

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**YAŞA BAĞLI MAKULA DEJENERASYONUNDA
VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ
(*VEGF*) GEN POLİMORFİZMLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. YUNUS BULĞU

DANIŞMAN
PROF. DR. CEM YILDIRIM

DENİZLİ-2012

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**YAŞA BAĞLI MAKULA DEJENERASYONUNDA
VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ
(*VEGF*) GEN POLİMORFİZMLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. YUNUS BULĞU

DANIŞMAN
PROF. DR. CEM YILDIRIM

DENİZLİ-2012

Prof. Dr. Cem YILDIRIM danışmanlığında Dr. Yunus BULĞU tarafından yapılan “Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonunda Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) Gen Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi” başlıklı tez çalışması 21.05.2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Göz Hastalıkları Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN Prof. Dr. Avni Murat AVUNDUK

ÜYE Prof. Dr. Cem YILDIRIM

ÜYE Prof. Dr. R. Hakan ERBAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

21.05.2012

Prof. Dr. Mustafa KILIÇ
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yetiŐmemde emekleri olan değerli hocalarım Prof. Dr. Cem YILDIRIM, Prof. Dr. Avni Murat AVUNDUK, Prof. Dr. Volkan YAYLALI, Yardımcı Doç. Dr. Ebru Nevin ÇETİN ve Uz. Dr. Semra ACER'e; genetik çalıŐmalarımnda emek sarfedip desteğini esirgemeyen sayın Doç. Dr. Vildan CANER hocama; istatistik hesaplamalarında yardımcı olan sayın Prof. Dr. Mehmet ZENCİR' e; asistanlık eğitimim ve tezimin hazırlanması sürecinde bana destek olan tüm asistan arkadaşlarıma ve göz polikliniği çalıŐanlarına, sevgili eŐime ve aileme teŐekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VI
TABLolar DİZİNİ	VII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
YBMD'nin Epidemiyolojisi	
Prevelans	
İnsidans	
Risk Faktörleri	
Demografik Risk Faktörleri	
Oküler Risk Faktörleri	
Diğer Risk Faktörleri	
Etyopatogenez	
YBMD' de Klinik Sınıflandırma	
YBMD' de Optik Koherans Tomografi	
Non-Eksudatif ve Eksudatif Tip YBMD Tedavisi	
YBMD ve Genetik	
GEREÇ VE YÖNTEM	
BULGULAR	
TARTIŞMA	
SONUÇLAR	
KAYNAKLAR	

SİMGELER VE KISALTMALAR

AREDS	Age Related Eye Disease Study
bp	Baz çifti
FAZ	Foveal avasküler zon
FDT	Fotodinamik tedavi
FFA	Fundus Floresein anjiografi
GK	Görme keskinliği
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
İSYA	İndosiyanin yeşili anjiografisi
İVTA	İntravitreal triamsinolon asetat
kb	Kilo baz çifti
KNV	Koroid neovaskülarizasyonu
Log MAR	Logarithm of Minimal Angle of Resolution
MPS	Macular Photocoagulation Study
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
OKT	Optik koherens tomografi
PED	Pigment epitel dekolmanı
POLA	Pathologies Ocularires Lies a Page
RPE	Retina pigment epiteli
SNP	Single nucleotide polimorfizm
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEGFR	Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü
YBMD	Yaşa bağlı makula dejenerasyonu

TABLÖLAR

- Tablo-1** YBMD' de incelenen VEGF geni intronik SNP' lerinden bazıları ve lokalizasyonları
- Tablo -2** *VEGF* rs1413711 SNP analizinde kullanılan primer seti ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimi (5' → 3')
- Tablo -3** *VEGF* rs2146323 SNP analizinde kullanılan primer seti ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimi (5' → 3')
- Tablo -4** *VEGF* rs3025033 SNP analizinde kullanılan primer seti ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimi (5' → 3')
- Tablo -5** *VEGF* geni rs1413711, rs2146323, rs3025033 SNP analizleri için hazırlanan reaksiyon karışımları
- Tablo -6** *VEGF* geni rs1413711 ve rs2146323, SNP analizleri için gerçek-zamanlı PCR protokolü
- Tablo -7** *VEGF* geni rs3025033 SNP analizi için gerçek-zamanlı PCR protokolü
- Tablo -8** Grupların yaş ve cinsiyet özellikleri
- Tablo -9** Grupların iris renk özellikleri
- Tablo -10** Grupların görme düzeyleri ve lens özellikleri
- Tablo -11** Kontrol grubu ve YBMD'li olgu gruplarında *VEGF* geni rs1413711 SNP'ye özgü genotipler ve görülme sıklıkları
- Tablo -12** YBMD'li olgu grubu klinik tiplerinde *VEGF* geni rs1413711 SNP'ye özgü genotipler ve görülme sıklıkları
- Tablo -13** *VEGF* geni rs1413711 SNP genotiplerinin dağılımı ve YBMD klinik tipleri ile kontrol grubu arasındaki ilişkinin %95 güven aralığı ile odds ratio (OR) değerleri
- Tablo -14** YBMD' li olgu grubu klinik tiplerinde *VEGF* geni rs2146323 SNP'ye özgü genotipler ve görülme sıklıkları

Tablo -15 *VEGF* geni rs2146323 SNP genotiplerinin dağılımı ve YBMD klinik tipleri ile kontrol grubu arasındaki ilişkinin %95 güven aralığı ile odds ratio (OR) değerleri

Tablo -16 YBMD'li olgu grubu klinik tiplerinde *VEGF* geni rs3025033 SNP' ye özgü genotipler ve görülme sıklıkları

ŞEKİLLER

- Şekil -1** *VEGF* geni yapısı ve YBMD ile ilişkili *VEGF* geni SNP' lerinden bazılarının pozisyonları
- Şekil -2** YBMD tiplerinin cinsiyete göre dağılımı
- Şekil -3** YBMD' li olguların klinik evrelere göre dağılımı
- Şekil -4** Druzen sayısı, boyutu ve tipinin hasta grubundaki gözlere göre dağılımı
- Şekil -5** Hasta grubunda yapılan intravitreal enjeksiyon sayılarının dağılımı
- Şekil -6** VEGF geni rs1413711 SNP analizine özgün erime eğrisi
- Şekil -7** Hasta ve kontrol grubunda *VEGF* geni rs1413711 SNP' ye özgün genotiplerin dağılımı
- Şekil -8** Hasta ve kontrol grubunda *VEGF* geni rs1413711 SNP'ye özgün GG ve GA+AA genotiplerinin dağılımı
- Şekil -9** *VEGF* geni rs2146323 SNP analizine özgün erime eğrisi
- Şekil -10** YBMD'li olgu grubu klinik tiplerinde *VEGF* geni rs2146323 SNP' ye özgü genotipler ve görülme sıklıkları
- Şekil -11** *VEGF* geni rs3025033 SNP analizine özgün erime eğrisi
- Şekil -12** YBMD'li olgu grubu klinik tiplerinde *VEGF* geni rs3025033 SNP' ye özgü genotipler ve görülme sıklıkları

ÖZET

Yaşa bağı makula dejenerasyonunda *vasküler endotelyal büyüme faktörü* (*VEGF*) gen polimorfizmlerinin değerlendirilmesi

Dr. Yunus BULĞU

Yaşa bağı makula dejenerasyonu; ilerleyen yaşlarda görme kaybının en önemli nedenlerinden biridir. Yapılan çalışmalarda yaşa bağı makula dejenerasyonunun özellikle yaş tipi ile *VEGF* geni arasında ilişki olduğu ayrıca bu bireylerde oküler *VEGF* düzeyinin yükseldiği gösterilmiştir. Yaşa bağı makula dejenerasyonu ile ilişkisi olduğu düşünülen birçok genle ilgili polimorfizm çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmada, *VEGF* genine ait üç adet tek nükleotid polimorfizmi (SNP) ile yaşa bağı makula dejenerasyonu arasındaki ilişki araştırıldı.

82 yaşa bağı makula dejenerasyonu olgusu ile yaş ve cinsiyet uyumlu 80 sağlıklı birey çalışmaya dahil edildi. Hasta ve kontrol grubunun ayrıntılı oftalmolojik muayeneleri yapıp, her iki gruptan SNP analizleri için 2 ml periferik kan örneği alındı. Gerçek-zamanlı PCR ile *VEGF* genine ait üç adet SNP'lerine (rs1413711, rs2146323, rs3025033) ait genotipler belirlendi.

Yaş, cinsiyet ve iris renkleri yönünden iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). *VEGF* geni rs1413711 ve rs 2146323 SNP'leri için sırasıyla GA+AA ve CA+AA genotip varlığının kuru tip YBMD riskini arttırdığı belirlenirken (sırasıyla OR= 6,28 %95 GA: 2,03-19,3 ve OR= 4,38 %95 GA:1,40-13,63), yaş ve miks tip YBMD bulunan olgularda her iki polimorfizm için benzer ilişki saptanmadı (sırasıyla OR= 1.08 ve 1.13; OR=1,06 ve 1,75). *VEGF* geni rs3025033 SNP'i ve YBMD'nin klinik tipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p=0.208$).

Bu çalışma sonucunda Türk popülasyonunda *VEGF* geni rs1413711 ve rs2146323 SNP'leri ile kuru tip YBMD arasında anlamlı ilişki olduğunu ortaya koyduk.

Anahtar Kelimeler: Gerçek-zamanlı PCR, tek nükleotid polimorfizmi, *VEGF*, YBMD

SUMMARY

Evaluation of *vascular endothelial growth factor (VEGF)* gene polymorphisms in age-related macular degeneration

Yunus BULGU, MD

Age related macular degeneration (AMD) is one of the most important reasons of vision loss in advanced age. An association has been reported between *vascular endothelial growth factor (VEGF)* gene and the in the wet type of AMD. In addition to, it has been shown that VEGF levels in ocular fluid were significantly elevated in patients with wet type of AMD. There are a number of studies examining the link between several gene polymorphisms and AMD. In this study, it was examined the relationship between 3 single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *VEGF* and AMD. We designed a case-control study which include 82 patients with AMD in study group and 80 healthy individuals well-matched in the terms of age and sex in control group.

Peripheral blood samples (2 ml) were drawn from both the control and study group for SNP analysis after full ophthalmic examination has been completed. The genotypes of each of the three tested SNPs (rs1413711, rs2146323, rs3025033) in both groups were determined by real-time PCR.

There was no statistical difference between study and control group in age, sex and iris colour ($p>0,05$). For two SNPs (rs1413711 and rs 2146323) of *VEGF* gene, it was determined that the presence of GA+AA genotype in rs1413711 and CA+AA genotype in rs2146323 were associated with an increased risk of the dry type of AMD (OR= 6,28 %95CI: 2,03-19,3 and OR= 4,38 %95CI:1,40-13,63, respectively). There was no relation between the genotypes and other type of AMD (OR= 1.08 ve 1.13; OR=1,06 ve 1,75). There was no statistical difference between SNP rs3025033 of *VEGF* gene and the clinical types of AMD ($p=0.208$).

In conclusion, we found that both SNP rs1413711 ve rs2146323 of *VEGF* gene are significantly associated with the dry type of AMD in Turkish population.

Key Words: Real-time PCR, single nucleotide polymorphism, *VEGF*, AMD.

GİRİŞ

YBMD (Yaşa Bağlı Maküla Dejenerasyonu), özellikle gelişmiş ülkelerde yaşam süresinin uzamasıyla beraber santral, kalıcı görme kaybının önemli bir nedeni olup 65 yaş üzerinde körlüğün en yaygın sebebinin oluşturmaktadır (1,2). Görülme sıklığı yaşla birlikte anlamlı oranda artış göstermektedir. YBMD oranı 66-74 yaşlarında % 10 iken, 75-85 yaşlarında % 30'lara yükselmektedir (3,4). 2020 yılında 85 yaş ve üzerindeki popülasyonun yaklaşık % 107 artacağı beklenirse YBMD prevalansında önemli ölçüde artacaktır (5).

YBMD neovasküler olmayan (kuru veya atrofik tip) ve neovasküler (yaş veya eksudatif tip) olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Neovasküler olmayan tip YBMD' li olguların yaklaşık % 90' ını oluşturmaktadır ve körlüklerin % 10'undan sorumludur. Neovasküler YBMD ise retina altında yeni damar oluşumu olarak adlandırılan koroidal neovaskülarizasyon gelişimi sonrası ortaya çıkmaktadır. Neovasküler YBMD olguların yaklaşık % 10' unu oluşturmasıyla birlikte yasal körlüklerin % 80-90'ından sorumludur (1,6-8).

Bugüne kadar YBMD ve *VEGF (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü) geni* polimorfizmlerinin ilişkisi konusunda çeşitli araştırmalar yapılmakla birlikte, literatürde bu konuda bir tutarlılık yoktur. Çeşitli etnik gruplarda yapılan araştırmalarda, birçok çalışmada YBMD ile *VEGF geni* polimorfizmleri arasında ilişkinin varlığı belirlenirken, benzer ilişkinin saptanmadığı araştırmalar da literatürde bulunmaktadır (9-11).

Türk popülasyonunda YBMD etyolojisine yönelik moleküler genetik çalışmalar yeni yeni yapılmaya başlanmıştır. Multifaktöriyel poligenik hastalarda, olası risk taşıyan kişilerin belirlenmesinde polimorfizm çalışmaları oldukça günceldir. Araştırmadaki amacımız, ülkemiz popülasyonunda *VEGF geni* polimorfizimleri ve YBMD arasındaki ilişkinin belirlenmesidir. Böylelikle hastalık için riskli kişiler henüz hastalık ortaya çıkmadan önce saptanabilecek ve göz polikliniğinde erken tanı- takip programına alınabilecektir.

GENEL BİLGİLER

YBMD; 50 ve üzerindeki yaş grubunda sık görülen RPE (Retina pigment epiteli), Bruch membranı ve koriokapillarisin dejenerasyonu ile karakterize bir maküla hastalığıdır. Gelişmiş ülkelerin çoğunda özellikle 60 yaş üzeri popülasyonda ciddi santral görme kaybının en önemli sebebidir (2). Günümüzde YBMD, beklenen yaşam süresinin uzamasına bağlı olarak ciddi bir sosyo-ekonomik problem oluşturmaktadır.

Atrofik (kuru, non-neovasküler) ve eksüdatif (yaş, neovasküler) olmak üzere iki tipi mevcuttur. Kuru tip YBMD' li olguların %90' ını oluşturmaktadır. Hastalığın ana klinik bulgusu RPE' de metabolik ürünlerin birikmesine bağlı olarak gelişen drusen ve RPE atrofi- hipertrofidir. YBMD' ye bağlı ileri görme kayıplarının %10-20'sinden atrofik tip sorumludur. Eksüdatif tip, YBMD' nin %10'unu oluşturmaya karşın, legal körlüklerin %80-90' ından sorumlu olup koroidden kaynaklanan yeni damarların Bruch membranını geçerek subretinal aralığa doğru ilerleyip bu bölgede fibrovasküler kompleks oluşturmasıyla karakterizedir (12-15).

YBMD'NİN EPİDEMİYOLOJİSİ

Prevalans

YBMD' nin görülme sıklığı yaşla beraber anlamlı şekilde artmaktadır. Genellikle bilateral görülmekle birlikte tutulum zamanı ve şiddeti açısından gözler arasında farklılıklar görülebilir. Gözlerden birinde KNV (Koroid neovaskülarizasyonu) varlığı durumunda diğer gözde 5 yıl içerisinde KNV gelişme riski %50-60 civarındadır (16). YBMD prevalansının %1,2-1,7 arasında olduğu ve 75 yaş üzerinde %30' un üzerine çıktığı yapılan çalışmalarda görülmüştür (2,4). Beaver Dam çalışmasında (2) prevalans %1,7; Rotterdam çalışmasında (17) %1,2 ve Blue Mountain çalışmasında (18) %1,4 olarak bildirilmiştir.

İnsidans

YBMD insidansını belirlemek adına birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların ortak noktaları yaşla birlikte insidansın arttığıdır (2,4). Beaver Dam

çalışmasında (19) erken YBMD' nin 5 yıllık insidansı 43-54 yaşları arasında %3,9; 75 yaş ve üzerinde %22,8; geç YBMD' nin 5 yıllık insidansı tüm yaş gruplarında %0,9; 75 yaş ve üzerinde %5,4 olarak bildirilmiştir.

POLA çalışmasında (20) ise YBMD'nin tüm yaş gruplarında 3 yıllık insidansı %0,49 iken 80 yaş üzerinde %3,41'e ulaştığı bildirilmiştir.

RİSK FAKTÖRLERİ

A) Demografik Risk Faktörleri:

1) Yaş: YBMD için ileri yaşın tartışılmaz ve önlenemeyen bir risk olduğu kesin olarak kanıtlanmıştır (21). Kopenag Göz Kliniği çalışmasında (3) YBMD prevalansı 60-64 yaş arasında % 2,3; 65-69 yaş arasında % 5,9; 70-74 yaş arasında % 12,1 ve 75-80 yaş arasında ise % 27,3 olarak tespit edilmiştir. Drusen gelişimi 43-54 yaş arası ve 75 yaş üzeri popülasyonda karşılaştırıldığında büyük drusen (>125 µ, %1,9'a karşılık %24), yumuşak drusen (%2,1'e karşılık %23), retina pigment epiteli anomalileri (%7,3'e karşılık %26,6) ve jeografik atrofi (%0'a karşılık %2) ileri yaş grubunda daha sık tespit edilmiştir (22). Tek bir drusen bulunma olasılığı, 55-64 yaş arasında % 40,8 iken; 85 yaş ve üstünde ise % 52,6'dır (2).

2) Cinsiyet: Yapılan çeşitli çalışmalarda 75 yaş ve üzeri bayanlarda erken YBMD insidansının iki kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (18,23-25). Kadınlarda görülme sıklığının fazla olması erkeklere göre daha uzun yaşam, menapoz sonrası östrojen hormonunun koruyucu etkisinin ortadan kalkması ve kişisel bakımlarının daha iyi olması şeklinde açıklanabilir (2,26). Buna karşın Rotterdam, Beaver Dam ve Kopenag çalışmalarında YBMD prevalansında kadın ve erkek arasında fark bulunmamıştır (17-19,27).

3) Irk-Etnik Faktörler: Beyazlarda, siyahlara göre YBMD insidansının daha yüksek olduğu bilinmektedir (28). NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) III çalışmasında (29) YBMD prevalansının non-hispanik siyahlara (%7,4) göre non-hispanik beyazlarda (%9,3) daha sık olduğu bulunmuştur. Bu durum, zencilerdeki melanin pigmentinin serbest radikalleri temizleme etkisi veya pigment epitelinin, Bruch membranını, koroidi ve dış retinayı predispozan faktörlere karşı koruyucu etkisi ile açıklanmaktadır (30).

4) Sosyoekonomik Faktörler: YBMD görülme sıklığının eğitim düzeyi düşük olan kişilerde daha fazla olduğunu bildiren yayınlar mevcuttur (31). Beaver Dam çalışmasında (32) ise YBMD ile eğitim seviyesi arasında ilişki olmadığı bildirilmiştir.

B) Oküler Risk Faktörleri

1) Kıırma Kusuru: Hipermetropik kişilerde drusen gelişimi ve yaş tip YBMD'nin daha yaygın olduğu bildirilmiştir (33,34). Bu durum kesin olarak kanıtlanmamış olsa da hipermetropide gözün yapısal ve mekanik açıdan makülopatiye yatkınlığının artması ile ilişkili olabilir.

2) Katarakt/ Katarakt Cerrahisi: Yapılan çalışmalarda kataraktlı lensin ultraviyole ışınlarına bariyer etkisinin ortadan kalkması, cerrahi sonrası gelişen inflamasyon etkisi ile YBMD progresyonunun hızlandığı düşünülmektedir (35,36).

3) İris Rengi: Melaninin; ışık ile oluşan oksidatif hasara karşı koruyucu özelliği olabileceği belirtilmiştir. Bu durumun melaninin antioksidan etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle koyu iris renginin YBMD riskini azalttığına dair yayınlar mevcuttur.(37)

4) Optik Diskte Çukur / Disk (c/d) Oranı: Cup/Disk oranının yüksek olduğu kişilerde yaş tip YBMD gelişme riskinin düşük olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (38).

C) Diğer Faktörler:

1) Antioksidanlar, Vitaminler, Mineraller: Antioksidan enzimler (Glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz), C vitamini, E vitamini, karotenoidler (alfa ve beta karoten, kriptoksantin, lutein, zeaksantin), ayrıca selenyum, çinko, bakır, magnezyum gibi eser elementler fotooksidasyon ve lipid peroksidasyonuna bağlı serbest radikallerin yol açtığı fotoreseptör hasarını önler ve tamir ederler (39). AREDS 22 No lu çalışmasında (40) lütein ve zeaksantin alımının YBMD gelişim olasılığını azalttığı bildirilmiştir. RPE'de süperoksit dismutaz, katalaz gibi enzimlerin kofaktörü olan çinkonun desteğinin de erken ve geç YBMD sıklığını azalttığı gösterilmiştir (41). Doymuş yağ asitleri ve kolesterolün diyetle fazla

miktarlarda alınması YBMD sıklık ve progresyonunu arttırırken, balık ve balık yağı alınmasının ise YBMD riskini azalttığı bildirilmiştir (42).

