19, παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των IL1β, IL6, IL8, IL27 και TNFα για την ομάδα ελέγχου, τους ασθενείς με ΔΟΩ (DME) και τους ασθενείς με ΠΔΑ (PDR). Αντίστοιχα για τις ίδιες ομάδες ασθενών παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των ICAM-1, VCAM και MCP-1 στο γράφημα 20, ενώ για την LCN2 ξεχωριστά στο γράφημα 21. Στο γράφημα 22 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των VEGFA και LCN2 στο υαλοειδές του κάθε ασθενούς με ΔΟΩ.



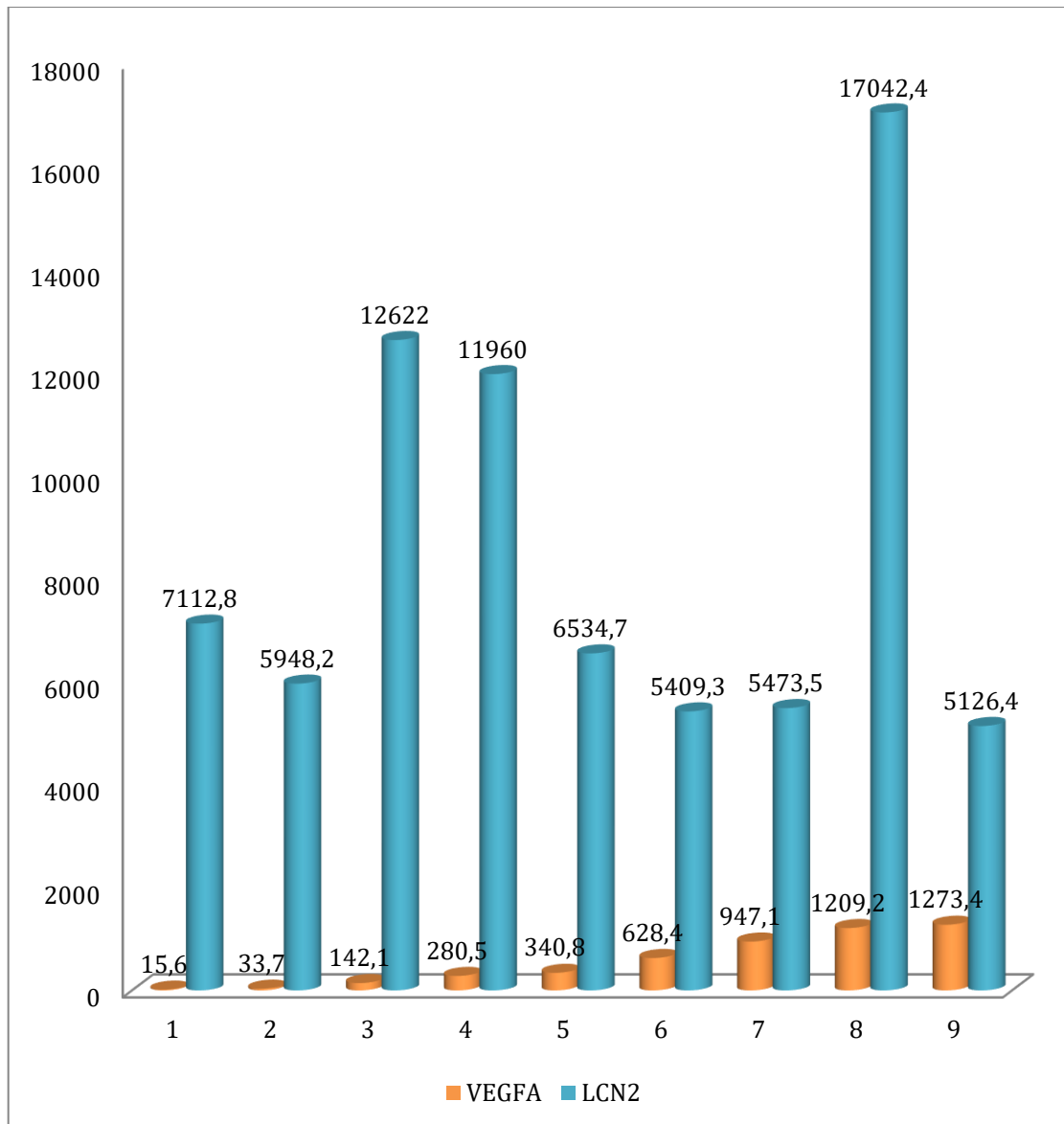
Γράφημα 19. Οι συγκεντρώσεις των IL1β, IL6, IL8, IL27 και TNFa για την ομάδα ελέγχου, τους ασθενείς ΔΟΩ (DME) και ΠΔΑ (PDR) αντίστοιχα.



Γράφημα 20. Οι συγκεντρώσεις των I-CAM, VCAM και MCP-1 για την ομάδα ελέγχου, τους ασθενείς ΔΟΩ (DME) και ΠΔΑ (PDR) αντίστοιχα.



Γράφημα 21. Οι συγκεντρώσεις της LCN2 για την ομάδα ελέγχου, τους ασθενείς ΔΟΩ (DME) και ΠΔΑ (PDR) αντίστοιχα.



Γράφημα 22. Οι συγκεντρώσεις του VEGFA και της LCN2 σε κάθε ασθενή με ΔΟΩ (DME) κατά σειρά αύξουσας συγκέντρωσης του VEGFA.

Συζήτηση

Σχετικά με την παθογένεση και την εξέλιξη της παραγωγικής υαλοαμφιβληστροειδοπάθειας, έχουν περιγραφεί πολλοί εμπλεκόμενοι μηχανισμοί (29, 168-173). Ένας από τους κύριους μηχανισμούς που συμμετέχουν στην παθογένεσή της είναι η φλεγμονή (30, 171, 174, 175). Η φλεγμονώδης διαδικασία η οποία ενεργοποιείται μετά από μια ρηγματογενή αποκόλληση αμφιβληστροειδούς διαμεσολαβείται από διάφορες κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες (176). Επιπλέον ο βαθμός φλεγμονής σχετίζεται με τους μηχανισμούς ανάπλασης (remodeling) που οδηγούν στην ανάπτυξη της ΠΥΑ (29). Στο πείραμά μας, βρήκαμε αυξημένα επίπεδα λιποκαλίνης2 στο υαλοειδές των ασθενών με ρηγματογενή αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς, κάτι που δεν είχε περιγραφεί μέχρι σήμερα. Ο ρόλος της λιποκαλίνης2 στη ρύθμιση της φλεγμονής αναπτύχθηκε στο γενικό μέρος καθώς επίσης και η επίδρασή της σε φλεγμονώδεις διαδικασίες του αμφιβληστροειδούς όπως παρατηρήθηκε σε πειραματικά μοντέλα επίμυων (116-118, 177, 178).

Παράλληλα η λιποκαλίνη2 έχει μια πλειοτροπική δράση ρυθμίζοντας την δραστηριότητα των μεταλλοπρωτεϊνών και συγκεκριμένα της μεταλλοπρωτεϊνάσης-9 (MMP-9) (179-182) η οποία επίσης θεωρείται ότι συμμετέχει στις επουλωτικές διαδικασίες που διέπουν την ΠΥΑ (183-185). Η λιποκαλίνη2 φαίνεται να έχει ρόλο και στην αντιδραστική γλοϊώση και φλεγμονή του νευρικού ιστού (186, 187), στοιχεία επίσης σημαντικά για την ανάπτυξη της ΠΥΑ (29, 188, 189).

Κύριο χαρακτηριστικό στην παθοφυσιολογία της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας καθώς και του διαβητικού οιδήματος της ωχράς κηλίδας είναι η φλεγμονή (190, 191). Στο πείραμά μας, καταδεικνύεται, η ποικίλου βαθμού συμμετοχή των παραγόντων φλεγμονής στις παθήσεις αυτές. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ρυθμιστικό ρόλο της λιποκαλίνης2 στη φλεγμονή (116-118, 177, 178), θα μπορούσε να ερμηνεύσει, τα αυξημένα επίπεδά της στο υαλοειδές των ασθενών αυτών. Ένα από τα σημαντικά φλεγμονώδη μονοπάτια σχετιζόμενα με την ανάπτυξη των αγγειακών επιπλοκών που αναπτύσσονται στη ΔΑ και στην ΠΔΑ, είναι το NF-κβ (192).

Μάλιστα σχετίζεται με την έκφραση των IL1b, IL6, IL8, TNF α , I-CAM και MCP-1 (192). Όπως αναφέραμε και στο γενικό μέρος η λιποκαλίνη2 μπορεί να αναστείλει το NF- κ B μονοπάτι και κατ'επέκταση την ενδοφθάλμια φλεγμονή όπως παρατηρήθηκε σε πειραματικά μοντέλα (118). Ο αντιφλεγμονώδης ρόλος της λιποκαλίνης 2 στα μακροφάγα και το NF- κ B έχει περιγραφεί και από τον Guo H και συνεργάτες (193).

Μια σημαντική παρατήρηση ήταν η αυξημένη συγκέντρωση της LCN2 στους ασθενείς με ΔΟΩ (DME) κυρίως σε σχέση με την ομάδα ελέγχου αλλά και σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΔΑ (PDR) (Γράφημα 21). Οι αγγειακές μεταβολές που εμφανίζονται στη ΔΑ, συνοδεύονται από τη ρήξη του έσω αιματοαμφιβληστροειδικού φραγμού που οδηγεί στην δημιουργία του ΔΟΩ (194). Η ρήξη αυτή μπορεί να προκληθεί λόγω βλάβης των πρωτεϊνών των μεσοκυττάρων συνδέσεων (junctional proteins) (ZO-1, VE-cadherin) και τη δυσλειτουργία των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων (195). Ο ρόλος της λιποκαλίνης 2 σε σχέση με τη δυσλειτουργία των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων έχει μελετηθεί στο αγγειακό σύστημα του εγκεφάλου (196) όπου έχει διαπιστωθεί ότι η λιποκαλίνη 2 μπορεί να μειώσει τη βλάβη των πρωτεϊνών αυτών (ZO-1, VE-cadherin) μετά από ένα εγκεφαλικό επεισόδιο και να διατηρείται έτσι, η ακεραιότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Το γεγονός αυτό και σε συνδυασμό με τις παρατηρήσεις μας υποδηλώνει ένα πιθανό ρόλο στο ΔΟΩ και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, για τον προσδιορισμό της ως βιοδείκτη ή ως θεραπευτικό στόχο.

Στους ασθενείς με ΔΟΩ, εκτός από τη λιποκαλίνη2, παρατηρήσαμε και στατιστικά σημαντική διαφορά (σε σχέση με την ομάδα ελέγχου) στις συγκεντρώσεις της IL8 καθώς και του VCAM (θεωρούμενου και ως διαμεσολαβητή της αγγειογένεσης (197) (Γράφημα 20), όπως και του ICAM-1 του οποίου ο ρόλος στο διαβητικό οίδημα έχει συνδυαστεί με την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας (198). Αντίθετα για τον VEGFA, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά, γεγονός που ήταν αναμενόμενο αφού οι ασθενείς αυτοί είχαν λάβει anti-VEGF αγωγή χωρίς ιδιαίτερη ανταπόκριση, γεγονός που τους οδήγησε σε επέμβαση υαλοειδεκτομής. Καταδεικνύεται έτσι η ανάγκη στοχοποίησης των παραγόντων αυτών, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ανθεκτικού στην anti-VEGF θεραπεία ΔΟΩ.

Τα αυξημένα επίπεδα λιποκαλίνης2 στο υαλοειδές των ασθενών με ΠΔΑ, έχουν μια ιδιαίτερη αξία αφού η διαπίστωση αυτή έρχεται να συμπληρώσει την υπάρχουσα βιβλιογραφία, όπου σε μια μελέτη βρέθηκε συσχέτιση των επιπέδων της λιποκαλίνης2 πλάσματος με τη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (199). Η παρατήρηση αυτή, θα είχε μεγαλύτερο αντίκτυπο εάν μελλοντικά γινόταν μια μελέτη που θα συνέκρινε τα επίπεδα λιποκαλίνης2 του περιφερικού αίματος με αυτά του υαλοειδούς ασθενών με διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια. Μια τέτοια συσχέτιση σε συνδυασμό με το στάδιο της νόσου (ΠΔΑ), θα μπορούσε να προσδιορίσει τη λιποκαλίνη2 ως βιοδείκτη, συμπληρώνοντας τις διάφορες απεικονιστικές μεθόδους όπως η φλουοροαγγειογραφία.

