

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Štěpán Rusňák

2014

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní program
Oftalmologie

**Stanovení promotorů angiogeneze v nitrooční tekutině pomocí multiplexové
imunoanalýzy**

**Angiogenesis Promoters Determination in the Intraocular Fluid by Means of Multiplex
Immunoanalysis**

MUDr. Štěpán Rusňák

Školitel: Doc. MUDr. Frederik Raiskup, PhD, FEBO, Klinik für Augenheilkunde,
Universitätsklinikum C. G. Carus, Dresden

Hradec Králové, 2013

Obhajoba dne:

Prohlášení

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 8.12. 2013

Poděkování

V úvodu doktorského studia mi byla oporou docentka Hejčmanová, za což jí velmi vděčím. Práce by nemohla vzniknout bez přispění všech spolupracovníků Oční kliniky FN Plzeň pod vedením docentky Říčařové a kolektivu Oddělení imunodiagnostiky FN Plzeň pod vedením profesora Topolčana. Za cenné připomínky a pomoc při finalizaci práce děkuji svému školiteli docentu Raiskupovi. V neposlední řadě děkuji svojí manželce zejména za trpělivost.

V Plzni dne 8.1. 2014

Štěpán Rusňák

1. Obsah

1. OBSAH	1
2. POUŽITÉ ZKRATKY	2
3. SOUHRN	4
4. SUMMARY	5
5. ÚVOD DO PROBLEMATIKY	6
ANGIOGENEZE	6
<i>Přehled hlavních faktorů angiogeneze</i>	7
VEGF	7
IP-10	8
MCP-1	9
BDNF	10
CNTF	10
TGF-beta1	11
EGF	12
IL6	12
IL8	13
PDGF AA	14
ANGIOGENEZE U PROLIFERATIVNÍ DIABETICKÉ RETINOPATIE	15
MULTIPLEXOVÁ IMUNOANALÝZA	17
6. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	20
7. MATERIÁL A METODIKA	21
8. VÝSLEDKY	23
9. DISKUSE	45
10. ZÁVĚR	49
11. POUŽITÁ LITERATURA	50

2. Použité zkratky

BDNF – brain derived growth factor

CCR – receptor chemokinu CC

CNTF – ciliary neurotrophic factor

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EGF – endothelial growth factor

GABA – gamma aminobutyric acid

GM-CSF – granulocyte macrophage colony stimulating factor

HIF – hipoxia inducible factor

CHAK – chemokine activated killer

IFN – interferon

Ig - imunoglobulin

IGF – insulin like growth factor

IL – interleukin

IP – interferon inducible protein

kDa – kilodalton

LNGFR – Low-affinity nerve growth factor receptor

LPS – lipopolysacharid

MAPK – mitogen activated proteinkinase

MCP – monocyte chemoattractant protein

PDGF – platelet derived growth factor

PDNF - parasite-derived counterpart of neurotrophic

PDR – proliferativní diabetická retinopatie

RNA – ribonukleová kyselina

TNF – tumor necrosis factor

TGF – transforming growth factor

TrkB – Tyrosine receptor kinase B

VEGF – vascular endothelial growth factor

3. Souhrn

Cílem práce bylo zjistit, zda lze pomocí multiplexové imunoanalýzy stratifikovat pacienty s proliferativní diabetickou retinopatií – tj. zda u pacientů s komplikovaným klinickým průběhem zjistíme rozdíl v koncentraci vybraných biomarkerů, proti pacientům s nekomplikovaným průběhem.

Bylo provedeno stanovení angiogenních, antiangiogenních a zánětlivých cytokinů multiplexovou analýzou ve 59 vzorcích nitrooční tekutiny aspirované z přední komory pacientů s PDR a u 51 kontrolních vzorků od pacientů s kataraktou. Bylo provedeno srovnání výsledků u pacientů s nekomplikovaným průběhem onemocnění a u terminálního stadia onemocnění s neovaskulárním glaukomem refrakterním na konvenční léčbu.

Bylo zjištěno, že stratifikace pacientů podle klinické závažnosti PDR koreluje s hodnotami koncentrace proangiogenních cytokinů měřených multiplexovou analýzou v nitrooční tekutině. Dále bylo nalezeno několik dalších cytokinů, jejichž hladiny jsou zvýšené v nitrooční tekutině pacientů s PDR oproti kontrolní skupině.

Pacienti s nejzávažnějším klinickým průběhem dosahovali nejvyšších hodnot proangiogenních cytokinů v nitrooční tekutině. Stanovení hodnot koncentrací proangiogenních cytokinů multiplexovou analýzou má tedy význam tam, kde z klinického nálezu hrozí komplikovaný průběh. Vysoká hladina VEGF v nitrooční tekutině znamená, že se jedná o skutečně rizikového pacienta a je na místě použít intenzivnější terapeutické postupy – opakované intravitreální injekce inhibitorů VEGF, kortikosteroidů, panretinální laserovou fotokoagulaci, cyklokryodestrukci či cyklofotodestrukci. Naopak nízké hladiny znamenají, že intenzivní antiVEGF terapie není na místě, její vedlejší nežádoucí účinky by převážily potenciální přínos.

4. Summary

The objective of the project was to find out whether patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR) can be stratified by means of multiplex immunoanalysis – i.e. whether in patients with complicated clinical finding a difference in concentration of selected biomarkers can be found in comparison with patients without complications.

Multiplex analysis was used to determine angiogenic, anti-angiogenic and inflammatory cytokines in 59 samples of intraocular fluid aspirated from anterior chamber of PDR patients and 51 cataract patients control samples. The results for patients without complications were compared with patients in the terminal stage of therapeutically unmanageable neovascular glaucoma due to proliferative diabetic changes.

It was found that patient stratification according to clinical severity of PDR correlates with pro-angiogenic cytokine concentration in the intraocular fluid. Furthermore, several additional cytokines were found the levels of which were elevated in the intraocular fluid of PDR patients compared to the control group.

Patients with clinically more severe finding had higher levels of pro-angiogenic cytokines in the intraocular fluid. Determining pro-angiogenic cytokine concentrations by the means of multiplex analysis is of importance when clinical findings show tendency for developing of possible complications.

The use of multiplex analysis to determine pro-angiogenic cytokine concentrations has value in cases where clinical findings show risk factors for developing of complications. High level VEGF in intraocular fluid means that the patient is truly at risk, thus the physician can justify applying more intensive therapy – e.g. repeated intravitreal injections of VEGF inhibitors, corticosteroids, more extensive panretinal laser photocoagulation, cyclocryodestruction or cyclophotodestruction. On the contrary, low levels signify that frequent anti-VEGF therapy is not of concern and that adverse effects would outweigh the potential benefit.

5. Úvod do problematiky

Angiogeneze

Fyziologická angiogeneze je podmínkou normálního průběhu řady biologických funkcí. Pro správnou funkci tělesných tkání je nezbytné dostatečné a uspořádané krevní zásobení systémem tepen, kapilár a žil. Formace krevních cév je komplexní proces přesně koordinované interakce buněk mnoha typů, který hraje životně důležitou úlohu jednak ve vývoji embrya a v časném postnatálním období a jednak při růstu dlouhých kostí u dětí a adolescentů. Po tomto období je formace nových cév možná zpravidla jen při hojení ran a v ženském reprodukčním systému.

Na regulaci fyziologické angiogeneze se podílí řada faktorů. Aby vznikla funkční cévní síť, musí být jejich součinnost přesně koordinována. Takto komplexní proces je mimořádně citlivý na jakékoli změny. Odchylky těchto procesů během embryogeneze mohou vést ke vzniku vrozených cévních malformací, zatímco poruchy regulace u dospělého jsou podkladem mnoha onemocnění. Patologická angiogeneze je podkladem řady onemocnění, jako je růst nádorů, lupénka, revmatoidní artritida, v neposlední řadě se podílí na patogenezi očních onemocnění, jako jsou věkem podmíněná degenerace sítnice a proliferativní retinopatie¹. Angiogeneze je koordinovaná kaskáda reakcí, které jsou na různých úrovních ovlivňovány součinností promotorů a inhibitorů angiogeneze. V současné době je známa řada tkáňových působků, které působí jako promotory či inhibitory angiogeneze. Mezi nejúčinnější promotory angiogeneze patří vaskulární endoteliální růstový faktor, jehož zvýšená exprese v nitrooční tekutině byla již prokázána u proliferativní diabetické retinopatie a věkem podmíněné makulární degeneraci². Byla identifikována řada dalších faktorů, které podporují nebo inhibují angiogenezi. Mezi hlavní pro-angiogenní regulátory patří mimo VEGF také růstové faktory: bazický růstový faktor fibroblastů (bFGF) a transformující růstové faktory alfa a beta (TGF-alfa a TGF-beta), Epidermal growth factor (EGF), interleukin 6 (IL-6) a další promotory angiogeneze a zánětu: Brain derived neurotrophic factor (BDNF), Ciliary neurotrophic factor (CNTF), interleukin 8 (IL-8), Interferon inducible protein-10 (IP-10), Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), Platelet derived growth factor AA (PDGF-AA), TGFβ Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta1).

Mezi přídatné pro-angiogenní faktory patří leptin a angiogenin 2. K faktorům tlumícím angiogenezi řadíme angiostatin, endostatin, trombospondin-1, angiopoetin (Ang)2 a IL-12. Přesná úloha mnoha těchto faktorů je nejasná, úloha některých klíčových faktorů byl ozřejmena^{1,3}.

Přehled hlavních faktorů angiogeneze

VEGF

VEGF (Vascular endothelial growth factor) je významný signální protein z rodiny růstových faktorů, který stimuluje vaskulogenezi a angiogenezi. Normální funkcí VEGF je tvořit cévy během embryonálního vývoje - vaskulogeneze a po zraněních, svaly (po cvičení) a nové cévy k přemostění blokové cirkulace (tzv. kolaterální cirkulace) - angiogeneze. Je signální protein z rodiny růstových faktorů produkovaný buňkami, které stimuluje vaskulogenezi a angiogenezi. VEGF je výrazně glykosylovaný protein o molekulární váze 46-48 kDa. Humánní VEGF se vyskytuje v molekulárních variantách o 111 (VEGF-111), 121 (VEGF-121, VEGF-121b), 145 (VEGF-145, VEGF-145b), 148 (VEGF-148), 162 (VEGF-162), 165 (VEGF-165; VEGF-165b), 183 (VEGF-183, VEGF-183b), 189 (VEGF-189, VEGF-189b) nebo 206 (VEGF-206) aminokyselinách.

VEGF-165 je nejběžnější formou VEGF ve většině tkání. Isoformy VEGF-121, VEGF-165 a VEGF-189 jsou nejčastěji se vyskytující isoformy a jsou obvykle produkovány simultánně.

VEGF-121 a VEGF-165 jsou rozpustné formy tohoto faktoru, zatímco isoformy VEGF-189 a VEGF-206 jsou většinou vázány na proteoglykany vážící heparin na povrchu buněk nebo na bazálních membránách. VEGF je syntetizován ve formě prekurzoru obsahujícího typickou hydrofobní signální sekvenci o 26 aminokyselinách

Gen pro VEGF je lokalizován na 6. chromozomu (6p12-p21). Receptory vážící VEGF (tj. VEGFR1, tj. Flt-1, VEGFR2, tj. KDR/Flk-1, a VEGFR3) jsou exprimovány na vaskulárních endoteliálních buňkách⁴.

VEGF je vysoce specifický mitogen pro vaskulární endoteliální buňky. In vitro stimuluje 2 kratší isoformy proliferaci makrovaskulárních endoteliálních buněk. VEGF významně ovlivňuje vaskulární permeabilitu, je silným angiogenním proteinem některých biosloučenin a pravděpodobně se účastní rozvoje neovaskularizací za fyziologických podmínek. V endoteliálních buňkách VEGF indukuje syntézu von Willebrandova faktoru, aktivátoru plazminogenu PAI-1. VEGF dále působí jako potentní chemoatraktant pro monocyty

a indukuje syntézu metaloproteinazy - intersticiální kolagenazy, která degraduje intersticiální kolagen.

VEGF je součástí korekčního systému, který obnovuje dodávku kyslíku tkáním, pokud není zajištěna adekvátní krevní cirkulace. Normální funkcí VEGF je tvorba krevních cév během embryonálního vývoje a po poraněních a tvorba kolaterální cirkulace. Příliš vysoká exprese VEGF může přispívat k rozvoji patologických procesů a onemocnění. Tumory, které dokáží exprimovat VEGF, mohou lépe růst a metastazovat, VEGF může způsobovat vaskulární onemocnění sítnice nebo jiných tkání^{5,6}.

AntiVEGF léčiva (jako např. bevacizumab, ranibizumab) mohou inhibovat VEGF a kontrolovat nebo zpomalit průběh chorob způsobených zvýšenou tvorbou VEGF.

IP-10

IP-10 (Interferon-inducible protein-10), v literatuře též pod synonymy IFN-inducible protein 10, immune protein-10, inflammatory protein 10, CXC motif chemokine)je malý cytokin z rodiny CXC chemokinů. Na základě přítomnosti 3D krystalické struktury a přímé mikrobicidní aktivity je IP-10 klasifikován jako kinocidin (tj. mikrobicidní chemokin).

Jedná se o protein o velikosti 8,7 kDa a o délce 98 aminokyselin. Gen pro IP-10 (tj. CXCL10 gen) je lokalizován na 4. chromozomu (4q12-21). Receptorem pro IP-10 je receptor CXCR3⁷.

Expese cytokinu IP-10 různými typy buněk, včetně monocytů, endoteliálních buněk, keratinocytů a fibroblastů, je indukována IFN-gamma a TNF-beta⁸. Lidské neutrofile produkují IP-10 jako odpověď na IFN-gamma v kombinaci s TNF-beta nebo bakteriálními lipopolysacharidy, tato odpověď může být blokována IL-10 nebo IL-4. Samotný IFN-gamma nebo IFN-beta v kombinaci s agonisty jako jsou IL8, G-CSF a GM-CSF nemá žádný efekt. IFN-gamma v kombinaci s TNF-beta, LPS nebo IL-1 vede k významné indukci produkce IP-10 neutrofile. Indukce syntézy IP-10 se využívá při analýze aktivity IFN-gamma.

IP-10 byl detekován v keratinocytech, lymfocytech, monocytech a endoteliálních buňkách v imunologicky aktivních procesech, jako je např. pozitivní tuberkulinový test nebo psoriáza. Keratinocyty v normální epidermis IP-10 neprodukují. In vivo u myši je IP-10 syntetizován především v játrech a ledvinách po intravenózní injekci prozánětlivých mediátorů, konkrétně po injekci IFN-gamma a předpokládá se, že hraje významnou roli v odpovědi jater a ledvin na systémovou infekci.