2) Sigara: Günde 25 adet ve üzerinde sigara içenlerde, hiç sigara içmeyenlere göre YBMD gelişimi için rölatif riskin 2,4 olduğu gösterilmiştir (43). Sigaranın yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) düzeylerini düşürerek, trombosit agregasyonunu, fibrinojen düzeyini, oksidatif stresi ve lipid peroksidasyonunu arttırarak ve antioksidan düzeylerini düşürerek etkili olabileceği savunulmuştur. Bu faktörlere bağlı RPE sayısında azalma ve RPE detoksifikasyon mekanizmasında yetersizliğe sekonder YBMD riskinin arttığı düşünülmektedir (19, 23, 44).

3) Alkol Kullanımı: YBMD ile alkol kullanımı ve tüketilen alkol tipiyle ilişkili çelişkili yayınlar mevcuttur (45,46).

4) Obesite: YBMD gelişiminde ve progresyonunda genel ve abdominal obesitenin etkili olabileceği bildirilmiştir (42).

5) Kardiyovasküler Faktörler: Karotis arter bifurkasyon noktasında aterom plağı varlığının ileri YBMD riskini 4,5 kat; ortak karotis arterde aterom plağı varlığının ise 2 kat artırdığı gösterilmiştir (47). Diyabet ve hiperglisemi ile YBMD ilişkisine dair ise çok az sayıda çalışma mevcuttur (48). Yüksek kan basıncı ile YBMD arasında hafif düzeyde bir ilişki olduğu bildirilmiştir (49).

6) Güneş Işığı Maruziyeti: İleri YBMD riskinin yaz aylarında açık havada kalma süresinin artması ile iki katına çıktığını, 5 ve 10 yıllık erken YBMD insidansının ve progresyonunun da güneş ışığına maruziyet ile arttığını gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (50,51). Ancak kesin olarak kanıtlanmamıştır.

7) İlaçlar: İlaçların YBMD üzerindeki etkisine dair birçok çalışma mevcuttur. Statin grubu kolesterol düşürücü ilaçların muhtemel antiinflamatuvar etkileri üzerinden, koroid neovaskülarizasyonu riskini azalttığını ve beta blokörlerin erken YBMD riskini düşürdüğü söylenmektedir (52,53).

8) Hormonal Faktörler: Postmenapozal östrojen alan kadınlarda neovasküler YBMD riskinin düşük olduğunu gösteren bazı çalışmalar olduğu gibi (54), arada hiçbir ilişkinin bulunmadığını belirten çalışmalar da vardır (55).

9) İnflamatuvar Faktörler: RPE' deki hücresel artıklar bazal lamina ve Bruch membranında inflamasyonu tetikleyerek drusen gelişimini uyarabilir. C reaktif

proteinin seviyelerinin YBMD hastalarında yüksek olduğu gösterilmiş ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde bu protein seviyelerinin takibi önerilmiştir (56).

10) Genetik Faktörler: YBMD riski aile öyküsü varlığında 2,4 kat, özellikle yaş tip YBMD riski 3,1 kat artmaktadır (57). YBMD' li 4764 hastada yapılan populasyon bazlı vaka- kontrol çalışmasında hastalığın ailesel dağılımı ve riski belirlenmiştir. Buna göre pozitif aile öyküsü olanda populasyon atfedilebilir risk (PAR): 0,34 olarak saptanmıştır. Tekrarlama riski hastaların kardeşlerinde: 2.95, 1. kuzenlerinde:1,29; 2. kuzenlerinde: 1,13 olarak saptanmıştır (58). Yapılan birçok bağlantı (linkage) ve ilişki (asosiyasyon) çalışmalarında hastalıkla en çok ilişkili lokus olarak 1q25-31 ve 10q.26 saptanmıştır (59,60).

11) Diğer Risk Faktörleri: Plazma fibrinojen seviyesi yüksekliği, homosistein seviyesi yüksekliği, dehidroepiandrosteron seviyesi yüksekliği, antioksidan enzim eksikliği ve serum leptin seviyesi yüksekliğinin çeşitli çalışmalarda YBMD ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (61,62).

ETYOPATOGENEZ

Bruch membranı anatomik olarak 5 tabakadan oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla: RPE'nin bazal membranı, iç kollajen tabaka, elastik tabaka, dış kollajen tabaka ve koryokapillaris bazal membranıdır.

YBMD ve koroid neovaskülarizasyonunun nedenleri şu anda tam olarak bilinmemekle birlikte yaşlanmış RPE hücrelerinin anormal enzimatik aktivitesinin metabolik yan ürünlerin birikimine neden olduğu varsayılmaktadır. YBMD' de Bruch membranındaki ilk dejeneratif değişiklikler RPE' nin hücre plazma membranı ile onun bazal membranı arasında bazal laminar depozit ile vesiküler, granüler ve filamantöz yapıdaki materyallerin iç ve dış kollajen katlarda birikmesiyle oluşan bazal lineer depozit adı verilen birikimlerdir. Bu depozitlerin RPE kaynaklı olduğu düşünülmektedir. RPE, fotoresöptör dış segmentlerinden kaynaklanan artıkların fagositoz ile ortamdan uzaklaştırılmasında büyük rol oynar. İlerleyen yaşla birlikte RPE' nin fagositoz kapasitesi oksidatif stres nedeniyle azalır ve sindirilemeyen hücre elemanları lipofuksin ve melanolipofuksin olarak lineer granüller şeklinde RPE bazal yüzeyinin altında iç ve dış kollajen tabakada birikmeye başlar. Bunun sonucunda sindirilemeyen lipofuksin, RPE lizozomlarında zamanla aşırı birikime uğrar ve RPE'

nin fagositoz yeteneğinde bozulmalara neden olur. Yaşlanma ve bazal lamina depozit birikimi ile birlikte Bruch membranındaki kalınlık artışı, Bruch membranının fibröz tabakalarındaki kollajen ve elastik liflerde sayıca artış, dizilimlerinde bozulmalar, lipid içeriğinde artış, su permeabilitesi ve oksijen difüzyonunun azalması ile besin-atık değişiminin bozulmasına sebep olur (63-64). Sonuç olarak RPE ve fotoreseptör hücre apoptozu indüklenir. Fotoreseptörler ve koryokapillaris için oldukça önem taşıyan RPE hücrelerinin ölümünü fotoreseptör kaybı ve koryokapillaris atrofi izler (65).

Anormal birikimler ve Bruch membranının yapısındaki değişiklikler, ortama makrofaj, dev hücre ve endojen sitokinlerin kemotaksisine yol açar. Böylece bölgede kronik bir enflamasyon tetiklenmiş olur. Enflamasyon sonucu gelişen hipoksi ve iskemiye bağlı anjiogenezis uyarılmakta ve bu da KNV gelişimi ile sonuçlanmaktadır. Anjiogenezisi aktive ve inhibe eden faktörler arasındaki dengenin bozulması sonucu KNV oluşur. Anjiogenez, vasküler endotel hücrelerinin proliferasyonu, ekstraselüler matriksin yeniden şekillenmesi, endotel hücre göçü ve kapiller tüp oluşumu ile meydana gelmektedir. Bu süreç, büyüme faktörleri, ekstraselüler matriks ve hücreler arasındaki kompleks etkileşimleriyle kontrol edilmektedir ve net sonuç anjiogenetik ve anjiostatik elemanlar oranındaki denge tarafından belirlenmektedir (66). Anjiogenezisi uyaran en önemli faktör VEGF iken anjiogenezisi inhibe eden en önemli faktör pigment epitel kaynaklı faktör (PEDF) dir (67). Anjiogenik faktörlerden bazıları; VEGF, PGF (Plasental büyüme faktörü) (PIGF), FGF (Fibroblast büyüme faktör), TGF-a (Transforme edici büyüme faktör-a), TNF-a (Tümör nekroz faktör-a) ve PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme faktör) iken anti-anjiogenik faktörlerden bazıları PEDF, anjiostatin, endostatin, vazostatin ve vasküler endotelial büyüme faktörü inhibitörüdür.

YBMD' DE KLİNİK SINIFLANDIRMA

YBMD klinik olarak iki tipe ayrılır:

1) Atrofik tip (Kuru tip): Non-neovasküler

2) Eksüdatif tip (Yaş tip): Neovasküler

Makülada yumuşak drusen ve RPE değişikliğinin bulunması **erken YBMD** olarak tanımlanırken, coğrafik atrofi ve eksüdatif YBMD bulunması **geç YBMD** olarak tanımlanır (19).

Age- Related Eye Disease Study (AREDS) grubu tarafından YBMD, progresyon açısından düşük, orta ve yüksek riskli kategorilere ayrılmıştır (68).

1- Erken YBMD

a) Düşük riskli non-neovasküler YBMD: Maküler alanda küçük, sert drusen (<63 μ) ile minimal ya da hiç pigment değişikliği olmaması ve normal santral görme keskinliği ile karakterizedir. Bu hastaların %10'u 5 yılda riskli gruba, %1,3'ü geç YBMD' ye progresyon gösterir.

b) Orta riskli non-neovasküler YBMD: Bir ya da her iki gözde yaygın orta büyüklükte (63-125 μ) veya daha geniş (>125 μ) drusen ile merkezi tutmayan coğrafik atrofi vardır. 5 yılda geç YBMD' ye ilerleme ihtimali yaklaşık %18'dir.

c) Yüksek riskli non-neovasküler YBMD: Gözlerden birinde neovasküler değişiklikler olsun ya da olmasın yumuşak drusen, konfluent drusen ve pigment epitel değişikliği ile birlikte en az bir gözde foveayı tutan coğrafik atrofi karakterizedir. Bu lezyonlarda 5 yıl içinde KNV' ye ilerleme ihtimali yaklaşık %10 olarak tespit edilmiştir.

2-Geç YBMD

a) Coğrafik atrofi

b) Neovasküler YBMD

ATROFİK (KURU) TİP YBMD

Drusen, RPE değişikliği, RPE' nin coğrafik atrofisi ve fokal hiperpigmentasyonu atrofik tip YBMD' nin karakteristiğidir. Atrofik (kuru) tip, YBMD' nin %90' indan sorumlu iken hastaların ancak %10' unda ağır görme azalması oluşturur. Görme kaybının yıllar içinde yavaş bir ilerleme gösterdiği kuru tip, yaş tipe dönüştüğü takdirde ani görme azalması gelişebilir.

Druzen

RPE bazal membranı ile Bruch membranının iç kollajen tabakası arasında biriken, küçük sarı-beyaz renkte, kollajen ve RPE hücre artıklarını içeren

ekstrasellüler eosinofilik materyallerdir. Druzen zamanla beyazlaşabilir, kenarları keskinleşebilir, pigment birikebilir, kalsifiye olabilir veya gerileyebilir.

Genellikle üzerindeki fotoreseptörleri etkilemediği için görsel semptomlara neden olmaz. Beaver Dam çalışmasında (2) 43-86 yaş arasındaki populasyonun %95,5' inde en az bir gözünde bir veya daha fazla druzen olduğu görülmüştür.

Druzen boyut ve görünümüne göre sınıflandırılabilir:

Boyuta göre:

- 1- Küçük druzen: <63 mikron
- 2- Orta druzen: 63- 125 mikron
- 3- Büyük druzen: >125 mikron

Klinik görünümüne göre:

Sert Druzen: En sık görülen druzen tipidir. Çapı 63 mikrondan küçük sınırları belirgin sarı-gri renkte görülür. Bruch membranının iç yüzeyinde periodic acit-schiff (PAS) pozitif hyalin materyal ve RPE' deki lipid birikimlerinden oluşur. Fundus floresein anjiografide (FFA) sert druzenin hiperfloresansı erken ve parlaktır, pencere defekti olarak görülür. İndosiyanin yeşil anjiografide (İSYA) keskin sınırlara sahip hiperfloresan noktalar şeklinde görülür (2).

Yumuşak Druzen: Yumuşak druzen 43-54 yaş arasında %1,9; 75 yaş üzerinde %24 olarak görülmüştür (6). Çapı 63 mikrondan büyük, sarı, sınırlan belirsiz farklı büyüklük ve şekilde olabilen amorf yapıda bazal lineer birikimlerdir. Bir araya gelmeleriyle konfluent druzen gelişir. Bazen druzenoid RPE dekolmanı şeklinde görülebilir. FFA' da zayıf gecikmiş hiperfloresan, İSYA' da ise tüm fazlarda hipofloresan özellik gösterirler. Konfluent ve büyük yumuşak druzende KNV gelişme riski oldukça fazladır (16).

Gerileyen ve Kalsifik Druzen: Keskin sınırlı, beyaz, kalsifiye, pigment birikimleri ile RPE incilmesi veya atrofisinin de görülebildiği lezyonlardır. FFA' da pencere defektlerinin olduğu hiperfloresan görünüm varken kalsifik druzende ise hipofloresans izlenir. Bu lezyonlar, İSYA' da hiperfloresans görünüm verirler (16).

Retiküler Psödodruzen: Düşük koroidal pezfüzyona bağlı geliştiği düşünülen 125-250 mikron çapında, sınırları belirsiz, sarımtırak, yuvarlak lezyonlardır. Makülada en çok üst temporal ark boyunca görülür. FFA' da genellikle görülmezken, İSYA' da erken fazda büyük koroid damarlarının keskinliği kaybolmakta, geç fazda ise

hipofloresan noktalardan oluşan bir görünüm ortaya çıkarmaktadır. KNV gelişme potansiyeli oldukça yüksek lezyonlardır.

RPE Değişiklikleri

YBMD' de RPE hücrelerinde azalma, atrofi, hacim kaybı, fokal hiperpigmentasyon gelişebilir.

Noncoğrafik atrofi: Keskin sınırlı ve alttaki koroidal damarların seçilebildiği RPE' nin fokal atrofisidir. Başlangıçta fovea dışında belirip zamanla foveayı da etkileyebilir. RPE ve fotoreseptör kaybı ile birlikte koryokapillaris vasküler yetmezlik söz konusudur. Zamanla atrofik alanlar içinde büyük koroidal damarlar belirgin hale geçer. FFA' da erken dönemde pencere defektine uyacak şekilde lekeli hiperfloresans özellik gösterirken, geç dönemde hiperfloresans giderek azalır.

Coğrafik atrofi: Kuru tip YBMD' nin ileri formudur. RPE' de geniş atrofi alanları ile beraber sensoriyal retina ve koriokapillarisin atrofisi de izlenir. Büyük damar arkadlarını aşmayacak şekilde foveayı da içine alan atrofilerdir. FFA' da erken fazda koriokapillaris atrofisine bağlı hiperfloresans izlenmezken, geç dönemde koroid ve skleranın boyanması nedeniyle hiperfloresans izlenir.

EKSÜDATİF (YAŞ) TİP YBMD

YBMD' nin %10' luk kısmını oluşturur. Bunun yanında ileri görme kayıplarının %80-90' ından sorumludur.

Eksüdatif tip YBMD' de KNV için en spesifik bulgu metamorfopsidir. Hastalar metamorfopsinin yanısıra santral veya parasantral skotom, ani ve ilerleyici görme azalması gibi şikayetlerle başvurabilirler. Fokal hiperpigmentasyonu ve büyük druzeni olan non-neovasküler YBMD hastaları yaş tipe ilerleme açısından takip edilmelidir.

RPE' deki fonksiyon bozukluğu ve yeni oluşan anormal damarlardan sızıntıya bağlı gri- subretinal hemoraji ve kabarıklık, vitreus hemorajisi, kistik retinal ödem, RPE dekolmanı, RPE yırtıkları veya diskiform skar gibi geç tip YBMD bulguları ve KNV' nin direkt kendisi görülebilir (12, 68, 69).

Macular Photocoagulation Study grubu (MPS) KNV' yi FFA' daki görünümlerine göre *klasik* ve *gizli KNV* olmak üzere iki ana şekilde tanımlamıştır (69).

A) Klasik KNV: FFA' da koroid dolum fazında sınırları belirgin, dantel veya tekerlek şeklinde yeni damar ağı dolmasına bağlı hiperfloresans vermeye başlar. Boya geçişinin zirveye ulaşması ile parlak hiperfloresans görülür. Zamanla subretinal alana ve KNV çevresine sızıntılar olur, sınırlar geç döneme doğru belirsizleşir.

Klasik KNV foveal avasküler zon (FAZ) merkezi ile olan ilişkisine bağlı olarak 3'e ayrılır (70).

Subfoveal KNV: FAZ merkezini tutanlar

Ekstrafoveal KNV: FAZ merkezine 200 mikrondan uzak olanlar

Jukstafoveal KNV: FAZ merkezine 200 mikrondan daha yakın olup merkezi tutmamış olanlar

Klasik KNV içerdiği klasik komponentin miktarına göre ise saf klasik, baskın klasik ve minimal klasik lezyon olarak 3'e ayrılabilir:

Saf Klasik KNV: Klasik KNV alanının lezyonun tamamını kaplaması

Baskın Klasik KNV: Klasik KNV alanının, tüm lezyon alanının %50 veya üzerini kaplaması

Minimal Klasik KNV: Klasik KNV alanının, tüm lezyon alanının %50'sinden daha azını kaplaması

B) Gizli KNV: FFA' daki görüntüsüne göre 2 tip gizli KNV paterni tanımlanmıştır. Bunlar pigment epitel dekolmanı ve kaynağı belirsiz geç kaçaktır (6).

1- Pigment Epitel Dekolmanı (PED): İrregüler RPE elevasyonu mevcuttur. Sınırları belirsiz, granüler tarzda minimal hiperfloresans ardından giderek artan ancak klasik KNV kadar parlak izlenmeyen hiperfloresans verir. PED; RPE altındaki materyalin özelliklerine göre hemorajik PED, seröz PED, druzenoid PED gibi alt tiplere ayrılabilir (6, 70).

2- Kaynağı Belirsiz Geç Kaçak: FFA' nın erken fazlarında kaynağı belirlenemeyen zayıf hiperfloresans veren, geç fazda ise RPE düzeyinde sınırları belirsiz benekli hiperfloresans ve boyanın sensoryal retina altında göllenmesine bağlı yaygın sızıntı ile karakterizedir (71).

Bunların dışında yaş tip YBMD' de görülebilecek diğer bulgular ise şunlardır:

Vitreus Hemorajisi: Koroid neovaskülarizasyonundan kaynaklanan kanın, vitreusa geçmesi ciddi görme kaybı ile beraber, ciddi merkezi ve periferik görme alanı kaybına da yol açar.

Ağır subretinal hemoraji: Ender bir tablodur. Çok nadir olarak total hemorajik dekolman ve sekonder açı kapanması glokomuna bile yol açabilir. Antikoagülan tedavinin bu tabloya yol açabileceğine dair çelişkili sonuçlar mevcuttur (72).

Retina pigment epitel yırtığı: Fibrovasküler veya seröz PED varlığında ya da laser fotokoagülasyon uygulamasından sonra gelişebilir. RPE'nin alttaki sıvının veya fibrovasküler dokunun gerilme gücüne dayanamaması sonucu gelişir. Nadiren seröz retinanın akut dekolmanı da gelişebilir.

Diskiform skar: KNV' ye genellikle fibröz bir doku eşlik eder. Fibröz doku, koroid neovaskülarizasyonu ile birlikte klinik olarak görünür hale geçtiğinde diskiform skar olarak tanımlanır. Genellikle sarı-beyaz renktedir. Skar dokusunda RPE hiperplazisinin derecesine göre hiperpigmentasyon görülür. Skar çevresinde veya üzerinde hemoraji ya da lipid bulunabilir.

Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonunda Optik Koherens Tomografi

Optik koherens tomografi (OKT), gözün kesitsel görüntülerini veren B- modu ultrason analogu olan yeni tekniktir. OKT, YBMD ve diğer maküler patolojilerin, optik sinir başını ilgilendiren hastalıkların tanı, takip ve ayırt edilmesinde FFA ve İSYA' ya yardımcı bir tetkiktir. KNV' nin yeri, uzanımı, büyüklüğü ve KNV' ye sekonder gelişen hemoraji, subretinal-intraretinal sıvı, eksüdasyon, PED ve subretinal fibrozisin yaygınlığı ve lokalizasyonunun tespitinde, tedaviye cevabın değerlendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Yeni YBMD tesbitinde, tek başına OKT' nin %96,4 sensitivite, %66,0 spesifiteye sahip olduğu gösterilmiştir (73).

Görüntülemelerde kırmızı, beyaz gibi parlak renkler yüksek reflektif sahalara; mavi, siyah gibi koyu renkler ise minimal reflektif sahaları göstermektedir. Retina pigment epiteli, koryokapillaris gibi yüksek reflektiviteye sahip yapılar kırmızı renkte görülürken, vitreus kavitesi, sıvı birikimi bölgeleri gibi düşük reflektiviteye sahip bölgeler mavi-siyah görülmektedir.

Druzen, OKT'de RPE ve koriokapillaris hattında düzensizlik ve lokalize elevasyonlar şeklinde görülür.

Klasik KNV, OKT' de RPE-koriokapillaris hattında lokalize-iğsi kalınlaşma, elevasyon ve sensoryal retinaya doğru genişleme şeklinde görülür. Beraberinde seröz ya da hemorajik PED veya geniş intraretinal hemorajilerin olması KNV' nin görülmesini engelleyebilir.

Subretinal sıvı birikimleri nörosensöryal retina ile RPE arasında siyah bir boşluk olarak görülür. OKT' de intraretinal veya subretinal sıvı birikimleri olması KNV' nin aktif olduğunu gösterir.

Seröz PED, genellikle yüksek ve geniş tabanlı RPE' nin lokalize elevasyonu ve dekolman altında siyah boş bir alan şeklinde görülür.

Fibrovasküler PED, küçük ve sığ RPE elevasyonları, elevasyon bölgelerinde septa formasyonu ve fibrovasküler yapının mavi- kırmızı yansıması şeklinde görülür.

