

lek. Maciej Szemraj

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Piotr Jurowski

Streszczenie

Tytuł: „Molekularne podstawy rozwoju zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem (AMD)”

Wstęp:

Zwyrodnienie plamki żółtej związane z wiekiem jest chorobą postępującą, o wieloczynnikowej i nie w pełni poznanej etiopatogenezie. Zarówno sucha, jak i wysiękowa postać AMD może ostatecznie doprowadzić do utraty centralnego pola widzenia. W badaniach genetycznych upatruje się szans na poprawę wykrywalności, diagnostyki, czy wyboru właściwej terapii.

Założenia:

1. istnieją różnice w ekspresji microRNA w surowicy chorych na suchą lub wysiękową postać AMD.

2. istnieją różnice w ilości microRNA, wpływających na ekspresję genów odpowiedzialnych za metabolizm jonów żelaza, w surowicy chorych na hemochromatozę i AMD oraz chorych na AMD bez hemochromatozy.

3. ekspresja genów odpowiedzialnych za metabolizm żelaza wpływa na różnice w stężeniu żelaza i białek związanych z jego metabolizmem w surowicy chorych z wrodzoną hemochromatozą i AMD oraz chorych z AMD bez hemochromatozy.

4. obecność miejsc polimorficznych (polimorfizmów pojedynczych nukleotydów SNP) w sekwencji nukleotydowej genów odpowiedzialnych za przemianę macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-2) oraz neowaskularyzację (VEGF, VEGFR-2) jest skorelowana z podwyższonym ryzykiem rozwoju zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem.

W związku z powyższym za cel pracy przyjęto:

1. identyfikację różnic w ekspresji wybranych microRNA w surowicy chorych na suchą lub wysiękową postać AMD.

2. ocenę ilości wybranych microRNA o udokumentowanym wpływie na ekspresję genów odpowiedzialnych za metabolizm jonów żelaza (TF, TFRC, DMT1, FTL, FPN1) w surowicy chorych z hemochromatozą i AMD oraz chorych na AMD bez hemochromatozy.

3. określenie wpływu ekspresji wybranych genów (TF, TFRC, DMT1, FTL, FPN1) na stężenie ich produktów białkowych i żelaza w surowicy chorych na wrodzoną hemochromatozę i AMD, chorych na AMD bez hemochromatozy.

4. analizę częstości występowania poszczególnych alleli w wybranych polimorfizmach sekwencji pojedynczych nukleotydów w genach MMP-2 (-735 C/T), MMP-7 (-181 A/G), MMP-9 (-1702 T/A, -1562 C/T), TIMP-2 (-418 G/C), VEGF (+405 G/C, +936 C/T), VEGFR-2 (+1719 T/A, -271 G/A) wśród chorych na suchą i wysiękową postać AMD oraz ich wpływu na wystąpienie i progresję AMD.

Materiał i metody:

W badaniach wzięło udział 150 chorych z rozpoznaną suchą postacią AMD, 150 chorych z rozpoznaną wysiękową postacią AMD, 25 chorych na hemochromatozę i AMD oraz 200 osób zdrowych (bez cech AMD i hemochromatozy).

Materiałem do badania była krew żylna w ilości 2 ml, która została rozfrakcjonowana poprzez wirowanie i wykorzystana do izolowania leukocytów oraz osocza krwi. Wyizolowane leukocyty posłużyły do izolacji DNA metodą fenolową i RNA metodą trizolową, natomiast osocze do izolowania microRNA. DNA leukocytów zostało wykorzystane do badania mutacji punktowych występujących w wybranych genach metodą SSCP i sekwencjonowania. RNA leukocytów posłużyło do badania ekspresji wybranych genów metodą Real time PCR. Stężenie żelaza w surowicy mierzono metodami kolorymetrycznymi, natomiast do ilościowego wykrywania białek w surowicy (TF, TFRI, DMT1, FTL i FPN1) wykorzystano specyficzne testy ELISA.

Wyniki:

Wykazano różnice w ekspresji miRNA oraz w częstości występowania polimorfizmów pojedynczych nukleotydów wybranych genów w surowicy chorych w zależności od postaci AMD.

Zaobserwowano zwiększoną ekspresję miR661 i miR3121 w surowicy chorych z suchą postacią AMD oraz miR4258, miR889 i Let7 u pacjentów z wysiękową postacią AMD.

Określono miRNA (miR-19a, miR-31, miR-133a, miR-141, miR-145, miR-149, miR-182, miR-194, miR-758) związane z genami odpowiedzialnymi za metabolizm żelaza. Ekspresja miR-31, miR-141 i miR-182 była znacząco wyższa, podczas gdy miR-133a, miR-145 i miR-149 była niższa w surowicy chorych z AMD i hemochromatozą w porównaniu do chorych na AMD bez wrodzonej hemochromatozy.

Osoby posiadające genotyp TT genu MMP-9 -1702 T/A oraz CC genu VEGF +936 C/T mają większe ryzyko rozwoju AMD. Heterozygoty TA genu MMP-9 -1702 T/A oraz CT genu MMP-9 -1562 C/T mają zwiększone ryzyko rozwoju wysiękowej postaci AMD.

Wnioski:

1. istnieją różnice w ekspresji microRNA w surowicy chorych na suchą postać AMD w porównaniu do wysiękowej postaci AMD. Określone, specyficzne miRNA mogą być potencjalnie zastosowane do oceny ryzyka wystąpienia suchej lub wysiękowej postaci AMD.

2. istnieją różnice w ekspresji kilku miRNA związanych z genami, których białka odpowiedzialne są za metabolizm jonów żelaza, u chorych z AMD oraz wrodzoną hemochromatozą w porównaniu do chorych na AMD bez wrodzonej hemochromatozy. Określone, specyficzne miRNA mogą być potencjalnie zastosowane w ocenie ryzyka wystąpienia AMD u chorych na wrodzoną hemochromatozę.

3. istnieją różnice w częstości występowania wybranych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów genów odpowiedzialnych za przemiany macierzy pozakomórkowej i neowaskularyzację pomiędzy chorymi na suchą i wysiękową postać AMD oraz osobami bez zmian zwyrodnieniowych plamki żółtej. Analiza obecności specyficznych genotypów i alleli w miejscach polimorficznych badanych genów może być wykorzystana do określenia ryzyka wystąpienia suchej lub wysiękowej postaci AMD.