



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ & ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ
ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΜΒΟΛΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ
ΥΠΟΠΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ ΓΙΑ ΤΟ
ΨΕΥΔΟΑΠΟΦΟΛΙΔΩΤΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΣΤΗΝ ΗΠΕΙΡΟ**

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Κ. ΧΗΡΑΣ
ΟΦΘΑΛΜΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα. Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Ημερομηνία αίτησης του κ. Χήρα Δημητρίου: 11-9-2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 592^α/24-10-2006

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Κίτσος Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Οφθαλμολογίας

Μέλη

Στεφανιώτου Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας

Petersen Michael, Professor Klinisk Genetisk Afdeling Aalborg University Hospital Denmark

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 30-5-2007

«Προσδιορισμός της συμβολής των μεταλλαγών υπόπτων γονιδίων με γενετική προδιάθεση για το ψευδοαποφολιδωτικό σύνδρομο στην Ηπειρο».

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 752^α/16-5-2013

1. Ασπιώτης Μιλτιάδης, Καθηγητής Οφθαλμολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Ασπρούδης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Οφθαλμολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Καλογερόπουλος Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής Οφθαλμολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Κίτσος Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Οφθαλμολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Κρούπης Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Αθηνών
6. Petersen Michael, Professor Klinisk Genetisk Afdeling Aalborg University Hospital Denmark
7. Στεφανιώτου Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 20-6-2013

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Τζαφλίδου Μαργαρίτα

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιικής



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη οφείλω στον επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής, αναπληρωτή καθηγητή Οφθαλμολογίας στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων κ. Γεώργιο Κίτσο, που με την επιμονή του και την αστείρευτη του ενέργεια και γνώση με βοήθησε να ολοκληρώσω την εργασία αυτή.

Θερμές ευχαριστίες για την ανεκτίμητη συμβολή του στον καθηγητή Κλινικής Γενετικής στο Πανεπιστήμιο Aalborg της Δανίας κ. Michael B. Petersen. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Μαρία Στεφανιώτου, αναπληρώτρια καθηγήτρια Οφθαλμολογίας στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, για την συμβολή της και τις εύστοχες παρατηρήσεις της κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Χρήστο Κρούπη, επίκουρο καθηγητή Κλινικής Βιοχημείας – Μοριακής Διαγνωστικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για την επιστημονική του καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, δίνοντας μου την δυνατότητα να εξοικειωθώ με τεχνικές του κλινικού βιοχημικού εργαστηρίου, αλλά και για την καλή του διάθεση και συνεργασία.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή της Οφθαλμολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων καθηγητή κ. Μιλτιάδη Ασπιώτη και την Διευθύντρια του Εργαστηρίου Κλινικής Βιοχημείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου ΑΤΤΙΚΟΝ επίκουρη καθηγήτρια κα. Κ. Δήμα, για την φιλοξενία στην κλινική και στον εργαστηριακό χώρο των νοσοκομείων. Να ευχαριστήσω θερμά την βιολόγο κα. Μαρία Γρηγοριάδου, την απόφοιτη του μεταπτυχιακού προγράμματος ειδίκευσης στην Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική Κωνσταντίνα Τζήκα, την μεταδιδακτορική υπότροφο Samantha Oliveira και τον βιολόγο Δρ. Χάρη Κόκοτα για την ανεκτίμητη βοήθειά τους στην εκμάθηση των τεχνικών και την συμβολή τους στην πραγματοποίηση των γενετικών αναλύσεων.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την κα. Αναστασία Καστανιά, διδάσκουσα στο Οικονομικό Πανεπιστήμιο Αθηνών για την πολύτιμη προσφορά στην οργάνωση και την ανάλυση των αποτελεσμάτων της έρευνας.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην αναφέρω και να μην ευχαριστήσω τον Συντονιστή Διευθυντή μου, οφθαλμίατρο Δρ. Κωνσταντίνο Ρούγγα στο Νοσοκομείο Άγιο Σάββα, για το αμέριστο ενδιαφέρον και τη συμβολή στην διόρθωση της διατριβής.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την συμμετοχή και την διόρθωση της διατριβής αυτής.

Ευχαριστώ όλους τους ασθενείς με ψευδοαποφολίδωση για τη δωρεά του αίματός τους και την συμμετοχή τους στην εθνική αυτή έρευνα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την αδερφή μου Ερατώ και τους γονείς μου Κωνσταντίνο και Αγγελική για την ουσιαστική στήριξη και συμπαράσταση που μου παρείχαν καθ'όλη την διάρκεια των σπουδών μου και στους οποίους αφιερώνω τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το ψευδοαποφολιδωτικό σύνδρομο (Ψ/Α.Σ) αποτελεί το πιο συχνά προσδιορισμένο αίτιο χρόνιου γλαυκώματος ανοικτής γωνίας (Ψ/Α.Γ: ψευδοαποφολιδωτικό γλαύκωμα) παγκοσμίως. Παρά την εκτεταμένη έρευνα, η ακριβής αιτιοπαθογένειά του παραμένει μέχρι και σήμερα άγνωστη.

Πρέπει να τονιστεί ότι το Ψ/Α.Γ αποτελεί σημαντική απειλή για την όραση, καθώς η πρόγνωση είναι επιβαρημένη, η εξέλιξη ταχεία και η ανάγκη για χειρουργική επέμβαση είναι συχνότερη από ότι στο πρωτοπαθές γλαύκωμα ανοικτής γωνίας.

Το Ψ/Α.Σ και το Ψ/Α.Γ φαίνεται να παρουσιάζουν ισχυρό οικογενή χαρακτήρα χωρίς ωστόσο να είναι εμφανής ένας απλός τρόπος κληρονομικότητας, προτείνοντας ένα σύνθετο μοντέλο κληρονομικότητας στο οποίο συμβάλλουν πολλαπλά γονίδια και περιβαλλοντικοί παράγοντες.

Στην Ελλάδα και ειδικότερα στην Ήπειρο έχει βρεθεί υψηλή συχνότητα Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ. Κατά συνέπεια, το Ψ/Α.Γ αναπόφευκτα επιφέρει μεγάλη επιβάρυνση για τον ασθενή, τον κοινωνικό του περίγυρο και τα συστήματα κοινωνικής ασφάλισης. Η αναγνώριση γενετικών παραγόντων που προδιαθέτουν για τη νόσο μπορεί να συμβάλει στον καθορισμό των ομάδων αυξημένου κινδύνου, οι οποίες και χρήζουν τακτικότερης παρακολούθησης με στόχο την πρόωπη διάγνωση της νόσου. Επίσης, οι γενετικοί πολυμορφισμοί μπορεί να παίξουν σημαντικό ρόλο και αναφορικά με τη θεραπεία, στα πλαίσια φαρμακογενωμικών προσεγγίσεων.

Η γενετική του γλαυκώματος αποτελεί ένα σύγχρονο και θελκτικό αντικείμενο έρευνας. Τα τελευταία χρόνια με την ανίχνευση – χαρτογράφηση γονιδιακών θέσεων και γονιδίων έχει αναδειχτεί σημαντικός ο ρόλος της γενετικής στο Γλαύκωμα. Στην κατεύθυνση αυτή συνέβαλε και η δημοσίευση ερευνών για το πρωτοπαθές γλαύκωμα ανοικτής γωνίας από την Πανεπιστημιακή Οφθαλμολογική Κλινική Ιωαννίνων. Για τον προσδιορισμό της συμβολής γενετικών παραγόντων κινδύνου για το Ψ/Α.Σ και το Ψ/Α.Γ πραγματοποιούνται γενετικές μελέτες σε διάφορους εθνικούς πληθυσμούς. Το 2007, δημοσιεύθηκε στο περιοδικό Science μία μελέτη που αποτέλεσε σημαντικό βήμα για την καλύτερη κατανόηση του Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ, αφού ανακαλύφθηκε ιδιαίτερα ισχυρή σύνδεση μεταξύ των δύο καταστάσεων και ενός συγκεκριμένου γονιδίου σε

σκανδιναβικούς πληθυσμούς. Η σύνδεση αυτή επιβεβαιώθηκε μετά από πολλές μελέτες σε διαφορετικούς πληθυσμούς παγκοσμίως, αποδεικνύοντας έναν κύριο γενετικό παράγοντα κινδύνου για το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ.

Με την παρούσα εργασία, για πρώτη φορά στη Ελλάδα, αξιολογείται η συμβολή μεταλλαγών - πολυμορφισμών ύποπτων γονιδίων με γενετική προδιάθεση για το ψευδοαποφολιδωτικό σύνδρομο και γλαύκωμα σε πληθυσμό από την Ήπειρο.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΨΕΥΔΟΑΠΟΦΟΛΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ-ΓΛΑΥΚΩΜΑΤΟΣ.....	5
2. ΚΛΙΝΙΚΑ, ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΨΕΥΔΟΑΠΟΦΟΛΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ-ΓΛΑΥΚΩΜΑΤΟΣ....	15
3. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΨΕΥΔΟΑΠΟΦΟΛΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ-ΓΛΑΥΚΩΜΑΤΟΣ	35
— Το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης E (<i>APOE</i>)	40
— Το γονίδιο της μεθυλενοτετραϋδροφυλλικής αναγωγάσης (<i>MTHFR</i>).....	42
— Το γονίδιο της οξειδάσης της λυσίνης like1 (<i>LOXLI</i>)	44
4. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ-ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ	52
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	66

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	67
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	107
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	143
ΥΠΟΜΝΗΜΑΤΑ Α Β.....	151
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	155
ABSTRACT.....	157
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	159

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΨΕΥΔΟ/

ΑΠΟΦΟΛΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ - ΓΛΑΥΚΩΜΑΤΟΣ

Εισαγωγή

Το ψευδοαποφολιδωτικό σύνδρομο (Ψ/Α.Σ, PXFS ή PEXS, pseudoexfoliation syndrome) είναι μια συσχετιζόμενη με την ηλικία γενικευμένη διαταραχή της εξωκυττάριας ουσίας. Χαρακτηρίζεται από την παραγωγή και την προοδευτική συγκέντρωση ενός ινώδους υλικού, το οποίο ονομάζεται ψευδοαποφολιδωτικό υλικό (Ψ/Α ή PEX υλικό), στους οφθαλμικούς ιστούς, καθώς επίσης στο δέρμα και στον συνδετικό ιστό διαφόρων σπλαχνικών οργάνων^{1,2}.

Το Ψ/Α.Σ αποτελεί μία εκτεταμένη εκφυλιστική κατάσταση, που παρουσιάζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 40-50 ετών και χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση ουσίας ασαφούς προελεύσεως και υφής στο περιφάκιο, στο επιθήλιο της ίριδας και στο κορικό χείλος, στο ακτινωτό σώμα, στη ζίννειο ζώνη και στο διηθητικό ηθμό. Η κατ' εξοχήν κλινική εικόνα είναι η εναπόθεση στο πρόσθιο περιφάκιο και στο κορικό χείλος μιας κοκκιώδους ουσίας η οποία μπορεί να παραμένει είτε με την μορφή γκριζόλευκων φολίδων είτε ως μεμβρανόμορφος σχηματισμός^{1,2}.

Το Ψ/Α.Σ αποτελεί το πιο συχνά προσδιορισμένο αίτιο χρόνιου γλαυκώματος ανοικτής γωνίας, γνωστό ως ψευδοαποφολιδωτικό γλαύκωμα (Ψ/Α.Γ, PXFG ή PEXG, pseudoexfoliation glaucoma) το οποίο κατέχει το 25% και πλέον του συνόλου των χρονίων γλαυκωμάτων ανοικτής γωνίας παγκοσμίως^{3, 4}. Πρέπει να τονιστεί ότι το Ψ/Α.Γ αποτελεί σημαντική απειλή για την όραση, καθώς διαφέρει από το κλασσικό πρωτοπαθές γλαύκωμα ανοικτής γωνίας (ΠΓΑΓ, POAG) ως προς τα κλινικά χαρακτηριστικά, πορεία και πρόγνωση. Η πρόγνωση είναι χειρότερη σε σχέση με το ΠΓΑΓ, διότι η διακύμανση της 24ωρης ενδοφθάλμιας πίεσης (ΕΟΠ) είναι πιο μεγάλη, η βλάβη του οπτικού νεύρου και των οπτικών πεδίων είναι πιο σοβαρή κατά την διάγνωση, με ταχύτερη εξέλιξη και η ανάγκη για χειρουργική επέμβαση είναι πιο συχνή. Επιπλέον, οι εκφυλιστικές αλλοιώσεις που προκαλούνται στους οφθαλμικούς ιστούς από την εναπόθεση του Ψ/Α υλικού προκαλούν μεταξύ άλλων συχνότερη εμφάνιση καταρράκτη, ενώ αυξάνουν και τον κίνδυνο επιπλοκών

κατά την διάρκεια της εγχείρησης του καταρράκτη³. Τέλος, το Ψ/Α.Σ συνδέεται αιτιολογικά με συστηματικές παθήσεις οι οποίες είναι στο επίκεντρο ερευνών που στοχεύουν στον προσδιορισμό των επιπτώσεων της συστηματικής διάστασης της πάθησης στην συνολική υγεία αυτής της ομάδας ασθενών⁴.

Πολλοί οφθαλμίατροι ακόμα και σήμερα πιστεύουν ότι το Ψ/Α.Σ απαντάται κυρίως σε ορισμένες χώρες, αλλά στην πραγματικότητα εντοπίζεται σε άτομα από σχεδόν όλες τις γεωγραφικές περιοχές του κόσμου και με υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης απ' όσο είχε αρχικώς εκτιμηθεί^{5, 6}. Αυτό σε συνδυασμό με την έλλειψη ενδιαφέροντος και εξειδικευμένης γνώσης για το νόσημα οδηγεί συχνά στην παράβλεψη ή λανθασμένη αναγνώριση του Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ.

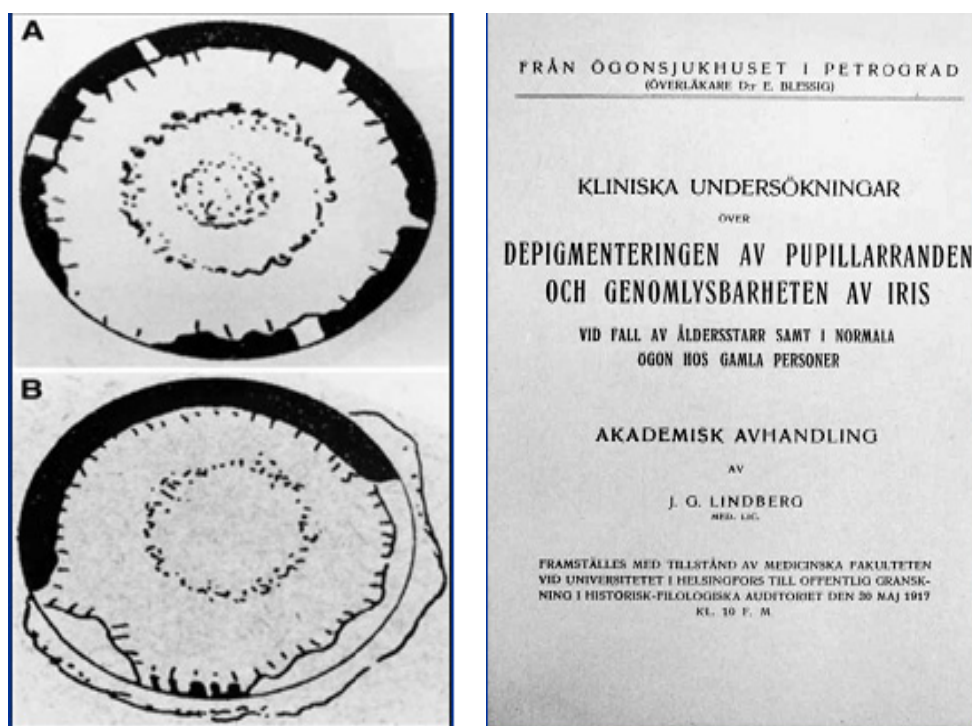
Όλα τα παραπάνω δείχνουν πόσο σημαντικό είναι για το καλό των ασθενών η αναγνώριση και καλύτερη κατανόηση του Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ εκ μέρους των οφθαλμιάτρων. Τέλος, είναι γνωστό ότι πολλοί όροι χρησιμοποιήθηκαν για να περιγράψουν αυτή την κατάσταση. Οι όροι αποφολίδωση και ψευδοαποφολίδωση (Ψ/Α) χρησιμοποιούνται το ίδιο συχνά στην έρευνα και στις δημοσιεύσεις παγκοσμίως.

Ιστορική αναδρομή του Ψ/Α.Σ

Ο πρώτος οφθαλμίατρος που παρατήρησε και περιέγραψε το φαινόμενο της Ψ/Α ήταν ο Lindberg, φιλανδικής καταγωγής, ο οποίος ξεκίνησε την έρευνά του το 1914⁷. Στόχος του ήταν η αποσαφήνιση των παρατηρήσεων του Axenfeld πάνω στις αλλοιώσεις της ίριδας στους οφθαλμούς ηλικιωμένων ατόμων. Ο Axenfeld περιέγραψε δύο τύπους εκφύλισης της ίριδας: α) την υαλώδη εκφύλιση του κορικού χείλους της ίριδος που προκαλεί μειωμένη μυδρίαση της κόρης και β) την ατροφία του μελάγχρου επιθηλίου στο κορικό χείλος της ίριδας. Για την έρευνά του ο Lindberg έπρεπε να κατασκευάσει μια σχισμοειδή λυχνία, βασιζόμενος στο προσχέδιο του Gullstrad, εφ' όσον δεν ήταν εμπορικά διαθέσιμη εκείνη την περίοδο. Ο Lindberg κατά τη διεξαγωγή της έρευνάς του, παρατήρησε ελαφρά γκρίζες φολίδες στο κορικό χείλος. Επίσης, παρατήρησε ότι αυτό το παράξενο υλικό σχημάτιζε μια μεμβράνη στην πρόσθια επιφάνεια του φακού. Το φαινόμενο αυτό ήταν εξίσου συχνό σε ασθενείς με ή χωρίς καταρράκτη, ηλικίας άνω των 55 ετών. Επίσης,

παρατηρήθηκε στο 50% των ασθενών με γλαύκωμα. Η ηλικία ήταν καθοριστικός παράγοντας, καθώς η συχνότητα του φαινομένου που περιέγραψε ήταν αυξημένη στα ηλικιωμένα άτομα. Όλες του οι παρατηρήσεις συνοδεύτηκαν από επιδέξια χειρόγραφα σχέδια (εικόνα 1.1, αριστερά). Τα κύρια συμπεράσματα του Lindberg πάνω στην Ψ/Α είναι έγκυρα και αναγνωρίζονται μέχρι και σήμερα.

Ο Lindberg παρουσίασε τη διδακτορική του διατριβή στο Πανεπιστήμιο του Ελσίνκι το 1917 (εικόνα 1.1, δεξιά). Το 1921, συμμετέχοντας σε ένα συνέδριο Οφθαλμολογίας στην Βόρεια Ευρώπη, γνώρισε έναν Νορβηγό οφθαλμίατρο τον Birger Malling και του έδωσε την διατριβή του εξηγώντας τα νέα του ευρήματα. Μεταξύ 1920-21, εργάστηκε στην κλινική του Axenfeld στο Freiburg της Γερμανίας. Αυτή την περίοδο, συνάντησε στην Βασιλεία της Ελβετίας έναν Ελβετό οφθαλμίατρο τον Alfred Vogt στον οποίο έδωσε επίσης την διατριβή του. Ο Malling και ο Vogt ωστόσο, δημοσίευσαν μελέτες πάνω στην Ψ/Α χωρίς να αναφέρονται στην έρευνα του Lindberg^{6,7}.



Εικόνα 1.1: Αριστερά: Περιγραφή της Ψευδοαποφολίδωσης με χειρόγραφα σχέδια από τον Lindberg⁷. Δεξιά: Η διδακτορική διατριβή του Lindberg με τα συμπεράσματά του πάνω στην Ψευδοαποφολίδωση το 1917⁷.

Το 1923, ο Malling σε δημοσίευσή του συνέδεσε την παρουσία των γκριζόλευκων φολίδων με την ύπαρξη αυξημένης ενδοφθάλμιας πίεσης. Το 1925, ο Vogt επίσης συσχέτισε την ψευδοαποφολιδώση με την αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης θεωρώντας ότι το ψευδοαποφολιδωτικό υλικό προερχόταν από το πρόσθιο περιφακίο, «Exfoliatio superficiale capsulae anterioris» και έδωσε τον χαρακτηρισμό «αποφολιδωτικό γλαύκωμα». Ο Busacca, ήταν της άποψης ότι οι φολίδες και ο μεμβρανόμορφος σχηματισμός στην πρόσθια επιφάνεια του φακού προερχόταν από ουσίες που βρίσκονταν φυσιολογικά στο υδατοειδές υγρό. Το 1934, ο Bertelsen έκρινε πιο δόκιμη την έκφραση ινιδοπάθεια του επιθηλίου του προσθίου περιφακίου, «fibrillopathia epitheliocapsularis», για την περιγραφή του νοσήματος. Το 1937, ο Hørgven διατύπωσε την άποψη ότι η παρουσία των φολίδων στις ίνες της Ζιννείου ζώνης αποτελούσε σταθερό εύρημα του συνδρόμου. Το 1954, η Giorgianna Theobald διατύπωσε την άποψη ότι το γκριζόλευκο υλικό δεν προερχόταν από το περιφακίο αλλά ότι ήταν προϊόν εναποθέσεων ή/και εκκρίσεων. Για το λόγο αυτό πρότεινε τον όρο «ψευδοαποφολιδώση» σε αντιδιαστολή με την πραγματική αποφολιδώση του περιφακίου που συνέβαινε σε περιβάλλον με υψηλή θερμοκρασία όπως κατά την παραγωγή υαλικών. Το 1956, ο Sunde μίλησε για «αποφολιδωτικό σύνδρομο» καθώς έρευνες με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κατέδειξαν την παρουσία του υλικού σε διάφορα σημεία του προσθίου ημιμορίου του οφθαλμού. Το 1959, ο Sampaolesi μελετώντας τη γωνία του προσθίου θαλάμου, διαπίστωσε την αυξημένη συχνότητα παρουσίας χρωστικής από το μελάγχρου επιθήλιο της ίριδας άνωθεν της γραμμής του Schwalbe. Το 1961, ο Simon Torr χρησιμοποίησε τον όρο «σύνθετο χρωστικό γλαύκωμα» με σκοπό να υπογραμμίσει την διαφορά του από το πρωτοπαθές χρωστικό γλαύκωμα^{6,7}.

Από ελληνικής πλευράς, πολλοί είναι οι μελετητές του συνδρόμου. Το 1932, ο Τράντας θεώρησε ότι οι παρατηρούμενες αλλοιώσεις ήταν αποτέλεσμα γεροντικής εκφύλισης και συνέδεσε την παρουσία τους με παθολογικές μεταβολές στο αποχετευτικό δίκτυο της γωνίας του προσθίου θαλάμου. Οι Ιωαννίδης, Κατσουράκης, Βελησσαρόπουλος (1961) μελέτησαν το αποφολιδωτικό γλαύκωμα, η Στεφανιώτου και Κοζομπόλης μελέτησαν την επιδημιολογία του Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ στην Ήπειρο και την Κρήτη αντίστοιχα και ο Κώνστας ασχολήθηκε κυρίως με την παθογένεια του Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ και την θεραπεία του Ψ/Α.Γ.

Από το 1917 έως το 1990 είχαν δημοσιευτεί μόνο 223 διεθνείς μελέτες σχετικά με την Ψ/Α, ενώ από το 1990 έως και σήμερα οι μελέτες είναι πάνω από περίπου 1400 εκ των οποίων οι 520 δημοσιευμένες την τελευταία πανταετία. Σε αυτήν την αύξηση ενδιαφέροντος συνέβαλαν πρόσφατες ανακαλύψεις για την γενετική αιτιολογία του Ψ/Α.Σ. Πλέον, με την υπάρχουσα τεχνολογία και την συνεργασία οφθαλμιάτρων, γενετιστών και μοριακών βιολόγων γίνονται μεγάλα βήματα για την καλύτερη κατανόηση αυτής της σύνθετης, με γενετική βάση, κατάστασης.

Επιδημιολογία του Ψ/Α.Σ και του Ψ/Α.Γ

Ανατρέχοντας κανείς στην βιβλιογραφία θα διαπιστώσει σωρεία αντικρουόμενων απόψεων και δεδομένων ως προς τη συχνότητα εμφάνισης του Ψ/Α.Σ στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές (πίνακας 1.1). Αυτό οφείλεται: 1) σε πραγματικές διαφορές στις συχνότητες, εξαιτίας εθνικών, φυλετικών καθώς και άλλων μη γνωστών παραγόντων, 2) στη διαφορετική κατανομή των ομάδων ασθενών ως προς την ηλικία και το φύλο, 3) στα διαφορετικά κλινικά κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διάγνωση του Ψ/Α.Σ, 4) στην ικανότητα του εξεταστή ιατρού να ανιχνεύσει τα σημεία της πάθησης σε πρώιμα στάδια και 5) στην σχολαστικότητα του εξεταστή. Επιπλέον, σημαντικό είναι ότι η διάγνωση εύκολα παραβλέπεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10% εάν η εξέταση του ασθενούς δεν γίνει κατόπιν διαστολής της κόρης.

Οι επιδημιολογικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί, περιλαμβάνουν διαφορετικούς πληθυσμούς όπως: γενικό πληθυσμό, άτομα πάνω από μία συγκεκριμένη ηλικία, ασθενείς από οφθαλμολογικές ή γενικές κλινικές, ασθενείς με καταρράκτη και ασθενείς με γλαύκωμα υπο αγωγή ή που υποβάλλονται σε χειρουργική επέμβαση. Αυτές οι διαφορές έχουν προκαλέσει σύγχυση και πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν όταν συγκρίνονται μελέτες. Η συχνότητα του Ψ/Α.Σ αυξάνει προοδευτικά στις παρακάτω ομάδες: 1) γενικό πληθυσμό, 2) άτομα ηλικίας άνω των 50 ετών, 3) άτομα με οφθαλμική υπερτονία, 4) ασθενείς με γλαύκωμα, 5) ασθενείς με γλαύκωμα που εισάγονται στο νοσοκομείο, 6) ασθενείς με γλαύκωμα που υποβάλλονται σε χειρουργική επέμβαση, 7) ασθενείς με απόλυτο γλαύκωμα⁶.

Πίνακας 1.1: Συχνότητα του Ψ/Α.Σ σε διάφορες εθνότητες.

Τοποθεσία	Ηλικία	Συχνότητα	Αναφορές
Αυστραλία (Aborigines)	>60	16,3%	Taylor και συν. 1977
Αυστραλία (Blue Mountain)	>48	2,3%	Mitchell και συν. 1999 ³⁷
Αυστραλία (Victoria)	>39	0,98%	Mccarty & Taylor 2000
Κεντρική Σουηδία	65-74	18,0%	Ekström 1987
Βόρεια Σουηδία	66	23,0%	Aström και συν. 2007
Βόρεια Σουηδία	87	61,0%	Aström και συν. 2007
Ισλανδία (Reykjavik)	>49	10,3%	Jonasson και συν. 2003 ¹⁴
Ισλανδία (Reykjavik Eye Study)	50-59 ≥80	2,5% 40,6%	Arnarsson και συν. 2007
Κεντρική Νορβηγία	>64	16,9%	Ringvold και συν. 1988
Φιλανδία (Oulu)	>70	22,1%	Hirvelä και συν. 1995
Ιαπωνία	>39	1,2%	Futa και συν. 1992
Κεντρικό Ιράν	>49	13,1%	Nouri-Mahdavi και συν. 1999
Νότια Ινδία	>39	6,0%	Krishnadas και συν. 2003
Chinese Singaporean	>39	0,2%	Foster & Seah 2005
Νότια Αφρική (Hlabisa/Temba)	>39	7,7/6,0%	Rotchford και συν. 2003
Ελλάδα (Ηπειρος)	>50	24,3%	Stefaniotou και συν. 1990 ⁸
Ελλάδα (Κρήτη)	>39	16,1%	Kozobolis και συν. 1997 ⁹
Ελλάδα (Θεσσαλονίκη)	55-59	5,4%	Bufidis 1998

➤ Συχνότητα του Ψ/Α.Σ στο γενικό πληθυσμό

Το Ψ/Α.Σ απαντάται σχεδόν σε όλες τις γεωγραφικές περιοχές του κόσμου με ποσοστά συχνότητας, σε άτομα ηλικίας 60 ετών και άνω, τα οποία ποικίλουν από 10%-20% περίπου. Αυτό που πρέπει πάλι να σημειωθεί είναι ότι τα αναφερόμενα ποσοστά συχνότητας του Ψ/Α.Σ σε μία γεωγραφική περιοχή εξαρτώνται και από την ικανότητα-σχολαστικότητα του εξεταστή. Συνεπώς, είναι πιο αξιοσημείωτη η σύγκριση επιδημιολογικών μελετών που διεξήχθησαν σε διαφορετικούς πληθυσμούς από τον ίδιο εξεταστή. Ο Aasved βρήκε ποσοστά συχνότητας Ψ/Α.Σ: 6,3%, 4% και 4,7% σε άτομα που φιλοξενούνταν σε οίκους ευγηρίας ηλικίας άνω των 60 ετών στην Νορβηγία, Αγγλία και Γερμανία αντίστοιχα. Ο Forsius, εξετάζοντας άτομα ηλικίας άνω των 60 ετών διαφορετικών πληθυσμών, βρήκε ποσοστά συχνότητας που ανέρχονταν από 0% σε Εσκιμώους της Γροιλανδίας έως 20% σε Ισλανδούς. Ο Lantukh βρήκε χαμηλά ποσοστά σε γηγενείς της Σιβηρίας, αλλά αρκετά υψηλότερα σε εσωτερικούς μετανάστες της περιοχής. Στις ΗΠΑ τα αναφερόμενα ποσοστά συχνότητας του Ψ/Α.Σ είναι παρόμοια με τα αντίστοιχα της Δυτικής Ευρώπης. Στην Framingham Eye Study, η συχνότητα σε γενικό πληθυσμό ήταν 0,6% σε άτομα ηλικίας μεταξύ 52-64 και 5% μεταξύ 75-84. Στις νότιες ΗΠΑ, το ποσοστό σε 2121 άτομα γενικού Καυκάσιου πληθυσμού άνω των 60 ετών ήταν 1,6% ενώ σε Αφροαμερικανούς ήταν ακόμα χαμηλότερο⁶.

Το Ψ/Α.Σ απαντάται συχνά στην Ελλάδα. Στην Ήπειρο, οι Στεφανιώτου⁸ και συν. μελέτησαν τη συχνότητα εμφάνισης του Ψ/Α.Σ. Σε 700 άτομα, εκ των οποίων μία ομάδα νοσοκομειακού και μία ομάδα γενικού πληθυσμού, ηλικίας άνω ή ίσης των 50 ετών, βρέθηκαν τα εξής: Ψ/Α.Σ στο 24,3%, η συχνότητα εμφάνισης αυξήθηκε προοδευτικά με την ηλικία, διαφορά μεταξύ των δύο φύλων δεν παρατηρήθηκε ενώ οφθαλμική υπερτονία βρέθηκε στο 39,5% των ατόμων. Στην Κρήτη, οι Κοζομπόλης⁹ και συν. βρήκαν τη συχνότητα του Ψ/Α.Σ σε άτομα γενικού πληθυσμού άνω των 40 ετών να είναι 16,1%. Η συχνότητα του Ψ/Α.Σ στην Ήπειρο και την Κρήτη είναι από τις υψηλότερες που έχουν καταγραφεί παγκοσμίως, παρόμοια με τις αντίστοιχες συχνότητες στην Σκανδιναβία.

Η συχνότητα του Ψ/Α.Σ μπορεί επίσης να ποικίλει στην ίδια ευρύτερη γεωγραφική περιοχή, σε όμοιο περιβάλλον και σε κοντινές αποστάσεις. Στους τέσσερις νομούς της Κρήτης, ο Κοζομπόλης⁹ βρήκε Ψ/Α.Σ σε ποσοστό από 11,5%

έως 27% σε άτομα ηλικίας άνω των 40. Ο Ringvold¹⁰ βρήκε ποσοστά 10,2%, 19,6%, και 21% σε τρεις συνορεύοντες δήμους στην Νορβηγία. Στο Νέο Μεξικό, οι Ισπανοαμερικανοί είχαν έξι φορές παραπάνω πιθανότητα να αναπτύξουν Ψ/Α.Σ σε σχέση με τους μη Ισπανοαμερικανούς. Στην Αυστραλία άτομα προερχόμενα από την Ελλάδα, τις Βόρειες χώρες και την Ινδία βρέθηκε ότι ήταν πιο πιθανό να πάσχουν από Ψ/Α.Σ^{5, 6}.

Τα αίτια για τις πραγματικές διαφορές στις συχνότητες ανάμεσα σε παρόμοιας ηλικίας γεωγραφικούς και εθνικούς πληθυσμούς παραμένουν άγνωστα αλλά φαίνεται να αφορούν στην γενετική ποικιλομορφία του συνδρόμου ή και στις περιβαλλοντικές επιδράσεις^{11, 12}.

➤ Ηλικία

Απ' όλες τις μελέτες αποδεικνύεται ότι η συχνότητα του Ψ/Α.Σ αυξάνεται με την ηλικία. Επίσης, ασθενείς με Ψ/Α.Σ και γλαύκωμα τείνουν να είναι μεγαλύτεροι ηλικιακά από τα άτομα με Ψ/Α.Σ χωρίς γλαύκωμα. Ο Forsius βρήκε ότι η συχνότητα του Ψ/Α.Σ διπλασιάζεται για κάθε δεκαετία μετά την ηλικία των 50 ετών^{6, 12}.

➤ Φύλο

Σε κάποιες μελέτες οι γυναίκες φαίνεται να εμφανίζουν πιο συχνά Ψ/Α.Σ ενώ σε άλλες βρέθηκε ίδια κατανομή στα δύο φύλα ή συχνότερη εμφάνιση στους άντρες. Παρόλ' αυτά, το γλαύκωμα μπορεί να αναπτύσσεται συχνότερα και σε σοβαρότερο βαθμό στους άντρες^{6, 12}.

➤ Συχνότητα του Ψ/Α.Σ στο γλαυκωματικό πληθυσμό

Η συχνότητα του Ψ/Α.Σ σε γλαυκωματικούς ασθενείς είναι σημαντικά υψηλότερη από ότι σε μη γλαυκωματικούς της ίδιας ηλικίας. Τα ποσοστά συχνότητας ποικίλουν, στην Ισλανδία μεταξύ 46-57%, στην Φιλανδία μεταξύ 28%-47%, στην Νορβηγία μεταξύ 33%-60%, στην Σουηδία 66% και στην Δανία 26%. Στην Ιρλανδία τα 2/3 των ασθενών με γλαύκωμα ανοιχτής γωνίας είχαν Ψ/Α.Σ^{6, 13-15}. Προκύπτει μία υψηλότερη συχνότητα Ψ/Α.Σ σε γλαυκωματικό πληθυσμούς κελτικής προέλευσης.

Ακόμα πιο αποκαλυπτικές είναι οι μελέτες που αποδεικνύουν ότι το Ψ/Α.Σ απαντάται σε γεωγραφικές περιοχές, ιδίως σε χώρες της Αφρικής και της Ασίας, με μεγαλύτερη συχνότητα απ' ό τι προηγουμένως υποψιάζονταν. Στις ΗΠΑ, τρεις μελέτες αναφέρουν ποσοστό Ψ/Α.Σ 12% σε γλαυκωματικούς ασθενείς, με συχνότητα χαμηλότερη στο νότο και στους Αφροαμερικανούς^{6, 11}. Σε μερικούς πληθυσμούς όπως, βαλτικούς, μεσόγειους και αραβικούς η συχνότητα του Ψ/Α.Γ μπορεί να ξεπεράσει αυτή του ΠΓΑΓ. Το Ψ/Α.Σ ευθύνεται για το 77% των περιπτώσεων χρόνιου γλαυκώματος ανοιχτής γωνίας στην ανατολική περιοχή της Αραβικής Χερσονήσου¹⁶.

➤ Συχνότητα του γλαυκώματος σε άτομα με Ψ/Α.Σ

Το γλαύκωμα απαντάται πιο συχνά σε άτομα με Ψ/Α.Σ σε σύγκριση με άτομα χωρίς Ψ/Α.Σ⁶ (πίνακας 1.2). Οι Kozart και Vanoff σε 100 άτομα με Ψ/Α.Σ βρήκαν γλαυκωματικές αλλοιώσεις στο οπτικό νεύρο ή βλάβες στα οπτικά πεδία στο 7% και οφθαλμική υπερτονία στο 15%. Το Ψ/Α.Σ ήταν κλινικά μονόπλευρο στο 76% των περιπτώσεων και ετερόπλευρο στο 24%. Ο Aasved βρήκε υψηλή ΕΟΠ με ή χωρίς γλαύκωμα στο 22,7% των ατόμων με Ψ/Α.Σ ενώ αντίστοιχα μόνο στο 1,2% των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Ανάλογα, ο Ringvold βρήκε το ποσοστό να είναι 30% και 4,8% αντίστοιχα ενώ ο Κοζομπόλης⁹ 28,8% και 5,4% αντίστοιχα στην Κρήτη. Παρόμοιες μελέτες έχουν διεξαχθεί σε πληθυσμούς στην Ευρώπη, Μέση Ανατολή, Αυστραλία και Ιαπωνία⁶.

Σε άτομα με Ψ/Α.Σ ο κίνδυνος ανάπτυξης γλαυκώματος είναι αθροιστικός με το χρόνο. Οι Henry και συν. βρήκαν σε οφθαλμούς με Ψ/Α τον αθροιστικό κίνδυνο να αναπτύξουν γλαύκωμα σε 5 και σε 10 χρόνια να είναι $5,3 \pm 0,1\%$ και $15,4 \pm 2\%$ αντίστοιχα¹⁷. Οι Jeng και συν., σε μία καθορισμένη γεωγραφική περιοχή, βρήκαν το 16% των ατόμων με Ψ/Α.Σ να πάσχει από γλαύκωμα κατά την διάγνωση του συνδρόμου, ενώ το 44% ανέπτυξε γλαύκωμα μέσα σε 15 έτη. Παρόλ' αυτά, υπήρχαν και άτομα με Ψ/Α.Σ που δεν ανέπτυξαν γλαύκωμα ακόμα και μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα¹⁸.

Πίνακας 1.2: Συχνότητα του γλαυκώματος σε ασθενείς με Ψ/Α.Σ.

Τοποθεσία	Ηλικία	Συχνότητα	Αναφορές
Αυστραλία (Blue Mountain)	>48	14,2%	Mitchell και συν. 1999
Βόρεια Σουηδία	66	2,1%	Aström και συν. 2007
Κεντρική Σουηδία	>45	0,9%	Ekstrom & Haglund 1991
Κεντρική Νορβηγία	>64	5,0%	Ringvold και συν. 1991
Φιλανδία (Oulu)	>70	5,0%	Hirvelä και συν. 1994
Ισλανδία (Reykjavik)	>49	12,0%	Jonansson και συν. 2003 ¹⁴
Νότια Ινδία	>39	7,5%	Krishnadas και συν. 2003
Νότια Αφρική (Hlabisa/Temba)	>39	2,3/2,8%	Rotchford και συν. 2003
Ελλάδα (Κρήτη)	>39	4,5%	Kozobolis και συν. 2000

➤ Ασυμμετρία κλινικής εκδήλωσης του Ψ/Α.Σ

Κατά την διάγνωσή του, το Ψ/Α.Σ είναι συνήθως ιστοπαθολογικά αμφοτερόπλευρο με ασύμμετρες κλινικές εκδηλώσεις⁶. Υπάρχουν μελέτες στις οποίες φαίνεται να είναι πιο συχνή η αμφοτερόπλευρη κλινική εμφάνιση του Ψ/Α.Σ και σε άλλες η μονόπλευρη. Στην πλειοψηφία τους, οι οφθαλμοί χωρίς κλινική εκδήλωση παρουσιάζουν πρώιμα σημεία της πάθησης. Οι ασθενείς με αμφοτερόπλευρο Ψ/Α.Σ είναι συνήθως μεγαλύτερης ηλικίας και τείνουν να έχουν σε μεγαλύτερο ποσοστό οφθαλμική υπερτονία ή γλαύκωμα σε σχέση με τους ασθενείς με μονόπλευρο Ψ/Α.Σ. Σε ασθενείς με αμφοτερόπλευρο Ψ/Α.Σ υπάρχει η τάση το γλαύκωμα να αναπτύσσεται ταυτόχρονα και στους δύο οφθαλμούς ή σε σύντομο χρονικό διάστημα. Παρόλ' αυτά, κλινικά ασύμμετρη εκδήλωση είναι πρόδρομος αμφοτερόπλευρης εκδήλωσης. Υπάρχουν αντιφατικές μελέτες ως προς την εξέλιξη των εκδηλώσεων. Σε ασθενείς με μονόπλευρο Ψ/Α.Σ, ο Tarkkanen βρήκε ότι δεν υπήρχε εμφάνιση Ψ/Α στον ετερόπλευρο οφθαλμό μέσα σε 5 έτη, ενώ οι Hansen και Sellevold βρήκαν ότι η εμφάνιση στον ετερόπλευρο οφθαλμό έγινε σε ποσοστό 40,8% και 31% σε άντρες και γυναίκες αντίστοιχα, μέσα σε 5 έτη. Ο Aasved βρήκε ότι το 43% των ασθενών ανέπτυξε αμφοτερόπλευρο Ψ/Α.Σ μέσα σε 7 έτη. Τέλος, ο Henry βρήκε το ποσοστό ανάπτυξης Ψ/Α στον ετερόπλευρο οφθαλμό να είναι 6,8% και 16,8% μέσα σε 5 και 10 έτη αντίστοιχα⁶.

2. ΚΛΙΝΙΚΑ, ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΨΕΥΔΟΑΠΟΦΟΛΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ - ΓΛΑΥΚΩΜΑΤΟΣ

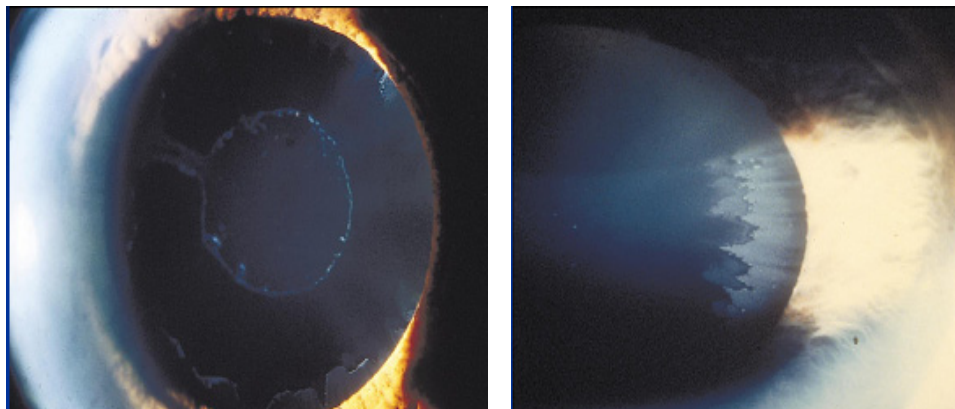
Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στο Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ

Οι οφθαλμικές εκδηλώσεις του Ψ/Α.Σ επηρεάζουν όλες τις δομές του προσθίου ημιμορίου οδηγώντας σε ένα ευρύ φάσμα από αυτόματες και ενδοχειρουργικές οφθαλμολογικές επιπλοκές, όπως: μετατόπιση του φακού, ρήξη της Ζιννείου ζώνης, κατάργηση του αιματοοφθαλμικού φραγμού, διασπορά χρωστικής, σχηματισμός οπίσθιων συνεχειών και δευτεροπαθές γλαύκωμα ανοιχτής γωνίας και κλειστής γωνίας³. Κάθε οφθαλμίατρος είναι σημαντικό να αναγνωρίζει τις οφθαλμικές εκδηλώσεις του Ψ/Α.Σ για να εκτιμήσει τον κίνδυνο ανάπτυξης Ψ/Α.Γ και πιθανών ενδοχειρουργικών οφθαλμολογικών επιπλοκών (συνοπτικός πίνακας 2.1).

➤ Φακός

Οι εναποθέσεις γκριζόλευκου υλικού στην πρόσθια επιφάνεια του φακού είναι το πιο σταθερό και σημαντικό διαγνωστικό χαρακτηριστικό του Ψ/Α.Σ. Η κλασική εικόνα περιλαμβάνει τις εξής τρεις ζώνες: 1) έναν σχετικά ομοιογενή κεντρικό δίσκο με διάμετρο σχεδόν ανάλογη ή και ελαφρώς μικρότερη από αυτή της κόρης, 2) μία κοκκιώδης περιφερική ζώνη, συχνά με οπές ή πριονωτή και 3) μία διαυγής ζώνη ανάμεσά τους¹⁹ (εικόνα 2.1, αριστερά). Η εξέταση κατόπιν μυδρίασης είναι απαραίτητη για την ακριβή διάγνωση του συνδρόμου.

Ο κεντρικός δίσκος έχει διάμετρο που ποικίλει από 1,5-3 mm και παρατηρείται καλύτερα με πλάγια δέσμη φωτός αφού τα όριά του μπορεί να κρύβονται πίσω από αυτά της ίριδας. Μικρότερος κεντρικός δίσκος μπορεί να παρατηρηθεί σε περίπτωση χρόνιας μύσης της κόρης και μεγαλύτερος σε περίπτωση χρόνιας διαστολής της κόρης. Για να ανιχνεύσει κανείς τα πρώιμα στάδια αυτού του σημείου στη σχισματοειδή λυχνία, η δέσμη φωτός θα πρέπει να τοποθετηθεί 45° από το άξονα της παρατήρησης, η ένταση του φωτός θα πρέπει να είναι μειωμένη και η εστίαση να γίνεται 2-3 mm από το κέντρο του φακού^{19,20}.



Εικόνα 2.1: Αριστερά: Κλασική εικόνα φακού οφθαλμού με Ψ/Α.Σ. Διακρίνονται οι χαρακτηριστικές τρεις ζώνες καθώς και μία εναπομείνουσα γέφυρα Ψ/Α υλικού που εκτείνεται στη διαυγή ζώνη⁶. Δεξιά: Κοκκιώδης περιφερική ζώνη⁶.

Στο 10%-20% περίπου των περιπτώσεων ο κεντρικός δίσκος απουσιάζει. Η κοκκιώδης περιφερική ζώνη είναι το πιο αξιόπιστο σημείο για την διάγνωση του Ψ/Α.Σ. Παρουσιάζει ένα σαφές εσωτερικό όριο και συχνά εμφανίζεται πριονωτή (εικόνα 2.1, δεξιά). Η διαυγής ζώνη ανάμεσά τους δημιουργείται από την συνεχή κίνησης της κόρης της ίριδας, που μηχανικά καθαρίζει το Ψ/Α υλικό από τον φακό.

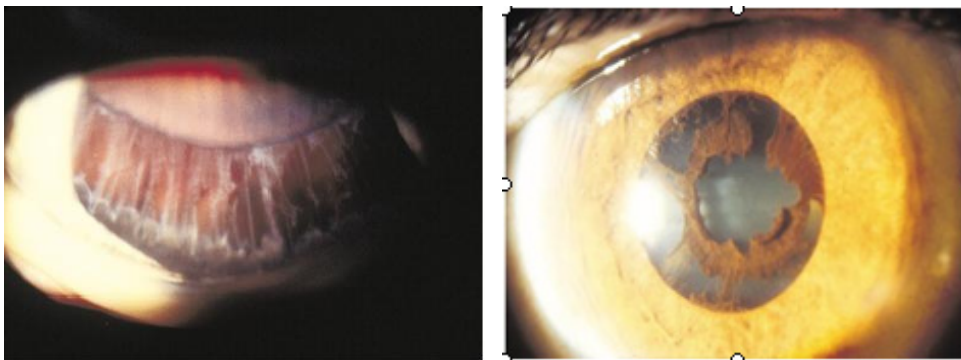
➤ Ζίννειος ζώνη και Ακτινωτό σώμα

Το Ψ/Α υλικό εντοπίζεται στη Ζίννειο ζώνη και το ακτινωτό σώμα ήδη από τα πρώιμα στάδια της πάθησης⁶ (εικόνα 2.2, αριστερά). Οι ίνες της Ζίννειου ζώνης, επικαλυμμένες από Ψ/Α υλικό, παρουσιάζονται πιο αδύναμες, σαθρές ή και θρυμματισμένες. Ασταθής Ζίννειος ζώνη και ανώμαλη ένωση της στο πρόσθιο περιφάκιο ή στο ακτινωτό μπορεί να εξηγήσει την χαρακτηριστική κατώτερη μετατόπιση του φακού. Αυτόματη απεξάρθρωση του φακού, μερική ή ολική, μπορεί να συμβεί κυρίως σε περιστατικά με προχωρημένη Ψ/Α. Η φακοδόνηση είναι συχνή και μία από τις κύριες αιτίες που προδιαθέτουν στην αύξηση των επιπλοκών κατά την διάρκεια της εγχείρησης του καταρράκτη. Επίσης, δεν συνοδεύεται πάντα από ιριδοδόνηση και αυτό μπορεί να οφείλεται στην ακαμψία της ίριδας, πιθανώς λόγω της εναπόθεσης σε αυτήν του Ψ/Α υλικού. Η πρόσθια μετακίνηση του φακού, λόγω της αστάθειας της Ζίννειου, μπορεί να προδιαθέσει σε κορικό αποκλεισμό κυρίως

στην επικλινή θέση του σώματος. Ο κορικός αποκλεισμός, στο Ψ/Α.Σ συνδέεται συνήθως με ίριδα plateau ενώ στο οξύ γλαύκωμα με τοματοειδή ίριδα⁶.

➤ Καταρράκτης στο Ψ/Α.Σ

Υπάρχουν πολλά στοιχεία που υποστηρίζουν την αιτιολογική σύνδεση του Ψ/Α.Σ με τον καταρράκτη, αν και η φύση της σύνδεσης δεν είναι ακόμη καλά χαρακτηρισμένη και κατανοητή^{16, 21}. Ο σχηματισμός καταρράκτη σε οφθαλμούς με Ψ/Α πιθανώς να σχετίζεται με την οφθαλμική ισχαιμία. Κατά την διάρκεια της εγχείρησης του καταρράκτη, οι ασθενείς με Ψ/Α.Σ έχουν περισσότερες πιθανότητες να εμφανίσουν επιπλοκές. Το Ψ/Α.Σ προδιαθέτει για το σχηματισμό οπισθίων συνεχειών ανάμεσα στο μελάγχρουν επιθήλιο της ίριδας και το πρόσθιο περιφάκιο, και τα δύο με εναποθέσεις Ψ/Α υλικού, τα οποία τείνουν να συμφύονται κυρίως όταν η κόρη βρίσκεται σε θεραπευτική μύση (εικόνα 2.2, δεξιά). Η ατελής διαστολή της κόρης είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου απώλειας υαλώδους κατά την διάρκεια της εγχείρησης του καταρράκτη. Η ρήξη της ζινείου ζώνης υπερδεκαπλασιάζει τον κίνδυνο παρεκτόπισης του φακού^{22, 23}. Έντονη διαστολή της κόρης μπορεί να προκαλέσει σύμφυση ολόκληρου του μελάγχρου επιθηλίου της ίριδας στο πρόσθιο περιφάκιο^{24, 25}.

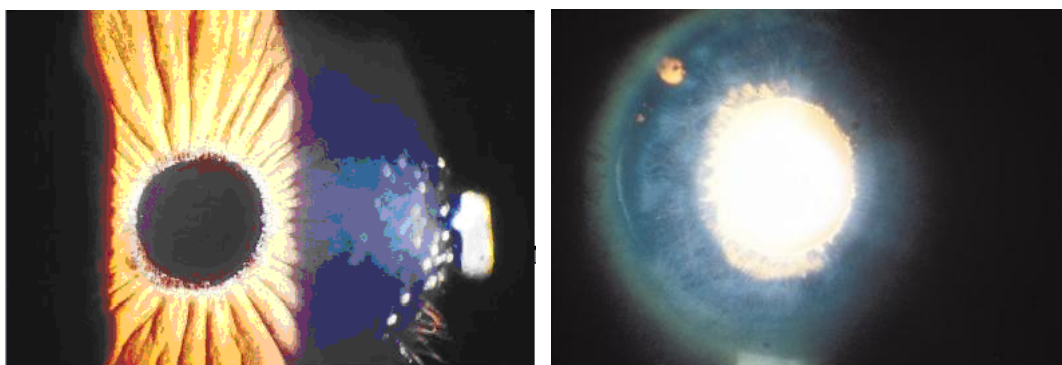


Εικόνα 2.2: Αριστερά: Πυκνή συσσώρευση Ψ/Α υλικού στην Ζίνειο ζώνη και το ακτινωτό σώμα. Οι ίνες είναι θρυμματισμένες και απύσες σε κάποιες περιοχές. Οι επιπλοκές κατά την διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης του καταρράκτη είναι αυξημένες σε σχέση με τους φυσιολογικούς οφθαλμούς⁶. Δεξιά: Συμφύσεις ανάμεσα στο κορικό χείλος και το πρόσθιο περιφάκιο κατόπιν φαρμακευτικής μυδρίασης⁶.

► Ίριδα και Κόρη

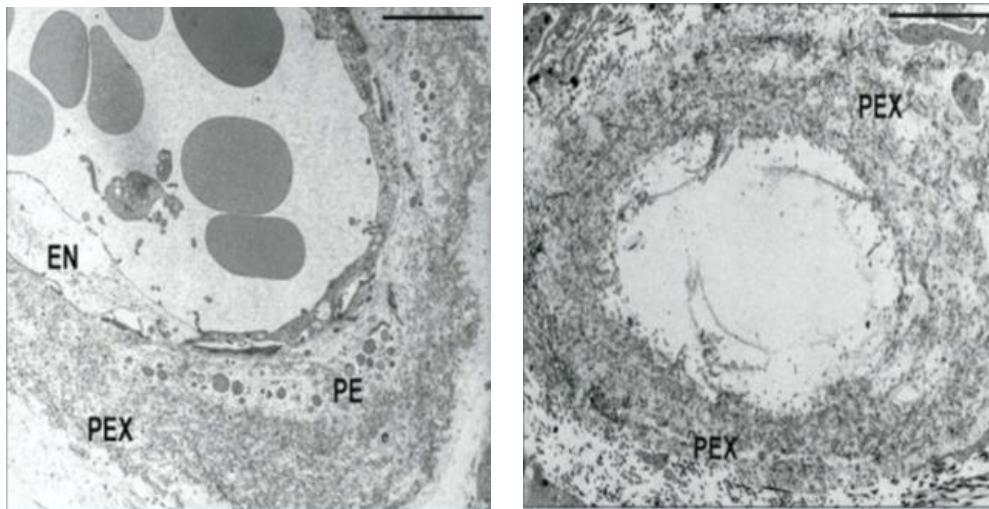
Οι διαταραχές της ίριδας είναι πρώιμες και χαρακτηριστικές στο Ψ/Α.Σ. Η ύπαρξη Ψ/Α υλικό στο κορικό χείλος μπορεί να υποδείξει την διάγνωση του Ψ/Α.Σ ακόμα και πριν από την μυδρίαση²⁶. Εξαιτίας της τριβής της ίριδας πάνω στον φακό προκαλείται ρήξη των κυττάρων του μελάγχρου επιθήλιου στην περιοχή του κορικού χείλους και του σφικτήρα της κόρης και διασπορά της χρωστικής στον πρόσθιο θάλαμο, το οποίο αποτελεί επίσης κλινικό σημείο του Ψ/Α.Σ (εικόνα 2.3, αριστερά). Η απελευθέρωση και διασπορά της χρωστικής οδηγεί σε ελλείμματα κατά την διαφανοποίηση της ίριδας στην περιοχή του σφικτήρα της κόρης και εναπόθεση χρωστικής στην επιφάνεια της ίριδας και στον διηθητικό ηθμό (εικόνα 2.3, δεξιά).

Κορικός αποκλεισμός μπορεί να προκύψει, σπανίως, εξαιτίας του συνδυασμού ακαμψίας και αύξησης του πάχους της ίριδας, οπισθίων συνεχειών και πρόσθιας μετακίνησης του φακού. Οι οφθαλμοί με Ψ/Α εμφανίζουν συχνότερη προδιάθεση για χρόνια γλαύκωμα κλειστής γωνίας από ότι για οξύ γλαύκωμα κλειστής γωνίας. Η ανάπτυξη οπίσθιων συνεχειών προδιαθέτει σε δευτεροπαθές γλαύκωμα κλειστής γωνίας όταν ακολουθείται αγωγή με φάρμακα που προκαλούν μύση. Οφθαλμοί με Ψ/Α και ευρέως ανοιχτή γωνία, μετά από πολλά χρόνια αγωγής με μυοτικά φάρμακα και σε συνδυασμό με την αστάθεια της Ζιννείου ζώνης, μπορεί να αναπτύξουν χρόνια κλειστή γωνία²⁷.



Εικόνα 2.3: Αριστερά: Εκτεταμένες εναποθέσεις Ψ/Α υλικού. Κατά τόπους ατροφία του κορικού χείλους⁶. Δεξιά: Ελλείμματα στην διαφανοποίηση της ίριδας στην περιοχή του σφικτήρα της κόρης σε οφθαλμό με γλαύκωμα κλειστής γωνίας και Ψ/Α. Ιριδετομή εμφανίζεται στην ενδεκάτη ώρα⁶.