Hemorajik PED' de ise, dekole bölgedeki RPE sınırının hemen altında hemorajinin neden olduğu orta derecede bir yansıma mevcuttur.

Coğrafik atrofi, OKT' de RPE- koriokapillaris bandı ve nörosensöryal retinanın incilmesi şeklinde görülür ve üstteki yapıların gölgeleme etkisi azaldığından derin koroidden gelen yansıma artmıştır.

Diskiform skarda ise OKT' de RPE- koriokapillaris bandı genişler, sınırları düzensizleşir ve üzerindeki retinada incelme görülür (74).

NON-EKSUDATİF TİP YBMD TEDAVİSİ

Yaşlanma için en yaygın hipotez, serbest radikallere bağlı hücrelerde oksidatif hasar gelişmesidir. Serbest radikalleri parçalayan enzimler (süperoksid dismutaz ve peroksidaz) hücreleri koruyucu etki gösterir. Oksidatif koruyucu enzimlerin bir veya daha fazlasında genetik defekt, antioksidan maddelerin diyet ile eksik alımı veya çevresel faktörler (sigara içimi gibi) patolojik değişikliklerin gelişmesine neden olur. Sürekli yaşa bağlı hasara maruziyetin santral nörosensöryal retina ve RPE' nin serbest radikallere daha hassas hale geldiğini bildiren çalışmalar vardır. AREDS; YBMD' de yüksek doz antioksidan vitaminlerin (500 mg vitamin C, 400 IU vitamin E ve 15 mg beta karoten) ve minerallerin (80 mg çinko oksit ve 2 mg bakır oksit) alımını önermektedir. 5 yıllık takipte bu tedavi sonucu tek taraflı orta derecede veya ileri YBMD' ye progresyonu %25, orta derecede (3 sıra veya daha çok) görme kaybı

riskini %19 azalttığını bildirmektedir. Sonuç olarak non- eksudatif tip YBMD' de bazı vitamin preparatları dışında aktif bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır (75).

EKSUDATİF TİP YBMD TEDAVİSİ

1) Lazer Fotokoagülasyon

Neovaskülarizasyonu koagülasyon nekrozu yaratarak yok etmeyi hedefleyen tedavi yöntemidir. Lazer fotokoagülasyon tedavisi ektrafoveal lezyonlar ile sınırlıdır. Artık jukstafoveal lezyonlar da bile pek kullanılmamaktadır. Tedavi başarısını etkileyen en önemli faktörler yetersiz tedavi ve nüks oranının yüksek olmasıdır (76).

2) Transpupiller Termoterapi

810 nm' lik bir diod lazeri uygun bir kontakt lens vasıtası ile genelde 800 mw enerji göze yöneltilerek, RPE' deki melanin ve koroid melanositleri tarafından emilen enerji 60 saniyelik tedavi süresince ısıya dönüşür. RPE yırtığı için risk faktörü olan baskın seröz PED ve geniş coğrafik atrofide kontrendikedir. Günümüzde YBMD tedavisinde pek tercih edilmemektedir.

3) Radyoterapi

Direk iyonizan radyasyonun patolojik bölgeye verilmesi ile uygulanır. Teleterapi (eksternal ışın tedavisi) ve brakiterapi (episkleral radyoaktif plak tedavisi) olmak üzere 2 teknik mevcuttur. Ancak radyasyon tedavisinin birçok çalışmada yararlı bir etki göstermediği hatta bazı gruplarda daha kötü sonuçların ortaya çıktığı görülmüştür (77).

4) Maküler Translokasyon Cerrahisi

Santral nörosensoryal retinaya yeni bir yerleşim sağlamak amaçlanır. Pars plana vitrektomi ile arka hyaloid yapışık ise tamamen ayrılır, retina altına sıvı enjekte edilerek tamamen dekole edilir ve 360 derece periferik retinotomi yapılarak retina optik diske kadar serbestleştirilir. Subfoveal KNV retina yerinden ayrıldıktan sonra cerrahi olarak çıkarılabileceği gibi yerinde bırakılarak termal lazer ile tahrip edilebilir. Disloke edilen retina sağlıklı subretinal dokuların bulunduğu bir bölgeye yeniden yerleştirilerek 360 derece periferik endolazer uygulanmakta ve silikon yağı tamponadı ile yerine tutunması sağlanmaktadır (78).

5) Submaküler Cerrahi

Foveadaki retinal fotoreseptörler korunarak alttaki KNV uzaklaştırılması planlanmıştır. En önemli komplikasyon yüksek nüks veya persistan KNV' dir (79). Bu durum submaküler cerrahiyi sınırlandırmaktadır.

6) Antianjiogenik İlaçlar

Ranibizumab

Rekombinant monoklonal antikor teknolojisi ile üretilen, VEGF' in bütün izoformlarına bağlanabilen insan anti-VEGF antikor fragmanıdır. VEGF' in inhibisyonu ile etkisini gösterir. Rosenfield ve ark.' nın yaptığı çalışmada (80) güvenli ve maksimum tolere edilen tek intravitreal dozun 500 µg olduğu bulunmuştur. Ranibizumabın YBMD' li olgularda etkinliğini değerlendirmek üzere birçok klinik araştırma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda intravitreal ranibizumab uygulaması FDT ile karşılaştırılmış, ranibizumab tedavisi alan hastalarda hem görme kaybının azaldığı hemde anlamlı olarak görme keskinliğinin arttığı görülmüştür (81,82).

Bevacizumab

Metastatik kolon kanserleri ve küçük hücreli dışındaki akciğer kanserlerinin tedavisinde 2004 yılında FDA onayı almış bir ajandır. İnsan VEGF-A' nın tüm izoformlarını nötralize etmek için tasarlanmış ve fare epitoplalarının insana uyarlanması ile fareden VEGF' e karşı elde edilmiş monoklonal antikordur. Mayıs 2005 tarihinden beri intravitreal off-label olarak kullanılmaktadır. Genelde yapılan uygulama tek başına ya da kombine tedavilerde ilk doz uygulanıp aylık kontrollerde OKT ve muayene bulgularına göre KNV aktivitesi devam ediyorsa intravitreal tedaviyi sürdürmek şeklindedir. İntravitreal uygulama dozu 1.25- 2.5 mg aralığındadır. Yapılan çalışmalarda intravitreal bevacizumab uygulamasının görme düzeylerini anlamlı olarak arttırdığı gösterilmiştir (83).

Pegaptanip Sodyum

VEGF' in selektif antagonistidir. VEGF' in 165 aminoasitlik major patolojik izoformuna bağlanarak, bunun VEGF reseptörüne bağlanmasını engeller. VEGF' nin inhibisyonu ile, anjiogenezisi ve vasküler permeabiliteyi azaltarak etkinliğini gösterir. Önerilen tedavi şekli 0.3 mg pegaptanip sodyumun 6 hafta aralıklarla intravitreal enjeksiyon şeklinde uygulanmasıdır (84).

7) Steroid Bazlı Tedaviler

Triamsinolon Asetonid (TA)

Antiinflamatuvar ve anjiostatik etkiye sahip sentetik bir steroiddir. Anjiostatik etkisi iki yönlü mekanizma ile oluşur. İnflamasyonu, RPE migrasyonunu ve proliferasyonunu azaltır. Vasküler endotel hücre ekstrasellüler matriksinin yapımını da etkiler (85). Pilot çalışmalar intravitreal triamsinolonu (İVTA) eksudatif YBMD tedavisinde monoterapi olarak önermemişlerdir. Bunun için İVTA ile kombine edilen fotodinamik tedavi (FDT) çalışmaları başlatılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. İVTA' nın, YBMD ile ilişkili olan ve FDT tarafından indüklenen inflamatuvar reaksiyonu ve anjiogenezisi inhibe ederek görme kaybını azalttığı savunulmuştur (86).

Anekortav Asetat

Anjiostatik etkili sentetik bir kortikosteroiddir. Posterior subtenon enjeksiyon şeklinde uygulanır. Glukokortikoid aktivitesi yoktur. Damar büyümesi sırasında endotel hücre migrasyonu için gerekli olan ekstrasellüler proteazların inhibisyonu ile etki eder. Bu mekanizma, anjiogenik uyarının başlamasından bağımsız olduğu için diğer antianjiogenik ilaçların mekanizmasından bağımsızdır. Altı aylık aralıklarla posterior jukstaskleral subtenon enjeksiyon şeklinde uygulanan anekortav asetatin, subfoveal klasik KNV için etkili ve güvenli bir tedavi olarak FDT' ye alternatif olabileceği savunulmuştur (87).

8) Fotodinamik Tedavi

Verteporfin, fotodinamik tedavide kullanılan sentetik bir benzoporfirin türevidir ve sentetik fotosensitizan ajan olarak kullanılmaktadır. FDT, verteporfinin intravenöz enjeksiyonu ve 689 nm dalga boyunda termal olmayan kırmızı lazer ışını uygulanması şeklindedir. Hastaya, 6 mg/m² dozunda verteporfin 3 ml' yi geçmeyecek şekilde 10 dakikada enjekte edilmektedir. Enjeksiyondan 15 dakika sonra lazer uygulanır. Verteporfin plazma lipoproteinlerine bağlanır ve özellikle neovaskülarizasyon bölgelerinde birikir. Lazer ışını, kısa ömürlü siglet oksijen ve reaktif oksijen radikali açığa çıkarır. Bu radikaller, lökotrien- siklooksijenaz yolu üzerinde prokoagülan ve vazoaktif maddeleri açığa çıkarır ve yeni oluşan damarların endotel hücrelerinde hasara yol açarak vasküler oklüzyona neden olur.

Verteporfinin yarılanma ömrü 5-6 saattir. Büyük kısmı fekal yoldan, az bir bölümü idrar yoluyla atılmaktadır. Porfirisini olan veya maddenin içeriklerinden herhangi birisine hipersensitivitesi olan hastalarda kontrendikedir.

Bu bilgiler ışığında, mevcut diğer tedavi seçenekleri ile karşılaştırıldığında FDT ile istatistiksel olarak başarılı sonuçlar alınsa da FDT'nin uygulama alanının kısıtlılığı ve görme kaybını önleyememesi en önemli engelidir (88).

YAŞA BAĞLI MAKÜLA DEJENERASYONU ve GENETİK

YBMD İle İlişkili Genler

YBMD ile ilişkili genlerin araştırıldığı birçok bağlantı çalışmaları bulunmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda bazı kromozomal lokuslar, YBMD hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (89). YBMD hastalığı ile ilişkili bulunan genler ve kromozom üzerindeki lokusları:

ABCA4 (ATP Binding Cassette Sub-Family, Member 4) **geni: 1p21**

CFH (Complement Factor H) **geni: 1q23-32**

CX3XR1 (Chemokine (C-X3-C motif) Receptor 1) **geni: 3p21.3**

IL8 (Interleukin 8) **geni: 4q13-21**

C2 ve B (Complement Factor B) **genleri: 6p21.3**

VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor A) **geni: 6p21**

TLR4 (Toll- Like Receptor 4) **geni: 9q32-33**

ERCC6 (Excision Repair Cross-Complementing Rodent Repair Deficiency, Complementation Group 6) **geni: 10q11**

ARMS2 (Age-Related Maculopathy Susceptibility 2) ve *HTRA1* (HtrA Serine Peptidase 1) **geni: 10q26.2**

Serping1 (Serpine Peptidase Inhibitor, Clade G (C1 inhibitor), Member 1) **geni: 11q12-13.1**

C3 (Complement Factor C3) **geni: 19p13,**

ApoE (Apolipoprotein E) **geni: 19q13.2**

VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖR-A (VEGF)

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör-A (VEGF-A) Geni

Hem fizyolojik hem de patolojik anjiyogenezin yanı sıra lenfanjiogenez ve damar geçirgenliğinin düzenlenmesinde rol oynayan önemli faktörlerden biri de *VEGF* gen ailesi üyeleridir. *VEGF-A* geni, *VEGF* gen ailesinin bir üyesidir ve kromozom 6p21.3 üzerinde lokalizedir. *VEGF* gen ailesi içinde, VEGF-A dışında, VEGF -B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F ve plental büyüme faktörü olmak üzere 6 farklı üye de yer almaktadır. *VEGF-A* geni, genel olarak *VEGF geni* ile aynı anlamda kullanılmaktadır. *VEGF-A geni*, 7 intronla birbirinden ayrılmış 8 ekzona sahip bir genidir.

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör-A

Genin, aynı adı taşıyan ürünü olan VEGF, 45 kiloDalton (kD) büyüklüğündedir. İlk olarak 1980'lerin başında vasküler permeabilite faktörü olarak adlandırılan bu faktör, bir deneysel çalışma sırasında kobaylarda tümörün neden olduğu batındaki asit sıvısından izole edilmiştir (90). Molar cinsinden, vasküler geçirgenlikte histaminden 50.000 kat daha güçlü olduğu saptanmıştır. Vasküler permeabilite faktörü, ilk kez klonlandığı ve eksprese edildiği 1989 yılına kadar kısmi olarak tanımlanabilmiş ve bu tarihte güçlü bir in vitro endotelyal hücre büyüme stimülatörü ve in vivo neovaskülarizasyon stimülatörü olduğu gösterilmiştir (91). Bu araştırmalar sonrasında, vasküler permeabilite faktörü, VEGF olarak adlandırılmaya başlanmıştır.

VEGF, damar endotel hücrelerine özgü homodimer glikoprotein yapısında heparin bağlayan büyüme faktörüdür. VEGF' in retinadaki ana kaynağı RPE, Müller ve ganglion hücreleri ile perisitlerdir. VEGF RPE' nin koroide bakan tarafından salgılanır. Koryokapillarisin RPE'ye komşu kenarında bulunan reseptörleri üzerinden etkilidir. RPE' nin koroid üzerindeki trofik rolü VEGF ile ilişkilidir.

VEGF-A, VEGF gen ailesi içinde anjiyogenezle en güçlü ilişkisi olan ve üzerinde en çok çalışılan izoformdur. Hipoksi ile aktive olabilen tek VEGF üyesidir. VEGF-A'nın şu ana kadar tespit edilen 9 izoformu tanımlanmış olup, içerdikleri aminoasit sayısı göre VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF_{165b}, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ olarak adlandırılmaktadırlar. VEGF₁₆₅, bu izoformlar içinde en çok bulunan, anjiyogenezde ana rolü oynayan, hem hücre içi etkinliği hem

de hücre dışı matrikse bağlanma özelliği olan izoformdur. VEGF-A etkisini, pozitif anjiojenik etkisini VEGFR1; mitojenik, anjiojenik ve vasküler geçirgenlik artışı etkisini VEGFR2 resöptörlerine bağlanarak gösterir. Bu nedenle YBMD'de KNV önlenmesi ve tedavisinde en önemli moleküldür (92).

VEGF Salgılanması

RPE, müller hücreleri, ganglion hücreleri ve perisitler retinada, VEGF' in ana kaynağını oluşturmaktadır. Hipoksik ya da iskemik durumlar anjiyogenezin başlıca aktivatörleridir. *VEGF-A* gen ekspresyonunda ana düzenleyici, hipoksi ile indüklenen faktör-1 (HIF-1)'dir. Birçok büyüme faktörü, hipofiz hormonları, nitrik oksit, inflamatuvar sitokinler ve onkojenik mutasyonlar da *VEGF* ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynarlar (93,94).

VEGF, RPE ve koryokapillarisin arasında parakrin sinyal oluşturarak endotelial fenestrasyonu sağlar. RPE'nin koryokapillaris ile komşu olan taban kısmındaki VEGF salgısı, fotoreseptörlerle komşu olan tepe kısmına göre 2-7 kat daha fazladır. Bu farklılık hipoksik durumlarda daha da artar (95). İleri glukasyon son ürünleri, reaktif oksijen ara ürünleri ve hipoksi, RPE' den VEGF salınımını arttıran güçlü uyarıcılardır.

YBMD' de VEGF' in Rolü

KNV gelişiminden sorumlu en güçlü büyüme faktörü, VEGF' dir. YBMD'li gözlerde RPE' de VEGF artışı olduğu gösterilmiştir. Hayvan modellerinde de VEGF'in KNV gelişimindeki önemi ortaya konmuştur. Yapılan bir deneysel çalışmada, RPE'de VEGF-A üretiminin indüklenmesinin KNV gelişimi için yeterli olduğu gösterilmiştir (96). Bunun yanı sıra YBMD saptanan hastaların vitreusunda VEGF düzeyinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (97). Hipoksi durumunda VEGF salınımının abartılı bir şekilde arttığı gösterilmiştir.

VEGFR1 ve VEGFR2 reseptörlerince zengin koryokapillarisde VEGF' in endotelde lökositlerin endotele adezyonunu sağladığı tespit edilmiştir. Aktive makrofajlar ise proteolitik enzimler salgırlar ve incelmış olan Bruch membranını eritirler. Sonuç olarak da, koroidal kapillerlerin migrasyonunu kolaylaştırırlar (95).

Başka bir teoriye göre, bruch membranının artmış kalınlığı VEGF' in koriokapillarisine ulaşmasına engel olarak koriokapillarisin atrofisine yol açar. Böylece bruch membranından artıkların temizlenmesi azalacaktır. Hipoksi ve bruch membranı degradasyonu ile beraber VEGF oluşumu daha da stimüle edilecek ve KNV oluşumuna neden olacaktır (98).

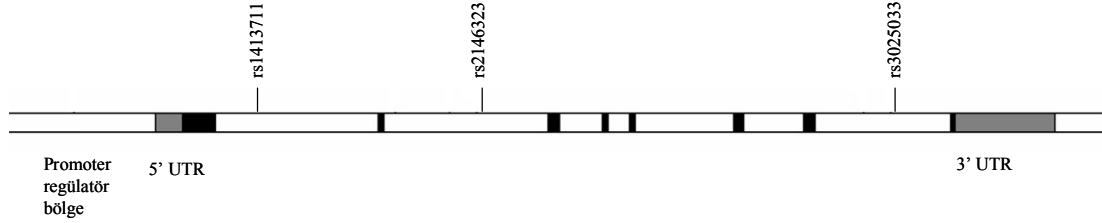
***VEGF-A* Tek Nükleotid Polimorfizm (SNP)' leri**

Polimorfizm, popülasyonun % 1'inden daha fazlasında görülen nükleotid değişim/lerini tanımlamada kullanılan genetik varyasyondur (89). Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) genom dizisindeki tek nükleotid değişimleridir. İnsan genomunda %0,1' lik yapısal farklılığın büyük kısmını SNP' ler oluştururlar. SNP'ler genlerin protein kodlayan ekzonlarında ve protein kodlamayan intronlarında bulunurlar. Genin ekzonlarındaki bir nükleotid değişimi aminoasidin farklı şekilde kodlanmasına neden olabilir ve aminoasidin yapısında farklılığa göre, proteinin hafiften şiddetliye kadar değişen oranlarda fonksiyon kaybına neden olabilir. Genomun çok küçük bir bölümü gen kodladığından, SNP'lerin çoğu gen kodlamayan bölgelere yerleşiktir. İntronik bölgelerde bulunan SNP'leri, bulunduğu genin mRNA stabilitesini etkileyebilirler veya transkripsiyon düzeyinde ekspresyonda azalmaya neden olabilirler. Gerek kodlayan bölgelerde gerekse kodlamayan bölgelerde var olan SNP' ler bireylerin hastalığa yatkınlık derecesini, aynı hastalığın farklı bireyler arasında neden farklı seyrettiğini, bireylerin neden tedaviye farklı şekilde yanıt verdiğini anlamada önemli veriler sağlamaktadırlar.

VEGF-A geninin promoter, 5'-untranslate bölgesi (5'-UTR), 3'-untranslate bölgesi (3'UTR) ve intronik bölgelerinde farklı polimorfizmlerin varlığı bildirilmiştir (9, 10, 99, 124).

Ruggiero ve ark. (99), *VEGF* geninde ekzonlar, intron-ekzon birleşim bölgeleri, promoter ve regülatör dizilerde bulunan toplam 77 SNP' leri (NCBI, Assembly GRCh37) dizi analizi yöntemi ile araştırmışlar ve çalışma popülasyonu içinde rs2146323'ün (intron 2'de) de yer aldığı 18 intronik SNP'lerinin (intron 1-6) varlığını belirlemişlerdir. *VEGF* geni SNP'lerden rs1413711 intron 1'de yer alırken,

rs3025033 intron 7’de yer almaktadır. YBMD ile ilişkili bazı SNP’lerin *VEGF* geni üzerindeki pozisyonları Şekil-1’de gösterilmiştir ve Tablo 1’de özetlenmiştir.



Şekil-1: *VEGF* geni yapısı ve YBMD ile ilişkili *VEGF* geni SNP’lerinden bazılarının pozisyonları

Tablo 1: YBMD’de incelenen *VEGF* geni intronik SNP’lerinden bazıları ve lokalizasyonları

SNP Lokalizasyonu	Referans SNP (rs) numarası	Kaynaklar
İntronik	rs1413711	Churchill(9), Almeida(117), Lin(10)
İntronik	rs2146323	Immomen (124)
İntronik	rs3025033	Immomen (124)

Sonuç olarak, *VEGF* genindeki intronik varyasyonların transkripsiyonu regüle edebileceği düşünülmektedir, ancak mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (9). Aynı zamanda, günümüzde yaş tip YBMD tedavisinde, VEGF üzerinden etki gösteren terapötik ilaçlar (ranibizumab, bevacizumab gibi) kullanılmaktadır. Hastaların tedavide verilecek olan anti-VEGF ajanlardan fayda görebilmesinin saptanabilmesi için, tedaviye yanıt ve SNP’ler arası ilişkinin araştırılabileceği çalışmalar faydalı olacaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Göz Hastalıkları polikliniğinde Mart 2011- Ocak 2012 tarihleri arasında muayenesi yapılan ardışık 82 YBMD'li olgu (Hasta Grubu) ve yaş-cins uyumlu 80 sağlıklı birey (Kontrol Grubu) çalışmaya dahil edildi.

