www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 58, No. 3, P: 156-161
May 2015

مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۵۸، شماره ۳
خرداد ۹٤، صفحه ۱۵٦-۱٦۱

مقاله اصلی

بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم ژن C3 با تخریب وابسته به سن ماکولا در منطقه گناباد از شمال‌شرق کشور

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۲۷- تاریخ پذیرش: ۹٤/۲/۱٦

[۱]مرتضی بنیادی*
[۲]ساناز رنجبر راد
[۳]محمد حسین جبارپور بنیادی
[۴]حمید احمدیه

۱-دانشیار ژنتیک پزشکی مولکولی، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی ، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲- دانشجوی ارشد ژنتیک ، گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم طبیعی ، دانشگاه آزاد اسلامی اهر ، اهر ایران
۳-متخصص چشم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد،گناباد، ایران
۴-استاد شبکیه، مرکز تحقیقات چشم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

*تبریز: دانشگاه علوم پزشکی تبریز ، ایران
تلفن:
Email:jabbarpour@tabrizu.ac.ir

خلاصه

مقدمه

تخریب وابسته به سن ماکولا (AMD) شایعترین علت نابینایی برگشت ناپذیر در افراد مسن سراسر جهان محسوب می شود. در کنار عوامل محیطی از جمله سن و مصرف سیگار، واریانت‌های ژنتیکی از لوکوس های ژنی متعدد با این بیماری ارتباط دارد. پلی مورفیسم های متعددی در بروز این بیماری دخیل می باشند که یکی از آنها پلی مورفیسم rs2230199 ژن C3 است که مهمترین پروتئین سیستم کمپلمان را کد میکند. در این مطالعه ما به بررسی نقش پلی مورفیسم rs2230199 در بروز بیماری AMD پرداخته می شود.

روش کار

این مطالعه موردشاهدی در منطقه گناباد در سال1393 انجام شد. در این تحقیق رابطه بین پلی‌مورفیسم - rs2230199 در ۵۱ بیمار از منطقه گناباد مبتلا به AMD نوع خشک با فنوتیپ آتروفی جغرافیایی با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و تکنیک پلی مورفیسم طول قطعات هضم شده (RFLP) بررسی شد. تعدادی از نمونه‌ها جهت تایید نتایج به دست آمده از روش RFLP به تصادف انتخاب شده و تعیین توالی شدند. همچنین، ۷۲ فرد سالم که از نظر سن و جنس با گروه بیمار مطابقت داشته و فاقد رابطه خانوادگی با آن‌ها و یا سابقه بیماری AMD در فامیل بودند، به عنوان گروه کنترل در این مطالعه شرکت داشتند. اطلاعات با آزمون های کای دو و دقیق فیشر بررسی شد.

نتایج

بررسی رابطه پلی‌مورفیسم rs2230199 در ژن C3 با بیماری AMD نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپی و اللی این پل‌مورفیسم در افراد مبتلا به AMD و گروه کنترل وجود دارد (p=۰/۰۰۰).

نتیجه گیری

پلی مورفیسمrs2230199 ژن C3 با افزایش خطر ابتلا به AMD در ارتباط است.

کلمات کلیدی: AMD، ژن C3، RFLP

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می باشد.

مقدمه

تخریب وابسته به سن ماکولا (AMD[1]) شایعترین علت نابینایی برگشت ناپذیر در افراد مسن بالای ۶۵ سال سراسر جهان محسوب می شود(۱). در این بیماری ماکولا یا لکه زرد تخریب می شود. ماکولا قسمت حساس به نور شبکیه و مسئول دید مستقیم و واضح است که برای کارهای دقیق مثل خواندن و رانندگی لازم است(۲). شیوع این بیماری به طور گسترده ای در گروه های نژادی مختلف، متفاوت است و تخمین زده می شود که تا سال ۲۰۲۰، حداقل ۸۰ میلیون نفر در سراسر جهان تحت تاثیرAMD قرار گیرند(۳). شناسایی عوامل خطر برای درک منشا اختلال و برای برقراری استراتژی برای جلوگیری از ابتلا به AMD از اهمیت عمده ای برخوردار است(۴). AMD بر اساس پیشرفت بیماری و ویژگی های بالینی خاص به دو نوع اولیه و پیشرفته طبقه بندی می شود(۵). مشخصه اصلی مراحل اولیه بیماری، ایجاد رسوبات زرد رنگ خارج سلولی مابین غشای رنگدانه ای اپیتلیوم (RPE) و غشای بروک معروف به دروزن می باشند(۶). این رسوبات متشکل ازگلیکولیپید، پروتئین و بقایای سلولی بوده و حاوی اجزاء سیستم کمپلمان، تعدیل و تنظیم کننده ها و سرین پروتئاز ها هستند(۷). AMD پیشرفته از نظر فیزیولوژیکی به ۲ شکل خشک و مرطوب بروز می کند(۸). در AMD خشک آتروفی جغرافیایی همراه با تغییرات دژنراتیو در غشای رنگدانه ای اپیتلیوم و گیرنده های نوری رخ می دهد(۹). در مقابل، AMD مرطوب با حضور رگ زایی کوروئیدال، ایجاد زخم و خونریزی در ناحیه زیر شبکیه مشخص می شود و شدیدا باعث تضعیف دید مرکزی بیمار و نهایتا کوری می گردد (۱۰).