Στους ασθενείς με ΠΔΑ, παρατηρήσαμε επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα VEGFA ($p=0.03$), σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, γεγονός που εναρμονίζεται με τη λογική της χρήσης anti-VEGF θεραπείας για την ΠΔΑ όπως περιγράφηκε στο πρωτόκολλο S και στην μελέτη Clarity (200, 201). Παράλληλα η παρατηρούμενη υπερέκφραση της IL8 και της MCP-1 στους ασθενείς με ΠΔΑ (PDR) έρχεται να επιβεβαιώσει άλλες μελέτες που προσδιορίζουν τις δύο αυτές κυτταροκίνες ως παθογενετικά σημαντικές για την ανάπτυξη της (202). Ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα MCP-1 μπορούν να παρατηρηθούν και μετά από δεύτερη υαλοειδεκτομή για ΠΔΑ (203) ενώ παράλληλα, τα αυξημένα επίπεδα MCP-1 και IL6 στην ομάδα αυτή θα πρέπει να αξιολογούνται για μια ενδεχόμενη εμφάνιση μετεγχειρητικού οιδήματος της ωχράς (204). Έτσι ο χειρουργός του οπισθίου ημιμορίου, σε ορισμένες περιπτώσεις, θα πρέπει να σταθμίζει ιδιαίτερα το φλεγμονώδες και όχι μόνο το αγγειακό στοιχείο, αναφορικά με την μετεγχειρητική φαρμακευτική αγωγή.

Προβληματισμοί σχετικά με τη διαγνωστική, θεραπευτική και χειρουργική προσέγγιση ασθενών με παθήσεις υαλοειδούς-αμφιβληστροειδούς

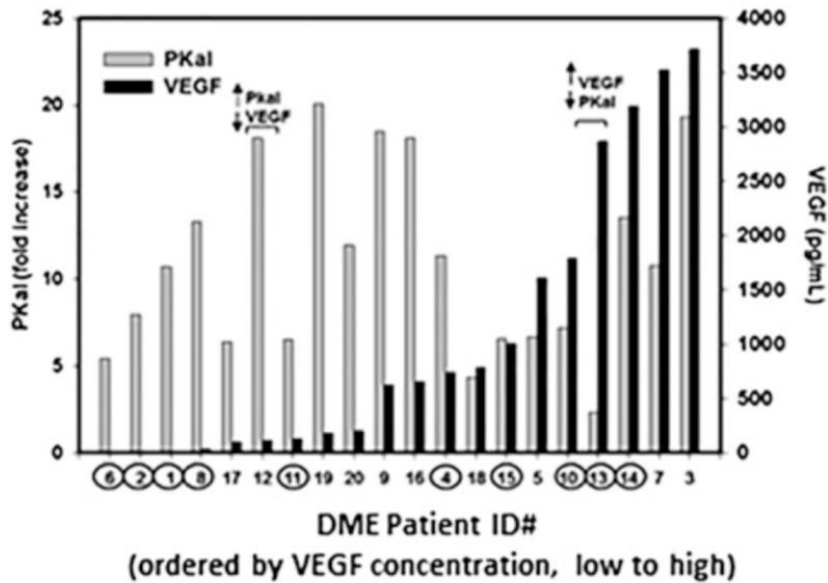
Στην οφθαλμολογία, η διάγνωση και η παρακολούθηση των ασθενών παραδοσιακά βασίζεται στην κλινική εξέταση και σε διάφορες απεικονιστικές μεθόδους όπως η τομογραφία οπτικής συνοχής (OCT). Τα τελευταία χρόνια όλο

και περισσότεροι φαρμακευτικοί παράγοντες για την αντιμετώπιση παθήσεων του αμφιβληστροειδούς (π.χ. διαβητικό οίδημα ωχράς) έχουν προστεθεί στις θεραπευτικές επιλογές των οφθαλμιάτρων (anti-VEGF, στεροειδή κ.α.). Ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις οι ασθενείς δεν ανταποκρίνονται επαρκώς στη θεραπεία. Ορισμένοι από αυτούς μπορεί να οδηγηθούν σε χειρουργική επέμβαση για τον έλεγχο της νόσου.

Ένας από τους λόγους που συντελούν σε αυτό είναι το γεγονός ότι στις περισσότερες περιπτώσεις εμπλέκονται παραπάνω από ένας παθογενετικοί μηχανισμοί. Για το λόγο αυτό δοκιμάζονται διάφορα θεραπευτικά πρωτόκολλα με συνδυασμένες θεραπείες για τη βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων. Επίσης γίνεται προσπάθεια δημιουργίας φαρμακευτικών παραγόντων που θα μπορούν να είναι σε θέση να αναστέλλουν περισσότερους από έναν παράγοντες. Για παράδειγμα το Faricimab που στοχεύει ταυτόχρονα στην αναστολή του VEGFA και της αγγειοποιητίνης (Ang-2) που βρίσκεται στη φάση (III) των κλινικών μελετών (158). Ωστόσο όπως προαναφέρθηκε, σε ορισμένες περιπτώσεις εγείρονται ορισμένοι προβληματισμοί, καθώς η πλήρης αναστολή ορισμένων παραγόντων όπως ο VEGF (134, 135, 205-212) μπορεί να μην είναι κατάλληλη και ιδανικότερα μια πιο εκλεκτική αναστολή θα ήταν προτιμητέα, ειδικά όταν πρόκειται για μακροχρόνιες θεραπείες.

Η ανάγκη για μια πιο εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση επιβεβαιώνεται και από την ετερογένεια που παρατηρείται μεταξύ των διαβητικών ασθενών, αναφορικά με τους εμπλεκόμενους παράγοντες. Για παράδειγμα σε μια εργασία για τη μελέτη του διαβητικού οιδήματος σε πειραματικά μοντέλα επίμυων (213) παρατηρήθηκε ότι το σύστημα καλικρεΐνης (Pkal) συμμετέχει στην παθοφυσιολογία του διαβητικού οιδήματος και μάλιστα είναι ανεξάρτητο από τον VEGF. Στην εικόνα 22, παρατηρείται αυτή η ετερογένεια, όπου αλλού έχουμε υπερέκφραση του VEGF και αλλού υπερέκφραση της Pkal. Κάτι αντίστοιχο σχετικά με την ετερογένεια αυτή παρατηρήσαμε και εμείς στο πείραμά μας (σχέση VEGFA με LCN2 στους ασθενείς με διαβητικό οίδημα (Γράφημα 22)).

PKal vs VEGF



Εικόνα 22. Συγκεντρώσεις καλικρεΐνης πλάσματος και VEGF σε δείγματα υαλοειδούς επί διαβητικού οιδήματος. Στον οριζόντιο άξονα παριστάνεται η συγκέντρωση του VEGF από χαμηλότερη προς μέγιστη (159).

Ιδανικά εάν γνωρίζαμε ποιος από τους εμπλεκόμενους παράγοντες υπερεκφράζεται στην εκάστοτε περίπτωση, θα μπορούσε να επιτευχθεί μια πιο στοχοποιημένη και εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση. Αυτό θα μπορούσε να γίνει με μέσα ταχείας βιοψίας υαλοειδούς κατά την προγραμματισμένη ενδοϋαλοειδική έγχυση, όπου μάλιστα έχει περιγραφεί μια λιγότερο παρεμβατική μέθοδος χρησιμοποιώντας την αναρροή (reflux) του υαλοειδούς (214). Επίσης βιοψία υαλοειδούς, θα μπορούσε να γίνεται και κατά την υαλοειδεκτομή, γεγονός που θα έδινε χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την επιλογή της καταλληλότερης μετεγχειρητικής αγωγής (π.χ. πρόληψη μετεγχειρητικών επιπλοκών (204).

Σε αυτή τη κατεύθυνση όμως υπάρχουν πολλά εμπόδια. Αρχικά τα δείγματα του υαλοειδούς από τη φύση τους έχουν μια πολυπλοκότητα, λόγω του συνδυασμού μικρής ποσότητας δείγματος και χαμηλής συγκέντρωσης βιοδεικτών. Οι μέχρι σήμερα διαθέσιμες διαγνωστικές μέθοδοι όπως η ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) βασίζονται στα αντισώματα, τα οποία

δημιουργούνται μετά από ανοσολογική απάντηση. Ωστόσο εξακολουθούν να έχουν κάποια προβλήματα όπως αυτά της μη ειδικής σύνδεσης (low signal to noise ratio) και της χαμηλής ευαισθησίας. Τα αντισώματα επίσης έχουν προβλήματα σταθερότητας και δεν τροποποιούνται εύκολα (215, 216). Επίσης δοκιμασίες όπως η ELISA είναι ακριβές δοκιμασίες (217), γεγονός που θα δυσκόλευε την επέκταση της χρήσης τους στην καθημερινή κλινική πράξη (π.χ. για πληθυσμιακό έλεγχο, σε κάθε υαλοειδεκτομή).

Ένα ακόμη γεγονός που θα πρέπει να έχουν υπόψιν τους οι ερευνητές είναι ότι οι μετρήσεις που γίνονται σε δείγματα υαλοειδούς με τη χρήση αντισωμάτων, για την μέτρηση παραγόντων όπως ο VEGF, σε οφθαλμούς που έχουν προηγουμένως λάβει θεραπεία με παράγοντες όπως οι anti-VEGF βασισμένους σε αντισώματα (π.χ. Ranibizumab, Aflibercept), ίσως να είναι εσφαλμένες. Αυτό μπορεί να γίνεται λόγω μη ειδικής σύνδεσης και ανταγωνισμού μεταξύ των αντισωμάτων (218-220). Κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται όταν οι οφθαλμοί έχουν λάβει θεραπεία βασισμένη σε απταμερή (π.χ. Pegaptanib) (220).

Μια καλή εναλλακτική, θα μπορούσε να είναι η χρήση των απταμερών για τον προσδιορισμό βιοδεικτών. Πιο συγκεκριμένα, τα αντισώματα λόγω του τρόπου παραγωγής τους (ανοσολογική απάντηση) δεν επιδέχονται τροποποιήσεις (215, 216) και άρα συχνά χαρακτηρίζονται από μη ειδική σύνδεση (χαμηλή ειδικότητα), δημιουργώντας έτσι θόρυβο σήματος (background noise).

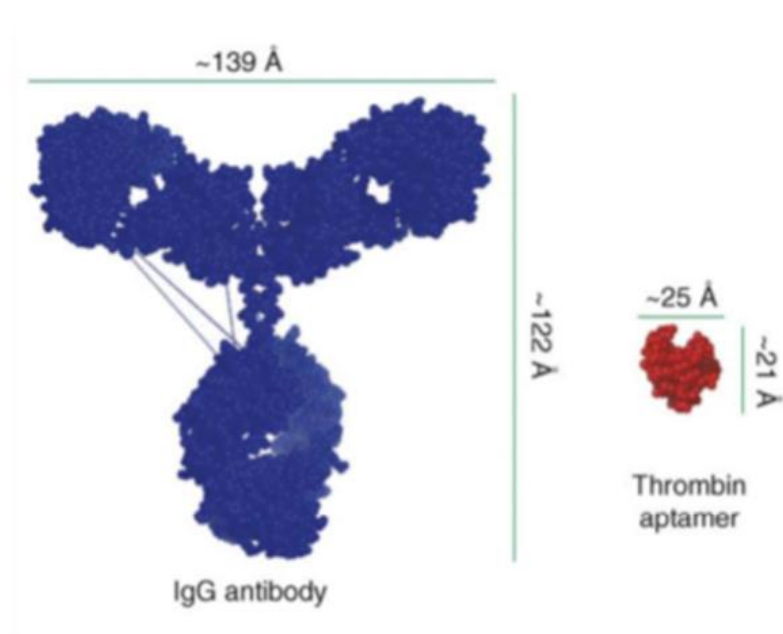
Αντίθετα με τα απταμερή, μπορεί να επιτευχθεί ειδικότερη σύνδεση δηλαδή να έχουν μεγαλύτερη ειδικότητα (specificity). Αυτό μπορεί να γίνει με δύο τρόπους, είτε κατά τη σύνθεση τους, όπου όσο μεγαλύτερη είναι η αλληλουχία τόσο μεγαλύτερη πολυπλοκότητα (αφού επιδέχονται τροποποιήσεις), είτε από τη δυνατότητα που μας δίνεται μέσω των διαδοχικών κύκλων SELEX για την επιλογή του καταλληλότερου απταμερούς (best matching) (215, 216).

