

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**Výzkum sklivce a vitreoretinálního rozhraní u mikrovaskulárních chorob sítnice se  
zaměřením na oční komplikace diabetes mellitus**

**MUDr. Libuše Křížová**

Praha, 2015

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

**Univerzita Karlova v Praze  
a Akademie věd České republiky**

Obor: Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy

Autor: MUDr. Libuše Křížová

Školitel: Prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA

Konzultantka: Prof. MUDr. Marta Kalousová, PhD

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. Lékařské fakulty.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	HYPOTÉZA, CÍLE PRÁCE .....	10
2.1	<i>HYPOTÉZA</i> .....	10
2.2	<i>CÍLE PRÁCE</i> .....	11
3	METODIKA.....	12
3.1	<i>CHARAKTERISTIKA SOUBORU PACIENTŮ</i> .....	12
3.2	<i>OPTICKÁ KOHERENČNÍ TOMOGRAFIE</i> .....	12
3.3	<i>ODBĚR BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU</i> .....	13
3.4	<i>LABORATORNÍ STANOVENÍ</i> .....	13
3.5	<i>STATISTICKÁ ANALÝZA</i> .....	14
4	VÝSLEDKY .....	15
4.1	<i>STUDIE STANOVENÍ KYSELINY MOČOVÉ A GLUKÓZY</i> .....	15
4.2	<i>VZTAH KYSELINY MOČOVÉ A VEGF</i> .....	20
4.3	<i>OCT PARAMETRY</i> .....	24
5	DISKUSE.....	26
6	ZÁVĚR.....	31
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	33
8	SEZNAM PUBLIKACÍ.....	38

## ABSTRAKT

V disertační práci jsou předloženy výsledky klinicko-laboratorního výzkumu zaměřeného na pacienty s diabetickým makulárním edémem (DME). Provedli jsme biochemické a imunochemické analýzy vzorků sklivce odebraného v průběhu pars plana vitrektomie. Dále jsme u pacientů s neproliferativní diabetickou retinopatií (NPDR) sledovali morfologické charakteristiky DME pomocí optické koherenční tomografie (OCT).

Dle našich závěrů byly sérové i sklivcové hladiny kyseliny močové a glukózy signifikantně vyšší u pacientů s diabetickou retinopatií a DME oproti kontrolní skupině. Také absolutní poměr (sérová/ sklivcová koncentrace) kyseliny močové a glukózy u diabetiků byl statisticky významně vyšší než u kontrol. Nejdůležitější determinantou zvyšující se koncentrace kyseliny močové a glukózy ve sklivci byl stupeň diabetické retinopatie. Dále jsme popsali, signifikantní korelaci sklivcové koncentrace kyseliny močové s koncentrací vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) u pacientů s DME a NPDR. Zjistili jsme také, že objem makulární oblasti sítnice – CV vypočítaný softwarem Cirrus HD-OCT signifikantně koreluje s koncentrací VEGF ve sklivci diabetiků, ale ne s kyselinou močovou. Tento parametr by mohl být v praxi použit k hodnocení efektivity terapie anti-VEGF preparáty.

Závěry nasvědčují tomu, že kyselina močová by mohla být jedním ze spolupůsobících kauzálních faktorů v patogenezi a progresi diabetické retinopatie.

**Klíčová slova:** diabetická retinopatie, diabetický makulární edém, sklivec, kyselina močová, optická koherenční tomografie, vaskulární endoteliální růstový faktor

## **ABSTRACT**

In this work I present conclusions of clinical-laboratory research focused on the patients with diabetic macular edema (DME). We performed biochemical and immunochemical analyses of vitreous samples that were collected during the pars plana vitrectomy. Moreover, at patients with non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR) we assessed morphological characteristics of DME using optical coherence tomography (OCT).

According to our findings, the vitreous and serum concentrations of uric acid and glucose were significantly higher in patients with diabetic retinopathy and DME compared to controls. Also total ratio (serum/ vitreous concentration) of uric acid and glucose was in diabetics significantly higher than in controls. The most important determinant of increasing concentration of both uric acid and glucose in the vitreous was the grade of diabetic retinopathy. Moreover, we demonstrated significant correlation between vitreous concentration of uric acid and concentration of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with DME and NPDR. We found further, that the volume of the macula (cube volume – CV) computed with the software of Cirrus HD-OCT correlates in diabetics significantly with the vitreous VEGF concentration, but not with uric acid. This OCT parameter could be used to assess the efficacy of anti-VEGF therapy in the clinical practice.

Our results suggest that uric acid should be considered as one of the causal factors in the pathogenesis and progression of diabetic retinopathy.

**Key words:** diabetic retinopathy, diabetic macular edema, vitreous, uric acid, optical coherence tomography, vascular endothelial growth factor

## SEZNAM ZKRATEK

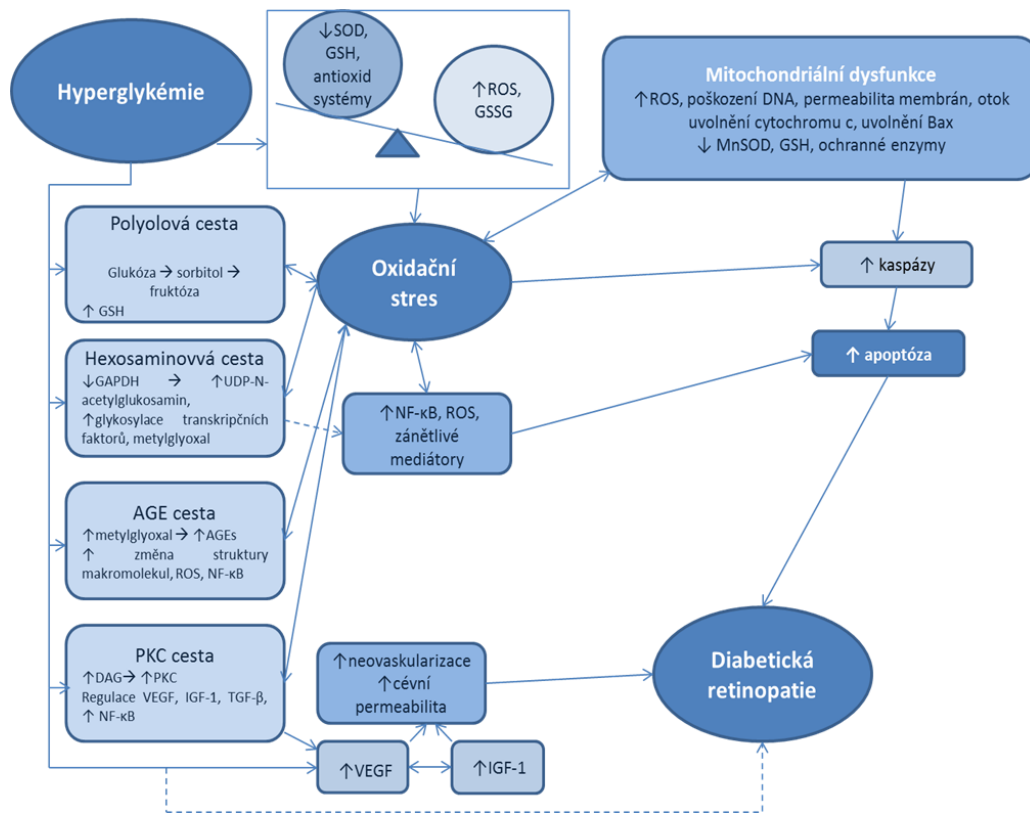
AGE	advanced glycation endproducts (konečné produkty pokročilé glykace)
CAT	cube average thickness (průměrná tloušťka sítnice v makule)
CRT	central retinal thickness (centrální tloušťka sítnice)
CV	cube volume (objem makulární oblasti)
DM	diabetes mellitus
DME	diabetický makulární edém
DR	diabetická retinopatie
GLUT	membránový transportér glukózy
HbA <sub>1c</sub>	glykovaný hemoglobin
HDL	high density lipoprotein (vysokodenzní lipoprotein)
HRB	hemoretinální bariéra
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry (mezinárodní federace klinické chemie)
IQR	interquartil range (mezikvartilové rozmezí)
LDL	low density lipoprotein (nízkodenzní lipoprotein)
NF-κB	nukleární faktor kappaB
NPDR	neproliferativní diabetická retinopatie
OCT	optická koherenční tomografie
PDR	proliferativní diabetická retinopatie
PKC	proteinkinasa C
RAGE	receptor pro konečné produkty pokročilé glykace
SRD	serous retinal detachment (sérozní odchlípení sítnice)
VEGF	vascular endothelial growth factor (cévní endoteliální růstový faktor)

# 1 ÚVOD

Diabetická retinopatie (DR) je mikrovaskulární komplikace diabetu postihující sítnici oka. DR vzniká v důsledku složitého komplexu mechanismů vedoucích k poškození sítnicových kapilár a následných specifických morfologických změn na sítnici (Kalvodová B. et al., 2012). Tyto změny vedou k alteraci permeability a proliferace endotelu, vzniku edému sítnice, abnormální vaskularizaci a v důsledku ke snížení zrakové ostrosti až ztrátě zraku. Podle klinického stádia se diabetická retinopatie dělí na neproliferativní (NPDR) a proliferativní (PDR), a to v závislosti na přítomnosti intraretinálních mikrovaskulárních změn či neovaskularizací. V jakékoli fázi diabetické retinopatie se navíc může vyvinout tzv. diabetický makulární edém (DME), který postihuje centrální oblast sítnice a spolu s PDR je nejčastějším důvodem zhoršení zrakové ostrosti.

Patofyziologie diabetické retinopatie a diabetického makulárního edému je studována mnoho desítek let, přesto zůstává přesný biochemický a molekulární mechanismus jejich vzniku stále ne zcela objasněný. V případě nadbytku glukózy intracelulárně, k němuž dochází při hyperglykémii zejména v non-inzulin-dependentních tkáních, jsou patologicky zvýšené náhradní metabolické cesty, které se za fyziologických podmínek uplatňují pouze minimálně. Jde o: a) akcentaci polyolové cesty, b) neenzymatickou glykaci proteinů, c) aktivaci proteinkinasy C a d) indukci oxidačního stresu. Metabolické souvislosti hyperglykemie a oxidačního stresu při rozvoji DR jsou schématicky znázorněny na obrázku 1. V současné době je oxidační stres považován za klíčovou příčinu rozvoje pozdních komplikací diabetes mellitus (DM) (Škrha J., 2010). Vysoké koncentrace ROS v sítnici diabetiků byly popsány v souvislosti se ztrátou pericytů, vznikem acelulárních sítnicových kapilár, zvýšenou cévní permeabilitou a ztluštěním bazálních membrán (Shin ES. et al., 2014).

