

(19)

Wpływ polimorfizmów Y402H, E318D oraz R102G genów kodujących białka układu dopełniacza na wyniki leczenia doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF u chorych na wysiękową postać zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem

Association between Y402H, E318D and R102G polymorphisms of complement proteins genes and the response to intravitreal anti-VEGF treatment in patients with neovascular age-related macular degeneration

Agnieszka Kubicka-Trzaska¹, Izabella Karska-Basta¹, Joanna Kobylarz¹, Sylwia Dziedzina², Marek Sanak², Bożena Romanowska-Dixon¹

¹ Klinika Okulistyki i Onkologii Okulistycznej Katedry Okulistyki Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Bożena Romanowska-Dixon

² Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej II Katedry Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Marek Sanak

Abstrakt:

Cel: określenie związku między polimorfizmami E318D (rs9332739) genu kodującego białko C2, R102G (rs2230199) genu kodującego białko C3 i Y402H (rs1061170) genu czynnika CFH układu dopełniacza a ryzykiem wystąpienia zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem oraz ocena ich wpływu na efekt leczenia antyangiogenego.

Material i metody: badaniami objęto 106 chorych na zwyrodnienie plamki związane z wiekiem leczonych doszkliskowymi iniekcjami ranibizumabu i/lub bewacyzumabu. Oceniając skuteczność leczenia, porównywano wyjściową najlepszą skorygowaną ostrość wzroku oraz grubość centralnej siatkówki w obrazie badania optycznej koherentnej tomografii z wynikami badań kontrolnych wykonywanych co miesiąc. Okres obserwacji wyniósł 6 miesięcy. Grupę kontrolną stanowiło 58 osób, u których wykluczono zwyrodnienie plamki związane z wiekiem. Badania przeprowadzono za pomocą sond genetycznych TaqMan firmy Applied Biosystems.

Wyniki: polimorfizmy E318D (C2) oraz R102G (C3) nie wykazały związku ze zwyrodnieniem plamki związanym z wiekiem. Genotyp CC polimorfizmu Y402H (CFH) występował częściej u chorych na zwyrodnienie plamki związane z wiekiem niż u osób z grupy kontrolnej [OR=3,09 (1,28–7,49); p=0,0069]. W ostatnim badaniu kontrolnym u chorych na zwyrodnienie plamki związane z wiekiem, u których stwierdzono genotyp CC rs1061170 CFH, najlepsza skorygowana ostrość wzroku była gorsza, a grubość centralnej siatkówki większa niż u chorych na zwyrodnienie plamki związane z wiekiem, u których nie stwierdzono tego genotypu [OR=7,67 (1,77–33,12), p=0,0052]. Na leczenie nie zareagowało 25,47% chorych ("non-responders"), genotyp CC polimorfizmu rs1061170 CFH stwierdzono u 51,8% spośród nich. U chorych z genotypem TT polimorfizmu rs1061170 CFH ostateczna najlepsza skorygowana ostrość wzroku była lepsza, a redukcja grubości centralnej siatkówki istotna w porównaniu z tymi samymi parametrami u chorych z genotypem CC rs1061170 CFH [OR=0,31 (0,11–0,84), p=0,0194].

Wnioski: wyniki naszych obserwacji wskazują, że genotyp CC rs1061170 CFH zwiększa ryzyko wystąpienia zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem. Ponadto genotyp CC rs1061170 CFH promuje negatywną odpowiedź na leczenie antyangiogenne, podczas gdy genotyp TT rs1061170 CFH może zmniejszać ryzyko braku odpowiedzi na leczenie doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF.

Słowa kluczowe: układ dopełniacza, polimorfizm genowy, zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (AMD).

Abstract:

Aim: To analyze the correlation between the E318D rs9332739 polymorphism of the C2 complement factor; R102G rs2230199 polymorphism of the C3 complement factor as well as the Y402H rs1061170 polymorphism of the CFH complement factor and risk of AMD as well as the response to anti-VEGF therapy.

Material and methods: 106 patients with age-related macular degeneration treated with intravitreal ranibizumab or bevacizumab were enrolled. The response to treatment was assessed at 4 weeks intervals for 6 months and was based on the results of best corrected visual acuity and central retinal thickness measurements compared to the respective baseline values.

The control group consisted of 58 healthy volunteers. The testing was performed using genetic probes (TaqMan Applied Biosystems) in all cases.

Results: E318D (C2) and R102G (C3) polymorphisms were not associated with age-related macular degeneration. The genotype CC of Y402H (CFH) polymorphism was more frequent in patients with age-related macular degeneration as compared to controls [OR=3.09 (1.28–7.49); $p=0.0069$]. At the last follow-up, patients with age-related macular degeneration positive for the CC rs1061170 CFH genotype presented with worse best corrected visual acuity and increased central retinal thickness as compared to their counterparts negative for this genotype [OR=7.67 (1.77–33.12), $p=0.0052$]. Among 25.47% of “non-responders”, the CC rs1061170 CFH genotype was present in 51.8% of cases. In patients with the TT rs1061170 CFH genotype the final best corrected visual acuity was better and a significant reduction of central retinal thickness was demonstrated in all those cases, as compared to subjects with the CC rs1061170 CFH genotype [OR=0.31 (0.11–0.84), $p=0.0194$].

Conclusions: The study showed that the CC rs1061170 CFH genotype may be associated with the age-related macular degeneration. Additionally, the CC rs1061170 CFH genotype may promote a negative response to anti-VEGF treatment, while patients with the TT rs1061170 CFH genotype showed better functional and structural response to anti-VEGF agents.

Key words:

complement system, genetic polymorphism, age-related macular degeneration (AMD).

