

Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové



Stanovení promotorů angiogeneze v nitrooční tekutině pomocí multiplexové  
imunoanalýzy

Štěpán Rusňák

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program *Oftalmologie*

Hradec Králové

2013

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Oftalmologie na Oční klinice Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: MUDr. Štěpán Rusňák, Oční klinika LF UK a FN Plzeň

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

Oponenti: prof. MUDr. Jirí Řehák, CSc., FEBO, Oční klinika LF UP a FN Olomouc

doc. MUDr. Petr Kolář, PhD, Oční klinika LF MU a FN Brno

Tato práce vznikla za podpory grantu IGA MZ 10 251-3

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

.....

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací

v doktorském studijním programu Oční lékařství.....

## OBSAH

Obsah .....	1
Souhrn .....	2
Summary .....	3
Úvod do problematiky .....	4
Cíle disertační práce .....	5
Materiál a metodika.....	6
Výsledky .....	7
Diskuse.....	11
Závěr.....	14
Použitá literatura .....	15
Přehled publikační činnosti autora.....	17
Originální článek v časopisu s IF:.....	17
Abstrakt v časopisu IF .....	17
Článek v recenzovaném časopisu: .....	17

## 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.

## 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.

## ÚVOD DO PROBLEMATIKY

Fyziologická angiogeneze je podmínkou normálního průběhu řady biologických funkcí. Patologická angiogeneze je podkladem řady onemocnění, jako je nádorové bujení, lupénka, revmatoidní artritida, v neposlední řadě se podílí na patogenezi očních onemocnění, jako jsou věkem podmíněná degenerace sítnice a proliferativní retinopatie. 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 degeneraci. 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 a po zraněních, svaly (po cvičení) a nové cévy k přemostění blokové cirkulace (tzv. kolaterální cirkulace).

Při nadprodukci se VEGF může podílet na závažných chorobách: např. nádory schopné produkovat VEGF mohou růst a vytvářet metastázy, nadprodukce VEGF vede také k vaskulárním chorobám sítnice. AntiVEGF léčiva (jako bevacizumab) mohou inhibovat VEGF a kontrolovat nebo zpomalit průběh těchto chorob.

Bylo prokázáno, že exprese VEGF je zvyšována tkáňovou hypoxií. VEGF lze stanovit kombinací imunoanalýzy a průtokové cytometrie tzv. multiplexovou analýzou v tělesných tekutinách. Multiplexová xMAP technologie umožňuje stanovení koncentrace až desítek různých analytů ve velmi malých objemech vzorků a funguje na principu kombinace sendvičové imunoanalýzy a průtokové cytometrie. Mikročástice proudí přístrojem jedna za druhou a u každé je měřena fluorescence po excitaci 2 laserovými paprsky. Jeden laser určuje barvu (tzv. spektrální kód) a zjišťuje typ analytu (tj. kvalitu), druhý laser určuje množství mapované molekuly (tedy kvantitu).

## 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.

## MATERIÁL A METODIKA

Za aseptických podmínek na operačním sále byl proveden odběr malého množství (30 – 50 mikrolitrů) nitrooční tekutiny z přední komory. Vzorky byly do hodiny zmrazeny na - 80 stupňů Celsia a při této teplotě skladovány. Následně byla provedena multiplexová imunoanalytická stanovení všech vzorků. U všech náběrů bylo provedeno stanovení EGF (Epidermal growth factor), IL-6, VEGF a dalších parametrů angiogeneze a zánětu: BDNF (Brain derived neurotrophic factor), CNTF (Ciliary neurotrophic factor), IL-8, IP-10 (Interferon inducible protein-10), MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), PDGF AA (Platelet derived growth factor AA), TGFb (Transforming growth factor beta 1).

Další markery: IL-10, fractalkine, PDGF AB/BB (Platelet derived growth factor AB/BB), IFN $\gamma$  (Interferon gamma), TNFa (Tumor necrosis factor alfa), FGF2 (Basic fibroblast growth factor), 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 (PDR) a u 51 kontrolních vzorků. Pacienti byli rozděleni do 4 skupin podle klinického nálezu.

Skupina 1 – pacienti s PDR bez nutnosti chirurgické reintervence.

Skupina 2 – pacienti s recidivujícím hemoftalmem jako méně závažnou komplikací PDR.

Skupina 3 – pacienti s neovaskulárním glaukomem refrakterním na léčbu jako závažná komplikace PDR.

Skupina 0 – pacienti kontrolní skupiny – odběr vzorku nitrooční tekutiny před operací katarakty u pacientů bez prokázané retinální patologie.



