

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI
KRÁLOVÉ**

**KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD
FARMACEUTICKÉ FAKULTY UK**

**RHEOFERETICKÉ POSTUPY PRO
ODSTRANĚNÍ CHOLESTEROLU A
JEJICH DOPAD NA IMUNITNÍ SYSTÉM
U PACIENTŮ S VĚKEM PODMÍNĚNOU
MAKULÁRNÍ DEGENERACÍ**
(Rigorózní práce)

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto rigorózní práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Hradci Králové dne 24.3.2014

.....
Mgr. Ellen Dreslerová

Touto cestou bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Ctiradu Andrysovi, PhD. a PharmDr. Petru Jilkovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a dále prof. MUDr. Milanu Bláhovi, CSc. a MUDr. Evě Rencové za všestrannou pomoc při vypracování této rigorózní práce.

1. Obsah

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | Obsah | 3 |
| 2. | Seznam zkratk | 4 |
| 3. | Úvod..... | 5 |
| 4. | Teoretická část | 7 |
| 4.4 | Věkem podmíněná makulární degenerace..... | 7 |
| 4.4.1 | Epidemiologie | 7 |
| 4.4.2 | Patogeneze..... | 10 |
| 4.4.3 | Subjektivní příznaky | 11 |
| 4.4.4 | Vyšetřovací metody | 11 |
| 4.4.5 | Klinické formy a klasifikace | 12 |
| 4.5 | Metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu | 15 |
| 4.5.1 | Aferéza | 15 |
| 4.5.2 | Imunoadsorpcie LDL-cholesterolu | 16 |
| 4.5.3 | Metody založené na filtraci částic plazmy | 18 |
| 4.5.4. | Účinky léčby hemorheoferézou | 19 |
| 4.6 | Charakteristika sledovaných markerů aterosklerózy a imunitního systému ... | 20 |
| 4.7 | Plazmatické glykoproteiny (α -2-makroglobulin) | 21 |
| 4.7.1 | Adhezivní molekuly (P-selektin) | 22 |
| 4.7.2 | Endoglin | 24 |
| 4.7.3 | IL-10..... | 26 |
| 4.7.4 | hsCRP..... | 28 |
| 4.7.5 | MCP-1 | 29 |
| 4.7.6 | IgM..... | 30 |
| 5. | Cíl práce | 31 |
| 6. | Experimentální část..... | 32 |
| 6.1 | Charakteristika souboru pacientů | 32 |
| 6.2 | Materiál a metody | 32 |
| 6.2.1 | Hemorheoferéza | 32 |
| 6.2.2 | Laboratorní metodika stanovení..... | 32 |
| 7 | Statistické zpracování výsledků..... | 34 |
| 7.1 | Výsledky | 34 |
| 7.1.1 | α -2 makroglobulin | 35 |
| 7.1.2 | sP-selektin | 35 |
| 7.1.3 | Endoglin (sCD105) | 35 |
| 7.1.4 | IL-10..... | 36 |
| 7.1.5 | hsCRP..... | 36 |
| 7.1.6 | MCP-1 | 36 |
| 7.1.7 | Imunoglobulin M | 37 |
| 8 | Tabulky a grafy | 38 |
| 8.1 | Přehled naměřených hodnot..... | 38 |
| 8.2 | Statistické zpracování výsledků..... | 38 |
| 8.3 | Grafické zpracování výsledků | 38 |
| 9 | Diskuze | 45 |
| 10 | Závěr | 48 |
| 11 | Přehled použité literatury | 49 |