AMD یک بیماری چند عاملی پیچیده است و در کنار عوامل محیطی از جمله سن، مصرف سیگار و تغذیه، فاکتور های ژنتیکی شامل واریانتهای ژنی متعدد نیز در بروز این بیماری نقش دارند (۱۱، ۱۲). طی چند سال اخیر ارتباط بین AMD و پلی‌مورفیسم-های تک نوکلئوتیدی متعدد به طور گسترده گزارش شده است(۱۳–۱۵). از مهمترین الل های ایجاد حساسیت در بروز این بیماری می توان به تعدادی از اجزای سیستم کمپلمان از جمله CFH، CFB، C2 و C3 اشاره کرد(۱۶–۱۸). بررسی ها نشان می دهد که فعالیت سیستم کمپلمان با ایجاد اختلال در ماتریکس خارج سلولی و ساختار ترشح شده از سلول های شبکیه چشم، نقش مهمی در تشکیل دروزن بازی می کند(۱۹، ۲۰). مولکول *C3 مهمترین جزء سیستم کمپلمان و* متعلق به خانواده گلیکوپروتئینی ماکروگلوبولین- α2 می باشد و نقش مهمی در پاسخ ایمنی بازی می کنند(۲۱). در مطالعات گذشته نقش این ماده در بروز و پیشرفت بیماری AMD مطرح و تعدادی از پلی مورفیسم های آن شناسایی گردیده اند(۲۲، ۲۳). مطالعات زیادی همراهی و ارتباط پلی مورفیسم rs2230199 این ژن را با بیماری AMD نشان داده است. این پلیمورفیسم باعث بروز ۲ آلوتایپ Fast (F) و Slow (S)میشود که از نظر حرکت پروتئین در الکتروفورز متفاوت می باشد و افراد دارای الل F مستعد بروز بیماری می باشند(۲۴). در این مطالعه پلی مورفیسم جایگاه rs2230199 جهت بررسی ژنوتیپی بیماری AMD نوع خشک با فنوتیپ آتروفی جغرافیایی در جمعیت شمال شرق ایران مورد مطالعه قرار می گیرد.

روش کار

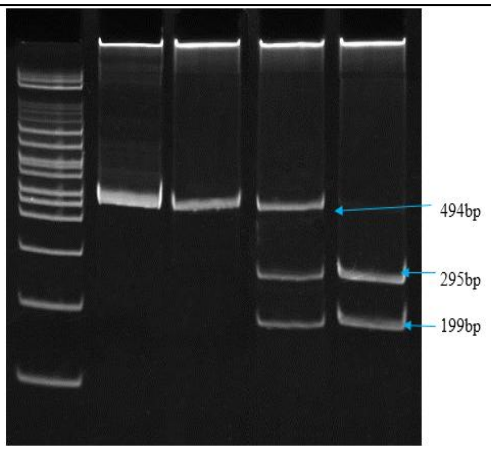
مطالعه حاضر یک مطالعه مورد- شاهدی است که افراد مطالعه شده در این پژوهش از شهرستان گناباد به متخصصین بینایی سنجی بیمارستان ها و مراکز درمانی شهر مراجعه کرده اند. در این مطالعه ۱۲۳ بیمار غیرخویشاوند مراجعه کننده مورد مطالعه قرار گرفتند.پس از معاینه بالینی توسط ۲ متخصص چشم،۵۱ فرد مبتلا به AMD نوع خشک با فنوتیپ آتروفی جغرافیایی‌از جمعیت شهرستان گناباد انتخاب شدند. معیار ورود به مطالعه بیماران با سن بالای ۶۰ سال و مبتلا به AMD نوع خشک حداقل در یک چشم خود بودند افراد تحت معاینه کامل چشم پزشکی شامل بررسی حدت بینایی, فوندوسکوپی, فوندوس فوتوگرافی و فلوروسین آنژیوگرافی قرار گرفتند. تصویربرداری-های بیماران در بیمارستان خاتم الانبیا و توس مشهد انجام گرفت. پس از تائید ابتلای این بیماران به AMD توسط متخصصین