Τα αιμοφόρα αγγεία της ίριδας στο Ψ/Α.Σ παρουσιάζουν συχνά μείωση της διαμέτρου του αυλού και στα προχωρημένα στάδια μπορεί να χάσουν την λειτουργικότητά τους καθώς τα κύτταρα του τοιχώματος τους εκφυλίζονται ολοκληρωτικά (εικόνα 2.4). Στη φλουροαγγειογραφία, είναι δυνατόν να παρατηρηθεί διαρροή χρωστικής στο κορικό χείλος καθώς επίσης και μικρονεαγγείωση, ελαφρότερης μορφής συγκρινόμενη με αυτή που απαντάται στο νεοαγγειακό γλαύκωμα. Οι διαταραχές του αγγειακού δικτύου της ίριδας οδηγούν σε μειωμένη αιμάτωση της ίριδας που προκαλεί ατροφία του μελάγχρου επιθηλίου, εναπόθεση χρωστικής στην πρόσθια επιφάνεια της ίριδας, κατάργηση του αιματοφθαλμικού φραγμού, υποξία του προσθίου ημιμορίου και αιμορραγίες στο στρώμα της ίριδας.



Εικόνα 2.4: Αλλοιώσεις των αγγείων της ίριδας στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Αριστερά: Περιαγγειακή συγκέντρωση Ψ/Α (PEX) υλικού και εκφυλιστική αλλοίωση των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων (EN) και των περικυττάρων (PE). Δεξιά: «Αγγείο φάντασμα» στο οποίο ίνες Ψ/Α υλικού περιβάλλουν ολοκληρωτικά τα κύτταρα του τοιχώματός του⁶.

Η μυδρίαση της κόρης στο Ψ/Α.Σ είναι ελαττωματική και αυτό πιθανώς να οφείλεται, εν μέρει, στην ατροφία και εκφύλιση των μυϊκών κυττάρων της ίριδας²⁷. Η εναπόθεση χρωστικής στην επιφάνεια της ίριδας είναι συχνή αλλά σπανίως παρατηρείται. Η ανίχνευσή της πρέπει να υποψιάσει τον εξεταστή και να τον παρακινήσει σε πιο προσεκτική αναζήτηση των κλινικών σημείων του Ψ/Α.Σ. Η χρωστική εναποτίθεται ομοιόμορφα πάνω στην επιφάνεια της ίριδας σε αντίθεση με την εναπόθεση στις κρύπτες στο σύνδρομο διασποράς χρωστικής. Το Ψ/Α υλικό προδιαθέτει στο σχηματισμό συνεχειών ανάμεσα στο μελάγχρου επιθήλιο της ίριδας

και το πρόσθιο περιφάκιο του φακού ακόμα και σε απουσία αγωγής με μυοτικά φάρμακα²⁸. Μικρά σωματίδια χρωστικής μπορούν να επιπλέουν στο υδατοειδές υγρό σε οφθαλμούς χωρίς μυδρίαση. Η διασπορά χρωστικής στο Ψ/Α.Σ κατόπιν μυδρίασης είναι άφθονη και πιο συχνή και σημαντική απ' ότι στο ΠΓΑΓ²⁹. Σημαντική αύξηση της ΕΟΠ μπορεί να συμβεί σε οφθαλμούς με Ψ/Α μετά από μυδρίαση και υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της έκτασης της αύξησης της ΕΟΠ και της ποσότητας της χρωστικής που απελευθερώθηκε³⁰. Συμπερασματικά, σε ασθενείς με Ψ/Α που υποβάλλονται σε μυδρίαση θα πρέπει πάντα να ελέγχεται η ΕΟΠ.

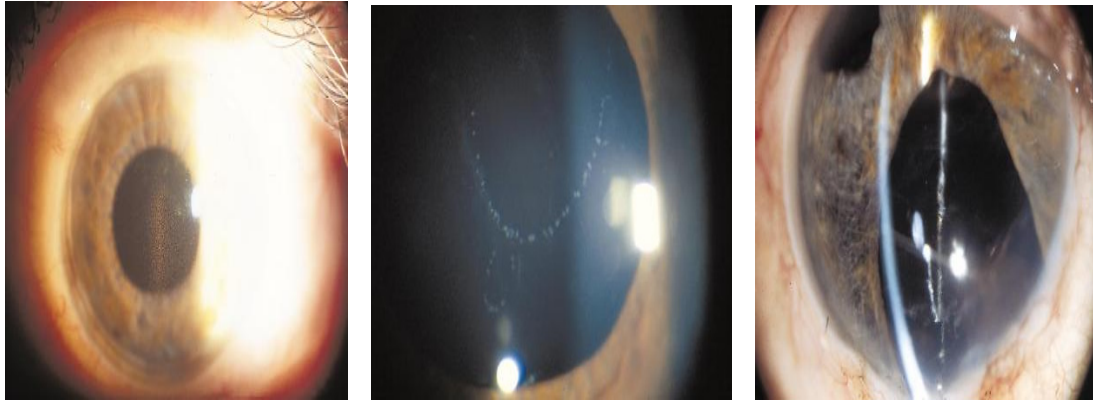
➤ Κερατοειδής, Πρόσθιος θάλαμος και Γωνία πρόσθιου θαλάμου

Διεσπαρμένες φολίδες Ψ/Α υλικού μπορεί να παρατηρηθούν στο ενδοθήλιο του κερατοειδούς και να θεωρηθούν λανθασμένα ως φλεγμονώδη ιζήματα. Η εναπόθεση χρωστικής στο ενδοθήλιο συνήθως είναι διάχυτη, μη ειδική, στο κέντρο του κερατοειδούς και περιστασιακά μπορεί να έχει την μορφή ατράκτου του Krukenberg (εικόνα 2.5, αριστερά). Σε οφθαλμούς με Ψ/Α, το φασματικό μικροσκόπιο καταδεικνύει μια σημαντικά μειωμένη πυκνότητα ενδοθηλιακών κυττάρων. Το κεντρικό πάχος του κερατοειδούς μπορεί να είναι παρόμοιο ή μειωμένο σε σχέση με οφθαλμούς χωρίς Ψ/Α³¹. Αυτό ίσως αντανακλά σε μία πρόιμη δυσλειτουργία του κερατοειδούς²⁶ ακόμα και σε μικρές αυξήσεις της ΕΟΠ ή κατόπιν εγχείρησης καταρράκτη.

Στο Ψ/Α.Σ είναι χαρακτηριστική και πρόιμη η εναπόθεση χρωστικής στη γραμμή του Schwalbe. Πιο συχνά, σε ποσοστό 90%, μία κυματοειδής γραμμή χρωστικής παρατηρείται πάνω από την γραμμή του Schwalbe κυρίως κατά την 6^η ώρα (Sampaolesi's line)³². Η αυξημένη εναπόθεση χρωστικής στο ηθμοειδές πέταλο είναι ένα κυρίαρχο κλινικό σημείο στο Ψ/Α.Σ και η κατανομή της, αντίθετα με το σύνδρομο διασποράς χρωστικής, τείνει να είναι ανώμαλη ή κατά τόπους. Κλινικά, ο βαθμός της χρωστικής φαίνεται να συνδέεται με τη σοβαρότητα του γλαυκώματος³³. Φολίδες Ψ/Α υλικού μπορούν να εντοπιστούν κατά τη γωνιοσκόπηση του προσθίου θαλάμου. Παρά την προαναφερόμενη σπανιότητα του γλαυκώματος κλειστής γωνίας σε οφθαλμούς με Ψ/Α, στενές γωνίες παρατηρούνται σε υψηλό ποσοστό.

➤ Υαλώδες σώμα και Αμφιβληστροειδής

Μετά από χειρουργική επέμβαση καταρράκτη, Ψ/Α υλικό μπορεί να ανιχνευτεί στην πρόσθια υαλοειδική επιφάνεια (εικόνα 2.5, κέντρο), στο οπίσθιο περιφάκιο και σε ενδοφακούς αποδεικνύοντας ότι ο κρυσταλοειδής φακός δεν είναι απαραίτητος για τον σχηματισμό του Ψ/Α υλικού⁶ (εικόνα 2.5, δεξιά).



Εικόνα 2.5: Αριστερά: Εναπόθεση χρωστικής στον κερατοειδή που μοιάζει με άτρακτο του Krukenberg. Στο Ψ/Α.Σ η εναπόθεση είναι συνήθως περισσότερο διάχυτη σε σύγκριση με το σύνδρομο διασποράς χρωστικής⁶. Κέντρο: Σωματίδια Ψ/Α υλικού στην πρόσθια υαλοειδική επιφάνεια σε αφακικό οφθαλμό. Η εναπόθεση ακολουθεί τα όρια μιας οπής του προσθίου υαλοειδούς. Δεξιά: Εναπόθεση Ψ/Α υλικού σε ενδοφακό οπισθίου θαλάμου⁶.

➤ Οπτικός δίσκος

Στο κλινικά μονόπλευρο Ψ/Α.Σ, οι παράμετροι του οπτικού δίσκου: rim, σχέση rim/disc, κοίλωση και έκταση κοίλωσης δεν διαφέρουν ουσιαστικά ανάμεσα στον οφθαλμό με και χωρίς Ψ/Α. Επίσης, στο μονόπλευρο Ψ/Α.Γ, οι συγκρίσεις μεταξύ των οφθαλμών δεν έδειξαν διαφορά στο μέγεθος των περιθηλαίων μηνίσκων³⁴.

➤ Επιπεφυκότας και Περιοφθάλμιοι ιστοί

Κλινικά ο επιπεφυκότας είναι φυσιολογικός. Παρόλ' αυτά, Ψ/Α υλικό μπορεί να ανιχνευθεί κατόπιν βιοψίας, ενώ η φλουροραγγειογραφική μελέτη μπορεί να δείξει απώλεια της φυσιολογικής αγγείωσης, συμφόρηση των πρόσθιων ακτινοειδών αγγείων και νεοαγγείωση⁶.

Κατά την βιοψία, Ψ/Α υλικό μπορεί να ανιχνευτεί εκτός από τον επιπεφυκότα και στους παρακάτω ιστούς: στα τοιχώματα των βραχέων οπίσθιων ακτινοειδών αρτηριών, στους εξωφθάλμιους μύες, στα κεντρικά αγγεία του αμφιβληστροειδή, στις περιδίνητες φλέβες και στο κογχικό διάφραγμα³⁵.

Πίνακας 2.1: Συνοπτική παρουσίαση των πρώιμων σημείων και επιπλοκών, κλινικών και χειρουργικών, του Ψ/Α.Σ σε σχέση με τους εμπλεκόμενους ιστούς⁴.

Tissue Involvement	Early Clinical Signs	Clinical Complications	Surgical Complications
Lens, ciliary body, and zonules	● Diffuse precapsular layer	● Cataract (nuclear)	● Zonular rupture/dialysis
	● Phacodonesis	● Phacodonesis	● Vitreous loss
	● PEX deposits on zonules (UBM)	● Lens subluxation	● Posterior capsule rupture
		● Angle-closure glaucoma due to pupillary and ciliary block	● Decentration of the lens implant
			● Anterior capsule fibrosis
			● Secondary cataract
Iris	● Peripupillary atrophy and iris sphincter region transillumination	● Melanin dispersion	● Miosis/poor surgical access
	● Melanin dispersion associated with pupillary dilation	● Poor mydriasis	● Intra- and postoperative hyphema
	● Poor mydriasis, asymmetric pupil sizes	● Iris rigidity	● Postoperative inflammation
		● Capillary hemorrhage	● Prolonged blood-aqueous barrier breakdown
		● Blood-aqueous barrier defects, pseudouveitis	● Posterior synechiae and pupillary block
		● Anterior chamber hypoxia	
		● Posterior synechiae	
Trabecular meshwork	● Pigment deposition	● Intraocular hypertension	● Postoperative IOP rise
	● Marked asymmetry of IOP	● Open-angle glaucoma	
	● Marked IOP rise after pupillary dilation		
Cornea	● Atypical cornea guttata	● Endothelial decompensation	● Endothelial decompensation
		● Endothelial migration/proliferation	
Posterior segment		● Retinal vein occlusion	

IOP = intraocular pressure; UBM = ultrasound biomicroscopy.

Κλινική πορεία-εξέλιξη του Ψ/Α.Σ προς το γλαύκωμα

Εκτιμάται ότι περίπου 60-70 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως παρουσιάζουν Ψ/Α.Σ. Από αυτούς περίπου το 25% παρουσιάζει αυξημένη ΕΟΠ εκ των οποίων το 1/3 πάσχει από γλαύκωμα. Πιθανοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της αυξημένης αντίστασης στην αποχέτευση του υδατοειδούς υγρού στο Ψ/Α.Γ περιλαμβάνουν: α) ένα «κώλυμα» στον διηθητικό ηθμό, εξαιτίας συσσώρευσης χρωστικής καθώς και Ψ/Α υλικού. Τόσο η ποσότητα του Ψ/Α υλικού όσο και της χρωστικής στην γωνία

του προσθίου θαλάμου συνδέονται με την αύξηση της ΕΟΠ, όμως ο βαθμός της χρωστικής αντιπροσωπεύει ένα πιο σταθερό και σημαντικό παράγοντα κινδύνου για το Ψ/Α.Γ, β) μία δυσλειτουργία του ενδοθηλίου του ηθμού και γ) την αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο υδατοειδές υγρό. Η κύρια αιτία για την αυξημένη αντίσταση στην αποχέτευση του υδατοειδούς φαίνεται να είναι η συγκέντρωση Ψ/Α υλικού στον παρασκληναριακό ιστό και οι εκφυλιστικές αλλοιώσεις στο σωλήνα του Schlemm⁴.

➤ Κίνδυνος ανάπτυξης γλαυκώματος σε άτομα με Ψ/Α.Σ και φυσιολογική ή υψηλή ΕΟΠ

Σε ασθενείς με Ψ/Α.Γ, οι γλαυκωματικές βλάβες του οπτικού νεύρου θεωρούνται συνέπεια της αυξημένης ΕΟΠ. Μολαταύτα το Ψ/Α.Σ, ακόμα και χωρίς αύξηση της ΕΟΠ, αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη γλαυκώματος³⁶⁻³⁸. Οι Mitchel και συν. βρήκαν ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης γλαυκώματος σε οφθαλμούς με Ψ/Α ήταν 5 φορές μεγαλύτερος συγκριτικά με οφθαλμούς χωρίς Ψ/Α. Η παρουσία Ψ/Α ήταν παράγοντας κινδύνου ανεξάρτητος από άλλους γνωστούς παράγοντες κινδύνου για γλαύκωμα. Πιθανός μηχανισμός της ανάπτυξης βλάβης στο οπτικό νεύρο ασθενών με Ψ/Α.Γ και φυσιολογική ΕΟΠ αποτελεί η διαταραχή της αιμάτωσης εξαιτίας της παρουσίας του Ψ/Α υλικού στα τοιχώματα των οπίσθιων ακτινοειδών αρτηριών και των περιδίνητων φλεβών.

Πολλοί οφθαλμοί με Ψ/Α και φυσιολογική ΕΟΠ στην διάρκεια του χρόνου αναπτύσσουν υψηλή ΕΟΠ και στη συνέχεια γλαύκωμα. Ο κίνδυνος οφθαλμικής υπερτονίας σε άτομα με Ψ/Α.Σ βρέθηκε να είναι 5,3% και 15,4% μέσα σε 5 και 10 έτη αντίστοιχα¹⁷. Οι Hovding και Aasved βρήκαν ότι σε άτομα με Ψ/Α.Σ, με ή χωρίς αυξημένη ΕΟΠ, ο κίνδυνος γλαυκώματος ήταν 2 φορές μεγαλύτερος απ' ό,τι σε άτομα χωρίς Ψ/Α.Σ (46,2% έναντι 23,1% μέσα σε 17-20 έτη)³⁹. Οφθαλμοί με υψηλή ΕΟΠ και Ψ/Α παρουσιάζουν ιδιαίτερο κίνδυνο γλαυκώματος καθώς ανέπτυξαν 2 φορές πιο συχνά γλαύκωμα σε σύγκριση με οφθαλμούς με υψηλή ΕΟΠ χωρίς Ψ/Α.Σ (35% έναντι 18% μέσα σε 9 έτη)⁴⁰. Επίσης, οι Grodum και συν. βρήκαν ότι σε ασθενείς με Ψ/Α.Σ και αυξημένη ΕΟΠ η μετάπτωση σε γλαύκωμα ήταν 2 φορές πιο συχνή σε σύγκριση με άτομα χωρίς Ψ/Α.Σ ελεγμένοι ως προς την ΕΟΠ, το φύλο και την ηλικία (55,1% έναντι 27,6% σε 8,7 έτη)³⁸.

Σε μία μελέτη 10ετούς παρακολούθησης, οι Puska και συν. βρήκαν ότι σε ασθενείς με μονόπλευρο Ψ/Α.Σ, το ποσοστό μετάπτωσης σε αμοτερόπλευρο Ψ/Α.Σ ήταν 38%⁴¹. Επιπλέον, η μετάπτωση σε Ψ/Α.Γ έγινε σε ποσοστό 32% για τους αρχικά με Ψ/Α οφθαλμούς και 38% για τους αρχικά χωρίς Ψ/Α ετερόπλευρους οφθαλμούς. Δεν βρέθηκε συσχέτιση με την ηλικία, τον βαθμό χρωστικής και την ποσότητα του Ψ/Α υλικού στην γωνία του προσθίου θαλάμου. Οι οφθαλμοί με Ψ/Α που μετέπειτα ανέπτυξαν γλαύκωμα παρουσίαζαν μεγαλύτερη κοίλανση και έκταση κοίλανσης, όπως επίσης μικρότερο rim και σχέση rim/disc σε σχέση με τους οφθαλμούς με Ψ/Α που δεν είχαν ακόμη αναπτύξει γλαύκωμα αλλά η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική μόνο για το rim. Είναι πιθανό στους οφθαλμούς με Ψ/Α οι γλαυκωματικές αλλοιώσεις στην οπτική θηλή να ξεκινούν πριν την ανίχνευση της αύξησης της ΕΟΠ⁴². Σε αυτή την περίπτωση θα πρέπει να ληφθούν υπόψη η μεγάλη διακύμανση της ΕΟΠ και οι μη ανιχνεύσιμες κορυφές της πίεσης που αποτελούν κλινικά χαρακτηριστικά του Ψ/Α.Γ⁴³. Σε οφθαλμούς με Ψ/Α που δεν ανέπτυξαν γλαύκωμα η ενδοφθάλμια πίεση παρέμεινε χωρίς διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια της μελέτης. Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύονται και από άλλη μία μελέτη που διεξήχθη από τον Aasved⁴⁴.

➤ Κίνδυνος ανάπτυξης γλαυκώματος στον ετερόπλευρο οφθαλμό σε ασθενείς με μονόπλευρο Ψ/Α.Γ

Σε ασθενείς με μονόπλευρο Ψ/Α.Γ, η παρουσία Ψ/Α στον ετερόπλευρο οφθαλμό είναι σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη γλαυκώματος. Ο κίνδυνος αυτός βρέθηκε να είναι 21%-26% σε διάστημα πέντε ετών. Όταν υπάρχει αμφοτερόπλευρο Ψ/Α.Σ η τάση ήταν η μετάπτωση σε γλαύκωμα να γίνεται ταυτόχρονα και στους δύο οφθαλμούς ή σε σύντομο χρονικό διάστημα⁴⁵. Οι Puska και συν. βρήκαν ότι στους οφθαλμούς χωρίς Ψ/Α το ποσοστό μετάπτωσης σε γλαύκωμα ήταν 33% και 38% σε πέντε και δέκα χρόνια αντίστοιχα⁴¹. Σε όλους τους ασθενείς το γλαύκωμα κατά την διάρκεια των ετών έγινε αμφίπλευρο. Η μετάπτωση σε οφθαλμική υπερτονία και γλαύκωμα ήταν σχετικά ταχεία καθώς έγινε μέσα σε πέντε έτη στο 88% και έξι έτη στο 100% των περιπτώσεων. Υψηλή ΕΟΠ βρέθηκε στο 50% των περιπτώσεων πριν την κλινική ανίχνευση του Ψ/Α υλικού και στο 25% όταν το Ψ/Α υλικό ανιχνεύθηκε κλινικά.

➤ Η έναρξη του γλαυκώματος σε σχέση με την κλινική ανίχνευση του Ψ/Α υλικού

Το γλαύκωμα μπορεί να αναπτυχθεί πριν, ταυτόχρονα ή μετά την εμφάνιση των κλινικών σημείων του Ψ/Α.Σ. Σε μία μελέτη του Aasved η εμφάνιση του Ψ/Α υλικού συνοδεύτηκε από αύξηση ή μη της ΕΟΠ⁴⁴. Τα ευρήματα της μελέτης των Hansen και Sellevold έδειξαν ότι η αύξηση της ΕΟΠ συμβαίνει στα πρώιμα στάδια του Ψ/Α.Σ⁴⁶. Αυτή την άποψη επιβεβαίωσε η έρευνα της Puska⁴¹. Στη μελέτη της ο κίνδυνος αύξησης της ΕΟΠ και ανάπτυξης γλαυκώματος φάνηκε να είναι μεγαλύτερος αμέσως μετά την κλινική ανίχνευση του Ψ/Α υλικού. Παρόλο αυτά ο κίνδυνος φαίνεται να είναι αθροιστικός και η μετάπτωση να είναι μέρος της φυσικής εξέλιξης της νόσου.

Κλινικά χαρακτηριστικά Ψ/Α.Γ

➤ Κλινική εμφάνιση του Ψ/Α.Γ

Το Ψ/Α.Γ διαφέρει τόσο ιστοπαθολογικά όσο και κλινικά από το ΠΓΑΓ. Συνήθως, οι ασθενείς με Ψ/Α.Γ είναι μεγαλύτερης ηλικίας από τους ασθενείς με ΠΓΑΓ. Κατά μία άποψη, οι άντρες με Ψ/Α.Γ έχουν σοβαρότερη κλινική εικόνα σε σχέση με τις γυναίκες⁶. Οι ασθενείς με Ψ/Α.Γ παραμένουν ασυμπτωματικοί μέχρις ότου να αναπτυχθούν σοβαρές βλάβες στην όραση. Παρόλ' αυτά, μερικοί ασθενείς ενδέχεται να διαμαρτυρηθούν για υποκειμενικές ενοχλήσεις, όπως αμβλύς πόνος στον οφθαλμό ή αίσθημα πίεσης. Προχωρημένη γλαυκωματική νευροπάθεια μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα όπως, δυσκολία στην ανάγνωση, περιορισμό της περιφερικής ή νυχτερινής όρασης ή ακόμα και απώλεια όρασης. Σημαντική μείωση της όρασης μπορεί να οφείλεται σε αγγειακά επεισόδια (όπως απόφραξη κεντρικής φλέβας αμφιβληστροειδούς ή κλάδου) που ίσως να σχετίζονται με το Ψ/Α.Σ^{3, 6}.

➤ Χαρακτηριστικά της ΕΟΠ στο Ψ/Α.Γ

Το Ψ/Α.Γ, σε σχέση με το ΠΓΑΓ, παρουσιάζει μέγιστη ΕΟΠ στατιστικά πιο υψηλή και διακύμανση της 24ωρης ΕΟΠ στατιστικά πιο μεγάλη. Σε μια μελέτη, υγιή άτομα παρουσίαζαν διακύμανση της ΕΟΠ ίση ή μικρότερη των 5mm Hg, ενώ περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς με Ψ/Α.Σ χωρίς οφθαλμική υπερτονία

παρουσίαζαν διακύμανση μεγαλύτερη των 5mm Hg και το 10% ίση ή μεγαλύτερη των 10mm Hg⁴⁷. Σε άλλη μελέτη, ημερήσια διακύμανση μεγαλύτερη των 5mmHg καταγράφηκε στο 58% των ασθενών με Ψ/Α.Σ και μόνο στο 16% των υγιών ατόμων. Οι ασθενείς με Ψ/Α.Σ που παρουσίαζαν σημαντική διακύμανση της ΕΟΠ είχαν μειωμένο πάχος στρώματος νευρικών ινών σε σχέση με τα υγιή άτομα καταδεικνύοντας την σημασία των μεταβολών της ΕΟΠ στην ανάπτυξη πρόιμης βλάβης στο Ψ/ΑΓ⁴⁸. Ασθενείς με Ψ/Α.Γ συχνά παρουσιάζονται με επίπεδα ΕΟΠ που μπορεί να ξεπερνούν τα 35mmHg ενώ χαμηλά επίπεδα ΕΟΠ είναι σπάνια. Σε μια ελληνική μελέτη που σύγκρινε ασθενείς με Ψ/Α.Γ και με ΠΓΑΓ που θα υποβάλλονταν σε χειρουργική επέμβαση γλαυκώματος, βρέθηκε ότι οι ασθενείς με Ψ/Α.Γ είχαν υψηλότερη μέγιστη ΕΟΠ σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΓΑΓ⁴⁹.

Στο Ψ/Α.Γ, όπως και στο ΠΓΑΓ, η ΕΟΠ είναι υψηλότερη τις πρωινές ώρες, μολαταύτα μπορεί να υπάρχουν εξαιρέσεις σε αυτό τον κανόνα και κορυφές ΕΟΠ μπορούν να συμβούν οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της ημέρας. Οι μεγαλύτερες διακυμάνσεις της 24ωρης ΕΟΠ στο Ψ/Α.Γ μπορεί να ευθύνονται για την ταχύτερη εξέλιξη, δυσκολότερη αντιμετώπιση και πιο συχνή ανάγκη για χειρουργική επέμβαση ή τύφλωση των ασθενών αυτών σε σύγκριση με τους ασθενείς με ΠΓΑΓ, παρόλο που κατά την διάγνωση, η νευροπάθεια και η βλάβη στα οπτικά πεδία μπορεί να είναι όμοια και στις δύο ομάδες ασθενών. Το 50% των ασθενών με Ψ/Α.Γ παρουσιάζει κορυφές ΕΟΠ εκτός ωρών εργασίας, αν και οι πρωινές μετρήσεις είναι οι πιο αξιόπιστες στη διαχείριση των περισσότερων ασθενών και είναι συνετό να μην στηριχτεί κανείς σε μία μοναδική μέτρηση για να καθορίσει την μακροχρόνια σταθερότητα των ασθενών με Ψ/Α.Γ⁴³. Η 24ωρη καταγραφή της ΕΟΠ των ασθενών με Ψ/Α.Γ υπό αγωγή είναι σημαντική για την σωστή διαχείριση τους. Σε αντίθεση με το ΠΓΑΓ, στο Ψ/Α.Γ οι οφθαλμοί απαντούν στην αγωγή με κορτικοστεροειδή σαν υγιείς οφθαλμοί.

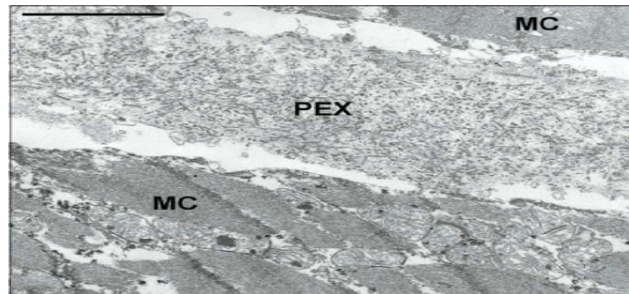
➤ **Οπτική νευροπάθεια και βλάβη οπτικών πεδίων στο Ψ/Α.Γ**

Μελέτες έχουν δείξει ότι, στο Ψ/Α.Γ η οπτική θηλή παρουσιάζει μικρότερη μέση επιφάνεια σε σύγκριση με το ΠΓΑΓ και το γλαύκωμα φυσιολογικής πίεσης. Ακόμα, σε σχέση με το ΠΓΑΓ, στο Ψ/Α.Γ η κοίλανση της οπτικής θηλής τείνει να είναι εκσεσημασμένη. Στο Ψ/Α.Γ, μικρές οπτικές θηλές μπορούν λανθασμένα να

θεωρηθούν ως φυσιολογικές και αυτό να οδηγήσει σε μία καθυστέρηση στην έναρξη της αγωγής^{50, 51}.

Σχέση Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ με συστηματικές παθήσεις

Το Ψ/Α.Σ είναι μία συστηματική νόσος, με πιο χαρακτηριστικές και καλά καθορισμένες κλινικές εκδηλώσεις να είναι οι οφθαλμικές^{3, 6, 15}. Το Ψ/Α υλικό ανευρίσκεται, με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, σε περιοφθάλμιους ιστούς (επιπεφυκότα, ιστούς του κόγχου, δέρμα βλεφάρων, εξωφθάλμιους μύες, ακτινοειδείς αρτηρίες και στρώματα του οπτικού νεύρου) καθώς και σε εξωφθάλμιους ιστούς (δέρμα και συνδετικό ιστό σπλαγγικών οργάνων όπως ήπαρ, νεφρά, πνεύμονες, εγκέφαλος, καρδιά, εγκεφαλικές μήνιγγες και τοιχώματα αγγείων)^{1, 2} (εικόνα 2.6). Η παρουσία Ψ/Α υλικού στα αγγεία σε στενή επαφή με το κολλαγόνο, τα ελαστικά ινίδια και τα περικύτταρα, μπορεί να εξηγήσει μια πιθανή επίδραση του Ψ/Α υλικού στην λειτουργία των αγγείων⁵².



Εικόνα 2.6: Ψ/Α (PEX) υλικό ανάμεσα σε κύτταρα του μυοκαρδίου (MC)⁴.

Μέχρι και σήμερα, η κλινική σημασία της συστηματικής παρουσίας Ψ/Α υλικού δεν είναι ακόμα καθορισμένη. Τα αποτελέσματα των μελετών πάνω στην συσχέτιση του Ψ/Α.Σ με διάφορες συστηματικές παθήσεις και την θνησιμότητα των ασθενών είναι αντικρουόμενα^{6, 49, 53-55}. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαφορές των πληθυσμών ασθενών και των ομάδων αναφοράς μεταξύ των μελετών. Οι περισσότερες θετικές συνδέσεις που βρέθηκαν ήταν μεταξύ του Ψ/Α.Σ και των αγγειακών παθήσεων^{49, 53,}

Στη Blue Mountain Eye μελέτη, όπως και σε άλλες μελέτες που διεξήχθησαν στην Ευρώπη, προέκυψε μια στατιστικά σημαντική σύνδεση μεταξύ του Ψ/Α.Σ και καρδιαγγειακών και χρόνιων αγγειοεγκεφαλικών παθήσεων. Εντούτοις, η επιβίωση των ασθενειών με Ψ/Α.Σ βρέθηκε να είναι παρόμοια με αυτή του φυσιολογικού πληθυσμού^{49, 53}. Έχει βρεθεί επίσης, μία σημαντική σύνδεση μεταξύ του Ψ/Α.Σ και της άνοιας λόγω νόσου Alzheimer ή αγγειακής αιτιολογίας⁵⁴. Το Ψ/Α.Σ θεωρείται μια γενικευμένη εκφυλιστική πάθηση του συνδετικού ιστού και αυτό μπορεί να εξηγήσει τη σύνδεση του με το ανεύρυσμα της κοιλιακής αορτής, μία άλλη πάθηση του συνδετικού ιστού, η οποία βέβαια δεν έχει επιβεβαιωθεί από όλες τις μελέτες⁵⁶.

Το Ψ/Α.Σ έχει επίσης συσχετιστεί θετικά με υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης στο πλάσμα⁵⁷⁻⁶⁰. Η υπερομοκυστεϊναιμία αυξάνει τον κίνδυνο φλεβικής θρόμβωσης και έχει βρεθεί ότι η απόφραξη της κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδούς είναι πιο συχνή στο Ψ/Α.Γ⁶¹. Η υπερομοκυστεϊναιμία βρέθηκε και σε ασθενείς με γλαύκωμα φυσιολογικής πίεσης στο οποίο οι αγγειακές διαταραχές είναι επίσης συχνές⁵⁹. Αυτό υποδεικνύει ότι η αύξηση των επιπέδων της ομοκυστεΐνης στο πλάσμα δεν είναι ειδική για το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ αλλά συμβαίνει σε διάφορες, συστηματικές και οφθαλμικές, παθήσεις με αγγειακές διαταραχές.

Μία μετρίου βαθμού νευροαισθητήρια απώλεια ακοής έχει βρεθεί σε ασθενείς με Ψ/Α.Σ αν και η κλινική σημασία καθώς και η ακριβής παθογένεια αυτής της κατάστασης δεν έχει ακόμα καθοριστεί.

Το γλαύκωμα αποτελεί μία από τις πιο κοινές αιτίες τύφλωσης παγκοσμίως, υπολογιζόμενη στο 12% των περιπτώσεων. Το γλαύκωμα δεν είναι ιάσιμο και η όραση που έχει χαθεί δεν μπορεί να επανέλθει. Παρ' όλα αυτά, η φαρμακευτική ή/και χειρουργική θεραπεία μπορεί να επιβραδύνει ή να αποτρέψει την περαιτέρω απώλεια της όρασης. Η κατάλληλη θεραπευτική αντιμετώπιση εξαρτάται, μεταξύ άλλων παραγόντων, από τον τύπο του γλαυκώματος. Η διάγνωση είναι το πρώτο βήμα για την διατήρηση της όρασης και η πρόωμη ανίχνευση των κλινικών σημείων είναι ζωτικής σημασίας για την αποτροπή της εξέλιξης της νόσου. Δεδομένου ότι το γλαύκωμα είναι μια χρόνια κατάσταση, πρέπει να παρακολουθείται εφόρου ζωής.

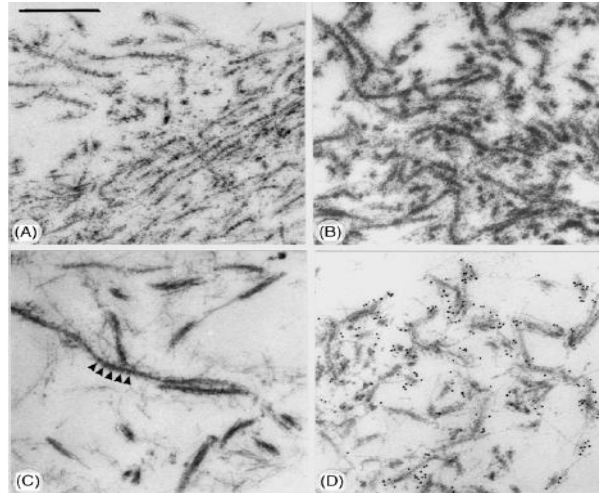
Βιοχημική σύσταση του Ψ/Α υλικού

Η ακριβής παθογένεια του Ψ/Α.Σ και η ακριβής βιοχημική σύσταση του Ψ/Α υλικού είναι μέχρι και σήμερα μόνο μερικώς γνωστά. Το παθολογικό εύρημα του Ψ/Α.Σ είναι μία διαταραχή της εξωκυττάριας ουσίας δηλαδή μια υπερβολική παραγωγή ή/και μειωμένη αποδόμηση ενός ανώμαλου εξωκυττάριου υλικού^{3,6}.

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι Ψ/Α υλικό αποτελεί ένα σύμπλεγμα γλυκοπρωτεΐνης/πρωτεογλυκάνης το οποίο φέρει επιτόπους της βασικής μεμβράνης και ινών του συνδετικού ιστού. Τα χαρακτηριστικά ινίδια του Ψ/Α υλικού, τα οποία αποτελούνται από ελαστικά μικροϊνίδια περιβαλλόμενα από άμορφη ουσία η οποία περιέχει διάφορες γλυκοζαμινογλυκάνες, περιλαμβάνουν επιτόπους ινών του συνδετικού ιστού όπως ελαστίνη, τροποελαστίνη, αμυλοειδές P, βιτρονεκτίνη και συστατικά ελαστικών μικροϊνιδίων όπως φμπριλλίνη-1, LTBP1, LTBP2 (πρωτεΐνες που δεσμεύουν τον TGF-β) και MAGP-1 (microfibril-associated glycoprotein)⁶. Αντισώματα έναντι συστατικών των ελαστικών μικροϊνιδίων και κυρίως έναντι της πρωτεΐνης LTBP1, έχουν αποδειχθεί χρήσιμα σαν δείκτες για το Ψ/Α υλικό σε εξωφθάλμιους ιστούς⁶². Μελέτες χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας έδειξαν ότι το Ψ/Α υλικό αποτελείται από τα συστατικά ελαστικών μικροϊνιδίων όπως φμπριλλίνη-1, φμπουλίνη-2 και βιτρονεκτίνη, τις πρωτεογλυκάνες syndecan και versican, εξωκυττάριους συνοδούς πρωτεϊνών όπως την clusterin, cross linking ένζυμα όπως οξειδάση λυσίνης και άλλες πρωτεΐνες επιβεβαιώνοντας πολλά από τα δεδομένα των ανοσοϊστοχημικών μελετών⁶. Όλα τα παραπάνω ενισχύουν τη άποψη ότι το Ψ/Α υλικό προέρχεται από την αυξημένη παραγωγή και συσσώρευση ελαστικών μικροϊνιδίων δεσμευμένων με διάφορες ουσίες.

Το Ψ/Α υλικό στο οπτικό μικροσκόπιο (ορατού φωτός) παρουσιάζει ηωσινοφιλικά συμπλέγματα και είναι θετικό στη χρώση PAS (periodic acid-Schiff)⁶³. Στις εναποθέσεις Ψ/Α υλικού διακρίνονται δύο τύποι ινών. Οι ίνες τύπου A που έχουν διάμετρο από 18-25nm, μήκος πάνω από 1μm με μεγάλη ικανότητα σύνδεσης και οι ίνες τύπου B που είναι πιο κοντές (0,3- 0,5μm), παχύτερες (30, 45nm) και με μικρότερη ικανότητα σύνδεσης (εικόνα 2.7). Οι ίνες του Ψ/Α υλικού στους εξωφθάλμιους ιστούς έχουν μικρότερη ικανότητα σύνδεσης και περιβάλλονται απο αυξημένη ποσότητα άμορφης ουσίας. Οι εναποθέσεις στο Ψ/Α.Σ έχουν

χαρακτηριστικά δομικά κριτήρια που τις διαφοροποιούν από κάθε άλλη γνωστή εναπόθεση εξωκυττάριου υλικού².



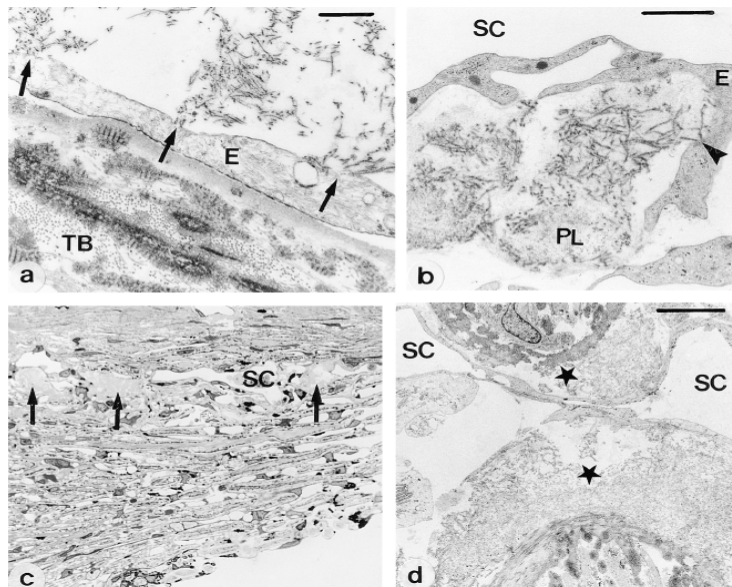
Εικόνα 2.7: Ίνες Ψ/A υλικού στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Α) Ίνες τύπου Α, λεπτότερες με μεγάλη ικανότητα σύνδεσης Β) Ίνες τύπου Β παχύτερες Γ) Συνένωση μικροινιδίων σε ώριμες ψευδοαποφολιδωτικές ίνες Δ) Χρήση αντισωμάτων έναντι φιμπριλλίνης-1 ως δείκτες για το Ψ/A υλικό¹⁹.

Προέλευση του Ψ/A υλικού

Έχει αποδειχθεί στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ότι το Ψ/A υλικό παράγεται από διάφορους τύπους κυττάρων όπως επιθηλιακά, ενδοθηλιακά, του συνδετικού ιστού, των μυών και των αγγειακών τοιχωμάτων. Στο πρόσθιο ημιμόριο του οφθαλμού παράγεται κυρίως από το: α) μη χρωστικό επιθήλιο του ακτινωτού σώματος, β) οπίσθιο μελάγχρου επιθήλιο της ίριδας και γ) περιφάκιο του φακού στην περιοχή του ισημερινού. Παράγεται επίσης από το ενδοθήλιο του κερατοειδούς, τα κύτταρα του διηθητικού ηθμού και τα περικύτταρα της ίριδας και του ακτινωτού σώματος. Η ενδοφθάλμια παραγωγή Ψ/A υλικού φαίνεται να είναι πολυεστιακή ενώ υπάρχει και η δευτεροπαθής εναπόθεση που γίνεται παθητικά με το υδατοειδές υγρό⁶.

Όλα τα είδη κυττάρων που εμπλέκονται στην παραγωγή ινιδίων παρουσιάζουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά: 1) ανωμαλίες της επιφάνειας, 2) διαταραχές της συνέχειας της βασικής μεμβράνης και 3) συστήματα έκκρισης δίνοντας την εντύπωση μιας ενεργοποιημένης μεταβολικής κατάστασης. Οι ίνες που παράγονται συχνά

παρουσιάζουν μια διαδικασία «ωρίμανσης» ή συνένωσης από μικροϊνίδια σε πιο σύνθετες ίνες. Οι Ψ/Α ίνες ποτέ δεν έχουν παρατηρηθεί ενδοκυττάρια, αλλά πάντα εξωκυττάρια και σε στενή σύνδεση με την επιφάνεια των κυττάρων. Η περικυττάρια συσσώρευση αυτών των ινών προκαλεί πιθανώς διαταραχή της βασικής μεμβράνης με συνέπεια κυτταρική δυσλειτουργία (π.χ. στα κύτταρα του διηθητικού ηθμού) που οδηγεί στον εκφυλισμό των εμπλεκόμενων κυττάρων (εκφυλιστική ινιδοπάθεια)⁶⁴ (εικόνα 2.8).



Εικόνα 2.8: Διηθητικός ηθμός στο Ψ/Α.Σ χωρίς (a,b) και με (c,d) γλαύκωμα. a) Παραγωγή Ψ/Α ινών (βέλη) από ένα ενδοθηλιακό κύτταρο (E) στον διηθητικό ηθμό (TB). b) Παραγωγή Ψ/Α ινών (βέλη) από το ενδοθήλιο (E) στο σωλήνα του Schlemm (SC) (PL, plaque material). c) Εξαφάνιση του σωλήνα του Schlemm εξαιτίας συσσώρευσης Ψ/Α υλικού. d) Υποχώρηση του αυλού του σωλήνα του Schlemm εξαιτίας της επαφής του εσωτερικού με το εξωτερικό τοίχωμα⁶.

Αιτιολογία του Ψ/Α.Σ

Τα αίτια της εμφάνισης του Ψ/Α.Σ είναι μέχρι σήμερα άγνωστα. Φαίνεται ότι το Ψ/Α.Σ αποτελεί μία σύνθετη και πολυπαραγοντική πάθηση με όψιμη έναρξη-εμφάνιση στην οποία εμπλέκονται γονιδιακοί και μη γονιδιακοί παράγοντες. Ενοχοποιείται συνδυασμός γονιδίων που προδιαθέτουν σε Ψ/Α.Σ και γονιδίων που προδιαθέτουν σε γλαύκωμα καθώς και εξωγενείς παράγοντες όπως: περιβάλλον (υπεριώδης ακτινοβολία), τοξικές ουσίες, διατροφή (μειωμένα επίπεδα ασκορβικού

οξέος), λοιμώξεις (ιογενείς), οφθαλμικός τραυματισμός, οφθαλμική χειρουργική επέμβαση^{65,66}.

Για τη διελεύκανση της αιτιολογίας θα ήταν χρήσιμες επιπλέον επιδημιολογικές μελέτες σε πληθυσμούς που δεν έχουν μελετηθεί όπως στην Κ. Αφρική και την Ν. Αμερική καθώς επίσης και γενεαλογικές μελέτες, σάρωση γονιδιώματος για τον εντοπισμό παθογόνων γονιδίων και γενετικές αναλύσεις με σκοπό την εκτίμηση μεταλλαγών ύποπτων γονιδίων για την ανάπτυξη-εκδήλωση του Ψ/Α.Σ.

Θεωρίες παθογένειας του Ψ/Α.Σ

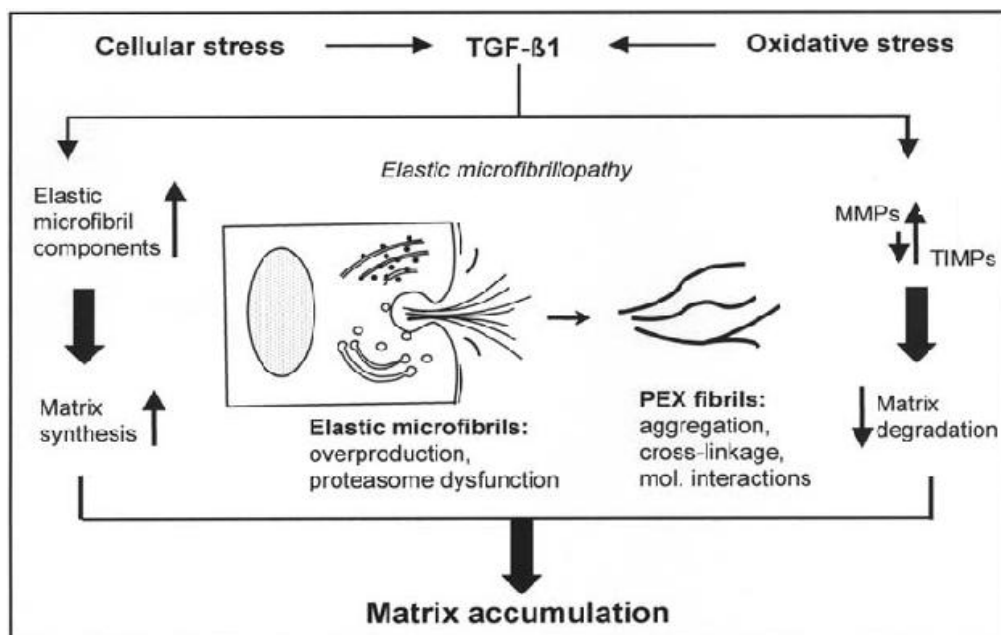
Υπάρχουν οι εξής τρεις παθογενετικές θεωρίες για το Ψ/Α.Σ χωρίς ωστόσο καμία να εξηγεί πλήρως την πάθηση και χωρίς η μία να αναιρεί την άλλη:

- Η θεωρία του αμυλοειδούς δεν έχει επιβεβαιωθεί και βασίζεται στην ανίχνευση πεπτιδίων β-αμυλοειδούς στο υδατοειδές υγρό ασθενών με Ψ/Α.Σ, αμυλοειδούς Ρ στις εναποθέσεις Ψ/Α υλικού και στο ότι το Ψ/Α.Σ μπορεί να συνυπάρχει με νόσο Alzheimer και πρωτοπαθή αμυλοείδωση⁶⁷⁻⁷⁰.
- Η θεωρία της βασικής μεμβράνης, σύμφωνα με την οποία το Ψ/Α υλικό παράγεται ως αποτέλεσμα της διαταραχής της βασικής μεμβράνης των κυττάρων, υποστηρίζεται από τα παρακάτω στοιχεία: 1) ανωμαλίες της επιφάνειας των κυττάρων που το παράγουν, 2) ύπαρξη επιτόπων της βασικής μεμβράνης στις εναποθέσεις Ψ/Α υλικού (λαμινίνη, ινωδογόνο, πρωτεογλυκανική θειική ηπαρίνη) και 3) αύξηση των επιπέδων του TGF-β1, (transforming growth factor) στο υδατοειδές υγρό ασθενών με Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ^{70, 71}. Είναι γνωστό ότι ο TGF-β1 προάγει την συγκέντρωση του εξωκυττάρου υλικού και την ίνωση σε πολλές παθολογικές καταστάσεις. Επίσης έχει βρεθεί ότι έχει ενισχυμένη τοπική σύνθεση σε ιστούς του προσθίου τμήματος του οφθαλμού. Η αποδόμηση του εξωκυττάρου υλικού ρυθμίζεται από τις μεσοκυττάρια μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) ικανές να αποδομούν ολόκληρη σχεδόν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και τα πρωτεϊνικά συστατικά της βασικής μεμβράνης. Η παρουσία των μεταλλοπρωτεϊνών έχει περιγραφεί στο υδατοειδές υγρό του ανθρώπου και η ενεργότητά τους ρυθμίζεται μερικώς από ειδικούς ενδογενείς ιστικούς αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs). Ο TGF-β1 αυξάνει την έκφραση της MMP-2 και της TIMP-2 (αναστολέας) στο υδατοειδές υγρό ασθενών με Ψ/Α.Γ. Εξαιτίας της ανισορροπίας των ενζύμων αποδόμησης της εξωκυττάριας

ουσίας (MMPs) και των αναστολέων τους (TIMPs), το παθολογικό Ψ/Α υλικό δεν αποδομείται αλλά με την πάροδο του χρόνου αθροίζεται προοδευτικά εντός των ιστών⁶.

➤ Η θεωρία των ελαστικών μικροϊνιδίων υποστηρίζει ότι το Ψ/Α.Σ αποτελεί ένα τύπο ελάστωσης (αυξημένη παραγωγή/συσσώρευση ελαστικών μικροϊνιδίων). Βασίζεται στο ότι ίνες Ψ/Α υλικού βάσει ενδείξεων ανοσοϊστοχημικών και μορφολογικών, προέρχονται από την εκφύλιση των ινών του συνδετικού ιστού. Επίσης, βασίζεται στην παρουσία στο Ψ/Α υλικό των πρωτεϊνών: LTBP (που δεσμεύουν τον TGF-β1) και φιμπριλλίνη-1 (κύριο συστατικό ελαστικών μικροϊνιδίων)⁷².

Καταλήγοντας, η τρέχουσα αντίληψη για το Ψ/Α.Σ προτείνει μία υπερβολική σύνθεση ή/και ανεπαρκή αποδόμηση των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας (ελάστωση), που διεγείρεται από τον TGF-β1 και οδηγεί σε συνάθροιση του εξωκυττάριου υλικού στις χαρακτηριστικές αποφολιδωτικές ίνες (σχήμα 2.1).



Σχήμα 2.1: Περίληψη της τρέχουσας παθογενετικής θεωρίας για το Ψ/Α.Σ⁴.

Αυξητικοί παράγοντες, ειδικά ο TGF-β1, αυξημένο οξειδωτικό και κυτταρικό stress και μία ελλιπή κυτταρική προστασία φαίνεται ότι αποτελούν παράγοντες κλειδιά για την παθογένειά του. Εξαιτίας μιας ανισορροπίας μεταξύ των μεταλλοπρωτεϊνών και των αναστολέων τους και μίας εκτενούς διαδικασίας cross linking που οδηγεί

στον σχηματισμό των ινών, το παθολογικό υλικό δεν αποδομείται κατάλληλα αλλά προοδευτικά συσσωρεύεται στους ιστούς (π.χ. διηθητικό ηθμό) με την πάροδο του χρόνου. Η άποψη της γενικευμένης ελάστωσης κέρδισε έδαφος από μία πρόσφατη γενετική μελέτη που έδειξε ότι οι πολυμορφισμοί του γονιδίου της οξειδάσης της λυσίνης-like1 (*LOXLI*), το οποίο είναι μέλος μιας οικογένειας γονιδίων που έχει σημαντικούς ρόλους στην σύνθεση ελαστίνης, είναι ισχυρά συνδεδεμένοι με το Ψ/Α.Σ και το Ψ/Α.Γ⁴.

3. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΨΕΥΔΟΑΠΟΦΟΛΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ - ΓΛΑΥΚΩΜΑΤΟΣ

Εισαγωγή

Η ακριβής αιτιοπαθογένεια του Ψ/Α.Σ είναι άγνωστη. Είναι όμως δεδομένο ότι εμπλέκονται γενετικοί και μη γενετικοί παράγοντες. Φαίνεται να ενοχοποιείται ένας συνδυασμός, γονιδίων που προδιαθέτουν σε Ψ/Α.Σ και γονιδίων που προδιαθέτουν ή/και επιβραδύνουν την ανάπτυξη γλαυκώματος. Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στον προσδιορισμό των γενετικών παραγόντων που συσχετίζονται με το Ψ/Α.Σ. Αποδείξεις που υποστηρίζουν ότι το Ψ/Α.Σ έχει γενετική βάση αποτελούν οι παρακάτω παρατηρήσεις:

1) Η γεωγραφική κατανομή του Ψ/Α.Σ. Από επιδημιολογικές μελέτες, προκύπτουν πραγματικές διαφορές στις συχνότητες ανάμεσα σε παρόμοιας ηλικίας γεωγραφικούς και εθνικούς πληθυσμούς υποδεικνύοντας την γενετική ποικιλομορφία του συνδρόμου^{11, 12}.

2) Η διαφορετική εξέλιξη του Ψ/Α.Σ. Κατά τη διάγνωση του Ψ/Α.Σ, υπέρτονια παρουσιάζει το 25% των ασθενών (εκ των οποίων κάποιοι πάσχουν ήδη από γλαύκωμα και κάποιοι όχι), ενώ από τους υπόλοιπους κάποιοι θα παρουσιάσουν γλαύκωμα στη πορεία των ετών και κάποιοι όχι^{6, 18}.

3) Ο οικογενής χαρακτήρας του συνδρόμου. Φαίνεται να κληρονομείται κατά τον αυτοσωματικό επικρατή χαρακτήρα με όσιμη έναρξη-εμφάνιση και με ελλιπή και ποικίλη διεισδυτικότητα^{13, 73, 74}.

4) Σε μία μελέτη διδύμων από την Ισλανδία βρέθηκε ότι σε 5 από τους 8 μονοωγενείς διδύμους με Ψ/Α.Σ, το Ψ.Α.Σ ήταν παρόν και στους δύο, υποδεικνύοντας επιγενετικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν την ανάπτυξη-εξέλιξη του συνδρόμου⁷⁵.

5) Σύνδεση του Ψ/Α.Σ με πολλές χρωμοσωματικές περιοχές. Η απώλεια της ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity), ενδεικτική παράμετρος της παρουσίας ενός γονιδίου σε μια περιοχή σχετική με την ανάπτυξη ή την εξέλιξη μιας ασθένειας, βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς με ΨΑ.Σ απ' ότι στους μάρτυρες⁷⁶. Σε

ασθενείς με Ψ/Α.Σ από την Κρήτη έχουν αναγνωρισθεί γενετικά ελλείμματα στις χρωμοσωμικές περιοχές 1q, 7p, 7q, 9p, 9q και 13q στην ίριδα και το πρόσθιο περιφάκιο, με τη χρήση μικροδορυφορικών δεικτών (microsatellite markers)⁷⁶. Επιπλέον, τα περιστατικά με γενετικά ελλείμματα συσχετίστηκαν θετικά με το υψόμετρο της κατοικίας του ασθενή υποδηλώνοντας αυξημένη ευαισθησία στην υπεριώδη ακτινοβολία των χρωμοσωμικών τμημάτων που εξετάστηκαν. Τέλος, έχει γίνει ταυτοποίηση γενετικών θέσεων που συσχετίζονται με τάση για ανάπτυξη Ψ/Α.Σ: 18q12.1-21.33, 2q, 17p και 19q με σάρωση γονιδιώματος σε πληθυσμό από Φιλανδία⁷⁷.

6) Η συσχέτιση του Ψ/Α.Σ με ειδικά αντιγόνα HLA. Συγκεκριμένοι τύποι των HLA αντιγόνων ιστοσυμβατότητας (HLA A1, A33, B8, B47, B51, B53, B57, B62, DR3, DR12 και DR13) βρέθηκε να είναι περισσότερο κοινοί μεταξύ των ασθενών με Ψ/Α.Σ, ενώ τρεις τύποι (HLA B12, B17 και DR2) λιγότερο κοινοί. Σε μια μελέτη σε Σουηδούς ασθενείς, βρέθηκε υψηλότερη συχνότητα του αντιγόνου HLA BW35 στο Ψ/Α.Γ απ' ότι στην ομάδα ελεγχου⁷⁸, αλλά το εύρημα αυτό δεν επιβεβαιώθηκε. Πιο πρόσφατα, προσδιορίστηκε μια συσχέτιση μεταξύ Ψ/Α.Σ και δεκατεσσάρων HLA αντιγόνων⁷⁹.

7) Η πρόσφατη ανακάλυψη από τους Thorleifsson και συν. μίας ιδιαίτερα ισχυρής σύνδεσης μεταξύ Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ και δύο ενιαίων νουκλεοτιδίων πολυμορφισμών στο γονίδιο *LOXLI* (15q24) που κωδικοποιεί την οξειδάση λυσίνη – like1⁸⁰. Η πρωτεΐνη οξειδάση της λυσίνης like1 είναι απαραίτητη για την ελαστογένεση, αποτελεί δομικό συστατικό των εναποθέσεων Ψ/Α υλικού και συμβάλλει στη συγκέντρωσή τους στους οφθαλμικούς και εξωφθαλμικούς ιστούς. Η σύνδεση του γονιδίου *LOXLI* με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ επιβεβαιώθηκε μετέπειτα από πολλές μελέτες αν και σε ορισμένους πληθυσμούς βρέθηκε να είναι λιγότερο ισχυρή⁸¹.

Όλα τα παραπάνω καταδεικνύουν ότι το Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ αποτελούν γενετικά ετερογενείς οντότητες, καθώς φαίνεται ότι η ανάπτυξη τους επηρεάζεται από περισσότερα γονίδια το οποίο εξηγεί και την φαινοτυπική ετερογένεια των δύο αυτών καταστάσεων.