2. Seznam zkratek

| | |
|----------------------|--|
| apo B ₁₀₀ | Apolipoprotein B ₁₀₀ |
| ATS | Ateroskleróza |
| BM | Bruchova membrána |
| BMI | Body mass index |
| CRP | C-reaktivní protein |
| hs CRP | highly sensitive C-reaktivní protein |
| CNV | Choroidální neovaskularizace |
| DFPP | Double filtration plasmapheresis |
| DSA | Adsorpce na dextransulfát |
| FA | Fluorescenční angiografie |
| FES | Framingham Eye Study |
| HDL | High density lipoproteins |
| ICAM-1 | Intercellular adhesion molecule 1 |
| IgM | Imunoglobulin M |
| IL | Interleukin |
| INF- γ | Interferon γ |
| LDL | Light density lipoprotein |
| MCP-1 | Monocyte chemotactic protein-1 |
| MDF | Membrane differential filtration |
| NHANES | National Health and Nutrition Examination Survey |
| OCT | Optická koherenční tomografie |
| PBS | Phosphate buffer saline |
| PCV | Polyploidní chorioideální vaskulopatie |
| PRR | Pattern recognition receptor |
| RPE | Retinální pigmentový epitel |
| TGF- β | Transforming growth factor β |
| TNF α | Tumor nekrotizující faktor |
| tPA | Tkáňový aktivátor plazminogenu |
| VCAM-1 | Vascular cell adhesion molecule 1 |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor α |
| VPMD | Věkem podmíněná makulární degenerace |

3. Úvod

Věkem podmíněná makulární degenerace (VPMD) je nejčastější příčinou praktické slepoty populace nad 60 let¹. Obvykle začíná jako suchá forma s měkkými drúzami: ohraničenými měkkými drúzami (65-125 μm) nebo neohraničenými měkkými drúzami 125 μm nebo retikulárními drúzami o velikosti přesahující 250 μm , které mají horší prognózu (ve smyslu vývoje do terminální formy VPMD)².

Patnáctiletý průběh suché formy VPMD s měkkými drúzami končí praktickou slepotou ve 27 %, z čehož 40 % je geografická forma a v 60 % se vyvine vlhká forma se submakulární choroidální neovaskularizací (CNV)³. Vývoj vlhké formy VPMD souvisí s poruchou perfuze v cévnatce a sítnici⁴. Perfuze závisí na krevním průtoku v mikrořečišti, který je určován stavem cév a rheologickými vlastnostmi krve. Krevní průtok krve je dále podmíněn viskozitou plné krve, která závisí na viskozitě buněk a plazmy. Viskozitu krve zvyšuje zvýšený počet erytrocytů, leukocytů, trombocytů a stoupající hematokrit. Fluidita plazmy závisí na její viskozitě. Ta je podmíněna koncentrací, velikostí a strukturou hlavně plazmatických proteinů a lipidů. Přítomnost vysokomolekulárních proteinů působí vzestup viskozity. S jejich koncentrací stoupá i agregabilita.

Vlhká forma VPMD je hlavní příčinou ztráty zraku u starší populace^{1,5}. Obvykle začíná jako suchá forma s měkkými drúzami a vyznačuje se horší prognózou⁶. Suchá forma VPMD může vést ke ztrátě zraku⁷. V případě diagnostiky v pokročilejším stádiu je vysoké riziko trvalé ztráty zraku v následujících 12 měsících. V současnosti není kromě rheoferézy žádná prokázaná účinná terapie u pokročilé suché makulární degenerace⁷. Hemorheoferéza je dle současných poznatků bezpečná a vysoce účinná forma eliminační diferenciální membránové filtrace vysokomolekulárních proteinů (např. fibrinogen, α 2- makroglobulin, IgM, trombomodulin a LDL- cholesterol). Tato metoda umožňuje normalizovat rheologické parametry jako viskozitu krve a plazmy a stejně tak i shlukovitost erytrocytů, zlepšuje flexibilitu erytrocytů a může vést ke značnému zlepšení zrakové činnosti u pacientů postižených VPMD⁸.