## 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.

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

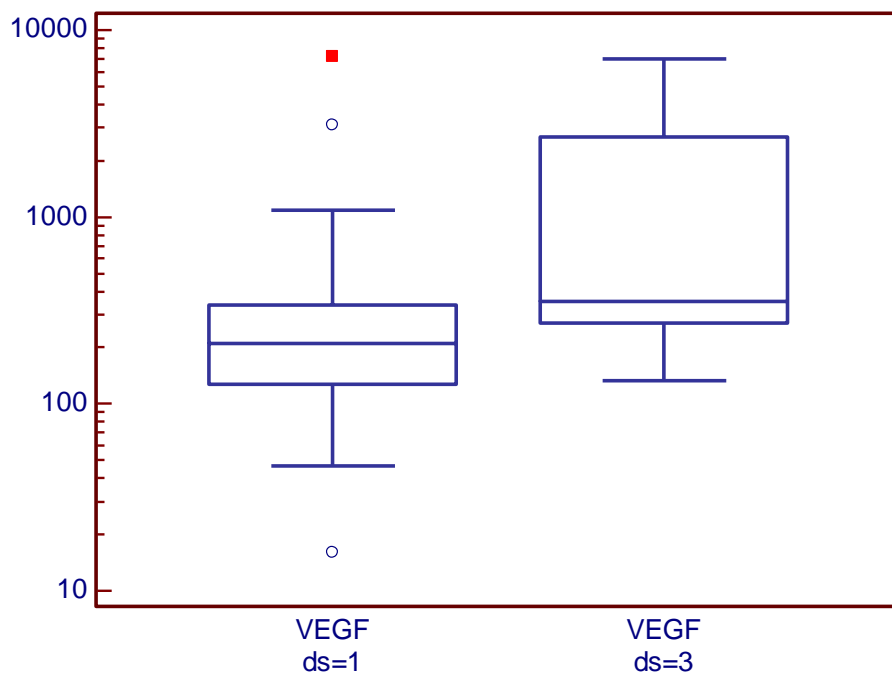
Zvýšené hodnoty VEGF byly naměřeny u pacientů ze skupiny 3 (komplikovaná PDR s neovaskulárním glaukomem refrakterním na léčbu) proti skupině 1 (nekomplikovaná PDR), proti skupině 2 (méně závažné komplikace PDR) a podle očekávání i proti kontrolní skupině.

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.

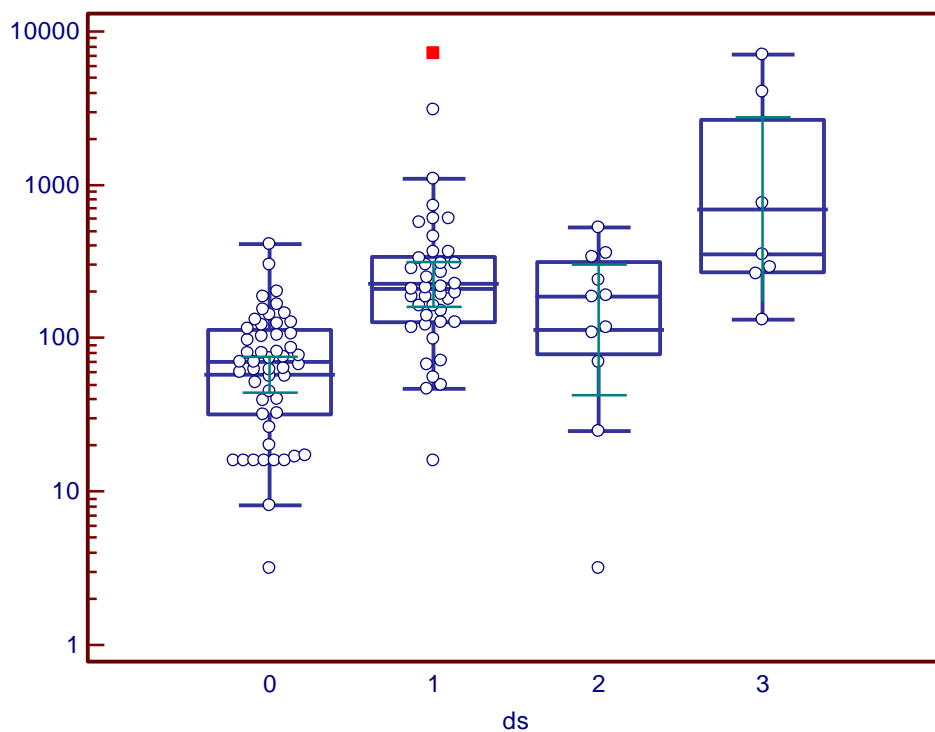
Pro hodnoty koncentrací markerů BDNF, CNTF, EGF, MCP – 1 a TGF beta nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinou pacientů s PDR a kontrolní skupinou.