Κληρονομικότητα

Το Ψ/Α.Σ φαίνεται να παρουσιάζει ισχυρό οικογενή χαρακτήρα. Ενδείξεις κληρονομικότητας βασίζονται στον αυξημένο σχετικό κίνδυνο εμφάνισης Ψ/Α.Σ στους συγγενείς πρώτου βαθμού των ασθενών⁷⁴ και σε δίδυμα αδέρφια⁷⁵ και στην τεκμηριωμένη μεταβίβαση του σε απογόνους δύο διαδοχικών γενεών^{13, 73}. Ο Aasved⁷⁴, εξετάζοντας τους συγγενείς πρώτου βαθμού άνω των σαράντα ετών σε εικοσιπέντε οικογένειες πασχόντων, βρήκε 9.4% προσβεβλημένα άτομα έναντι 1% των ατόμων που ανιχνεύθηκαν σε τυχαίο πληθυσμό και πρότεινε ότι το Ψ/Α.Σ ακολουθεί αυτοσωμικό επικρατή τρόπο κληρονομησης. Πολλαπλοί τρόποι κληρονομικότητας έχουν προταθεί για το Ψ/Α.Σ, όπως: κατά τον αυτοσωματικό επικρατή χαρακτήρα^{74, 82}, κατά τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα⁸³, κατά τον φυλοσύνδετο⁸⁴, ή ακόμα και κληρονομικότητα μόνο από τη μητέρα (μιτοχονδριακή)⁷³. Μία μελέτη επιπολασμού με μεγάλο διάστημα παρακολούθησης εκτίμησε τη συχνότητα του Ψ/Α.Σ και ανέλυσε τον τρόπο μετάδοσης του Ψ/Α.Σ στις επόμενες γενιές σε έναν απομονωμένο πληθυσμό στη Ν.Φιλανδία. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της, το Ψ/Α.Σ φαίνεται να κληρονομείται κατά τον αυτοσωματικό επικρατή χαρακτήρα με ατελή διεισδυτικότητα, η οποία είναι περισσότερο μειωμένη στους άντρες απ' ότι στις γυναίκες. Παρ' όλο αυτά φάνηκε ότι η παρουσία Ψ/Α.Σ ήταν μεγαλύτερος παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης γλαυκώματος στους άντρες απ' ότι στις γυναίκες⁸⁵.

Ένας κοινός τρόπος κληρονομικότητας του Ψ/Α.Σ δεν συνάγεται από όλες τις μελέτες πιθανότατα λόγω του σύνθετου χαρακτήρα του συνδρόμου που εμπλέκει συνδυασμό γονιδίων ή/και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Από τις περισσότερες μελέτες, φαίνεται να κληρονομείται κατά τον αυτοσωματικό επικρατή χαρακτήρα με ελλιπή και ποικίλη διεισδυτικότητα. Επιπλέον, το Ψ/Α.Σ είναι μία διαταραχή με όψιμη έναρξη-εμφάνιση και επιπολασμό που αυξάνει προοδευτικά σε άτομα ηλικίας άνω των 50 ετών. Ως εκ τούτου, η διάγνωση του γίνεται συνήθως σε ηλικιωμένους ασθενείς και οι πάσχοντες απόγονοι δύο ή τριών γενεών είναι δύσκολο να προσδιοριστούν και να διαχωριστούν τα φυσιολογικά νέα άτομα από αυτά που πιθανώς να αναπτύξουν την νόσο. Συνεπώς, οι παραδοσιακές γενεαλογικές μελέτες είναι δύσκολο να διεξαχθούν.

Συσχετιζόμενα γονίδια με το Ψ/Α.Σ

Υποψήφια γονίδια για την ανάπτυξη του συνδρόμου αποτελούν τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που σχηματίζουν τις εναποθέσεις του Ψ/Α υλικού. Από την ανάλυση της διαφοροποιημένης γονιδιακής έκφρασης με τη μέθοδο του υβριδισμού, επαληθεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν στους ιστούς με Ψ/Α υλικό πάνω από 20 γονίδια τα οποία έχουν σχέση με τον μεταβολισμό του εξωκυττάριου υλικού και το οξειδωτικό stress. Από αυτά, μία ομάδα γονιδίων παρουσιάζει αυξημένη έκφραση, όπως τα γονίδια που κωδικοποιούν τις εξής πρωτεΐνες: φιμπριλλίνη-1, LTBP-1, LTBP-2, TGase-2, TIMP-2, AKAP-2, απολιποπρωτεΐνη D, AdoR-A3. Μία άλλη ομάδα παρουσιάζει μειωμένη έκφραση και κωδικοποιεί τις: TIMP-1, Clusterin, Mgst-1, GST-T1 και αμυλοειδές ορού A1⁸⁶. Ο TGF-β1 ρυθμίζει τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια καθώς αυξάνει την έκφραση της φιμπριλλίνης-1, των LTBP-1 και -2, της TGase-2 και καταστέλλει την έκφραση Clusterin σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης (in vitro). Γι' αυτό θεωρείται βασικός μεσολαβητής στην ινική διαδικασία του Ψ/Α.Σ. Επιπλέον, στις εναποθέσεις Ψ/Α υλικού, με πρωτεομική προσέγγιση, έχει προσδιοριστεί η παρουσία πρωτεϊνών του συνδετικού ιστού όπως ελαστίνη, τροποελαστίνη, αμυλοειδές P, φιμπριλλίνη-1, φιμπουλίνη-2, βιτρονεκτίνη, LTBP-1 και -2 (που δεσμεύουν τον TGF-β1) και MAGP-1, μαζί με πρωτεογλυκάνες, MMPs και TIMPs, την συνοδό πρωτεΐνη clusterin και ένζυμα που συμμετέχουν στο σχηματισμό σταυροειδών δεσμών (cross-linking) όπως τρανσγλουταμινάση-2, απολιποπρωτεΐνες και οξειδάσες της λυσίνης^{87, 88}. Μία συχνή μέθοδος για τον προσδιορισμό γονιδίων υπόπτων για την ανάπτυξη παθήσεων είναι ο έλεγχος γενετικών δεικτών στο γονιδίωμα και ο προσδιορισμός των δεικτών των οποίων η έκφραση συνδέεται περισσότερο με τους πάσχοντες.

Υποψήφια γονίδια με γενετική προδιάθεση για το Ψ/Α.Σ και το Ψ/Α.Γ

Μέχρι σήμερα, τα ύποπτα γονίδια που έχουν κυρίως μελετηθεί και συσχετιστεί με την πάθηση είναι τα εξής:

1) Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου που κωδικοποιεί την clusterin έχει βρεθεί ότι συνδέονται με το Ψ/Α.Σ και το Ψ/Α.Γ σε δύο διαφορετικούς πληθυσμούς χωρίς ωστόσο να θεωρείται κύριος παράγοντας κινδύνου. Η clusterin είναι μία εξωκυττάρια

συνοδός πρωτεΐνη, η έλλειψη της οποίας οδηγεί σε χρόνια και σταθερή συγκέντρωση Ψ/Α υλικού. Έχει βρεθεί σημαντικά αυξημένη σε συνθήκες κυτταρικού stress, όπως υποξίας/ισχαιμίας και οξειδωτικού stress, οι οποίες χαρακτηρίζουν το Ψ/Α.Σ. Στο Ψ/Α.Σ, αντίθετα από το αναμενόμενο, η έκφρασή της είναι μειωμένη, το οποίο επιπλέον ενισχύει την άποψη ότι οι κυτταρικοί προστατευτικοί μηχανισμοί στο Ψ/Α.Σ είναι ελαττωματικοί. Ο TGF-β1, πιθανώς να συμβάλλει στην μειωμένη έκφραση της clusterin σε οφθαλμούς με Ψ/Α in vivo, καθώς έχει βρεθεί ότι μεταβάλλει την έκφραση της στα μη χρωστικοφόρα επιθηλιακά κύτταρα in vitro^{89, 90}.

2) Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου της μεσοκυττάριας μεταλλοπρωτεΐνάσης 1 (matrix metalloproteinase 1 ή MMP1) στο χρωμόσωμα 11 μπορεί να εμπλέκονται στην ανάπτυξη του συνδρόμου⁹¹. Οι μεταλλοπρωτεΐνάσες είναι μία μεγάλη ομάδα ενδοπεπτιδασών που συμβάλλουν στην ανακύκλωση της εξωκυττάριας ουσίας. Μεταβολές στα ένζυμα αυτά πιθανώς προκαλούν ανωμαλίες στο μεταβολισμό του εξωκυτταρίου υλικού, χαρακτηριστικές για το Ψ/Α.Σ και το Ψ/Α.Γ. Παρ'όλο αυτά, άλλη μελέτη που αξιολόγησε την πιθανή συσχέτιση των πολυμορφισμών των μεταλλοπρωτεΐνασών με Ψ/Α.Γ και το ΠΓΑΓ είχε αρνητικά αποτελέσματα⁹². Επιπλέον, από μία πρόσφατη μελέτη προέκυψε σύνδεση του πολυμορφισμού του γονιδίου της MMP1 με την ανάπτυξη ΠΓΑΓ στις γυναίκες⁹³.

3) Η σύνδεση του Ψ/Α.Σ με τον πολυμορφισμό του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης E (APOE) είναι αμφιλεγόμενη^{94, 95}. Σε μία μόνο μελέτη φάνηκε ο πολυμορφισμός του γονιδίου να επηρεάζει θετικά την ανάπτυξη του συνδρόμου⁹⁵.

4) Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου της μεθυλενοτετραϋδροφυλλικής αναγωγάσης (MTHFR) έχουν μελετηθεί για πιθανή συσχέτιση με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ⁹⁶. Το γονίδιο αυτό έχει θεωρηθεί ύποπτο για προδιάθεση γλαυκώματος χωρίς ωστόσο τα αποτελέσματα μελετών να του έχουν αποδώσει κύριο ρόλο στην πάθηση.

5) Πρόσφατα, δύο ενιαίοι νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο της οξειδάσης της λυσίνης like 1 (LOXLI) βρέθηκε να συνδέονται ιδιαίτερα ισχυρά με το Ψ/Α.Σ και το Ψ/Α.Γ σε ασθενείς από την Ισλανδία και την Σουηδία⁸⁰. Μετέπειτα, η σύνδεση αυτή, λιγότερο ή περισσότερο ισχυρή, επιβεβαιώθηκε σε διαφορετικούς πληθυσμούς παγκοσμίως⁹⁷⁻¹¹⁵. Το γονίδιο LOXLI θεωρείται σε ορισμένους πληθυσμούς και ειδικά στην Σκανδιναβία ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου για ανάπτυξη γλαυκώματος κυρίως μέσω του Ψ/Α.Σ.

Το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης E (*APOE*)

Το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης E (*APOE*) στο χρωμόσωμα 19q13.2 έχει τρία αλληλία (E2, E3, E4) που κωδικοποιούν για τρεις ισόμορφες της απολιποπρωτεΐνης E (E2, E3, E4). Οι τρεις ισομορφές διαφέρουν ως προς ένα αμινοξύ στη θέση 112 και 158. Συγκεκριμένα, το E3 αλληλίο (φυσιολογικό αλληλίο) κωδικοποιεί για κυστεΐνη/αργινίνη, το E2 για κυστεΐνη/κυστεΐνη και το E4 για αργινίνη/αργινίνη. Τα αλληλία κληρονομούνται με τον συνεπικρατή τρόπο με αποτέλεσμα να προκύπτουν έξι πιθανοί διαφορετικοί γονότυποι (E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, E4/E4), με τον ομόζυγος E3/E3 να είναι ο φυσιολογικός γονότυπος (wild type). Οι συχνότητες των *APOE* αλληλίων που βρήκαν οι Σκλαβούνου και συν. (1997) σε 216 Έλληνες εθελοντές υγιείς αιμοδότες ήταν: 5,3% για το E2, 88% για το E3 και 6,5% για το E4¹¹⁶. Οι κατανομές των αλληλίων του γονιδίου *APOE* είναι διαφορετικές μεταξύ βόρειας και νότιας Ευρώπης, αφού μεσογειακές χώρες όπως Ιταλία, Τουρκία και Ελλάδα έχουν χαμηλότερες συχνότητες αλληλίων E2 και E4^{116, 117}. Παρ'όλο αυτά σε μια πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ανάλογη κατανομή αλληλίων σε Ιταλικό και Γερμανικό πληθυσμό¹¹⁸.

Η απολιποπρωτεΐνη E (*APOE*) είναι μία γλυκοπρωτεΐνη 34-KDa η οποία αποτελείται από 299 αμινοξέα. Η *APOE* είναι μία από τις πέντε κύριες μορφές απολιποπρωτεϊνών του αίματος (A-E). Παράγεται κυρίως από το ήπαρ και τον εγκέφαλο και έχει δύο κύριους μεταβολικούς ρόλους: α) την μεταφορά των τριγλυκεριδίων, από την περιοχή σύνθεσής ή απορρόφησής τους, στους ιστούς όπου αποθηκεύονται ή μεταβολίζονται μέσω χυλομικρών και VLDL και β) την μεταφορά της χοληστερόλης, από τα περιφερικά όργανα στο ήπαρ για καταβολισμό μέσω HDL. Επίσης, η *APOE* ρυθμίζει την ενεργότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η *APOE* εμπλέκεται άμεσα στην εναπόθεση αμυλοειδούς και στο σχηματισμό χαρακτηριστικών ινιδίων αφού προωθεί την συνάθροιση των πρόδρομων αμυλοειδογενών πρωτεϊνών^{119, 120}.

Το αλληλίο E4 έχει συνδεθεί με εγκεφαλικές και συστηματικές διαταραχές αμυλοειδούς, όπως η ασθένεια του Alzheimer (AD) σε ενήλικες προχωρημένης ηλικίας και με διαταραχές πριονίων¹²¹. Η γονοτύπωση του *APOE* χρησιμοποιείται σαν συμπληρωματική διαγνωστική εξέταση σε ενήλικες προχωρημένης ηλικίας με συμπτώματα γεροντικής άνοιας. Η παρουσία του αλληλίου E4 αποτελεί προδιαθεσικό

παράγοντα και αυξάνει την πιθανότητα η νοητική διαταραχή (γεροντική άνοια) να οφείλεται στην AD^{119, 120}. Επίσης, το αλληλίο E4 έχει συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακές παθήσεις¹²¹ ενώ το αλληλίο E2 με οικογενή υπερλιποπρωτεϊναιμία (τύπος III). Η γονοτύπωση του APOE χρησιμοποιείται σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο αίμα για να ελεγχθεί η κληρονομικότητα. Άτομα με το αλληλίο E4 είναι περισσότερο πιθανό να ανταποκριθούν σε διατροφή χαμηλών λιπαρών και λιγότερο στις στατίνες αντίθετα με τα άτομα με αλληλίο E2 που έχουν καλύτερη θεραπευτική ανταπόκριση στις στατίνες.

Διάφορες μελέτες έχουν εξετάσει τη σύνδεση των αλληλίων του APOE με οφθαλμικές παθήσεις. Ο ρόλος των APOE αλληλίων έχει καθοριστεί στην ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας¹²²⁻¹²⁴. Για το ΠΓΑΓ υπάρχουν μελέτες που έχουν δείξει θετική συσχέτιση του APOE με την πάθηση^{125, 126} ενώ άλλες αρνητική συσχέτιση^{127, 128}. Το ενδιαφέρον για την συσχέτιση του Ψ/A.Σ με τα αλληλία του APOE βασίζεται στο γεγονός ότι το Ψ/A.Σ και Ψ/A.Γ έχουν κοινά χαρακτηριστικά με διαταραχές του αμυλοειδούς όπως η AD. Υπάρχουν τα παρακάτω στοιχεία: 1) κλινικές μελέτες έδειξαν ότι οι ασθενείς με AD παρουσιάζουν πιο συχνά Ψ/A.Σ¹²⁹, 2) στο υδατοειδές υγρό ασθενών με Ψ/A.Σ έχουν ανιχνευθεί πεπτίδια β-αμυλοειδούς και υλικό που δεσμεύει τη χρωστική Congo Red^{130, 131}, 3) αμυλοειδές P έχει ανιχνευθεί στις εναποθέσεις Ψ/A υλικού¹³² και 4) πρόσφατα στο Ψ/A υλικό έχει αποδειχθεί η παρουσία της απολιποπρωτεΐνης E⁸⁸ και άλλων απολιποπρωτεϊνών, όπως της απολιποπρωτεΐνης J (clusterin) και της απολιποπρωτεΐνης D^{5, 86, 87, 90}.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν κυρίως δύο μελέτες που αξιολόγησαν την πιθανή σύνδεση του γονότυπου του APOE με το Ψ/A.Σ-Ψ/A.Γ με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Σε μία μελέτη απ' τη Τουρκία ο πολυμορφισμός του APOE βρέθηκε ότι έχει ισχυρή σύνδεση με την ανάπτυξη Ψ/A.Σ. Συγκεκριμένα, οι Yilmaz και συν. το 2005 σε δείγμα 76 ασθενών με Ψ/A.Σ βρήκαν σημαντική σύνδεση μεταξύ του αλληλίου E2 και του Ψ/A.Σ αφού οι ασθενείς είχαν σε ποσοστό 50% το αλληλίο E2 ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στους μάρτυρες ήταν 20%. Αντίθετα, το αλληλίο E3 βρέθηκε να είναι «προστατευτικό» αφού εμφανιζόταν στο 72% των μαρτύρων ενώ αντίστοιχα στο 42% των ασθενών⁹⁵. Εντούτοις, μία πιο πρόσφατη μελέτη με μεγαλύτερο δείγμα ασθενών από τη Γερμανία και την Ιταλία δεν επιβεβαίωσε τα παραπάνω αποτελέσματα. Οι Krumbiegel και συν. το 2010 σε δείγμα 661 ασθενών

από τη Γερμανία (με και χωρίς γλαύκωμα) και 209 από την Ιταλία (με και χωρίς γλαύκωμα) βρήκαν το αλληλίο E3 να είναι πιο συχνό και στους δύο πληθυσμούς (από 80% έως 83%) ενώ το E2 ήταν πιο σπάνιο (από 6% έως 9%). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συχνότητες των αλληλίων και των γονοτύπων μεταξύ ασθενών και μαρτύρων και στους δύο πληθυσμούς¹¹⁸.

Το γονίδιο της μεθυλενοτετραϋδροφυλλικής αναγωγάσης (*MTHFR*)

Το γονίδιο της μεθυλενοτετραϋδροφυλλικής αναγωγάσης (*MTHFR*) αποτελείται από 11 εξώνια και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1p36.3. Η αναγωγάση του μεθυλενοτετραϋδροφυλλικού (*MTHFR*) είναι ένα ένζυμο το οποίο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και ανάγει μη αντιστρεπτά το 5,10-μεθυλενοτετραϋδροφυλλικό προς 5-μεθυλενοτετραϋδροφυλλικό, το οποίο χρησιμοποιείται για τη μετατροπή της ομοκυστεΐνης προς μεθειονίνη, με τη δράση του ενζύμου συνθάση της μεθειονίνης. Το ένζυμο *MTHFR* περιορίζει την συγκέντρωση της ομοκυστεΐνης στο αίμα, εμποδίζοντας την τοξική της δράση στο ενδοθήλιο των αγγείων. Μια μεταλλαγμένη μορφή του ενζύμου, που προκύπτει από την αντικατάσταση της θυμίνης από κυτοσίνη στη θέση 677, προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης της ομοκυστεΐνης στο αίμα και θεωρείται ότι αποτελεί προδιαθετικό παράγοντα θρομβοφιλίας. Η μετάλλαξη C677T στο γονίδιο *MTHFR* καθιστά το ένζυμο θερμοευαίσθητο με μειωμένη καταλυτική δράση και στην ομοζυγωτία συνδέεται με υπερομοκυστεϊναιμία. Η παραπάνω μετάλλαξη σε ομοζυγώτες αποτελεί την πιο κοινή αιτία μέτριας υπερομοκυστεϊναιμίας (15-30μM/L). Αύξηση των επιπέδων της ομοκυστεΐνης στο αίμα μπορεί να οφείλεται και σε μη γενετικούς παράγοντες όπως κάπνισμα, μεγάλη κατανάλωση καφέ, χαμηλά επίπεδα B6 και B12 βιταμινών και φυλλικού οξέος στο πλάσμα και καθιστική ζωή. Οι Αντωνιάδη και συν. (1999) βρήκαν σε 160 Έλληνες εθελοντές υγιείς αιμοδότες την συχνότητα της μετάλλαξης C677T του γονιδίου *MTHFR* σε ομοζυγωτία να είναι 8%¹³³.

Η ομοκυστεΐνη είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για στεφανιαία νόσο¹³⁴, αγγειοεγκεφαλικά επεισόδια¹³⁵ και θρομβοφλεβίτιδα¹³⁶. Πρόσφατα, υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης στο πλάσμα έχει βρεθεί ότι συνδέονται ισχυρά με αγγειακές παθήσεις που εκδηλώνονται στον οφθαλμό όπως, θρόμβωση αρτηρίας και φλέβας αμφιβληστροειδούς, πρόσθια ισχαιμική οπτική νευροπάθεια μη αρτηριδική,

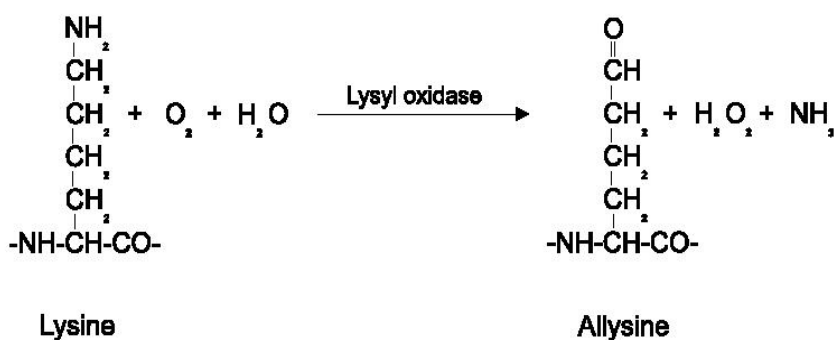
νεοαγγειακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας¹³⁷ και παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια¹³⁸. Η ακριβής αιτιοπαθογένεια του γλαυκώματος είναι ελάχιστα κατανοητή. Παρόλο που η αυξημένη ΕΟΠ θεωρείται ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου για το γλαύκωμα, παθογενετικοί μηχανισμοί πέραν της αύξησης της ΕΟΠ εμπλέκονται στην ανάπτυξη γλαυκωματικής βλάβης. Μικροαγγειακοί παράγοντες ίσως να συμβάλουν στην ισχαιμία της κεφαλής του οπτικού νεύρου και κατά συνέπεια στην απώλεια νευρικών ινών του αμφιβληστροειδούς. Ενδείξεις που υποστηρίζουν αυτή την άποψη αποτελούν, οι διαταραχές στην ροή του αίματος στις οφθαλμικές και αμφιβληστροειδικές αρτηρίες σε ασθενείς με γλαύκωμα¹³⁹, η σύνδεση μεταξύ γλαυκώματος και συστηματικών αγγειακών παθήσεων¹⁴⁰ και η επιδείνωση της γλαυκωματικής διαδικασίας κατά την νυχτερινή υπόταση¹⁴¹. Γι' αυτό τον λόγο παράγοντες όπως η υπερομοκυστεϊναιμία που μπορούν να προκαλέσουν αγγειακές παθήσεις του οφθαλμού μπορούν με έμμεσο τρόπο να συμβάλουν στην παθογένεια του γλαυκώματος. Επιπλέον, πρόσφατα βρέθηκε ότι η ομοκυστεϊνή προκαλεί ανισορροπία μεταξύ των μεταλλοπρωτεϊνών και των αναστολέων τους¹⁴² που εμπλέκεται στην παθογένεση του Ψ/Α.Σ⁴. Επίσης σε μοντέλο ποντικίου έχει βρεθεί ότι προκαλεί απόπτωση των νευρικών ινών του αμφιβληστροειδούς¹⁴³.

Λίγες μελέτες έχουν εξετάσει την σύνδεση μεταξύ υπερομοκυστεϊναιμίας και γλαυκώματος ανοιχτής γωνίας, χωρίς συνέπεια στα αποτελέσματα. Οι Bleich και συν. βρήκαν υψηλά επίπεδα ομοκυστεϊνης στο αίμα σε ασθενείς με ΠΓΑΓ και Ψ/Α.Γ¹⁴⁴,¹⁴⁵. Δύο ακόμα μελέτες επιβεβαίωσαν τα παραπάνω αποτελέσματα για το Ψ/Α.Γ^{58, 59} ενώ άλλες δύο μελέτες απέτυχαν στο να δείξουν σύνδεση μεταξύ ομοκυστεϊνης στο αίμα και ΠΓΑΓ και γλαύκωμα φυσιολογικής πίεσης^{59, 146}. Όσον αφορά το Ψ/Α.Σ, η υπερομοκυστεϊναιμία ίσως να συμβάλει στον αυξημένο αγγειακό κίνδυνο που έχει βρεθεί ότι διατρέχουν οι ασθενείς με Ψ/Α.Σ που περιλαμβάνει και τα ανευρύσματα της κοιλιακής αορτής⁵⁶. Στους ασθενείς με Ψ/Α.Σ οι διαταραχές αυτές θα μπορούσαν να ενισχυθούν επιπλέον από βλάβες σε γονίδια με σημαντικούς ρόλους στη σύνθεση ελαστίνης όπως το γονίδιο *LOXLI*¹⁴⁷. Υψηλά επίπεδα ομοκυστεϊνης έχουν ανιχνευθεί στους ασθενείς με Ψ/Α.Σ, εκτός από το πλάσμα, στο υδατοειδές υγρό και τα δάκρυα^{60, 145, 148}. Υπερομοκυστεϊναιμία έχει βρεθεί και στους ασθενείς με AD και άνοια οφειλόμενη σε αγγειοπάθεια με τους οποίους οι ασθενείς με Ψ/Α.Γ έχουν κοινά ευρήματα^{149, 150}.

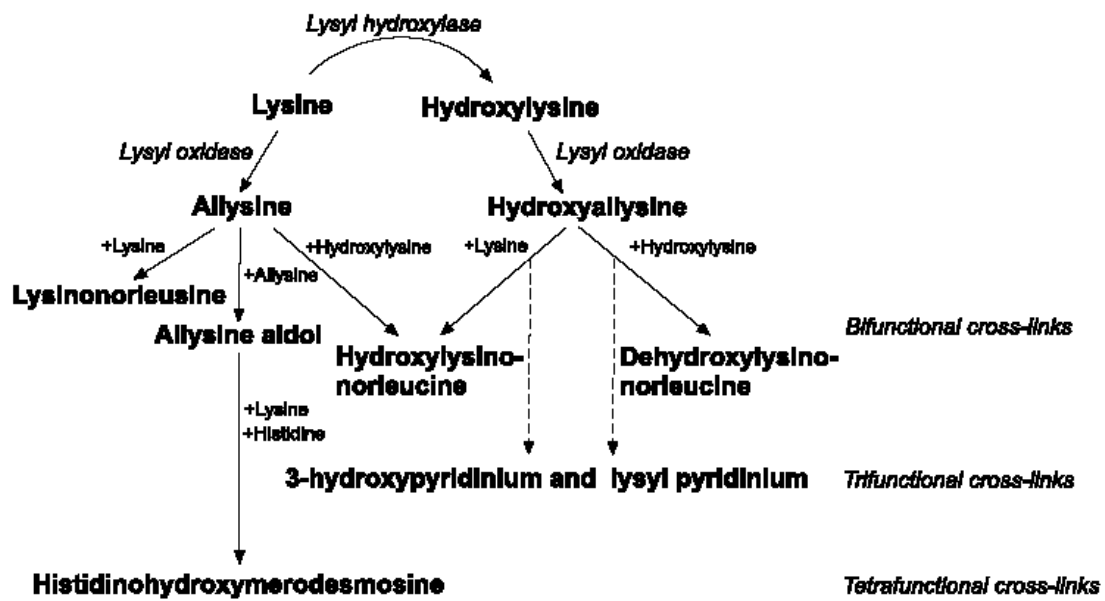
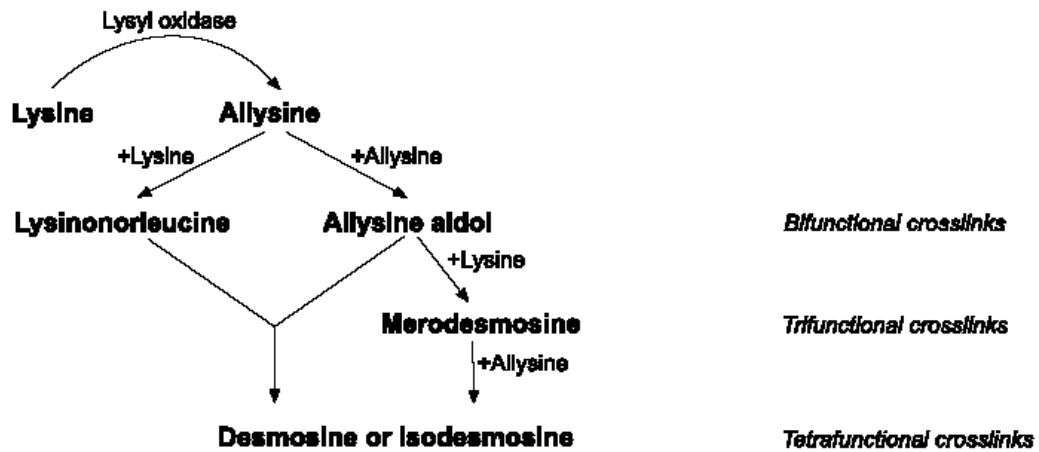
Υπάρχουν μελέτες που εξέτασαν τη σύνδεση των μεταλλάξεων του *MTHFR* με το γλαύκωμα. Μόνο σε μία από αυτές, των Junemann και συν. (2005) βρέθηκε ότι η μετάλλαξη C677T ήταν πιο συχνή στο ΠΓΑΓ απ' ότι σε μάρτυρες εντούτοις στο Ψ/Α.Γ δεν ήταν σημαντικά συχνότερη¹⁵¹. Σε δύο πρόσφατες μελέτες του 2008 και του 2009 δεν αποδείχθηκε σύνδεση μεταξύ των μεταλλάξεων του γονιδίου *MTHFR* και του Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ και ΠΓΑΓ^{96, 152}.

Το γονίδιο της οξειδάσης της λυσίνης like1 (*LOXL1*)

Οι οξειδάσες της λυσίνης είναι μια οικογένεια ενζύμων που περιλαμβάνει 5 μέλη: την οξειδάση της λυσίνης (LOX) και τα παράλογα (LOXL1, LOXL2, LOXL3, LOXL4). Οι λειτουργικές διαφορές αυτών των ενζύμων δεν είναι καλά καθορισμένες. Πρόκειται για εξωκυττάρια ένζυμα, με συμπάραγοντα χαλκό, που καταλύουν τη διασύνδεση του κολλαγόνου και της ελαστίνης με την δημιουργία σταυροδεσμών¹⁵³. Συγκεκριμένα, καταλύουν, μέσω οξειδωτικής απαμίνωσης, τον σχηματισμό αλδευδών από κατάλοιπα λυσίνης σε πρόδρομες ουσίες κολλαγόνου ή ελαστίνης (σχήμα 3.1). Οι αλδεύδες είναι υψηλής δραστηριότητας και αντιδρούν αυθόρμητα με κατάλοιπα αλδεύδης που προέρχονται από τη δράση άλλων οξειδασών της λυσίνης. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται πολύπλοκοι σταυροδεσμοί στο κολλαγόνο και στην ελαστίνη οι οποίοι διαφέρουν ως προς τη δομή (σχήμα 3.2). Το αποτέλεσμα είναι η απαραίτητη “τιθάσευση” του κολλαγόνου και της ελαστίνης, για την σταθεροποίηση των ινών κολλαγόνου και την ακεραιότητα των ώριμων μορίων ελαστίνης.



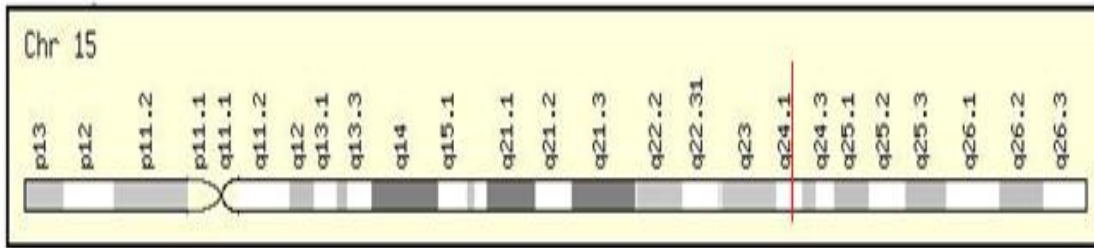
Σχήμα 3.1: Η οξειδάση της λυσίνης με οξειδωτική απαμίνωση της λυσίνης δημιουργεί την αλλυσίνη (<http://herkules.oulu.fi/isbn9514267397/html/i894480.html>).

A**B**

Σχήμα 3.2: Α) Αντιδράσεις της λυσίνης και της υδροξυλυσίνης στην βιοσύνθεση δι-, τρι- και τετραλειτουργικών σταυροδεσμών στην ελαστίνη και Β) το κολλαγόνο (<http://herkules.oulu.fi/isbn9514267397/html/i894480.html>).

Το κάθε γονίδιο της *LOX* οικογένειας γονιδίων (*LOX*, *LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3*, *LOXL4*) στους ανθρώπους περιέχει ένα μοτίβο ενωμένο με χαλκό, κατάλοιπα λυσιλο-τυροσιλ-κινόνης (LTQ) και μία περιοχή παρόμοια με υποδοχέα κυτταροκίνης (CRL) στην καλά διατηρημένη περιοχή του C-τελικού άκρου. Τα παράλογα γονίδια εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα και είναι τα εξής: *LOX* - 5q23.2, *LOXL2* - 8p21.3, *LOXL3* - 2p13, *LOXL4* - 10q24.

Το γονίδιο *LOXL1* (UniProtKB: Q08397, OMIM: 153456, HGNG: 6665, GeneID: 4016) εντοπίζεται στη χρωμοσωμική θέση 15q24-25 (base pair 74,218,788-base pair 74,244,477, εικόνα 3.1) και κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη LOXL1 (EC 1.4.3.13). Αποτελείται από επτά εξόνια και κωδικοποιεί mRNA (2358 βάσεις) και την πρωτεΐνη 574 αμινοξέων (63KDa) (<http://www.genecards.org>). Πέντε από τα επτά εξόνια (εξόνια 2-6) του *LOXL1* παρουσιάζουν ισχυρή ομολογία μεταξύ τους και κωδικοποιούν την καταλυτική περιοχή του C τελικού άκρου που διασυνδέεται με την ελαστίνη. Η αλληλουχία αμινοξέων στο C-τελικό άκρο είναι εξαιρετικά διατηρούμενη, φαίνεται να είναι επαρκής για την δραστηριότητα της αμινοοξειδάσης, και κάθε μέλος της οικογένειας μπορεί να διατηρήσει αυτή τη λειτουργία. Οι διαφορές στην αλληλουχία μεταξύ του γονιδίου *LOXL1* και των υπολοίπων παραλόγων βρίσκονται στο εξόνιο 1, το οποίο κωδικοποιεί την μοναδική περιοχή του N τελικού άκρου που απαιτείται για την κατάλληλη ενεργοποίηση του ενζύμου, την αναγνώριση του υποστρώματος και τον σχηματισμό δεσμών¹⁵⁴. Το N-τελικό άκρο είναι λιγότερο διατηρημένο και μπορεί να προσδώσει πρόσθετους ρόλους σε κάθε ξεχωριστό μέλος της οικογένειας των οξειδασών της λυσίνης όπως στην ανάπτυξη, το γήρας, την καταστολή όγκων, τον έλεγχο της κυτταρικής εξέλιξης και την χημειοταξία. Οι περιοχές της *LOX* και *LOXL1* πρωτεΐνη που κωδικοποιούνται από συγκεκριμένες DNA ισομορφές των *LOX* και *LOXL1* γονιδίων ρυθμίζουν την εναπόθεση των δύο ενζύμων στις ελαστικές ίνες αντιδρώντας με την τροποελαστίνη. Είναι πιθανό οι διαφορές στις αλληλουχίες αυτών των περιοχών της *LOX* και *LOXL1* να είναι υπεύθυνες για τις λειτουργικές διαφορές των δύο ενζύμων¹⁵⁴.

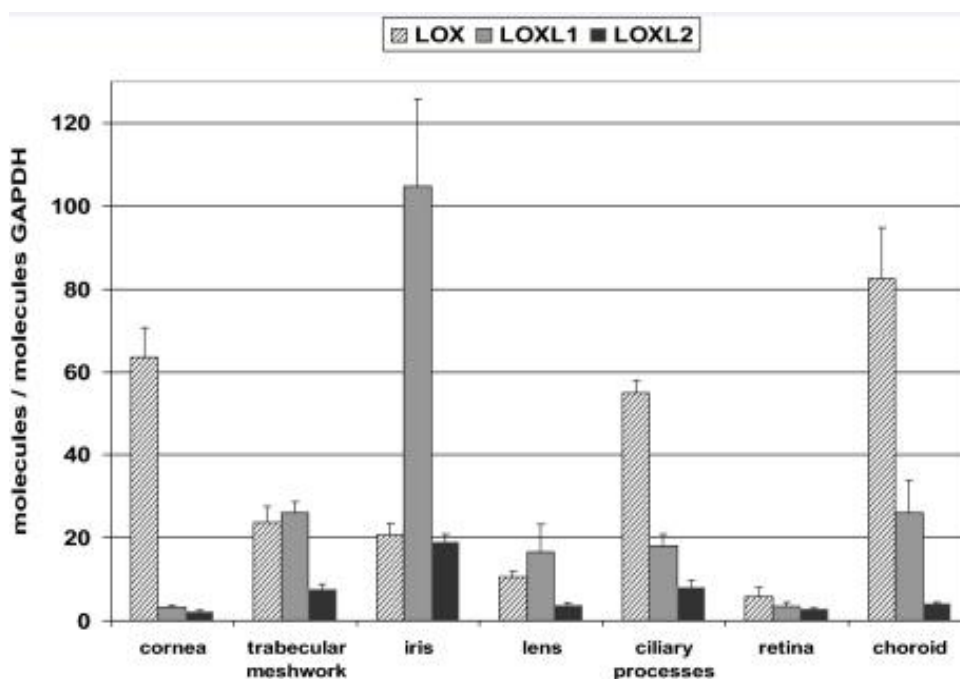


Εικόνα 3.1: Γενωμική τοποθεσία του γονιδίου LOXL1 (<http://genecards.org>).

Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν, ότι το προπεπτίδιο LOXL1 εμπλέκεται στην ελαστογένεση καταλύοντας τον πολυμερισμό της τροποελαστίνης για τον σχηματισμό ώριμου πολυμερούς ελαστίνης και αλληλεπιδρώντας με την φιμπουλίνη-5. Όπως έχει αναφερθεί, οι ελαστικές ίνες προσδίδουν ανθεκτικότητα στο εξωκυττάριο υλικό και η απώλειά τους συνδέεται με την γήρανση και σημαντικές παθήσεις όπως το εμφύσημα. In vivo, σε knock-out ποντίκια (με έλλειψη της LOXL1 πρωτεΐνης) βρέθηκε μειωμένη παραγωγή ελαστίνης και συσσώρευση τροποελαστίνης σε πολλούς ιστούς με αποτέλεσμα αγγειακές και άλλες διαταραχές¹⁵⁴⁻¹⁵⁶.

Η LOXL1 πρωτεΐνη, ξεχωριστά από την LOX, εντοπίζεται ειδικά στους τόπους ελαστογένεσης και λειτουργεί τόσο ως cross-link ένζυμο όσο και ως παράγοντας που συμμετέχει στην οργάνωση της ελαστογένεσης¹⁵⁶. Η πρωτεΐνη LOXL1 θεωρείται απαραίτητη για την ομοίωση των ελαστικών ινών κατά την ανάπτυξη και διατήρηση των ιστών¹⁵⁴ και πιθανώς να έχει συγκεκριμένο ρόλο στην αναδιαμόρφωση του συνδετικού ιστού κατά την διάρκεια δυναμικών διαδικασιών όπως ή ίνωση, ο καρκίνος, η εξέλιξη ιστών και οι ιστικές βλάβες¹⁵⁷. Στον άνθρωπο η πρωτεΐνη LOXL1 ανιχνεύθηκε σε πολλούς ιστούς όπως στο δέρμα, καρδιά, πλακούντα, πνεύμονες, ήπαρ, νεφρούς και μυοσκελετικούς ιστούς¹⁵⁸. Αν και ο ρόλος του γονιδίου *LOXL1* στον σχηματισμό και στην ομοίωση της εξωκυττάριας ουσίας στον οφθαλμό δεν είναι αποδεδειγμένος, η πρωτεϊνική έκφραση του *LOXL1* έχει πρόσφατα ανιχνευτεί σε διάφορους οφθαλμικούς ιστούς όπως κερατοειδής, ίριδα, φακός, ακτινωτό σώμα και οπτικό νεύρο^{81, 159}. Τα επίπεδα έκφρασης βρέθηκαν υψηλότερα στην ίριδα απ' ότι στον κερατοειδή και στον αμφιβληστροειδή. Η LOX ισομορφή ανιχνεύθηκε στις εξωκυττάριας ίνες και στο οπτικό νεύρο. Οι LOXL2, LOXL3 και LOXL4 ισομορφές ανιχνεύτηκαν επίσης σχεδόν σε όλους τους οφθαλμικούς ιστούς. (εικόνα 3.2). Σε μία μελέτη των Schlötzrer-Schrehardt και συν. βρέθηκε ότι η πρωτεϊνική έκφραση του *LOXL1* ήταν σημαντικά αυξημένη στα

πρώιμα στάδια σε ασθενείς με Ψ/Α.Σ και μειωμένη στα προχωρημένα στάδια με ή χωρίς γλαύκωμα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η έκφραση των *LOX* και *LOXL2* δεν είχε διαφορά ανάμεσα στις ομάδες. Φαίνεται ότι η πρωτεΐνη *LOXL1* συμμετέχει στα αρχικά στάδια της ελαστογένεσης. Τροποποιήσεις στην επεξεργασία, την ενεργοποίηση ή/και την ειδικότητα του υποστρώματος μπορεί να συμβάλλουν στην ανώμαλη συσσώρευση ελαστικών ινών στα χαρακτηριστικά ινίδια του Ψ/Α υλικού¹⁶⁰.



Εικόνα 3.2: Πρωτεϊνική έκφραση του *LOX*, *LOXL1* και *LOXL2* σε οφθαλμικούς ιστούς¹⁶⁰.

Οι Thorleifsson και συν. (2007) πρόσφατα δημοσίευσαν μία μελέτη που αποτέλεσε σημαντικό βήμα για την κατανόηση του Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ αφού αναζήτησαν συγκεκριμένα γονίδια που προκαλούν γλαύκωμα σε ασθενείς από τη Σουηδία και την Ισλανδία. Ανακάλυψαν ιδιαίτερα ισχυρή σύνδεση μεταξύ Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ και τριών ενιαίων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs) στο γονίδιο *LOXL1* στο χρωμόσωμα 15q24.1. Ο αποδοτέος κίνδυνος σε επίπεδο πληθυσμού (population attributable risk, PAR) ήταν σχεδόν 100%. Δύο πολυμορφισμοί ανιχνεύθηκαν στο εξόνιο 1 και ένας στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου και θεωρείται ότι απονέμουν κίνδυνο για Ψ/Α.Γ κυρίως μέσω του Ψ/Α.Σ. Ο πολυμορφισμός στο ιντρόνιο είναι ο rs2165241 (αλλαγή C σε T) και είναι αγνώστου

λειτουργίας, αφού δεν κωδικοποιεί κάποιο αμινοξύ, ενώ οι δύο πολυμορφισμοί στο εξόνιο είναι ο rs3825942 (G153D, αλλαγή G σε A) και ο rs1048661 (R141L, αλλαγή G σε T)⁸⁰. Το αλλήλιο κινδύνου για τον rs2165241 ήταν το αλλήλιο T, ενώ για τους G153D και R141L το αλλήλιο G. Ο απόλυτος υψηλός κινδύνου G-G για το Ψ/Α.Σ, που σχηματίζεται από τους G153D και R141L, στην ομοζυγωτία βρέθηκε ότι αυξάνει κατά 700 φορές το κίνδυνο για Ψ/Α.Σ συγκριτικά με τον απόλυτο χαμηλού κινδύνου. Παρ'όλου αυτά, σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό ο κίνδυνος για Ψ/Α.Σ ήταν περίπου μόνο δυόμισι φορές μεγαλύτερος, καθώς το 25% περίπου των ατόμων της ομάδας ελέγχου ήταν ομοζυγώτες για τον απόλυτο υψηλός κινδύνου.

Η σύνδεση του γονιδίου *LOXLI* με το Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ επιβεβαιώθηκε από πολλές μελέτες σε διαφορετικούς πληθυσμούς από τις ΗΠΑ^{97, 98, 100}, Αυστραλία⁸¹, Ινδία⁹⁹, Πακιστάν¹¹⁰, Ιαπωνία^{102, 103, 105}, Κίνα^{104, 109}, Κορέα^{111, 115}, Τουρκία¹¹², Λατινική Αμερική¹¹³, Αφρική¹¹⁴ και Ευρώπη^{101, 106, 107, 161} αποδεικνύοντας ότι πρόκειται για κύριο γενετικό παράγοντα κινδύνου που σχετίζεται σχεδόν με το σύνολο των περιπτώσεων Ψ/Α.Σ παγκοσμίως. Αντίθετα, καμία σύνδεση δε βρέθηκε με το ΠΓΑΓ^{108, 112, 162}, το χρωστικοφόρο γλαύκωμα¹⁶³ και με το γλαύκωμα κλειστής γωνίας¹⁶⁴.

Ο G153D, από τους πολυμορφισμούς του *LOXLI*, είναι αυτός που ανιχνεύεται συχνότερα στους πάσχοντες από Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ παγκοσμίως. Απο πολλές μελέτες προκύπτει ότι ανιχνεύεται στο 94%-100% των ασθενών με Ψ/Α.Γ, στο 95%-100% των ασθενών με Ψ/Α.Σ και στο 57%-88% της ομάδας ελέγχου^{108, 165}. Συγκεκριμένα το G αλλήλιο θεωρείται ο ισχυρότερος παράγοντας κινδύνου για Ψ/Α.Γ αφού εντοπίζεται στο 95%-100% των περιπτώσεων με Ψ/Α.Σ με ένα μέσο odds ratio (OR) 10,89.

Ο πολυμορφισμός R141L δεν έχει συσχετιστεί με την πάθηση στον ίδιο βαθμό όπως ο G153D και η σύνδεση δεν έχει αποδειχθεί σε όλες τις μελέτες^{97, 99}. Επιπλέον ο αυξημένος κίνδυνος στους ασιατικούς πληθυσμούς αφορά το αλλήλιο T σε αντίθεση με τους Καυκάσιους που το αλλήλιο κινδύνου είναι το αλλήλιο G. Στις περισσότερες μελέτες που έχει αποδειχθεί η σύνδεση, το G αλλήλιο ανιχνεύεται στο 78%-84% των ασθενών με Ψ/Α.Γ, στο 78%-83% των ασθενών με Ψ/Α.Σ και στο 60%-68% των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Σε πληθυσμούς από την Ιαπωνία αντίθετα ανιχνεύεται το αλλήλιο T στο 96%-100% των ασθενών με Ψ/Α.Γ, στο 98%-100% των ασθενών με Ψ/Α.Σ και στο 51%-54% των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Αυτή η διαφορετική συσχέτιση δείχνει μία ασαφή σύνδεση μεταξύ του R141L και του Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ.

Είναι πιθανό ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός να μην έχει κύριο ρόλο στην ανάπτυξη Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ ή να απαιτεί την συνύπαρξη άλλων γενετικών ή περιβαλλοντικών παραγόντων¹⁶⁵.

Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό της συσχέτισης του γονιδίου *LOXLI* με το Ψ/Α.Σ και το Ψ/Α.Γ είναι η πολλή υψηλή συχνότητα των πολυμορφισμών στους πάσχοντες, με τον αποδοτέο κίνδυνο σε επίπεδο πληθυσμού σε διάφορες μελέτες να είναι μεταξύ 80%-99%. Παρολ' αυτά η συχνότητα των πολυμορφισμών βρέθηκε σχετικά υψηλή και στα άτομα των ομάδων ελέγχου με αναφερόμενα ποσοστά έως και 88%. Αυτό δείχνει ότι πιθανώς γονίδια «προστατευτικά» ή περιβαλλοντικοί παράγοντες επιβραδύνουν την ανάπτυξη της νόσου. Από μία μελέτη των Challa και συν. (2008) βρέθηκε ότι οι δύο πολυμορφισμοί του *LOXLI* έχουν πολλή υψηλή κλινική ευαισθησία (test θετικό σε άτομα που έχουν την διαταραχή) αλλά πολλή χαμηλή κλινική ειδικότητα (test αρνητικό σε άτομα που δεν έχουν την διαταραχή). Για τον G153D η ευαισθησία για το G αλληλίο είναι 100% και η ειδικότητα 3,1% ενώ για τον R141L η ευαισθησία για το G αλληλίο είναι 95,7% και η ειδικότητα 13%⁹². Αυτό δείχνει ότι γενετικά tests για πολυμορφισμούς του *LOXLI* θα είχαν περιορισμένη χρήση σε γενικό πληθυσμό. Επιπλέον οι ομοιότητες στις συχνότητες των πολυμορφισμών στους ασθενείς με Ψ/Α.Σ και στους ασθενείς με Ψ/Α.Γ καθιστούν προβληματικό το διαχωρισμό, μέσω διαγνωστικών γενετικών tests, των ασθενών με Ψ/Α.Σ που θα αναπτύξουν Ψ/Α.Γ από αυτούς που δεν θα αναπτύξουν. Ακόμα, η έκφραση της πρωτεΐνης *LOXLI* δεν είναι ξεκάθαρο αν επηρεάζεται από τους πολυμορφισμούς του *LOXLI* σε τέτοιο βαθμό ώστε να οδηγήσει σε μία συστηματική πάθηση όπως το Ψ/Α.Σ. Αυτό ενισχύει την πολυπαραγοντική παθογένεια του Ψ/Α.Σ¹⁶⁵.

Η σύνδεση του *LOXLI* με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ περιπλέκεται επιπλέον από δύο μελέτες σε πληθυσμό έγχρωμων της Νοτίου Αφρικής, των οποίων τα αποτελέσματα διαφοροποιούνται από τα μέχρι τώρα γνωστά για την σύνδεση του G153D του *LOXLI* με την πάθηση. Σε αυτές τις μελέτες το αλληλίο κινδύνου ήταν το αλληλίο A, σε αντίθεση με το αλληλίο G που αφορά όλους τους άλλους πληθυσμούς παγκοσμίως^{114, 167}.

Παρά την περίπλοκη φύση της σύνδεσης του *LOXLI* με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ, ήδη διάφορες εταιρίες «ταχυδρομικής» γενετικής συμπεριέλαβαν τους πολυμορφισμούς του σε γενετικά tests για το Ψ/Α.Γ με δείγμα σίελου. Η εταιρία deCODEme έχει

αναπτύξει γενετικά tests για τους πολυμορφισμούς rs2165241 και rs1078967, η 23andMe για τον rs2165241 ενώ οι εταιρίες Navigenics και Pathway δεν αναφέρουν επακριβώς τους πολυμορφισμούς του *LOXLI* που συμπεριέλαβαν στα tests για το Ψ/Α.Γ. Να σημειώσουμε ότι τα γενετικά tests των εταιριών θεωρούνται εδραιωμένα εάν, για πάνω από 750 περιπτώσεις, το p value είναι μικρότερο από 0,01.

Η πρωτεΐνη *LOXLI*, μαζί με άλλες πρωτεΐνες όπως *APOE*, έχει ανιχνευθεί στις εναποθέσεις Ψ/Α υλικού σε οφθαλμικούς ιστούς τόσο με ανοσοϊστοχημική ανάλυση όσο και με φασματοσκοπία μάζας⁸⁸. Είναι βιολογικά εύλογο ότι μεταβολές στη λειτουργία του *LOXLI* μπορούν να έχουν ως συνέπεια παθολογική παραγωγή ελαστίνης και συσσώρευση ινώδους υλικού τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα του Ψ/Α.Σ. Παρ'όλο αυτά ο ακριβής μηχανισμός που οδηγεί στην ανάπτυξη Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ δεν έχει ακόμα καθοριστεί. Οι πολυμορφισμοί του *LOXLI* που συνδέονται με το Ψ/Α.Σ κωδικοποιούν τη μη διατηρούμενη N-τελική αλληλουχία της πρωτεΐνης η οποία μπορεί να έχει ρυθμιστική λειτουργία, κατευθύνοντας την πρωτεΐνη στους τόπους ελαστογένεσης, αλλά δεν επηρεάζει την καταλυτική της δράση. Είναι πιθανό οι πολυμορφισμοί του *LOXLI* που σχετίζονται με το Ψ/Α.Σ να βρίσκονται σε ανισοροπία με άλλες αλλαγές της αλληλουχίας του DNA που επηρεάζουν την έκφραση γονιδίου. Γι' αυτό το λόγο, είναι απαραίτητες μελέτες σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης ώστε να καθοριστεί αν η μείωση της έκφρασης του *LOXLI* σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης είναι υπεύθυνη για τη νόσο⁹⁷.

Τέλος, λόγω της επιβεβαιωμένης σύνδεσης του Ψ/Α.Σ με την AD και τις αγγειακές παθήσεις, δύο πρόσφατες μελέτες εξέτασαν την πιθανή συσχέτισή της AD και των αγγειακών παθήσεων με τους πολυμορφισμούς του *LOXLI*. Οι Hollö και συν. βρήκαν ότι η συχνότητα του αλληλίου κινδύνου G δεν διέφερε μεταξύ ασθενών με Ψ/Α και αγγειακή πάθηση και ασθενών με Ψ/Α χωρίς αγγειακή πάθηση¹⁶¹. Οι Abramsson και συν. δεν βρήκαν σύνδεση μεταξύ των πολυμορφισμών του γονιδίου και της AD¹⁶⁸.

4. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ - ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ

Εισαγωγή

Ως μετάλλαξη ορίζεται μία μόνιμη αλλαγή ή αλλοίωση στο γενετικό υλικό ενός κυττάρου, η οποία επηρεάζει την νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός ή περισσότερων γονιδίων. Οι μεταλλάξεις αποτελούν καθημερινότητα για τη ζωή ενός κυττάρου. Αν και οι πιο πολλές είναι επιβλαβείς εφόσον δεν επιδιορθωθούν, χωρίς αυτές η εξέλιξη θα ήταν αδύνατη. Μία νέα μετάλλαξη, για ένα δεδομένο γονίδιο, εμφανίζεται με συχνότητα περίπου μία στο εκατομμύριο κατά τη μετάβαση της γενετικής πληροφορίας από το μητρικό στο θυγατρικό κύτταρο. Συνεπώς αν θεωρηθεί σωστή η εκτίμηση πως το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει περίπου 25.000 γονίδια, τότε το 2,5% όλων των νεογέννητων φέρει μια νέα μετάλλαξη. Οι περισσότερες όμως από τις προαναφερθείσες μεταλλάξεις δεν εκδηλώνονται, αφού το αντισταθμιστικό γονίδιο του αλληλόμορφου χρωμοσώματος είναι φυσιολογικό, ενώ για να εκδηλωθεί κάποια γενετική ασθένεια είναι απαραίτητο να υπάρχει μετάλλαξη και στα δύο αλληλόμορφα χρωμοσώματα, στο συγκεκριμένο γονίδιο από το οποίο εξαρτάται η ασθένεια (υπολειπόμενη κληρονομηση).

Η κατάταξη των μεταλλάξεων γίνεται με διάφορους τρόπους. Μία αρχική κατάταξη γίνεται βάσει το είδος της βάσης που αντικαθίσταται κάθε φορά:

1) Μεταλλάξεις μετάπτωσης (transition) όπου μία πουρίνη (αδενίνη ή γουανίνη) αντικαθίσταται από μία άλλη πουρίνη ή μία πυριμιδίνη (θυμίνη ή κυτοσίνη) αντικαθίσταται από μία άλλη πυριμιδίνη.

2) Μεταλλάξεις μεταστροφής (transversion) όπου μία πουρίνη αντικαθίσταται από μία πυριμιδίνη ή το αντίστροφο.

Μία δεύτερη κατάταξη γίνεται βάσει του μεγέθους του γενετικού υλικού που υφίσταται μετάλλαξη:

1) Μεταλλάξεις που προκαλούν μεγάλες αναδιατάξεις στο μόριο του DNA, όπως ελλείμματα ή προσθήκες μεγάλων τμημάτων DNA και

2) Σημειακές μεταλλάξεις (point mutations) στις οποίες μόνο μία βάση υφίσταται την αλλοίωση. Οι σημειακές μεταλλάξεις κατηγοριοποιούνται ως εξής:

α) Μεταλλάξεις με λάθος νόημα ή παρερμηνεύσιμες (missense), στις οποίες η αλλαγή της βάσης οδηγεί κατά την μετάφραση σε αντικατάσταση ενός αμινοξέος από άλλο

β) Μεταλλάξεις χωρίς νόημα ή μη νοηματικές (nonsense), στις οποίες η αλλαγή της βάσης οδηγεί κατά την μετάφραση στη δημιουργία ενός εκ των τριών κωδικονίων λήξης της πρωτεϊνοσύνθεσης (UAA, UAG, UGA). Έτσι, δημιουργούνται πρωτεΐνες με μικρότερο μέγεθος και μειωμένη λειτουργικότητα

γ) Μεταλλάξεις αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης (frame shift), όπου υπάρχει προσθήκη ή έλλειμμα ενός ή περισσοτέρων νουκλεοτιδίων, χωρίς ο αριθμός των προστιθέμενων ή αφαιρούμενων νουκλεοτιδίων να είναι πολλαπλάσιο του τρία, με αποτέλεσμα να αλλάζει το πλαίσιο ανάγνωσης και να δημιουργείται μία εντελώς διαφορετική πρωτεΐνη

δ) Σιωπηρές μεταλλάξεις (silent), δηλαδή μεταλλάξεις στις οποίες έχει αντικατασταθεί το τρίτο νουκλεοτίδιο κάποιου κωδικονίου και λόγω του εκφυλισμού του γενετικού κώδικα, η μετάλλαξη αυτή δε συνεπάγεται την αλλαγή κάποιου αμινοξέος κατά τη μετάφραση

ε) Μεταλλάξεις στις συντηρητικές αλληλουχίες ματίσματος (splicing) ιντρονίων, δηλαδή μεταλλάξεις που επηρεάζουν την ωρίμανση του mRNA παρεμποδίζοντας τη σωστή αποκοπή των αλληλουχιών που αντιστοιχούν στα ιντρόνια και την ανασυγκόλληση των αλληλουχιών που αντιστοιχούν στα εξόνια

στ) Μεταλλάξεις στους υποκινητές (promoter) των γονιδίων όπου συνήθως εντοπίζονται σε θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων, με αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας μεταγραφής αυτού του γονιδίου

ζ) Μεταλλάξεις στις μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες (ιντρόνια) των γονιδίων, με φυσική απόρροια την αποικοδόμηση mRNA και τελικά την μειωμένη ικανότητα πρωτεϊνοσύνθεσης.

