

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Tamara Knežević

**Povezanost perifernih morfoloških
promjena mrežnice i genotipskih
promjena u bolesnika sa senilnom
makularnom degeneracijom**

DOKTORSKI RAD



Zagreb, 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Tamara Knežević

**Povezanost perifernih morfoloških
promjena mrežnice i genotipskih
promjena u bolesnika sa senilnom
makularnom degeneracijom**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.

Doktorski rad je izrađen na Klinici za očne bolesti Stomatološkog fakulteta, Kliničkom zavodu za kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu KBC-a Sestre milosrdnice u Zagrebu i Laboratoriju za genotipizaciju LGC Genomycs, Velika Britanija.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Zoran Vatavuk

Lektor doktorskog rada:
Anita Jureković, prof.

ZAHVALE:

Mentoru, prof.dr. sc. Zoranu Vatavuku na idejnoj i organizacijskoj podršci tijekom rađanja i stvaranja ove disertacije.

Prof. dr. sc. Thomasu Fribergu, na prilici za uključivanje u ovakav projekt.

Ivani Čelap, spec. medicinske biokemije i laboratorijske medicine na nesebičnoj pomoći, savjetima i produbljivanju uvida u svijet genetske medicine.

Dr. sc. Biljani Andrijević-Derk, na bezuvjetnoj podršci, pomoći i prijateljstvu.

Mome ocu, Petru Kneževiću, na nesebičnoj i bezuvjetnoj ljubavi, podršci i životnoj mudrosti.

Mojoj kćeri Luciji, za svjetlost i snagu koju mi daje na životnom putu.

Ovaj rad posvećujem svom ocu.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Senilna makularna degeneracija	1
1.1.1. Arhitektura mrežnice	1
1.1.2. Starenje i oko	7
1.1.2.1. Starenje i SMD	7
1.1.2.2. Strukturne i vaskularne promjene	7
1.1.2.3. Oksidativni stres.....	10
1.1.2.4. Parainflamatorna upalna reakcija	11
1.1.3. Epidemiologija SMD-a.....	12
1.1.4. Patogeneza SMD-a.....	12
1.1.5. Uloga sustava komplementa u patogenezi SMD-a.....	15
1.1.5.1. Sustav komplementa.....	15
1.1.5.2. Klasični put aktiviranja komplementa.....	17
1.1.5.3. Lektinski put aktiviranja komplementa	20
1.1.5.4. Alternativni put aktiviranja komplementa	20
1.1.5.5. Kontrola sustava komplementa	21
1.1.5.6. Uloga sustava komplementa u SMD-u	23
1.1.6. Klasifikacija, klinička slika i prirodni tijek SMD-a.....	25
1.1.7. Rizični čimbenici za razvoj SMD-a.....	28
1.1.7.1. Demografske karakteristike: dob, spol, rasa.....	28
1.1.7.2. Indeks tjelesne mase i hipertenzija.....	28
1.1.7.3. Pušenje	29
1.1.7.4. Genetski rizični čimbenici	30
1.2. Genetika SMD-a.....	31
1.2.1. Građa ljudskog genoma	31
1.2.2. Varijabilnost ljudskog genoma.....	32
1.2.3. Hardy-Weinbergova ravnoteža.....	34
1.2.4. Nukleotidni polimorfizmi u SMD-u.....	36

1.2.4.1.	Polimorfizmi gena za CFH na 1q31.3 kromosomu.....	36
1.2.4.2.	Polimorfizmi na 10q26 kromosomu	38
1.2.4.3.	Polimorfizmi gena za komplement faktor B i C2	38
1.2.4.4.	Polimorfizmi gena za komponentu komplementa 3 (C3).....	39
1.3.	Periferne promjene mrežnice	40
1.3.1.	Anatomija periferne mrežnice	40
1.3.2.	Degeneracije periferne mrežnice.....	41
1.3.2.1.	Benigne periferne degeneracije.....	41
1.3.2.2.	Maligne periferne degeneracije	45
1.3.3.	Pregled istraživanja povezanosti perifernih promjena mrežnice i genotipskih promjena u SMD-u	48
1.4.	Dijagnostičke metode u otkrivanju SMD-a	50
1.4.1.	Osobna i obiteljska anamneza	50
1.4.2.	Klinički pregled	50
1.4.3.	Optička koherentna tomografija (OCT)	51
1.4.4.	Fluoresceinska angiografija (FAG)	51
1.4.5.	Fotografija fundusa i usporedba konvencionalnih fundus kamera sa širokokutnom fundus kamerom (Optomap P200MA, Optos).....	52
1.4.6.	Indocijanin angiografija.....	54
1.5.	Liječenje SMD-a	55
1.5.1.	Sadašnji načini liječenja SMD-a	55
1.5.2.	Budućnost liječenja kliničkih oblika SMD-a	57
2.	HIPOTEZA, CILJ I SVRHA ISTRAŽIVANJA	60
2.1.	Hipoteza	60
2.2.	Ciljevi istraživanja	60
2.3.	Svrha istraživanja	61
3.	ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA.....	62
3.1.	Odabir ispitanika	62
3.2.	Anamneza i klinički pregled ispitanika	63
3.3.	Snimanje mrežnice širokokutnom fundus kamerom (Optomap P200MA, Optos).....	63

3.4.	Analiza snimaka učinjenih širokokutnom fundus kamerom	63
3.5.	Snimanje makularnog područja OCT metodom (Carl Zeiss Cirrus™ HD – OCT).....	65
3.6.	Genotipizacija.....	65
3.6.1.	Estrakcija DNK metodom na kolonama	66
3.6.2.	Genotipizacija metodom kompetitivne alel-specifične lančane reakcije polimeraze (KASP)	67
3.7.	Kriteriji za uključivanje i neuključivanje ispitanika u istraživanje	70
3.7.1.	Kriteriji za uključivanje ispitanika u SMD i kontrolnu skupinu	70
3.7.2.	Kriteriji za neuključivanje ispitanika u SMD i kontrolnu skupinu	70
3.8.	Statistička analiza.....	71
4.	REZULTATI.....	72
4.1.	Opći podaci	72
4.2.	Demografske karakteristike	74
4.3.	Raspodjela genotipskih promjena u ispitivanoj populaciji.....	75
4.4.	Raspodjela perifernih promjena mrežnice u ispitivanoj populaciji	77
4.5.	Raspodjela genotipskih promjena prema pojedinim perifernim promjenama mrežnice u ispitivanoj populaciji.....	84
4.6.	Predikcija prisustva pojedinih perifernih promjena s obzirom na prisustvo genotipskih promjena u ispitivanoj populaciji	97
4.7.	Prikaz MAF-ova i Hardy-Weinbergove ravnoteže pojedinih nukleotidnih polimorfizama u ispitivanoj populaciji.....	111
4.8.	Prikaz kappa vrijednosti u SMD i kontrolnoj skupini.....	114
5.	RASPRAVA.....	115
6.	ZAKLJUČAK	121
7.	SAŽETAK.....	123
8.	SUMMARY	125
9.	LITERATURA.....	128
10.	ŽIVOTOPIS	145

POPIS OZNAKA I KRATICA

SMD - senilna makularna degeneracija

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

CFH - komplement faktor H (*engl. Complement Factor H*)

PP - papilarni promjer, jedinica za definiranje veličine struktura i promjena mrežnice u svakodnevnoj oftalmološkoj praksi; 1PP=1,5 mm

RPE - sloj retinalnog pigmentnog epitela

SD-OCT - spektralna optička koherentna tomografija (*engl. Spectral-Domain Optical Coherent Tomography*)

CRP - C-reaktivni protein

TNF- α - čimbenik nekroze tumora (*engl. Tumour Necrosis Factor*)

IGF-I - inzulinu sličan čimbenik rasta (*engl. Insulin Like Growth Factor*)

PDGF - čimbenik rasta porijeklom iz trombocita (*engl. Platelet Derived Growth Factor*)

HGF - čimbenik rasta hepatocita (*engl. Hepatocyte Growth Factor*)

PEDF - čimbenik rasta porijeklom iz pigmentnog epitela (*engl. Pigment Epithelium Derived Growth Factor*)

MMP - metaloproteinaze

PED - odignuće retinalnog pigmentnog epitela (*engl. Pigment Epithelial Detachment*)

CNV - koroidalna neovaskularizacija (*engl. Choroidal NeoVascularization*)

MAC - kompleks koji napada staničnu membranu (*engl. Major Antigen Complex*)

MBL - manoza vezujući lektin (*engl. Mannose-Binding Lectin*)

CR1 - receptor za komplement (*engl. Complement Receptor 1*)

DAF - čimbenik ubrzanja raspada (*engl. Decay Accelerating Factor*)

RCA - regulatorski proteini aktivacije komplementa (*engl. Regulators of Complement Activation*)

SCR - ponavljajuće proteinske domene (*engl. Short Consensus Repeat*)

CSLO - konfokalna skenirajuća laserska oftalmoskopija (*engl. Confocal Scanning Laser Ophthalmoscopy*)

VEGF - vaskularni endotelni čimbenik rasta (*engl. Vascular Endothelial Growth Factor*)

bFGF - osnovni čimbenik rasta fibroblasta (*engl. basic Fibroblast Growth Factor*)

HWR - Hardy-Weinbergova ravnoteža

OR - omjer izgleda (*engl. Odd Ratio*)

1. UVOD

1.1. Senilna makularna degeneracija

Senilna makularna degeneracija (SMD) je multifaktorijalna neurodegenerativna bolest mrežnice i vodeći je uzrok nepovratnog gubitka vida u bolesnika starijih od 50 g. u razvijenim zemljama (1).

Usprkos brojnim istraživanjima, njena patogeneza ostaje i dalje najvećim dijelom nepoznanica (2).

Za SMD su karakteristične patološke degenerativne promjene smještene u makularnom području, zahvaćajući primarno sloj retinalnog pigmentnog epitela (RPE), Bruchove membrane (BM) i koriokapilarisa, a potom i funkcionalno najvažniji, sloj fotoreceptora.

Klinički SMD se dijeli u dva oblika: 80-90 % bolesnika razvija **suhi (ne-eksudativni)** oblik koji karakterizira rana pojava žućkastih sub-RPE depozita tzv. druza, a u kasnijim fazama razvoj geografske atrofije. S druge strane, 10-20 % bolesnika razvija **vlažni (eksudativni) oblik** koji karakterizira pojava koroidalnih neovaskularizacija (2).

Oba klinička oblika (geografska atrofija i koroidalne neovaskularizacije) mogu dovesti do dramatičnog pada vidne oštine, a time značajno narušiti kvalitetu života i socioekonomski status oboljelih od te bolesti.

1.1.1. Arhitektura mrežnice

Mrežnica je višeslojna unutarnja ovojnica očne jabučice i smatra se dijelom središnjeg živčanog sustava (3). Prostire se na 72% površine očne jabučice, što u promjeru iznosi 22 mm. Sadrži vidne stanice kao dio vidnog puta (bipolarne, horizontalne, amakrine, interpleksiformne i ganglijske stanice) i fotoreceptore (čunjiće i štapiće) čija je osnovna uloga procesuiranje svjetlosnih impulsa i detekcija svjetlosti, kontrasta, boje i pokreta.

Gledajući kliničku važnost struktura arhitekture mrežnice, može se reći da mrežnica polazi od vidnog živca smještenog u centru mrežnice i prostire se do nazubljene linije (*lat. orra serrata*) u prednjem dijelu očne jabučice. Anatomski se pojednostavljeno može podijeliti na makularno područje sa stražnjim polom i periferiju mrežnice. Središnja mrežnica je područje 6 mm cirkumferencijalno od

foveje do ekvatora, dok se područje između ekvatora i orre serate naziva perifernom mrežnicom. Nadalje, periferna mrežnica se može podijeliti na srednju periferiju, smještenu posteriorno od ekvatora i daleku periferiju, smještenu anteriorno od ekvatora. Srednja i daleka periferija se spajaju u liniji ekvatora (3).

Optička os oka je točka na polovici udaljenosti između vidnog živca i centra makule.

Ekvator mrežnice se definira kao kružnica s centrom u optičkoj osi oka.

Dio vidnog živca u centru mrežnice, jedino dostupnog kliničkom pregledu, nazivamo intraokularni dio vidnog živca ili tzv. papila ili glava vidnog živca (*lat. papilla nervi optici* PNO), duljine 1 mm i fiziološkog promjera 1,5 x 1,8 mm. PNO je građen od aksona ganglijskih stanica mrežnice uz dodatak astrocita, kapilarnih stanica i fibroblasta i anatomski je mjesto izlazišta nemijeliziranih živčanih vlakana iz stražnjeg dijela očne jabučice na putu prema orbiti i središnjem živčanom sustavu.

Temporalno od vidnog živca, između temporalnih ogranaka krvnih žila, smještena je makula ili žuta pjega (*lat. macula lutea*) - okruglo, avaskularno područje promjera oko 5,5 mm. Središnji dio makule je foveja (*lat. fovea centralis*), depresija mrežnice veličine do 1.5 mm u promjeru te njen najuži centar foveola, promjera 0,3-0,4 mm koji sadrži najveći broj i gustoću fotoreceptora čunjića odgovornih za centralnu vidnu oštrinu visoke rezolucije što funkcionalno omogućuje razlikovanje boja, čitanje i raspoznavanje finih detalja i lica.

U području foveje postoji tzv. fovealna avaskularna zona (FAZ), promjera do 0,5 mm koja se opskrbljuje isključivo krvlju iz koriokapilarne mreže i ima važno dijagnostičko i terapijsko značenje u brojnim bolestima mrežnice.

Makularno područje obiluje makularnim pigmentom ksantofilom (luteinom i zeaksantinom) s funkcijom zaštite od kratkih valnih duljina ultraljubičastih zraka i djelovanja slobodnih kisikovih radikala, tzv. bisretinoida, nusproizvoda vidnog ciklusa u stanicama retinalnog pigmentnog epitela (RPE) (19).

Mrežnica je vrlo aktivno metaboličko tkivo u kojem se kisik i hranjive tvari transportiraju putem dva neovisna krvožilna sustava: cirkulacija mrežnice opskrbljuje krvlju dvije trećine unutarnje mrežnice do unutarnjeg pleksiformnog sloja, dok je vanjska trećina mrežnice fiziološki avaskularna - transport nutrijenata i kisika teče preko koriokapilarne mreže, zahvaljujući visokom perfuzijskom tlaku koroidalnog sustava (3).

Funkcionalno gledajući, mrežnica je dio središnjeg živčanog sustava i sadrži tri neurona vidnog puta, direktno uključenih u prijenos vidnih informacija: 1. fotoreceptore - čunjiće i štapiće, 2. bipolarne stanice i 3. ganglijske stanice. Postoje još dvije vrste neurona, tzv. interneuroni - horizontalne i amakrine stanice koje imaju važnu ulogu u pojačavanju i inhibiciji pojedinih signala unutar sinapsi neurona vidnog puta.

U mrežnici postoji i potporni sustav stanica zadužen za održavanje arhitektonske strukture mrežnice, fagocitozu i prijenos neurotransmitera neurona vidnog puta i sačinjavaju ga Müllerove stanice, smještene u unutarnjoj i vanjskoj graničnoj membrani, astrociti, smješteni u sloju živčanih vlakana i

mikroglija koja se nalazi u svim slojevima mrežnice. Mikroglija ima mogućnost brze migracije i fagocitoze kao odgovor na stres i ozljedu tkiva (36).

Mrežnica je građena od dvaju listova: neurosenzorne mrežnice koja sadrži devet slojeva mrežnice i sloja RPE. Neurosenzorna mrežnica prianja čvrsto uz sloj RPE dok je on kao neophodan dio mrežnično - krvne barijere povezan čvrstim vezama s Bruchovom membranom (BM) i koriokapilarisom.

Gledano od unutrašnjosti oka prema žilnici, anatomsku arhitekturu mrežnice sačinjavaju sljedeći slojevi:

1. Unutarnja granična membrana (*lat. membrana limitans interna*) – bazalna membrana građena od Müllerovih stanica

2. Sloj retinalnih živčanih vlakana (*lat. stratum fibrarum opticarum*) – sloj živčanih vlakana, aksona ganglijskih stanica, trećeg neurona vidnog puta

3. Sloj ganglijskih stanica (*lat. stratum gangliosum*) – građen od tijela ganglijskih stanica, trećeg neurona vidnog puta

4. Unutarnji pleksiformni sloj (*lat. stratum reticulare internum*) – građen od sinapsi aksona bipolarnih stanica (drugog neurona vidnog puta) i dendrita ganglijskih i amakrinih stanica (trećeg neurona vidnog puta)

5. Unutarnji nuklearni sloj (*lat. stratum nuclearis internum*)- građen od tijela amakrinih, bipolarnih i horizontalnih stanica

6. Vanjski pleksiformni sloj (*lat. stratum reticulare externum*)– građen od guste mreže sinapsi dendrita horizontalnih stanica iz unutarnjeg nuklearnog sloja i unutarnjeg segmenta fotoreceptora iz vanjskog nuklearnog sloja

7. Vanjski nuklearni sloj (*lat. stratum nuclearis externum*)– građen od staničnih tijela fotoreceptora

8. Vanjska granična membrana (*lat. membrana limitans externa*) – sloj koji razdvaja unutarnji segment fotoreceptora od njihovog tijela

9. Sloj fotoreceptora (*lat. stratum neuroepitheliale*) – sloj građen od čunjića i štapića

Mrežnica sadrži dva tipa fotoreceptora: čunjiće i štapiće. Broj i distribucija ljudskih fotoreceptora je jedinstvena: sedam milijuna čunjića, smještenih većinom u središnjoj mrežnici je odgovorno za centralni vid, finu rezoluciju i kolorni vid te sadrži tri podvrste čunjića osjetljive na crveni, zeleni i plavi spektar svjetla i s druge strane, 75-150 milijuna štapića koji sadrže vidni pigment rodopsin, smješteni u perifernoj mrežnici, odgovorni za periferni vid, vid u sumrak (mezopički vid) i noćni vid (skotopički vid).

Fotoreceptori su građeni od unutarnjeg i vanjskog dijela.

Unutarnji dio (*engl. Inner Segment IS*) sintetizira fotopigment opsin koji se transportira u vanjski dio fotoreceptora (*engl. Outer Segment OS*), smješten uz sloj RPE-a u kojem se događa proces absorpcije fotona svjetla u procesu fototransdukcije: pretvaranja energije svjetlosnog fotona u energiju membranskog potencijala. Vidni pigment se regenerira u tzv. vidnom ciklusu u sloju RPE-a.

10. Sloj retinalnog pigmentnog epitela (*lat. stratum pigmentosum RPE*)

Sloj građen od jednog reda kuboidnih pigmentiranih stanica između neurosenzorne mrežnice i žilnice od iznimne je važnosti za homeostazu mrežnice. S obzirom na to da se radi o sloju pigmentnih stanica, RPE apsorbira svjetlosnu energiju, transportira ione, vodu, metaboličke produkte iz subretinalnog prostora u krv i preuzima hranjive tvari (glukozu, retinol, masne kiseline) iz krvotoka za fotoreceptore. Funkcija fotoreceptora uvelike ovisi o metabolizmu RPE-a: podražljivost fotoreceptora ovisi o mogućnosti reizomerizacije 11-cis retinala u RPE-u, stabilizaciji sastava iona u subretinalnom prostoru i fagocitozi vanjskih segmenata fotoreceptora.

RPE ima sposobnost lučenja raznih čimbenika rasta kojima se održava strukturalni integritet endotela koriokapilarisa i fotoreceptora i održava imunoprivilegiranost oka lučenjem imunosupresorskih čimbenika (4).

Apikalni dio RPE-a nalazi se u međufotoreceptorskom prostoru oblažući vanjske segmente fotoreceptora, međusobno povezane mrežom proteina i proteoglikana, poznate pod imenom interfotoreceptorski matriks (IPM) i ima kritičnu ulogu u fagocitozi i obnovi oljuštenih vanjskih segmenata fotoreceptora, što se smatra jednom od najznačajnijih funkcija RPE-a (5).

Stvaranjem mikrovila RPE-a, internalizacijom fagosoma i njihovim spajanjem s lizosomima u citoplazmi RPE-a, zaokružuje se proces fagocitoze vanjskog segmenta. Potpuna izmjena svih vanjskih segmenata fotoreceptora dogodi se svakih 8-13 dana. U slučaju disfunkcije RPE-a, oštećena je fagocitička aktivnost čime započinje degeneracija i odumiranje fotoreceptora (6-8).

U svom bazalnom dijelu, RPE se sastoji od bazalne membrane građene od ekstracelularnog matriksa (ECM) koji sadrži kolagen, laminin i heparan sulfat i anatomski i funkcionalno je dio BM, odvajajući RPE od fenestriranog endotela koriokapilarisa. RPE i ECM su povezani tzv. fokalnim adhezijama građenim od transmembranskih proteina integrina. Integrini sadrže vinkulin koji poput mostova povezuje citoskelet s jedne i ECM s druge strane. Površina bazalne membrane RPE-e je prožeta brojnim invaginacijama u kojima se odvija transport preko BM i koriokapilarisa (9,10).

BM je acelularna pentalamilarna strukturna potpora RPE-u i koriokapilarisu i građena je od bazalne membrane RPE-a, vanjskog kolagenog sloja, odijeljenog od unutarnjeg kolagenog sloja zonom elastičnih vlakana i sloja bazalne membrane endotelnih stanica koriokapilarisa (11).

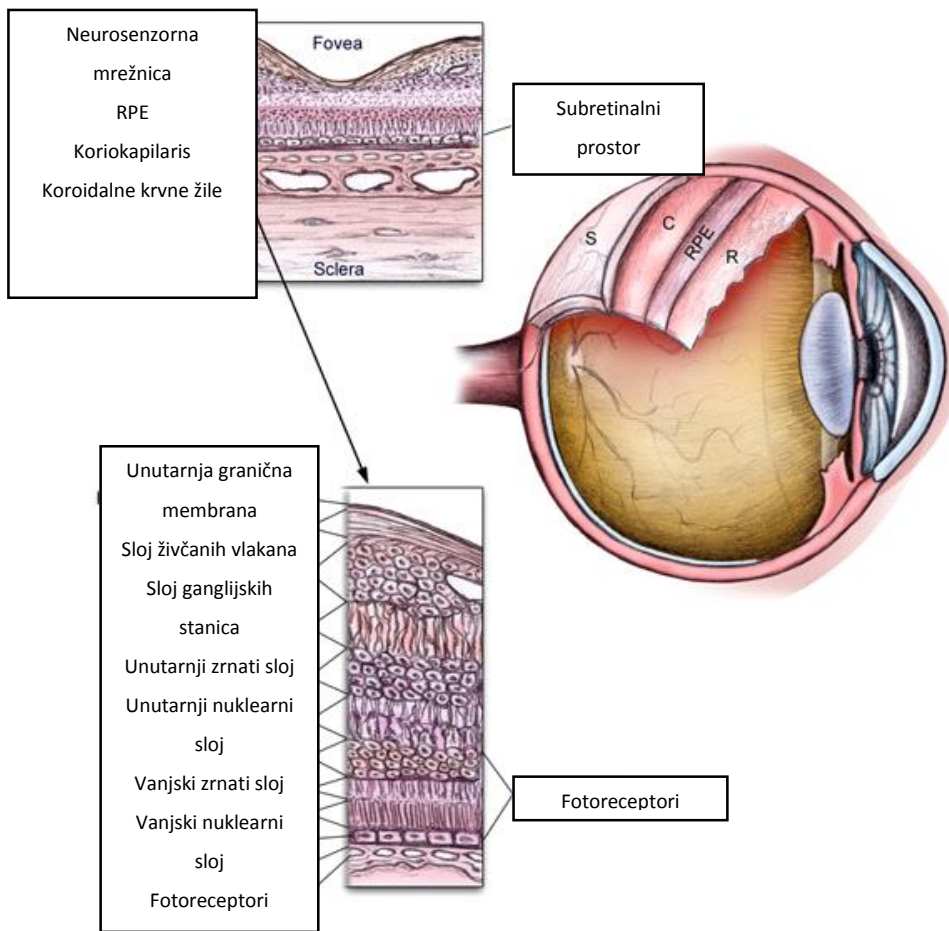
Da bi se detektirala svjetlost u mrežnici, odnosno apsorbiralo svjetlo u fotoreceptorima, potrebno je da fotoosjetljivi derivat vitamina A 11-cis retinal vezan uz opsin, prijeđe u izomer trans retinal. Time se aktivira opsin, protein koji pokreće aktivne signalne puteve i inicira proces fototransdukcije u fotoreceptorima. S obzirom da je apsorpcija svjetlosnih fotona kontinuirani proces i da bi se generiralo dovoljno 11-cis retinala za normalnu funkciju fotoreceptora, potrebno je ponovno pretvoriti sav trans-retinal u 11 cis-retinal putem niza enzimskih reakcija poznatih pod imenom vidni ciklus. Vidni ciklus započinje cirkuliranjem retinoida tj. otpuštanjem trans-retinala iz opsina i nakon redukcije u trans-retinol, transportira se uz pomoć međufotoreceptorskog proteina koji veže retinoide (*engl. Interphotoreceptor Binding Protein IRBP*) u subretinalni prostor i ulazi u stanicu RPE-a. RPE je glavno mjesto za regeneraciju 11-cis retinala u vidnom ciklusu u tri koraka koji se potom vraća u fotoreceptore (4,12,13).

Epitelne stanice RPE-a na svojim lateralnim stranama povezane su čvrstim vezama. Od apikalne prema bazalnoj strani, stanice su povezane vanjskim listovima staničnih membrana (*lat. zonula occludens*), staničnim mikrofilamentima (*lat. zonula adherens*) i dezmosomima (*lat. macula adherens*). U literaturi se spominje i četvrta međustanična veza unutar zonula occludentes građena od koneksona koji povezuju lateralne strane epitelnih stanica (14,15).

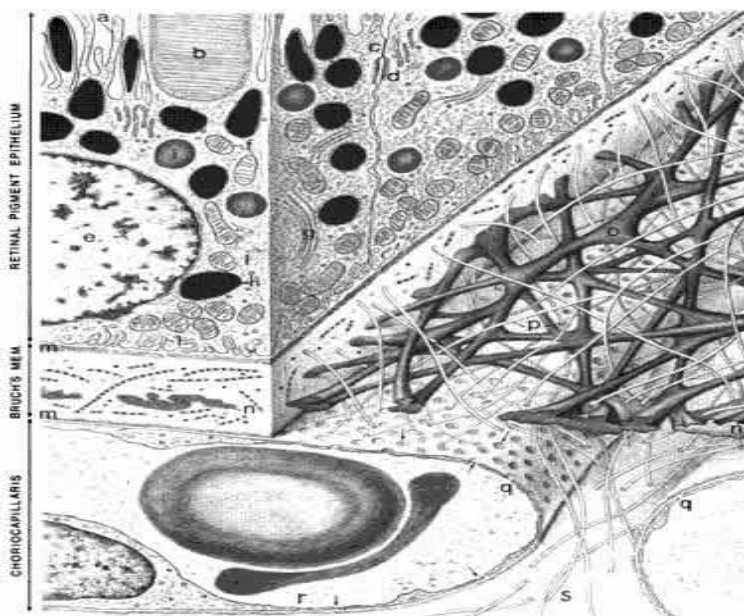
Takve čvrste veze između stanica RPE-a i semipermeabilnost BM važan su dio održavanja homeostaze mrežnice i čine tzv. vanjsku hematoretinalnu barijeru.

Osim vanjske, oko posjeduje i unutarnju hematoretinalnu barijeru građenu od čvrstih veza (*lat. „zonulae occludentes“*) između vaskularnih endotelnih stanica mrežnice, pericita, astrocita i Müllerovih stanica. Obje barijere čine oko nepropusnim za brojne molekule, uključujući i lijekove (15).

Slika 1. Slojevi mrežnice (preuzeto iz Clinical Ophthalmology, TD Duane i suradnici)



Slika 2. Sloj RPE-BM-koriokapilaris (preuzeto iz Clinical Ophthalmology, TD Duane i suradnici)



1.1.2. Starenje i oko

1.1.2.1. Starenje i SMD

Starenje je proces postupnih i spontanijih promjena koji dovodi do progresivnog slabljenja fizioloških funkcija, propadanja tkiva i organa i u konačnici, do potpunog gubitka funkcije, bolesti i smrti.

SMD je bolest oka koje stari. Opće je prihvaćena činjenica da se u osoba mlađih od 50 g. gotovo nikad ne pojavljuju klinički simptomi i znakovi ove bolesti. U većini kliničkih studija, ispitanici su stariji od 65 godina. Isto tako je poznato da bolest ne počinje virusnom infekcijom, ozljedom ili ishemijom, već se radi o subkliničkoj upali koja se razvija godinama prije pojave bolesti. No čak i tada mnogi bolesnici ne razviju znakove bolesti.

Iako proces biološkog starenja podrazumijeva stanovite strukturne, vaskularne i metaboličke promjene u makularnom području osobito na razini RPE-a i BM koje ne dovode uvijek do pojave SMD-a, brojni su dokazi u literaturi da te iste promjene mogu narušiti okularnu homeostatsku ravnotežu i uz djelovanje okolišnih i genetskih čimbenika dovesti do razvoja SMD-a. S povećanjem dobi smanjuje se broj fotoreceptora, povećava debljina BM, stanjuje žilnica i formiraju se tvrde druze na periferiji mrežnice. U SMD-u te se promjene pogoršavaju, uz pojavu novih patoloških promjena kao što su meke druze, koroidalne neovaskularizacije i pada vidne oštine. Parainflamatorne promjene u kojima se pokušava očuvati homeostaza tkiva i metabolička funkcija kao odgovor tkiva na oksidativni stres praćene su povišenom razinom upalnih citokina i aktivacijom retinalne mikro- i makroglije te su prijelazno stanje između normalnog stanja i upale. Takva vrsta minimalnog kroničnog upalnog odgovora postupno se pojačava i aktivacijom sustava komplementa započinje progresija biološkog procesa starenja u bolest poznatu pod imenom SMD (16, 36, 43).

1.1.2.2. Strukturne i vaskularne promjene

Biološko starenje RPE-a i Bruchove membrane podrazumijeva strukturne i vaskularne promjene: strukturne promjene stanica prvenstveno zahvaćaju RPE-BM-koriokapilaris kompleks. Broj stanica RPE-a se smanjuje; povećava se stanični pleomorfizam i smanjuje koncentracija melanina na stražnjem polu. S dobi RPE stanice nakupljaju metabolički otpad kao nusproizvod nepotpune razgradnje fagocitiranih dijelova fotoreceptora. U prilog tome ide činjenica da se koncentracija lipofuscina, glavnog sastojka metaboličkog debrisa, značajno povećava s dobi. U biološkom starenju povećava se razgradnja masnih kiselina u procesu lipidne peroksidacije. S druge strane, niska koncentracija O₂, povišena razina lipofuscina i masnih kiselina u mrežnici s ekspozicijom UV zrakama

(osobito zrakama s kratkom valnom duljinom npr. plavog spektra) dovodi do oksidativnog stresa stanica RPE-a putem proizvodnje metabolita retinoidnog vidnog ciklusa tzv. fototoksičnog bisretinoida A2E i njegovih metabolita i dokozaheksanoične kiseline (DHA) kao proizvoda lipidne peroksidacije (2,4,19,20). A2E se nakuplja u mitochondrijskim membranama RPE stanica i uzrokuje nastanak slobodnih kisikovih radikala čime se utire put apoptozi stanica RPE-a (31, 32). Oštećene stanice RPE-a pokreću aktivaciju alternativnog sustava komplementa. Kao posljedica oksidativnog stresa i hiperaktivnosti sustava komplementa, stvara se „circulus vitiosus“ čime fiziološki procesi starenja, udruženi s okolišnim i genetskim rizičnim čimbenicima, postaju početna karika u patofiziološkom lancu nastanka SMD-a (31, 32).

Oštećenje stanica RPE-a dovodi do stvaranja abnormalnog ekstracelularnog matriksa (ECM), čime se dodatno pogoršava normalni metabolizam pigmentnog epitela, uzrokujući geografsku atrofiju i gubitak koriokapilarisa. Oštećene stanice RPE-a stvaraju čimbenike rasta koji mogu dovesti do razvoja koroidalnih neovaskularizacija.

Ubikvitin je intracelularni protein pronađen u ganglijskim stanicama, stanicama RPE-a i subretinalnim depozitima. On omogućava proteolitičku degradaciju proteina čime se sprječava njihova agregacija u citoplazmi. S dobi, proces ovog zaštitnog mehanizma biva kompromitiran porastom razine oksidiranog glutationa, čime se omogućuje subretinalna akumulacija proteinskog debrisa epitela (16).

Druze su subretinalni žučkasti depoziti celularnog debrisa, lipida, lipoproteina i amiloidnog depozita koji se javljaju s dobi i dijele su u nekoliko kategorija, ovisno o svom izgledu i veličini. Tvrdе druze su veličine do 63 μm i imaju oštre granice. Meke druze koje se ne smatraju normalnim nalazom obično su veće od 125 μm i imaju nejasne granice. Bazalni linearni depoziti su građeni od membranoznog materijala u unutarnjem kolagenim slojevima BM, dok su bazalni laminarni depoziti građeni od kolagena i amorfnog detritusa smještenog između bazalne membrane i RPE-a. Debljina druzi je u korelaciji s degeneracijom RPE, fotoreceptora i gubitka vidne oštine. Jedino se tvrde druze smatraju znakom normalnog starenja. U Copenhagen Eye City Study je dokazano da je nakon 14 godina praćenja, samo 2,9% ispitanika s nalazom tvrdih druzi razvilo geografsku atrofiju ili CNV u odnosu na ispitanike s mekim druzama koji su razvili geografsku atrofiju u 34,4%, odnosno CNV u 53,1% slučajeva (43).

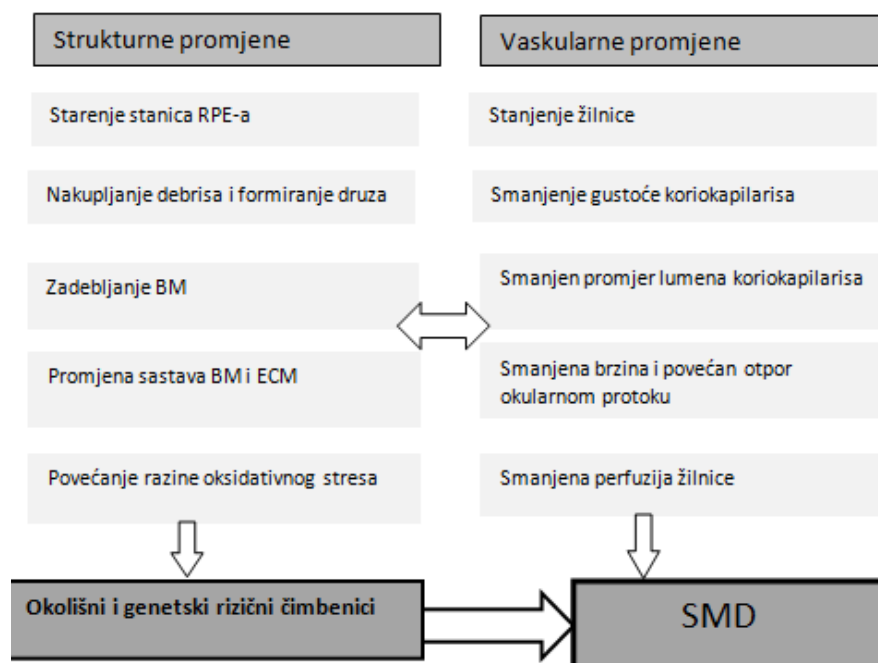
BM je sloj koji regulira metaboličku i ionsku ravnotežu između RPE-a i koriokapilarisa.

S dobi, BM povećava debljinu od 2 μm u prvom desetljeću do 5 μm u desetom desetljeću života. Te promjene zahvaćaju elastične i kolagene slojeve BM i posljedično tome dolazi do smanjene degradacije i povećane proizvodnje ECM. S dobi se povećava razina inaktivnog oblika tkivnih metaloproteinaza MMP-2, MMP-9 i tkivnog inhibitora MMP-a TIMP-3 koje povećavaju degradaciju ECM, čime se lako formiraju pukotine u BM-u i utire slobodan put za razvoj neovaskularizacija (16, 46).

Uočeno je da je s dobi povećana i količina lipidnih depozita, heparan sulfata, laminina, fibronektina i glikozaminoglikana u BM. Povećava se i akumulacija lipidnih estera. Time povećanje debljine,

promjena molekularnog sastava i elekričnog naboja BM, dovode do gubitka permeabilnosti BM čime se pogoršava protok hranjivih tvari iz koriokapilarisa u RPE, a što ugrožava homeostazu RPE-a. Tijekom biološkog procesa starenja, uočene su i značajne vaskularne promjene koriokapilarne mreže. Gustoća kapilarne mreže se smanjuje za 45%, promjer lumena kapilara za 34% i smanjuje se broj arteriola (16). Na animalnim modelima dokazano je da se s dobi smanjuje pulsatilni okularni protok za 35-42% i povećava okularni vaskularni otpor za 57-93 % (37). Time se povećava osmotski gradijent i smanjuje koroidalna perfuzija u stanicama RPE-a, što uzrokuje ishemiju lokalnog tkiva i povećava oksidativni stres, a time smanjenje metaboličke funkcije, nakupljanje debrisa i stvaranje druzi. Dokazano je da su s dobi promjene prisutne i na mitohondrijskoj razini: smanjuje se broj i površina mitohondrija, povećan je gubitak krista i gustoća tijela mitohondrija i prisutna destrukcija mitohondrijskih membrana (46). Kao posljedica visoke metaboličke aktivnosti, ekspozicije UV zračenju, akumulacije lipofuscina u stanicama RPE-a, smanjenja protuoksidacijskih mehanizama i promijenjene koroidalne hemodinamike, povećava se stres endoplazmatskog retikuluma i smanjuje sposobnost autofagije. Time se zapravo povećava razina oksidativnog stresa i pojačava razina imunološke reakcije, što narušava homeostatsku ravnotežu i potiče apoptozu stanica mrežnice, osobito RPE-a (16, 31, 32, 46).

Slika 3. Proces biološkog starenja oka (preuzeto iz Ehrlich i suradnici)



1.1.2.3. Oksidativni stres

1956. godine američki liječnik Deman Harman objavio je univerzalnu hipotezu starenja tzv. „teoriju slobodnih radikala“ prema kojoj je starenje posljedica narušene ravnoteže slobodnih kisikovih radikala (*engl. Reactive Oxygen Species ROS*), proizvoda oksidativne fosforilacije u mitohondrijima stanica i protektivnih antioksidativnih metabolita, što posljedično dovodi do oštećenja tkiva (34).

Mrežnica je jedno od tkiva s najvećom potrošnjom kisika u ljudskom organizmu (35).

Najviše razine kisika se nalaze u žilnici, no unutar slojeva mrežnice, osobito prema njenoj unutrašnjosti i unutrašnjem dijelu fotoreceptora koji sadrže visoku koncentraciju nezasićenih masnih kiselina, gradijent koncentracije kisika pada. Takav mikrookoliš, uz obilje fotoosjetljivih tvari i izlaganja dnevnom svjetlu zahtijeva vrlo visoki stupanj oksigenacije tkiva. Zahvaljujući prisustvu antioksidansa i mehanizama reparacije tkiva, posljedice oksidativnog stresa i oštećenja svedene su na najmanju moguću mjeru (36).

U procesu starenja koji dovodi do smanjenja okularnog protoka i povećanja vaskularnog otpora, dolazi do hipoksije vulnerabilnih tkiva kao što su fotoreceptor-BM-koriokapilaris kompleks i povećane proizvodnje ROS-a. S dobi se smanjuje razina zaštitnih antioksidansa kao što su vitamin C i E i povećava razina lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija je proces lančanih reakcija u kojima oksigenirani metaboliti u kemijskoj reakciji s masnim kiselinama (dokozaheksanoična, linoleična i arahidonska kiselina) proizvode elektrofilne aldehide i slobodne radikale (ROS), što je izrazito štetno za stanične funkcije kao što su integritet, protok i funkcija stanične membrane (37). Tijekom procesa lipidne peroksidacije dolazi do nakupljanja A2E i DHA u stanicama RPE-a i nastanka proapoptotički reaktivnih kisikovih radikala i toksičnih produkata lipidne peroksidacije tzv. DHA-karboksietilpirola (DHA-CEP), poznatog pod imenom CEP-protein. CEP protein je imunoreaktivan, može aktivirati sustav komplementa i time uzrokovati apoptozu stanica RPE-a (41, 42). Paralelno ovom procesu, postoji još nekoliko metaboličkih puteva kojima nastaje ROS u stanicama RPE-a: sustav komplementa aktivira fagocite koji putem mijeloperoksidaze arahidonsku kiselinu pretvaraju u hidroksispojeve i ROS; potom metabolički put posredovan ksantin oksidazom – u stanju ishemije tkiva, dolazi do stvaranja hipoksantina, ksantina, urične kiseline i ROS-a koji se posredstvom metaboličkog puta ovisnog o željezu pretvaraju u vodikov peroksid i hidroksiradikale. Fagocite aktivira sustav komplementa, arahidonska kiselina ili oksidativno oštećenje tkiva i počinju proizvoditi vodikov peroksid koji se transformira u kloroksid, što dovodi do direktnog oštećenja stanica RPE-a (36). Lipofuscin, uz pomoć svjetla, također proizvodi ROS što uzrokuje smanjenje lizosomske aktivnosti, pojačava lipidnu peroksidaciju, smanjuje fagocitozu i time dovodi do apoptoze stanice RPE-a, a s vremenom do smrti fotoreceptora i gubitka vidne funkcije. Čimbenici rizika koji još dodatno pogoršavaju oksidativni stres su zračenje, dob, upala, pušenje i reperfuzijska ozljeda (36, 38).