Hasta grubunda rutin poliklinik muayenesi sonucu, en az bir gözünde YBMD tespit edilen 82 olgu çalışmaya alındı. Bu gruptaki hastaların seçiminde şu kriterlere uyuldu:

1. Biyomikroskopla yapılan göz dibi muayenesinde, incelenen gözde “YBMD” nin bulunması,
2. Diyabetes Mellitus olmaması,
3. Glokom olmaması,
4. YBMD dışında retinal ya da maküler göz hastalığının bulunmaması,
5. Koroid neovaskülarizasyonuna neden olabilecek durumların bulunmaması (anjioid streak, yoğun inflamasyon, oküler travma gibi)
6. >6 D üstü myopi olmaması,
7. Gönüllülerin 55 yaş ve üzerinde olması.
8. Rutin oftalmolojik muayeneyi engelleyecek düzeyde ortam opasitelerinin olması (Yoğun katarakt, vitreus hemorajisi, korneal opasite ve skar)

Kontrol grubunda ise Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Göz Hastalıkları Polikliniği' ne başvuran, 80 sağlıklı olgu çalışmaya alındı. Bu gruptaki hastaların seçiminde şu kriterlere uyuldu:

1. Biyomikroskopla yapılan göz dibi muayenesinde, her iki gözde “YBMD” ye ait bulguların bulunmaması,
2. Diyabetes Mellitus olmaması,
3. Glokom olmaması,
4. Göz dibi muayenesinde, retinal veya maküler hastalıkların bulunmaması,

5. Koroid neovaskularizasyonuna neden olabilecek durumların bulunmaması (anjioid streak, yoğun inflamasyon, oküler travma gibi)
6. >6 D üstü myopi olmaması,
7. Gönüllülerin 55 yaş ve üzerinde olması.
8. Rutin oftalmolojik muayeneyi engelleyecek düzeyde ortam opasitelerinin olmaması (Yoğun katarakt, vitreus hemorajisi, korneal opasite ve skar)

Tüm olguların sosyo- demografik verileri, hastalık öyküleri ve iris renkleri kaydedildikten sonra sırasıyla;

1. Ayrıntılı oftalmolojik muayene ile;
 - a) Otofrefraktometri ve otokeratometri ölçümleri (*Mrk-3100 keratometer, Mirae Optics Co Ltd, Korea*),
 - b) En iyi düzeltilmiş görme keskinliği değerlendirmesi (Snellen eşeli ve ETDRS LogMAR kartı (*Precision Vision, North Harvard Ave. Villa Park, USA*),
 - c) Dilatasyonlu fundus bakışı (+ 90 dioptri lens ile)

2. Hasta grubunun fundus fotoğrafları ve FFA görüntüleri kaydedilirken kontrol grubunun fundus fotoğrafları kaydedildi (*Topcon TRC- 50IX , Topcon Corporation Made in Japan*).

3. YBMD yaş, kuru ve bir gözünde kuru diğer gözünde yaş tip olan bireyler miks tip olarak belirlendi ve hastalar AREDS evreleme sistemine göre evrelendirildi (68).

4. Her iki gruba ait bireylerden, genomik DNA izolasyonunda kullanılmak üzere EDTA'lı tüplere 2 ml periferik kan örnekleri alındı.

5. İzole edilen genomik DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık değerleri belirlendi.

6. Gerçek-zamanlı PCR (Real-time PCR) kullanılarak rs1413711, rs2146323 ve rs3025033 SNP analizleri yapıldı.

Bu çalışma için, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı (Karar no: 21.12.10/08 sayı) alındı. Tüm katılımcılara uygulamaların ayrıntılı açıklamalarını içeren bilgilendirilmiş gönüllü olur formu okutularak, yazılı izinleri alındı.

Periferik Kan Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu

Periferik kan örneklerinden genomik DNA izolasyonları ticari kit yardımıyla yapıldı (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics, Almanya). DNA izolasyonu için uygulanan basamaklar, aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1. EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örneklerinden 200 µl periferik kan örneği alındı ve ependorf tüplerine aktarıldı.
2. 200 µl örneklere, kitle birlikte sağlanan 200 µl bağlama tamponu (Binding Buffer) ve 40 µl Proteinaz K eklenerek, 15 sn kuvvetlice vortekslendi (pulse-vorteks). Örnekler 70°C'de 10 dk inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası örneklere 100 µl isopropanol eklendi ve 15 sn kuvvetlice vortekslendi (pulse vorteks). Kısa bir santrifüj işlemi yapıldı.
4. Karışım, kitle sağlanan "spin kolon" tüplere aktarıldı ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Kolonlar, kitle sağlanan temiz toplama tüplerine yerleştirildi ve filtratı içeren bir önceki toplama tüpleri atıldı.
5. Dikkatlice spin kolonlar açıldı ve 500 µl inhibitör uzaklaştırma tamponu (Inhibitor Removal Buffer) eklendi. 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Kolonlar temiz toplama tüplerine yerleştirildi ve filtrat içeren toplama tüpleri atıldı.
6. Dikkatlice spin kolonlar açıldı ve 500 µl yıkama tamponu (Wash Buffer) eklendi. 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Kolonlar temiz toplama tüplerine yerleştirildi ve filtrat içeren toplama tüpleri atıldı.
7. Dikkatlice spin kolonlar açıldı ve 500 µl yıkama tamponu (Wash Buffer) eklendi. 8.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
8. Kolonlar tekrar temiz toplama tüplerine yerleştirildi ve filtrat içeren toplama tüpleri atıldı. 13.000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi.
9. Kolonlar steril mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi ve filtrat içeren toplama tüpleri atıldı. Kolonlara 200 µl elüsyon tamponu (Elution Buffer) (70°C) eklendi ve 8.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
10. Elde edilen DNA örnekleri, bir sonraki analiz aşamasına kadar -20 °C'de saklandı.

Genomik DNA örneklerinin konsantrasyonlarının ve saflık değerlerinin belirlenmesi

82 adet hasta grubu ile 80 adet kontrol grubunun periferik kan örneklerinden izole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık değerleri, spektrofotometrik yöntemle (Biophotometer, Eppendorf) belirlendi. Ölçümler sırasında tek kullanımlık spektrofotometre küvetleri (Eppendorf) kullanıldı.

Konsantrasyon ölçümü yapılmadan önce, steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde DNA örneklerinin 1/50 oranında dilüsyonları hazırlandı. Daha sonra hazırlanan örnekleri tek kullanımlık spektrofotometre küvetlerine aktarıldı. Konsantrasyon ölçümleri, spektrofotometrenin dsDNA programında gerçekleştirildi ve her örneğin "konsantrasyon, A260, A280 ve A260/280 değerleri" kaydedildi.

Gerçek-zamanlı PCR (Real-time PCR) ile SNP Analizleri

VEGF geni rs1413711, rs2146323 ve rs3025033 SNP analizleri, gerçek-zamanlı PCR sistemi (LightCycler 480, Roche, Almanya) kullanılarak yapıldı. Hedef rs1413711, rs2146323 ve rs3025033 SNP'lerine ait genotiplerin belirlenmesi amacıyla, sırasıyla 158 bp (baz pair=baz çifti), 200 bp ve 194 bp' lik DNA fragmanların çoğaltılmasında kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin dizaynı yapıldı (Genmar Laboratuvarı, İzmir). Kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri Tablo-2, 3 ve 4'te gösterildi.

Tablo-2: *VEGF* rs1413711 SNP analizinde kullanılan primer seti ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimi (5' → 3')

Forward (F) primer	5'-TGACAATATTCTCCCGGGACC-3'
Reverse (R) primer	5'-AGTGTGACCTTCAGAGGCC-3'
Prob 1 (FL-Prob)	5'-CTTCCAAGGCCAGGGGGCA-3'-FL*
Prob 2 (LC640 Prob)	**5'L640-AGGAGGGGCGGTTCTAGGCAGGCA-3'

* FL: Fluoresin, ** 640: LightCycler Red 640 Fluorasan boya.

Tablo-3: *VEGF* rs2146323 SNP analizinde kullanılan primer seti ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimi (5' → 3')

Forward (F) primer	5'-AAGCTTAGGGAAGTGCTTCAA-3'
Reverse (R) primer	5'-CTGCGCTGATAGACATCCAT-3'
Prob 1 (FL-Prob)	5'-TGTAATGCCACTCTTTGGAGCTT-3'-FL*
Prob 2 (LC640 Prob)	**5'L640-GAATCAGGCAAGTCCTTCC-3'

* FL: Floresin, ** 640: LightCycler Red 640 fluorasan boya.

Tablo-4: *VEGF* rs3025033 SNP analizinde kullanılan primer seti ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimi (5' → 3')

Forward (F) primer	5'-AAGACTTTGTGGGGATTTCCCTA-3'
Reverse (R) primer	5'-TTGGTTTCACATAGGGCCAA-3'
Prob 1 (FL-Prob)	5'-AGGGAAGTCCTTGGAGTGTCTCCCC-3'-FL*
Prob 2 (LC640 Prob)	**5'L640-CCCCAGCAATGTTCTTGTGGC-3'

* FL: Floresin, ** 640: LightCycler Red 640 fluorasan boya.

Gerçek-zamanlı PCR'da her bir SNP analizi için hazırlanan reaksiyon karışımları Tablo-5'te gösterildi. Her bir içerik belirtilen sıra ve miktarlarda ependorf tüpüne aktarıldı ve homojenize edildikten sonra 96 kuyulu mikroyellere 18 µl olacak şekilde paylaştırıldı. Her bir kuyuya 2 µl DNA örneği eklendi. Negatif kontrol için, DNA örneği yerine 2 µl 'PCR- grade' su kullanıldı. Örneklerin mikroyelle aktarılmasından sonra, mikroyellere özel kapatici ile kapatıldı ve SNP analizi için LightCycler® 480 gerçek-zamanlı PCR sistemine yerleştirildi.

Tablo-5: *VEGF* geni rs1413711, rs2146323, rs3025033 SNP analizleri için hazırlanan reaksiyon karışımları

Komponent	Ana konsantrasyon	Çalışma Konsantrasyonu	Final konsantrasyon	1x Hacim
H ₂ O	-	-	-	6.4 µl
MgCl ₂	25 mM	25 mM	3 mM	1.6 µl
F-primer	100 µM	5 µM	0.5 µM	2 µl
R-primer	100 µM	5 µM	0.5 µM	2 µl
FL-prob	20 µM	2 µM	0.2 µM	2 µl
LC640-prob	20 µM	2 µM	0.2 µM	2 µl
Enzim karışımı*	10 x	10 x	10 x	2 µl
DNA				2 µl

*: LightCycler FastStart DNA Master Hybprobe kiti (Roche Diagnostics, Almanya) kullanıldı.

Her üç SNP analizi için, özgün primer seti ve hibridizasyon problemlerinin erime derecesi (T_m ; temperature of melting) değerlerine ve bu setle çoğaltılacak hedef bölgenin büyüklüğüne göre, gerçek-zamanlı PCR protokolünün optimizasyon çalışmaları yapıldı. İlk olarak primer setleri yardımı ile hedef bölgenin amplifikasyonu sağlandı. Daha sonra ampliconun identifikasyonu için erime eğri analizi (melting curve analysis) yapıldı. Bunun için, LightCycler 480 Software’i (Version 1.5) kullanılarak öncelikle her örneğin ısı (T)’ye göre fluorasan sinyali (F) grafiği elde edildi ve sonrasında F’ nin T ’ye göre negatif türevi ($-dF/dT$) alınarak erime eğrisi oluşturuldu ve amplicona özgün T_m ’leri belirlendi. *VEGF* geni rs1413711 ve rs2146323 SNP analizleri için optimize edilen gerçek-zamanlı PCR protokolleri Tablo-6’da; rs3025033 SNP için ise Tablo-7’de verildi.

Tablo-6: *VEGF* geni rs1413711 ve rs2146323, SNP analizleri için gerçek-zamanlı PCR protokolü

Denatürasyon		Döngü			Erime			Soğuma
Parametre								
Analiz modu	Yok	Kantitasyon modu			Erime Eğrisi modu			Yok
Döngü	1	45			1			1
Hedef (°C)	95	95	56	72	95	40	85	40
Süre	10dk	10 sn	10 sn	10 sn	30 sn	45 sn	0	30 sn
Artış (°C/s)	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	-	1.5
Kazanım Modu	Yok	Yok	Tek	Yok	Yok	Yok	Sürekli	Yok
Kazanım (°C)	-	-	-	-	-	-	5	-

Tablo-7: *VEGF* geni rs3025033 SNP analizi için gerçek-zamanlı PCR protokolü

Denatürasyon		Döngü			Erime			Soğuma
Parametre								
Analiz modu	Yok	Kantitasyon modu			Erime Eğrisi modu			Yok
Döngü	1	40			1			1
Hedef (°C)	95	95	56	72	95	40	85	40
Süre	10dk	10 sn	10 sn	10 sn	30 sn	45 sn	0	30 sn
Artış (°C/s)	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	-	1.5
Kazanım Modu	Yok	Yok	Tek	Yok	Yok	Yok	Sürekli	Yok
Kazanım (°C)	-	-	-	-	-	-	12	-

İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için *SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 14.0* programı kullanıldı. Hasta ve kontrol grubu için *VEGF* geni rs 1413711, rs 2146323 ve rs3025033 polimorfizmlerine ait genotipler arasındaki ilişki *Pearson Ki- Kare* testi kullanılarak analiz edildi. Ayrıca kontrol grubu referans alınarak %95 güven aralığında *Odds Ratio* değerleri hesaplandı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya, hasta grubu olarak, 45'i erkek (% 54,9), 37'si kadın (% 45,1) 82 YBMD' li hasta dahil edilirken; kontrol grubu olarak 40' ı erkek (% 50), 40' ı kadın (% 50) 80 birey dahil edildi. Hastaların yaş ortalamaları, hasta grubunda $71,6 \pm 5,37$, kontrol grubunda $62,8 \pm 5,22$ idi. Gruplar arasında yaş ve cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$). Grupların yaş ve cinsiyet özellikleri Tablo-8 ile özetlenmiştir.

Tablo-8: Grupların yaş ve cinsiyet özellikleri

	Hasta grubu	Kontrol grubu	P değeri
Yaş(yıl, ort \pmSD)	$71,6 \pm 5,37$	$62,8 \pm 5,22$	$>0,05$
Erkek n (%)	45 (% 54,9)	40 (% 50)	$>0,05$
Kadın n (%)	37 (% 45,1)	40 (% 50)	

SD=Standard deviasyon; ort=ortalama; n=olgu sayısı; $p < 0,05$ =istatistiksel anlamlılık.

İris renkleri bakımından değerlendirildiğinde hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$). Grupların iris renk özellikleri Tablo-9'da özetlenmiştir.

Tablo-9: Grupların iris renk özellikleri

İris rengi	Hasta grubu n (%)	Kontrol grubu n (%)	P değeri
Kahverengi	50 (% 61)	49 (%61,3)	$>0,05$
Yeşil	3 (%3,7)	6 (%7,5)	
Mavi	11 (%13,4)	3 (%3,8)	
Ela	18 (%22)	22 (%27,5)	

n=olgu sayısı; $p < 0,05$ =istatistiksel anlamlılık

Çalışmaya dahil edilen gözlerin ortalama görme düzeyleri hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktü ($p < 0,05$). Hasta grubu ile kontrol grubu arasında lens özellikleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı

($p<0,05$). Tablo-10'da grupların görme düzeyleri ve lens özellikleri karşılaştırılmıştır.

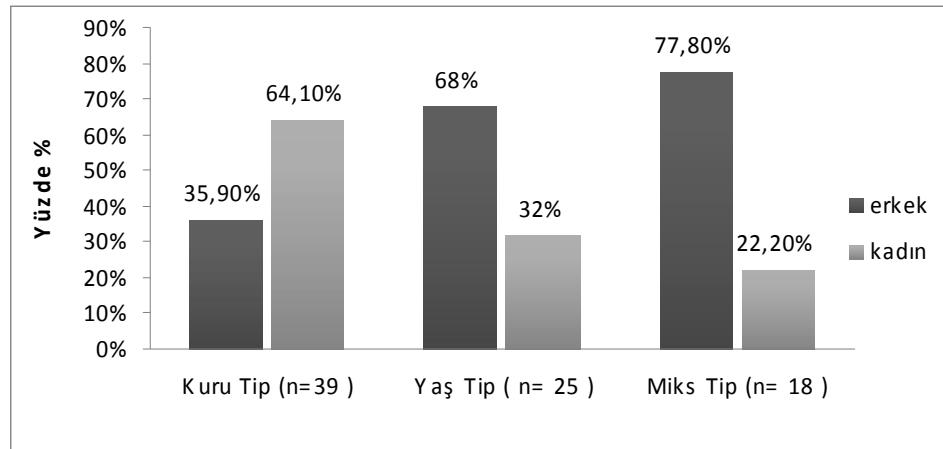
Tablo-10: Grupların görme düzeyleri ve lens özellikleri

	Hasta grubu n= 164	Kontrol grubu n=160	P değeri
Görme düzeyi (ort±SD)	0,39± 0,34	0,94±0,11	<0,05
Lens			
Fakik	85 (%51,8)	143(%88,4)	<0,05
Psödo fakik	79 (%48,2)	17 (%12,6)	
Afakik	0 (%0)	0 (%0)	

SD=Standard deviasyon; ort=ortalama; n=göz sayısı; $p< 0,05$ =istatistiksel anlamlılık

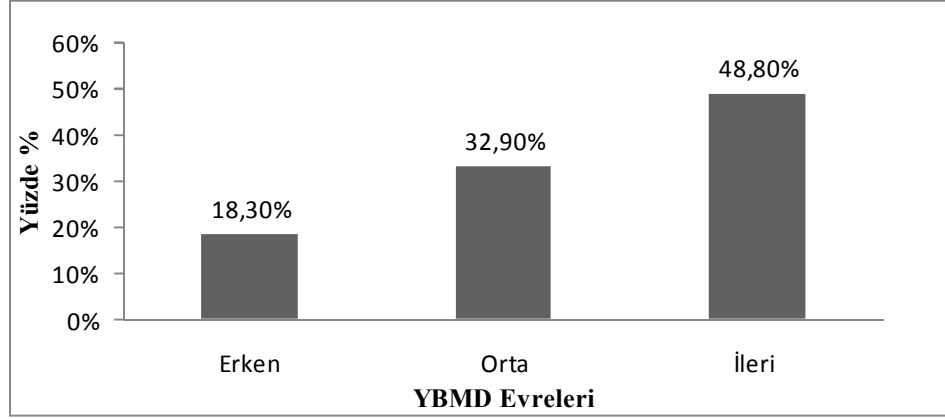
Çalışmaya dahil edilen 164 gözün 96'sında kuru tip (%58,3), 68'inde (%41,7) yaş tip saptandı. Hasta grubundaki YBMD olgularının tipleri cinsiyete göre sınıflandırıldığında 39 kuru tip olgunun 14'ü erkek (%35,9) iken 25'i kadın (%64,1); 25 yaş tip olgunun 17'si erkek (%68), 8'i kadın (%32) ve 18 miks tip olgunun 14'ü erkek (%77,8), 4'ünün kadın (%22,2) olduğu saptandı (Şekil-2).