Deplece přesně definovaného spektra vysokomolekulárních látek z krve za účelem zlepšení fluidity plazmy je možná pomocí hemorheoferézy⁷. Hemaferézou lze

oddělit z krve krevní elementy speciálními separátory na principu centrifugace nebo filtrace a získat tak plazmu, kterou lze dále zpracovávat. Plazmaferéza je výměna plazmy. V případě VPMD je optimální rheoferéza jako recentní metoda plazmatické filtrace, která použitím filtrů s dutými vlákny o otvorech v dimenzi nanometrů odstraní z krve exaktně definované spektrum vysokomolekulárních a rheologicky aktivních plazmatických proteinů. Série léčebných pulsů a odstranění proteinů vede k redukci bariéry difuze z Bruchovy membrány (BM) a normalizuje metabolickou výměnu retinálního pigmentového epitelu (RPE) a choriokapilaris, zlepší výživu RPE a neuroepitelu⁸.

Při vlastním provedení techniky se jedná o filtraci plazmy, která odstraněním vysokomolekulárních látek vede k redukci bariéry difuze z BM a normalizuje metabolickou výměnu mezi RPE a choriokapilaris. Zlepší výživu buněk RPE a neuroepitelu a snížením ischemie snižuje produkci vascular endothelial growth factor (VEGF) buňkami RPE. Úprava poměrů na molekulární úrovni a aktivace funkčních rezerv sítnice může zabránit rozvoji procesu vedoucího ke ztrátě zraku. Předpokládá se i zlepšení průtoku krve cévnatkou, který je u suché formy VMPD výrazně alterován⁹. Snížení ischemie vede k poklesu produkce VEGF buňkami RPE. Dále byla prokázána také nižší viskozita plazmy i celé krve a snížená agregace erytrocytů. Na pracovišti řešitele byla rheoferéza pro účely léčby pacientů s VPMD modifikována, standardizována, její klíčové části patentovány, a jako léčebná metoda je využívána od r. 2006. Cílem této rigorózní práce je ověřit účinnost hemorheoferézy a její modifikace používané na pracovišti ve FN v Hradci Králové a její vliv na imunitní systém.

4. Teoretická část

4.4 Věkem podmíněná makulární degenerace

VPMD může být zejména ve svých iniciálních stádiích velmi obtížně odlišitelná od přirozeného procesu stárnutí sítnice. Většinou jsou přítomny malé tvrdé drúzy, které nejsou ještě projevem VPMD¹⁰. Dále dochází v makulární oblasti ke vzniku nepravidelností v pigmentaci toroidního charakteru, ale na rozdíl od patologického procesu u VPMD zůstává fyziologická úroveň zrakové ostrosti. Dopplerovská flowmetrie prokazuje pokles intenzity prokrvení makulární oblasti, dále snížení počtu perifoveolárních arteriol a venul s rozšířením foveolární a vaskulární zóny a snížení v počtu gangliových buněk sítnice¹¹.

Také další zrakové funkce vykazují v souvislosti s procesem stárnutí pokles. Jde o adaptaci na tmu, schopnost stereopse, kontrastní citlivost, barevné vidění a denzitu foveolárního pigmentu¹².

4.4.1 Epidemiologie

4.4.1.1 Prevalence

Prevalenci VPMD zkoumalo několik populačních studií s podobnými, nicméně různorodými definicemi a terminologiemi. Hodnocení bylo většinou prováděno na základě fotodokumentace¹¹.

Framinghamská studie *Framingham Eye Study* (FES) vyšetřila dvě třetiny sledovaných pacientů *Framingham Heart Study*. V průběhu dvou let absolvovalo oftalmologické vyšetření 2631 pacientů ve věku od 52 do 85 roků. Definice VPMD byla stanovena jako pokles zrakové ostrosti pod 20/30. Zároveň byl definován jeden či více následujících znaků:

- makulární nebo perimakulární drúzy,
- pigmentové změny (ne sekundární, či z jiné příčiny),
- nadzvýšení retinálního pigmentového epitelu,
- exsudáty charakteru circináty.