1.1.2.4. Parainflamatorna upalna reakcija

Parainflamatorna reakcija je minimalna kontrolirana imunološka reakcija tkiva kojom lokalni tkivni imunološki sustav odgovara na reparaciju tkiva, djelujući između aktivnog i inaktivnog stanja, u stanjima oksidativnog stresa, hiperglikemije ili hiperkolesterolemije s ciljem održanja funkcionalnosti i homeostaze (39). Parainflamatorna reakcija će prijeći u kroničnu upalu ako stanje smanjene funkcije ili poremećene homeostaze traje dulje vrijeme. U bolestima kao što diabetes mellitus tipa 2, aterosklerozi i neurodegenerativnim bolestima, dokazana je disregulacija parainflamatorne imunološke reakcije. Isto tako je poznato da su u procesu starenja u mrežnici, glavni uzroci tkivnog stresa i okidači parainflamatorne reakcije apoptoza retinalnih stanica, oksidirani lipoproteini i slobodni kisikovi radikali. Kao dio parainflamatornog odgovora, na animalnim modelima je dokazana aktivacija, subretinalna migracija i akumulacija retinalne mikroglije koja fagocitira dio lipofuscina u subretinalnom prostoru. Mikroglija u dodiru s RPE-om potiče proizvodnju i sekreciju proupalnih i angiogenih čimbenika koji sudjeluju u patogenezi SMD-a (39, 40, 46).

Promjene su prisutne i u retinalnoj makrogliji: Müllerove stanice su mjesto nakupljanja biljega oksidativnog stresa tzv. glijalnog fibrilarnog proteina (*engl. Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP*). Njegova ekspresija se povećava starenjem i koncentracija je značajno viša u područjima geografske atrofije tkiva gdje Müllerove stanice, s ciljem održavanja imunoprivilegiranosti oka, hipertrofiraju i proliferiraju u tzv. procesu reaktivne glioze. Müllerove stanice imaju sposobnost kemotaksije makrofaga i mikroglije što pojačava imunološki odgovor lokalnog tkiva i ima za posljedicu apoptozu fotoreceptora. Dokazano je i da se u procesu reaktivne glioze luče čimbenici rasta kao što su čimbenik rasta fibroblasta (*engl. Fibroblast Growth Factor, FGF-2*) i neurotrofički čimbenik rasta porijeklom od glijalnih stanica (*engl. Glial Cells Derived Neurotrophic Factor, GDNF*) koji imaju funkciju sprječavanja procesa umiranja stanica fotoreceptora (41).

Starenjem se događaju i morfološke promjene astrocita: smanjuje se njihov broj i gustoća filamenata te povećava broj staničnih organela čime se pokušava nadoknaditi smanjenje broja astrocita (40, 46). Parainflamatorne promjene su prisutne i u tkivu žilnice u obliku zadebljanja i fibroze koroidalnog tkiva, povećanog broja CD45(+)CR1g(+) makrofaga, morfoloških abnormalnosti melanocita. Isto tako je prisutan slom hematoretinalne barijere i aktivacija komplementa na razini RPE-a i BM (40, 46).

U procesu biološkog starenja događaju se promjene i u sustavu komplementa: u kultiviranim stanicama RPE-a dokazana je povećana aktivacija sustava komplementa i povećanje razine pojedinih komponenata komplementa u tkivima RPE i BM: čimbenika H (CFH), B (CFB) i C3 (40, 46).

Na animalnim modelima dokazana je povećana ekspresija CFH s ciljem sprječavanja aktivacije sustava komplementa kao imunološkog odgovora na proupalna oštećenja tkiva, čime se pokušava održati ravnoteža. Povećava se razina proupalnih citokina kao što su čimbenik nekroze tumora TNF- α (*engl. Tumor Necrosis Factor*) i interleukina (IL-6) i smanjuje razina protektivnih citokina (IL-10, IL-

4) čime se uz oksidativni stres i aktivaciju mikro- i makroglije te sustava komplementa narušava delikatna zaštita i ravnoteža i omogućuju patološke promjene karakteristične za SMD (42, 46).

1.1.3. Epidemiologija SMD-a

SMD je vodeći uzrok ireverzibilnog gubitka vidne oštine u razvijenim zemljama i treći uzrok sljepoće u svijetu (1,17,18). Prema podacima iz EUREYE study, prevalencija SMD-a u europskoj populaciji u dobi većoj od 65 g. iznosi 3,3% (19), eksudativne SMD 2.3%, dok je u sjevernoameričkoj populaciji ukupna prevalencija SMD-a u populaciji starijoj od 40 g. iznosila 6,5%, od čega 0.8% otpada na eksudativni SMD. SMD je bila uzrokom značajnog gubitka vida, u 46% slučajeva u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) (20). Prevalencija, incidencija i progresija rastu s dobi. Prema Beaver Eye Dam Study u kojoj su većinom sudjelovali ispitanici bijele rase, prevalencija bilo kojeg kliničkog oblika SMD-a je iznosila manje od 10% u dobi od 43- 54 godine života i više od 30% u dobi od 75-85 godina. Beaver Eye Dam studija je pokazala da progresija bolesti u 10- godišnjem vremenskom intervalu je najznačajnija u ovoj drugoj dobnoj skupini i iznosi 46% (106).

Prema posljednjim podacima, ukupna prevalencija SMD-a u svijetu je 8,7% i s obzirom na to da svjetska populacija ima sve dulji životni vijek, procjenjuje se da će 2020.g. 196 milijuna ljudi oboljeti od ove bolesti, što ju svrstava u jedan od najznačajnijih svjetskih zdravstvenih problema današnjice (21).

1.1.4. Patogeneza SMD-a

Biološkim starenjem progresivno degeneriraju stanice RPE-a što je najraniji i prijelomni trenutak u razvoju SMD-a (22).

Pet ključnih patogenetskih procesa: oksidativni stres, lipofuscinogeneza, družogeneza, upala i razvoj neovaskularizacija dovode do razvoja suhe (ne-eksudativne, geografske atrofije) ili vlažne (eksudativne) degeneracije makularnog područja (2,16, 22, 34, 36, 46).

Brojni su dokazi da je oksidativni stres osnovni patogenetski proces u nastanku SMD-a. Okolišni čimbenici kao pušenje značajno povećavaju rizik od nastanka SMD-a (130, 133, 134) dok antioksidansi kao dodaci prehrani smanjuju rizik od nastanka bolesti (119, 125). Postmortem analiza je dokazala da je u BM donora postojala ekstracelularna akumulacija peroksidiranih lipida i da je

antioksidativni kapacitet obrnuto proporcionalan dobi, debljini BM i gustoći fotoreceptora (46). Biljezi oksidativnog stresa, ukupni oksidativni stres i ukupni antioksidativni kapacitet bili su značajno povišeni u ispitanika sa SMD-om u odnosu na ispitanike iz kontrolne skupine u kliničkim studijama (31, 32, 35, 36, 38, 44).

Lipofuscinogeneza je proces nakupljanja lipofuscina u lizosomima stanica RPE-a i dio je normalnog procesa starenja. Lipofuscin je pigmentna granula građena od produkata lizosomske digestije, prvenstveno lipida 50%, proteina 44%, fotocitotoksičnih produkata lipidne peroksidacije, a znak je oštećenja rada mitohondrija i membrana postmitotičkih stanica RPE-a (24).

Lipofuscin je visoko reaktivni pigment u kojem se fotooksidacijom bisretinoidnih fototoksičnih spojeva (A2E) formiraju izrazito proapoptotički reaktivni kisikovi radikali i toksični produkti lipidne peroksidacije tzv. DHA-karboksietilpirol (DHA-CEP) poznat pod imenom CEP-protein čija je imunoreaktivnost u SMD tkivima, u odnosu na normalna retinalna tkiva dokazana u brojnim radovima (44, 45, 46).

Funkcionalno-metaboličke promjene stanica RPE-a i lipofuscinogeneza tijekom vremena dovode do ljuštenja dijelova citoplazme bazalne površine RPE-stanica, stvaranja tzv. bazalnih depozita i sekvestracije debrisa iz oštećenih stanica RPE-a u prostor između bazalne membrane RPE-a i unutarnjeg kolagenog sloja Bruchove membrane. Celularni debris aktivira kronični lokalni imunološki odgovor i postaje „ciljem“ enkapsulacije brojnih upalnih medijatora što se smatra inicijalnim događajem druzogeneze (23, 29).

Druzogeneza je kompleksni i multifaktorijski proces stvaranja i nakupljanja amorfni depozita ekstracelularnog matriksa (ECM) tzv. druzi između sloja RPE stanica i unutarnjeg kolagenog sloja Bruchove membrane tijekom dugog niza godina što se uz pojavu pigmentnih abnormalnosti smatra glavnim rizičnim čimbenikom za razvoj uznapredovalih stadija SMD-a (25, 26, 28). Sama pojava nekoliko malih druzi $\leq 63 \mu\text{m}$ ne znači dijagnozu SMD-a: prema podacima iz Beaver Dam i Blue Mountain studija, jedna ili više malih druzi su nađene u 95.5-98% ispitivane populacije; tek pojava druzi $\geq 63 \mu\text{m}$ i mekih druzi može dovesti do razvoja geografske atrofije ili eksudativne makulopatije (27, 28). Formiranje druzi uzrokuje separaciju sloja RPE od sloja fotoreceptora i time poremećen transport nutrijenata važnih za rad fotoreceptora (kisik, vitamin A), aktivaciju imunološke reakcije i lokalnog upalnog odgovora (29, 30).

Proteomske i imunohistokemijske studije analize sastava druzi otkrile su da druze sadrže brojne proteine akutne faze (vitronektin, α -antikimotripsin, CRP, amiloid-P, fibrinogen, protrombin), proteine remodeliranja tkiva nakon ozljede (ApoE), komponente sustava komplementa (C3a, C3b, C5a, kompleks C5b-C9), njihove regulatorne proteine (CFH, Apo-J protein, CD46 membranski koregulacijski protein, CR1 receptor komplementa) i aktivatore sustava komplementa (celularni debris) čime je direktno dokazano da su druze nusproizvod lokalnog upalnog odgovora na oštećenje RPE stanica i BM te da je lokalna imunološka reakcija i aktivacija sustava komplementa jedan od prijelomnih trenutaka u patogenezi SMD-a. Brojni su dokazi u literaturi da disregulacija sustava

komplementa s nekontroliranom aktivacijom i proizvodnjom C5b-C9 kompleksa komplementa aktivno pridonosi druzogenezi, degeneraciji RPE-a i fotoreceptora i disrupciji BM (29, 48-51, 79).

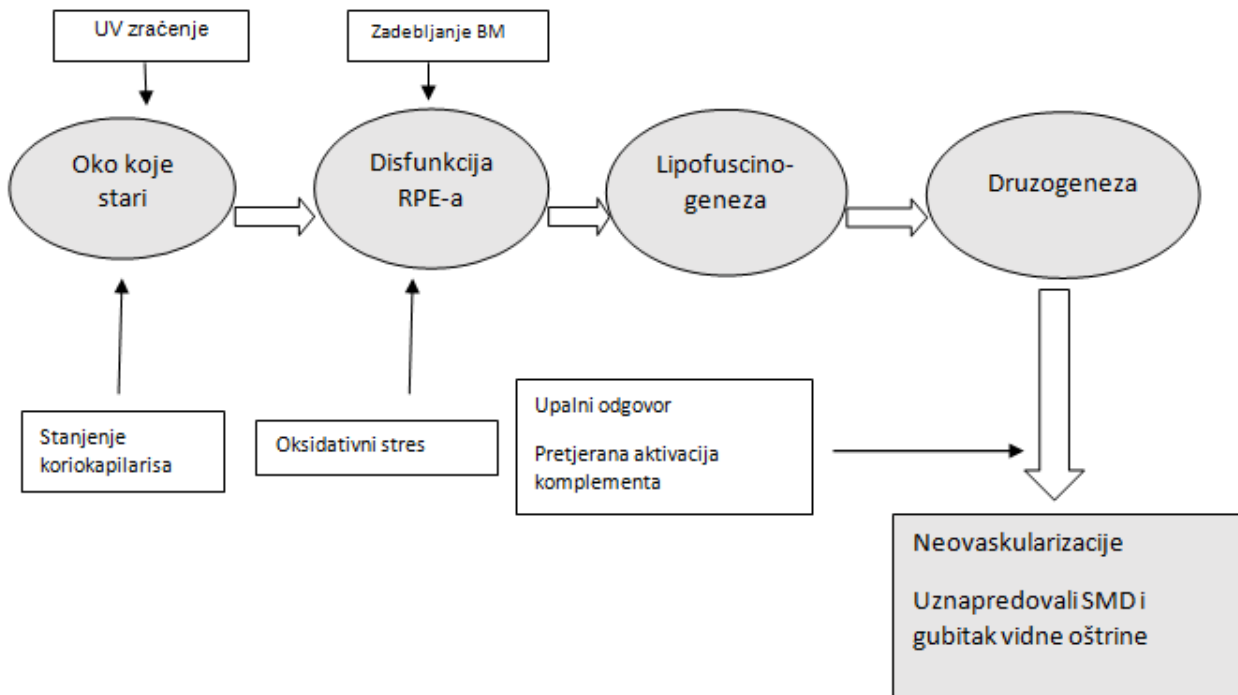
Slični patogenetski procesi su poznati u aterosklerozi, Alzheimerovoj bolesti i glomerulonefritisu u kojima akumulacija netopivih ekstracelularnih depozita vodi do lokalnog upalnog odgovora i aktivacije komplementa (50-52).

Kao posljedica akumulacije ekstracelularnog debrisa dolazi do zadebljanja BM i smanjenja propusnosti za hranjive tvari u i iz RPE sloja kroz BM. To uzrokuje metabolički distres RPE stanica i uz smanjeni protok krvi u koroidalnoj cirkulaciji ima za posljedicu razvoj hipoksije retinalnog i koroidalnog tkiva i lokalne upale s nakupljanjem upalnih stanica (neutrofila, makrofaga, mastocita, mikro- i makroglije) čime se otvara put k retinalnoj i koroidalnoj angiogenezi (53).

Angiogeneza je važan evolucijski mehanizam tijekom embrionalnog razvoja i reparacije oštećenih tkiva i događa se u svim tkivima ljudskog organizma. Patogeneza nije u potpunosti razjašnjena, no glavnim „okidačem“ se smatra hipoksija i kronična ozljeda tkiva. U uvjetima tkivne hipoksije, kao što je to u retinalnom i koroidalnom tkivu, u stanicama RPE-a povećava se proizvodnja proangiogenih čimbenika (VEGF, HGF, TNF- α , PDGF, IL-8, angiopoetina) ili smanjuje proizvodnja protuangiogenih čimbenika (PEDF, TGF- β , angiostatina, endostatina, TIMP). Proangiogeni čimbenici rasta, prvenstveno vaskularni endotelni čimbenik rasta (*engl. Vascular Endothelial Growth Factor* VEGF) vežu se za receptore tirozin kinaze (VEGFR-1 i 2) na endotelnim stanicama i uzrokuju povećanu ekspresiju integrina, transmembranskih receptora na endotelnim stanicama, važnim za adherenciju stanica za ECM i proteinaza (serin proteinaza, MMP i uPA) koje sudjeluju u razgradnji ECM-a i kapilarne bazalne membrane. Nakon što integrini i proteinaze liziraju ECM, omogućena je migracija i proliferacija endotelnih stanica i nastanak lumena novih krvnih žila što se smatra ključnim korakom angiogeneze.

Nastanak koroidalnih neovaskularizacija (CNV) glavni je uzrok dramatičnog pada vidne oštrine u bolesnika sa SMD-om. Porijeklom iz koroidalnih krvnih žila CNV urastaju kroz pukotine BM u prostor smješten ispod RPE-a. Novonastale krvne žile su povećane vaskularne permeabilnosti, lako krvare i time dolazi do nakupljanja seruma ili krvi ispod RPE-a, što uzrokuje odignuće RPE-a (PED). Daljnjim napredovanjem, neovaskularizacije dolaze do subretinalnog prostora gdje nakupljanje tekućine i krvi u bolesnika uzrokuje iskrivljenje linija predmeta, stanje poznato pod imenom metarmofopsija. Time CNV značajno pridonose padu vidne oštrine u takvih bolesnika (54-56).

Slika 4. Proces patogeneze SMD-a



1.1.5. Uloga sustava komplementa u patogenezi SMD-a

1.1.5.1. Sustav komplementa

Sustav komplementa je jedan od glavnih efektorskih mehanizama nespecifične imunosti građen od više od trideset plazmatskih proteina, membranskih regulatora i receptora kojima je glavna uloga nastanak, amplifikacija i kontrola upale. Komplement je otkriven prije sto godina kao termolabilan protein plazme koji sudjeluje u opsonizaciji bakterija uz pomoć protutijela i smatrao se „komplementarnim“ sustavom humoralnoj imunosti. No od tada je došlo do dramatične metamorfoze u shvaćanju njegove biološke funkcije. Aktivirana enzimatska kaskada putem prekursora, prvenstveno proteaza, sastavnih dijelova stanične membrane koje svojim cijepanjem aktiviraju daljnje enzime u kaskadi, omogućuje organizmu obranu od infekcije putem stimulacije upale, fagocitoze i direktnim uništavanjem mikroorganizma (58, 59).

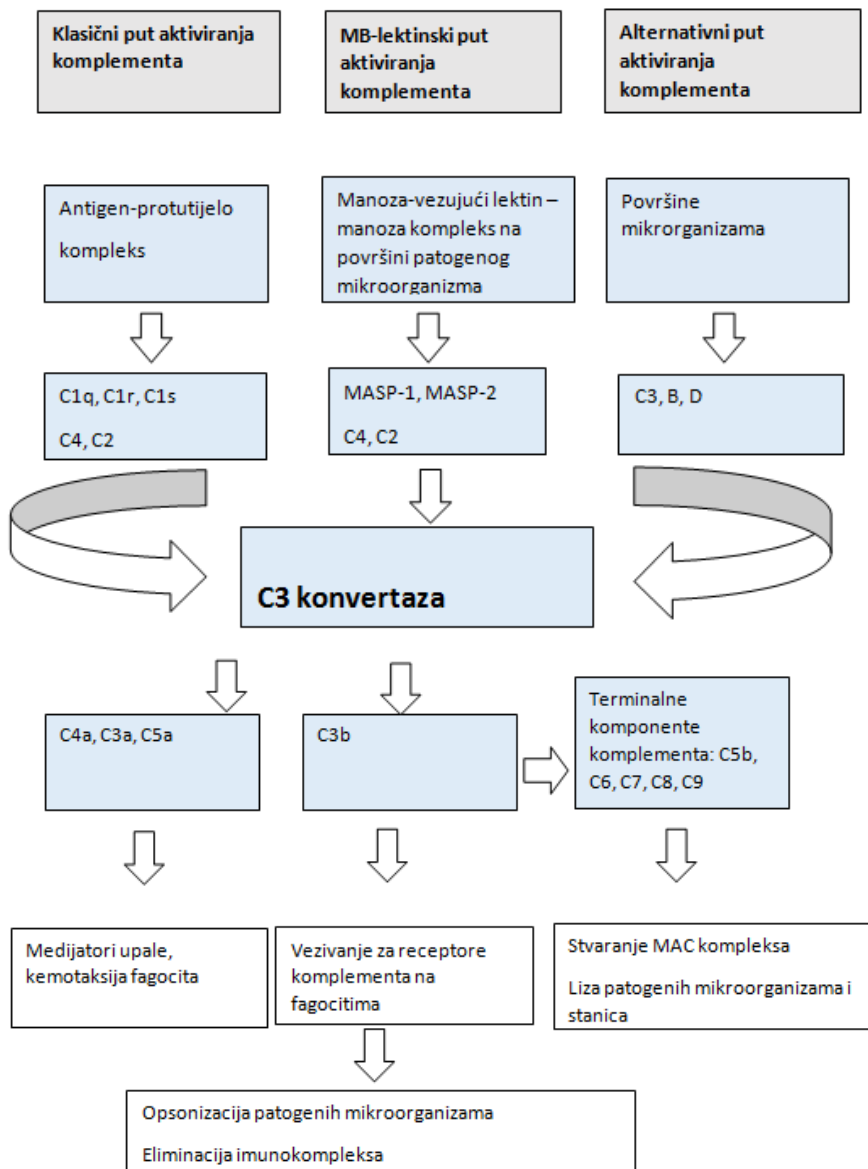
U kaskadi reakcija gdje svaka proteaza može aktivirati i više prekursora i time pojačavati jačinu reakcije, razgradnjom svakog sljedećeg proteina stvara se novi aktivni peptid i tako se nastavlja kaskadna reakcija do terminalne komponente.

Osnovne biološke funkcije sustava komplementa su: opsonizacija (C3b,C4b), upalna reakcija (C5a, C3a,C4a -degranulacija mastocita i bazofila, kemotaksija neutrofila i proizvodnje upalnih citokina) citoliza ciljnih stanica MAC C5b-C9), opsonizacija i destrukcija mikroorganizama i imunokompleksa (C3b, C4b). Tri su puta aktivacije sustava komplementa: klasični, alternativni i MB-lektinski put. Svaki od njih se može aktivirati samostalno kao dio nespecifične imunosti. Početni događaj za aktivaciju svih triju sustava komplementa jest prepoznavanje „okidača“ egzogenog (mikroorganizmi) ili endogenog porijekla (ishemija, ozljeda) (59, 60).

Komplement se aktivira putem svojih receptora koji imaju sposobnost prepoznavanja molekularnih uzoraka stranih antigena na površini mikroorganizama. Takvi receptori su lektin, fikolin, CRP, C1q i IgM. Time započinje sekvenca cijepanja prekursora nakon čega se novonastali peptidi vežu za patogen i aktiviraju sljedeću komponentu sustava. Ključna komponenta sustava je C3 komplement koji se aktivira putem klasičnog puta, reakcijom antigen-protutitijelo ili alternativnim putem aktiviranja. Krajnji cilj je stvaranje kompleksa terminalne komponente komplementa koji napada staničnu membranu patogena tzv. MAC (*engl. Major Antigen Complex*) C5b-C9 sa sposobnošću lize i destrukcije patogena.

Kaskadni sustav je nestabilan i samoograničavajući, reakcija se djelomično gasi sama zbog sebe, a djelomično zbog aktivnosti sustava regulatorskih proteina (59, 60).

Slika 5. Sustav komplementa (preuzeto iz Immunobiology, CA Janeway i suradnici)



1.1.5.2. Klasični put aktiviranja komplementa

Klasični put aktiviranja komplementa aktivira se vezivanjem C1q komponente komplementa na antigen-protutijelo kompleks ili direktnim vezivanjem C1q komponente na mikroorganizam. C1q je dio C1 kompleksa. C1 kompleks je sastavljen od molekule C1q i po dvije molekule C1r i C1s. Vezanjem C1q dolazi do konformacijske promjene C1 kompleksa i posljedično, aktiviranja C1r komponente koja cijepa C1s na dva dijela, od kojih je jedan serin proteaza. Serin proteaza cijepa sljedeće dvije

komponente klasičnog sustava: C4 na C4a i C4b i potom C2 na C2a i C2b. C4b i C2b zajedno čine C3 konvertazu (58-60).

C2b serinska proteaza cijepa komponentu C3 na C3a i C3b. C3b se najvećim dijelom razgrađuje, a manjim dijelom se veže na površinu stanice, što je osnovni uvjet za nastavak kaskade. Taj dio C3b se veže za C4b2b i stvara C5 konvertazu, a potom i cijepa C5 na C5a i C5b. C5b se dalje veže s C6 i C7 i stvara kompleks C5b67 na koji se vežu C8 i C9. C8 ima sposobnost vezivanja kompleksa na površine stanice i udruživši se s 19 molekula C9, stvara se cirkularni polimer koji stvaranjem pora može perforirati staničnu membranu mikroorganizma. To je tzv. C5b-C9 ili MAC kompleks, terminalni kompleks sustava komplementa. Putem pora, MAC ulazi u lipidni dvosloj stanične membrane i lizira stanicu patogena. MAC ima i sposobnost vezivanja za stanične membrane stanica domaćina, stimulirajući lučenje čimbenika rasta iz vaskularnog endotela (62).

Tijekom nastajanja MAC-a, otpuštaju se i snažni anafilatoksini C3a, C4a i C5a koji imaju sposobnost kemotaksije fagocita, degranulacije mastocita i neutrofila i prezentaciju antigena dendritičkim stanicama. C3a i većim dijelom C5a imaju sposobnost indukcije genske ekspresije i sinteze proteina IL-8 i TNF- α u monocitima i makrofagima (60, 63). Ovi citokini imaju važan utjecaj na lokalnu (npr. na mjestu ozljede) i perifernu homeostazu inducirajući cijeli niz promjena: sintezu endotelnih adhezijskih molekula, kemokina, čimbenika rasta, NO i tkivnih enzima povezanih s remodeliranjem tkiva. C3a i C5a induciraju sposobnost endotelne adhezije, migracije i angiogeneze što je preduvjet za reparaciju tkiva nakon ozljede (64).

Tablica 1. Proteini klasičnog puta aktiviranja komplementa

Proteini klasičnog puta aktiviranja komplementa		
Komponenta komplementa	Aktivna forma	Biološka funkcija
C1	C1q	Direktno se veže na površinu mikroorganizma ili na antigen-protutijelo kompleks, omogućavajući autoaktivaciju C1r
	C1r	Cijepa C1s na aktivnu proteazu
	C1s	Cijepa C4 i C2
C2	C2a	Prekursor vazoaktivnog C2 kinina
	C2b	Aktivni enzim C3/C5 konvertaze Cijepa C3 i C5
C3	C3a	Anafilatoksin
	C3b	Opsonizacija mikroorganizma Amplifikacija upale Vezivanje C5 za cijepanje s C2b
C4	C4a	Upalni medijator
	C4b	Opsonizacija mikroorganizma Vezivanje C1 za cijepanje s C1s

1.1.5.3. Lektinski put aktiviranja komplementa

Lektinski put se aktivira putem manosa vezujućeg lektin kompleksa (MBL), molekule slične C1q komponenti, a građene od dvije podjedinice – MASP-1 i MASP-2. Koncentracije lektina rastu u krvi tijekom reakcije akutne faze nespecifične imunosti i nadopuna su klasičnom putu aktiviranja komplementa. MBL i C1q spadaju u obitelj kolektina, obitelji proteina građeni od kolagenih i lektinskih domena u trostrukim heliksima. MASP-1 i MASP-2 su homologni C1r i C1s i smatra se da su nastali genskom duplikacijom od istog prekursora. Kad se MBL veže za površinu patogena, MASP-1 i MASP-2 razgrađuju C4 i C2. Na taj način lektinski put također stvara C3 konvertazu spajanjem C2b i C4b. Osobe s deficijencijom lektinskog puta aktiviranja komplementa imaju povećanu incidenciju infekcija tijekom djetinjstva što je dokaz važnosti nespecifične imunosti u djece prije sazrijevanja imunološkog sustava (59, 60).

1.1.5.4. Alternativni put aktiviranja komplementa

Treći put aktivacije komplementa je evolucijski nastariji i funkcionalno je biološka nadopuna klasičnog puta. Ovaj put se aktivira uglavnom mikroorganizmima, no u suprotnosti s klasičnim putem aktiviranja, može se aktivirati i bez prisustva patogena i to spontanom hidrolizom C3. Kao i u klasičnom putu aktiviranja, put aktivacije započinje stvaranjem C3 konvertaze (C3bBb). Hidrolizom komponente C3 nastaje fragment C3i koji se veže za faktor B. Faktor D cijepa faktor B vezan za fragment C3i na Ba i Bb. Fragment Bb s komponentom C3 stvara kompleks C3bBb ili C3 konvertazu. Stvorena C3 konvertaza cijepa C3 na C3a i C3b, gdje se ponovno C3b spaja s faktorom B i nastaje još C3 konvertaze koja dalje cijepa još više molekula C3. Kompleks C3bBb se vrlo brzo razgrađuje, no u slučaju spajanja s properdinom (P) nastaje stabilni kompleks C3bBbP koji ima mogućnost razgradnje svih molekula C3. Daljni put aktivacije i stvaranja MAC-a ide kao u klasičnom putu aktiviranja (58-60).

Tablica 2. Proteini alternativnog puta aktiviranja komplementa

Proteini alternativnog puta aktiviranja komplementa		
Komponenta komplementa	Aktivna forma	Biološka funkcija
C3	C3b	Imunoatherencija Eliminacija imunokompleksa Stimulacija fagocitoze Stimulacija ADCC i NK stanica Fragment C3 i C5 konvertaze Vezivanje za B za cijepanje s D
Faktor B	Ba	Mobilizacija neutrofila
	Bb	Aktivni enzim C3 i C5 konvertaze
Faktor D	D	Serin proteaza u krvi Cijepanje faktora B vezanog za C3b na Ba i Bb
Properdin	P	Plazmatski protein s afinitetom vezivanja na C3 konvertaze

1.1.5.5. Kontrola sustava komplementa

S obzirom na to da sustav komplementa ima veliku mogućnost amplifikacije upalne reakcije kroz enzimatsku kaskadu i time potencijalne destruktivne učinke, postoji nekoliko mehanizama regulacije aktivnosti sustava komplementa i time sprječavanja nekontrolirane aktivacije imunološke reakcije.

Efektorske molekule sustava komplementa se nalaze inaktivne u malim koncentracijama u perifernoj krvi. Aktivacija prekursora je obično vezana uz prisustvo mikroorganizama i aktivirani fragmenti se vežu u blizini ili se brzo hidroliziraju, čime se omogućuje prva "linija kontrole" protiv nekontrolirane aktivacije. Nadalje, da bi se spriječila aktivnost komplementa protiv proteina stanica domaćina i omogućilo razlikovanje stranih i domaćih antigena, postoji grupa regulatorskih proteina svih triju puta aktivacije. Regulacija klasičnog puta je pod kontrolom inhibitora serinske proteaze (**C1 inhibitor ili C1INH**) koji inaktivira Cr ili C1s i/ili inhibira formiranje enzima C3 konvertaze, čime C1INH ograničava vrijeme u kojem C1q ima mogućnost razgradnje C4 i C2 (59, 60).

Na vlastitim stanicama tkiva postoji receptor za komplement **CR1** i protein poznat pod nazivom **DAF** ili **CD55** koji se natječe s faktorom B za vezivanje s C3b na površini stanice i može dislocirati C3b iz već nastale konvertaze.

Stvaranje C3 konvertaze može biti spriječeno i prelaskom C3b iz aktivnog oblika u inaktivni iC3b uz djelovanje plazmatske proteaze **faktora I**. Kao njegovi kofaktori koji također mogu inhibirati vezanje C2 na C4b i faktora B na C3b, su i već spomenuti **CR1**, membranski faktor proteolize (**MCP** ili **CD46**) i protein koji veže C4b (**C4BP**).

Osim navedenih, postoji i membranski protein **CD59 (protektin)** koji sprječava formaciju MAC kompleksa za autologne i alogene stanice i nalazi se na gotovo svim staničnim membranama (59, 60).

U regulaciji alternativnog puta središnju ulogu ima **faktor H (CFH)**.

CFH je plazmatski glikoprotein koji cirkulira u perifernoj krvi u relativno visokim koncentracijama (500 µg/L ili 3 mmol/L). Građen je od 1213 aminokiselina koje nakon glikolizacije tvore glikoprotein od 155 kDa. Protein sadrži 20 ponavljajućih jedinica tzv. proteinskih domena poznatih pod imenom „suši“ domene (*engl. Short Consensus Repeate* SCR), svaka duljine od 60 aminokiselina.

Dokazane su važne funkcionalne domene za CFH: tri vezna mjesta za C3b, SCR 1-4, SCR 12-14, SCR 19-20 i tri vezna mjesta za sijaličnu kiselinu i heparin (SCR 6-8). Clark i suradnici su dokazali da u mrežnici rekombinantni SCR 6-8 fragmenti vežu heparin i dermatan-sulfat na koroidalnim krvnim žilama, BM i RPE-u (69).

S obzirom da CFH ima visoki afinitet vezanja za C3b, ali ne i za C4b, on prvenstveno sprječava nastajanje i ubrzava razgradnju C3 konvertaze alternativnog puta, C3bBb i veže se kao kofaktor faktora I za trenutnu inaktivaciju C3b u iC3b. iC3B je vrlo važan ligand za makrofage i dendritičke stanične receptore kao što je CD11a-c/18 (70).

CFH ima sposobnost regulacije aktivacije komplementa u krvi i staničnim površinama. No dok se CFH trenutno veže za C3b u krvi, za njegovu učinkovitost na stanicama nužno je prisustvo polianionskih molekula na površini stanica kao što su sijalična kiselina, C3b, heparin i glikozaminoglikani čime se povećava njegov afinitet vezivanja za C3b (67, 68, 71).

CFH ima također sposobnost stvaranja oligomera s dimeričkim mjestima vezivanja na SCR 6-8 i 16-20. Funkcionalno značenje oligomerizacije nije poznato, no smatra se da ima ulogu u agregaciji proteina u bolestima proteinskih depozita kao što su npr. druze (62).

Okemefuna i suradnici su dokazali da CFH ima i sposobnost vezanja C-reaktivnog proteina (CRP) na dva vezna mjesta: SCR 7 i SCR 8-11. CRP je protein akutne faze koji se veže za fosfokolin nekrotičnih i apoptičkih stanica bakterija i vežući se i za C1q, aktivira klasični put aktiviranja komplementa i suprimira aktivaciju alternativnog sustava komplementa (73, 74).

Regulatorski proteini CFH, C4BP DAF, CD55, MCP su članovi genske obitelji regulatora aktivacije komplementa (RCA) smještene na kromosomu 1q31. Svi imaju 44 proteinske domene (SCR) koje sadrže aminokiseline kao npr. cistein koji može formirati disulfidne veze. Svi navedeni proteini imaju

sposobnost ubrzanja raspada C3/C5 konvertaze i/ili djeluju kao kofaktori faktora I za cijepanje i inaktivaciju (i) C3b i/ili C4b komponente (75).

Tablica 3. Pregled kontrolnih proteina sustava komplementa i njihovih bioloških funkcija

Biološka funkcija	
Ime	Biološka funkcija
C1 inhibitor(C1NH)	Veže C1r, C1s, odstranjujući ih od C1q
C4-vezujući protein(C4BP)	Veže C4b, odstranjujući C2b, kofaktor za faktor I za cijepanje C4b
Komplement receptor (CR1)	Veže C4b, odstranjujući C2b ili veže C3b odstranjujući Bb; kofaktor za faktor I
Faktor H	Veže C3b, odstranjujući Bb, kofaktor za faktor I
Faktor I	Serinska proteaza koja cijepa C3b i C4b, potpomognuta od H, MCP, C4BP ili CR1
Faktor ubrzanja raspadanja (DAF)	Membranski protein koji odstranjuje Bb od C3b i C2b od C4b
Membranski kofaktorski protein (MCP)	Membranski protein koji inaktivira C3b i C4b uz pomoć kofaktora I
CD59 (protektin)	Prevenira formiranje MAC-a na autolognim ili alogenim stanicama Receptor na svim staničnim membranama

1.1.5.6. Uloga sustava komplementa u SMD-u

Brojni su dokazi u literaturi da je razvoj SMD-a posljedica lokalnih kroničnih upalnih događanja na razini RPE-Bruchove membrane i da disregulacija kontrole sustava komplementa ima središnju ulogu u nastanku i napredovanju bolesti.

Tri su razine dokaza koji idu u prilog tome:

- imunohistokemijske i proteomske analize sastava druza očiju donora
- cjelogenomske studije asocijacije
- studije o razini plazmatskih proteina sustava komplementa u perifernoj krvi

1. Imunohistokemijske i proteomske studije su istraživale proteine sustava komplementa, regulatora i proupalnih markera na donorskim očima. Njihovi rezultati su pokazali da je koncentracija komplementa u BM, žilnici i družama značajno viša u donorskim očima oboljelih od SMD-a u usporedbi s kontrolnim ispitanicima. Druze sadrže gotovo sve proteine alternativnog puta aktivacije komplementa i njihove proizvode aktivacije te razgradnje uključujući CFH, C3, C5, C6, C7, C8 i C9 zasebno i u kombinaciji kao MAC kompleks. CFH je prisutan u očima zdravih ljudi i ima zaštitnu funkciju. S druge strane, CFH prisutan u očima oboljelih od SMD-a ima značajno manji afinitet vezanja za BM što može imati za posljedicu nekontroliranu aktivaciju sustava komplementa (43, 53, 66-68, 76, 77). In vivo i in vitro je također dokazano da anafilatoksini C3a i C5a nađeni u družama imaju sposobnost indukcije ekspresije VEGF-a nakon inducirane ozljede tkiva laserskom fotokoagulacijom (78).
2. Cjelogenomske studije blizanaca i obitelji pokazale su da je sklonost obolijevanju od SMD-a veća u pojedinaca s pozitivnom obiteljskom anamnezom. Isto tako, brojni su objavljeni radovi dokazali da prisustvo pojedinih varijacija genskih lokusa za komponente komplementa CFH, LOC387715/HTRA1, B/C2 i C3 povećava ili smanjuje rizik od SMD-a. Najjača povezanost s pojavom SMD-a je dokazana za CFH genske varijacije (80-102). O samim genskim varijacijama pojedinih genskih lokusa i njihovom utjecaju na SMD bit će više riječi u sljedećem poglavlju.

S obzirom na to da je većina tkiva i organa ovisna o proizvodnji komplementa u jetri, mozak i mrežnica su jedina tkiva i organi koji imaju mogućnost lokalne proizvodnje komplementa. U literaturi postoje dokazi da je transkripcija gena za komponente komplementa i regulatorne proteine klasičnog i alternativnog puta najveća u RPE sloju, BM i žilnici (65).
3. Ako pretpostavimo da disregulacija sustava komplementa ima središnju ulogu u patogenezi SMD-a, u tom slučaju bi bila mjerljiva aktivnost sustava komplementa u perifernoj krvi. Scholl i suradnici su dokazali da su razine aktivacijskih markera sustava komplementa (Ba, C3d, MAC, C3a, C5a) puno više u bolesnika sa SMD-om i da promjena u substratima komplementa za jednu standardnu devijaciju kao što su kofaktor B, regulatori (faktor D) ili aktivacijski markeri (Ba i C3d) povećava rizik od SMD-a za pet puta (104). Hecker i suradnici su uočili da su plazmatski proteini faktor D, faktor B, Ba i C3d povišeni u uznapredovalim stadijima SMD-a (105). Reynolds i suradnici su otkrili da su povišene plazmatske koncentracije biljega alternativnog sustava komplementa C5a, anafilatoksina i Bb u oboljelih od SMD-a (106). Postoje i dokazi da oboljeli od SMD-a češće obolijevaju od drugih sistemskih bolesti povezanih s povećanom sistemskom aktivacijom komplementa:

sistemskog lupus erythematoses (SLE) i membranskog glomerulonefritisa tipa II (MPGN II) (107, 108).

1.1.6. Klasifikacija, klinička slika i prirodni tijek SMD-a

Postoji nekoliko klasifikacija SMD-a od kojih je najviše u široj kliničkoj praksi klasifikacija prema kliničkoj studiji **Age-Related Eye Disease Study (AREDS)** Nacionalnog Instituta zdravlja Sjedinjenih Američkih Država (*engl. National Institute of Health, NIH*). Prema toj klasifikaciji, SMD se dijeli na **ranu, intermedijarnu i kasnu ili uznapredovalu SMD**. Prvi klinički znak **rane SMD** je prisustvo retinalnih pigmentnih abnormalnosti – hipo- ili hiperpigmentacija ili disgrupacija i/ili nekoliko (manje od dvadeset) srednje velikih druze, klinički žučkastih, fokalnih depozita u makularnom području. Druze se mogu kategorizirati prema veličini i izgledu. Prema veličini dijele se na male (do 63 μm), srednje (63-124 μm) i velike (više od 124 μm). Prema izgledu dijele se na tvrde s jasno definiranim granicama i meke s nejasnim granicama koje su obično velike i mogu konfluirati. Bolesnici u ovoj skupini imaju malu mogućnost progresije bolesti nakon 5 godina i prema AREDS studiji, čine 85% oboljelih od SMD-a dok ih 15% u sljedećih 10 godina razvije velike druze (109,110,119).

Prema AREDS studiji, **intermedijarna SMD** je klinički karakterizirana najmanje jednom velikom druzom ili brojnim srednje velikim druzama u jednom ili oba oka ili područjem geografske atrofije koje ne zahvaća centar makule. U ovoj studiji, prevalencija intermedijarne SMD u jednom oku je iznosila 37%, a za oba oka je iznosila 71%. Progresija ovog stupnja bolesti u uznapredovalu SMD tijekom 5 godina je 6,3%, no stopa progresije raste na 26% ako su promjene prisutne u oba oka (110, 111, 119).

Retikularne pseudodruze ili tzv. subretinalni druzenoidni depoziti kao novi klinički entitet, vidljiv u plavom svjetlu kolorne fundus fotografije nije uključen ni u jednu dosadašnju klasifikaciju (109,110). U Beaver Eye Dam studiji su spominjane pod imenom „retikularne druze“ (116). Mogu se dokazati autofluorescencom ili SD-OCT-om (*engl. Spectral-Domain Optical Coherence Tomography*) (46, 47, 56). Cohen i suradnici su dokazali da su retikularne pseudodruze prisutne u u 24% bolesnika s novootkrivenim CNV-om, dok su Curcio i suradnici dokazali da njihovo prisustvo povećava rizik za razvoj geografske atrofije (56).

Prema AREDS studiji, **uznapredovala SMD** se definira klinički kao geografska atrofija koja je posljedica suhe SMD ili vlažna (eksudativna) SMD koja zahvaća centar makule. Gubitak vidne oštine je prisutan u svim kliničkim oblicima. Prema Beaver Eye Dam studiji, 22% bolesnika s uznapredovalom SMD u jednom oku razviju tijekom 5 godina i uznapredovalu SMD i u drugom oku, dok prema AREDS studiji, rizik progresije u drugom oku iznosi od 35 do 50% tijekom 5 godina

(110,116). U **geografskoj atrofiji**, klinički su vidljive jedna ili više zona demarkacije RPE-a i/ili zone korioretinalne atrofije s ili bez okolnih druzi i u makularnom centru su prisutne u 10% bolesnika s mogućim razvojem CNV-a.

Vidna oštrina na daljinu je obično očuvana i sporo se pogoršava, no ono što bolesnici prvo primjećuju je otežano čitanje.