Cytokinu IP-10 se přisuzuje řada rolí. Především se jedná o chemoatrakci monocytů/makrofágů, T-buněk, NK-buněk a dendritických buněk, usnadnění adheze T-buněk k endoteliálním buňkám, protitumorózní aktivity a inhibice angiogeneze⁹. IP-10 se pravděpodobně významně podílí na hypersenzitivních reakcích pozdního typu. Zvýšené hladiny IP-10 nalézáme v psoriatických plakách charakterizovaných neutrofilní infiltrací. Předpokládá se i účast IP-10 na regulaci růstu nezralých hematopoetických progenitorových buněk.

MCP-1

MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), v literatuře též uváděný jako monocyte chemotactic protein-1, chemokine ligand 2, C-C motif ligand 2, small inducible cytokine A2) je malý cytokin patřící do skupiny CC chemokinů. Jeho hlavní význam spočívá v chemoatrakci monocytů, paměťových T buněk a dendritických buněk do oblasti zánětu vyvolaného poraněním tkáně nebo infekcí.

Jedná se o monomerní polypeptid o molekulární váze přibližně 13 kDa, délka cytokinu je 76 aminokyselin. Gen pro MCP-1 je u člověka kódován na 17. chromozomu (17q11.2-q21.1)¹⁰. MCP-1 se váže na povrchové receptory CCR2 a CCR4.

MCP-1 je ukotven v cytoplazmatické membráně endoteliálních buněk, je exprimován monocyty, makrofágy, dendritickými buňkami, vaskulárními endoteliálními buňkami, buňkami hladkého svalstva, glomerulárními mezangiálními buňkami a osteoblastickými buňkami. Syntéza a uvolňování MCP-1 v mezangiálních buňkách je indukována IgG komplexy.

MCP-1 vykazuje chemotaktickou aktivitu pro monocyty a bazofily, zvyšuje protitumorózní aktivity monocytů a je nezbytný při formaci granulomů. Reguluje expresi povrchových buněčných antigenů (CD11c, CD11b) a expresi cytokinů (IL1, IL6) a je potentním aktivátorem humánních bazofilů, indukujících degranulaci a uvolňování histaminu. IL1, TNF-alfa, PDGF, TGF-beta indukují syntézu MCP-1 v humánních kloubních chondrocytech, což může hrát roli v iniciaci a progresi degenerativních a zánětlivých artopatií. MCP-1 může dále indukovat proliferaci a aktivaci NK buněk, označovaných jako CHAK (CC-Chemokine-activated killer).

Předpokládá se, že se MCP-1 podílí na patogenezi některých onemocnění charakterizovaných monocytární infiltrací, jako je psoriáza, revmatoidní artritida a ateroskleróza. MCP-1 je

zapojen do zánětlivých procesů centrálního nervového systému, které jsou charakterizované neuronální degenerací. Zvýšená exprese MCP-1 byla zjištěna např. u epilepsie, Alzheimerovy choroby nebo traumat mozku^{11,12}.

BDNF

BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) je protein skládající se z 252 aminokyselin. Gen pro BDNF je lokalizován na 11. chromozomu (11p15.5-p11.2)¹³. BDNF se váže minimálně na 2 receptory na povrchu buněk, tj. TrkB a LNGFR, může ale také modulovat aktivitu různých neurotransmiterových receptorů.

BDNF se nachází v neuronech centrálního nervového systému. Je exprimován především v hipokampu, mozkové kůře a synapsích mezimozku. BDNF je také exprimován Schwannovými buňkami po lézi periferních nervů, denervovanými svaly, v sítnici, ledvinách a prostatě, BDNF je také možno detekovat v lidských slinách¹⁴.

BDNF selektivně napomáhá přežívání primárních senzoryckých neuronů a retinálních gangliových buněk, dále podporuje přežívání a diferenciaci některých cholinergních neuronů a dopaminergních neuronů in vitro.

Syntéza BDNF ve specifických neuronech centrálního nervového systému (hipokampu nebo mozkové kůry) může být ovlivněna neuronální aktivitou pozitivně (systém transmiteru glutamátu) nebo negativně (systém GABA transmiteru).

BDNF může být použit v lokální terapii neurologických degenerativních onemocnění, jako je Parkinsonova nebo Alzheimerova choroba¹⁵. Efekt BDNF na motorické neurony předpokládá možnost budoucího využití v léčbě motorických neuropatií a amyotrofické laterální sklerózy.

CNTF

CNTF (Ciliary neurotrophic factor), v literatuře též jako membrane-associated neurotransmitter stimulating factor je protein o molekulární hmotnosti 24kDa. Lidský gen pro CNTF je uložen na chromozomu 11 (11q12.2)¹⁶. Receptory pro CNTF (CNTFR-1, gp130 a LIFR-1) jsou exprimovány výlučně buňkami nervového systému a skeletálních svalů.

CNTF je možné nalézt především v periferní nervové tkáni. Hlavním zdrojem jsou pravděpodobně Schwannovy buňky periferních nervů a astrocyty centrálního nervového systému. CNTF je ve vysoké koncentraci přítomen v nitroočních tkáních. CNTF je také exprimován buňkami na povrchu kostí – bylo zjištěno, že tlumí aktivitu osteoblastů¹⁷.

Předpokládá se, že CNTF se uvolňuje po nervových poraněních a společně s dalšími faktory se podílí na přežití a regeneraci neuronů.

In vitro CNTF podporuje růst parasympatických neuronů a sympatických, sensorických a spinálních motorických neuronů. Dále se účastní diferenciace O-2A progenitorových buněk v oligodendrocyty a astrocyty typu 2. V gangliových buňkách CNTF indukuje syntézu substance P, vazoaktivního intestinálního peptidu a somatostatinu. In vivo stimuluje CNTF syntézu cholinacetyltransferázy. CNTF vykazuje také funkce endogenního pyrogenu.

TGF-beta1

TGF-beta1 (Transforming growth factor-beta 1) patří do rodiny transformujících růstových faktorů a je kódován genem TGFB1 na 19. chromozomu (19q13)¹⁸. Jedná se o cytokin o molekulární hmotnosti 25 kDa a délce 112 aminokyselin vážící se na 3 typy receptorů¹⁹. První typ receptorů nalézáme především v hematopoetických progenitorových buňkách. Typ 3 (betaglykan) může být exprimován téměř všemi buňkami s výjimkou primárně epiteliálních, endoteliálních nebo lymfoidních buněk.

TGF-beta1 je secernován většinou imunitních buněk (makrofágy, lymfocyty), endoteliálními buňkami a chondrocyty, ve velké míře je exprimován tkání sleziny.

TGF-beta1 je nejvýznamnější známý inhibitor růstu normálních nebo transformovaných epiteliálních buněk, endoteliálních buněk, fibroblastů, nervových buněk, lymfoidních a jiných hematopoetických buněk, hepatocytů a keratinocytů. TGF-beta1 inhibuje proliferaci T-lymfocytů skrze regulaci signálů zprostředkovaných IL2. Tento faktor inhibuje také růst NK buněk

a deaktivuje makrofágy, syntézu GM-CSF a IL3 a expresi receptorů pro G-CSF. TGF-beta1 dále inhibuje růst nezralých hematopoetických progenitorových buněk.

TGF-beta1 stimuluje syntézu většiny proteinů extracelulární matrix, včetně kolagenu, proteoglykanů, glykosaminoglykanů, fibronektinu, integrinu nebo např. osteonektinu a reguluje syntézu aktivátoru plazminogenu a jeho inhibitoru. TGF-beta1 působí supresivně na imunitní systém, jelikož inhibuje IL2 dependentní proliferaci T buněk a B lymfocytů²⁰.

TGF-beta1 může být lokálně využit jako významný regulátor v procesu hojení ran a zlomenin kostí. Antagonisté TGF-beta1 se využívají v terapii fibrotických onemocnění, která jsou často provázána zvýšenou aktivitou TGF-beta1⁴⁶.

EGF

EGF (Epidermal growth factor) je globulární protein o molekulární hmotnosti 6,4 kDa, obsahující 53 aminokyselin²¹. Gen pro tento faktor je lokalizován na 4. chromozomu (4q25-q27). Váže se na EGF receptor (EGFR, HER1), který u člověka existuje ve dvou formách s vysokou nebo nízkou afinitou pro vazbu EGF. Aktivita EGF receptoru může být modulována jinými růstovými faktory, např. PDGF, FGF nebo bombesinem²². EGF je možné detekovat téměř ve všech tělesných tekutinách. Je produkován buňkami různých orgánů, včetně mozku, ledvin, slzných žláz a žaludku. Produkce EGF je stimulována testosteronem a naopak inhibována estrogény.

EGF inhibuje sekreci žaludečních kyselin a moduluje syntézu řady hormonů, včetně prolaktinu v hypofýze nebo choriového gonadotropinu v buňkách choriového karcinomu. V centrálním nervovém systému EGF ovlivňuje aktivitu některých GABAergních a dopaminergních neuronů. EGF je významný mitogen řady buněk ektodermálního, mezodermálního nebo endodermálního původu. In vitro EGF kontroluje a stimuluje proliferaci epidermálních a epiteliálních buněk, včetně fibroblastů, renálních epiteliálních buněk, gliálních buněk, ovariálních buněk nebo thyroideálních buněk. Dále stimuluje proliferaci embryonálních buněk.

EGF funguje jako silný chemoatraktant pro fibroblasty a epiteliální buňky, samostatně nebo v kombinaci s jinými cytokiny se uplatňuje v procesech hojení ran.

Vzhledem ke schopnosti stimulovat proliferaci mukózních buněk žaludky je EGF možno použít jako gastroprotektivum. Lokální aplikace EGF se využívá k podpoře regenerace epidermis a tvorby granulační tkáně po závažných popáleninách.

Předpokládá se, že EGF hraje roli v některých případech mužské neplodnosti, především v případech nevysvětlené oligospermie⁴⁹.

IL6

IL6 (Interleukin-6) je protein skládající se ze 185 aminokyselin. Monocyty exprimují minimálně 5 různých molekulárních forem IL6 o molekulární hmotnosti 21,5-28 kDa. U lidských jedinců je gen pro IL6 uložen na 7. chromozomu (7p21-p14)²³. Receptor pro IL6 je exprimován např. na T buňkách, mitogenem aktivovaných B buňkách nebo periferních monocitech. IL6 receptor je výrazně glykosylovaný protein o molekulární hmotnosti 80 kDa a délce 449 aminokyselin.

IL6 se řadí do rodiny cytokinů zahrnujících mimo jiné i LIF, CNTF, onkostatin M, IL11 a CT-1. Všichni členové této rodiny cytokinů indukují expresi proteinů v játrech.

IL6 je produkován různými typy buněk. Hlavním zdrojem in vivo jsou stimulované monocyty, fibroblasty a endoteliální buňky. IL6 je dále produkován stimulovanými makrofágy, T buňkami, B lymfocyty, granulocyty, buňkami hladkého svalstva, chondrocyty, osteoblasty nebo keratinocyty. Fyziologickým stimulem vedoucím k produkci IL6 jsou IL1, bakteriální endotoxiny, TNF, PDNF a onkostatin M. V případě fibroblastů je syntéza IL6 stimulována interferony, TNF-beta, PDGF a virovými infekcemi. IL6 může částečně regulovat svou vlastní syntézu.

IL6 funguje jako prozánětlivý i protizánětlivý cytokin. Patří mezi nejvýznamnější mediátory akutní fáze zánětlivé odpovědi. Je schopný prostupovat hematoencefalickou bariérou a iniciovat syntézu PGE2 v hypotalamu. IL6 je faktor stimulující diferenciaci B buněk a aktivující T buňky. V přítomnosti IL2 indukuje diferenciaci zralých i nezralých T buněk v cytotoxické T buňky. Indukuje také proliferaci thymocytů.

Stanovení sérových hladin IL6 je možné využívat k monitoraci aktivity myelomů – nízké hladiny svědčí pro monoklonální gamapatie nebo doutnající myelomy, naopak markantně zvýšené hladiny IL6 je možné zachytit u progresivní choroby nebo u pacientů s plazmacelulární leukemií²⁴.

Dysregulace exprese IL6 je pravděpodobně jedním z hlavních faktorů účastnících se patogeneze řady chorob. Nadprodukcí IL6 zjišťujeme např. u revmatoidní artritidy, mnohočetného myelomu, Castelmanovy choroby, srdečního myomu nebo jaterní cirhózy. IL6 se pravděpodobně účastní i patogeneze chronické polyartritidy. Výrazně zvýšené hodnoty IL6 v mozkomíšním moku je možné detekovat u řady bakteriálních nebo virových meningitid²⁵.

IL8

IL8 (Interleukin-8) je neglykosylovaný protein o molekulární hmotnosti 8 kDa a délce 72 aminokyselin. Gen pro IL8 je lokalizován na 4. chromozomu (4q12-q21). [62] IL8 receptor (CD128) je dimerický glykoprotein skládající se z 59 kDa²⁶.

IL8 je produkován stimulovanými monocyty, makrofágy, fibroblasty, endoteliálními buňkami, keratinocyty, melanocyty, hepatocyty, chondrocyty a řadou tumorózních buněk. Syntéza IL8 je výrazně stimulována IL1 a TNF-. V kůži je exprese IL8 zvyšována leukoregulinem. IFN-gamma může fungovat jako stimulátor. Syntéza IL8 může být dále

indukována např. viry nebo bakteriálními lipopolysacharidy. V chondrocytech je syntéza IL8 stimulována TNF-alfa a bakteriálními lipopolysacharidy. V lidských astrocytech je syntéza a sekrece IL8 indukována IL1 a TNF-alfa. V epiteliálních, endoteliálních a fibroblastických buňkách je sekrece IL8 indukována IL17.

IL8 se liší od ostatních cytokinů schopností specificky aktivovat neutrofilní granulocyty. V neutrofilech způsobuje IL8 přechodný vzestup koncentrace kalcia a uvolňování enzymů z granul. IL8 také zvyšuje chemotaxi a expresi adhezivních molekul. IL8 způsobuje chemotaxi neutrofilů a jiných granulocytů do tkání s aktivní infekcí a indukuje zde fagocytózu. IL8 se řadí mezi významné promotory angiogeneze.

Účast IL8 se předpokládá v patogenezi psoriázy a revmatoidní artritidy, IL8 je také markerem různých zánětlivých procesů. IL8 se spolu s IL1 a IL6 podílí na patogenezi chronické polyartritidy (výrazně zvýšené koncentrace IL8 byly stanoveny přímo v synoviální tekutině).

PDGF AA

PDGF AA (Platelet-derived growth factor AA) je hydrofilní protein o molekulární váze 16 kDa a délce 124 aminokyselin. Gen pro PDGF AA je lokalizován na 7. chromozomu (7p21-p22). PDGF AA se váže na receptor PDGFRA (CD104a), jehož gen je umístěn na 4. chromozomu (4q11-q12)²⁷.