**Obrázek 1:** Cesty, které vedou, vlivem oxidačního stresu, v sítnici diabetiků k rozvoji DR (zdroj: Kowluru RA., Chan PS., 2007)



Jak vyplývá z obrázku 1, oxidační stres má úzkou spojitost nejenom s metabolickou dysfunkcí zapříčiněnou hyperglykemií, ale také se zánětlivou reakcí a aktivací nukleárního faktoru kappaB (NF-κB). NF-κB spouští expresi pro-apoptotických proteinů v pericytech a buňkách retinálního endotelu (Shin ES. et al., 2014).

Kyselina močová je u člověka konečným produktem odbourávání purinů; není však pouhou odpadní látkou, neboť má také antioxidační vlastnosti (Murray RK. et al., 2013). Kyselina močová představuje 35 - 65 % celkové antioxidační kapacity krevní plazmy a je tedy jejím nejhojnějším antioxidantem (Kvasnicová V., 2014). Jako nejdůležitější antioxidační působení kyseliny močové se uvádí inhibice tvorby hydroxylového radikálu. Po reakci s hydroxylovým radikálem a s perferyllovými radikály (komplexy železa s aktivním kyslíkem) se urát mění na radikál (urátový anionradikál, jehož nespárovaný elektron je lokalizován na pětičlenném kruhu), který může biologicky škodit (Kvasnicová V., 2014). Tento urátový radikál může být účinně vychytán kyselinou askorbovou, jejíž redukční potenciál je nižší (Murray RK et al., 2013).



Bylo prokázáno, že pacienti s DM mají vyšší plazmatickou koncentraci kyseliny močové a že hyperurikémie a hyperinsulinémie spolu souvisejí, nicméně podstata této skutečnosti dosud objasněna nebyla (Chaudhary K. et al, 2013). Metaanalýza jedenácti kohortových studií s 42,834 pacienty potvrdila, že sérová hladina kyseliny močové pozitivně koreluje se vznikem DM 2. typu (Kodama S. et al, 2009). Zvýšená hladina kyseliny močové se také jeví jako jedna z příčin zvýšené produkce oxidu dusnatého, nadměrného oxidačního stresu a neadekvátní imunitní a zánětlivé odpovědi (Aroor AR. et al., 2013).

Na vzniku a progresi DR se podílí také vaskulární endoteliální růstového faktoru (VEGF); jeho isoforma 165 je zodpovědná mimo jiné za patologickou neovaskularizaci (Simó R., Hernández C., 2008). VEGF je za fyziologických okolností v oku nezbytný pro trofiku choriokapilaris a má neuroprotektivní vliv na sítnici při retinální ischemii (Agarwal P. et al., 2014). Sklivcové i sérové hladiny VEGF jsou zvýšené již v časných fázích diabetické retinopatie a je popsáno, že jeho koncentrace přímo koreluje se závažností očního postižení (Caldwell RB. et al., 2003). Hlavním stimulem pro zvýšenou tvorbu a aktivitu VEGF je především hypoxie (Abcouwer SF., 2013).

## **2 HYPOTÉZA, CÍLE PRÁCE**

### **2.1 HYPOTÉZA**

Vliv kyseliny močové na rozvoj diabetických komplikací dokazují především studie z nefrologie a kardiologie. Podle závěrů epidemiologických studií se zvýšená koncentrace kyseliny močové v séru podílí na patofyziologickém mechanismu metabolického syndromu a na rozvoji sekundárních komplikací diabetu. Vysoká koncentrace kyseliny močové souvisí s endotelovou dysfunkcí a sníženou elasticitou cévních stěn. Je jednou z příčin nadměrného oxidačního stresu a neadekvátní imunitní a zánětlivé odpovědi ve tkáních. V literatuře je publikována pouze jedna práce, která sledovala vztah kyseliny močové a DR. Podle té je možné, že kyselina močová se podílí na snížení totální antioxidační kapacity sklivce u DM, což přispívá k porušení hemoretinální bariéry a progresi PDR cestou indukce VEGF (Yokoi M. et al., 2005).

U DR je sklivcová koncentrace VEGF vysoká a přímo koreluje se stupněm diabetického poškození sítnice. Vztahu sklivcové koncentrace VEGF k morfologickým charakteristikám diabetického makulárního edému (vyšetřených optickou koherenční tomografií - OCT) se před zavedením anti-VEGF terapie odborná veřejnost prakticky nevěnovala. Až intervenčními studiemi bylo prokázáno, že anti-VEGF terapie vede u DME k redukci tloušťky sítnice. Vyšetření pomocí OCT následně začalo být považováno za možnou cestu, jak neinvazivně ve standardních klinických podmínkách posuzovat efektivitu léčby a přeneseně i „monitorovat hladiny VEGF“. V literatuře se přitom vyskytují pouze ojedinělé práce, které skutečně měří tloušťku sítnice pomocí OCT a zároveň invazivně in vivo monitorují koncentraci VEGF ve sklivci diabetiků.

## 2.2 CÍLE PRÁCE

Na základě hypotézy byly stanoveny čtyři dílčí cíle:

1. V rámci prospektivní studie stanovit sérové a sklivcové hladiny glukózy a kyseliny močové u pacientů s různým stupněm diabetické retinopatie a u nediabetických kontrol.
2. Definovat případnou závislost koncentrací glukózy a kyseliny močové ve sklivci a séru na míře poškození sítnice a popsat dosud neprozkoumaný vztah kyseliny močové k diabetické retinopatii.
3. Určit vzájemný vztah koncentrací kyseliny močové a VEGF ve sklivci a séru u diabetického makulárního edému a u nediabetických kontrol.
4. Hodnotit morfologické změny sítnice pacientů s makulárním edémem a pokročilou neproliferativní diabetickou retinopatií pomocí OCT a určit jejich závislost na sérových a sklivcových hladinách kyseliny močové a VEGF.

## **3 METODIKA**

### **3.1 CHARAKTERISTIKA SOUBORU PACIENTŮ**

Nábor pacientů do studie probíhal v den příjmu pacienta k plánované sítnicové operaci (vitrektomii) pro patologii zadního očního segmentu. Diabetická retinopatie byla hodnocena podle Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group.

Obě části studie byly schváleny etickou komisí VFN a 1.LFUK v Praze, respektive Etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Palackého. V obou případech byly vzorky biochemicky zpracovány v laboratořích Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. Lékařské fakulty University Karlovy. Všichni pacienti byli ve stabilním klinickém stavu bez klinických a laboratorních známek akutního zánětu a podepsali informovaný souhlas.

Do první studie bylo zahrnuto 81 pacientů s DME s průměrnou dobou trvání diabetes mellitus  $15,6 \pm 9,0$  let. Sledovaný soubor pacientů byl rozdělen podle stupně diabetické retinopatie (DR) na: 24 pacientů s proliferativní DR (PDR) a 57 s neproliferativní DR (NPDR). Kontrolní skupinu tvořili pacienti bez diabetes mellitus s jinou sítnicovou patologií - idiopatickou makulární dírou ( $n = 40$ ) nebo epiretinální membránou ( $n = 8$ ).

Do druhé studie jsme zařadili celkem 29 pacientů. Šestnáct pacientů v tomto souboru mělo DM 2. typu a NPDR s DME; průměrná doba trvání diabetu u nich byla  $18,0 \pm 8,3$  let. Do kontrolní skupiny bylo zařazeno 13 pacientů bez DM, kteří podstoupili plánovanou vitrektomii pro epiretinální membránu.

### **3.2 OPTICKÁ KOHERENČNÍ TOMOGRAFIE**

Pacienti z druhé studie byli den před operací vyšetřeni OCT spectral-domain přístrojem (CIRRUS HD-OCT, Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Německo) jako tzv. „macular cube acquisition“ podle doporučení výrobce. Data získaná v režimu „macular cube 512 x 128 scan“ sestávají ze 128 rastrových skenů s 512 A-skeny a snímají centrální oblast makuly o ploše 6 x 6 mm. U každého pacienta jsme sledovali následující tři parametry vypočtené pomocí Cirrus HD-OCT softwaru: 1. centrální tloušťka sítnice (central retinal thickness - CRT), 2. objem makulární oblasti (cube volume - CV) a 3. průměrná tloušťka sítnice v makule (cube average thickness - CAT) a kontrolovali jsme přesnost měření. Centrální řez procházející foveou byl ještě dále hodnocen nezávislým vyšetřujícím podle přítomnosti/absence serózního odchlípení sítnice (SRD).

### **3.3 ODBĚR BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU**

V rámci studie byla odebrána pacientovi v den sítnicové operace na lačno žilní krev z kubitální žíly. Krevní vzorky ve zkumavce bez antikoagulantu byly ihned po odběru centrifugovány 10 minut při 1450 g a získané sérum následně rozpipetováno do sterilních zkumavek. Krátce po odběru krve provedl vitreoretinální chirurg odběr vzorku neředěného sklivce (cca 0,3ml). Sklivec se získával pomocí vitrektomu v úvodu standardní terapeutické pars plana vitrektomie před otevřením infuzního portu. Po odběru byly vzorky krve a sklivce uchovány nejdříve v odběrovém centru Oční kliniky, poté v Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LFUK a VFN v Praze při -80°C po dobu potřebnou k biochemickému zpracování materiálu.

### **3.4 LABORATORNÍ STANOVENÍ**

Rutinní laboratorní analýza sklivce a séra byla provedena podle standardních biochemických metod doporučených IFCC.

Koncentrace kyseliny močové byla určena enzymaticky (urikázoperoxidázou) s fotometrickou detekcí. Dolní limit kvantifikace této metody byl 30  $\mu\text{mol/l}$ .