Επίσης με τα απταμερή μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης (affinity), γεγονός που σημαντικό αφού με τα δείγματα υαλοειδούς όπως προαναφέραμε έχουμε το πρόβλημα του συνδυασμού μικρής ποσότητας δείγματος και χαμηλής συγκέντρωσης βιοδεικτών. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μειώνοντας τη συγκέντρωση του εκτιθέμενου μορίου στόχου κατά τη διαδικασία της SELEX. Έτσι αυξάνουμε την εκλεκτική πίεση (increase selective pressure),

(221) επιτυγχάνοντας μεγαλύτερη συγγένεια (μικρή σταθερά K_D) και άρα καλύτερη ακρίβεια στις μετρήσεις.

Συνεχίζοντας, τα απταμερή πλεονεκτούν έναντι των αντισωμάτων και σε άλλους τομείς. Για παράδειγμα λόγω της δυνατότητας *in vitro* σχεδιασμού δεν απαιτούνται πειραματόζωα για την παραγωγή τους (οικονομικότερη) (222).

Επίσης η ανάπτυξη τους είναι πολύ ταχύτερη (μερικές εβδομάδες). Επιπροσθέτως, παρέχεται μεγάλη ευελιξία στην επιλογή του μορίου στόχου και ο ερευνητής μπορεί να προσδιορίσει ακριβώς το σημείο πρόσδεσης. Είναι πολύ μικρότερα σε μέγεθος (12-30 kDA έναντι 150-170 kDA των αντισωμάτων) (εικόνα 23), όπως πολύ μικρότερο μπορεί να είναι και το μόριο στόχος που μπορεί να στοχοποιηθεί (60 kDA έναντι 600 kDA με τα αντισώματα). Αντίθετα με τα αντισώματα, τα απταμερή επιδέχονται πολλές τροποποιήσεις (σύνδεση με χημικές ενώσεις) χωρίς να αλλάζουν οι ιδιότητές τους και άρα πρακτικά μπορεί να επιλεγεί οποιαδήποτε μέθοδος σήμανσης (φθορισμός, φωτοβολία, χρωματομετρία κ.α.). Συνεχίζοντας τα απταμερή εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερη σταθερότητα και διάρκεια ζωής, ενώ επανέρχονται εάν μετουσιωθούν. Τέλος τα απταμερή δεν χρειάζονται κάποια ιδιαίτερη συντήρηση (π.χ. κατάψυξη) και η αναπαραγωγή τους είναι εύκολη, πολύ φθηνή και μπορεί να γίνει σε μεγάλη κλίμακα (223). Όλα αυτά τα πλεονεκτήματα και το γεγονός ότι δεν εμφανίζουν αντιγονικότητα (224) κάνουν τα απταμερή ιδανικούς αντικαταστάτες των αντισωμάτων στο πεδίο της διάγνωσης. Στον Πίνακα 15, συνοψίζονται τα πλεονεκτήματα των απταμερών έναντι των αντισωμάτων.



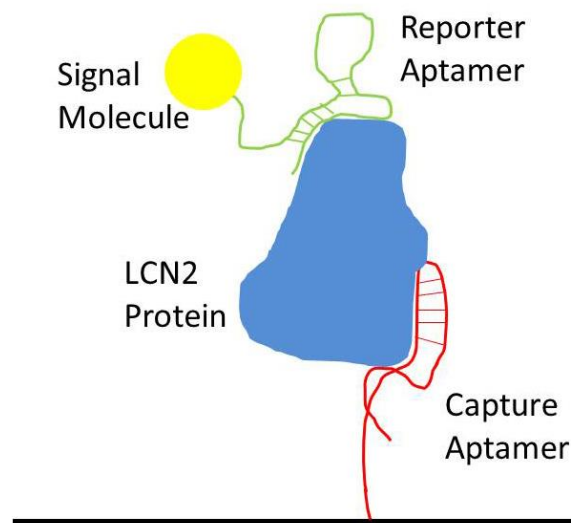
Εικόνα 23. Σύγκριση μεγέθους αντισώματος και απταμερούς (Hidding, 2017)

Πίνακας 15. Σύγκριση Αντισωμάτων και Απταμερών

Χαρακτηριστικά	Αντισώματα	Απταμερή
Χρόνος Ανάπτυξης	4-6 Μήνες	Μερικές εβδομάδες
Διαδικασία Ανάπτυξης	Απαιτείται ανοσολογική απάντηση από πειραματόζωα	Δημιουργία in vitro
Μέγεθος	150-170 kDA	12-30 kDA
Ελάχιστο Μέγεθος Στόχου	600 kDA	60 kDA
Δυνατότητα Τροποποίησης	Δυνατότητα σύνδεσης μόνο με ένα τύπο μορίου για σήμανση	Εύκολη τροποποίηση, δέσμευση και σήμανση
Σταθερότητα	Ευαίσθησια σε ακραίες μεταβολές θερμοκρασίας και PH (δεν επανέρχονται αν μετουσιωθούν)	Μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, εύκολη επαναφορά εαν μετουσιωθούν
Συντήρηση	Απαιτούν συντήρηση	Εύκολη μεταφορά και αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου

Πλατφόρμα ALISA

Η πλατφόρμα ALISA (Aptamer Liked Immobilized Sorbent Assay), είναι μια πλατφόρμα παρόμοια με την ELISA που όμως αντικαθιστά τα αντισώματα με απταμερή. Στην ALISA, ο στόχος ακινητοποιείται σε μια επιφάνεια από ένα απταμερές και μετά συνδέεται με ένα άλλο απταμερές. Το απταμερές που δεν ακινητοποιεί το στόχο, δημιουργεί ένα σήμα προκειμένου να ανιχνευθεί από τον βιοαισθητήρα. Η ικανότητα των απταμερών να συνδέονται με το στόχο είναι ουσιώδης (225). Η πλατφόρμα αυτή συνδυάζει όλα τα στοιχεία που προαναφέρθηκαν για το σχεδιασμό και ανάπτυξη ενός απταμερούς (SELEX, μέθοδοι σήμανσης, μέθοδοι ακινητοποίησης). Στην εικόνα 24 παρουσιάζεται σχηματικά η πλατφόρμα αυτή.



Εικόνα 24. Σχηματική αναπαράσταση της πλατφόρμας ALISA για την ανίχνευση της LCN2. Αποτελείται από δύο απταμερή, ένα για την ακινητοποίηση του μορίου στόχος (κόκκινο) και ένα για τη σύνδεση με το μόριο σήμανσης (πράσινο) (Limberis 2019).

Σχεδιασμός απταμερούς Λιποκαλίνης 2

Ένα μέρος του κινήτρου μας για την ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα, βασισμένου στα απταμερή, για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της λιποκαλίνης2, είναι το γεγονός ότι έχει ήδη περιγραφεί η ανάπτυξη ενός απταμερούς LCN2 με τη χρήση SELEX. Ο Lee και οι συνεργάτες (226), ανέπτυξαν έναν βιοαισθητήρα βασισμένο στην ALISA για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της LCN2 στον ορό ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ). Ο βιοαισθητήρας είχε την ικανότητα να ανιχνεύσει την LCN2 σε ένα γραμμικό εύρος 2.500-500.000 pg/ml με ελάχιστο όριο ανίχνευση τα 600 pg/ml. Έγινε δοκιμή σε δείγματα περιφερικού αίματος. Η εργασία αυτή μπορεί να αποτελέσει τη βάση για την ανάπτυξη μιας πλατφόρμας ALISA για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της LCN2 στα δείγματα υαλοειδούς.

Η δυσκολία για την ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα που θα έχει εφαρμογή στο σημείο φροντίδας του ασθενούς point-of-care testing (POCT) ή (παρακλίνιος εργαστηριακός έλεγχος) για την ανίχνευση της LCN2 στα δείγματα υαλοειδούς, είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση της σε συνδυασμό με το μικρό όγκο των δειγμάτων σε σύγκριση με αυτά του ορού. Στα πειράματά μας, η μέση συγκέντρωση στην ομάδα ελέγχου ήταν 3.300 pg/ml και 7.100 pg/ml στην ομάδα των ατόμων με ρηγματογενή αποκόλληση. Παρόλο που τα επίπεδα LCN2 ήταν στα προβλεπόμενα όρια εύρους του αισθητήρα που αναπτύχθηκε για το ΗΚΚ, το πρόβλημα του συνδυασμού χαμηλών συγκεντρώσεων και μικρού όγκου στα δείγματα υαλοειδούς δημιουργεί την ανάγκη δημιουργίας απταμερών με μεγαλύτερη συγγένεια και ειδικότητα προς την LCN2 ευρισκόμενη σε διαφορετικό δείγμα, για την επίτευξη μεγαλύτερου λόγου σήματος/θορύβου (signal to noise ratio) και χωρίς την παρουσία διασταυρούμενης αντίδρασης μεταξύ απταμερών. Προκειμένου να λειτουργήσει ο βιοαισθητήρας ALISA με τη μεγαλύτερη δυνατή ευαισθησία, απαιτούνται δύο μοναδικά υψηλής συγγένειας και υψηλής ευαισθησίας απταμερή, τα οποία θα συνδέονται σε χωρικά διαφορετικές περιοχές στην επιφάνεια της LCN2. Σαν σημείο αναφοράς, ο βιοαισθητήρας για την LCN2 που περιεγράφηκε από τους Lee και συνεργάτες, χρησιμοποιούσε δύο απταμερή με τιμές K_D μεταξύ 2,24 pM και 60,9 pM. Ενώ αυτές οι τιμές, είναι εντυπωσιακά χαμηλές παρέχοντας εν δυνάμει καλή ανίχνευση στον

ορό του ασθενούς, στην περίπτωση των δειγμάτων υαλοειδούς, ίσως θα πρέπει να βελτιωθεί η συγγένεια. Στην εικόνα 25 παρουσιάζονται οι ακολουθίες των συνδεδεμένων με την λιποκαλίνη απταμερών και οι μετρούμενες σταθερές K_D (201).

Name	Aptamer sequences (N40)	Affinity (K_D , M)	size (bp)
LCN2_apt1	GCCACGACTTGGGGAATCCTAAGGGCTGTGAACGCCGTGG	6.47×10^{-13}	40
LCN2_apt2	CCACAGTAGGTGAGGTTCACTGAGTTATCCATTGTTGGCA	2.24×10^{-12}	40
LCN2_apt3	CCCAAGNGCGAGCTGGCGGCTTGTTCATAAATTCGTGG	7.19×10^{-12}	40
LCN2_apt4	CGGAGGGCGGAAGCAAAGCGTAACAGAAAGCCAACACGCG	6.09×10^{-11}	40
LCN2_apt5	CCCAGCAATCCATTACTTCGTTAGTTCTAATTACCAACC	8.16×10^{-11}	39
LCN2_apt6	GCACGGTACGCTCTTGAGTGATCCACAATTTCTAACCGCG	8.01×10^{-10}	40
LCN2_apt7	CCGCGTCACTCACTGCTCCACTGCGTTGCGTCTCTA	1.10×10^{-9}	38
LCN2_apt8	CGACAATAGATCAGAACGCTCGAGTTCGCGAGGTGGGGG	3.42×10^{-9}	39
LCN2_apt9	GCATGCAGAAATCATGGAGACCAAATGGGTATAGGTCG	7.02×10^{-9}	39

5' - ATACCAGCTTATTCAATT ----- 40N ----- AGATAGTAAGTGCATCT - 3'
 Forward primer Reverse primer

Εικόνα 25 Αλληλουχίες απταμερών συνδεδεμένων με τη λιποκαλίνη και μετρούμενη σταθερά K_D (201).

Για να επιτευχθεί η δημιουργία απταμερών μεγαλύτερης συγγένειας με την LCN2, προτείνονται μερικά σημεία κλειδιά αναφορικά με το σχεδιασμό της SELEX. Η πρώτη και σημαντικότερη αλλαγή του σχεδιασμού, αφορά στο μήκος της τυχαίας ακολουθίας στην αρχική δεξαμενή απταμερών. Το μεγαλύτερο μήκος θα προσφέρει μεγαλύτερου βαθμού πολυπλοκότητα τρισδιάστατης δομής στην αρχική δεξαμενή. Η λογική της αυξημένης πολυπλοκότητας βασίζεται στο γεγονός ότι θα προσφέρει πιο εκλεπτυσμένες δομές αυξάνοντας την πιθανότητα για ανάπτυξη υψηλότερου βαθμού αλληλεπιδράσεων μεταξύ απταμερών και LCN2 και έτσι να αυξηθεί η συγγένεια και η ειδικότητα. Η προτεινόμενη αύξηση του μήκους της ακολουθίας είναι από 40 σε 60 νουκλεοτίδια. Το μειονέκτημα όμως του σχεδιασμού αυτού, είναι η απώλεια αντιπροσώπευσης της “δεξαμενής” αφού μόνο ένας συγκεκριμένος αριθμός μοναδικών απταμερών μπορεί να δημιουργηθεί στην αρχική δεξαμενή λόγω φυσικών περιορισμών σύνθεσης. Η πιο απλά, λιγότερο από το μισό της θεωρητικής αντιπροσώπευσης θα είναι διαθέσιμο σε σύγκριση με αντίστοιχα μικρότερα κομμάτια τυχαίων ακολουθιών. Ωστόσο οι πιο εκλεπτυσμένες ακολουθίες για την επίτευξη συγγένειας, πιστεύεται ότι αντισταθμίζουν την απώλεια σε αντιπροσώπευση.