Podle těchto kritérií se VPMD objevila minimálně na jednom oku u 5,7 % účastníků studie. Prevalence onemocnění narůstala s věkem od 1,2 % u účastníků studie do 65 let až po 6,4 % u věkové skupiny 65-74 let. Ve věkové kategorii nad 75 let se VPMD vyskytla u téměř 20 % osob. V této populaci byla suchá forma více než 15krát častější než forma vlhká¹³. Americká národní studie *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) vyšetřovala 3056 účastníků ve věku 45 až 64 let po dobu více než 3 let. Věkem podmíněná makulární degenerace zde byla definovaná zrakovou ostrostí 20/25 nebo nižší. Dále byly vymezeny následující znaky onemocnění:

- drúzy
- disciformní jizva
- přítomnost lipidů
- subretinální krvácení
- ztráta makulárního reflexu s disociací pigmentu

Jediná evropská velikostí srovnatelná je studie z Holandska- *Rotterdam Study*, která vyšetřila celkem 6251 účastníků ve věku 55 až 98 let žijících v Holandsku.

Atrofická forma VPMD byla definována jako přesně ohraničená oblast okrskové atrofie RPE s jasně viditelnými chorioideálními cévami. Neovaskulární forma VPMD byla definována jako:

- serózní nebo hemoragické odchlípení RPE,
- subretinální neovaskulární membrána,
- subretinální hemoragie,
- subretinální fibrózní jizva.

Suma prevalence VPMD byla v této studii 1,7 %, což je nižší prevalence než ve studiích v USA. Prevalence znovu narůstá s věkem¹⁴. Ačkoliv se tyto populační studie mírně liší jak ve svých definicích, tak i v terminologii, všechny shodně ukazují na to, že prevalence VPMD narůstá s věkem a že je výskyt atrofické formy VPMD výrazně vyšší než formy neovaskulární¹¹.

4.4.1.2 Incidence

Incidence je počet nemocných s nově vzniklým onemocněním na 100 000 obyvatel za období kalendářního roku či jiné přesně definované období.

Incidenčních studií, které se zabývají VPMD, je velmi málo. Např. Framinghamská studie využila data o prevalenci a věku k přibližnému odhadu pětileté incidence onemocnění podle již výše uvedené a dané definice. Tento odhad činil u 65letých 2,5 %, u 70letých 6,7 % a u 75letých 10,8 %¹³.

4.4.1.3 Celkové rizikové faktory VPMD

Výsledky studií především v otázce celkových, ale i makulárních rizikových faktorů jsou značně nekonzistentní a mnohdy si dokonce odporují. Intervenční studie k průkazu rizikových faktorů jsou obtížně proveditelné, takže pro potvrzení jednotlivých rizikových vlivů zbývají převážně menší průřezové, *case-control* (případ- kontrola) studie, srovnávací a sekundárně analytické studie, jejichž vstupní kritéria, hodnotící parametry a v neposlední řadě i počet probandů mohou být příčinou těchto kontroverzí. V následujícím přehledu jsou vyjmenovávány některé vlivy, které jsou uváděny do souvislosti se vznikem a rozvojem obou typů VPMD:

- Ateroskleróza,
- Cerebrovaskulární onemocnění
- Levostranná komorová hypertrofie,
- Hypovitaminóza A a C,
- Snížená vitální kapacita plic, či opakované chronické plicní infekty,
- Hypermetropie,
- Nižší úroveň vzdělání,
- Nižší vzrůst,
- Výskyt VPMD v rodině,
- Vyšší plazmatická hladina vitamínu A,
- Světlá duhovka,
- Vyšší příjem nasycených mastných kyselin a cholesterolu,
- Systolický tlak vyšší než 95 mm Hg,
- Užívání antihypertenziv (thiazidová diuretika),
- Nižší hladiny sérových karotenoidů,
- Vyšší kalorický příjem,
- Změněná lipidová triáda,
- Kouření,
- Kouření v anamnéze,

- Vyšší index tělesné hmotnosti (BMI),
- Rodinná anamnéza,
- Vyšší expozice modrého (465-480nm), viditelného světla, UV záření
- Vyšší spotřeba piva,
- Degenerativní změny elastických vláken v oblastech pokožky chráněné před sluncem,
- Vyšší hladina cukru v krvi,
- Diabetes,
- Vyšší hladiny hs CRP
- Infarkt myokardu.