Sklivcové a sérové hladiny VEGF byly stanoveny imunochemicky pomocí metody ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Pro naši studii byl použit standardní kit pro lidský VEGF o 80 jamkách potažených monoklonální protilátkou (R and D Systems, Minneapolis, MN, USA) a byl dodržen doporučený postup výrobce. Výsledky jsou vyjádřeny v jednotkách pg/ml; limity kvantifikace byly min = 31,2 pg/ml a max = 1000 pg/ml.

Glykovaný hemoglobin HbA<sub>1c</sub> byl stanoven vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, přičemž kalibrace byla nastavena dle referenční metody IFCC. Koncentrace glukózy byla stanovena enzymaticky (glukózaoxidáza) s fotometrickou detekcí. Enzymatickou metodou s fotometrií byl stanoven také celkový cholesterol (cholesteroidáza) a triglyceroly (glycerol-3-fosfát oxidáza). HDL cholesterol byl stanoven homogenní enzymatickou kolorimetrickou reakcí a LDL výpočtem z hodnot celkového a HDL cholesterolu a triglycerolů dle Friedwalda.

Kreatinin byl stanoven pomocí Jaffé metody, C-reaktivní protein pomocí turbidimetrie. Albumin byl stanoven fotometricky pomocí bromkrezolové zeleně a urea UV metodou s ureázou.

### 3.5 *STATISTICKÁ ANALÝZA*

Pro statistickou analýzu získaných dat byly u obou souborů použity aktuální verze SPSS (verze 16 v první části a verze 18 v druhé části, IBM SPSS inc., Chicago, IL, USA).

V první části dizertační práce jsme porovnávali oba typy biologického materiálu (sérum a sklivce) u diabetiků a kontrolní skupiny pacientů. Statistická analýza byla provedena v závislosti na charakteru rozložení dat pomocí zobecněného lineárního modelu či Kruskal-Wallis a Mann-Whitney U-testu pro neparametrické testování. Výsledná data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  standardní odchylka (SD), jako signifikantní jsou označeny hodnoty významnosti  $p < 0.05$ , dále byl vypočítán 95% interval spolehlivosti (CI).

Data pro glukózu nebyla rozložena podle Gaussova normálního rozdělení (testováno Levene testem), ale asymetricky. Tato data byla pro další analýzy transformována do logaritmického měřítka a byl vypočítán geometrický průměr  $\pm$  SD.

K posouzení stupně prosakování glukózy a kyseliny močové z krve do sklivce jsme vypočítali absolutní poměr dané látky (koncentrace ve sklivci/ koncentrace v séru) a porovnali poměry mezi skupinami.

Druhá část: U 16 sklivcových vzorků ležela koncentrace VEGF a u 3 sklivcových vzorků koncentrace kyseliny močové pod limitem kvantifikace. Vzhledem k tomu, že rozsah souboru byl malý, nešlo s jistotou posoudit, zda jsou veličiny rozděleny podle Gaussova normálního rozložení. Vyřazení zmíněných pozorování pod limitem kvantifikace by způsobilo bias odhadu, proto jsme jako alternativu zvolili statistické zpracování neparametrickými testy, které vyhodnocují pouze na základě vzájemných srovnání hodnot. Jako ukazatele polohy a variability skupiny jsme zvolili míry ordinální, konkrétně medián a dolní/horní kvartil. Údaje pod dolním limitem detekce jsme započítali jako "menší než všechny ostatní"; údaje v intervalu detekce jsme srovnali podle skutečně naměřené hodnoty.

Mann-Whitney U test a Fisherův test jsme použili k porovnání dat DME supiny s kontrolní skupinou. Pro vyhodnocení statistické závislosti mezi laboratorními parametry navzájem a OCT hodnotami jsme použili lineární regresní analýzu se Spearmanovými korelačními koeficienty. Výsledná data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SD, nebo medián společně s 1. a 3. kvantilem (mezikvartilovým intervalem - IQR), jako signifikantní jsou označeny hodnoty významnosti  $p < 0.05$ .

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 STUDIE STANOVENÍ KYSELINY MOČOVÉ A GLUKÓZY

Koncentrace kyseliny močové ve sklivci byla u diabetiků signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny pacientů. Také sérová hladina kyseliny močové v séru diabetiků byla vyšší než u nediabetiků, jak je znázorněno v tabulce 1.

**Tabulka 1:** Koncentrace glukózy a kyseliny močové u diabetiků a nediabetických kontrol

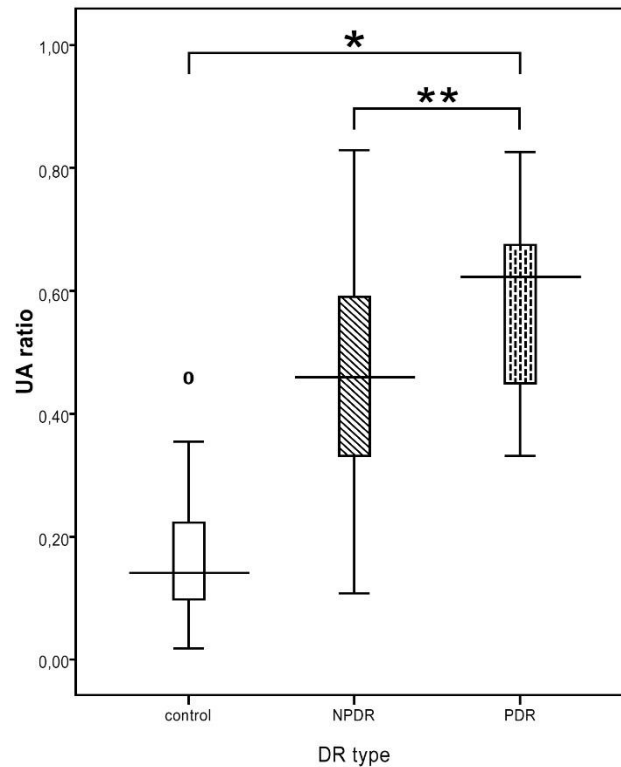
Parametr		DM (n=81)	kontroly (n=48)	p
kyselina močová	sklivec ( $\mu\text{mol/l}$ )	169,6 $\pm$ 70,6	52,0 $\pm$ 35,9	***
	sérum ( $\mu\text{mol/l}$ )	344,6 $\pm$ 72,8	314,5 $\pm$ 88,1	*
	absolutní poměr	0,494 $\pm$ 0,18	0,163 $\pm$ 0,10	***
glukóza na lačno	sklivec (mmol/l)	5,6 $\pm$ 2,7	1,2 $\pm$ 0,8	***
	sérum (mmol/l)	8,9 $\pm$ 3,6	5,0 $\pm$ 0,8	***
	absolutní poměr	0,646 $\pm$ 0,24	0,240 $\pm$ 0,15	***

Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  standardní odchylka, absolutní poměr (koncentrace ve sklivci/ koncentrace v séru).

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  DM versus kontrolní skupina

Průměr absolutního poměru kyseliny močové mezi sklivcem a sérem u diabetiků se signifikantně lišil od kontrol (tabulka 1). Kromě toho, korelovala sklivcová hladina kyseliny močové signifikantně ( $p=0,022$ ) s typem diabetické retinopatie; kyselina močová byla vyšší u PDR ( $194 \pm 56 \mu\text{mol/l}$ ) ve srovnání s NPDR ( $159 \pm 74 \mu\text{mol/l}$ ). Také průměrný absolutní poměr kyseliny močové byl u PDR vyšší než u NPDR ( $p=0,006$ ), jak je znázorněno na obrázku 2.

**Obrázek 2:** Průměrný absolutní poměr kyseliny močové u kontrol, NPDR a PDR

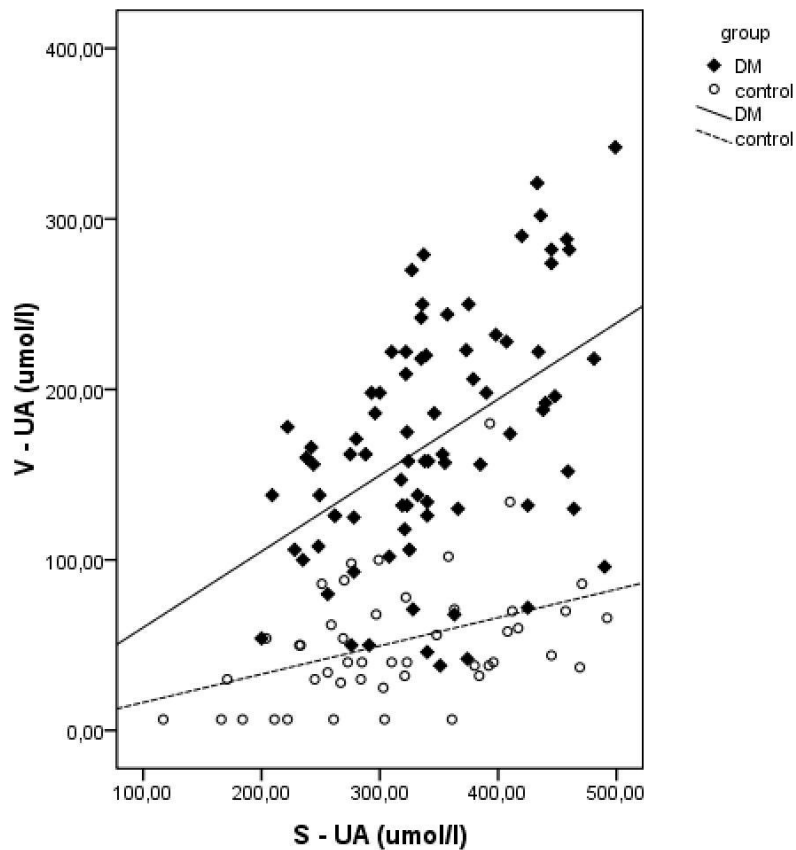


Zkratky: UA ratio – poměr sklivcové a sérové koncentrace kyseliny močové, \* $p < 0.01$  kontroly versus diabetici, \*\* $p < 0.001$  PDR versus NPDR pacienti

Obrázek 3 ukazuje, že stejné zvýšení koncentrace kyseliny močové v séru vede k většímu nárůstu její intravitreální koncentrace u diabetických pacientů (0,281 krát; CI = (0,039; 0,522)) než u kontrol (0,166 krát; CI = (-0,011; 0,343));  $p = 0,023$ .