PDGF AA je syntetizován především megakaryocyty. Je skladován v alfa-granulech destiček, ze kterých je uvolňován po aktivaci buněk (např. trombinem). Dále může být syntetizován např. makrofágy, endoteliálními buňkami, fibroblasty, gliálními buňkami, astrocyty, myoblasty, buňkami hladkého svalstva a řadou tumorózních buněk. Syntéza PDGF AA může být indukována IL1, IL6, TNF-alfa, TGF-beta and EGF.

Na rozdíl od většiny ostatních cytokinů není PDGF AA uvolňován do cirkulace. PDGF AA se váže na některé plazmatické proteiny a proteiny extracelulární matrix. Působí jako lokální autokrinní a parakrinní růstový faktor. V dospělém organismu se PDGF AA podílí na procesu hojení ran.

PDGF-AA působí jako slabý mitogenní faktor na buňky hladkého svalstva. Společně s bFGF, který zvyšuje expresi receptorů PDGFRA, ale pozitivně působí na DNA syntézu těchto buněk. PDGF AA reguluje syntézu svého vlastního receptoru a ovlivňuje expresi receptorů pro IL1, 5-hydroxytryptamin, transferin a muskarinových receptorů.

PDGF AA podporuje proliferaci a mobilitu oligodendrocytů a inhibuje diferenciaci jejich progenitorových buněk²⁸. V nízkých koncentracích působí PDGF AA jako chemoatraktant pro fibroblasty, monocyty a neutrofilů. PDGF AA funguje jako významný modulátor funkcí T buněk, jako chemoatraktant pro některé typy hematopoetických buněk a jako vazokonstriktor.

PDGF AA se podílí na patogenezi fibroproliferativních onemocnění, významně zvýšené hladiny jsou přítomné u obliterativní bronchiolity⁴⁸.

Angiogeneze u proliferativní diabetické retinopatie

Diabetes mellitus je jedním z nejčastějších endokrinních onemocnění na světě; v roce 2000 postihovalo téměř 6% lidské populace, v roce 2025 bude tímto onemocněním postiženo až 300 milionů lidí. Diabetická retinopatie je známkou očního postižení při diabetu a je nejčastější příčinou slepoty ve vyspělých zemích. Postihuje 80% pacientů s délkou trvání diabetu více než 10 let. Naproti tomu je prokázáno, že její incidenci lze snížit až o 90% dobrou metabolickou kompenzací a pečlivou monitorací očního nálezu²⁹.

V patogenezi diabetické retinopatie hrají rozhodující úlohu mikrovaskulární cévní změny. Hyperglykémie způsobuje zánik pericytů a zesílení basální membrány, což vede k poškození funkce cévní stěny a ke zvýšenému prosakování cévní stěnou a zhroucení hemoretinální bariéry.

Bezprostřední reakce vedoucí k apoptoze pericytu probíhá kaskádovitou reakcí signálních proteinkináz, kdy chronická hyperglykémie aktivuje proteinkinázu C delta a mitogen aktivovanou proteinkinázu (MAPK), vedoucí ke zvýšené expresi proteinu tyrosin fosfatázy. Ta způsobí defosforylaci receptoru PDGF -R (platelet derived growth factor receptor) na povrchu pericytu, snížená signální intracelulární reakce z tohoto receptoru pak způsobí apoptozu pericytu³⁰.

S pokračujícím průběhem postižení, pokud trvá zhroucení hemoretinální bariéry, začíná v patogenezi nálezu hrát řídicí roli hypoxie. Hypoxie přímo stimuluje expresi proangiogenních cytokinů cestou transkripčních faktorů skupiny HIF -1 (hypoxia - inducible faktoru 1) . Transkripční faktory jsou proteiny s navázanou specifickou DNA doménou, které regulují transkripci genetické informace z DNA na messenger RNA (mRNA). Signální cesta HIF transkripčních faktorů zprostředkovává u savců efekt hypoxie na buňku. Za hypoxických podmínek transkripční faktory skupiny HIF 1 vedou k expresi proteinů zajišťujících přežívání za hypoxických podmínek. Jedním s důsledků je zvýšená exprese vaskulárního

cévního růstového faktoru - VEGF³¹. Po objevení pro- angiogenních vlastností vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) byly u pacientů s PDR detekovány i změny v koncentracích dalších pro - angiogenních markerů, kterými jsou insulinu podobné růstové faktory (IGF), hepatocyte growth factor (HGF), basic fibroblast growth factor (b-FGF) a platelet-derived growth factor (PDGF). Prokázány byly i změny v hladinách prozánětlivých markerů a angiopoetinu. Produkce angiogenních faktorů je doprovázena i zvýšenou tvorbou anti-angiogenních markerů. Jedná se o interferon inducible protein 10 (IP10), Pigment epithelium derived factor (PEGF), Transforming growth factor beta (TGFb), Trombospondin (TSP), Endostatin, Angiostatin a Somatostatin^{32,33}.

Následkem zvýšené exprese proangiogenních cytokinů dochází k patologické novotvorbě cév - patologické angiogenezi. Patologická angiogeneze je určujícím faktorem proliferativní diabetické retinopatie. Vlivem hypoxie dochází k tvorbě fragilních novotvořených cév na terči zrakového nervu, sítnici, ve sklivci a v komorovém úhlu. Komplikace proliferativní diabetické retinopatie, které přímo ohrožují zrakové funkce ale i oko jako orgán jsou krvácení do sklivce, trakční odchlípení sítnice a neovaskulární glaukom.

Terapie proliferativní diabetické retinopatie vychází z patogeneze – vede ji snaha ovlivnit hypoxii. V počátečních stádiích se uplatňuje laserová léčba v podobě panretinální fotokoagulace, kde cestou snížení metabolické aktivity v laserem zajizvené sítnici dochází ke snížení hypoxie⁴⁷.

Pokud dále dochází k novotvorbě cév a zejména jejich prorůstání do sklivce, vzniká akutní riziko krvácení do sklivce z ruptury novotvořených cév při kontrakci doprovodné fibrozní tkáně ve vazivově se měnícím sklivci, posléze pak riziko trakčního odchlípení sítnice. Terapie tohoto nálezu je vedle snahy o maximální panretinální fotokoagulaci tam, kde to průhlednost očních médií dovolí, již chirurgická. Cestou pars plana vitrektomie je provedeno odstranění prokrváceného sklivce, rozrušení vitreoretinálních adhezí, ošetření neovaskulárních formací endodiatermokoagulací, peeling epiretinálních fibrozních membrán a většinou dočasná náhrada sklivce tamponádou expanzním plynem nebo silikonovým olejem.

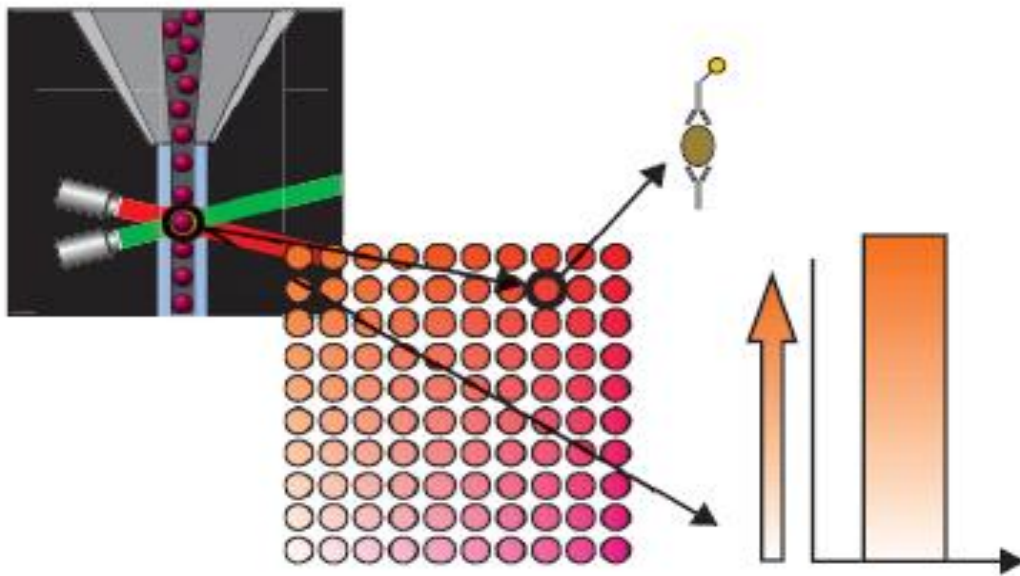
U floridních nálezů, kde se hypoxie nedaří dostat pod kontrolu, dochází k novotvorbě cév i v předním segmentu oka, zejména v komorovém úhlu. Příмым následkem je zvýšení nitrooční tenze, neovaskulární glaukom. Terapie tohoto terminálního stadia proliferativní diabetické retinopatie je svízelná, vedle lokální antiglaukomatozní terapie přichází ke slovu léčba chirurgická v podobě cykloablativních metod – cyklokryokoagulace či

cyklofotokoagulace, implantace drenážních implantátů a v poslední době stále častěji i antiVEGF terapie. Intravitreální aplikace protilátky proti vaskulárnímu cévnímu růstovému faktoru (nejčastěji bevacizumabu) velmi účinně ovlivní koncentraci VEGF v nitrooční tekutině, která vede k rapidní regresi neovaskularizací a většinou k poklesu nitrooční tenze⁴⁵.

Multiplexová imunoanalýza

Koncentraci cytokinů v tělesných tekutinách lze stanovit kombinací imunoanalýzy a průtokové cytometrie - tzv. multiplexovou analýzou.

Multiplexová technologie umožňuje stanovení koncentrace až desítek různých analytů ve velmi malých objemech vzorků a funguje na principu kombinace sendvičové imunoanalýzy a průtokové cytometrie³⁴. Jedná se o analytický postup, který podporuje další rozvoj genomiky a proteomiky, která je v současné době celosvětově rozšířená a využívaná pro výzkumy v oblastech hematologie, biochemie, imunologie, mikrobiologie, genetiky atd. Principem multiplexové analýzy je vazba antigenu na protilátku kovalentně vázanou na povrchu barevně kódovaných mikrokuliček s tzv. spektrálním kódem. Množství navázané látky je stanoveno díky reporterové fluorescenční molekule tj. značené druhé protilátce. Mikročástice proudí přístrojem jedna za druhou a u každé je měřena fluorescence po excitaci 2 laserovými paprsky (obr. 1). Měření probíhá na speciálním průtokovém cytometru Luminex 100 IS (obr. 2), který určuje jedním laserem spektrální kód kuličky (druh analyzované látky) a druhým laserem množství reporterové molekuly (kvantitu analyzované látky). Koncentrace jednotlivých analytů jsou vypočteny na základě sestrojených standardních kalibračních křivek pro každý analyt (obr. 4). Imunoanalytická reakce probíhá v roztoku, mikrokuličky jsou polystyrenové o velikosti 4,7 mikrometrů. Tento postup kombinující imunoanalýzu a průtokovou cytometrii umožňuje stanovení teoreticky až 100 analytů v jediném alikvotu vzorku o objemu 10–50 mikrolitrů, což je při stanovení z nitrooční tekutiny nezbytnou podmínkou. Pro analýzu lze obecně použít různé biologické materiály – sérum, plazma, exsudáty, supernatanty buněčných kultur nebo lyzáty buněk. Výhodou multiplexového měření je absolutní porovnatelnost mezi jednotlivými markery, protože je pro ně jednotná preanalytická i analytická fáze a tím časová i ekonomická úspora při zpracování vzorků.



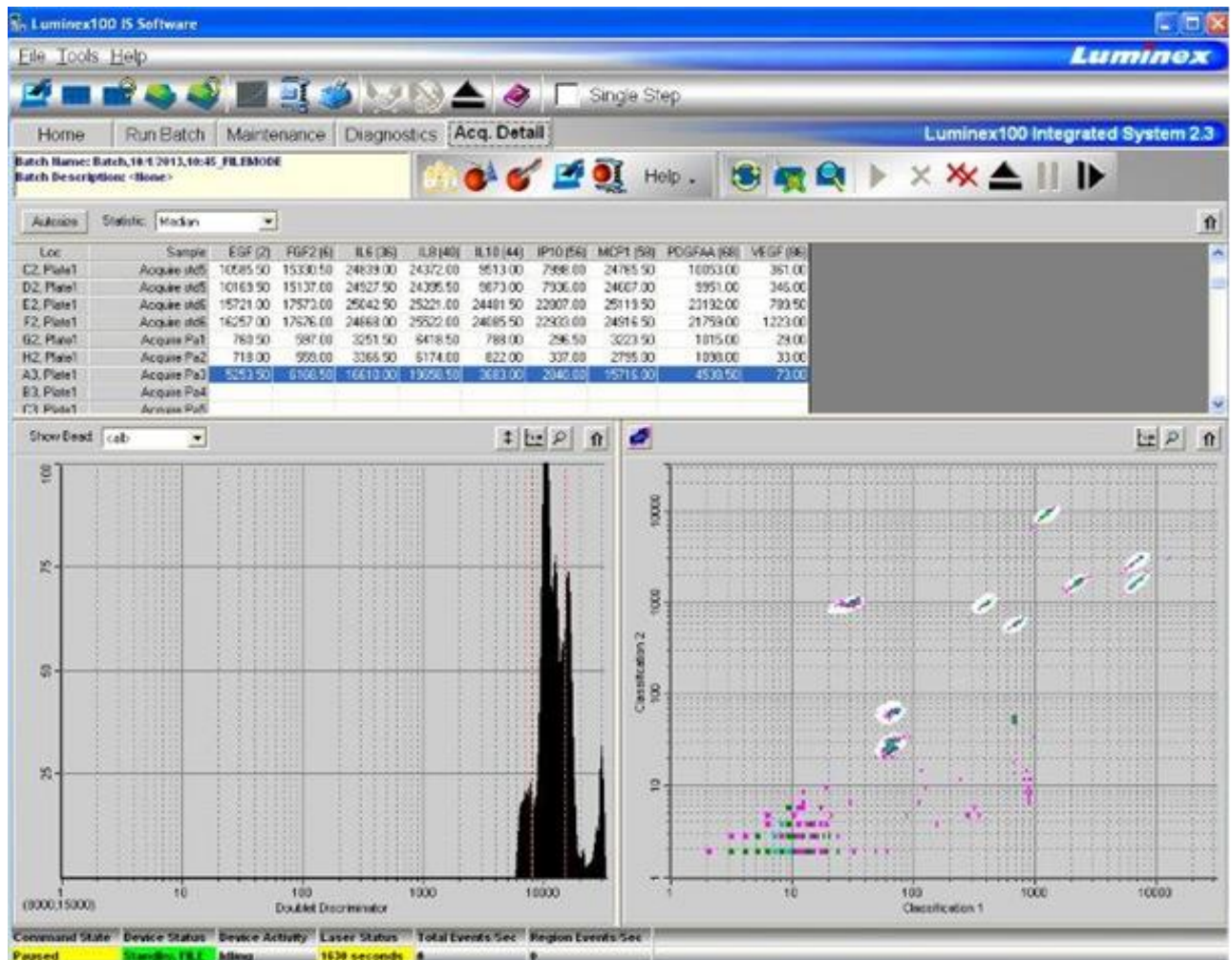
Obr.1: Schéma principu multiplexové imunoanalýzy.