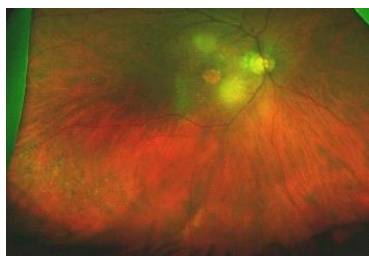
Vlažni oblik SMD-a karakterizira klinički i angiografski pojava odignuća RPE-a (*engl. Pigment Epithelial Detachment PED*) ili klasičnog, okultnog, predominantno klasičnog ili minimalno klasičnog CNV-a, subretinalnih ili intaretinalnih hemoragija i eksudacije, fibrovaskularnih ožiljaka te u najtežim slučajevima, serozne ablacije mrežnice.

Klasična CNV se angiografski dokazuje i karakterizira u ranoj fazi angiografije kao dobro ograničena hiperfluorescenca s kasnijim progresivnim curenjem fluoresceina. Okultna CNV je karakterizirana ili kao fibrovaskularni PED ili kasno curenje fluoresceina iz nedeterminiranog izvora (115).

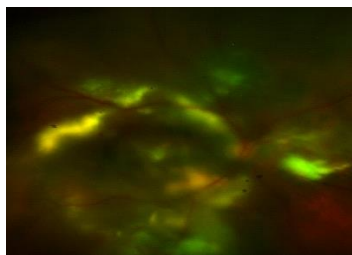
Slika 6. Na slici su prikazani klinički oblici SMD-a: **a)** Suhi oblik koji karakterizira prvenstveno prisustvo druzi ili pigmentnih abnormalnosti, **b)** Geografska atrofija, uznapredovala suhi oblik SMD-a i **c)** Vlažni oblik SMD-a koji karakterizira pojava PED-a ili subretinalne hemoragije ili akumulacije tekućine porijeklom iz CNV-a (izvor slika: istraživanje u sklopu ove disertacije snimane Optomap P200MA fundus kamerom)



a. Suhi oblik SMD-a



b. Geografska atrofija



c. Vlažni oblik SMD-a

SMD je bilateralna bolest makularnog područja. U ranoj SMD gubitak vidne oštine je općenito blag i većinom asimptomatski. U slučaju prisustva smetnji, bolesnici se žale na slabiji vid prilikom čitanja slova, zamagljen vid, vidne skotome, smanjenu kontrastnu osjetljivost i adaptaciju na mrak. Tijekom mjeseci ili godina, vidna oština se smanjuje s pojavom centralnih ili paracentralnih skotoma. Klinički nalaz konfluirajućih druze, fokalnih hiperpigmentacija RPE-a ili ektrafovealnih područja korioretinalne atrofije su tri klinička nalaza koja povećavaju rizik od gubitka vidne oštine. U bolesnika koji su stariji od 65 godina i imaju bilateralno druze, a bez gubitka vidne oštine, rizik od nastanka geografske atrofije ili CNV-a je 9% u godini dana, 16% unutar dvije godine i 24% unutar triju godina. U bolesnika koji imaju uznapredovalu SMD na jednom oku, rizik od razvoja CNV na drugom oku je 7-10% na godinu. Ako drugo oko nema fokalne hiperpigmentacije ili druze, petogodišnji rizik razvoja bolesti je samo 10%, no ako postoje navedene promjene, tada se vjerojatnost nastanka CNV-a na drugom oku povećava na 60%. U uznapredovalo SMD bolesnici primijete nagli gubitak vidne oštine unutar nekoliko dana ili tjedana kao posljedicu pojave subretinalne hemoragije ili akumulacije tekućine, a zbog prisustva CNV-a. Iako od uznapredovale SMD boluje samo 10-15% SMD populacije, ona je odgovorna za 80% slabovidnosti (vidna oština na boljem oku uz najbolju moguću korekciju 0.1-0.3) i sljepoće (vidna oština na boljem oku uz najbolju moguću korekciju od 0.02-0.05) u toj populaciji. Rizik od sljepoće na oba oka u osobe s gubitkom vida na jednom oku koje ima uznapredovalu SMD tijekom 5 godina je 12%. Iako većina bolesnika s uznapredovalom SMD ne postanu slijepi u potpunosti, pad vidne oštine značajno narušava kvalitetu života manifestiranu nemogućnošću samostalnog funkcioniranja u svakodnevnom životu ili u trećine bolesnika, pojavom kliničke depresije (110-118).

1.1.7. Rizični čimbenici za razvoj SMD-a

1.1.7.1. Demografske karakteristike: dob, spol, rasa

Prema brojnim studijama rizik razvoja SMD-a raste s dobi. Prevalencija rane SMD raste s 8% od 43. do 54. godine života na više od 30% starijih od 75. godine života. Prevalencija uznapredovale SMD raste od 0.1% od 43. do 54. g. života na 7.1% u ljudi starijih od 75. g. života (115). Ukupna prevalencija u dobi od 65. do 80. g. je 9-42%, ovisno o studiji, definiciji SMD-a, zemljopisnoj lokaciji i etničkoj pripadnosti ispitanika (96-98).

Prema podacima iz AREDS studije, ispitanici u dobi od 71. do 80. g. imaju 1,5 puta veći rizik za obolijevanje od rane SMD, 3,3 puta veći rizik od intemedijarne SMD i geografske atrofije i 5,1 puta veći rizik od uznapredovale SMD, u odnosu na ispitanike u dobi od 60. do 65 g. (117).

Analizom dobivenih podataka iz Beaver Eye Deam studije, Blue Mountain studije i Rotterdam studije, dokazano je da ženski spol ima povećani rizik od obolijevanja od SMD-a s omjerom izgleda od 1,15 puta (118,119).

Prema podacima iz dviju studija autora Bressler i suradnici i Klein i suradnici, prevalencija svih oblika i stupnjeva SMD-a je viša u bijele rase nego u crne rase, dok žuta rasa ima manju prevalenciju u odnosu na bijelu rasu, no višu u odnosu na crnu. Chang i suradnici su dokazali da bijelci imaju dva puta veći rizik od razvoja novih fokalnih hiperpigmentacija unutar 3000 μm od foveolarnog centra i progresije SMD-a u odnosu na pripadnike crne rase (121-123).

1.1.7.2. Indeks tjelesne mase i hipertenzija

Indeks tjelesne mase (*engl. BMI*) je indeks koji klasificira stupanj težine i izračunava se kao iznos tjelesne težine u kilogramima (kg) podijeljen s kvadratom tjelesne visine u metrima (m). Jedinica za BMI je kg/m^2 . Ako pogledamo iznos BMI, tada osobe s $\text{BMI} \leq 19 \text{ kg}/\text{m}^2$ su pothranjene, s $\text{BMI} 19\text{-}25 \text{ kg}/\text{m}^2$ normalne tjelesne težine, s $\text{BMI} 25\text{-}30 \text{ kg}/\text{m}^2$ prevelike tjelesne težine, a s $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$ pretile osobe.

U AREDS studiji, osobe s $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg}/\text{m}^2$ su imale značajno povećanu incidenciju uznapredovale MD s omjerom izgleda od 1,93.

U studiji Seddon i suradnici, BMI ispitanici od $25\text{-}29 \text{ kg}/\text{m}^2$ su imali omjer izgleda 2,32, dok s $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$ 2,35 za rizik od progresije SMD-a (126). Smith i suradnici, analizom podataka iz Beaver Eye Dam, Rotterdam i Blue Mountain studije, ustanovili su da je rizik ispitanika s prevelikom težinom i

pretilih do 1,3 puta veći za prevalenciju SMD-a (127). Dokazano je da preveliki kalorijski unos povećava rizik od SMD-a zbog povećanog rizika od oksidativnog stresa (124-127) .

Za hipertenziju kao čimbenik rizika podaci su nekonzistentni u većini populacijskih studija. No u Beaver Eye Dam studiji, ispitanici s liječenom kontroliranom hipertenzijom (sistolčki krvni tlak / dijastolički krvni tlak do 160/95 mmHg) imaju dva puta veći rizik dok ispitanici s neliječenom nekontroliranom hipertenzijom imaju tri puta veći rizik razvoja uznapredovale SMD u odnosu na normotenzivne ispitanike. Prema rezultatima AREDS studije, ispitanici s hipertenzijom imaju 1,5 puta veći rizik od uznapredovale SMD u odnosu na normotenzivne ispitanike. U Macular Photocoagulation studiji ispitanici s hipertenzijom imali su povećanu pojavnost subretinalnih neovaskularizacija u nezahvaćenom oku 1,7 puta više u odnosu na kontrolnu skupinu. Povišeni krvni tlak smanjuje elastičnost velikih krvnih žila zbog degenerativnih promjena kolagena i elastina. Slične promjene su nađene i u BM. Time bi krvni tlak mogao biti biljeg praćenja degenerativnih promjena u SMD-u (113,115,127-129).

1.1.7.3. Pušenje

Pušenje je najkonzistentniji rizični čimbenik za prevalenciju i u manjoj mjeri za incidenciju uznapredovale SMD (neovaskularnu SMD i geografsku atrofiju) u svim dosadašnjim populacijskim studijama. Dokazano je da pušenje 20 cigareta dnevno smanjuje razinu β -karotena za 72% u cirkulirajućoj krvi, koncentraciju luteina u mrežnici, koroidalni protok i medikamentnu detoksikaciju na razini RPE-a (130-132).

Prema AREDS studiji, ispitanici pušači s 10 kutija cigareta / godinu imali su 1,55 veći rizik od pojave SMD-a u odnosu na nepušače.

U analizi triju studija, Beaver Eye Dam, Rotterdam i Blue Mountain studije, rizik od pojave SMD-a bio je značajno veći (2,4, 3,1 i 4,2 puta) u ispitanika koji su pušači.

Chang i suradnici su dokazali da za ranu SMD i progresiju (srednje do velike druze i fokalne hiperpigmentacije), rizik obolijevanja za pušače koji puše više od 10 cigareta dnevno je do tri puta veći u odnosu na kontrolne ispitanike.

S obzirom na hipotezu u kojoj u patogenezi SMD-a hipoksija stimulira nastanak VEGF-a što dovodi do retinalne endotelne proliferacije i razvoja neovaskularizacija, a time i do uznapredovale SMD, aterosklerotsko oštećenje krvnih žila ili vazokonstrikcija uzrokovana pušenjem može dovesti do dodatnog hipoksičnog opterećenja čime se zasigurno povećava i mogućnost razvoja uznapredovale SMD.

Dokazano je i da pušenje smanjuje i razinu cirkulirajućih antioksidansa i time retinalnu obranu od oksidativnog stresa i povećava aktivnost fosfolipaze A2, enzima koji katalizira proizvodnju upalnih medijatora kao što su leukotrieni i prostaglandini čime potiče upalu (131-135).

1.1.7.4. Genetski rizični čimbenici

Brojne su genetske i epidemiološke studije dokazale da je SMD kompleksna multifaktorijalna bolest nastala interakcijom brojnih okolišnih i genetskih čimbenika (136). Unazad dvadesetak godina započela je era genetskih istraživanja SMD-a čime je otvoreno novo poglavlje u etiologiji ove bolesti. Iako su takve studije bile uvijek izazov za istraživače zbog velike kliničke varijabilnosti i kasnog obolijevanja ispitanika, prvi koraci su učinjeni devedesetih godina prošlog stoljeća s blizanačkim i obiteljskim agregacijskim studijama u kojima se na osnovu pozitivne obiteljske anamneze i obolijevanju u najbližih srodnika dokazala nasljedna predispozicija za SMD što je bio važan korak u dokazivanju heritabilnosti SMD-a (137-140).

Jedna takva studija je dokazala da su genetski čimbenici odgovorni za 46-71% varijacija u kliničkoj slici bolesti, dok su u studiji analize povezanosti Klein i suradnici 1998. po prvi put dokazali povezanost genskog lokusa 1q25-31 s pojavom SMD-a u u 10 članova obitelji (138,140).

Unazad desetak godina učinjene su brojne cjelogenomske asocijacijske studije za ranu i uznapredovalu SMD koje istražuju povezanost varijacije genetskog slijeda i fenotipa određene bolesti. U njima je dokazano da je rizik od nastanka SMD-a, osobito za uznapredovale kliničke oblike, snažno povezan s nekoliko genskih lokusa: gen za CFH na 1q31 kromosomu, gen LOC387715 ili ARMS2 (*engl. Age-Related Maculopathy Susceptibility 2*) na 10q26 kromosomu, komplement faktor C2 i B (C2/CFB) na 6. kromosomu i komplement faktor 3 (C3) na 19. kromosomu.

Genske varijacije za CFH, ARMS2, CFB i C2 uzrokuju 75% slučajeva SMD-a i time je direktno dokazano da je aktivacija sustava komplementa jedan od vodećih etioloških čimbenika u razvoju SMD-a (83-103).

1.2. Genetika SMD-a

1.2.1. Građa ljudskog genoma

Ljudski genom je cjelokupna genetska informacija čovjeka (*lat. Homo sapiens*) pohranjena u slijedu nukleotida poznatim pod imenom **deoksiribonukleinska kiselina (DNK)**.

DNK je zgusnuti dvolančani polimer građen od ponavljajućih slijedova nukleotida, jedinica građenih od dušičnih baza - adenina (A), gvanina (G), citozina (C) i timina (T), šećera deoksiriboze i fosfatne grupe i nalazi se u jezgri (tzv. nuklearni genom) i mitohondrijima (ekstrakromosomalni genom) svake stanice organizirane u 23 para kromosoma (141,142).

1990. g. započet je **Human Genom Project (HGP)**, međunarodni istraživački projekt koji je do 2003. g. definirao sadržaj slijeda dušičnih baza DNK, identificirao i pozicionirao gene ljudskog genoma i time definirao kompletnu genetsku poruku kodiranu u dvostrukoj uzvojnici. Iako je biološka funkcija 50% gena još nepoznata, poznata je činjenica da ljudski genom ima između 20 -25 tisuća gena i da se broj nukleotidnih baza procjenjuje na više od 3 milijarde. Od ukupnog broja gena, 25% otpada na gene i genima slične sekvence, dok je 75% tzv. ekstragenska DNK. 10% ukupnog broja gena otpada na kodirajuću DNK, a 90% na nekodirajuću sekvencu DNK.

Kao jedan od najvećih uspjeha moderne genetike, rezultati HGP-a pohranjeni su u obliku **ENCODE** projekta (*engl. Encyclopedia for DNA Elements*), enciklopedije svih funkcionalnih DNK elemenata i gena kao skupa transkriptata koji kodiraju fenotipska obilježja svake jedinice (142-145).

Gen je osnovna materijalna i funkcionalna jedinica genetičkog materijala i biološkog nasljeđivanja. Sačinjava ga nukleotidna sekvenca koja sadrži genetičku informaciju za sintezu određenog proteina, tj. formiranje određene karakteristike u interakciji s okolinom. Mjesto određenog gena na kromosomu zove se genski lokus.

Geni su transkripcijski aktivni dijelovi DNK, prosječne dužine od 600-4000 parova nukleotida. S obzirom na to da je čovjek diploidni organizam koji u svakoj stanici ima parove kromosoma naslijeđene od majke i oca, time i na svakom kromosomu ima dvije inačice gena tzv. alela. U slučaju da su oba alela ista, tada govorimo o homozigotu, a ako su različita, govorimo o heterozigotu. Aleli su osnova genetske raznolikosti ljudske vrste.

Genotip je skup svih gena tj. u užem smislu riječi, skup svih specifičnih kombinacija alela na određenom genskom lokusu.

Gen sadrži genetičku informaciju za sintezu određenog proteina pohranjenu u tripletima baza poznatim pod imenom kodon. Prijenos genetičke informacije se događa u dvjema etapama:

transkripcija u kojoj se genetička informacija „prepisuje“ na glasničku ribonukleinsku kiselinu (mRNK) i potom u sljedećoj etapi, prepisana šifra se prevodi u redosljed aminokiselina uz pomoć transportne RNK (tRNK) u procesu poznatom pod imenom „translacija“ (146, 147).

1.2.2. Varijabilnost ljudskog genoma

Genetska varijabilnost je ukupna varijabilnost genskih alela koji se pojavljuju unutar i između populacija i ima veliku evolucijsku važnost jer omogućuje stvaranje genetskog skupa varijacija, a time sposobnost preživljavanja ljudske vrste i mogućnosti prilagodbe na okoliš. Genetska varijabilnost se događa putem mutacija koje trajno mijenjaju kemijsku strukturu gena, ali se time povećava i broj varijacija na genskim lokusima u humanoj populaciji, vodeći do **polimorfizma gena**. Svaki gen može biti polimorfan s velikim brojem mogućih varijanti ili fiksiran sa samo jednom vrstom alela (147-150).

Homo sapiens je vrsta koja za razliku od drugih vrsta ima relativno kratko evolucijsko razdoblje za akumulaciju genskih varijacija i zato ima relativno ograničenu genetsku raznolikost: dva pripadnika ljudske vrste, bez obzira na populaciju, podudaraju se u 99,9% genetske građe i zapravo se fenotipska raznolikost može zahvaliti razlici od 0.1% u građi nukleotidnih baza – dva pripadnika ljudske vrste se razlikuju u 1:1000 parova dušičnih baza na određenom genskom lokusu.

Promjene učestalosti određenih alela su posljedica djelovanja fundamentalnih evolucijskih sila koje su omogućile diferencijaciju unutar i između populacija: genetičkog skretanja

(promjena učestalosti alela unutar male populacije slučajnim uzorkovanjem), tijekom gena

(migraciji), prirodnoj selekciji i mutacijama.

Istinsku diferencijaciju između pojedinih jedinki uzrokovale su izmjene gena tijekom mejoze i mutacije (150-154).

Mutacije su trajne promjene u DNK slijedu s učestalošću u populaciji manjoj od 1%; većinom su slučajno uzrokovane i najčešće se javljaju kao posljedica spontanog pogrešaka u replikaciji i popravku DNK (146, 154).

Varijacije na genskom lokusu koje se javljaju s učestalošću većom od 1% u općoj populaciji zovu se **nukleotidni polimorfizmi** i zaslužni su za 90% DNK varijacija u ljudskom genomu. Najučestaliji polimorfizam u humanoj populaciji zove se **pojedinačni nukleotidni polimorfizam** (*engl. Single Nucleotide Polymorphism* SNP) i javlja se na 1: 200 dušičnih baza u humanom genomu (149,150).

Većina SNP-a ima dva alela i obično se radi o supstituciji jedne dušične baze drugom u paru kromosoma, na primjer: u AAGCCTA i AAGCTTA polimorfizmu, dušična baza citozin je zamijenjen timinom i označava se kao promjena C→T ili A→G i sl. Jedan alel je "glavni" alel i obično je učestaliji, dok je drugi rjeđi i tada se u literaturi, osobito u bazama SNP-a, govori o učestalosti rjeđeg alela, tj.

alela s učestalošću najmanjom na određenom lokusu primijećenoj u određenoj populaciji (*engl. Minor Allele Frequency MAF*).

Polimorfizmi se obično označavaju skraćenicom „rs“ (*engl. Restriction Site*) i brojem pod kojim su otkriveni i uneseni u bazi. Na učestalost pojavljivanja SNP-a utječe prirodni odabir kao i genetska rekombinacija i stopa mutacije. U ljudi je 30% genskih lokusa polimorfno, a svaka je jedinka heterozigot za najmanje 10-20% svih lokusa. Poznati polimorfni sustav je sustav ABO krvnih grupa (145,150,153).

Do sada je poznato više od 9 milijuna sekvenci DNK koje su katalogizirane u bazama podataka kao što je **ENSEMBL**.

ENSEMBL je baza genomske informacije nastala kao rezultat zajedničkog znanstveno istraživačkog projekta Europskog bioinformatičkog Instituta i Sanger Instituta, s ciljem da se objelodane podaci iz HGP-a. Sada su kompletno dostupni svjetskoj znanstvenoj zajednici na www.ensembl.org.

Druga poznata baza podataka humanog genoma je **OMIM** (*engl. Online Mendelian Inheritance in Man*), javno dostupna baza podataka genetskih fenotipova i pridruženih genetskih bolesti koju je osnovao Nacionalni centar za biotehnošku informaciju u Sjedinjenim Američkim Državama (*engl. National Center for Biotechnology Information NCBI*). Dostupna je na adresi www.omim.org ili kao dio velike baze podataka poznate pod imenom **ENTREZ** : www.ncbi.nlm.nih.gov (154-157).

Genomska distribucija SNP-a je većinom heterogena. Većina SNP-a se nalazi u nekodirajućim regijama genoma bez utjecaja na fenotip pojedinca. SNP-i koji se nalaze u kodirajućim regijama gena, a koji uzrokuju poremećaj funkcije ili strukture kodiranih proteina, uzrok su većine recesivnih ili dominantnih nasljednih monogenetskih poremećaja i rutinski se analiziraju u dijagnostičke svrhe. Druga skupina SNP-a uzrokuje primarni poremećaj proteina koji sudjeluju u metabolizmu lijekova i cilj su farmakogenetskih analiza. Ostali funkcionalni SNP-i koji su povezani s povećanom sklonošću određenoj bolesti smješteni su na promotorima, intronima, intragenim regijama i mjestima povezivanja (*engl. Splice Sites*) (154-159).

Skup specifičnih alela (SNP-a) u skupu usko povezanih gena na kromosomu koji se nasljeđuju zajedno statistički su povezani. Ta grupa alela zove se **haplotip** i ostaje sačuvan tijekom replikacije kroz nekoliko generacija. Ako se identificiraju pojedini aleli i njihova statistička povezanost unutar sekvence haplotipa, tada se mogu identificirati i drugi polimorfni lokusi u regiji. Na taj način se mogu dobiti vrlo važne informacije o rekombinaciji genetskog materijala tijekom mejoze čime se mogu locirati mutacije koje mogu uzrokovati određenu bolest (157-159).

Statistička povezanost dvaju alela na dva ili više lokusa, poznata pod imenom **neravnoteža vezanja** (*engl. Linkage Disequilibrium LD*) ključni je preduvjet za izradu studija povezanosti unutar ljudskog genoma. Ako postoji LD između dvaju alela, tada poznavanje genotipa jednog SNP-a može predvidjeti genotip drugog SNP-a.

Cilj takvih istraživanja je da se polimorfizmi iskoriste kao biljezi genetske sklonosti pojedinca za određene multifaktorijske bolesti koristeći analizu neravnoteže vezanja odnosno analizu SNP alela u populacijskim studijama i da se identificira genski lokus povezan s određenom bolešću ili fenotipom (160-162).

DNK polimorfizmi su ključni za pozicijsko kloniranje, kartiranje gena i izolaciju brojnih gena uzročnika bolesti, praćenje gena i prenatalnu dijagnostiku za detekciju nositelja monogenetskih poremećaja.

Pretpostavka je da se SNP-i koji se nasljeđuju u „paketima“ s genetski predisponiranim alelima mogu lokalizirati i izolirati, a proteini koje oni kodiraju mogu biti cilj novih generacija lijekova.

Polimorfizmi ljudskog genoma i njihove sekvence su detaljno opisani u međunarodnim projektima kao što je HapMap projekt, kojem je cilj definirati što veći broj SNP-ova i učiniti ih dostupnima javnosti (163).

1.2.3. Hardy-Weinbergova ravnoteža

S obzirom na činjenicu da tri četvrtine potomstva dvaju heterozigota dobivaju dominantno svojstvo, a samo jedna četvrtina recesivno svojstvo, bilo bi za očekivati da će s vremenom u velikoj populaciji s nasumičnim parenjem svi potomci dobiti dominantno svojstvo, no to se ne događa, već naprotiv - učestalost dominantnog svojstva ne raste na račun recesivnog i u takvim populacijama, omjeri određenog genotipa, a time i fenotipa, ostaju konstantni. Ova je pojava poznata kao **Hardy-Weinbergova ravnoteža* (HWR)** i osnovno je načelo populacijske genetike.

Populacijska genetika se bavi skupom gena u određenoj populaciji s nasumičnim parenjem, učestalošću alela svih gena u određenoj populaciji i promjenama alela tijekom generacija. Ova grana genetike pokušava odrediti odnos između učestalosti genotipa u pojedinoj populaciji i učestalosti pojedinog alela u skupu gena i čimbenike koji utječu na promjenu učestalosti tijekom vremena.

Smatra se da je populacija u genetskoj ravnoteži kad je učestalost alela u skupu gena konstantna tijekom generacija. To se događa kad su zadovoljeni određeni uvjeti: vrlo velika populacija, diploidni i seksualno reproduktivni organizmi, nasumično parenje jedinki, izostanak migracija, mutacija i prirodnog odabira i ista učestalost alela u pripadnika obaju spolova.

HWR se primjenjuje na dvije jedinke s dvama alelima, dominantnim i recesivnim alelom. Populacija s takvim genom se može opisati kao populacija s trima mogućim genotipovima, odnosno učestalosti triju genotipa.

Učestalost genotipa je broj jedinki u populaciji podijeljen s ukupnim brojem jedinki u populaciji, kao što je prikazano u tablici 4.

Tablica 4. Broj jedinki s određenim genotipom i učestalosti genotipa u hipotetskoj populaciji

Genotip	Broj jedinki genotipa	Učestalost genotipa
AA	98	0.33
Aa	124	0.41
aa	78	0.26
Ukupno	300	1.0

*Ime je dobiveno prema dvojici znanstvenika, engleskom matematičaru G.H. Hardy i njemačkom liječniku W.Weinbergu koji su 1908. neovisno definirali odnos između učestalosti genotipa i alela u savršenoj populaciji u ravnoteži

Pretpostavimo da na određenom lokusu imamo dva alela, A1 i A2. Učestalost alela A1 nazovimo p i učestalost A2 je q, odnosno $f(A1)=p$ i $f(A2)=q$.

U uvjetima HWR, očekivani udio pojedinih genotipova bi bio:

$$(p+q)^2,$$

odnosno pojedinih učestalost alela, kad imamo dva alela je iduća:

$$(p+q)^2=p^2+2pq+q^2=1; \text{ gdje je } f(A1A1)=p^2, f(A1A2)=2pq \text{ i } f(A2A2)=q^2$$

Implikacije HWR-a su sljedeće:

- populacija je u stanju ravnoteže.
- učestalost alela ostaje konstantna iz generacije u generaciju.
- učestalosti genotipova ostaju konstantne iz generacije u generaciju
- udjeli prema Hardy-Weinbergovom principu će se dostići nasumičnim parenjem u jednoj generaciji

Odstupanja od HWR se događaju u idućim uvjetima:

Nasumično parenje – tim procesom se postiže HWR u jednoj generaciji. Ako je taj uvjet narušen, tada populacija neće postići udjele prema HWR i ravnoteža će biti narušena. Uobičajen uzrok takve pojave je parenje između srodnika, čime se povećava homozigotnost svih gena.

Prirodni odabir – uzrokuje brzu promjenu učestalosti alela u populaciji. U pravilu ne postoji pozitivni ili negativni odabir određenog genotipa. No u slučaju pojave štetnih karakteristika postoji negativan odabir jer pogođene jedinke imaju smanjenu reproduktivnu sposobnost od nepogođenih jedinki u populaciji. U odsutnosti novih mutacija, ovo smanjenje reproduktivne sposobnosti smanjuje učestalost mutiranog alela i time pomaže očuvanju HWR.

Prirodni odabir može djelovati i u suprotnom smjeru, u smislu povećanja reproduktivne sposobnosti. Poznato je da određeni heterozigoti u autosomno recesivnim poremećajima pokazuju blago povećanje biološke sposobnosti razmnožavanja u odnosu na nepogođene homozigote. To je tzv. prednost heterozigota koja im pomaže u povećanju mogućnosti preživljavanja u okolišu. Najbolji primjer za to su pripadnici crne rase u Africi koji boluju od srpaste anemije. Homozigoti imaju tešku anemiju i trajno loše zdravstveno stanje, dok su heterozigoti otporniji na infekciju *Plasmodium malariae* čime oni imaju biološku prednost u odnosu na homozigote. U tim regijama broj heterozigota raste i time se narušava HWR.

Mutacije imaju vrlo suptilan učinak na učestalost alela. Stope mutacije se kreću od 10^{-4} - 10^{-8} . Mutacije se događaju na gotovo svim genskim lokusima, ali s različitom stopom. Ako određeni lokus pokazuje visoku stopu mutacije, tada će doći do porasta udjela mutiranog alela u populaciji. No učinak mutacija je smanjen gubitkom mutiranih alela zbog smanjene reproduktivne sposobnosti ili mogućnosti prilagodbe pogođenih homozigota.

Migracije genetski povezuju dvije ili više populacija. U tom slučaju, uvode se novi geni kao posljedica nasumičnog parenja migriranih jedinki i nastupa promjena učestalosti pojedinih alela, odnosno HWR, što se naziva **tijekom ili migracijom gena**. Primjer za to je incidencija alela za krvnu grupu B u cijelom svijetu što je direktna posljedica invazija pripadnika ljudske vrste iz Azije.

Zaključno, HWR je nužna početna točka u populacijskoj genetici za istraživanje genetskog skupa određene populacije koja zadovoljava prije navedene uvjete (145,163-166).

1.2.4. Nukleotidni polimorfizmi u SMD-u

1.2.4.1. Polimorfizmi gena za CFH na 1q31.3 kromosomu

CFH se kao glavni regulator alternativnog sustava komplementa uglavnom izlučuje u jetri i putem krvi brzo dolazi do svih tkiva i organa. Osim u jetri, sintetizira se i u makrofagima, B-limfocitima, endotelnim stanicama i trombocitima. S obzirom na slabiju propusnost krvno-retinalne barijere za mnoge proteine, oko kao organ ima sposobnost samostalne lokalne proizvodnje CFH kako bi se dodatno zaštitilo od

nekontrolirane aktivacije komplementa. Ekspresija CFH je dokazana u optičkom živcu, leći, cilijarnom tijelu, bjeloočnici i RPE-u. Imunohistokemijskim metodama je dokazana značajna distribucija CFH u retinalnim, pijalnim arterijama i astrocitima očnog živca (168). Hageman i suradnici su dokazali da se najveća transkripcija za CFH događa u druzama, RPE-u i koroidalnim kapilarama, na razinama sličnima u jetri (168,169).

CFH sprječava aktivaciju komplementa u krvi i stanicama inhibirajući stvaranje i ubrzavajući razgradnju C3 konvertaze alternativnog puta, C3bBb i vezivanjem kao kofaktor faktora I za trenutnu inaktivaciju C3b u iC3b (poglavlje 1.1.5.d). Ove aktivnosti ovise o interakciji sC3b molekulom vezivanjem na jednom od tri vezna mjesta.

Gen za CFH je u ENTREZ bazi poznat pod identifikacijskim brojem (ID) 3075. U ljudskom genomu se nalazi na 1q31.3 kromosomu, smješten je blizu gena za RCA i veličine oko 100 kb, s 22 egzona i transkriptom od 4.1kb. Iz gena za CFH se generiraju dvije mRNK, 4.3 kb i 1.8 kb mRNK. Obje mRNK su smještene u jetri i ekstrahepatičkim tkivima. U slučaju mutacije gena za CFH dolazi do razvoja deficijencije CFH. Deficijencija CFH uzrokuje nekontroliranu aktivaciju alternativnog puta sustava komplementa, pretjerano stvaranje C3 konvertaze i smanjenje razine C3, što u konačnici smanjuje i ukupnu hemolitičku aktivnost i povećava aktivnost sustava komplementa.

Jedan od najčešćih polimorfizama za CFH je **polimorfizam Y402H T→C (rs1061170)** gdje je na 402. kodonu aminokiselina tirozin zamijenjena histidinom, MAF=0,28. Taj polimorfizam kodira vezno mjesto za heparin i C-reaktivni protein na SCR 7 domeni. Time se smanjuje afinitet vezanja C-reaktivnog proteina, što dovodi do smanjenog vezivanja CFH za celularni debris i odstranjivanje debrisu te zbog pojačane aktivacije sustava komplementa, uzrokuje pojačanu upalu na razini RPE-a i koriokapilarisa (70, 83).

Brojne studije su dokazale da ovaj polimorfizam dovodi do povećanog rizika za pojavu uznapređovalog SMD-a, osobito geografsku atrofiju (GA) i neovaskularnu SMD (83-89). Meta-analiza multiplih asocijacijskih studija za CFH je pokazala da **heterozigoti za Y402H varijantu imaju 2,5 puta, a homozigoti 7,4 puta veći rizik** za razvoj SMD-a, odnosno sa svakim C-alelom rizik od bolesti raste za 2,5 puta (83-86). Osoba s CC genotipom ima čak 6 puta veći izgled za pojavu GA, a za CNV 5,1 puta u odnosu na TT genotip. Pušači s oba CC alela imaju čak 12 puta veći izgled za uznapređovalu SMD u odnosu na nepušače (89).

Idući SNP na 14. intronu gena za CFH na 1q31.3 kromosomu koji povećava rizik za pojavu SMD-a je vrlo česti SNP **rs1410996**, MAF=0,49 sa zamjenom T→C koji je pokazao čak veću povezanost s bolešću u odnosu na Y402H ($p=2.65 \times 10^{-61}$ vs $p=1.79 \times 10^{-59}$). Razina povezanosti je gotovo istovjetna kao i s Y402H: **heterozigoti imaju 2,7 puta, a homozigoti čak 7,6 puta veći rizik za uznapređovalu SMD** u usporedbi s nerizičnim genotipom. Nadalje, osobe s visokorizičnim genotipom koji sadrži rs1061170 i rs1410996 alele imaju 15 puta veći rizik za razvoj SMD-a (91).

1.2.4.2. Polimorfizmi na 10q26 kromosomu

Slično kao i 1q31.3, prema individualnim asocijacijskim studijama i meta-analizama, 10q26 kromosom sadrži dva genska lokusa sa značajnom neravnotežom vezivanja i povezanošću s razvojem SMD-a: hipotetski gen LOC387715/ARMS2 (*engl. Age-Related Maculopathy Susceptibility 2*) i HTRA1 (*engl. High-Temperature Requirement Factor A1*) (90-98).

LOC387715/ARMS2 gen; ENTREZ ID 387715/5654/59338 je nedavno identificiran, no biološka funkcija je zasad nepoznata zbog nedostatka potpunog znanja o transkripciji tog gena i do sada je izoliran samo u genomima viših primata. On kodira protein građen od 107 aminokiselina s devet fosforilacijskih mjesta i molekularnom masom od 12 kDa. Njegova transkripcija je najveća u RPE - koroidalnom sloju, a lokaliziran je u vanjskim mitohondrijskim membranama (96, 98).

Na ARMS2 genskom lokusu (prethodno poznat pod imenom LOC387715) smješten je polimorfizam rs10490924 (Ala69Ser) na egzonu 1 sa substitucijom dušičnih baza G→T što uzrokuje zamjenu aminokiseline alanin za serin, MAF=0,27. U nekoliko asocijacijskih studija pokazao je jaku povezanost s pojavom SMD-a. **Heterozigoti s tim alelom imaju 2,7, a homozigoti čak 8,2 puta veći rizik za razvoj uznapredovale SMD**, dok pušači koji su ujedno homozigoti za ARMS2 i CFH imaju 34,5 puta veći rizik za razvoj bolesti (91-96,170).

Povezanost SMD-a i gena HtrA1 je visoko značajna ($p=1 \times 10^{-9}$). HtrA1 gen zauzima 53.37 Kb regiju na kromosomu 10q26.13 (ENTREZ ID 5654) i kodira obitelj serinskih proteaza čija ekspresija je zabilježena u mrežnici miševa i ljudi, a u humanim fibroblastima raste s dobi (94,171).

HtrA1 regulira degradaciju proteoglikanskog ECM što olakšava drugim enzimima, prvenstveno kolagenazama i MMP pristup njihovim substratima. Pretjerana ekspresija HtrA1 narušava integritet BM i omogućuje invaziju endotelnih stanica putem ECM, kao što se događa prilikom nastanka CNV-a. HtrA1 inhibira i TGF- β koji ima važnu funkciju u odlaganju ECM i angiogenezi (94).

Od 2006. do 2008. g. u nekoliko asocijacijskih studija pronađena je značajna povezanost SNP-a rs11200638 sa substitucijom G→A, MAF=0,29 u promotorskoj regiji HtrA1 s povećanim rizikom od nastanka SMD-a: **heterozigoti imaju 2,2 puta, a homozigoti čak 8,7 puta veći rizik od razvoja bolesti** (94, 97, 98).

1.2.4.3. Polimorfizmi gena za komplement faktor B i C2

Daljni dokazi koji idu u prilog hipotezi da sustav komplementa ima središnju ulogu u patogenezi SMD-a dolaze iz studija koje su pokazale da postoje i protektivni haplotipovi u regijama koje kodiraju komplement faktor B (CFB) na kromosomu 6p21.3 (ENTREZ ID 629) i C2 na 6p21.3 kromosomu

(ENTREZ 717) locirani u regiji glavnog sustava histokompatibilnosti klasa III (MHC-III). Kao što je prije spomenuto, CFB aktivira alternativni put sustava komplementa, dok komplement C2 aktivira klasični put aktiviranja komplementa. CFB i C2 imaju visoku ekspresiju u neurosenzornoj mrežnici, RPE-u i žilnici. CFB je izoliran kao dio druzi i BM, i u manjoj mjeri u stromi žilnice, dok je njegov imunoreaktivni aktivni oblik (Ba) nađen u RPE stanicama i BM. Distribucija CFB je bila gotovo jednaka distribuciji C3, CFH i C5-9 (169).

Gold i suradnici su prvi uspjeli dokazati da dva SNP-a CFB gena rs4151667(L9H) i rs641153(R32Q) imaju veću učestalost pojavljivanja u kontrolnoj nego u SMD skupini. Daljnja analiza haplotipova je identificirala 4 SNP-a koja su značajno povezana sa SMD-om: za CFB gen, rs4151667 (L9H) sa supstitucijom T→A (MAF=0,03) i rs641153 (R32Q) sa supstitucijom C→T (MAF=0,10) dok za C2 gen su izolirani rs547154 (IVS10) C→A (MAF=0,10) i rs9332739 (E318D) G→C (MAF=0,03). Ta četiri SNP-a su bila u snažnoj neravnoteži vezanja, dok haplotipovi koji sadržavaju ta četiri alela imaju protektivni učinak s omjerom izgleda 0,45 i 0,36. Zanimljiva je činjenica da je haplotip s normalnim alelima povećavao rizik za 1,32 puta od SMD-a, s time da je u 56% kontrolnih ispitanika bio prisutan protektivni alel na CFB ili C2 lokusu, a u 74% ispitanika sa SMD-om nije dokazan niti jedan protektivni alel (99).

Spencer i suradnici su u svom istraživanju potvrdili da je rs641153 varijanta gena za CFB značajno povezana sa smanjenim rizikom za razvoj SMD-a ($p=0.025$) s omjerom izgleda 0,21, dok su rs547154 i rs9332739, udruženi s rs641153 bili prisutni u 4% oboljelih od SMD-a i 10% kontrolnih ispitanika (100).

Protektivni učinak prethodno spomenutih polimorfizama zasniva se na činjenici da se u prisustvu R32Q varijante smanjuje aktivnost CFB, komponente Ba te je četiri puta manji afinitet vezanja za C3b komponentu važnu za nastanak MAC-a. Time je još jednom dokazano da uz ovakve genotipske promjene u kojima je promijenjen kritični enzim za CFB, dolazi do nekontrolirane aktivacije alternativnog sustava komplementa, a time posljedično i do razvoja bolesti (172).

1.2.4.4. Polimorfizmi gena za komponentu komplementa 3 (C3)

Kao što je već prije spomenuto, C3 je važan plazmatski protein u formiranju MAC C5-9 kompleksa koji vodi do lize ciljnih stanica i sudjeluje i u klasičnom i u alternativnom putu aktiviranja sustava komplementa. Gen za C3 se nalazi na 19p13.3 kromosomu, ENTREZ ID=718. Povezanost SNP-a C3 gena, i to elektroforetski „brzog“ alotipa (C3F) i rizika za razvoj SMD-a otkrivena je u dvjema studijama provedenim na engleskoj i škotskoj populaciji. U njima je dokazano da je SNP rs2230199 (R102G) sa supstitucijom C→G (MAF=0,09) gdje je arginin zamijenjen glicinom funkcionalni polimorfizam koji povećava u heterozigota 1,7 puta, a u homozigota 2,6 puta rizik od razvoja SMD-a. C3F varijanta ima

za funkcionalnu posljedicu promijenjeno vezivanje za mononuklearne receptore komplementa u ljudi (173). Spencer i suradnici su u svom istraživanju potvrdili da **R102G polimorfizam povećava rizik od SMD-a za 1,55 puta**, dok su Maller i suradnici dokazali da **heterozigoti imaju 1,9 puta, a homozigoti 2,5 puta veći rizik od razvoja SMD-a** (101-103).

1.3. Periferne promjene mrežnice

1.3.1. Anatomija periferne mrežnice

Periferija mrežnice se definira kao svi dijelovi mrežnice udaljeni više od 6000 μm ili 4 papilarna promjera (PP) cirkumferencijalno od foveolarnog centra do spoja mrežnice i cilijarnog tijela poznatog pod imenom orra serrata. Cilijarno tijelo polazi 1mm od limbusa i prostire se 6 mm posteriorno i dijeli se u: prva 2 mm čine dio poznat pod imenom pars plicata, a preostala 4mm čine dio pars plana. Superiorno i inferiorno su smještene *aa.i nn.ciliares breves* i *vv.vorticosaes* koje služe kao orijentir prilikom opisa retinalnih defekata. Na 3 i 9 sati cirkumferencije smješteni su *nn.ciliares longes*. Arteriole su manjeg promjera i svjetlije u odnosu na vene i postaju nevidljive 2mm posteriorno od orre serrate. Orra serrata sadrži dentalne nastavke – retinalne ekstenzije u pars plana, meridijalne nabore-radialne nabore retinalnog tkiva i rubove epitela pars plana između dentalnih nastavaka.