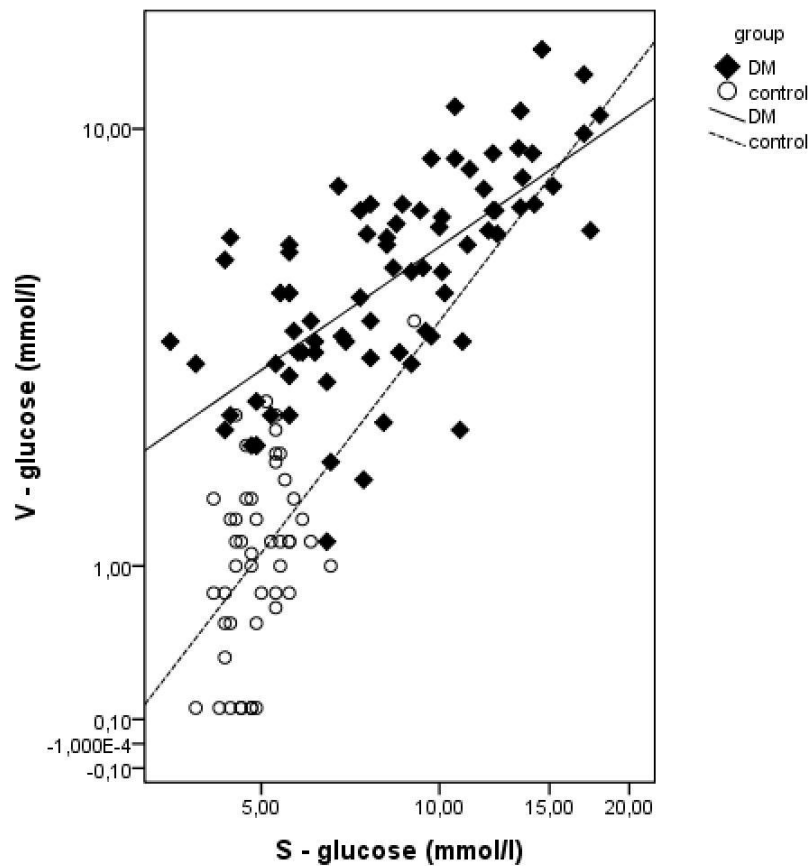
**Obrázek 3:** Závislost sklivcové a sérové koncentrace kyseliny močové u kontrol versus u diabetiků



Zkratky: V-UA – koncentrace kyseliny močové ve sklivci, S-UA – koncentrace kyseliny močové v séru

Data pro glukózu měla asymetrické rozložení, a proto byla převedena do logaritmické stupnice. Koncentrace glukózy ve sklivci byly signifikantně vyšší u diabetických pacientů ve srovnání s kontrolní skupinou pacientů. Také byl nalezen signifikantní rozdíl v lačné glykemii mezi oběma skupinami, jak shrnuje tabulka 1. a obrázek 4.

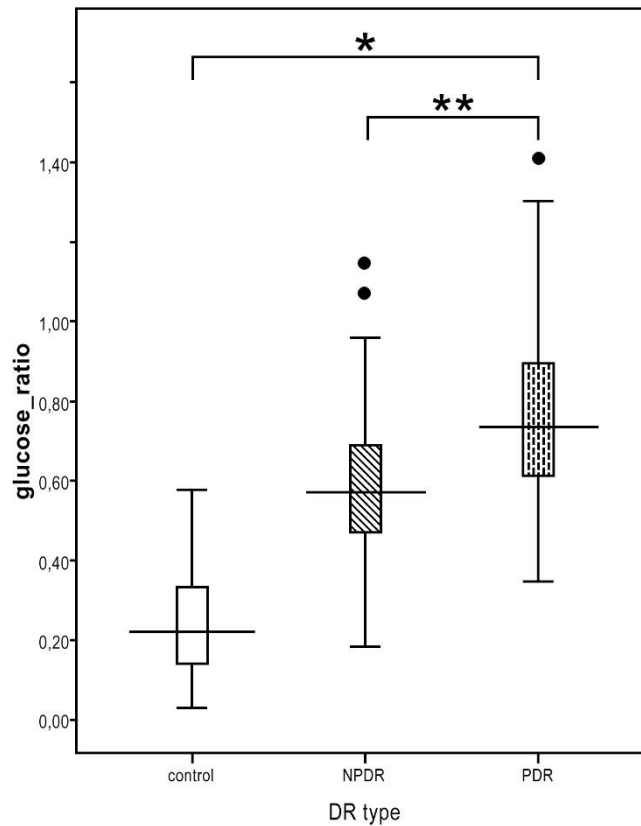
**Obrázek 4:** Vztah sklivcové a sérové koncentrace glukózy u pacientů s diabetem a u kontrol



*Zkratky: V-glucose – koncentrace glukózy ve sklivci, S-glucose – koncentrace glukózy v séru*

Jak bylo uvedeno, průměrný absolutní poměr glukózy u diabetiků byl signifikantně vyšší než u nediabetických kontrol (tabulka 1, obrázek 3). Pacienti s PDR ( $6,3 \pm 2,9$  mmol/l) měli vyšší průměrnou hladinu glukózy ve sklivci než pacienti s NPDR ( $5,3 \pm 2,5$  mmol/l), ale tento rozdíl nebyl statisticky signifikantní ( $p = 0,233$ ). Nicméně průměrný absolutní poměr glukózy u PDR byl signifikantně vyšší než u NPDR a u kontrol (obrázek 5).

**Obrázek 5:** Průměrný absolutní poměr glukózy u kontrol, NPDR a PDR



Zkratky: *glucose ratio* – poměr sklivcové a sérové koncentrace glukózy, \* $p < 0.01$  kontroly versus diabetici, \*\* $p < 0.001$  PDR versus NPDR pacienti

Intraokulární hladiny kyseliny močové a glukózy u DM 1. typu se signifikantně nelišily od DM 2. typu (kyselina močová  $p = 0,457$ ; glukóza  $p = 0,530$ ). Ve skupině diabetiků jsme nepozorovali signifikantní korelaci mezi intravitreální koncentrací kyseliny močové, respektive glukózy s dobou trvání diabetu (kyselina močová  $p = 0,879$ ; glukóza  $p = 0,540$ ) nebo s terapií diabetu insulinem (kyselina močová  $p = 0,284$ ; glukóza  $p = 0,672$ ). Intravitreální koncentrace kyseliny močové a glukózy u diabetiků a u kontrol nekorelovaly ani s přidruženou hyperlipidémií ani s arteriální hypertenzí.

Hodnoty HbA<sub>1c</sub> byly stanoveny pouze v krvi diabetiků, proto jsme také jenom u této skupiny hodnotili korelaci glykovaného hemoglobinu s biochemickými změnami sklivce. Průměrná hladina HbA<sub>1c</sub> u NPDR byla  $6,7 \pm 1,8\%$ , což bylo méně (hraniční signifikance  $p = 0,05$ ) ve srovnání s PDR ( $7,5 \pm 1,5\%$ ). Nicméně, nebyla dokázána

statisticky signifikantní korelace HbA<sub>1c</sub> s intravitreálními koncentracemi kyseliny močové a glukózy.

V této výzkumné části jsme ukázali, že intravitreální hladiny kyseliny močové a glukózy jsou signifikantně vyšší u pacientů s DM než u kontrolní skupiny. Dále jsme zjistili, že nejdůležitější determinantou zvyšující se koncentrace kyseliny močové a glukózy ve sklivci je stupeň diabetické retinopatie. Absolutní poměr obou molekul byl signifikantně vyšší u PDR ve srovnání s NPDR (příloha 1: Křížová L. et al., 2011).

#### 4.2 VZTAH KYSELINY MOČOVÉ A VEGF

##### *Biochemická analýza séra a sklivce*

Prokázali jsme, že biochemické složení sklivce diabetiků se statisticky signifikantně liší od kontrolní skupiny. Ze stanovovaných biochemických parametrů byla koncentrace VEGF, kyseliny močové a celkové bílkoviny ve sklivci diabetiků signifikantně vyšší než u kontrol, jak je znázorněno v tabulce 2 a obrázcích 6 - 8. Také sklivcová koncentrace albuminu byla u diabetiků rovněž vyšší, ale rozdíl mezi skupinami však nebyl signifikantní. Ve všech nediabetických kontrolních vzorcích sklivce byla koncentrace VEGF pod detekčním limitem 31.2 pg/ml.

**Tabulka 2:** *Laboratorní analýza sklivce u DME a nediabetických kontrol*

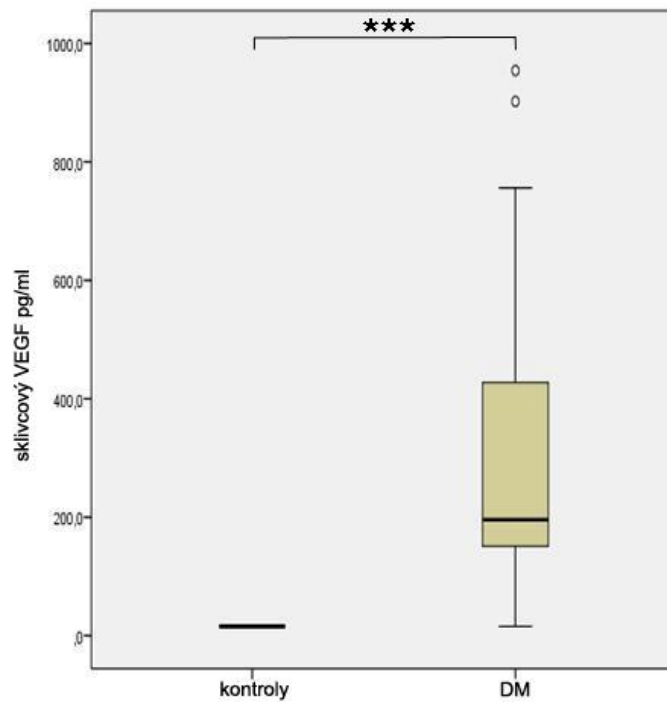
<b>Parametr</b>	<b>DME (n=16)</b>	<b>kontroly (n=13)</b>	<b>p</b>
<b>VEGF (pg/ml)</b>	192.7 (140.9 – 523.5)	< LOD	***
<b>kys. močová (μmol/l)</b>	156.0 (86.0 – 209.0)	70.0 (48.5 – 138.0)	*
<b>albumin (mg/l)</b>	1050 (618 – 1780)	550 (295 – 1495)	ns
<b>celková bílkovina (g/l)</b>	6.3 (4.9 – 9.1)	3.6 (3.1 – 4.2)	***