4.4.2 Patogeneze

Věkem denzita fotoreceptorů, zvláště tyčinek (které jsou umístěny parafoveolárně a ve skutečnosti jejich hustota v sítnici je při okrajích makuly) klesá na 30 %. Základním předpokladem zachování dobrých zrakových funkcí i ve stáří je neporušená funkce RPE, BM a choriokapilaris. Selhání některé z výše jmenovaných složek systému vidění vede ke vzniku VPMD¹¹. RPE je vrstvou buněk vykazující vysokou metabolickou aktivitu. Buňky RPE slouží k fagocytóze použitých zevních segmentů fotoreceptorů a recyklaci fotopigmentu zpět do fotoreceptorů. Odpadní materiál je po fagocytóze fagozomy enzymaticky zpracován a bazální částí buňky RPE vyloučen směrem do BM¹⁵. Se zvyšujícím se množstvím lipofuscinu v buňce RPE se snižuje její metabolická aktivita a dochází sekundárně ke snížení počtu fotoreceptorů¹⁶.

BM je velmi důležitá struktura, která odděluje vysoce metabolicky aktivní kompartment buněk RPE a strukturu zajišťující jeho nutriční choriokapilaris. Jedná se o semipermeabilní membránu, která tvoří základnu pro buňky RPE na straně jedné a endotelové buňky choriokapilaris na straně druhé¹¹. Porucha BM vede k poruše výživy RPE a fotoreceptorů. BM a její stárnutí má tedy zásadní roli v patofyziologii VPMD¹⁷.

Choroidální krevní průtok v makulární oblasti je nejvyšším v celém těle¹⁸. Buňkám RPE a fotoreceptorům zajišťuje dostatečný přísun kyslíku a živin, které jsou nezbytné pro bezchybnou funkci celého systému vidění¹⁹. Uvnitř choriokapilaris

dochází k fyziologické obnově cévních pletení. Endotelové buňky na popud VEGF proliferují skrze bazální membránu kapilár a formují nové cévní klíčky. Pokud tento proces přestoupí fyziologické hranice (na podkladě ischemie) dochází ke vzniku choroidální neovaskulární membrány²⁰.

4.4.3 Subjektivní příznaky

Pacienta přivádí k oftalmologovi obvykle pocit zhoršujícího se vidění nejdříve do blízka, kdy je rušivě vnímáno deformování a výpadky písmen, tzv. metamorfopsie. Postupně tyto mikroskotomy splývají v absolutní centrální kotom, který zhoršuje čtení do blízka až k úplné neschopnosti číst a psát i přes užití zvětšujících pomůcek. Zhoršuje zrakovou ostrost i do dálky a pro rozeznávání obličejů a nápisů musí postižený otáčet hlavu, aby obraz dopadal na nepostižená místa sítnice. V konečných stádiích může být centrální zraková ostrost snížena až na počítání prstů před okem, pro orientaci v prostoru využívá nemocný zachované periferní vidění. Proces ve většině případů probíhá na obou očích asymetricky, druhé oko bývá postiženo v průběhu několika let.

K poklesu centrální zrakové ostrosti dochází u atrofické formy pozvolna během několika let, u exsudativního typu však udávají nemocní rychlé snížení vizu v důsledku rostoucí subretinální membrány¹¹.

4.4.4 Vyšetřovací metody

Mezi speciální vyšetřovací metody patří fluorescenční a indocyaninová angiografie a optická koherenční tomografie. Všechny tři tyto metody mají své místo jak v diagnostice, tak v terapii VPMD.

4.4.4.1 Fluorescenční angiografie

Fluorescenční angiografie (FA) je založena na principu fluorescence, který se vyvolá excitací molekul látky schopné fluorescence (v případě FA jde o sodnou sůl fluoresceinu) netermálním světelným zářením. V průběhu vlastní excitace se aktivují volné elektrony, které přecházejí do excitované pozice. Tento stav je ovšem nestabilní a během krátké doby dochází k návratu excitovaných elektronů do výchozí pozice. Tento

návrat je doprovázen emisí světelné energie o vyšší vlnové délce, než je vlnová délka světla, která fluorescenci vyvolala²¹.