Wprowadzenie

W krajach rozwiniętych zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (Age-related Macular Degeneration – AMD) stanowi obecnie najczęstszą przyczynę utraty wzroku u osób powyżej 50. roku życia (1). Jest to schorzenie o złożonej etiopatogenezie. Do czynników ryzyka zalicza się podeszły wiek, palenie tytoniu, płeć żeńską, przynależność etniczną kaukaską, choroby sercowo-naczyniowe, cukrzycę, otyłość, dietę bogatą w tłuszcze zwierzęce i ubogą w antyoksydanty, jasny kolor tęczówek, stany po operacji zaćmy oraz przewlekłe narażenie na działanie promieniowania ultrafioletowego (2). Spośród czynników ryzyka należy także wymienić rodzinne występowanie AMD, może to świadczyć o dziedzicznym charakterze tego schorzenia i potwierdza zasadność oraz konieczność poszukiwania markerów genetycznych ryzyka AMD (3, 4). Do tej pory zidentyfikowano wiele polimorfizmów genetycznych o istotnym powiązaniu z tym schorzeniem (3, 4). Wiadomo, że m.in. polimorfizmy genów kodujących endotelialną syntazę tlenu azotu czy też białka regulujące homeostazę jonów żelaza i kontrolujące nasilenie procesów stresu oksydacyjnego biorą udział w patomechanizmie AMD (5, 6). Według współczesnych poglądów na patogenезę AMD, w którą są zaangażowane nie tylko miejscowe mechanizmy zapalne i immunologiczne, ale także ogólnoustrojowe, najistotniejsze znaczenie – jak się wydaje – mają polimorfizmy genów kodujących białka układu dopełniacza (7, 8). O udziale mechanizmów zapalnych w przebiegu AMD świadczy m.in. obecność tych białek w druzach oraz podsiatkówkowych błonach neowaskularnych u chorych na AMD. Ponadto w surowicy krwi u chorych na AMD stwierdzono występowanie podwyższonych stężeń niektórych białek układu dopełniacza – białek C2 oraz C3 (9).

Obecnie standardem leczenia wysiękowej postaci AMD są doszkliskowe iniekcje czynnika anty-VEGF. Jak potwierdzają obserwacje kliniczne, nie u wszystkich chorych terapia anty-VEGF jest skuteczna. Około 20–35% chorych to tzw. „non-responders”, czyli osoby niereagujące na leczenie antyangiogenne lub reagujące, lecz słabo, u których pomimo leczenia dochodzi do progresji zmian zwyrodnieniowych w plamce oraz pogorszenia widzenia (10, 11). Dlatego coraz większe zainteresowanie wzbudzają badania nad poznaniem genetycznych uwarunkowań tego schorzenia. Poznanie swoistych dla AMD nieprawidłowości genetycznych bowiem może być pomocne w przewidywa-

niu przebiegu klinicznego choroby i odpowiedzi na zastosowane leczenie anty-VEGF, a tym samym przydatne do genetycznej indywidualizacji leczenia tego schorzenia.

Wziąwszy pod uwagę przedstawione założenia, przystąpiono do badań, które miały na celu analizę występowania polimorfizmów E318D (rs9332739) genu kodującego białko C2, R102G (rs2230199) genu kodującego białko C3 oraz Y402H (rs1061170) genu czynnika CFH układu dopełniacza i określenie, jaki mają one związek z ryzykiem występowania wysiękowej postaci AMD, oraz wykazanie zależności między tymi wariantami genów a odpowiedzią na leczenie doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF.

Material i metody

Badaniami objęto 106 chorych na wysiękową postać AMD leczonych w naszej klinice doszkliskowymi iniekcjami ranibizumabu i bewacyzumabu. Wszystkich poddano wstępnemu badaniu okulistycznemu, które obejmowało: ocenę najlepszej skorygowanej ostrości wzroku (Best Corrected Visual Acuity – BCVA), pomiar ciśnienia wewnątrzgałkowego (Intraocular Pressure – IOP), ocenę przedniego odcinka oka i dna oka, kolorową fotografię dna oka (fundus kamera Topcon-TRC-50DX, Japonia), pomiar centralnej grubości siatkówki (Central Retinal Thickness – CRT) za pomocą optycznej koherentnej tomografii (Optical Coherence Tomography – OCT) (Topcon 3D OCT 2000, Japonia) oraz badanie angiografii fluoresceinowej (Fluorescein Angiography – FA) (Topcon, TRC-50DX/A, Japonia). Co 4 tygodnie przeprowadzano badania kontrolne – wszystkie ww. z wyjątkiem FA.

Leczenie doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF (ranibizumabem 0,5 mg/ 0,05 ml, bewacyzumabem 1,25 mg/ 0,5 ml) przebiegało dwufazowo: w fazie „nasycającej” każdy chory otrzymywał trzy kolejne iniekcje czynnika anty-VEGF w odstępach miesięcznych, a fazie „podtrzymującej” podstawą doboru leczenia był wynik badania klinicznego wg schematu *pro re nata*, czyli „w razie potrzeby”.

Grupa kontrolna liczyła 58 osób dobranych pod względem płci i wieku spośród operowanych w naszej klinice z powodu zaćmy pacjentów, u których wykluczono obecność AMD. W wywiadach lekarskich, które przeprowadzono zarówno u chorych na AMD, jak i u osób z grupy kontrolnej, nie stwierdzono rodzinnego występowania chorób dziedzicznych i nowotworowych.

Po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej UJ (KBE-T/67/B/2013) oraz świadomej pisemnej zgody pacjenta na udział w badaniu we wszystkich przypadkach pobrano jednorazowo do oznaczeń genetycznych 4–5 ml pełnej krwi, w której badano polimorfizmy: *E318D rs9332739* (C2), *R102G rs2230199* (C3) oraz *Y402H rs1061170* (CFH).

Izolacja DNA

Krew obwodową do badań molekularnych pobierano na antykoagulant EDTA. Do pełnej krwi dodawano 6-procentowy roztwór wielkocząsteczkowego dekstranu (Dextran T500, Pharmacia) w celu sedymentacji erytrocytów. Bogate w leukocyty osocze odciągano i wirowano przez 10 min/ 20000 x g. DNA izolowano z białych komórek krwi metodą Chomczyńskiego i Sacchiego (DNAzol, Gibco). Ten odczynnik zawiera roztwór lizujący – izotiocjanian guanidyny, który dzięki rozbiciu wiązań wodorowych powoduje całkowite uwolnienie DNA z kompleksów jądrowych z białkami histonowymi. Do powstałego po odwirowaniu osadu dodawano 0,4 ml odczynnika DNAzol i wstrząsano. Po rozpuszczeniu błon komórkowych leukocytów DNA precypitowano 95-procentowym alkoholem etylowym w objętości 0,2 ml. Następnie wyizolowane DNA płukano w 70-procentowym etanolu i suszono w cieplarni w temperaturze 37°C. Wysuszone DNA zalewano wodą redestylowaną i w takiej postaci poddawano dalszym badaniom.

Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

Wyizolowane w ten sposób DNA było amplifikowane i poddawane genotypowaniu metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym („real-time PCR” – Polymerase Chain Reaction – PCR). Ta metoda bazuje na klasycznej metodzie polimerazowej reakcji łańcuchowej i pozwala na monitorowanie ilości produktu amplifikacji w każdym cyklu reakcji, wykorzystując swoiste pod względem wariantów sekwencji znakowane fluorescencyjnie sondy molekularne przyłączające się między parą starterów PCR. W tym przypadku użyto sond TaqMan (TaqManprobes, 5'-nuclease probes). Są to krótkie oligonukleotydy komplementarne do powielanej sekwencji DNA, zawierające na końcu 5' barwnik fluorescencyjny, a na końcu 3' cząsteczkę wygaszającą fluorescencję. Podczas każdego cyklu PCR sonda rozpoznaje swoisty region matrycy DNA i wiąże się z nim między miejscami przyłączenia starterów. Po związaniu się z nimi w procesie elongacji sonda jest degradowana przez polimerazę Taq mającą aktywność 5'-egzonukleazy, w wyniku tego fluorochrom ulega oddzieleniu, wywołując emisję fluorescencji.

Reakcja „real-time PCR” była przeprowadzana na płytkach 96-dółkowych w aparacie 7900 HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Standardowa mieszanina reakcyjna zawierała roztwory substratów i polimerazy; TaqMan Universal PCR Master Mix, startery, sondy, wodę oraz DNA zgodnie z zaleceniem producenta (TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol – Applied Biosystems). Sondy oraz startery zakupiono w firmie Applied Biosystems w postaci gotowych do użycia TaqMan Gene Expression Assay.

Analiza statystyczna

W badanych grupach istotność różnic między częstością alleli i genotypów oceniano za pomocą testu Chi². Analizę związku genotypów polimorfizmu z występowaniem AMD wykonano

według modelu regresji logistycznej. Dla każdej pary obliczano wartość ilorazu szans (Odds Ratio – OR) oraz przedział ufności (95% PU). Wartości OR były następnie korygowane pod względem potencjalnych czynników zakłócających i podawane jako OR skorygowane. Do analizy statystycznej i opracowania wyników użyto oprogramowania STATISTICA 10.0. Wartości $p < 0,05$ uznano za statystycznie istotne.

Wyniki

W tabeli I przedstawiono szczegółową charakterystykę grupy chorych na AMD oraz grupy kontrolnej. U chorych na AMD zwraca uwagę znacznie częściej występujące obciążenie rodzinne tym schorzeniem aniżeli u osób z grupy kontrolnej ($p=0,0034$). Analizie poddano wpływ kilku czynników, tj.: płci, wieku, palenia tytoniu, miejsca zamieszkania, pozytywnego wywiadu rodzinnego w kierunku AMD, które potencjalnie zwiększają prawdopodobieństwo rozwoju AMD, na ryzyko rozwoju tego schorzenia niezależnie od badanych polimorfizmów genowych. W naszym materiale klinicznym płeć żeńska, wiek powyżej 60 lat, środowisko miejskie oraz pozytywny wywiad rodzinny istotnie wpływały na zwiększenie ryzyka wystąpienia AMD – najsilniejszą dodatnią korelację stwierdzono dla wieku powyżej 60 lat ($p=0,0002$) oraz pozytywnego wywiadu rodzinnego ($p=0,0023$) (tab. II). Na uwagę za-

Badana cecha/ Characteristic	Grupa AMD/ AMD group liczba/ number n=106	Grupa kontrolna/ Control group liczba/ number n=58	p
Płeć/ Sex			0,0206
kobiety/ females	70 (66%)	30 (53%)	
mężczyźni/ males	36 (34%)	28 (47%)	
Wiek/ Age	56–90 lat (śr. 71,2 roku)	54–88 lat (śr. 68,4 roku)	0,0232
≤ 60 lat/ ≤ 60 years	13 (12,3%)	11 (18,9%)	
> 60 lat/ > 60 years	93 (87,7%)	47 (81,1%)	
Palenie tytoniu/ Smoking			0,0896
obecnie/ w przeszłości/ current/ former	31 (29%)	15 (25,8%)	
nigdy/ never	75 (71%)	43 (74,2%)	
Miejsce zamieszkania/ Living environment			0,0176
miasto/ urban	74 (69,8%)	36 (62%)	
wieś/ rural	32 (30,2%)	22 (38%)	
Wywiad rodzinny/ Family history of AMD			0,0034
pozytywny/ positive	24 (22,64%)	4 (4%)	
negatywny /negative	82 (77,35%)	54 (96%)	

Tab. I. Charakterystyka chorych na AMD i osób z grupy kontrolnej.
Tab. I. Characteristics of subjects with AMD and a control group.

Badana cecha/ Characteristics	Grupa AMD/ AMD group Liczba/ number n=106	Grupa kontrolna/ Control group liczba/ number n=58	OR (95% PU)	p (p<0,05)
Płeć/ Sex				0,0216
kobiety/ females	70 (66%)	30 (53%)	2,16 (1,11–4,19)	
mężczyźni/ males	36 (34%)	28 (47%)	0,46 (0,24–0,90)	
Wiek/ Age				0,0002
≤ 60 lat / ≤ 60 years	13 (12,3%)	11 (18,9%)	0,18 (0,24–0,90)	
> 60 lat / > 60 years	93 (87,7%)	47 (81,1%)	5,51 (2,20–13,80)	
Palenie tytoniu/ Smoking status				0,0931
obecnie/ w przeszłości current/ former	31 (29%)	15 (25,8%)	0,50 (0,23–1,13)	
nigdy/ never	75 (71%)	43 (74,2%)	1,98 (0,89–4,44)	
Miejsce zamieszkania/ Living environment				0,0191
miasto/ urban	74 (69,8%)	36 (62%)	2,33 (1,14–4,76)	
wieś/ rural	32 (30,2%)	22 (38%)	0,43 (0,21–0,87)	
Wywiad rodzinny w kierunku AMD/ Family history of AMD				0,0023
pozytywny/ positive	24 (22,64%)	4 (4%)	8,44 (3,56–14,70)	
negatywny/ negative	82 (77,35%)	54 (96%)	0,11 (0,19–0,80)	

Tab. II. Ryzyko rozwoju AMD związane z płcią, wiekiem, paleniem tytoniu, miejscem zamieszkania i obciążeniem rodzinnym AMD.

