Association between Polymorphisms of Rs4151667(L9H) CFB Gene and Age-Related Macular Degeneration in a Population in the North West of Iran

Roshanipour N, BSc; Jabbarpour Bonyadi M*, PhD; Jabbarpour Bonyadi MH, MD; Javadzadeh A, MD

University of Tabriz, Tabriz, Iran
** Correspondence: jabbarpour@tabrizu.ac.ir*

Purpose: To investigate the possible association of polymorphisms of rs4151667(L9H) B gene with age-related macular degeneration (AMD) in a population from the North West of Iran.
Methods: In this study, 56 patients with AMD and 144 age-, sex-, and ethnic-matched controls were recruited. Both patients and controls were selected from the North West of Iran. The association of polymorphisms of rs4151667(L9H) CFB gene with AMD was investigated using polymerase chain reaction (PCR) and digested fragment length polymorphism technique (RFLP).
Results: A significant association was found between the polymorphism of rs4151667(L9H) CFB gene and AMD disease. (P=0.01 for TT genotype and P=0.02 for AT genotype)
Conclusion: The TT genotype increases the likelihood of AMD by 2.6 times as compared to genotypes other than TT, whereas the AT genotype has a protective effect against the disease.

Keywords: AMD, CFB gene, PCR-RFLP, Polymorphism

- Bina J Ophthalmol 2017; 22 (2): 104-109. **Received:** 23 July 2016 **Accepted:** 2 October 2016

ارتباط بین پلی‌مورفیسم rs4151667(L9H) ژن CFB با بیماری AMD در جمعیت شمال غرب ایران

نسرین روشنی‌پور[۱]، دکتر مرتضی جبارپور بنیادی[۲*]، دکتر محمدحسین جبارپور بنیادی[۲] و دکتر علیرضا جوادزاده[۴]

هدف: بررسی همراهی پلی‌مورفیسم rs4151667(L9H) ژن فاکتور B با بیماری تحلیل ماکولای وابسته به سن (AMD) در جمعیت شمال غرب ایران.
روش پژوهش: در این تحقیق، ۵۶ فرد مبتلا به AMD به عنوان گروه بیمار و ۱۴۴ فرد سالم به عنوان گروه شاهد که از نظر سن و جنس و قومیت با گروه بیمار تطابق داشته و هر دو گروه از جمعیت شمال غرب ایران بودند، برای ورود به مطالعه انتخاب شدند. همراهی پلی‌مورفیسم rs4151667(L9H) از ژن CFB در بیماران مبتلا به AMD با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و تکنیک پلی‌مورفیسم طول قطعات هضم شده (RFLP) بررسی گردید.
یافته‌ها: بین پلی‌مورفیسم ذکر شده و بیماری AMD ارتباط معنی‌داری وجود داشت (ژنوتیپ TT با P=۰/۰۱ و ژنوتیپ AT با P=۰/۰۲).
نتیجه‌گیری: احتمال بروز بیماری AMD در افراد دارای ژنوتیپ TT، ۲/۶ برابر افرادی است که ژنوتیپی غیر از TT دارند و ژنوتیپ AT نقش محافظتی در برابر این بیماری دارد.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۹۵؛ دوره ۲۲، شماره ۲: ۱۰۹-۱۰۴.

• **پاسخ‌گو:** دکتر مرتضی جبارپور بنیادی (email: jabbarpour@tabrizu.ac.ir)
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد- دانشکده ژنتیک- دانشگاه آزاد تبریز- تبریز- ایران
۲- دانشیار- گروه ژنتیک- قطب تنوع زیستی- گروه علوم جانوری- دانشکده علوم طبیعی- دانشگاه تبریز- تبریز- ایران

دریافت مقاله: ۲ مرداد ۱۳۹۵
تایید مقاله: ۱۱ مهر ۱۳۹۵

۳- چشم‌پزشک- مرکز تحقیقات چشم- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران
۴- استاد- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی تبریز- تبریز- ایران
دانشگاه تبریز- دانشکده علوم طبیعی- قطب علمی تنوع زیستی