Ως σημειακοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs), ορίζονται οι διαλληλικές διαφοροποιήσεις σε ποσοστό >1% του πληθυσμού κάθε 1:250 έως 1:300 βάσεις στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Μπορεί να

βρίσκονται είτε σε κωδικοποιούσες περιοχές είτε όχι και μπορεί να συνδέονται με νόσημα ή όχι.

Οι μεταλλάξεις, θα μπορούσαν επιπροσθέτως να χωρισθούν στις κληρονομούμενες (hereditary) και στις επίκτητες ή αυθόρμητες (acquired or spontaneous). Οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις είναι αυτές που μεταβιβάζονται από γενιά σε γενιά, γιατί βρίσκονται στο γενετικό υλικό των γαμετικών κυττάρων (germline mutations), ενώ οι επίκτητες ή αυθόρμητες είναι το αποτέλεσμα τυχαίων λαθών στην αντιγραφή του DNA, συναντώνται στα σωματικά κύτταρα και δε μεταβιβάζονται από γενιά σε γενιά. Οι σωματικές μεταλλάξεις (somatic mutations) συνήθως υπάρχουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα παρουσία υψηλών επιπέδων φυσιολογικών αλληλουχιών «φυσικού τύπου» (wild-type) που λειτουργούν σαν υπόβαθρο. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη μεθόδων με μεγαλύτερη ευαισθησία συγκριτικά με αυτές που χρησιμοποιούνται για ανάλυση μεταλλάξεων στη γαμετική σειρά¹⁶⁹.

Τεχνικές ανάλυσης μεταλλάξεων

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα για την ανάλυση και τον προσδιορισμό μεταλλάξεων είναι ποικίλες και βασίζονται σε πολλές και διαφορετικές αρχές με πιο σύνηθες κοινό χαρακτηριστικό τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό. Οι τεχνικές ανάλυσης μεταλλάξεων χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες σύμφωνα με το αν μπορούν να προσδιορίσουν γνωστές ή άγνωστες μεταλλάξεις.

Εάν είναι γνωστό το φάσμα των μεταλλάξεων ενός συγκεκριμένου πληθυσμού θα χρησιμοποιηθούν τεχνικές ανίχνευσης που στοχεύουν συγκεκριμένες μεταλλάξεις όπως:

- *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLPs, Ανίχνευση μεταλλάξεων με χρήση περιοριστικών ενζύμων)*: Η τεχνική RFLPs ήταν από τις πρώτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση DNA τόσο στη Μοριακή Διαγνωστική, όσο και στη Γενετική. Σήμερα, η χρήση της δεν είναι τόσο ευρεία όσο στο παρελθόν, λόγω της ανακάλυψης νέων τεχνικών, πιο απλών, γρήγορων και ευαίσθητων. Η χρήση περιοριστικών ενζύμων και η εμφάνιση του αποτελέσματος με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό και την τεχνική της αποτύπωσης ήταν από τις πρώτες προσεγγίσεις για την ανίχνευση μεταλλάξεων.

- *Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων του DNA – Maxam & Gilbert Sequencing, Sanger Sequencing*: τεχνική προσδιορισμού της αλληλουχίας των βάσεων δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων (DNA) και γενικότερα των νουκλεϊκών οξέων (δηλαδή και RNA)^{170, 171}.
- *Pyrosequencing (Αλληλούχηση DNA σε πραγματικό χρόνο)*: μέθοδος αλληλούχησης DNA πραγματικού χρόνου (Real-time DNA-sequencing) σε μικρό τμήμα του DNA που βασίζεται στην ανίχνευση πυροφωσφορικού (PPi) που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης πολυμερισμού του DNA¹⁷².
- *Next Generation Sequencing – Sequencing νέας γενιάς*: νεώτερη τεχνολογία ανάλυσης αλληλουχίας DNA η οποία καθιστά δυνατή τη λήψη πληροφοριών για όλο το γονιδίωμα¹⁷³.
- *Quantitative PCR (QPCR, Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου με χρήση ανιχνευτών υβριδισμού ή TaqMan)*: βασίζεται στην ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια και την καταγραφή του φθορισμού που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR¹⁶⁹. Τα PNAs (Peptide Nucleic Acids, Πεπτιδικά Νουκλεϊκά Οξέα) και τα LNAs (Locked Nucleic Acids, «Κλειδωμένα» Νουκλεϊκά Οξέα) είναι ένα είδος ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση της PCR. Πρόκειται για μία τεχνική που χρησιμοποιεί φυσικές μοριακές ρυθμίσεις για επίτευξη ειδικότητας¹⁷⁴. Η ασύμμετρη PCR με χρήση ανιχνευτών υβριδισμού (Asymmetric PCR with probes) είναι μία παραλλαγή της PCR. Η κύρια διαφορά της από τη συνήθη PCR είναι ότι χρησιμοποιούνται άνισες συγκεντρώσεις των δύο εκκινητών¹⁶⁹.
- *Αλληλοειδική ενίσχυση PCR (Allele – Specific Amplification, ASA ή ARMS)*: Μία άλλη κατηγορία μεθοδολογιών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων είναι αυτές που βασίζονται στην αλληλοειδική ενίσχυση κατά την αντίδραση της PCR (Allele-Specific Amplification, ASA). Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε δύο παράλληλες αντιδράσεις.
- *ASO (Υβριδισμός με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια)*: τεχνική ανάλυσης γνωστών σημειακών μεταλλάξεων, βασίζεται στο γεγονός ότι τα ολιγονουκλεοτίδια (probes) υβριδίζονται μόνο με αλληλουχίες που παρουσιάζουν απόλυτη συμπληρωματικότητα¹⁶⁹.
- *Μικροσυστοιχίες Ολιγονουκλεοτιδίων DNA (DNA Microarrays)*: βασίζεται στον υβριδισμό ιχνηθετημένου RNA ή DNA του δείγματος προς εξέταση με

συμπληρωματικά μόρια DNA ακινητοποιημένα σε συγκεκριμένα σημεία επάνω σε μία σταθερή επιφάνεια¹⁶⁹.

Σε αντίθετη περίπτωση, θα χρησιμοποιηθούν τεχνικές που μπορούν να προσδιορίσουν οποιαδήποτε μετάλλαξη σαρώνοντας τη γενωμική περιοχή όπως:

- *SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)*: τεχνική απλή και σχετικά γρήγορη για την ανίχνευση άγνωστων μεταλλάξεων, βασίζεται στην ιδιότητα που έχει το μονόκλωνο DNA να σχηματίζει δευτεροταγείς δομές¹⁶⁹.
- *DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με κλίση αποδιατακτικού)*: βασική μέθοδος ανίχνευσης σημειακών μεταλλάξεων, βασίζεται στη διαφορά κινητικότητας που έχει μία νουκλεοτιδική αλληλουχία σε σχέση με μία άλλη, όταν κινείται σε πηκτή που περιέχει βαθμίδωση σε αποδιατακτικό (οι δύο συμπληρωματικές αλυσίδες αποδιατάσσονται είτε λόγω αύξησης της θερμοκρασίας είτε λόγω παρουσίας συγκεκριμένων χημικών αποδιατακτικών ουσιών)^{169, 175}.
- *TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis, Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση θερμοκρασίας)*: η μέθοδος TGGE αποτελεί μια παραλλαγή της μεθόδου DGGE, καθώς αντί της χρήσης βαθμίδωσης συγκέντρωσης χημικών αποδιατακτικών, χρησιμοποιείται βαθμίδωση θερμοκρασίας¹⁷⁶.
- *COLD-PCR (Co-amplification at Lower Temperature, Συν-ενίσχυση σε χαμηλότερη θερμοκρασία αποδιάταξης-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)*: νέα παραλλαγή της κλασικής τεχνικής της PCR που ενισχύει ειδικά και επιλεκτικά μία μετάλλαξη ή γενικότερα ένα μεταλλαγμένο αλληλίο που βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση μέσα σε ένα μείγμα με περίσσεια φυσιολογικών αλληλίων (π.χ σωματική μετάλλαξη), ανεξάρτητα από το είδος της μετάλλαξης ή τη θέση της μέσα στην αλληλουχία¹⁷⁷.
- *PTT (Protein Truncation Test, Δοκιμασία πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης)*: ανιχνεύει γρήγορα και με αξιοπιστία μη νοηματικές μεταλλάξεις καθώς και μεταλλάξεις που αλλάζουν το πλαίσιο ανάγνωσης¹⁶⁹.
- *D-HPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography, Αποδιατακτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης)*: παραλλαγή της ήδη καταξιωμένης τεχνικής HPLC σε δείγματα PCR.

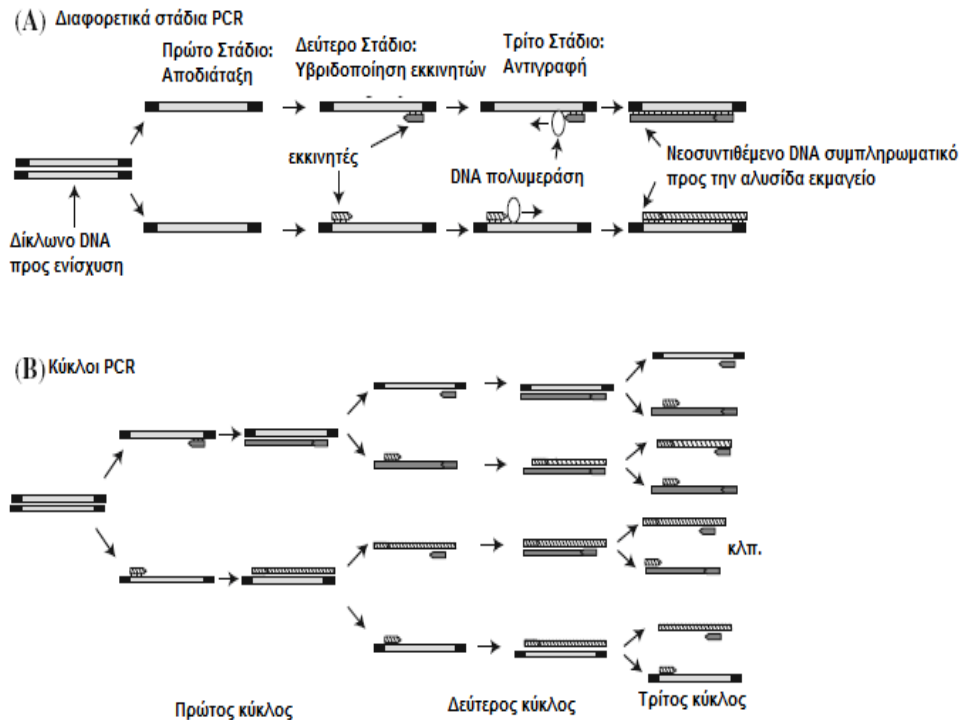
- *Φασματομετρία Μάζας με Ιοντισμό Εκρόφησης* με τη βοήθεια υλικού μήτρας σε συνδυασμό με ανιχνευτή χρόνου πτήσης (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS*): επιτρέπει την αλληλούχηση εκατοντάδων βάσεων σε μερικά μόνο δευτερόλεπτα¹⁷⁸.

Τέλος, μία τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων, αλλά και τον έλεγχο ύπαρξης νέων, άγνωστων μεταλλάξεων σε δείγματα είναι η *Υψηλής διακριτικότητας ανάλυση καμπυλών τήξεως (High Resolution Melting Curve Analysis)*. Είναι μια γρήγορη μέθοδος που βασίζεται στην ανάλυση των καμπυλών τήξης των προϊόντων PCR παρουσία ειδικών φθορίζουσών ουσιών, με ειδικά όργανα υψηλής διακριτικής ικανότητας¹⁷⁹.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου και ανάλυση καμπυλών τήξης

Η τεχνολογία της PCR σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR) είναι διαθέσιμη εδώ και περισσότερο από δέκα χρόνια, αλλά σημειώνεται μεγάλη αύξηση στην εφαρμογή της τα τελευταία χρόνια¹⁸⁰. Μία μέθοδος ανάλυσης SNPs που προσφέρει ταχύτητα και ακρίβεια στη γονοτύπωση, είναι η ανάλυση καμπυλών τήξης (melting curve analysis) κατόπιν ενίσχυσης με Real-time PCR. Η τεχνική επιτρέπει γονοτύπωση σε ένα κλειστό τριχοειδές χωρίς να παρεμβάλλονται άλλοι χειρισμοί μετά την PCR, ελαχιστοποιώντας με τον τρόπο αυτό τον κίνδυνο επιμόλυνσης και μειώνοντας τον, απαιτούμενο για την ανάλυση, χρόνο¹⁸¹. Η PCR πραγματοποιείται με στόχο τον πολλαπλασιασμό ορισμένης αλληλουχίας ενός υποστρώματος γενωμικού DNA (σχήμα 4.1). Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης είναι απαραίτητοι δύο ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που οριοθετούν την προς ενίσχυση περιοχή, τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs-deoxy nucleotide triphosphates), μια θερμοανθεκτική πολυμεράση και ιόντα μαγνησίου. Η PCR πραγματοποιείται με διαδοχικές αλλαγές της θερμοκρασίας (θερμικούς κύκλους). Αρχικά εφαρμόζεται υψηλή θερμοκρασία για το διαχωρισμό των δίκλωνων μορίων (denaturation-melting), στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώνεται ώστε να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες (annealing) και τελικά η θερμοκρασία

ρυθμίζεται στους 72°C , την ιδανική θερμοκρασία για την αντιγραφή από τη χρησιμοποιούμενη πολυμεράση (extension-elongation)^{169, 181, 182}.



Σχήμα 4.1: Αρχή της μεθόδου PCR. Α) Τα τρία στάδια ενός κύκλου PCR Β) Πολλαπλασιασμός της επιλεγμένης αλληλουχίας σε διαδοχικούς κύκλους PCR¹⁸².

Στην PCR πραγματικού χρόνου, τα δεδομένα συλλέγονται κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης του DNA και όχι σε ένα μόνο τελικό σημείο, όπως με τη συμβατική PCR. Η τεχνική χρησιμοποιεί φθορίζοντα μόρια που ιχνηθετούν τα προϊόντα της PCR και οργανολογία που καταγράφει το φθορισμό κατά την πρόοδο της αντίδρασης. Τα δεδομένα που συλλέγονται δίνουν πληροφορίες για την ταυτότητα, ποσότητα και αλληλουχία των ενισχυόμενων τμημάτων DNA^{169, 181}. Ο μειωμένος κίνδυνος επιμολύνσεων, η ευκολία στη διαχείριση των δειγμάτων, ο περιορισμός των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, η ελάττωση του συνολικού όγκου αντίδρασης και η μεγάλη ευαισθησία, ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου έχουν συντελέσει στην αύξηση της χρήσης της τόσο στην έρευνα όσο και σε κλινικά εργαστήρια^{169, 183}.

Από κινητικής άποψης, μια αντίδραση PCR μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από τρεις φάσεις. Η φάση του θορύβου διαρκεί έως ότου το σήμα του προϊόντος της

PCR γίνεται μεγαλύτερο από το σήμα του υποβάθρου του συστήματος. Η φάση της εκθετικής ανάπτυξης ξεκινά μόλις συσσωρευτεί επαρκής ποσότητα προϊόντος, έτσι ώστε να είναι ανιχνεύσιμο πάνω από το θόρυβο και ολοκληρώνεται όταν η απόδοση της αντίδρασης μειωθεί, καθώς η αντίδραση εισέρχεται στη φάση κορεσμού^{169, 182}. Ο κορεσμός οφείλεται στην εξάντληση κάποιου κρίσιμου παράγοντα που μπορεί να είναι οι εκκινητές, οι φθορίζοντες ιχνηθέτες (όταν είναι ιχνηθέτες υδρόλυσης) ή τα dNTPs¹⁸⁴.

Πρέπει να σημειωθεί ότι σε ένα τυπικό πείραμα real-time PCR οι καμπύλες όλων των δειγμάτων φθάνουν στο ίδιο επίπεδο κορεσμού και έτσι οι μετρήσεις τελικού σημείου δε δίνουν καμία πληροφορία για την αρχική ποσότητα των μορίων στόχων στο δείγμα. Η διάκριση μπορεί να γίνει ωστόσο στη λογαριθμική φάση, κατά την οποία η πρώτη σημαντική αύξηση του μετρούμενου φθορισμού συσχετίζεται με την αρχική ποσότητα του εκμαγείου-στόχου. Με άλλα λόγια ο κύκλος όπου κάθε αντίδραση δίνει πρώτη φορά σήμα μεγαλύτερο του σήματος υποβάθρου (κύκλος ουδός-Ct: Cycle Threshold ή κύκλος ποσοτικοποίησης-Cq: Cycle Quantification) εξαρτάται από την ποσότητα του DNA-στόχου που υπήρχε στο δείγμα στην αρχή της αντίδρασης. Όσο λιγότερα μόρια περιέχει αρχικά το δείγμα, τόσο περισσότεροι κύκλοι απαιτούνται για την ανίχνευση του σήματος, δηλαδή τόσο μεγαλύτερη είναι η τιμή Cq^{169, 182, 184}.

Το μεγαλύτερο μέρος της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων γίνεται με υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το εκάστοτε όργανο της PCR σε πραγματικό χρόνο, με τη βοήθεια ειδικών λογισμικών, που επιτρέπουν τη γρήγορη και αξιόπιστη παρουσίαση τους¹⁶⁹. Μια σημαντική παράμετρος της real-time PCR που δεν εξετάστηκε μέχρι στιγμής είναι η φύση και οι ιδιότητες των φθορίζοντων μορίων ιχνηθετών. Μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά τέτοια μόρια που εμπίπτουν σε μια από τις ακόλουθες κατηγορίες: χρωστικές που προσδένονται στη διπλή έλικα του DNA (όπως η SYBR Green), ανιχνευτές υβριδισμού DNA (hybridization probes), ανιχνευτές υδρόλυσης διπλής χρωστικής (τύπου TaqMan), «μοριακοί φάροι» (molecular beacons) και μόρια «σκορπιού»^{169, 182}.

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

φθορισμοφόρο δότη, σε ένα γειτονικό μόριο αποδέκτη, με αποτέλεσμα το μόριο δότης να επιστρέφει στη βασική μη διεγερμένη του κατάσταση. Το φαινόμενο FRET μπορεί να συμβεί μόνο όταν τα δύο μόρια (δότης και δέκτης) βρεθούν σε μια συγκεκριμένη απόσταση, που ονομάζεται ακτίνα Förster, στην οποία η απόδοση της μεταφοράς ενέργειας είναι 50% και εξαρτάται από τις φασματοσκοπικές ιδιότητες των μορίων. Όταν το κατάλληλο ζεύγος δότη-δέκτη βρεθεί στην απαιτούμενη απόσταση, λόγω του φαινομένου FRET το μόριο δότης δεν εκπέμπει πλέον φθορισμό. Εάν το μόριο δέκτης είναι επίσης φθορίζον, εκπέμπει φθορισμό στο χαρακτηριστικό για αυτό μήκος κύματος, οπότε και μπορεί να ανιχνευθεί. Η κύρια προϋπόθεση για να συμβεί κάτι τέτοιο είναι η ενέργεια που χάνει το μόριο δότης επιστρέφοντας στη βασική κατάσταση να ταυτίζεται με την ενέργεια που απαιτείται για τη διεγερση του μορίου δέκτη. Με άλλα λόγια το φάσμα απορρόφησης του μορίου δέκτη πρέπει να επικαλύπτει το φάσμα εκπομπής του μορίου δότη¹⁶⁹.

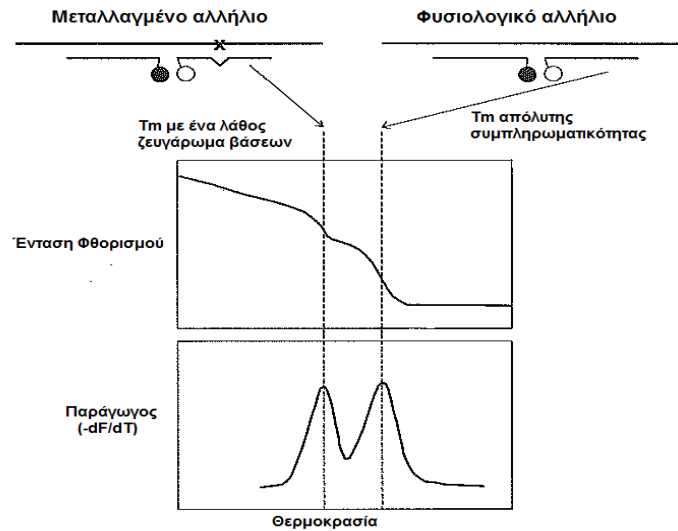
Στην παρούσα ερευνητική εργασία έγινε χρήση ανιχνευτών υβριδισμού. Πρόκειται για ανιχνευτές σχεδιασμένους να υβριδοποιούνται ο ένας δίπλα στον άλλον στην υπό ενίσχυση αλληλουχία. Το 3' άκρο του ενός ανιχνευτή είναι επισημασμένο με μια χρωστική, η οποία δρα ως δότης στο φαινόμενο FRET, ενώ το 5' άκρο του δεύτερου ανιχνευτή είναι επισημασμένο με μια χρωστική δέκτη. Στη real-time PCR, η πρώτη χρωστική διεγείρεται από πηγή ακτινοβολίας που υπάρχει στο χρησιμοποιούμενο όργανο και στη συνέχεια εκπέμπει ακτινοβολία σε λίγο μεγαλύτερο μήκος κύματος. Όταν οι δύο χρωστικές βρεθούν κοντά, η εκπεμπόμενη ακτινοβολία διεγείρει τη δεύτερη χρωστική που με τη σειρά της εκπέμπει ακτινοβολία σε ακόμα μεγαλύτερο μήκος κύματος, η οποία και καταγράφεται από το όργανο. Η απόδοση μεταφοράς της ενέργειας μεταξύ των δύο χρωστικών εξαρτάται από την απόσταση μεταξύ τους, η οποία πρακτικά είναι 1-5 νουκλεοτίδια όταν οι ανιχνευτές υβριδοποιούνται στην αλληλουχία-στόχο και σε διάταξη «κεφαλή-ουρά». Η μέτρηση της έντασης του φθορισμού πραγματοποιείται σε κάθε κύκλο, μετά το στάδιο του υβριδισμού και η αύξησή της, κατά την πρόοδο της αντίδρασης, είναι ανάλογη με την αύξηση της ποσότητας της ενισχυόμενης αλληλουχίας. Ενίοτε, είναι χρησιμότερο να λαμβάνονται οι λόγοι των σημάτων της χρωστικής που λειτουργεί ως δέκτης (τα οποία συνεχώς αυξάνουν) προς τα σήματα της χρωστικής που λειτουργεί ως δότης (τα οποία συνεχώς φθίνουν). Οι ανιχνευτές υβριδισμού παρέχουν μεγάλη ευαισθησία και εξειδίκευση στην ταυτοποίηση των προϊόντων της PCR, ακόμα και στις

περιπτώσεις που τα προς προσδιορισμό δείγματα περιέχουν μικρό αριθμό προσδιοριζόμενων μορίων^{181, 182}. Οι ανιχνευτές υβριδισμού παίζουν σημαντικό ρόλο και στη γονοτύπωση που επιτυγχάνεται εν συνεχεία με την ανάλυση των καμπυλών τήξης. Η ανάλυση αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι κάθε μόριο δίκλωνου DNA έχει τη δική του ειδική θερμοκρασία τήξης (T_m), η οποία ορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA παραμένει δίκλωνο και το 50% γίνεται μονόκλωνο. Η τιμή της T_m εξαρτάται από το μήκος μιας αλληλουχίας, την περιεκτικότητά της σε ζεύγη γουανίνης-κυτοσίνης και την παρουσία λάθους ζευγαρώματος βάσεων (mismatch)¹⁸¹.

Η ανάλυση καμπυλών τήξης ακολουθεί την ενίσχυση με real-time PCR. Αρχικά εφαρμόζεται υψηλή θερμοκρασία για την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων, στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώνεται ώστε να επιτευχθεί υβριδισμός των ανιχνευτών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες και τελικά η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά ώστε να προσδιορισθούν τα T_m των δίκλωνων μορίων, με ταυτόχρονη συνεχή μέτρηση της έντασης του φθορισμού. Είναι σημαντικό για τη λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων να σχηματισθούν κατά το δυνατόν περισσότερα διμερή αλληλουχίας στόχου-ανιχνευτών και λιγότερα δίκλιωνα PCR προϊόντα. Σε αυτό μπορεί να βοηθήσει η εφαρμογή μεθοδολογίας ασύμμετρης PCR¹⁸⁵ και η χρήση πολυμερασών που δε διαθέτουν ικανότητα 5' εξωνουκλεάσης¹⁸¹.

Στην περίπτωση που εξετάζεται ένας SNP στην ενισχυμένη αλληλουχία, σχεδιάζονται κατάλληλοι ανιχνευτές, ένας εκ των οποίων υβριδίζεται σε περιοχή που περιλαμβάνει την πολυμορφική θέση. Γενικά ο ανιχνευτής μπορεί να είναι συμπληρωματικός είτε για το φυσιολογικό είτε για το μεταλλαγμένο αλληλίο. Σε χαμηλή θερμοκρασία ο ανιχνευτής αυτός υβριδοποιείται και στα δύο αλληλία. Με τη βραδεία αύξηση της θερμοκρασίας, ο ανιχνευτής αποδιατάσσεται αρχικά από το αλληλίο με το οποίο δεν είναι απόλυτα συμπληρωματικός και σε υψηλότερη θερμοκρασία και από το έτερο αλληλίο. Καλά σχεδιασμένοι ανιχνευτές μπορούν να επιτύχουν διαφορά στην T_m της τάξης των 8-10° C για μία μόνο αλλαγή βάσης στην περιοχή υβριδοποίησης του ανιχνευτή. Η μείωση του μετρούμενου σήματος φθορισμού που προκύπτει από την ελάττωση του αριθμού των υβριδισμένων ανιχνευτών, παράγει τις χαρακτηριστικές καμπύλες τήξης για τους ομοζυγώτες φυσιολογικούς, τους ετεροζυγώτες και τους ομοζυγώτες μεταλλαγμένους. Η αρνητική

πρώτη παράγωγος παρέχει καλύτερη οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων^{181, 186} (σχήμα 4.2).



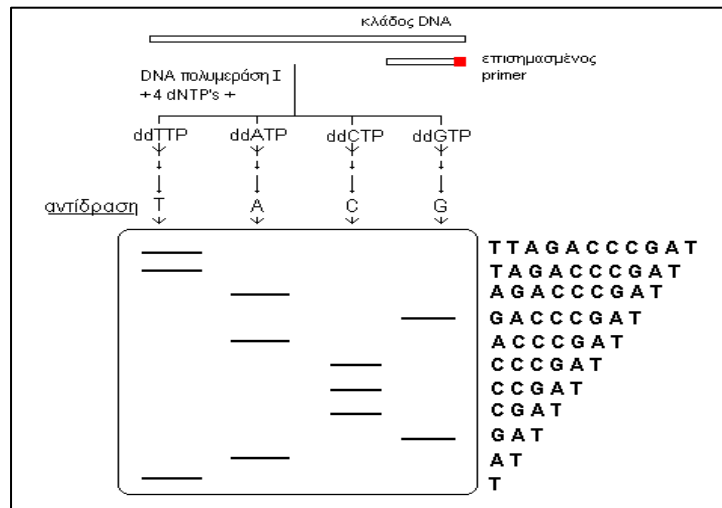
Σχήμα 4.2: Σχηματική αναπαράσταση γονοτύπωσης με ανάλυση καμπυλών τήξης με χρήση ανιχνευτών υβριδισμού. Στο παράδειγμα ο ανιχνευτής είναι συμπληρωματικός του φυσιολογικού αλληλίου. Κατά την αύξηση της θερμοκρασίας ο ανιχνευτής αυτός αποδιατάσσεται ταχύτερα από το μεταλλαγμένο αλληλίο, αφού η παρουσία του λάθος ζευγαρώματος στην πολυμορφική θέση μειώνει την T_m του δίκλωνου μορίου. Η αποδιάταξη έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση των δύο ανιχνευτών, μεταξύ των οποίων δεν εκδηλώνεται πλέον το φαινόμενο FRET. Έτσι η μετρούμενη ένταση φθορισμού μειώνεται. Η αποδιάταξη και η συνεπακόλουθη μείωση της έντασης φθορισμού για το φυσιολογικό αλληλίο επέρχεται σε υψηλότερη θερμοκρασία¹⁸¹.

Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων DNA (DNA sequencing)

Πρόκειται για μία τεχνική προσδιορισμού της αλληλουχίας των βάσεων δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων (DNA) και γενικότερα των νουκλεϊκών οξέων (δηλαδή και RNA). Ένας σημαντικός σταθμός στην ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων έγινε το 1977 όταν περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Maxam & Gilbert¹⁷⁰ μια μέθοδος ανάλυσης της αλληλουχίας του DNA με χημική αποικοδόμηση των βάσεων. Αργότερα το ίδιο έτος, προτάθηκε από τον Sanger¹⁷¹ και τους συνεργάτες του μια ενζυμική μέθοδος για την ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας βασιζόμενη

στον πρόωρο τερματισμό της νουκλεϊκής σύνθεσης. Σήμερα, οι δύο αυτές μέθοδοι έχουν υποστεί αρκετές τροποποιήσεις (δημιουργία διάφορων πρωτοκόλλων), οι βασικές τους αρχές όμως εξακολουθούν να παραμένουν αναλλοίωτες. Όλα τα σύγχρονα αυτοματοποιημένα μηχανήματα ανάλυσης του DNA (DNA sequencers) στηρίζονται κυρίως στην εφαρμογή της μεθόδου του Sanger.

Η τεχνική του Sequencing, κατά Sanger, είναι μία διαδικασία με την οποία επιτυγχάνεται η αλληλούχηση τμημάτων DNA που συνήθως είναι προϊόντα μιας αντίδρασης PCR που έχει προηγηθεί. Βασίζεται στην παρουσία στο μείγμα της αντίδρασης δι-δεοξυνουκλεοτιδίων (di-deoxynucleotide, ddNTPs) και των τεσσάρων αζωτούχων βάσεων (A, T, G, C), τα οποία όταν τοποθετηθούν στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα από τη DNA-πολυμεράση, τότε η σύνθεση της νέας αλυσίδας διακόπτεται και το συγκεκριμένο δι-δεοξυνουκλεοτίδιο σηματοδοτεί τον τερματισμό της αλυσίδας. Αυτό συμβαίνει διότι, τα δι-δεοξυνουκλεοτίδια στερούνται επιπλέον και της υδροξυλομάδας στην 3' θέση του δακτυλίου της δεοξυριβόζης. Λόγω της έλλειψης αυτής της υδροξυλομάδας, αφού η πολυμεράση τοποθετήσει αυτό το δι-δεοξυνουκλεοτίδιο στην αλυσίδα που συντίθεται, δεν μπορεί πια να τοποθετηθεί άλλο νουκλεοτίδιο στη συνέχεια γιατί δεν είναι εφικτό να σχηματιστεί ο φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ των νουκλεοτιδίων. Ο σχηματισμός του φωσφοδιεστερικού δεσμού απαιτεί την παρουσία μιας 3'-υδροξυλομάδας από το ήδη υπάρχον –τελευταίο-νουκλεοτίδιο και μιας 5'-φωσφορικής ομάδας από το «επόμενο» νουκλεοτίδιο που θα τοποθετηθεί στην αλυσίδα. Πραγματοποιούνται τέσσερις σειρές τέτοιων αντιδράσεων όπου στην καθεμία χρησιμοποιείται ένα από τα τέσσερα δι-δεοξυνουκλεοτίδια. Μετά το τέλος όλης της διαδικασίας προκύπτουν τμήματα DNA των οποίων το μέγεθος εξαρτάται από το σημείο όπου τοποθετήθηκε το δι-δεοξυνουκλεοτίδιο. Τα τμήματα αυτά αναλύονται με ηλεκτροφόρηση κατά την οποία επιβεβαιώνεται το μήκος του¹⁷¹ (σχήμα 4.3). Οι πληροφορίες αυτές συνδυάζονται και προκύπτει η πλήρης αλληλουχία των αζωτούχων βάσεων στο τμήμα του DNA που μας ενδιαφέρει. Έτσι μπορούμε να ανιχνεύσουμε αν σε κάποια θέση υπάρχει μετάλλαξη ή αν πρόκειται για φυσιολογικό DNA.



Σχήμα 4.3: Αρχή ενζυμικής μεθόδου DNA sequencing κατά Sanger¹⁶⁹.

Παρά το γεγονός ότι, η μέθοδος του Sanger για DNA sequencing είναι ο πιο αξιόπιστος τρόπος για τον ακριβή προσδιορισμό της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων ενός τμήματος DNA και έχει χαρακτηριστεί ως το «χρυσό πρότυπο» (gold standard) μεταξύ όλων των μεθόδων ανίχνευσης μεταλλάξεων, δυστυχώς χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλή ευαισθησία που κυμαίνεται περίπου στο 5-20%. Αυτό σημαίνει ότι η μέθοδος αυτή δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση π.χ σωματικών μεταλλάξεων σε αλληλία που βρίσκονται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση μέσα στο δείγμα και παρουσία περίσσειας φυσιολογικών αλληλίων. Υπάρχει δηλαδή κίνδυνος πολλά δείγματα που φέρουν τη μετάλλαξη να χαρακτηριστούν ως φυσιολογικά (ψευδώς αρνητικά).

Κατά την ανάλυση μεταλλάξεων με τη χρήση αυτόματου DNA sequencer, οι σημειακές μεταλλάξεις φαίνονται σαν δύο αλληλοεπικαλυπτόμενες κορυφές εξαιτίας της ύπαρξης και του φυσιολογικού νουκλεοτιδίου στο αλληλόμορφο γονίδιο. Για μεταλλάξεις που προκαλούν αλλαγή στο πλαίσιο ανάγνωσης (προσθήκες ή απαλοιφές), υπάρχει εμφάνιση διπλών κορυφών από το σημείο της αλλαγής και μέχρι το τέλος του γραφήματος. Οι διπλές κορυφές είναι ισοϋψείς μόνο σε περίπτωση ετεροζυγωτίας, δηλαδή σε περίπτωση που η μετάλλαξη υπάρχει στο ένα από τα δύο αλληλόμορφα γονίδια (και συνεπώς στο 50% όλων των μορίων DNA). Με αυτόν το τρόπο, παρουσιάζονται οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις.

Η τροποποίηση της μεθόδου Sanger με την αντικατάσταση της ραδιενεργούς σήμανσης από φθορίζουσες χρωστικές κατέστησε δυνατή την αυτοματοποίηση του DNA sequencing και τον ταχύ και αξιόπιστο προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων του DNA με τη χρήση ειδικών αυτοματοποιημένων οργάνων (DNA Sequencers). Το προς ανάλυση δείγμα υπόκειται αρχικά ενίσχυση με συμβατική PCR με κατάλληλους εκκινητές, η οποία ακολουθείται από τη μέθοδο των θερμικών κύκλων (cycle sequencing). Σε αυτή το προϊόν PCR, αφού προηγουμένως καθαρισθεί με στήλες ή με ενζυμική κατεργασία με ExoSAP-IT (Affymetrix, ΗΠΑ), αντιγράφεται με χρήση της Taq πολυμεράσης παρουσία ενός εκκινητή, dNTPS και επισημασμένων με φθορίζουσες χρωστικές ddNTPs. Τα διαφορετικού μεγέθους τμήματα που παράγονται, εισάγονται στη συνέχεια στο DNA sequencer, όπου πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση σε ειδικά τριχοειδή στα οποία διοχετεύεται ειδικό πολυμερές που αναγεννάται μετά το πέρας της αντίδρασης. Εφ' όσον τα φάσματα της εκπομπής των τεσσάρων χρωστικών δεν αλληλεπικαλύπτονται τότε με μια οπή στο τέλος του τριχοειδούς και το κατάλληλο laser και ανιχνευτή είναι δυνατόν να ανιχνεύονται τα σήματα φθορισμού που προκύπτουν από τις τέσσερις χρωστικές σε ένα μόνο πέρασμα στο ίδιο τριχοειδές. Τα σήματα αντιστοιχίζονται σε καμπύλες με διαφορετικά χρώματα και στη συνέχεια «μεταφράζονται» σε βάσεις DNA με κατάλληλο λογισμικό¹⁶⁹.

Τέλος, με τον όρο Next Generation Sequencing (NGS) περιγράφονται οι νεότερες και ταχύτερες τεχνολογίες ανάλυσης αλληλουχίας DNA οι οποίες καθιστούν δυνατή τη λήψη πληροφοριών για τη γενωμική αλληλουχία σε ένα επίπεδο που ήταν παλιότερα αδιανόητο. Οι νέες τεχνολογίες γενετικής ανάλυσης δεν είναι μόνο ευέλικτες, αλλά χαρακτηρίζονται και από ικανοποιητικές αποδόσεις και αρκετά χαμηλό κόστος ώστε να επεξεργάζονται το μεγάλο αριθμό των δειγμάτων που απαιτούνται για να ληφθούν στατιστικώς σημαντικές πληροφορίες. Η πληροφορία που προκύπτει από το NGS τροφοδοτεί ένα παγκόσμιο υπολογιστικό σύστημα που λειτουργεί χάρη σε μεγάλους παρόχους βιοπληροφορικών υπηρεσιών. Η πληροφορία αυτή αποτελεί τη βάση για εκτενέστερες σειρές ερμηνείας, όπως η ομαδοποίηση σε πλήρη γονιδιώματα, ο σχολιασμός της δομής γονιδίων καθώς και η χαρτογράφηση ως προς ήδη γνωστά πρότυπα γονιδιώματα και μεταγραφώματα προκειμένου για ποσοτική ανάλυση έκφρασης¹⁸⁷.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν οι εξής:

1 Η αξιολόγηση σε ελληνικό πληθυσμό από την Ήπειρο του επιπολασμού δύο γνωστών πολυμορφισμών στο γονίδιο *LOXLI*, οι οποίοι έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι συσχετίζονται με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ και η εκτίμηση της συμβολής τους στην εκδήλωση και ανάπτυξη των δυο αυτών καταστάσεων στον υπο μελέτη πληθυσμό. Η πρόσφατη ανακάλυψη της σύνδεσης του γονιδίου *LOXLI* με το Ψ/Α.Γ, κυρίως μέσω του Ψ/Α.Σ, έγινε σε ασθενείς από την Ισλανδία και την Σουηδία και βρέθηκε να είναι ιδιαίτερα ισχυρή. Η σύνδεση αυτή μετέπειτα, λιγότερο ή περισσότερο ισχυρή, επιβεβαιώθηκε σε πολλούς πληθυσμούς παγκοσμίως.

2. Η ανάπτυξη μεθοδολογίας για την ανίχνευση των πολυμορφισμών G153D και R141L του γονιδίου *LOXLI* με την χρήση πραγματικού χρόνου PCR και ανάλυση καμπυλών τήξης. Συνιστά μία εύκολη μέθοδο που παρέχει ταχύτητα στην ανίχνευση μεταλλάξεων και μετά από το αρχικό στάδιο των βελτιστοποιήσεων η μέθοδος είναι εξαιρετικά ταχεία και ακριβής, προσφερόμενη για ευρείας κλίμακας κλινική εφαρμογή.

3. Ο προσδιορισμός της συμβολής των πολυμορφισμών *MTHFR* 677C>T και *APOE* στη εκδήλωση και ανάπτυξη Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ στην Ήπειρο με την χρήση εξακριβωμένων μεθόδων για την γονοτύπωσή τους. Τα αποτελέσματα δημοσιευμένων μελετών για την αξιολόγηση των παραπάνω πολυμορφισμών ως γενετικοί παράγοντες κινδύνου για το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ είναι αντικρουόμενα.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Έγινε συλλογή 310 δειγμάτων περιφερικού αίματος, 10 mL σε δοκιμαστικούς σωλήνες με αντιπηκτικό EDTA, μετά από ενημέρωση και τελική έγγραφη συγκατάθεση των ατόμων που συμμετείχαν στην έρευνα αυτή (επισυνάπτεται υπόμνημα). Η οφθαλμολογική εξέταση και η συλλογή του υλικού έγινε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων - Οφθαλμολογική Κλινική - Τμήμα Γλαυκώματος, υπό την επίβλεψη του Αναπλ. Καθηγητή Γ. Κίτσου και η απομόνωση του DNA και γονοτύπωση των πολυμορφισμών στο Ινστιτούτο Υγείας Του Παιδιού, υπό την επίβλεψη του Δ/ντή Δρ. M. Petersen και στο Αττικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο - Τμήμα Κλινικής Βιοχημείας, υπό την επίβλεψη του Επ. Καθηγητή X. Κρούπη. Η μελέτη διεξήχθη σύμφωνα με την Διακήρυξη του Ελσίνκι και τις μετέπειτα τροποποιήσεις και το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από τις Επιτροπές Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και του Ινστιτούτου Υγείας Του Παιδιού.

Αναλυτικά, συλλέχθηκαν δείγματα αίματος από 82 ασθενείς με Ψ/Α.Γ (μέση ηλικία \pm SD, 74.5 ± 7.7 έτη, 55.6% άντρες), 69 ασθενείς με Ψ/Α.Σ (76.2 ± 7.2 έτη, 39.1% άντρες), 52 ασθενείς με ΠΓΑΓ (69.4 ± 8.8 έτη, 51% άντρες) και 107 άτομα ομάδας ελέγχους (74.4 ± 8.2 έτη, 43.9% άντρες). Οι ασθενείς και τα άτομα της ομάδας ελέγχου ήταν ισοσκελισμένοι ως προς ηλικία, φύλο και όλοι με καταγωγή από την Ήπειρο.

Όλοι οι ασθενείς και τα άτομα της ομάδας ελέγχου υποβλήθηκαν σε λήψη λεπτομερούς ιστορικού, ατομικού και οικογενειακού και σε πλήρη οφθαλμολογική εξέταση που περιέλαβε: λήψη οπτικής οξύτητας με τα οπτότυπα Snellen, οπτικών πεδίων με το περίμετρο του Humphrey, εξέταση των πρόσθιων μορίων με την σχισμοειδή λυχνία, εξέταση του φακού κατόπιν μυδρίασης για τον έλεγχο παρουσίας Ψ/Α υλικού στο πρόσθιο περιφάκιο, βυθοσκόπηση και γωνιοσκοπία με την ειδική ύαλο γωνιοσκοπίας (επισυνάπτεται υπόμνημα).

Το Ψ/Α.Σ καθορίστηκε από την παρουσία του χαρακτηριστικού Ψ/Α υλικού στο πρόσθιο περιφάκιο και/ή στο κορικό χείλος σε έναν ή και στους δύο οφθαλμούς με

φυσιολογική οπτική θηλή και ΕΟΠ ≤ 21 mmHg αμφοτερόπλευρα. Τα κριτήρια συμμετοχής για τους ασθενείς με ΠΓΑΓ ήταν: ΕΟΠ χωρίς θεραπεία ≥ 22 mmHg σε τουλάχιστον δυο 24ωρες καταγραφές της ΕΟΠ, ανοικτή γωνία πρόσθιου θαλάμου, γλαυκωματική οπτική θηλή και γλαυκωματικές αλλοιώσεις σε τουλάχιστον τρία οπτικά πεδία. Αποκλείστηκαν ασθενείς με δευτεροπαθές ή κλειστής γωνίας γλαύκωμα. Τα κριτήρια για την διάγνωση του ΠΓΑΓ ήταν σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Γλαυκώματος¹⁸⁸. Το Ψ/Α.Γ καθορίστηκε από τα σημεία του γλαυκώματος ανοικτής γωνίας και την ανίχνευση με την σχισμοειδή λυχνία των Ψ/Α εναποθέσεων στο πρόσθιο περιφάκιο και/ή στο κορικό χείλος σε ένα η και στους δύο οφθαλμούς. Τα άτομα της ομάδας ελέγχου ήταν παρόμοιας ηλικίας με τους πάσχοντες χωρίς ενδείξεις Ψ/Α εναποθέσεων στο πρόσθιο ημιμόριο. Είχαν ΕΟΠ εντός φυσιολογικών ορίων (≤ 21 mmHg) με φυσιολογική οπτική θηλή, ανοικτή γωνία, φυσιολογικά οπτικά πεδία και χωρίς οικογενειακό ιστορικό γλαυκώματος. Τα κριτήρια αποκλεισμού της μελέτης ήταν: η καταγωγή εκτός Ηπείρου, η εργασία σε μονάδες επεξεργασίας γυαλιού, η υποψία παρουσίας Ψ/Α.Σ ή/και γλαυκώματος και επιπλέον για τα άτομα της ομάδας ελεγχου, η εγχείρηση καταρράκτη και στους δύο οφθαλμούς και η ηλικία κάτω των 60.

Τα δεδομένα όσο αναφορά το φύλο, την ηλικία και το ατομικό ιστορικό (ΣΔ: σακχαρώδη διαβήτη, ΑΥ: αρτηριακή υπέρταση, ΚΠ: καρδιοπάθεια και ΑΠ: αγγειοπάθεια) των ασθενών των ομάδων με Ψ/Α.Σ (PEX), Ψ/Α.Γ (PEXG), ΠΓΑΓ (POAG) και των ατόμων της ομάδας ελέγχου (CONTROLS) παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες 5.1Α, Β, Γ και Δ.

Πίνακας 5.1Α: Στοιχεία και ατομικό ιστορικό των ασθενών με Ψ/Α.Σ (PEX).

ID	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΣΔ	ΑΥ	ΚΠ	ΑΠ
PEX1	Α	82		ΝΑΙ		ΝΑΙ
PEX2	Θ	89		ΝΑΙ		
PEX3	Θ	72		ΝΑΙ		
PEX4	Α	76				
PEX5	Θ	71	ΝΑΙ	ΝΑΙ		
PEX6	Θ	71		ΝΑΙ		
PEX7	Α	90		ΝΑΙ	ΝΑΙ	
PEX8	Θ	76		ΝΑΙ	ΝΑΙ	
PEX9	Θ	62				

PEX10	⊖	63				
PEX11	⊖	85				
PEX12	⊖	77		NAI		
PEX13	⊖	75		NAI		
PEX14	A	78	NAI			
PEX15	A	65		NAI	NAI	NAI
PEX16	⊖	71		NAI		
PEX17	A	80		NAI		
PEX18	⊖	80		NAI	NAI	
PEX19	A	69				
PEX20	⊖	77	NAI	NAI		
PEX21	⊖	80	NAI	NAI		
PEX22	⊖	80		NAI	NAI	
PEX23	A	74				
PEX24	⊖	70				
PEX25	⊖	71		NAI		
PEX26	⊖	74		NAI		
PEX27	⊖	68		NAI		
PEX28	A	71				
PEX29	⊖	78		NAI	NAI	
PEX30	A	71		NAI		
PEX31	A	72		NAI		
PEX32	⊖	78		NAI		
PEX33	A	77	NAI			
PEX34	A	68				
PEX35	⊖	76				
PEX36	A	86	NAI	NAI	NAI	
PEX37	A	76		NAI		
PEX39	A	71		NAI		
PEX40	⊖	75		NAI		
PEX41	⊖	79		NAI	NAI	
PEX42	A	81	NAI	NAI	NAI	
PEX43	⊖	84	NAI	NAI		
PEX44	⊖	89		NAI	NAI	
PEX45	⊖	61				
PEX46	⊖	72	NAI	NAI		
PEX47	⊖	88	NAI			
PEX48	A	83				
PEX49	⊖			NAI		
PEX50	⊖	90		NAI		
PEX51	A	89				

PEX52	A	77		NAI		NAI
PEX53	A	81	NAI	NAI		
PEX55	A	81				
PEX56	A	81				
PEX58	Θ	77				
PEX59	Θ	78				
PEX60	Θ	76		NAI		
PEX61	Θ	70				
PEX62	Θ	75	NAI	NAI		
PEX63	A	80		NAI		
PEX64	A	76		NAI	NAI	
PEX65	A	76		NAI		
PEX66	Θ	80				
PEX67	Θ	90				
PEX68	Θ	74		NAI		
PEX69	Θ	81		NAI	NAI	
PEX70	A	84				
PEX71	Θ	77				
PEX72	Θ	71	NAI	NAI		

Πίνακας 5.1B: Στοιχεία και ατομικό ιστορικό των ασθενών με Ψ/Α.Γ (PEXG).

ID	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΣΔ	ΑΥ	ΚΗ	ΑΠ
PEXG1	Θ	75		NAI	NAI	
PEXG2	A	68		NAI		
PEXG3	Θ	67		NAI		
PEXG4	Θ	40				
PEXG5	A	84				
PEXG6	Θ	69				
PEXG7	A	67				
PEXG8	A	59				
PEXG9	A	82				
PEXG10	A	71		NAI		
PEXG11	A			NAI		
PEXG12	A	85				
PEXG13	A	56	NAI	NAI		
PEXG14	Θ	75		NAI		
PEXG15	A	82		NAI		
PEXG16	A	71		NAI		
PEXG17	Θ	66				

PEXG18	A	73		NAI		
PEXG19	⊖	77		NAI		
PEXG20	A	66	NAI			
PEXG21	A	68		NAI		
PEXG22	⊖	79	NAI	NAI	NAI	
PEXG23	⊖	75				
PEXG24	⊖	81				
PEXG25	A	79				
PEXG26	⊖	72		NAI		
PEXG27	⊖	75				
PEXG28	⊖	66			NAI	NAI
PEXG29	⊖	81		NAI		
PEXG30	A	80				
PEXG31	⊖	62				
PEXG32	⊖	80		NAI	NAI	NAI
PEXG33	A	81		NAI		
PEXG34	A	80		NAI		
PEXG35	⊖	88		NAI		
PEXG36	⊖	74	NAI	NAI	NAI	NAI
PEXG37	⊖	76		NAI	NAI	
PEXG38	⊖	75	NAI			NAI
PEXG39	⊖	78		NAI		
PEXG40	A	72				
PEXG41	A	71		NAI	NAI	NAI
PEXG42	A	68		NAI	NAI	NAI
PEXG43	⊖	75				
PEXG44	A	73				
PEXG45	A	79		NAI	NAI	
PEXG46	⊖	94		NAI		
PEXG47	⊖	84		NAI		
PEXG48	A	85				
PEXG49	⊖	75		NAI		
PEXG50	⊖	75		NAI		
PEXG51	A	89				
PEXG52	⊖	84				
PEXG53	A	84	NAI			
PEXG54		65				
PEXG55	A	72				
PEXG56	⊖	81				
PEXG57	⊖	69				
PEXG58	⊖	69		NAI		

PEXG59	A	68		NAI		
PEXG61	A	67				
PEXG62	A	72				
PEXG64	Θ	75		NAI		
PEXG65	A	80				
PEXG66	A	82				
PEXG67	Θ	73				
PEXG68	A	75				
PEXG69	A	72		NAI		
PEXG70	A	72		NAI		NAI
PEXG72	Θ	80		NAI		
PEXG73	A	64				
PEXG74	A	64				
PEXG76	Θ	75	NAI	NAI		
PEXG77	Θ	73				
PEXG78	Θ	73	NAI			
PEXG79	A	68		NAI		
PEXG80	A	61		NAI		
PEXG81	A	69				
PEXG82	A	82			NAI	
PEXG83	A	66		NAI	NAI	
PEXG84	A	73		NAI		
PEXG85	A	74				
PEXG86	A	76		NAI		

Πίνακας 5.1Γ: Στοιχεία και ατομικό ιστορικό των ασθενών με ΠΓΑΓ (ΡΟΑΓ).

ID	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΣΔ	ΑΥ	ΚΠ	ΑΠ
ΡΟΑΓ 1	A	75		NAI		
ΡΟΑΓ 4	Θ	85				
ΡΟΑΓ 5	A	65		NAI	NAI	
ΡΟΑΓ 6	Θ	61				
ΡΟΑΓ 7	Θ	65		NAI	NAI	
ΡΟΑΓ 8	Θ	51		NAI		
ΡΟΑΓ 9	Θ	74		NAI		
ΡΟΑΓ 10	A	70		NAI		
ΡΟΑΓ 11	A	76				
ΡΟΑΓ 12	Θ	58		NAI		
ΡΟΑΓ 13	A	71		NAI		
ΡΟΑΓ 14	Θ	54		NAI		

POAG 16	⊖	78	NAI	NAI		
POAG 17	⊖	71	NAI	NAI	NAI	
POAG 18	⊖	72		NAI		
POAG 19	A	61	NAI			
POAG 21	A	68	NAI		NAI	
POAG 22	⊖	59				
POAG 23	⊖	77		NAI		
POAG 24	A	66				
POAG 25	A	68		NAI	NAI	
POAG 26	A	74				
POAG 27	A	59	NAI	NAI	NAI	
POAG 28	A	66				
POAG 29						
POAG 31	A	57				
POAG 33	⊖	83				
POAG 34	A	82				
POAG 35	A	62				
POAG 36	A	65				
POAG 37	⊖	79				
POAG 38	⊖	81				
POAG 40	A	81				
POAG 41	⊖	56				
POAG 42	A	72				
POAG 44	⊖	69				
POAG 46	A	54				
POAG 47	⊖	73				
POAG 48	⊖	68				
POAG 49	A	81				
POAG 51						
POAG 53	A	68				
POAG 54	A	70				
POAG 56						
POAG 57						
POAG 58						
POAG 59	A	84				
POAG 61						
POAG 62						
POAG 63						
POAG 64						
POAG 67						
POAG75						

Πίνακας 5.1Α: Στοιχεία και ατομικό ιστορικό των ατόμων της ομάδας ελέγχου (CONTROLS).

ID	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΣΔ	ΑΥ	ΚΠ	ΑΠ
C 1	Θ	73		NAI	ΣΝ	NAI
C 2	Θ	75		NAI		
C 3	A	71	NAI	NAI		
C 4	Θ	78				
C 5	Θ	77				
C 6	A	72		NAI		
C 7	Θ	94				
C 8	Θ	76		NAI	NAI	
C 9	Θ	85		NAI		
C 10	Θ	71		NAI		
C 11	A	66		NAI		
C 12	Θ	71		NAI		
C 13	A	60	NAI			
C 14	Θ	75				
C 15	A	73				
C 16	Θ	85				
C 17	A	76		NAI		
C 18	Θ	81				
C 19	Θ	71		NAI		
C 21	Θ	75		NAI	NAI	
C 22	Θ	67		NAI		
C 23	Θ	73	NAI			
C 24	Θ	82			NAI	
C 25	Θ	80	NAI			
C 27	A	88			NAI	
C 28	A	60				
C 29	Θ	75		NAI		
C 30	A	73				
C 31	A	81		NAI	APPYΘM.	
C 32	Θ	70				
C 33	Θ	72				
C 34	Θ	66	NAI	NAI		
C 35	A	78				
C 36	Θ	82		NAI		
C 37	Θ	75		NAI		
C 38	A	65		NAI		
C 39	A	60		NAI		

C 40	Θ	82				
C 41	Θ	82			NAI	
C 43	A	60				
C 44	A	84				
C 45	Θ	77			ΣN / "E"	
C 46	Θ	78		NAI		
C 47	A	74		NAI	ΣN	
C 48	Θ	70	NAI			
C 49	A	76				
C 50	Θ	80		NAI		
C 51	A	78		NAI	ΣN	
C 52	Θ	75				
C 53	Θ	75				
C 54	A	68				
C 55	A	78		NAI		
C 56	A	60	NAI			
C 57	A	68				
C 58	A	60				
C 60	A	81				
C 61	A	79		NAI	NAI	
C 63	Θ	74	NAI	NAI		
C 64	Θ	76		NAI		
C 66	A	60	NAI			
C 67	A	83		NAI		
C 68	A	82		NAI		
C 69	A	64	NAI	NAI		
C 70	Θ	82				
C 71	Θ	75	NAI			
C 72	Θ	72				
C 73	A	60		NAI		
C 74	Θ	70	NAI	NAI		
C 75	A	79			NAI	
C 76	Θ	85				
C 77	A	84		NAI	NAI	
C 78	Θ	82		NAI		
C 79	Θ	86			NAI	
C 80	Θ	74		NAI		
C 81	Θ	79		NAI		
C 82	A	84		NAI		
C 83	Θ	83		NAI	NAI	
C 84	Θ	71				

C 85	A	73		NAI		
C 86	A	79				
C 87	Θ	87				NAI
C 88	Θ	66		NAI	NAI	
C 89	A	78				
C 90	A	75			ΣΝ	
C 91	A	74		NAI		
C 92	A	92		NAI		AEE
C 93	A	63		NAI	APPYΘM.	NAI
C 94	A	59		NAI		
C 95	Θ	79				
C 96	Θ	75				
C 97	A	72				
C 98	Θ	75				
C 99	Θ	80		NAI		
C100	A	77				
C101	Θ	72				
C102	Θ	69				
C103	A	60				
C104	Θ	74				
C105	A	79				
C106	Θ	70		NAI		
C107	A	73				
C108	A	80				
C109	Θ	72				
C110	Θ	70		NAI		
C111	A	63				NAI
C112	Θ	80				
C114	A	64				
C115	Θ	64	NAI			NAI
C116	Θ	83	NAI	NAI		
C117	Θ	84		NAI		
C118	A	82				NAI
C119	A	77				
C120	Θ	64		NAI		
C121	A	80				
C122	Θ	77				NAI
C123	Θ	71				

Απομόνωση γενωμικού DNA από λευκοκύτταρα αίματος

Η απομόνωση γενωμικού DNA από λευκοκύτταρα αίματος έγινε με τη μέθοδο εξαλάτωσης με την οποία ταυτόχρονα επεξεργάζεται μεγάλος αριθμός δειγμάτων¹⁸⁹.