*Data jsou uvedena jako medián a mezikvartilový interval IQR*

*\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 DME versus kontrolní pacienti*

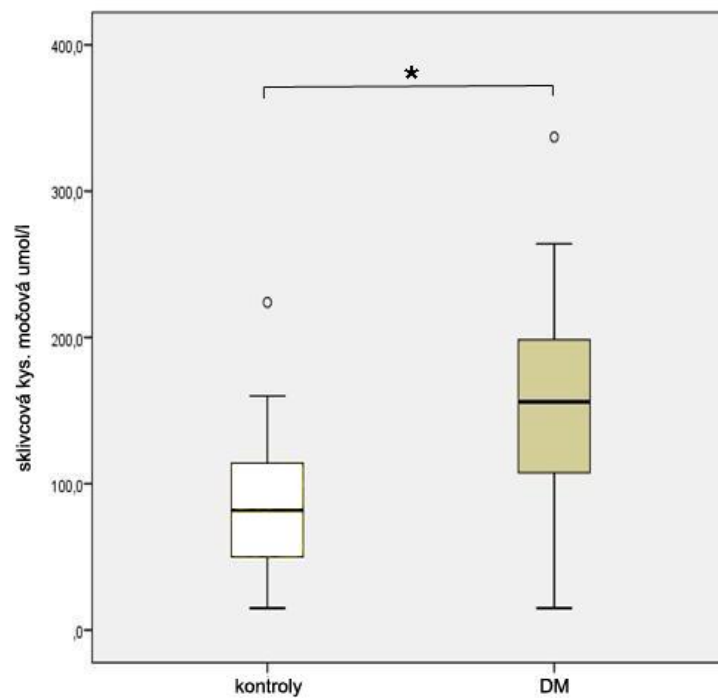
*zkratky: ns = nesignifikantní, LOD - limit detekce (31.2 pg/ml)*

**Obrázek 6:** Sklivcová koncentrace VEGF u DME a kontrolní skupiny



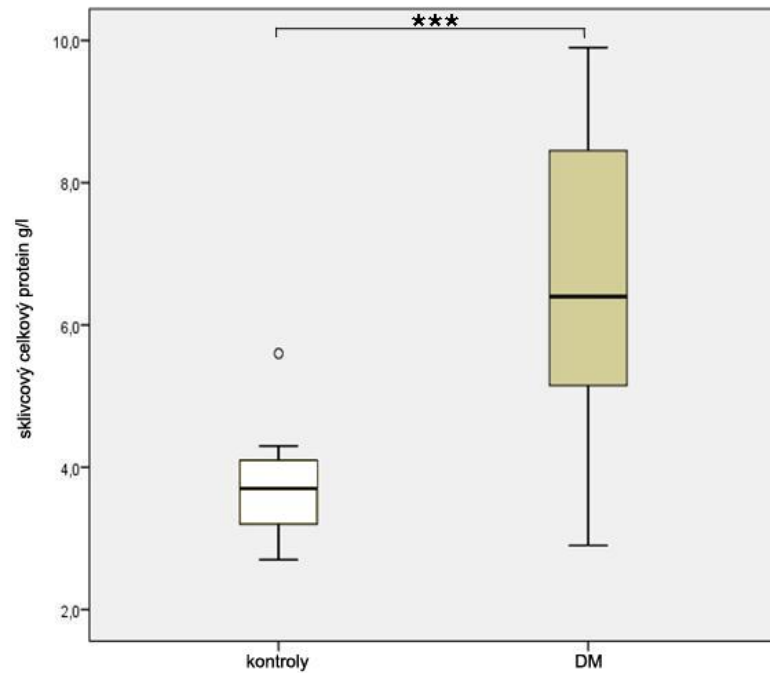
\*\*\* $p < 0.001$  DME versus kontrolní pacienti

**Obrázek 7:** Sklivcová koncentrace kyseliny močové u DME a kontrolní skupiny



\* $p = 0,038$  DME versus kontrolní pacienti

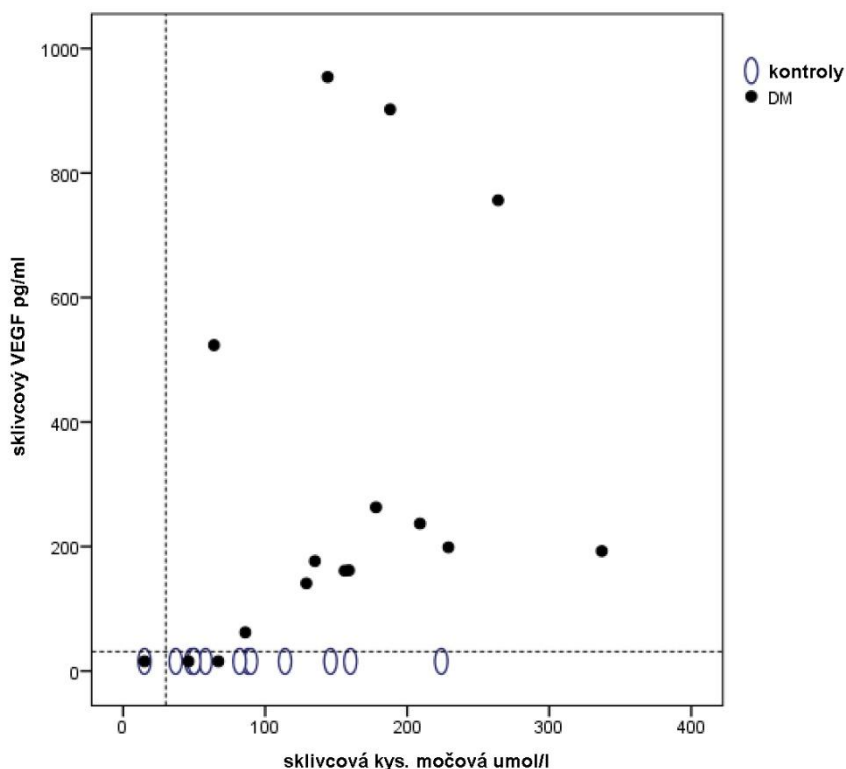
**Obrázek 8:** Sklivcová koncentrace celkové bílkoviny u DME a kontrolní skupiny



\*\*\* $p < 0.001$  DME versus kontrolní pacienti

Ve skupině pacientů s DME byla dále popsána signifikantní korelace mezi sklivcovou koncentrací kyseliny močové a sklivcovým VEGF ( $\rho = 0.559$ ,  $p = 0.03$ ). Obrázek 9 znázorňuje vztah koncentrace kyseliny močové ve sklivci u diabetiků a kontrol.

**Obrázek 9:** Vztah sklívčové koncentrace kyseliny močové a VEGF u DME a kontrol



Šrafované linie představují limit detekce (VEGF = 31.2 pg/ml, UA = 30  $\mu$ mol/l)

Sklívčové koncentrace jak kyseliny močové tak VEGF diabetiků, nekorelovaly se sklívčovou koncentrací celkové bílkoviny. U kontrolní skupiny nebyla nalezena žádná vzájemná korelace mezi stanovovanými biochemickými analyty ve sklívci.

Medián sérové koncentrace kyseliny močové u pacientů s DME byl signifikantně vyšší než u kontrol (337.0  $\mu$ mol/l, IQR: 324.0 – 407.0  $\mu$ mol/l u DME versus 259.5  $\mu$ mol/l, IQR: 220.0 – 334.8  $\mu$ mol/l u kontrolní skupiny;  $p= 0.025$ ). Také medián koncentrace VEGF v séru diabetiků (414.3 pg/ml, IQR: 293.1 – 512.0 pg/ml) byl vyšší než u kontrol (332.7 pg/ml, IQR: 149.4 - 551.8 pg/ml), ale rozdíl mezi oběma skupinami nebyl statisticky signifikantní.

V kontrolní skupině byla popsána signifikantní korelace mezi koncentrací kyseliny močové v séru a ve sklívci ( $r= 0.652$ ,  $p= 0.016$ ), u pacientů s DME však ne. Sklívčová koncentrace VEGF nekorelovala se sérovou koncentrací VEGF ani u jedné ze skupin.

### 4.3 OCT PARAMETRY

Mediány CRT, CAT a CV jsou uvedeny v tabulce 6 a mezi skupinami se jejich hodnoty signifikantně nelišily. Statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinami byl pouze v přítomnosti subretinální tekutiny, jak rovněž vyplývá z tabulky 3.

Hodnota CRT u diabetiků korelovala signifikantně s CAT ( $\rho = 0.589$ ,  $p = 0.016$ ). Dále CRT u pacientů s DM korelovala signifikantně také s CV ( $\rho = 0.581$ ,  $p = 0.018$ ). Nicméně nejsilnější korelace ve skupině diabetiků se ukázala mezi CAT a CV ( $\rho = 0.999$ ,  $p < 0.001$ ). Přítomnost subretinální tekutiny byla pospána u šesti diabetických očí, ale její přítomnost nekorelovala s žádným z ostatních OCT parametrů (CRT, CAT, CV). Ze všech sledovaných OCT parametrů se pouze v diabetické skupině ukázala statisticky signifikantní korelace CV se sklivcovou koncentrací VEGF ( $\rho = 0.515$ ,  $p = 0.041$ ). (obrázek 10). Hodnoty CRT, CAT, CV a SRD u pacientů s DME a u kontrol nekorelovaly ani se sklivcovou koncentrací kyseliny močové ani s albuminem a celkovou bílkovinou ve sklivci.