[1] Age-related macular

مربوطه براساس کرایتریای تشخیصی ارایه شده توسط برد[۲] و همکاران، مشاوره ژنتیکی و رسم شجره نامه‌ی خانوادگی صورت گرفت (۲۵). معیار خروج از مطالعه شامل بیماران دارای هرگونه نشانه ای از علائم AMD نوع مرطوب بودند.پس از تائید ابتلای این بیماران به AMD توسط متخصصین مربوطه، مشاوره ژنتیکی و رسم شجره نامه‌ی خانوادگی صورت گرفت و پروباند مشخص شد. در صورتی که پروباند خانواده و سایر بیماران احتمالی خانواده در دسترس بودند تاریخچه بیماری به طور کامل ثبت می‌شد. همزمان ۷۳ فرد سالم از همان جمعیت که رابطه خویشاوندی با یکدیگر یا با بیماران نداشتند ولی از لحاظ سن و جنس با گروه بیمار مطابقت داشتند، به عنوان گروه کنترل وارد مطالعه شدند. پس از اخذ رضایت نامه ی کتبی از بیماران در مرحله ی بعد نمونه گیری از خون وریدی به میزان ۵ سی سی صورت گرفت و جهت بررسی به مرکز ژنتیک پزشکی‌مولکولی تبریز فرستاده شد.

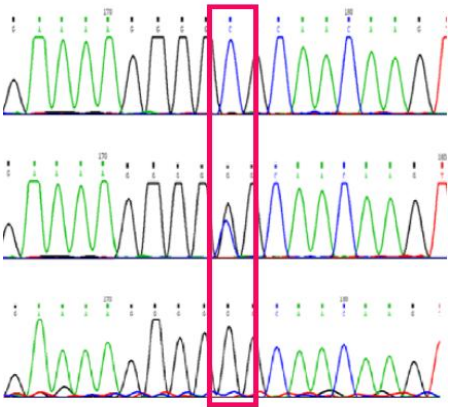
از لکوسیت خون بیماران DNA مطابق‌روش استاندارد استخراج گردید(۲۶). پلیمورفیسم ژن C3 در جایگاه C/G ۳۰۴ با روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. از پرایمر های F: 5′– CCC TCG CAC CTC CTT CAC و R: 5′– CCT CTG GCT GGC ACC TCA AT برای این پلیمورفیسم استفاده شد. آزمون PCR توسط دناتوراسیون به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه و سپس ۳۳ سیکل امپلیفیکاسیون (۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه در ۵۶ درجه و ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه صورت پذیرفت. پس از آن مرحله تمدید (elongation) نهایی (۵ دقیقه در ۷۲ درجه) در پایان ۳۳ سیکل انجام شد و یک محصول ۴۹۴ جفت بازی را به همراه داشت. محصول PCR توسط آنزیم HhaI در دمای ۳۷ درجه وارد مرحله آنزیمی گردید. در نهایت بر روی ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز انجام و نتایج با رنگ آمیزی اتیدیوم برماید مشاهده شد. الل نرمال برای آنزیم HhaI هیچ توالی قابل شناسایی ندارد، اما در الل جهش یافته، یک جایگاه شناسایی برای این آنزیم ایجاد می شود که حاصل این تغییر ایجاد ۲ قطعه ۲۹۵ و ۱۹۹ جفت بازی پس از هضم آنزیمی می باشد (شکل ۱).