Obr.2: Přístroj Luminex 100IS.



Obr.3: Analytický panel MILLIPLEX MAP.



Obr.4.: Detail obrazovky výsledků na přístroji Luminex 100IS.

6. Cíle disertační práce

Cílem práce bylo zjistit, zda existují korelace mezi hladinou VEGF a dalších cytokinů v nitrooční tekutině stanovenou multiplexovou analýzou a klinickým nálezem, a zjistit, zda vůbec a v jaké fázi onemocnění by mělo stanovení angiogenních proteinů význam.

7. Materiál a metodika

Za aseptických podmínek na operačním sále byl proveden odběr malého množství (30 – 50 mikrolitrů) nitrooční tekutiny z přední komory. Paracentéza přední komory byla provedena tenkou 30 gauge jehlou u limbu v temporálním meridiánu paralelně s rovinou duhovky. U pacientů, kde byl odběr prováděn v rámci chirurgického zákroku pars plana vitrektomie, byla paracentéza a odběr proveden jako první nitrooční manévr bezprostředně po zarouškování pod operačním mikroskopem. U pacientů kontrolní skupiny bez jakékoliv oční patologie byl odběr prováděn v úvodu operace katarakty, kdy standardní pomocnou paracentézou bylo aspirováno 30 mikrolitrů z přední komory plochou hydrodisekční kanylou, přední komora byla po té doplněna viskomateriálem, byl proveden sklerokorneální tunel a bylo pokračováno v operaci katarakty běžným způsobem. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s aspirací tekutiny s přední komory. Vzorky byly do hodiny po odběru zmrazeny na - 80 stupňů Celsia a při této teplotě skladovány. Následně byla provedena multiplexová imunoanalytická stanovení všech vzorků. Koncentrace proteinů byla stanovena multiplexovou xMAP imunoanalýzou za použití přístroje Luminex 100 (Luminex corp., USA) a komerčně dostupných souprav (obr.3.): MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Panel, MILLIPLEX MAP TGF beta1, MILLIPLEX MAP Human Brain-Derived Protein Panel Millipore Corporation (Billerica, MA, USA). Stanovení byla provedena dle instrukcí výrobce a v každé analýze byly zařazeny kontrolní vzorky dodávané výrobcem. U všech náběrů bylo provedeno stanovení EGF IL-6, VEGF a dalších parametrů angiogeneze a zánětu: BDNF, CNTF, IL-8, IP-10, MCP-1, PDGF, TGFbeta. Další markery: IL-10, fractalkine, PDGF AB/BB, IFNgamma, TNFalfa, RANTES byly stanoveny pouze v prvních analýzách, protože se ukázalo, že jejich koncentrace v nitrooční tekutině pacientů i u kontrolního souboru jsou z velké části pod limitem detekce použité technologie. Ve stanovování těchto markerů nebylo proto dále pokračováno.

Multiplexová stanovení byla provedena v 59 vzorcích nitrooční tekutiny pacientů s proliferativní diabetickou retinopatií a u 51 kontrolních vzorků. Pacienti byli rozděleni do 4 skupin podle klinického nálezu.

- Skupina 1 – pacienti s PDR bez nutnosti chirurgické reintervence tzn., byla provedena panretinální fotokoagulace a dále byla sledována klidná PDR, nedocházelo k rozvoji

neovaskularizací, nebyly přítomny klinické popř. fluoroangiografické (FAG) známky ischemie.

- Skupina 2 – pacienti s recidivujícím hemoftalmem jako méně závažnou komplikací PDR. Recidivující hemoftalmus při proliferativní diabetické retinopatii v terénu bez rozvoje ischemických komplikací, jako je rubeoza duhovky či progresse neovaskularizací na fundu je známkou více pokročilého onemocnění a je většinou indikací k chirurgickému zákroku – pars plana vitrektomii. Ke krvácení do sklivce dochází při kontrakci fibrovaskulární tkáně na terči zrakového nervu či kdekoliv na očním pozadí v souvislosti s postupnou fibrotizací neovaskulárních formací.
- Skupina 3 – pacienti s neovaskulárním glaukomem refrakterním na léčbu jako závažná komplikace PDR. Pokud v nálezu dominuje ischemie, dochází k rozvoji neovaskulární tkáně na fundu a zejména v předním segmentu – v duhovce a komorovém úhlu, dochází k vzestupu nitrooční tenze – neovaskulárnímu glaukomu. Tento nález je vždy známkou velmi pokročilého stadia proliferativní retinopatie, jeho léčba je často svízelná, vedle lokální terapie se uplatňuje i chirurgická léčba v podobě cyklodestruktivních výkonů a drenážních implantátů.
- Skupina 0 – pacienti kontrolní skupiny – odběr vzorku nitrooční tekutiny před operací katarakty u pacientů bez prokázané retinální patologie.

Pomocí deskriptivní statistiky byly vypočteny pro jednotlivé markery a skupiny hodnoty mediánů a 5. a 95. percentilu. Hodnoty hladin markerů byly porovnány mezi kontrolní skupinou versus PDR (všechny skupiny). Klinické závažnosti byly porovnány neparametrickým testem Mann-Whitney pro nezávislé vzorky. Dále byly porovnány hladiny markerů mezi skupinou kontrolní a jednotlivými skupinami klinické závažnosti PDR testem Kruskal-Wallis. Hladiny markerů mezi nejnižší klinickou závažností PDR skupina 1 a nejvyšší klinickou závažností skupina 3 byly porovnány Mann-Whitney testem pro nezávislé vzorky. Za signifikantní byly hodnoceny testy s $P < 0,0001$. Dále byly pro jednotlivé skupiny vytvořeny Box- a Whisker diagramy.

Mezi jednotlivými faktory byla provedena pořadová korelace a byl vypočten Spearmanův korelační faktor.

8. Výsledky

Přehled hodnot medianu, 5. a 95. percentilu hodnot koncentrací v pg/ml v jednotlivých skupinách udává tabulka 1.

Statisticky signifikantně zvýšené byly hodnoty měřené u pacientů s PDR (skupina 1,2,3) proti skupině kontrol u proangiogenních cytokinů VEGF, IL-6, IL-8 a PDGF AA. – viz graf 1,2,3 a 4, tabulka 3, 4, 5 a 6.

Statisticky signifikantně zvýšené byly naměřené hodnoty u pacientů s PDR (skupina 1,2,3) proti skupině kontrol u antiangiogenního cytokinu IP-10 - graf 5 a tabulka 7

Zvýšené hodnoty VEGF byly naměřeny u pacientů ze skupiny 3 (komplikovaná PDR s neovaskulárním glaukomem refrakterním na léčbu) proti skupině 1 (nekomplikovaná PDR), proti skupině 2 (méně závažné komplikace PDR) a podle očekávání i proti kontrolní skupině - graf 6 a tabulka 8.

Zejména u pacientů s nekomplikovanějším průběhem se sekundárním glaukomem s nutností opakované chirurgické (cyklokryodestrukce, drenážní implantáty) a antiVEGF (ranibizumab) intervence jsme našli nejvyšší hodnoty koncentrací VEGF, které se lišily o řády proti pacientům s méně komplikovaným průběhem - graf 7.

Pro hodnoty koncentrací markerů BDNF, CNTF, EGF, MCP – 1 a TGF beta nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinou pacientů s PDR a kontrolní skupinou – graf 8, 9, 10, 11 a 12, tabulka 9, 10, 11, 12 a 13.

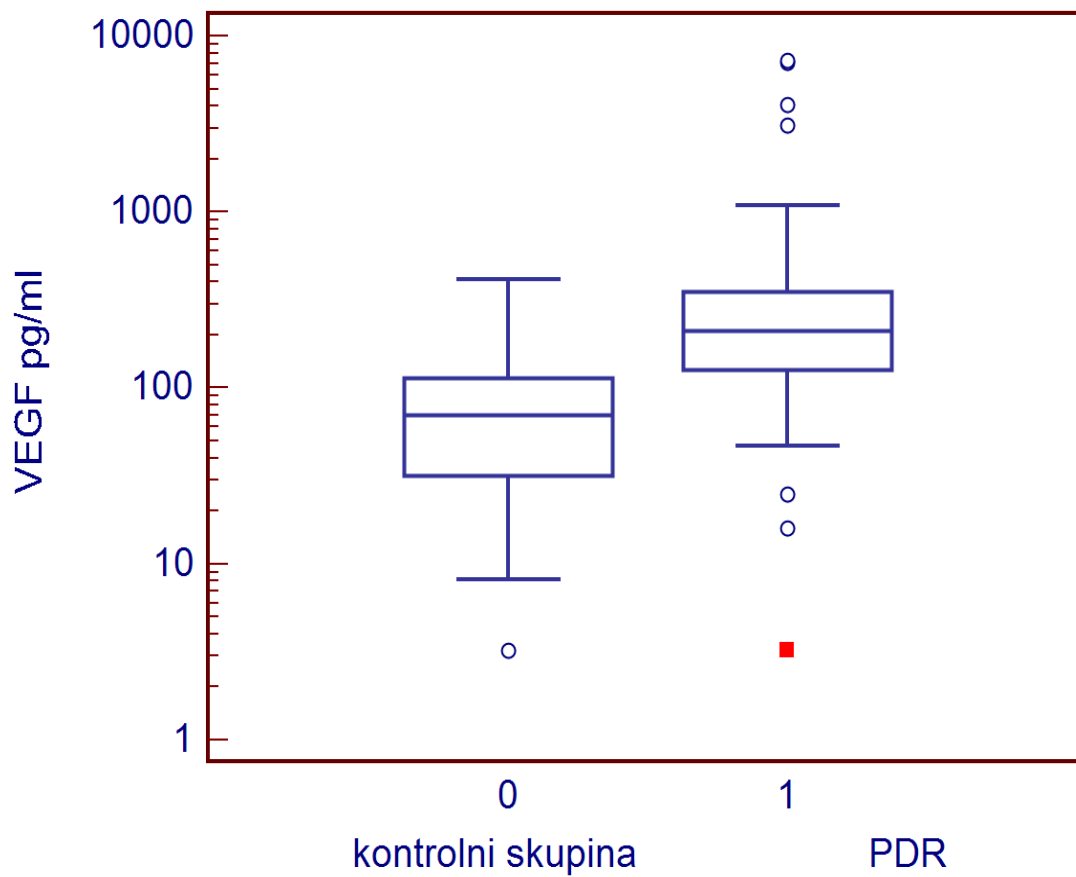
Hladiny koncentrací vybraných analytů u jednoho pacienta s PDR odebrané před a po antiVEGF terapii (0,5 mg bevacizumabu intravitreálně) dokumentuje graf 13.

Spearmanův korelační koeficient pro jednotlivé markery udává tabulka 2.

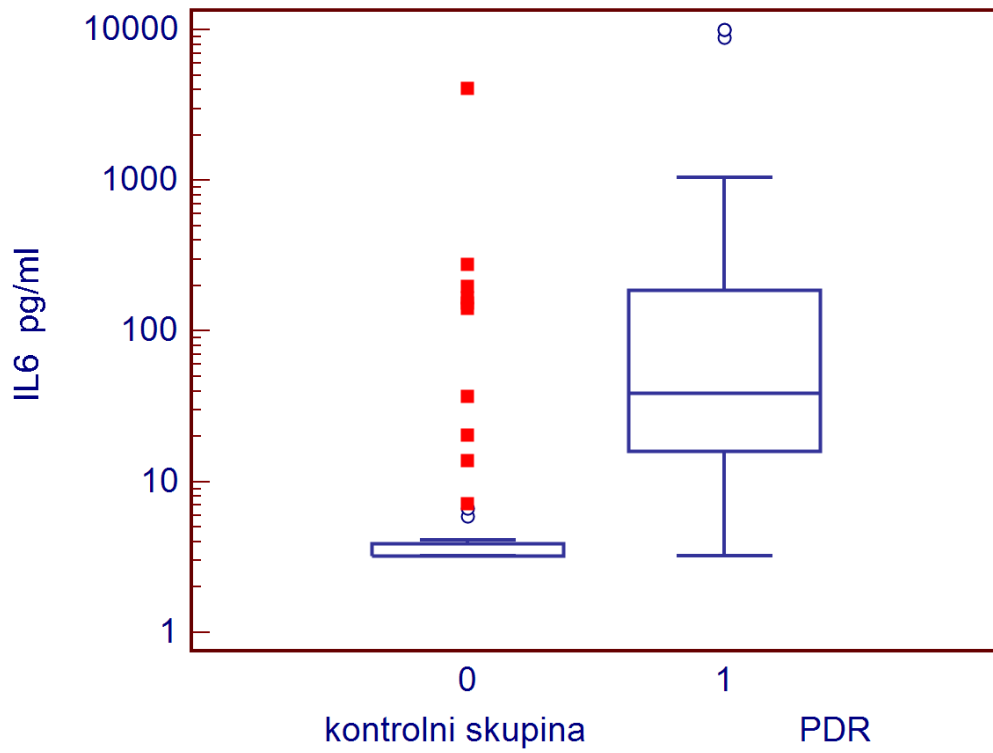
Tabulka 1.: Hodnoty medianu, 5. a 95. percentilu v pg/ml v jednotlivých skupinách u sledovaných markerů.