Μια άλλη προτεινόμενη αλλαγή στο σχεδιασμό της SELEX είναι η εκτέλεση των κύκλων με μεγαλύτερη εκλεκτική πίεση για τη βελτίωση των σταθερών συγγένειας και προκειμένου συμπεριληφθεί περιβάλλον το οποίο μιμείται το υαλοειδές σώμα. Μέσω της μείωσης της συγκέντρωσης της LCN2 στους διαδοχικούς κύκλους SELEX κατά την εισαγωγή των απταμερών, η εκλεκτική πίεση αυξάνεται έτσι που μόνο τα απταμερή με τη μεγαλύτερη συγγένεια θα επιλεγούν για επόμενους κύκλους. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της SELEX και επιλεγούν τα απταμερή με τη μεγαλύτερη συγγένεια, μέσω της μέτρησης των σταθερών συγγένειας με τη βοήθεια επιφανειακού συντονισμού πλασμονίου, τα απταμερή που θα χαρακτηριστούν για τον βιοαισθητήρα, θα ελεγχθούν σε περιβάλλον που μιμείται το υαλοειδές. Η εξομοίωση αυτή με το υαλοειδές σώμα θα παρέχει τον αρχικό χαρακτηρισμό για τον προσδιορισμό του λόγου σήμα προς θόρυβο, τις μη ειδικές συνδέσεις και τις αλληλεπιδράσεις με τα στοιχεία του υαλοειδούς. Εν συνεχεία δείγματα υαλοειδούς με γνωστές συγκεντρώσεις LCN2 μπορούν να χρησιμοποιηθούν για δοκιμές προκειμένου να γίνει κατοχύρωση του βιοαισθητήρα καθώς και για τη μικρο-ρύθμισή του αναφορικά με την ευαισθησία και την ακρίβεια.

Η λογική της προτεινόμενης ανάπτυξης βιοαισθητήρα ALISA για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση επιπέδων LCN2 στο υαλοειδές, βασίζεται στα στοιχεία που βρήκαμε και υποδηλώνουν το ρόλο της στην ανάπτυξη παραγωγικής υαλοαμφιβληστροειδοπάθειας μετά από ρηγματογενή αποκόλληση αμφιβληστροειδούς (227), αλλά και στο γεγονός ότι ανιχνεύθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις σε δείγματα υαλοειδούς διαβητικών ασθενών με ΠΔΑ και ΔΟΩ. Επιπροσθέτως ο βιοαισθητήρας ALISA θα έχει τη δυνατότητα μελλοντικής ανάπτυξης ενός υψηλής συγγένειας και υψηλής ευαισθησίας εργαλείου για ένα γρήγορο, φθινό και με μεγάλη ακρίβεια παρακλίνιο εργαστηριακό έλεγχο point-of-care testing (POCT).

Συμπεράσματα

Στην παρούσα διατριβή, αναφορικά με την ομάδα των ασθενών με ρηγματογενή αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα λιποκαλίνης-2 στο υαλοειδές, αλλά και ένας συσχετισμός της αύξησης αυτής με το βαθμό ΠΥΑ. Επιπλέον, αυτή η υπερέκφραση της λιποκαλίνης φαίνεται να σχετίζεται και με άλλες κλινικές παραμέτρους όπως η παρουσία ενδοφακού (προηγούμενη φακοθρυψία) ή μη, την έκταση της αποκόλλησης καθώς και με τη διάρκεια των συμπτωμάτων. Τα ευρήματά μας καταδεικνύουν τον εν δυνάμει ρόλο της λιποκαλίνης-2 ως βιοδείκτη για την ανάπτυξη και εξέλιξη της ΠΥΑ, συμπληρώνοντας άλλες μελέτες που προσπαθούν να ερμηνεύσουν τον ρόλο της στην αντιδραστική γλοιώση και τη φλεγμονή του νευρικού ιστού. Μεγάλες προοπτικές μελέτες θα μπορέσουν να καθορίσουν τον ακριβή της ρόλο της βιοδείκτη ή ως θεραπευτικού στόχου στην πάθηση αυτή.

Αυξημένα επίπεδα λιποκαλίνης-2, βρέθηκαν και στο υαλοειδές των διαβητικών ασθενών και ιδιαίτερα σε αυτούς με διαβητικό οίδημα της ωχράς κηλίδας. Η παρατήρηση αυτή, προστίθεται στις υπάρχουσες γνώσεις μας σχετικά με την παθοφυσιολογία του διαβητικού οιδήματος αλλά και της παραγωγικής διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, για τη θεραπεία των οποίων γίνεται προσπάθεια απομόνωσης των εμπλεκόμενων παθογενετικών μηχανισμών.

Επίσης αναδείχθηκε ο ρόλος διαφόρων φλεγμονωδών παραγόντων στις παραπάνω υαλοαμφιβληστροειδικές παθήσεις, επιβεβαιώνοντας την τρέχουσα βιβλιογραφία. Έτσι δίνονται χρήσιμες πληροφορίες, που θα μπορούσαν να βρουν εφαρμογή στη φαρμακευτική και χειρουργική προσέγγιση των ασθενών αυτών.

Παράλληλα, μετά από ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, προσδιορίστηκε η διαγνωστική χρήση των απταμερών ως οικονομικότερη και αποτελεσματικότερη σε σύγκριση με τα αντισώματα, ειδικά για τις οφθαλμικές παθήσεις όπου τα δείγματα είναι μικρά και οι συγκεντρώσεις βιοδεικτών χαμηλές. Η ανάπτυξη μίας διαγνωστικής πλατφόρμας παρόμοιας με την ELISA που θα είναι βασισμένη στα απταμερή (πλατφόρμα ALISA), θα έδινε λύσεις στα υπάρχοντα διαγνωστικά προβλήματα.

Έτσι, ο σχεδιασμός ενός απταμερούς λιποκαλίνης-2 θα μπορούσε να προσφέρει στην οφθαλμολογική κοινότητα ένα εργαλείο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί όχι μόνο για ερευνητικούς σκοπούς (θεραπευτικός στόχος) αλλά

και στην καθημερινή κλινική πράξη, ως βιοαισθητήρας, στοχεύοντας σε μια πιο εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση.

Περίληψη

Η παρούσα διατριβή αφορά τη μελέτη νεότερων διαγνωστικών, θεραπευτικών μεθόδων και χειρουργικών τεχνικών σε παθήσεις υαλοειδούς αμφιβληστροειδούς. Ουσιαστικά γίνεται προσπάθεια διερεύνησης των εμπλεκόμενων παθογενετικών μηχανισμών και ανίχνευσης πιθανών νέων βιοδεικτών ή και θεραπευτικών στόχων για τις παθήσεις αυτές, με σύγχρονα διαγνωστικά μέσα όπως η κυτταρομετρία ροής. Η μελέτη αυτή στοχεύει να δώσει απαντήσεις σε διλήμματα που παρουσιάζονται σχετικά με τις νεότερες θεραπευτικές και χειρουργικές επιλογές. Επίσης σε εναρμόνιση με την τρέχουσα βιβλιογραφία αναζητείται το βέλτιστο διαγνωστικό μέσο (βιοαισθητήρας) που θα μπορούσε να έχει εφαρμογή στην καθημερινή κλινική πράξη.

Πιο συγκεκριμένα, αρχικά έγινε ενδελεχής μελέτη της τρέχουσας βιβλιογραφίας σχετικά με τις σημαντικότερες υαλοαμφιβληστροειδικές παθήσεις όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, το διαβητικό οίδημα της ωχράς κηλίδας και η παραγωγική υαλοαμφιβληστροειδοπάθεια, αναφορικά με την παθοφυσιολογία, τη διαγνωστική προσέγγιση και τις θεραπευτικές επιλογές. Παράλληλα έγινε διερεύνηση σχετικά με την πιθανή διαγνωστική εφαρμογή των απταμερών στην οφθαλμολογία, όπου μέχρι στιγμής έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ως θεραπευτικά μέσα (π.χ. πεγκαπτανίμη).

Εν συνεχεία έγινε εξέταση 92 ασθενών με υαλοαμφιβληστροειδικές παθήσεις. Από αυτούς, οι 54 κρίθηκαν κατάλληλοι για τη μελέτη και πραγματοποιήθηκε λήψη δειγμάτων υαλοειδούς. Πιο συγκεκριμένα από 24 ασθενείς με ρηγματογενή αποκόλληση αμφιβληστροειδούς και από 20 διαβητικούς ασθενείς από τους οποίους οι 11 είχαν παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και οι 9 διαβητικό οίδημα ωχράς κηλίδας. Επίσης ελήφθησαν δείγματα από 10 ασθενείς με διάφορες άλλες υαλοαμφιβληστροειδικές παθήσεις (6 με ιδιοπαθή επιαμφιβληστροειδική μεμβράνη, 2 με οπή ωχράς ολικού πάχους και 2 με σύνδρομο υαλοωχρικής έλξης) οι οποίοι θεωρήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Στην ομάδα των ασθενών με ρηγματογενή αποκόλληση εκτιμήθηκαν επιπλέον και άλλοι κλινικοί παράγοντες, όπως η κατάσταση του φακού, η διάρκεια των συμπτωμάτων, το εύρος της

αποκόλλησης και ο βαθμός παραγωγικής υαλοαμφιβληστροειδοπάθειας (εφόσον υπήρχε). Οι μελετούμενοι παράγοντες ήταν οι: IL1β, IL6, IL8, IL27, TNFα, ICAM, VCAM, MCP-1, VEGF, καθώς και η λιποκαλίνη 2 (LCN2/NGAL). Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Η στατιστική ανάλυση περιελάβανε Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test, t-test, Spearman's correlation coefficient and Fisher's exact test και έγινε με στατιστικό πακέτο IBM SPSS 21.0 (Statistical Package for Social Sciences).

Στα αποτελέσματα, τα συνολικά δεδομένα μας οδήγησαν να επικεντρωθούμε περισσότερο σε αυτά που αφορούσαν την λιποκαλίνη2 (LCN2). Αναφορικά με την ομάδα των ασθενών με ρηγματογενή αποκόλληση αμφιβληστροειδούς, η διάμεση LCN2 ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς (7.095 pg/ml) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (3.289 pg/ml), ($p < 0,001$). Επίσης βρέθηκε θετική συσχέτιση των επιπέδων της LCN2 με το βαθμό παραγωγικής υαλοαμφιβληστροειδοπάθειας ($r_s = 0.94$, $p < 0.001$), τη διάρκεια των συμπτωμάτων ($r_s = 0.87$, $p < 0.001$), το εύρος της αποκόλλησης (1-2 έναντι 3-4 τεταρτημόρια, $p < 0.001$), ενώ ήταν υψηλότερα στους ψευδοφακικούς ασθενείς σε σύγκριση με τους έμφακους ($p = 0.007$). Η αύξηση της LCN2, σχετιζόταν με την αύξηση των IL6, IL8, ICAM, VCAM-1 και MCP-1. Μετά την πραγματοποίηση πολυμεταβλητής γραμμικής παλινδρόμησης, βρέθηκε ότι μόνο ο βαθμός παραγωγικής υαλοαμφιβληστροειδοπάθειας σχετιζόταν ανεξάρτητα με την LCN2 (συντελεστής $b = 2,97$, 95% διάστημα εμπιστοσύνης = 1.89 έως 4.67, $p < 0,001$, $R^2 = 66\%$). Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια μετά την ανάλυση ευαισθησίας. Κάτι τέτοιο δεν έχει περιγραφεί μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία γεγονός που προσθέτει νέα δεδομένα σχετικά με την παθοφυσιολογία της παραγωγικής υαλοαμφιβληστροειδοπάθειας, δίνοντας το ερέθισμα για μεγαλύτερες μελέτες προκειμένου να προσδιοριστεί ως βιοδείκτης ή ως πιθανός θεραπευτικός στόχος. Αυξημένα επίπεδα LCN2 βρέθηκαν επίσης στο υαλοειδές των ασθενών με παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και ιδιαίτερα στους ασθενείς με διαβητικό οίδημα ώχρας, παρατήρηση που επίσης χρήζει ιδιαίτερης αξιολόγησης με περισσότερες μελέτες. Επίσης μέσα από τα πειράματά μας, επιβεβαιώθηκε ο ρόλος των υπολοίπων μετρούμενων κυτταροκινών και παραγόντων, στις φλεγμονώδεις διεργασίες που αναπτύσσονται στις παθήσεις

αυτές, επιβεβαιώνοντας την τρέχουσα βιβλιογραφία. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι χρήσιμες για τον θεράποντα οφθαλμίατρο και τον χειρουργό υαλοειδούς αφού υπό το πρίσμα αυτό θα πρέπει να αξιολογεί όχι μόνο το αγγειακό αλλά και το φλεγμονώδες στοιχείο στην εκάστοτε περίπτωση.