مقدمه

تحلیل ماکولای وابسته به سن (AMD: Age-related Macular Degeneration) یک بیماری پیش‌رونده بخش مرکزی شبکیه چشم است که به طور عمده سالمندان با سن بیش از ۶۵ سال را در کشورهای توسعه یافته مبتلا می‌کند[۱]. AMD یک ناهنجاری اپی‌تلیوم رنگدانه‌ای شبکیه (RPE: Retinal Pigment Epithelial) است که منجر به تحلیل گیرنده‌های نوری (فتورسپتورها) در مرکز شبکیه و از دست رفتن دید مرکزی غیر قابل برگشت می‌گردد[۲]. ویژگی اصلی این بیماری، تجمع رسوبات زرد رنگ خارج سلولی معروف به دروزن (Drusen) می‌باشد[۳-۵]. این رسوبات متشکل از گلیکولیپید، پروتیین و بقایای سلولی بوده و حاوی اجزای سیستم کمپلمان، تعدیل و تنظیم‌کننده‌ها و پروتئازها هستند[۶]. AMD از نظر بالینی به دو دسته خشک (GA: Geographic Atrophy) و مرطوب (CNV: Choroidal Neo Vascularization) تقسیم می‌شود که نوع خشک همراه با ایجاد تغییرات در غشای بروک بوده و باعث مرگ آتروفیک سلولی در مرکز شبکیه می‌شود، نوع مرطوب در اثر رشد غیرطبیعی رگ‌های خونی در زیر ماکولا ایجاد می‌گردد[۷]. AMD یک بیماری چندعاملی بسیار پیچیده است که یکی از عوامل اصلی ابتلا به این بیماری، افزایش سن می‌باشد. هم‌چنین عوامل محیطی مانند مصرف سیگار، عادات غذایی و قرار گرفتن در معرض نورهای سمی، خطر وقوع AMD را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهند[۸-۱۵]. شواهد روزافزون نشان داده‌اند که روندهای التهابی، به ویژه مسیر فعالیت کمپلمان با ایجاد اختلال در ماتریکس خارج‌سلولی و ساختار ترشح شده از سلول‌های شبکیه چشم، نقش مهمی در تشکیل دروزن بازی می‌کند[۱۶-۲۰]. یک‌سری از آلل‌های چندشکلی مربوط به سیستم کمپلمان (CFH_{2-4-5},C_3, CFH) قادر به افزایش خطر ابتلا به AMD و بخش دیگر (CFH_{1-3}, C_2, CFB) با کاهش خطر ابتلا به این بیماری در ارتباط می‌باشند[۲۱-۲۳]. CFB فاکتور B کمپلمان را کدگذاری می‌کند که قسمتی از مسیر آلترناتیو است. پس از فعال‌سازی این مسیر، CFB توسط فاکتور D به دو زیرواحد غیرکاتالیتکی و کاتالیتکی تجزیه می‌شود. زیرواحد فعال، یک پروتئاز سرینی است که همراه با C_3b کونورتاز مسیر فرعی را تشکیل می‌دهد[۲۴-۲۸].