S vanjske strane, neurosenzorna mrežnica je u dodiru s RPE i žilnicom. S unutarnje strane dodiruje staklasto tijelo. Ovo prozirno, želatinozno tkivo ispunjava dvije trećine očne jabučice, ima volumen 4-5 ml u odraslih i u kontaktu je s optičkim diskom, cilijarnim tijelom, zonulama i lećom i čvrsto je spojen na svojoj bazi, 3-4 mm širokoj zoni na orri serrati. Baza staklastog tijela glavni je čimbenik procjene kliničkog tijeka razvojnih varijacija, degeneracija i bolesti periferne mrežnice.

Kao i središnja mrežnica, tako i periferna mrežnica prolazi biološki proces starenja. U djeteta ima izrazito sjajni refleks blizu orre serrate i potpuno je razvijena u dobi od 7 godina kad i orra serrata, pars plana cilijarnog tijela doživljavaju izgled odrasle osobe. Tijekom starenja, događa se progresivni gubitak perifernih retinalnih svjetlosnih refleksa, porast pojave perifernih degeneracija mrežnice i staklastog tijela; u RPE-u se smanjuje broj granula melanina i povećava koncentracija lipofuscina i kompleksnih granula (174-176).

1.3.2. Degeneracije periferne mrežnice

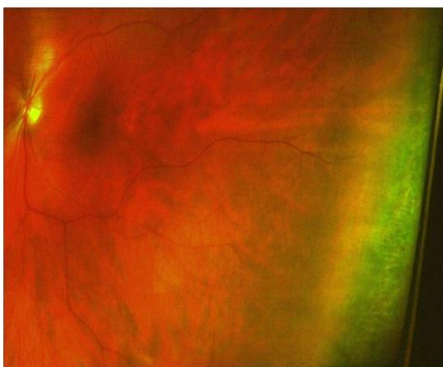
Degeneracije periferne mrežnice su ireverzibilne retrogradne promjene periferne mrežnice u odraslih osoba koje mogu biti trofičke – praćene isključivo gubitkom tkiva ili trakcijske – za posljedicu mogu imati povlačenje staklastog tijela ili zonula mrežnice te degeneracije trofičko-trakcijskog karaktera. S obzirom na tu činjenicu, možemo ih dijeliti na benigne i maligne periferne degeneracije (177).

1.3.2.1. Benigne periferne degeneracije

1. Mikrocistoidne degeneracije

Građene su od sitnih cistoidnih prostora bez pravih zidova u vanjskom pleksiformnom i unutarnjem nuklearnom sloju mrežnice i daju mrežnici izgled „pčelinjeg saća“. Obično se nalaze u odrasloj populaciji 1-2 PP od orre serate. Ponekad se u području ovih degeneracija mogu naći atrofične rupice, no obično bez ozbiljnih posljedica ili smetnji, jer su obično smještene u području baze staklastog tijela. Zbog ekstenzije mikrocistoidnih degeneracija, povećavanja i spajanja mikrocista i urastanja nakupina Müllerovih stanica te u slučaju dovoljno snažne vitrealne trakcije, neurosenzorna mrežnica je sklona rascjepu (retinoshizi) (177-180).

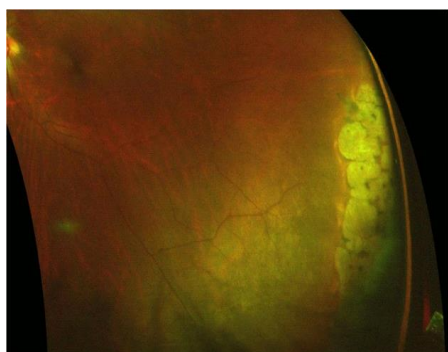
Slika 7 . Mikrocistoidne degeneracije snimljene širokokutnom fundus kamerom (izvor slika: www.optos.com)



2. Kaldrmaste degeneracije (*engl. pavingstone degenerations*)

Žutosivi korioretinalni areali stanjene mrežnice uzrokovanim gubitkom sloja fotoreceptora i vanjske granične membrane, atrofijom RPE-a, prijanjanja mrežnice za BM i alteracijom koriokapilarisa. Hiperpigmentacije potiču od proliferiranih stanica pigmentnog epitela. Ove su degeneracije paralelne orra serrati i prisutne u 22-27% odrasle i u 40% miopske populacije. Bilateralne su u 38-41% slučajeva (177,181).

Slika 8. Kaldrmaste degeneracije (izvor slika: istraživanje u sklopu ove disertacije snimane Optomap P200MA fundus kamerom)



3. Retikularne pigmentne degeneracije (RPP)

Razgranati pigmentni kompletni ili nekompletni poligonski lanci perivaskularnih hiperpigmentacija koji su posljedica degeneracije RPE-a u ekvatorijalnoj zoni retine. Ova degeneracija je prisutna u 20% populacije iznad 40 godina života i bilateralna je u svim slučajevima (177, 179).

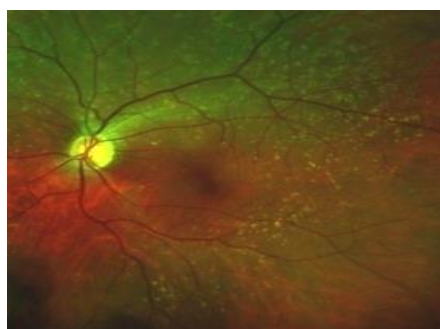
Slika 9. Retikularne pigmentne degeneracije (izvor slika: istraživanje u sklopu ove disertacije snimane Optomap P200MA fundus kamerom)



4. Periferne druze

Skupine malih žućkastobijelih okruglih lezija, često s hiperpigmentiranim granicama (posljedica proliferacije RPE-a); vrlo su slične druzama na stražnjem polu i češće se javljaju u starijoj dobi. Nastaju kao posljedica abnormalne funkcije RPE-a, no smatraju se benignom retinalnom degeneracijom povezanom s dobi (177, 179).

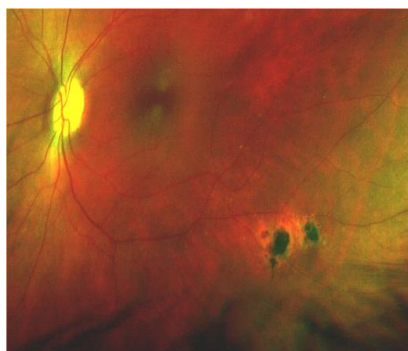
Slika 10. Periferne druze (izvor slika: istraživanje u sklopu ove disertacije snimane Optomap P200MA fundus kamerom)



5. Hiperpigmentacije – hiperplazija RPE i pigmentne nakupine (*engl. pigment clumping*)

Hiperplazija RPE-a nastaje kao posljedica proliferacije stanica RPE-a formirajući pigmentne retinalne lezije nepravilnih oblika. Vitrealna trakcija, upala, infekcija ili trauma mogu biti “okidači” za hiperplaziju RPE. Kao manje nakupine proliferiranog pigmenta formiraju se tzv. pigmentne nakupine (*engl. pigment clumping*). To stečeno stanje tijekom života treba razlikovati od tzv. kongenitalne hipertrofije RPE-a (*engl. Congenital Hypertrophy of RPE*). CHRPE je kongenitalna hipertrofija (povećanje u veličini stanica) RPE-a i događa se odmah nakon rođenja ili kasnije. S povećanjem veličine stanica, povećava se i broj melaninskih granula, a time i razina pigmentacije. Lezija je obično okrugla ili ovalna, crne boje i oštih granica. Unutar lezije, vrlo često se mogu vidjeti depigmentirane zone koje su posljedica pojave RPE stanica bez melaninskih granula. S vremenom, tijekom degeneracije CHRPE-a mogu se pojaviti zone korioretinalne atrofije i zone tzv. nove degeneracije (*engl. white-without pressure*). Većinom su benigne promjene, no u literaturi je opisana povezanost sa sindromom obiteljske adenomatozne polipoze. Obično su unilateralne (177, 179, 182).

Slika 11. Hiperplazija RPE



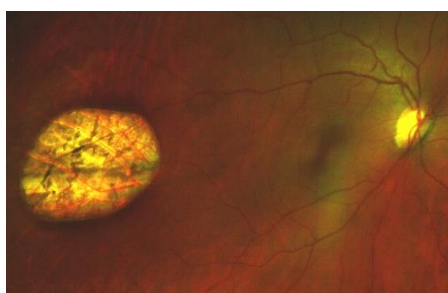
Slika 12. CHRPE i pigmentne nakupine (preuzeto iz www.optos.com)



6. Hipopigmentacije – atrofični areali i defekti RPE

Korioretinalna atrofija je posljedica gubitka koriokapilarisa, RPE-a i vanjskih slojeva mrežnice. Unutar lezije su vrlo često prisutne nakupine pigmenta zbog migracije degeneriranih stanica RPE-a u unutarnje slojeve mrežnice (177, 179).

Slika 13. Korioretinalna atrofija (izvor slika: istraživanje u sklopu ove disertacije snimane Optomap P200MA fundus kamerom)

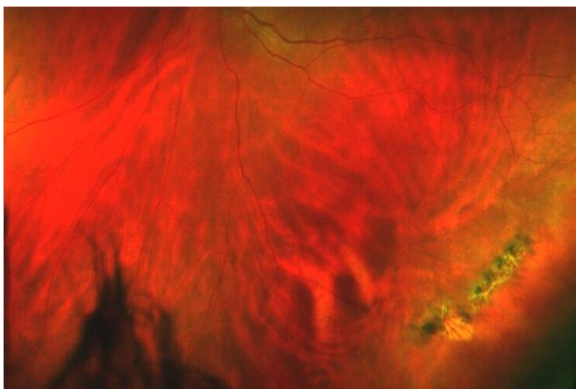


1.3.2.2. Maligne periferne degeneracije

1. Mrežolike degeneracije (*engl. lattice degenerations*)

Cirkumferencijalno orijentirane mrežolike bijele linije unutar otoka stanjene mrežnice i proliferiranog RPE, obično smještene između ekvatora i orre serrate. Iznad te degeneracije prisutna je likvefakcija staklastog tijela koji je čvrsto prišvršćen uz rubove degeneracije. Bijele linije predstavljaju sklerozirane retinalne krvne žile. Male rupture koje se mogu naći unutar degeneracije, osobito nakon skleralne indentacije, obično su posljedica daljnjeg stanjenja mrežnice ili vitreoretinalne adhezije i trakcije na rubovima primarne lezije. Neke od ovih degeneracija mogu sadržavati pahuljaste degenerirane Müllerove stanice (*engl. snowflake*). Prisutne su u 6-8% populacije i najčešće se pojavljuju u 2. ili 3. desetljeću života. Smještene su češće temporalno nego nazalno i obično su bilateralne. Češće su u kratkovidnih osoba i mogu se naći u 20-30% bolesnika s ablacijom mrežnice. Mrežolike degeneracije su čimbenik rizika za razvoj ablacije mrežnice ili od okruglih rupa bez ablacije stražnje hijaloidne membrane ili trakcijskih ruptura kao komplikacija ablacije stražnje hijaloidne membrane. Miopski bolesnici s mrežolikim degeneracijama i okruglim rupama zahtijevaju pažljivo praćenje radi mogućnosti razvoja lokalizirane ablacije mrežnice. Profilaktička laserska fotokoagulacija takvih promjena je nužna u slučaju znakova progresije takvih lokaliziranih, subkliničkih u prave kliničke ablacije mrežnice (177, 183, 184).

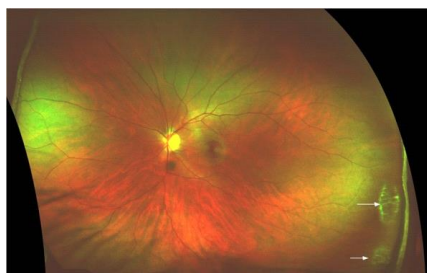
Slika 14. Mrežolike degeneracije (izvor slika: istraživanje u sklopu ove disertacije snimane Optomap P200MA fundus kamerom)



2. Degeneracije poput puževa traga (*engl. snailtrack degenerations*)

Vitreoretinalne degeneracije karakterizirane oštro ograničenim arealima poput smrznutog inja i praćene likvefakcijom staklovine. Bjelkasti izgled lezija je sličan puževom tragu, po čemu su i dobile ime. Vrlo često sadrže erozije i rupe poput mrežolikih degeneracija te se smatra da imaju slične moguće komplikacije i klinički tijek (177, 185, 186).

Slika 15. Degeneracije poput puževa traga (izvor slika: istraživanje u sklopu ove disertacije snimane Optomap P200MA fundus kamerom)



3. Bjedilo bez pritiska (*engl. white without pressure*)

Bjelkasta područja periferne mrežnice vidljiva bez skleralne indentacije. Obično su asimptomatska, no ponekad je moguć razvoj gigantske rupture na rubovima degeneracije te u slučaju razvoja rupture, u tih se bolesnika preporuča profilaktička laserska fotokoagulacija ili krioterapija (177, 185, 187).

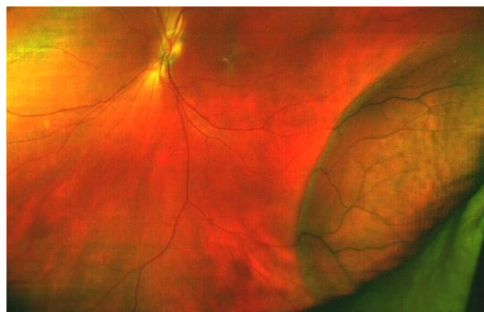
Slika 16. Bjedilo bez pritiska (izvor slika: istraživanje u sklopu ove disertacije snimane Optomap P200MA fundus kamerom)



4. Degenerativna retinoshiza

Rascjep slojeva periferne mrežnice u dva sloja: unutarnji i vanjski sloj, najčešće u vanjskom zrnatom sloju (tzv. tipična retinoshiza) uzrokovana degeneracijom neuroretinalnih i glijalnih elemenata u području periferne cistoidne degeneracije. Ako je rascjep u sloju živčanih vlakana, tada govorimo o retikularnoj retinoshizi koja je puno rjeđa. Degenerativna retinoshiza je prisutna u 5% populacije i većinom je bilateralna. Obično je smještena u inferotemporalnim dijelovima obaju fundusa i klinički izgleda kao glatka nepokretna elevacija mrežnice. Većinom su bez komplikacija, no u određenom broju slučajeva moguć je razvoj ruptura ili ablacije mrežnice (177, 188, 189).

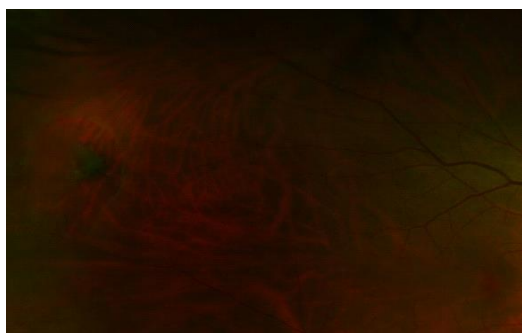
Slika 17. Degenerativna retinoshiza (izvor slika: istraživanje u sklopu ove disertacije snimane Optomap P200MA fundus kamerom)



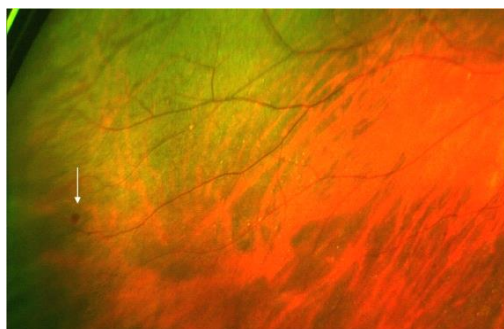
5. Rupture

Defekti u cijeloj debljini neurosenzorne mrežnice koji se patofiziološki dijele na one koji su posljedica vitreoretinalne trakcije (rupture) s predilekcijskim mjestom u gornjem dijelu fundusa i na one koji su posljedica kronične atrofije periferne mrežnice (atrofične rupe) s predilekcijskim mjestom u temporalnom fundusu. Morfološki se rupture dijele u U, nekompletni U, rupture s operkulumom, retinodijalizu i gigantske rupture (177, 190, 191).

Slika 18.a. Rupture (izvor slika: istraživanje u sklopu ove disertacije snimane Optomap P200MA fundus kamerom)



Slika 18.b. Atrofične rupe



Slika 19. Morfološki izgled ruptura – a) U-ruptura, b) nekompletna U-ruptura (linearna), c) L-ruptura, d) ruptura s operkulumom, e) dijaliza mrežnice (preuzeto iz udžbenika oftalmologije „Clinical ophthalmology“, autori Kanski i suradnici)



1.3.3. Pregled istraživanja povezanosti perifernih promjena mrežnice i genotipskih promjena u SMD-u

Sve dosad korištene klasifikacije SMD-a opisuju samo promjene unutar makularnog područja. Prema rezultatima posljednjih studija, osobe s genotipskim promjenama karakterističnim za SMD, nemaju samo prisutne promjene u makularnom području, već ih se može naći i na periferiji mrežnice. Rudolf i suradnici su analizirali postmortem karakteristike druze u makularnom području i perifernoj mrežnici u devet očiju bolesnika sa SMD-om. Pronašli su značajne razlike u morfologiji, sastavu i fizikalnim obilježjima između tipova druze u tim dvjema lokacijama. Meke druze su se nalazile samo u makularnom području, dok su u perifernoj mrežnici bile prisutne tvrde i miješane druze (192).

Lewis i suradnici su analizirali 850 donorskih očiju s ciljem određivanja histopatološke analize degeneracije perifernih retikularnih pigmentnih promjena (RPP) i zaključili da su RPP i degeneracije makule konkomitantni procesi u biološkom procesu starenja oka te da su retikularne pigmentacije mogući čimbenik rizika za razvoj SMD-a (193).

Periferne druze su jedina fenotipska razlika u kasnim stadijima SMD-a u obiteljima s pojedinačnim i obiteljima s multiplim jedinkama oboljelih od SMD-a (195).

2007. Shuler i suradnici ispitivali su povezanost šesnaest različitih fenotipova s genotipom s jednim ili dvama T alelima gena ARMS2 na 776 ispitanika, od čega je 164 ispitanika bilo s oba T rizična alela, a 330 je imalo jedan rizičan T alel. Od perifernih promjena mrežnice analizirane su periferne druze i RPP. Dokazano je da je ARMS2 neovisni čimbenik rizika za neovaskularnu SMD i da bolesnici s dvama T alelima za rs10490924 u svom genotipu mogu imati pojavu kliničkih znakova bolesti u ranijoj dobi, no nije dokazana povezanost ARMS2 polimorfizama s perifernim promjenama mrežnice (238).

2008. objavljen je drugi rad istog prvog autora u kojem su ispitivani fenotipi 796 ispitanika oboljelih od SMD-a nosioca barem jednog C alela polimorfizma CFHY402H (rs1061170) i uspoređivali ih s fenotipom 160 nenosioca tog alela. Dokazano je da su RPP povezane s CFHY402H polimorfizmom i da promjene SMD-a nisu samo ograničene na makularno područje te stoga, prilikom kliničke procjene bolesnika sa SMD-om, treba uzeti i obzir periferne promjene mrežnice (194).

2008. Seddon i suradnici su ispitivali povezanost šest nukleotidnih polimorfizama gena za CFH, ARMS2, HTRA1, CFB, C2 i C3 s perifernim retinalnim fenotipovima u 2103

člana obitelji i blizanaca te dokazali da su periferne druze i RPP povezani s polimorfizmima CFHY402H (rs1061170) i CFHrs1410996. Za CFHY402H CC genotip, vjerojatnost prisustva perifernih druzi je bila 2,8, a RPP-a 2,0 puta veća u odnosu na ispitanike s TT genotipom, a s kliničkim znakovima srednje teške do uznapredovale makulopatije. Slični rezultati su dobiveni i za polimorfizam CFH rs1410996. Povezanost nije dokazana za genske lokuse ARMS2, HTRA1, CFB, C2 ili C3. U osoba koje nisu imale znakova makulopatije, vjerojatnost prisustva druzi ili retikularnih pigmentacija je bila 2 puta veća u onih s CT ili CC genotipom obaju polimorfizama za CFH, no trend povezanosti nije bio statistički značajan. RPP su bile statistički značajno povezane s rizičnim C alelom i vjerojatnost njihovog prisustva je 2,2-2,4 puta veća u slučaju CC genotipa (196).

2008. je objavljen rad Mantel i suradnika koji su dokazali na uzorku od 411 ispitanika da je rizik za pojavu SMD-a 2,95 puta veći s jednim C alelom, odnosno čak 9,05 puta veći s dvama CC alelima za polimorfizam CFHY402H (rs1061170). Utvrđena je značajna povezanost CC genotipa s perifernim druzama ($p=0,028$) i centralnim druzama ($p=0,049$). Nije bilo značajne povezanosti za RPP (198).

2010. Munch i suradnici su ispitivali povezanost malih makularnih i perifernih druzi i polimorfizama za CFH, ARMS2, HtrA1 i CFB. Dokazana je povezanost CC genotipa i makularnih druzi s $OR=1,8$ za CC genotip i $OR=1,2$ za CT genotip polimorfizma CFH gena. Što se tiče perifernih promjena, ispitivana je povezanost perifernih druzi i polimorfizama te je dokazano da bolesnici s CC genotipom za polimorfizam CFHY402H (rs1061170) imaju četiri puta, dok oni s CT genotipom imaju 2 puta veću vjerojatnost prisustva perifernih druzi. Nije dokazana povezanost makularnih i perifernih druzi s polimorfizmima gena ARMS2, HtrA1 i CFB (197).

2014. Mantel i suradnici su ispitivali genotipsku-fenotipsku korelaciju polimorfizma R32Q (rs641153) za gen CFB u bolesnika oboljelih od SMD-a na 349 ispitanika i dokazali da R32Q polimorfizam pokazuje značajnu statističku povezanost s manjim druzama (do 125 μm), smanjujući istovremeno vjerojatnost pojave velikih druzi. Dokazano je i da ispitanici s R32Q polimorfizmom imaju 2,25 puta veću vjerojatnost prisustva perifernih druzi (240).

Iako su studije koje su do sada povezivale periferne morfološke promjene mrežnice s genotipom dokazale da vjerojatnost prisustva perifernih promjena do 2,8 puta veća za CC genotip u CFH polimorfizama i 2,2 puta veća za RQ32 polimorfizam, te studije nisu mogle tehnički zadovoljavajuće i detaljno snimiti periferiju mrežnice čime je bilo onemogućeno uključivanje neovisnog centra za analizu slika i izbjegavanje pristranosti u ocjeni nalaza. Slike periferije mrežnice su u svim navedenim

studijama slikane standardnom fundus kamerom koja može prikazati 30-50 stupnjeva periferne mrežnice u jednoj snimci. Posljednjih godina došlo je od značajnog napretka u tehnologiji snimanja očne pozadine širokokutnom kamerom kojom je moguće prikazati do 200 stupnjeva mrežnice u jednoj snimci i takav je uređaj komercijalno dostupan (Optomap P200MA, Optos). Tim dijagnostičkim alatom se može dobiti detaljan uvid u periferiju mrežnice, a time odrediti s većom pouzdanošću mjesto perifernih promjena mrežnice u fenotipu SMD-a (212).

1.4. Dijagnostičke metode u otkrivanju SMD-a

1.4.1. Osobna i obiteljska anamneza

U kliničkoj slici SMD-a obično su prisutni simptomi i znakovi kao što su metamorfopsija, smanjena vidna oštrina, skotomi, fotopsije, poteškoće u adaptaciji na mrak (200). Važno je uzeti podatke o uzimanju lijekova i nutritivnih nadomjestaka, podatke iz prethodne očne i obiteljske anamneze, podatke o prethodnim alergijskim reakcijama, anamnestičke podatke o kvantitativnim pušačkim navikama, izloženosti svjetlu, prehrani i lijekovima (201, 202).

1.4.2. Klinički pregled

Klinički pregled podrazumijeva: određivanje vidne oštine na Snellenovim optotipovima, mjerenje očnog tlaka aplanacijskim tonometrom, pregled prednjeg segmenta na biomikroskopu, binokularni pregled očne pozadine na biomikroskopu koristeći nekontaktnu Volk Superfield leću da bi se detektirali klinički znakovi SMD-a: tvrde i meke, konfluirajuće druze, fokalne hiperpigmentacije i atrofije RPE-a, subretinalna eksudacija, makularni edem, hemoragije, subretinalna fibroza, odignuća RPE (*engl. Pigment Epithelial Detachment, PED*).

1.4.3. Optička koherentna tomografija (OCT)

OCT je dijagnostička neinvazivna metoda slojevitog snimanja makularnog područja i očnog živca koja koristi metodu niskokoherentne interferometrije da bi proizvela dvodimenzionalnu ili trodimenzionalnu sliku optičke refleksije tkivnih mikrostrukture. OCT ima longitudinalnu i lateralnu prostornu rezoluciju od 1-15 mikrometara i može prepoznati i analizirati signal veličine 10^{-10} optičke jakosti (203).

Novije generacije OCT-a, kao što je SD-OCT, koristeći valnu duljinu od 850 nm (*engl. Spectral Domain OCT*) povećale su brzinu snimanja slike na 40 000 slika u sekundi i povećale mogućnost otkrivanja strukturnih promjena mrežnice i žilnice te omogućile prikaz prednjeg segmenta oka (204).

Najnovija generacija OCT-a je tzv. DRI OCT-1 Atlantis, Topcon (*engl. Deep Range Imaging OCT*) koji koristi veću valnu duljinu od 1050 nm s većom brzinom snimanja od 100 000 slika u sekundi i u odnosu na SD-OCT, prodire dublje i vizualizira očna tkiva kao što su žilnica ili bjeloočnica u kratkom vremenu (205).

OCT je važna metoda u dijagnosticiranju patoloških promjena u SMD-u – serozne ablacije mrežnice, hemoragije, subretinalnog CNV-a i dokumentaciji retinalnog zadebljanja. Uz pomoć snimke makularnog područja OCT-om, moguća je klinička diferencijacija vrste CNV-a, retinalne angiomatozne proliferacije (RAP), disciformnih ožiljaka u prirodnom tijeku bolesti, kao i odgovor na liječenje (206).

1.4.4. Fluoresceinska angiografija (FAG)

U slučaju metarmofopsije, neobjašnjivog gubitka vidne oštine i kliničkog ili OCT nalaza odignuća RPE-a ili mrežnice, makularnog edema, subretinalne hemoragije, tvrdih druzi ili subretinalne fibroze, indicirano je učiniti FAG.

FAG je dijagnostička metoda za ispitivanje funkcionalnog stanja krvožilnog sustava mrežnice i žilnice koja koristi fluorescein kao kontrast i specijaliziranu kameru koja snima kretanje kontrasta kroz cirkulaciju. Nakon što se fluorescein intravenski injicira u sistemsku cirkulaciju, ekscitira se svjetlosnom zrakom plavog spektra uz pomoć kobalt plavog ekscitacijskog filtera, potom prelazi u ekscitirano stanje u kojem otpušta elektrone u žutozelenom spektru, te uz pomoć žutozelenog blokirajućeg filtera emitira samo žutozeleno svjetlo, a potom se fotografiraju angiogrami prolaska fluoresceina kroz retinalnu cirkulaciju.

U SMD-u, FAG se kao dijagnostička metoda koristi za određivanje prisustva, veličine, mjesta i kliničkog tipa CNV-a. Do pojave anti-VEGF lijekova, FAG je bio nezamjenjiva metoda u odluci o vrsti liječenja (npr. laserskom fotokagulacijom ili fotodinamskom terapijom), za praćenje liječenja u utvrđivanju perzistentnih ili rekurentnih CNV-a. Od drugih indikacija, FAG se koristi za utvrđivanje postojanja neke druge retinološke bolesti i za utvrđivanje uzroka gubitka vidne oštine čiji se uzrok ne može odrediti kliničkim pregledom (207).

Tijekom izvođenja FAG-a, moguće su nuspojave kao što su mučnina, povraćanje, alergijske reakcije i u 1:200 000 slučajeva, anafilaktički šok. Svaka angiografija mora biti praćena jasnim kliničkim protokolom prevencije rizika i komplikacija dijagnostičke procedure (208).

1.4.5. Fotografija fundusa i usporedba konvencionalnih fundus kamera sa širokokutnom fundus kamerom (Optomap P200MA, Optos)

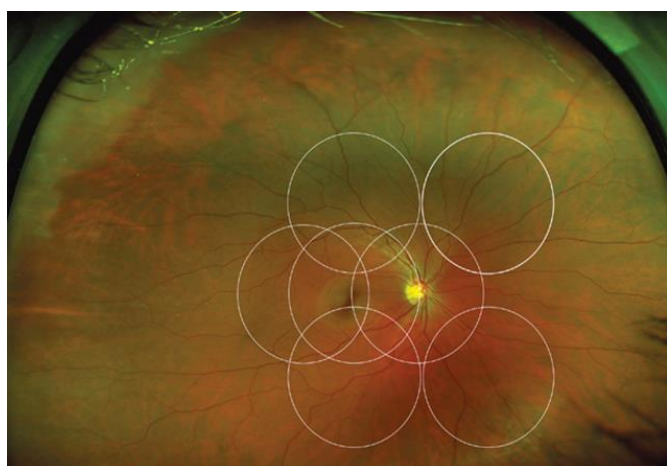
U praćenju tijeka bolesti vrlo važno mjesto ima kolorna snimka očne pozadine.

Standardne fundus kamere su kamere koje rade na optičkom principu monokularne indirektno oftalmoskopije i omogućuju uspravnu uvećanu sliku fundusa. Obično prikazuju 30-50 stupnjeva retinalnog područja s povećanjem od 2,5 puta. Tradicionalne fundus kamere omogućuju prikaz periferne mrežnice ako je objektiv usmjeren prema periferiji. Diabetic Retinopathy Study je usavršila metodu u kojoj se fotografije periferne mrežnice prikazuju pojedinačno ili se superponira nekoliko snimaka u jednu. Da bi se dobila što veća površina prikaza mrežnice, superponira se sedam standardnih polja snimanja i time se prikaže 75 stupnjeva polja mrežnice. Iako sedam standardnih superponiranih polja može prilično dobro prikazati srednju periferiju, tim načinom nije moguće prikazati krajnji periferni dio mrežnice (209).

Danas su u uporabi tzv. širokokutne fundus kamere kao što je Optomap P200MA (Optos) koje prikazuju retinalno područje unutar 200 stupnjeva vidnog polja, što odgovara 82.5% površine mrežnice i omogućuju istovremeno uvid u stražnji pol, srednju i daleku periferiju mrežnice. Ove fundus kamere najnovije generacije koriste skenirajuću konfokalnu lasersku oftalmoskopiju (engl. Confocal Scanning Laser Ophthalmoscopy CSLO) kao osnovnu tehnologiju snimanja, čime je omogućeno snimanje veće površine mrežnice u jednoj snimci (210). CSLO je tehnologija snimanja mrežnice koja koristi zeleni laser (532 nm) za snimanje neurosenzorne mrežnice i sloja RPE-a i crveni laser (633 nm) za snimanje RPE-a i žilnice. Pritom se koristi elipsoidno zrcalo da bi se stvorio virtualni fokus smješten iza šarenice. Konfokalna tehnika snimanja podrazumijeva da fokusirane laserske zrake skeniraju istovremeno strukture mrežnice „točku po točku“ u dvije dimenzije, a potom se bilježi reflektirana

svjetlost dobivena kroz mali otvor (konfokalni otvor). Konfokalni otvor potiskuje informacije dobivene izvan točke snimanja, što bi, u protivnom, izazivalo nejasnu sliku. U računalu se rekonstruira trodimenzionalna slika kompleksnih objekata snimanja i dobiva oštra snimka visokog kontrasta i rezolucije. U usporedbi s tradicionalnom fundus fotografijom, prednosti ove tehnologije su unaprijeđena kvaliteta snimki, mala dubina fokusa, potiskivanje raspršene svjetlosti, veća ugodna za bolesnika zbog smanjene jačine svjetlosti i bolje mogućnosti snimanja u uvjetima slabe vidljivosti. Širokokutne kamere mogu proizvesti snimke s autofluorescencem, važne za dijagnostiku poremećaja RPE-a i koristiti Heidelberg retinalnu fluoresceinsku angiografiju za dodatnu dijagnostičku obradu s kontrastom (210, 211, 212).

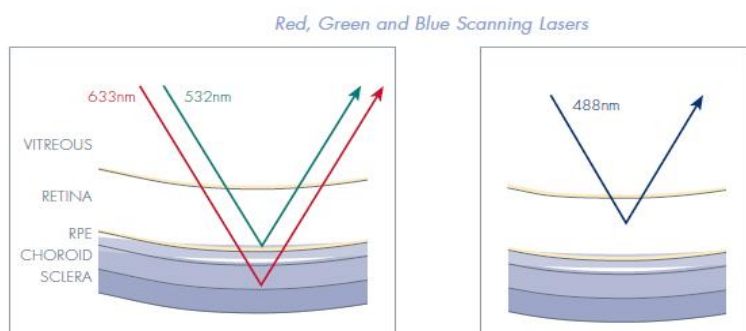
Slika 20. Usporedba snimke mrežnice širokokutnom fundus kamerom s prikazanih 200 stupnjeva područja mrežnice sa superponiranim snimkama mrežnice učinjenima standardnom fundus kamerom gdje se može prikazati maksimalno 30-50 stupnjeva (izvor: istraživanje u sklopu ove disertacije)



Slika 21. Prikaz širokokutnog simultanog snimanja visoke rezolucije s dvije laserske zrake (preuzeto iz www.optos.com)

The P200[®] MA

Ultraširoko polje snimanja, ultravisoka rezolucija, simultano snimanje



Iako je širokokutna kamera unaprijedila način prikaza mrežnice, prilikom analize treba voditi računa o ograničenjima ovog vrijednog dijagnostičkog alata. Naime, širokokutna kamera nije u mogućnosti snimiti 360 stupnjeva mrežnice do *orre serrate* u jednoj snimci. Isto tako, ne može zamijeniti ulogu indirektno oftalmoskopije sa skleralnom indentacijom radi analize mrežnice u sva četiri kvadranta. Prilikom snimanja periferne mrežnice, zbog elipsoidnosti zrcala i sferičnog oblika bulbusa, moguća je distorzija snimke periferne mrežnice čime je onemogućeno direktno mjerenje perifernih retinalnih struktura. Unatoč ograničenjima, treba još jednom istaknuti da je ovom metodom učinjen značajan korak naprijed u prikazu i analizi perifernih promjena mrežnice u odnosu na standardne metode snimanja (212).

1.4.6. Indocijanin angiografija

Indocijanin angiografija je dijagnostička metoda vrlo slična FAG-u, no za razliku od FAG-a, omogućuje bolju vizualizaciju žilnice i korisna je u dijagnosticiranju specifičnih kliničkih oblika SMD-a kao što su PED, slabo definirana CNV, okultna CNV, retinalna angiomatozna proliferacija (RAP) i idiopatska polipoidna koroidalna vaskulopatija. Za izvođenje ove pretrage koristi se indocijanin koji se apsorbira i emitira energiju u infracrvenom dijelu spektra koji dobro prolazi kroz RPE (213).

1.5. Liječenje SMD-a

1.5.1. Sadašnji načini liječenja SMD-a

Tek se u posljednja dva desetljeća pojavljuju nove mogućnosti liječenja kliničkih oblika SMD-a i uglavnom su orijentirane na uznapredovali eksudativni oblik SMD-a. Iako eksudativni oblik SMD-a čini samo 15 % oboljelih, vrlo je važno pravovremeno ga liječiti jer je glavni uzrok dramatičnog pada vidne oštine u SMD bolesnika.

Prema rezultatima prospektivnih, multicentričnih, randomiziranih kliničkih studija AREDS1 na 4757 i AREDS2 na 4203 ispitanika s bilateralnim, velikim druzama ili druzama u jednom oku i uznapredovalom bolešću u drugom oku, uporaba kombinacije 500 mg vitamina C, 400 IU vitamina E, 10 mg luteina, 2 mg zeaksantina, omega-3 nezasićenih masnih kiselina (350 mg dokozaheksanoične (DHA) i 650 mg eikozapentanoične kiseline (EPA)), 2 mg bakra i 25 mg cinka, dovodi do smanjenja stope progresije intermedijarnog SMD-a za 25-30% unutar 5 godina, dok je rizik gubitka vida za 3 ili više linija Snellenovih tablica smanjen za 19% (214). Iako je stopa progresije značajno smanjena u intermedijarnoj SMD, do danas nema dokaza da uzimanje takve kombinacije antioksidansa značajno smanjuje rizik napredovanja bolesti u bolesnika s ranom SMD.

Laserska fotokoagulacija je jedna od prvih načina liječenja koja koristi lasersku zraku uzrokujući fotokoagulaciju CNV membrana. Prema rezultatima MPS studije (*engl. Macular Photocoagulation Study*), nakon provedene laserske fotokoagulacije, ispitanici s dobro ograničenim subfoveolarnim CNV-om pokazali su značajno poboljšanje vidne oštine, brzinu čitanja ili kontrastnu osjetljivost. No, isto tako je primijećeno da nakon 3 i 6 mjeseci od završetka liječenja, kod očiju liječenih laserskom fotokoagulacijom, dolazi do pogoršanja vidne oštine u odnosu na neliječene oči. Također je primijećeno da 50 % očiju zahtijeva ponovno liječenje i da je u 30% novootkrivenih CNV-a stopa recidiva 30%, tako da se za subfoveolarne CNV više ne preporučuje kao mogući način liječenja (215).

Loša strana ovog načina liječenja je i da se u procesu liječenja, uništavaju i zdrava okolna tkiva, uzrokujući trenutni gubitak vida zbog nastanka skotoma te visoke stope recidiva (215).

Prema podacima iz MPS-a, za bolesnike s jukstafoveolarnim CNV-om liječenih laserskom fotokoagulacijom, unatoč dobrim kratkoročnim rezultatima poboljšanja vidne oštine, zbog velike stope perzistentnog i rekurentnog CNV-a te s vremenom značajnog pada vidne oštine, laserska fotokoagulacija nije zaživjela kao prvi izbor liječenja (215).

Što se tiče ektrafoveolarnih i peripapilarnih lokalizacija CNV-a, prema MPS-u, laserska fotokoagulacija je uspjela sniziti rizik gubitka vidne oštine tijekom dviju godina, no rekurentni ili perzistentni CNV je bio prisutan u 50% ispitanika, dok je nakon 5 godina 40% očiju ispitanika imalo gubitak vidne oštine od 30 slova u odnosu na 62% očiju u kontrolnoj skupini (215). Trenutne smjernice liječenja daju prednost intravitrealnom liječenju s antagonistima vaskularnog endotelijalnog čimbenika rasta (anti-VEGF) kao prvi izbor liječenja ektrafoveolarnih CNV-a u odnosu na lasersku fotokoagulaciju.

S pojavom verteporfirina (Visudyne, Novartis) došlo je do pojave novog načina liječenja tzv. fotodinamske terapije (*engl. PhotoDynamic Therapy, PDT*) za liječenje eksudativnog oblika SMD-a za bolesnike s dominantno klasičnim CNV-om. Verteporfirin djeluje ciljano na neovaskularna i neoplastička tkiva, s ciljem selektivnog djelovanja na abnormalne krvne žile i minimaliziranja oštećenja okolnog zdravog tkiva. Nakon intravenozne primjene, fotoosjetljivi verteporfirin se nakuplja u tkivima bogatim lipoproteinima niske gustoće (*engl. Low-Density Lipoproteins, LDL*). Nakon što se osvijetli laserskom zrakom valne duljine od 689 nm, dolazi do direktne destrukcije neovaskularnog tkiva posredovane procesom lipidne peroksidacije i nastankom slobodnih kisikovih radikala. Vaskularno endotelno oštećenje uzrokuje agregaciju trombocita i vaskularnu trombozu. U TAP studiji (*engl. The Treatment of the Age Related Macular Degeneration With Photodynamic Therapy*) pokazalo se da PDT terapija s verteporfirinom smanjuje rizik od umjerenog gubitka vidne oštine, definirane kao gubitak triju ili više linija na Snellenovim tablicama tijekom dviju godina, stoga je ova vrsta liječenja indicirana za predominantno klasične subfoveolarne CNV. Iako se pokazao učinkovit, ovaj način liječenja zahtijeva ponavljanje nakon 3-4 mjeseca zbog visoke stope reaktivacije CNV-a (216).

1971. g. američki liječnik i znanstvenik Judah Moses Falkman postavio je hipotezu da su solidni tumori ovisni o angiogenezi i da luče tvari koje pospješuju njihovu angiogenezu (199). 1983. g. kloniran je vaskularni endotelni čimbenik rasta (*engl. Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF*), važan čimbenik rasta koji potiče angiogenezu tumora, a 2004. g. je sintetiziran bevacizumab, prvi lijek odobren od Američke udruge za hranu i lijekove (*engl. Food and Drug Administration, FDA*) za inhibiciju angiogeneze tumora. S pojavom antagonista vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (anti-VEGF), kao što su pegaptanib (Macugen, Pfizer), bevacizumab (Avastin, Roche), ranibizumab (Lucentis, Novartis) i aflibercept (Eylea, Bayer) došlo je do revolucionarnog zaokreta u liječenju vlažnog (eksudativnog) oblika SMD-a. Anti-VEGF lijekovi su pokazali značajno poboljšanje u vidnoj oštini i kliničkoj regresiji bolesti u odnosu na dosadašnje načine liječenja (fotodinamsku terapiju ili lasersku fotokoagulaciju) (217-225). Anti-VEGF liječenje postalo je prva linija liječenja eksudativne SMD.

Intravitrealni bevacizumab (1,25 mg) je monoklonsko protutijelo koje se veže za sve izooblike VEGF-A. Njegovo korištenje je odobreno za metastatski kolorektalni karcinom, karcinom dojke i karcinom pluća tipa malih stanica. Intravitrealni bevacizumab je prvi ispitivan kod bolesnika s eksudativnom

SMD i preliminarni rezultati su pokazali značajno poboljšanje vidne oštine i smanjenje retinalnog zadebljanja mjenog OCT-om (217). S obzirom na to da je u svijetu odobren za liječenje drugih bolesti, ali ne i za liječenje SMD-a, u oftalmološku je praksu uveden kao lijek s „off-label“ statusom zbog odličnih rezultata liječenja, dobre podnošljivosti i manje cijene liječenja u odnosu na ranibizumab (217-219).