Şekil-2: YBMD tiplerinin cinsiyete göre dağılımı



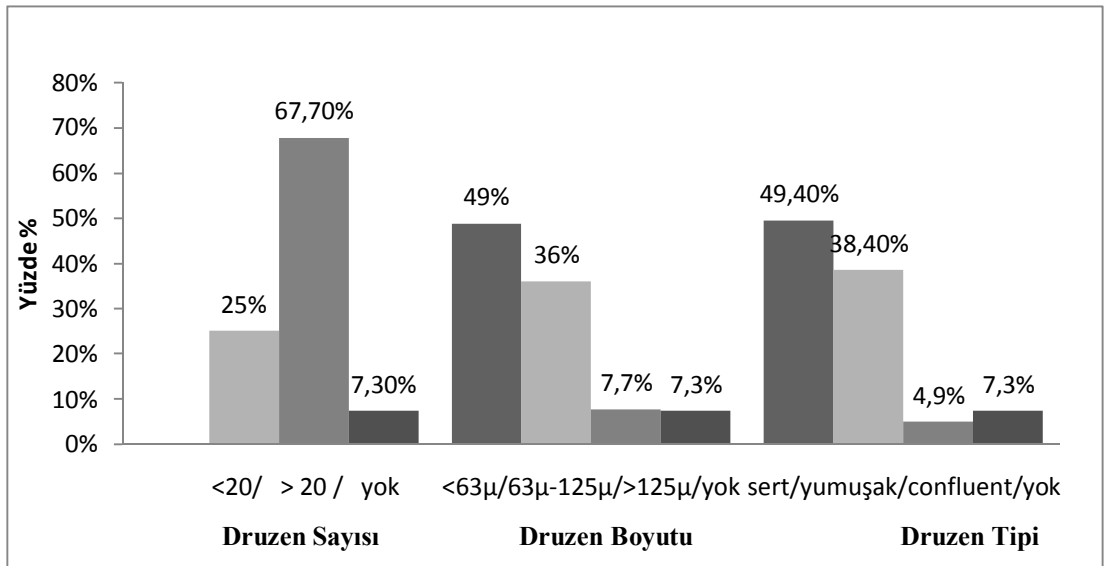
Çalışmaya dahil edilen hasta grubundaki olguların gözleri YBMD evresine göre sınıflandırıldığında 30 gözde erken evre (% 18,3), 54 gözde orta evre (%32,9) ve 80 gözde ileri evre (%48,8) YBMD olduğu saptandı. (Şekil-3)

Şekil-3: YBMD' li olguların klinik evrelere göre dağılımı



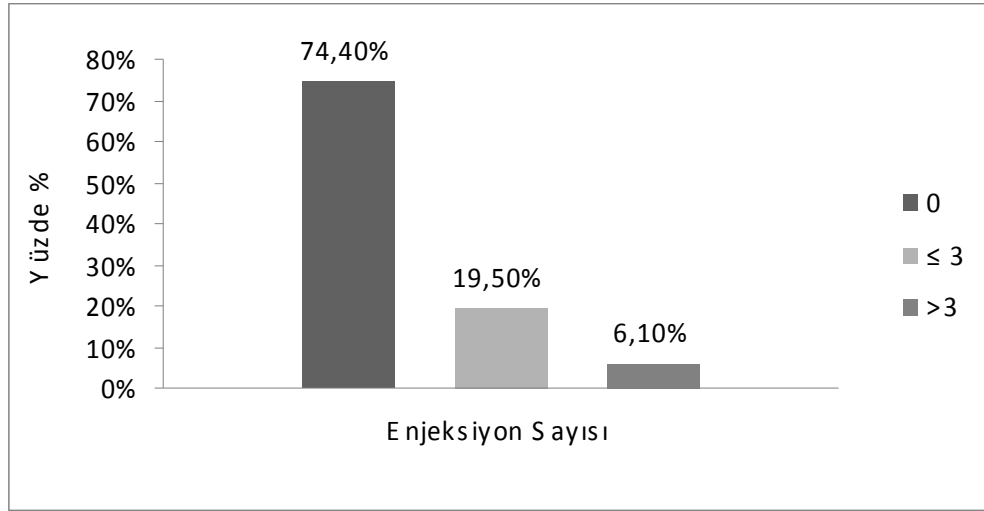
Hasta grubundaki gözler druzen sayısı, boyutu ve tipi açısından değerlendirildiğinde druzen sayısı 41 gözde (%25) 20'nin altında, 111 gözde (%67,7) 20'nin üzerinde saptandı, 12 gözde (%7,3) ise druzen saptanmadı. Çalışmaya dahil edilen gözler druzen boyutuna göre incelendiğinde 80 gözde (%49) 63µ altında, 53 gözde (%36) 63 µ ve 125µ arasında, 9 gözde (% 7,7) 125 µ ve üzerinde saptandı. Druzen tipleri sert, yumuşak ve confluent olarak sınıflandırıldığında ise sırasıyla oranları 81 göz (%49,4), 63 göz (38,4), 8 göz (% 4,9) olarak saptandı (Şekil-4).

Şekil- 4: Druzen sayısı, boyutu ve tipinin hasta grubundaki gözlere göre dağılımı



Hasta grubundaki olguların intravitreal anti-VEGF enjeksiyon bilgileri incelendiğinde 61 olguya (%74,4) hiç enjeksiyon yapılmadığı, 16 olguya (%19,5) 3 ve altında enjeksiyon yapıldığı, 5 olguya (%6,1) ise 3 üzerinde enjeksiyon yapıldığı tespit edildi (Şekil- 5).

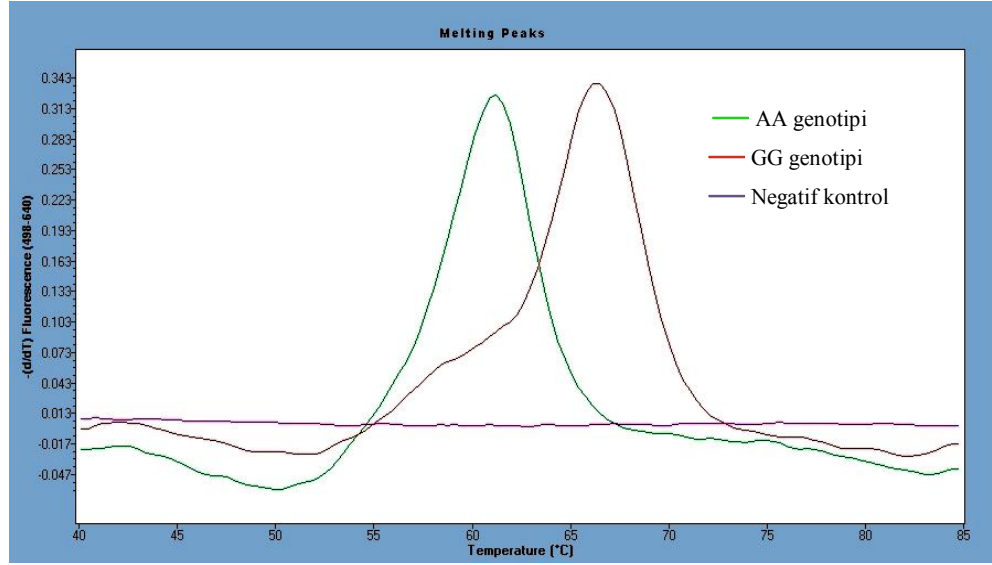
Şekil- 5: Hasta grubunda yapılan intravitreal enjeksiyon sayılarının dağılımı



Gerçek-zamanlı PCR ile rs1413711 SNP Analizi

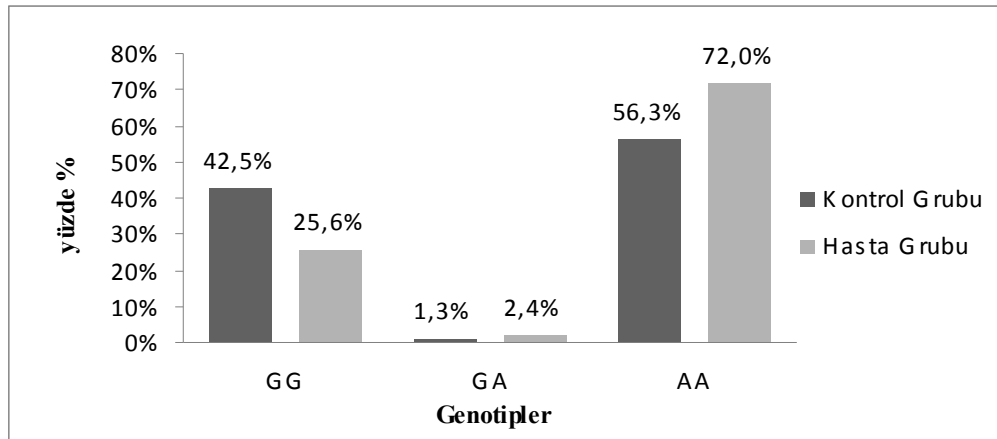
VEGF geni intron 1’de yer alan ve hedef SNP’yi içeren 158 bp’lik amplicon çoğaltıldıktan sonra, ampliconun identifikasyonu erime eğrisi analizi (LightCycler 480 Software, version 1.5) ile yapıldı. Buna göre rs1413711 SNP için sadece 61°C’de erime eğrisi gözlenen örneklerin AA genotipine ve sadece 67°C’de erime eğrisi gözlenen örneklerin GG genotipine (wild-type) sahip oldukları belirlendi (Şekil-6). Hem 61°C hem de 67°C’de erime eğrisi gözlenen örneklerin de GA genotipine sahip oldukları belirlendi.

Şekil-6: *VEGF* geni rs1413711 SNP analizine özgün erime eğrisi



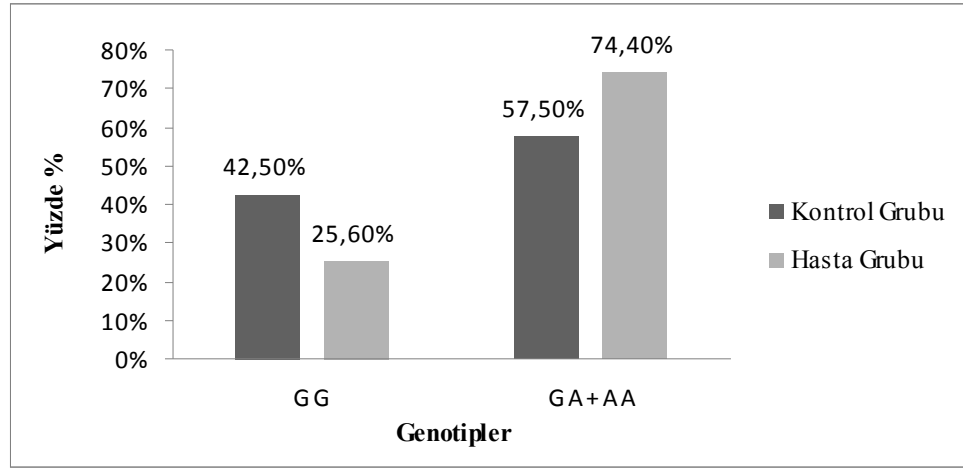
Kontrol grubu değerlendirildiğinde, *VEGF* geni rs1413711 SNP için GG, GA ve AA genotipine sahip birey sayıları sırasıyla 34 (%42.5), 1 (%1.3) ve 45 (%56.3) olarak belirlenirken, olgu grubunda ise *VEGF* geni rs1413711 SNP için GG, GA ve AA genotipine sahip birey sayıları sırasıyla 21 (%25.6), 2 (%2.4) ve 59 (%72) olarak belirlendi (Şekil-7). Kontrol ve olgu grubu birlikte değerlendirildiğinde, rs1413711 SNP'ne özgü genotipler arasında istatistiksel bir anlamlılık belirlenemedi ($p=0.072$).

Şekil-7: Hasta ve kontrol grubunda *VEGF* geni rs1413711 SNP'ye özgün genotiplerin dağılımı



En azından tek bir allelde nükleotid değişiminin gözlemlendiği genotipler birlikte değerlendirildiğinde, kontrol grubunda GG ve GA+AA genotipleri sırasıyla 34 (%42.5) ve 46 (%57.5) bireyde gözlenirken, olgu grubunda ise bu genotipler sırasıyla 21 (%25.6) ve 61 (%74.4) olguda gözlemlendi (Şekil-8).

Şekil-8: Hasta ve kontrol grubunda *VEGF* geni rs1413711 SNP'ye özgün GG ve GA+AA genotiplerinin dağılımı



Kontrol ve olgu grubu birlikte değerlendirildiğinde, rs1413711 SNP'ne özgü GG ve GA +AA genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptandı ($p=0.023$) (Tablo-11).

Tablo-11: Kontrol grubu ve YBMD'li olgu gruplarında *VEGF* geni rs1413711 SNP'ye özgü genotipler ve görülme sıklıkları

rs1413711	Genotip görülme sıklığı (n-%)		P Değeri
	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	
GG	34 (%42.5)	21 (%25.6)	p = 0.023
GA + AA	46 (%57.5)	61 (%74.4)	

n= olgu sayısı; $p < 0,05$: istatistiksel anlamlılık; A: Adenin, G: Guanin

YBMD'li olgu grubu klinik olarak tiplendirildiğinde, kuru tip YBMD'li olgularda *VEGF* geni rs1413711 SNP için GG, GA ve AA genotipine sahip birey

sayıları sırasıyla 4 (%10.3), 2 (%5.1) ve 33 (%84.6) olarak belirlenirken, yaş tip YBMD'li olgularda GG ve AA genotipli birey sayıları sırasıyla 10 (%40.) ve 15 (%60) olarak belirlendi. Her iki klinik tipe sahip miks olgularda ise GG ve AA genotipli birey sayıları sırası ile 7 (%38.) ve 11 (%61.1) idi. *VEGF* geni rs1413711 SNP'i ve YBMD'nin klinik tipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu (p=0.030) (Tablo-12).

Tablo-12: YBMD'li olgu grubu klinik tiplerinde *VEGF* geni rs1413711 SNP'ye özgü genotipler ve görülme sıklıkları

rs1413711	Genotip görülme sıklığı (n-%)			P Değeri
	Kuru Tip	Yaş Tip	Miks Tip	
GG	4 (%10.3)	10 (%40)	7 (%38.9)	p = 0.030
GA	2 (%5.1)	0 (%0)	0 (%0)	
AA	33(%84.6)	15 (%60)	11 (%61.1)	

n: olgu sayısı; p<0,05: istatistiksel anlamlılık; A: Adenin, G: Guanin

VEGF geni rs1413711 SNP genotipleri ve YBMD'nin klinik tipleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre GA+AA genotip varlığının kuru tip YBMD riskini arttırdığı belirlenirken (OR= 6.28), yaş ve miks tip YBMD bulunan olgularda benzer ilişki saptanmadı (sırasıyla OR= 1.08 ve 1.13) (Tablo-13).

Tablo-13: *VEGF* geni rs1413711 SNP genotiplerinin dağılımı ve YBMD klinik tipleri ile kontrol grubu arasındaki ilişkinin %95 güven aralığı ile odds ratio (OR) değerleri

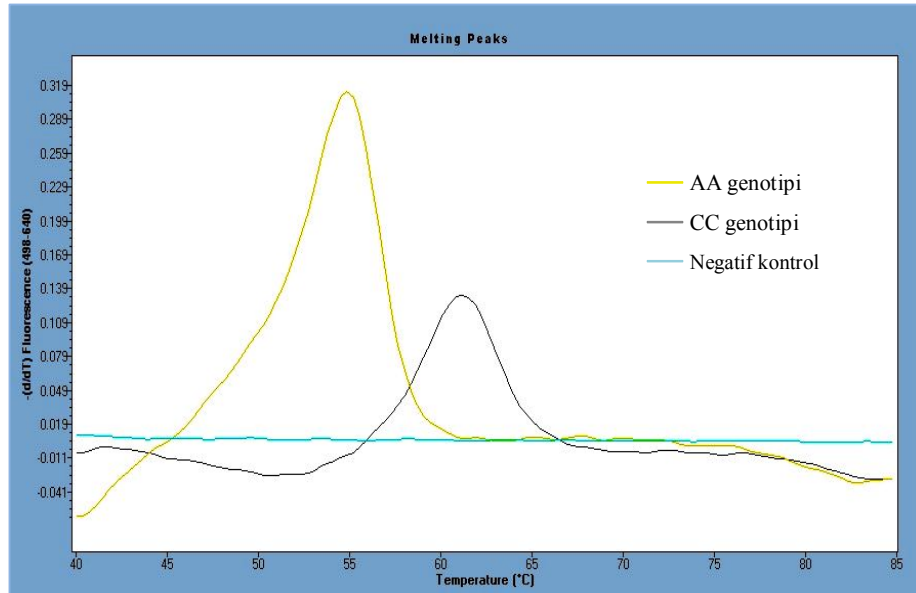
	Genotip görülme sıklığı (n-%)		OR(%95 GA)
	GA+AA	GG	
Kontrol	46 (%58,2)	33 (%41,8)	Referans
Yaş Tip	15 (%60)	10 (%40)	1,08 (0,43-2,69)
Kuru Tip	35 (%89,7)	4 (%10,3)	6,28 (2,03-19,3)
Miks Tip	11 (%61,1)	7 (%38,9)	1,13 (0,40-3,21)

n: olgu sayısı; OR: odds ratio; %95 GA: %95 güven aralığı >1 veya <1 ; istatistiksel olarak anlamlılık; A: Adenin, G: Guanin

Gerçek-zamanlı PCR ile rs2146323 SNP Analizi

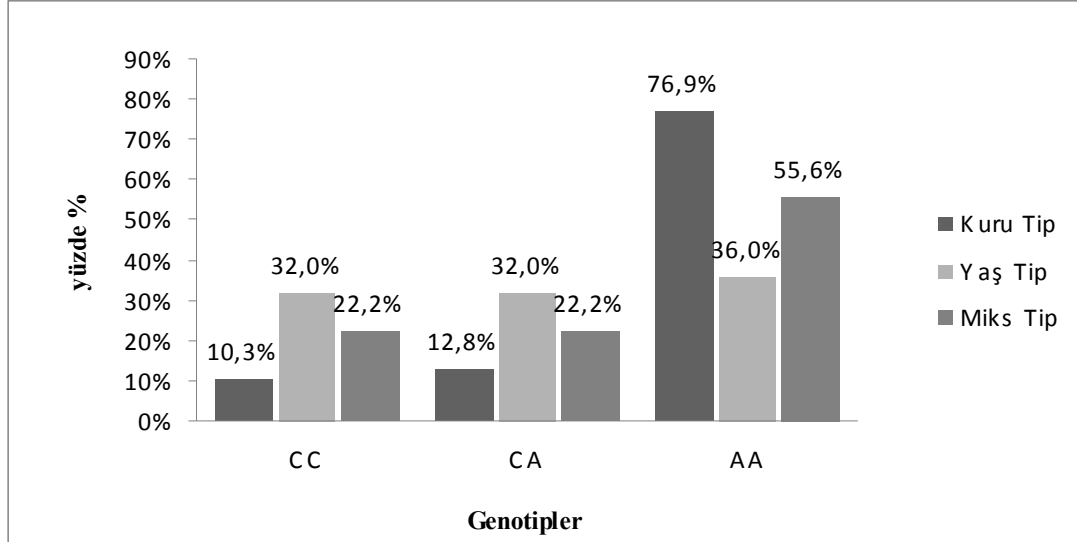
VEGF geni intron 2’de yer alan ve hedef SNP’ yi içeren 200 bp’lik amplicon çoğaltıldıktan sonra, ampliconun identifikasyonu erime eğrisi analizi (LightCycler 480 Software, version 1.5) ile yapıldı. Buna göre rs2146323 SNP için sadece 55°C’de erime eğrisi gözlenen örneklerin AA genotipine ve sadece 62°C’de erime eğrisi gözlenen örneklerin CC genotipine (wild-type) sahip oldukları belirlendi (Şekil-9). Hem 55°C hem de 62°C’de erime eğrisi gözlenen örneklerin de CA genotipine sahip oldukları belirlendi.

Şekil- 9: *VEGF* geni rs2146323 SNP analizine özgün erime eğrisi



YBMD’li olgu grubu klinik olarak tiplendirildiğinde, kuru tip YBMD’li olgularda *VEGF* geni rs2146323 SNP için CC, CA ve AA genotipine sahip birey sayıları sırasıyla 4 (%10.3), 5 (%12.8) ve 30(%76.9) olarak belirlenirken, yaş tip YBMD’li olgularda ise bu genotipler sırasıyla 8 (%32), 8 (%32) ve 9 (%36) olguda belirlendi. Her iki klinik tipe sahip miks olgularda ise bu genotiplere sahip olgu sayıları sırası ile 4 (%22.2), 4 (%22.2) ve 10 (%55.6) idi (Şekil-10).

Şekil-10: YBMD'li olgu grubu klinik tiplerinde *VEGF* geni rs2146323 SNP'ye özgü genotipler ve görülme sıklıkları



VEGF geni rs2146323 SNP'i ve YBMD' nin klinik tipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ($p=0.028$) (Tablo-14).

Tablo-14: YBMD'li olgu grubu klinik tiplerinde *VEGF* geni rs2146323 SNP'ye özgü genotipler ve görülme sıklıkları

rs2146323	Genotip görülme sıklığı (n-%)			P Değeri
	Kuru Tip	Yaş Tip	Miks Tip	
CC	4 (%10,3)	8 (%32)	4 (%22.2)	p = 0.028
CA	5 (%12,8)	8 (%32)	4 (%22.2)	
AA	30 (%76,9)	9 (%36)	10 (%55.6)	

n: olgu sayısı; $p<0,05$: istatistiksel anlamlılık; C: sitozin, A: Adenin

VEGF geni rs2146323 SNP genotipleri ve YBMD' nin klinik tipleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre CA+AA genotip varlığının kuru tip YBMD riskini arttırdığı belirlenirken (OR= 4,38), yaş ve miks tip YBMD bulunan olgularda benzer ilişki saptanmadı (sırasıyla OR= 1,06 ve 1.75) (Tablo-15).