Skupina	0		1		2		3	
Parametr	Median	5 - 95 P	Median	5 - 95 P	Median	5 - 95 P	Median	5 - 95 P
BDNF	12,000	12,000 - 59,671	12,000	12,000 - 49,373	12,000	12,000 - 103,230	30,000	12,000 - 81,430
CNTF	122,000	122,0 - 2667,915	393,190	122,000 - 1787,448	276,190	122,000 - 573,630	388,285	197,960 - 578,610
EGF	24,880	13,893 - 115,989	36,220	14,021 - 133,305	96,470	4,228 - 120,416	46,240	3,950 - 114,200
FGF2	16,000	3,200 - 21,341	16,000	3,200 - 25,758	16,000	3,200 - 16,000	17,390	3,200 - 28,290
IL10	3,200	3,200 - 12,324	3,200	3,200 - 20,950	3,200	3,200 - 11,788	3,200	3,200 - 40,506
IL6	3,200	3,200 - 196,312	37,190	3,992 - 4577,375	25,220	3,366 - 299,134	319,970	22,630 - 9982,690
IL8	3,200	3,200 - 15,490	25,280	13,205 - 184,622	27,960	13,840 - 53,670	36,850	20,040 - 96,370
IP10	105,915	12,930 - 307,680	460,675	159,492 - 2237,278	365,345	150,900 - 758,610	815,250	318,83 - 1698,360
MCP1	962,590	3,200 - 2931,627	2772,210	353,180 - 3249,450	2336,770	2020,39 - 2653,150	661,225	3,200 - 2881,940
PDGFAA	111,260	5,845 - 212,847	227,955	104,574 - 756,335	208,360	151,580 - 344,620	200,170	79,910 - 316,610
TGFB1	49,000	49,000 - 49,000	49,000	49,000 - 220,411	49,000	49,000 - 84,710	298,890	49,000 - 955,580
VEGF	69,850	16,000 - 200,633	211,620	48,099 - 1990,975	187,960	4,276 - 523,246	352,820	132,84 - 7052,890

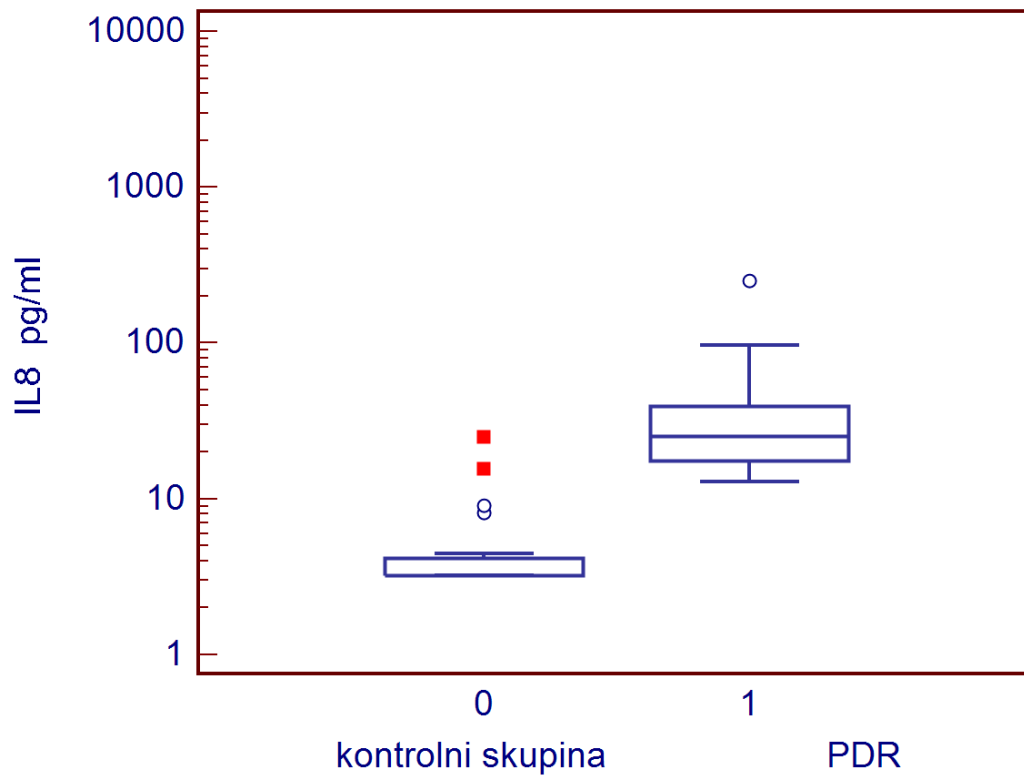
Graf 1.: Box a Whisker diagram hodnot koncentrací VEGF kontrolní skupiny a skupiny pacientů s PDR v pg/l.



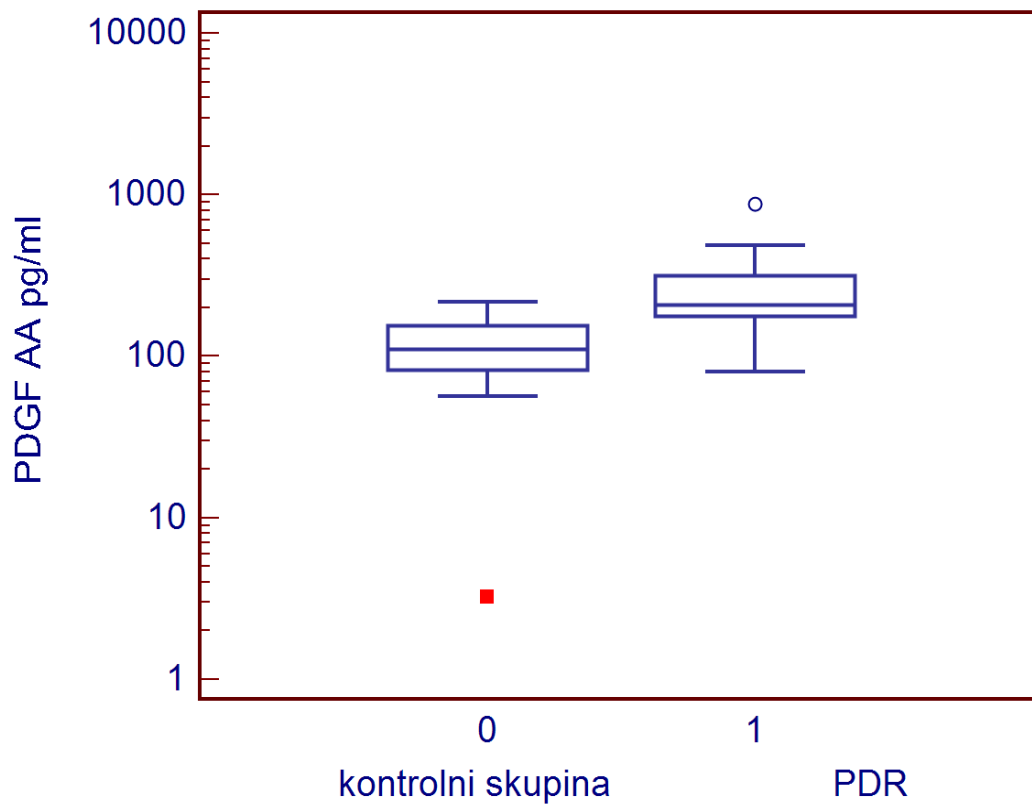
Graf 2.: Box a Whisker diagram hodnot koncentrací IL-6 kontrolní skupiny a skupiny pacientů s PDR v pg/l.



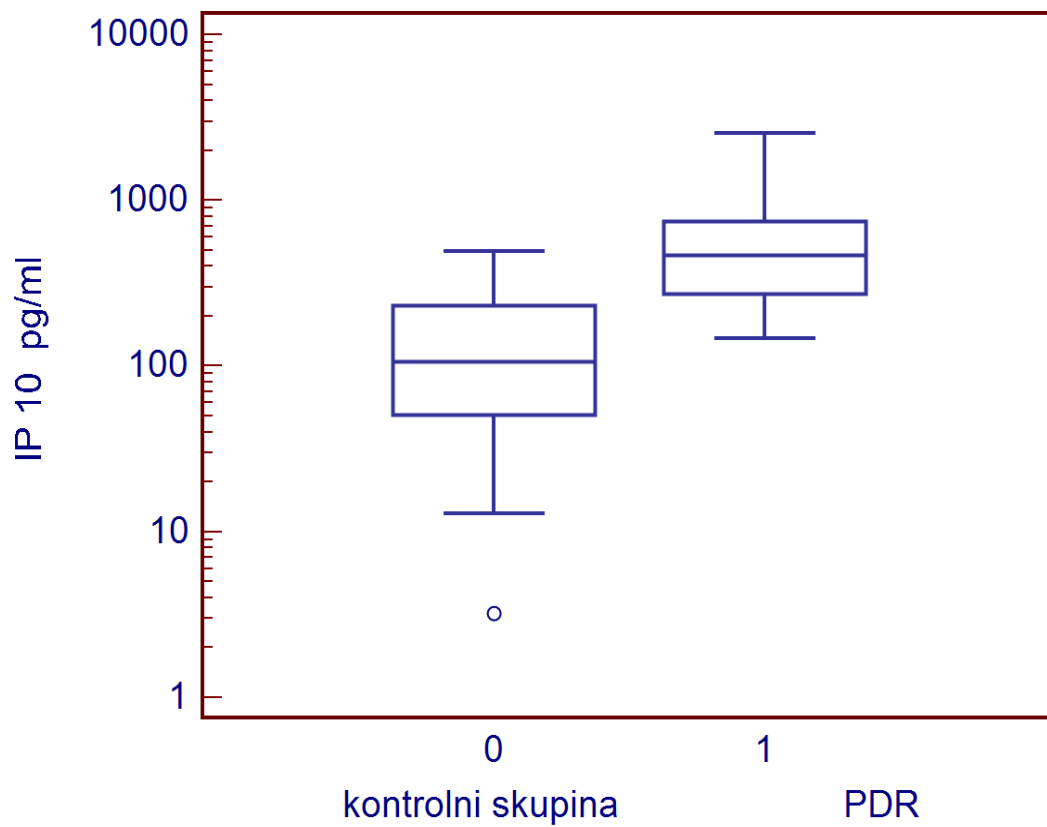
Graf 3.: Box a Whisker diagram hodnot koncentrací IL-8 kontrolní skupiny a skupiny pacientů s PDR v pg/l.



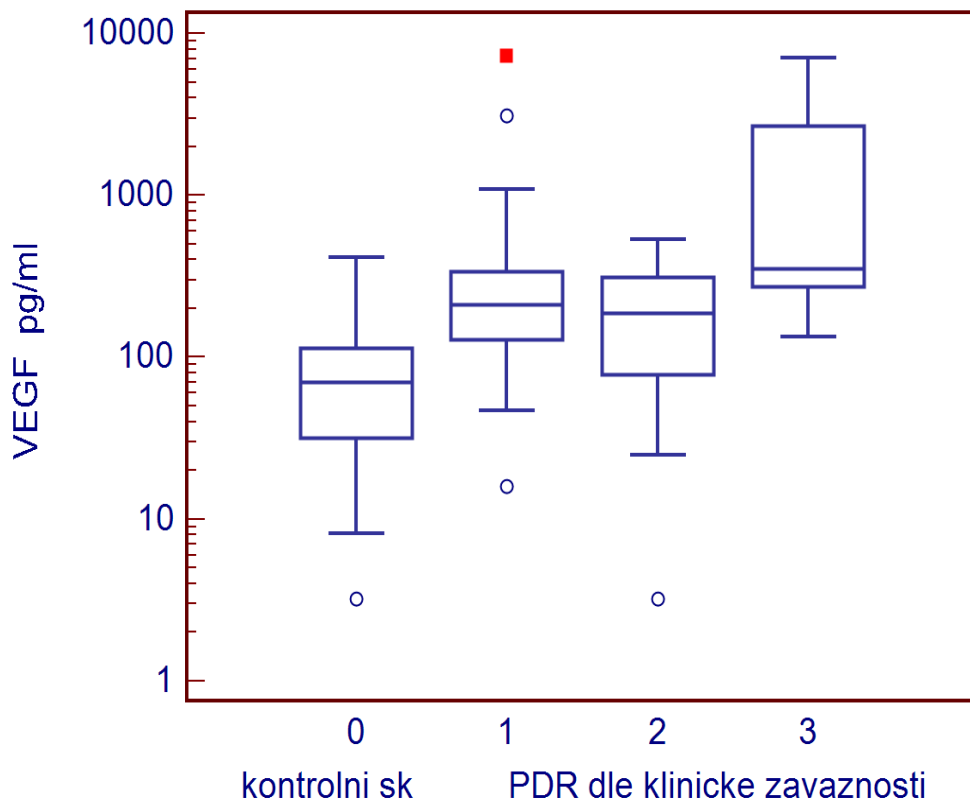
Graf 4.: Box a Whisker diagram hodnot koncentrací PDGF AA kontrolní skupiny a skupiny pacientů s PDR v pg/l.



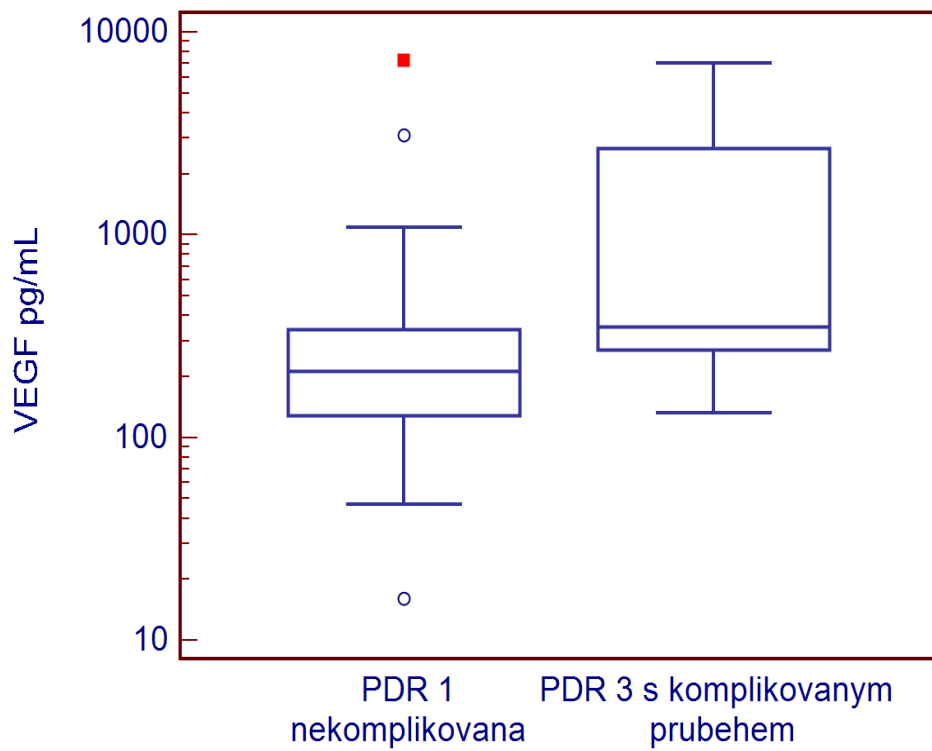
Graf 5.: Box a Whisker diagram hodnot koncentrací IP-10 kontrolní skupiny a skupiny pacientů s PDR v pg/l.