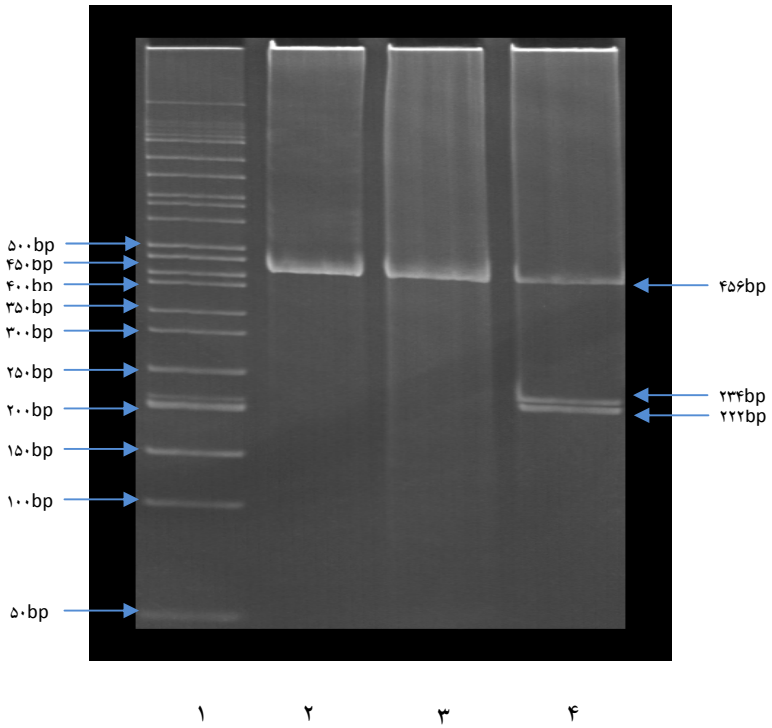
نقش دقیق CFB در ابتلا به بیماری AMD هنوز ثابت نشده است. اگرچه نشان داده شده که پروتیین BF محتوی گلوتامین در موقعیت ۳۲، در مقایسه با پروتئین حاوی آرژنین دارای فعالیت کاهش یافته همولیتیک می‌باشد[۲۹-۳۶]. بیان ژن CFB در شبکیه عصبی چشم، RPE و کرویید افزایش یافته و پروتیین CFB در دروزن و غشاء بروک مشاهده شده است[۳۷]. نتایج متاآنالیز نشان داد که پلی‌مورفیسم c.26T>A (rs4151667) ژن CFB اثرات محافظتی قابل‌توجهی در ابتلا به بیماری AMD دارد[۳۸]. هدف از این مطالعه، مقایسه فراوانی پلی‌مورفیسم ژن مذکور در دو گروه بیمار و شاهد و بررسی همراهی احتمالی پلی‌مورفیسم (rs4151667) ژن CFB در استعداد ابتلا به بیماری تحلیل ماکولای وابسته به سن در جمعیت شمال غرب ایران می‌باشد.

روش پژوهش

در این مطالعه موردی- شاهدی، ۲۰۰ فرد غیرخویشاوند مورد بررسی ژنتیکی در جایگاه پلی‌مورفیسم c.26T>A(L9H) ژن CFB قرار گرفتند. از این تعداد، ۵۶ فرد مبتلا به AMD به بیمارستان نیکوکاری تبریز مراجعه کرده بودند. بیماران پس از معاینه بالینی توسط متخصصین چشم‌پزشکی از نظر شدت بینایی، فوندسکوپی، فوندوس فوتوگرافی و فلوروسین آنژیوگرافی مورد بررسی قرار گرفته و به مرکز ژنتیک معرفی شدند. ۱۴۴ فرد سالم که از لحاظ سن، جنس و نژاد با گروه بیمار مطابقت داشتند به عنوان گروه شاهد مورد مطالعه قرار داده گرفتند. معیارهای ورود به مطالعه سن بالای شصت سال بود که معاینه بالینی شامل بررسی حدت بینایی، فوندسکوپی، فوندوس فوتوگرافی و فلوروسین آنژیوگرافی برای آن‌ها صورت گرفت.

از هر دو گروه شاهد و بیمار که از جمعیت شمال غرب ایران بودند، رضایت‌نامه کتبی جهت شرکت در پژوهش اخذ گردید و پس از آن، نمونه‌گیری از خون به میزان ۴ cc صورت گرفت. DNA از گلبول‌های سفید خون به روش نمک اشباع استخراج شد[۳۹]. DNA استخراج شده توسط دستگاه PCR تکثیر و با استفاده از روش PCR-RFLP ژنوتیپ در جایگاه c.26T>A تعیین گردید. برای ارزیابی پلی‌مورفیسم از پرایمرهای F:AGTGATGTGGGTAGGACAGG و R:TTGGAGAAGTCGGAAGGAGC استفاده شد. برنامه PCR به شکل زیر صورت گرفت: واسرشت‌سازی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵

درجه و سپس ۳۴ سیکل امپلیفیکاسیون (۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه در ۵۹ درجه، ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه) انجام پذیرفت. پس از آن، مرحله طویل‌سازی (Elongation) نهایی (۵۱ دقیقه در ۷۲ درجه) صورت گرفت که یک محصول ۴۵۶ جفت بازی به همراه داشت. محصول PCR توسط آنزیم محدودکننده $Bts^{\alpha}I$ در دمای ۵۵ درجه به مدت ۲۴-۱۶ ساعت وارد مرحله آنزیمی گردید. در نهایت محصولات هضم آنزیمی شده PCR بر روی ژل اگارز ۱/۵ درصد رنگ‌آمیزی شده با Safe Stain الکتروفورز گردید و نتایج تحت اثر نور UV مورد مشاهده قرار گرفتند. آلل T برای آنزیم $Bts^{\alpha}I$ هیچ توالی قابل شناسایی نداشت، اما در صورت وجود آلل A ، یک جایگاه شناسایی برای آنزیم ایجاد می‌شد که حاصل این تغییر، ایجاد ۲ قطعه ۲۳۴ و۲۲۲ جفت بازی پس از هضم آنزیمی بود (تصویر ۱). نتایج ژنوتیپی و آللی موجود در میان گروه بیمار و شاهد با آزمون‌های آماری کای‌مربع و دقیق فیشر تحلیل شد. P کم‌تر از ۵ درصد به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.



ستون ۱: DNA Ladder 50 bp ستون ۲: محصول PCR ستون ۳: نمونه هموزیگوت TT ستون ۴: نمونه هتروزیگوت AT

تصویر ۱- محصولات RFLP-PCR پلی‌مورفیسم rs4151667 ژن CFB

یافته‌ها

گروه بیمار (۵۶ نفر شامل ۲۹ زن و ۲۷ مرد) و گروه شاهد (۱۴۴ نفر شامل ۶۸ نفر زن و ۷۶ نفر مرد) برای پلی‌مورفیسم rs4151667 (L9H) ژن CFB با تکنیک RFLP-PCR بررسی شدند. میانگین سن بیماران و گروه شاهد به ترتیب ۷/۶۶± ۷۴/۵ سال و ۶/۴۳± ۷۲/۲۷ سال بود. از گروه بیمار، ۳۹/۲۸ درصد مبتلا به بیماری چشمی نوع مرطوب و ۶۰/۷۱ درصد مبتلا به نوع خشک بودند. توالی ژنوتیپ‌های AA و AT و TT جایگاه CFB c. 26 T>A به ترتیب صفر ، ۵/۳۵ و ۹۴/۶۴ درصد در بیماران و صفر ، ۱۳/۱۹ و ۸۶/۸۰ درصد در افراد سالم بود. در بررسی این جایگاه پلی‌مورفیسمی میان توزیع ژنوتیپ‌های AT و TT افراد بیمار و شاهد (افراد سالم) تفاوت معنی‌داری وجود داشت، به طوری که P محاسبه شده برای ژنوتیپ AT، ۰/۰۲ و برای ژنوتیپ TT، ۰/۰۱ بود که نشان‌دهنده ارتباط این پلی‌مورفیسم با بیماری AMD می‌باشد. فراوانی آللی نیز برای هر دو گروه محاسبه گردید که این مقدار برای آلل‌های A وT در گروه بیماران ۲/۶۷ و ۹۷/۳۲ درصد و در گروه شاهد ۶/۵۹ و ۹۳/۴ بود. نتایج حاصل‌شده از تحلیل آماری در جدول ۱ نمایش داده شده است.