Tab. II. Risk of AMD development depending on patient's sex, age, smoking status, living environment and a family history of AMD.

śluguje fakt, że w badanej grupie chorych nie wykazano istotnej statystycznie zależności między paleniem tytoniu, uważanym za jeden z najważniejszych modyfikowalnych czynników ryzyka rozwoju AMD, a występowaniem tego schorzenia ($p=0,0931$).

W tabelach III, IV i V przedstawiono rozkład genotypów i alleli trzech badanych polimorfizmów: E318D rs9332739 (C2), R102G rs2230199 (C3) oraz Y402H rs1061170 (CFH) oraz wartości otrzymane dla przeprowadzonej analizy ilorazu szans w grupie chorych na AMD w odniesieniu do grupy kontrolnej. Między dwiema grupami nie wykazano istotnych statystycznie różnic w rozkładzie genotypów i alleli dla polimorfizmów E318D rs9332739 (C2) i R102G rs2230199 (C3) (tab. III i IV). Natomiast w przypadku polimorfizmu Y402H rs1061170 (CFH)

stwierdzono występowanie istotnych różnic w rozkładzie genotypów CC ($p=0,0069$), TT ($p=0,0193$) oraz alleli C ($p=0,034$) i T ($p=0,022$) między grupą badaną a grupą osób niechorujących na AMD. Analiza wykazała, że genotyp CC oraz allel C zwiększają ryzyko wystąpienia wysiękowej postaci AMD (OR 3,04, 95% PU 1,34–9,91; OR 2,35, 95% PU 1,45–5,44), podczas gdy genotyp TT oraz allel T mogą je zmniejszać (OR 0,42, 95% PU 0,20–0,89; OR 0,29, 95% PU 0,11–0,78) (tab. V).

Wyniki obserwacji wskazywały, że u 27 chorych (25,47%) z badanej grupy nie odnotowano pozytywnej reakcji na miejscowe leczenie antyangiogenne. U tych chorych pomimo leczenia nie uzyskano poprawy zarówno funkcji leczonego oka, jak i zobrazowanej badaniem OCT morfologii dołka – za brak

Genotyp/ allel Genotype/ allele	Grupa AMD/ AMD group n=106	Grupa kontrolna/ Control group n=58	Wskaźnik OR nieskorygowany (95% PU)/ OR crude (95% PU)	Wskaźnik OR skorygowany (95% PU)/ OR adjusted (95% PU)	p
GG	101 (95%)	51 (88%)	0,36 (0,11–1,20)	0,38 (0,16–1,28)	0,1032
gc	5 (5%)	7 (12%)	2,77 (0,83–9,25)	2,86 (0,88–9,30)	0,1032
G	198 (94,3%)	98 (89%)	0,98 (0,28–2,45)	0,98 (0,28–2,45)	0,1340
g	6 (2,85%)	6 (5,45%)	0,5 (0,12–1,23)	0,5 (0,12–1,23)	0,2240
c	6 (2,85%)	6 (5,45%)	0,5 (0,12–1,23)	0,5 (0,12–1,23)	0,2240

Tab. III. Rozkład genów i alleli polimorfizmu E318D rs9332739 C2 oraz analiza ilorazu szans (Odds Ratio – OR) w grupie chorych na AMD i w grupie kontrolnej.

Tab. III. Distribution of genotypes and alleles of the E318D rs9332739 C2 polymorphism as well as the odds ratio (OR) in a study group and healthy controls.

Genotyp/ Allel Genotype/ Allele	Grupa AMD/ AMD group n=106	Grupa kontrolna/ Control group n=58	Wskaźnik OR nieskorygowany (95% PU)/ OR crude (95% PU)	Wskaźnik OR skorygowany (95% PU)/ OR adjusted (95% PU)	p
GG	65 (61%)	40 (69%)	0,81 (0,4–1,64)	0,72 (0,31–1,54)	0,3080
gc	34 (32%)	16 (28%)	1,4 (0,71–2,78)	1,8 (0,88–2,85)	0,5951
cc	7 (7%)	2 (3%)	0,51 (0,23–2,55)	0,58 (0,19–2,95)	0,2862
G	130 (61,93%)	78 (70,9%)	0,66 (0,32–2,67)	0,68 (0,35–2,69)	0,2242
g	33 (15,7%)	14 (12,7%)	1,28 (0,98–2,34)	1,30 (0,85–2,38)	0,3641
c	47 (22,4%)	16 (1,45%)	0,53 (0,23–2,45)	0,68 (0,56–2,86)	0,5428

Tab. IV. Rozkład genów i alleli polimorfizmu R102G rs2230199 C3 oraz analiza ilorazu szans (Odds Ratio – OR) w grupie chorych na AMD i w grupie kontrolnej.

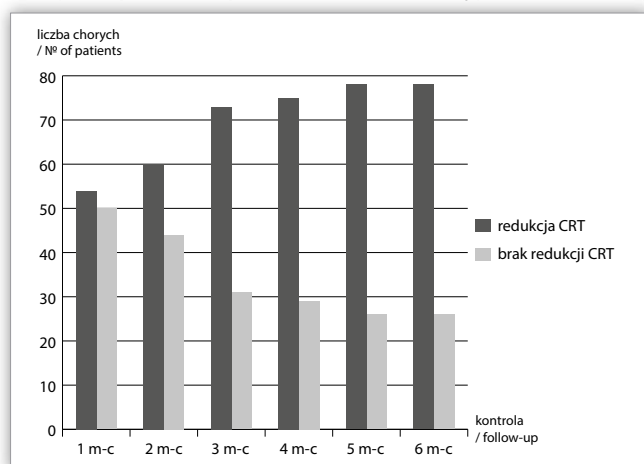
Tab. IV. Distribution of genotypes and alleles of the R102G rs2230199 C3 polymorphism and odds ratio (OR) in a study group and healthy controls.