4.4.4.2 Indocyaninová angiografie

Indocyaninová angiografie je diagnostický postup, který dovede zobrazit chorioideální cirkulaci. Poprvé byla použita v medicíně v roce 1957²². Zlepšení metodiky přineslo zavedení videoangiografie s použitím senzitivní infračervené videokamery a záznamem na videokazetu²³. Dalším zdokonalením bylo zavedení digitálních zobrazovacích systémů, které umožnily zobrazení s vysokým rozlišením²⁴.

4.4.4.3 Optická koherenční tomografie

Optická koherenční tomografie (OCT) je neinvazivní, nekontaktní, transpupilární vyšetření sítnice při použití paprsku o určitém vlnovém rozpětí. Vyšetření OCT je vlastně analogií A- skenu při ultrazvukovém vyšetření, ovšem místo zvuku je užíváno světlo. Přístroj je interferometr a měří časové rozdíly v reflexi kontrolního paprsku odraženého od jednotlivých vrstev retiny²⁵.

4.4.5 Klinické formy a klasifikace

Věkem podmíněná makulární degenerace může být zejména ve svých iniciálních stádiích velmi obtížně odlišitelná od přirozeného procesu stárnutí sítnice. Stárnutí je fyziologický proces postihující všechny tělesné orgány a tkáně. Jedná se o stav, který není projevem žádné nemoci. Každá tělesná buňka má naplánován životní cyklus od svého vzniku až po apoptózu. Tělesné tkáně, ve kterých nedochází k mitotické obnově zaniklých buněk (nervová tkáň, sítnice) mají vysokou incidenci manifestace projevů stárnutí zejména po 75. roce života¹¹.

Věkem podmíněnou makulární degeneraci rozdělujeme na 2 kategorie: suchou (neexsudativní) a vlhkou (exsudativní). Suchá forma značně převažuje a je jí postiženo asi 85-90 % pacientů. Vlhká forma se vyskytuje u zbylých 10-15 %. Co do závažnosti postižení centrální zrakové ostrosti je však vlhká forma zodpovědná v 85 % za těžkou ztrátu zrakové ostrosti¹¹.

4.4.5.1 Suchá forma VPMD

Suchá forma VPMD je charakteristická výskytem drúz, změnami ve vrstvě retinálního pigmentového epitelu (RPE) a v konečném stádiu onemocnění grafickou atrofií RPE. Suchá forma se vyskytuje nezávisle na chorioideální neovaskulární membráně (CNV). Je spojena s chorioretinální atrofií bez patrných defektů v BM. Klinické studie prokazují pokles chorioretinálního průtoku²⁶. Chorioretinální atrofie vede k následné degeneraci buněk RPE, která je spojena s involucí fotoreceptorů v postižené oblasti²⁷.

Drúzy se podle vzhledu a velikosti dělí na dvě základní kategorie:

1. **Tvrdé drúzy**: jejich velikost je menší než 63 μm , při oftalmologickém vyšetření je diferencujeme jako malá, dobře ohraničená depozita žluté barvy. Tento typ drúz je asociován s velmi malým rizikem přechodu k pozdním formám VPMD. Výskyt více než 8 tvrdých drúz je ovšem asociován s rizikem vzniku měkkých drúz¹¹.

2. **Měkké drúzy**: jejich velikost je větší než 63 μm , jsou neostře ohraničené, často splývají. Jsou asociovány s vyšším rizikem vzniku vlhké formy VPMD. Výskyt drúz ovšem není statickým jevem. Objevují se charakteristické dynamické změny. Tvrdé drúzy se mohou zvětšovat a měnit na měkké drúzy. Měkké drúzy se mohou zvětšovat a splývat do velkých fluentní tvarů. To vede k ablaci RPE¹¹.