جدول ۱- توزیع ژنوتیپی و آللی پلی‌مورفیسم rs4151667(L9H) ژن CFB در افراد مبتلا به بیماری AMD و گروه شاهد

ژنوتیپ	بیمار (تعداد: ۵۶)		شاهد (تعداد: ۱۴۴)		درصد شانس	میزان P
	تعداد	درصد	تعداد	درصد		
AA	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر	۱/۰۰۰
AT	۳	۵/۳۵	۱۹	۱۳/۱۹	۰/۳۷۲	۰/۰۲۸
TT	۵۳	۹۴/۶۴	۱۲۵	۸۶/۸۰	۲/۶۸۵	۰/۰۱۷
الل ها						
A	۳	۲/۶۷	۱۹	۶/۵۹	۰/۳۸۹	۰/۰۷۴
T	۱۰۹	۹۷/۳۲	۲۶۹	۹۳/۴	۲/۵۶۶	۰/۱۱۱

بحث

دژنراسیون وابسته به سن ماکولا (AMD) از علل اختلال بینایی در دوران سالمندی[۴۰] و یک بیماری عصبی دیررس و چندعاملی می‌باشد. این بیماری توسط انحطاط مجموعه گیرنده‌های نوری/ اپی‌تلیال رنگدانه‌ای شبکیه باعث از دست رفتن دید مرکزی به صورت برگشت‌ناپذیر می‌گردد. علت اصلی بروز این بیماری تاکنون مشخص نشده است. سهم عامل ژنتیک در توسعه AMD در سال‌های اخیر از طریق تجمیع مطالعات خانوادگی، مطالعه فنوتیپ‌های مشابه در دوقلوها و خطر بالای ابتلا به بیماری در بستگان درجه یک افراد بیمار مشخص شده است[۴۱-۴۳]. به نظر می‌رسد التهاب در بیماری‌زایی AMD نقش قابل‌توجهی داشته باشد و مطالعات مختلف در سال‌های اخیر موید نقش التهاب در بروز و پیش‌رفت این بیماری بوده‌اند[۴۴-۴۷]. بر همین اساس، ژن‌های مربوط به سیستم ایمنی و التهابی در رابطه با بیماری AMD بسیار مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که از جمله می‌توان ژن CFH (کدکننده فاکتور کمپلمان H)، CFB و C_2 را نام برد[۴۸]. در این راستا Klein و همکاران[۴۹] یک گونه رایج (P.Y402H و rs1061170) در ژن CFH که به شدت با بیماری AMD در ارتباط بود را شناسایی کردند. سیستم کمپلمان وظیفه دفاع در برابر عوامل بیماری‌زا و پاسخ به واکنش‌های ایمنی و التهابی سلول‌ها را بر عهده دارد[۵۰]. مطالعات صورت گرفته در جمعیت‌های مختلف، نتایج متفاوتی را برای ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های ژن CFB با بیماری AMD نشان داده‌اند. به طوری که نتایج پژوهش Liu و همکاران نشان داد که پلی‌مورفیسم rs641153 ژن CFB با بیماری AMD در جمعیت چینی در ارتباط نمی‌باشد. با این حال Lee و همکاران دریافتند که پلی‌مورفیسم ژن CFB با بیماری AMD در جمعیت چینی سنگاپور مرتبط است[۵۱-۵۴].