Intravitrealni ranibizumab (0,5 mg) je odobren za liječenje svih subtipova neovaskularne SMD. Ranibizumab je rekombinirani, humanizirani imunoglobulin G1 dizajniran za intravitrealnu primjenu. Veže se za sve izooblike humanog VEGF-A inhibirajući njihovu biološku aktivnost (220).

Komparativna studija učinkovitosti i podnošljivosti ranibizumaba i bevacizumaba tzv. CATT studija (*engl. The Comparison of AMD Treatments Trials*) pokazala je da oba lijeka imaju podjednaku učinkovitost mjerenu poboljšanjem vidne oštine i podjednako dobar profil podnošljivosti (221).

Pegabtanib (0.3 mg) je prvi selektivni antagonist VEGF-a indiciran za neovaskularnu SMD koji veže 165 izooblika VEGF-A. S obzirom na to da u dvjema kliničkim studijama nije pokazao takvu kliničku učinkovitost kao ranibizumab ili bevacizumab, upotrebljava se iznimno u kliničkoj praksi (219).

Aflibercept (2mg) je inhibitor VEGF-A i placentarnog čimbenika rasta (PGF) jednake učinkovitosti kao i ranibizumab. U komparativnoj VIEW studiji (*engl. Investigation of Efficacy and Safety in Wet AMD Trials*), 2 mg aflibercepta svakih 4 ili 8 tjedana tijekom triju mjeseca jednako je učinkovito kao 0,5 mg ranibizumaba (222).

Kliničke studije u kojima je bolesnicima sa SMD-om davan anti-VEGF lijek u kombinaciji s intravitrealnim kortikosteroidima ili vertepofirinom, pokazale su da kombinacija ovih lijekova ne dovodi do značajnog kliničkog poboljšanja. U tih bolesnika dokazan je i veći rizik od razvoja katarakte ili glaukoma kao komplikacija liječenja (223-225).

1.5.2. Budućnost liječenja kliničkih oblika SMD-a

Trenutne smjernice liječenja neovaskularnog SMD-a podrazumijevaju inhibiciju VEGF-a intravitrealnim aplikacijama njegovih antagonista, čija je učinkovitost i profil podnošljivosti vrlo dobro dokumentiran u brojnim kliničkim studijama. Usprkos ostvarenom napretku u liječenju SMD-a, mnogi bolesnici ne postižu značajan pomak u poboljšanju vidne oštine, dok neki od njih čak i gube vidnu oštrinu. Prema podacima iz CATT studije, nakon liječenja antagonistima VEGF-a, u nekih ispitanika je bila povećana incidencija geografske atrofije (226).

Također ne treba zanemariti niti potrebu za čestim posjetama liječniku i veliki broj intravitrealnih injekcija koje se daju bolesniku. Sve te činjenice rađaju potrebu za novim načinima liječenja. U tijeku su kliničke studije koje pokušavaju odrediti mjesto novih terapijskih mogućnosti zasnovanih na inhibiciji pojedinih komponenti komplementa, čimbenika rasta, matičnih stanica, imunosupresorima, antiamiloidnim protutijelima. Istraživanja uloge pericita u patofiziologiji SMD-a su pokazala da su periciti potporne stanice endotelnih stanica krvnih žila koje luče čimbenike rasta kao što su VEGF, PDGF (*engl. Platelet Derived Growth Factor*, PDGF) i time imaju ključnu ulogu u preživljavanju endotelnih stanica. PDGF je čimbenik rasta endotelnih stanica koji se veže na B-receptor pericita. Vezivanjem endotelnih stanica i pericita, stabiliziraju se kanali endotelnih stanica. CNV s dobrom mrežom pericita pokazuju određenu razinu rezistencije na anti-VEGF liječenje. Cilj kombiniranog anti-VEGF i anti-PDGF liječenja bio bi odvajanje pericita od CNV-a i indukcija regresije neovaskularnog kompleksa (227). U tijeku je treća faza kliničke studije za antagonist PDGF-a Fovistu ili E10030 (Novartis) u kojoj se uspoređuje učinkovitost Foviste u kombinaciji s anti-VEGF lijekovima i anti-VEGF monoterapijom (228). Fovista 1,5mg, aptamer koji se daje u obliku intravitrealnih injekcija i veže s visokim afinitetom za PDGF uzrokuje separaciju pericita od bazalnih membrana neovaskularizacija. U fazi 2b kliničkog istraživanja, bolesnici koji su dobivali Fovistu u kombinaciji s ranibizumabom, imali su statistički značajno povećanje vidne oštine, čak 62% od početne vrijednosti ili 10.6 slova više u usporedbi sa skupinom bolesnika koji su dobivali samo ranibizumab.

U tijeku je druga faza kliničkog istraživanja za sonopizumab (iSONEP, Lpath Inc.), humanizirano monoklonsko protutijelo koje neutralizira angiogene, neovisne o VEGF-u, sfingozin-1-fosfate (S1P) i ima potencijalno antiangiogene, antiupalne i antifibrotičke učinke. Prema prvoj fazi istraživanja, rezultati su obećavajući: 15 bolesnika koji nisu imali kliničko poboljšanje nakon prethodne terapije anti-VEGF lijekovima, nakon intravitrealne aplikacije iSONEP-a imali su 30% smanjenje veličine CNV-a (229).

Drugi obećavajući načini liječenja CNV-a podrazumijevaju uporabu antiintegrinskih lijekova umjesto antagonista VEGF-a. Integrini su važni prenosioci unutarstaničnih signala i sudjeluju u regulaciji staničnog oblika i pokretljivosti. Antiintegrinski oligopeptid ALG-1001 (Allegro Ophthalmics) inhibira VEGF, staničnu adheziju posredovanu $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, and $\alpha v\beta 1$ integrinima, a time i rast aberantnih krvnih žila. U tijeku su klinička istraživanja ALG-1001 za liječenje SMD-a, dijabetičkog makularnog edema i vitreomakularne trakcije. U liječenju SMD-a, skupina ispitanika koja je dobivala 3,2 mg mjesečnih intravitrealnih injekcija poboljšala je vidnu oštrinu za 5 ili više slova i pokazala 30% smanjenje u centralnoj foveolarnoj debljini na OCT-u nakon 60 dana liječenja (230).

CNV ovisi o sposobnosti brze proliferacije vaskularnih endotelnih stanica. Ionizirajuće zračenje oštećuje sposobnost replikacije stanica. Brahterapija koristi male doze ionizirajućeg zračenja s ciljem postizanja regresije CNV-a i prevencije komplikacija kao što je radijacijska retinopatija, optička neuropatija i katarakta. Neovista (Newark) je novi dizajnirani beta radijacijski sustav u trajanju od 3-4

minute koji se aplicira tijekom pars plana vitrektomije. U tijeku su istraživanja epimakularne brahiterapije (kliničke studije pod imenom MERITAGE, CABERNET, MERLOT) koja će odrediti mjesto subtenonske radioterapije u liječenju SMD-a. 2013. g. je objavljena studija INTREPID o učinkovitosti i podnošljivosti ORAYA (Oraya Therapeutics), stereotaktičke neinvazivne radioterapije u liječenju neovaskularnog SMD-a. U studiji se pokazalo da se značajno smanjuje ukupni broj potrebnih intravitrealnih injekcija uz dobar profil podnošljivosti tijekom jedne godine liječenja (231, 232).

Što se tiče učinkovite topikalne terapije neovaskularnog SMD-a, u tijeku je druga faza kliničkog istraživanja skvalamina, lijeka koji inhibira VEGF, PDGF i bazični čimbenik rasta fibroblasta (*engl. Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF*). Pretkliničke studije su pokazale da u doziranju jednom dnevno postiže zadovoljavajuće terapijske koncentracije čime se smanjuje ukupan broj potrebnih intravitrealnih injekcija (232).

Obećavajuća skupina novih lijekova kao mehanizam djelovanja ima inhibiciju VEGF receptora putem inhibicije intracelularne kaskade tirozin kinaze. Oralna administracija vatalaniba (PTK787, Bayer, Novartis), inhibitora tirozin kinaze, blokira fosforilaciju VEGF i PDGF receptora i time sprječava nastajanje retinalnih neovaskularizacija (232).

Cilijarni neurotrofički čimbenik (*engl. Ciliary Neurotrophic Factor, CNTF*) usporava progresiju gubitka vidne oštine u geografskoj atrofiji potičući produkciju PDGF antagonista. Lijek se aplicira u obliku intravitrealnog implantata (233).

Retinostat (Oxford BioMedica) je genska terapija za liječenje neovaskularnog SMD-a koja omogućuje inserciju gena preko lentiviralnog vektora važnog za ekspresiju endostatina i angiostatina, inhibitora angiogeneze, u stanice RPE-a. U tijeku je prva faza kliničkog istraživanja subretinalno administriranog Retinostata u bolesnika s uznapredovalom bolešću i subretinalnom fibrozom (234).

Objavlivanjem rezultata navedenih kliničkih studija, ostvarit će se značajan iskorak u potrazi za novim načinima liječenja koja će zasigurno omogućiti bolesnicima bolju vidnu oštrinu, uz smanjenje rizika i troškova liječenja.

2. HIPOTEZA, CILJ I SVRHA ISTRAŽIVANJA

2.1. Hipoteza

Hipoteza postavljena u ovom istraživanju je da su **periferne morfološke promjene mrežnice povezane s genskim polimorfizmima senilne makularne degeneracije.**

2.2. Ciljevi istraživanja

Ciljevi istraživanja bili su:

Opći cilj:

Ispitati povezanost perifernih morfoloških promjena mrežnice i prisustva nukleotidnog polimorfizma CFH (rs1061170, rs1410996), LOC387715/ARMS2 (rs10490924) i HTRA1 (rs11200638), CFB (rs641153, rs4151667) i C2 (rs547154, rs9332739) i C3 (rs2230199) u bolesnika sa SMD-om u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika.

Specifični ciljevi:

1. Ispitati promjene na stražnjem polu i perifernoj mrežnici oba oka skupine ispitanika sa SMD-om i kontrolne skupine ispitanika širokokutnom fundus kamerom
2. Ispitati prisustvo nukleotidnog polimorfizma CFH (rs1061170, rs1410996), LOC387715/ARMS2 (rs10490924) i HTRA1 (rs11200638), CFB (rs641153, rs4151667) i C2 (rs547154, rs9332739) i C3 (rs2230199) analizom uzetog uzorka periferne krvi u objema skupinama ispitanika
3. Ispitati stupanj povezanosti centralnih i perifernih promjena mrežnice u podskupini sa suhim i podskupini s vlažnim oblikom SMD-a
4. Ispitati stupanj povezanosti pojedinih polimorfizama i perifernih promjena mrežnice u podskupini sa suhim i podskupini s vlažnim oblikom SMD-a te u kontrolnoj skupini ispitanika

2.3. Svrha istraživanja

Ovim istraživanjem se ispitala povezanost perifernih promjena mrežnice i genotipskih promjena karakterističnih za SMD. S obzirom na dostupnost novih načina vizualizacije periferije mrežnice u ovom istraživanju, u ovoj studiji je širokokutnom fundus kamerom omogućena objektivna fotodokumentacija i analiza šireg područja periferije mrežnice ispitanika.

Sadašnje klasifikacije kliničkih znakova SMD-a opisuju promjene isključivo u makularnom području.

Dokazivanjem ove povezanosti, ovim istraživanjem će se procijeniti uloga fenotipskih promjena periferije mrežnice u bolesnika sa SMD-om i definirati novi mogući fenotip za SMD u populaciji s visokorizičnim genotipom, sa ili bez vidljivih promjena u makularnom području.

Time će biti moguća potpunija klasifikacija bolesti, pravodobno otkrivanje i praćenje bolesnika sa SMD-om.

3. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

Ovo prospektivno randomizirano istraživanje je provedeno na Klinici za očne bolesti, Kliničkom zavodu za kemiju KBC „Sestre milosrdnice“, Vinogradska 29, Zagreb i u LGC Genomics laboratoriju u Velikoj Britaniji u trajanju od godinu dana.

3.1. Odabir ispitanika

U istraživanje su bili uključeni ispitanici u dobi iznad 50 godina, susljedno redom dolaska na Kliniku te ovisno o kliničkoj slici, prema redu dolaska, svrstani su u skupinu ispitanika sa SMD-om ili u kontrolnu skupinu sa zdravim ispitanicima. Uz ispunjene kriterije za uključivanje u ovu studiju, ispitanicima je dodijeljen jedinstveni identifikacijski broj. Svi dobiveni podaci o ispitanicima su bili vođeni i čuvani pod jedinstvenim identifikacijskim brojem radi zaštite identiteta ispitanika po načelima profesionalne tajne. Očekivana distribucija ispitanika po spolu u obje skupine, u skladu sa epidemiološkim podacima, bila je nešto veća u korist ženskog spola: očekivani omjer žena i muškaraca je 1,25–1,5:1.

Prilikom dolaska i po redu dolaska, svim ispitanicima je uzeta detaljna anamneza (opća i očna anamneza), napravljen klinički pregled, fotodokumentirana mrežnica širokokutnom fundus kamerom, snimljeno makularno područje metodom optičke koherentne tomografije (OCT), uzet uzorak periferne krvi za genotipizaciju, učinjena izolacija DNK iz uzorka periferne krvi u Zavodu za kemiju KBC Sestre milosrdnice i potom je DNK upućena na genotipizaciju u LGC Genomics laboratorij u Veliku Britaniju.

U slučaju sumnjivih promjena ili prisustva druge retinološke bolesti, dodatno se snimila fluoresceinska angiografija i konzultirao drugi oftalmolog.

Pažljivo odabrani ispitanici koji zadovoljavaju kriterije uključivanja u studiju bili su upoznati s prirodom, tijekom i ishodom potencijalne očne bolesti, mogućnostima liječenja, svrhom i načinom provođenja istraživanja. Nakon pristanka ispitanika da sudjeluju u istraživanju, isti su potpisali informirani pristanak.

Istraživanje se provodilo u skladu sa načelima Dobre kliničke prakse i Etičkih načela Helsinške deklaracije.

3.2. Anamneza i klinički pregled ispitanika

Anamnestički su dobiveni podaci o dobi, spolu i navikama – jesu li pušači ili nepušači.

Klinički pregled je obuhvaćao:

- određivanje vidne oštine Snellenovim optotipom
- pregled prednjeg segmenta oka na biomikroskopu (određivanje prozirnosti rožnice, leće i staklastog tijela)
- mjerenje intraokularnog tlaka aplanacijskim tonometrom
- priprema ispitanika za pregled i snimanje očne pozadine instilacijom midrijatičkih kapi (sol Mydriacil 1% ili sol Neosinephrin 10%)
- stupanj zamućenosti leće se određivao prema LOCS III klasifikaciji (*engl. Lens Opacities Classification System*) (235)

Kod pseudofaknih bolesnika, stupanj zamućenosti stražnje kapsule je bio karakteriziran kao: blago zamućena +, umjereno zamućena ++, izrazito zamućena +++.

- binokularni pregled očne pozadine na biomikroskopu koristeći nekontaktnu Volk Superfield leću.

3.3. Snimanje mrežnice širokokutnom fundus kamerom (Optomap P200MA, Optos)

Očna pozadina svakog oka snimljena je nekontaktним širokokutnim sistemom za snimanje očne pozadine poznatim pod tvorničkim nazivom Optos P200MA, što predstavlja minimalni rizik za bolesnika, jer je jačina svjetla manja u odnosu na jačinu svjetla komercijalno dostupnih fotoaparata. U objema skupinama bolesnika snimano je makularno područje (Resmax) i cijela očna pozadina (P200) bez kontrasta što je podrazumijevalo: najmanje dvije snimke stražnjeg pola, jedna snimka gornje polovice, jedna slika donje polovice mrežnice i jedna slika makularnog područja.

3.4. Analiza snimaka učinjenih širokokutnom fundus kamerom

Analizirane su tri najbolje snimke svakog oka ispitanika – snimka makularnog područja, gornje i donje polovice mrežnice.

Snimke oba oka svakog ispitanika pod brojem su analizirala dva oftalmologa neovisno (pristupnik i mentor) radi izbjegavanja pristranosti prilikom ocjene nalaza.

Snimke svakog oka su bile analizirane s obzirom na prisustvo/odsustvo sljedećih morfoloških obilježja periferne mrežnice:

- druze bilo kojeg tipa i veličine (tvrde, meke, kalcificirane, retikularne)
- hiperpigmentacije RPE (pigmentne nakupine (PN) i nevusi (N))
- hipopigmentacije RPE (atrofični areali (AA), defekti RPE)
- retikularne pigmentne promjene=RPP (razgranati kompletni ili nekompletni poligonski lanci hiperpigmentacija)
- druge pigmentne promjene:
 - mrežolike ili engl.lattice degeneracije (LD)
 - kaldrmaste ili engl. paving stone degeneracije (PS),
 - bljedilo bez pritiska ili engl. white without pressure (WWP),
 - promjene poput puževa traga ili engl. snailtrack degeneracije (ST),
 - rupture (R), retinoshize (RS)
 - sinhize (SH)
 - vitrealni opaciteti (VO)

Periferija mrežnice je bila definirana kao svi dijelovi mrežnice udaljeni više od 6000 μm ili četiri papilarna promjera (PP) cirkumferencijalno od foveolarnog centra i bila je podijeljena na četiri kvadranta gdje je svaki kvadrant veličine 3 sata. Svaki kvadrant je bio analiziran anteriorno i posteriorno od ekvatora. Ekvator mrežnice je bio označen kao kružnica veličine 7 PP s centrom u optičkoj osi oka. Optička os oka se definira kao točka na polovici udaljenosti papilomakularne distance.

Prisustvo periferne promjene mrežnice definirala se kao prisustvo bilo koje od prije navedenih morfoloških promjena vidljive u barem 1 ili više sati periferne mrežnice u barem jednom oku i izražena je prema vrsti promjene, lokalizaciji (anteriorno ili posteriorno od ekvatora) i veličini (broj sati i kvadranta). Ovisno o broju očiju uključenih u analizu i radi lakše statističke analize, ispitanici u SMD skupini su bili podijeljeni u dvije podskupine:

1. Ispitanici sa suhim oblikom SMD-a, označeni slovom **S** (*lat. sicca*) i podijeljeni na:

S1 Drugo oko bez znakova SMD-a

S2 Oba oka sa znakovima ranog SMD-a

2. Ispitanici s vlažnim oblikom SMD-a, označeni slovom **E** (*lat. exudativa*) i podijeljeni na:

E0 Drugo oko bez znakova SMD-a

E1 Drugo oko sa suhim oblikom SMD-a

E2 Oba oka sa vlažnim oblikom SMD-a

3.5. Snimanje makularnog područja OCT metodom (Carl Zeiss Cirrus™ HD – OCT)

U objema skupinama bolesnika snimano je makularno područje OCT aparatom koji je u svakodnevnoj uporabi na Klinici. Snimljene su barem dvije slike makularnog područja oba oka veličine 6x6 mm u 512x218 snimki te se koristio program Macular Change Analysis kojim se učinila kvalitativna analiza makularnog područja (morfologija, reflektivitet) i kvantitativna analiza (makularna debljina). Time se dokumentiralo prisustvo / odsustvo SMD-a i udio odignuća retinalnog pigmentnog epitela (tzv. PED) kao podtipa vlažnog oblika SMD-a.

3.6. Genotipizacija

Ispitanicima skupine sa SMD-om i kontrolne skupine izvađeno je 6 mL periferne krvi iz kubitalne vene (jedna epruveta sa K-EDTA) radi ekstrakcije DNK i dokazivanja prisutnosti genskih polimorfizama s učestalošću pojavljivanja rjeđeg alela (MAF) minimalno od 1-5%, a koji su prema podacima iz ENSEMBL baze podataka, pokazivali najveću dokazanu povezanost s obolijevanjem od SMD-a, prikazani u tablici 5:

Tablica 5.

KROMOSOM	GEN	SNP	Normalni genotip	Heterozigot	Homozigot	MAF
1.31.3q	CFH	rs1410996	TT	TC	CC	0,28
1.31.3q	CFH	rs1061170	TT	CT	CC	0,49
10.26q	ARMS2	rs10490924	GG	TG	TT	0,27
10.26q	HtrA1	rs11200638	GG	GA	AA	0,29
6	CFB	rs4151667	TT	AT	AA	0,03
6	CFB	rs641153	CC	CT	TT	0,10
6	C2	rs9332739	GG	CG	CC	0,03
6	C2	rs547154	CC	CA	AA	0,10
19	C3	rs2230199	CC	CG	GG	0,09

3.6.1. Estrakcija DNK metodom na kolonama

Genomska DNK je izolirana iz uzoraka venske pune krvi uzete uz K₃EDTA u Kliničkom zavodu za kemiju KBC Sestre milosrdnice, metodom adsorpcije DNA na kolonu (236). Za izolaciju DNK korišten je komercijalni kit High Pure Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

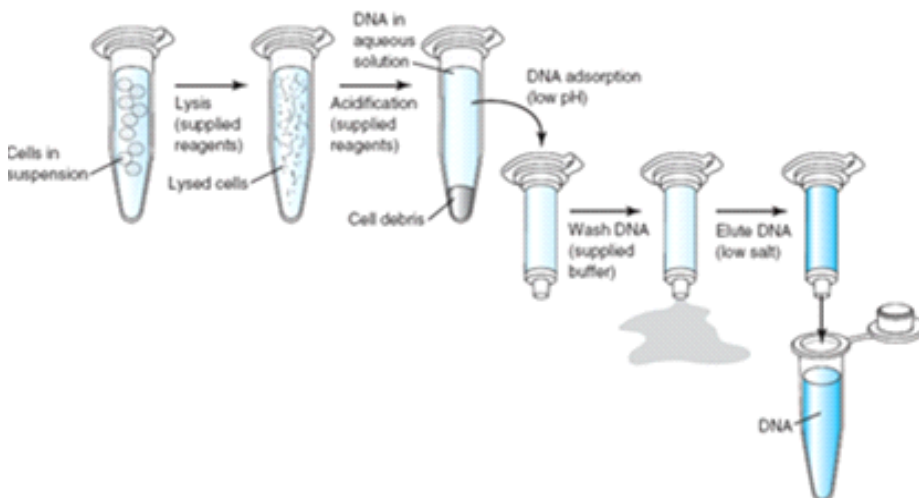
Tablica 6. Sadržaj kita za izolaciju

1. Pufer za lizu tkiva
2. Vezujući pufer
3. Proteinaza K
4. Pufer za uklanjanje inhibitora
5. Pufer za ispiranje
6. Pufer za eluciju DNA
7. Tubice s membranskim filterom
8. Tubice za prikupljanje eluata

Metoda izolacije:

- u mikroeprevetu za centrifugiranje stavi se uzorak pune krvi te doda vezujući pufer i proteinaza K, uzorak se promiješa i inkubira 10 minuta na 70°C
- u smjesu se doda izopropanol, promiješa te se sadržaj iz mikroeprevete prebaci u tubice s membranskim filterom i centrifugira 1 minutu na 8000 x g
- u tubicu s membranskim filterom se doda pufer za uklanjanje inhibitora te se centrifugira 1 minutu na 8000 x g
- u tubicu s membranskim filterom se doda pufer za ispiranje te se centrifugira 1 minutu na 8000 x g
- ponovi se prethodni postupak (pufer za ispiranje) te se još jednom centrifugira 10 sekundi na 13000 x g.
- tubica s membranskim filterom se stavi u mikroeprevetu te se doda pufer za eluciju DNK, centrifugira 1 minutu na 8000 x g
- mikroeprevete s eluiranom DNK se pospreme za daljnju analizu.

Koncentracija dobivene DNK je oko 50 ng/μL.



3.6.2. Genotipizacija metodom kompetitivne alel-specifične lančane reakcije polimeraze (KASP)

Za identifikaciju i mjerenje pojedinih genotipskih varijacija na nukleotidnoj razini s ciljem detekcije pojedinih SNP-ova za potrebe ove disertacije, korištena je KASP metoda koja se zasniva na jedinstvenoj fluorescentnoj tehnologiji kompetitivne alel specifične lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (*engl. Competitive Allele Specific Polymerase Chain Reaction*) (237).

Lančana reakcija polimeraze (*engl. Polymerase Chain Reaction, PCR*) je standardna molekularna metoda analize gena koja sadržava tri osnovne faze:

1. inicijalnu denaturaciju DNK na temperaturi od 94 do 96°C kojom se odvaja dvostruki lanac DNK, pri čemu svaki lanac postaje kalup za proces amplifikacije
2. vezivanje oligonukleotidnih početnica (primera) za jednolančane DNK na temperaturi od 50 do 65°C
3. sinteza (ekstenzija) novog komplementarnog lanca DNK na temperaturi od 72°C

Ponavljajuća denaturacija dvolančane DNK i vezivanje početnica dovode do stvaranja novih kopija željenog fragmenta DNK. Uobičajeni broj od 30 do 35 ciklusa u prosječnom PCR protokolu stvara više od milijun kopija ciljnog fragmenta DNK.

Sve potrebno za PCR jest: termostabilna DNK polimeraza, uzorak DNK (50 do 100 nanograma), dvije oligonukleotidne početnice, reakcijski pufer Mg^{2+} i nukleotidi: adenin, timin, citozin i gvanidin (A, T, C i G).

PCR u realnom vremenu zasniva se na principima standardnog PCR-a, odnosno primjenjuju se standardne početnice i specijalne probe koje su komplementarne segmentu ciljne regije DNK, a obilježene su različitim kombinacijama spojeva koji emitiraju svjetlosnu energiju i spojeva koji blokiraju takvo djelovanje. Time primjenom fluorescentne tehnologije omogućuju alelnu razlikovanje produkata PCR-a. Tijekom PCR reakcije dinamika odnosa ovih spojeva se mijenja, tako da se kao krajnji učinak mjeri porast energije zračenja u obliku fluorescentne svjetlosti tzv. FRET sustav (*engl. Fluorescence Resonance Energy Transfer*).

KASP je tehnologija temeljena na alel-specifičnoj oligoekstenziji i FRET sustavu, razvijena za potrebe genetskog laboratorija KBioscience, a potom je evoluirala u općepriznati i korišteni tehnološki standard u Europi i Sjevernoj Americi. Više informacija o razvoju metode je dostupno na web adresi: <http://www.lqcggenomics.com>.

KASP tehnologija koristi tri komponente: DNK, KASP mikropostroj koji sadrži dvije alel specifične početnice, reverznu početnicu i KASP tzv „master mix“ koji sadrži FRET kazetu i Taq polimerazu u optimalnoj puferskoj otopini. U prvoj fazi, jedna od alel specifičnih početnica se veže za ciljni dio DNK i udružena s reverznom početnicom, vrši amplifikaciju ciljne genske regije.

Reverzna početnica se veže, vrši elongaciju i stvara komplementarnu kopiju alela. U sljedećim ciklusima PCR-a, razina alel specifičnih fragmenata se povećava. Fluorescentno označeni dio FRET kazete je komplementaran novoj sekvenci te se vezanjem stvara fluorescentni signal.

KASP reagensi:

DNK otopljena u 10mM Tris-HCl pufera pH 8,3

Dvije PCR alel specifične početnice

Reverzna početnica

FAM (6-karboksifluorescein) i HEX (heksaklorni analog) bojila

Taq polimeraza

ROX (5-karboksi-X-rodamin)

2.8 mM MgCl₂

5% DMSO (CH)₃SO₂

Koncentracija DNK potrebna za analizu je 5-50 ng po mikropostroju.

U tablici 7. prikazane su analizirane sekvence pojedinih nukleotidnih polimorfizama.

Tablica 7.

Kromosom	SNP	Sekvenca
1	rs1061170	ATGGTCCTTAAAAATGTTATTTTCCTATTTGGAAAATGGATATAAT CAAAT[C/T]ATGGAAGAAAGTTTGTACAGGGTAAATCTATAGACG TGCCTGCCATCCTGGCT
1	rs1410996	GTGAAGTCCGTCAATGAGATTTACGTCCTGACTCAGTCCCTGACTA CCTCATG[C/T]CACTCAGCTATACCACTGATGTAGAGGGCCTGTGGC CCACCAACCCTGGAGCAATTC
10	rs10490924	GTGACAAGCAGAGGAGCAAACGTCTTTATCACACTCCATGATCCCA GCT[G/T]CTAAAATCCACACTGCTTACCAGCCTTCTTCTCTCCTGGA ACCCAGAGAG
10	rs11200638	TGTGGGTCTGGGCGCGGGCTTTCTGCCAGCTCCGCGGACGCTGCCTTC GTCC[A/G]GCCGCAGAGGCCCGCGGTACAGGGTCCCGCGTGCGGGGTA CCGGGGGCAGAACCA
6	rs641153	TCGGAAGGAGCCGCTTTGATCTCTACCCCTCCAGAGACAGGATCCCT GGGGC[C/T]GGGCCAAAGACCATGGAGTGGTGGTCACACCTGAAGAGAA AGGCTGATGAAGGCT
6	rs4151667	AGCTTCTCCTGCCTTCCAACGCCATGGGGAGCAATCTCAGCCCCAA C[A/T]CTGCCTGATGCCCTTTATCTTGGGCCTCTTGGGCCTCTTGTCTGGA GGTAAGCGAGGGTAACCTTCCCTT
6	rs547154	TGAGGATCAGATGGGGAAGAGGCAAGTGAGGGGCACTGTGTCCAGGTTT CCAA[A/C]ACGGGCCTCTGGCGGCTCCTCACATCCTCCCACACCAAGGAG GGCAA
6	rs9332739	CCCAAAGTCTCCTCATGTCTGTCTGACGACAACTCCCGGGATATGACT GA[C/G]GTGATCAGCAGCCTGGAAAATGCCAACTATAAAGGTACGGGTGTCA TCACGTGATGGTGAT
19	rs2230199	CTGCCACGCCTAGATCCCAGCCAACAGGGAGTTCAAGTCAGAAAAGGGG [C/G]GCAACAAGTTCGTGACCGTGCAGGCCACCTTCGGGACCCAAGTGGTG GAGAAGGTGGTGCT

3.7. Kriteriji za uključivanje i neuključivanje ispitanika u istraživanje

3.7.1. Kriteriji za uključivanje ispitanika u SMD i kontrolnu skupinu

1. Ispitanici stariji od 50 godina (n=150) s kliničkom slikom SMD-a barem jednog oka

Klinička slika SMD-a podrazumijeva: prisustvo barem jedne druze $\geq 63\mu\text{m}$ unutar $3000\ \mu\text{m}$ od foveole, hipo- ili hiperpigmentacije RPE, geografske atrofije ili koroidalne neovaskularizacije u jednom ili oba oka.

Bolesnici su nadalje, ovisno o kliničkoj slici, bili podijeljeni u podskupinu ispitanika sa suhim ili vlažnim oblikom SMD-a.

U podskupinu sa suhim oblikom SMD-a su bili uključeni ispitanici s hipo- ili hiperpigmentacijama, mekim, tvrdim ili miješanim druzama ili geografskom atrofijom u makularnom području.

U podskupinu s vlažnim oblikom SMD-a bili su uključeni ispitanici s klinički vidljivim odignućem RPE-a, eksudacijama ili hemoragijama u makularnom području, prethodno dokazani fluoresceinskom angiografijom i/ili OCT-om.

2. Ispitanici kontrolne skupine stariji od 50 godina (n=150) bez znakova SMD-a. Za ispitanike kontrolne skupine su provedeni isti medicinski postupci kao i za ispitanike SMD skupine navedeni u poglavljima 3.2–3.5.

3.7.2. Kriteriji za neuključivanje ispitanika u SMD i kontrolnu skupinu

- ispitanici s znakovima makulopatije bilo kojeg drugog uzroka u oba oka (miopska makulopatija, okluzivne bolesti oka, dijabetička retinopatija, centralna serozna makulopatija, korioretinitisi, cistoidni makularni edem, epimakularna membrana, toksične retinopatije, hereditarne bolesti oka, makulopatija kao posljedica laserskih i operativnih liječenja)
- ispitanici s kratkovidnošću većom od 3 dioptrije
- ispitanici s vizualno signifikantnom kataraktom ili pseudofakni bolesnici s vizualno signifikantnim zamućenjima stražnje kapsule oba oka
- ispitanici kod kojih se ne može dokumentirati ili analizirati barem 270 stupnjeva periferne mrežnice oba oka

- ispitanici kod kojih se ne može uzeti uzorak periferne krvi iz bilo kojeg razloga

3.8. Statistička analiza

Demografske i genetske karakteristike ispitanika u skupini bolesnika sa SMD-om i skupini kontrolnih ispitanika kao i prevalencija suhe i vlažne forme senilne degeneracije makule, perifernih morfoloških promjena prikazane su distribucijom frekvencija (apsolutne i relativne frekvencije).

Razlike perifernih morfoloških promjena i genotipskih promjena između skupine bolesnika sa SMD-om i skupine kontrolnih ispitanika testirane su χ^2 testom.

Povezanost kliničkih oblika SMD-a (suhog i eksudativnog oblika) i perifernih promjena mrežnice i povezanost perifernih promjena mrežnice s genotipskim promjenama mrežnice analizirana je metodom logističke regresije i prikazana je omjerom izgleda (*engl. odds ratio - OR*) i 95% intervalima pouzdanosti (*engl. confidence interval - CI*).

Za procjenu podudarnosti analiza snimki dvaju ispitivača (pristupnika i mentora) koristio se Cohenov kappa (κ) koeficijent.

P vrijednosti ispod 0,05 se smatraju značajnima.

U analizi se koristila programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 21 (www.spss.com).

4. REZULTATI

4.1. Opći podaci

U ovoj studiji ukupni broj ispitanika uključenih u istraživanje koji su zadovoljili kriterije uključivanja iznosio je 310, od čega je 160 ispitanika uključeno u SMD skupinu, a 150 ispitanika u kontrolnu skupinu.

Prilikom odabira bolesnika, u SMD skupinu regrutirano je ukupno 171 ispitanika od kojih, prema kriterijima neuključivanja nije uključeno 11 ispitanika zbog sljedećih razloga:

- tri ispitanika zbog obostrane katarakte,
- četiri ispitanika zbog nemogućnosti snimanja barem 270 stupnjeva periferne mrežnice,
- jedan ispitanik zbog nemogućnosti vađenja i dobivanja uzorka periferne krvi,
- dva ispitanika zbog obostrane refrakcijske pogreške oka veće od 3 dpt i miopske makulopatije
- jedan ispitanik zbog dijabetičke retinopatije

U kontrolnoj skupini, ukupno je regrutiran 151 ispitanik od kojih nije uključen jedan ispitanik zbog obostrane katarakte.

U tablici 8. je prikazano koliko je ispitanika imalo nepotpune podatke.

Tablica 8. Analiza podataka koji nedostaju prema ispitivanim skupinama

	Kontrola			SMD		
	N	Nedostaje		N	Nedostaje	
		N	%		N	%
DRUZE	150	0	0,00	154	6	3,75
RPP	150	0	0,00	157	3	1,88
HIPERPIGMENTACIJE (PIGMENTNE NAKUPINE ILI NEVUSI)	150	0	0,00	160	0	0,00
HIPOPIGMENTACIJE (DEFEKTI RPE AA)	150	0	0,00	160	0	0,00
OD	150	0	0,00	160	0	0,00
WWP	150	0	0,00	160	0	0,00
RS	150	0	0,00	160	0	0,00
PS	150	0	0,00	160	0	0,00
LD	150	0	0,00	160	0	0,00
R	150	0	0,00	160	0	0,00
VO	150	0	0,00	160	0	0,00
SH	150	0	0,00	160	0	0,00
rs4151667	146	4	2,67	160	0	0,00
rs10490924	145	5	3,33	159	1	0,63
rs1061170	145	5	3,33	159	1	0,63
rs641153	145	5	3,33	160	0	0,00
rs11200638	145	5	3,33	160	0	0,00
rs9332739	145	5	3,33	160	0	0,00
rs547154	145	5	3,33	160	0	0,00
rs2230199	145	5	3,33	160	0	0,00
rs1410996	144	6	4,00	160	0	0,00

U SMD skupini nepotpune podatke imalo je ukupno 6 ispitanika (3.75%) kao i u kontrolnoj skupini ukupno 6 ispitanika (4%). Ukupni broj ispitanika s nedostatnim podacima je bio 4%.

4.2. Demografske karakteristike

Tablica 9. Usporedba demografskih karakteristika ispitivanog uzorka

		Skupina			
		SMD N=160		Kontrola N=150	
		N	%	N	%
Dob (skupine)	50-65 godina	24	15,0%	33	22,0%
	66-75 godina	51	31,9%	55	36,7%
	>75 godina	85	53,1%	62	41,3%
Spol	Muški	55	34,4%	56	37,3%
	Ženski	105	65,6%	94	62,7%
Pušenje	Ne	136	85,5%	134	89,3%
	Da	23	14,5%	16	10,7%

Tablica 10. Prikaz statističke značajnosti u demografskim karakteristikama između dvije skupine ispitanika

		Skupina
Dob (skupine)	X ² test	4,853
	df	2
	P	0,088
Spol	X ² test	0,295
	df	1
	P	0,587
Pušenje	X ² test	1,010
	df	1
	P	0,315

Nema značajnih razlika u raspodjeli dobnih skupina, spolu i pušenju između ispitivane i kontrolne skupine čime je i kontroliran utjecaj tih varijabli na rezultate daljnje statističke obrade.

4.3. Raspodjela genotipskih promjena u ispitivanoj populaciji

Tablica 11. Učestalost genotipa (normalni, heterozigot i homozigot) u SMD i kontrolnoj skupini - tablica distribucije genotipa prema rs-u u SMD i kontrolnoj skupini

Polimorfizam	Genotip	Skupina			
		SMD		Kontrola	
		N	%	N	%
rs4151667*	TT	151	94,4%	125	85,6%
	AT	9	5,6%	20	13,7%
	AA	0	0,0%	1	,7%
rs10490924**	GG	50	31,4%	87	60,0%
	GT	68	42,8%	54	37,2%
	TT	41	25,8%	4	2,8%
rs1061170*	TT	33	20,8%	38	26,2%
	CT	72	45,3%	76	52,4%
	CC	54	34,0%	31	21,4%
rs641153**	CC	153	95,6%	116	80,0%
	CT	7	4,4%	28	19,3%
	TT	0	0,0%	1	0,7%
rs11200638**	GG	56	35,0%	92	63,4%
	GA	65	40,6%	49	33,8%
	AA	39	24,4%	4	2,8%
rs9332739*	GG	152	95,0%	126	86,9%
	CG	8	5,0%	18	12,4%
	CC	0	0,0%	1	0,7%
rs547154**	CC	155	96,9%	117	80,7%
	AC	5	3,1%	28	19,3%
	AA	0	0,0%	0	0,0%
rs2230199	CC	106	66,3%	99	68,3%
	CG	52	32,5%	41	28,3%
	GG	2	1,3%	5	3,4%
rs1410996**	TT	4	2,5%	15	10,4%
	CT	56	35,0%	84	58,3%
	CC	100	62,5%	45	31,3%

* χ^2 test: $P < 0,05$; ** χ^2 test: $P < 0,001$

Tablica 12. Rezultati testiranja χ^2 testom iz tablice 11.

		Skupina
rs4151667	χ^2 test	6,996
	df	2
	P	0,030
rs10490924	χ^2 test	41,465
	df	2
	P	<0,001
rs1061170	χ^2 test	6,052
	df	2
	P	0,049
rs641153	χ^2 test	17,995
	df	2
	P	<0,001
rs11200638	χ^2 test	38,847
	df	2
	P	<0,001
rs9332739	χ^2 test	6,556
	df	2
	P	0,038
rs547154	χ^2 test	20,651
	df	1
	P	<0,001
rs2230199	χ^2 test	2,093
	df	2
	P	0,351
rs1410996	χ^2 test	32,077
	df	2
	P	<0,001

Tablice 11. i 12. prikazuju učestalost genotipa (normalni, heterozigot i homozigot) u SMD i kontrolnoj skupini. **Značajne razlike zabilježene su u svim genotipovima osim rs2230199. U SMD skupini su značajno češći heterozigoti i homozigoti rs10490924, rs11200638 i rs1410996, dok su u kontrolnoj skupini značajno češći heterozigoti i homozigoti rs4151667, rs641153, rs9332739, rs547154. Raspodjela genotipova rs1061170 također se značajno razlikuje između ispitivanih skupina, ali je na samoj granici značajnosti (P=0,049) te se može reći kako su heterozigoti i homozigoti bili značajno češći u SMD skupini.**

4.4. Raspodjela perifernih promjena mrežnice u ispitivanoj populaciji

Tablica 13. Raspodjela perifernih promjena u SMD i kontrolnoj skupini

		Skupina			
		SMD		Kontrola	
		N	%	N	%
DRUZE**	Ne	39	25,3%	84	56,0%
	Da	115	74,7%	66	44,0%
RPP**	Ne	87	55,4%	121	80,7%
	Da	70	44,6%	29	19,3%
HIPERPIGMENTACIJE (PIGMENTNE NAKUPINE ILI NEVUSI)	Ne	141	88,1%	128	85,3%
	Da	19	11,9%	22	14,7%
PIGMENTNE NAKUPINE	Ne	148	92,5%	142	94,7%
	Da	12	7,5%	8	5,3%
NEVUSI	Ne	152	95,0%	136	90,7%
	Da	8	5,0%	14	9,3%
HIPOPIGMENTACIJE (DEFEKTI RPE AA)	Ne	133	83,1%	131	87,3%
	Da	27	16,9%	19	12,7%
DRPE	Ne	156	97,5%	146	97,3%
	Da	4	2,5%	4	2,7%
AA	Ne	137	85,6%	135	90,0%
	Da	23	14,4%	15	10,0%
OD (WWP,R, RS, PS, LD, SH, VO)	Ne	103	64,4%	111	74,0%
	Da	57	35,6%	39	26,0%
WWP*	Ne	148	92,5%	128	85,3%
	Da	12	7,5%	22	14,7%
RS	Ne	156	97,5%	149	99,3%
	Da	4	2,5%	1	,7%
PS**	Ne	120	75,0%	141	94,0%
	Da	40	25,0%	9	6,0%
LD	Ne	160	100,0%	149	99,3%
	Da	0	0,0%	1	,7%
R	Ne	160	100,0%	149	99,3%
	Da	0	0,0%	1	,7%
VO*	Ne	160	100,0%	146	97,3%
	Da	0	0,0%	4	2,7%
SH	Ne	157	98,1%	145	96,7%
	Da	3	1,9%	5	3,3%

* χ^2 test: P<0,05; ** χ^2 test: P<0,001

Tablica 14. Rezultati testiranja χ^2 testom iz tablice 13.