Tablo-15: *VEGF* geni rs2146323 SNP genotiplerinin dağılımı ve YBMD klinik tipleri ile kontrol grubu arasındaki ilişkinin %95 güven aralığı ile odds ratio (OR) değerleri

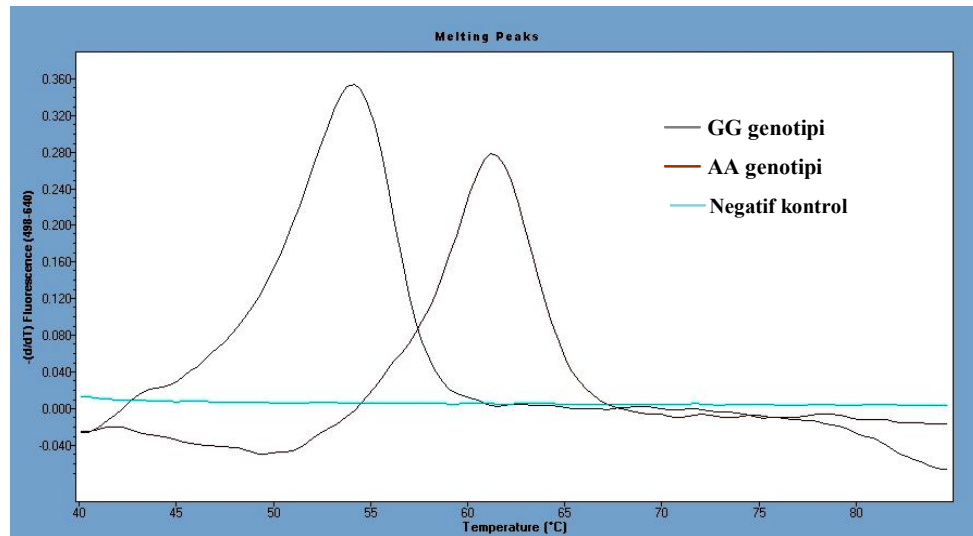
	Genotip görülme sıklığı (n-%)		OR(%95 GA)
	CA+AA	CC	
Kontrol	52 (%66,7)	26 (%33,3)	Referans
Yaş Tip	17 (%68)	8 (%32)	1,06 (0,41-2,8)
Kuru Tip	35 (%89,7)	4 (%10,3)	4,38 (1,40-13,63)
Miks Tip	14 (%77,9)	4 (%22,2)	1,75 (0,52-5,85)

n: olgu sayısı; OR: odds ratio; %95 GA: %95 güven aralığı >1 veya <1 ; istatistiksel olarak anlamlılık; C: sitozin, A: Adenin

Gerçek-zamanlı PCR ile rs3025033 SNP Analizi

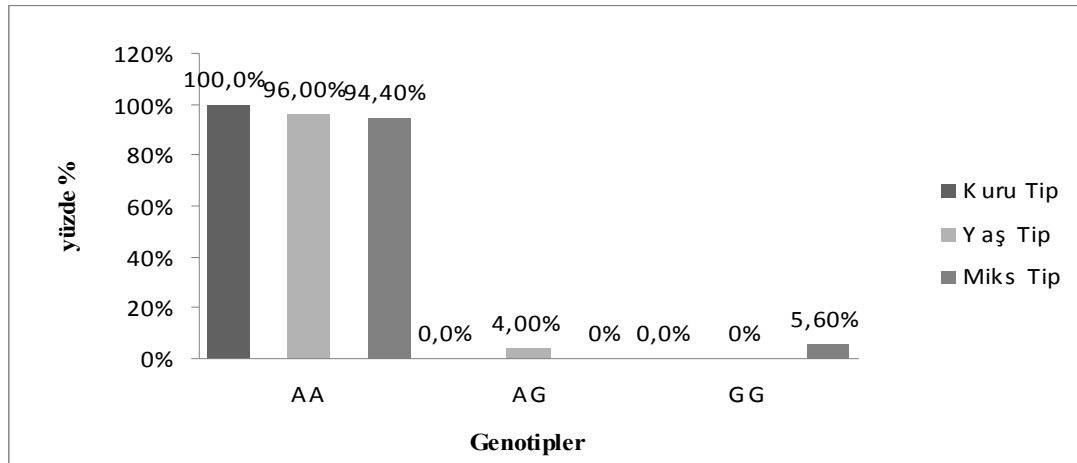
VEGF geni intron 7’de yer alan ve hedef SNP’yi içeren 194 bp’ lik ampikon çoğaltıldıktan sonra, ampikonun identifikasyonu erime eğrisi analizi (LightCycler 480 Software, version 1.5) ile yapıldı. Buna göre rs3025033 SNP için sadece 54°C’de erime eğrisi gözlenen örneklerin GG genotipine ve sadece 62°C’de erime eğrisi gözlenen örneklerin AA genotipine (wild-type) sahip oldukları belirlendi (Şekil-11). Hem 54°C hem de 62°C’de erime eğrisi gözlenen örneklerin de AG genotipine sahip oldukları belirlendi

Şekil- 11: *VEGF* geni rs3025033 SNP analizine özgün erime eğrisi



YBMD' li olgu grubu klinik olarak tiplendirildiğinde, *VEGF geni* rs3025033 SNP için kuru tip YBMD' li olguların tümünün AA genotipine sahip oldukları belirlendi (n=39). Yaş tip YBMD olgularda ise AA ve AG genotipine sahip birey sayıları sırasıyla 24 (%96) ve 1 (%4) olarak belirlenirken, her iki klinik tipe sahip miks olgularda ise AA ve GG genotipli bireylerin sayıları sırası ile 17 (%94.4) ve 1 (%5.6) idi (Şekil-12).

Şekil-12: YBMD'li olgu grubu klinik tiplerinde *VEGF geni* rs3025033 SNP' ye özgü genotipler ve görülme sıklıkları



VEGF geni rs3025033 SNP' i ve YBMD' nin klinik tipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (p=0.208). (Tablo-16)

Tablo-16: YBMD'li olgu grubu klinik tiplerinde *VEGF geni* rs3025033 SNP' ye özgü genotipler ve görülme sıklıkları

rs3025033	Genotip görülme sıklığı (n-%)			P Değeri
	Kuru Tip	Yaş Tip	Miks Tip	
AA	39 (%100)	24 (%96)	17 (%94.4)	p= 0.208
AG	0 (%0)	1 (%4)	0 (%0)	
GG	0 (%0)	0 (%0)	1 (%5.6)	

n: olgu sayısı; p<0,05: istatistiksel anlamlılık; A: Adenin, G: Guanin

TARTIŞMA

YBMD, özellikle gelişmiş ülkelerde yaşam süresinin uzamasıyla beraber santral, kalıcı görme kaybının önemli bir nedeni olup 65 yaş üzerinde körlüğün en yaygın sebebinin oluşturmaktadır (1,2). YBMD' ye bağlı ileri görme kayıplarının %10-20'sinden atrofik tip sorumludur. Eksüdatif tip, YBMD' nin %10'unu oluşturmaya karşın legal körlüklerin %80-90' ından sorumlu olup koroidden kaynaklanan yeni damarların (KNV) Bruch membranını geçerek subretinal aralığa doğru ilerleyip bu bölgede fibrovasküler kompleks oluşturmasıyla karakterizedir (12-15).

KNV gelişiminden sorumlu en güçlü büyüme faktörü, VEGF'dir. VEGF-A, VEGF gen ailesi içinde anjiyogenezle en güçlü ilişkisi olan ve üzerinde en çok çalışılan izoformdur. Hipoksi ile aktive olabilen tek VEGF üyesidir. VEGF-A, pozitif anjiyojenik etkisini VEGFR1 reseptörüne; mitojenik, anjiyojenik ve vasküler geçirgenlik artışı etkisini de VEGFR2 reseptörüne bağlanarak gösterir. Bu nedenle VEGF, YBMD' de KNV önlenmesi ve tedavisinde en önemli moleküldür (92).

YBMD insidansını belirlemek adına birçok çalışma yapılmıştır. Klein ve ark. (19) yaşları 43 ile 86 arasında değişen 3583 kişilik popülasyon üzerinde yaptıkları Beaver Dam çalışmasında erken YBMD'nin 43-54 yaşları arasında %3,9; 75 yaş ve üzerinde %22,8; geç YBMD' nin 5 yıllık insidansının tüm yaş gruplarında %0,9; 75 yaş ve üzerinde %5,4 olarak bildirilmiştir. Vinding'in (3) yaşları 60-80 arasında değişen 1000 birey üzerinde yapmış olduğu çalışmada YBMD prevalansının 60-64 yaş arasında % 2,3; 65-69 yaş arasında % 5,9; 70-74 yaş arasında % 12,1 ve 75-80 yaş arasında ise % 27,3 olarak tespit etmiştir. Yapılan çalışmalar, YBMD görülme sıklığının yaşla birlikte anlamlı oranda artış gösterdiğini ortaya koymuştur.

Bizim çalışmamızda da hasta ve kontrol grubundaki bireylerin 55 yaş üzerinde olması amaçlanmış ve daha genç hastalarda YBMD tespit edilse bile çalışmaya

alınmamışlardır. Çalışmamızda hasta ve kontrol grubunun ortalama yaşları sırasıyla $71,6 \pm 5,37$ ve $62,8 \pm 5,22$ olmakla birlikte ve her iki grubun yaşları arasında anlamlı fark vardı. Çalışmamızda, kontrol grubunun yaş ortalamasının daha düşük olması, olgularımızın çalışmaya dahil edilme kriterlerinin detaylı olarak belirlenmesi nedeniyle olabilir. Doğrudan ileri yaşla ilişkili olan YBMD hastalığı ile beraber ileri yaş grubunda daha sık görülen sistemik hastalıkların dışlanmış olması kontrol grubunda yaş ortalamasının daha düşük olmasını açıklayabilir.

YBMD’de cinsiyetin risk faktörü olup olmadığı konusunda çeşitli sonuçlar vardır. Framingham çalışmasında (4), orta-ağır YBMD’nin kadınlarda daha sık olduğu bulunmuştur. Beaver Dam çalışmasında (2) erken YBMD insidansının 75 yaş üstünde kadınlarda erkeklerden 2,2 kat sık olduğu görülmüştür. Frank ve ark. yaptığı çalışmada ise cinsiyet arasında fark olmadığı tespit edilmiştir (35).

Bizim çalışmamız prevalans çalışması olmamakla birlikte, YBMD grubu ile kontrol grubundaki bireyler cinsiyet dağılımı bakımından kontrol grubuna göre istatistiksel olarak fark göstermemekteydi.

İris renginin YBMD prevalansı ile ilişkisine dair çalışmalar literatürde yer almaktadır. Melaninin; ışık ile oluşan oksidatif hasara karşı koruyucu özelliği olabileceği belirtilmiştir. Bu durumun melaninin antioksidan etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Frank ve ark.’nın (35) çalışmasında açık göz rengine (mavi, ela) sahip bireylerde YBMD riskinin anlamlı oranda arttığı gösterilmiştir. Khan ve ark.’nın (100) 446 ileri YBMD hastasını 283 kişilik kontrol grubu ile karşılaştırdıkları çalışmada iris rengi ile YBMD arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.

Bizim çalışmamızda, hasta ve kontrol grubu iris renkleri açısından kıyaslandığında anlamlı fark olmadığı tespit edildi ($p > 0,05$). Bu durum; Türk populasyonunda kahverengi göz renginin fazla olmasından ya da çalışmaya dahil

edilen birey sayısının az olmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu konunun aydınlatılması için hasta ve kontrol sayısının artırıldığı daha geniş çalışmaların Türk populasyonunda yapılması uygun olacaktır.

Yapılan çalışmalarda kataraktlı lensin ultraviyole ışınlarına bariyer etkisinin ortadan kalkması, cerrahi sonrası gelişen inflamasyon etkisi ile YBMD progresyonunu hızlandırdığı düşünülmektedir. Lundgwist ve ark. (35) ile Wang ve ark. (36); yapmış oldukları ayrı ayrı çalışmalarda katarakt cerrahisi geçirmiş olan kişilerde YBMD sıklığının arttığını ortaya koymuşlardır.

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da bireylerin lens özellikleri dikkate alındığında; literatüre uygun olarak YBMD grubunda katarakt cerrahisi geçirme öyküsünün kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi.

Age- Related Eye Disease Study (AREDS) grubu YBMD'yi, progresyon açısından düşük, orta ve yüksek riskli kategorilere ayırırken kullanılan kriterlerin başında druzen sayı, tipi ve boyutu gelmektedir. Yapılan prevelans çalışmalarında YBMD hastalarında tespit edilen druzenlerin sayısı, boyutu ve tipiyle ilişkili bilgiler ortaya konulmuştur. Beaver Dam çalışmasında (2) 43-54 yaş arası bireylerin %0.6' sında, 75 yaş üzeri bireylerin ise %9' unda yumuşak druzen görüldüğü bildirilmiştir. Aynı çalışmada tüm yaş gruplarında, 63 µ altındaki küçük sert druzen tipinin YBMD hastaları arasında en geniş yer tuttuğu gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda da gözler druzen boyutuna göre incelendiğinde 80 gözde (%49) 63µ altında, 53 gözde (%36) 63 µ ve 125µ arasında, 9 gözde (% 7,7) 125 µ ve üzerinde saptandı. Druzen tipinde ise 164 gözün 81'inde (%49,4) sert druzen saptandı. Çalışmamızdaki YBMD grubunun yaş ortalaması dikkate alındığında, her ne kadar birey sayısı az olsa da literatür bilgisiyle paralellik gösterdiği tespit edildi.

Bugüne kadar YBMD ile ilişkili olduğu düşünülen *VEGF-A* (Vascular Endothelial Growth Factor A) geni dışında birçok gen ve lokusları bildirilmiştir. Bunlardan en önemlileri ve bulunmuş oldukları lokuslar şunlardır: *CFH* (Complement Factor H) geni: 1q23-32, *ARMS2* (Age-Related Maculopathy Susceptibility 2) ve *HTRA1* (HtrA Serine Peptidase 1) geni: 10q26.2.

CFH geni için YBMD ile en yakından ilişkili bulunan SNP'i Y402H'dır. Y402H SNP'nin numarası: rs1061170' dir. CFH geninin YBMD ile ilişkili olduğu saptanan diğer SNP' leri: rs3753394, rs800292, rs1061147, rs1061170, rs380390, rs1329428'dir. Beyaz ırkta hastalıkla major ilişkili SNP olarak rs1061170 (Y402H) gösterilmektedir (101-102).

Chen ve ark. (103) 163 YBMD hastası ile kontrol grubu olarak 244 Çinli bireyi kapsayan çalışmalarında, CFH genine ait 6 SNP (rs3753394, rs800292, rs1061147, rs1061170, rs380390, and rs1329428) incelenmiştir. Bunlardan rs3753394 SNP ile yaş tip YBMD arasında anlamlı ilişki olduğu saptanmıştır.

Brantley ve ark. (104) yapmış oldukları bir çalışmada, yaş tip YBMD'si olan 69 hastada FDT tedavisine yanıt genotipe göre değerlendirilmiş. CFH geni Y402H SNP için TC ve CC genotipine sahip bireylere göre TT genotipine sahip bireylerde tedaviye verilen yanıtın anlamlı olarak daha kötü olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak CFH geni Y402H SNP ile FDT cevabı arasında ilişki olduğu belirtilmiştir.

Tang ve ark. (105) 40 vaka-kontrol çalışmasını inceledikleri meta-analiz çalışması sonucunda HTRA1 geni -512G>A SNP'i AA ve GA genotiplerinin varlığında YBMD riskinin arttığını bildirmişlerdir.(OR= 7.46 %95 güven aralığında)

Yunanistan' da yapılan bir çalışmada, 100 YBMD hastası ve 115 kontrol grubu *ARMS2* geni G270T polimorfizmi için genotip frekansı karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmamıştır (p:0,189). Ancak YBMD hastaları erken ve geç evre olarak

sınıflandırdıklarında, geç evre YBMD hastalığı ile G270T polimorfizmi arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (106).

Birçok vaka-kontrol çalışmasında *VEGF geni* tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) ile meme kanseri, böbrek hastalığı, ankilozan spondilit, Alzheimer hastalığı, prostat kanseri ve idiyopatik tekrarlayan düşükler gibi çeşitli hastalıklar arasında ilişki olduğu saptanmıştır (107-112). Bu farklı patolojilerin yanı sıra diyabetik retinopati gelişimi ve serum VEGF düzeylerinin artışının; *VEGF geni* C-460T (rs 833061) ve G-116A (rs1570360) SNP'leri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (113,114). Awata ve ark. (107) yaptıkları bir çalışmada Tip 2 diyabetli hastalarda diyabetik retinopati ile C+405G (rs2010963) polimorfizmi arasında ilişki olduğu ve Japon popülasyonunda yükselmiş serum VEGF düzeylerinin CC genotipi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Ayrıca, Vannay ve ark. ise (114) +405C (rs2010963) allel varlığı ve -460TT (rs833061) / +405CC (rs2010963) haplotipleri ile prematüre retinopatisinin şiddeti arasında ilişki olduğunu saptamışlardır. Suganthalakshmi ve ark. (115) Hindistanlı bireylerde rs2010963 CG genotipi ile retinopati arasında ilişki olduğunu bulmuşlardır. Watson ve ark. ise (116) + 405 polimorfizmi (rs2010963) ile retinopati arasında ilişki saptamamışlar fakat serum VEGF düzeylerinde artış olduğunu belirtmişlerdir.

Park ve ark. ise (117) 111 polipoidal koroidal vaskülopatili (PKV) hasta ile 123 kontrol grubundan oluşan Koreli bireyler üzerinde yapmış oldukları çalışmada VEGF geni SNP'leri ile PKV arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir. *VEGF geni* SNP'lerinden rs1413711, rs833069, ve rs2146323'ten yalnızca rs833069 ile PKV arasında anlamlı ilişki tespit etmişlerdir. *VEGF geni* rs833069 polimorfizmi için AA genotipine sahip bireylerde PKV gelişme riskinin GG genotipine sahip bireylere göre 6,25 kat arttığı göstermişlerdir.

VEGF-A geninin promoter, 5'-untranslated bölgesi (5'-UTR), 3'- untranslated bölgesi (3'UTR) ve intronik bölgelerinde farklı polimorfizmlerin varlığı bildirilmiştir (99). *VEGF* genindeki intronik varyasyonların transkripsiyonu regüle edebileceği düşünülmektedir, ancak mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (9). Aynı zamanda, günümüzde yaş tip YBMD tedavisinde, VEGF üzerinden etki gösteren terapötik ilaçlar (ranibizumab, bevacizumab gibi) kullanılmaktadır. Hastaların tedavide verilecek olan anti-VEGF ajanlardan fayda görebilmesinin saptanabilmesi için, tedaviye yanıt ve SNP'ler arası ilişkinin araştırılabileceği çalışmalar faydalı olacaktır. Biz de bu doğrultuda çalışmamızda YBMD ile ilişkili olduğu düşünülen intronik bölgelere ait sırasıyla 3 adet *VEGF* geni SNP'nin (rs1413711, rs2146323, rs3025033) gerçek zamanlı PCR ile genotip sıklıklarını belirledik.

Bugüne kadar YBMD ve *VEGF* (*Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü*) geni polimorfizmlerinin ilişkisi konusunda çeşitli araştırmalar yapılmakla birlikte, literatürde bu konuda bir tutarlılık yoktur. Çeşitli etnik gruplarda yapılan araştırmalarda, birçok çalışmada YBMD ile *VEGF* geni polimorfizmleri arasında ilişkinin varlığı belirlenirken, benzer ilişkinin saptanmadığı araştırmalar da literatürde bulunmaktadır (9, 10,11).

Szafilik ve ark.'nın (118) Polonya popülasyonundan oluşan 100 yaş tip YBMD olgusu ile 104 sağlıklı birey arasında yapmış oldukları çalışmada YBMD ile ilişkili olduğu düşünülen *VEGF* geni C-460T (rs833061) polimorfizminin varlığı PCR ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı açısından farklılık olduğunu gözlemlemişlerdir. Yaş tip YBMD ile C/T genotipi arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır (OR 3.04, 95% CI 1.65-5.60). Diğer yandan T/T genotipinin hastalıktan koruyucu etkisinin olduğu sonucuna varmışlardır.

Boekhoorn ve ark.'nın (119) 4228 YBMD hastası üzerinde yapmış oldukları popülasyon bazlı kohort çalışmasında (The Rotterdam Study), *VEGF* geni SNP'lerinden rs699947, rs 1570360 ve rs2010963' ün YBMD ile ilişkisi olup

olmadığı değerlendirilmiştir. Bu ilişki YBMD evresine ve tipine göre ayrı ayrı incelenmiştir. Sonuç olarak bu 3 SNP ile YBMD evreleri ve tipleri arasında ilişki saptanmamıştır.

Janik- Papis ve ark. ise (11) 88 kuru tip, 177 yaş tip YBMD olgusu ile 136 bireyden oluşan kontrol grubu ile Polonya popülasyonu üzerinde yapmış oldukları çalışmada YBMD ile *VEGF* geni SNP'leri arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Çalışmada rs833061 ve rs2010963 polimorfizmlerinin analizleri yapılmış ve rs833061 polimorfizmine ait C/T genotipi ile hem kuru tip hem de yaş tip YBMD arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Yine aynı polimorfizme ait T/T genotipinin ise kuru tip YBMD riskini azalttığını göstermişlerdir. rs2010963 polimorfizmine ait C/C genotipinin de kuru tip YBMD ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.

Yine ayrı bir çalışmada 11 adet *VEGF* geni SNP'nin (bizim çalışmamızda değerlendirilmeyen) YBMD ile ilişkisi incelenmiştir. Galan ve ark'nın (120) yapmış oldukları bu çalışma 226 YBMD hastası ile 248 kişilik kontrol grundan oluşmuştur. Çalışma sonucunda bu 11 *VEGF* geni SNP' den rs833069 ile YBMD arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır. *VEGF* geni SNP'i rs833069 için G homozigotluğu ile A allelinin homozigot taşıyıcılığı kıyaslandığında G homozigotluğunda YBMD riskinin 5 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Haines ve ark. (121) YBMD 'nin farklı formlarını kapsayan geniş bir kohort çalışmasında yaş tip YBMD ile *VEGF* geni +405C/G (rs2010963) SNP'i arasında pozitif ilişki olduğunu belirlemişlerdir.

Ayrıca Mori ve ark. (122) 408 YBMD hastası ile 142 kontrol grubunu kapsayan vaka-kontrol çalışmasında; YBMD ile içlerinde *VEGF* geni SNP'lerinin de olduğu farklı gen polimorfizmlerinin ilişkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmada *VEGF* genine ait 3 adet SNP (rs699947, rs1570360, rs2010963) analiz edilmiştir.