در این مطالعه برای نخستین بار پلی‌مورفیسم ژن CFB و رابطه آن با بیماری AMD در جمعیت شمال غرب ایران مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه ما ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ جایگاه rs4151667(L9H) ژن CFB با بیماری AMD را نشان داد به طوری که میزان فراوانی ژنوتیپ TT و ژنوتیپ AT بین افراد سالم و افراد بیمار تفاوت معنی‌داری داشت. بر اساس این مطالعه فراوانی ژنوتیپ TT در افراد گروه شاهد ۸۶/۸۰ درصد و در افراد بیمار ۹۴/۶۴ درصد بود که نشان می‌دهد ژنوتیپ TT با افزایش استعداد ابتلا به بیماری AMD همراه است (P= ۰/۰۱). هم‌چنین فراوانی ژنوتیپ AT در افراد گروه شاهد ۱۳/۱۹ درصد و در افراد بیمار ۵/۳۵ درصد مشاهده شد که حاکی از اثر حفاظتی آلل A در بروز بیماری AMD می‌باشد (P= ۰/۰۲). نتایج حاصل از متا-آنالیز انجام شده توسط Thakkinstian و همکاران[۵۵] نشان‌دهنده اثر حفاظتی آلل A در جمعیت قفقازی است در حالی که در جمعیت‌های آسیایی (ژاپن، چین، کره) ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم rs4151667(L9H) با بیماری AMD مشاهده نگردید. مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ توسط Contreras و همکاران[۵۶] در جمعیت مکزیک صورت گرفت، نشان‌دهنده اثر حفاظتی آلل A در بروز بیماری AMD این جمعیت بود. نتایج متضاد حاصل‌شده از مطالعه ارتباط بین ژن CFB با بیماری AMD در جمعیت‌های متفاوت، می‌تواند به علت تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها و بیانگر نقش ژنتیک در بروز بیماری AMD باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه پلی‌مورفیسم rs4151667(L9H) ژن

CFB در جمعیت شمال غرب ایران نشان می‌دهد که آلل A اثر حفاظتی در بروز بیماری AMD دارد. با توجه به تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌ها پیشنهاد می‌شود مطالعات تکمیلی در جمعیت‌های مختلف با تعداد نمونه‌های بیش‌تر انجام گیرد. هم‌چنین بررسی سایر پلی‌مورفیسم‌های ژنCFB در ارتباط با همراهی این ژن در بروز بیماری AMD در جوامع گوناگون موثر خواهد بود.

سپاس‌گزاری

از تمامی خانواده‌های محترم بیماران که با این پروژه مشارکت نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Holliday EG, Smith AV, Cornes BK, et al. Insights into the genetic architecture of early stage age-related macular degeneration: a genome-wide association study meta-analysis. *PLoS One* 2013;8:e52830.
2. Ratnapriya R, Chew EY. Age-related macular degeneration-clinical review and genetics update. *Clin Genet* 2013:84:160-166.
3. Thakkinstian A, McKay GJ, McEvoy M, et al. Systematic review and meta-analysis of the association between complement component 3 and age-related macular degeneration: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2011;173:1365-1379.
4. Dreyhaupt J, Mansmann U, Pritsch M, et al. Modelling the natural history of geographic atrophy in patients with agerelated macular degeneration. *Ophthalmic Epidemiol* 2005'12:353-362.
5. Johnson LV, Leitner WP, Staples MK, et al. Complement activation and inflammatory processes in drusen formation and age related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2001;73:887-896.
6. Gregory S, Hageman PJL, Victor Chong NH, et al. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the rpe-bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Am J Epidemiol* 2001;173:1365-1379.
7. Nowak JZ. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacol Rep* 2006;58:353-363.