Τέλος μετά από ανασκόπηση της βιβλιογραφίας διαπιστώθηκε ότι η πιο οικονομική, εύλικτη και αποτελεσματική επιλογή για την ανάπτυξη διαγνωστικών βιοαισθητήρων ειδικά για δείγματα υαλοειδούς θα ήταν με τη χρήση απταμερών. Μια πλατφόρμα βασισμένη στην ELISA που όμως αντί για αντισώματα θα χρησιμοποιούσε απταμερή (πλατφόρμα ALISA) θα ήταν η πιο ωφέλιμη. Η ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα με μεγαλύτερη συγγένεια και ειδικότητα ως προς την ανίχνευση των επιπέδων λιποκαλίνης υαλοειδούς, θα ήταν χρήσιμη τόσο για ερευνητικούς σκοπούς όσο και στην καθημερινή κλινική πράξη.

Περίληψη στα αγγλικά (Summary)

This thesis deals with the study of latest diagnostic, therapeutic methods, and surgical techniques in vitreoretinal diseases. We investigated the pathogenic mechanisms involved and identified potential new biomarkers for these diseases using modern diagnostic tools, such as flow cytometry. The study aims to provide answers to the dilemmas presented with newer treatments and surgical options, with the aim of achieving a more personalized therapeutic approach for these patients. The results of the study have initiated the future development of a biosensor to be used as a diagnostic tool for both future research as well as an effective, low cost approach for daily clinical practice. The approach to this work was an initial literature review on the most significant vitreoretinal diseases, such as proliferative diabetic retinopathy (PDR), diabetic macular edema (DME), and proliferative vitreoretinopathy (PVR) and including a comprehensive investigation regarding the pathophysiology, diagnostic, and therapeutic options. At the same time, we have investigated the possible diagnostic application of

aptamers, short single-stranded oligonucleotides, in ophthalmology, which have been successfully used as therapeutic agents (e.g. pegaptanib).

Subsequently, 92 patients with various vitreoretinal diseases were examined. Of these, 54 were considered suitable for the study and vitreous samples were collected, including samples from 24 patients with rhegmatogenous retinal detachment (RRD) and from 20 diabetic patients, of which 11 had PDR and 9 DME. Control samples were collected from 10 patients with various vitreoretinal diseases and indication for vitrectomy, such as idiopathic epiretinal membrane (n=6), full thickness macular hole (n=2), and vitreomacular traction syndrome (n=2). In the group of patients with RRD, some other clinical factors such as the lens status, symptom duration, the extent of the detachment as well as the level of PVR (if present), were also assessed. These samples were quantitatively analyzed for IL1b, IL6, IL8, IL27, TNFa, ICAM, VCAM, MCP-1, VEGF and LCN2(NGAL) using flow cytometry. Statistical analysis was performed using IBM SPSS 21.0 (Statistical Package for Social Sciences), which included the Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test, t-test, Spearman's correlation coefficient and Fisher's exact test.

Our overall data lead us to focus more on the levels of LCN2 from the patient vitreous samples. Regarding the RRD group, we found that the median LCN2 was significantly higher in the RRD group as compared to control group ($p < 0.001$). Median LCN2 was also significantly higher in pseudophakic patients as compared to phakic patients ($p = 0.007$). LCN2 also correlated with the extend of detachment (1-2 vs 3-4 quadrants, $p < 0.001$) as well as with duration of symptoms ($r_s = 0.87$, $p < 0.001$). Increased level of LCN2 was correlated to the increased expression of IL6, IL8, ICAM, VCAM-1 and MCP-1. After multivariate linear regression analysis, only PVR was independently related with LCN2 concentration. In particular, increased PVR grading was associated with increased LCN2 concentration (coefficient $b = 2.97$, 95% confidence interval = 1.89 to 4.67, $p < 0.001$). Results did not change after conducting sensitivity analyses. We are the first to report this correlation between PVR and LCN2 adding further information regarding the pathogenesis and progression of PVR. Larger studies could elucidate if LCN2 could be a biomarker and even a therapeutic target. Elevated levels of LCN2 have also been found in the vitreous of PDR and especially in DME patients as compared to controls, an observation that also needs further evaluation from

larger future studies. Through our experiments, we have also observed the role of the other measured cytokines and factors, in the inflammatory processes that develop in these vitreoretinal diseases, confirming the current literature. These observations are useful for the ophthalmologist and vitreoretinal surgeons, as they should evaluate not only the vascular but also the inflammatory component in each case.

Finally, after reviewing the literature, it was found that the most flexible and cost-efficient method for the development of diagnostic biosensors, specific for vitreous samples would be aptamers. A platform similar to ELISA but substituting antibodies with aptamers (ALISA platform) would be the optimal. The development of a point-of-care testing (POCT) biosensor with higher affinity and specificity for the detection of LCN2 vitreous levels could be useful not only for research purposes but in clinical practice as well.

Βιβλιογραφικές Αναφορές

1. PB. B. Vitreous - in Health and Disease. J S, editor. New York: Springer; 2014.
2. Crafoord S GF, Sebag J. Vitreous biochemistry and artificial vitreous. J S, editor. New York: Springer; 2014.
3. Ohlmann AV, Ohlmann A, Welge-Lussen U, et al. Localization of collagen XVIII and endostatin in the human eye. *Curr Eye Res.* 2005;30(1):27-34. Epub 2005/05/07.
4. Sebag J. The vitreous: structure, function, and pathobiology: Springer-Verlag; 1989.
5. Kim H, Robinson SB, Csaky KG. Investigating the movement of intravitreal human serum albumin nanoparticles in the vitreous and retina. *Pharm Res.* 2009;26(2):329-37. Epub 2008/10/30.
6. Comper WD, Laurent TC. Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol Rev.* 1978;58(1):255-315. Epub 1978/01/01.
7. Sebag J. Diabetic vitreopathy. *Ophthalmology.* 1996;103(2):205-6. Epub 1996/02/01.
8. Cain SA, Morgan A, Sherratt MJ, et al. Proteomic analysis of fibrillin-rich microfibrils. *Proteomics.* 2006;6(1):111-22. Epub 2005/11/23.
9. DR. B. Pathobiology of Ocular Disease: A Dynamic Approach.. . *Br J Ophthalmol.* 1983(67(8)):558-9.
10. Balazs EA, Toth LZ, Eckl EA, et al. Studies on the Structure of the Vitreous Body. Xii. Cytological and Histochemical Studies on the Cortical Tissue Layer. *Experimental eye research.* 1964;3:57-71. Epub 1964/03/01.
11. Gloor BP. Cellular proliferation on the vitreous surface after photocoagulation. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.* 1969;178(2):99-113. Epub 1969/01/01.
12. Newsome DA, Linsenmayer TF, Trelstad RL. Vitreous body collagen. Evidence for a dual origin from the neural retina and hyalocytes. *J Cell Biol.* 1976;71(1):59-67. Epub 1976/10/01.
13. Sakamoto T, Ishibashi T. Hyalocytes: essential cells of the vitreous cavity in vitreoretinal pathophysiology? *Retina.* 2011;31(2):222-8. Epub 2011/01/18.
14. Teng CC. An electron microscopic study of cells in the vitreous of the rabbit eye. I. The macrophage. *Eye Ear Nose Throat Mon.* 1969;48(1):46-55. Epub 1969/01/01.
15. Kita T ST, Ishibashi TE. . Hyalocytes - essential vitreous cells in vitreo-retinal health and disease. J S, editor. New York: Springer; 2014. 151-64 p.
16. J. S. The vitreous: structure, function, and pathobiology. New York: Springer-Verlag; 1989.
17. Romero-Aroca P, Baget-Bernaldiz M, Pareja-Rios A, et al. Diabetic Macular Edema Pathophysiology: Vasogenic versus Inflammatory. *J Diabetes Res.* 2016;2016:2156273. Epub 2016/10/21.

18. A. M. The Human Retina in Health and Disease Teaching Set. University of Pennsylvania: Scheie Eye Institute; 2016.
19. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 2005;85(3):845-81. Epub 2005/07/01.
20. Wang W, Lo ACY. Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. *International journal of molecular sciences.* 2018;19(6). Epub 2018/06/22.
21. Sun JK, Glassman AR, Beaulieu WT, et al. Rationale and Application of the Protocol S Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Algorithm for Proliferative Diabetic Retinopathy. *Ophthalmology.* 2019;126(1):87-95. Epub 2018/08/11.
22. Gupta V, Arevalo JF. Surgical management of diabetic retinopathy. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2013;20(4):283-92. Epub 2013/12/18.
23. Romero-Aroca P. Targeting the pathophysiology of diabetic macular edema. *Diabetes care.* 2010;33(11):2484-5. Epub 2010/10/29.
24. Bhagat N, Grigorian RA, Tutela A, et al. Diabetic macular edema: pathogenesis and treatment. *Survey of ophthalmology.* 2009;54(1):1-32. Epub 2009/01/28.
25. Wells JA, Glassman AR, Ayala AR, et al. Aflibercept, bevacizumab, or ranibizumab for diabetic macular edema. *N Engl J Med.* 2015;372(13):1193-203. Epub 2015/02/19.
26. Daruich A, Matet A, Moulin A, et al. Mechanisms of macular edema: Beyond the surface. *Prog Retin Eye Res.* 2018;63:20-68. Epub 2017/11/12.
27. Campochiaro PA, Hafiz G, Mir TA, et al. Pro-permeability Factors in Diabetic Macular Edema; the Diabetic Macular Edema Treated With Ozurdex Trial. *Am J Ophthalmol.* 2016;168:13-23. Epub 2016/05/01.
28. Charteris DG, Downie J, Aylward GW, et al. Intraretinal and periretinal pathology in anterior proliferative vitreoretinopathy. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie.* 2007;245(1):93-100. Epub 2006/04/14.
29. Pastor JC, Rojas J, Pastor-Idoate S, et al. Proliferative vitreoretinopathy: A new concept of disease pathogenesis and practical consequences. *Prog Retin Eye Res.* 2016;51:125-55. Epub 2015/07/26.
30. Sadaka A, Giuliari GP. Proliferative vitreoretinopathy: current and emerging treatments. *Clin Ophthalmol.* 2012;6:1325-33. Epub 2012/09/04.
31. Kon CH, Asaria RH, Occleston NL, et al. Risk factors for proliferative vitreoretinopathy after primary vitrectomy: a prospective study. *The British journal of ophthalmology.* 2000;84(5):506-11. Epub 2000/04/27.
32. Kon CH TP, Aylward GW *Vitreoretinal Surgery*: Springer Berlin Heidelberg; 2005.
33. Machemer R, Aaberg TM, Freeman HM, et al. An updated classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *American journal of ophthalmology.* 1991;112(2):159-65. Epub 1991/08/15.
34. Wubben TJ, Besirli CG, Zacks DN. Pharmacotherapies for Retinal Detachment. *Ophthalmology.* 2016;123(7):1553-62. Epub 2016/04/05.
35. Akdis M, Burgler S, Cramer R, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2011;127(3):701-21 e1-70. Epub 2011/03/08.
36. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature reviews Immunology.* 2010;10(2):89-102. Epub 2010/01/19.