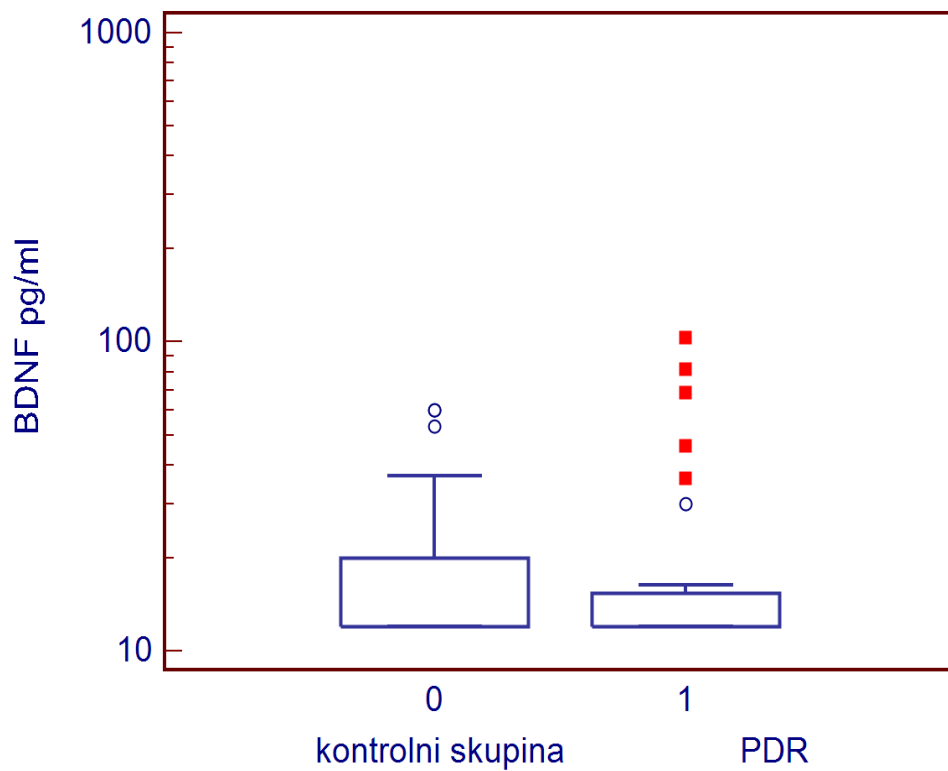
Graf 6.: Hladiny koncentrace VEGF v pg/ml dle rozdělení do skupin 0-3 podle klinické závažnosti.



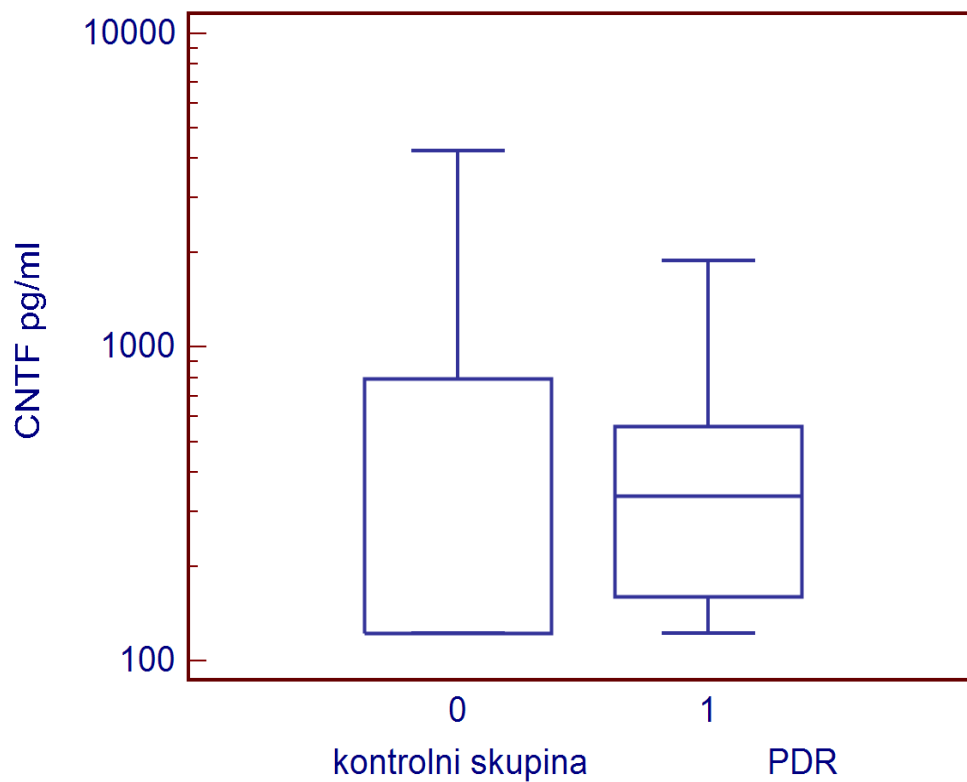
Graf 7.: Koncentrace VEGF v pg/ml u PDR skupiny 1 (PDR s nekomplikovaným průběhem) oproti PDR skupině 3 (skupina s neovaskulárním glaukomem refrakterním na léčbu).



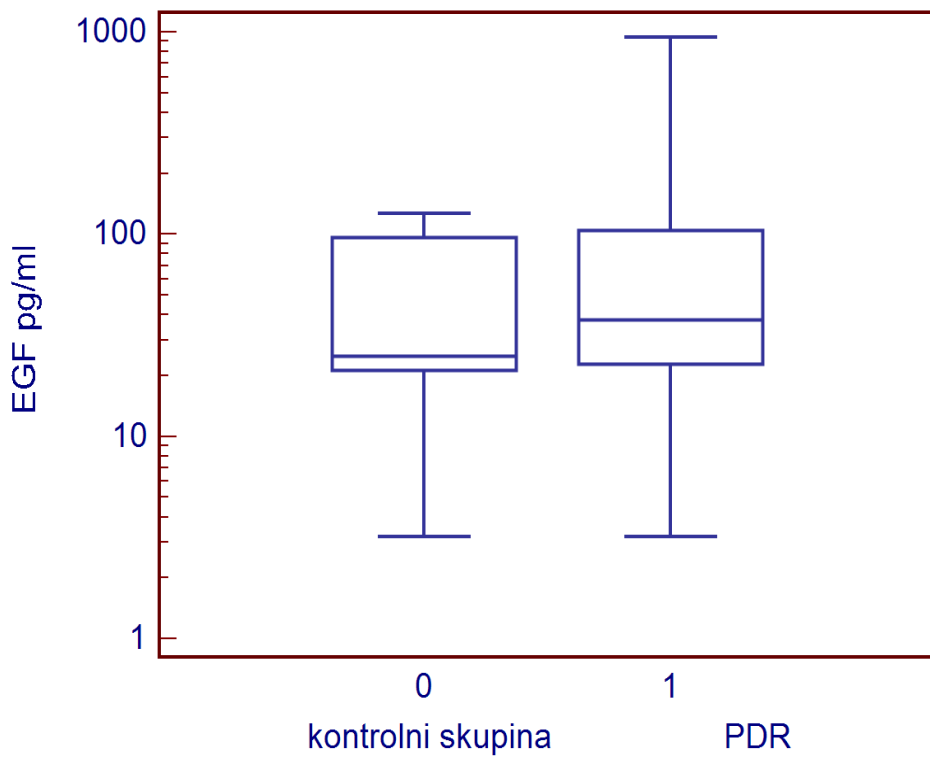
Graf 8. Box a Whisker diagram hodnot koncentrací BDNF kontrolní skupiny a skupiny pacientů s PDR v pg/l – nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl.



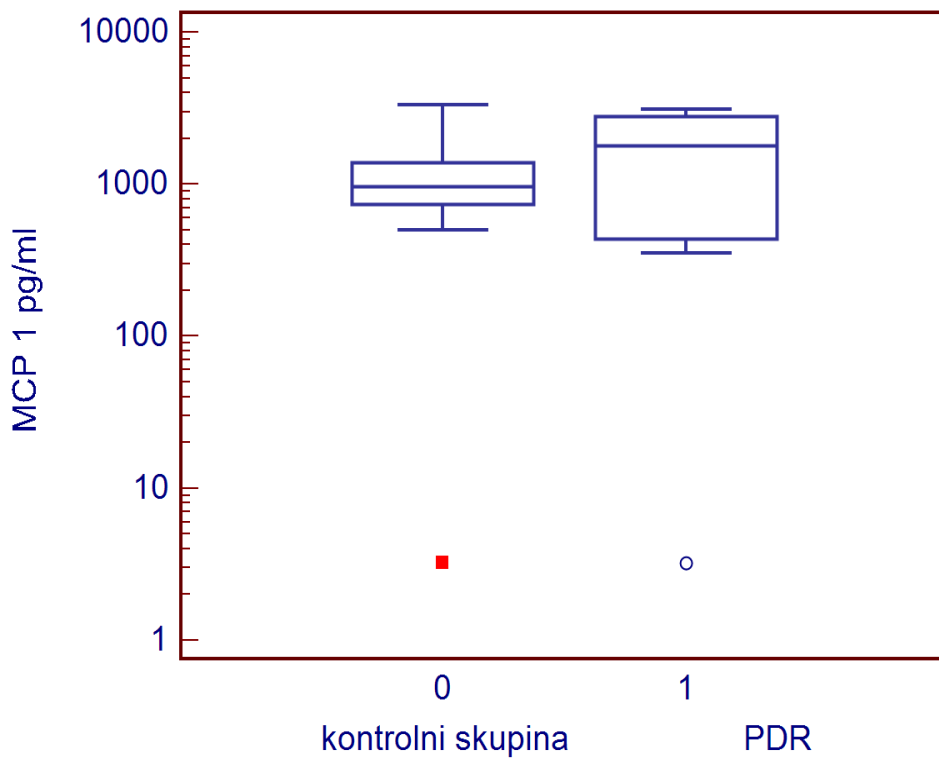
Graf 8.: *Box a Whisker diagram hodnot koncentrací CNTF kontrolní skupiny a skupiny pacientů s PDR v pg/l – nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl.*



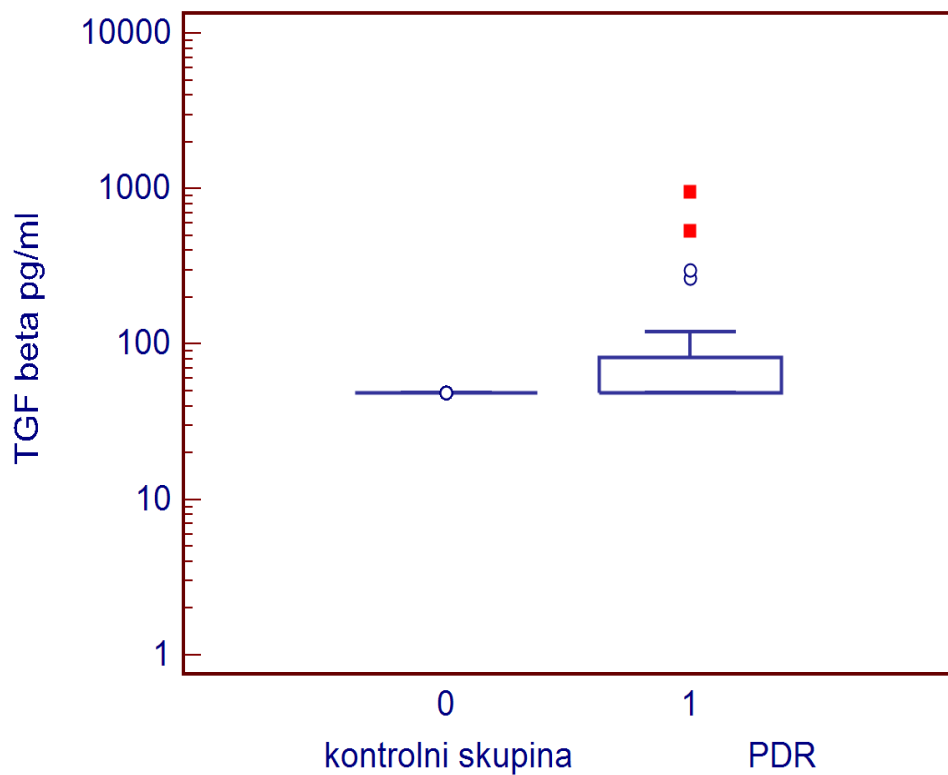
Graf 10.: *Box a Whisker diagram hodnot koncentrací EGF kontrolní skupiny a skupiny pacientů s PDR v pg/l – nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl.*



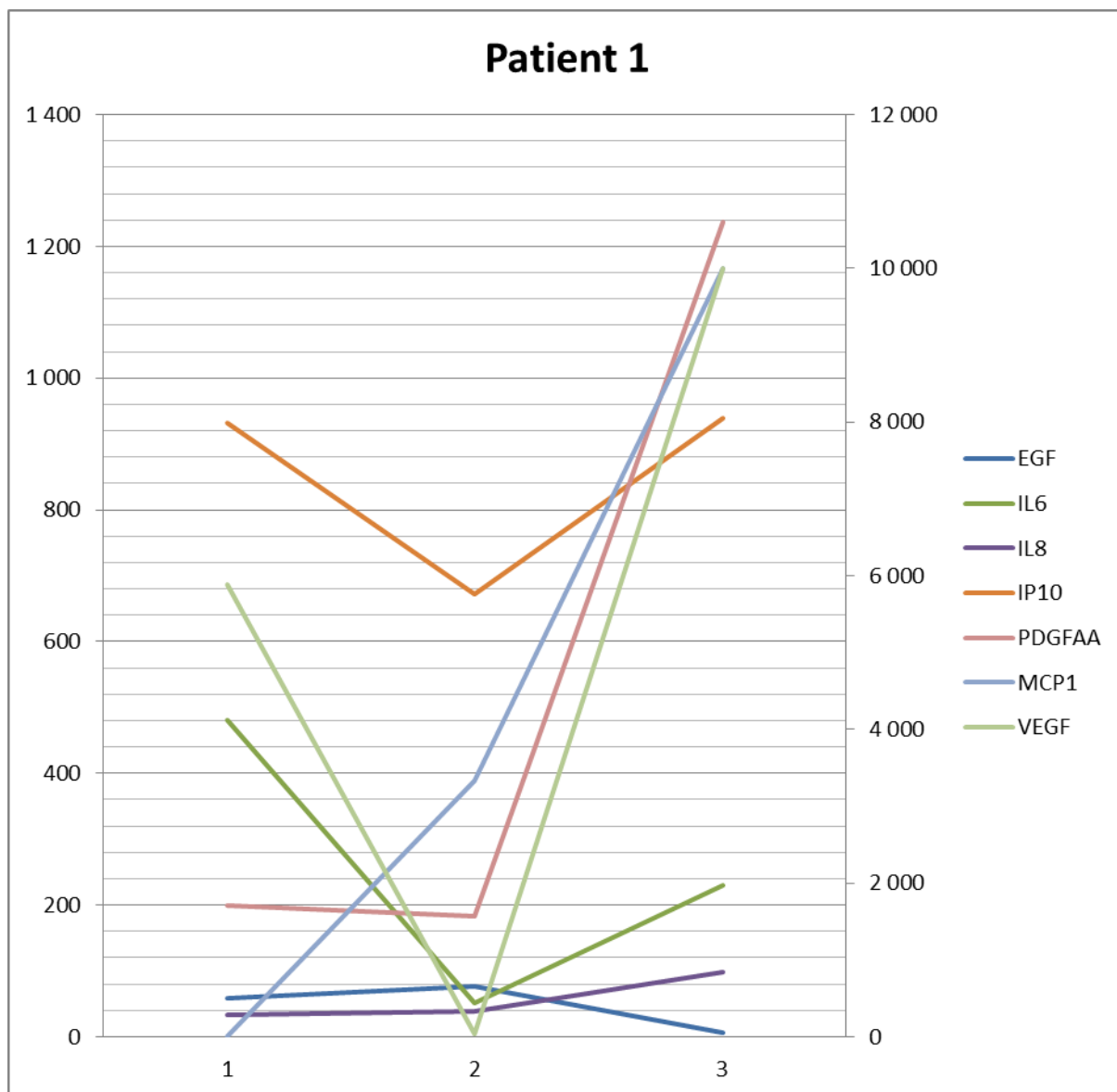
Graf 11.: Box a Whisker diagram hodnot koncentrací MCP-1 kontrolní skupiny a skupiny pacientů s PDR v pg/l – nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl.