Genotyp/ Allel Genotype/ Allele	Grupa AMD/ AMD group n=106	Grupa kontrolna/ Control group n=58	Wskaźnik OR nieskorygowany (95% PU)/ OR crude (95% PU)	Wskaźnik OR skorygowany (95% PU)/ OR adjusted (95% PU)	p
CC	38 (36%)	9 (15%)	3,04 (1,34–9,91)	3,09 (1,28–7,49)	0,0069
CT	50 (47%)	30 (52%)	0,58 (0,41–1,66)	0,82 (0,41–1,66)	0,5402
TT	18 (17%)	19 (33%)	0,42 (0,20–0,89)	0,41 (0,18–0,93)	0,0193
C	87 (82,9%)	37 (67,3%)	2,35 (1,45–5,44)	2,36 (1,34–5,67)	0,0340
T	66 (62,9%)	47 (85,5%)	0,29 (0,11–0,78)	0,35 (0,18–0,97)	0,0220

Tab. V. Rozkład genów i alleli polimorfizmu Y402H rs1061170 CFH oraz analiza ilorazu szans (Odds Ratio – OR) w grupie chorych na AMD i w grupie kontrolnej.

Tab. V. Distribution of genotypes and alleles of the Y402H rs1061170 CFH polymorphism and odds ratio (OR) in a study group and healthy controls.

poprawy funkcji oka uznawano brak poprawy BCVA lub jej pogorszenie względem tych parametrów uzyskanych w badaniu wyjściowym. Morfologię dołka oceniano pomiarami CRT oraz ilości płynu śródsiatkówkowego, pod częścią neurosensoryczną siatkówki oraz pod nabłonkiem barwnikowym siatkówki (Retinal Pigment Epithelium – RPE). Na rycinie 1. przedstawiono liczbę chorych, u których stwierdzono redukcję CRT, oraz liczbę



Ryc. 1. Liczba chorych, u których stwierdzono redukcję centralnej grubości siatkówki (Central Retinal Thickness – CRT), oraz liczba chorych, w oczach których nie odnotowano poprawy morfologii dołka w obrazie OCT w poszczególnych badaniach kontrolnych.

Fig. 1. Number of patients with reduction of central retinal thickness (CRT) and with unchanged CRT in treated eyes during a follow-up period in OCT scans.

chorych, w oczach których nie odnotowano poprawy morfologii dołka w obrazie OCT w poszczególnych badaniach kontrolnych.

Analiza statystyczna wykazała zależność między genotypami polimorfizmu rs1061170 a odpowiedzią na zastosowane leczenie antyangiogenne. Analiza stosunku szansy braku reakcji na leczenie u chorych z genotypami CC i TT polimorfizmu rs1061170 do szansy braku reakcji na leczenie u chorych bez tych genotypów wykazała, że genotyp CC promuje negatywną odpowiedź na leczenie antyangiogenne (OR 7,67 95% PU, 1,77–33,12), podczas gdy genotyp TT może zmniejszać ryzyko wystąpienia słabej odpowiedzi na leczenie doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF (OR 0,31 95% PU, 0,11–0,84 (tab. V)). Jednocześnie wykazano, że u chorych z genotypem CC podano średnio o 1,4 iniekcji doszkliskowej więcej w porównaniu do liczby iniekcji podawanych u osób bez tego genotypu.

Omówienie

Ostatnie obserwacje wskazują na istotny wpływ tła genetycznego na wyniki terapii antyoksydantami, fotodynamiczną i doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF u chorych na wysiękową postać AMD (12–17). W większości publikacji podkreśla się znaczenie kilku wariantów genów kodujących białka układu dopełniacza, wśród których najistotniejsze znaczenie ma polimorfizm rs1061170 (Y402H) genu kodującego czynnik CFH (10, 13, 15, 16, 18, 19).

Czynnik CFH jest istotnym regulatorem aktywacji układu dopełniacza. Jego polimorfizm Y402H (rs1061170) (zamiana tyrozyny na histydynę), powodujący nadreaktywność drogi alterna-

tywnej dopełniacza, prowadzi do niszczenia własnych komórek, w tym m.in. komórek RPE (17). Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań immunohistochemicznych wykazały, że pacjenci będący homozygotycznymi nosicielami genotypu CC wykazują 2,5-rza zwiększoną immunoreaktywność białka C reaktywnego (C Reactive Protein – CRP) w obrębie naczyńówki, błony Brucha i druz (10, 20). Gromadzenie się CRP w przestrzeni pod RPE jest uważane za biomarker przewlekłego zapalenia toczonego się w obrębie kompleksu RPE–naczyniówka (20). To sugeruje, że polimorfizm *Y402H* zaburza mediowaną przez czynnik H funkcję CRP, odgrywając w ten sposób ważną rolę w inicjacji lokalnego zapalenia, które prowadzi do uszkodzenia komórek RPE indukowanego aktywacją dopełniacza. Polimorfizm *Y402H* (*rs 1061170*) implikuje zmniejszenie roli ochronnej czynnika H lub jego całkowity brak, czynnika, który jest supresorem aktywacji alternatywnej drogi zarówno w osoczu, jak i w tkankach objętych zapaleniem (15). Polimorfizm *Y402H* wobec współistnienia środowiskowych i osobniczych czynników ryzyka AMD osłabia aktywność CFH jako regulatora alternatywnej drogi układu dopełniacza, zezwalając na jego niekontrolowaną aktywację. Dochodzi do rozwoju przewlekłego lokalnego odczynu zapalnego („para-inflammation”), który zagraża powstaniem zmian zwyrodnieniowych w plamce (15, 20).