Çalışma sonucunda *VEGF* geni SNP'leri ile YBMD arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Bizim çalışmamızda, her ne kadar yukarıda bahsedilen 6 çalışmaya (11,118-122) dahil edilen *VEGF* geni polimorfizmlerin varlığı araştırılmamış olmakla birlikte, farklı *VEGF* geni SNP' lerinin de YBMD ile ilişkisinin değerlendirilmesinin önemini vurgulamak açısından bizim çalışmamızın bulgularının literatüre ek katkı sağladığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda değerlendirilen SNP'lerle ilgili diğer araştırma sonuçlarına baktığımızda, Almeida ve ark. (123) Brezilya popülasyonuna ait %77,5'i yaş tip, %22,5'i kuru tip olan 160 YBMD hastası ile 140 kontrol grubundan oluşan çalışmada *VEGF* geni rs1413711 SNP'nin YBMD ile olan ilişkisini incelemiştir. Çalışma sonucunda TT genotipine sahip bireylerde YBMD riskinde artış olduğu ve bu riskin yaş tip ve kuru tip için benzer olduğunu saptamışlardır. Ayrıca kontrol grubuna göre yaş tip YBMD grubunda wild- allel (T) görülme sıklığının anlamlı oranda fazla olduğu tespit edilmiştir.

Diğer bir çalışmada; Lin ve ark.'nın (10) Tayvan Çinliler'inden oluşan popülasyon üzerinde yapmış oldukları çalışmaya 104'ü kuru tip, 86'sı yaş tip olmak üzere toplam 190 YBMD'li hasta ile kontrol grubu olarak 180 birey dahil etmişlerdir. Çalışmada +405C/G (rs2010963), -460 T/C (rs833061), +674 C/T (rs1413711), +936C/T (rs3025039) ve -2578C/A (rs699947)'den oluşan *VEGF* genine ait 5 SNP'nin YBMD ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu 5 SNP'den yalnızca +936C/T (rs3025039) ile yaş tip YBMD arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmıştır. Lin ve ark. elde ettikleri bu bulguların; +674 C/T (rs1413711) SNP' i ile yaş tip YBMD arasında ilişkinin varlığını ortaya koyan Churchill ve ark.'nın elde ettikleri bulgularla uyumsuzluğunun, etnik farklılıklardan kaynaklanabileceğini de vurgulamışlardır.

Yi Qu ve ark.'nın (124) yapmış oldukları vaka- kontrol çalışmasına; Çin popülasyonunda 159 neovasküler YBMD hastası ile yaş ve cinsiyet uyumlu 140 bireyden oluşan kontrol grubu dahil edilmiştir. Çalışmada -460T/C (rs833061), +405C/G (rs2010963), +674C/T (rs1413711) ve +936C/T (rs3025039)' yi kapsayan 4 *VEGF* geni SNP'i, incelenmiştir. Çin popülasyonunda yapılan bu çalışmada analiz edilen SNP'ler ile neovasküler YBMD arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanamamıştır.

Fang ve ark.'nın (125) 515 yaş tip YBMD ile 253 kontrol grubundan oluşan kohort çalışmasında; *VEGF* geni SNP'lerinden rs1413711 ve rs3025039 ile yaş tip YBMD arasındaki ilişki incelenmiştir. Çalışma sonucunda bu SNP'ler ile YBMD arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanamamıştır.

Bizim çalışmamızda ise kontrol grubu ile YBMD grubu kıyaslandığında *VEGF* geni rs1413711 G>A SNP için GG, GA ve AA genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamadı ($p=0.072$). Ancak; en azından tek bir allelde nükleotid değişiminin gözlemlendiği genotipler (GG ve GA+AA) birlikte değerlendirildiğinde; rs1413711 SNP' ne özgü GG ve GA +AA genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptandı ($p=0.023$). YBMD' li olgu grubu ayrıca klinik olarak tiplendirildi (kuru, yaş ve miks tip) ve *VEGF* geni rs1413711 G>A SNP için GG, GA ve AA genotiplerinin varlığı karşılaştırıldı. *VEGF* geni rs1413711 SNP'i ve YBMD' nunun klinik tipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ($p=0.030$). *VEGF* geni rs1413711 G>A SNP genotipleri ve YBMD'nin klinik tipleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre GA+AA genotip varlığının kuru tip YBMD riskini arttırdığı belirlenirken (OR= 6.28), yaş ve miks tip YBMD bulunan olgularda benzer ilişki saptanamadı (sırasıyla OR= 1.08 ve 1.13). YBMD ile *VEGF* geni rs1413711 SNP'i arasındaki ilişkiyi inceleyen yukarıdaki çalışmalardan Almeida ve ark.'nın (123) elde ettikleri bulgular, bizim çalışmamızın bulguları ile uyumludur ve bu SNP varlığının YBMD'nin kuru tipi ile anlamlı ilişkili olduğu belirlenmiştir. Lin ve ark. ise yaş tip YBMD ile rs1413711 polimorfizmi

arasında anlamlı ilişki saptarken, bizim çalışmamızda rs1413711 SNP'i ile yaş tip arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (OR= 1,08). Churchill, Yi Qu ile Fang ve ark.'nın (9,124,125) yapmış oldukları ayrı ayrı çalışmaların sonucunda ise bizim çalışmamıza benzer şekilde rs1413711 SNP'i ile yaş tip YBMD arasında anlamlı ilişki saptamamışlardır.

Kloeckener ve ark. ise (126) 309 YBMD'li göz üzerinde yaptıkları çalışmada; YBMD'li hastalara intravitreal uygulanan anti-VEGF ajan olan ranibizumab'a hastaların vermiş oldukları yanıt ile genetik faktörlerin ilişkisi değerlendirilmiştir. Daha önceden YBMD ile ilişkisi incelenen *CFH* (Kompleman Faktör H), *CFB* (Kompleman Faktör B), *HTRA1* (*HtrA Serine Peptidase1*), *ARMS2* (*Age-Related Maculopathy Susceptibility 2*) ve *VEGF-A* gen polimorfizmlerinin yanı sıra üzerinde daha az çalışmanın mevcut olduğu *KDR* (*Kinase insert domain receptor*), *LRP5* (*low density lipoprotein receptor-related protein 5*) ve *FZD4* (*frizzled family receptor 4*) gen polimorfizmleri çalışmada analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda *VEGF* geni rs1413711 SNP'i ile yaş tip YBMD'i olup intravitreal ranibizumab uygulanan hastaların ilaca vermiş oldukları yanıt arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır.

McKibbin ve ark (127); Kloeckener ve ark.'nın (126) çalışmasına benzer şekilde dizayn ettikleri çalışmada; *CFH*, *VEGF* ve *HTRA1* geni SNP'leri ile yaş tip YBMD'si bulunup intravitreal ranibizumab tedavisine verilen yanıt arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir. Yaş tip YBMD'li 104 olgunun değerlendirildiği bu çalışmada, *VEGF* geni SNP'i olarak bizim çalışmamızda da yer alan rs1413711 SNP'i analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda *VEGF* geni rs1413711 SNP'i için en azından bir C allelini içeren genotipe (TC ve CC genotipleri) sahip bireylerin, TT genotipine sahip bireylerle karşılaştırıldığında, LogMAR eşeline göre görme keskinliği artışının daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu genotiplere sahip yaş YBMD bireylerinin ranibizumaba daha iyi cevap verdikleri gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda da Kloeckener ve ark. (126) ile McKibbin ve ark.'nın (127) analiz ettiği *VEGF* geni rs1413711 polimorfizmi değerlendirilmiştir. Çalışmamız sonucunda *VEGF* geni rs1413711 polimorfizmi ile kuru tip YBMD arasında anlamlı ilişki olduğu saptanmıştır. Ancak Kloeckener ve ark. ile McKibbin ve ark.'nın çalışmaları ile bizim çalışmamız arasında bazı farklılıklar söz konusudur. Bunlardan birincisi Kloeckner ve ark. ile McKibbin ve ark.'nın çalışmaya dahil ettikleri hastaların hepsi yaş tip YBMD'den oluşmaktadır. Bizim çalışmamızda ise hem kuru hem de yaş tip YBMD'si olan gözler yer almıştır. İkinci farklılık ise Kloeckner ve ark.'nın çalışmasında genetik ilişki anti-VEGF tedavi uygulanan kişilerin tedaviye vermiş oldukları yanıt ile değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise yaş tip YBMD'si olup anti-VEGF tedavi uygulanan hastalar mevcut olsa da bunların uzun dönem sonuçları olmadığı için tedaviye yanıt açısından değerlendirilmesi mümkün olmamıştır.

Richardson ve ark. (128) kuru ve yaş tipi içeren 577 YBMD hastası ile 173 kontrol grubunu dahil ettikleri çalışmada; 7 farklı *VEGF* geni SNP'nin (rs833061, rs25648, rs3024997, rs2146323, rs3025030, rs3025035 ve rs10434) YBMD ile ilişkisini değerlendirmiş ve hiçbirinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptamamışlardır. Bizim çalışmamızda ise *VEGF* geni rs2146323 SNP'i ve YBMD'nin klinik tipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ($p=0.028$). Ayrıca *VEGF* geni rs2146323 SNP genotipleri ve YBMD'nin klinik tipleri arasındaki ilişki de değerlendirildi ve kontrol grubuna göre CA+AA genotip varlığının kuru tip YBMD riskini arttırdığı belirlendi (OR= 4,38). Yaş ve miks tip YBMD bulunan olgularda ise benzer ilişkinin saptanmadığı görüldü (sırasıyla OR= 1,06 ve 1.75). İki çalışma arasında benzer bulguların gözlenmemesinin, Richardson ve ark.'nın incelemiş oldukları popülasyonla bizim çalışma grubumuz arasındaki etnik farklılıktan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Nakata ve ark. (129) ise intravitreal bevacizumab uygulanmış 94 yaş tip YBMD hastası ile üçlü terapi uygulanan (FDT+ triamsinolon+ bevacizumab) 79 yaş

tip olgu üzerinde yapmış oldukları çalışmada; 4 adet *VEGF* geni SNP'i (rs699946, rs699947, rs3025033, rs3025035) ile tedavilere verilen yanıt arasındaki ilişkiyi incelenmiştir. Analiz edilen SNP'lerden rs3025033'ye ait GG genotipine sahip birey sayısı oldukça az olduğu için, bu SNP çalışma dışı bırakılmıştır. Bizim çalışmamızda da YBMD grubunda rs3025033 SNP'ye ait GG genotipine sahip birey sayısı çok az olduğundan, bu SNP'ne ait genotipler ve YBMD tipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanamadı ($p = 0.208$).

Diğer bir çalışmada, Immomen ve ark. (130) tarafından 162 YBMD hastası ile 85 kontrol hastasının FDT (fotodinamik tedavi)' ye vermiş oldukları yanıt ile *VEGF* gen polimorfizmleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Sırasıyla rs699947, rs2146323 ve rs3025033 *VEGF* geni SNP leri analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda YBMD hastalarında rs3025033 SNP'i ile FDT yanıtı arasında ilişki saptanmamışken, rs2146323 SNP'i A alleleline sahip bireylerde FDT tedavisinin başarısız sonuçlarla ilişkili olduğu saptanmıştır. Her ne kadar Immomen ve ark. yapmış oldukları çalışmada farklı amaç hedefleseler de bizim çalışmamızda da YBMD ile ilişkili olabileceğini düşündüğümüz bu SNP'lerden ikisi (rs3025033 ve rs2146323) çalışılmış ve rs2146323 SNP'i ile kuru tip YBMD arasında ilişki olduğu saptanmışken, rs3025033 SNP'i ile YBMD'nin klinik tipleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Sonuç olarak; yapmış olduğumuz çalışma ile YBMD klinik tipleri ile *VEGF* genine ait 3 intronik SNP in (rs1413711, rs2146323, rs3025033) ilişkisini araştırdık. Çalışmamızın sonucunda *VEGF* genine ait SNP'lerden rs1413711 ile rs2146323'ün kuru tip YBMD riskinde artışa neden olduğunu ancak rs3025033 ile YBMD'nin klinik tipleri arasında bir ilişkinin olmadığını belirledik. Bunun dışında yapmış olduğumuz çalışmada iris rengi ile YBMD arasındaki ilişki incelendiğinde literatür bilgisinin aksine YBMD hastalarında, koyu göz renginin daha fazla olduğunu tespit ettik. Bu durumun Türk toplumunda koyu göz renginin daha sıklıkla gözlemlenmesinin bir sonucu olabileceğinden yola çıkarak, çalışmamızın bir diğer

önemli bulgusu da iris rengi ve YBMD arasında anlamlı bir ilişkinin bulunmaması ve iris renginin bu hastalık için bir risk faktörü olarak değerlendirilemeyeceğidir.

Yukarıda da belirtildiği gibi, YBMD ile *VEGF* geni SNP'leri arasındaki henüz netlik kazanmayan birçok nokta bulunmamaktadır ve çalışmamızın bulguları da bunu destekler niteliktedir. Birçok çalışmada da belirttiği gibi, elde edilen verilerdeki bu tutarsızlığın temelinde etnik faktörlerin etkisi olabilir. Ancak, etnik faktörler dışında diğer faktörlerin katılımı ve nasıl rol oynadıkları ile ilgili daha detaylı çalışmalara gereksinim vardır. Özellikle YBMD'de genetik faktörlerin rolünün belirlenmesi için, öncelikle bu hastalıkla ilgili risk faktörlerin net olarak tanımlanması gerekmektedir ve sonrasında da bu faktörlerin dışlanarak planlanacağı yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmaların genetik faktörlerin bu hastalık üzerindeki net rolünü ortaya koymada son derece yararlı olacağını düşünmekteyiz.

Konu ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, bu çalışmaların temelde YBMD etyopatogenezinde büyük öneme sahip olan *VEGF* genindeki polimorfizmlerin hastalığa yatkınlık açısından risk oluşturup oluşturmadığını amaçladığını görmekteyiz. Bunun yanı sıra, *VEGF* genine ait farklı bölgelerdeki SNP'lerin gerek YBMD'nin klinik tipleri ile gerekse yaş tip YBMD'ye yönelik uygulanan anti-VEGF tedavilere hastaların vermiş oldukları yanıt ile ilişkileri de değerlendirilmiştir. Böylelikle, yaş tip YBMD tedavisinde kritik öneme sahip anti-VEGF tedavisine verilen yanıtla genetik faktörlerin ilişkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

Yapmış olduğumuz bu çalışmanın Türk popülasyonunda analiz edilen *VEGF* geni SNP'leri ile YBMD arasındaki ilişkinin değerlendirildiği ilk çalışma olması nedeniyle önem taşıdığını düşünmekteyiz. Bununla birlikte bu çalışmanın, ülkemizde yaş tip YBMD hastalarına uygulanan anti-VEGF tedavilere verilen yanıtın *VEGF* geni polimorfizmleri ile ilişkisinin değerlendirileceği çalışmalara da öncelik edebileceğini düşünmekteyiz. Bu konunun aydınlatılmasında birey sayısının

arttırıldığı ve uzun dönem takibe alınan hastalardan oluşan daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır.

SONUÇLAR

1. Hasta grubu ile Kontrol grubu arasında hasta sayısı, yaş ortalaması ve cinsiyet gibi demografik özellikler bakımından anlamlı fark saptanmadı.
2. Hasta ve Kontrol grubu iris renkleri bakımından değerlendirildiğinde hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı.
3. Hasta ve kontrol grubu birlikte değerlendirildiğinde, *VEGF* geni rs1413711 SNP'ne özgü GG, GA ve AA genotipleri arasında anlamlı fark belirlenemedi.
4. En azından tek bir allelde nükleotid değişiminin gözlemlendiği genotipler (GA ve AA) birlikte değerlendirildiğinde; hasta ve kontrol grupları için *VEGF* geni rs1413711 SNP'ne özgü GG ve GA +AA genotipleri arasında anlamlı fark saptandı.
5. *VEGF* geni rs1413711 SNP'ine ait genotipler açısından YBMD' nin klinik tipleri arasında anlamlı fark tespit edildi.
6. *VEGF* geni rs1413711 SNP'ine ait genotipleri ve YBMD' nin klinik tipleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre GA+AA genotip varlığının kuru tip YBMD riskini arttırdığı belirlenirken, yaş ve miks tip YBMD bulunan olgularda benzer ilişki saptanmadı.
7. *VEGF* geni rs2146323 SNP'ine ait genotipleri açısından YBMD' nin klinik tipleri arasında anlamlı farklılık saptandı.
8. *VEGF* geni rs2146323 SNP'ine ait genotipler ve YBMD' nin klinik tipleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre CA+AA genotip varlığının kuru tip YBMD riskini arttırdığı belirlenirken, yaş ve miks tip YBMD bulunan olgularda benzer ilişki saptanmadı.

9. *VEGF* geni rs3025033 SNP' ine ait genotipleri açısından YBMD' nin klinik tipleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Sonuç olarak Türk popülasyonunda *VEGF* geni rs1413711 ve rs2146323 SNP'leri ile YBMD hastalığının kuru tipi arasında ilişki olduğu, rs1413711 SNP'ine ait GA+AA genotip varlığı ile rs2146323 SNP'ine ait CA+AA genotip varlığının kuru tip YBMD riskini arttırdığı tespit edildi.

KAYNAKLAR

- 1- Congdon N, O'Colmain B, Klaver CC, Klein R, Muñoz B, Friedman DS, et al. Eye Diseases Prevalence Research Group. Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. Arch Ophthalmol. 2004 Apr;122(4): 477- 85.
- 2- Klein R, Klein BE, Linton KL. Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. Ophthalmology 1992; 99: 933-43.
- 3- Vinding T. University Eye Clinic and Copenhagen City Heart Study. Macular changes, prevalence and sex ratio. An epidemiological study of 1000 aged individuals. Acta Ophthalmol 1989; 67: 609-16.
- 4- Leibowitz HM, Krueger DE, Mauser LR. The Framingham Eye Study Monograph: an ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975. Surv Ophthalmol 1980; 24, 335-610.
- 5- Thylefors B. A global initiative for the elimination of avoidable blindness. Am J Ophthalmol 1998;125:90-93
- 6- Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD de Jong PT et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol 39:367-374,1995
- 7- Ferris FL, Fine SL, Hyman L. Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy. Arch Ophthalmol 102:1640-1642,1984
- 8- Bressler NM. Age-related macular degeneration is the leading cause of blindness. JAMA 2004;291:1900- 1901.

- 9- Churchill AJ, Carter JG, Lovell HC, Ramsden C, Turner SJ, Yeung A et al. VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* 2006 Oct 1;15(19):2955-61.
- 10- Lin JM, Wan L, Tsai YY, Lin HJ, Tsai Y, Lee CC et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 2008 Jun;145(6):1045-1051
- 11- Janik-Papis K, Zaras M, Krzyzanowska A, Wozniak K, Blasiak J, Szaflik J et al. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and age-related macular degeneration in a Polish population. *Exp Mol Pathol.* 2009 Dec;87(3):234-8
- 12- Van Leeuwen R, Klaver CC, Vingerling JR. Epidemiology of age-related maculopathy. *European Journal of Epidemiology* 2003;18:845-54.
- 13- Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy (TAP) Study Group. Photodynamic therapy of choroidal neovascularisation in age related macular degeneration with verteporfin: One year results of two randomized clinical trials-TAP Report No.1. *Arch Ophthalmol* 1999;117: 1329-45.
- 14- El-Amir AN, Sagoo MS, da Cruz L. Age-related macular degeneration. *Br J Hosp Med* 2005 ;66:677-81
- 15- Miller JW, Schmidt-Erfurth U, Sickenberg M, Pournaras CJ, Laqua H, Barbazetto I, et al. Photodynamic therapy with verteporfin for choroidal neovascularization caused by age-related macular degeneration: results of a single treatment in a phase 1 and 2 study. *Arch Ophthalmol.*1999 Sep;117(9):1161- 73.
- 16- Bressler NM, Maguire MG, Bressler SB, Fine SL. Relationship of drusen and abnormalities of the retinal pigment epithelium to the prognosis of nevascular macular degeneration: the Macular Photocoagulation Study Group. *Arch Ophthalmol* 1190;108:1442-7.
- 17- Vingerling JR, Dielemans I, Bots ML, Hofman A. The prevalence of age-related maculopathy in the Rotterdam study. *Ophthalmology* 1995; 102:205-10.
- 18- Mitchell P, Smith W, Attebo K, Wong JJ. Prevalence of age-related maculopathy in Australia: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 1995; 102:1450-60.

- 19- Klein R, Klein BE, Jensen SC, Meur SM. The five-year incidence and progression of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 1997; 104:7-21.
- 20- Delcourt C, Lacroux A, Carriere I, POLA Study Group. The three- year incidence of age- related macular degeneration: The " Pathologies Ocularies Liees a Page" (POLA) Prospective Study
- 21- Shen JK, Dong A, Hackett SF, Bell WR, Gren WR, Campochiaro PA. Oxidative damage in age-related macular degeneration. *Histol Histopathol* 2007; 22(12):1301-8.
- 22- Vinding T. Age-related macular degeneration. Macular changes, prevalence and sex ratio. An epidemiological study of 1000 aged individuals. *Acta Ophthalmol* 1989; 67: 609-16.
- 23- Hyman L. Epidemiology of AMD. Age-Related Macular Degeneration: Principles and Practise. Hampton R, Nelsen P. Eds. New york. Raven Pres Ltd. 1992:1-35
- 24- Ambati J, Ambati B, Yoo S, Ianchulev S, Adamis A. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol* 2003;48:257-293
- 25- Klein R, Peto T, Tod A, Vannewkirk M. The epidemiolgy of age-related macular degeneration. *Am J ophthalmol* 2004; 137: 486-495
- 26- Cruickshanks KJ, Homman RF, Klein R, Nondohl DM. The prevalence of age-related maculopathy by geographic region and athnicity: The Colarado-Wisconsin study of age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol* 1997; 115:242-50.
- 27- Evans J. Risk factors for age-related macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* 2001;20(2).227-253
- 28- Mukesh BN, Dimitrov PN, Leikin S., Wang JJ, Mitchell P, McCarty CA et al. Five-year incidence of age-related maculopathy: The Visual Impairment Project. *Ophthalmology* 2004; 11:1176-1182.