8. Thornton J, Edwards R, Mitchell P, et al. Smoking and age-related macular degeneration: a review of association". *Eye* 2005;19:935-944.
9. Chakravarthy U, Augood C, Bentham GC, et al. Cigarette smoking and age-related macular degeneration in the EUREYE Study. *Ophthalmology* 2007;114:1157-1163.
10. Kaushik S, Wang JJ, Flood V, et al. Dietary glycemic index and the risk of age-related macular degeneration. *Am J Clin Nutrition* 2008;88:1104-1110.
11. Tan JSL, Wang JJ, Flood V, et al. Dietary antioxidants and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 2008;115:334-341.
12. Kishan AU, Modjtahedi BS, Martins EN,et al. Lipids and age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2011;56: 195–213, 2011.
13. Wu J, Seregard S, Algvere PV. Photochemical damage of the retina. *Surv Ophthalmol* 2006;51:461-481.
14. Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, et al. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. Progress in Retinal and Eye Research 2005; 24:275-306.
15. Algvere PV, Marshall J, Seregard S. Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 2006;84:4-15.
16. Zipfel PF, Lauer N, Skerka C. The Role of Complement in AMD. *Adv Exp MedBiol* 2010;703:9-24.
17. Reynolds R, Hartnett ME, Atkinson JP, et al. Plasma Complement Components and Activation Fragments: Associations with Age-Related Macular Degeneration Genotypes and Phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50: 5818-5827.
18. Gehrs KM, Jackson JR, Brown EN, et al. Complement, age-related macular degeneration and a vision of the future. *Arch Ophthalmol* 2010;128:349-358.
19. Rodrigues EB. Inflammation in dry age-related macular degeneration. *Ophthalmologica* 2007;221:143-152.
20. Anderson DH, Radeke MJ, Gallo NB, et al. The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. *Prog Retin Eye Res* 2010;29:95-112.
21. Seddon JM, Cote J, Page WF, et al. The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. *Arch Ophthalmol* 2005;123:321–327.
22. Gold B, Merriam JE, Zernant J, et al. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nature Genetics* 2006;38:458-462.
23. Francis PJ, Klein ML. Update on the role of genetics in the onset of age-related macular degeneration. *J Clin Ophthalmol* 2011;5:1127-1133.
24. Hageman GS, Hancox LS, Taiber AJ, et al. Extended haplotypes in the complement factor H (CFH) and CFHrelated (CFHR) family of genes protect against age-related macular degeneration: characterization, ethnic distribution and evolutionary implications. *Annals of Medicine* 2006;38:592-604.
25. Hughes AE, Orr N, Esfandiary H, et al. A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration. *Nature Genetics* 2006;38:1173-1177.
26. H. Zhang, M. A.Morrison, A. DeWan et al., "The NEI/NCBI dbGAP database: genotypes and haplotypes that may specifically predispose to risk of neovascular age-related macular degeneration," BMC Medical Genetics, vol. 9, p. 51, 2008.
27. Davis CA, Forristal J. Partial properdin deficiency. J Lab Clin Med 1980;96:633–639. [PubMed: 6903190].
28. Markiewski MM, Deangelis RA, Lambris JD. Complexity of complement activation in sepsis. J Cell Mol Med. 2008; 12(6A):2245–2254. [PubMed: 18798865].