[۲] Bird



شکل ۱– نتایج آزمون PCR-RFLP جهت تعیین پلی مورفیسم rs2230199

ستون ۱ : DNA Ladder 100bp، ستون ۲ : محصول PCR، ستون ۳ : نمونه هموزیگوت GG، ستون ۴ : نمونه هتروزیگوت CG،ستون ۵ : نمونه هموزیگوت CC



شکل ۲- نتایج توالی یابی پلیمورفیسم rs2230199

از بالا به پایین :ژنوتیپ CC، ژنوتیپCG، ژنوتیپ GG

چند نمونه از هر ژنوتیپ جهت تایید نتایج PCR -RFLP تعیین توالی شدند (شکل ۲).فراوانی ژنوتیپ مشاهده شده با فراوانی ژنوتیپ مورد انتظار با توجه به تعادل هاردی-واینبرگ مقایسه شد. بررسی آماری نتایج بین افراد بیمار وکنترل، به روش کای مربع و تست آزمون دقیق فیشر انجام شد. odd ratio (OR) و فاصله اطمینان ۹۵٪ (CI ها) برای خطرات نسبی محاسبه شده و p value<0.05 به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه توزیع ژنوتیپی پلیمورفیسم rs2230199 مطابق با تعادل هاردی-واینبرگ می باشد.

جدول ۱– توزیع ژنوتیپی و اللی پلی‌مورفیسم *304 C/G* ژن *C3* در افراد مبتلا به بیماری AMD و گروه کنترل

ژنوتیپ-الل	گروه بیمار N(F)	گروه کنترل N(F)	Odds ratio (95% CI)	P
CC	۲۲ (۴۳/۱۴)	۵۷ (۷۹/۱۷)	۰/۲	۰/۰۰۰
CG	۲۶ (۵۰/۹۸)	۱۵ (۲۰/۸۳)	۳/۹۳۵	۰/۰۰۰
GG	۳ (۵/۸۸)	۰	Inf	۰/۰۱۴
C	۷۰ (۶۸/۶۳)	۱۸۸ (۹۲/۳۵)	۰/۱۸۱	۰/۰۰۰
G	۳۲ (۳۱/۳۷)	۱۵ (۷/۶۵)	۵/۵۱۸	۰/۰۰۰

F(Frequency)- Inf(Infinitive)

در افراد مبتلا به AMD نسبت به گروه کنترل متفاوت است. توالی ژنوتیپ های CC، CG و GG جایگاه C3 304C/G به ترتیب ۰/۴۳۱، ۰/۵۰۹و ۰/۰۵۸ در بیماران و ۰/۷۹۱، ۰/۲۰۸ و صفر در افراد سالم بود. در بررسی این جایگاه پلی مورفیسمی نشان داده شد که توزیع ژنوتیپ‌های CG بین افراد بیمار و کنترل (افراد سالم) تفاوت معنی داری نشان داده است. به طوری که *P* value محاسبه شده برای این ژنوتیپ ۰/۰۰۰ بدست آمده که کمتر از ۰/۰۵ است و گویای ارتباط این پلی‌مورفیسم با بیماری AMD نوع خشک با فنوتیپ آتروفی جغرافیایی می-باشد. توزیع آللی این پلی‌مورفیسم نیز بین افراد بیمار و کنترل معنی دار می‌باشد. فراوانی آلل G (آلل ایجاد حساسیت) برای گروه بیمار ۳۱/۳۷ ٪ و برای گروه کنترل ۷/۶۵ ٪ می باشد. P value محاسبه شده برای آلل G (p=۰/۰۰۰) به معنی ارتباط این الل‌ها با بیماری AMD نوع خشک با فنوتیپ آتروفی جغرافیایی می‌باشد (جدول۱).