Wyniki badań epidemiologicznych udowodniły, że wystąpienie polimorfizmu *Y402H rs1061170* (CFH) 2–4-krotnie zwiększa ryzyko rozwoju AMD u heterozygot oraz 3–7-krotnie u homozygot (19). Ponadto osoby z genotypem homozygotycznym CC wykazują gorszą reakcję na leczenie doustnymi antyoksydantami i cynkiem w porównaniu do osób będących nosicielami homozygotycznego genotypu TT (12). Rozbieżne wyniki natomiast odnotowano w badaniach chorych poddanych terapii fotodynamicznej (Photodynamic Therapy – PDT) z użyciem werteporfiny. Wykazano, że pacjenci będący nosicielami genotypu CC polimorfizmu *rs1061170* (*Y402H*) gorzej reagują na PDT (14). Brantley i wsp. zaś zaobserwowali, że wyniki leczenia PDT są znacznie gorsze u osób będących homozygotami TT w porównaniu do chorych z genotypem CC (CFH) (13).

Istnienie różnych zależności między polimorfizmem *rs1061170* (*Y402H*) a odpowiedzią na miejscowe leczenie antyangiogenne zostało przedstawione w kilku publikacjach (12–17, 21–25). Brantley i wsp. obserwacją objęli chorych leczonych doszkliskowymi iniekcjami bewacyzumabu. Wykazali, że po 6 miesiącach od rozpoczęcia leczenia BCVA była znacznie gorsza u osób z genotypem CC *Y402H rs1061170* (CFH) w porównaniu do BCVA u pacjentów z genotypami TT i CT (13). Podobne obserwacje opisali Nischler i wsp. oraz Imai i wsp. (16, 17). Lee i wsp. natomiast nie wykazali wpływu występowania różnych genotypów *rs1061170* (CFH) na ostateczną BCVA u chorych na wysiękową postać AMD leczonych doszkliskowymi iniekcjami ranibizumabu. Niemniej jednak po 9 miesiącach obserwacji autorzy odnotowali, że chorzy z genotypem CC otrzymali o około 1 iniekcję więcej w porównaniu do liczby iniekcji u chorych z genotypami TT czy CT (15). Mckibbin i wsp. wykazali, że u chorych na wysiękową postać AMD leczonych ranibizumabem w okresie 6-miesięcznej obserwacji wyniki leczenia były bardziej korzystne u osób z genotypem wysokiego ryzyka (CC) dla rozwoju AMD (26). Menghini i wsp. natomiast wykazali, że genotyp CT *rs1061170* (*Y402H*) CFH

był istotnym wskaźnikiem pozytywnej odpowiedzi na leczenie i poprawy BCVA ocenianej po 12 i 24 miesiącach od włączenia leczenia ranibizumabem (27). Brak zależności między genotypami polimorfizmu *rs1061170* (*Y402H*) CFH a wynikami leczenia ranibizumabem u chorych na AMD w okresie rocznej obserwacji przedstawili w swojej pracy Yamashiro i wsp. (28). Na uwagę zasługują także wyniki badań przeprowadzonych z udziałem pacjentów z 43 ośrodków klinicznych, zostali objęci badaniem CATT (Comparison of AMD Treatments Trials), u których oznaczano polimorfizmy *rs1061170* (CFH), *rs10490924* (ARMS2), *rs11200638* (HTRA1) oraz *rs2230199* (C3). Analiza statystyczna nie wykazała u chorych różnic w odpowiedzi na miejscowe leczenie antyangiogenne, które byłyby zależne od nosicielstwa genotypu badanego wariantu genowego. Żaden z badanych genotypów nie wpływał istotnie na ostateczną ostrość wzroku, zmianę CRT czy liczbę podanych iniekcji doszkliskowych czynnika anty-VEGF. Podobnie nie wykazano zależności między liczbą występujących u jednego chorego genotypów będących czynnikami ryzyka rozwoju AMD a ostatecznymi wynikami leczenia. Nie stwierdzono także zależności między allelami/genotypami zagrażającymi powstaniem AMD a odpowiedzią na leczenie niezależnie od rodzaju podawanego doszkliskowo leku oraz zastosowanego schematu leczenia (iniekcje comiesięczne *vs pro re nata*) (29).

Podobnie jak większość opublikowanych wyników i wyniki naszych badań wskazują na istotną zależność między polimorfizmem *Y402H rs1061170* (CFH), który zwiększa ryzyko wystąpienia AMD, a rozwojem tego schorzenia. W okresie 6-miesięcznej obserwacji u chorych z genotypem CC *rs1061170* (CFH) zaobserwowaliśmy istotnie gorsze funkcjonalne oraz anatomiczne wyniki leczenia doszkliskowymi iniekcjami ranibizumabu i bewacyzumabu aniżeli u osób nieposiadających tego genotypu. U chorych odnotowaliśmy gorszą ostateczną BCVA oraz większą CRT zobrazowaną badaniem OCT. W okresie 6-miesięcznej obserwacji chorym z tej grupy podano średnio o 1,4 iniekcji więcej aniżeli osobom „negatywnym” dla tego genotypu. Najistotniejsze różnice w odpowiedzi na leczenie (BCVA i CRT) między chorymi z genotypami CC oraz TT i CT były zauważalne w pierwszym okresie leczenia (faza „nasycająca”), kiedy wszyscy chorzy otrzymali trzy iniekcje czynnika anty-VEGF w odstępach comiesięcznych.

Wyniki naszych obserwacji wykazały, że polimorfizmy *E318D rs9332739* (C2) oraz *R102G rs2230199* (C3) nie mają związku z rozwojem AMD. Wyniki badań przeprowadzonych w Stanach Zjednoczonych przez Spencera i wsp. wykazały, że wariant *E318D* genu czynnika C2 pełni rolę protekcyjną wobec rozwoju AMD w populacji kaukaskiej (30). Wyniki badań przeprowadzonych w Australii nie potwierdziły tej obserwacji (31). Havvas i wsp. przeprowadzili badanie z udziałem 120 chorych na AMD, wyniki ich badania również nie wskazywały, aby ten polimorfizm miał istotne implikacje patogenetyczne dla rozwoju AMD w populacji greckiej (32). Ochronna rola polimorfizmu genetycznego białka C2 układu dopełniacza nie została również potwierdzona w badaniach przeprowadzonych w populacji azjatyckiej, w której stwierdzono bardzo rzadkie występowanie tego wariantu genetycznego (33). Na ochronny wpływ polimorfizmu *R102G rs2230199* (C3) na rozwój AMD w populacji azjatyckiej natomiast wskazały wyniki badań Pei i wsp. oraz Yanagisawa i wsp. (34, 35). Ocena występowania polimorfizmu *R102G rs2230199* (C3) w populacji

niemieckiej nie potwierdziła istnienia związku między tym wariantem genowym a rozwojem AMD (36). Ten wariant zmienia mobilność cząsteczki C3, która może przybierać formy szybką – C3F – lub wolną – C3S, wykazujące różnice w wiązaniu się z receptorami (34–36). Patofizjologię i molekularny mechanizm działania badanych polimorfizmów przedstawiono szczegółowo w naszej wcześniejszej publikacji (37).