29. Lokki ML, Koskimies SA. Allelic differences in hemolytic activity and protein concentration of BF molecules are found in association with particular HLA haplotypes. Immunogenetics. 1991; 34(4):242–246.
30. Lokki ML, Koskimies SA. Allelic differences in hemolytic activity and protein concentration of BF molecules are found in association with particular HLA haplotypes. Immunogenetics 1991;34:242–246. [PubMed: 1916952].
31. Chong EW, Kreis AJ, Wong TY, Simpson JA, Guymer RH. Alcohol consumption and the risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. Am J Ophthalmol. 2008;145:707–715.
32. Chaine G, Hullo A, Sahel J et al. Case-control study of the risk factors for age related macular degeneration. France-DMLA Study Group. Br J Ophthalmol. 1998;82:996–1002.
33. Age-Related Eye Disease Study Research Group. Risk factors associated with age-related macular degeneration A case-control study in the age-related eye disease study: Age-related eye disease study report number 3. Ophthalmol.2000;107:2224–2232.
34. Miyazaki M, Nakamura H, Kubo M et al. Risk factors for age related maculopathy in a Japanese population: the Hisayama study. Br J Ophthalmol. 2003;87:469–472.
35. Krishnaiah S, Das T, Nirmalan PK et al. Risk factors for agerelated macular degeneration: findings from the Andhra Pradesh eye disease study in South India. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005;46:4442–4449.
36. Tomany SC, Wang JJ, Van Leeuwen R et al. Risk factors for incident age-related macular degeneration: pooled findings from 3 continents. Ophthalmology. 2004;111: 1280–1287.
37. Gold B, Merriam JE, Allikmets R et al. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age related macular degeneration. Nat Genet. 2006;38:458–462.
38. Petersa JL, Suttona AJ, Jones DR et al. Contour-enhanced meta-analysis funnel plots help distinguish publication bias from other causes of asymmetry. J Clin Epidemiol. 2008;61:991–996.
39. Miller SA, Dykes D, Polsky F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleatedcells. Nucleic Acids Res 1988;16(3):1215.
40. Ni Dhubhghaill SS, Cahill MT, Campbell M, Cassidy L, Humphries MM, Humphries P. The pathophysiology of cigarette smoking and age-related macular degeneration. Adv Exp Med Biol 2010; 664: 437-446.
41. Smith W, Assink J, Klein Ret al. Risk factors for age-related macular degeneration: pooled findings from three continents. Ophthalmology 2001: 108: 697–704.
42. Swaroop, A., Chew, EY., Rickman, CB., Abecasis, GR. Unraveling a multifactorial late-onset disease: from genetic susceptib ility to disease mechanisms for age-related macular degeneration. The Annual Review of Genomics and Human Genetics2009;10: 19-43.
43. Spencer KL, Olson LM, Schnetz-Boutaud N et al. Using genetic variation and environmental risk factor data to identify individuals at high risk for age-related macular degeneration. PLoS One 2011: 6: e17784.
44. Klein R, Knudtson M, Klein B, Wong T, Cotch M, Liu K,etal. Inflammation, complement factor H, and age-related macular degeneration. Ophthalmology 2008; 115(10):1742–1749.
45. 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; 134:411–31.
46. Penfold PL, Madigan MC, Gillies MC, Provis JM. Immunological and aetiological aspects of macular degeneration. Prog Retin Eye Res 2001; 20:385–414.
47. Ernst E, Hammerschmidt DE, Bagge U, Matrai A, Dormandy JA. Leukocytes and the risk of ischemic diseases. JAMA 1987; 257:2318–24.
48. Patel N, Adewoyin T, Chong NV. Age-related macular degeneration:a perspective on genetic studies. Eye 2008; 22(6): 768–776.
49. R.J. Klein, C. Zeiss, E.Y. Chew, J. Tsai, R.S. Sackler, C. Haynes, et al., Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration, Science 308 (2005) 385–389.
50. Walport, M.J. Complement. First of two parts. The New England Journal of Medicine. 2001.344, 1058–1066.
51. Cui, L., Zhou, H., Yu, J., Sun, E., Zhang, Y., Jia,W., Jiao, Y., Snellingen, T., Liu, X., Lim, A.,Wang, N., Liu, N., 2010. Noncoding variant in the complement factor H gene and risk of exudative age-related macular degeneration in a Chinese population. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 51, 1116e1120.
52. Liu, X., Zhao, P., Tang, S., Lu, F., Hu, J., Lei, C., Yang, X., Lin, Y., Ma, S., Yang, J., Zhang, D., Shi, Y., Li, T., Chen, Y., Fan, Y., Yang, Z., 2010. Association study of complement factor H, C2, CFB, and C3 and age-related macular degeneration in a Han Chinese population. Retina 30, 1177e1184.
53. Lee, K.Y., Vithana, E.N., Mathur, R., Yong, V.H., Yeo, I.Y., Thalamuthu, A., Lee, M.W., Koh, A.H., Lim, M.C., How, A.C., Wong, D.W., Aung, T., 2008. Association analysis of CFH, C2, BF, and HTRA1 gene polymorphisms in Chinese patients with polypoidal choroidal vasculopathy. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 49, 2613e2619.
54. Kaur, I., Katta, S., Reddy, R.K., et al., 2010. The involvement of complement factor B and complement component C2 in an Indian cohort with age-related macular degeneration. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 51, 59e63.
55. Ammarin Thakkinstian. et al., The Association Between Complement Component /Complement Factor B Polymorphisms and Age-related Macular Degeneration: A HuGE Review and Meta-Analysis, 2012.
56. Alejandra V. et al., CFH haplotypes and ARMS2, C2, C3, and CFB alleles show association with susceptibility to age-related macular degeneration in Mexicans, 2014.