- 29- Klein R, Rowland M, Haris M. Third National Health and Nutrition Examination Survey. Racial/ ethnic differences in age-related maculopathy. *Ophthalmol* 1995;102:371-381
- 30- Jampol LM, Tielsch J. Race, macular degeneration, and the Macular Photocoagulation study. *Arch Ophthalmol* 1992; 110:1699-700
- 31- Varma R, Fraser-Bell S, Tan S, Klein R, Azen SP. Los Angeles Latino Eye Study Group. Prevalence of age-related macular degeneration in Latinos. *Ophthalmology* 2004; 111: 1288-1297.
- 32- Klein R, Klein B, Jensen S, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Beaver Dam study. The relation of socioeconomic factors to age related cataract, maculopathy and impaired vision. *Ophthalmol* 1994; 101: 1969-1979
- 33- A case control Study in the Age-Related Eye Disease Study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3. Risk factors associated with Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmol* 2000; 107:2224-2232
- 34- Mönestam E, Lundqvist B. Long-term visual outcome after cataract surgery: Comparison of healthy eyes and eyes with age-related macular degeneration. *J Cataract Refract Surg.* 2012 Mar;38(3):409- 14
- 35- Lundgwist B, Monestam E. Longitudinal changes in subjective and objective visual function 5 years after cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 2006; 32:1944-1950.
- 36- Wang JJ, Klein R, Smith W, Klein BE, Tomany S, Mitchell P. Cataract surgery and the 5-year incidence of late-stage age-related maculopathy: pooled findings from the Beaver Dam and Blue Mountains eye studies. *Ophthalmology.* 2003
- 37- Frank RN, Puklin JE, Stock C.,Cante LA. Race, iris color, and age-relate macular degeneration. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2000; 98: 109-115.
- 38- Menghini M, Sutter FK, Barthelmes D. ,Fleischhauer JC, Kurz-Levin MM, Boesch MM et al. Does cataract surgery increase the risk of exudative age-related macular degeneration? Results from a large retrospective case-control study. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2007; 224(4):288-91.
- 39- Age Related Eye Disease Study Research Group: A Randomized, Placebo Controlled Clinical Trial of High- Dose Supplementation with Vitamins C and E and

Beta Carotene and Zinc for Age Related Macular Degeneration and Vision Loss. AREDS Report No 8. Arch Ophthalmol. 2001;119:1417- 1436

- 40- Age-Related Eye Disease Study Research Group, SanGiovanni JP, Chew EY, Clemons TE, Ferris FL 3rd, Gensler G, Lindblad AS, et al. The relationship of dietary carotenoid and vitamin A, E, and C intake with age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS Report No. 22. Arch Ophthalmol. 2007 Sep;125(9):1225- 32.
- 41- Tan JS Wang JJ, Flood V, Rochtchina E, Smith V, Mitchell P. Dietary Antioxidants and The Long Term Incidence of Age Related Macular Degeneration: The Blue Mountains Eye Study. Ophthalmology. 2008 Feb; 115(2):334- 41
- 42- Seddon JM, Cote J, Davis N, Rosner B. Progression of age-related macular degeneration: association with body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio. Arch Ophthalmol 2003; 21: 785-792.
- 43- Delcourt C, Lacroux A, Carriere I, POLA Study Group. The three- year incidence of age- related macular degeneration: The " Pathologies Oculaires Liees a l'Age" (POLA) Prospective Study
- 44- Tan JS, Mitchell P, Kifley A, Flood F, Smith W, Wang JJ. Smoking and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. Arch Ophthalmol 2007; 125(8): 1089-95.
- 45- Eye Disease Case Control Study Group. Risk factors for neovascularization for age related macular degeneration. Arch Ophthalmol 1992;110:1701-170854
- 46- Fraser-Bell S, Wu J, Klein R, Azen SP, Varma R. Smoking, alcohol intake, estrogen use, and age-related macular degeneration in Latinos: the Los Angeles Latino Eye Study. Am J Ophthalmol. 2006 Jan;141(1):79- 87.
- 47- Mares-Perlman JA, Brady WE, Klein R, Klein BE, Bowen P, Palta M. Serum antioxidants and age-related macular degeneration in a population- based case-control study. Arch Ophthalmol 1995;113:1518-23.
- 48- Snow KK, Seddon JM. Do age-related macular degeneration and cardiovascular disease share common antecedents? Ophthalmol Epidemiol 1999; 6: 125-143.

- 49- Klein R, Klein BE, Jensen SC, Cruickshanks KJ, Lee K, Danforth LG. Medication use and the 5-year incidence of early age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol*. 2001; 119: 1354- 1359.
- 50- Klein BE, Klein R, Lee KE, Jensen SC. Measures of obesity and age-related eye diseases. *Ophthalmol Epidemiol* 200; 8: 251- 262.
- 51- Tomany SC, Cruickshanks KJ, Klein R, Klein B, Knudston MD. Sunlight and 10-year incidence of early age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 2004; 122: 750- 757
- 52- Wilson H, Scgwartz DM, Bhatt H, McCulloch CE, Duncan JL. Statin and aspirin therapy are associated with decreased rates of choroidal neovascularization among patients with age related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2004; 137: 615-24.
- 53- Hyman L, Schachat AP, He Q, Leske MC. Hypertension, cardiovascular disease, and age-related macular degeneration. Age-related Macular Degeneration Risk Factors Study Group. *Arch Ophthalmol* 2000; 118: 351- 358.
- 54- Snow KK, Cote J, Yang W, Davis NJ, Seddon JM. Association between reproductive and hormonal factors and age-related maculopathy in postmenopausal women. *Am J Ophthalmol* 2002; 134: 842- 848.
- 55- Klein BE, Klein R, Jensen SC, Ritter LL. Are sex hormones associated with age-related maculopathy in women? The Beaver Dam Eye Study. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1994; 92: 289- 295.
- 56- Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol* 2002; 134: 411431.
- 57- Klaver CC, Wolfs RC, Assink JJ, van Duijn CM, Hofman A, de Jong PT. Genetic risk of age-related maculopathy: population based familial aggregation study. *Arch Ophthalmol* 1998; 116: 1646- 1651.
- 58- Luo L, Harmon J, Yang X, Chen H, Patel S, Mineau G, et al. Familial aggregation of age-related macular degeneration in the Utah population. *Vis. Res.* 2008;48, 494-500.

- 59- Jakobsdottir J, Conley Y.P, Weeks D.E, Mah T.S, Ferrell R.E, Gorin M.B. Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26. *Am. J. Hum. Genet.* 2005;77, 389–407.
- 60- Klein M.L, Schultz D.W, Edwards A, Matisse T.C, Rust K, Berselli C.B, et al. Age-related macular degeneration. Clinical features in a large family and linkage to chromosome 1q. *Arch. Ophthalmol* 1998;116, 1082–1088.
- 61- Defay R, Pinchinat S, Lumbroso S, Sutan C, Delcourt C. Sex steroids and age related macular degeneration in older French women: The POLA Study. *Ann Epidemiol* 2004; 14: 202-208.
- 62- Axer-Siegel R, Bourla D, Ehrlich R, Dotan G, Benjamini Y, Gavendo S, et al. Association of neovascular age-related macular degeneration and hyperhomocysteinemia. *Am J Ophthalmol* 2004;137:84-88.
- 63- Ding X, Patel M, Chan CC. Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2009;28(1):1-18.
- 64- Guymer R, Bird A. Age changes in Bruch' s membrane and related structure. *Retina Volume 2.* Ryan SJ Los Angeles. Mosby. 2001 ;1051-63.
- 65- Cour M, Kiilgaard J, Nissen M. Age-related macular degeneration. Epidemiology and optimal treatment. *Drugs aging* 2002; 19(2):101-133.
- 66- Spaide R. Etiology of late age-related macular disease. In *Age-related macular degeneration.* Editors: Alfaro DV, Liggett PE, Mieler WF, Quiroz-Mercado H, Jager RD, Tano Y. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia 2006. p.23-29.
- 67- Kulkarni AD, Kuppermann BD. Wet age-related macular degeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;13:57(14)
- 68- The Age-Related Eye Disease Study Research Group. The age-related eye disease study system for classifying age-related macular degeneration from stereoscopic color fundus photographs: The Age-Related Eye Disease Study Report No.6. *Am J Ophthalmol* 2001;132:668-81.

- 69- Macular Photocoagulation Study Group. Subfoveal neovascular lesions in age related macular degeneration: guidelines for evaluation and treatment in the Macular Photocoagulation Study. Arch Ophthalmol 1991; 109:1242-57.
- 70- Schmidt-Erfurth U, Miller J, Sickenberg M, Bunse A, Laqua H, Gragoudas E, et al. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization: Clinical and angiographic examples. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1998;236:365-74
- 71- Macular Photocoagulation Study Group: Occult choroidal neovascularization. Influence on visual outcome in patients with age-related macular degeneration. Arch Ophthalmol 1996; 114:400-412.
- 72- Submacular Surgery Trials (SST) Research Group. Surgery for hemorrhagic choroidal lesions of age-related macular degeneration: ophthalmic findings. SST report no.13. Ophthalmology 2004; 111: 1993-2006
- 73- Jaffe GJ, Caprioli J. Optical coherence tomography to detect and manage retinal disease and glaucoma. Am J Ophthalmol 137;2004:156-69
- 74- Ritter M, Elledge J, Simader C, Deak GG, Benesch T, Blodi BA, et al. Evaluation of optical coherence tomography findings in age-related macular degeneration: a reproducibility study of two independent reading centres. Br J Ophthalmol. 2011 Mar;95(3):381- 5.
- 75- Age-related Eye Disease Study. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamin C and E, beta carotene, and zinc for age related maculopathy AREDS report no.8. Arch Ophthalmol 2001;119:1427- 1436.
- 76- Macular Photocoagulation Study Group. Risk factors for choroidal neovascularization in the second eye of patients with juxtafoveal or subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. Arch Ophthalmol. 1997; 115: 741- 747.
- 77- The Radiation Therapy for Age-Related Macular Degeneration Study Group: A prospective, randomized, double-masked trial on radiation therapy for neovascular agerelated macular degeneration. Ophthalmol 1999;106:2239- 2247.
- 78- Eckardt C, Eckardt U, Conrad HG. Macular translocation with and without counterrotation of the globe in patients with age-related macular degeneration. Am J Ophthalmol 1999;128:135- 146.

- 79- De Juan JR. E, Machemer R. Vitreous surgery for hemorrhagic and fibrous complications of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 1991;111:1-7.
- 80- Rosenfeld PJ, Schwartz SD, Blumenkranz MS, Miller JW, Haller JA, Reimann JD, et al. Maximum tolerated dose of humanized anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment for treating neovascular age related macular degeneration. *Ophthalmol* 2005;112:1048- 1053
- 81- Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, et al. MARINA study group; Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration *N Engl J Med* 2006;355:1419- 1431.
- 82- Brown DM, Kaiser PK, Michels M, Soubrane G, Heier JS, Kim RY, et al Ranibizumab versus verteporfin for age related macular degeneration 2006;355:1432- 1444
- 83- Costa RA, Jorge R, Calucci D, Cardillo JA, Melo LA Jr, Scott IU. Intravitreal Bevacizumab for choroidal neovascularization caused by AMD (IBeNA Study): Results of a phase I dose escalation study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4569-4578.
- 84- Zhou B, Wang B. Pegaptanib for the treatment of age-related macular degeneration. *Exp Eye Res.* 2006 Sep;83(3):615- 9.
- 85- Ahmadi H, Taei R, Riazi-Esfahani M, Piri N, Homayouni M, Daftarian N, et al. Intravitreal bevacizumab versus combined intravitreal bevacizumab and triamcinolone for neovascular age-related macular degeneration: six-month results of a randomized clinical trial. *Retina.* 2011 Oct;31(9):1819- 26
- 86- Gillies MC, Simpson JM, Luo W, Penfold P, Hunyor AB, Chua W. Randomized clinic trial of a single dose of intravitreal triamcinolone acetate for neovascular age-related macular degeneration: One year results. *Arch Ophthalmol* 2003;121;667- 673
- 87- Russell SR, Hudson HL, Jerdan JA; Anecortave Acetate Clinical Study Group. Anecortave acetate for the treatment of exudative age-related macular

- degeneration-a review of clinical outcomes. *Surv Ophthalmol.* 2007 Jan;52 Suppl 1:S79- 90. Review.
- 88- Vertoporphin in Photodynamic Therapy Study Group: Vertoporphin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: two-year results of a randomized clinical trial including lesions with occult with no classic choroidal neovascularization- vertoporphin in photodynamic therapy report 2. *Am J Ophthalmol* 2001; 131:541- 560.
- 89- Nussbaum R. L, McInnes, R.H, Willard F. Thompson & Thompson Genetics in Medicine, Revised Reprint, 6th Edition,2004.
- 90- Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res.* 1986 Nov;46(11):5629- 32
- 91- Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, et al. Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;165:1198 - 1206.
- 92- Klaiser PK. Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular disease. *Am J Ophthalmol* 2006;142:660-68.
- 93- Arjima O, Nikinmaa M. Oxygen- dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors. *Exp Eye Res* 2006;83: 473 - 483.
- 94- Ozaki H, Yu AY, Della N, Ozaki K, Luna JD, Yamada H. Hypoxia inducible factor-1 alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:182 - 189.
- 95- Blaauwgeers HG, Holtkamp GM, Rutten H, Witmer AN, Koolwijk P, Partanen TA. Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium an localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner chorio capillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol* 1999;155:421- 428.
- 96- Spilsbury K, Garrett KL, Shen WY, Constable IJ, Rakoczy PE. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. *Am J Pathol* 2000;157:135 - 144.

- 97- Wells JA, Murthy R, Chibber R, Nunn A, Molinatti PA, Kohner EM. Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in the vitreous of patients with subretinal neovascularisation. *Br J Ophthalmol* 1996;80: 363- 366.
- 98- Ramrattan RS, Van der Schaft TL, Mooy CM, de Bruijn WC, Mulder PG, de Jong PT. Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35: 2857 - 2864.
- 99- Ruggiero D, Dalmaso C, Nutile T, Sorice R, Dionisi L, Aversano M, et al. Genetics of VEGF serum variation in human isolated populations of cileto: importance of VEGF polymorphisms. *PLoS One*. 2011 Feb 9;6(2):e16982
- 100- Khan JC, Shahid H, Thurlby DA, Bradley M, Clayton DG, Moore AT, et al. Genetic Factors in AMD Study. Age related macular degeneration and sun exposure, iris colour, and skin sensitivity to sunlight. *Br J Ophthalmol*. 2006 Jan;90(1): 29-32.
- 101-Edwards A.O, Ritter 3rd R, Abel K.J, Manning A, Panhuysen C, Farrer L.A. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 2005;308, 421–424.
- 102- Haines J.L, Hauser M.A, Schmidt S, Scott W.K, Olson L.M, Gallins P, et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 2005;308, 419–421.
- 103- Chen L.J, Liu D.T, Tam P.O, Chan W.M, Liu K, Chong K.K, et al. Association of complement factor H polymorphisms with exudative age-related macular degeneration. *Mol. Vis* 2006;12, 1536–1542.
- 104- Brantley Jr M.A, Edelstein S.L, King J.M, Plotzke M.R, Apte R.S, Kymes S.M, et al Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to photodynamic therapy. *Eye* 2009;23(3):626-31.
- 105-Tang NP, Zhou B, Wang B, Yu RB. HTRA1 promoter polymorphism and risk of age-related macular degeneration: a meta-analysis. *Ann Epidemiol*. 2009 Oct;19(10):740- 5.

- 106- Marioli DI, Pharmakakis N, Deli A, Havvas I, Zarkadis IK. Complement factor H and LOC387715 gene polymorphisms in a Greek population with age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009;247(11):1547-53.
- 107- Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Wolf G, Wascher TC et al. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. *Int. J. Cancer,* 106, 468–471.
- 108- Summers AM, Coupes BM, Brennan MF, Ralph SA, Short CD, Brenchley PE. VEGF- 460 genotype plays an important role in progression to chronic kidney disease stage 5. *Nephrol. Dial. Transplant.*2005; 20, 2427–2432.
- 109- Seo JS, Lee SS, Kim SI, Ryu WH, Sa KH, Kim SU, et al. Influence of VEGF gene polymorphisms on the severity of ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford).* 2005 Oct;44(10): 1299-302.
- 110- Del Bo R, Scarlato M, Ghezzi S, Martinelli Boneschi F, Fenoglio C, Galbiati S, et al. Vascular endothelial growth factor gene variability is associated with increased risk for AD. *Ann Neurol.* 2005 Mar;57(3):373-80.
- 111- Lin CC, Wu HC, Tsai FJ, Chen HY, Chen WC. Vascular endothelial growth factor gene-460 C/T polymorphism is a biomarker for prostate cancer. *Urology.* 2003 Aug;62(2): 374-7.
- 112- Papazoglou D, Galazios G, Papatheodorou K, Liberis V, Papanas N, Maltezos E, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 2005 Apr;83(4):959-63.
- 113- Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, et al. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002May;51(5): 1635- 9.
- 114- Vannay A, Dunai G, Bányász I, Szabó M, Vámos R, Treszl A, Hajdú J, Tulassay T, Vásárhelyi B. Association of genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor and risk for proliferative retinopathy of prematurity. *Pediatr Res.* 2005 Mar;57(3): 396- 8.
- 115- Suganthalakshmi B, Anand R, Kim R, Mahalakshmi R, Karthikprakash S, Namperumalsamy P, et al. Association of VEGF and eNOS gene polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy. *Mol Vis.* 2006 Apr 11;12: 336- 41.

- 116- Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine*. 2000 Aug;12(8):1232-5.
- 117- Park DH, Kim IT. Polymorphisms in the VEGF-A in polypoidal choroidal vasculopathy in a Korean population. *Jpn J Ophthalmol*. 2012 Mar;56(2):145-51.
- 118- Szaflik JP, Błasiak J, Krzyanowska A, Zaraś M, Janik-Papis K, Borucka AI, et al. Distribution of the C-460T polymorphism of the vascular endothelial growth factor gene in age-related macular degeneration. *Klin Oczna*. 2009;111(4-6):125-7.
- 119- Boekhoorn SS, Isaacs A, Uitterlinden AG, van Duijn CM, Hofman A, de Jong PT, et al. Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and risk of age-related macular degeneration: the Rotterdam Study. *Ophthalmology*. 2008 Nov;115(11):1899-903.
- 120- Galan A, Ferlin A, Caretti L, Buson G, Sato G, Frigo AC, et al. Association of age-related macular degeneration with polymorphisms in vascular endothelial growth factor and its receptor. *Ophthalmology*. 2010 Sep;117(9):1769-74.
- 121- Haines JL, Schnetz-Boutaud N, Schmidt S, Scott WK, Agarwal A, Postel EA, et al. Functional candidate genes in age-related macular degeneration: significant association with VEGF, VLDLR and LRP6. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Jan;47(1):329-35.
- 122- Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Takita H, Kabasawa S, Kawasaki I, et al. Phenotype and genotype characteristics of age-related macular degeneration in a Japanese population. *Ophthalmology*. 2010 May;117(5):928-38.
- 123- Almeida LN, Melilo-Carolino R, Veloso CE, Pereira PA, Miranda DM, De Marco LA, et al. Homozygosity for the +674C>T polymorphism on VEGF gene is associated with age-related macular degeneration in a Brazilian cohort. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2012 Feb;250(2):185-9.
- 124- Qu Y, Dai H, Zhou F, Zhang X, Xu X, Zhang X, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and risk of neovascular age-related macular degeneration in a Chinese cohort. *Ophthalmic Res*. 2011;45(3):142-8.

- 125- Fang AM, Lee AY, Kulkarni M, Osborn MP, Brantley MA Jr. Polymorphisms in the VEGFA and VEGFR-2 genes and neovascular age-related macular degeneration. *Mol Vis*. 2009 Dec 10;15:2710-9.
- 126- Kloeckener-Gruissem B, Barthelmes D, Labs S, Schindler C, Kurz-Levin M, Michels S, et al. Genetic association with response to intravitreal ranibizumab in patients with neovascular AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Jul 1;52(7):4694-702.
- 127- McKibbin M, Ali M, Bansal S, Baxter PD, West K, Williams G, et al. CFH, VEGF and HTRA1 promoter genotype may influence the response to intravitreal ranibizumab therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 2012 Feb;96(2):208-12.
- 128- Richardson AJ, Islam FM, Guymer RH, Cain M, Baird PN. A tag-single nucleotide polymorphisms approach to the vascular endothelial growth factor-A gene in age-related macular degeneration. *Mol Vis*. 2007 Nov 26;13:2148-52.
- 129- Nakata I, Yamashiro K, Nakanishi H, Tsujikawa A, Otani A, Yoshimura N. VEGF gene polymorphism and response to intravitreal bevacizumab and triple therapy in age-related macular degeneration. *Jpn J Ophthalmol*. 2011 Sep;55(5):435-43.
- 130- Immonen I, Seitsonen S, Tommila P, Kangas-Kontio T, Kakko S, Savolainen ER, et al. Vascular endothelial growth factor gene variation and the response to photodynamic therapy in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2010 Jan;117(1):103-8.