Poznanie polimorfizmów genetycznych zagrażających rozwojem AMD i mających wpływ na wyniki leczenia wysiękowej postaci AMD oraz ich ocena mogą być cennymi narzędziami do wczesnego identyfikowania chorych „opornych” na terapię antyangiogenną. Ze względu na dużą rozbieżność dotychczas poznanych wyników badań klinicznych, które wskazują na zróżnicowany wpływ badanych polimorfizmów genowych na rozwój AMD oraz na wyniki zastosowanego leczenia w zależności od badanej grupy chorych, wydaje się wskazane stworzenie indywidualnego i swoistego dla danej populacji panelu badań genetycznych.

Niektórzy autorzy podkreślają, jak istotne znaczenie ma zjawisko kumulacji efektów alleli ryzyka rozwoju AMD w prognozowaniu odpowiedzi na leczenie antyangiogenne (24). Dlatego w celu zwiększenia prawdopodobieństwa postawienia właściwej prognozy dotyczącej niepowodzenia terapii anty-VEGF poszukuje się kolejnych wariantów genowych, które mogłyby wpływać na przebieg kliniczny AMD i jego leczenie. Być może już w niedalekiej przyszłości będą one istotnym elementem diagnostyki chorych na AMD – pomogłoby zaplanować indywidualną strategię postępowania w tych przypadkach.

Wnioski

U chorych z badanej grupy genotyp CC polimorfizmu *rs1061170 CFH (Y402H)* zwiększa ryzyko wystąpienia AMD. Genotyp CC polimorfizmu *rs1061170 CFH* odpowiada za negatywną odpowiedź na leczenie antyangiogenne, podczas gdy genotyp TT może zmniejszać ryzyko braku odpowiedzi na leczenie doszklistkowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF lub ryzyko, że odpowiedź ta będzie słaba. Niezależnie od polimorfizmu *Y402H rs1061170 (CFH)* ryzyko zachorowania na AMD zwiększają: płeć żeńska, wiek powyżej 60. roku życia, środowisko miejskie oraz dodatni wywiad rodzinny.

Wprowadzenie do standardów diagnostycznych AMD panelu badań genetycznych może odegrać w niedalekiej przyszłości dużą rolę w procesach indywidualizacji i prognozowania skuteczności prowadzonego leczenia antyangiogenne.

Praca powstała w ramach programu statutowego nr K/ZDS/003846.

Piśmiennictwo

1. Bourne RR, Jonas JB, Flaxman SR, Keeffe J, Leasher J, Naidoo K, et al.: *Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Prevalence and causes of vision loss in high-income countries and in Eastern and Central Europe: 1990–2010*. Br J Ophthalmol. 2014; 98(5): 629–638.
2. Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klaver CC, Klein BE, et al.: *Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents*. Ophthalmology. 2001; 108(4): 697–704.

3. Cascella R, Ragazzo M, Straffella C, Missiroli F, Borgiani P, Angelucci F, et al.: *Age-related macular degeneration: insights into inflammatory genes*. J Ophthalmol. 2014; 2014: 582842–582846.
4. Ting AY, Lee TK, MacDonald IM: *Genetics of age-related macular degeneration*. Curr Opin Ophthalmol. 2009; 20: 369–376.
5. Wysokiński D, Danisz K, Pawłowska E, Dorecka M, Romaniuk D, Robaszkiewicz J, et al.: *Transferrin receptor levels and polymorphism of its gene in age-related macular degeneration*. Acta Biochim Pol. 2015; 62(2): 177–184.
6. Synowiec E, Wysokiński D, Zaras M, Kolodziejska U, Stoczynska-Fidelus E, Janik K, et al.: *Association between polymorphism of the DNA repair SMUG1 and UNG genes and age-related macular degeneration*. Retina. 2014; 34(1): 38–47.
7. McHarg S, Clark SJ, Day AJ, Bishop PN: *Age-related macular degeneration and the role of the complement system*. Mol Immunol. 2015, Mar 21. pii: S0161-5890(15)00087-5. doi: 10.1016/j.molimm.2015.02.032.
8. Whitmore SS, Sohn EH, Chirco KR, Drack AV, Stone EM, Tucker BA, et al.: *Complement activation and choriocapillaris loss in early AMD: implications for pathophysiology and therapy*. Prog Retin Eye Res. 2015; 45: 1–29.
9. Machalińska A, Kawa MP, Marlicz W, Machaliński B: *Complement system activation and endothelial dysfunction in patients with age-related macular degeneration (AMD): possible relationship between AMD and atherosclerosis*. Acta Ophthalmol. 2012; 90(8): 695–703.
10. Brantley MA Jr., Fang AM, King JM, Tewari A, Kymes SM, Shiels A.: *Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to intravitreal bevacizumab*. Ophthalmology 2007; 114: 2168–2173.
11. 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; 52: 4694–4702.
12. Klein ML, Francis PJ, Rosner B, Reynolds R, Hamon SC, Schultz DW, et al.: *CFH and LOC387715/ARMS2 genotypes and treatment with antioxidants and zinc for age-related macular degeneration*. Ophthalmology. 2008; 115(6): 1019–1025.
13. Brantley MA Jr., Edelstein SL, King JM, Plotzke MR, Apte RS, Kymes SM, 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): 626–631.
14. Feng X, Xiao J, Longville B, Tan AX, Wu XN, Cooper MN, et al.: *Complement factor H Y402H and C-reactive protein polymorphism and photodynamic therapy response in age-related macular degeneration*. Ophthalmology. 2009; 116(10): 1908–1912.
15. Lee AY, Raya AK, Kymes SM, Shiels A, Brantley MA Jr.: *Pharmacogenetics of complement factor H (Y402H) and treatment of exudative age-related macular degeneration with ranibizumab*. Br J Ophthalmol 2009; 93: 610–613.
16. Nischler C, Oberkofler H, Ortner C, Paikl D, Riha W, Lang N, et al.: *Complement factor H Y402H gene polymorphism and response to intravitreal bevacizumab in exudative age-related macular degeneration*. Acta Ophthalmol. 2011; 89: e344–349.
17. Imai D, Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Awata T, Inoue S, et al.: *CFH, VEGF, and PEDF genotypes and the response to in-*