		Skupina
DRUZE	χ^2 test	29,681
	df	1
	P	<0,001
RPP	χ^2 test	22,390
	df	1
	P	<0,001
HIPERPIGMENTACIJE (PIGMENTNE NAKUPINE ILI NEVUSI)	χ^2 test	,526
	df	1
	P	0,468
PIGMENTNE NAKUPINE	χ^2 test	,602
	df	1
	P	0,438
NEVUSI	χ^2 test	2,205
	df	1
	P	0,138
HIPOPIGMENTACIJE (DEFEKTI RPE AA)	χ^2 test	1,085
	df	1
	P	0,298
DRPE	χ^2 test	0,009
	df	1
	P	0,926
AA	χ^2 test	1,378
	df	1
	P	0,240
OD WWP RS PS LD SH	χ^2 test	2,776
	df	1
	P	0,096
WWP	χ^2 test	4,072
	df	1
	P	0,044
PS	χ^2 test	21,001
	df	1
	P	<0,001
VO	χ^2 test	4,322
	df	1
	P	0,038

Tablice 13. i 14. prikazuju razlike u raspodjeli perifernih promjena u SMD i kontrolnoj skupini. **U SMD skupini značajno veća je učestalost perifernih druza, RPP i kaldrmastih degeneracija, dok su u kontrolnoj skupini bile češće WWP i VO.**

Tablica 15. Razlike u perifernim promjenama između S i E podskupine

		SMD skupina			
		S		E	
		N	%	N	%
DRUZE	Ne	16	20,8%	22	28,9%
	Da	61	79,2%	54	71,1%
RPP	Ne	41	52,6%	45	57,7%
	Da	37	47,4%	33	42,3%
HIPERPIGMENTACIJE (PIGMENTNE NAKUPINE ILI NEVUSI)	Ne	74	92,5%	65	83,3%
	Da	6	7,5%	13	16,7%
HIPOPIGMENTACIJE (DEFEKTI RPE ILI AA)	Ne	68	85,0%	63	80,8%
	Da	12	15,0%	15	19,2%
OD	Ne	51	63,8%	50	64,1%
	Da	29	36,3%	28	35,9%
PS	Ne	62	77,5%	56	71,8%
	Da	18	22,5%	22	28,2%

Tablica 16. Rezultati testiranja χ^2 testom iz tablice 15.

		S i E skupine
DRUZE	χ^2 test	1,367
	df	1
	P	0,242
RPP	χ^2 test	0,415
	df	1
	P	0,520
HIPERPIGMENTACIJE (PIGMENTNE NAKUPINE ILI NEVUSI)	χ^2 test	3,137
	df	1
	P	0,077
HIPOPIGMENTACIJE (DEFEKTI RPE AA)	χ^2 test	0,499
	df	1
	P	0,480
OD	χ^2 test	0,002
	df	1
	P	0,963
PS	χ^2 test	0,680
	df	1
	P	0,410

* χ^2 test: $P < 0,05$; ** χ^2 test: $P < 0,001$

Tablice 15. i 16. prikazuju razlike u perifernim promjenama između S i E podskupine. Nije bilo značajnih razlika između ispitanika u objema skupinama.

Tablica 17. Predikcija pripadnosti SMD skupini u odnosu na kontrolnu skupinu

	B	S.E.	Wald	df	OR	95% CI		P
						Lower	Upper	
DRUZE	1,09	0,28	14,91	1,00	2,97	1,71	5,16	<0,001
RPP	0,87	0,30	8,24	1,00	2,39	1,32	4,32	0,004
PIGMENTNE NAKUPINE	0,56	0,54	1,07	1,00	1,75	0,61	5,06	0,301
NEVUSI	-0,97	0,53	3,28	1,00	0,38	0,13	1,08	0,070
DRPE	-0,03	0,83	0,00	1,00	0,97	0,19	4,99	0,975
AA	0,63	0,42	2,26	1,00	1,88	0,83	4,27	0,132
PS	1,51	0,42	13,23	1,00	4,52	2,01	10,21	<0,001

Tablica 18. Predikcija pripadnosti E skupini u odnosu na S skupinu unutar SMD skupine (S ili E) u odnosu na kontrolnu skupinu

	B	S.E.	Wald	df	OR	95% CI		P
						Lower	Upper	
DRUZE	-0,47	0,42	1,26	1	0,62	0,27	1,42	0,261
RPP	-0,19	0,37	0,26	1	0,83	0,41	1,70	0,612
PIGMENTNENAKUPINE	0,11	0,73	0,02	1	1,12	0,27	4,65	0,877
NEVUSI	2,19	1,10	4,01	1	8,98	1,05	76,95	0,045
DRPE	1,02	1,32	0,59	1	2,77	0,21	37,16	0,442
AA	0,04	0,49	0,01	1	1,04	0,40	2,71	0,930
PS	0,30	0,40	0,59	1	1,35	0,62	2,94	0,443

B–beta koeficijent, **S.E.**–standard error, **df**–degrees of freedom

Tablica 17. prikazuje predikciju prisustva SMD-a kod ispitanika s perifernim promjenama.

Multivarijantnom analizom dobiveno je da ispitanici s perifernim druzama imaju 2,97 puta, s RPP-om 2,39 puta, a s kaldrmastim degeneracijama 4,52 puta veći omjer izgleda za prisustvo SMD-a.

U tablici 18. prikazana je predikcija pripadnosti S ili E skupini u odnosu na periferne promjene. Dobiveno je da u ispitanika koji imaju nevuse 8,98 puta veći omjer izgleda za eksudativnu SMD.

Tablica 19. Razlike u genotipovima između S i E podskupine

Polimorfizam	Genotip	S i E skupine			
		S		E	
		N	%	N	%
rs4151667*	TT	76	95,0%	73	93,6%
	AT	4	5,0%	5	6,4%
	AA	0	0,0%	0	0,0%
rs10490924**	GG	30	37,5%	20	25,6%
	GT	32	40,0%	36	46,2%
	TT	18	22,5%	22	28,2%
rs1061170*	TT	13	16,3%	20	25,6%
	CT	36	45,0%	35	44,9%
	CC	31	38,8%	23	29,5%
rs641153**	CC	74	92,5%	77	98,7%
	CT	6	7,5%	1	1,3%
	TT	0	0,0%	0	0,0%
rs11200638**	GG	32	40,0%	23	29,5%
	AG	31	38,8%	33	42,3%
	AA	17	21,3%	22	28,2%
rs9332739*	GG	78	97,5%	72	92,3%
	CG	2	2,5%	6	7,7%
	CC	0	0,0%	0	0,0%
rs547154**	CC	75	93,8%	78	100,0%
	AC	5	6,3%	0	0,0%
	AA	0	0,0%	0	0,0%
rs2230199	CC	52	65,0%	53	67,9%
	CG	27	33,8%	24	30,8%
	GG	1	1,3%	1	1,3%
rs1410996**	TT	2	2,5%	1	1,3%
	CT	26	32,5%	29	37,2%
	CC	52	65,0%	48	61,5%

* χ^2 test: P<0,05; ** χ^2 test: P<0,001

Tablica 20. Rezultati testiranja χ^2 testom iz tablice 19.

		S i E skupine
rs4151667	χ^2 test	0,146
	df	1
	P	0,702
rs10490924	χ^2 test	2,610
	df	2
	P	0,271
rs1061170	χ^2 test	2,659
	df	2
	P	0,265
rs641153	χ^2 test	3,606
	df	1
	P	0,058
rs11200638	χ^2 test	2,151
	df	2
	P	0,341
rs9332739	χ^2 test	2,215
	df	1
	P	0,137
rs547154	χ^2 test	5,034
	df	1
	P	0,025
rs2230199	χ^2 test	0,161
	df	2
	P	0,923
rs1410996	χ^2 test	0,632
	df	2
	P	0,729

* χ^2 test: P<0,05; ** χ^2 test: P<0,001

Tablice 19. i 20. prikazuju razlike u genotipovima između S i E podskupine. **Jedine značajne razlike su zabilježene u većoj učestalosti heterozigota rs547154 u S skupini (P=0,025).**

4.5. Raspodjela genotipskih promjena prema pojedinim perifernim promjenama mrežnice u ispitivanoj populaciji

Tablica 21. Razlike u raspodjeli genotipova između SMD i kontrolne skupine za pojedinu vrstu perifernih promjena: **periferne družice**

		DRUZE			
		SMD		Kontrola	
		N	%		
rs4151667*	Normalni (divlji) aleli	109	94,8%	55	84,6%
	Heterozigot	6	5,2%	10	15,4%
	Homozigot	0	0,0%	0	0,0%
rs10490924**	Normalni (divlji) aleli	33	28,7%	41	63,1%
	Heterozigot	47	40,9%	24	36,9%
	Homozigot	35	30,4%	0	0,0%
rs1061170	Normalni (divlji) aleli	19	16,5%	16	24,6%
	Heterozigot	50	43,5%	34	52,3%
	Homozigot	46	40,0%	15	23,1%
rs641153**	Normalni (divlji) aleli	111	96,5%	51	78,5%
	Heterozigot	4	3,5%	13	20,0%
	Homozigot	0	0,0%	1	1,5%
rs11200638**	Normalni (divlji) aleli	39	33,9%	43	66,2%
	Heterozigot	43	37,4%	22	33,8%
	Homozigot	33	28,7%	0	0,0%
rs9332739**	Normalni (divlji) aleli	112	97,4%	57	87,7%
	Heterozigot	3	2,6%	8	12,3%
	Homozigot	0	0,0%	0	0,0%
rs547154*	Normalni (divlji) aleli	111	96,5%	53	81,5%
	Heterozigot	4	3,5%	12	18,5%
	Homozigot	0	0,0%	0	0,0%
rs2230199	Normalni (divlji) aleli	80	69,6%	43	66,2%
	Heterozigot	33	28,7%	19	29,2%
	Homozigot	2	1,7%	3	4,6%
rs1410996**	Normalni (divlji) aleli	1	,9%	6	9,2%
	Heterozigot	39	33,9%	39	60,0%
	Homozigot	75	65,2%	20	30,8%

Tablica 22. Rezultati testiranja χ^2 testom iz tablice 21.

		DRUZE
rs4151667	χ^2 test	5,301
	df	1
	P	0,021
rs10490924	χ^2 test	31,887
	df	2
	P	<0,001
rs1061170	χ^2 test	5,602
	df	2
	P	,061
rs641153	χ^2 test	15,277
	df	2
	P	<0,001
rs11200638	χ^2 test	28,272
	df	2
	P	<0,001
rs9332739	χ^2 test	6,809
	df	1
	P	0,009
rs547154	χ^2 test	11,512
	df	1
	P	0,001
rs2230199	χ^2 test	1,312
	df	2
	P	0,519
rs1410996	χ^2 test	23,324
	df	2
	P	<0,001

Tablice 21. i 22. prikazuju razlike u raspodjeli genotipova između SMD i kontrolne skupine za ispitanike koji imaju dijagnosticirane druze. U ispitanika koji imaju **druze** u **SMD skupini**, **značajno je veća učestalost heterozigota i homozigota rs10490924, rs11200638, rs1410996**, dok su heterozigoti i homozigoti **rs4151667, rs641153, rs9332739 i rs547154 češći u kontrolnoj skupini.**

Tablica 23. Razlike u raspodjeli genotipova između SMD i kontrolne skupine za pojedinu vrstu perifernih promjena: **retikularne pigmentne promjene (RPP)**

Polimorfizam	Genotip	RPP			
		SMD		Kontrola	
		N	%		
rs4151667	TT	66	94,3%	24	88,9%
	AT	4	5,7%	3	11,1%
	AA	0	0,0%	0	0,0%
rs10490924*	GG	21	30,0%	13	48,1%
	GT	29	41,4%	13	48,1%
	TT	20	28,6%	1	3,7%
rs1061170	TT	7	10,0%	7	25,9%
	CT	34	48,6%	12	44,4%
	CC	29	41,4%	8	29,6%
rs641153*	CC	67	95,7%	22	81,5%
	CT	3	4,3%	4	14,8%
	TT	0	0,0%	1	3,7%
rs11200638*	GG	25	35,7%	13	48,1%
	AG	26	37,1%	13	48,1%
	AA	19	27,1%	1	3,7%
rs9332739	GG	68	97,1%	25	92,6%
	CG	2	2,9%	2	7,4%
	CC	0	0,0%	0	0,0%
rs547154	CC	67	95,7%	23	85,2%
	AC	3	4,3%	4	14,8%
	AA	0	0,0%	0	0,0%
rs2230199	CC	49	70,0%	19	70,4%
	CG	19	27,1%	7	25,9%
	GG	2	2,9%	1	3,7%
rs1410996*	TT	1	1,4%	1	3,7%
	CT	22	31,4%	18	66,7%
	CC	47	67,1%	8	29,6%

* χ^2 test: $P < 0,05$; ** χ^2 test: $P < 0,001$

Tablica 24. Rezultati testiranja χ^2 testom iz tablice 23.

		RPP
rs4151667	χ^2 test	0,848
	df	1
	P	0,357
rs10490924	χ^2 test	7,600
	df	2
	P	0,022
rs1061170	χ^2 test	4,205
	df	2
	P	0,122
rs641153	χ^2 test	6,016
	df	2
	P	0,049
rs11200638	χ^2 test	6,548
	df	2
	P	0,038
rs9332739	χ^2 test	1,020
	df	1
	P	0,312
rs547154	χ^2 test	3,226
	df	1
	P	0,072
rs2230199	χ^2 test	0,056
	df	2
	P	0,972
rs1410996	χ^2 test	11,192
	df	2
	P	0,004

Tablice 23. i 24. prikazuju razlike u raspodjeli genotipova između SMD i kontrolne skupine za ispitanike koji su imali pozitivnu dijagnozu RPP. U SMD skupini su značajno češći homozigoti i heterozigoti rs10490924, rs11200638 i rs1410996, dok su u kontrolnoj skupini češći homozigoti rs641153.

Tablica 25. Razlike u raspodjeli genotipova između SMD i kontrolne skupine za pojedinu vrstu perifernih promjena: **hiperpigmentacije (pigmentne nakupine ili nevusi)**

Polimorfizam	Genotip	HIPERPIGMENTACIJE (PIGMENTNE NAKUPINE ILI NEVUSI)			
		SMD		Kontrola	
		N	%		
rs4151667	TT	19	100,0%	18	81,8%
	AT	0	0,0%	4	18,2%
	AA	0	0,0%	0	0,0%
rs10490924*	GG	5	26,3%	11	50,0%
	GT	7	36,8%	10	45,5%
	TT	7	36,8%	1	4,5%
rs1061170	TT	3	15,8%	8	36,4%
	CT	10	52,6%	11	50,0%
	CC	6	31,6%	3	13,6%
rs641153	CC	19	100,0%	18	81,8%
	CT	0	0,0%	4	18,2%
	TT	0	0,0%	0	0,0%
rs11200638*	GG	6	31,6%	13	59,1%
	AG	6	31,6%	8	36,4%
	AA	7	36,8%	1	4,5%
rs9332739	GG	18	94,7%	19	86,4%
	CG	1	5,3%	3	13,6%
	CC	0	0,0%	0	0,0%
rs547154	CC	19	100,0%	18	81,8%
	AC	0	0,0%	4	18,2%
	AA	0	0,0%	0	0,0%
rs2230199	CC	14	73,7%	13	59,1%
	CG	5	26,3%	8	36,4%
	GG	0	0,0%	1	4,5%
rs1410996*	TT	1	5,3%	2	9,5%
	CT	6	31,6%	16	76,2%
	CC	12	63,2%	3	14,3%

* χ^2 test: $P < 0,05$; ** χ^2 test: $P < 0,001$

Tablica 26. Rezultati testiranja χ^2 testom iz tablice 25.

		HIPERPIGMENTACIJE
rs4151667	χ^2 test	3,828
	df	1
	P	0,050
rs10490924	χ^2 test	7,098
	df	2
	P	0,029
rs1061170	χ^2 test	3,118
	df	2
	P	0,21
rs641153	χ^2 test	3,828
	df	1
	P	0,05
rs11200638	χ^2 test	7,184
	df	2
	P	0,028
rs9332739	χ^2 test	0,812
	df	1
	P	0,368
rs547154	χ^2 test	3,828
	df	1
	P	0,050
rs2230199	χ^2 test	1,518
	df	2
	P	0,468
rs1410996	χ^2 test	10,204
	df	2
	P	0,006

Tablice 25. i 26. prikazuju razlike u raspodjeli genotipova između SMD i kontrolne skupine za ispitanike koji su imali pozitivnu dijagnozu hiperpigmentacija. **U SMD skupini su značajno češći homozigoti i heterozigoti rs10490924, rs11200638 i rs1410996, dok su u kontrolnoj skupini značajno češći heterozigoti rs4151667, rs641153 i rs547154.**

Tablica 27. Razlike u raspodjeli genotipova između SMD i kontrolne skupine za pojedinu vrstu perifernih promjena: **hipopigmentacije (defekti RPE-a i atrofični areali=AA)**

Polimorfizam	Genotip	HIPOPIGMENTACIJE (DEFEKTI RPE AA)			
		SMD		Kontrola	
		N	%		
rs4151667	TT	27	100,0%	16	84,2%
	AT	0	0,0%	2	10,5%
	AA	0	0,0%	1	5,3%
rs10490924*	GG	5	18,5%	10	52,6%
	GT	15	55,6%	8	42,1%
	TT	7	25,9%	1	5,3%
rs1061170	TT	8	29,6%	6	31,6%
	CT	13	48,1%	9	47,4%
	CC	6	22,2%	4	21,1%
rs641153	CC	26	96,3%	15	78,9%
	CT	1	3,7%	4	21,1%
	TT	0	0,0%	0	0,0%
rs11200638*	GG	7	25,9%	12	63,2%
	AG	14	51,9%	6	31,6%
	AA	6	22,2%	1	5,3%
rs9332739	GG	24	88,9%	16	84,2%
	CG	3	11,1%	2	10,5%
	CC	0	0,0%	1	5,3%
rs547154*	CC	27	100,0%	15	78,9%
	AC	0	0,0%	4	21,1%
	AA	0	0,0%	0	0,0%
rs2230199	CC	16	59,3%	13	68,4%
	CG	10	37,0%	6	31,6%
	GG	1	3,7%	0	0,0%
rs1410996	TT	1	3,7%	2	10,5%
	CT	11	40,7%	12	63,2%
	CC	15	55,6%	5	26,3%

* χ^2 test: $P < 0,05$; ** χ^2 test: $P < 0,001$

Tablica 28. Rezultati testiranja χ^2 testom iz tablice 27.

		HIPOPIGMENTACIJE
rs4151667	χ^2 test	4,561
	df	2
	P	0,102
rs10490924	χ^2 test	7,121
	df	2
	P	0,028
rs1061170	χ^2 test	0,022
	df	2
	P	,989
rs641153	χ^2 test	3,465
	df	1
	P	0,063
rs11200638	χ^2 test	6,905
	df	2
	P	0,032
rs9332739	χ^2 test	1,453
	df	2
	P	0,484
rs547154	χ^2 test	6,226
	df	1
	P	0,013
rs2230199	χ^2 test	0,948
	df	2
	P	0,623
rs1410996	χ^2 test	4,110
	df	2
	P	0,128

Tablice 27. i 28. prikazuju razlike u raspodjeli genotipova između SMD i kontrolne skupine za ispitanike koji su imali pozitivnu dijagnozu hipopigmentacija. **U SMD skupini značajno su češći homozigoti i heterozigoti rs10490924, rs11200638, dok su u kontrolnoj skupini značajno češći heterozigoti rs547154.**

Tablica 29. Razlike u raspodjeli genotipova između SMD i kontrolne skupine za pojedinu vrstu perifernih promjena: **ostale degeneracije (OD)**

Polimorfizam	Genotip	OD			
		SMD		Kontrola	
		N	%		
rs4151667	TT	56	98,2%	36	92,3%
	AT	1	1,8%	2	5,1%
	AA	0	0,0%	1	2,6%
rs10490924*	GG	18	31,6%	20	52,6%
	GT	24	42,1%	16	42,1%
	TT	15	26,3%	2	5,3%
rs1061170*	TT	10	17,5%	12	31,6%
	CT	24	42,1%	20	52,6%
	CC	23	40,4%	6	15,8%
rs641153	CC	54	94,7%	33	86,8%
	CT	3	5,3%	5	13,2%
	TT	0	0,0%	0	0,0%
rs11200638*	GG	21	36,8%	22	57,9%
	AG	21	36,8%	14	36,8%
	AA	15	26,3%	2	5,3%
rs9332739	GG	52	91,2%	35	92,1%
	CG	5	8,8%	2	5,3%
	CC	0	0,0%	1	2,6%
rs547154	CC	55	96,5%	33	86,8%
	AC	2	3,5%	5	13,2%
	AA	0	0,0%	0	0,0%
rs2230199	CC	35	61,4%	24	63,2%
	CG	22	38,6%	12	31,6%
	GG	0	0,0%	2	5,3%
rs1410996**	TT	0	0,0%	7	18,4%
	CT	16	28,1%	18	47,4%
	CC	41	71,9%	13	34,2%

* χ^2 test: $P < 0,05$; ** χ^2 test: $P < 0,001$

Tablica 30. Rezultati testiranja χ^2 testom iz tablice 29.

		OD
rs4151667	χ^2 test	2,390
	df	2
	P	0,303
rs10490924	χ^2 test	8,173
	df	2
	P	0,017
rs1061170	χ^2 test	6,991
	df	2
	P	0,030
rs641153	χ^2 test	1,843
	df	1
	P	0,175
rs11200638	χ^2 test	7,880
	df	2
	P	0,019
rs9332739	χ^2 test	1,883
	df	2
	P	0,39
rs547154	χ^2 test	3,110
	df	1
	P	0,078
rs2230199	χ^2 test	3,325
	df	2
	P	0,19
rs1410996	χ^2 test	18,579
	df	2
	P	<0,001

Tablice 29. i 30. prikazuju razlike u raspodjeli genotipova između SMD i kontrolne skupine za ispitanike koji su imali pozitivnu dijagnozu ostalih degeneracija (OD). **U SMD skupini značajno su češći homozigoti rs10490924, rs11200638, rs 1061170 i rs1410996.**

Tablica 31. Razlike u raspodjeli genotipova između SMD i kontrolne skupine za pojedinu vrstu perifernih promjena: **kaldrmaste degeneracije (PS)**

Polimorfizam	Genotip	PS			
		SMD		Kontrola	
		N	%		
rs4151667	TT	40	100,0%	9	100,0%
	AT	0	0,0%	0	0,0%
	AA	0	0,0%	0	0,0%
rs10490924	GG	12	30,0%	4	50,0%
	GT	18	45,0%	3	37,5%
	TT	10	25,0%	1	12,5%
rs1061170	TT	7	17,5%	2	25,0%
	CT	16	40,0%	6	75,0%
	CC	17	42,5%	0	0,0%
rs641153	CC	38	95,0%	6	75,0%
	CT	2	5,0%	2	25,0%
	TT	0	0,0%	0	0,0%
rs11200638	GG	14	35,0%	4	50,0%
	AG	16	40,0%	3	37,5%
	AA	10	25,0%	1	12,5%
rs9332739	GG	36	90,0%	8	100,0%
	CG	4	10,0%	0	0,0%
	CC	0	0,0%	0	0,0%
rs547154*	CC	39	97,5%	6	75,0%
	AC	1	2,5%	2	25,0%
	AA	0	0,0%	0	0,0%
rs2230199	CC	24	60,0%	6	75,0%
	CG	16	40,0%	2	25,0%
	GG	0	0,0%	0	0,0%
rs1410996**	TT	0	0,0%	2	25,0%
	CT	11	27,5%	5	62,5%
	CC	29	72,5%	1	12,5%

* χ^2 test: $P < 0,05$; ** χ^2 test: $P < 0,001$

Tablica 32. Rezultati testiranja χ^2 testom iz tablice 31.

		PS
rs4151667	χ^2 test	NA
	df	NA
	P	NA
rs10490924	χ^2 test	1,340
	df	2
	P	0,512
rs1061170	χ^2 test	5,382
	df	2
	P	0,068
rs641153	χ^2 test	3,491
	df	1
	P	0,062
rs11200638	χ^2 test	0,865
	df	2
	P	0,649
rs9332739	χ^2 test	0,873
	df	1
	P	0,35
rs547154	χ^2 test	5,760
	df	1
	P	0,016
rs2230199	χ^2 test	0,640
	df	1
	P	0,424
rs1410996	χ^2 test	16,290
	df	2
	P	<0,001

Tablice 31. i 32. prikazuju razlike u raspodjeli genotipova između SMD i kontrolne skupine za ispitanike koji su imali prisutne **kaldrmaste degeneracije**. **U SMD skupini značajno su češći homozigoti rs1410996.**

Tablica 33. Predikcija prisustva kliničkih oblika SMD-a prilikom prisustva određenog genotipa

OR za pripadnost SMD skupini u odnosu na kontrolu		SMD skupina					
		N	%	OR	95% CI		P
rs4151667	TT	151	94,4%	1,00			
	AT	9	5,6%	0,37	0,16	0,85	0,018
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs10490924	GG	50	31,4%	1,00			
	GT	68	42,8%	2,19	1,33	3,61	0,002
	TT	41	25,8%	17,83	6,03	52,73	<0,001
rs1061170	TT	33	20,8%	1,00			
	CT	72	45,3%	1,09	0,62	1,92	0,764
	CC	54	34,0%	2,01	1,06	3,81	0,034
rs641153	CC	153	95,6%	1,00			
	CT	7	4,4%	0,19	0,08	0,45	<0,001
	CC	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs11200638	GG	56	35,0%	1,00			
	AG	65	40,6%	2,18	1,32	3,59	0,002
	AA	39	24,4%	16,02	5,43	47,23	<0,001
rs9332739	GG	152	95,0%	1,00			
	CG	8	5,0%	0,37	0,16	0,88	0,024
	CC	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs547154	CC	155	96,9%	1,00			
	AC	5	3,1%	0,13	0,05	0,36	<0,001
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs2230199	CC	106	66,3%	1,00			
	CG	52	32,5%	1,18	0,72	1,94	0,500
	GG	2	1,3%	0,37	0,07	1,97	0,246
rs1410996	TT	4	2,5%	1,00			
	CT	56	35,0%	2,50	0,79	7,92	0,120
	CC	100	62,5%	8,33	2,62	26,52	<0,001

U odnosu na normalni genotip, omjer izgleda za prisustvo SMD-a značajno **povećava** sljedeći genotip: **homozigoti rs10490924 za 17,83 puta, rs1061170 za 2,01 puta, rs11200638 za 16,02 puta i rs1410996 za 8,33 puta; te rs10490924 heterozigot za 2,19 puta.**

U kontrolnoj skupini u odnosu na normalni genotip, sljedeći genotip značajno **smanjuje** omjer izgleda za prisustvo SMD-a: **rs4151667 heterozigot za 1/0,37=2,70 puta, rs641153 heterozigot za 1/0,19=5,26 puta, rs9332739 heterozigot za 1/0,37=2,70 puta te rs547154 heterozigot za 1/0,13=7,69 puta.**

4.6. Predikcija prisustva pojedinih perifernih promjena s obzirom na prisustvo genotipskih promjena u ispitivanoj populaciji

Tablica 34. Predikcija prisustva **druza** s obzirom na pojedine genotipove u SMD skupini

SMD skupina		DRUZE					
		N	%	OR	95% CI		P
rs4151667	TT	109	94,8%	1,00			
	AT	6	5,2%	0,66	0,16	2,78	0,571
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs10490924	GG	33	28,7%	1,00			
	GT	47	40,9%	1,05	0,46	2,39	0,908
	TT	35	30,4%	2,47	0,85	7,20	0,096
rs1061170	TT	19	16,5%	1,00			
	CT	50	43,5%	1,80	0,75	4,35	0,191
	CC	46	40,0%	4,50	1,55	13,02	0,006
rs641153	CC	111	96,5%	1,00			
	CT	4	3,5%	0,43	0,09	2,02	0,287
	TT	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs11200638	GG	39	33,9%	1,00			
	AG	43	37,4%	0,72	0,32	1,63	0,427
	AA	33	28,7%	1,83	0,63	5,36	0,268
rs9332739	GG	112	97,4%	1,00			
	CG	3	2,6%	0,18	0,04	0,80	0,024
	CC	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs547154	CC	111	96,5%	1,00			
	AC	4	3,5%	1,37	0,15	12,63	0,782
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs1410996	TT	1	,9%	1,00			
	CT	39	33,9%	4,87	0,41	57,63	0,209
	CC	75	65,2%	7,14	0,62	82,67	0,116

Tablica 34. prikazuje omjere izgleda za prisustvo druza u SMD skupini s obzirom na pojedine genotipove. U odnosu na normalni genotip, **homozigot rs1061170 ima 4,5 puta veće izgleda za prisustvo druza, dok heterozigoti rs9332739 i značajno smanjuju izgleda za prisustvo druza 1/0,18=5,55 puta.**

Tablica 35. Predikcija prisustva **RPP-a** s obzirom na pojedine genotipove u SMD skupini

SMD skupina		RPP					
		N	%	OR	95% CI		P
rs4151667	TT	66	94,3%	1,00			
	AT	4	5,7%	0,99	0,26	3,85	0,993
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs10490924	GG	21	30,0%	1,00			
	GT	29	41,4%	0,96	0,45	2,02	0,906
	TT	20	28,6%	1,29	0,55	2,98	0,559
rs1061170	TT	7	10,0%	1,00			
	CT	34	48,6%	3,51	1,35	9,14	0,010
	CC	29	41,4%	4,49	1,66	12,13	0,003
rs641153	CC	67	95,7%	1,00			
	CT	3	4,3%	0,93	0,20	4,30	0,925
	TT	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs11200638	GG	25	35,7%	1,00			
	AG	26	37,1%	0,79	0,38	1,65	0,536
	AA	19	27,1%	1,10	0,48	2,51	0,817
rs9332739	GG	68	97,1%	1,00			
	CG	2	2,9%	0,40	0,08	2,03	0,267
	CC	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs547154	CC	67	95,7%	1,00			
	AC	3	4,3%	1,90	0,31	11,72	0,488
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs1410996	TT	1	1,4%	1,00			
	CT	22	31,4%	2,00	0,20	20,49	0,559
	CC	47	67,1%	2,76	0,28	27,51	0,386

Tablica 35. prikazuje omjere izgleda za prisustvo RPP-a u SMD skupini s obzirom na pojedine genotipove. U odnosu na normalni genotip, **homozigot rs1061170 ima 4,49 puta, a heterozigot rs1061170 ima 3,51 puta veće izgleda za prisustvo RPP-a.**

Tablica 36. Predikcija prisustva hiperpigmentacija (pigmentne nakupine i nevusi) s obzirom na pojedine genotipove u SMD skupini

SMD skupina		HIPERPIGMENTACIJE					
		N	%	OR	95% CI		P
rs4151667	TT	19	100,0%	1,00			
	AT	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs10490924	GG	5	26,3%	1,00			
	GT	7	36,8%	1,03	0,31	3,47	0,958
	TT	7	36,8%	1,85	0,54	6,35	0,326
rs1061170	TT	3	15,8%	1,00			
	CT	10	52,6%	1,61	0,41	6,30	0,491
	CC	6	31,6%	1,25	0,29	5,38	0,764
rs641153	CC	19	100,0%	1,00			
	CT	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
	TT	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs11200638	GG	6	31,6%	1,00			
	AG	6	31,6%	0,85	0,26	2,79	0,786
	AA	7	36,8%	1,82	0,56	5,92	0,317
rs9332739	GG	18	94,7%	1,00			
	CG	1	5,3%	1,06	0,12	9,15	0,955
	CC	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs547154	CC	19	100,0%	1,00			
	AC	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs1410996	TT	1	5,3%	1,00			
	CT	6	31,6%	0,36	0,03	4,03	0,407
	CC	12	63,2%	0,41	0,04	4,26	0,454

Tablica 36. prikazuje omjere izgleda prisustva hiperpigmentacija u SMD skupini s obzirom na pojedine genotipove. Nije bilo značajnih prediktivnih vrijednosti.

Tablica 37. Predikcija prisustva **hipopigmentacija (defekti RPE i atrofični areali=AA)** s obzirom na pojedine genotipove u SMD skupini

SMD skupina		HIPOPIGMENTACIJE					
		N	%	OR	95% CI		P
rs4151667	TT	27	100,0%	1,00			
	AT	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs10490924	GG	5	18,5%	1,00			
	GT	15	55,6%	2,55	0,86	7,56	0,092
	TT	7	25,9%	1,85	0,54	6,35	0,326
rs1061170	TT	8	29,6%	1,00			
	CT	13	48,1%	0,69	0,25	1,87	0,463
	CC	6	22,2%	0,39	0,12	1,25	0,113
rs641153	CC	26	96,3%	1,00			
	CT	1	3,7%	0,81	0,09	7,05	0,852
	TT	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs11200638	GG	7	25,9%	1,00			
	AG	14	51,9%	1,92	0,72	5,16	0,195
	AA	6	22,2%	1,27	0,39	4,13	0,688
rs9332739	GG	24	88,9%	1,00			
	CG	3	11,1%	3,20	0,72	14,29	0,128
	CC	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs547154	CC	27	100,0%	1,00			
	AC	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs1410996	TT	1	3,7%	1,00			
	CT	11	40,7%	0,73	0,07	7,75	0,796
	CC	15	55,6%	0,53	0,05	5,43	0,592

Tablica 37. prikazuje omjere izgleda za prisustvo hipopigmentacija u SMD skupini s obzirom na pojedine genotipove. Nije bilo značajnih prediktivnih vrijednosti.

Tablica 38. Predikcija prisustva drugih **perifernih degeneracija (engl. other degenerations=OD: mrežolikih degeneracija, poput puževog traga, bljedila bez pritiska, kaldrmastih degeneracija, vitrealnih opaciteta, ruptura)** s obzirom na pojedine genotipove u SMD skupini

SMD skupina		OD					
		N	%	OR	95% CI		P
rs4151667	TT	56	98,2%	1,00			
	AT	1	1,8%	0,21	0,03	1,74	0,149
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs10490924	GG	18	31,6%	1,00			
	GT	24	42,1%	0,97	0,45	2,08	0,937
	TT	15	26,3%	1,03	0,43	2,42	0,954
rs1061170	TT	10	17,5%	1,00			
	CT	24	42,1%	1,15	0,47	2,80	0,758
	CC	23	40,4%	1,71	0,68	4,27	0,254
rs641153	CC	54	94,7%	1,00			
	CT	3	5,3%	1,37	0,30	6,37	0,684
	TT	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs11200638	GG	21	36,8%	1,00			
	AG	21	36,8%	0,80	0,38	1,68	0,550
	AA	15	26,3%	1,04	0,45	2,42	0,924
rs9332739	GG	52	91,2%	1,00			
	CG	5	8,8%	3,21	0,74	13,94	0,120
	CC	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs547154	CC	55	96,5%	1,00			
	AC	2	3,5%	1,21	0,20	7,48	0,836
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs1410996	TT	0	,0%	1,00			
	CT	16	28,1%		0,00		0,999
	CC	41	71,9%		0,00		0,999

Tablica 38. prikazuje omjere izgleda za prisustvo OD-a u SMD skupini s obzirom na pojedine genotipove. Nije bilo značajnih prediktivnih vrijednosti.

Tablica 39. Predikcija prisustva **kaldrmastih degeneracija** s obzirom na pojedine genotipove u SMD skupini

SMD skupina		PS					
		N	%	OR	95% CI		P
rs4151667	TT	40	100,0%	1,00			
	AT	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs10490924	GG	12	30,0%	1,00			
	GT	18	45,0%	1,14	0,49	2,65	0,761
	TT	10	25,0%	1,02	0,39	2,68	0,965
rs1061170	TT	7	17,5%	1,00			
	CT	16	40,0%	1,06	0,39	2,89	0,908
	CC	17	42,5%	1,71	0,62	4,70	0,301
rs641153	CC	38	95,0%	1,00			
	CT	2	5,0%	1,21	0,23	6,50	0,824
	TT	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs11200638	GG	14	35,0%	1,00			
	AG	16	40,0%	0,98	0,43	2,24	0,961
	AA	10	25,0%	1,03	0,40	2,65	0,944
rs9332739	GG	36	90,0%	1,00			
	CG	4	10,0%	3,22	0,77	13,54	0,110
	CC	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs547154	CC	39	97,5%	1,00			
	AC	1	2,5%	0,74	0,08	6,85	0,794
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs1410996	TT	0	,0%	1,00			
	CT	11	27,5%		0,00		0,999
	CC	29	72,5%		0,00		0,999

Tablica 39. prikazuje omjere izgleda za prisustvo kaldrmastih degeneracija u SMD skupini s obzirom na pojedine genotipove. Nije bilo značajnih prediktivnih vrijednosti.

Tablica 40. Predikcija pripadnosti S podskupini s obzirom na pojedine genotipove u SMD skupini

SMD skupina		S skupina					
		N	%	OR	95% CI		P
rs4151667	TT	76	95,0%	1,00			
	AT	4	5,0%	0,77	0,20	2,97	0,703
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs10490924	GG	30	37,5%	1,00			
	GT	32	40,0%	0,59	0,28	1,24	0,166
	TT	18	22,5%	0,55	0,24	1,27	0,158
rs1061170	TT	13	16,3%	1,00			
	CT	36	45,0%	1,58	0,68	3,66	0,284
	CC	31	38,8%	2,07	0,86	5,01	0,105
rs641153	CC	74	92,5%	1,00			
	CT	6	7,5%	6,24	0,73	53,11	0,094
	TT	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs11200638	GG	32	40,0%	1,00			
	AG	31	38,8%	0,68	0,33	1,40	0,289
	AA	17	21,3%	0,56	0,24	1,27	0,165
rs9332739	GG	78	97,5%	1,00			
	CG	2	2,5%	0,31	0,06	1,57	0,157
	CC	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs547154	CC	75	93,8%	1,00			
	AC	5	6,3%	NA	0,00		0,999
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs1410996	TT	2	2,5%	1,00			
	CT	26	32,5%	0,45	0,04	5,24	0,522
	CC	52	65,0%	0,54	0,05	6,17	0,621

Tablica 40. prikazuje omjere izgleda pripadnosti S podskupini s obzirom na pojedine genotipove u SMD skupini. Nije bilo značajnih prediktivnih vrijednosti.

Tablica 41. Predikcija pripadnosti E skupini s obzirom na pojedine genotipove u SMD skupini

SMD skupina		E skupina					
		N	%	OR	95% CI		P
rs4151667	TT	73	93,6%	1,00			
	AT	5	6,4%	1,30	0,34	5,04	0,703
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs10490924	GG	20	25,6%	1,00			
	GT	36	46,2%	1,69	0,81	3,54	0,166
	TT	22	28,2%	1,83	0,79	4,25	0,158
rs1061170	TT	20	25,6%	1,00			
	CT	35	44,9%	0,63	0,27	1,46	0,284
	CC	23	29,5%	0,48	0,20	1,17	0,105
rs641153	CC	77	98,7%	1,00			
	CT	1	1,3%	0,16	0,02	1,36	0,094
	TT	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs11200638	GG	23	29,5%	1,00			
	AG	33	42,3%	1,48	0,72	3,06	0,289
	AA	22	28,2%	1,80	0,79	4,13	0,165
rs9332739	GG	72	92,3%	1,00			
	CG	6	7,7%	3,25	0,64	16,62	0,157
	CC	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs547154	CC	78	100,0%	1,00			
	AC	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs1410996	TT	1	1,3%	1,00			
	CT	29	37,2%	2,23	0,19	26,06	0,522
	CC	48	61,5%	1,85	0,16	21,02	0,621

Tablica 41. prikazuje omjere izgleda pripadnosti E podskupini s obzirom na pojedine genotipove u SMD skupini. Nije bilo značajnih prediktivnih vrijednosti.