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

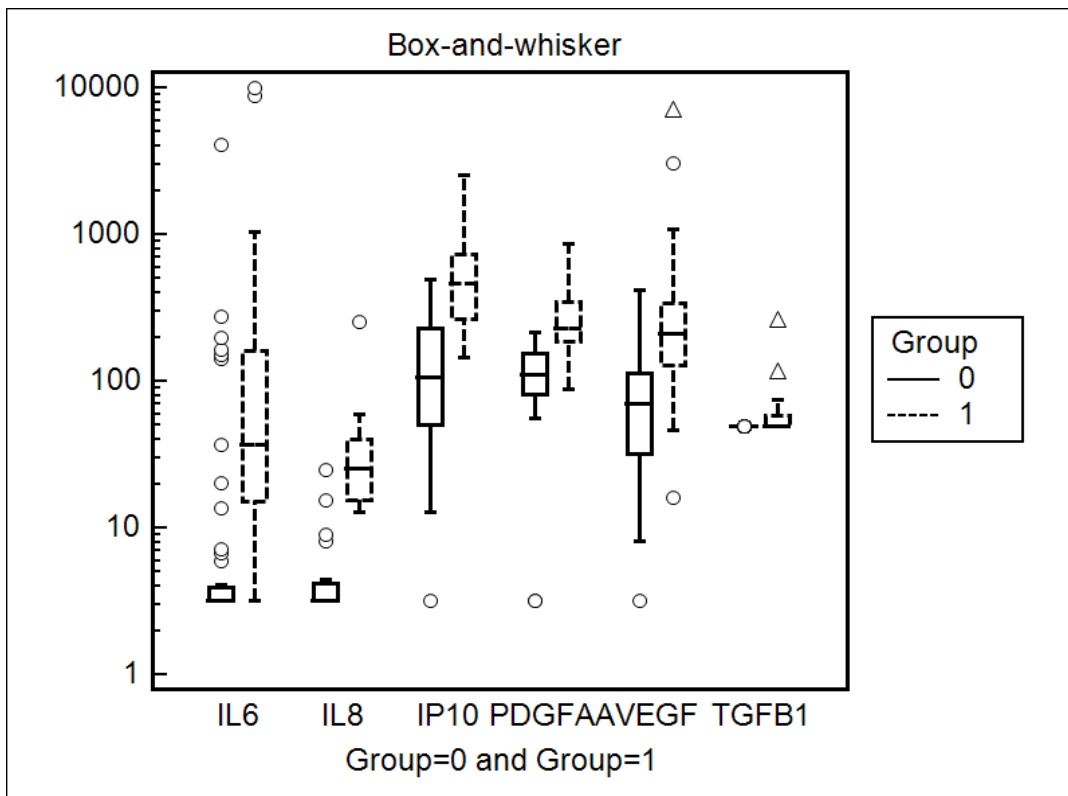
Tabulka 1.: Hodnoty medianu, 5. a 95. percentilu v pg/ml v jednotlivých skupinách u sledovaných markerů.



Koncentrace VEGF u PDR skupiny 1 (PDR s nekomplikovaným průběhem) oproti PDR skupině 3( skupina s neovaskulárním glaukomem refrakterním na léčbu).



VEGF hladiny koncentrace v pg/ml dle rozdělení do skupin 0-3 podle klinické závažnosti.



Hladiny markerů, pro které byly nalezeny signifikantní rozdíly mezi PDR (1) a kontrolní skupinou (0).

## DISKUSE

Biomarkery se v moderní medicíně staly důležitou součástí diagnostiky i terapie a jejich využití v oftalmologii by nemělo být výjimkou. Protože multiplexová analýza založená na X – map technologii umožňuje stanovení desítek analytů naráz 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. popisuje zvýšené koncentrace cytokinů IP 10, MCP 1 a VEGF ve sklivcové tekutině v porovnání s kontrolní skupinou bez PDR (8). Murugeswari a kol. 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 PEDF byla u pacientů s PDR snížena. (9). Yoshimura 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 (10). 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 Freiburger a kol. publikovali výsledky ukazující zvýšené hodnoty PDGF AB u pacientů s PDR (11).

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. 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 (12). Freiburger 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 (11). 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.