**Tabulka 3:** OCT parametry pacientů s DME a kontrolní skupiny

Parametr	DME (n=16)	kontroly (n=13)	p
<b>CRT (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	479,0 (421,5 – 661,3)	498,0 (374,5 – 540,5)	ns
<b>CAT (<math>\mu\text{ml}</math>)</b>	392,0 (329,8 – 414,3)	332,0 (316,0 – 346,5)	ns
<b>CV (<math>\text{mm}^3</math>)</b>	14,2 (11,9 – 15,0)	12,0 (11,4 – 12,5)	ns
<b>SRD</b>	6 (37,5%)	0 (0%)	*

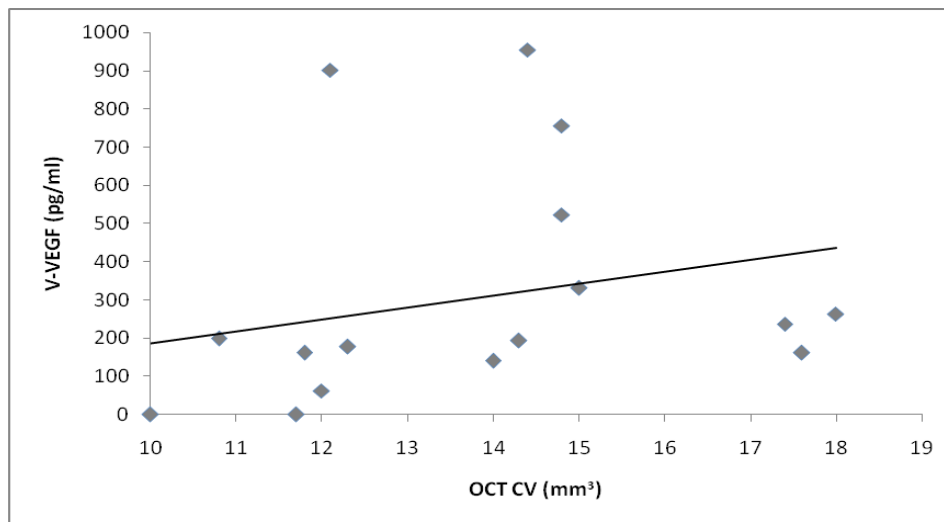
Data jsou uvedena jako medián  $\pm$  mezikvartilové rozmezí (IQR) nebo jako počet a procentuální zastoupení;

\* $p < 0.05$  DME versus kontrolní pacienti

zkratky: CRT - centrální tloušťka sítnice (central retinal thickness), CV - objem makulární oblasti (cube volume), CAT - průměrná tloušťka sítnice v makule (cube average thickness), ns = nesignifikantní, SRD – sérozní odchlípení neuroretiny



**Obrázek 10:** Grafická závislost koncentrace VEGF ve sklivci a CV hodnoty OCT u pacientů s DME



zkratky: OCT – optická koherenční tomografie, V-VEGF – sklivcová koncentrace, CV – objem makulární oblasti sítnice

Hodnotili jsme zároveň korelaci nejlépe korigované zrakové ostrosti se změnami OCT parametrů a složením sklivce a nenašli jsme ani u jedné ze skupin signifikantní závislost. Ani mezi OCT parametry a sérovými hladinami kyseliny močové a VEGF nebyla signifikantní korelace.

Souhrnně ukazují závěry druhé výzkumné části, že intravitreální koncentrace kyseliny močové u pacientů s diabetickým makulárním edémem a NPDR signifikantně koreluje s intravitreální hladinou VEGF. Dále jsme popsali, že u DME skupiny objem makulární oblasti sítnice (CV) měřené pomocí Cirrus-HD-OCT signifikantně koreluje s koncentrací VEGF ve sklivci (příloha 2: Křížová L. et al., 2015).

## 5 DISKUSE

Pro obě výzkumné části bylo společné stanovení koncentrací kyseliny močové v séru a ve sklivci. Důležitý podíl kyseliny močové na vzniku vaskulárních komplikací podporuje mnoho studií, které dokládají, že zvýšená sérová koncentrace kyseliny močové je spojována s vyšším rizikem vzniku kardiovaskulárních chorob, systémové arteriální hypertenze, urychlené aterosklerózy nebo skupiny metabolického syndromu (Hayden MR., Tyagi SC., 2004, Zoccali C. et al., 2006, Ioachimescu AC. et al., 2007, Jalal DI. et al, 2013, Sowers JR., 2013). Přesné mechanismy vztahu kyseliny močové k jejich patogenezi však zůstávají málo objasněné.

Obě naše studie popisují koncentrace několika molekul ve sklivci a v séru u různých stupňů DR. Při hodnocení závěrů bychom měli zvážit především to, že zvýšená koncentrace určité biochemické látky ve sklivci nemusí být pouze přímým následkem její zvýšené difúze hemoretinální bariérou. Je nutné předpokládat také lokální produkci, tak jak to bylo studii prokázáno například u VEGF (Pe'er J. et al., 1996, Abcouwer SF., 2013).

Abychom lépe posoudili, do jaké míry spolu souvisí koncentrace kyseliny močové a glukózy v séru a ve sklivci, použili jsme ve statistické analýze první studie také výpočet absolutního poměru. Vycházeli jsme z předpokladu, že při zachovaných fyziologických poměrech je hladina dané látky ve sklivci úměrná její hladině v séru. Tedy, že při zvýšení koncentrace např. kyseliny močové v séru, se promítne jako její zvýšení ve sklivci a poměr sérum/sklivec zůstane zachován. Mohli jsme ale pozorovat, že určité zvýšení koncentrace kyseliny močové v krvi vede u DM k většímu nárůstu její intravitreální koncentrace než u kontrol. Obdobně tomu bylo i při porovnání absolutního poměru glukózy. Naše závěry dále ukazují, že absolutní poměr kyseliny močové a glukózy je vyšší u PDR než NPDR. Tento fakt lze vysvětlit jednak snadnějším pronikáním obou látek přes hemoretinální bariéru, nebo v případě kyseliny močové i lokální produkcí, jak bude uvedeno dále.

Hemoretinální bariéra je u DR a DME porušena. Její narušení je zprostředkováno zánětlivými mediátory, jakými jsou prostaglandiny, cytokiny a VEGF (Antcliff RJ, Marshall J., 1999, Antonetti DA. et al., 1999, Quam T. et al., 2001, Shin ES. et al, 2014). Pomocí sklivcové fluorometrie bylo prokázáno, že u pacientů s DR a DME je pasivní průnik molekul fluoresceinu přes HRB oproti kontrolám vyšší o faktor 12 (Sander B. et

al., 2001). V případě kyseliny močové v první části naší studie to bylo o faktor 1,69. Pokud by se kyselina močová do sklivce u DR dostávala zvýšeným pasivním průnikem, mohlo by se jednat pouze o pasivní ukazatel rizika DR.

Kyselina močová je konečný produkt metabolismu purinů a za normálních okolností působí jako antioxidant (Hayden MR., Tyagi SC., 2004). V literatuře je velice málo informací o vztahu kyseliny močové k DR, nebo o jejích fyziologických hladinách ve sklivci. U různých systemických chorob byla popsána predominantně lokální produkce kyseliny močové (Johnson RJ. et al., 2003). Lokální produkci kyseliny močové u pacientů s DR nasvědčují také závěry naší druhé výzkumné části. Ačkoli celková bílkovina ve sklivci diabetiků byla ve srovnání s kontrolní skupinou signifikantně vyšší, její hladiny nekorelovaly ani se sklivcovou kyselinou močovou, ani s VEGF. Dále jsme u diabetiků, na rozdíl od kontrol, nenašli korelaci mezi sérovou a sklivcovou koncentrací kyseliny močové. Jednou z možností, jak vysvětlit zvýšené hladiny kyseliny močové ve sklivci diabetiků a jejich korelaci se stupněm DR, by tedy mohla být její lokální produkce buňkami sítnice. S jistotou by bylo nutno tento předpoklad ale doložit dalšími studii, například se značenou kyselinou močovou.

U diabetiků spouští hyperglykemie řadu metabolických pochodů vedoucích k oxidačnímu stresu (obrázek 6). Fyziologické lokální antioxidanty, které chrání kapilární endotel, jsou oxidačním stresem spotřebovány (Hayden MR., Tyagi SC., 2004) a vzniká posun v oxidačně-redukční rovnováze kyseliny močové. Tento tzv. "urate redox shuttle" znamená, že kyselina močová, která za fyziologických podmínek působí jako antioxidant, se paradoxně stává oxidantem a podílí se na endoteliálním poškození cestou oxidačního stresu (Hayden MR., Tyagi SC., 2004). Johnson et al. navíc dokázali, že lokální ischemie vede cestou enzymatické aktivace ke zvýšené produkci kyseliny močové a tvorbě oxidantů (Johnson RJ. et al., 2003). I podle autorů Yokoi et al. je možné, že kyselina močová se podílí na snížení totální antioxidantní kapacity sklivce u DM, což přispívá k porušení hemoretinální bariéry a progresi PDR cestou indukce VEGF (Yokoi M. et al., 2005). Společně s VEGF a ostatními molekulami by mohla být kyselina močová jedním ze spolupůsobících kauzálních faktorů DR, neboť v druhé části výzkumu jsme prokázali korelaci obou molekul ve sklivci diabetiků.

V obou mých výzkumných částech byla průměrná koncentrace kyseliny močové v séru diabetiků signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny pacientů. V předchozích studiích byla sérová koncentrace kyseliny močové u DM popsána jako nižší, stejná nebo vyšší

(Ioachimescu AG. et al., 2007) v porovnání s nediabetickými kontrolami. Nicméně, při současné hladině HbA<sub>1c</sub> pod 9%, byla hladina kyseliny močové signifikantně vyšší u DM (Ioachimescu AG. et al., 2007), stejně jako v našem případě.

Závěry první části výzkumu také ukazují, že pokročilé stupně DR korelovaly se zvýšenou hladinou glukózy ve sklivci. Ačkoli není mnoho studií, které by měřily hladinu glukózy ve sklivci, existuje nespočet studií, které dokazují, že vysoká hladina glukózy v séru je hlavním faktorem zapojeným do retinálních vaskulárních změn při progresi DR (např. Sheetz MJ., King GL., 2002, Ciulla TA. et al., 2003). Předpokládáme tedy, že mechanismus účinku glukózy přítomné ve sklivci bude v mnohém podobný těm, které jsou popsány při hyperglykemii, a že i glukóza přítomná ve sklivci se účastní na lokálních změnách sítnice při vzniku a progresi DR. Teorie, kterými hyperglykemie mění buněčné funkce a stimuluje expresi signálních molekul v patogenezi DR jsou následující: a) akcentace polyolové cesty, b) produkce pokročilých produktů glykace neenzymatickou glykací proteinů, c) indukce oxidačního stresu, d) aktivace proteinkinasy C (Sheetz MJ., King GL., 2002, Ciulla TA. et al., 2003, Kowluru RA., Chan PS., 2007). Všemi těmito cestami může glukóza u DR přispívat k endoteliální dysfunkci a vést k následnému zvýšení permeability hematoretinální bariéry.