Tablica 42. Predikcija prisustva **druza** s obzirom na pojedine genotipove u svih ispitanika

SVI ZAJEDNO (SMD+KONTROLA)		DRUZE					
		N	%	OR	95% CI		P
rs4151667	TT	164	91,1%	1,00			
	AT	16	8,9%	0,80	0,37	1,72	0,561
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs10490924	GG	74	41,1%	1,00			
	GT	71	39,4%	1,17	0,71	1,93	0,526
	TT	35	19,4%	2,84	1,30	6,20	0,009
rs1061170	TT	35	19,4%	1,00			
	CT	84	46,7%	1,38	0,78	2,44	0,274
	CC	61	33,9%	2,65	1,36	5,19	0,004
rs641153	CC	162	90,0%	1,00			
	CT	17	9,4%	0,59	0,29	1,20	0,143
	TT	1	0,6%	NR	0,00		0,999
rs11200638	GG	82	45,6%	1,00			
	AG	65	36,1%	1,05	0,63	1,72	0,861
	AA	33	18,3%	2,50	1,14	5,45	0,022
rs9332739	GG	169	93,9%	1,00			
	CG	11	6,1%	0,45	0,20	1,01	0,053
	CC	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs547154	CC	164	91,1%	1,00			
	AC	16	8,9%	0,59	0,28	1,21	0,148
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs1410996	TT	7	3,9%	1,00			
	CT	78	43,3%	2,01	0,74	5,49	0,174
	CC	95	52,8%	3,25	1,18	8,92	0,022

Tablica 42. prikazuje omjere izgleda za prisustvo druza u svih ispitanika s obzirom na pojedine genotipove. U odnosu na normalni genotip, **homozigot rs1061170 ima 2,65 puta, homozigot rs10490924 ima 2,84 puta, homozigot rs11200638 za 2,50 puta i homozigot rs1410996 ima 3,25 puta veće izgleda za prisustvo druza.**

Tablica 43. Predikcija prisustva **RPP-a** s obzirom na pojedine genotipove u svih ispitanika

SVI ZAJEDNO (SMD+KONTROLA)		RPP					
		N	%	OR	95% CI		P
rs4151667	TT	90	92,8%	1,00			
	AT	7	7,2%	0,65	0,27	1,57	0,336
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs10490924	GG	34	35,1%	1,00			
	GT	42	43,3%	1,56	0,91	2,67	0,106
	TT	21	21,6%	2,71	1,34	5,50	0,006
rs1061170	TT	14	14,4%	1,00			
	CT	46	47,4%	0,31	0,15	0,64	0,002
	CC	37	38,1%	0,58	0,34	1,02	0,058
rs641153	CC	89	91,8%	1,00			
	CT	7	7,2%	0,50	0,21	1,18	0,114
	TT	1	1,0%	NR	0,00		0,999
rs11200638	GG	38	39,2%	1,00			
	AG	39	40,2%	1,50	0,88	2,56	0,139
	AA	20	20,6%	2,47	1,22	5,00	0,012
rs9332739	GG	93	95,9%	1,00			
	CG	4	4,1%	0,36	0,12	1,06	0,064
	CC	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs547154	CC	90	92,8%	1,00			
	AC	7	7,2%	0,54	0,22	1,28	0,160
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs1410996	TT	2	2,1%	1,00			
	CT	40	41,2%	3,43	0,76	15,55	0,109
	CC	55	56,7%	5,31	1,18	23,89	0,029

Tablica 43. prikazuje omjere izgleda za prisustvo RPP-a u svih ispitanika s obzirom na pojedine genotipove. U odnosu na normalni genotip, **homozigot rs10490924 ima 2,71 puta veći omjer izgleda za prisustvo RPP-a, homozigot rs11200638 za 2,47 puta i homozigot rs1410996 za 5,31 puta. Heterozigot rs1061170 ima značajno manje izgleda 1/0,31=3,23 puta za prisustvo RPP-a.**

Tablica 44. Predikcija prisustva hiperpigmentacija s obzirom na pojedine genotipove u svih ispitanika

SVI ZAJEDNO (SMD+KONTROLA)		HIPERPIGMENTACIJE					
		N	%	OR	95% CI		P
rs4151667	TT	37	90,2%	1,00			
	AT	4	9,8%	1,03	0,34	3,14	0,954
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs10490924	GG	16	39,0%	1,00			
	GT	17	41,5%	1,22	0,59	2,54	0,587
	TT	8	19,5%	1,64	0,65	4,12	0,298
rs1061170	TT	11	26,8%	1,00			
	CT	21	51,2%	0,90	0,41	1,99	0,798
	CC	9	22,0%	0,65	0,25	1,66	0,364
rs641153	CC	37	90,2%	1,00			
	CT	4	9,8%	0,81	0,27	2,42	0,705
	TT	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs11200638	GG	19	46,3%	1,00			
	AG	14	34,1%	0,95	0,45	1,99	0,893
	AA	8	19,5%	1,55	0,63	3,84	0,342
rs9332739	GG	37	90,2%	1,00			
	CG	4	9,8%	1,18	0,39	3,63	0,767
	CC	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs547154	CC	37	90,2%	1,00			
	AC	4	9,8%	0,88	0,29	2,64	0,814
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs1410996	TT	3	7,5%	1,00			
	CT	22	55,0%	0,99	0,27	3,70	0,993
	CC	15	37,5%	0,62	0,16	2,36	0,479

Tablica 44. prikazuje omjere izgleda za prisustvo hiperpigmentacija u svih ispitanika s obzirom na pojedine genotipove. Nije bilo značajnih prediktivnih vrijednosti.

Tablica 45. Predikcija prisustva **hipopigmentacija** s obzirom na pojedine genotipove u svih ispitanika

SVI ZAJEDNO (SMD+KONTROLA)		HIPOPIGMENTACIJE					
		N	%	OR	95% CI		P
rs4151667	TT	43	93,5%	1,00			
	AT	2	4,3%	0,40	0,09	1,75	0,224
	AA	1	2,2%	NR	0,00		0,999
rs10490924	GG	15	32,6%	1,00			
	GT	23	50,0%	1,89	0,94	3,81	0,076
	TT	8	17,4%	1,76	0,69	4,47	0,236
rs1061170	TT	14	30,4%	1,00			
	CT	22	47,8%	0,71	0,34	1,49	0,366
	CC	10	21,7%	0,54	0,22	1,31	0,174
rs641153	CC	41	89,1%	1,00			
	CT	5	10,9%	0,93	0,34	2,53	0,882
	TT	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs11200638	GG	19	41,3%	1,00			
	AG	20	43,5%	1,44	0,73	2,86	0,290
	AA	7	15,2%	1,32	0,51	3,39	0,563
rs9332739	GG	40	87,0%	1,00			
	CG	5	10,9%	1,42	0,51	3,97	0,508
	CC	1	2,2%	NR	0,00		0,999
rs547154	CC	42	91,3%	1,00			
	AC	4	8,7%	0,76	0,25	2,26	0,616
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs1410996	TT	3	6,5%	1,00			
	CT	23	50,0%	1,05	0,28	3,89	0,944
	CC	20	43,5%	0,85	0,23	3,20	0,814

Tablica 45. prikazuje omjere izgleda za prisustvo hipopigmentacija u svih ispitanika s obzirom na pojedine genotipove. Nije bilo značajnih prediktivnih vrijednosti.

Tablica 46. Predikcija prisustva **OD-a** s obzirom na pojedine genotipove u svih ispitanika

SMD skupina		OD					
		N	%	OR	95% CI		P
rs4151667	TT	92	95,8%	1,00			
	AT	3	3,1%	0,23	0,07	0,78	0,019
	AA	1	1,0%	NR	0,00		0,999
rs10490924	GG	38	40,0%	1,00			
	GT	40	42,1%	1,27	0,75	2,16	0,377
	TT	17	17,9%	1,58	0,78	3,21	0,205
rs1061170	TT	22	23,2%	1,00			
	CT	44	46,3%	0,94	0,51	1,74	0,850
	CC	29	30,5%	1,15	0,59	2,26	0,678
rs641153	CC	87	91,6%	1,00			
	CT	8	8,4%	0,62	0,27	1,42	0,258
	TT	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs11200638	GG	43	45,3%	1,00			
	AG	35	36,8%	1,08	0,63	1,84	0,772
	AA	17	17,9%	1,60	0,79	3,24	0,195
rs9332739	GG	87	91,6%	1,00			
	CG	7	7,4%	0,81	0,33	2,00	0,645
	CC	1	1,1%	NR	0,00		0,999
rs547154	CC	88	92,6%	1,00			
	AC	7	7,4%	0,56	0,24	1,35	0,197
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs1410996	TT	7	7,4%	1,00			
	CT	34	35,8%	0,55	0,20	1,51	0,245
	CC	54	56,8%	1,02	0,38	2,74	0,973

Tablica 46. prikazuje omjere izgleda za prisustvo OD-a u svih ispitanika s obzirom na pojedine genotipove. U odnosu na normalne alele, **heterozigot rs4151667 značajno smanjuje izgleda prisustva OD-a za 1/0,23=4,35 puta.**

Tablica 47. Predikcija prisustva **PS-a** s obzirom na pojedine genotipove u svih ispitanika

SVI ZAJEDNO (SMD+KONTROLA)		PS					
		N	%	OR	95% CI		P
rs4151667	TT	49	100,0%	1,00			
	AT	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs10490924	GG	16	33,3%	1,00			
	GT	21	43,8%	1,57	0,78	3,17	0,206
	TT	11	22,9%	2,45	1,04	5,76	0,041
rs1061170	TT	9	18,8%	1,00			
	CT	22	45,8%	1,20	0,52	2,77	0,664
	CC	17	35,4%	1,72	0,72	4,14	0,225
rs641153	CC	44	91,7%	1,00			
	CT	4	8,3%	0,66	0,22	1,96	0,455
	TT	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs11200638	GG	18	37,5%	1,00			
	AG	19	39,6%	1,44	0,72	2,90	0,301
	AA	11	22,9%	2,48	1,07	5,77	0,035
rs9332739	GG	44	91,7%	1,00			
	CG	4	8,3%	0,97	0,32	2,94	0,953
	CC	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs547154	CC	45	93,8%	1,00			
	AC	3	6,3%	0,50	0,15	1,72	0,275
	AA	0	0,0%	NA	NA	NA	NA
rs1410996	TT	2	4,2%	1,00			
	CT	16	33,3%	1,10	0,23	5,19	0,907
	CC	30	62,5%	2,22	0,49	10,13	0,304

Tablica 47. prikazuje omjere izgleda za prisustvo **kaldrmastih degeneracija** u svih ispitanika s obzirom na pojedine genotipove. U odnosu na normalni genotip, **homozigot rs10490924 ima 2,45 puta, a rs11200638 ima 2,48 puta veće izgleda** za prisustvo kaldrmastih degeneracija u svih ispitanika s obzirom na pojedine genotipove.

4.7. Prikaz MAF-ova i Hardy-Weinbergove ravnoteže pojedinih nukleotidnih polimorfizama u ispitivanoj populaciji

Tablica 48. Prikaz MAF-ova u SMD i kontrolnoj skupini

CHR	SNP	A1	A2	MAF
SMD				
1	rs1061170	T	C	0,4591
1	rs1410996	T	C	0,2
6	rs9332739	C	G	0,025
6	rs547154	A	C	0,01562
6	rs641153	T	C	0,02187
10	rs10490924	T	G	0,4686
10	rs11200638	A	G	0,4469
6	rs41151667	A	T	0,025
19	rs2230199	G	C	0,1687
CHR	SNP	A1	A2	MAF
KONTROLNA SKUPINA				
1	rs1061170	C	T	0,4759
1	rs1410996	T	C	0,3958
6	rs9332739	C	G	0,06897
6	rs547154	A	C	0,09655
6	rs641153	T	C	0,1034
10	rs10490924	T	G	0,2138
10	rs11200638	A	G	0,1966
6	rs41151667	A	T	0,07192
19	rs2230199	G	C	0,1759

Tablice 49. i 50. Hardy - Weinbergova ravnoteža

Tablica 49.

rs4151667	Promatrani #	Očekivani #
Uobičajeni homozigot	125	124,8
Heterozigot	20	20,3
Rijetki homozigot	1	0,8
Var allele freq:	0,08	
$\chi^2 =$	0,04	
χ^2 test <i>P</i> vrijednost =	0,839	1 df
rs10490924	Promatrani #	Očekivani #
Uobičajeni homozigot	87	89,6
Heterozigot	54	48,7
Rijetki homozigot	4	6,6
Var allele freq:	0,21	
$\chi^2 =$	1,69	
χ^2 test <i>P</i> vrijednost =	0,194	1 df
rs1061170	Promatrani #	Očekivani #
Uobičajeni homozigot	38	39,8
Heterozigot	76	72,3
Rijetki homozigot	31	32,8
Var allele freq:	0,48	
$\chi^2 =$	0,37	
χ^2 test <i>P</i> vrijednost =	0,541	1 df
rs641153	Promatrani #	Očekivani #
Uobičajeni homozigot	116	116,6
Heterozigot	28	26,9
Rijetki homozigot	1	1,6
Var allele freq:	0,10	
$\chi^2 =$	0,24	
χ^2 test <i>P</i> vrijednost =	0,621	1 df
rs11200638	Promatrani #	Očekivani #
Uobičajeni homozigot	92	93,6
Heterozigot	49	45,8
Rijetki homozigot	4	5,6
Var allele freq:	0,20	
$\chi^2 =$	0,71	
χ^2 test <i>P</i> vrijednost =	0,400	1 df

Tablica 50.

rs9332739	Promatrani #	Očekivani #
Uobičajeni homozigot	126	125,7
Heterozigot	18	18,6
Rijetki homozigot	1	0,7
Var allele freq:	0,07	
$\chi^2 =$	0,16	
χ^2 test <i>P</i> vrijednost =	0,688	1 df
rs547154	Promatrani #	Očekivani #
Uobičajeni homozigot	117	118,4
Heterozigot	28	25,3
Rijetki homozigot	0	1,4
Var allele freq:	0,10	
$\chi^2 =$	1,66	
χ^2 test <i>P</i> vrijednost =	0,198	1 df
rs2230199	Promatrani #	Očekivani #
Uobičajeni homozigot	99	98,5
Heterozigot	41	42,0
Rijetki homozigot	5	4,5
Var allele freq:	0,18	
$\chi^2 =$	0,09	
χ^2 test <i>P</i> vrijednost =	0,768	1 df
rs1410996	Promatrani #	Očekivani #
Uobičajeni homozigot	15	22,6
Heterozigot	84	68,9
Rijetki homozigot	45	52,6
Var allele freq:	0,60	
$\chi^2 =$	6,94	
χ^2 test <i>P</i> vrijednost =	0,008	1 df

Tablice 49. i 50. prikazuju izračun Hardy–Weinbergovih ravnoteža za pojedine genotipove u ispitivanoj i kontrolnoj skupini. **Za utvrđivanje statistički značajnih razlika između genotipskih skupina primijenjena je Bonferronijeva korekcija, te je razina značajnosti postavljena na 0,0063 (0,05/8). Sukladno rezultatima i uključenoj korekciji, nije bilo značajnih odstupanja od Hardy–Weinbergove ravnoteže u ispitivanoj i kontrolnoj skupini.**

4.8. Prikaz kappa vrijednosti u SMD i kontrolnoj skupini

Tablica 51. Prikaz kappa vrijednosti u SMD i kontrolnoj skupini

SMD skupina

Weighted Kappa ^a	0,963
Standard error	0,010
95% CI	0,944 to 0,982

Kontrolna skupina

Weighted Kappa ^a	0,978
Standard error	0,008
95% CI	0,962 to 0,994

^a Linear weights

Prema dobivenom Cohenovom koeficijentu, podaci dobiveni analizom slika dva čitača (pristupnika i mentora) su bili dosljedni u obje skupine.

5. RASPRAVA

SMD je kompleksna multifaktorijalna neurodegenerativna bolest makularnog područja čija je genetska etiologija do unazad desetak godina bila nepoznata, a patogenetski mehanizmi su i dalje predmetom brojnih kliničkih istraživanja.

Procijenjeno je da je ukupno otprilike 20 000-25 000 gena kodirano humanim genomom i od toga samo 10-20% gena ima ekspresiju u određenim visokodiferenciranim stanicama kao što je npr. RPE (143, 144, 227). U radovima je opisano 1100 gena čija je ekspresija zabilježena u stanicama RPE-a (227).

Prvi revolucionarni korak u otkrivanju etioloških genetskih čimbenika SMD-a je bilo istraživanje Klein i suradnika 2005. g. u kojem je dokazano da homozigoti za C alel gena za CFH imaju 7,5 puta veću šansu obolijevanja od SMD-a (86). Time se otvorilo novo poglavlje u etiologiji SMD-a tijekom kojeg se otkrivaju brojni nukleotidni polimorfizmi genskih lokusa povezanih s povećanim rizikom obolijevanja od SMD-a. U literaturi je objavljeno nekoliko radova koji su imali za cilj odrediti genotipsko-fenotipsku korelaciju CFH i ARMS2 s uznapređovalim oblicima SMD-a: za uznapređovalu (eksudativnu) SMD za homozigote HTRA1 i CFH genotip su dva rada Levezuel i suradnika koji su dokazali povezanost okultne ili minimalno klasične CNV i CFH polimorfizma i predominantno klasične CNV i HTRA1 polimorfizma (87, 229), dok su Seddon i suradnici dokazali da su CFH i ARMS2 polimorfizmi neovisno povezani s progresijom iz rane i intermedijarne u uznapređovalu SMD (88).

U radu Shulera i suradnika, fenotipskom analizom bolesnika s genskom varijacijama za ARMS2 (A69S) dokazana je povezanost s uznapređovalom SMD i ranije obolijevanje tih bolesnika, osobito ako su pušači, što je i direktni dokaz genetsko-okolišne interakcije (238).

Od gena koji su odgovorni za 75% slučajeva pojave SMD-a već su prije navedeni geni za CFH, CFB, C2 i C3, ARMS2 i HtrA1 čije su genske varijacije i povezanost s fenotipom bili predmetom ovog istraživanja.

Do sada su klasifikacije SMD-a opisivale samo promjene unutar makularnog područja.

No, posljednji podaci iz literature ukazuju na to da je genska ekspresija fenotipskih obilježja SMD-a moguća i na periferiji mrežnice.

U poglavlju 1.3.3. prikazani su radovi objavljeni u literaturi koji ukazuju na veću vjerojatnost prisustva perifernih promjena mrežnice kod određenih genotipova etiološki povezanih s pojavom SMD-a: Shuler i suradnici su dokazali povezanost RPP-a s CFHY402H

polimorfizmom i da promjene SMD-a nisu samo ograničene na makularno područje te stoga, prilikom kliničke procjene bolesnika sa SMD-om treba uzeti i obzir periferne promjene mrežnice (194). U drugom radu istog autora nije dokazana povezanost ARMS2 polimorfizama s perifernim promjenama mrežnice (238).

Seddon i suradnici su u članova obitelji i blizanaca dokazali 2,8 puta veću vjerojatnost prisustva perifernih druza, dok je vjerojatnost prisustva RPP-a 2,2 puta veća s CC genotipom polimorfizama CFHY402H i rs1410996 u ispitanika s kliničkim znakovima srednje teške do uznapredovale makulopatije. Dokazano je i da osobe bez makulopatije, a s CT ili CC genotipom CFHY402H imaju 2 puta veću vjerojatnost prisustva perifernih druza ili RPP-a (196). U ovom radu za genske lokuse ARMS2, HTRA1, CFB, C2 ili C3 nije dokazana povezanost.

Munch i suradnici su dokazali povezanost perifernih druza i polimorfizma CFHY402H (197).

Droz i suradnici su u jednom radu dokazali povezanost polimorfizma CFHY402H s perifernim družama, no ne i s RPP-om (198), a u drugom radu Mantela i suradnika dokazana je 2,25 puta veća vjerojatnost perifernih druza u ispitanika s R32Q polimorfizmom gena CFB (240).

S rastućim brojem ovakvih znanstvenih radova, očit je klinički značaj morfologije periferije mrežnice u genotipsko-fenotipskom spektru SMD-a.

U svim navedenim radovima korištena je standardna fundus kamera koja prikazuje 30-50 stupnjeva mrežnice. Od perifernih promjena analizirane su samo periferne druze i RPP.

Do sada u literaturi nije objavljen niti jedan rad o povezanosti drugih perifernih promjena i polimorfizama SMD-a. Također treba istaknuti da do sada nema objavljenih radova u kojima je periferna mrežnica dokumentirana i analizirana uz pomoć širokokutne fundus kamere.

U ovoj studiji je ispitivana povezanost perifernih promjena mrežnice s devet nukleotidnih polimorfizama etiološki povezanih sa SMD-om. Periferija mrežnice je dokumentirana i analizirana širokokutnom fundus kamerom.

U objema skupinama, statistički značajne razlike prisustva pojedinih olimorfizama zabilježene su za polimorfizme gena CFH, ARMS2, HtrA1, CFB i C2, dok za polimorfizam C3 gena nije dokazana statistički značajna razlika između obiju skupina. U skupini bolesnika sa SMD-om, dokazana je statistički značajno veća učestalost genotipova: polimorfizma gena ARMS2 (rs10490924), polimorfizma gena HtrA1 (rs11200638) i polimorfizma gena za CFH (rs1410996 i rs1061170).

U kontrolnoj skupini su bili statistički značajno češći genotipovi polimorfizama gena za CFB (rs641153 i rs4151667) i polimorfizmi gena za C2 (rs9332739 i rs547154). Time je ostvarena očekivana raspodjela genotipova: u SMD skupini onih koji prema literaturi dokazano povećavaju rizik od SMD-a (83-98) i u kontrolnoj skupini onih koji smanjuju rizik od pojave SMD-a (99, 100).

Analizom raspodjela genotipova između obiju skupina u odnosu na periferne promjene, za sve periferne promjene u SMD skupini su bili statistički značajno češći genotipovi polimorfizama ARMS2 i HtrA1 dok je polimorfizam CFH bio prisutan u svih, osim u ispitanika s hipopigmentacijama. U kontrolnoj skupini ispitanika, samo su oni s hipopigmentacijama imali statistički značajno češći polimorfizam za C2.

Kad se analizira povezanost CFH genotipova s prisustvom SMD-a, tada se dobivaju statistički značajni podaci: za CFH, ispitanici s CC genotipom na rs1061170 imaju OR=2,01, odnosno s CC genotipom na rs1410996 OR=8,33 puta veći izgled za prisustvo bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu. Dobiveni rezultati povezanosti CFH i SMD-a su vrlo slični podacima u literaturi (OR=2,45-7,4) (83-86).

Dokazana je čak i snažnija povezanost ARMS2 i HtrA1 genotipova s prisustvom SMD-a: za ARMS2, ispitanici s GT/TT genotipom na rs10490924 imaju OR=2,19 i OR=17,83, dok je za HtrA1 AG/AA genotip na rs11100638 OR=2,18, odnosno OR=16,02 puta veći izgled za prisustvo bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu. Za ta dva gena dokazano je da sa svakim T ili A alelom više, rizik za SMD raste 8 puta, što je čak više u odnosu na podatke iz literature (OR=2,2-8,7).

Shuler i suradnici su dokazali da je polimorfizam ARMS2 statistički značajno češće prisutan u mlađoj dobi od 73,9 godina i da je čimbenik rizika za uznapredovalu SMD. Dokazano je i da homozigoti koji imaju prisutan CFH i ARMS2 polimorfizam, obolijevaju u još ranijoj dobi od 72,3 godine (238).

U ovoj studiji nije bilo statistički značajne razlike između S i E skupine onih koji su imali GT ili TT genotip ARMS2 polimorfizma, tako da se ti genotipovi nisu mogli povezati sa stupnjem bolesti. Isti rezultat je dobiven za CFH polimorfizme. Treba naglasiti i da se u slučaju prisustva dvaju ili više rizičnih polimorfizama njihov učinak multiplicira, stoga su potrebne daljnje analize na većem broju ispitanika koje bi utvrdile rizik za bolest u slučaju prisustva više rizičnih čimbenika istovremeno.

U ovoj studiji je dokazano da u kontrolnoj skupini genotipovi polimorfizama CFB i C2 značajno smanjuju izgled za prisustvo SMD-a i time je dokazan njihov protektivni učinak: Za CFB, ispitanici s AT/CT genotipom na rs4151667/641153 s OR=0,37 i OR=0,16 imaju 2,7, odnosno 5,26 puta manji izgled za prisustvo SMD-a. Za C2, prisustvo genotipova CG/CA na rs9332739/rs547154 je smanjivalo izgled za SMD OR=0,37, odnosno OR=0,13, odnosno 2,70 i 7,69 puta. Dobiveni su vrlo slični rezultati objavljenima u literaturi (100, 240).

S obzirom na to da je uzorak ispitanika homozigota za CFB i C2 polimorfizme bio premalen za statističku analizu, nije moguće odrediti njihov učinak na pojavu ili odsustvo bolesti. Za polimorfizam C3 gena nije bilo značajnih razlika u raspodjeli, utjecaja na prisustvo ili odsustvo bolesti između obiju skupina, te je taj polimorfizam izuzet iz daljnje analize.

Nadalje, pogledajmo razlike u dobivenoj raspodjeli perifernih promjena između SMD i kontrolne skupine. U SMD skupini, u odnosu na kontrolnu skupinu, statistički je značajno veća pojavnost druza (74,7% u odnosu na 44%), RPP-a (44,6% u odnosu na 19,3%) i kaldrmastih degeneracija (25,0% u odnosu na 6,0%). Seddon i suradnici su dobili također veću pojavnost perifernih druza i RPP-a u oboljelih od SMD-a (periferne druze 11-12% očiju, a RPP u 24-25% očiju) (186). Što se tiče kaldrmastih degeneracija, do sada u literaturi nije objavljena niti jedna studija o pojavnosti tih perifernih promjena u oboljelih od SMD-a, niti je dokazana povezanost s polimorfizmima gena za SMD. Analizom distribucije drugih perifernih promjena (hiper- i hipopigmentacija, mrežolikih degeneracija, degeneracija poput puževog traga, retinoshiza, sinhiza, ruptura i vitrealnih opaciteta) u ovoj studiji je nađeno da se u kontrolnoj skupini češće pojavljuju promjene bljedilo bez pritiska i vitrealni opaciteti. No, s obzirom na mali broj ispitanika s navedenim promjenama ($WWP=22$, $VO=4$), značaj tog rezultata bi trebalo definirati u studiji s većim brojem ispitanika.

Brojni prethodno spomenuti radovi govore u prilog činjenici da u patogenezi SMD-a ključno mjesto ima disfunkcija i apoptoza stanica RPE-a i fotoreceptora makularnog područja koja uz oksidativni stres i imunološku disregulaciju, dovodi do pojave bolesti. S obzirom na činjenicu da su periferne druze, RPP i kaldrmaste degeneracije prvenstveno degeneracije starije dobi u kojima se događaju promjene na razini RPE-a ili fotoreceptora, na osnovu rezultata ovog istraživanja vrlo je vjerojatno da promjene na razini RPE-a u SMD-u nisu prisutne samo u makularnom području, već se nalaze i na periferiji mrežnice i da se mogu manifestirati u obliku perifernih degeneracija.

Multivarijantnom analizom razine povezanosti tih istih perifernih promjena s centralnom makulopatijom, dobiva se da ispitanici koji imaju periferne druze imaju gotovo tri puta, RPP dva puta, a kaldrmaste degeneracije 4,5 puta veće izgleda prisustva SMD-a u odnosu na kontrolnu skupinu. Jedna studija Seddon i suradnika pokazala je da su periferne druze i RPP dva puta vjerojatnije u srednjoj do uznapredovaloj makulopatiji (196). Ti rezultati upućuju na to da su navedene periferne promjene vrlo vjerojatno dio kliničke slike SMD-a.

Za određivanje mjesta perifernih promjena kao dijela fenotipa SMD-a treba pogledati rezultate povezanosti perifernih promjena i pojedinih polimorfizama. U ovoj studiji je nađeno da bolesnici s CC genotipom polimorfizma CFHY402H imaju 4,50 puta veće izgleda za prisustvo perifernih druza i 4,49 puta veće izgleda za prisustvo RPP-a, a oni s CT genotipom 3,51 puta veći izgled za prisustvo RPP-a. Sličan rezultat je dobiven u prethodnim trima studijama za periferne druze (196,197,198) i u dvije studije za retikularne pigmentacije (194, 196). S obzirom na to da je broj ispitanika u ovoj studiji relativno malen, napravljena je dodatna statistička analiza u kojoj je u svih ispitanika, bez obzira na prisustvo ili odsustvo bolesti analizirana razina povezanosti perifernih promjena i polimorfizama. Potvrđena je povezanost perifernih druza i RPP-a s oba polimorfizma CFH (rs1061170 i rs1410996). Budući da je CFH regulator sustava komplementa

i da genska ekspresija polimorfizma za CFH dovodi u konačnici do smanjene kontrole alternativnog sustava komplementa, ove periferne promjene mogle bi biti znakom difuzne imunološke disregulacije mrežnice u takvih ispitanika. Ovim rezultatom se potvrđuje i da su periferne druze i RPP dio fenotipa SMD-a i s obzirom na razinu povezanosti s CFH polimorfizmom, mogle bi se smatrati biljegom tog visokorizičnog polimorfizma. No prisustvo jednog polimorfizma ne znači nužno i bolest, kao što je to slučaj u 73,8% ispitanika u kontrolnoj skupini koji imaju CC ili CT genotip za CFHY402H. U ovoj studiji je dokazano i da ispitanici kontrolne skupine imaju statistički značajno veću učestalost protektivnih polimorfizama gena za CFB i C2. Stoga je vjerojatnije da je prisustvo ili odsustvo SMD-a uvjetovano interakcijom više genskih lokusa i okolišnih čimbenika koji tijekom biološkog procesa starenja mogu dovesti do kliničke slike SMD-a. Daljnje studije na većem broju bolesnika su nužne da bi se odredila razina genotipsko-fenotipske povezanosti i time redefinirala klasifikacija SMD-a, što bi omogućilo ranije otkrivanje, praćenje i pravovremeno liječenje bolesti.

Prilikom analize povezanosti polimorfizama ARMS2 i HtrA1 s prisustvom perifernih druzi i RPP-a, nije dokazana statistički značajna povezanost. Kad se ispitala ista povezanost na svim ispitanicima i dobio veći uzorak, bez obzira na prisustvo ili odsustvo bolesti, dokazana je povezanost s ARMS2 i HtrA1 polimorfizmima: za periferne druze i TT genotip ARMS2 OR=2,84, a za AA genotip HtrA1 OR=2,50. Slično je dokazano i za RPP: izgledi za prisustvo RPP-a uz ARMS2 OR=2,71, a uz HtrA1 OR=2,47.

Do sada u literaturi nema objavljenih podataka o povezanosti tog polimorfizma s perifernim promjenama. Shuler i suradnici u jednom od svojih radova postavljaju hipotezu da su ARMS2 varijante povezane s uznapredovalom SMD i pojavom bolesti u ograničenom, lokaliziranom obliku (238). No s obzirom na činjenicu da ARMS2 gen kodira mitohondrijske proteine i da nosioci tog polimorfizma, udruženo s pušenjem kao čimbenikom rizika, imaju povećan rizik od SMD-a, govori u prilog drugoj mogućoj hipotezi da je oksidativni stres jedan od temeljnih patogenetskih mehanizama SMD-a, podjednako zastupljen u centralnoj i perifernoj mrežnici (46, 88, 90, 92, 96).

Iako je pojavnost kaldrmastih degeneracija bila veća u SMD skupini, za te periferne promjene nije dokazana statistički značajna povezanost niti s jednim od SMD polimorfizama. S obzirom na mali broj ispitanika s tom vrstom perifernih promjena, učinjena je dodatna statistička analiza u koju su uključeni svi ispitanici s kaldrmastim degeneracijama i polimorfizmima iz obje skupine. Dobiveno je da ispitanici s TT genotipom ARMS2 polimorfizma imaju 2,45 puta, a oni s AA genotipom HtrA1 polimorfizma imaju 2,48 puta veći omjer izgleda za prisustvo kaldrmastih degeneracija. Za daljnje razumijevanje ovog rezultata, bit će nužne studije s većim brojem ispitanika kako bi se odredilo fenotipsko mjesto ovih perifernih promjena u genetskom spektru SMD-a.

Što se tiče protektivnih polimorfizama, u ovoj studiji je zabilježena smanjena vjerojatnost pojave perifernih druza u onih ispitanika koji imaju prisutni 1 C alel na polimorfizmu C2 (rs9332739) u SMD skupini, što ukazuje da prisustvo C2 polimorfizama smanjuje izgleda za prisustvo fenotipskih promjena na periferiji mrežnice. S obzirom na činjenicu da je broj takvih ispitanika u SMD skupini bio relativno mali, potrebna su daljnja istraživanja da bi se potvrdio ovaj rezultat.

Unatoč činjenici da su ciljevi ove studije prvenstveno analizirali povezanost perifernih promjena i polimorfizama u ispitanika s makulopatijom, poželjno bi bilo napraviti dodatnu statističku analizu povezanosti perifernih i genotipskih promjena u ispitanika kontrolne skupine, a bez znakova makulopatije i time odrediti fenotipski značaj tih perifernih promjena u zdravih ispitanika s perifernim fenotipom. U slučaju prisustva perifernog fenotipa, moglo bi se posumnjati na visokorizični genotip, a time i na veći rizik obolijevanja od SMD-a. To bi svakako omogućilo ranije otkrivanje i bolje praćenje bolesti.

U ovoj studiji korištena je širokokutna fundus kamera kojom se, u odnosu na standardnu fundus kameru, snima 82,5% mrežnice u jednoj snimci. Prednost ove studije u odnosu na prethodno objavljene je mogućnost preciznije analize periferije mrežnice ispitanika.

S obzirom na način analize periferije mrežnice, dokazivanjem povezanosti perifernih druza, RPP-a i potencijalno kalcemastih degeneracija s CFH i ARMS2 polimorfizmima u ovoj studiji, može se zaključiti da su navedene periferne promjene dio fenotipa SMD-a. U slučaju njihovog prisustva na periferiji mrežnice, dobiva se informacija o mogućem rizičnom genotipu, razvoju i ishodima osnovne bolesti. S obzirom na to da sadašnje klasifikacije ne uzimaju u obzir periferne promjene kao dio fenotipa SMD-a, bit će ubuduće nužne korekcije takvih klasifikacija s ciljem pravodobnog otkrivanja i praćenja oboljelih od SMD-a.

6. ZAKLJUČAK

U prethodnim poglavljima smo ukazali na važnost i složenost etiologije SMD-a kao multifaktorijalne bolesti.

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju povezanost perifernih morfoloških promjena mrežnice i genotipskih promjena u SMD-u.

Potvrđivanjem hipoteze i dobivanjem rezultata statističke analize, definirano je nekoliko važnih činjenica:

1. Dokazivanjem povezanosti perifernih druza, RPP-a i kaldrmastih degeneracija i CFH, ARMS2 i HtrA1 polimorfizama u SMD skupini zaključuje se da su ove periferne promjene vrlo vjerojatno dio fenotipskih obilježja SMD-a.
2. Veće prisustvo perifernih druza, RPP-a i kaldrmastih degeneracija u SMD skupini u odnosu na kontrolnu skupinu.
3. U skupini bolesnika sa SMD-om, dokazana je statistički značajno veća učestalost genotipova: polimorfizma ARMS2 gena (rs10490924), polimorfizma gena HtrA1 (rs11200638) i polimorfizma gena za CFH (rs1410996 i rs1061170).
4. U kontrolnoj skupini bili su statistički značajno češći genotipovi polimorfizama gena za CFB (rs641153 i rs4151667) i polimorfizmi gena za C2 (rs9332739 i rs547154).
5. Veći omjeri izgleda za prisustvo perifernih druza i RPP-a u ispitanika s CFHY402H (rs1061170) u SMD skupini, čime ove morfološke promjene mrežnice mogu biti biljezi navedenih polimorfizama.
6. S obzirom na smanjenu izglednost pojave perifernih druza u onih ispitanika koji imaju prisutan 1 C alel na polimorfizmu C2 (rs9332739) u SMD skupini, može se reći da se u slučaju prisustva protektivnih genotipova smanjuju izgledi za prisustvo fenotipskih promjena na periferiji mrežnice.

7. Ispitanici koji imaju periferne druze imaju gotovo tri puta, RPP dva puta, a kaldrmaste degeneracije 4,5 puta veće izgleda za prisustvo SMD-a u odnosu na kontrolnu skupinu.
8. Analizom povezanosti perifernih druzi i RPP-a i genotipskih promjena u SMD skupini, dokazana je povezanost perifernih druzi i RPP-a s CFHY402H.
9. Prilikom analize svih ispitanika i njihovih genotipa, sa ili bez SMD-a, dokazana je statistički značajna povezanost:
 - a) perifernih druzi s polimorfizmima CFHY402H, ARMS2 i HtrA1,
 - b) RPP-a i polimorfizma CFH rs1410996, ARMS2 i HtrA1,
 - c) kaldrmastih degeneracija i ARMS2 i HtrA1 polimorfizma.
10. Za hiperpigmentacije, hipopigmentacije i druge periferne promjene (mrežolike, poput puževa traga, bljedilo bez pritiska, rupture, retinoshize, sinhize i vitrealne opacitete) nije dokazana povezanost s ispitivanim polimorfizmima.

7. SAŽETAK

Senilna makularna degeneracija (SMD) je multifaktorijalna neurodegenerativna bolest mrežnice i vodeći uzrok gubitak vida u razvijenim zemljama. Bolest je u početku karakterizirana pojavom tzv. druza- žučkastih depozita na razini retinalnog pigmentnog epitela (RPE), fokalnih hiper- ili hipopigmentacija, dok su kasniji poznati klinički oblici bolesti geografska atrofija (suhi oblik) na razini fotoreceptora i RPE i eksudativni (vlažni) oblik na razini koriokapilarisa. Njihovo pravodobno otkrivanje je od velikog značaja jer dovode do dramatičnog pada vidne oštine unutar godinu dana. Do unazad desetak godina procjena rizika se zasnivala na kliničkom izgledu promjena makularnog područja, najlakše dostupnog pregledu. Novija istraživanja ukazuju da se ključne morfološke promjene SMD-a mogu nalaziti i na periferiji mrežnice te da se značajnije pojavljuju u uznapredovaloj SMD. Nadalje utvrđena je snažna povezanost genskih polimorfizama gena za CFH, ARMS2, HtrA1, C2, CFB i C3 i pojave SMD-a.

Studije koje su do sada ispitivale povezanost perifernih i genotipskih promjena su snimale i analizirale periferiju mrežnice standardnim fundus kamerama koje mogu snimiti 30-50 stupnjeva mrežnice u jednoj snimci.

Stoga je cilj ove studije određivanje povezanosti perifernih morfoloških promjena i nukleotidnih polimorfizama gena za CFH, ARMS2, HTRA1, C2, CFB i C3 u SMD-u i njenu implikaciju na težinu i tijek bolesti.

U istraživanje su bili uključeni ispitanici u dobi iznad 50 godina, susljedno redom dolaska na Kliniku, te ovisno o kliničkoj slici, bili su, prema redu dolaska, svrstani u skupinu ispitanika sa SMD-om ili u kontrolnu skupinu sa zdravim ispitanicima.

U SMD skupinu uključeno je 160, a u kontrolnu skupinu 150 ispitanika. Nije bilo značajne statističke značajne razlike u dobi, spolu i navikama između obiju skupina ispitanika, čime se ostvario uvjet za valjanu statističku analizu.

Svim ispitanicama je nakon zadovoljenih kriterija uključivanja učinjen klinički pregled, snimanje i analiza snimaka makularnog područja i periferije mrežnice širokokutnom kamerom koja snima 200 stupnjeva mrežnice u jednoj snimci, snimanje makularnog područja OCT-om i genotipizacija DNK iz uzorka periferne krvi.

Između SMD i kontrolne skupine, nije bilo statistički značajne razlike u dobi, spolu i navikama. Rezultati istraživanja su dokazali statistički značajno češće prisustvo perifernih druza, retikularnih pigmentacija i kaldrmastih degeneracija u SMD skupini.

Dokazana je povezanost genotipova s centralnim promjenama u SMD skupini, odnosno da određeni genotip značajno povećava omjer izgleda za prisustvo SMD-a: homozigoti rs10490924 za 17,83 puta, rs1061170 za 2,01 puta, rs11200638 za 16,02 puta i rs1410996 za 8,33 puta; te rs10490924 heterozigot za 2,19 puta.

U kontrolnoj skupini u odnosu na normalni genotip, sljedeći genotip značajno smanjuje vjerojatnost prisustva SMD-a: rs4151667 heterozigot za 2,70 puta, rs641153 heterozigot za 5,26 puta, rs9332739 heterozigot za 2,70 puta te rs547154 heterozigot za 7,69 puta.

Multivarijantnom analizom razine povezanosti tih istih perifernih promjena s centralnom makulopatijom, vidljivo je da ispitanici koji imaju periferne druze imaju gotovo tri puta, RPP dva puta, a kaldrmaste degeneracije 4,5 puta veće izgleda za prisustvo SMD-a u odnosu na kontrolnu skupinu.

Dokazana je povezanost perifernih druzi i RPP-a s polimorfizmom CFHY402H u ispitanika sa SMD-om: za periferne druze, OR=4,5 za CC genotip, za RPP OR=4,49 za CC i OR=3,51 za CT genotip.

Prilikom analize povezanosti perifernih promjena i nukleotidnih polimorfizama na ukupnom broju ispitanika sa ili bez znakova makulopatije, dokazani su veći izgledi prisustva perifernih druzi i RPP-a u ispitanika s polimorfizmima CFH, ARMS2 i HtrA1 dok je za kaldrmaste degeneracije dokazan veći izgled za prisustvo u ispitanika s polimorfizmima ARMS2 i HtrA1. Nije nađena povezanost hiperpigmentacija, hipopigmentacija i ostalih perifernih degeneracija (mrežolikih degeneracija, bljedila bez pritiska, ruptura, retinoshiza, vitrealnih opaciteta) s nukleotidnim polimorfizmima.

Ovim istraživanjem je dokazano važno mjesto perifernih druzi, RPP-a i potencijalno kaldrmastih degeneracija u fenotipu SMD-a, a time i klasifikaciji, pravodobnom otkrivanju i praćenju bolesnika sa SMD-om.

Ključne riječi: Senilna makularna degeneracija, periferne morfološke promjene mrežnice, pojedinačni nukleotidni polimorfizmi u senilnoj makularnoj degeneraciji

8. SUMMARY

The association of the peripheral morphological retinal changes and genotypic changes in the patients with age-related macular degeneration

Tamara Knežević, 2016.

Age-related macular degeneration (ARMD) is a multifactorial neurodegenerative disease of macular region of the retina and is a leading cause of visual loss of elderly people in developed countries. Early signs of the disease are characterized by the presence of the visible soft drusen, areas of hyperpigmentation or depigmented areas, whereas later stages manifest as either choroidal neovascularization (CNV) or atrophy of photoreceptors and retinal pigment epithelium. In the last decade the risk assessment was based on the clinical examination of the macular region, clinically the easiest one to approach to. Recent clinical data showed that the pathologic changes could be found at the retinal periphery. Likewise, clinical studies confirmed a strong association of the CFH, ARMS2, HtrA1, C2,CFB and C3 susceptibility genes with ARMD.

The reports that linked the peripheral retinal changes and nucleotide polymorphisms of the susceptibility genes have analysed peripheral retina with standard fundus camera which can analyze only 30-50 degrees at once.

The aim of this study is to determine the association of the peripheral retinal changes and genotypic changes in ARMD and their implications on the course and prognosis of the disease.