➤ Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα, Εξοπλισμός και Πειραματική διαδικασία:

- Αντιπηκτικό διάλυμα Na₂-EDTA 10% w/v
- Διάλυμα Lysis I (16,6 g NH₄Cl, 2,0 g KHCO₃, 0,7 g EDTA-Na₂ και dH₂O σε τελικό όγκο 2,0 L και pH = 7)
- Διάλυμα Lysis II (2,42 g Tris HCl, 46,6 g NaCl, 1,48 g EDTA-Na₂ και dH₂O σε τελικό όγκο 2,0 L και pH = 8,3)
- Διάλυμα NaCl 6 M
- Διάλυμα SDS 10%
- Πρωτεΐνάση K (10 mg/mL)
- Απόλυτη αιθανόλη
- Αιθανόλη 70%
- Σωληνάρια φυγοκέντρησης 50 mL
- Σωληνάρια φυγοκέντρησης 15 mL
- Ακρορύγχη
- Πιπέτα (Pasteur γυάλινη)
- Φυγόκεντρος (Heraeus Laboratory Centrifuges, United Kingdom)
- Κλίβανος (Biometra, Germany)
- Συσκευή Vortex (Heidolph REAX 2000, Germany)

1. Λήψη 10 mL αίματος σε σωληνάριο με αντιπηκτικό EDTA. Προσθήκη 30 mL απεσταγμένου νερού (dH₂O), ήπια ανάδευση για να επιτευχθεί λύση των ερυθροκυττάρων του αίματος.

2. Φυγοκέντρηση για 20 min στις 4.000 στροφές/min στους 4 °C, προκειμένου να καθιζάνουν τα λευκοκύτταρα. Κατόπιν απομακρύνουμε το υπερκείμενο διάλυμα που περιέχει τα λυμένα ερυθροκύτταρα και το πλάσμα του αίματος.

3. Προσθήκη 15 mL διαλύματος λύσης I. Ήπια ανάδευση προκειμένου να λυθούν τυχόν ερυθροκύτταρα που δεν λύθηκαν στο πρώτο στάδιο. Φυγοκέντρηση για 20 min

στις 4.000 στροφές/λεπτό στους 4 °C. Απομάκρυνση του υπερκείμενου που αποτελείται από λυμένα ερυθροκύτταρα και το πλάσμα του αίματος.

4. Προσθήκη 5 mL διαλύματος λύσης II και ανακίνηση μέχρι τη διάλυση του ιζήματος. Το διάλυμα λύσης II είναι υποτονικό και προκαλεί τη λύση των μεμβρανών των λευκοκυττάρων.

5. Προσθήκη 20 μ L πρωτεΐνάσης K και 400 μ L διαλύματος SDS 10%. Επώαση σε κλίβανο στους 37 °C για 24 ώρες ή στους 55 °C για 2 ώρες. Η πρωτεΐνάση διασπά τις πρωτεΐνες, ιστόνες και μη ιστόνες οι οποίες είναι δεσμευμένες με το DNA. Το διάλυμα SDS είναι αποδιατακτικό και μετουσιώνει τις πρωτεΐνες με αποτέλεσμα την κατακρήμνισή τους.

6. Προσθήκη διαλύματος NaCl 6 M και ισχυρή ανακίνηση για 30 sec, καθιστά εφικτή την καταβύθιση των πρωτεϊνών κι άλλων μετουσιωμένων μορίων.

7. Φυγοκέντρηση για 20 min στις 4.000 στροφές/min στους 4 °C, οπότε καθιζάνουν τα μετουσιωμένα μόρια με τη μορφή ιζήματος, ενώ στο υπερκείμενο διάλυμα παραμένει το ολικό DNA.

8. Μεταφορά του υπερκείμενου διαλύματος σε άλλο σωληνάριο και φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 4.000 στροφές/λεπτό στους 4 °C προκειμένου να καθιζάνουν τυχόν εναπομείναντα μόρια εκτός του DNA.

9. Προσθήκη 2 όγκων καθαρής αιθανόλης, περίπου μέχρι τελικού όγκου 20 mL. Με ήπια ανάδευση προκαλείται αφυδάτωση του μορίου DNA και κατακρήμνιση του. Συλλογή του DNA με τη χρήση αποστειρωμένης γυάλινης πιπέτας Pasteur.

10. Έκπλυση του DNA πάνω στην πιπέτα Pasteur με 70% αιθανόλη για σταδιακή ενυδάτωση του και διάλυση του σε 1 mL dH₂O σε σωληνάριο eppendorf και ανάδευση του σωληναρίου για 24 ώρες στους 4 °C.

Ποσοτικός προσδιορισμός DNA με το φθορισμόμετρο Qubit

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

τάξεις μεγέθους ανάλογα με το αν η χρωστική είναι ελεύθερη ή προσδεδεμένη σε μόριο δίκλωνου DNA. Η μέτρηση πρότυπων διαλυμάτων (standards), που παρέχονται με το kit, επιτρέπει τον αυτοματοποιημένο σχεδιασμό καμπύλης βαθμονόμησης με βάση την οποία γίνεται η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης. Το εύρος της δοκιμασίας κυμαίνεται μεταξύ 2–1000 ng.

➤ Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα, Εξοπλισμός και Πειραματική διαδικασία:

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

1. Ετοιμάζουμε το διάλυμα εργασίας σε ένα σωληνάριο eppendorf προσθέτοντας 200 μL ρυθμιστικό διάλυμα (Component A) και 1 μL χρωστικής (Component B) για κάθε δείγμα. Αναδεύουμε έντονα.

2. Τοποθετούμε 190 μL διαλύματος εργασίας σε δύο σωληνάρια για τα πρότυπα διαλύματα (standards).

3. Προσθέτουμε 10 μL κάθε πρότυπου δείγματος στο αντίστοιχο σωληνάριο και αναδεύουμε έντονα.

4. Τοποθετούμε 180–199 μL διαλύματος εργασίας σε σωληνάρια για τα άγνωστα δείγματα.

5. Προσθέτουμε 1–20 μL άγνωστου δείγματος σε κάθε σωληνάριο, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 200 μL. Αναδεύουμε έντονα.

6. Επωάζουμε για 2 min.

7. Μετράμε το φθορισμό των πρότυπων και άγνωστων δειγμάτων με το φθορισμόμετρο Qubit 1.0.

Μέθοδος για τη γονοτύπωση του *APOE* και *MTHFR 677C>T*

Συμβατική PCR - Οργανολογία

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

- ❖ Δύο συνθετικοί νουκλεοτιδικοί εκκινητές (~20 νουκλεοτίδια ο καθένας), συμπληρωματικοί περιοχών σε αντίθετες πλευρές των δύο αλυσίδων έτσι ώστε να περικλείεται ανάμεσα τους το DNA στόχος. Οι εκκινητές αυτοί μετά τον υβριδισμό με το DNA στόχο έχουν τα 3' -OH άκρα αντικριστά μεταξύ τους.
- ❖ Μια αλληλουχία στόχος, δείγματος DNA, που βρίσκεται μεταξύ του ζεύγους των εκκινητών και μπορεί να έχουν μήκος 100-35000 bp.
- ❖ Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, ώστε να αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για να βρουν οι εκκινητές τις συμπληρωματικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων του DNA.
- ❖ Τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs).
- ❖ Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Τα μονόκλιωνα μόρια μπορούν να παραχθούν με απλό τρόπο από δίκλιωνα μόρια του DNA, όταν θερμαίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες, οπότε αποχωρίζονται. Η DNA πολυμεράση απαιτεί επίσης την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Επομένως το σημείο έναρξης της σύνθεσης του DNA μπορεί να καθοριστεί με την χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδίου εναρκτήριου μορίου (εκκινητή, primer), που συνδέεται με την μήτρα σε αυτό ακριβώς το σημείο. Έτσι με την κατάλληλη επιλογή εκκινητών μπορούμε να κατευθύνουμε τη DNA πολυμεράση να συνθέσει συγκεκριμένη περιοχή του DNA.

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

1. Αποδιάταξη. Το πρώτο στάδιο είναι η θερμική αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας στόχου, που επιτυγχάνεται αυξάνοντας τη θερμοκρασία στο σωληνάριο της αντίδρασης συνήθως στους 95 °C. Στο στάδιο αυτό στο δοχείο αντίδρασης

περιέχονται: τα dNTPs, η θερμοανθεκτική πολυμεράση και το ζεύγος εκκινητών σε περίσσεια. Η θερμοκρασία διατηρείται συνήθως για ένα περίπου λεπτό.

2. Υβριδισμός. Στο δεύτερο στάδιο, του υβριδισμού, η θερμοκρασία του μίγματος σταδιακά κατεβαίνει περίπου στους 55 °C. Η θερμοκρασία αυτή ποικίλει ανάλογα με τις ακολουθίες. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου οι εκκινητές σχηματίζουν ζεύγη βάσεων με τις συμπληρωματικές περιοχές του DNA στόχου.

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

Για την εκτέλεση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε θερμικός κυκλοποιητής: Primus 25 της MWG Biotech, Γερμανίας (εικόνα 5.1).



Εικόνα 5.1: Σχηματική παράσταση του θερμικού κυκλοποιητή Primus 25 της MWG.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι η πιο κοινή τεχνική ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων. Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την απομόνωση τμημάτων DNA που συντίθενται κατά την PCR. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι τόσο το DNA όσο και το RNA είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH λόγω των φωσφορικών ομάδων τους και κατά συνέπεια θα μετακινηθούν προς την άνοδο (το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο) όταν εφαρμοσθεί ηλεκτρικό πεδίο. Ο διαχωρισμός των νουκλεϊκών οξέων επιτυγχάνεται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος όταν αυτά ηλεκτροφορηθούν σε γέλη πολυμερούς. Η ταχύτητα μετακίνησης των μορίων DNA

είναι αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογαρίθμου του αριθμού των βάσεων τους. Έτσι, τα μικρότερα μόρια DNA μετακινούνται στην πηκτή πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα. Επειδή η πηκτή εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μεγέθους διαχωρίζονται σε «ζώνες». Η συγκέντρωση της αγαρόζης που χρησιμοποιείται σε κάθε εφαρμογή εκφράζεται σε %w/v και εξαρτάται από την ικανότητα διάκρισης (resolution) που επιδιώκεται. Η πηκτή αγαρόζης είναι διαπερατή για χρωστικές, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο έχει τη δυνατότητα να παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα και να σχηματίζει φθορίζον σύμπλοκο με το DNA, καθιστώντας ορατές τις ζώνες των διαχωρισμένων μορίων.

➤ Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός:

- Ρυθμιστικό διάλυμα 5XTBE (τρεις-βορικό-EDTA) [54g Trizma Base (Sigma #201-064-4), 27,5 g βορικό οξύ (Sigma #036K0210) και 20ml EDTA 0,5M pH 8.0 σε 1L]
- Βρωμιούχο αιθίδιο (500μg/ml), [Sigma,012K8934]
- Αγαρόζη (HT Biotechnology, UK), 100g
- Δείκτης μοριακών βαρών 50-766bp, (NEB, ΗΠΑ, N3234G)
- Χρωστική 6X (loading dye) με κυανό της βρωμοφαινόλης (BPB) και φικόλη
- Πιπέτες (Thermo, Γερμανία) των 20μL και των 100μL
- Ρύγχη των 20μL χωρίς φίλτρο
- Ηλεκτροφορητική συσκευή Reqlab (Γερμανία)
- Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης EPS5301 (Amersham, Αγγλία)
- Τράπεζα ακτινοβολίας UV (Vilbert Loumart, Γαλλία) και κάμερα (Vilbert Loumart, Γαλλία)

Γονοτύπωση του *APOE* γονιδίου και του *MTHFR 677C>T*

Η γονοτύπωση των πολυμορφικών *APOE* αλληλίων πραγματοποιήθηκε κατόπιν ενίσχυσης με PCR χρησιμοποιώντας τον πρόσθιο εκκινητή APOE-F: 5' – TCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCA – 3' και τον ανάστροφο εκκινητή APOE-R: 5' – ACAGAATTGCCCCGGCCTGGTACACTGCCA – 3' Για κάθε δείγμα DNA, η συνολική αντίδραση της PCR είχε τελικό όγκο 25 μl. Τα συστατικά και τελικές ποσότητες περιγράφονται στον πίνακα 5.2. Το πρόγραμμα στο θερμικό κυκλοποιητή (MJ Research PTC 200, Peltier Thermal Cycler) περιελάμβανε αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 5 min ακολουθούμενη από 40 κύκλους στους 94°C για 30 sec, 65°C για 30 sec, επέκταση στους 70°C για 1.5 min, και τελική επέκταση στους 70°C για 10 min. Ακολούθησε πέψη του PCR προϊόντος μεγέθους 227 bp με χρήση περιοριστικού ενζύμου HhaI (New England Biolabs, USA) για 24h στους 37°C σε 91, 81, 72, και 48 bp τμήματα. Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα 3% NuSieve – 1% αγαρόζης και επισκοπούνται σε υπεριώδη ακτινοβολία μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο^{190, 191}.

Η ανίχνευση του πολυμορφισμού *MTHFR 677C>T* πραγματοποιήθηκε κατόπιν ενίσχυσης με PCR χρησιμοποιώντας τον πρόσθιο εκκινητή MTHFR1: 5' - TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA - 3' και τον ανάστροφο εκκινητή MTHFR2: 5'- AGGACGGTGCGGTGAGAGTG - 3'. Για κάθε δείγμα DNA, η συνολική αντίδραση της PCR είχε τελικό όγκο 25 μl. Τα συστατικά και τελικές ποσότητες περιγράφονται στον πίνακα 5.3. Το πρόγραμμα στο θερμικό κυκλοποιητή περιελάμβανε αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 3 min ακολουθούμενη από 30 κύκλους στους 94°C για 1 min, 58°C για 1 min, επέκταση στους 72°C για 2 min, και τελική επέκταση στους 72°C για 8 min. Ακολούθησε πέψη του PCR προϊόντος μεγέθους 198 bp με χρήση περιοριστικού ενζύμου HinfI (New England Biolabs, USA) για 24h στους 37°C σε 175 και 23 bp τμήματα. Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα 3% NuSieve – 1% αγαρόζης και επισκοπούνται σε υπεριώδη ακτινοβολία μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο^{133, 192}.

Πίνακας 5.2: Συστατικά και τελικές ποσότητες του μίγματος της PCR για το *APOE*.

Συστατικά	Ποσότητες (μL)
DNA	1
ddH ₂ O	8,35
Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) χωρίς Mg ⁺⁺	5
dNTPs	2,5
MgCl ₂	1,5
APOE-F εκκινητής	2
APOE-R εκκινητής	2
DMSO	2,5
Taq pol	0,15
Τελικός όγκος	25

Πίνακας 5.3: Συστατικά και τελικές ποσότητες του μίγματος της PCR για το *MTHFR*.

Συστατικά	Ποσότητες (μL)
DNA	1
ddH ₂ O	13,75
Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) χωρίς Mg ⁺⁺	5
dNTPs	2
MgCl ₂	2
MTHFR-1 εκκινητής	1
MTHFR-2 εκκινητής	1
Taq pol	0,15
Τελικός όγκος	25

Μέθοδος για τη γονοτύπωση του *LOXL1*

Real-time PCR και ανάλυση καμπυλών τήξης - Οργανολογία

Η ανάλυση καμπυλών τήξης μετά από ενίσχυση με PCR πραγματικού χρόνου αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο γονοτύπωσης πολυμορφισμών μονού νουκλεοτιδίου που εκμεταλλεύεται τη μεταβολή στη θερμοκρασία τήξης ενός δίκλωνου μορίου DNA, όταν στην αλληλουχία υπάρχει κάποιο λάθος ζευγάρι βάσεων και πραγματοποιήθηκε με το θερμικό κυκλοποιητή LightCycler 1.5. (Roche Applied Science, εικόνα 5.2). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε υάλινα τριχοειδή (capillaries) τα οποία τοποθετούνται σε ένα περιστρεφόμενο δίσκο χωρητικότητας 32 δειγμάτων (εικόνα 5.2).



Εικόνα 5.2: Δεξιά: Το όργανο LightCycler 1.5 Αριστερά: Ο περιστρεφόμενος δίσκος με χωρητικότητα 32 τριχοειδών.

Στο LightCycler οι θερμοκρασιακές αλλαγές επέρχονται με μεγάλη ταχύτητα μέσω ροής αέρα διαμέσου των εξαιρετικά λεπτών γυάλινων τριχοειδών. Ο αέρας θερμαίνεται από ένα θερμικό σπείραμα με $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ ακρίβεια στην επιτυγχανόμενη θερμοκρασία, ενώ ένας ανεμιστήρας ανακατανέμει τη ροή του αέρα εντός του θερμικού θαλάμου, ώστε να εξασφαλίζονται ταυτόσημες συνθήκες για όλα τα τριχοειδή του περιστρεφόμενου δίσκου. Τα τριχοειδή, με χωρητικότητα 20 μl , διαθέτουν υψηλό λόγο επιφάνειας προς όγκο, επιτρέποντας γρήγορη εξισορρόπηση της θερμοκρασίας μεταξύ αέρα και δείγματος. Έτσι επιτυγχάνονται γρήγοροι ρυθμοί

μεταβολής της θερμοκρασίας που φτάνουν μέχρι και τους 20°C ανά δευτερόλεπτο και επιτρέπουν την τέλεση μιας PCR αντίδρασης 30-40 κύκλων σε χρονικό διάστημα 20-30 λεπτών (Lightcycler manual).

Η οπτική μονάδα του LightCycler ανιχνεύει το φθορισμό ανά προγραμματισμένα χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR και κατά συνεχή τρόπο κατά την ανάλυση καμπυλών τήξης. Διαθέτει τρία κανάλια ανίχνευσης που μετρούν το εκπεμπόμενο φως σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος (530 nm, 640 nm και 710 nm) καθώς και μία δίοδο εκπομπής φωτός (LED: Light Emitting Diode) που δρα ως πηγή διέγερσης. Οι κυριότερες φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται για την επισήμανση των ανιχνευτών DNA στο όργανο LightCycler σημειώνονται στον πίνακα 5.4.

Κατά τη μέτρηση του σήματος φθορισμού, ιώδες φως μήκους κύματος 470 nm εκπέμπεται και εστιάζεται στην άκρη του τριχοειδούς, διεγείροντας τα φθορισμοφόρα της αντίδρασης. Έπειτα ο παραγόμενος φθορισμός διαχωρίζεται σε διαφορετικά μήκη κύματος που μετρώνται από τα τρία κανάλια. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων ένας κατάλληλος κινητήρας περιστρέφει κυκλικά το δίσκο με τα δείγματα, έτσι ώστε το άκρο κάθε τριχοειδούς να τοποθετείται ακριβώς στο εστιακό σημείο της φθορισμομετρικής οπτικής. Η βέλτιστη θέση για τη μέτρηση καθορίζεται για κάθε τριχοειδές σε μια «διαδικασία αναζήτησης» (“seek process”) που προηγείται κάθε PCR αντίδρασης (Lightcycler manual).

Πίνακας 5.4: Μέγιστο απορρόφησης και εκπομπής των χρωστικών που χρησιμοποιούνται στο όργανο LightCycler.

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

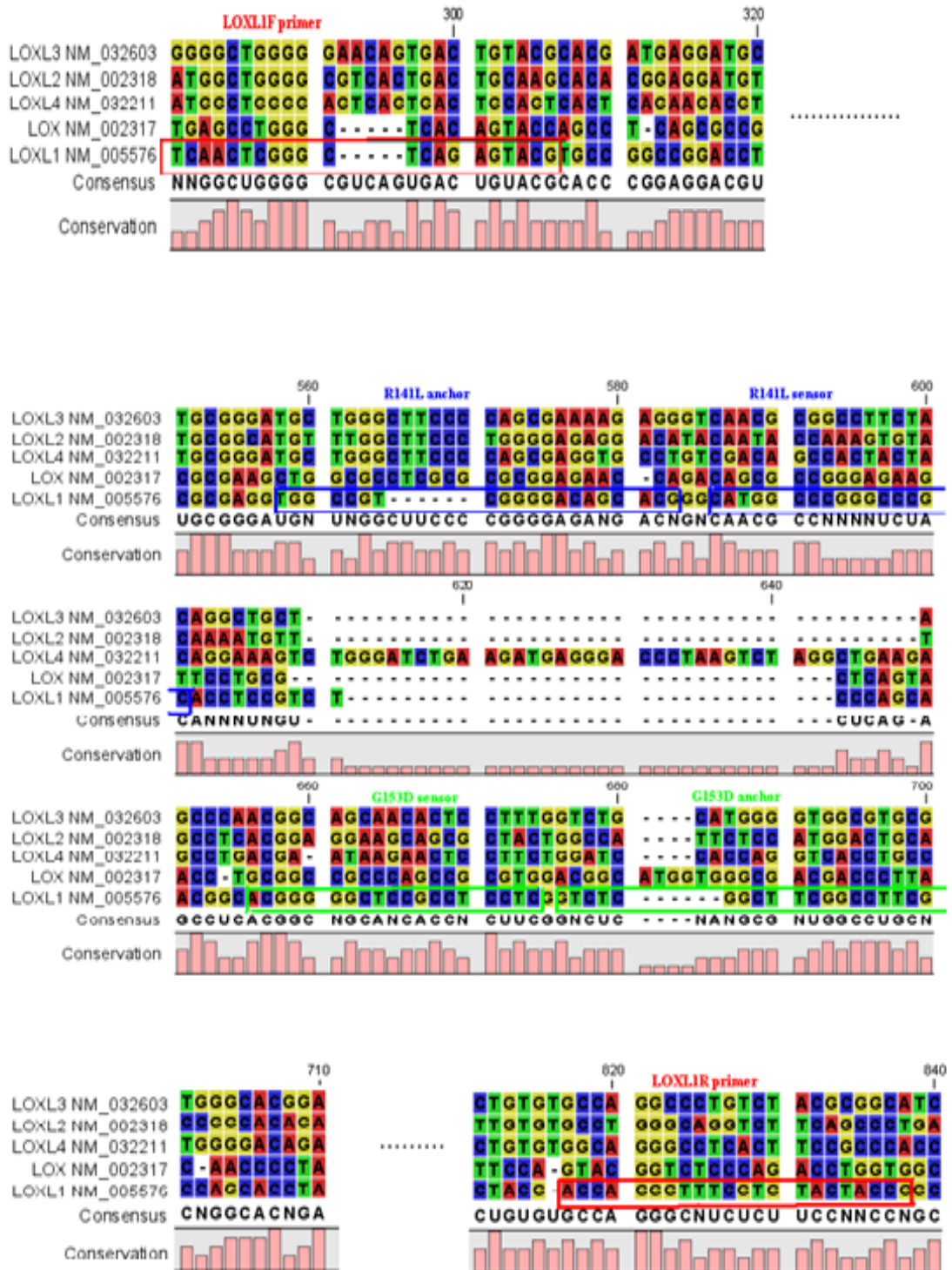
Τα δεδομένα για το κατάλληλο πειραματικό πρωτόκολλο εισάγονται σε υπολογιστή και μέσω σύνδεσης μεταφέρονται στο όργανο. Επίσης, ο υπολογιστής καταγράφει τις θερμοκρασίες και τα σήματα φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και επεξεργάζεται τέλος τα αποτελέσματα μέσω κατάλληλου αναλυτικού λογισμικού (Lightcycler manual).

Real-time PCR και ανάλυση καμπυλών τήξης για το γονίδιο *LOXL1*

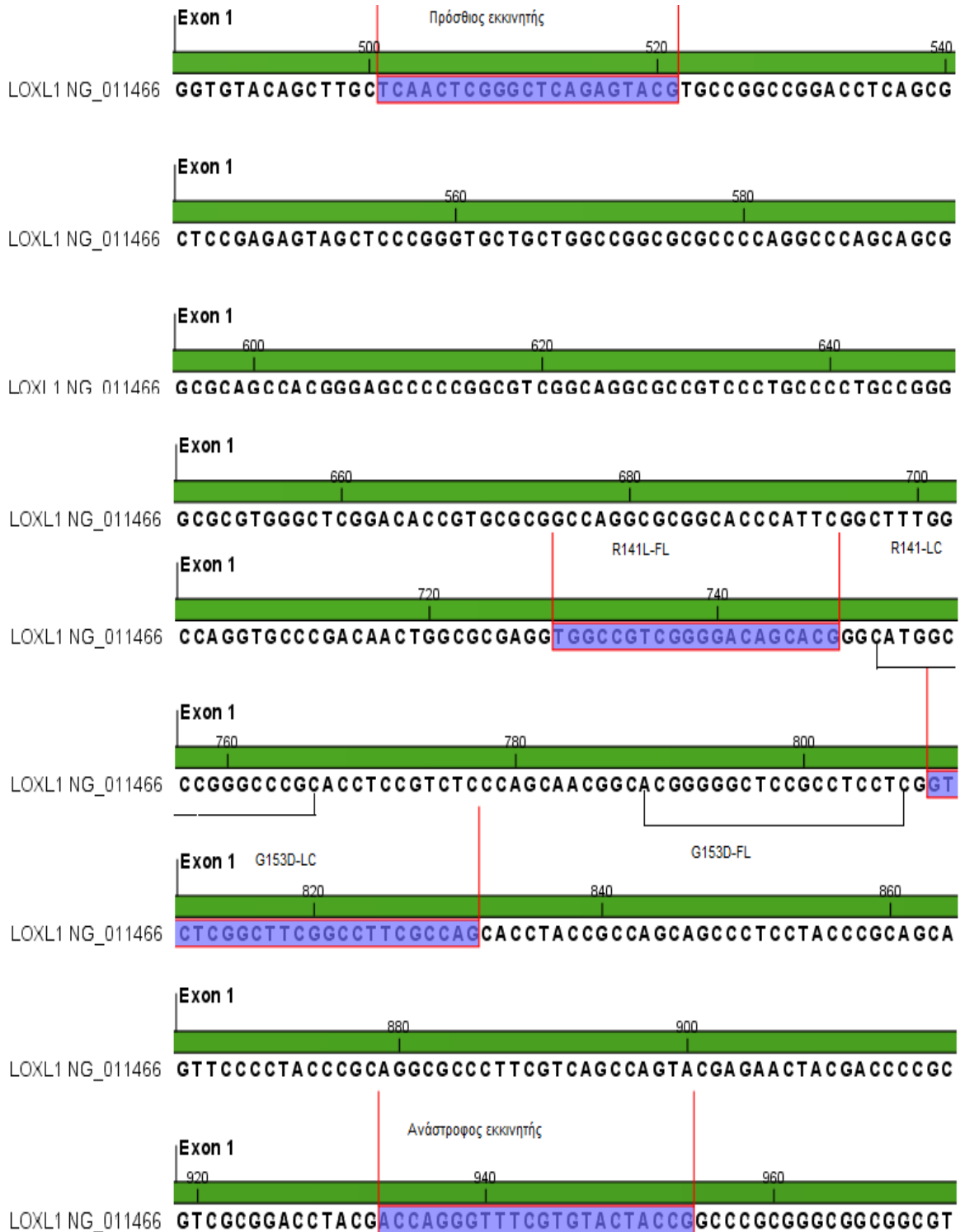
Για το γονίδιο *LOXL1* εξετάστηκαν δύο μη συνώνυμοι πολυμορφισμοί (SNPs) στο εξόνιο 1. Ο πολυμορφισμός G153D (rs3825942) συνιστά μια μετάπτωση G→A που αντιστοιχεί σε μία αντικατάσταση γλυκίνης σε ασπαρτικό (gly→asp) στο κωδικόνιο 153 και ο πολυμορφισμός R141L (rs1048661) συνιστά μία μετάπτωση G→T που αντιστοιχεί σε μία αντικατάσταση αργινίνης σε λευκίνη (arg→leu) στο κωδικόνιο 141.

Για τις ανάγκες της γονοτύπωσης ενισχύθηκε με real-time PCR γενομικό τμήμα 454 bp του *LOXL1* το οποίο εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 15q24.1 (GenBank accession number: NG_011466). Στο τμήμα αυτό μετέπειτα μπορούν να προσδεθούν οι ειδικοί ανιχνευτές υβριδισμού (hybridization probes) και για τους δύο πολυμορφισμούς καθώς οι εξεταζόμενοι πολυμορφισμοί είναι πολύ κοντά μεταξύ τους. Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν in silico με τη βοήθεια βιοπληροφορικού λογισμικού. Για την κατάλληλη επιλογή των εκκινητών και ανιχνευτών έγινε στοίχιση (alignment) του *LOXL1* με τα *LOX*, *LOXL2*, *LOXL3* και *LOXL4* καθώς αυτά παρουσιάζουν ουσιαστικές ομολογίες στο εξόνιο-1 και επελέγησαν εκκινητές και ανιχνευτές όσο το δυνατόν πιο ειδικοί για το *LOXL1* (ένα τμήμα της στοίχισης παρουσιάζεται στην εικόνα 5.3).

Οι ανιχνευτές ήταν επισημασμένοι με δύο διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές έτσι ώστε κατά τον υβριδισμό να εκδηλώνεται φαινόμενο μεταφοράς ενέργειας με φθορισμό (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer) και να εκπέμπεται ακτινοβολία. Μπορούσαν ακόμα να μπουν και στην ίδια αντίδραση με την εξής διάταξη: κεφαλή- ουρά και ουρά- κεφαλή στο PCR προϊόν (εικόνα 5.4). Συγκεκριμένα κατά το στάδιο του υβριδισμού (annealing) το όργανο διεγείρει με ακτινοβολία μήκους κύματος 470 nm τη χρωστική φλουορεσκεΐνη των ανιχνευτών *LOXL1*-FL. Η φλουορεσκεΐνη εκπέμπει στη συνέχεια ακτινοβολία που απορροφάται από την παρακείμενη φθορίζουσα χρωστική LC640 ή LC705 των ανιχνευτών *LOXL1*-LC, η οποία και φθορίζει στα 640 nm ή 705 nm αντίστοιχα. Το σήμα του φθορισμού μετράται από το όργανο και καταγράφεται σε διάγραμμα σε συνάρτηση με τους κύκλους της αντίδρασης.



Εικόνα 5.3: Στοιχισμός (alignment) των γονιδίων *LOX*, *LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3* και *LOXL4* (CLC-Sequence Viewer, CLCbio, Δανία). Το κόκκινο πλαίσιο περιλαμβάνει τις αλληλουχίες των εκκινήσεων του *LOXL1*, ενώ το μπλέ και το πράσινο τις αλληλουχίες των ανιχνευτών για τους πολυμορφισμούς R141L και G153D SNP, αντίστοιχα.



Εικόνα 5.4: Σχετική θέση των εκκινητών και των ανιχνευτών υβριδισμού για την γονοτύπωση των δύο πολυμορφισμών κατά μήκος του γονιδίου *LOXL1*. Με πράσινο χρώμα σημειώνεται το εξόνιο 1 του γονιδίου *LOXL1*.

Στην αντίδραση της real-time PCR για το *LOXLI* χρησιμοποιήθηκαν: ένα ζευγάρι εκκινητών, δύο ζευγάρια ανιχνευτών (ένα για κάθε πολυμορφισμό, 100% συμπληρωματικοί των σπάνιων αλληλίων A και T), DMSO (χημικός παράγοντας απαραίτητος λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε GC νουκλεοτίδια), μίγμα πολυμεράσης και μαγνήσιο από το kit LightCycler Faststart DNA Master HybProbe της Roche Applied Science. Οι αλληλουχίες και οι θερμοκρασίες τήξης (T_m) των ανιχνευτών και εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 5.5. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε και με το πρόγραμμα «combined» του Lightcycler για την εξέταση ταυτόχρονα των δύο πολυμορφισμών ώστε να γίνει προσπάθεια εξοικονόμησης χρόνου και αντιδραστηρίων.

Κατόπιν βελτιστοποιήσεων, πραγματοποιήθηκε ασύμμετρη PCR (αναλογία πρόσθιου:ανάστροφου εκκινητή =1:4) με σκοπό να ενισχυθεί περισσότερο η μία αλυσίδα ώστε να έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση το υπόστρωμα του ανιχνευτή, πράγμα το οποίο οδηγεί σε δυνατότερο σήμα άρα και χαμηλότερο όριο ανίχνευσης του πολλαπλασιασμένου τμήματος του DNA. Επίσης, σε όλα τα δείγματα έγινε αραίωση 1:5 με στόχο την αποφυγή αναστολέων και την οριοθέτησή τους σε επιθυμητή συγκέντρωση (100ng). Το πρωτόκολλο σε τελικό όγκο 10 μL και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της ενίσχυσης φαίνονται στους πίνακες 5.6 και 5.7. Μετά την ενίσχυση ακολουθεί πρόγραμμα τήξης κατά το οποίο η θερμοκρασία μετά από αρχική αποδιάταξη στους 95°C, μειώνεται στους 40°C και κατόπιν σταδιακά αυξάνεται με παράλληλη συνεχή καταγραφή της έντασης του φθορισμού. Η καμπύλη τήξης, η οποία και σχεδιάζεται αυτόματα από το όργανο, προκύπτει από τη αρνητική πρώτη παράγωγο της συνάρτησης μεταβολής της έντασης του φθορισμού ως προς τη θερμοκρασία. Ο πίνακας 5.8 συνοψίζει το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της δοκιμασίας τήξης. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα modified του Lightcycler όταν εξετάστηκαν ξεχωριστά οι δύο πολυμορφισμοί. Ο ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας κατά την τήξη επιλέχθηκε 0,5°C/sec και με τα δύο προγράμματα. Για την καλύτερη ανάλυση των καμπυλών τήξης, τα ήδη υπάρχοντα ενισχυμένα δείγματα μπορούν να αναλυθούν και με το πρόγραμμα melting. Με το πρόγραμμα melting ο ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας επιλέχθηκε 0,3°C/sec στην περίπτωση των δέκα δειγμάτων και 0,7°C/sec στην περίπτωση λιγότερων δειγμάτων. Τα πρωτόκολλα σε τελικό όγκο 10 μL και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της ενίσχυσης και ανάλυσης καμπυλών τήξης φαίνονται στους πίνακες 5.9-5.12.

Πίνακας 5.5: Οι αλληλουχίες και οι θερμοκρασίες τήξης (T_m) των ανιχνευτών και εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη real-time PCR για τη γονοτύπωση του *LOXLI*.

Εκκινητής/ Ανιχνευτές	Αλληλουχία	T_m (°C)	Θέση στη GeneBank αλληλουχία NG_011466
Πρόσθιος εκκινητής, LOXL1F	TCAACTCGGGCTCAGAGTACG	59,0	501-521
Ανάστροφος εκκινητής, LOXL1R	CGGTAGTACACGAAACCCTGGT	59,9	933-954
Ανιχνευτές FL R141L: G153D:	TGGCCGTCGGGGACAGCACG-FL ACGGGGACTCCGCCTCCTC-FL	72,2 64,9	729-748 789-807
Ανιχνευτές LC R141L: G153D:	LC705-CATGGCCCTGGCCCGC LC640-GTCTCGGCTTCGGCCTTCGCCAG	66,0 73,2	751-766 809-831

* Με κόκκινο χρώμα φαίνονται οι πολυμορφικές θέσεις.

Πίνακας 5.6: Πρωτόκολλο real-time PCR για το γονίδιο *LOXLI*.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	-	2,4	-
MgCl ₂	25mM	1,6	4mM
DMSO	-	0,6	-
G153D-FL	3 mM	0,6	0,18 mM
G153D-LC	3 mM	0,6	0,18 mM
Πρόσθιος εκκινητής LOXL1F	20 pmol/μL	0,2	0,4 pmol/μL
Ανάστροφος εκκινητής LOXL1R	20 pmol/μL	0,8	1,6 pmol/μL
R141L-FL	3 mM	0,6	0,18 mM
R141L-LC	3 mM	0,6	0,18 mM
Roche Mix	10X	1	1X

Πίνακας 5.7: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα real-time PCR για το γονίδιο *LOXL1*.

Στάδιο PCR	Θερμ/σία	Διάρκεια	Ρυθμός μεταβολής θερμ/σίας	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός κλώνων DNA	95°C	10 min		
Διαχωρισμός κλώνων DNA	95°C	20 sec	20°C/sec	45 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών στο DNA	58°C	20 sec	20°C/sec	
Επέκταση εκκινητών	72°C	20 sec	20°C/sec	

Πίνακας 5.8: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης καμπυλών τήξης για το γονίδιο *LOXL1*.

Στάδιο ανάλυσης τήξης	Θερμ/σία	Διάρκεια	Ρυθμός μεταβολής θερμ/σίας	
1 ^ο	95°C	30 sec	20°C/sec	
2 ^ο	45°C	1 min	20°C/sec	
3 ^ο	85°C	-	0,5°C/sec	
Στάδιο cooling		40°C	30sec	20°C/sec

Πίνακας 5.9: Πρωτόκολλο real-time PCR για τον πολυμορφισμό G153D ή R141L.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	-	3,6	-
MgCl ₂	25mM	1,6	4mM
DMSO	-	0,6	-
G153D-FL ή R141L-FL	3 mM	0,6	0,18 mM
G153D-LC ή R141L-LC	3 mM	0,6	0,18 mM
Πρόσθιος εκκινητής-LOXL1F	20 pmol/μL	0,2	0,4 pmol/μL
Ανάστροφος εκκινητής-LOXL1R	20 pmol/μL	0,8	1,6 pmol/μL
Roche Mix	10X	1	1X

Πίνακας 5.10: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα real-time PCR για τους πολυμορφισμούς G153D και R141L ξεχωριστά (modified).

Στάδιο PCR	Θερμ/σία	Διάρκεια	Ρυθμός μεταβολής θερμ/σίας	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός κλώνων DNA	95°C	10 min		
Διαχωρισμός κλώνων DNA	95°C	20 sec	20°C/sec	45 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών στο DNA	60°C	20 sec	20°C/sec	
Επέκταση εκκινητών	72°C	20 sec	20°C/sec	

Πίνακας 5.11: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης καμπυλών τήξης για τους πολυμορφισμούς G153D και R141L ξεχωριστά (modified).

Στάδιο ανάλυσης τήξης	Θερμ/σία	Διάρκεια	Ρυθμός μεταβολής θερμ/σίας
1 ^ο	95°C	30 sec	20°C/sec
2 ^ο	45°C	1 min	20°C/sec
3 ^ο	85°C	-	0,5°C/sec
Στάδιο cooling	40°C	30sec	20°C/sec

Πίνακας 5.12: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης καμπυλών τήξης για τους πολυμορφισμούς G153D και R141L (melting).

Στάδιο ανάλυσης τήξης	Θερμ/σία	Διάρκεια	Ρυθμός μεταβολής θερμ/σίας
1 ^ο	95°C	30sec	20°C/sec
2 ^ο	45°C	90sec	20°C/sec
3 ^ο	80°C	-	0,3°C/sec

Μέθοδος επιβεβαίωσης της γονοτύπωσης του γονιδίου *LOXL1*

Η ενίσχυση με συμβατική PCR του *LOXL1*, ο καθαρισμός των PCR προϊόντων, το cycle sequencing, ο καθαρισμός των cycle sequencing προϊόντων και το DNA sequencing αποτελούν διαδικασία επιβεβαίωσης της γονοτύπωσης κάποιων δειγμάτων.

Η ενίσχυση με συμβατική PCR (Primus 25 της MWG Biotech, Γερμανίας) έγινε με το ακόλουθο πρωτόκολλο με τελικό όγκο 25 μL (kit πολυμεράσης kapa Biosystems, πίνακας 5.13) και θερμοκρασιακό πρόγραμμα (πίνακας 5.14). Όπως προαναφέρθηκε ενισχύθηκε περιοχή 454 bp του γονιδίου *LOXL1* στη χρωμοσωμική περιοχή 15q24 (GenBank accession number: NG_011466) με τη χρήση εκκινητών .

Πίνακας 5.13: Πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του *LOXL1*.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	-	11,9	-
Buffer B (+Mg)	5X	5	1X
Enhancer 1	5X	5	1X
dNTPs (kappa)	10 mM	0,5	0,2mM
Πρόσθιος εκκινητής <i>LOXL1F</i>	20 pmol/ μL	0,5	0.4 pmol/ μL
Ανάστροφος εκκινητής <i>LOXL1R</i>	20 pmol/ μL	0,5	0.4 pmol/ μL
Kapa Πολυμεράση (Robust)	5U/ μL	0,1	0,02U/ μL

Πίνακας 5.14: Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του *LOXL1*.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός κλώνων DNA	95°C	3 min	-
Διαχωρισμός κλώνων του DNA	94°C	1 min	40 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	55°C	1 min	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	1 min	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	5 min	-

Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων έγινε με το προτυποποιημένο σετ αντιδραστηρίων High Pure PCR Cleanup Micro Kit της Roche Applied Science (Ελβετία). Η μέθοδος βασίζεται στην κατακράτηση του DNA από τις ειδικές στήλες του kit που περιέχουν μεμβράνες πυριτίου. Το DNA απορροφάται στην μεμβράνη παρουσία του διαλύματος πρόσδεσης (Binding Buffer) το οποίο εξασφαλίζει τις απαραίτητες συνθήκες (υψηλές συγκεντρώσεις άλατος και κατάλληλο pH). Οι προσμίξεις (όπως περίσσεια εκκινητών, άλατα, ένζυμα, μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια, αγαρόζη, χρωστικές, βρωμιούχο αιθίδιο) διαπερνούν την στήλη και απομακρύνονται με εκπλύσεις. Η κάθε στήλη παρέχει αποτελεσματική πρόσδεση PCR προϊόντων μεγέθους μεγαλύτερου των 70 bp. Το DNA μετά την ολοκλήρωση των εκπλύσεων, εκλύεται με 10 ή 20 μL από το διάλυμα έκλυσης.

➤ Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα, Εξοπλισμός και Πειραματική διαδικασία:

- Πιπέτες (Thermo, Fisher USA) των 10 μl , 100 μl , 200 μl και 1000 μl
- Ακρορύγχη με φίλτρο των 10 μl , 200 μl και 1000 μl
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus, Thermo Fisher, USA)
- Συσκευή Vortex (Fisher, USA)
- Αποστειρωμένο νερό (BIOΣΕΡ Α.Ε, Ελλάδα)
- Σωληνάρια τύπου eppendorfs των 1,5 ml
- Σωληνάρια συλλογής των 2ml (Collection Tubes)
- Στήλες High Pure Micro Filter Tubes
- Διάλυμα πρόσδεσης (Binding Buffer)
- Διάλυμα εκπλύσεων (Washing Buffer)
- Διάλυμα έκλυσης (Elution Buffer)
- Αιθανόλη

1. Προσθέτουμε δις απεσταγμένο νερό στο δείγμα μέχρι τελικού όγκου 100 μL .
2. Σε κάθε δείγμα (των 100 μL) προσθέτουμε 400 μL διάλυμα πρόσδεσης, αναδεύουμε έντονα και φυγοκεντρούμε σύντομα.
3. Εισάγουμε μια στήλη High Pure Filter Tube σε ένα σωληνάριο συλλογής. Μεταφέρουμε το δείγμα του δεύτερου βήματος στο επάνω μέρος της στήλης και φυγοκεντρούμε για 30- 60 sec στα 8000 x g.

4. Απορρίπτουμε το διήθημα και τοποθετούμε τη στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο.
5. Προσθέτουμε 400 μl διάλυμα εκπλύσεων στη στήλη και φυγοκεντρούμε για 30- 60 sec στα 8000 x g.
6. Απορρίπτουμε το διήθημα και τοποθετούμε τη στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο.
7. Προσθέτουμε 300 μl διάλυμα εκπλύσεων στη στήλη και φυγοκεντρούμε για 30- 60 sec στα 8000 x g.
8. Απορρίπτουμε το διήθημα και τοποθετούμε τη στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο και φυγοκεντρούμε στα 17900 x g για ένα επιπλέον λεπτό.
9. Απορρίπτουμε το σωληνάριο συλλογής με το διήθημα και τοποθετούμε την στήλη σε ένα καθαρό eppendorf των 1,5 ml.
10. Για την έκλουση του DNA, προστίθενται 20 μl διαλύματος έκλουσης. Φυγοκεντρούμε στα 8000 x g για 1 min.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, στην **αντίδραση των θερμικών κύκλων (cycle sequencing)** τα περισσότερα συστατικά που χρησιμοποιούνται είναι τα ίδια με αυτά της PCR και ακολουθείται η ίδια διαδικασία με θερμικούς κύκλους. Οι διαφορές είναι οι εξής: 1) σε κάθε αντίδραση cycle sequencing χρησιμοποιείται μόνο ο ένας εκκινητής (πρόσθιος ή ανάστροφος), με αποτέλεσμα η ενίσχυση να είναι γραμμική και όχι εκθετική, 2) χρησιμοποιούνται και διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs), τα οποία διακόπτουν την επέκταση του DNA όταν ενσωματωθούν και 3) η αντίδραση του cycle sequencing είναι μια διαδικασία γραμμικής ενίσχυσης και λιγότερο επιρρεπής στις επιμολύνσεις, αλλά παρόλα αυτά δεν παύει να χρειάζεται στείρες συνθήκες. Στους πίνακες 5.15 και 5.16 καταγράφονται τα συστατικά της αντίδρασης και το ακολουθούμενο θερμοκρασιακό πρόγραμμα.

Πίνακας 5.15: Πρωτόκολλο Cycle Sequencing.

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
RRmix, ABI (Applied Biosystems)	1	
5X sequencing ρυθμιστικό διάλυμα, ABI	7	1,75X
Εκκινητής LOXL1F (5 pmol/μl)	1	0,25 pmol/μl
H ₂ O	9	
Κεκαθαρισμένο PCR προϊόν	2	

Πίνακας 5.16: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα Cycle Sequencing.

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

Ο καθαρισμός των προϊόντων του **Cycle Sequencing** έγινε με το προτυποποιημένο σετ αντιδραστηρίων Nucleoseq της Macherey – Nagel (Γερμανία). Το kit αυτό αποτελείται από στήλες NucleoSEQ, σχεδιασμένες για το γρήγορο και αποτελεσματικό καθαρισμό νουκλεϊκών οξέων. Περιέχουν gel το οποίο παρέχει αξιόπιστη αφαίρεση των μικρότερων μορίων από τα νουκλεϊκά οξέα. Ακαθαρσίες όπως άλατα, περίσσεια επισημαντών, νουκλεοτιδία, ίχνη οργανικών διαλυτών και εκκινητών συγκρατούνται από τη στήλη ενώ τα νουκλεϊκά οξέα που μας ενδιαφέρουν ανακτούνται με υψηλή απόδοση.

➤ Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα, Εξοπλισμός και Πειραματική διαδικασία:

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

1. Φυγοκέντρηση των στηλών NucleoSEQ για 30 sec στα 750 x g για να συλλεχθεί στον πυθμένα, η πηκτή που βρίσκεται σε σκόνη μέσα στις στήλες.
2. Προσθήκη 600μl στείρου νερού και έντονη ανακίνηση ώστε να ενυδατωθεί το gel. Αφαιρούνται οι φυσαλίδες κάνοντας vortex.
3. Επώαση τουλάχιστον 30 min ή όλη τη νύχτα. Η επώαση μπορεί να γίνει σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4°C. Οι ενυδατωμένες στήλες μπορούν να φυλαχθούν

στους 4°C έως 14 μέρες. Γίνεται ανασύσταση του gel που έχει συγκεντρωθεί στον πάτο της στήλης κάνοντας έντονη ανάδευση. Δεν πρέπει να δημιουργηθούν φυσαλίδες. Αφαιρούμε το πώμα που βρίσκεται στον πυθμένα της στήλης και τοποθετούμε τη στήλη μέσα στο δοχείο συλλογής.

4. Φυγοκέντρωση για 2 min στα 750 x g για να αφαιρεθεί το διάλυμα αποθήκευσης που περισσεύει. Απορρίπτουμε το δοχείο συλλογής με το διάλυμα και τοποθετούμε τη στήλη στο κατάλληλο δοχείο συλλογής.

5. Ανοίγουμε το καπάκι της στήλης. Προσεκτικά φορτώνουμε το δείγμα στο κέντρο του gel χωρίς να διαταράξουμε την επιφάνειά του. Τοποθετώντας το δείγμα στα πλάγια της στήλης μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της αποτελεσματικότητας της στήλης. Ο όγκος του δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 20 μl.

6. Φυγοκέντρωση της στήλης για 4 – 6 min στα 750 x g. Απορρίπτουμε τη στήλη ξηραίνουμε το δείγμα η το χρησιμοποιούμε απευθείας.

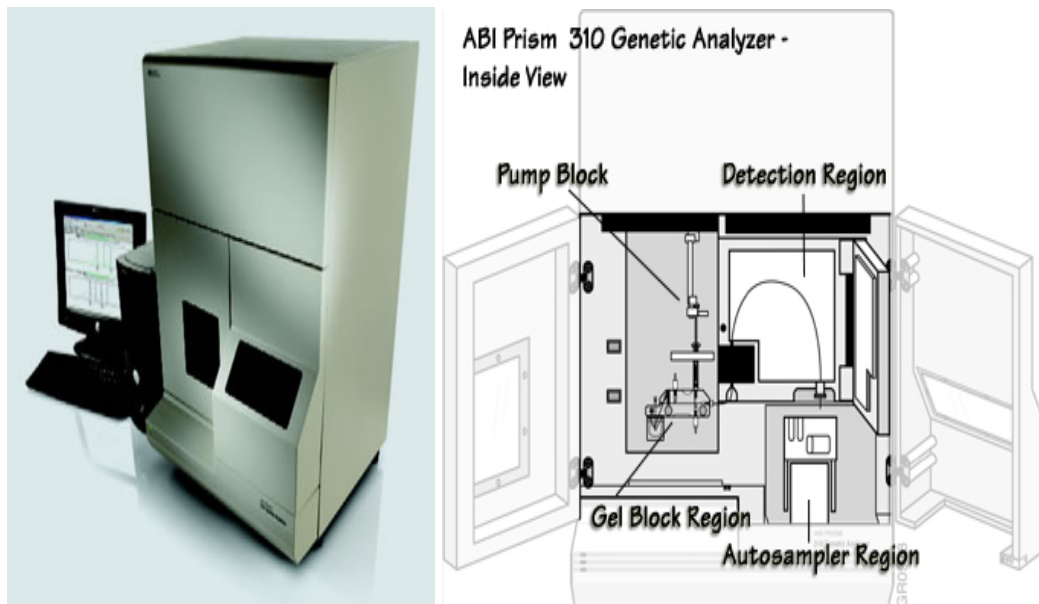
Ακολουθεί η **προετοιμασία των δειγμάτων για το DNA sequencing** όπου τα κεκαθαμένα προϊόντα του Cycle Sequencing τοποθετούνται στη συνέχεια στο ABI Prism 310 Genetic Analyzer, με τη διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω:

➤ Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα, Εξοπλισμός και Πειραματική διαδικασία:

- Επωαστήρας σωληναρίων (Grant, Αγγλία)
- Πιπέτες (Thermo, Fisher USA) των 100μl
- Αποστειρωμένο νερό (BIOΣΕΡ Α.Ε, Ελλάδα)
- Συσκευή Vortex (Fisher, USA)
- Σωληνάρια τύπου eppendorfs των 1,5 ml
- Πολυμερές POP4 (Applied Biosystems, USA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10X (Applied Biosystems, USA)
- Φορμαμίδιο (Applied Biosystems, USA)
- Σωληνάρια αντίδρασης 0,5 ml (Applied Biosystems, USA)
- Τριχοειδές 47 mm (Applied Biosystems, USA)
- Γενετικός Αναλυτής ABI 310 (Applied Biosystems, USA)

1. Τοποθετούμε σε ένα σωληνάριο τύπου Eppendorf των 1,5 ml, 10 μl από το καθαρό cycle sequencing προϊόν και 10 μl υπερκαθαρό φορμαμίδιο.
2. Επωάζουμε τους 95°C για 2 min και στην συνέχεια στους 4°C για άλλα 2 min.
3. Τα μεταφέρουμε στα σωληνάρια αντίδρασης των 0,5 ml και τα φορτώνουμε στον γενετικό αναλυτή ABI310.

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων του DNA (DNA sequencing) στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με το όργανο ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ΗΠΑ) (εικόνα 5.5).



Εικόνα 5.5: Ο γενετικός αναλυτής ABI Prism 310 Αριστερά: Εξωτερική άποψη Δεξιά: Εσωτερική άποψη (www.invitrogen.com).

Για την πραγματοποίηση της αλληλούχησης τα σωληνάρια τοποθετούνται σε αυτόματο δειγματολήπτη. Ο δίσκος αυτός εν συνεχεία φέρνει κάθε δείγμα σε επαφή με το ηλεκτρόδιο-κάθοδος και το ένα άκρο ενός υάλινου τριχοειδούς που περιέχει πολυμερές. Το ηλεκτρόδιο-άνοδος στο άλλο άκρο του τριχοειδούς βυθίζεται ακολούθως σε ρυθμιστικό διάλυμα. Καθώς ρεύμα ρέει από την κάθοδο προς την άνοδο, μέρος του δείγματος εισέρχεται στο τριχοειδές, σε μια διαδικασία που καλείται ηλεκτροκινητική έγχυση. Το άκρο του τριχοειδούς που βρίσκεται προς την

κάθοδο εισέρχεται κατόπιν στο ρυθμιστικό διάλυμα. Ηλεκτρικό ρεύμα εφαρμόζεται εκ νέου, ώστε να συνεχισθεί η ηλεκτροφόρηση. Όταν τα νουκλεοτίδια φθάσουν στο παράθυρο ανίχνευσης μια πηγή laser διεγείρει τις φθορίζουσες χρωστικές και ο φθορισμός καταγράφεται από μια ψυχρή, διπλού φορτίου κάμερα (charge-coupled device-CCD). Το λογισμικό ερμηνεύει τέλος το αποτέλεσμα και αναγνωρίζει τις βάσεις που αντιστοιχούν στα δεδομένα της μετρούμενης έντασης φθορισμού.

Το όργανο αυτό χρησιμοποιεί ομάδες εικονικών φίλτρων για να ανιχνεύσει την ένταση του φθορισμού σε τέσσερις μη επικαλυπτόμενες περιοχές πάνω στην CCD κάμερα. Κάθε περιοχή αντιστοιχεί σε ένα φάσμα μηκών κύματος που περιέχει ή είναι κοντά στο μέγιστο της εκπομπής της χρωστικής του ABI prism. Οι ακριβείς θέσεις των CCD περιοχών και οι κατάλληλοι συνδυασμοί των χρωστικών για αυτές τις θέσεις εξαρτώνται από τις ομάδες των εικονικών φίλτρων που χρησιμοποιούνται. Για παράδειγμα, με την ομάδα εικονικών φίλτρων E το όργανο καταγράφει την ένταση του φωτός σε τέσσερις περιοχές ή «παράθυρα» κεντραρισμένα στα 540 nm, στα 570 nm, στα 595 nm, και στα 625 nm. Οι θέσεις των παραθύρων σε κάθε ομάδα εικονικού φίλτρου έχει βελτιστοποιηθεί ώστε να παρέχει το μέγιστο δυνατό διαχωρισμό μεταξύ των κέντρων ανίχνευσης για τις διαφορετικές χρωστικές ενώ διατηρεί καλή ένταση σήματος.

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

- Ενίσχυση του τμήματος DNA με συμβατική PCR ή με real-time PCR
- Καθαρισμός των PCR προϊόντων με στήλες
- Εφαρμογή της μεθόδου θερμικών κύκλων (Cycle Sequencing) στα κεκαθαρμένα PCR προϊόντα
- Καθαρισμός των προϊόντων του Cycle Sequencing και προετοιμασία για εισαγωγή στο ABI Prism 310 Genetic Analyzer
- Αλληλούχιση και λήψη των δεδομένων
- Ανάλυση δεδομένων με πρόγραμμα Chromas Lite 2.01 (Technelysiym, Αυστραλία)

Βιοπληροφορική

Σ' αυτή την εργασία έγινε χρήση κατάλληλων λογισμικών με σκοπό τον σχεδιασμό εκκινητών και ανιχνευτών, τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των αναλύσεων και την ανάδειξη συσχετίσεων μεταξύ των τεσσάρων πολυμορφισμών και των κλινικών εκληδώσεων των ατόμων που συμμετείχαν στην μελέτη.

❖ Σχεδιασμός εκκινητών και ανιχνευτών

Η ειδικότητα και η αξιοπιστία της γενετικής ανάλυσης καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το σωστό σχεδιασμό των εκκινητών και ανιχνευτών για μια αντίδραση real-time PCR και ανάλυση καμπυλών τήξης. Οι εκκινητές θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από παρόμοια περιεκτικότητα σε γουανίνες-κυτοσίνες, να μη φέρουν συμπληρωματικές αλληλουχίες (ιδιαίτερα στο 3' άκρο τους) και να μη σχηματίζουν δευτεροταγείς και παλινδρομικές δομές. Σημαντική προϋπόθεση αποτελεί οι εκκινητές να είναι 100% συμπληρωματικοί της αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί και να μην προσδένονται μη ειδικά σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος, κάτι που μπορεί να διασφαλισθεί τόσο με την κατάρτιση ενός κατάλληλου θερμοκρασιακού προγράμματος, όσο κυρίως με τη σωστή επιλογή των εκκινητών¹⁶⁹.