Vzhledem k tomu, že glykemie je dynamicky proměnný parametr, stal se zlatým standardem používaným k posouzení dlouhodobé kompenzace diabetu glykovaný hemoglobin HbA<sub>1c</sub> (Kalvodová B. et al., 2012). Korelace hladin HbA<sub>1c</sub> se stupněm sítnicového poškození u DR, kterou jsme ukázali v naší studii (průměrný HbA<sub>1c</sub> u NPDR 6.7±1.8% versus u PDR 7.5±1.5%), je v souladu se závěry velkých prospektivních studií UKPDS (1998), DCCT (Zhang L. et al., 2001). Na druhou stranu jsme v naší studii ale nenašli signifikantní korelaci mezi intravitreální koncentrací kyseliny močové nebo glukózy a hladinami HbA<sub>1c</sub>. Ani v druhé části výzkumu jsme nenašli žádnou statisticky významnou korelaci mezi HbA<sub>1c</sub> a biochemickými změnami ve sklivci nebo OCT parametry.

Studie posledních let ukazují, že zvýšené hladiny VEGF v oku diabetiků způsobují konformační změny mezibuněčných „tight junctions“ endoteliálních buněk retinálních cév. Tímto mechanismem je VEGF zodpovědný za zvýšení cévní permeability a porušení hematoretinální bariéry u očí s DME (Quam T. et al., 2001, Caldwell RB. et al., 2003, Abcouwer SF., 2013). Sklivcové hladiny VEGF korelují signifikantně se

stupněm závažnosti DR (Quam T. et al., 2001, Zhang X. et al., 2014, Rahimi Z. et al., 2014). Někteří autoři pozorovali také signifikantní korelaci mezi ztluštěním sítnice ve fovee měřenou na OCT a koncentracemi VEGF ve sklivci (Funatsu H. et al., 2006, Shimada H. et al., 2009) a komorové vodě (Javanmard SH. et al, 2012). Spojitost mezi sklivcovými koncentracemi VEGF a morfologií DME popsali Sonoda et al.; nenašli signifikantní korelaci mezi VEGF a cystoidním versus difúzním DME (Sonoda S. et al., 2014).

Podle naší studie korelace mezi sklivcovými hladinami VEGF a centrální tloušťkou sítnice - CRT nebyla u diabetiků ani u kontrolní skupiny signifikantní. Naše závěry však dokazují, že vyšší hodnoty objemu makulární oblasti sítnice - CV s vysokou hladinou VEGF ve sklivci pacientů s DME statisticky významně korelují. Nicméně, je také potřeba zmínit, že každý z autorů předchozích studií definoval centrální sítnicovou tloušťku jinak. Tloušťka sítnice v centru fovey ve studii od autorů Funatsu et al. byla vypočítána jako průměrná foveální tloušťka ze 4 manuálních měření pro každého pacienta (Funatsu H. et al., 2006). Shimada et al. použili průměrnou tloušťku centrální plochy sítnice o průměru 1000  $\mu\text{m}$  stejně jako my, avšak vypočítanou automaticky OCT přístrojem značky Humphrey (Shimada H. et al, 2009). A ve studii od autorů Javanmard et al. byla centrální makulární tloušťka definována jako průměrná tloušťka centrální plochy sítnice o průměru 500  $\mu\text{m}$  (Javanmard SH. et al., 2012).

OCT se od svého zavedení do oftalmologie na konci 90. let minulého století používá k hodnocení dynamiky DME a odpovědi na jeho terapii různými modalitami (laser, intravitreální injekce triamcinolonu, vitrektomie). U pacientů s DME je všeobecně akceptováno, že centrální tloušťka sítnice – CRT se vedle nejlépe korigované zrakové ostrosti stala nejdůležitějším markerem pro posuzování efektivity léčby (DRCR.net, 2007). To je z toho důvodu, že změny ve foveální oblasti jsou rozhodující pro centrální zrakovou ostrost. V naší studii CRT, CAT ani CV s nejlépe korigovanou centrální zrakovou ostroší nekorelovaly, a to ani u pacientů s DME, ani u kontrolní skupiny.

Studie, které by korelovaly sklivcové hladiny VEGF u DME s OCT parametry před zavedením anti-VEGF terapie prakticky neexistovaly. Až intervenčními studiemi bylo prokázáno, že anti-VEGF terapie vede u DME k redukci tloušťky sítnice (Massin P. et al. 2010, Mitchell P. et al, 2011) a vyšetření pomocí OCT začalo být považováno za možnou cestu, jak neinvazivně ve standardních klinických podmínkách posuzovat

hladiny VEGF. Tyto empirické závěry však nejsou doloženy stanovením hladiny VEGF před a po terapii a vycházejí pouze z klinického pozorování redukce DME po anti-VEGF terapii. Například autoři Nguyen et al. publikovali práci, která hodnotí efekt anti-VEGF terapie za pomoci centrální tloušťky sítnice na OCT, i objemu makulární oblasti sítnice - CV (Nguyen QD. et al., 2006).

Závěry druhé části mého výzkumu ukazují, že vyšší hodnoty objemu makulární oblasti sítnice – CV u pacientů s DME korelují s vysokou hladinou VEGF ve sklivci. Zároveň jsme dokázali, že přítomnost subretinální tekutiny u diabetiků nevykazuje signifikantní korelaci se sklivcovým VEGF. Z toho důvodu, že DME postihuje většinou rozsáhlejší oblast makuly a ne jenom foveální krajinu, se zdá být hodnocení koncentrace VEGF za pomoci objemu makulární oblasti sítnice - CV i v klinické praxi opodstatněné.

Fakt, že přítomnost subretinální tekutiny nekoreluje s koncentrací VEGF ve sklivci diabetiků, je částečně v souladu se závěrem autorů Sonoda et al., kteří u diabetiků s DME nenašli statisticky významnou korelaci mezi intravitreální hladinou VEGF a množstvím subretinální tekutiny (Sonoda S. et al., 2013). Jiné studie prokazují, že přítomnost subretinální tekutiny má často špatnou prognózu po terapii DME (Deak GG. et al. 2010, Ota M. et al., 2010).

## 6 ZÁVĚR

Studiem systémových i lokálních rizikových faktorů podílejících se na vzniku a rozvoji diabetického postižení sítnice se v posledních desetiletích zabývají ve světě různá pracoviště. S přibývajícimi znalostmi na tomto poli se mění pohled na patogenezi diabetické retinopatie a kromě sérové hladiny glukózy je potřeba sledovat mnoho dalších parametrů. Velice důležitou roli v patogenezi diabetické retinopatie hrají angiogenní a antiangiogenní faktory, mediátory zánětu a oxidační stres, jejichž vzájemné vztahy jsou v progresi tohoto onemocnění rozhodující.

V disertační práci jsou předloženy výsledky klinicko-laboratorního výzkumu zaměřeného na pacienty s diabetickým makulárním edémem. Provedli jsme biochemické a imunochemické analýzy vzorků sklivce odebraného v průběhu pars plana vitrektomie. Dále jsme u pacientů s neproliferativní diabetickou retinopatií sledovali morfologické charakteristiky diabetického edému pomocí OCT. Souhrn závěrů studií ve vztahu k cílům předložené práce lze tematicky rozdělit do následujících částí:

1. Došla jsem k závěru, že sérové i sklivcové hladiny kyseliny močové a glukózy byly signifikantně vyšší u pacientů s DR a DME oproti kontrolní skupině. Také absolutní poměr (sérová/ sklivcová koncentrace) kyseliny močové a glukózy u diabetiků byl statisticky významně vyšší než u kontrol; tzn. stejná koncentrace dané molekuly v séru odpovídala vyšším koncentracím ve sklivci diabetiků než kontrol.

2. Dokázali jsme, že nejdůležitější determinantou zvyšující se koncentrace kyseliny močové a glukózy ve sklivci je stupeň diabetické retinopatie. Koncentrace kyseliny močové a glukózy byla vyšší ve sklivci pacientů s proliferativní, než u pacientů s neproliferativní diabetickou retinopatií a u kontrol. Také absolutní poměr (sérová/ sklivcová koncentrace) glukózy a kyseliny močové byl signifikantně vyšší u pacientů s proliferativní, než u pacientů s neproliferativní diabetickou retinopatií, a než u kontrol.

Vliv vysoké glykémie na endotel sítnicových kapilár a rozvoj retinopatie u diabetiků je dobře prozkoumán. Předpokládáme, že podobným patogenetickým mechanismem budou působit také vysoké hladiny glukózy ve sklivci. Je velice pravděpodobné, že i vysoké koncentrace kyseliny močové ve sklivci značí, že také ta se podílí na progresi diabetické retinopatie. Avšak k tomu, abychom pochopili roli a přesný mechanismus účinku kyseliny močové v patogenezi DR, budou potřeba další studie.

3. Ve druhé části mého výzkumu jsem popsala signifikantní korelaci sklivcové koncentrace kyseliny močové s koncentrací VEGF u pacientů s diabetickým makulárním edémem a NPDR. Je známo, že VEGF se v patogenezi diabetického makulárního edému podílí na zvýšení permeability sítnicových cév a porušení hemoretinální bariéry. Prokázala jsem, že sklivcová koncentrace kyseliny močové u pacientů s diabetickou retinopatií je vyšší než u nediabetických kontrol a zároveň, že u pacientů s makulárním edémem u neproliferativní diabetické retinopatie koreluje sklivcová koncentrace kyseliny močové s VEGF. To potvrzuje náš předpoklad, že kyselina močová by mohla být jedním ze spolupůsobících kauzálních faktorů v patogenezi diabetické retinopatie a diabetického makulárního edému.