- travitreal injection of bevacizumab for the treatment of age-related macular degeneration. *J Ocul Biol Dis Infor.* 2010; 3: 53–59.
18. Tsuchihashi T, Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Kabasawa S, Takita H, et al.: *Complement factor H and high-temperature requirement A-1 genotypes and treatment response of age-related macular degeneration.* *Ophthalmology.* 2011; 118(1): 93–100.
 19. Sofat R, Casas JP, Webster AR, Bird AC, Mann SS, Yates JRW, et al.: *Complement factor H genetic variant and age-related macular degeneration: effect size, modifiers and relationship to disease subtype.* *Int J Epidemiol.* 2012; 41: 250–262.
 20. Johnson PV, Betts KE, Radeke MJ, Hageman GS, Anderson DH, Johnson LT: *Individual homozygous for the age-related macular degeneration risk-conferring variant of complement factor H have elevated levels of CRP in the choroid.* *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 17456–17461.
 21. Veloso CE, de Almeida LN, Recchia FM, Pelayes D, Nehemy MB: *VEGF gene polymorphism and response to intravitreal ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration.* *Ophthalmic Res.* 2014; 51(1): 1–8.
 22. Veloso CE, Almeida LN, Nehemy MB: *CFH Y402H polymorphism and response to intravitreal ranibizumab in Brazilian patients with neovascular age-related macular degeneration.* *Rev Col Bras Cir.* 2014 Nov-Dec; 41(6): 386–392.
 23. Chen H, Yu KD, Xu GZ: *Association between variant Y402H in age-related macular degeneration (AMD) susceptibility gene CFH and treatment response of AMD: a meta-analysis.* *PLoS One.* 2012; 7(8): e42464. doi: 10.1371/journal.pone.0042464.
 24. Smailhodzic D, Muether PS, Chen J, Kwestro A, Zhang AY, Omar A, et al.: *Cumulative effect of risk alleles in CFH, ARMS2, and VEGFA on the response to ranibizumab treatment in age-related macular degeneration.* *Ophthalmology.* 2012; 119(11): 2304–2311.
 25. 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; 52(7): 4694–4702.
 26. 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; 96(2): 208–212.
 27. Menghini M, Kloeckener-Gruissem B, Fleischhauer J, Kurz-Levin MM, Sutter FK, Berger W, et al.: *Impact of loading phase, initial response and CFH genotype on the long-term outcome of treatment for neovascular age-related macular degeneration.* *PLoS One.* 2012; 7(7): e42014.
 28. Yamashiro K, Tomita K, Tsujikawa A, Nakata I, Akagi-Kurashige Y, Miyake M, et al.: *Factors associated with the response of age-related macular degeneration to intravitreal ranibizumab treatment.* *Am J Ophthalmol.* 2012; 154(1): 125–136.
 29. Hagstrom SA, Ying GS, Pauer GJ, Sturgill-Short GM, Huang J, Callanan DG, et al.: *Pharmacogenetics for genes associated with age-related macular degeneration in the Comparison of AMD Treatments Trials (CATT).* *Ophthalmology.* 2013; 120(3): 593–599.
 30. Spencer KL, Hauser MA, Olson LM, Schmidt S, Scott WK, Gallins P, et al.: *Protective effect of complement factor B and complement component 2 variants in age-related macular degeneration.* *Hum Mol Gen.* 2007; 16(16): 1986–1992.
 31. Richardson AJ, Islam FMA, Guymer RH, Baird PN: *Analysis of rare variants in the complement component 2 (C2) and factor B (BF) genes refine association for age-related macular degeneration (AMD).* *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50: 540–543.
 32. Havvas I, Marioli DI, Deli A, Zarkadis IK, Pharmakakis N: *Complement C3, C2, and factor B gene polymorphisms and age-related macular degeneration in a Greek cohort study.* *Eur J Ophthalmol.* 2014; 24(5): 751–760.
 33. Wu L, Tao Q, Chen W, Wang Z, Song Y, Sheng S, et al.: *Association between polymorphisms of complement pathway genes and age-related macular degeneration in a Chinese population.* *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54(1): 170–174.
 34. Pei XT, Li XX, Bao YZ, Yu WZ, Yan Z, Qi HJ, et al.: *Association of c3 gene polymorphisms with neovascular age-related macular degeneration in a chinese population.* *Curr Eye Res.* 2009; 34(8): 615–622.
 35. Yanagisawa S, Kondo N, Miki A, Matsumiya W, Kusuhara S, Tsukahara Y, et al.: *A common complement C3 variant is associated with protection against wet age-related macular degeneration in a Japanese population.* *PLoS One.* 2011; 6(12): e28847. doi: 10.1371/journal.pone.0028847.
 36. Baatz H, Poupel L, Coudert M, Sennlaub F, Combadiere C: *Polymorphisms of complement factor genes and age-related macular degeneration in a German population.* *Klin Monbl Augenheilkd.* 2009; 226(8): 654–658.
 37. Kubicka-Trząska A, Karska-Basta I, Dziedzina S, Sanak M: *Zmienność genetyczna układu dopełniacza w patogenezie zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem.* *Klin Oczna* 2015; 117(2): 130–135.

Praca wpłynęła do Redakcji 22.06.2015 r. (KO-00016-2015)
Zakwalifikowano do druku 05.04.2016 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):

dr hab. n. med. Agnieszka Kubicka-Trząska
Klinika Okulistyki i Onkologii Okulistycznej UJ CM
ul. Kopernika 38
31-501 Kraków
e-mail: akubicka@onet.pl