Οι ανιχνευτές υβριδισμού πρέπει να υβριδίζονται στον ίδιο κλώνο του PCR προϊόντος σε απόσταση 1-5 βάσεων μεταξύ τους, δεν πρέπει να περιέχουν επαναλαμβανόμενες, μονότονες ή συμπληρωματικές με τον εαυτό τους αλληλουχίες, συμπλέγματα από βάσεις G και C στα άκρα τους και αλληλουχίες πλούσιες σε βάσεις πουρίνης. Ακόμα, δεν θα πρέπει να υβριδίζονται με τους εκκινητές και καλό θα ήταν να έχουν σημεία τήξης 5-10°C ψηλότερα από αυτούς. Το σημείο τήξης του ανιχνευτή που καλύπτει τη μετάλλαξη (mutation sensor probe) επιδιώκεται να είναι 5°C χαμηλότερο από αυτό του έτερου ανιχνευτή (ανιχνευτής πρόσδεσης-anchor probe). Τέλος, όσον αφορά την αλληλουχία-στόχο των ανιχνευτών αυτή είναι προτιμότερο να είναι μια «ισορροπημένη» περιοχή, να περιλαμβάνει δηλαδή ίσες αναλογίες των τεσσάρων βάσεων και να μην είναι συμπληρωματική με τον εαυτό της, μονότονη ή επαναλαμβανόμενη¹⁶⁹.

Για την επιτυχή επιλογή εκκινητών και ανιχνευτών αξιοποιήθηκαν αφενός τα διαδικτυακά εργαλεία GenBank και Blast του NCBI (National Center of Biotechnology Information) και αφετέρου το λογισμικό CLC-Sequence Viewer (CLCbio, Δανία), που επιτρέπουν την καλύτερη οπτικοποίηση, σχεδιασμό και αξιολόγηση των αλληλουχιών και ειδικά για το *LOXLI* που διαθέτει μεγάλη ομολογία με το *LOX* και τα *LOX2-4* στην περιοχή που μας ενδιαφέρει.

❖ Στατιστική επεξεργασία

Από στατιστικής σκοπιάς ένας πολυμορφισμός μπορεί να θεωρηθεί ως μία κατηγορική μεταβλητή με τρεις δυνατές τιμές, οι οποίες είναι: ο ομοζυγώτης φυσιολογικός, ο ετεροζυγώτης και ο ομοζυγώτης μεταλλαγμένος. Έτσι είναι δυνατόν να ελεγχθεί με στατιστικά μέτρα η συσχέτιση ενός SNP με μία νόσο.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το προγράμμα SPSS 19.0 software (IBM-SPSS Inc., USA) και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ίσο με 0,05. Αρχικά για τις ποσοτικές μεταβλητές εφαρμόστηκε η δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov (έλεγχος κανονικής κατανομής) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε Ανονα δοκιμασία μέσω όρων. Περιγραφική στατιστική χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των συχνοτήτων και των ποσοστών των κατηγορικών μεταβλητών. Η σύγκριση των αναλογιών στις ομάδες ασθενών και ελέγχου για πιθανή συνδεση των πολυμορφισμών με παθολογική κατάσταση έγινε με το χ^2 test . Χρησιμοποιήσαμε είτε το Fisher's exact test είτε το Pearson Chi-Square test¹⁹³ και υπολογίσαμε το σχετικό λόγο συμπληρωματικών πιθανοτήτων (odds ratio, OR) και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI). Επίσης,, εφαρμόστηκε το στατιστικό εργαλείο Logistic Regression για το Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ με σκοπό να κατασκευάσουμε μοντέλο πρόβλεψης του νοσήματος ως προς τους ακόλουθους παράγοντες κινδύνου: φύλο, σακχαρώδη διαβήτη, αρτηριακή υπέρταση, καρδιοαγγειακή νόσο, αγγειακή νόσο και τους τέσσερις πολυμορφισμούς που μελετήσαμε (*APOE*, *MTHFR* και G153D και R141L *LOXLI*).

Με το πρόγραμμα SNPstats¹⁹⁴ έγινε έλεγχος για την καταλληλότητα του υπό εξέταση πληθυσμού, μέσω της ισορροπίας Hardy-Weinberg. Ο έλεγχος αυτός εκτιμά την ανεξαρτησία μεταξύ των αλληλίων που κληρονομούνται από τους γονείς, ακολουθεί χ^2 κατανομή με 1 βαθμό ελευθερίας και έχει τύπο:

$$HW = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

όπου O: η παρατηρούμενη συχνότητα των αλληλίων, E: η αναμενόμενη συχνότητα του αλληλίου με την υπόθεση ανεξαρτησίας στην κληρονομία.

Εφόσον επιβεβαιωθεί η υπόθεση της ανεξαρτησίας στη μεταβίβαση των αλληλίων, μπορεί να συνεχιστεί η στατιστική ανάλυση. Συγκεκριμένα κατασκευάζεται πίνακας συνάφειας (contingency table) και εφαρμόζεται το τεστ χ^2 . Ο υπολογισμός του OR για κάθε γονότυπο συγκριτικά με το γονότυπο αναφοράς (ομοζυγώτες φυσιολογικοί) προϋποθέτει για το μέγεθος της υποκείμενης συσχέτισης.

Σε περίπτωση που χρειάζεται προσαρμογή του μοντέλου λόγω συγχυτικών παραγόντων χρησιμοποιούνται μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης, τα οποία εύκολα εκτιμούν την αλληλεπίδραση μεταξύ SNPs και άλλων παραγόντων. Ο γενικός τύπος της λογιστικής παλινδρόμησης είναι:

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

όπου: p η πιθανότητα εκδήλωσης της νόσου, G η κατηγορική μεταβλητή του πολυμορφισμού και Z η μεταβλητή που συνυπολογίζεται για την καλύτερη προσαρμογή του μοντέλου. Η εξίσωση αυτή περιλαμβάνει τρεις παραμέτρους (α, β, γ) που πρέπει να υπολογισθούν.

Ας πάρουμε για παράδειγμα τον πολυμορφισμό G153D, όπου το G αλληλίο θεωρείται αλληλίο κινδύνου. Ανάλογα με τον αριθμό των αλληλίων που χρειάζονται για τη μεταβολή του κινδύνου διακρίνονται 5 μοντέλα κληρονομικότητας:

1. Συνεπικρατές μοντέλο (Co-dominant model): Είναι το πιο γενικό μοντέλο και επιτρέπει κάθε γονότυπος να προσδίδει έναν διαφορετικό και μη αθροιστικό κίνδυνο. Το μοντέλο αυτό συγκρίνει τους ετεροζυγώτες (He) και ομοζυγώτες μεταλλαγμένους (Va) προς τους ομοζυγώτες φυσιολογικούς και υπολογίζει δύο ORs αντίστοιχα. Ο τύπος που περιγράφει το μοντέλο είναι:

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

2. Επικρατές μοντέλο (Dominant model): Στο μοντέλο αυτό ένα μόνο G αλληλίο θεωρείται αρκετό για να μεταβάλλει τον κίνδυνο, με αποτέλεσμα οι ετερόζυγοι και ομόζυγοι φυσιολογικοί να φέρουν τον ίδιο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου. Έτσι η

σύγκριση γίνεται μεταξύ του συνόλου των G/G και G/A γονοτύπων (Do) προς τους A/A με βάση την εξίσωση:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta D_0 + \gamma Z$$

3. Υπολειπόμενο μοντέλο (Recessive model): Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό δύο αντίγραφα του φυσιολογικού αλληλίου είναι απαραίτητα για τη μεταβολή του κινδύνου, με αποτέλεσμα οι γονότυποι G/G και G/A να έχουν την ίδια επίδραση. Ο συνδυασμός των G/G και G/A (Re) συγκρίνεται με το γονότυπο A/A με βάση την εξίσωση:

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

4. Υπερ-επικρατές μοντέλο (Over-dominant model): Το μοντέλο αυτό συγκρίνει τους ομοζυγώτες (G/G και A/A) με τους ετεροζυγώτες (G/A-He) με χρήση της εξίσωσης:

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

5. Αθροιστικό μοντέλο (Additive Model): Το μοντέλο αυτό θεωρεί ότι κάθε αντίγραφο του G αλληλίου επιδρά στον κίνδυνο κατά τρόπο αθροιστικό, ώστε οι ομοζυγώτες φυσιολογικοί G/G να φέρουν διπλάσιο κίνδυνο από τους ετεροζυγώτες G/A. Έτσι η σύγκριση γίνεται μεταξύ του συνδυασμού των γονοτύπων G/G και G/A με βάρη 2 και 1 αντίστοιχα (Ad: 2G/G + 1TG/A) και του γονοτύπου A/A με τύπο:

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

Για την επιλογή του πλέον κατάλληλου μοντέλου κληρονομικότητας συγκρίνεται κάθε μοντέλο με το πιο γενικό (το συνεπικρατές) μέσω της εφαρμογής του ελέγχου λόγου πιθανοφάνειας (Likelihood Ratio Test- LRT). Το τεστ αυτό παρέχει ένα μέτρο της καταλληλότητας του μοντέλου (goodness of fit) και εκτιμά ποιο μοντέλο ταιριάζει καλύτερα στο μελετούμενο σύνολο δεδομένων. Η εξίσωση που συγκρίνει το σκορ πιθανοφάνειας (likelihood score) δύο μοντέλων έχει ως εξής (L1 και L2 η πιθανοφάνεια των δύο μοντέλων που συγκρίνονται):

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

Ωστόσο, κάποιες φορές το LRT δεν αρκεί ώστε να επιλεγεί κάποιο μοντέλο εις βάρος κάποιου άλλου. Κριτήρια όπως το AIC (Akaike information) μπορεί να φανούν χρήσιμα σε τέτοιες περιπτώσεις. Το μοντέλο με τη μικρότερη τιμή AIC είναι αυτό που προτιμάται. Η AIC υπολογίζεται από τον τύπο:

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

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

Τέλος, για να επιβεβαιώσουμε ότι οι στατιστικές αναλύσεις που πραγματοποιήσαμε είχαν επίπεδο ισχύος προχωρήσαμε σε Ανάλυση Ισχύος με το πρόγραμμα GPOWER Version 3.1.5¹⁹⁵. Για όλους τους υπολογισμούς με το Pearson Chi-Square χρησιμοποιήσαμε «μέγεθος αποτελέσματος» (effect size) = 0,30-μέτριο.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της γονοτύπωσης των τεσσάρων πολυμορφισμών για τις ομάδες των ασθενών με Ψ/Α.Σ (PEX), Ψ/Α.Γ(PEXG) και ΠΓΑΓ(ΡΟΑΓ) και την ομάδα ελέγχου (CONTROLS) παρουσιάζονται στους πίνακες 6.1Α, Β, Γ και Δ (όπου παύλα: το δείγμα δεν ενισχύθηκε). Στη συνέχεια γίνεται ανάλυση των αποτελεσμάτων για τους τέσσερις πολυμορφισμούς.

Πίνακας 6.1Α: Αποτελέσματα γονοτύπωσης για την ομάδα Ψ/Α.Σ (PEX).

ID	MTHFR C677T	APOE	LOXL1 G153D	LOXL1 R141L
PEX 1	C/C	C/C	G/G	G/T
PEX 2	C/C	C/C	G/G	G/G
PEX 3	C/T	C/C	G/G	G/G
PEX 4	C/C	C/C	G/A	G/G
PEX 5	C/T	C/C	G/A	G/G
PEX 6	T/T	C/C	G/A	G/G
PEX 7	T/T	C/C	G/G	G/T
PEX 8	C/T	C/T	G/G	G/G
PEX 9	C/T	C/C	G/G	G/G
PEX 10	C/C	C/C	G/G	G/G
PEX 11	C/T	C/C	G/G	G/T
PEX 12	C/C	C/C	G/G	G/G
PEX 13	T/T	C/C	G/G	G/G
PEX 14	C/C	C/C	G/G	T/T
PEX 15	C/C	C/C	G/G	G/G
PEX 16	C/T	C/T	-	-
PEX 17	C/C	C/C	-	-
PEX 18	C/T	C/C	G/G	G/G
PEX 19	C/T	C/C	-	-
PEX 20	C/C	C/C	-	-
PEX 21	C/T	C/C	G/G	G/T
PEX 22	C/T	C/C	G/G	G/T
PEX 23	C/T	C/C	G/G	G/G
PEX 24	C/C	C/C	G/G	G/T

PEX 25	C/T	C/C	G/G	G/T
PEX 26	C/C	C/C	G/G	G/G
PEX 27	C/T	C/C	G/G	G/G
PEX 28	T/T	C/C	G/G	G/G
PEX 29	C/T	C/T	G/G	G/G
PEX 30	C/T	C/C	G/G	G/T
PEX 31	C/C	C/C	G/G	G/T
PEX 32	C/C	C/C	G/A	G/G
PEX 33	C/C	C/C	G/G	T/T
PEX 34	C/T	C/C	G/A	G/G
PEX 35	C/C	C/C	G/A	G/G
PEX 36	T/T	C/C	G/A	G/G
PEX 37	C/C	C/C	G/A	G/G
PEX 39	T/T	C/C	G/A	G/G
PEX 40	C/C	C/C	G/A	G/G
PEX 41	T/T	C/C	G/A	G/T
PEX 42	C/T	C/T	G/G	G/G
PEX 43	T/T	C/C	G/G	G/T
PEX 44	C/T	C/C	G/A	G/G
PEX 45	C/C	C/C	G/G	G/T
PEX 46	C/C	C/C	G/G	G/G
PEX 47	C/T	C/C	G/A	G/G
PEX 48	C/T	C/C	-	-
PEX 49	C/T	C/C	G/G	G/G
PEX 50	C/C	C/C	-	-
PEX 51	C/T	C/C		
PEX 52	C/T	C/C	G/G	G/T
PEX 53	C/C	C/C	-	-
PEX 55	C/T	C/C	-	-
PEX 56	C/T	C/C	-	-
PEX 58	C/T	C/C	-	-
PEX 59	C/C	C/C	G/A	G/G
PEX 60	C/T	C/C	-	-
PEX 61	C/C	C/T	G/A	G/T
PEX 62	C/T	C/C	G/G	G/T
PEX 63	C/T	C/T	G/G	G/T
PEX 64	T/T	C/T	-	G/G

PEX 65	C/T	C/C	G/G	G/T
PEX 66	C/C	C/C	G/A	G/T
PEX 67	C/T	C/C	G/G	G/T
PEX 68	C/T	C/C	G/G	G/G
PEX 69	C/T	C/C	-	-
PEX 70	C/C	C/C	-	-
PEX 71	C/T	C/C	-	-
PEX 72	C/T	C/T	G/A	G/G

Πίνακας 6.1B: Αποτελέσματα γονοτύπωσης για την ομάδα Ψ/Α.Γ (PEXG).

ID	MTHFR C677T	APOE	LOXL1 G153D	LOXL1 R141L
PEXG 1	C/C	C/C	G/G	G/G
PEXG 2	C/T	C/T	G/G	G/G
PEXG 3	C/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 4	C/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 5	C/T	C/C	G/G	G/T
PEXG 6	C/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 7	C/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 8	C/C	C/C	G/G	G/G
PEXG 9	C/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 10	C/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 11	C/T	-	-	-
PEXG 12	C/T	C/C	-	-
PEXG 13	C/T	C/C	-	-
PEXG 14	T/T	C/C	-	-
PEXG 15	T/T	C/C	-	-
PEXG 16	C/T	C/C	-	-
PEXG 17	C/C	C/C	G/G	G/G
PEXG 18	C/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 19	C/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 20	C/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 21	C/T	-	G/G	G/G
PEXG 22	C/C	C/C	G/G	G/T
PEXG 23	C/T	C/C	G/G	G/T
PEXG 24	C/T	-	G/G	G/G
PEXG 25	C/T	C/T	G/G	G/G

PEXG 26	C/C	C/C	G/G	G/G
PEXG 27	C/C	C/C	G/G	G/G
PEXG 28	C/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 29	C/C	C/C	G/G	G/T
PEXG 30	T/T	C/C	G/G	G/T
PEXG 31	C/T	C/T	G/G	G/T
PEXG 32	C/C	C/C	G/A	G/G
PEXG 33	C/C	C/C	G/A	G/G
PEXG 34	C/C	C/C	G/A	G/G
PEXG 35	C/T	C/C	G/G	T/T
PEXG 36	C/C	C/C	G/A	G/G
PEXG 37	C/C	C/C	G/A	G/G
PEXG 38	C/T	C/C	G/A	G/G
PEXG 39	T/T	C/C	G/G	G/T
PEXG 40	C/C	C/C	G/G	G/T
PEXG 41	C/C	C/C	G/A	G/G
PEXG 42	C/T	C/C	G/A	G/G
PEXG 43	C/C	C/C	G/A	G/G
PEXG 44	C/T	C/C	G/A	G/G
PEXG 45	C/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 46	T/T	C/C	G/G	G/T
PEXG 47	C/C	C/C	G/A	G/G
PEXG 48	C/T	C/C	G/G	G/T
PEXG 49	T/T	C/C	G/A	G/G
PEXG 50	C/C	C/C	G/A	G/G
PEXG 51	C/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 52	T/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 53	C/C	C/T	-	-
PEXG 54	C/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 55	C/C	C/C	G/G	G/G
PEXG 56	C/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 57	C/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 58	C/C	-	-	-
PEXG 59	C/T	C/C	G/A	G/G
PEXG 61	T/T	C/C	-	-
PEXG 62	C/C	C/C	-	-
PEXG 64	T/T	C/C	G/A	G/G

PEXG 65	C/C	C/C	G/A	G/G
PEXG 66	T/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 67	C/C	C/C	-	-
PEXG 68	C/T	C/C	G/A	G/G
PEXG 69	C/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 70	C/T	C/C	G/A	G/G
PEXG 72	C/T	C/T	G/G	G/G
PEXG 73	T/T	C/C	G/G	G/T
PEXG 74	C/T	C/C	G/A	G/G
PEXG 76	C/C	C/C	G/G	G/T
PEXG 77	C/T	C/C	G/G	G/T
PEXG 78	T/T	C/T	G/G	G/G
PEXG 79	C/T	C/T	G/G	G/G
PEXG 80	C/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 81	C/C	C/T	G/G	G/G
PEXG 82	C/C	C/C	G/G	G/G
PEXG 83	C/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 84	C/T	C/C	G/G	G/G
PEXG 85	C/C	C/C	G/G	-
PEXG 86	C/T	-	G/G	G/G

Πίνακας 6.1Γ: Αποτελέσματα γονοτύπωσης για την ομάδα με ΠΓΑΓ (POAG).

ID	MTHFR C677T	APOE	LOXL1 G153D	LOXL1 R141L
POAG 1	C/C	C/C	G/G	G/T
POAG 4	C/T	C/C	G/G	G/G
POAG 5	C/C	C/T	G/A	G/G
POAG 6	-	C/C	G/G	T/T
POAG 7	-	C/C	G/A	G/G
POAG 8	-	C/C	G/A	G/T
POAG 9	-	C/T	G/G	G/G
POAG 10	C/T	C/C	G/G	G/G
POAG 11	C/T	C/C	G/G	G/T
POAG 12	C/T	C/C	G/A	G/G
POAG 13	C/T	C/C	G/G	G/T
POAG 14	C/T	C/C	G/A	G/G
POAG 16	T/T	C/C	G/G	G/G

POAG 17	C/T	C/T	G/G	G/T
POAG 18	C/C	C/T	G/G	T/T
POAG 19	C/T	C/C	G/A	G/G
POAG 21	C/T	C/C	G/G	G/T
POAG 22	C/T	C/C	G/A	G/T
POAG 23	C/C	C/C	G/G	G/G
POAG 24	-	C/C	G/A	G/G
POAG 25	C/C	C/C	G/A	G/T
POAG 26	C/C	C/C	G/A	G/T
POAG 27	C/C	C/C	G/A	G/G
POAG 28	-	C/C	G/G	G/G
POAG 29	C/C	C/C	-	-
POAG 31	C/T	C/C	G/A	G/T
POAG 33	C/T	C/C	G/G	G/G
POAG 34	T/T	C/C	G/A	G/G
POAG 35	C/T	C/C	G/A	G/G
POAG 36	C/T	C/C	G/G	G/T
POAG 37	C/T	C/T	G/G	G/G
POAG 38	C/T	C/C	G/G	G/G
POAG 40	C/T	C/C	G/G	G/T
POAG 41	C/T	C/C	G/A	G/G
POAG 42	C/C	C/C	G/A	G/T
POAG 44	C/T	C/C	G/G	G/T
POAG 46	C/T	C/C	G/G	G/G
POAG 47	C/T	C/C	G/G	G/G
POAG 48	T/T	C/T	G/G	G/T
POAG 49	C/C	C/C	G/G	G/T
POAG 51	C/T	C/C	-	-
POAG 53	C/T	C/C	G/G	G/G
POAG 54	C/C	C/T	G/G	T/T
POAG 56	C/C	C/C	-	-
POAG 57	T/T	C/C	-	-
POAG 58	C/T	C/T	-	-
POAG 59	C/T	C/C	G/G	G/G
POAG 61	T/T	C/T	-	-
POAG 62	-	C/C	-	-
POAG 63	C/C	C/T	-	-

POAG 64	C/C	C/C	-	-
POAG 67	C/C	-	-	-
POAG 75	T/T	C/C	G/G	T/T

Πίνακας 6.1Α: Αποτελέσματα γονοτύπωσης για την ομάδα ελέγχου (CONTROLS).

ID	MTHFR C677T	APOE	LOXL1 G153D	LOXL1 R141L
C 1	C/C	-	G/G	G/G
C 2	C/C	-	G/G	G/T
C 3	C/C	-	G/G	G/T
C 4	C/C	-	G/G	-
C 5	C/C	-	G/G	G/T
C 6	T/T	-	G/G	G/T
C 7	C/C	-	G/G	T/T
C 8	T/T	-	G/G	G/T
C 9	-	-	G/A	G/G
C 10	-	-	G/A	G/G
C 11	-	-	G/G	G/G
C 12	-	-	G/G	G/T
C 13	-	-	G/A	G/G
C 14	-	-	G/A	G/G
C 15	-	-	G/G	G/T
C 16	T/T	-	G/G	T/T
C 17	C/T	-	A/A	G/T
C 18	C/C	-	G/A	G/G
C 19	C/T	-	G/A	G/G
C 21	T/T	-	G/A	G/G
C 22	C/T	-	G/G	T/T
C 23	C/C	C/C	G/G	G/T
C 24	C/T	C/T	-	-
C 25	C/C	C/C	G/G	G/T
C 27	C/T	C/C	-	-
C 28	T/T	C/C	G/G	G/G
C 29	C/C	C/T	G/G	-
C 30	C/T	C/T	G/G	G/G
C 31	C/T	C/C	G/A	G/G
C 32	C/T	C/T	G/G	G/G

C 33	C/C	C/C	G/A	G/T
C 34	C/T	C/C	G/A	G/G
C 35	C/C	C/C	G/G	G/T
C 36	T/T	C/C	G/G	G/T
C 37	C/T	-	G/A	G/G
C 38	T/T	C/C	G/A	G/G
C 39	C/T	C/C	G/G	G/G
C 40	C/T	C/C	G/A	G/T
C 41	C/T	C/C	G/A	G/G
C 43	C/T	C/C	G/G	-
C 44	T/T	C/C	G/G	G/T
C 45	C/T	C/C	G/G	-
C 46	C/T	C/C	G/G	-
C 47	C/C	C/C	G/G	-
C 48	C/C	C/C	G/G	G/T
C 49	-	-	G/G	G/T
C 50	-	-	G/A	G/T
C 51	C/C	C/C	G/G	G/T
C 52	C/T	C/C	G/G	G/G
C 53	C/C	-	G/G	G/T
C 54	C/C	C/C	G/G	T/T
C 55	C/C	C/C	G/A	G/T
C 56	T/T	C/C	-	-
C 57	C/C	-	G/A	G/T
C 58	T/T	C/C	G/G	G/G
C 60	C/C	C/C	G/G	G/G
C 61	C/C	-	G/A	G/G
C 63	C/T	C/C	G/G	T/T
C 64	C/T	C/C	G/A	G/G
C 66	C/T	-	G/G	G/T
C 67	C/T	C/C	G/G	G/T
C 68	C/C	C/C	-	-
C 69	C/C	C/C	A/A	G/G
C 70	C/T	C/C	G/A	G/G
C 71	C/T	C/C	G/G	G/T
C 72	C/T	C/C	G/A	G/G
C 73	C/C	-	-	-

C 74	C/T	C/C	G/A	G/G
C 75	C/T	C/C	G/A	G/G
C 76	T/T	C/C	G/A	G/G
C 77	T/T	C/C	G/A	G/G
C 78	C/C	-	G/G	G/T
C 79	T/T	C/C	-	-
C 80	C/C	C/C	-	-
C 81	C/T	C/C	G/A	G/G
C 82	C/C	C/C	G/G	G/T
C 83	C/T	C/C	G/A	G/G
C 84	C/C	-	G/A	G/G
C 85	C/T	C/C	G/A	G/G
C 86	C/T	C/C	G/G	G/T
C 87	C/C	C/C	G/G	-
C 88	C/C	-	-	-
C 89	C/T	C/C	A/A	G/G
C 90	C/T	-	-	-
C 91	C/C	C/C	G/A	G/T
C 92	C/C	C/C	G/A	G/G
C 93	T/T	C/C	G/A	G/G
C 94	C/C	-	-	-
C 95	T/T	-	G/A	G/G
C 96	C/C	C/C	A/A	G/G
C 97	C/C	C/C	G/A	G/G
C 98	C/T	-	G/A	G/T
C 99	C/T	C/C	G/A	G/T
C 100	T/T	-	-	G/G
C 101	C/C	-	-	-
C 102	C/C	C/C	G/G	G/T
C 103	C/T	-	-	-
C 104	C/T	C/C	G/G	G/T
C 105	C/T	C/C	-	G/G
C 106	T/T	C/C	G/A	G/T
C 107	C/C	C/C	G/A	G/G
C 108	T/T	C/C	G/A	G/G
C 109	C/C	C/C	-	G/G
C 110	C/T	C/C	G/G	G/T

C 111	C/C	C/C	G/A	G/G
C 112	C/T	C/C	G/G	G/T
C 114	C/C	C/C	G/A	G/T
C 115	C/T	C/C	G/A	G/G
C 116	T/T	C/C	G/A	G/G
C 117	C/C	C/C	G/A	G/T
C 118	T/T	C/C	G/G	G/T
C 119	T/T	C/C	G/A	G/G
C 120	C/C	C/C	-	-
C 121	C/T	C/C	-	-
C 122	C/C	C/C	-	-
C 123	C/T	C/C	-	-

Παρατηρώντας τους πίνακες των αποτελεσμάτων της γονοτύπωσης των τεσσάρων πολυμορφισμών πρέπει να διευκρινίσουμε τα εξής:

Για τον πολυμορφισμό του *MTHFR* C677T, καταγράφονται οι τρεις πιθανοί γονότυποι: ο ετεροζυγώτης C/T, ο φυσιολογικός ομοζυγώτης C/C και ο παθολογικός ομοζυγώτης T/T που προκαλεί μέτρια υπερομοκυστεϊναιμία, η οποία με βάση την βιβλιογραφία συνδέεται με το Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ.

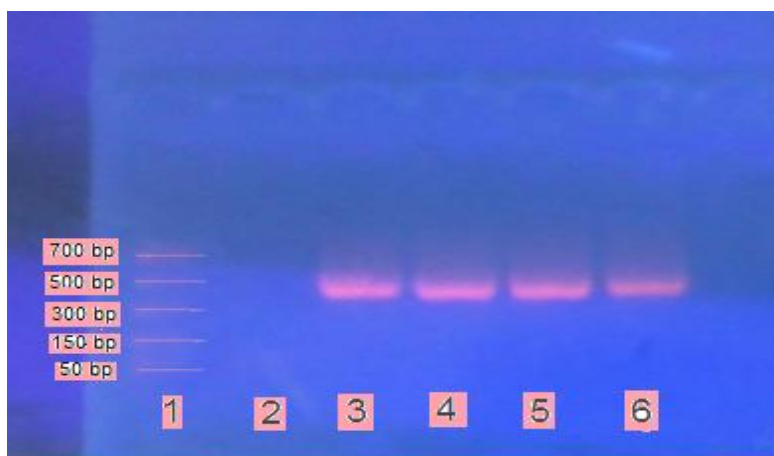
Για τον πολυμορφισμό του *APOE*, υπάρχουν έξι πιθανοί διαφορετικοί γονότυποι (E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, E4/E4) που προκύπτουν από τα αλληλία E2, E3, και E4. Στη παρούσα μελέτη, εστίασαμε στο αλληλίο E2 του *APOE* που έχει συνδεθεί σε μία μελέτη με το Ψ/Α.Σ και παρουσιάζουμε τους γονότυπους που περιέχουν τουλάχιστον ένα αλληλίο E2: C/T (E2/E2, E2/E3, E2/E4: T στη θέση 158) και τους γονότυπους χωρίς το E2 αλληλίο: C/C (E3/E3, E4/E4, E3/E4: C στη θέση 158).

Για τον πολυμορφισμό G153D του *LOX1*, καταγράφονται οι τρεις πιθανοί γονότυποι: ο ομοζυγώτης G/G που με βάση την βιβλιογραφία σε Καυκάσιους πληθυσμούς συνδέεται με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ, ο ετεροζυγώτης G/A και ο ομοζυγώτης A/A.

Τέλος, για τον πολυμορφισμό R141L του *LOX1*, καταγράφονται οι τρεις πιθανοί γονότυποι: ο ομοζυγώτης G/G που με βάση την βιβλιογραφία σε Καυκάσιους πληθυσμούς επίσης συνδέεται με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ, ο ετεροζυγώτης G/T και ο ομοζυγώτης T/T.

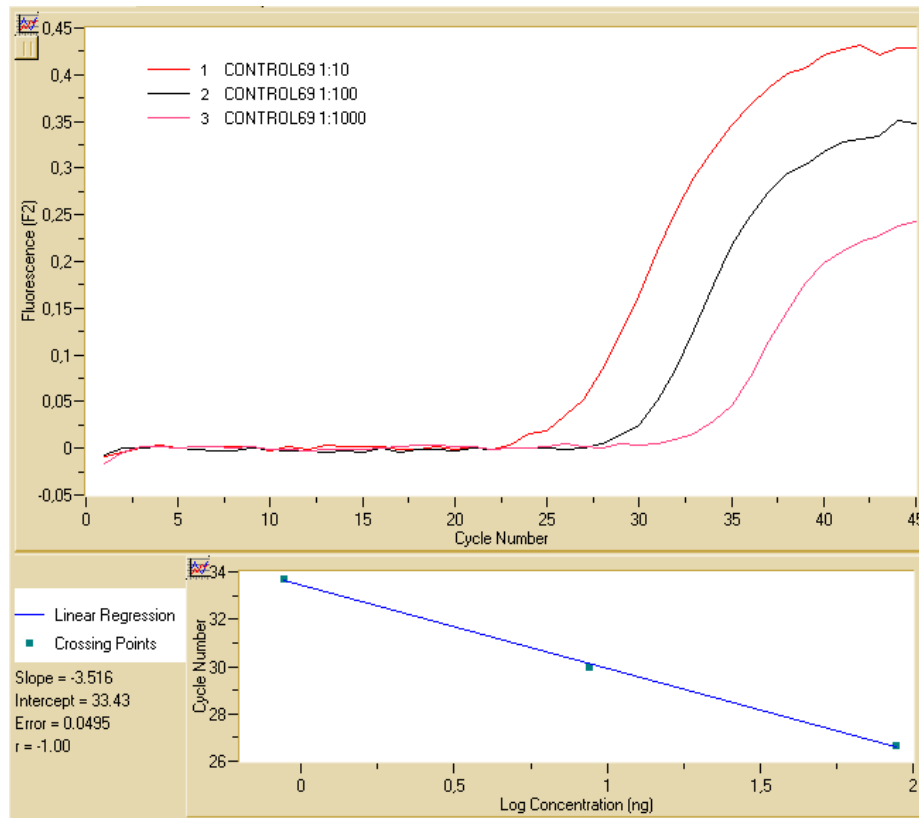
Αποτελέσματα της γονοτύπωσης των πολυμορφισμών G153D και R141L του LOXL1

Η PCR πραγματικού χρόνου για το *LOXL1* οδήγησε σε ενίσχυση γονιδιακού τμήματος 454 bp, χωρίς παραπροϊόντα, όπως επιβεβαιώθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (εικόνα 6.1).



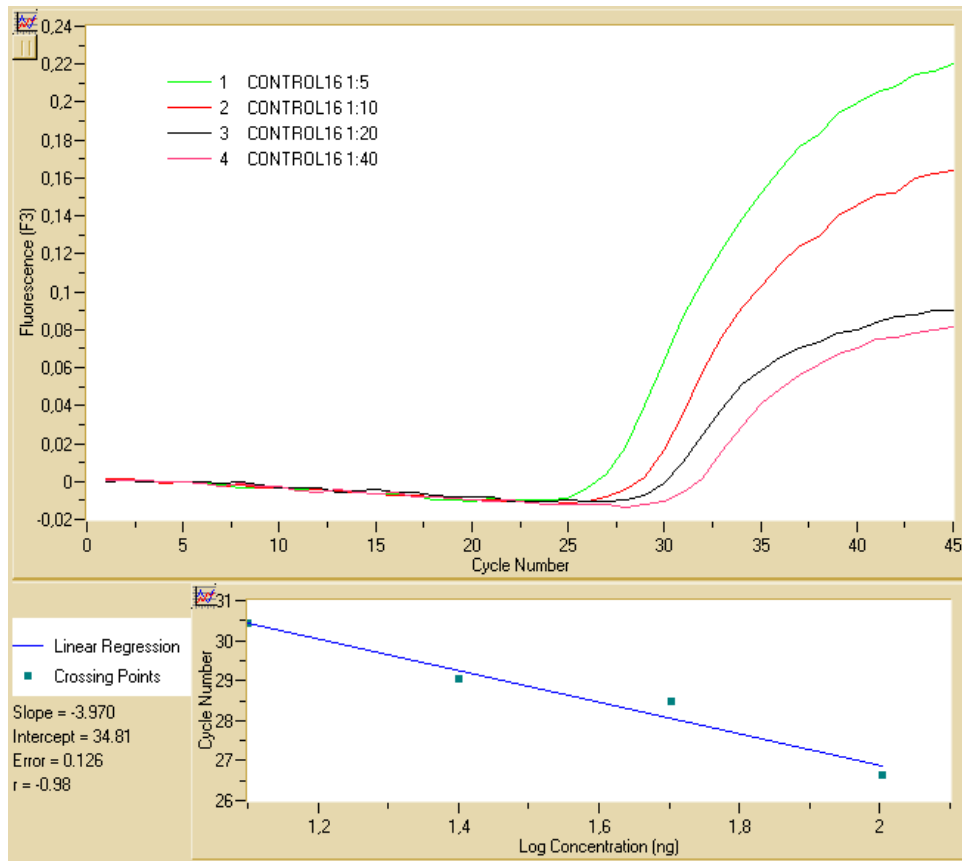
Εικόνα 6.1: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%. 1) Στην πρώτη στήλη: δείκτης μοριακών βαρών (marker), 2) Στην δεύτερη στήλη: τυφλό δείγμα (blank) και 3) Στις στήλες 3, 4, 5 και 6: ζώνες 453bp προϊόντα της PCR για το *LOXL1*.

Για το σχεδιασμό καμπύλης αναφοράς της αντίδρασης για τον πολυμορφισμό G153D χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις δείγματος ομοζυγώτη A/A, ανιχνευθέντος με τα δύο προγράμματα combined και modified στο Lightcycler και επιβεβαιωμένου με DNA Sequencing. Η αρχική συγκέντρωση του δείγματος μετρημένη με το φθορισμόμετρο Qubit, ήταν 876,3 ng/μL. Οι μετρήσεις έγιναν μόνο παρουσία των ανιχνευτών για τον G153D στο κανάλι F2. Το όριο ανίχνευσης (LOD: Limit Of Detection) ήταν η αραιώση 1:1000 (0,8663 ng/μL), καθώς ανιχνεύθηκε σε 4/5 προσπάθειες (80%). Η κλίση της καμπύλης αναφοράς ήταν -3,516 και η απόδοσή της 1,92 (n=3) (εικόνα 6.2). Η επαναληψιμότητα της ποσοτικοποίησης ελέγχθηκε με ενίσχυση τριών δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης (C_1 :87,63 ng/μL, C_2 :8,763 ng/μL, C_3 :0,8763 ng/μL) εις τριπλούν (n=3) στην ίδια αντίδραση (within-run precision) με μέση τιμή (\bar{x}) των C_q (C_{q1} =26,66, C_{q2} =29,99, C_{q3} =33,69) και συντελεστή διακύμανσης (CV) των C_q κάτω του 2,5%.



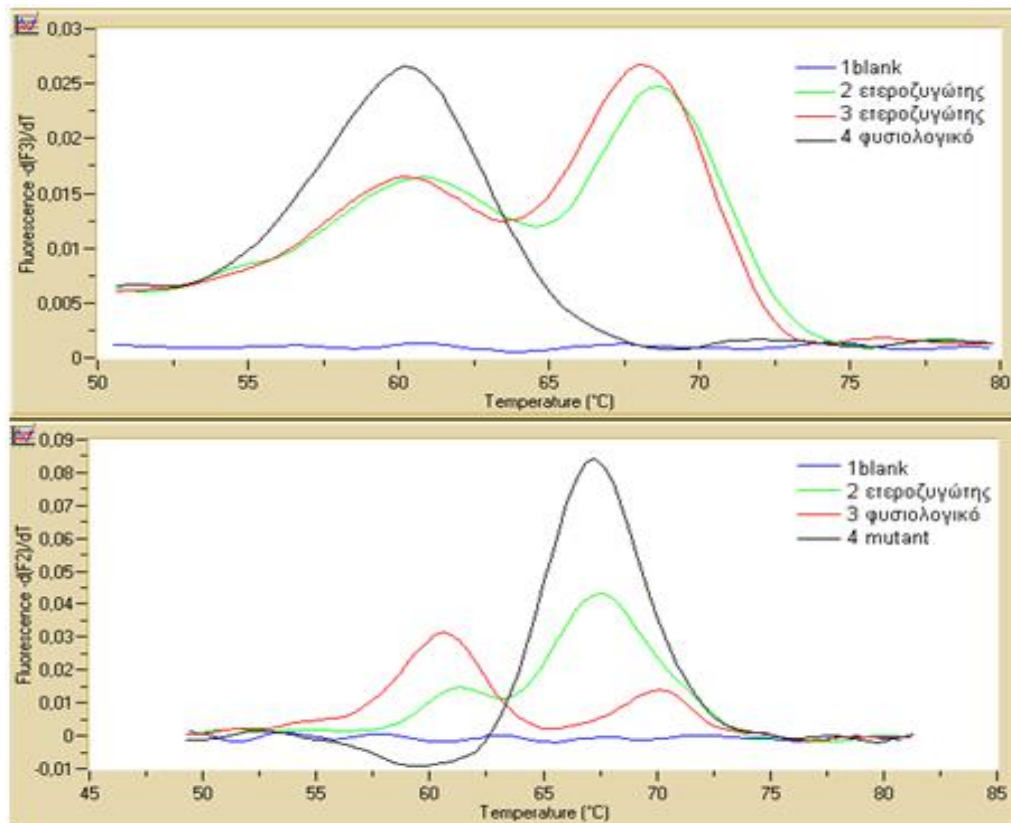
Εικόνα 6.2: Καμπύλη αναφοράς για την αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου για τον G153D. Επάνω: ενίσχυση γνωστού δείγματος ομοζυγώτη (A/A) (C69) και διαδοχικές αραιώσεις (C69 1:10, C69 1:100, C69 1:1000). Κάτω: καμπύλη αναφοράς με κλίση -3,516.

Για το σχεδιασμό καμπύλης αναφοράς της αντίδρασης για τον πολυμορφισμό R141L χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις δείγματος ομοζυγώτη T/T, ανιχνευθέντος με τα δύο προγράμματα combined και modified στο Lightcycler και επιβεβαιωμένου με DNA Sequencing. Η αρχική του συγκέντρωση μετρημένη με το φθορισμόμετρο Qubit, ήταν 504 ng/μL. Οι μετρήσεις έγιναν μόνο παρουσία των ανιχνευτών για τον R141L στο κανάλι F3. Το όριο ανίχνευσης ήταν η αραιώση 1:320 (1,6 ng/μL), καθώς ανιχνεύθηκε σε 4/5 προσπάθειες (80%). Η κλίση της καμπύλης αναφοράς ήταν -3,970 και η αποδοτικότητα της 1,79 (n=3) (εικόνα 6.3). Η επαναληψιμότητα της ποσοτικοποίησης ελέγχθηκε με ενίσχυση τεσσάρων δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης (C₁:100,8 ng/μL, C₂:50,4 ng/μL, C₃:25,2 ng/μL, C₄:12,6 ng/μL) εις τριπλούν (n=3) στην ίδια αντίδραση (within-run precision) με μέση τιμή (x) των C_q (C_{q1}=26,65, C_{q2}=28,47, C_{q3}=29,05 C_{q4}=30,44) και συντελεστή διακύμανσης (CV) των C_q κάτω του 2,5%.

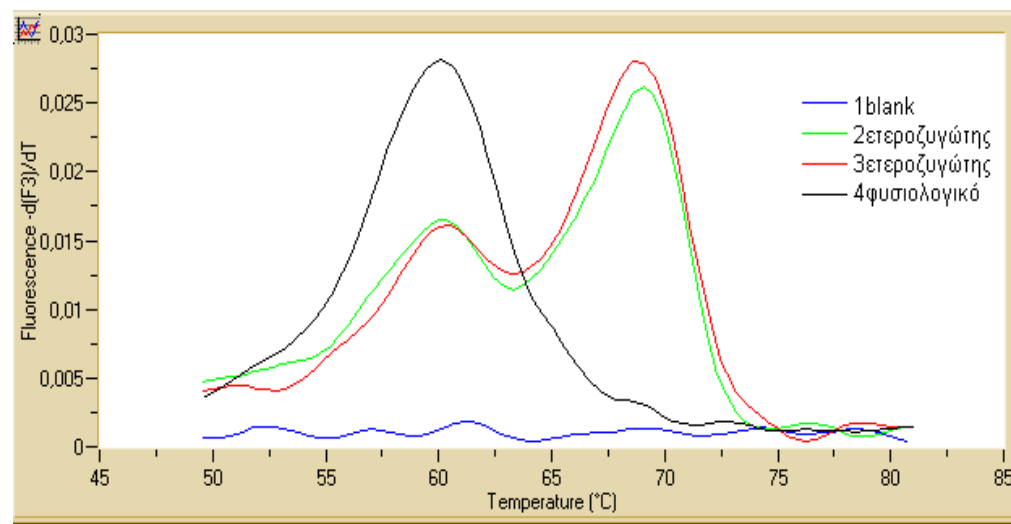


Εικόνα 6.3: Καμπύλη αναφοράς για την αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου για τον R141L. Επάνω: ενίσχυση γνωστού δείγματος ομοζυγώτη T/T (C16) και διαδοχικές αραιώσεις (C16 1:5, C16 1:10, C16 1:20, C16 1:40). Κάτω: καμπύλη αναφοράς με κλίση -3,970.

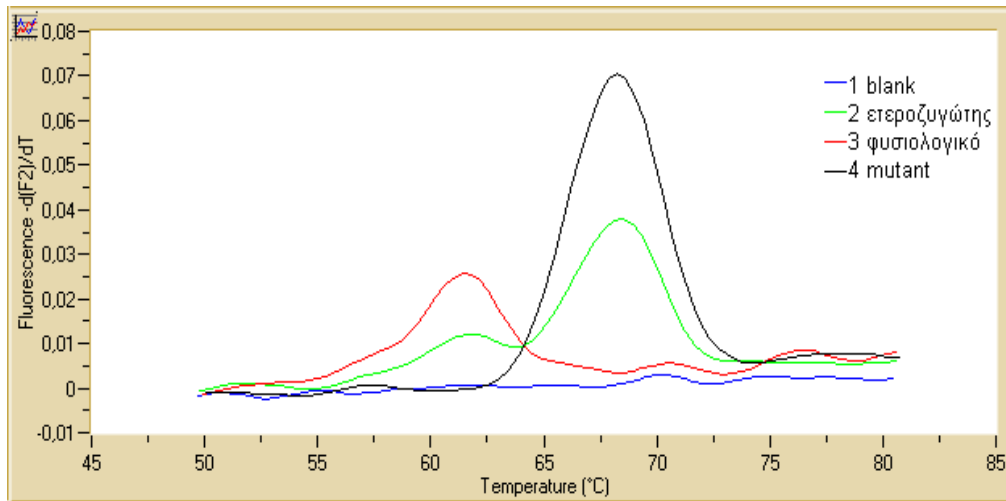
Η ανάλυση των καμπυλών τήξης για τους δύο πολυμορφισμούς με τα δύο προγράμματα (combined και modified) παρουσιάζεται στις παρακάτω ενδεικτικές εικόνες (εικόνα 6.4-6.8). Στην ανάλυση των καμπυλών οι κορυφές των δύο αλληλίων και για τους δύο πολυμορφισμούς ήταν σαφώς διαχωρισμένες ($\Delta T_m > 6^\circ\text{C}$). Τα σημεία τήξης (T_m) των δύο σπάνιων αλληλίων A και T ήταν υψηλότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα για τα αλληλία κινδύνου G όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς οι ανιχνευτές ήταν 100% συμπληρωματικοί των σπάνιων αλληλίων. Για τον G153D, το T_m ήταν $68,22^\circ\text{C}$ για το αλληλίο A και $61,91^\circ\text{C}$ για το αλληλίο G ($\Delta T_m = 6.31^\circ\text{C}$). Για τον R141L, το T_m ήταν $68,63^\circ\text{C}$ για το αλληλίο T και $61,28^\circ\text{C}$ για το αλληλίο G ($\Delta T_m = 7.35^\circ\text{C}$). Η αναπαραγωγιμότητα των χαρακτηριστικών των καμπυλών τήξης ελέγχθηκε και ήταν πολύ ικανοποιητική (CV για κάθε $T_m < 2.5\%$).



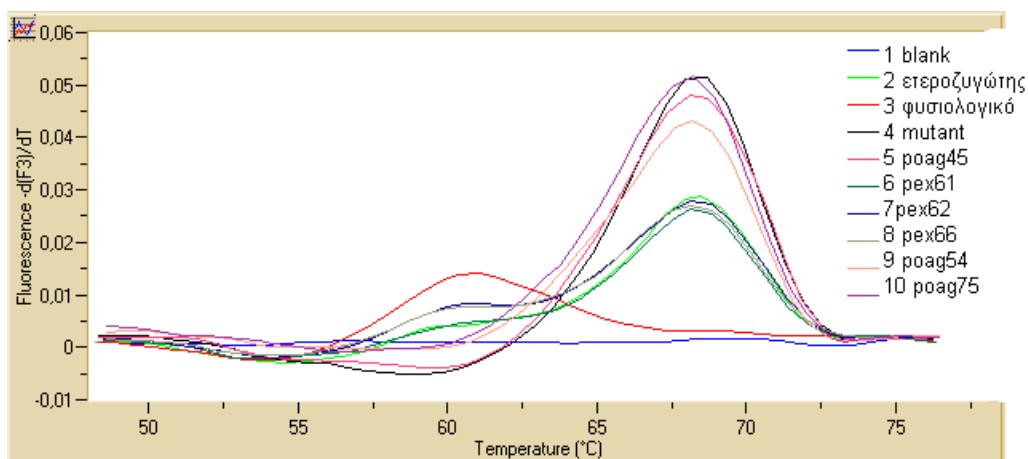
Εικόνα 6.4: Ανάλυση καμπυλών τήξεως με συνδυασμένη γονοτύπωση. Πάνω εικόνα: για τον R141L για δύο ετεροζυγώτες G/T και έναν ομοζυγώτη G/G. Κάτω εικόνα: για τον G153D, για έναν ετεροζυγώτη G/A, έναν ομοζυγώτη G/G και έναν A/A.



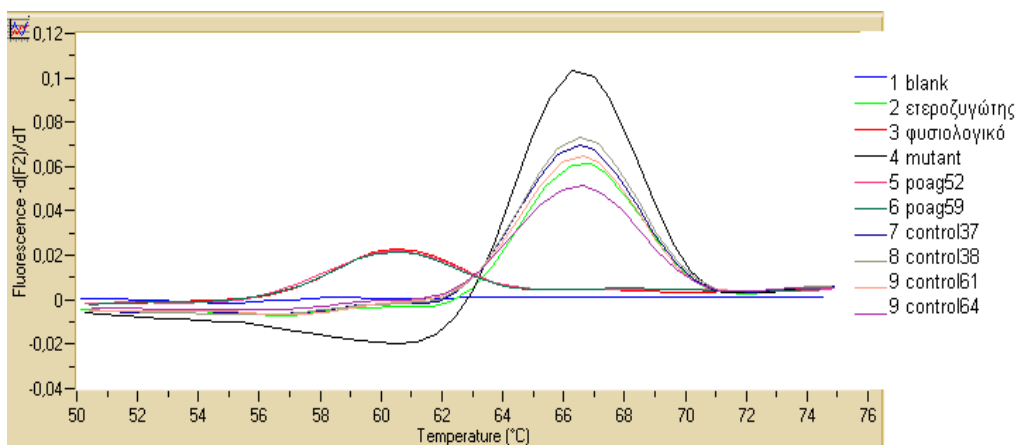
Εικόνα 6.5: Ανάλυση καμπυλών τήξεως (πρόγραμμα modified) για τον R141L για δύο ετεροζυγώτες G/T και έναν ομοζυγώτη G/G.



Εικόνα 6.6: Ανάλυση καμπυλών τήξεως (πρόγραμμα modified) για τον G153D για έναν ετεροζυγώτη G/A, έναν ομοζυγώτη G/G και έναν A/A.

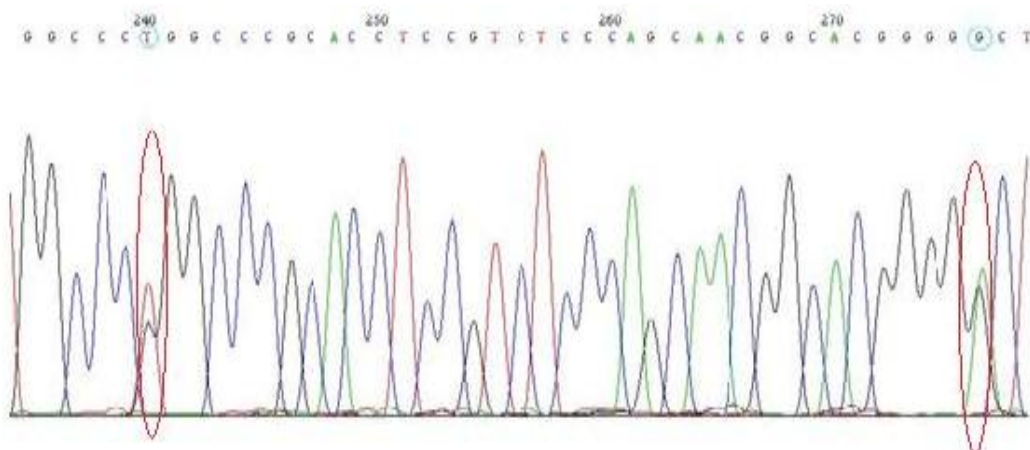


Εικόνα 6.7: Ανάλυση δειγμάτων με το πρόγραμμα melting για τον R141L.

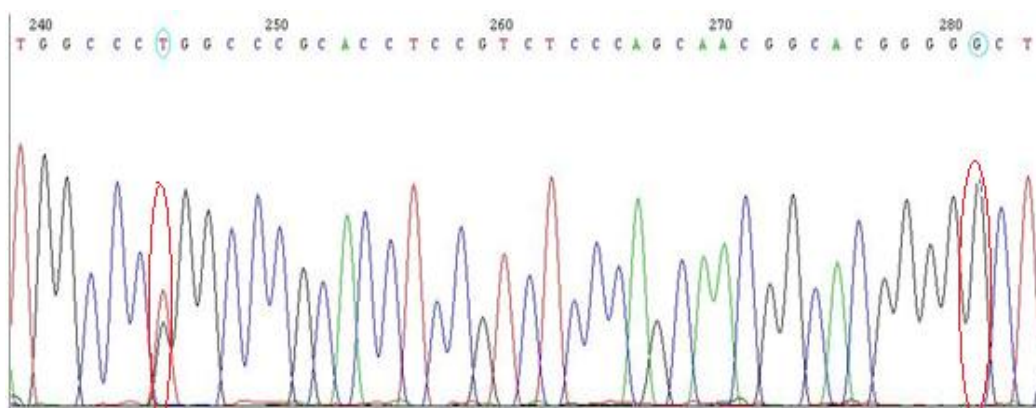


Εικόνα 6.8: Ανάλυση δειγμάτων με το πρόγραμμα melting για τον G153D.

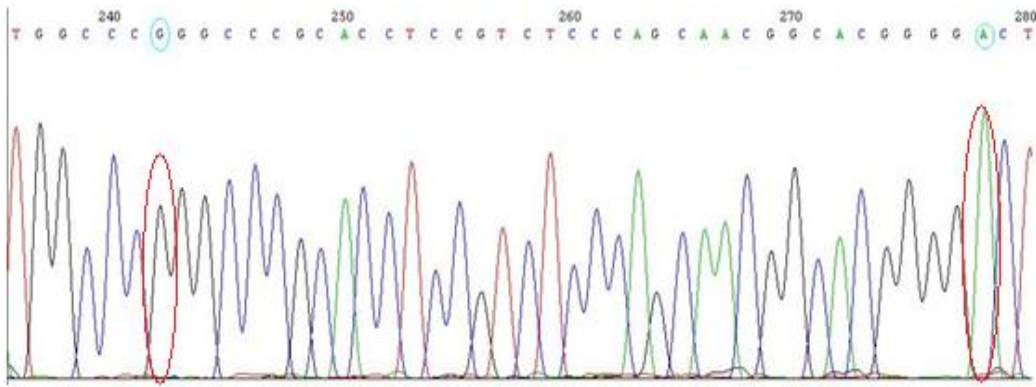
Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν σε δέκα επιλεγμένα δείγματα με την μέθοδο DNA sequencing. Το πρώτο γράφημα (εικόνα 6.9) αφορά δείγμα ετεροζυγώτη G/T στον R141L, με αλληλουχία CCCTGG και δύο κορυφές και ετεροζυγώτη G/A στον G153D, με αλληλουχία CGGGG και δύο κορυφές. Το δεύτερο γράφημα (εικόνα 6.10) αφορά δείγμα ετεροζυγώτη G/T στον R141L, με αλληλουχία CCCTGG και δύο κορυφές και ομοζυγώτη G/G στον G153D, με αλληλουχία CGGGG και μία κορυφή. Τέλος, το τρίτο γράφημα (εικόνα 6.11) αφορά δείγμα ομοζυγώτη G/G στον R141L, με αλληλουχία CCCGGG και μία κορυφή και ομοζυγώτη A/A στον G153D, με αλληλουχία CGGGGA και μία κορυφή.



Εικόνα 6.9: Γράφημα από DNA sequencer. Ετεροζυγώτης G/T στον R141L (δύο κορυφές) και ετεροζυγώτης G/A στον G153D (δύο κορυφές).



Εικόνα 6.10: Γράφημα από DNA sequencer. Ετεροζυγώτης G/T στον R141L (δύο κορυφές) και ομοζυγώτης G/G στον G153D (μία κορυφή).



Εικόνα 6.11: Γράφημα από DNA sequencer. Ομοζυγώτης G/G στον R141L (μία κορυφή) και ομοζυγώτης A/A στον G153D (μία κορυφή).

Συμπερασματικά, για τη γονοτύπωση των πολυμορφισμών G153D και R141L του γονιδίου LOXL1 αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε στο όργανο LightCycler μεθοδολογία PCR πραγματικού χρόνου και ανάλυση καμπυλών τήξης. Η μεθοδολογία με το πρόγραμμα modified (ξεχωριστή ανάλυση του κάθε πολυμορφισμού) αναπτύχθηκε με ικανοποιητικό τρόπο, ήταν ταχεία, αξιόπιστη, επιδεικνύοντας καλή απόδοση - επαναληψιμότητα στην ποσοτικοποίηση (αναπαραγωγιμότητα Ct CV<2,5%) και αξιοπιστία στη γονοτύπωση (CV<2,5%). Επίσης, ήταν ακριβής καθώς σε δέκα επιλεγμένα δείγματα έγινε σύγκριση με την μέθοδο αναφοράς του DNA sequencing (100% συμφωνία).

Για λόγους εξοικονόμησης χρόνου και αντιδραστηρίων, καθώς οι δύο πολυμορφισμοί είναι κοντινοί και το PCR προϊόν το ίδιο, έγινε προσπάθεια ανάπτυξης μεθοδολογίας για την εξέταση ταυτόχρονα των δύο πολυμορφισμών με το πρόγραμμα combined (συνδυασμένης γονοτύπωσης) με probes που χρησιμοποιούσαν διαφορετικά φθορισμοχρώματα. Πρέπει ωστόσο να αναφερθεί, ότι η μέθοδος είχε κάποιους περιορισμούς καθώς πολλές φορές ήταν προβληματική η διαφοροποίηση των ετεροζυγωτών G/A και G/T από τους ομοζυγώτες A/A και T/T, αντίστοιχα. Οι δύο πολυμορφισμοί βρίσκονται πολύ κοντά και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στη σχεδίαση των εκκινητών και ανιχνευτών για την αποφυγή δυσχερούς υβριδοποίησης και χαμηλής απόδοσης. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η ανάλυση των καμπυλών τήξης έχει καλύτερο αποτέλεσμα κατά την εξέταση έως 16 περίπου δειγμάτων κάθε φορά (δηλαδή στη μισή χωρητικότητα του LightCycler).

Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Έλεγχος πληθυσμών

Συλλέχθηκαν δείγματα αίματος και απομονώθηκε DNA από 82 ασθενείς με Ψ/Α.Γ (55.6% άντρες), 69 ασθενείς με Ψ/Α.Σ (39.1% άντρες), 52 ασθενείς με ΠΓΑΓ (51% άντρες) και 107 άτομα ομάδας ελέγχου (43.9% άντρες). Ελέγχοντας τις ομάδες ως προς την ποιοτική μεταβλητή του φύλου δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στατιστικά σημαντικές (p value >0.05). Αναφορικά με την ηλικία, εφαρμόστηκε η δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov (έλεγχος κανονικής κατανομής) εντός των ομάδων ασθενών και της ομάδας ελέγχου με χρήση του προγράμματος SPSS. Στη συνέχεια, καθώς οι κατανομές ήταν κανονικές, πραγματοποιήθηκε Ανονα δοκιμασία μέσω όρων ώστε να ελεγχθεί εάν παρουσιάζουν την ίδια ηλικιακή κατανομή. Παρατηρήθηκε από τα αποτελέσματα, ότι οι ομάδες ασθενών και η ομάδα ελέγχου είναι ηλικιακά σωστά ισοσκελισμένες. Ενδεικτικά αναφέρονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις στον πίνακα 6.2.

Πίνακας 6.2: Δοκιμασία Ανονα. Έλεγχος των ομάδων σε σχέση με την ηλικία.

	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ
Ψ/Α.Σ	76,2	7,2
Ψ/Α.Γ	74,5	7,7
ΠΓΑΓ	69,4	8,8
ΟΜ. ΕΛ.	74,4	8,2
ΣΥΝΟΛΙΚΑ	74,0	8,0

Ακολουθεί η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των δειγμάτων που γονοτυπώθηκαν και η σύγκριση μεταξύ των ομάδων ως προς τους τέσσερεις πολυμορφισμούς. Ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg, ο έλεγχος χ^2 , οι σχετικοί κίνδυνοι, τα όρια εμπιστοσύνης και οι τιμές AIC για κάθε μοντέλο κληρονόμησης υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα SNPStats. Συμπληρωματικά, έγινε έλεγχος με το πρόγραμμα SPSS 19.0 software και GPOWER Version 3.1.5.

Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων για τον G153D του *LOXL1*

Αρχικά, για τον G153D, μελετήθηκαν η ομάδα του Ψ/Α.Σ και ελέγχου και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 6.3: Συχνότητες των αλληλίων και γονοτύπων για τον G153D (SNP1), στις ομάδες Ψ/Α.Σ (status=2) και ελέγχου (status=0). Τεστ Hardy-Weinberg.

SNP1 allele frequencies (n=150)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=2	
Allele	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
G	230	0.77	141	0.73	89	0.84
A	70	0.23	53	0.27	17	0.16

SNP1 genotype frequencies (n=154)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=2	
Genotype	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
A/A	4	0.03	4	0.04	0	0
G/A	62	0.41	45	0.46	17	0.32
G/G	84	0.56	48	0.49	36	0.68
NA	4	---	3	---	1	---

SNP1 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=150)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	84	62	4	230	70	0.069
STATUS=0	48	45	4	141	53	0.13
STATUS=2	36	17	0	89	17	0.33

Πίνακας 6.4: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον G153D και οι υπολογιζόμενοι ORs.

SNP1 association with response STATUS (n=150, crude analysis)							
Model	Genotype	STATUS=0	STATUS=2	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	G/G	48 (49.5%)	36 (67.9%)	1.00			
	G/A	45 (46.4%)	17 (32.1%)	0.50 (0.25-1.02)	0.026	193.6	202.6
	A/A	4 (4.1%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)			
Dominant	G/G	48 (49.5%)	36 (67.9%)	1.00			
	G/A-A/A	49 (50.5%)	17 (32.1%)	0.46 (0.23-0.93)	0.028	194	200.1
Recessive	G/G-G/A	93 (95.9%)	53 (100%)	1.00			
	A/A	4 (4.1%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	0.06	195.3	201.3
Overdominant	G/G-A/A	52 (53.6%)	36 (67.9%)	1.00			
	G/A	45 (46.4%)	17 (32.1%)	0.55 (0.27-1.10)	0.086	195.9	201.9
Log-additive	---	---	---	0.45 (0.23-0.87)	0.014	192.8	198.8

Πιστοποιείται για τον G153D, στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το Ψ/Α.Σ. Ο γονότυπος G/G εμφανίζεται στο 67,9% των ασθενών με Ψ/Α.Σ σε σχέση με το 49,5% των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Διαλέγουμε το αθροιστικό μοντέλο κληρονομικής

καθώς δίνει μικρότερη τιμή AIC (192,8) και ο OR για το λιγότερο συχνό αλληλίο A είναι 0,45 με 95% όρια εμπιστοσύνης 0,23-0,87 ($p=0,014$).

Στη συνέχεια, για τον G153D, μελετήθηκαν οι ομάδες του Ψ/A.Γ και ελέγχου και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 6.5: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων για τον G153D (SNP1) στις ομάδες Ψ/A.Γ (status=3) και ελέγχου (status=0). Τεστ Hardy-Weinberg.

SNP1 allele frequencies (n=168)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=3	
Allele	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
G	264	0.79	141	0.73	123	0.87
A	72	0.21	53	0.27	19	0.13

SNP1 genotype frequencies (n=171)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=3	
Genotype	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
A/A	4	0.02	4	0.04	0	0
G/A	64	0.38	45	0.46	19	0.27
G/G	100	0.6	48	0.49	52	0.73
NA	3	---	3	---	0	---

SNP1 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=168)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	100	64	4	264	72	0.11
STATUS=0	48	45	4	141	53	0.13
STATUS=3	52	19	0	123	19	0.35

Πίνακας 6.6: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον G153D και οι υπολογιζόμενοι ORs.

SNP1 association with response STATUS (n=168, crude analysis)							
Model	Genotype	STATUS=0	STATUS=3	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	G/G	48 (49.5%)	52 (73.2%)	1.00			
	G/A	45 (46.4%)	19 (26.8%)	0.39 (0.20-0.76)	0.0019	222.3	231.7
	A/A	4 (4.1%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)			
Dominant	G/G	48 (49.5%)	52 (73.2%)	1.00			
	G/A-A/A	49 (50.5%)	19 (26.8%)	0.36 (0.19-0.69)	0.0017	223	229.3
Recessive	G/G-G/A	93 (95.9%)	71 (100%)	1.00			
	A/A	4 (4.1%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	0.035	228.4	234.6
Overdominant	G/G-A/A	52 (53.6%)	52 (73.2%)	1.00			
	G/A	45 (46.4%)	19 (26.8%)	0.42 (0.22-0.82)	0.0089	226	232.3
Log-additive	---	---	---	0.35 (0.19-0.67)	7e-04	221.4	227.7

Πιστοποιείται για τον G153D, στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το Ψ/A.Γ. Ο γονότυπος G/G εμφανίζεται στο 73,2% των ασθενών με Ψ/A.Γ σε σχέση με το 49,5% των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Διαλέγουμε το αθροιστικό μοντέλο κληρονομότητας

καθώς δίνει μικρότερη τιμή AIC (221,4) και ο OR για το λιγότερο συχνό αλληλίο A είναι 0,35 με 95% όρια εμπιστοσύνης 0,19-0,67.

Τέλος, για τον G153D, μελετήθηκαν οι ομάδες του ΠΓΑΓ και ελέγχου και δεν πιστοποιείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το ΠΓΑΓ ($p > 0.05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 6.7: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων για τον G153D (SNP1) στις ομάδες ΠΓΑΓ (status=1) και ελέγχου (status=0). Τεστ Hardy-Weinberg.

SNP1 allele frequencies (n=140)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=1	
Allele	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
G	211	0.75	141	0.73	70	0.81
A	69	0.25	53	0.27	16	0.19

SNP1 genotype frequencies (n=143)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=1	
Genotype	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
A/A	4	0.03	4	0.04	0	0
G/A	61	0.44	45	0.46	16	0.37
G/G	75	0.54	48	0.49	27	0.63
NA	3	---	3	---	0	---

SNP1 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=140)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	75	61	4	211	69	0.066
STATUS=0	48	45	4	141	53	0.13
STATUS=1	27	16	0	70	16	0.31

Πίνακας 6.8: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον G153D και οι υπολογιζόμενοι ORs

SNP1 association with response STATUS (n=140, crude analysis)							
Model	Genotype	STATUS=0	STATUS=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	G/G	48 (49.5%)	27 (62.8%)	1.00			
	G/A	45 (46.4%)	16 (37.2%)	0.63 (0.30-1.33)	0.11	174.2	183
	A/A	4 (4.1%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)			
Dominant	G/G	48 (49.5%)	27 (62.8%)	1.00			
	G/A-A/A	49 (50.5%)	16 (37.2%)	0.58 (0.28-1.21)	0.14	174.6	180.4
Recessive	G/G-G/A	93 (95.9%)	43 (100%)	1.00			
	A/A	4 (4.1%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	0.084	173.7	179.6
Overdominant	G/G-A/A	52 (53.6%)	27 (62.8%)	1.00			
	G/A	45 (46.4%)	16 (37.2%)	0.68 (0.33-1.43)	0.31	175.7	181.6
Log-additive	---	---	---	0.55 (0.28-1.09)	0.081	173.7	179.5

Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων για τον R141L του *LOXLI*

Η στατιστική ανάλυση του R141L έγινε κατά τον ίδιο τρόπο με την ανάλυση του G153D. Αρχικά, μελετήθηκαν οι ομάδες του Ψ/Α.Σ και ελέγχου και για τον πολυμορφισμό R141L δεν πιστοποιείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το Ψ/Α.Σ ($p > 0.05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 6.9: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων για τον R141L (SNP2) στις ομάδες Ψ/Α.Σ (status=2) και ελέγχου (status=0). Τεστ Hardy-Weinberg.

SNP2 allele frequencies (n=147)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=2	
Allele	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
G	222	0.76	137	0.74	85	0.79
T	72	0.24	49	0.26	23	0.21

SNP2 genotype frequencies (n=154)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=2	
Genotype	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
G/G	82	0.56	49	0.53	33	0.61
G/T	58	0.39	39	0.42	19	0.35
T/T	7	0.05	5	0.05	2	0.04
NA	7	---	7	---	0	---

SNP2 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=147)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	82	58	7	222	72	0.51
STATUS=0	49	39	5	137	49	0.59
STATUS=2	33	19	2	85	23	1

Πίνακας 6.10: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον R141L και οι υπολογιζόμενοι ORs.

SNP2 association with response STATUS (n=147, crude analysis)							
Model	Genotype	STATUS=0	STATUS=2	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	G/G	49 (52.7%)	33 (61.1%)	1.00			
	G/T	39 (41.9%)	19 (35.2%)	0.72 (0.36-1.46)	0.59	198.3	207.2
	T/T	5 (5.4%)	2 (3.7%)	0.59 (0.11-3.25)			
Dominant	G/G	49 (52.7%)	33 (61.1%)	1.00			
	G/T-T/T	44 (47.3%)	21 (38.9%)	0.71 (0.36-1.40)	0.32	196.3	202.3
Recessive	G/G-G/T	88 (94.6%)	52 (96.3%)	1.00			
	T/T	5 (5.4%)	2 (3.7%)	0.68 (0.13-3.62)	0.64	197.1	203.1
Overdominant	G/G-T/T	54 (58.1%)	35 (64.8%)	1.00			
	G/T	39 (41.9%)	19 (35.2%)	0.75 (0.38-1.50)	0.42	196.7	202.6
Log-additive	---	---	---	0.74 (0.41-1.33)	0.31	196.3	202.3

Στη συνέχεια, για τον R141L, μελετήθηκαν οι ομάδες του Ψ/Α.Γ και ελέγχου και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 6.11: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων για τον R141L (SNP2) στις ομάδες Ψ/Α.Γ (status=3) και ελέγχου (status=0). Τεστ Hardy-Weinberg.

SNP2 allele frequencies (n=163)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=3	
Allele	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
G	262	0.8	137	0.74	125	0.89
T	64	0.2	49	0.26	15	0.11

SNP2 genotype frequencies (n=171)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=3	
Genotype	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
G/G	105	0.64	49	0.53	56	0.8
G/T	52	0.32	39	0.42	13	0.19
T/T	6	0.04	5	0.05	1	0.01
NA	8	---	7	---	1	---

SNP2 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=163)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	105	52	6	262	64	1
STATUS=0	49	39	5	137	49	0.59
STATUS=3	56	13	1	125	15	0.57

Πίνακας 6.12: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον R141L και οι υπολογιζόμενοι ORs.

SNP2 association with response STATUS (n=163, crude analysis)							
Model	Genotype	STATUS=0	STATUS=3	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	G/G	49 (52.7%)	56 (80%)	1.00			
	G/T	39 (41.9%)	13 (18.6%)	0.29 (0.14-0.61)	0.001	215	224.3
	T/T	5 (5.4%)	1 (1.4%)	0.18 (0.02-1.55)			
Dominant	G/G	49 (52.7%)	56 (80%)	1.00			
	G/T-T/T	44 (47.3%)	14 (20%)	0.28 (0.14-0.57)	2e-04	213.2	219.4
Recessive	G/G-G/T	88 (94.6%)	69 (98.6%)	1.00			
	T/T	5 (5.4%)	1 (1.4%)	0.26 (0.03-2.23)	0.16	224.7	230.9
Overdominant	G/G-T/T	54 (58.1%)	57 (81.4%)	1.00			
	G/T	39 (41.9%)	13 (18.6%)	0.32 (0.15-0.66)	0.0012	216.3	222.5
Log-additive	---	---	---	0.32 (0.17-0.62)	2e-04	213.3	219.5

Πιστοποιείται για τον R141L στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το Ψ/Α.Γ. Ο γονότυπος G/G εμφανίζεται στο 80% των ασθενών με Ψ/Α.Γ σε σχέση με το 52,7% των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Διαλέγουμε το αθροιστικό μοντέλο κληρονομική με την τιμή AIC (213,3) και ο OR για το λιγότερο συχνό αλληλίο A είναι 0,32 με 95% όρια εμπιστοσύνης 0,17-0,62.

Τέλος, για τον R141L, μελετήθηκαν οι ομάδες του ΠΓΑΓ και ελέγχου και δεν πιστοποιείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το ΠΓΑΓ ($p>0.05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 6.13: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων για τον R141L (SNP2) στις ομάδες ΠΓΑΓ (status=1) και ελέγχου (status=0). Τεστ Hardy-Weinberg.

SNP2 allele frequencies (n=136)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=1	
Allele	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
G	199	0.73	137	0.74	62	0.72
T	73	0.27	49	0.26	24	0.28

SNP2 genotype frequencies (n=143)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=1	
Genotype	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
G/G	72	0.53	49	0.53	23	0.53
G/T	55	0.4	39	0.42	16	0.37
T/T	9	0.07	5	0.05	4	0.09
NA	7	---	7	---	0	---

SNP2 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=136)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	72	55	9	199	73	0.83
STATUS=0	49	39	5	137	49	0.59
STATUS=1	23	16	4	62	24	0.7

Πίνακας 6.14: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για τον R141L και οι υπολογιζόμενοι ORs.

SNP2 association with response STATUS (n=136, crude analysis)							
Model	Genotype	STATUS=0	STATUS=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	G/G	49 (52.7%)	23 (53.5%)	1.00			
	G/T	39 (41.9%)	16 (37.2%)	0.87 (0.41-1.88)	0.67	174.9	183.6
	T/T	5 (5.4%)	4 (9.3%)	1.70 (0.42-6.95)			
Dominant	G/G	49 (52.7%)	23 (53.5%)	1.00			
	G/T-T/T	44 (47.3%)	20 (46.5%)	0.97 (0.47-2.00)	0.93	173.7	179.5
Recessive	G/G-G/T	88 (94.6%)	39 (90.7%)	1.00			
	T/T	5 (5.4%)	4 (9.3%)	1.81 (0.46-7.09)	0.4	173	178.8
Overdominant	G/G-T/T	54 (58.1%)	27 (62.8%)	1.00			
	G/T	39 (41.9%)	16 (37.2%)	0.82 (0.39-1.72)	0.6	173.4	179.3
Log-additive	---	---	---	1.08 (0.61-1.94)	0.78	173.6	179.5

Έλεγχος απλότυπου των δύο πολυμορφισμών του *LOXLI*

Επιπλέον, υπολογίστηκαν οι συχνότητες των απλοτύπων των δύο πολυμορφισμών του *LOXLI* με το πρόγραμμα SNPstats καθώς και ο παράγων d' του linkage disequilibrium (πίνακας 6.15). Ο απλότυπος κινδύνου για το Ψ/Α.Σ και το Ψ/Α.Γ είναι ο απλότυπος που σχηματίζεται από τα δύο αλληλία κινδύνου (GG). Ανευρέθησαν, με τη δοκιμασία χ^2 , στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συχνότητες απλοτύπου ανάμεσα στις ομάδες του Ψ/Α.Σ και ελέγχου ($p=0,027$) και του Ψ/Α.Γ και ελέγχου ($p=0,001$). Στον πληθυσμό μας, η συχνότητα του υπολογισμένου απλότυπου κινδύνου (GG) για το Ψ/Α.Σ και το Ψ/Α.Γ βρέθηκε να είναι 76% στο Ψ/Α.Γ και 63% στο Ψ/Α.Σ σε σχέση με το 46.% στην ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 6.15: Υπολογισμός των συχνοτήτων των απλοτύπων για το *LOXLI* για τις ομάδες Ψ/Α.Σ, Ψ/Α.Γ, ΠΓΑΓ και ελέγχου.

SNP1 - SNP2	Ψ/Α.Σ	Ψ/Α.Γ	ΠΓΑΓ	ΟΜ. ΕΛ.
G G	63%	76%	53%	46%
A G	16%	13%	19%	27%
G T	21%	11%	28%	26%
A T	0%	0%	0%	1%
D'	0,9979	0,9945	0,9984	0,8987

Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για το *LOXLI*

Για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα με τη διεθνή βιβλιογραφία παρακάτω παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα με τους σχετικούς λόγους συμπληρωματικών πιθανοτήτων (odds ratios, ORs) και p values και στους δύο πολυμορφισμούς για το υπολλειπόμενο μοντέλο χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SPSS (πίνακας 6.16). Στο πρόγραμμα SNPstats οι ORs υπολογίζονται σε σχέση με το αλληλίο σε μεγαλύτερο ποσοστό (OR για το A ή το T), ενώ στο πρόγραμμα SPSS οι υπολογισμοί γίνονται σε σχέση με το αλληλίο με το μικρότερο ποσοστό (OR για το G αλληλίο που είναι αλληλίο κινδύνου).

Πίνακας 6.16: Κατανομή των G153D και R141L του *LOXLI* στους ασθενείς με Ψ/Α.Σ, Ψ/Α.Γ, ΠΓΑΓ και στα άτομα της ομάδας ελέγχου.

		Αλληλίο		Γονότυπος					
G153D	n	A	G	P value	AA	GA	GG	P value†	OR† (95%CI)
Ψ/Α.Γ	71	19 13%	123 87%	0.002*	0 0%	19 27%	52 73%	0.002*	2.794 (1.445-5.401)
Ψ/Α.Σ	53	17 16%	89 84%	0.032*	0 0%	17 32%	36 68%	0.039*	2.162 (1.073-4.357)
ΠΓΑΓ	43	16 19%	70 81%	>0.05	0 0%	16 37%	27 63%	>0.05	
ΟΜ. ΕΛ.	97	53 27%	141 73%		4 4%	45 46%	48 49%		
R141L	n	T	G	P value	TT	GT	GG	P value†	OR† (95%CI)
Ψ/Α.Γ	70	15 11%	125 89%	<0.001*	1 1%	13 19%	56 80%	<0.001*	3.592 (1.760-7.329)
Ψ/Α.Σ	54	23 21%	85 79%	0.399	2 4%	19 35%	33 61%	0.39	1.411 (0.713-2.791)
ΠΓΑΓ	43	24 28%	62 72%	>0.05	4 9%	16 37%	23 53%	>0.05	
ΟΜ. ΕΛ.	93	49 26%	137 74%		5 5%	39 42%	49 53%		

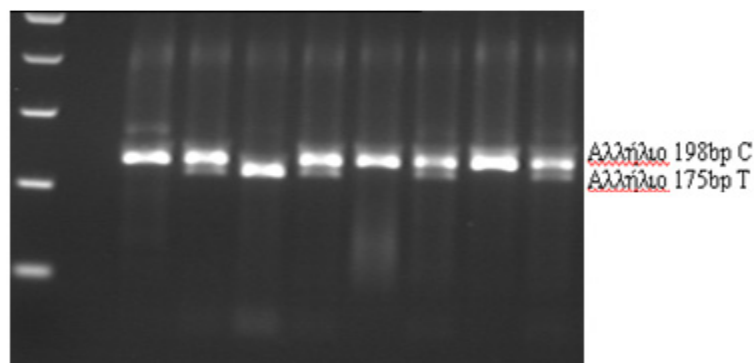
Τα P values και ORs υπολογίστηκαν σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Οι αστερίσκοι (*) υποδεικνύουν την στατιστική σημαντικότητα ενώ οι σταυροί (†) τα p values και ORs από την σύγκριση του γονότυπου κινδύνου GG έναντι όλων των άλλων μαζί γονοτύπων.

Επιπλέον, συγκρίναμε την κατανομή των δύο πολυμορφισμών του *LOXLI* μεταξύ Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ και βρήκαμε διαφορά στατιστικά σημαντική για τον R141L. Η συχνότητα του G αλληλίου του R141L ήταν σημαντικά υψηλότερη στο Ψ/Α.Γ (89%, $p=0.032$) σε σχέση με το Ψ/Α.Σ (79%). Ο γονότυπος GG του R141L επίσης βρέθηκε να συνδέεται σημαντικά με το Ψ/Α.Γ (80%, $p=0.027$, $OR=2.545$, 95% $CI=1.142-5.673$) συγκριτικά με το Ψ/Α.Σ (61%).

Τέλος, αναλύσαμε τους δύο πολυμορφισμούς όσον αφορά την δυνατότητα τους να προβλέπουν την πάθηση ως γενετικό test για το Ψ/Α.Γ στο γενικό πληθυσμό. Ο R141L επιδεικνύει 98.6% κλινική ευαισθησία (69 απο τις 70 περιπτώσεις με Ψ/Α.Γ έχουν το G αλληλίο), αλλά μόνο 5.4% κλινική ειδικότητα (5 απο τα 93 άτομα της ομάδας ελέγχου δεν έχουν το G αλληλίο) ως διαγνωστικό test για το Ψ/Α.Γ. Ο G153D επιδεικνύει 100% ευαισθησία (71 από τις 71 περιπτώσεις με Ψ/Α.Γ έχουν το G αλληλίο), αλλά μόνο 4.1% ειδικότητα (4 από τα 97 άτομα της ομάδας ελέγχου δεν έχουν το G αλληλίο).

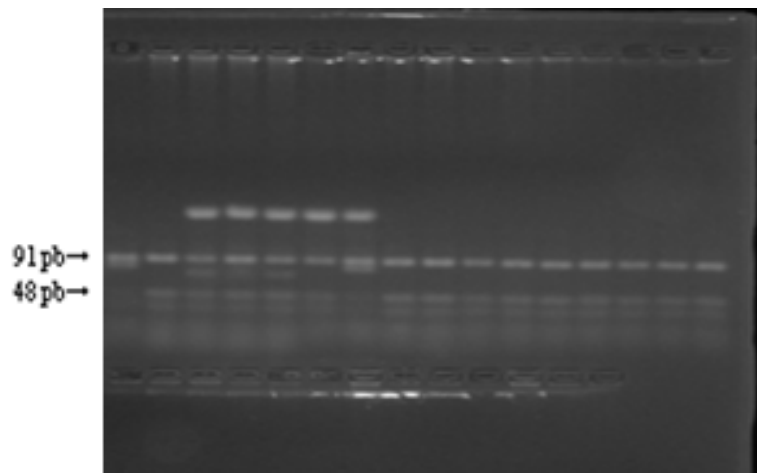
Αποτελέσματα της γονοτύπωσης των *MTHFR* C677T και *APOE*

Τα προϊόντα της PCR του *MTHFR* έπειτα από κοπή με το περιοριστικό ένζυμο *HinfI* ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα 3% NuSieve – 1% αγαρόζης και επισκοπούνται σε υπεριώδη ακτινοβολία μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Καταγράφηκαν οι τρεις πιθανοί γονότυποι: ο ετεροζυγώτης C/T, ο φυσιολογικός ομοζυγώτης C/C και ο παθολογικός ομοζυγώτης T/T που προκαλεί μέτρια υπερομοκυστεϊναιμία, η οποία με βάση την βιβλιογραφία συνδέεται με το Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ. Στην εικόνα 6.12 παρουσιάζεται ενδεικτικά μια φωτογραφία ηλεκτροφόρησης. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται ως εξής: 1) για τον φυσιολογικό ομοζυγώτη C/C διακρίνεται μία ζώνη 198 βάσεων, 2) για τον ετεροζυγώτη C/T διακρίνονται 2 ζώνες, 198 και 175 βάσεων και 3) για τον παθολογικό ομοζυγώτη T/T διακρίνεται μία ζώνη 175 βάσεων^{133, 192}.



Εικόνα 6.12: Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR του *MTHFR*. 1) Στην πρώτη στήλη: δείκτης μοριακών βαρών (marker), 2) Στην δεύτερη στήλη: τυφλό δείγμα (blank) και 3) Στην τρίτη, τέταρτη και πέμπτη στήλη: δείγματα ομοζυγώτη φυσιολογικού, ετεροζυγώτη και ομοζυγώτη παθολογικού, αντίστοιχα.

Τα προϊόντα της PCR του *APOE* έπειτα από κοπή με το περιοριστικό ένζυμο HfaI ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα 3% NuSieve – 1% αγαρόζης και επισκοπούνται σε υπεριώδη ακτινοβολία μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Για τον πολυμορφισμό του *APOE*, υπάρχουν έξι πιθανοί διαφορετικοί γονότυποι (E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, E4/E4) που προκύπτουν από τα αλληλία E2, E3, και E4. Στη παρούσα μελέτη, εστίασαμε στο αλληλίο E2 του *APOE* που έχει συνδεθεί σε μία μελέτη με το Ψ/Α.Σ και καταγράψαμε τους γονότυπους που περιέχουν τουλάχιστον ένα αλληλίο E2: C/T (E2/E2, E2/E3, E2/E4: T στη θέση 158) και τους γονότυπους χωρίς το E2 αλληλίο: C/C (E3/E3, E4/E4, E3/E4: C στη θέση 158). Στην εικόνα 6.13 παρουσιάζεται ενδεικτικά μια φωτογραφία ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR, ο συνδυασμός των οποίων καθορίζει το γονότυπο^{190, 191}. Από το αρχικό προϊόν των 227 βάσεων παράγονται τμήματα 72 και 48 βάσεων στο αλληλίο E4, τμήματα 91 και 83 βάσεων στο αλληλίο E2 και τμήματα 91 και 48 βάσεων στο αλληλίο E3.



Εικόνα 6.13: Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR του *APOE* ο συνδυασμός των οποίων καθορίζει τον γονότυπο. 1) Στην πρώτη στήλη: E2/E2 (C/T), 2) Στην δεύτερη στήλη: E3/E3 (C/C) και 3) Στην τρίτη, τέταρτη και πέμπτη στήλη: E3/E4 (C/C).

Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων για τον *MTHFR* C677T

Αρχικά, για τον πολυμορφισμό *MTHFR* C677T, μελετήθηκαν οι ομάδες του Ψ/Α.Σ και ελέγχου και δεν πιστοποιείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το Ψ/Α.Σ ($p > 0.05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 6.19: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων για τον *MTHFR* C677T (SNP1) στις ομάδες Ψ/Α.Σ (status=2) και ελέγχου (status=0). Τεστ Hardy-Weinberg.

SNP1 allele frequencies (n=176)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=2	
Allele	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
C	215	0.61	130	0.61	85	0.62
T	137	0.39	84	0.39	53	0.38

SNP1 genotype frequencies (n=176)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=2	
Genotype	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
C/C	69	0.39	44	0.41	25	0.36
C/T	77	0.44	42	0.39	35	0.51
T/T	30	0.17	21	0.2	9	0.13

SNP1 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=176)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	69	77	30	215	137	0.34
STATUS=0	44	42	21	130	84	0.07
STATUS=2	25	35	9	85	53	0.62

Πίνακας 6.20: Μοντέλα κληρονομικότητας για τον *MTHFR* C677T και υπολογιζόμενοι ORs.

SNP1 association with response STATUS (n=176, crude analysis)							
Model	Genotype	STATUS=0	STATUS=2	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	C/C	44 (41.1%)	25 (36.2%)	1.00			
	C/T	42 (39.2%)	35 (50.7%)	1.47 (0.75-2.85)	0.27	239.12	248.6
	T/T	21 (19.6%)	9 (13%)	0.75 (0.30-1.90)			
Dominant	C/C	44 (41.1%)	25 (36.2%)	1.00			
	C/T-T/T	63 (58.9%)	44 (63.8%)	1.23 (0.66-2.29)	0.52	239.32	245.6
Recessive	C/C-C/T	86 (80.4%)	60 (87%)	1.00			
	T/T	21 (19.6%)	9 (13%)	0.61 (0.26-1.43)	0.25	238.42	244.7
Overdominant	C/C-T/T	65 (60.8%)	34 (49.3%)	1.00			
	C/T	42 (39.2%)	35 (50.7%)	1.59 (0.86-2.93)	0.13	237.52	243.8
Log-additive	---	---	---	0.97 (0.63-1.48)	0.88	239.7	246

Ο παθολογικός γονότυπος T/T εμφανίζεται στο 13% των ασθενών με Ψ/Α.Σ σε σχέση με το 19,6% των ατόμων της ομάδας ελέγχου.

Στη συνέχεια, για τον *MTHFR* C677T, μελετήθηκαν οι ομάδες του Ψ/Α.Γ και ελέγχου και επίσης δεν πιστοποιείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το Ψ/Α.Γ ($p>0.05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 6.21: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων για τον *MTHFR* C677T (SNP1) στις ομάδες Ψ/Α.Γ (status=3) και ελέγχου (status=0). Τεστ Hardy-Weinberg.

SNP1 allele frequencies (n=189)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=3	
Allele	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
C	227	0.6	130	0.61	97	0.59
T	151	0.4	84	0.39	67	0.41

SNP1 genotype frequencies (n=189)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=3	
Genotype	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
C/C	71	0.38	44	0.41	27	0.33
C/T	85	0.45	42	0.39	43	0.52
T/T	33	0.17	21	0.2	12	0.15

SNP1 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=189)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	71	85	33	227	151	0.45
STATUS=0	44	42	21	130	84	0.07
STATUS=3	27	43	12	97	67	0.5

Πίνακας 6.22: Μοντέλα κληρονομικότητας για τον *MTHFR* C677T και υπολογιζόμενοι ORs.

SNP1 association with response STATUS (n=189, crude analysis)							
Model	Genotype	STATUS=0	STATUS=3	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	C/C	44 (41.1%)	27 (32.9%)	1.00			
	C/T	42 (39.2%)	43 (52.4%)	1.67 (0.88-3.17)	0.19	261.4	271.1
	T/T	21 (19.6%)	12 (14.6%)	0.93 (0.40-2.19)			
Dominant	C/C	44 (41.1%)	27 (32.9%)	1.00			
	C/T-T/T	63 (58.9%)	55 (67.1%)	1.42 (0.78-2.59)	0.25	261.4	267.8
Recessive	C/C-C/T	86 (80.4%)	70 (85.4%)	1.00			
	T/T	21 (19.6%)	12 (14.6%)	0.70 (0.32-1.53)	0.37	261.9	268.4
Overdominant	C/C-T/T	65 (60.8%)	39 (47.6%)	1.00			
	C/T	42 (39.2%)	43 (52.4%)	1.71 (0.95-3.05)	0.071	259.4	265.9
Log-additive	---	---	---	1.06 (0.71-1.59)	0.76	262.6	269.1

Ο γονότυπος T/T εμφανίζεται στο 14,6% των ασθενών με Ψ/Α.Γ σε σχέση με το 19,6% των ατόμων της ομάδας ελέγχου.

Τέλος, για τον *MTHFR* C677T, μελετήθηκαν οι ομάδες του ΠΓΑΓ και ελέγχου και επίσης δεν πιστοποιείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το ΠΓΑΓ ($p>0.05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 6.23: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων για τον *MTHFR* C677T (SNP1) στις ομάδες ΠΓΑΓ (status=1) και ελέγχου (status=0). Τεστ Hardy-Weinberg.

SNP1 allele frequencies (n=153)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=1	
Allele	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
C	185	0.6	130	0.61	55	0.6
T	121	0.4	84	0.39	37	0.4

SNP1 genotype frequencies (n=160)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=1	
Genotype	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
C/C	59	0.39	44	0.41	15	0.33
C/T	67	0.44	42	0.39	25	0.54
T/T	27	0.18	21	0.2	6	0.13
NA	7	---	0	---	7	---

SNP1 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=153)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	59	67	27	185	121	0.31
STATUS=0	44	42	21	130	84	0.07
STATUS=1	15	25	6	55	37	0.54

Πίνακας 6.24: Μοντέλα κληρονομικότητας για τον *MTHFR* C677T οι υπολογιζόμενοι ORs.

SNP1 association with response STATUS (n=153, crude analysis)							
Model	Genotype	STATUS=0	STATUS=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	C/C	44 (41.1%)	15 (32.6%)	1.00			
	C/T	42 (39.2%)	25 (54.4%)	1.75 (0.81-3.76)	0.22	190	199.1
	T/T	21 (19.6%)	6 (13%)	0.84 (0.28-2.47)			
Dominant	C/C	44 (41.1%)	15 (32.6%)	1.00			
	C/T-T/T	63 (58.9%)	31 (67.4%)	1.44 (0.70-2.99)	0.32	190.1	196.2
Recessive	C/C-C/T	86 (80.4%)	40 (87%)	1.00			
	T/T	21 (19.6%)	6 (13%)	0.61 (0.23-1.64)	0.32	190.1	196.1
Overdominant	C/C-T/T	65 (60.8%)	21 (45.6%)	1.00			
	C/T	42 (39.2%)	25 (54.4%)	1.84 (0.92-3.70)	0.085	188.1	194.2
Log-additive	---	---	---	1.04 (0.64-1.68)	0.88	191.1	197.1

Ο γονότυπος T/T εμφανίζεται στο 13% των ασθενών με ΠΓΑΓ σε σχέση με το 19,6% των ατόμων της ομάδας ελέγχου.

Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων για το *APOE*

Η στατιστική ανάλυση του *APOE* έγινε κατά τον ίδιο τρόπο με την ανάλυση του *MTHFR C677T*. Αρχικά, για το *APOE*, μελετήθηκαν οι ομάδες του Ψ/Α.Σ και ελέγχου και δεν πιστοποιείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το Ψ/Α.Σ ($p > 0.05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 6.25: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων για το *APOE* (SNP2) στις ομάδες Ψ/Α.Σ (status=2) και ελέγχου (status=0). Τεστ Hardy-Weinberg.

SNP2 allele frequencies (n=146)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=2	
Allele	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
C	280	0.96	150	0.97	130	0.94
T	12	0.04	4	0.03	8	0.06

SNP2 genotype frequencies (n=176)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=2	
Genotype	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
C/C	134	0.92	73	0.95	61	0.88
C/T	12	0.08	4	0.05	8	0.12
NA	30	---	30	---	0	---

SNP2 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=146)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	134	12	0	280	12	1
STATUS=0	73	4	0	150	4	1
STATUS=2	61	8	0	130	8	1

Πίνακας 6.26: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για το *APOE* και οι υπολογιζόμενοι ORs.

SNP2 association with response STATUS (n=146, crude analysis)							
Model	Genotype	STATUS=0	STATUS=2	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
---	C/C	73 (94.8%)	61 (88.4%)	1.00	0.16	204	209.9
---	C/T	4 (5.2%)	8 (11.6%)	2.39 (0.69-8.33)			

Όπως συνάγεται από τους πίνακες, ο γονότυπος C/T, που περιέχει το αλληλίο E2, εμφανίζεται στο 11,6% των ασθενών με Ψ/Α.Σ σε σχέση με το 5,2% των ατόμων της ομάδας ελέγχου, η συσχέτιση αυτή όμως δε φθάνει σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας.

Στη συνέχεια, για το *APOE*, μελετήθηκαν οι ομάδες του Ψ/Α.Γ και ελέγχου και επίσης δεν πιστοποιείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το Ψ/Α.Γ ($p > 0.05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 6.27: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων για το *APOE* (SNP2) στις ομάδες Ψ/Α.Γ (status=3) και ελέγχου (status=0). Τεστ Hardy-Weinberg

SNP2 allele frequencies (n=154)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=3	
Allele	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
C	296	0.96	150	0.97	146	0.95
T	12	0.04	4	0.03	8	0.05

SNP2 genotype frequencies (n=189)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=3	
Genotype	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
C/C	142	0.92	73	0.95	69	0.9
C/T	12	0.08	4	0.05	8	0.1
NA	35	---	30	---	5	---

SNP2 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=154)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	142	12	0	296	12	1
STATUS=0	73	4	0	150	4	1
STATUS=3	69	8	0	146	8	1

Πίνακας 6.28: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για το *APOE* και οι υπολογιζόμενοι ORs.

SNP2 association with response STATUS (n=154, crude analysis)						
Model	Genotype	STATUS=0	STATUS=3	OR (95% CI)	P-value	AIC BIC
---	C/C	73 (94.8%)	69 (89.6%)	1.00		
	C/T	4 (5.2%)	8 (10.4%)	2.12 (0.61-7.35)	0.22	216 222.1

Όπως συνάγεται από τους πίνακες, ο γονότυπος C/T, που περιέχει το αλληλίο E2, εμφανίζεται στο 10,4% των ασθενών με Ψ/Α.Γ σε σχέση με το 5,2% των ατόμων της ομάδας ελέγχου, η συσχέτιση αυτή όμως δε φθάνει σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας.

Τέλος, για το *APOE*, μελετήθηκαν οι ομάδες του ΠΓΑΓ και ελέγχου και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 6.29: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων για το *APOE* (SNP2) στις ομάδες ΠΓΑΓ (status=1) και ελέγχου (status=0). Τεστ Hardy-Weinberg.

SNP2 allele frequencies (n=129)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=1	
Allele	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
C	244	0.95	150	0.97	94	0.9
T	14	0.05	4	0.03	10	0.1

SNP2 genotype frequencies (n=160)						
	All subjects		STATUS=0		STATUS=1	
Genotype	Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Proportion
C/C	115	0.89	73	0.95	42	0.81
C/T	14	0.11	4	0.05	10	0.19
NA	31	---	30	---	1	---

SNP2 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=129)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	115	14	0	244	14	1
STATUS=0	73	4	0	150	4	1
STATUS=1	42	10	0	94	10	1

Πίνακας 6.30: Τα μοντέλα κληρονομικότητας για το *APOE* και οι υπολογιζόμενοι ORs.

SNP2 association with response STATUS (n=129, crude analysis)							
Model	Genotype	STATUS=0	STATUS=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
---	C/C	73 (94.8%)	42 (80.8%)	1.00			
	C/T	4 (5.2%)	10 (19.2%)	4.35 (1.28-14.72)	0.012	171.7	177.4

Όπως φαίνεται από τα ανωτέρω, για τον πολυμορφισμό του *APOE* πιστοποιείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το ΠΓΑΓ. Ο γονότυπος C/T, που περιέχει το αλληλίο E2, εμφανίζεται στο 19,2% των ασθενών με ΠΓΑΓ σε σχέση με το 5,2% των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Ο OR που υπολογίζεται για το αλληλίο E2 είναι 4,35 με 95% όρια εμπιστοσύνης 1,28-14,72.

Λογιστική παλινδρόμηση

Εφαρμόστηκε το στατιστικό εργαλείο λογιστικής παλινδρόμησης (Logistic Regression, SPSS πρόγραμμα) για το Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ με σκοπό να κατασκευάσουμε μοντέλο πρόβλεψης του νοσήματος ως προς όλους μαζί τους ακόλουθους παράγοντες κινδύνου: φύλο, σακχαρώδη διαβήτη, αρτηριακή υπέρταση, καρδιαγγειακή νόσο, αγγειακή νόσο και όλα τα γονίδια τα οποία μελετήσαμε (*APOE*, *MTHFR* και αλληλία GG vs υπόλοιπα για τους δύο *LOXL1* πολυμορφισμούς). Τα αποτελέσματα της λογιστικής παλινδρόμησης παρουσιάζονται στους πίνακες 6.31 και 6.32.

Πίνακας 6.31: Logistic Regression για το Ψ/Α.Σ.

Variables in the Equation								95% C.I. for EXP(B)	
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Lower	Upper
Step 1 ^a	CLOXL1_G153L(1)	1,131	,331	11,688	1	,001	3,098	1,620	5,923
	Constant	,057	,239	,057	1	,811	1,059		
Step 2 ^b	CLOXL1_G153L(1)	1,678	,403	17,321	1	,000	5,353	2,429	11,795
	CLOXL1R141L(1)	1,337	,412	10,514	1	,001	3,806	1,697	8,539
	Constant	-1,083	,436	6,166	1	,013	,338		
Step 3 ^c	CLOXL1_G153L(1)	1,812	,417	18,897	1	,000	6,122	2,705	13,859
	CLOXL1R141L(1)	1,360	,419	10,547	1	,001	3,896	1,715	8,853
	arterialhypertension	,828	,355	5,445	1	,020	2,289	1,142	4,591
	Constant	-1,588	,500	10,105	1	,001	,204		

- a. Variable(s) entered on step 1: CLOXL1_G153L.
 b. Variable(s) entered on step 2: CLOXL1R141L.
 c. Variable(s) entered on step 3: arterialhypertension.

Πίνακας 6.32: Logistic Regression για το Ψ/Α.Γ.

Variables in the Equation								95% C.I. for EXP(B)	
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Lower	Upper
Step 1 ^a	CLOXL1R141L(1)	1,003	,357	7,894	1	,005	2,728	1,355	5,493
	Constant	-1,211	,304	15,822	1	,000	,298		
Step 2 ^b	CLOXL1_G153L(1)	1,219	,368	10,980	1	,001	3,384	1,645	6,958
	CLOXL1R141L(1)	1,442	,392	13,562	1	,000	4,231	1,964	9,117
	Constant	-2,268	,455	24,823	1	,000	,103		

- a. Variable(s) entered on step 1: CLOXL1R141L.
 b. Variable(s) entered on step 2: CLOXL1_G153L.

Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα, φαίνεται ότι ο γονότυπος GG και των δύο SNPs παραμένει σημαντικός παράγων κινδύνου για την ανάπτυξη τόσο του Ψ/Α.Σ όσο και του Ψ/Α.Γ όταν εξετάζεται μαζί με όλους μαζί τους υπόλοιπους παράγοντες κινδύνου. Ειδικότερα, ο G153D, ο R141L και η αρτηριακή υπέρταση συνδέονται με τον κίνδυνο για Ψ/Α.Σ. (OR=6.122, 95% CI=2.705–13.859, $p<0.001$, OR=3.896, 95% CI=1.715–8.853, $p=0.001$ και OR=2.289, 95% CI=1.142–4.591, $p=0.02$, αντίστοιχα). Επίσης, ο G153D και ο R141L συνδέονται με τον κίνδυνο για PEXG (OR=3.384, 95% CI=1.645–6.958, $p=0.001$ and OR=4.231, 95% CI=1.964–9.117, $p<0.001$, αντίστοιχα).

Ανακεφαλαιώνοντας, παρουσιάζουμε τις στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ γονοτύπων και φαινοτύπων που προέκυψαν από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων γονοτύπωσης των τεσσάρων πολυμορφισμών καθώς και το επίπεδο ισχύος της κάθε στατιστικής ανάλυσης.

1. Ο γονότυπος GG του G153D *LOXLI* έναντι του GA+AA (στο υπολλειπόμενο μοντέλο) συσχετίστηκε με το Ψ/Α.Σ (68%, $p=0.039$, OR=2.162, 95% CI=1.073–4.357, $G_{power}=0.95$) και το Ψ/Α.Γ (73%, $p=0.002$, OR=2.794, 95% CI=1.445–5.401, $G_{power}=0.97$) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (49%).

2. Ο γονότυπος GG του R141L *LOXLI* έναντι του GT+TT συσχετίστηκε επίσης με το Ψ/Α.Γ (80%, $p<0.001$, OR=3.592, 95% CI=1.760–7.329, $G_{power}=0.96$) αλλά όχι με το Ψ/Α.Σ (61%, $p=0.39$, $G_{power}=0.95$) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (53%).

3. Ο γονότυπος GG του R141L βρέθηκε να συνδέεται σημαντικά με το Ψ/Α.Γ (80%, $p=0.027$, OR=2.545, 95% CI=1.142–5.673, $G_{power}=0.91$) συγκριτικά με το Ψ/Α.Σ (61%).

4. Η υψηλότερη συχνότητα του E2 αλληλίου του *APOE* στους ασθενείς με ΠΓΑΓ (19%) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (5%, $p=0.012$) συνδέθηκε με μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης ΠΓΑΓ (OR=4.35, 95% CI 1.28–14.72, $G_{power}=0.92$).

Αξίζει τέλος να σημειωθεί ότι και οι δύο πολυμορφισμοί του *LOXLI* δεν συσχετίστηκαν με το ΠΓΑΓ ($p>0.05$, $G_{power}>0.93$).

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το Ψ/Α.Σ αποτελεί μια πάθηση σύνθετη, πολυπαραγοντική, με όψιμη έναρξη εμφάνιση και με συχνότητα που αυξάνεται με την ηλικία. Το παθογνωμικό εύρημα είναι μία διαταραχή της εξωκυττάριας ουσίας, δηλαδή μια υπερβολική παραγωγή ή/και μειωμένη αποδόμηση ενός ανώμαλου ινώδους εξωκυτταρικού υλικού, στους οφθαλμικούς ιστούς, στο δέρμα και στο συνδετικό ιστό διαφόρων σπλαχνικών οργάνων^{1, 2}. Η ακριβής αιτιοπαθογένειά του παραμένει μέχρι και σήμερα άγνωστη παρά την εκτεταμένη έρευνα.

Το Ψ/Α.Σ παρουσιάζει διαφορετική γεωγραφική κατανομή, εντοπίζεται όμως σχεδόν σε όλες τις γεωγραφικές περιοχές του κόσμου και με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης απ' όσο είχε αρχικώς εκτιμηθεί^{5, 6, 12}. Αυτό σε συνδυασμό με την έλλειψη ενδιαφέροντος και εξειδικευμένης γνώσης οδηγεί συχνά στην παράβλεψη ή λανθασμένη αναγνώρισή του. Η γεωγραφική κατανομή του συνδρόμου υποδεικνύει την γενετική ποικιλομορφία του. Στην Ελλάδα και ειδικότερα στην Ήπειρο έχει βρεθεί υψηλή συχνότητα Ψ/Α.Σ⁸ παρόμοια σχεδόν με τις αντίστοιχες συχνότητες στην Σκανδιναβία.

Στον οφθαλμό, το Ψ/Α.Σ μεταπίπτει σε Ψ/Α.Γ σε ποσοστό 46,2%³⁹ μέσα σε 17-20 έτη το οποίο κατέχει το 25% και πλέον του συνόλου των χρονίων γλαυκωμάτων ανοικτής γωνίας παγκοσμίως^{3, 4, 18}. Πρέπει να τονιστεί ότι το Ψ/Α.Γ αποτελεί συχνή απειλή για την όραση, καθώς η πρόγνωση είναι επιβαρημένη, η οπτική νευροπάθεια και η βλάβη των οπτικών πεδίων είναι πολύ σοβαρές κατά τη διάγνωση, με ταχεία εξέλιξη ενώ και η ανάγκη για χειρουργική επέμβαση είναι συχνότερη σε σχέση με το ΠΓΑΓ. Επίσης, το Ψ/Α.Σ αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα επιπλοκών κατά την διάρκεια της εγχείρησης του καταρράκτη, ενώ υπάρχουν και πολλά στοιχεία που υποστηρίζουν την αιτιολογική σύνδεσή του με τον καταρράκτη, αν και η φύση της σύνδεσης δεν είναι ακόμη καλά χαρακτηρισμένη^{16, 21}. Επιπλέον, το Ψ/Α.Σ συνδέεται αιτιολογικά με συστηματικές παθήσεις, κυρίως αγγειοπάθειες και χρόνιες εγκεφαλικές παθήσεις, οι οποίες είναι στο επίκεντρο ερευνών που στοχεύουν στον προσδιορισμό των επιπτώσεων της συστηματικής διάστασης της πάθησης στην συνολική υγεία αυτής της ομάδας ασθενών⁴. Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι

η φαινοτυπική ετερογένεια του συνδρόμου αντικατοπτρίζει την γενετική του ποικιλομορφία.

Υπάρχουν πολλές αποδείξεις που υποστηρίζουν ότι το Ψ/Α.Σ έχει γενετική βάση. Φαίνεται μάλιστα να παρουσιάζει ισχυρό οικογενή χαρακτήρα, χωρίς ωστόσο να είναι εμφανής ένας απλός τρόπος κληρονομικότητας, προτείνοντας ένα σύνθετο μοντέλο κληρονομικότητας στο οποίο συμβάλλουν πολλαπλά γονίδια και/ή περιβαλλοντικοί παράγοντες^{13, 73, 74}.

Το Ψ/Α.Γ αναπόφευκτα επιφέρει μεγάλη επιβάρυνση για τον ασθενή, τον κοινωνικό του περίγυρο και τα συστήματα κοινωνικής ασφάλισης. Σε αυτά τα πλαίσια γίνεται κατανοητό ότι η ανάγκη εφαρμογής προληπτικών μέτρων και η αναζήτηση νέων θεραπειών είναι επιτακτική. Η αναγνώριση βιοδεικτών και αναμεσά τους γενετικών παραγόντων που προδιαθέτουν για τη νόσο μπορεί να συμβάλλει τα μέγιστα προς την κατεύθυνση αυτή, καθότι θα καταστήσει δυνατό τον καθορισμό των ομάδων αυξημένου κινδύνου, οι οποίες και χρήζουν τακτικότερης παρακολούθησης με στόχο την πρόωμη διάγνωση της νόσου. Άλλωστε, οι γενετικοί πολυμορφισμοί μπορεί να παίξουν σημαντικό ρόλο και αναφορικά με την επιλογή θεραπείας, στα πλαίσια φαρμακογενωμικών προσεγγίσεων.

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στην ανακάλυψη των γενετικών παραγόντων που συσχετίζονται με το Ψ/Α.Σ. Για τον προσδιορισμό της συμβολής γνωστών και/ή ύποπτων γενετικών παραγόντων κινδύνου για το Ψ/Α.Σ και το Ψ/Α.Γ διεξάγονται έρευνες σε διάφορους εθνικούς πληθυσμούς με αποτελέσματα συχνά αντικρουόμενα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιολόγηση, σε ένα σημαντικό δείγμα καλά ελεγμένων ασθενών και υγιών μαρτύρων με καταγωγή από την Ήπειρο, της συμβολής δύο πολυμορφισμών στο γονίδιο *LOXLI* που στην βιβλιογραφία συσχετίζονται ισχυρά με το Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ. Επίσης, εκτιμήσαμε τους πολυμορφισμούς *MTHFR 677C>T* και *APOE* οι οποίοι είναι ύποπτοι για προδιάθεση για το Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ. Λαμβάνοντας υπ' όψιν την όψιμη έναρξη εμφάνιση της πάθησης, η μελέτη μας συμπεριέλαβε στην ομάδα ελέγχου άτομα ηλικίας 60 ετών και άνω.

Το 2007, δημοσιεύθηκε στο περιοδικό *Science* μία μελέτη που αποτέλεσε σημαντικό βήμα για την καλύτερη κατανόηση του Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ⁸⁰. Σε ασθενείς

από την Ισλανδία και την Σουηδία με σάρωση γονιδιώματος, ανακαλύφθηκε ιδιαίτερα ισχυρή σύνδεση μεταξύ των δύο αυτών καταστάσεων και τριών σημειακών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNP_s) στο γονίδιο *LOXLI* που κωδικοποιεί την οξειδάση της λυσίνης like1. Τα τρία αλληλία κινδύνου είναι: το αλληλίο T του πολυμορφισμού rs2165241, αγνώστου λειτουργίας, στο ιντρόνιο 1, το αλληλίο G του πολυμορφισμού G153D (rs3825942), που αντιστοιχεί σε μία αντικατάσταση γλυκίνης σε ασπαρτικό στο κωδικόνιο 153, στο εξόνιο 1 και το αλληλίο G του πολυμορφισμού R141L (rs1048661), που αντιστοιχεί σε μία αντικατάσταση αργινίνης σε λευκίνη στο κωδικόνιο 141, επίσης στο εξόνιο 1. Το Ψ/A.Σ-Ψ/A.Γ φάνηκε να συσχετίζεται ισχυρότερα κυρίως με τους δύο πολυμορφισμούς στο εξόνιο του γονιδίου. Το ένζυμο της οξειδάσης της λυσίνης like1 είναι απαραίτητο για την ελαστογένεση, αποτελεί δομικό συστατικό των εναποθέσεων Ψ/A υλικού και συμβάλλει στη συγκέντρωσή τους στους οφθαλμικούς και εξωφθάλμιους ιστούς⁸⁸. Η σύνδεση του γονιδίου με την πάθηση επαληθεύτηκε μετέπειτα σε όλους τους πληθυσμούς, επιβεβαιώνοντας το *LOXLI* ως κύριο γενετικό παράγοντα κινδύνου για το Ψ/A.Σ-Ψ/A.Γ παγκοσμίως^{81, 97-115, 161, 165-167}. Παρ'όλο αυτά υπάρχουν ανοικτά ζητήματα όσο αναφορά την σύνδεση αυτή. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίον το γονίδιο οδηγεί στην ανάπτυξη Ψ/A.Σ-Ψ/A.Γ δεν έχει ακόμα καθοριστεί. Επίσης, το αλληλίο κινδύνου των πολυμορφισμών και οι συχνότητες του διαφέρουν μεταξύ των εθνικών πληθυσμών και επιπλέον παρουσιάζει υψηλές συχνότητες και στους υγιείς μάρτυρες.

Παρά την περίπλοκη φύση της σύνδεσης του *LOXLI* με το Ψ/A.Σ-Ψ/A.Γ, ήδη διάφορες εταιρίες «ταχυδρομικής» γενετικής συμπεριέλαβαν τους πολυμορφισμούς του σε γενετικά tests για το Ψ/A.Γ με δείγμα σίελου. Η εταιρία deCODEme έχει αναπτύξει γενετικά tests για τους πολυμορφισμούς rs2165241 και rs1078967, η 23andMe για τον rs2165241 ενώ οι εταιρίες Navigenics και Pathway δεν αναφέρουν επακριβώς τους πολυμορφισμούς του *LOXLI* που συμπεριέλαβαν στα tests για το Ψ/A.Γ. Να σημειώσουμε ότι τα γενετικά tests των εταιριών θεωρούνται εδραιωμένα εάν σε ανάλυση πάνω από 750 περιπτώσεων το p value βρεθεί μικρότερο από 0,01.

Από τα αποτελέσματα της μελέτη μας, επιβεβαιώνουμε την σύνδεση του γονιδίου *LOXLI* με το Ψ/A.Σ-Ψ/A.Γ σε ελληνικό πληθυσμό και συγκεκριμένα από την Ήπειρο όπου οι δύο αυτές καταστάσεις απαντώνται αρκετά συχνά. Για τον πολυμορφισμό G153D αποδείχθηκε η σύνδεση με το Ψ/A.Σ και το Ψ/A.Γ, ενώ για τον πολυμορφισμό R141L η σύνδεση αποδείχθηκε μόνο για το Ψ/A.Γ. Στην παρούσα

μελέτη, συγκρίναμε τις συχνότητες των αλληλίων και των γονοτύπων του R141L στο Ψ/A.Σ και Ψ/A.Γ και βρήκαμε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο αυτών ομάδων, το οποίο δεν είχε φανεί σε προηγούμενες μελέτες. Με βάση τα αποτελέσματα μας, προτείνουμε ότι το γονίδιο *LOXLI* μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη του Ψ/A.Γ είτε μέσω του Ψ/A.Σ με την αύξηση της ΕΟΠ είτε ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου. Επίσης, μολονότι ο πληθυσμός της Ηπείρου έχει παρόμοια ποσοστά συχνότητας Ψ/A.Σ-Ψ/A.Γ με τους Σκανδιναβικούς πληθυσμούς, οι διαφορές στις συχνότητες των γονοτύπων του *LOXLI* μεταξύ των δύο πληθυσμών καταδεικνύουν ότι επιπρόσθετοι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη Ψ/A.Σ-Ψ/A.Γ.

Οι πολυμορφισμοί του *LOXLI* στη μελέτη μας δεν βρέθηκε να συνδέονται με το ΠΓΑΓ, σε συμφωνία με όλες τις άλλες μελέτες^{108, 112, 162, 164, 167}, επιβεβαιώνοντας ότι διαφορετικοί γενετικοί παράγοντες συνεισφέρουν στο ΠΓΑΓ που διαφέρει τόσο ιστοπαθολογικά όσο και κλινικά από το Ψ/A.Γ.

Ο κίνδυνος για ανάπτυξη Ψ/A.Γ στον πληθυσμό μας βρέθηκε να συνδέεται ισχυρότερα με τον G/G απλότυπο. Παρ'όλα αυτά, η συχνότητα του απλότυπου υψηλού κινδύνου ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη στους Σκανδιναβικούς πληθυσμούς⁸⁰. Η συχνότητα του απλότυπου κινδύνου (GG) βρέθηκε να είναι 76% στο Ψ/A.Γ και 63% στο Ψ/A.Σ σε σχέση με το 46% στην ομάδα ελέγχου.