Graf 12.: Box a Whisker diagram hodnot koncentrací TGF beta kontrolní skupiny a skupiny pacientů s PDR v pg/l – nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl.



Graf 13.: Hladiny koncentrací vybraných analytů u jednoho pacienta s PDR skupiny 3 odebrané před a po antiVEGF terapii (0,5 mg bevacizumabu intravitreálně) v pg/ml na časové ose, bod 1 bezprostředně před aplikací bevacizumabu, bod 2 měsíc po aplikaci ukazuje signifikantní snížení koncentrace VEGF a IL-6 s opětovným nastoupením koncentrací 3 měsíce po aplikaci (bod 3)



Tabulka 2.: Spearmanův korelační koeficient pro jednotlivé markery.

		BDNF	CNTF	EGF	FGF2	IL10	IL6	IL8	IP10	MCP1	PDGFAA	TGFB1	VEGF
BDNF	Correlation Coefficient Significance Level P n		0,512 <0,001 77	-0,276 0,004 105	-0,110 0,266 105	0,192 0,050 105	0,170 0,090 101	0,259 0,008 104	0,232 0,027 91	0,148 0,285 54	0,028 0,781 102	0,190 0,057 101	0,046 0,651 100
CNTF	Correlation Coefficient Significance Level P n	0,512 <0,001 77		-0,352 0,002 76	-0,146 0,210 76	0,099 0,393 76	0,190 0,102 75	0,303 0,008 75	0,288 0,019 66	0,316 0,050 39	0,135 0,246 76	0,136 0,244 75	0,191 0,103 74
EGF	Correlation Coefficient Significance Level P n	-0,276 0,004 105	-0,352 0,002 76		0,561 <0,001 109	-0,192 0,008 187	-0,142 0,055 184	-0,051 0,597 108	-0,210 0,043 93	-0,562 <0,001 54	-0,019 0,845 106	-0,106 0,284 104	0,022 0,767 180
FGF2	Correlation Coefficient Significance Level P n	-0,110 0,266 105	-0,146 0,210 76	0,561 <0,001 109		0,170 0,076 110	0,054 0,583 105	0,139 0,150 108	-0,005 0,961 93	-0,333 0,013 55	-0,036 0,714 107	-0,019 0,849 104	-0,110 0,275 101
IL10	Correlation Coefficient Significance Level P n	0,192 0,050 105	0,099 0,393 76	-0,192 0,008 187	0,170 0,076 110		0,520 <0,001 183	0,280 0,003 108	0,000 1,000 93	-0,189 0,168 55	0,140 0,152 107	0,311 0,001 104	-0,040 0,595 179
IL6	Correlation Coefficient Significance Level P n	0,170 0,090 101	0,190 0,102 75	-0,142 0,055 184	0,054 0,583 105	0,520 <0,001 183		0,809 <0,001 104	0,761 <0,001 92	0,616 <0,001 53	0,608 <0,001 103	0,531 <0,001 102	0,140 0,063 178
IL8	Correlation Coefficient Significance Level P n	0,259 0,008 104	0,303 0,008 75	-0,051 0,597 108	0,139 0,150 108	0,280 0,003 108	0,809 <0,001 104		0,772 <0,001 92	0,668 <0,001 53	0,635 <0,001 105	0,583 <0,001 103	0,324 0,001 100
IP10	Correlation Coefficient Significance Level P n	0,232 0,027 91	0,288 0,019 66	-0,210 0,043 93	-0,005 0,961 93	0,000 1,000 93	0,761 <0,001 92	0,772 <0,001 92		0,638 <0,001 53	0,605 <0,001 90	0,537 <0,001 91	0,383 <0,001 89
MCP1	Correlation Coefficient Significance Level P n	0,148 0,285 54	0,316 0,050 39	-0,562 <0,001 54	-0,333 0,013 55	-0,189 0,168 55	0,616 <0,001 53	0,668 <0,001 53	0,638 <0,001 53		0,676 <0,001 53	0,261 0,059 53	0,612 <0,001 53
PDGFAA	Correlation Coefficient Significance Level P n	0,028 0,781 102	0,135 0,246 76	-0,019 0,845 106	-0,036 0,714 107	0,140 0,152 107	0,608 <0,001 103	0,635 <0,001 105	0,605 <0,001 90	0,676 <0,001 53		0,417 <0,001 102	0,337 0,001 98
TGFB1	Correlation Coefficient Significance Level P n	0,190 0,057 101	0,136 0,244 75	-0,106 0,284 104	-0,019 0,849 104	0,311 0,001 104	0,531 <0,001 102	0,583 <0,001 103	0,537 <0,001 91	0,261 0,059 53	0,417 <0,001 102		0,247 0,014 99
VEGF	Correlation Coefficient Significance Level P n	0,046 0,651 100	0,191 0,103 74	0,022 0,767 180	-0,110 0,275 101	-0,040 0,595 179	0,140 0,063 178	0,324 0,001 100	0,383 <0,001 89	0,612 <0,001 53	0,337 0,001 98	0,247 0,014 99	

Tabulka 3: Mann – Whitney test pro nezávislé vzorky, koncentrace VEGF kontrolní skupina versus všichni pacienti s PDR , statisticky signifikantní rozdíl.

Average rank of first group	35,4804
Average rank of second group	72,1638
Mann-Whitney U	483,50
Test statistic Z (corrected for ties)	6,046
Two-tailed probability	P < 0,0001

Tabulka 4 Mann – Whitney test pro nezávislé vzorky, koncentrace IL-6 kontrolní skupina versus všichni pacienti s PDR, statisticky signifikantní rozdíl.

Average rank of first group	33,7255
Average rank of second group	74,9333
Mann-Whitney U	394,00
Test statistic Z (corrected for ties)	6,861
Two-tailed probability	P < 0,0001

Tabulka 5 Mann – Whitney test pro nezávislé vzorky, koncentrace IL-8 kontrolní skupina versus všichni pacienti s PDR, statisticky signifikantní rozdíl.

Average rank of first group	16,1333
Average rank of second group	44,3448
Mann-Whitney U	19,00
Test statistic Z (corrected for ties)	6,399
Two-tailed probability	P < 0,0001

Tabulka 6 Mann – Whitney test pro nezávislé vzorky, koncentrace PDGF AA kontrolní skupina versus všichni pacienti s PDR, statisticky signifikantní rozdíl.

Average rank of first group	19,5968
Average rank of second group	41,5179
Mann-Whitney U	111,50
Test statistic Z (corrected for ties)	4,895
Two-tailed probability	P < 0,0001

Tabulka 7 Mann – Whitney test pro nezávislé vzorky, koncentrace IP-10 kontrolní skupina versus všichni pacienti s PDR, statisticky signifikantní rozdíl.

Average rank of first group	17,3333
Average rank of second group	39,6087
Mann-Whitney U	55,00
Large sample test statistic Z	5,204
Two-tailed probability	P < 0,0001

Tabulka 8 Kruskal- Wallis test porovnání koncentrace VEGF mezi jednotlivými skupinami dle klinické závažnosti. 1 – kontrolní skupina, 2 - PDR s nejlehčím průběhem, 3 – PDR s recidivujícím hemoftalmem, 4 – PDR s nejzávažnějším průběhem(pouze pro potřeby tohoto testu posunutí číslování skupin –viz první sloupec).

Factor	n	Average Rank	Different (P<0.05) from factor nr
(1) 0	51	35,48	(2)(3)(4)
(2) 1	41	72,76	(1)
(3) 2	11	60,50	(1)(4)
(4) 3	7	92,43	(1)(3)

Tabulka 9 Mann – Whitney test pro nezávislé vzorky, koncentrace MCP-1 kontrolní skupina versus všichni pacienti s PDR, nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl.

Average rank of first group	17,0800
Average rank of second group	20,3000
Mann-Whitney U	102,00
Test statistic Z (corrected for ties)	0,840
Two-tailed probability	P = 0,4010

Tabulka 10 Mann – Whitney test pro nezávislé vzorky, koncentrace CNTF kontrolní skupina versus všichni pacienti s PDR, nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl.

Average rank of first group	22,5556
Average rank of second group	25,9500
Mann-Whitney U	231,00
Test statistic Z (corrected for ties)	0,864
Two-tailed probability	P = 0,3878

Tabulka 11 Mann – Whitney test pro nezávislé vzorky, koncentrace TGF beta kontrolní skupina versus všichni pacienti s PDR, nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl.

Average rank of first group	25,0000
Average rank of second group	34,6667
Mann-Whitney U	279,00
Test statistic Z (corrected for ties)	3,304
Two-tailed probability	P = 0,0010

Tabulka 12 Mann – Whitney test pro nezávislé vzorky, koncentrace EGF kontrolní skupina versus všichni pacienti s PDR, nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl.

Average rank of first group	50,1078
Average rank of second group	61,0083
Mann-Whitney U	1229,50
Test statistic Z (corrected for ties)	1,778
Two-tailed probability	P = 0,0754

Tabulka 13 Mann – Whitney test pro nezávislé vzorky, koncentrace BDNF kontrolní skupina versus všichni pacienti s PDR, nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl.

Average rank of first group	30,9355
Average rank of second group	30,0345
Mann-Whitney U	436,00
Test statistic Z (corrected for ties)	0,234
Two-tailed probability	P = 0,8146

9. Diskuse

Biomarkery se v moderní medicíně staly důležitou součástí diagnostiky i terapie řady onemocnění a jejich využití v oftalmologii není výjimkou. Protože multiplexová analýza založená na X – MAP technologii umožňuje stanovení až desítek analytů najednou v malém objemu vzorku (10 – 50 mikrolitrů), jedná se o slibnou technologii pro uvedení laboratorní medicíny do oftalmologie.

V této studii jsme potvrdili, že pacienti s PDR mají vyšší nitrooční koncentrace proangiogenních, antiangiogenních a zánětlivých cytokinů v porovnání s pacienty bez PDR. Nitrooční koncentrace IL 6, IL 8, IP 10, PDGF AA, TGF beta1 a VEGF byly u pacientů s PDR zvýšené. V současné době řada studií porovnává nitrooční koncentrace cytokinů u pacientů s PDR a bez PDR. Maier a kol.³⁵ popisuje zvýšené koncentrace cytokinů IP 10, MCP 1 a VEGF ve sklivcové tekutině v porovnání s kontrolní skupinou bez PDR. Murugeswari a kol.³⁶ dokumentují zvýšenou koncentraci IL 6, IL 8, MCP 1 a VEGF ve sklivci u pacientů s PDR v porovnání s pacienty s makulární dírou. Naopak koncentrace PDGF byla u pacientů s PDR snižena. Yoshimura³⁷ provedl rozsáhlou analýzu mediátorů ve sklivcové tekutině pacientů s PDR a u pacientů s jinou oční patologií a zjistil zvýšené koncentrace VEGF, MCP 1, IL 6 a IL 8 v porovnání s kontrolní skupinou. V naší práci jsme dosáhli podobných výsledků, pouze jsme nezjistili zvýšenou koncentraci MCP 1 u pacientů s PDR. Zjistili jsme zvýšenou koncentraci PDGF AA a neměřitelné hodnoty PDGF AB/BB u pacientů s PDR, na rozdíl od našich výsledků Freiburger³⁰ a kol. publikovali výsledky ukazující zvýšené hodnoty PDGF AB u pacientů s PDR.

Antiangiogenní IP-10 je vedle VEGF další cytokin, jehož koncentrace v nitrooční tekutině je významně zvýšená u pacientů s proliferativní diabetickou retinopatií. Terapeutické využití této skutečnosti bude zcela jistě předmětem dalšího zkoumání.

Pro klinickou praxi je důležité dále stratifikovat pacienty s PDR, avšak dosud existuje velmi málo studií, které porovnávají hodnoty biomarkerů u různých stadií PDR. Funatsu a kol.³⁸ rozdělili pacienty do dvou skupin s progresí, resp. regresí PDR. Hodnoty VEGF a IL 6 byly zvýšené u pacientů s progresí PDR. Multivariátní logistickou regresní analýzou prokázal, že vyšší hodnoty VEGF byly spojené s progresí choroby po chirurgickém zákroku. Zvýšená hodnota VEGF byla identifikována jako izolovaný rizikový faktor určující výsledek

chirurgického zákroku pro PDR. Freiburger³⁰ analyzoval 23 pacientů s rubeosou duhovky jako významným indikátorem vasoproliferativní aktivity. Nalezl zvýšené koncentrace PDGF AA, které byly signifikantně vyšší u pacientů s rubeosou duhovky. V naší studii pacienti refrakterní k terapii dosahovali nejvyšších hodnot IL 6, TGFbeta1 a VEGF v porovnání s ostatními PDR pacienty, to znamená, že hodnoty těchto faktorů korelují se závažností PDR. Nebyl prokázán signifikantní rozdíl v koncentracích biomarkerů mezi skupinami 2 (recidivující hemoftalmus) a 1 (nekomplikovaná PDR).