The inclusion criteria were the age (older than 50) and the presence or absence of the clinical signs of the disease. Depending on those criteria, they were referred either to ARMD or control group.

We included 160 participants in ARMD group and 150 participants in the control group.

All the participants have undergone the clinical examination, the wide angle fundus photographing, OCT of the macular region and DNA genotyping from extracted peripheral blood.

The results showed that there was no statistical significant difference in demographic characteristics (age, sex or habits) between those two groups.

The peripheral drusen, peripheral reticular pigment and paving stone degenerations are more prevalent in ARMD group.

Likewise, we found statistically significant difference in odd ratio for the association of the nucleotide polymorphisms and ARMD disease: In ARMD group, homozygotes rs10490924 have 17,83 times, rs1061170 2,01 times, rs11200638 16,02 times, rs1410996 8,33 times and heterozygotes rs10490924 2,19 times higher risk for ARMD than in control group.

In the control group, we found statistically significant difference in odd ratio for the association of the nucleotide polymorphisms and control group: In the control group, heterozygotes rs4151667 2,70 times, rs641153 5,26 times, rs9332739 2,70 times and rs547154 7,69 times less risk for ARMD than in a disease group.

Multivariate analysis of the magnitude of the association of peripheral retinal changes and maculopathy showed that patients with peripheral drusen have almost three times, those with RPP two times and with paving stone degenerations 4,5 times more risk for ARMD macular changes compared to the control group.

In ARMD group, there was a strong association of the peripheral drusen and reticular pigment with polymorphism CFHY402H: for peripheral drusen OR=4,5 for CC genotype and for RPP OR=4,49 for CC and OR=3,51 for CT genotype.

When we analyze peripheral retinal changes and genotypic changes in all participants together with or without signs of maculopathy, we found that peripheral drusen and RPP are statistically significant more present in the participants with polymorphisms of CFH, ARMS2 and HTRA1 genes. We also found that paving stone degenerations are statistically significant more present in the participants with polymorphisms ARMS2 and HtrA1 genes.

There was no statistically significant association between hyperpigmentations, hypopigmentations, white without pressure, lattice degenerations, holes, retinoschisis and vitreal opacities with nucleotide polymorphisms in both groups.

These results have shown the significance of the peripheral drusen and RPP and potentially paving stone degenerations in the phenotypic features of ARMD and therefore, defining their potential role in the classification of the disease, early detection and follow-up of the patients with ARMD.

Key words: *Age-related macular degeneration, peripheral retinal morphologic changes, single nucleotide polymorphisms*

9. LITERATURA

1. Klein R, Peto T, Bird A, Vannewkirk MR. The epidemiology of Age-Related Macular Degeneration. *Am J of Ophthalmol.* 2003;137:486-95.
2. Nowak JZ. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacol Rep.* 2006;58:353-63.
3. Sensory Reception: Human Vision: structure and function of the Human Eye. Vol. 27 *Encyclopaedia Britannica*;1987. Str. 174.
4. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 2005;85:845-81.
5. Hageman GS, Marmor MF, Yao XY, Johnson LV. The interphotoreceptor matrix mediates primal retinal adhesion. *Arch Ophthalmol.* 1995;113(5):655-60.
6. Hollyfield JG. Phagocytic capacities of the pigment epithelium. *Exp Eye Res.* 1976;22:457-68.
7. Young RW. The renewal of rod and cone outer segments in the rhesus monkey. *J Cell Biology.* 1971;49:303-18.
8. Katz ML. Incomplete proteolysis may contribute to lipofuscin accumulation in the retinal pigment epithelium. *Adv Exp Med Biol.* 1989;266:109-16.
9. Turksen K, Aubin JE, Sodek J, Kanins VI. Localization of laminin, type IV collagen, fibronectin and heparan sulfate proteoglycan in chick retinal pigment epithelium basement membrane during embryonic development. *J Histochem Cytochem.* 1985;3:665-71.
10. Zarbin M. Analysis of retinal pigment epithelium integrin expression and adhesion to aged submacular Bruch's membrane. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2003;101:499-520.
11. Booij JC, Beisekeeva J, Gorgles TGMF, Bergen AB. The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog Ret Eye Res.* 2010;29:1-18.
12. Okajima TI, Wigert B, Chader GJ, Pepperberg DR. Retinoid processing in retinal pigment epithelium of toad (*Bufo marinus*) *J Biol Chem.* 1994;269:21983-89.
13. Wu Q, Blakeley LR, Cornwall MC, Crouch RK, Wiggert BN, Koutalos Y. Interphotoreceptor retinoid-binding protein is the physiologically relevant carrier that removes retinol from rod photoreceptor outer segments. *Biochem.* 2007;46:8669-79.
14. Hudspeth JA, Yee AG. The intercellular junctional complexes of retinal pigment epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1973;12:354-65.
15. Rizzolo LJ, Peng S, Luo Y, Xiao W. Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res.* 2011;30(5):296-325.
16. Erlich R, Harris A, Khejadiya NS, Winston DM, Ciruella TA, Wirotsko B. Age-related macular degeneration and the aging eye. *Clin Interv Aging.* 2008;3(3):473-82.

17. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D i sur. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ.* 2004 Nov;82(11):844-51.
18. Congdon N, O'Colmain B, Klaver CC, i sur. Eye Diseases Prevalence Research Group. Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol.* 2004;122(4):477-85.
19. Augood CA, Vingerltnng JR, De Jong PTVM, i sur. Prevalence of Age-Related Maculopathy in Older Europeans. *Arch Ophthalmol.* 2006;124:529-35.
20. Klein R, Klein BE, Jensen SC; Mares-Perlman JA, Cruickshanks KJ, Palta M. Age-related maculopathy in a multiracial United States population:the national Health and Nutrition Examination Survey III. *Ophthalmol.* 1999;106(6):1056-65.
21. Wong WL, Su X, Li X, i sur. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040; a systematic review and meta-analysis. *Lancet Global Health.* 2014 Feb;2(2):e106-16.
22. Warburton S, Southwick K, Hardman RM, i sur. Examining the proteins of functional retinal lipofuscin using proteomic analysis as a guide for understanding its origin. *Mol Vision.* 2005;11:1122-34.
23. Burns RP, Feeney-Burns L. Clinico-morphologic correlations of drusen of Bruch's membrane. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1980;78:206-25.
24. Sparrow JR, Dowling JE, Bok D. Understanding RPE lipofuscin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:8325-6.
25. Algvare PV, Seregard S. Drusen maculopathy: a risk factor for AMD. Can we prevent visual loss? *Acta Ophthalmol Scand.* 2003;81:427-9.
26. Bressler NM, Silva JC, Bressler SB, Fine SL, Green WR. Clinicopathological correlation of drusen and reticular pigment epithelial abnormalities in age-related macular degeneration. *Retina.* 1994;14:130-42.
27. Klein R, Klein BE, Tomany SC, Meuer SM, Huang GH. Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: The Beaver Dam Eye study. *Ophthalmol.* 2002;109:1767-79.
28. Wang JJ, Foran S, Smith W, Mitchell P. Risk of age-related macular degeneration in eyes with macular drusen or hyperpigmentation: The Blue Mountain eye study cohort. *Arch Ophthalmol.* 2003;121:658-63.
29. Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV. A role of local inflammation in the formation of the drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol.* 2002;134:411-31.
30. Nowak JZ. Drusen, basal deposits, inflammation and age-related macular degeneration (AMD). *Mag Okul.* 2005;2:174-86.

31. Nowak JZ. Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids-derived oxidation products and bioretinoids as potential inducers of CNS diseases: focus on age-related macular degeneration. *Pharmacol Rep.* 2013;65:288-304.
32. Cai X, McGinnis JF. Oxidative stress: the Achilles' heel of neurodegenerative diseases of the retina. *Front Biosci.* 2012;17:1976-95.
33. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956;11(3):298–300.
34. Augustin AJ, Kirchoff J. Inflammation and the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Expert Opin Ther Targets.* 2009;13(6):641-51.
35. Yu DY, Cringle SJ. Retinal degeneration and local oxygen metabolism. *Exp Eye Res.* 2005;80(6):745–51.
36. Jarrett SG, Boulton ME. Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Mol Aspects Med.* 2012;33(4):399-417.
37. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991;11(1):81-128.
38. Fujihara M, Nagai N, Sussan TE, Biswal S, Handa JT. Chronic cigarette smoke causes oxidative damage and apoptosis to retinal pigmented epithelial cells in mice. *PLoS One* 2008; 3(9):e3119.
39. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008;454(7203):428-35.
40. Xu H, Chen M, Forrester JV. Para-inflammation in the aging retina. *Prog Retin Eye Res.* 2009;28(5):348-68.
41. Bringmann A, Wiedermann P. Müller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica.* 2012;227(1):1-19.
42. Ramirez JM, Ramirez AL, Salazar JJ, de Hoz R, Trivino A. Changes of astrocytes in retinal aging and age related macular degeneration. *Exp Eye Res.* 2001;73(5):601-15.
43. Crabb JW, Miyagi M, Gu X, et al. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:14682-7.
44. Gu X, Meer SG, Miyagi M, Rayborn ME, Hollyfield JG, Crabb JW, Salomon RG. Carboxyethylpyrrole protein products and autoantibodies, biomarkers for age-related macular degeneration. *J Biol Chem.* 2003;278(43):42027-35.
45. Kinnunen K, Petrovski G, Moe MC, Berta A, Kaarniranta K. Molecular mechanisms of retinal pigment epithelium damage and development of age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.* 2012;90:299-309.
46. Ardeljan D, Chan CC. Aging is not a disease: distinguishing age-related macular degeneration from aging. *Prog Retin Eye Res.* 2013;37:1-49.

47. Salter JM, Cassone VM, Wilkerson MK, Delp MD. Ocular and regional cerebral blood flow in aging Fischer-344 rats. *J Appl Physiol.* 1985;85(3):1024-9.
48. Hageman GS, Mullins RF, Russell SR, Johnson LV, Anderson DH. Vitronectin is a constituent of ocular drusen and the vitronectin gene is expressed in human retinal pigmented epithelial cells. *Faseb J.* 1999;13(3):477-84.
49. Johnson LV, Ozaki S, Staples MK, Ericksson PA, Anderson DH. A potential role for immune complex pathogenesis in drusen formation. *Exp Eye Res.* 2000;70:441-9.
50. Anderson DH, Ozaki S, Nealon M i sur. Local cellular sources of apolipoprotein E in the human retina and retinal pigmented epithelium:implications for the process of drusen formation. *Am J Ophthalmol.* 2001;131:767-81.
51. Mullins RF, Russell SR, Anderson DH, Hageman GS. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis and dense deposit disease. *Faseb J.* 2000;14:835-46.
52. Mullins RF, Aptsiauri N, Hageman GS. Structure and composition of drusen associated with glomerulonephritis:implications for the role of complement activation in drusen biogenesis. *Eye.* 2001;15:390-5.
53. Issa PC, Chong NV, Scholl HPN. The significance of the complement system for the pathogenesis of age-related macular degeneration-current evidence and translation into clinical application. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011;249:163-74.
54. Campochiaro PA, Soloway P, Ryan SJ, Miller JW. The pathogenesis of choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 1999;7481:135-43.
55. Burns MS, Tyler NK. Selective neovascularization of the retinal pigment epithelium in rat photoreceptor degeneration in vivo. *Curr Eye Res.* 1990;9:1061-75.
56. Curcio CA, Messinger JD, Sloan KR, i sur. Subretinal drusenoid deposits in non-neovascular age-related macular degeneration: morphology, prevalence, topography, and biogenesis model. *Retina.* 2013;33:265-76.
57. Das A, McGuire PG. Retinal and choroidal angiogenesis:pathophysiology and strategies for inhibition. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22(6):721-48.
58. Zarbin MA. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol.* 2004;122:598-614.
59. Janeway CA, Travers P, Walport M, Schlomchik M. *Immunobiology:the immune system in health and disease.* 5.izd. New York:Garland Publishing;2001. Str. 43-64.
60. Mesarić B, Vitale B. *Imunološke bolesti oka.* 16.izd. Zagreb:Školska knjiga;1991. Str. 41-44.

61. Markiewski MM, Lambris JD. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol.* 2007;171:715-27.
62. Bradley DT, Zipfel PF, Hughes AE. Complement in age-related macular degeneration: a focus on function. *Eye.* 2011;25:683-93.
63. Benzaquen LR, Nicholson-Weller A, Halperin JA. Terminal complement proteins C5b-9 release basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor from endothelial cells. *J Exp Med.* 1994;79:985-92.
64. Takabayashi T, Vannier E, Clark BD, et al. A new biologic role for C3a and C3a desArg: regulation of TNF- α and IL-8 synthesis. *J Immunol.* 1996;156:3455-60.
65. Albrecht EA, Chinnaiyan AM, Varambally S, et al. C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol.* 2004;164:849-59.
66. Anderson DH, Radeke MJ, Gallo NB, et al. The pivotal role of the complement system in aging in age-related macular degeneration: Hypothesis re-visited. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29:95-112.
67. Cordoba SR, Gordillo JE, Jorge EG, Lopez-Trascasa M, Sanchez-Corral P. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol.* 2004;41:355-67.
68. Jessy JA, Quigg RJ. The simple design of complement factor H: Looks can be deceiving. *Mol Immunol.* 2007;44:123-32.
69. Johnson LV, Leitner WP, Staples MK, Anderson MH. Complement activation and inflammatory process in drusen formation and age related macular degeneration. *Exp Eye Res.* 2001;73:887-96.
70. Clark SJ, Bishop PN, Day AJ. Complement factor H and age related macular degeneration: the role of glycosaminoglycan recognition in disease pathology. *Biochem Soc Trans.* 2010;38:1342-8.
71. Laine M, Jarva H, Seitsonen S, et al. Y402 polymorphism of complement factor H affects binding affinity to C-reactive protein. *J Immunol.* 2007;383:1-5.
72. Clark SJ, Ridge LA, Herbert AP, et al. Tissue-specific host recognition by complement factor H is mediated by differential activities of its glycosaminoglycan-binding regions. *J Immunol.* 2012;204:9-57.
73. Nan R, Gor J, Lengyel I, Perkins SJ. Uncontrolled zinc and copper-induced oligomerisation of the human complement regulator factor H and its possible implications for functions and disease. *J Mol Biol.* 2008;384(5):1341-52.

74. Okemefuna AI, Nan R, Miller A, Gor J, Perkins SJ. Complement factor H binds at two independent sites to C-reactive protein in acute phase concentrations. *J Biol Chem.* 2010;285(2):1053-65.
75. Jarva H, Jokiranta TS, Hellwage J, Zipfel P, Meri S. Regulation of complement activation by C-reactive protein: Targeting the complement inhibitory activity of factor H by an interaction with short consensus repeat domains 7 and 8-11. *J Immunol.* 1999;163:3957-62.
76. Hourcade D, Holers MV, Atkinson JP. The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. *Adv Immunol.* 1989;45:381-416.
77. Hageman GS, Luthert PJ, Chong NHV, Johnson LV, Anderson DH, Mullins RF. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2001;20:705-32.
78. Yuan X, GU X, Crabb JS, i sur. Quantative proteomics: comparison of the macular Bruch membrane/choroid complex from age-related macular degeneration and normal eyes. *Mol Cell Proteomics.* 2010;9:1031-46.
79. Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, i sur. Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;14:103(7):2328-33.
80. Heiba IM, Elston RC, Klein BE, Klein R. Sibling correlations and segregation analysis of age-related maculopathy:the Beaver Dam eye Study. *Genet Epidemiol.* 1994;11:51-67.
81. Klaver CC, Wolfs RC, Assink JJ, Van Duijn CN, Hofman A, de Jong PT. Genetic risk of age-related maculopathy. Population based familial aggregation study. *Arch Ophthalmol.* 1997;116:1646-51.
82. Seddon JM, Cote J, Page WF, Aggen SH, Neale MC. The US twin study of age-related macular degeneration:relative roles of genetic and environmental influences. *Arch Ophthalmol.* 2005;123:321-7.
83. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, i sur. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science.* 2005;308:385-9.
84. Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science.* 2005;308(5720):421-4.
85. Haines JL, Hauser MA, Schimdt S, i sur. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science.* 2005;308:419-21.
86. Thakkistan A, Han P, McEvoy M, i sur. Systematic review and meta-analysis of association between complement factor HY402 polymorphism and age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* 2006;15:2784-90.

87. Leveziel N, Puche N, Richard F, i sur. Genotypic Influences on Severity of Exudative Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:2620-5.
88. Seddon JM, Francis PJ, George S, Schultz DW, Rosner B, Klein ML. Association of CFH Y402H and LOC387715 A69S with progression of age-related macular degeneration. *JAMA.* 2007;297:1793-800.
89. Sepp T, Khan JC, Thurlby DA, i sur. The genetic factors in AMD Study Group. Complement factor H variant Y402H is a major risk determinant for geographic atrophy and choroidal neovascularization in smokers and nonsmokers. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:536-40.
90. Shuler RJ Jr, Hauser MA, Caldwell J, i sur. Neovascular age-related macular degeneration and its association with LOC387715 and complement factor H polymorphism. *Arch Ophthalmol.* 2007;125(1):63-7.
91. Maller J, George S, Purcell S, i sur. Common variant in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences a risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006;38(9):1055-9.
92. Rivera A, Fisher SA, Fritsche LG, i sur. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum Mol Genet.* 2005;14:3227-36.
93. Jakobsdottir J, Conley YP, Weeks DE, Mahet TS, Ferrell RE, Gorin MB. Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26. *Am J Hum Gen.* 2005;77:389-407.
94. Tong Y, Liao J, Zhang Y, Zhou J, Mao M. LOC38775/ HTRA1 gene polymorphisms and susceptibility to age-related macular degeneration: a HuGE review and meta-analysis. *Mol Vis.* 2012;16:1958-81.
95. Francis PJ, George S, Schultz DW, i sur. The LOC387715 gene, smoking, body mass index, environmental associations with advanced age-related macular degeneration. *Hum Hered.* 2007;63:212-8.
96. Kanda A, Chen W, Othman M, i sur. A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(41):16227-32.
97. Yang Z, Camp NJ, Sun H, i sur. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science.* 2006;314:992-3.
98. Dewan A, Liu M, Hartman S, i sur. HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science.* 2006;314:989-92.
99. Gold B, Merriam JE, Zernant J, i sur. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006;38(4):458-62.

100. Spencer KL, Hauser AM, Olson LM, i sur. Protective effect of complement factor B and complement component 2 variants in age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* 2007;16:1986-92.
101. Maller JB, Fagerness JA, Reynolds RC, Neale BM, Daly MJ, Seddon JM. Variation in complement factor 3 is associated with risk of age-related macular degeneration. *Nature Genet.* 2007;39:1200-1.
102. Yates JRW, Sepp T, Baljinder KM, i sur. for the Genetic factors in AMD study group. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2007;357-66.
103. Spencer KL, Olson LM, Anderson BM, i sur. C3 R102G polymorphism increases risk of age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* 2008;17(12):1821-4.
104. Scholl HPN, Issa CP, Walier M, i sur. Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *Plos One.* 2008;3:2593.
105. Hecker LA, Edwards AO, Ryu E, i sur. Genetic control of the alternative pathway of complement in humans and age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* 2010;19:209-15.
106. Reynolds R, Hartnett ME, Atkinson JP, Giclas PC, Rosner B, Seddon JM. Plasma component complements and activation fragments: associations with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(12):5818-27.
107. Nitsch D, Douglas I, Smeeth L, Fletcher A. Age-related macular degeneration and complement activation-related diseases: a population-based-case control study. *Ophthalmol.* 2008;115:1904-10.
108. Mcavoy CE, Silvestri G. Retinal changes associated with type 2 glomerulonephritis. *Eye.* 2005;19:985-9.
109. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, i sur. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration:The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol.* 1995;39:367-74.
110. Age-Related Eye Disease Study Research Group. The Age-Related Eye Disease Study system for classifying age-related macular degeneration from stereoscopic fundus photographs:the Age-Related Eye Disease Study Report Number 6. *Am J Ophthalmol.* 2001;132(5):668-81.
111. Sunness JS, Rubin GS, Applegate CA, i sur. Visual function abnormalities and prognosis in eyes with age-related geographic atrophy of the macula and good visual acuity. *Ophthalmol.* 1997;104:1677-91.
112. Fine AM, Elman MJ, Eber JE, Prestia PA, Starr JS, Fine SL. Earliest symptoms caused by neovascular membranes in the macula. *Arch Ophthalmol.* 1986;104:513-4.

113. Slakter JS, Stur M. Quality of life in patients with age-related macular degeneration: impact of the condition and benefits of treatment. *Surv Ophthalmol.* 2005;50:263-73.
114. Casten RJ, Rovner BW, Tasman W. Age-related macular degeneration and depression: a review of recent research. *Curr Opin Ophthalmol.* 2004;15:181-3.
115. Macular Photocoagulation Study Group. Risk factors for choroidal neovascularization in the second eye of patients with juxtafoveal and subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol.* 1997;115:741-7.
116. Klein R, Klein BE, Linton KL. Prevalence of age-related maculopathy:the Beaver eye Dam Study. *Ophthalmol.* 1992;99:933-43.
117. Mitchell P, Smith W, Attebo K, Wang JJ. Prevalence of age-related maculopathy in Australia: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmol.* 1995;102:1450-60.
118. Van Leeuwen R, Klaver CCW, Vingerling JR, Hofman A, de Jong PTVM. The risk and natural course of age-related maculopathy. Follow-up at 6 ½ years in th Rotterdam Study. *Arch Ophthalmol.* 2003;121:519-26.
119. Age–Related Eye Disease Study Research Group. Risk factors associated with age-related macular degeneration: A case control study in the age-related eye disease study: Age-related eye disease study report. *Ophthalmol.* 2000;107(12):2224-32.
120. Smith W, Mitchell P, Wang JJ. Gender, oestrogen, hormone replacement and age-related macular degeneration: Results from the Blue Mountains eye Study. *Aus and New Zealand J Ophthalmol.* 1997;25(Suppl):S13-5.
121. Bressler SB, Munoz B, Solomon SD, West SK. Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Salisbury Eye evaluation (SEE) Project. *Arch Ophthalmol.* 2008;126:241-5.
122. Klein R, Klein BE, Knutson MD, i sur. Prevalence of age-related macular degeneration in 4 racial/ethnic/ groups in the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis. *Ophthalmol.* 2006;113:373-80.
123. Chang MA, Bressler SB, Munoz B, West SK. Racial differences and other risk factors for incidence and progression of age-related macular degeneration: Salisbury Eye Evaluation (SEE) Project. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;49:2395-402.
124. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults-The Evidence Report. National Institutes of Health. *Obes Res.* 1998;6(Suppl):S51–209.
125. Age–Related Eye Disease Study Research Group. Risk factors for the incidence of advanced are-related macular degeneration in the Age Related Eye Disease Study (AREDS). AREDS Report No 19. *Ophthalmol.*2005;112(4):533-9.
126. Seddon JM, Cote J, Davis W, Rosner B. Progression of age-related macular degeneration. Association with body mass index, waist circumference and waist-hip ratio. *Arch Ophthalmol.* 2003;123:786-92.

127. Smith W, Assink J, Klein R, i sur. Risk factors for age-related macular degeneration. Pooled findings from three continents. *Ophthalmol.* 2001;108:697-704.
128. Hirvela H, Luukinen H, Laaaraa E, i sur. Risk factors of age-related maculopathy in a population of 70 years of age or older. *Ophthalmol.* 1996;103:871-7.
129. O'Rourke MF. Basic concepts of the understanding of large arteries in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1985;Suppl 2:S14-21.
130. Newsome DA, Huh W, Green WR. Bruch membrane age-related changes vary by region. *Curr Eye Res.* 1987;10:1211-21.
131. Stryker WS, Kaplan LA, Stein EA, Stampfer MJ, Sober A, Willet WC. The relation of diet, cigarette smoking and alcohol consumption to plasma beta-carotene and alphotocopherol levels. *Am J Epidemiol.* 1988;127:283-96.
132. Hammond BR, Wooten BR, Snodderly DM. Cigarette smoking and the retinal carotenoids: implications for age-related macular degeneration. *Vision Res.* 1996;36:3003-9.
133. Bettman JW, Fellows V, Chao P. The effect of cigarette smoking on the intraocular circulation. *Arch Ophthalmol.* 1958;59:481-8.
134. Alberg A. The influence of cigarette smoking on circulating antioxidant nutrients. *Toxicology.* 2002;180:121-37.
135. Sastry BV, Hemontolor ME. Influence of nicotine and cotinine on retinal phospholipase A2 and its significance to macular function. *J Ocul Pharmacol Ther.* 1998;14:447-58.
136. Seddon JM, Reynolds R, Yu Y, Daly MJ, Rosner B. Risk models for progression to advanced age-related macular degeneration using demographic, environmental, genetic and ocular factors. *Ophthalmol.* 2011;118:2203-11.
137. Grizzard WS, Beck RW. Twin study of age related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35:1504.
138. Klein ML, Mauldin WM, Stoumbs VD. Heredity and age related macular degeneration: observations in monozygotic twins. *Arch Ophthalmol.* 1994;112:932-7.
139. Seddon JM, Cote J, Page WF, Aggen SH, Neale MC. The US twin study of age-related macular degeneration. Relative roles of genetic and environmental influences. *Arch Ophthalmol.* 2005;123:321-7.
140. Klein ML, Schultz DW, Edwards A, i sur. Age-related macular degeneration: clinical features in a large family and linkage to chromosome 1q. *Arch Ophthalmol.* 1998;116:1082-8.
141. Saenger W. *Principles of Nucleic Acid Structure.* New York:Springer-Verlag;1984. Str. 156.
142. Gregory SG, Barlow KF, McLay KE, Kaul R, Swarbreck D, Dunham A, i sur. The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature.* 2006;441(7091):315–21.
143. International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409 (6822):860-921.

144. Naidoo N, Pawitan Y, Soong R, Cooper DN, Ku CS. Human genetics and genomics a decade after the release of the draft sequence of the human genome. *Hum Genomics*. 2011;5 (6): 577–622.
145. The Encode Project Consortium. Identification and analysis of the functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*. 2007;447:799-816.
146. Turnpenny PD, Ellard S. Emery's elements of medical genetics. 14.izd. Philadelphia:Elsevier, Churchill and Livingstone;2012. Str. 129-150.
147. Collins LJ. The RNA infrastructure: An Introduction to ncRNA networks. Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX):Landes Bioscience;2000-2013.
148. King RA, Rotter JI, Motulsky AG. The genetic basis of common diseases. 2.izd. Oxford:Oxford University Press;2002.
149. Brookes AJ. The essence of SNP. *Gene*. 1999;234:177-186.
150. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of the life. *Nature Genet*. 2001;27:234-6.
151. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Lane CR, i sur. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature Genet*. 1999;22:231-8.
152. Kaessmann H, Heisig D, von Haeseler A, Paabo S. DNA sequence variation in a non-coding region of low recombination on the human X chromosome. *Nature Genet*. 1999;22(1):78-81.
153. Paabo S. The mosaic that is our genome. *Nature*. 2003;421(6921):409-12.
154. Sankar P, Cho MK. Toward a new vocabulary of human genetic variation. *Science*. 2002;298(5597):1337-8.
155. Flicek P, Amodde MR, Barrell D, i sur. Ensembl 2014. *Nucleic Acids Res*.2014;42:D749-55.
156. Amberger J, Bocchini A, Scott AF, Hamosh A. McKusick's On Line Mendelian Inheritance In Man (OMIM). *Nucleic Acid Res*. 2009;37:D793-6.
157. NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res*. 2014;41:D8-20.
158. Gabriel S, Schaffer SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstein B, Higgins J. The structure of the haplotype blocks in the human genome. *Science*. 2002;296:2225-9.
159. Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med*. 2005;56:303-20.
160. Lander ES, Botstein D. Mapping complex genetic traits in humans: new methods using a complete RFLP linkage map. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1986;51: 49–62.
161. Reich DE, Cargill M, Bolk S, i sur. Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature*. 2001;411:199-204.
162. Haastbacka J, de la Chapelle A, Kaitlic I, Sistonen P, Weaver A, Lender E. Linkage disequilibrium mapping in isolated founder populations: dystrophic dysplasia in Finland. *Nature Genet*. 1992;2:204-11.

163. The International HapMap Consortium. The international HapMap project. *Nature*. 2003;426:789-96.
164. Stern C. The Hardy-Weinberg law. *Science*. 1943;2510:137-8.
165. Crow JF. Hard. Weinberg and language impediments. *Genetics*. 1999;3:821-5.
166. Emigh TH. A comparison of tests for Hardy-Weinberg equilibrium. *Biometrics*. 1980;36(4):627-42.
167. Massel J. Rethinking Hardy-Weinberg and genetic drift in undergraduate biology. *Bioessays*. 2012;34(8):701-10.
168. Mandal NA, Ayyagari R. Complement factor H: Spatial and temporal expression and localization in the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:4091-7.
169. Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(20):7227-32.
170. Ross RJ, Verma V, Rosenberg KI, Chan CC, Tuo J. Genetic markers and biomarkers for age related macular degeneration. *Expert Rev Ophthalmol*. 2007;2(3):443-57.
171. Ly DH, Lockhart DJ, Lerner RA, Schultz PG. Mitotic misregulation and human aging. *Science*. 2000;287:2486-92.
172. Montes T, Tortajada A, Morgan P, Rodriguez de Cordoba S, Harris CL. Functional basis of protection against age related macular degeneration conferred by a common polymorphism in complement factor B. *Proceed of the Natl Acad of Sci USA*. 2009;106(11):4366-71.
173. Arvilommi H. Capacity of complement C3 phenotypes to bind on mononuclear cells in man. *Nature*. 1974;251:740-1.
174. Straatsma BR, Foos RY, Spencer LM. The retina: Topography and clinical correlations. In: *Transactions of the New Orleans Academy of Ophthalmology: Symposium on Retina and Retinal Surgery*. St Louis;Mosby. 1969:1–26.
175. Straatsma BR, Landers MB, Kreiger AE. The ora serrata in the adult human eye. *Arch Ophthalmol*. 1968;80-3.
176. Rutnin U, Schepens CL. Fundus appearance in normal eyes. II: The standard peripheral fundus and developmental variations. *Am J Ophthalmol*. 1967;64:840.
177. Kanski JJ, Bowling B, Nischel KK, Peerson A. *Clinical ophthalmology:a systematic approach*. 7.izd. Edinburgh,New York:Elsevier/Saunders;2011. Str. 687-723.
178. O'Malley PF, Allen RA. Peripheral cystoid degeneration of the retina. Incidence and distribution in 1,000 autopsy eyes. *Arch Ophthalmol*. 1967;77:769.
179. Foos RY, Spencer LM, Straatsma BR. Trophic degenerations of the peripheral retina. In: *Transactions of the New Orleans Academy of Ophthalmology: Symposium on Retina and Retinal Surgery*. St Louis;CV Mosby. 1969:90–102.

180. Foos RY, Feman SS. Reticular cystoid degeneration of the peripheral retina. *Am J Ophthalmol.* 1970;69:392-403.
181. O'Malley PF, Allen RA, Straatsma BR, i sur. Paving-stone degeneration of the retina. *Arch Ophthalmol.* 1965;73:169-82.
182. Chapman PD, Church W, Gunn A. Congenital hypertrophy of retinal pigment epithelium: a sign of familial adenomatous poliposis. *BMJ.* 1989;298(6670):353-4.
183. Straatsma BR, Zeegen P, Foos RY,, i sur. Lattice degeneration of the retina. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1974;78 (2):OP87-113.
184. Wilkinson CP. Interventions for asymptomatic retinal breaks and lattice degeneration for preventing retinal detachment. *Cochrane Database Syst Rev [Internet].* 2005.
185. Spencer LM, Straatsma BR, Foos RY. Tractional degenerations of the peripheral retina. In: *Transactions of the New Orleans Academy of Ophthalmology: Symposium on Retina and Retinal Surgery.* St Louis;CV Mosby. 1969:103–27.
186. Shukla M, Ahuja OP. A possible relationship between lattice and snailtrack degenerations of the retina. *Am J Ophthalmol.* 1981;92(4):482-5.
187. Orlin A, Fattoo A, Ehrich J,D'Amico DJ, Chan RP, Kiss S. Ultra-widefield fluorescein angiography of white-without pressure. *Clin Ophthalmol.* 2013;7:959-64.
188. Straatsma BR, Foos RY. Typical and reticular degenerative retinoschisis. *Am J Ophthalmol.* 1973;75:551.
189. Foos RY. Senile retinoschisis: Relationship to cystoid degeneration. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1970;74:33.
190. Foos RY, Allen RA. Retinal tears and lesser lesions of the peripheral retina in autopsy eyes. *Am J Ophthalmol.* 1967;64:643.
191. Foos RY. Retinal holes. *Am J Ophthalmol.* 1978;86:354.
192. Rudolf M, Clark ME, Chimento MF, Li CM, Medeiros NE, Curcio CA. Prevalence and morphology of druse types in the macula and periphery of eyes with age related maculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:1200-9.
193. Lewis, Straatsma BR, Foos RY, Lightfoot DO. Reticular degeneration of the pigment epithelium. *Ophthalmol.* 1985;92:1485-95.
194. Shuler RK, Schmidt S, Gallins P, i sur. Peripheral reticular pigmentary change is associated with complement factor H polymorphisms (Y402H) in age-related macular degeneration. *Ophthalmol.* 2008;115:520-4.
195. Postel EA, Agarwal A, Scmidt S, Fan YT, Scott WK, Gilbert JR, Haines JL, i sur. Comparing age-related macular degeneration phenotype in probands from singleton and multiplex families. *Am J Ophthalmol.* 2005;139:820-5.

196. Seddon JM, Reynolds R, Rosner B. Peripheral retinal drusen and reticular pigment: Association with CFHY402H and CFHrs1410996 genotypes in family and twin studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:586-91.
197. Munch IC, Jakob E, Kessel L, i sur. Small, hard macular drusen and peripheral drusen associations with AMD genotypes in the Inter99 eye study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(5):2317-21.
198. Droz I, Mantel I, Ambresin A, Faouzzi M, Schorderet DF, Munier FL. Genotype-phenotype correlation of age related macular degeneration: influence of complement H factor polymorphism. *Br J Ophthalmol.* 2008;92:513-7.
199. Folkman J. Angiogenesis-dependent diseases. *Semin Oncol.* 2001 Dec;28(6):536-42. Review.
200. Fine AM, Elman MJ, Ebert JE, i sur. Earliest symptoms caused by neovascular membranes in the macula. *Arch Ophthalmol.* 1986;104:513-4.
201. Seddon JM, Ajani UA, Mitchell BD. Familial aggregation of age-related maculopathy. *Am J Ophthalmol.* 1997;123:199-206.
202. Tan JS, Mitchell P, Kifley A, i sur. Smoking and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol.* 2007;125:1089-95.
203. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schwan JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, i sur. Optical coherence tomography. *Science.* 1997;254:1178-81.
204. Hu Z, Wu X, Ouyang Y, Sadda SR. Semiautomated segmentation of the choroid in spectral-domain optical coherence tomography volume scans. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:1722-9.
205. Schaal KB, Pang CE, Pozzoni MC, Englebort M. The premacular bursa's shape revealed in vivo by swept-source optical coherence tomography. *Ophthalmol.* 2014;121(5):1020-8.
206. McDonald HR, Williams GA, Scott IU, i sur. Laser scanning imaging for macular disease: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmol.* 2007;114:1221-8.
207. American Academy of Ophthalmology Preferred Practice Patterns Committee. Preferred Practice Pattern® Guidelines. Comprehensive Adult Medical Eye Evaluation. San Francisco, CA: American Academy of Ophthalmology; 2010. Available at: www.aao.org/ppp.
208. Kwiterovich KA, Maguire MG, Murphy RP, i sur. Frequency of adverse systemic reactions after fluorescein angiography. Results of a prospective study. *Ophthalmol.* 1991;98:1139-42.
209. Diabetic Retinopathy, i sur. Diabetic retinopathy study. Report Number 6. Design, methods, and baseline results. Report Number 7. A modification of the Airlie House classification of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1981;21(1):1-226.
210. Atkinson A, Mazo C. Imaged area of the retina. Data on file, Optos.

211. Staurengi G, Viola F, Mainster MA, i sur. Scanning laser ophthalmoscopy and angiography with a wide-field contact lens system. *Arch Ophthalmol*. 2005;123:244-52.
212. Friberg TR, Gupta A, Yu J, Huang L, Suner I, Puliafito CA, Schwartz SD. Ultrawide angle fluorescein angiographic imaging: a comparison to conventional acquisition systems. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2008;39(4):304-11.
213. American Academy of Ophthalmology. Indocyanine green angiography. *Ophthalmol*. 1998;105:1564-9.
214. AREDS2-HOME Study Research Group, Chew EY, Clemons TE, Bressler SB, i sur. Randomized trial of a home monitoring system for early detection of choroidal neovascularization Home Monitoring of the Eye (HOME) Study. *Ophthalmol*. 2014;121:535-44.
215. Macular Photocoagulation Study Group. Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy: five-year results from randomized clinical trials. *Arch Ophthalmol*. 1991;109:1109-14.
216. TAP Study Group. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age related macular degeneration with verteporfin. Two-year results of 2 randomized clinical trials-TAP report 2. *Arch Ophthalmol*. 2001;119:198-207.
217. Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, i sur. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmol*. 2005;112:1035-47.
218. Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD, i sur. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmol*. 2006;113:363-72.
219. Bashshur ZF, Haddad ZA, Schakal A, i sur. Intravitreal bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: a one-year prospective study. *Am J Ophthalmol*. 2008;145:249-56.
220. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, i sur. MARINA Study Group. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2006;355:1419-31.
221. Martin DF, Maguire MG, Fine SL, i sur. Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT) Research Group. Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results. *Ophthalmol*. 2012;119:1388-98.
222. Heier JS, Brown DM, Chong V, i sur. VIEW 1 and VIEW 2 Study Groups. Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmol*. 2012;119:2537-48.

223. Sacu S, Varga A, Michels S, i sur. Reduced fluence versus standard photodynamic therapy in combination with intravitreal triamcinolone: short-term results of a randomised study. *Br J Ophthalmol*. 2008;92:1347-51.
224. Kaiser PK, Boyer DS, Cruess AF, i sur. DENALI Study Group. Verteporfin plus ranibizumab for choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: twelve-month results of the DENALI study. *Ophthalmol*. 2012;119:1001-10.
225. Larsen M, Schmidt-Erfurth U, Lanzetta P, i sur. MONT BLANC Study Group. Verteporfin plus ranibizumab for choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: twelve-month MONT BLANC study results. *Ophthalmol*. 2012;119:992-1000.
226. Grunwald JE, Daniel E, Huang J, i sur. Risk of geographic atrophy in the Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT). *Ophthalmol*. 2014;121(1):150-61.
227. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development*. 1998;125:1591-8.
228. Dugel P. A phase 2b study of E10030, a platelet derived growth factor (PDGF) inhibitor in combination with a vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitor for neovascular age-related macular degeneration (AMD). Paper presented at: 36th annual meeting of the Macula Society; Dana Point, CA; February 27-March 2, 2013.
229. Lpath, Inc. Overview. Lpath Incorporated website. <http://www.lpath.com/about-lpath/overview>. 2013.
230. Kaiser PK, Boyer DS, Campochiaro PA, i sur. Integrin peptide therapy: the first wet AMD experience. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:ARVO E-Abstract A0141.
231. Dugel PU, Petrarca R, Bennett M, i sur. Macular epiretinal brachytherapy in treated age-related macular degeneration: MERITAGE Study: twelve-month safety and efficacy results. *Ophthalmol*. 2012;119:1425–31.
232. Emerson MV, Lauer AK. Current and emerging therapies for the treatment of age related macular degenerations. *Clinical Ophthalmol*. 2008;2(2):377-88.
233. Ling V, Nystuen A, Elliott SA, i sur. Generation of combination PDGF / VEGF-antagonist ECT devices. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:ARVO E-Abstract A0141.
234. Phase I Dose Escalation Safety Study of Retinostat in Advanced Age-Related Macular Degeneration (AMD) (GEM). www.clinicaltrials.gov. 2014.
235. Chylack LT Jr, Wolfe JK; Singer DM, i sur. The Lens Opacities Classification System III. The Longitudinal Study of Cataract Study Group. *Arch Ophthalmol*. 1993;111:831-6.
236. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA for human nucleated cells. *Nucleic Acid Res*. 1988;16(3):1215.

237. Geodet M, Fara AG, Beritognolo I, Sabatti M. Allel-specific PCR in SNP genotyping. *Methods Mol Biol.* 2009;578:415-24.
238. Shuler RK Jr, Schimdt S, Gallins P, i sur. Phenotype analysis of patients with the risk variant LOC387715 (A69S) in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 2007;145:303-7.
239. Leveziel N, Zerbib J, Richard F, i sur. Genotype-phenotype correlations for exudative age related macular degeneration associated with homozygous HTRA1 and CFH genotypes. *Invest Ophthalmol and Visual Sci.* 2008;49(7):3090-4.
240. Mantel I, Ambresin A, Moetteli L, Droz I, Roduit R, Munier FL Schorderet DF. Complement factor B polymorphism and the phenotype of early age-related macular degeneration. *Ophthalmic Genet.* 2014;35(1):12-7.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 02.04.1975. godine u Malom Lošnju. Nakon završene XV. Matematičke gimnazije, 1993. sam upisala Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu na kojem sam diplomirala 1999. godine. 2000. završavam pripravnički staž u Klinici za dječje bolesti Klaićeva u Zagrebu.

Od 2000-2006. stalno zaposlena kao specijalist za bolničke lijekove u Merck, Sharp & Dohme. 2006. započinjem specijalizaciju iz oftalmologije, a 2010. polažem specijalistički ispit iz oftalmologije. Od tada radim u Poliklinici Ghetaldus.

Trenutno radim u ambulanti za dijagnostiku i liječenje bolesti stražnjeg segmenta oka u Poliklinici Ghetaldus.

Aktivno ili pasivno sudjelujem na stručnim skupovima u zemlji.

Autor sam dva CC rada i 3 rada koji citiraju drugi indeksi.

Član sam Hrvatskog oftalmološkog društva.