Αποδείξαμε ότι η σύνδεση των δύο πολυμορφισμών με το Ψ/A.Γ δεν είναι τόσο ισχυρή ώστε να δικαιολογεί τη χρήση διαγνωστικών tests για την προδιάθεση στην πάθηση στον γενικό πληθυσμό. Στη μελέτη μας, ενώ οι δύο πολυμορφισμοί μεμονωμένα έχουν υψηλή κλινική ευαισθησία, η κλινική τους ειδικότητα είναι πολύ χαμηλή (4,1% - 5,4%) εξαιτίας του υψηλού τους επιπολασμού στα άτομα της ομάδας ελέγχου το οποίο έχει καταγραφεί και σε προηγούμενες μελέτες^{98, 115}. Αυτό περιορίζει την χρήση γενετικών tests για την πρόβλεψη στο γενικό πληθυσμό αυτών που θα νοσήσουν από Ψ/A.Σ-Ψ/A.Γ αλλά, ίσως να είναι χρήσιμα γενετικά tests για τον πολυμορφισμό R141L του *LOXLI* για την πρόβλεψη των ατόμων με Ψ/A.Σ που θα αναπτύξουν γλαύκωμα. Η παραπάνω παρατήρηση θα μπορούσε να αποδειχθεί από μεγάλες προοπτικές μελέτες. Η ύπαρξη υψηλού επιπολασμού του αλληλίου κινδύνου G στα άτομα της ομάδας ελέγχου και με Ψ/A.Σ φανερώνει ότι υπάρχουν και άλλα

προστατευτικά γονίδια ή περιβαλλοντικοί παράγοντες που δρουν καθυστερώντας την ανάπτυξη Ψ/Α.Σ και Ψ/Α.Γ. Είναι βιολογικά εύλογο ότι βλάβες στο *LOXLI* μπορούν να έχουν ως συνέπεια την παθολογική παραγωγή ελαστίνης, που δεν αποδομείται εύκολα, και την συσσώρευση ινώδους υλικού, τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα του Ψ/Α.Σ, αλλά ο ακριβής μηχανισμός που οδηγεί στην ανάπτυξη Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ δεν έχει ακόμα καθοριστεί.

Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει τη σύνδεση της υπερομοκυστεϊναιμίας με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ και το ΠΓΑΓ^{58, 59, 144, 145}. Από την μελέτη μας δεν προκύπτει σύνδεση του πολυμορφισμού *MTHFR* C677T, που αποτελεί την πιο κοινή αιτία μέτριας υπερομοκυστεϊναιμίας, με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ και το ΠΓΑΓ. Τα αποτελέσματα μας δεν επιβεβαιώνουν την μελέτη των Junemann και συν. που βρήκαν ότι ο πολυμορφισμός C677T ήταν πιο συχνός στο ΠΓΑΓ¹⁵¹. Συμφωνούν ωστόσο με αρκετές άλλες μελέτες που δείχνουν ότι ο παραπάνω πολυμορφισμός από μόνος του δεν αποτελεί κύριο γενετικό παράγοντα κινδύνου για τις υπό διερεύνηση παθήσεις^{96, 152}. Στα άτομα της ομάδας μας ελέγχου, η συχνότητα του παθολογικού γονοτύπου TT βρέθηκε να είναι 20%, σημαντικά υψηλότερη από την αντίστοιχη αναφερόμενη συχνότητα σε βορειοευρωπαϊκούς πληθυσμούς (5-10%). Σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς η συχνότητα του γονοτύπου TT κυμαίνεται από 4% έως 26%¹⁹⁶. Επιβεβαιώνουμε τη διαφορετική συχνότητα του γονοτύπου TT στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές, η οποία φαίνεται να αυξάνεται από τον βορά προς το νότο. Η επιβεβαίωση ή μη της σύνδεσης του πολυμορφισμού *MTHFR* C677T με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ και το ΠΓΑΓ μπορεί να οφείλεται σε διαφορές ανάμεσα στις ομάδες ασθενών των μελετών όσο αναφορά την εθνική καταγωγή και τα κριτήρια διάγνωσης ή στον διαφορετικό καθορισμό του μεγέθους δείγματος των μελετών.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προτείνουν ότι τα αλληλία του *APOE* μπορούν να επηρεάσουν τον κίνδυνο εκδήλωσης ΠΓΑΓ, αλλά δεν παρουσιάζουν καμία προδιάθεση για το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ. Συγκεκριμένα, δεν βρήκαμε καμία ένδειξη σημαντικής σύνδεσης του αλληλίου E2 με το Ψ/Α.Σ, σε αντίθεση με τη μελέτη των Yilmaz και συν⁹⁵. Τα ευρήματα μας, συμφωνούν με μία πρόσφατη μελέτη σε ευρωπαϊκό πληθυσμό με μεγαλύτερο δείγμα ασθενών, ότι τα αλληλία του *APOE* δεν μπορούν να θεωρηθούν κύριος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη Ψ/Α.Σ ή Ψ/Α.Γ¹¹⁸. Στον πληθυσμό μας, το αλληλίο E2 φαίνεται να συνδέεται με αύξηση του κινδύνου εκδήλωσης ΠΓΑΓ. Το αλληλίο E2, σε μια μελέτη των Junemann και συν.

βρέθηκε να συνδέεται με αυξημένη ΕΟΠ¹⁹⁷. Πρόσφατες μελέτες εκτίμησαν την πιθανή σύνδεση των αλληλίων του *APOE* με το ΠΓΑΓ με τα αποτελέσματα αυτών να είναι αντικρουόμενα. Υπάρχουν μελέτες που έχουν δείξει θετική συσχέτιση του *APOE* με την πάθηση^{125, 126} ενώ άλλες αρνητική συσχέτιση^{127, 128}. Ένας πιθανός λόγος αυτών των ανόμοιων ευρημάτων θα μπορούσε να είναι η διαφορετική γεωγραφική κατανομή των αλληλίων του *APOE* με συνέπεια η σύνδεση μεταξύ του *APOE* και του ΠΓΑΓ να ποικίλει στους διάφορους εθνικούς πληθυσμούς. Το *APOE* θα μπορούσε να έχει περισσότερο εμφανή επίδραση σε πληθυσμούς εκτεθειμένους σε διαφορετικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως διατροφή, ορμονικά επίπεδα ή με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο. Χρειάζεται επιπλέον έρευνα, με μεγαλύτερο δείγμα ασθενών και λαμβάνοντας υπόψη αυτήν τη σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων με σκοπό να κατανοήσουμε πλήρως τον ρόλο της απολιποπρωτεΐνης Ε στο Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ και το ΠΓΑΓ.

Στην παρούσα μελέτη εκτιμήσαμε σημειακούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs) σε ένα μεσαίο μέγεθος δείγματος και για το λόγο αυτό υπολογίσαμε το επίπεδο ισχύος για όλες τις στατιστικές αναλύσεις με το Pearson Chi-Square για την συσχέτιση των πολυμορφισμών με τις ομάδες ασθενών με Ψ/Α.Σ, Ψ/Α.Γ και ΠΓΑΓ¹⁹³. Το «μέγεθος αποτελέσματος» (effect size) για την Ανάλυση Ισχύος των στατιστικών ελέγχων μπορεί να οριστεί γενικά ως η έκταση ή η ένταση του υπό εξέταση φαινομένου και είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες ή προκαθορίζεται από τον ερευνητή που σχεδιάζει την μελέτη. Συμβατικοί δείκτες για το «μέγεθος αποτελέσματος» προτάθηκαν από τον Cohen^{200, 201}. Στην μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε ως προτεινόμενο το μέτριο «μέγεθος αποτελέσματος» και η post hoc παρατηρούμενη ισχύς των στατιστικών ελέγχων με το Pearson Chi-Square παρουσιάστηκε με το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορισμένο ίσο με 0,05.

Η μεθοδολογία που αναπτύξαμε για τη γονοτύπωση των δύο SNPs του *LOXLI* συνιστά σημαντική πρόοδο σε σχέση με τις υπάρχουσες, επειδή βελτιώνει την αναλυτική ειδικότητα χρησιμοποιώντας στην ίδια αντίδραση της real-time PCR και τους δύο ανιχνευτές μαζί με τους καλά σχεδιασμένους εκκινητές. Η μεθοδολογία του PCR-Cycle Sequencing δεν μπορεί πάντα με ακρίβεια να διακρίνει τις εξαιρετικά ομόλογες αλληλουχίες του DNA και λάθη στη γονοτύπωση μπορούν να συμβούν έστω και σπάνια (στην μελέτη μας δεν παρατηρήθηκαν κατά τη μικρή σχετικά σύγκριση των δύο μεθόδων που επιτελέσαμε), αλλά σε ποσοστό που θα μπορούσε να

επιηρεάσει τις γενετικές συσχετίσεις. Αυτή η δυσκολία στη γονοτύπωση ομόλογων γενωμικών περιοχών αναμένεται να αυξηθεί με τον ερχομό του Next Generation Sequencing όπου οι αντιδράσεις συμβαίνουν σε πολύ μικρότερες γενωμικές αλληλουχίες. Η μέθοδος μας είναι ταχεία, ακριβής, επαναλήψιμη, με μειωμένο κίνδυνο επιμολύνσεων λόγω της χρήσης ενός μόνο σωληναρίου και χαρακτηρίζεται από υψηλή παραγωγικότητα και δυνατότητα αυτοματισμού. Η μέθοδος για την εξέταση ταυτόχρονα των δύο SNPs του *LOXL1* υπερέχει στην εξοικονόμηση χρόνου και αντιδραστηρίων αλλά έχει κάποιους περιορισμούς λόγω της δημιουργίας artefacts και δεν την προτείνουμε. Προτιμάται η ξεχωριστή ανάλυση του κάθε πολυμορφισμού με την επικυρωμένη αναπτυχθείσα μεθοδολογία.

Η παρούσα είναι η πρώτη μελέτη σε έλληνες ασθενείς που καταδεικνύει ότι οι πολυμορφισμοί του *LOXL1* συνδέονται με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ. Μολονότι προσδιορίστηκε ένας κύριος γενετικός παράγοντας, το γονίδιο *LOXL1*, η χρήση γενετικών tests είναι προβληματική. Στον πληθυσμό μας, προτείνουμε ότι ο R141L μπορεί να συμβάλλει στην εκδήλωση Ψ/Α.Γ ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου και όχι απαραίτητως μέσω του Ψ/Α.Σ. Συμπερασματικά, θα πρέπει να υπάρχουν και άλλα γονίδια που αλληλεπιδρούν με το *LOXL1* ή και γονίδια ανεξάρτητα από το *LOXL1*, που εμπλέκονται σε αυτήν την σύνθετη με όψιμη έναρξη-εμφάνιση διαταραχή. Απαιτείται μελλοντική έρευνα για να εξηγήσει τον τρόπο με τον οποίο το γονίδιο *LOXL1* οδηγεί στην ανάπτυξη Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ καθώς σε ορισμένους εθνικούς πληθυσμούς έχει γίνει αντιστροφή των αλληλίων κινδύνου (για τον πολυμορφισμό R141L το αλλήλιο κινδύνου είναι το G στους Καυκάσιους πληθυσμούς ενώ στους Ασιατικούς είναι κυρίως το T). Αυτή η διαφοροποίηση στα γενετικά ευρήματα, υποδεικνύει ότι οι πολυμορφισμοί του *LOXL1* δεν αποτελούν μοναδικούς αιτιολογικούς παράγοντες για την ανάπτυξη του Ψ/Α.Γ. Οι πολυμορφισμοί του *LOXL1* που αναλύθηκαν και συνδέονται με το Ψ/Α.Σ κωδικοποιούν τη μη διατηρούμενη N-τελική αλληλουχία της πρωτεΐνης η οποία μπορεί να έχει ρυθμιστική λειτουργία, κατευθύνοντας την πρωτεΐνη στους τόπους ελαστογένεσης, αλλά δεν επηρεάζει την καταλυτική της δράση. Είναι πιθανό οι πολυμορφισμοί του *LOXL1* που σχετίζονται με το Ψ/Α.Σ να βρίσκονται σε ανισορροπία με άλλες αλλαγές της αλληλουχίας του DNA που επηρεάζουν την έκφραση γονιδίου. Γι' αυτό το λόγο, είναι απαραίτητες μελέτες σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης ώστε να καθοριστεί αν η μείωση της έκφρασης του *LOXL1* σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης είναι υπεύθυνη

για τη νόσο^{97, 198}. Τέλος, σε μια πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση των απλοτύπων του υποκινητή του *LOXL1* με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ σε Καυκάσιο πληθυσμό από τις ΗΠΑ, προτείνοντας ότι πολυμορφισμοί στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου μπορούν να επηρεάσουν την έκφρασή του, προκαλώντας μείωση της ενζυμικής του δραστηριότητας προδιαθέτοντας για τη νόσο¹⁹⁹. Μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να επεκταθεί και σε άλλα γονίδια της *LOX* οικογένειας γονιδίων (*LOX*, *LOXL2*, *LOXL3* and *LOXL4*) των οποίων οι πρωτεΐνες επίσης εκφράζονται στους οφθαλμικούς ιστούς.

Η έρευνα πάνω στο Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ με την υπάρχουσα τεχνολογία μπορεί να δώσει την απάντηση στην περίπλοκη αιτιοπαθογένεια αυτής της κοινής, σοβαρής και ενδεχομένως ιάσιμης διαταραχής που αποτελεί σημαντική αιτία τύφλωσης παγκοσμίως. Απώτερος σκοπός είναι η πρόωμη διάγνωση-πρόγνωση και η εξατομίκευση της θεραπείας, στα πλαίσια φαρμακογενωμικών προσεγγίσεων. Εφικτός στόχος μπορεί να είναι η ανακάλυψη φαρμάκων που επεμβαίνουν σ'ένα αρχικό στάδιο της πάθησης με την παρεμπόδιση του σχηματισμού ή την αφαίρεση του Ψ/Α υλικού πριν την ανάπτυξη γλαυκώματος.

ΥΠΟΜΝΗΜΑΤΑ Α Β**ΥΠΟΜΝΗΜΑ Α****Α.Α:**

ΚΛΙΝΙΚΟ – ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ : «ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΜΒΟΛΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ ΥΠΟΠΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ ΓΙΑ ΤΟ ΨΕΥΔΟΑΠΟΦΟΛΙΔΩΤΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΣΤΗΝ ΗΠΕΙΡΟ»

	Ψ/Α:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Όνομα :		ΔΟ	ΑΟ
Ημερομηνία γέννησης:	Ψ/Α.Γ:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Όνομα μητέρας :			
Όνομα πατέρα:		ΝΑΙ	ΟΧΙ
Φύλο :			
Τόπος γέννησης :	Οφθαλμός (αν ναι):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Τόπος κατοικίας :		ΔΟ	ΑΟ
Τηλέφωνο :			

.....

Κληρονομικό ιστορικό γλαυκώματος:

Όνομα μητρικής γιαγιάς :

Όνομα πατρικής γιαγιάς :

Όνομα μητρικού παππού :

Όνομα πατρικού παππού :

**ΑΤΟΜΙΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ : Σ.Δ. Α.Υ. ΚΑΡΔΙΟΠΑΘΕΙΑ ΑΓΓΕΙΟΠΑΘΕΙΑ
ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΑ**

ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΟ ΑΝΑΜΝΗΣΤΙΚΟ :**ΠΑΡΟΥΣΑ ΝΟΣΟΣ:****Όραση** (με διόρθωση)

ΔΟ:

ΑΟ:

Πρόσθια μόρια:

ΔΟ:

Ψ/Α :

ΝΑΙ

ΟΧΙ

ΑΟ:

Ψ/Α:

Ενδοφθάλμια Πίεση:

ΔΟ:

Θεραπεία:

ΑΟ:

Θεραπεία:

Παρουσία Γλαυκώματος:

ΔΟ:

ΑΟ:

Έτη διάγνωσης Γλαυκώματος: ΔΟ:

ΑΟ:

Γωνία (εύρος, χρωστική):

ΔΟ:

ΑΟ:

Βυθός:

ΔΟ:

ΑΟ:

C/D Ratio:

ΔΟ:

ΑΟ:

Οπτικά πεδία:

ΔΟ:

ΑΟ:

Αποτελέσματα Γενετικής ανάλυσης:

ΥΠΟΜΝΗΜΑ Β

ΕΝΗΜΕΡΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗ ΑΣΘΕΝΗ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ «ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΜΒΟΛΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ ΥΠΟΠΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ ΓΙΑ ΤΟ ΨΕΥΔΟΑΠΟΦΟΛΙΔΩΤΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΣΤΗΝ ΗΠΕΙΡΟ»

Το ψευδοαποφολιδωτικό σύνδρομο αποτελεί τον πλέον συχνό αιτιολογικό παράγοντα εμφάνισης του Χρονίου Γλαυκώματος.

Το Χρόνιο γλαύκωμα είναι μια σοβαρή νόσος του οφθαλμού και αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες τύφλωσης σε περίπτωση που δεν προβλεφθεί, διαγνωσθεί και θεραπευθεί εγκαίρως,

Το Χρόνιο γλαύκωμα, σε πολλές περιπτώσεις, κληρονομείται από γενεά σε γενεά. Για να προβλέψουμε ποιος από τους συγγενείς θα νοσήσει στο μέλλον χρειάζονται γενετικές αναλύσεις οι οποίες γίνονται σε εξειδικευμένα κέντρα με τη συνεργασία οφθαλμιατρών και γενετιστών.

Οι γενετικές αυτές αναλύσεις γίνονται μετά από λήψη αίματος (10 cc) από τους ασθενείς και τους συγγενείς τους.

Μέρος αυτής της μεγάλης προσπάθειας αποτελούν και οι γιατροί της Πανεπιστημιακής Οφθαλμολογικής Κλινικής Ιωαννίνων και οι συνεργάτες τους.

Θα επιθυμούσαμε τη συγκατάθεσή σας για τη λήψη αίματος από εσάς και τους συγγενείς σας για την επιτυχία του πιο πάνω σκοπού μας.

Ο επιβλέπων της έρευνας

Συγκατάθεση εξεταζόμενου

Κίτσος Γεώργιος, Αν. Καθηγητής Οφθαλμολογίας

Ο υπεύθυνος της έρευνας

Χήρας Δημήτριος, Ιατρός

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός

Το ψευδοαποφολιδωτικό σύνδρομο (Ψ/Α.Σ) αποτελεί μια σύνθετη πάθηση, με όψιμη έναρξη εμφάνιση στην οποία εμπλέκονται πολλαπλά γονίδια και/ή περιβαλλοντικοί παράγοντες. Το Ψ/Α.Σ αποτελεί το πιο συχνά προσδιορισμένο αίτιο χρόνιου γλαυκώματος ανοικτής γωνίας. Στον ελληνικό πληθυσμό της Ηπείρου, το Ψ/Α.Σ και το ψευδοαποφολιδωτικό γλαύκωμα (Ψ/Α.Γ) απαντώνται σε υψηλή συχνότητα. Στην παρούσα μελέτη, αναπτύξαμε μία αξιόπιστη μεθοδολογία για τη γονοτύπωση του γονιδίου *LOXLI*, διερευνήσαμε την αναφερόμενη σύνδεση του *LOXLI* με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ και εκτιμήσαμε τη συμβολή των πολυμορφισμών *APOE* και *MTHFR* ως γενετικοί δείκτες κινδύνου και στις δύο καταστάσεις στον πληθυσμό μας.

Μέθοδος

Συλλέχθηκαν δείγματα αίματος από 82 ασθενείς με Ψ/Α.Γ, 69 ασθενείς με Ψ/Α.Σ, 52 ασθενείς με πρωτοπαθές γλαύκωμα ανοικτής γωνίας (ΠΓΑΓ) και 107 άτομα ομάδας ελέγχου. Η γονοτύπωση των πολυμορφισμών του *APOE* και *MTHFR* C677T πραγματοποιήθηκε με εξακριβωμένες μεθόδους από το γενωμικό DNA που εξήχθη. Για τη γονοτύπωση δύο γνωστών σημειακών πολυμορφισμών (G153D και R141L) του *LOXLI* αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε μεθοδολογία PCR πραγματικού χρόνου και ανάλυση καμπυλών τήξης για τους προαναφερθέντες πολυμορφισμούς του γονιδίου *LOXLI* χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά κανάλια του οργάνου LightCycler (Roche), εξετάζοντας ξεχωριστά κάθε πολυμορφισμό.

Αποτελέσματα

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για τους πολυμορφισμούς του *APOE* και *MTHFR* μεταξύ Ψ/Α.Σ, Ψ/Α.Γ και ομάδας ελέγχου. Το E2 αλληλίο του *APOE* φάνηκε να συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο για ΠΓΑΓ στον υπό μελέτη πληθυσμό. Η μεθοδολογία για το *LOXLI* ήταν ταχεία και αξιόπιστη, επιδεικνύοντας καλή απόδοση και επαναληψιμότητα στην ποσοτικοποίηση και αξιοπιστία στη

γονοτύπωση. Από τα αποτελέσματα επιβεβαιώνεται η σύνδεση του *LOXLI* με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ σε Ελληνικό πληθυσμό. Η σύνδεση του Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ με τον G153D φάνηκε να είναι λιγότερο ισχυρή στον πληθυσμό που μελετήθηκε (Ψ/Α.Σ: OR=2,162, p=0,039, Ψ/Α.Γ: OR=2,794, p=0,002) σε σχέση με άλλους πληθυσμούς σε διάφορες μελέτες. Ενώ για τον πολυμορφισμό R141L η σύνδεση αποδείχθηκε μόνο για το Ψ/Α.Γ (OR=3,529, p<0,001). Δεν προέκυψε σύνδεση του ΠΓΑΓ με κανέναν από τους δύο πολυμορφισμούς του *LOXLI*.

Συμπεράσματα

Επιβεβαιώσαμε την σύνδεση του *LOXLI* με το Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ, ενώ οι πολυμορφισμοί του *APOE* και *MTHFR* δεν αποτελούν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη Ψ/Α.Σ-Ψ/Α.Γ στον ελληνικό πληθυσμό από την Ήπειρο. Στον πληθυσμό μας, προτείνουμε ότι ο R141L μπορεί να συμβάλλει στην εκδήλωση Ψ/Α.Γ ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου και όχι απαραίτητως μέσω του Ψ/Α.Σ.

ABSTRACT

Purpose

Pseudoexfoliation syndrome (PXFS) is a late-onset and complex disorder involving a combination of genetic and non-genetic factors in its etiopathogenesis. PXFS is one of the most common causes of glaucoma worldwide. In the Greek population of Epirus, PXFS and pseudoexfoliation glaucoma (PXFG) occur at a high prevalence. In this study, we validate a novel genotyping *LOXLI* method, investigate the previously reported association of *LOXLI* with PXFS/PXFG, and evaluate *APOE* and *MTHFR* polymorphisms as genetic risk factors for both these conditions in our population.

Methods

Blood samples were collected from 82 patients with PXFG, 69 patients with PXFS, 52 patients with primary open-angle glaucoma (POAG) and 107 controls. *APOE* and *MTHFR* 677C>T genotyping was performed from extracted genomic DNA by established methods. A novel methodology of real-time PCR and melting curve analysis was developed and validated in order to accurately genotype the *LOXLI* G153D and R141L polymorphisms by using two different fluorescent channels of the LightCycler instrument (Roche) examining each SNP separately.

Results

No significant differences were observed for the *APOE* and *MTHFR* polymorphisms between PXFS, PXFG and control subjects. The *APOE* ϵ 2 allele appears to be associated with elevated risk of POAG in our population. Our novel *LOXLI* genotyping method was easy to perform, fast and accurate. A statistically significant association was found for *LOXLI* gene with PXFS/PXFG in this Greek population. The association of PXFS and PXFG with G153D appeared to be less powerful in this population (PXFS: OR=2.162, p=0.039, XFG: OR=2.794,

p=0.002) compared to other populations and as for R141L, the association was proven only with PXFG (OR=3.592, p<0.001). None of the two *LOXLI* SNPs was significantly associated with POAG.

Conclusions

We confirmed the association between *LOXLI* and PXFS/PXFG, while the *APOE* and *MTHFR* polymorphisms are not significant risk factors for the development of PXFS/PXFG in our population of patients from Epirus (Greece). In our population, we suggest that the R141L *LOXLI* may contribute to XFG onset independently rather than through IOP elevation and subsequent glaucoma.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Schlötzer-Schrehardt U, Dorfler S, Naumann GO. Immunohistochemical localization of basement membrane components in pseudoexfoliation material of the lens capsule. *Curr Eye Res* 1992;11:343-355.
2. Streeten BW, Li ZY, Wallace RN et al. Pseudoexfoliative fibriolopathy in visceral organs of a patient with pseudoexfoliation syndrome. *Arch Ophthalmol* 1992;110:1757-1762.
3. Naumann GOH, Schlötzer-Schrehardt U, Kuchle M. Pseudoexfoliation syndrome for the comprehensive ophthalmologist: intraocular and systemic manifestations. *Ophthalmology* 1998;105:951-968.
4. Schlötzer-Schrehardt U, Naumann GOH. Ocular and systemic Pseudoexfoliation syndrome. *Am J Ophthalmol* 2006;141:921.
5. Ringvold A. Epidemiology of the pseudoexfoliation syndrome. *Acta Ophthalmol Scand* 1999;77:371-375.
6. Ritch R, Schlötzer-Schrehardt U. Exfoliation syndrome. *Survey Ophthalmol* 2001;45:265-315.
7. Lindberg JG. Clinical investigations on depigmentation of the pupillary border and translucency of the iris in cases of senile cataract and normal eyes in elderly persons. *Acta Ophthalmol* 1998;67:190 (Suppl.):1-96.
8. Stefaniotou M, Petroustos G, Psilas K. The frequency of Pseudo exfoliation in a region of Greece (Epirus). *Acta Ophthalmol* 1990;68(3):307-309.
9. Kozobolis VP, Papatzanaki M, Vlachonikolis IG. Epidemiology of pseudoexfoliation in the island of Crete (Greece). *Acta Ophthalmol Scand* 1997;75:726-729.
10. Ringvold A, Blika S, Elsas T. The prevalence of pseudoexfoliation in three separate municipalities of Middle-Norway. A preliminary report. *Acta Ophthalmol* 1987;182:17-20.
11. Ringvold A. Epidemiology of glaucoma in Northern Europe. *Eur J Ophthalmol* 1996;6:26-29.
12. Forsius H. Exfoliation syndrome in various ethnic populations. *Acta Ophthalmol* 1988;184:71-85.

13. Allingham RR, Loftsdottir M, Gottfredsdottir MS et al. Pseudoexfoliation syndrome in Icelandic families. *Br J Ophthalmol* 2001;85:702-707.
14. Jonasson F, Damji KF, Arnarsson A et al. Prevalence of open-angle glaucoma in Iceland: Reykjavik Eye Study. *Eye* 2003;17:747-753.
15. Vesti E, Kivela T. Exfoliation syndrome and exfoliation glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 2000;19:345-368.
16. Bialasiewicz AA, Wali U, Shenoy R et al. Patients with secondary open-angle glaucoma in pseudoexfoliation (PEX) syndrome among a population with high prevalence of PEX: clinical findings and morphological and surgical characteristics. *Ophthalmologie* 2005;102:1064-1068.
17. Henry JC, Krupin T, Schmitt M et al. Long-term follow-up of pseudoexfoliation and the development of elevated intraocular pressure. *Ophthalmology* 1987;94:545-552.
18. Jeng S, Karger R, Hodge D et al. The risk of Glaucoma in Pseudoexfoliation Syndrome. *J Glaucoma* 2007;16:117-121.
19. Ritch R, Schlötzer-Schrehardt U, Konstas AGP. Why is glaucoma associated with exfoliation syndrome? *Progress in Retinal and Eye Research* 2003;22:253-275.
20. Joannides T, Katsourakis N, Velissaropoulos P. Glaucoma capsulare. *Ophthalmologica* 1961;142:160-189.
21. Seland JH, Chylack LT. Cataracts in the exfoliation syndrome (Fibrillopathia epitheliocapsularis). *Trans Ophthalmol Soc UK* 1982;102:375-379.
22. Schlötzer-Schrehardt U, Naumann GOH. An histopathologic study of zonular instability in pseudoexfoliation syndrome. *Am J Ophthalmol* 1994;118:730-743.
23. Futa R, Furuyoshi N. Phakodonesis in capsular glaucoma: A clinical and electron microscopic study. *Jpn J Ophthalmol* 1989;33:311-317.
24. Hietanen J, Kivela T, Vesti E et al. Exfoliation syndrome in patients scheduled for cataract surgery. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1992;70:440-446.
25. Hirvela H, Luukinen H, Laatikainen L. Prevalence and risk factors of lens opacities in the elderly in Finland. A population based study. *Ophthalmology* 2000;102:108-117.
26. Prince AM, Ritch R. Clinical signs of the pseudoexfoliation syndrome. *Ophthalmology* 1986;93:803-807.

27. Kristensen P. Mydriasis-induced pigment liberation in the anterior chamber associated with acute rise in intraocular pressure open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1965;43:714-724.
28. Krause U, Tarkkanen A. Cataract and pseudoexfoliation. A clinicopathological study. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1978;56:329-334.
29. Mapstone R. Pigment release. *Br J Ophthalmol* 1981;65:258-263.
30. Puska P, Vasara K, Harju Met al. Corneal thickness and corneal endothelium in normotensive subjects with unilateral exfoliation syndrome. *Graefe' s Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000;238:659-663.
31. Kitsos G, Gartzios C, Asproudis I, Bagli E. Central corneal thickness in subjects with glaucoma and in normal individuals (with or without pseudoexfoliation syndrome). *Clin Ophthalmol* 2009;3:537-542.
32. Sampaolesi R, Zarate J, Croxatto O. The chamber angle in exfoliation syndrome. Clinical and pathological findings. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1988;66 (Suppl.184):48-53.
33. Puska P, Raitta C. Peripapillary atrophy in unilateral capsular glaucoma. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993;231:642-646.
34. Kühle M, Schlöltzer-Schrehardt U, Naumann G. Occurrence of pseudoexfoliative material in paracapsular structures in pseudoexfoliation syndrome. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1991;69:124-130.
35. Konstas AGP, Tsironi S, Ritch R. Current concepts in the pathogenesis and management of exfoliation syndrome and exfoliative glaucoma. *Comp Ophthalmol Update* 2006;7:131-141.
36. Ekström C. Elevated intraocular pressure and pseudoexfoliation of the lens capsule as risk factors for chronic open-angle glaucoma. A population-based five-year follow-up study. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1993;71:189-195.
37. Mitchell P, Wang JJ, Hourihan F. The relationship between glaucoma and pseudoexfoliation. The Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol* 1999;117:1319-1324.
38. Grodum K, Heijl A, Bengtsson B. Risk of glaucoma in ocular hypertension with and without pseudoexfoliation. *Ophthalmology* 2005;112:386-390.
39. Hovding G, Aasved H. Prognostic factors in the development of manifest open angle glaucoma. A long-term follow-up study of hypertensive and normotensive eyes. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1986;64:601-608.

40. Pohjanpelto P. Influence of exfoliation syndrome on prognosis in ocular hypertension > 25mmHg. A long-term follow-up. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1986;64:39-44.
41. Puska P. Unilateral exfoliation syndrome: Conversion to bilateral exfoliation and to glaucoma: A prospective 10-year follow-up study. *J Glaucoma* 2002;11:517-524.
42. Tomita G, Puska P, Raitta C. Interocular differences in optic disc configuration in the unilateral exfoliation syndrome. *Acta Ophthalmol* 1994;72:162-167.
43. Konstas AGP, Mantziris DA, Stewart WC. Diurnal intraocular pressure in untreated exfoliation and primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1997;115:182-185.
44. Aasved H. Intraocular pressure in eyes with and without fibrillopathia epitheliocapsularis (so-called senile pseudoexfoliation). *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1971;9:601-610.
45. Hansen E, Sellevold Oj. Pseudoexfoliation of the lens capsule II. Development of the exfoliation syndrome. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1969;47:161-173.
46. Hansen E, Sellevold Oj. Pseudoexfoliation of the lens capsule III. Ocular tension in eyes with pseudoexfoliation. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1970;48:446-454.
47. Altintas Ö, Yüksel N, Karabas VL et al. Diurnal intraocular pressure variation in pseudoexfoliation syndrome. *Eur J Ophthalmol* 2004;14:495-500.
48. Gumus MK, Bozkurt B, Sonmez B et al. Diurnal variation of intraocular pressure and its correlation with retinal fiber analysis in Turkish population with exfoliation syndrome. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244:170-176.
49. Konstas AGP, Tsatsos I, Kardasopoulos A et al. Preoperative features of patients with exfoliation glaucoma and primary open-angle glaucoma. The AHERA study. *Acta Ophthalmol Scand* 1998;76:208-212.
50. Jonas JB, Papastathopoulos KI. Optic disk appearance in pseudo exfoliation syndrome. *Am J Ophthalmol* 1997;123:174-180.
51. Harju M. Exfoliation glaucoma: studies on intraocular pressure, optic nerve head morphometry, and ocular blood flow. *Acta Ophthalmol Scand* 2002;80:228-229.
52. Asano N, Schlötzer-Schrehardt U, Naumann GOH. A histopathologist study of iris changes in pseudoexfoliation syndrome. *Ophthalmology* 1995;102:1279-1290.

53. Mitchell P, Wang JJ, Smith W. Association of pseudoexfoliation syndrome with increased vascular risk. *Am J Ophthalmol* 1997;124:685-687.
54. Ritland JS, Egge K, Lydersen Set al. Exfoliative glaucoma and primary open-angle glaucoma: associations with death causes and comorbidity. *Acta Ophthalmol Scand* 2004;82:401-404.
55. Grodum K, Heijl A, Bengtsson B. Glaucoma and mortality. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004;242:397-401.
56. Schumacher S, Schlötzer-Schrehardt U, Martus P et al. Pseudoexfoliation syndrome and aneurysms of the abdominal aorta. *Lancet* 2001;357:359-360.
57. Puustjärvi T, Blomster H, Kontkamen M et al. Plasma and aqueous humour levels of homocysteine in exfoliation syndrome. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004;242:749-754.
58. Leibovitch I, Kurtz S, Shemesh G et al. Hyperhomocystinemia in pseudoexfoliation glaucoma. *J Glaucoma* 2003;12:36-39.
59. Vessani RM, Ritch R, Liebmann JM et al. Plasma homocysteine is elevated in patients with exfoliation syndrome. *Am J Ophthalmol* 2003;136:41-46.
60. Altintas Ö, Maral H, Yüksel N et al. Homocysteine and nitric oxide levels in plasma of patients with pseudoexfoliation syndrome, pseudoexfoliation glaucoma, and primary open-angle glaucoma. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243:1213-1217.
61. Cursiefen C, Hammer T, Kuchle M et al. Pseudoexfoliation syndrome in eyes with ischemic central retinal vein occlusion. *Acta Ophthalmol Scand* 2001;79:476-478.
62. Schlötzer-Schrehardt U, Kuchle M, Hofmann-Rummelt C et al. Latent TGF- β 1 binding protein (LTBP-1): a new marker for intra and extraocular PEX deposits. *Klim Monatsbl Augenheilkd* 2000;216:412-419.
63. Morrison JC, Green WR. Light microscopy of the exfoliation syndrome. *Acta Ophthalmol* 1998;184 (Suppl): 5-27.
64. Shimizu T, Futa R. The fine structure of pigment epithelium of the iris in capsular glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1985;223:77-82.
65. Damji KF, Bains HS, Stefansson E et al. Is pseudoexfoliation syndrome inherited? A review of genetic and nongenetic factors and a new observation. *Ophthalmic Genetics* 1998;19:175-185.

66. Orr AC, Robitail JM, Price PA et al. Exfoliation syndrome: clinical and genetic features. *Ophthalmic Genet* 2001;22:171-185.
67. Aasved H: The frequency of fibrillopathia epitheliocapsularis (so-called senile exfoliation or pseudoexfoliation) in patients with open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1971;49:194-210.
68. Streeten BW, Qi Y, Wallace RN. Comparison of components in pseudoexfoliation fibers and Alzheimers disease plaques [abstract]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(Suppl):S90.
69. Barbujani G, Jacquez GM, Ligi L. Diversity of some gene frequencies in European and Asian populations. V. Steep multilocus clines. *Am J Hum Genet* 1990;47:867-875.
70. Meretoja J, Tarkkanen A. Occurrence of amyloid in eyes with pseudoexfoliation. *Ophthalmic Res* 1977;9:80-91.
71. Koliakos GG, Konstas AG, Triantos A, Ritch R. Increased growth factor activity in the aqueous humour of patients with exfoliation syndrome. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000;238:491-495.
72. Schlötzer-Schrehardt U, Von de Mark K, Sakai LY et al. Increased extracellular deposition of fibrillin- containing fibrils in pseudoexfoliation syndrome. *Invest Ophthalmol* 1997;38:970-984.
73. Damji KF, Bains HS, Amjadi K et al. Familial occurrence of pseudoexfoliation in Canada. *Can J Ophthalmol* 1999;34:257-265.
74. Aasved H. Study of relatives of persons with fibrillopathia epitheliocapsularis (pseudoexfoliation of the lens capsule). *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1975;53:879-886.
75. Gottfredsdottir MS, Sverrisson T, Musch DC et al. Chronic open-angle glaucoma and associated ophthalmic findings in monozygotic twins and their spouses in Iceland. *J Glaucoma* 1999;8:134-139.
76. Kozobolis VP, Detorakis ET, Sourvinos G et al. Loss of heterozygosity in pseudoexfoliation syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1255-1260.
77. Lemmela S, Forsman E, Sistonen P et al. Genomwide scan of exfoliation syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4136-4142.
78. Olivius E, Polland W. Histocompatibility (HLA) antigens in capsular glaucoma and simplex glaucoma. *Acta Ophthalmol* 1980;58:406-410.

79. FitzSimon JS, Mulvihill A, Kennedy S. Association of HLA type with pseudoexfoliation of the lens capsule. *Br J Ophthalmol* 1996;80:402–404.
80. Thorleifsson G, Magnusson KP, Sulem P et al. Common sequence variants in the LOXL1 gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science* 2007;317:1397-1400.
81. Hewitt AW, Sharma S, Burdon KP et al. Ancestral LOXL1 variants are associated with pseudoexfoliation in Caucasian Australians but with markedly lower penetrance than in Nordic people. *Hum Mol Genet* 2008;17:710-716.
82. Tarkkanen A, Voipio H, Koivusalo P. Family study of pseudoexfoliation and glaucoma. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1965;43:679-683.
83. Klouman OF. Pseudoexfoliation in ophthalmic practice. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1967;45:822-828.
84. Sood GC, Sofat BK, Mehrotra SK et al. Capsular exfoliation syndrome. *Br J Ophthalmol* 1973;57:120-124.
85. Forsman E, Cantor R, Lu A et al. Exfoliation Syndrome: prevalence and inheritance in a subisolate of the Finnish population. *Acta Ophthalmol* 2007;85:500-507.
86. Zenkel M, Pöschl E, Von der Mark K et al. Differential gene expression in pseudoexfoliation syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:3742-3752.
87. Ovodenko B, Rostango A, Neubert TA et al. Proteomic analysis of exfoliation deposits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:1447-1457.
88. Sharma S, Chataway T, Burdon KP et al. Identification of LOXL1 protein and Apolipoprotein E as components of surgically isolated pseudoexfoliation material by direct mass spectrometry. *Exp Eye Res* 2009;89:479-485.
89. Burdon KP, Sharma S, Hewitt AW et al. Genetic analysis of the clusterin gene in pseudoexfoliation syndrome. *Mol Vis* 2008;14:1727-1736.
90. Krumbiegel M, Pasutto F, Mardin CY et al. Exploring functional candidate genes for genetic association in German patients with pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2796-2801.
91. Tsironi EE, Pefkianaki M, Tsezou A et al.: Evaluation of MMP1 and MMP3 gene polymorphisms in exfoliation syndrome and exfoliation glaucoma. *Mol Vis* 2009;15:2890-2895.

92. Mossbock G, Weger M, Faschinger C et al. Role of functional single nucleotide polymorphisms of MMP1, MMP2, and MMP9 in open angle glaucomas. *Mol Vis* 2010;16:1764-70.
93. Michael S, Yousaf S, Khan MI et al. Polymorphisms in matrix metalloproteinases MMP1 and MMP9 are associated with primary open-angle and angle closure glaucoma in a Pakistani population. *Mol Vis* 2013;19:441-7.
94. Ritland JS, Utheim TP, Utheim OA et al. Effects of APOE and CHRNA4 genotypes on retinal nerve fibre layer thickness at the optic disc and on risk for developing exfoliation syndrome. *Acta Ophthalmol Scand* 2007;85:257-261.
95. Yilmaz A, Tamer L, Ates NA et al. Effects of apolipoprotein E genotypes on the development of exfoliation syndrome. *Exp Eye Res* 2005;80:871-875.
96. Fan BJ, Chen T, Grosskreutz C, Pasquale L, Rhee D, DelBono E, Haines JL, Wiggs JL. Lack of association of polymorphisms in homocysteine metabolism genes with pseudoexfoliation syndrome and glaucoma. *Mol Vis* 2008;14:2484-91.
97. Fan BJ, Pasquale L, Grosskreutz CL et al. DNA sequence variants in the LOXL1 gene are associated with pseudoexfoliation glaucoma in a US clinic-based population with broad ethnic diversity. *BMC Med Genet* 2008;9:5.
98. Challa P, Schmidt S, Liu Y et al. Analysis of LOXL1 polymorphisms in a United States population with pseudoexfoliation glaucoma. *Mol Vis* 2008;14:146-149.
99. Ramprasad VL, George R, Soumitra N et al. Association of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the LOXL1 gene with pseudoexfoliation syndrome in India. *Mol Vis* 2008;14:318-322.
100. Aragon-Martin JA, Ritch R, Liebmann J et al. Evaluation of LOXL1 gene polymorphisms in exfoliation syndrome and exfoliation glaucoma. *Mol Vis* 2008;14:533-541.
101. Mossbock G, Renner W, Faschinger C et al. Lysyl oxidase-like protein 1 (LOXL1) gene polymorphisms and exfoliation glaucoma in a Central European population. *Mol Vis* 2008;14:857-861.
102. Mori K, Imai K, Matsuda A et al. LOXL1 genetic polymorphisms are associated with exfoliation glaucoma in the Japanese population. *Mol Vis* 2008;14:1037-1040.

103. Fuse N, Miyazawa A, Nakazawa T et al. Evaluation of LOXL1 polymorphisms in eyes with exfoliation glaucoma in Japanese. *Mol Vis* 2008;14:1338-1343.
104. Gong WF, Chiang SW, Chen LJ et al. Evaluation of LOXL1 polymorphisms in primary open-angle glaucoma in southern and northern Chinese. *Mol Vis* 2008;14:2381-2389.
105. Hayashi H, Gotoh N, Ueda Y et al. Lysyl oxidase-like 1 polymorphisms and exfoliation syndrome in the Japanese population. *Am J Ophthalmol* 2008;145:582-585.
106. Lemmela S, Forsman E, Onkamo P et al. Association of LOXL1 gene with Finnish exfoliation syndrome patients. *J Hum Genet* 2009;54:289-297.
107. Pasutto F, Krumbiegel M, Mardin CY et al. Association of LOXL1 common sequence variants in German and Italian patients with pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:1459-1463.
108. Chen H, Chen LJ, Zhang M, Gong W, Tam PO, Lam DS, Pang CP. Ethnicity-based subgroup meta-analysis of the association of LOXL1 polymorphisms with glaucoma. *Mol Vis* 2010;16:167-77.
109. Mayinu, Chen X. Evaluation of LOXL1 polymorphisms in exfoliation syndrome in the Uygur population. *Mol Vis* 2011;17:1734-44.
110. Micheal S, Khan MI, Akhtar F, Ali M, Ahmed A, den Hollander AI, Qamar R. Role of Lysyl oxidase-like 1 gene polymorphisms in Pakistani patients with pseudoexfoliative glaucoma. *Mol Vis* 2012;18:1040-4.
111. Park do Y, Won HH, Cho HK, Kee C. Evaluation of lysyl oxidase-like 1 gene polymorphisms in pseudoexfoliation syndrome in a Korean population. *Mol Vis* 2013;19:448-53.
112. Kasım B, İrkeç M, Alikasıfoğlu M, Orhan M, Mocan MC, Aktaş D. Association of LOXL1 gene polymorphisms with exfoliation syndrome/glaucoma and primary open angle glaucoma in a Turkish population. *Mol Vis* 2013;19:114-20.
113. Jaimes M, Rivera-Parra D, Miranda-Duarte A, Valdés G, Zenteno JC. Prevalence of high-risk alleles in the LOXL1 gene and its association with pseudoexfoliation syndrome and exfoliation glaucoma in a Latin American population. *Ophthalmic Genet* 2012;33(1):12-7.

114. Rautenbach RM, Bardien S, Harvey J, Ziskind A. An investigation into LOXL1 variants in black South African individuals with exfoliation syndrome. *Arch Ophthalmol* 2011;129(2):206-10.
115. Sagong M, Gu BY, Cha SC. Association of lysyl oxidase-like 1 gene polymorphisms with exfoliation syndrome in Koreans. *Mol Vis* 2011;17:2808-17.
116. Sklavounou E, Economou-Petersen E, Karadima G et al. Apolipoprotein E polymorphism in the Greek population. *Clin Genet* 1997;52:216-218.
117. Corbo RM, Scacchi R, Mureddu L et al. Apolipoprotein E polymorphism in Italy investigated in native plasma by a simple polyacrylamide gel isoelectric focusing technique. Comparison with frequency data of other European populations. *Ann Hum Genet* 1995;59:197-209.
118. Krumbiegel M, Pasutto F, Mardin CY et al. Apolipoprotein E genotypes in pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma. *J Glaucoma* 2010;19:561-565.
119. Stritmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1993;90:1977-1981.
120. Castano EM, Prelli FC, Frangione B. Apolipoprotein E and amyloidogenesis. *Lab Invest* 1995;73:457-460.
121. Prasher VP, Sajith SG, Ress SD et al. Significant effect of APOE epsilon 4 genotype on the risk of dementia in Alzheimer's disease and mortality in persons with Down syndrome. *Int J Geriatr Psychiatry* 2008;23:1134-1140.
122. Klaver CC, Kliffen M, Van Duijn CM et al. Genetic Association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 1998;63:200-206.
123. Baird PN, Guida E, Chu DT et al. The epsilon2 and epsilon4 alleles of the apolipoprotein gene are associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1311-1315.
124. Utheim OA, Ritland JS, Utheim TP et al. Apolipoprotein E genotype and risk for development of cataract and age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol* 2008;86:401-403.

125. Al-Dabbagh NM, Al-Dohayan N, Arfin M et al. Apolipoprotein E polymorphisms and primary glaucoma in Saudis. *Mol Vis* 2009;15:912-919.
126. Yuan HP, Xiao Z, Yang BB. A study on the association of apolipoprotein E genotypes with primary open-angle glaucoma and primary angle-closure glaucoma in northeast of China. *Zhonghua Yam Ke Za Zhi* 2007;43:416-420.
127. Jia LY, Tam PO, Chiang SW et al. Multiple gene polymorphisms analysis revealed a different profile of genetic polymorphisms of primary open-angle glaucoma in northern Chinese. *Mol Vis* 2009;15:89-98.
128. Zetterberg M, Tasa G, Palmer MS et al. Apolipoprotein E polymorphisms in patients with primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2007;143:1059-1060.
129. Linner E, Popovic V, Gottfries CG et al. The exfoliation syndrome in cognitive impairment of cerebrovascular or Alzheimer's type. *Acta Ophthalmol Scand* 2001;79:283-285.
130. Janciauskiene S, Krakau T. Alzheimer's peptide: a possible link between glaucoma, exfoliation syndrome and Alzheimer's disease. *Acta Ophthalmol Scand* 2001;79:328-329.
131. Berlau J, Lorenz P, Beck R et al. Analysis of aqueous humour proteins of eyes with and without pseudoexfoliation syndrome. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001;239:743-746.
132. Li ZY, Streeten BW, Yohai N. Amyloid P protein in pseudoexfoliative fibrilloglycopathies. *Curr Eye Res* 1989;8:217-227.
133. Antoniadis T, Hatzis T, Kroupis C et al. Prevalence of factor V Leiden, Prothrombin G20210A, and MTHFR C677T Mutations in a Greek population of Blood Donors. *Am J Hematology* 1999;61:265-267.
134. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H et al. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *NEJM* 1997;337:230-236.
135. Perry IJ, Refsum H, Morris RW et al. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet* 1995;346:1395-1398.
136. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *NEJM* 1998;338:1042-1050.

137. Axer-Siegel R, Bourla D, Ehrlich R et al. Association of neovascular age-related macular degeneration and hyperhomocysteinemia. *Am J Ophthalmol* 2004;137:84-89.
138. Goldstein M, Leibovitch I, Yeffimov I et al. Hyperhomocysteinemia in patients with diabetes mellitus and without diabetic retinopathy. *Eye* 2004;18:460-465.
139. Flammer J, Orgul S, Costa VP et al. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 2002;21:359-393.
140. Lee DJ, Gomez-Marin O, Lam BL et al. Glaucoma and survival: the national health interview survey 1986-1994. *Ophthalmology* 2003;110:1476-1483.
141. Tokunaga T, Kashiwagi K, Tsumura T et al. Association between nocturnal blood pressure reduction and progression of visual field defect in patients with primary open-angle glaucoma or normal-tension glaucoma. *Jpn J Ophthalmol* 2004;48:380-385.
142. Glushchenko AV, Jacobsen DW. Molecular targeting of proteins by L-homocysteine: mechanistic implications for vascular disease. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:1883-98.
143. Moore P, El-sherbeny A, Roon P et al. Apoptotic cell death in the mouse retinal ganglion cell layer is induced in vivo by the excitatory amino acid homocysteine. *Exp Eye Res* 2001;73:45-57.
144. Bleich S, Junemann A, Von Ahsen N et al. Homocysteine and risk of open-angle glaucoma. *J Neural Transm* 2002;109:1499-1504.
145. Bleich S, Roedl J, Von Ahsen N et al. Elevated homocysteine levels in aqueous humor of patients with pseudoexfoliation glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2004;138:162-164.
146. Wang G, Medeiros FA, Barshop BA et al. Total plasma homocysteine and primary open angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2004;137:401-406.
147. Wierzbicki AS. Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Diad Vasc Dis Res* 2007;4:143-150.
148. Roedl JB, Bleich S, Reulbanch U et al. Homocystein in tear fluid of patients with pseudoexfoliation glaucoma. *J Glaucoma* 2007;16:234-239.
149. Leblhuber F, Walli J, Artner-Dworzak E. Hyperhomocysteinemia in dementia. *J Neural Transm* 2000;107:1469-1474.
150. Seshadri S, Beiser A, Selhub J. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002;346:476-483.

151. Junemann AG, Von Ahsen N, Reulbanch U et al. C677T variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2005;139:721-723.
152. Clement C, Goldberg I, Healey P et al. Plasma homocysteine, MTHFR gene mutation and Open-angle glaucoma. *Journal of glaucoma* 2009;18(1):73-78.
153. Lucero HA, Kagan HM. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:2304-2316.
154. Thomassin L, Werneck CC, Broekelmann T et al. The pro-regions of lysyl oxidase and lysyl oxidase-like 1 are required for deposition onto elastic fibers. *J Biol Chem* 2005;280:42848-42855.
155. Hirai M, Ohbayashi T, Horiguchi M et al. Fibulin-5/ DANCE has an elastogenic organizer activity that is abrogated by proteolytic cleavage in vivo. *J Cell Biol* 2007;176:1061-1071.
156. Liu X, Zhao Y, Gao J et al. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet* 2004;36:178-182.
157. Decitre M, Gleyzal C, Raccurt M et al. Lysyl oxidase- like protein localizes to sites of de novo fibrinogenesis in fibrosis and in the early stromal reaction of ductal breast carcinomas. *Lab Invest* 1998;78:143-151.
158. Hayashi K, Fong KSK, Mercier F et al. Comparative immunocytochemical localization of lysyl oxidase (LOX) and the lysyl oxydase-like (LOXL) proteins: changes in the expression of LOXL during development and growth of mouse tissues. *J Mol Histol* 2004;35:845-855.
159. Urban Z, Agapova O, Huchtagowder V et al. Population defferences in elastin maturation in optic head tissue and astrocyres. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:3209-3215.
160. Schlötzer-Schrehardt U, Pasutto F, Sommer P et al. Genotype-Related Expression of Lysyl Oxidase-like 1 in ocular tissues of patients with pseudoexfoliation syndrome/ glaucoma and Normal Patiens. *Am J Ophthalmol* 2008;173:1724-1735.
161. Hollö G, Gal A, Kothy P et al. LOXL1 gene sequence variants and vascular disease in exfoliation syndrome and exfoliative glaucoma. *J Glaucoma* 2011;20(3):143-7.

162. Liu Y, Schmidt S, Qin X et al. Lack of association between LOXL1 variants and primary open- angle glaucoma in three different populations. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:3465-3468.
163. Rao KN, Ritch R, Dorairaj SK et al. Exfoliation syndrome and exfoliation glaucoma- associated LOXL1 variations are not involved in pigment dispersion syndrome and pigmentary glaucoma. *Mol Vis* 2008;14:1254-1262.
164. Chakrabarti S, Rao KN, Kaur I et al. The LOXL1 gene variations are not associated with primary open- angle and primary angle- closure glaucomas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2343-2347.
165. Challa P. Genetics of pseudoexfoliation syndrome. *Current Opinion in Ophthalmology Issue* 2009;20:88-91.
166. Fingert JH, Alward WL, Kwon YH et al. LOXL1 mutations are associated with exfoliation syndrome in patients from the Midwestern United States. *Am J Ophthalmol* 2007;144:974-975.
167. Williams SE, Whigham BT, Liu Y et al. Major LOXL1 risk allele is reversed in exfoliation glaucoma in a South African population. *Mol Vis* 2010;16:705-712.
168. Abramsson A, Landgren S, Zetterberg M et al. No association of LOXL1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 2011;13:160-166.
169. Λιανίδου Ε.Σ. Τεχνικές Μοριακής Διαγνωστικής. Αθήνα, 2009.
170. Maxam A.M, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;74(2): 560-564.
171. Sanger F, Nicklen S, Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5463-5467.
172. Nyren P, Lundin A. Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Anal Biochem* 1985;151(2):504-509.
173. Next-generation genome, Editorial. *Nat Methods* 2008; 5(12):989.
174. Nielsen P.E, Egholm M et al. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 1991; 254(5037):1497-1500.
175. Myers R.M, Fischer S.G. et al. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1985;13(9):3111-3129.

176. Wartei R.M, Hosseini S.H, Moran C.P. Detecting base pair substitutions in DNA fragments by temperature-gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1990;18:2699-2705.
177. Li J, Wang L et al. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat Med* 2008;14(5):579-584.
178. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988; 60(20):2299-2301.
179. Wittwer C.T, Reed G.H et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 2003;49(6 Pt 1):853-860.
180. Schmittgen T.D. Real-Time Quantitative PCR. *Methods* 2001;25:383-385.
181. Burt C.A, Ashwood E.R, Bruns D.E. *Tietz Textbook of Clinical chemistry and molecular diagnostics* 2006; 4:1393-1445.
182. Evrard A, Boulle N, Lutfalla G.S et al. Nanoscience: Nanobiotechnology and Nanobiology. *Real Time PCR* 2010;15:845-869.
183. Kaltenboeck B, Wang C. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Adv Clin Chem* 2005;40:219-59.
184. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27(2-3):95-125.
185. Kroupis C, Christopoulos K, Devetzoglou M et al. Asymmetric real-time PCR detection of BRCA1 5382insC mutation by melting curve analysis in the LightCycler. *Clin Chim Acta* 2008;390(1-2):141-4.
186. Lyon E, Wittwer CT. LightCycler technology in molecular diagnostics. *J Mol Diagn* 2009;11(2): 93-101.
187. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2008;26(10):1135-1145.
188. European Glaucoma Society. *Terminology and Guidelines for Glaucoma*. Savona, Italy: DOGMA S.r.l. 2008; ch 1.4.3:87.
189. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215.
190. Wenham PR, Prince WH, Blundell G. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *Lancet* 1991; 337:1158-9.

191. Avramopoulos D, Mikkelsen M, Vassilopoulos D, Grigoriadou M, Petersen MB. Apolipoprotein E allele distribution in parents of Down's syndrome children. *Lancet* 1996;347:862-5.
192. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuve LP, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
193. Ryman N, Palm S, André C, Carvalho GR, Dahlgren TG, Jorde PE, Laikre L, Larsson LC, Palmé A, Ruzzante DE. Power for detecting genetic divergence: differences between statistical methods and marker loci. *Mol Ecol* 2006;15:2031-45.
194. Sole X, Guino E, Valls J et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006;22:1928-1929.
195. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 2007;39:175-91.
196. Wilcken B, Bamforth F, Li Z et al. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J Med Genet* 2003;40:619-625.
197. Junemann A, Bleich S, Reulbach U et al. Prospective case control study on genetic association of apolipoprotein epsilon2 with intraocular pressure. *Br J Ophthalmol* 2004;88:581-582.
198. Kim S, Kim Y. Variants in LOXL1 associated with exfoliation glaucoma do not affect amine oxidase activity. *Mol Vis* 2012;18:265-270.
199. Fan B, Pasquale LR, Rhee D et al. LOXL1 promoter haplotypes are associated with exfoliation syndrome in a U.S. Caucasian population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(5):2372-8.
200. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. Lawrence Erlbaum, Inc.,1988;New Jersey.
201. Borenstein M, Rothstein H, Cohen J. Power And Precision, Biostat, Inc.,2001;United States of America.