4. Porovnali jsme OCT parametry s koncentracemi kyseliny močové, VEGF, celkové bílkoviny a albuminu a popsali vzájemnou závislost morfologických změn sítnice na biochemických změnách sklivce. Zjistili jsme, že objem makulární oblasti sítnice – CV vypočítaný softwarem Cirrus HD-OCT signifikantně koreluje s koncentrací VEGF ve sklivci diabetiků, ale ne s kyselinou močovou. Průměrná tloušťka sítnice v makule – CAT, ani centrální tloušťka sítnice – CRT nekorelovala u našich pacientů ani s VEGF, ani s kyselinou močovou. Vzhledem k tomu, že diabetický makulární edém postihuje zpravidla větší oblast makuly a není vždy symetricky rozdělen kolem fovey, zdá se být hodnocení koncentrace VEGF pomocí objemu makulární oblasti sítnice - CV v klinické praxi pochopitelné. Tento parametr by mohl být v praxi použitý k hodnocení efektivity terapie anti-VEGF preparáty.

Přínosem naší studie je prokázání toho, že koncentrace kyseliny močové ve sklivci souvisí se stupněm diabetické retinopatie a zároveň se sklivcovou koncentrací VEGF. Mechanismy účinku VEGF v patogenezi diabetické retinopatie a diabetického makulárního edému jsou v posledních dvou dekádách intenzivně studovány, role kyseliny močové v patogenezi diabetické retinopatie je však zatím neprozkoumaná a naše závěry nasvědčují tomu, že kyselina močová by mohla být jedním ze spolupůsobících kauzálních faktorů. K objasnění bližších patofyziologických souvislostí bude potřeba dalších experimentálních studií.



## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abcouwer SF. Angiogenic Factors and Cytokines in Diabetic Retinopathy. *J Clin Cell Immunol.* 2013, Suppl: 1–12.

Agarwal P, Jindal A, Saini VK et al. Advances in diabetic retinopath. *Indian J Endocrinol Metab.* 2014, 18: 772-777.

Antcliff RJ., Marshall J. The pathogenesis of edema in diabetic retinopathy. *Semin Ophthalmol.* 1999, 14:223-32.

Antonetti DA, Lieth E, Barber AJ, Gardner TW. Molecular mechanisms of vascular permeability in diabetic retinopathy. *Semin Ophthalmol.* 1999, 14: 240-248.

Aroor AR, McKarns S, Demarco VG et al. Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. *Metabolism.* 2013, 62: 1543-1552.

Caldwell RB, Bartoli M, Behzadian MA et al. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev.* 2003, 19: 442-55.

Chaudhary K, Malhotra K, Sowers J et al. Uric acid – Key Ingredient in the Recipe for Cardiorenal Metabolic Syndrome. *Cardiorenal Med.* 2013, 3: 208-220.

Ciulla TA, Amador AG, Zinman B. Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema. Pathophysiology, screening and novel therapies. *Diabetes Care.* 2003, 26: 2653-2664.

Deak GG, Bolz M, Ritter M et al. A systemic correlation between morphology and functional alterations in diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010, 51: 6710-6714.

Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. Relationship between optical coherence tomography-measured central thickness and visual acuity in diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2007, 114(3): 525-36.

Funatsu H, Yamashita H, Nakamura S, Mimura T, Eguchi S, Noma H, Hori S. Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 2006.113: 294-301.

Hayden MR, Tyagi SC. Uric acid: A new look at an old risk marker for cardiovascular disease, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus: The urate redox shuttle. *Nutr Metab*. 2004, 1: 10.

Ioachimescu AG, Brennan DM, Hoart BM et al. Serum uric acid, mortality and glucose control in patients with Type 2 diabetes mellitus: a PreCIS database study. *Diabetic Medicine*.2007, 24: 1369-1374.

Jalal DI, Chonchol M, Chen W et al. Uric acid as a target of therapy in CKD. *Am J Kidney Dis*. 2013, 61: 134–146.

Javanmard SH, Hasanpour Z, Abbaspoor Z, Naderian GA, Jahanmard M. Aqueous concentrations of VEGF and soluble VEGF receptor-1 in diabetic retinopathy patients. *J Res Med Sci*. 2012, 17: 1124-1127.

Johnson RJ, Kang DH, Kivlighn S et al. Is There a Pathogenic Role for Uric Acid in Hypertension and Cardiovascular and Renal Disease?.*Hypertension*.2003, 41: 1183-1190.

Kalvodová B, Sosna T, Řehák J et al. Doporučené postupy pro diagnostiku a léčbu diabetické retinopatie. *Česká a slovenská oftalmologie*. 2012, 68: 236-241.

Kodama S, Saito K, Yachi Y et al. Association between serum uric acid and development of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009, 32: 1737-1742.

Kowluru RA, Chan PS. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Experimental Diabetes Research*. 2007, doi: 10.1155/2007/43603.

Křížová L, Kalousová M, Kuběna A et al. Increased uric acid and glucose concentrations in vitreous and serum of patients with diabetic macular oedema. *Ophthalmic Res*. 2011, 46: 73-79.

Křížová L, Kalousová M, Kuběna A et al. Correlation of vitreous Vascular Endothelial Growth Factor and uric acid concentration using optical coherence tomography in diabetic macular oedema. *Journal of Ophthalmology*. 2015, doi: 10.1155/2015/478509.

Kvasnicová V. Urát. In: Kolektiv autorů. *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi – verze 12*. 2014, ISBN 80–238–9775–6.

Marshall G, Garg SK, Jackson WE et al. Factors influencing the onset and progression of diabetic retinopathy in subjects with insulin-dependent diabetes mellitus. *Ophthalmology*. 1993, 100: 1133-1139.

Massin P, Bandello F, Garweg J et al. Safety and efficacy of ranibizumab in diabetic macular edema (RESOLVE study): a 12-month randomized, controlled, doublemasked, multicenter phase II study. *Diabetes Care*. 2010, 33(11): 2399–2405.

Mitchell P, Bandello F, Schmidt-Erfurth U et al. (RESTORE study group). The RESTORE Study: ranibizumab monotherapy or combined with laser versus laser monotherapy for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2011, 118: 615-625.

Murray RK et al. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 1. vydání. Praha: Galen, 2013. ISBN-13: 978-80-7262-907-7.

Nguyen QD, Tatlipinar S, Shah SM et al. Vascular endothelial growth factor is a critical stimulus for diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol*. 2006, 142: 961-969.

Ota M, Nishijima K, Sakamoto A et al. Optical coherence tomographic evaluation of foveal hard exudates in patients with diabetic maculopathy accompanying macular detachment. *Ophthalmology*. 2010, 117: 1996-2002.

Pe'er J, Folberg R, Itin A et al. Upregulated expression of vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*. 1996, 80: 241-245.

Quam T, Xu Q, Joussen AM et al. VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001, 42: 2480-2513.

Rahimi Z, Moradi M, Nasri H. A systematic review of the role of renin angiotensin aldosterone system genes in diabetes mellitus, diabetic retinopathy and diabetic neuropathy. *J Res Med Sci.* 2014,19: 1090–1098.

Sander B, Larsen M, Moldow B et al. Diabetic macular edema: passive and active transport of fluorescein through the blood-retina barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001, 42: 433-8.

Sheetz MJ, King GL. Molecular understanding of hyperglycaemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA.* 2002, 228: 2579-2588.

Sheporo D, Morel NM. Pericyte Physiology. *FASEB J.* 1993, 7: 1031-1038.

Shimada H, Akaza E, Yuzawa M, Kawashima M. Concentration gradient of vascular endothelial growth factor in the vitreous of eyes with diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009, 50: 2953-2955.

Shin ES, Sorenson CM, Sheibani N. Diabetes and retinal Vascular dysfunction. *J Ophthalmic Vis Res.* 2014, 9: 362-373.

Simó R, Hernández C. Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: Hopes and fears for a new therapeutic strategy. *Diabetologia.* 2008, 51: 1574–1580.

Sonoda S, Sakamoto T, Shirasawa M, Yamashita T, Otsuka H, Terasaki H. Correlation between reflectivity of subretinal fluid in OCT images and concentration of intravitreal VEGF in eyes with diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013, 454: 5367-5374.

Sonoda S, Sakamoto T, Yamashita T, Shirasawa M, Otsuka H, Sonoda Y. Retinal morphologic changes and concentrations of cytokines in eyes with diabetic macular edema. *Retina.* 2014, 34: 741 -748.

Sowers JR. Diabetes mellitus and vascular disease. *Hypertension.* 2013, 61: 943–947.

Škrha J. Oxidační stres a jeho vztah ke komplikacím diabetu. *Interní Med.* 2010, 12: 414–418.

Yokoi M, Yamagishi S-I, Takeuchi M et al. Elevations of AGE and vascular endothelial growth factor with decreased total antioxidant status in the vitreous fluid of diabetic patients with retinopathy. *Br J Ophthalmol*. 2005, 89: 673-675.

Zhang L, Krzentowski G, Albert A et al. Risk of developing retinopathy in Diabetes Control and Complications Trial type 1 diabetic patients with good or poor metabolic control. *Diabetes Care*. 2001, 24: 1275-1279.

Zhang X, Zhao J, Zhao T et al. Effects of intensive glycemic control in ocular complications in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Endocrine*. 2014, [Epub ahead of print] PMID: 25355306.

Zoccali C, Maio R, Mallamaci F et al. Uric acid and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Soc Nephrol*. 2006, 17: 1466-1471.

## 8 SEZNAM PUBLIKACÍ

Křížová L, Kalousová M, Kuběna A et al. Correlation of vitreous Vascular Endothelial Growth Factor and uric acid concentration using optical coherence tomography in diabetic macular oedema. *Journal of Ophthalmology*. 2015, doi: 10.1155/2015/478509. (IF 1,425)

Křížová L, Kalousová M, Kuběna A et al. Increased uric acid and glucose concentrations in vitreous and serum of patients with diabetic macular oedema. *Ophthalmic Res*. 2011, 46: 73-79. (IF 1,56)

Křížová L, Rombold F. Aflibercept bei okkulten choroidaler Neovaskularisation bei altersbedingter Makuladegeneration. *Thieme Case Report*. 2014; 6: 8-9.

Křížová L, Systémové rizikové faktory progresu diabetické retinopatie. *Prakt. Lék*. 2009, 89 (5), pp. 227-229.

### **Abstrakt:**

Kotilová L., Kalousová M., Kalvodová B. et al. The potential role of uric acid in pathogenesis of diabetic retinopathy. *European Journal of Ophthalmology* 2008, 18 (3), 487-504. (IF 1,01)