Multiplexová technologie, kterou jsme použili ve studii, redukuje nejen náklady a čas imunoanalýzy, zároveň podstatně redukuje objem vzorku, který je potřebný k analýze v porovnání s tradičními imunoanalytickými metodami (ELISA) při zachování komparability výsledků. Tato skutečnost má význam zejména při zavádění laboratorních postupů do oftalmologie. Limitujícím činitelem X – MAP technologie na tomto poli je omezená možnost detekovat některé faktory. V naší studii jsme nebyli schopni detekovat fractalkin, PDGF AB/BB, IL 10, IFN gamma, TNF alfa, FGF 2 a RANTES. Podobně Yoshimura a kol. nebyli schopni detekovat hladiny IL 1 beta, IL 2, IL 4, IL 5, IL 10, IL 17, IFN gamma, TNF alfa eotaxin, MIP 1 alfa, RANTES, EGF a FGF 2. Tři práce demonstrují potenciál xMAP technologie v oftalmologii. Curnow a kol.³⁹ stanovovali panel cytokinů ve sklivci a z jejich spektra potvrdili možnost rozlišení mezi infekční a neinfekční uveitidou dle hladin IL 6, IL 8, MCP 1, IL 13, IL 2 a TNF alfa. Funding a kol.⁴⁰ použili xMAP technologii při stanovení 17 imunomediátorů ve sklivci k rozlišení pacientů s rejekcí rohovky v porovnání s pacienty s neinfekční alterací přední komory. Výsledky prokázaly jak komplexní imunologické interakce procesu rejekce, tak vhodnost stanovování analytů z velmi malého vzorku tekutiny. V podobné práci Banerjee a kol.⁴¹ měřili koncentrace 19 cytokinů u 58 očí během PPV pro nejrůznější vitreoretinální patologie.

Sohn a kol.⁴² prokázali schopnost multiplexové imunoanalýzy v procesu monitorace léčby. Po intravitreální injekci 2 antiangiogenních látek (bevacizumab a triamcinolon) pozorovali změny v koncentracích jednotlivých biomarkerů v závislosti na konkrétním typu terapie. Efektivnější způsob léčby byl spojen s poklesem koncentrací IL 6, IP 10, MCP 1, PDGF AA a VEGF v porovnání s méně účinným postupem, kdy došlo pouze ke snížení hladiny VEGF.

Studie Sohna a kol. v souladu s našimi výsledky u pacientů ze skupiny 3 (sekundární glaukom refrakterní na léčbu) ukazují na potenciál biomarkerů ke stratifikaci pacientů a k individualizaci terapie. Terapie na míru získává na důležitosti mimo jiné kvůli ceně

nových léčiv. Většina nových léčebných postupů je založena na inhibici VEGF. Do klinického používání byly zavedeny antiVEGF preparáty a jsou široce používány v léčbě řady očních chorob, ale rozšíření těchto postupů nastoluje nové otázky. Bylo zjištěno, že inhibice VEGF má negativní efekt na retinální buňky. Studie prokázaly, že systémová inhibice VEGF vede k redukci tloušťky jak zevní, tak vnitřní jádrové vrstvy sítnice u dospělých myší. Výsledky ukazují na skutečnost, že endogenní VEGF hraje důležitou roli pro přežívání neuronálních buněk sítnice a jeho inhibice by měla být provázena opatrností⁴³. Vzhledem k riziku, které doprovází antiVEGF léčbu, je nezbytně nutné vybrat pacienty, kteří mohou profitovat z této léčby přes riziko vedlejších účinků. V naší studii dokazujeme, že určité komplikace, jako je neovaskulární glaukom refrakterní na léčbu, jsou spojené se zvýšenými hodnotami určitých biomarkerů, lze tedy ospravedlnit agresivnější terapii. Tyto pacienti mohou podstoupit opakované injekce antiVEGF preparátů, kortikosteroidů, panretinální fotokoagulaci, cyklokryo- či cyklofotodestrukci na základě zjištěných zvýšených koncentrací biomarkerů.

Další slibnou možností využití stanovení hodnoty proangiogenních cytokinů v nitrooční tekutině pomocí multiplexové imunoanalýzy je možnost odebrat hodnoty cytokinů, zejména VEGF u pacientů pars plana vitrektomií pro komplikace diabetu mellitu před dalším, plánovaným zákrokem, například evakuací silikonového oleje či operací komplikované katarakty. V těchto případech existuje riziko rozvoje neovaskulárních komplikací po výše zmíněných zákrocích. Stanovení hodnot VEGF před tímto zákrokem a případná detekce pacientů s vyššími hodnotami koncentrace VEGF by mohla být imperativem k odložení elektivního zákroku, provedení potřebných opatření ke snížení proangiogenní aktivity, resp. ischemie, jako je rozšíření panretinální fotokoagulace či antiVEGF terapie. Stanovení koncentrace VEGF v nitrooční tekutině je však problematické u pacientů po intravitreální antiVEGF léčbě. Stanovení koncentrace VEGF je ovlivněno antiVEGF terapií cestou přímé interakce s imunoanalýzou, což jsme ověřili v naší laboratoři (dosud nepublikovaná data). Tato interakce vyžaduje stanovení postupu vyšetření u těchto pacientů. Poločas antiVEGF preparátů v oku byl stanoven na 9,8 dne⁴⁴. Do studie byli tedy zařazeni pacienti bez anamnézy antiVEGF terapie či pacienti nejméně 2 měsíce po poslední antiVEGF intravitreální injekci. S rozšiřováním antiVEGF terapie je tedy důležité multifaktoriální sledování této léčby např. pomocí faktorů, které nejsou touto terapií přímo ovlivněny⁴⁵. V naší studii jsme několik potenciálních kandidátů prověřili. Hodnoty koncentrace IL 8 a PDGF AA v naší studii nebyly

ovlivněny podáním protilátky proti VEGF. Naopak hodnoty koncentrací IL 6 a IP 10 korelovaly v tomto případě s hodnotami koncentrace VEGF.

Čím více biomarkerů PDR bude k dispozici, jejich panel bude možné použít k identifikaci rizikových pacientů, k monitoraci progresu onemocnění a efektu léčby.

10. Závěr

Hodnoty koncentrací zkoumaných promotorů angiogeneze stanovené multiplexovou imunoanalýzou korelují s klinickou závažností nálezu. Byla potvrzena možnost odhalit pacienty s komplikovaným průběhem onemocnění díky stanovení angiogenních cytokinů v nitrooční tekutině. Této skutečnosti je možné využít při výběru vhodného terapeutického postupu.

Multiplexová imunoanalýza má potenciál využití v terapii diabetické retinopatie.

11. Použitá literatura

1. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003;9:653-60.
2. Simó R, Carrasco E, García-Ramírez M, Hernández C. Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev.* 2006;2(1):71-98.
3. Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature.* 2005;438(7070):960-6.
4. Cébe Suarez S, Pieren M, Cariolato L, Arn S, Hoffmann U, Bogucki A, Manlius C, Wood J, Ballmer-Hofer K. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Sep;63(17):2067-77.
5. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal.* 2007 Oct;19(10):2003-12.
6. Amo Y, Masuzawa M, Hamada Y, Katsuoka K. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor-D in angiosarcoma patients. *Br J Dermatol.* 2004 Jan;150(1):160-1.
7. Booth V, Keiwer DW, Kamphuis MB, Clark-Lewis I, Sykes BD. The CXCR3 binding chemokine IP-10/CXCL10: structure and receptor interactions. *Biochemistry.* 2002 Aug 20;41(33):10418-25.
8. Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature.* 1985 Jun 20-26;315(6021):672-6.
9. Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol.* 2002 Apr 1;168(7):3195-204.
10. Mehrabian M, Sparkes RS, Mohandas T, Fogelman AM, Lusk AJ. Localization of monocyte chemoattractant protein-1 gene (SCYA2) to human chromosome 17q11.2-q21.1. *Genomics.* 1991 Jan;9(1):200-3.

11. Hickman SE, El Khoury J. Mechanisms of mononuclear phagocyte recruitment in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2010 Apr;9(2):168-73.
12. Semple BD, Bye N, Rancan M, Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. Role of CCL2 (MCP-1) in traumatic brain injury (TBI): Evidence from severe TBI patients and CCL2^{-/-} mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010 April; 30(4): 769–782.
13. Maisonpierre PC, Le Beau MM, Espinosa R, Ip NY, Belluscio L, de la Monte SM, Squinto S, Furth ME, Yancopoulos GD. Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics*. 1991 Jul;10(3):558-68.
14. Mandel AL, Ozdener H, Utermohlen V. Identification of pro- and mature brain-derived neurotrophic factor in human saliva. *Arch Oral Biol*. 2009 Jul;54(7):689-95.
15. Mattson MP. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Nov;1144:97-112.
16. Lam A, Fuller F, Miller J, Kloss J, Manthorpe M, Varon S, Cordell B. Sequence and structural organization of the human gene encoding ciliary neurotrophic factor. *Gene*. 1991 Jun 30;102(2):271-6.
17. McGregor NE, Poulton IJ, Walker EC, Pompolo S, Quinn JM, Martin TJ, Sims NA. Ciliary neurotrophic factor inhibits bone formation and plays a sex-specific role in bone growth and remodeling. *Calcif Tissue Int*. 2010 Mar;86(3):261-70.
18. Vaughn SP, Broussard S, Hall CR, Scott A, Blanton SH, Milunsky JM, Hecht JT. Confirmation of the mapping of the Camurati-Englemann locus to 19q13.2 and refinement to a 3.2-cM region. *Genomics*. 2000 May 15;66(1):119-21.
19. Derynck R, Jarrett J, Chen E, Eaton D, Bell J, Assoian R, Roberts A, Sporn M, Goeddel D. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal transformed cells. *Nature*. 1985 Aug 22-28;316(6030):701-5.
20. Wahl S, Wen J, Mousopoulos N. TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege. *Immunol Rev*. 2006 Oct;213:213-27.
21. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem*. 1990 May 15;265(14):7709-12.

22. Dreux AC, Lamb DJ, Modjtahedi H, Ferns GA. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2006 May;186(1):38-53.
23. Ferguson-Smith AC, Chen YF, Newman MS, May LT, Sehgal PB, Ruddle FH. Regional localization of the interferon-beta 2/B-cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21. *Genomics*. 1988 Apr;2(3):203-8.
24. Gadó K, Domján G, Hegzesi H, Falus A. Role of interleukin-6 in pathogenesis of multiple myeloma. *Cell Biol Int*. 2000;24(4):195-209.
25. Nishimoto N. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2006 May;18(3):277-81.
26. Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, Maysushima K, Murphy P, Nomiyama H, Oppenheim J, Rot A, Schall T, Tsang M, Thorpe R, Van Damme J, Wadhwa M, Yoshie O, Zlotnik A, Zoon K. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res*. 2002 Oct;22(10):1067-8.
27. Heldin CH. Structural and functional studies on platelet/derived growth factor. *EMBO J*. 1992 December; 11(12): 4251–4259.
28. Barres BA, Hart IK, Coles HSR, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*. 1992 Jul 10;70(1):31-46.
29. Adeghate E, Schattner P, Dunn E. An update on the etiology and epidemiology of diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1084:1-29.
30. Freyberger H, Bröcker M, Yakut H et al. Increased levels of platelet-derived growth factor in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2000;108(2):106-9.
31. Norris ML, Millhorn DE. Hypoxia-induced protein binding to O₂-responsive sequences on the tyrosine hydroxylase gene. *J Biol Chem*. 1995 Oct 6;270(40):23774-9.
32. Simó R, Carrasco E, García-Ramírez M, Hernández C. Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev*. 2006;2(1):71-98.

33. Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature*. 2005;438(7070): 960-6.
34. Kellar KL, Iannone MA. Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays. *Exp Hematol*. 2002;30(11):1227-37.
35. Maier R, Weger M, Haller-Schober EM et al. Multiplex bead analysis of vitreous and serum concentrations of inflammatory and proangiogenic factors in diabetic patients. *Mol Vis*. 2008;14:637-43.
36. Murugeswari P, Shukla D, Rajendran A, Kim R, Namperumalsamy P, Muthukkaruppan V. Proinflammatory cytokines and angiogenic and anti-angiogenic factors in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy and eales' disease. *Retina*. 2008;28(6):817-24.
37. Yoshimura T, Sonoda KH, Sugahara M et al. Comprehensive analysis of inflammatory immune mediators in vitreoretinal diseases. *PLoS One*. 2009;4(12):e8158.
38. Funatsu H, Yamashita H, Mimura T, Noma H, Nakamura S, Hori S. Risk evaluation of outcome of vitreous surgery based on vitreous levels of cytokines. *Eye*. 2007; 21(3): 377-82.
39. Curnow SJ, Falciani F, Durrani M et al. Multiplex bead immunoassay analysis of aqueous humor reveals distinct cytokine profiles in uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(11):4251-9.
40. Funding M, Hansen TK, Gjedsted J, Ehlers N. Simultaneous quantification of 17 immune mediators in aqueous humour from patients with corneal rejection. *Acta Ophthalmol Scand*. 2006;84(6):759-65.
41. Banerjee S, Savant V, Scott RA, Curnow SJ, Wallace GR, Murray PI. Multiplex bead analysis of vitreous humor of patients with vitreoretinal disorders. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(5):2203-7.
42. Sohn HJ, Han DH, Kim IT et al. Changes in aqueous concentrations of various cytokines after intravitreal triamcinolone versus bevacizumab for diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol*. 2011;152(4): 686-94.
43. Saint-Geniez M, Maharaj AS, Walshe TE et al. Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on müller cells and photoreceptors. *PLoS One*. 2008;3(11): 3550-4.

44. Krohne TU, Eter N, Holz FG, Meyer CH. Intraocular pharmacokinetics of bevacizumab after a single intravitreal injection in humans. *Am J Ophthalmol*. 2008;146(4):508-12.
45. Campochiaro PA, Choy DF, Do DV et al. Monitoring ocular drug therapy by analysis of aqueous samples. *Ophthalmology*. 2009;116(11):2158-64.
46. Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol*. 1998 Mar;30(3):293-8.
47. Tasman W, Magargal LE, Augsburger JJ. Effects of argon laser photocoagulation on rubeosis iridis and angle neovascularization. *Ophthalmology*. 1980 May;87(5):400-2.
48. Alho HS, Maasilta PK, Vainikka T, Salminen US. Platelet-derived growth factor, transforming growth factor-beta, and connective tissue growth factor in a porcine bronchial model of obliterative bronchiolitis. *Exp Lung Res*. 2007 Aug;33(6):303-20.
49. Wong RW, Kwan RW, Mak PH, Mak KK, Sham MH, Chan SY. Overexpression of epidermal growth factor induced hypospermatogenesis in transgenic mice. *J Biol Chem*. 2000 Jun 16;275(24):18297-301.