بحث

در این مطالعه پلی مورفیسم ژن C3 و رابطه آن با بیماری AMD نوع خشک(آتروفی جغرافیایی) در جمعیت شمال شرق کشور برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت. بررسی هایی که در جمعیت های مختلف صورت گرفته نتایج متفاوتی را برای ارتباط میان پلی مورفیسم های ژن C3 با بیماری AMD نشان داده است. نتایج نشان می‌دهد که استعداد ابتلا به بیماری در افراد با ژنوتیپ CG و GG بیشتر بوده و افراد با ژنوتیپ CC حساسیت کمتری به این بیماری نشان می دهند. بنابراین مطالعه‌ی حاضر نقش محافظت کننده‌ی ژنوتیپ CC را در ابتلا به بیماری نشان می‌دهد در صورتی که ژنوتیپ هتروزیگوت CG و هموزیگوت GG یک فاکتور خطر برای ابتلا به بیماری AMD محسوب می‌شود. در تایید نتایج به دست آمده، مطالعات انجام شده در جمعیت‌های انگلیس(p=۰/۰۰۴)، مکزیک(p=۰/۰۴) و فرانسه (p=۰/۰۲) ارتباط معنی‌دار بین پلی‌مورفیسم rs2230199 ژن C3 و بیماری AMD را گزارش کرده‌اند و در هر سه مطالعه وجود آلل G درجمعیت‌های مورد مطالعه احتمال ابتلاء به AMD را به میزان قابل توجهی افزایش می دهد (۲۴، ۲۷، ۲۸). این یافته ها با نتایج به دست آمده در تحقیق ما مطابقت دارد. همچنین در مطالعه‌ای که بر جمعیتی از اقوام قفقازی آمریکا انجام گردید، نشان داده شد که پلی مورفیسم rs2230199 ژن C3 با هر دو نوع AMD، هم نوع خشک(آتروفی جغرافیایی) و هم نوع مرطوب همراهی دارد که این همراهی در هر دو نوع بیماری به صورت یکسان می باشد(۲۹). با توجه به یافته حاصل از این مطالعه احتمال می رود همراهی‌ای که بین پلی مورفیسم rs2230199 و AMD با آتروفی جغرافیایی در جمعیت مورد مطالعه دیده شد، همین همراهی با AMD نوع مرطوب نیز در همین جمعیت دیده شود. برخلاف نتایج به دست آمده، در کشور های آسیای دور از جمله چین (p=۰/۵۶۵) و ژاپن و کره جنوبی هیچ ارتباط معنی داری بین واریانت rs2230199 و بروز بیماری AMD یافت نشد(۳۰-۳۲).

نتیجه گیری

تبیین نقش پلی مورفیسم rs2230199 در بروز بیماری AMD نوع خشک و نیز واریانت های سایر اجزای سیستم کمپلمان مفاهیم مهمی را در استفاده از داروهایی که در جهت درمان تخریب ماکولا بر سیستم کمپلمان اثر دارند، در بر دارد. از این رو پیشنهاد می شود مطالعات جامع پیرامون پلی مورفیسم های سایر ژن های دخیل در سیستم کمپلمان نیز صورت پذیرد.

تشکر وقدردانی

از تمامی خانواده های محترم بیماران که در این پروژه مشارکت داشتند، تشکر و قدردانی می شود.

Reference:

1. Holliday EG, Smith AV, Cornes BK, Buitendijk GH, Jensen RA, Sim X, 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(1):e52830.
2. Parmeggiani F, Sorrentino FS, Romano MR, Costagliola C, Semeraro F, Incorvaia C, et al. Mechanism of Inflammation in Age-Related Macular Degeneration: An Up-to-Date on Genetic Landmarks. Mediators Inflamm 2013;2013:435607.
3. 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. Ophthalmology 2000;107(12):2224-2232.
4. Guymer RH, Chong EW. Modifiable Risk Factors of Age-Related Macular Degeneration. Med J Aust 2006 May 1;184(9):455-458.
5. Scholl H, Fleckenstein M, Issa P,Keilhauer C, Holz F, Weber BH. An update on the genetics of age-related macular degeneration. Mol Vis 2007;13:196-205.
6. Thakkinstian A, McKay GJ, McEvoy M, ChakravarthyU, Chakrabarti S, Silvestri G, 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(12):1365-1379.
7. Gregory S. Hageman PJL, N.H. Victor Chong, Lincoln V. Johnsonc,Don H. Andersonc, Robert F. Mullins. 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(12):1365-1379.
8. Nowak JZ. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. Pharmacol Rep 2006;58(3):353-363.
9. Ratnapriya R CE. Age-related macular degeneration – clinical reviewand genetics update. Clin Genet. 2013;84(2):160-6.
10. Bressler NM. Early Detection and Treatment of Neovascular Age-related Macular Degeneration .J Am Board Fam Pract 2002;15(2):142-152.
11. Katta S, Kaur I, Chackrabarti S. The molecular genetic basis of age-related macular degeneration: an overview. J Genet 2009;88(4):425-449.
12. van de Ven JP, Smailhodzic D, Boon CJ, Fauser S, Groenewoud JM, Chong NV, et al. Association analysis of genetic and environmental risk factors in the cuticular drusen subtype of age-related macular degeneration. Mol Vis 2012;18:2271-2278.
13. Swaroop A, Branham KE, Chen W, Abecasis G. Genetic susceptibility to age-related macular degeneration: a paradigm for dissecting complex disease traits. Hum Mol Genet 2007;16(2):174-182.
14. Leveziel N, Puche N, Zerbib J, Benlian P, Coscas G, Soubrane G, Souied E. Genetic Factors Associated with Age-Related Macular Degeneration. Med Sci (Paris) 2010;26(5):509-515.
15. Gorin MB. Genetic insights into age-related macular degeneration: Controversies addressing Risk, Causality, and Therapeutics. Mol Aspects Med 2012;33(4):467-486.
16. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, et al. Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration. Science 2005;308(5270):384-389.
17. Thakkinstian A, McEvoy M, Chakravarthy U, Chakrabarti S, McKay GJ, Ryu E, et al. The Association Between Complement Component 2/Complement Factor B Polymorphisms and Age-related Macular Degeneration: A HuGE Review and Meta-Analysis. Am J Epidemiol 2012;176(5):361-372.
18. Francis PJ, Hamon SC, Ott J, Weleber RG, Klein ML. Polymorphisms in C2, CFB and C3 are associated with progression to advanced age related macular degeneration associated with visual loss. J Med Genet 2009;46(5):300-307.
19. Zipfel PF, Lauer N, Skerka C. The Role of Complement in AMD. Adv Exp MedBiol 2010;703:9-24.
20. Reynolds R, Hartnett ME, Atkinson JP, Giclas PC, Rosner B, Seddon JM. Plasma Complement Components and Activation Fragments: Associations with Age-Related Macular Degeneration Genotypes and Phenotypes. Invest Ophthalmol Vis Sci 2009;50(12): 5818-5827.
21. Botto M, Fong Ky, So AK, Koch C, Walport MJ. Molecular Basis of Polymorphisms of Human Complement Component C3. J Exp Med 1990;172(4):1011–1017.
22. Park KH FB, Ryu E, Tosakulwong N, Edwards AO. Complement Component 3 (C3) Haplotypes and Risk of Advanced Age-Related Macular Degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 2009;50(7):3386-3393.
23. Yates J, SeppT, Matharu BK, Khan JC, Thurlby D, Shahid H, et al. Complement C3 Variant and the Risk of Age-Related Macular Degeneration. N Engl J Med 2007;357(6):553-561.

24. Spencer KL, Olson LM, Anderson BM, Schnetz-Boutaud N, Scott WK, Gallins P, et al. C3 R102G polymorphism increases risk of age-related macular degeneration. Hum Mol Genet 2008;17(12):1821-1824.
25. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. Surv Ophthalmol 1995;39(5):367-374.

26. Miller SA, Dykes D, Polsky F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleatedcells. Nucleic Acids Res 1988;16(3):1215.
27. Buentello-Volante B R-RG, Miranda-Duarte A, Pompa-Mera EN, Graue-Wiechers F, Bekker-Méndez C. Susceptibility to advanced age-related macular degeneration and alleles of complement factor H, complement factor B, complement component 2, complement component 3, and age-related maculopathy susceptibility 2 genes in a Mexican population. Mol Vis 2012;15:2518-2525.
28. Zerbib J, Richard F, Puche N, Leveziel N, Cohen SY, Korobelnik JF, et al. R102G polymorphism of the C3 gene associated with exudative age-related macular degeneration in a French population. Mol Vis 2010;16:1324-1330.
29. McKay GJ DS, Patterson CC, Chakravarthy U, Silvestri G. Complement Component 3: an assessment of association with AMD and analysis of gene-gene and gene-environment interactions in a Northern Irish cohort. Mol Vis 2010;16:194-199.
30. Cui L ZH, Yu J, Sun E, Zhang Y, Jia W, et al. Noncoding Variant in the Complement Factor H Gene and Risk of Exudative Age-Related MacularDegeneration in a Chinese Population. Invest Ophthalmol Vis Sci 2009;51(2):1116-1120.
31. 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.
32. Kim SJ, Lee SJ, Kim NR, Chin HS. Association of polymorphisms in C2, CFB and C3 with exudative age-related macular degeneration in a Korean population. Exp Eye Res 2012;96(1): 42-47.