37. Brocker C, Thompson D, Matsumoto A, et al. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Human genomics*. 2010;5(1):30-55. Epub 2010/11/26.
38. Wooff Y, Man SM, Aggio-Bruce R, et al. IL-1 Family Members Mediate Cell Death, Inflammation and Angiogenesis in Retinal Degenerative Diseases. *Front Immunol*. 2019;10:1618. Epub 2019/08/06.
39. Eandi CM, Charles Messance H, Augustin S, et al. Subretinal mononuclear phagocytes induce cone segment loss via IL-1beta. *eLife*. 2016;5. Epub 2016/07/21.
40. Hu SJ, Calippe B, Lavalette S, et al. Upregulation of P2RX7 in Cx3cr1-Deficient Mononuclear Phagocytes Leads to Increased Interleukin-1beta Secretion and Photoreceptor Neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2015;35(18):6987-96. Epub 2015/05/08.
41. Zhao M, Bai Y, Xie W, et al. Interleukin-1beta Level Is Increased in Vitreous of Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration (nAMD) and Polypoidal Choroidal Vasculopathy (PCV). *PloS one*. 2015;10(5):e0125150. Epub 2015/05/16.
42. Nassar K, Grisanti S, Elfar E, et al. Serum cytokines as biomarkers for age-related macular degeneration. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2015;253(5):699-704. Epub 2014/07/25.
43. Lavalette S, Raoul W, Houssier M, et al. Interleukin-1beta inhibition prevents choroidal neovascularization and does not exacerbate photoreceptor degeneration. *The American journal of pathology*. 2011;178(5):2416-23. Epub 2011/04/26.
44. Markiewicz L, Pytel D, Mucha B, et al. Altered Expression Levels of MMP1, MMP9, MMP12, TIMP1, and IL-1beta as a Risk Factor for the Elevated IOP and Optic Nerve Head Damage in the Primary Open-Angle Glaucoma Patients. *BioMed research international*. 2015;2015:812503. Epub 2015/06/30.
45. Appelbaum T, Santana E, Aguirre GD. Strong upregulation of inflammatory genes accompanies photoreceptor demise in canine models of retinal degeneration. *PloS one*. 2017;12(5):e0177224. Epub 2017/05/10.
46. Yoshida N, Ikeda Y, Notomi S, et al. Clinical evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*. 2013;120(1):100-5. Epub 2012/09/19.
47. Tsai T, Kuehn S, Tsiampalis N, et al. Anti-inflammatory cytokine and angiogenic factors levels in vitreous samples of diabetic retinopathy patients. *PloS one*. 2018;13(3):e0194603. Epub 2018/03/28.
48. Zhou J, Wang S, Xia X. Role of intravitreal inflammatory cytokines and angiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Current eye research*. 2012;37(5):416-20. Epub 2012/03/14.
49. Patel JI, Saleh GM, Hykin PG, et al. Concentration of haemodynamic and inflammatory related cytokines in diabetic retinopathy. *Eye (Lond)*. 2008;22(2):223-8. Epub 2006/09/27.
50. Scuderi S, D'Amico A G, Federico C, et al. Different Retinal Expression Patterns of IL-1alpha, IL-1beta, and Their Receptors in a Rat Model of Type 1 STZ-Induced Diabetes. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2015;56(2):431-9. Epub 2015/02/14.

51. Kowluru RA, Odenbach S. Role of interleukin-1beta in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *The British journal of ophthalmology*. 2004;88(10):1343-7. Epub 2004/09/21.
52. Wong CW, Cheung N, Ho C, et al. Characterisation of the inflammatory cytokine and growth factor profile in a rabbit model of proliferative vitreoretinopathy. *Scientific reports*. 2019;9(1):15419. Epub 2019/10/30.
53. El-Ghrably IA, Dua HS, Orr GM, et al. Intravitreal invading cells contribute to vitreal cytokine milieu in proliferative vitreoretinopathy. *The British journal of ophthalmology*. 2001;85(4):461-70. Epub 2001/03/27.
54. Ghasemi H. Roles of IL-6 in Ocular Inflammation: A Review. *Ocul Immunol Inflamm*. 2018;26(1):37-50. Epub 2017/02/02.
55. Tilg H, Dinarello CA, Mier JW. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunology today*. 1997;18(9):428-32. Epub 1997/09/18.
56. Mocan MC, Kadayifcilar S, Eldem B. Elevated intravitreal interleukin-6 levels in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Canadian journal of ophthalmology Journal canadien d'ophtalmologie*. 2006;41(6):747-52. Epub 2007/01/17.
57. Funatsu H, Yamashita H, Ikeda T, et al. Vitreous levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2003;110(9):1690-6. Epub 2003/09/18.
58. Shimizu E, Funatsu H, Yamashita H, et al. Plasma level of interleukin-6 is an indicator for predicting diabetic macular edema. *Japanese journal of ophthalmology*. 2002;46(1):78-83. Epub 2002/02/21.
59. Limb GA, Little BC, Meager A, et al. Cytokines in proliferative vitreoretinopathy. *Eye (Lond)*. 1991;5 (Pt 6):686-93. Epub 1991/01/01.
60. Karkhur S, Hasanreisoglu M, Vigil E, et al. Interleukin-6 inhibition in the management of non-infectious uveitis and beyond. *Journal of ophthalmic inflammation and infection*. 2019;9(1):17. Epub 2019/09/17.
61. Vegas-Revenga N, Calvo-Rio V, Mesquida M, et al. Anti-IL6-Receptor Tocilizumab in Refractory and Noninfectious Uveitic Cystoid Macular Edema: Multicenter Study of 25 Patients. *Am J Ophthalmol*. 2019;200:85-94. Epub 2019/01/21.
62. Yoshida A, Yoshida S, Khalil AK, et al. Role of NF-kappaB-mediated interleukin-8 expression in intraocular neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1998;39(7):1097-106. Epub 1998/06/10.
63. Oh IK, Kim SW, Oh J, et al. Inflammatory and angiogenic factors in the aqueous humor and the relationship to diabetic retinopathy. *Current eye research*. 2010;35(12):1116-27. Epub 2010/12/03.
64. Funk M, Schmidinger G, Maar N, et al. Angiogenic and inflammatory markers in the intraocular fluid of eyes with diabetic macular edema and influence of therapy with bevacizumab. *Retina*. 2010;30(9):1412-9. Epub 2010/08/17.
65. Roh MI, Kim HS, Song JH, et al. Effect of intravitreal bevacizumab injection on aqueous humor cytokine levels in clinically significant macular edema. *Ophthalmology*. 2009;116(1):80-6. Epub 2009/01/03.
66. Lee WJ, Kang MH, Seong M, et al. Comparison of aqueous concentrations of angiogenic and inflammatory cytokines in diabetic macular oedema and macular oedema due to branch retinal vein occlusion. *The British journal of ophthalmology*. 2012;96(11):1426-30. Epub 2012/08/30.

67. Kwon JW, Jee D. Aqueous humor cytokine levels in patients with diabetic macular edema refractory to anti-VEGF treatment. *PloS one*. 2018;13(9):e0203408. Epub 2018/09/12.
68. Shi Y, Hui Y, Zhang X, et al. [IL-8 in experimental proliferative vitreoretinopathy induced by macrophages]. *Yan ke xue bao = Eye science*. 1997;13(2):49-51, 66. Epub 1997/06/01.
69. Watzlawick R, Kenngott EE, Liu FD, et al. Anti-Inflammatory Effects of IL-27 in Zymosan-Induced Peritonitis: Inhibition of Neutrophil Recruitment Partially Explained by Impaired Mobilization from Bone Marrow and Reduced Chemokine Levels. *PloS one*. 2015;10(9):e0137651. Epub 2015/09/12.
70. Li JP, Wu H, Xing W, et al. Interleukin-27 as a negative regulator of human neutrophil function. *Scandinavian journal of immunology*. 2010;72(4):284-92. Epub 2010/10/05.
71. Fitzgerald DC, Ciric B, Touil T, et al. Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2007;179(5):3268-75. Epub 2007/08/22.
72. Yan A, You H, Zhang X. Levels of Interleukin 27 and Interleukin 35 in the Serum and Vitreous of Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy. *Ocular immunology and inflammation*. 2018;26(2):273-9. Epub 2016/08/19.
73. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. 2010;20(2):87-103. Epub 2010/12/08.
74. Mirshahi A, Hoehn R, Lorenz K, et al. Anti-tumor necrosis factor alpha for retinal diseases: current knowledge and future concepts. *Journal of ophthalmic & vision research*. 2012;7(1):39-44. Epub 2012/06/28.
75. Zorena K, Raczynska D, Raczynska K. Biomarkers in diabetic retinopathy and the therapeutic implications. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:193604. Epub 2013/12/07.
76. Arita R, Nakao S, Kita T, et al. A key role for ROCK in TNF-alpha-mediated diabetic microvascular damage. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013;54(3):2373-83. Epub 2013/03/07.
77. Adamiec-Mroczek J, Oficjalska-Mlynczak J. Assessment of selected adhesion molecule and proinflammatory cytokine levels in the vitreous body of patients with type 2 diabetes--role of the inflammatory-immune process in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2008;246(12):1665-70. Epub 2008/08/07.
78. Kocabora MS, Telli ME, Fazil K, et al. Serum and Aqueous Concentrations of Inflammatory Markers in Diabetic Macular Edema. *Ocular immunology and inflammation*. 2016;24(5):549-54. Epub 2015/09/25.
79. Liu Y, Cao GF, Xue J, et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-mediated in vitro human retinal pigment epithelial (RPE) cell migration mainly requires Akt/mTOR complex 1 (mTORC1), but not mTOR complex 2 (mTORC2) signaling. *European journal of cell biology*. 2012;91(9):728-37. Epub 2012/05/19.
80. Gahmberg CG, Tolvanen M, Kotovuori P. Leukocyte adhesion--structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands. *European journal of biochemistry*. 1997;245(2):215-32. Epub 1997/04/15.
81. Sumagin R, Lomakina E, Sarelius IH. Leukocyte-endothelial cell interactions are linked to vascular permeability via ICAM-1-mediated signaling.

- American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2008;295(3):H969-H77. Epub 2008/07/22.
82. Noda K, Nakao S, Ishida S, et al. Leukocyte adhesion molecules in diabetic retinopathy. *J Ophthalmol.* 2012;2012:279037. Epub 2011/12/02.
 83. Jain A, Saxena S, Khanna VK, et al. Status of serum VEGF and ICAM-1 and its association with external limiting membrane and inner segment-outer segment junction disruption in type 2 diabetes mellitus. *Molecular vision.* 2013;19:1760-8. Epub 2013/08/08.
 84. Limb GA, Chignell AH. Vitreous levels of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) as a risk indicator of proliferative vitreoretinopathy. *Br J Ophthalmol.* 1999;83(8):953-6. Epub 1999/07/22.
 85. Kong DH, Kim YK, Kim MR, et al. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *International journal of molecular sciences.* 2018;19(4). Epub 2018/04/05.
 86. Pober JS. Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis research.* 2002;4 Suppl 3:S109-16. Epub 2002/07/12.
 87. Dong A, Shen J, Zeng M, et al. Vascular cell-adhesion molecule-1 plays a central role in the proangiogenic effects of oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011;108(35):14614-9. Epub 2011/08/17.
 88. Barile GR, Chang SS, Park LS, et al. Soluble cellular adhesion molecules in proliferative vitreoretinopathy and proliferative diabetic retinopathy. *Current eye research.* 1999;19(3):219-27. Epub 1999/09/17.
 89. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research.* 2009;29(6):313-26. Epub 2009/05/16.
 90. Wu J, Zhong Y, Yue S, et al. Aqueous Humor Mediator and Cytokine Aberrations in Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dis Markers.* 2019;2019:6928524. Epub 2019/12/25.
 91. Weissman IL. Stem cells are units of natural selection for tissue formation, for germline development, and in cancer development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2015;112(29):8922-8. Epub 2015/07/22.
 92. Rangasamy S, McGuire PG, Franco Nitta C, et al. Chemokine mediated monocyte trafficking into the retina: role of inflammation in alteration of the blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. *PloS one.* 2014;9(10):e108508. Epub 2014/10/21.
 93. Abu el-Asrar AM, Van Damme J, Put W, et al. Monocyte chemotactic protein-1 in proliferative vitreoretinal disorders. *American journal of ophthalmology.* 1997;123(5):599-606. Epub 1997/05/01.
 94. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine.* 2003;9(6):669-76. Epub 2003/06/05.
 95. Ramakrishnan S, Anand V, Roy S. Vascular endothelial growth factor signaling in hypoxia and inflammation. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology.* 2014;9(2):142-60. Epub 2014/03/13.
 96. Shaik-Dasthagirisaheb YB, Varvara G, Murmura G, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF), mast cells and inflammation. *International*

journal of immunopathology and pharmacology. 2013;26(2):327-35. Epub 2013/06/13.

97. Nakao S, Arima M, Ishikawa K, et al. Intravitreal anti-VEGF therapy blocks inflammatory cell infiltration and re-entry into the circulation in retinal angiogenesis. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012;53(7):4323-8. Epub 2012/06/05.