Vybrali jsme 3 práce, které demonstrují potenciál X map technologie v oftalmologii. Curnow a kol. 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 (13). Funding a kol. 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 prokázali jak komplexní imunologické interakce procesu rejekce, tak vhodnost stanovování analytů z velmi malého vzorku tekutiny (14). V podobné práci Banerjee a kol. měřili koncentrace 19 cytokinů u 58 očí během PPV pro nejruznější vitreoretinální patologie (15).

Sohn a kol. 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 (16).

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 (16). 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 opatrností (17). 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 nevasculární glaukom refrakterní na léčbu, jsou spojené se zvýšenými hodnotami určitých biomarkerů, lze tedy ospravedlnit agresivnější terapii. Tyto pacienti mohou podstoupit opakované injekce anti VEGF preparátů, kortikosteroidů, agresivnější panretinální fotokoagulaci, cyklokryo či cyklofotodestrukci na základě zvýšených koncentrací biomarkerů.

Stanovení koncentrace VEGF v nitrooční tekutině je 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 dne (19). 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 ovlivněny. V naší studii jsme několik potenciálních kandidátů prověřili. Čím více biomarkerů PDR bude k dispozici, jejich panel bude možné použít k identifikaci rizikových pacientů, k monitoraci progresu onemocnění a efektu léčby.

## 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.

Multiplexová imonoanalýza má potenciál využití v terapii diabetické retinopatie.



## POUŽITÁ LITERATURA

1. Adegate E, Schattner P, Dunn E. An update on the etiology and epidemiology of diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1084:1-29.
2. Klein R, Klein B. The Beaver Dam Eye Study, 1987- 2010. Available at <http://www.bdeyestudy.org/>. Accessed November, 2011.
3. Klein BE. Overview of epidemiologic studies of diabetic retinopathy. *Ophthalmic Epidemiol.* 2007;14(4):179-83.
4. 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.
5. Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature.* 2005;438(7070): 960-6.
6. Spaide RF. Peripheral areas of nonperfusion in treated central retinal vein occlusion as imaged by wide-field fluorescein angiography. *Retina.* 2011;31(5):829-37.
7. Kellar KL, Iannone MA. Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays. *Exp Hematol.* 2002;30(11):1227-37.
8. 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.
9. 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.
10. Yoshimura T, Sonoda KH, Sugahara M et al. Comprehensive analysis of inflammatory immune mediators in vitreoretinal diseases. *PLoS One.* 2009;4(12):e8158.
11. 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.
12. 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.

13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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): e3554.
18. Campochiaro PA, Choy DF, Do DV et al. Monitoring ocular drug therapy by analysis of aqueous samples. *Ophthalmology.* 2009;116(11):2158-64.
19. 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.

# PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA

## originální článek v časopisu s IF:

**Rusnak S**, Vrzalova J, Hecová L, Kozova M, Topolčan O, Ricarova R. Defining the seriousness of proliferative vitreoretinopathy by aspiration of cytokines from the anterior chamber. *Biomark Med.* 2013 Oct;7(5):759-67 **IF 3,217**

## abstrakt v časopisu IF

**Assessment of Angiogenesis Promotors and Cytokines in Intraocular Fluid of Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy**

**Rusnak S.**, Kozova M., Vrzalova J., Holubec L., Ricarova R.

*Current Medicinal Chemistry* , Special Issue Abstracts,2011;2:201, ISSN: 0929-8673, **IF 4.708**

## článek v recenzovaném časopisu:

**Resorpce diabetického cystoidního makulárního edému po intravitreální aplikaci triamcinolon acetonidu v závislosti na kompenzaci základního onemocnění**

**Rusňák Š.**, Fidranská H., Belfínová Š., Frdlíková D., Kozlerová Š.

*Čes. a slov. Oftal.*, 64, 2008, No. 1, p. 26-29

**Stanovení koncentrace biomarkerů v nitrooční tekutině v různých stádiích proliferativní diabetické retinopatie pomocí multiplexové xMAP analýzy**

**Š. Rusňák**, J. Vrzalová, M. Kozová, R. Říčařová, O. Topolčan

*Plzeň. lék. Sborn.* 78,2012, 51-58

### **Penetrující poranění cizím nitroočním tělískem organického původu**

Doležalová J., Rusňák Š., Říčařová R.

Čes. a slov. Oftal., , 2001, No. 6, p. 381-386

### **Lze úspěšně léčit těžké perforující poranění?**

Doležalová J., Rusňák Š., Říčařová R., Karel I.

Čes. a slov. Oftal., , 2004, No. 2, p. 118-123

### **Makulární translokace – první zkušenosti**

Doležalová J., Rusňák Š.

Čes. a slov. Oftal., , 2004, No. 4, p. 239-247