98. Mor F, Quintana FJ, Cohen IR. Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. *J Immunol*. 2004;172(7):4618-23. Epub 2004/03/23.

99. Zhao Y, Singh RP. The role of anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) in the management of proliferative diabetic retinopathy. *Drugs in context*. 2018;7:212532. Epub 2018/09/06.

100. Cornel S, Adriana ID, Mihaela TC, et al. Anti-vascular endothelial growth factor indications in ocular disease. *Romanian journal of ophthalmology*. 2015;59(4):235-42. Epub 2015/10/01.

101. Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1482(1-2):272-83. Epub 2000/11/04.

102. Xu S, Venge P. Lipocalins as biochemical markers of disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1482(1-2):298-307. Epub 2000/11/04.

103. Abella V, Scotece M, Conde J, et al. The potential of lipocalin-2/NGAL as biomarker for inflammatory and metabolic diseases. *Biomarkers*. 2015;20(8):565-71. Epub 2015/12/17.

104. Ferreira AC, Da Mesquita S, Sousa JC, et al. From the periphery to the brain: Lipocalin-2, a friend or foe? *Progress in neurobiology*. 2015;131:120-36. Epub 2015/07/15.

105. Bolignano D, Donato V, Coppolino G, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage. *Am J Kidney Dis*. 2008;52(3):595-605. Epub 2008/08/30.

106. Pitashny M, Schwartz N, Qing X, et al. Urinary lipocalin-2 is associated with renal disease activity in human lupus nephritis. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(6):1894-903. Epub 2007/05/29.

107. Cruz DN, Gaiao S, Maisel A, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of cardiovascular disease: a systematic review. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2012;50(9):1533-45. Epub 2012/10/24.

108. Thorsvik S, Damas JK, Granlund AV, et al. Fecal neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker for inflammatory bowel disease. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2017;32(1):128-35. Epub 2016/09/20.

109. Al Nimer F, Elliott C, Bergman J, et al. Lipocalin-2 is increased in progressive multiple sclerosis and inhibits remyelination. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*. 2016;3(1):e191. Epub 2016/01/16.

110. Gulkesen A, Akgol G, Poyraz AK, et al. Lipocalin 2 as a clinical significance in rheumatoid arthritis. *Central-European journal of immunology*. 2017;42(3):269-73. Epub 2017/12/06.

111. Hurst A, Hendry GS, Hughes A, et al. Enumeration of sublethally heated staphylococci in some dried foods. *Canadian journal of microbiology*. 1976;22(5):677-83. Epub 1976/05/01.

112. Yan QW, Yang Q, Mody N, et al. The adipokine lipocalin 2 is regulated by obesity and promotes insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(10):2533-40. Epub 2007/07/20.
113. Yang J, Moses MA. Lipocalin 2: a multifaceted modulator of human cancer. *Cell Cycle*. 2009;8(15):2347-52. Epub 2009/07/03.
114. Salom D, Sanz-Marco E, Mullor JL, et al. Aqueous humor neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in patients with idiopathic acute anterior uveitis. *Molecular vision*. 2010;16:1448-52. Epub 2010/08/04.
115. Koban Y, Sahin S, Boy F, et al. Elevated lipocalin-2 level in aqueous humor of patients with central retinal vein occlusion. *International ophthalmology*. 2019;39(5):981-6. Epub 2018/03/25.
116. Parmar T, Parmar VM, Perusek L, et al. Lipocalin 2 Plays an Important Role in Regulating Inflammation in Retinal Degeneration. *J Immunol*. 2018;200(9):3128-41. Epub 2018/04/01.
117. Parmar T, Parmar VM, Arai E, et al. Acute Stress Responses Are Early Molecular Events of Retinal Degeneration in *Abca4*^{-/-}*Rdh8*^{-/-} Mice After Light Exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(7):3257-67. Epub 2016/06/18.
118. Valapala M, Edwards M, Hose S, et al. Increased Lipocalin-2 in the retinal pigment epithelium of *Cryba1* cKO mice is associated with a chronic inflammatory response. *Aging Cell*. 2014;13(6):1091-4. Epub 2014/09/27.
119. Tang W, Ma J, Gu R, et al. Lipocalin 2 Suppresses Ocular Inflammation by Inhibiting the Activation of NF-kappaB Pathway in Endotoxin-Induced Uveitis. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(1):375-88. Epub 2018/03/29.
120. Marti GE, Stetler-Stevenson M, Bleesing JJ, et al. Introduction to flow cytometry. *Semin Hematol*. 2001;38(2):93-9. Epub 2001/04/20.
121. Castillo L, MacCallum DM. Cytokine measurement using cytometric bead arrays. *Methods Mol Biol*. 2012;845:425-34. Epub 2012/02/14.
122. Chandola C, Kalme S, Casteleijn MG, et al. Application of aptamers in diagnostics, drug-delivery and imaging. *J Biosci*. 2016;41(3):535-61. Epub 2016/09/02.
123. Yigit MV, Mazumdar D, Lu Y. MRI detection of thrombin with aptamer functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Bioconjug Chem*. 2008;19(2):412-7. Epub 2008/01/05.
124. Kim D, Jeong YY, Jon S. A drug-loaded aptamer-gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer. *ACS Nano*. 2010;4(7):3689-96. Epub 2010/06/17.
125. Wang CH, Huang YF, Yeh CK. Aptamer-conjugated nanobubbles for targeted ultrasound molecular imaging. *Langmuir*. 2011;27(11):6971-6. Epub 2011/05/11.
126. Charlton J, Sennello J, Smith D. In vivo imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase. *Chem Biol*. 1997;4(11):809-16. Epub 1998/01/31.
127. Huang YF, Shangguan D, Liu H, et al. Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells. *Chembiochem*. 2009;10(5):862-8. Epub 2009/03/04.
128. Latorre A, Posch C, Garcimartin Y, et al. Single-point mutation detection in RNA extracts using gold nanoparticles modified with hydrophobic molecular beacon-like structures. *Chem Commun (Camb)*. 2014;50(23):3018-20. Epub 2014/02/06.

129. Zhou J, Rossi JJ. Cell-type-specific, Aptamer-functionalized Agents for Targeted Disease Therapy. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014;3:e169. Epub 2014/06/18.
130. Zhu Q, Liu G, Kai M. DNA Aptamers in the Diagnosis and Treatment of Human Diseases. *Molecules*. 2015;20(12):20979-97. Epub 2015/11/28.
131. Ng EW, Shima DT, Calias P, et al. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(2):123-32. Epub 2006/03/07.
132. Ferrara N, Damico L, Shams N, et al. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina*. 2006;26(8):859-70. Epub 2006/10/13.
133. Nishijima K, Ng YS, Zhong L, et al. Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. *The American journal of pathology*. 2007;171(1):53-67. Epub 2007/06/27.
134. D'Amore PA. Vascular endothelial cell growth factor-a: not just for endothelial cells anymore. *Am J Pathol*. 2007;171(1):14-8. Epub 2007/06/27.
135. Friberg TR, Tolentino M, Weber P, et al. Pegaptanib sodium as maintenance therapy in neovascular age-related macular degeneration: the LEVEL study. *Br J Ophthalmol*. 2010;94(12):1611-7. Epub 2010/05/18.
136. Ishibashi T. Maintenance therapy with pegaptanib sodium for neovascular age-related macular degeneration: an exploratory study in Japanese patients (LEVEL-J study). *Japanese journal of ophthalmology*. 2013;57(5):417-23. Epub 2013/07/19.
137. Inoue M, Kadonosono K, Arakawa A, et al. Long-term outcome of intravitreal pegaptanib sodium as maintenance therapy in Japanese patients with neovascular age-related macular degeneration. *Japanese journal of ophthalmology*. 2015;59(3):173-8. Epub 2015/03/04.
138. A Phase 3 Safety and Efficacy Study of Fovista® (E10030) Intravitreal Administration in Combination With Lucentis® Compared to Lucentis® Monotherapy. <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT01944839>.
139. ZIMURA in Combination With LUCENTIS in Patients With Neovascular Age Related Macular Degeneration (NVAMD). <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03362190>.
140. Zimura in Subjects With Geographic Atrophy Secondary to Dry Age-Related Macular Degeneration. <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02686658>.
141. Lakhin AV, Tarantul VZ, Gening LV. Aptamers: problems, solutions and prospects. *Acta naturae*. 2013;5(4):34-43. Epub 2014/01/24.
142. Jeddi I, Saiz L. Three-dimensional modeling of single stranded DNA hairpins for aptamer-based biosensors. *Sci Rep*. 2017;7(1):1178. Epub 2017/04/28.
143. Capek I. DNA Engineered Noble Metal Nanoparticles: Fundamentals and State-of-the-Art of Nanobiotechnology: John Wiley & Sons; 2015.
144. Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng*. 2007;24(4):381-403. Epub 2007/07/14.
145. Sefah K, Shangguan D, Xiong X, et al. Development of DNA aptamers using Cell-SELEX. *Nat Protoc*. 2010;5(6):1169-85. Epub 2010/06/12.

146. Sharma S, Byrne H, O'Kennedy RJ. Antibodies and antibody-derived analytical biosensors. *Essays Biochem.* 2016;60(1):9-18. Epub 2016/07/02.
147. Mamedov TG, Pienaar E, Whitney SE, et al. A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Comput Biol Chem.* 2008;32(6):452-7. Epub 2008/09/02.
148. Ilgu M, Nilsen-Hamilton M. Aptamers in analytics. *Analyst.* 2016;141(5):1551-68. Epub 2016/02/13.
149. Ruscito A, DeRosa MC. Small-Molecule Binding Aptamers: Selection Strategies, Characterization, and Applications. *Front Chem.* 2016;4:14. Epub 2016/06/01.
150. Nomura Y, Sugiyama S, Sakamoto T, et al. Conformational plasticity of RNA for target recognition as revealed by the 2.15 Å crystal structure of a human IgG-aptamer complex. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(21):7822-9. Epub 2010/08/03.
151. McKeague M, Derosa MC. Challenges and opportunities for small molecule aptamer development. *J Nucleic Acids.* 2012;2012:748913. Epub 2012/11/15.
152. McKeague M, McConnell EM, Cruz-Toledo J, et al. Analysis of In Vitro Aptamer Selection Parameters. *Journal of molecular evolution.* 2015;81(5-6):150-61. Epub 2015/11/05.
153. Winter PC. Polymerase chain reaction (PCR). Cooper DN, editor. Hoboken NJ: Wiley; 2003.
154. Catuogno S, Esposito CL. Aptamer Cell-Based Selection: Overview and Advances. *Biomedicines.* 2017;5(3). Epub 2017/08/15.
155. Paul A, Avci-Adali M, Ziemer G, et al. Streptavidin-coated magnetic beads for DNA strand separation implicate a multitude of problems during cell-SELEX. *Oligonucleotides.* 2009;19(3):243-54. Epub 2009/09/08.
156. Avci-Adali M, Paul A, Wilhelm N, et al. Upgrading SELEX technology by using lambda exonuclease digestion for single-stranded DNA generation. *Molecules.* 2009;15(1):1-11. Epub 2010/01/30.
157. Gyllensten UB, Erlich HA. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(20):7652-6. Epub 1988/10/01.
158. Hussain RM, Neiweem AE, Kansara V, et al. Tie-2/Angiopoietin pathway modulation as a therapeutic strategy for retinal disease. *Expert opinion on investigational drugs.* 2019;28(10):861-9. Epub 2019/09/13.
159. Murgha YE, Rouillard JM, Gulari E. Methods for the preparation of large quantities of complex single-stranded oligonucleotide libraries. *PLoS One.* 2014;9(4):e94752. Epub 2014/04/16.
160. Hasegawa H, Savory N, Abe K, et al. Methods for Improving Aptamer Binding Affinity. *Molecules.* 2016;21(4):421. Epub 2016/04/05.
161. Wang J, Rudzinski JF, Gong Q, et al. Influence of target concentration and background binding on in vitro selection of affinity reagents. *PLoS One.* 2012;7(8):e43940. Epub 2012/09/07.
162. Kalra P, Dhiman A, Cho WC, et al. Simple Methods and Rational Design for Enhancing Aptamer Sensitivity and Specificity. *Front Mol Biosci.* 2018;5:41. Epub 2018/06/06.
163. Mueller NH, Ammar DA, Petrash JM. Cell penetration peptides for enhanced entry of alphaB-crystallin into lens cells. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2013;54(1):2-8. Epub 2012/11/15.

164. Solutions CL. Protein Affinity Chromatography. Caframo Limited; 2016; Available from: <https://www.caframolabsolutions.com/application/homogenizing/protein-affinity-chromatography>. .
165. Lean JS, Stern WH, Irvine AR, et al. Classification of proliferative vitreoretinopathy used in the silicone study. The Silicone Study Group. *Ophthalmology*. 1989;96(6):765-71. Epub 1989/06/01.
166. The classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology*. 1983;90(2):121-5. Epub 1983/02/01.
167. <https://www.aimplexbio.com/resources> [database on the Internet]. Biosciences Inc. 2017.
168. Pennock S, Haddock LJ, Elliott D, et al. Is neutralizing vitreal growth factors a viable strategy to prevent proliferative vitreoretinopathy? *Progress in retinal and eye research*. 2014;40:16-34. Epub 2014/01/15.
169. Rouberol F, Chiquet C. [Proliferative vitreoretinopathy: pathophysiology and clinical diagnosis]. *Journal francais d'ophtalmologie*. 2014;37(7):557-65. Epub 2014/07/07. Prolifération vitreo-rétinienne : physiopathologie et diagnostic clinique.
170. Pastor JC. Proliferative vitreoretinopathy: an overview. *Survey of ophthalmology*. 1998;43(1):3-18. Epub 1998/08/26.
171. Pastor JC, de la Rúa ER, Martin F. Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. *Prog Retin Eye Res*. 2002;21(1):127-44. Epub 2002/03/22.
172. Leaver PK. Proliferative vitreoretinopathy. *The British journal of ophthalmology*. 1995;79(10):871-2. Epub 1995/10/01.
173. Laqua H, Machemer R. Glial cell proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). *American journal of ophthalmology*. 1975;80(4):602-18. Epub 1975/10/01.
174. Tosi GM, Marigliani D, Romeo N, et al. Disease pathways in proliferative vitreoretinopathy: an ongoing challenge. *Journal of cellular physiology*. 2014;229(11):1577-83. Epub 2014/03/08.
175. Charteris DG, Sethi CS, Lewis GP, et al. Proliferative vitreoretinopathy-developments in adjunctive treatment and retinal pathology. *Eye (Lond)*. 2002;16(4):369-74. Epub 2002/07/09.
176. Moysidis SN, Thanos A, Vavvas DG. Mechanisms of inflammation in proliferative vitreoretinopathy: from bench to bedside. *Mediators of inflammation*. 2012;2012:815937. Epub 2012/10/11.
177. Chassaing B, Srinivasan G, Delgado MA, et al. Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. *PLoS One*. 2012;7(9):e44328. Epub 2012/09/08.
178. Berard JL, Zarruk JG, Arbour N, et al. Lipocalin 2 is a novel immune mediator of experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis and is modulated in multiple sclerosis. *Glia*. 2012;60(7):1145-59. Epub 2012/04/14.
179. Hofmaier F, Hauck SM, Amann B, et al. Changes in matrix metalloproteinase network in a spontaneous autoimmune uveitis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(5):2314-20. Epub 2011/01/14.
180. Kobayashi T, Kim H, Liu X, et al. Matrix metalloproteinase-9 activates TGF-beta and stimulates fibroblast contraction of collagen gels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;306(11):L1006-15. Epub 2014/04/08.

181. Kubben FJ, Sier CF, Hawinkels LJ, et al. Clinical evidence for a protective role of lipocalin-2 against MMP-9 autodegradation and the impact for gastric cancer. *Eur J Cancer*. 2007;43(12):1869-76. Epub 2007/07/03.
182. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, et al. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem*. 2001;276(40):37258-65. Epub 2001/08/04.
183. Symeonidis C, Papakonstantinou E, Souliou E, et al. Correlation of matrix metalloproteinase levels with the grade of proliferative vitreoretinopathy in the subretinal fluid and vitreous during rhegmatogenous retinal detachment. *Acta ophthalmologica*. 2011;89(4):339-45. Epub 2009/09/22.
184. Zeng J, Jiang D, Zhu X, et al. [A quantitative study of matrix metalloproteinases in proliferative vitreoretinopathy]. *Yan ke xue bao = Eye science*. 2003;19(2):130-2. Epub 2003/07/23.
185. Kon CH, Occeleston NL, Charteris D, et al. A prospective study of matrix metalloproteinases in proliferative vitreoretinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1998;39(8):1524-9. Epub 1998/07/11.
186. Tassoni A, Gutteridge A, Barber AC, et al. Molecular Mechanisms Mediating Retinal Reactive Gliosis Following Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation. *Stem Cells*. 2015;33(10):3006-16. Epub 2015/07/16.
187. Lee S, Park JY, Lee WH, et al. Lipocalin-2 is an autocrine mediator of reactive astrocytosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(1):234-49. Epub 2009/01/09.
188. Eastlake K, Heywood WE, Banerjee P, et al. Comparative proteomic analysis of normal and gliotic PVR retina and contribution of Muller glia to this profile. *Experimental eye research*. 2018;177:197-207. Epub 2018/09/04.
189. Eastlake K, Banerjee PJ, Angbohang A, et al. Muller glia as an important source of cytokines and inflammatory factors present in the gliotic retina during proliferative vitreoretinopathy. *Glia*. 2016;64(4):495-506. Epub 2015/11/12.
190. Rubsam A, Parikh S, Fort PE. Role of Inflammation in Diabetic Retinopathy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4). Epub 2018/03/23.
191. Noma H, Mimura T, Yasuda K, et al. Role of inflammation in diabetic macular edema. *Ophthalmologica Journal international d'ophtalmologie International journal of ophthalmology Zeitschrift fur Augenheilkunde*. 2014;232(3):127-35. Epub 2014/10/25.
192. Suryavanshi SV, Kulkarni YA. NF-kappabeta: A Potential Target in the Management of Vascular Complications of Diabetes. *Front Pharmacol*. 2017;8:798. Epub 2017/11/23.
193. Guo H, Jin D, Chen X. Lipocalin 2 is a regulator of macrophage polarization and NF-kappaB/STAT3 pathway activation. *Mol Endocrinol*. 2014;28(10):1616-28. Epub 2014/08/16.
194. Bandello F, Lattanzio R, Zucchiatti I, et al. Pathophysiology and treatment of diabetic retinopathy. *Acta diabetologica*. 2013;50(1):1-20. Epub 2013/01/02.
195. Diaz-Coranguez M, Ramos C, Antonetti DA. The inner blood-retinal barrier: Cellular basis and development. *Vision research*. 2017;139:123-37. Epub 2017/06/18.
196. Du Y, Li W, Lin L, et al. Effects of lipocalin-2 on brain endothelial adhesion and permeability. *PLoS One*. 2019;14(7):e0218965. Epub 2019/07/04.

197. Koch AE, Halloran MM, Haskell CJ, et al. Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature*. 1995;376(6540):517-9. Epub 1995/08/10.
198. Funatsu H, Yamashita H, Sakata K, et al. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and intercellular adhesion molecule 1 are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2005;112(5):806-16. Epub 2005/05/10.
199. Chung JO, Park SY, Cho DH, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels are positively associated with diabetic retinopathy in patients with Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2016;33(12):1649-54. Epub 2016/04/22.
200. Sivaprasad S, Prevost AT, Vasconcelos JC, et al. Clinical efficacy of intravitreal aflibercept versus panretinal photocoagulation for best corrected visual acuity in patients with proliferative diabetic retinopathy at 52 weeks (CLARITY): a multicentre, single-blinded, randomised, controlled, phase 2b, non-inferiority trial. *Lancet*. 2017;389(10085):2193-203. Epub 2017/05/13.
201. Gross JG, Glassman AR, Jampol LM, et al. Panretinal Photocoagulation vs Intravitreal Ranibizumab for Proliferative Diabetic Retinopathy: A Randomized Clinical Trial. *Jama*. 2015;314(20):2137-46. Epub 2015/11/14.
202. Hernandez C, Segura RM, Fonollosa A, et al. Interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and IL-10 in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2005;22(6):719-22. Epub 2005/05/25.
203. Sassa Y, Yoshida S, Ishikawa K, et al. The kinetics of VEGF and MCP-1 in the second vitrectomy cases with proliferative diabetic retinopathy. *Eye (Lond)*. 2016;30(5):746-53. Epub 2016/02/27.
204. Yoshida S, Kubo Y, Kobayashi Y, et al. Increased vitreous concentrations of MCP-1 and IL-6 after vitrectomy in patients with proliferative diabetic retinopathy: possible association with postoperative macular oedema. *Br J Ophthalmol*. 2015;99(7):960-6. Epub 2015/01/30.
205. Heier JS, Brown DM, Chong V, et al. Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2012;119(12):2537-48. Epub 2012/10/23.
206. Martin DF, Maguire MG, Ying GS, et al. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*. 2011;364(20):1897-908. Epub 2011/04/30.
207. Dixon JA, Oliver SC, Olson JL, et al. VEGF Trap-Eye for the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Expert opinion on investigational drugs*. 2009;18(10):1573-80. Epub 2009/08/22.
208. Lowe J, Araujo J, Yang J, et al. Ranibizumab inhibits multiple forms of biologically active vascular endothelial growth factor in vitro and in vivo. *Experimental eye research*. 2007;85(4):425-30. Epub 2007/08/24.
209. Brown DM, Kaiser PK, Michels M, et al. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*. 2006;355(14):1432-44. Epub 2006/10/06.
210. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*. 2006;355(14):1419-31. Epub 2006/10/06.
211. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET, Jr., et al. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*. 2004;351(27):2805-16. Epub 2004/12/31.

212. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, et al. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(17):11393-8. Epub 2002/08/15.
213. Kita T, Clermont AC, Murugesan N, et al. Plasma Kallikrein-Kinin System as a VEGF-Independent Mediator of Diabetic Macular Edema. *Diabetes*. 2015;64(10):3588-99. Epub 2015/05/17.
214. Srividya G, Jain M, Mahalakshmi K, et al. A novel and less invasive technique to assess cytokine profile of vitreous in patients of diabetic macular oedema. *Eye (Lond)*. 2018;32(4):820-9. Epub 2018/01/06.
215. Zhang Y, Lai BS, Juhas M. Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications. *Molecules*. 2019;24(5). Epub 2019/03/15.
216. Zhou J, Rossi J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(3):181-202. Epub 2016/11/04.
217. Yoon SY, Gee G, Hong KJ, et al. Application of aptamers for assessment of vaccine efficacy. *Clin Exp Vaccine Res*. 2017;6(2):160-3. Epub 2017/08/05.
218. Rezzola S, Nawaz MI, Cancarini A, et al. Vascular Endothelial Growth Factor in the Vitreous of Proliferative Diabetic Retinopathy Patients: Chasing a Hiding Prey? *Diabetes care*. 2019;42(7):e105-e6. Epub 2019/06/22.
219. Sumner G, Georgaros C, Rafique A, et al. Anti-VEGF drug interference with VEGF quantitation in the R&D systems human quantikine VEGF ELISA kit. *Bioanalysis*. 2019;11(5):381-92. Epub 2019/03/21.
220. Takahashi H, Nomura Y, Nishida J, et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Concentration Is Underestimated by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the Presence of Anti-VEGF Drugs. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(2):462-6. Epub 2016/02/13.
221. Cerchia L, Giangrande PH, McNamara JO, et al. Cell-specific aptamers for targeted therapies. *Methods Mol Biol*. 2009;535:59-78. Epub 2009/04/21.
222. J H. A therapeutic battle: Antibodies vs. Aptamers. Available from: www.rug.nl/research/zernike/education/topmasternanoscience/programme-documents/ns190papers/ns_190_hidding-atherapeuticbattleantibodiesvs.aptamers.pdf.
223. Zhu G, Niu G, Chen X. Aptamer-Drug Conjugates. *Bioconjugate chemistry*. 2015;26(11):2186-97. Epub 2015/06/18.
224. Lee JF, Stovall GM, Ellington AD. Aptamer therapeutics advance. *Current opinion in chemical biology*. 2006;10(3):282-9. Epub 2006/04/20.
225. Deuchler S, Singh P, Muller M, et al. Dealings between Cataract and Retinal Reattachment Surgery in PVR. *Journal of ophthalmology*. 2016;2016:2384312. Epub 2016/04/02.
226. Lee KA, Ahn JY, Lee SH, et al. Aptamer-based Sandwich Assay and its Clinical Outlooks for Detecting Lipocalin-2 in Hepatocellular Carcinoma (HCC). *Scientific reports*. 2015;5:10897. Epub 2015/06/04.
227. Batsos G, Christodoulou E, Vartholomatos G, et al. Vitreous levels of Lipocalin-2 on patients with primary rhegmatogenous retinal detachment. *PLoS One*. 2019;14(12):e0227266. Epub 2020/01/01.