Další změnou, kterou lze pozorovat, je kalcifikace. Uvnitř drúz jsou patrné krystaly cholesterolu. Drúzy s postupujícím věkem obvykle přibývají. Oboustranná přítomnost měkkých drúz je významným rizikovým faktorem rozvoje pokročilých forem VPMD (geografická atropie RPE, CNV). Tvrdé drúzy jsou naopak častěji spojeny s výskytem suché formy VPMD²⁸.

4.4.5.2 Vlhká forma VPMD

Vlhká forma VPMD je charakterizována ablací RPE, chorioideální neovaskularizací, nebo subretinální hemoragií v oblasti makuly. Terminální stádium vlhké formy VPMD představuje disciformní jizva. V posledním desetiletí byly v rámci

vlhké formy VPMD vyčleněny další dvě klinické jednotky: retinální angiomatozní proliferace (RAP) a polyploidní chorioideální vaskulopatie (PCV).

Chorioideální neovaskulární membrána vzniká, když se objeví defekt BM. Novotvořené cévy choriokapiláris poté přes defekt prorůstají do prostoru pod RPE a později i pod neuroretinu. Velikost edému neuroretiny je známkou aktivity CNV¹¹.

Chorioideální neovaskulární membrána je definovaná jako růst chorioideálních cév přes Bruchovu membránu do RPE a neuroretiny. Základním vaskulárním faktorem, který se na jejím růstu podílí je VEGF²⁹.

VEGF je produkován buňkami RPE a slouží k fyziologické obnově choriokapilaris. Vlivem hypoxie ve stáří dochází k jeho nadprodukcii, která vede k přílišné proliferaci chorioideálních cév, a tím vzniká CNV¹¹.

4.5 *Metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu*

4.5.1 *Aferéza*

Slovo aferéza pochází z řečtiny a znamená odstranění. Pojem LDL-aferéza lze tedy chápat jako odstranění LDL-cholesterolu. Tento název byl poprvé užit profesorem Borbergem jako pojmenování pro selektivní eliminaci LDL-cholesterolu na podkladě imunoadsorpce, reakce specifické protilátky s odpovídající strukturou LDL-částice. V tomto smyslu je název stále užíván některými autory^{30,31}.

V literatuře se tento název používá ve smyslu označujícím všechny metody odstraňující LDL-cholesterol, a to i v případě těch, které nejsou v eliminaci LDL-částic zdaleka tak selektivní, jako je „původní“ LDL-aferéza na principu imunoadsorpce.

Selektivní metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu jsou v České republice v současnosti prováděny pouze na pracovišti hemaferézy FN Hradec Králové, spektrum nemocných je velmi omezené a detaily této problematiky se týkají relativně úzkého okruhu odborníků. Proto některé metody extrakorporální eliminace a jejich modifikace nemají zavedený český název.

První metodou užitou k extrakorporální eliminaci cholesterolu byla **plazmaferéza**. Principem plazmaferézy je odstranění plazmy obsahující nežádoucí součásti. Její oddělení z plné krve, probíhající buď pomocí centrifugace nebo s pomocí membránové separace, spočívající v použití membrán o definované velikosti pórů, zadržujících krevní tělíska. Odstraněná plazma může být nahrazena roztoky krystaloidů nebo koloidů, albuminem nebo plazmou. Nevýhodou této metody je její neselektivita eliminace nežádoucí látky, v tomto případě LDL-cholesterolu. Při déletrvající léčbě dochází k závažným ztrátám imunoglobulinů, hormonů, transportních proteinů a stopových prvků. Nežádoucí je i odstranění lipoproteinů o vysoké hustotě - high density lipoproteins (HDL). Plazmaferéza se stala východiskem pro vývoj selektivnějších metod, které jsou až na výjimky založeny na dalším zpracování separátorem oddělené plazmy³².

Selektivní metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu již pracují na základě imunitní nebo fyzikálně chemické interakce mezi aktivním povrchem eliminačního média a hlavní substancí LDL-částic apolipoproteinem B₁₀₀ (apo B₁₀₀), nebo na principu filtrace podle velikosti částic.

4.5.2 Imunoadsorpce LDL-cholesterolu

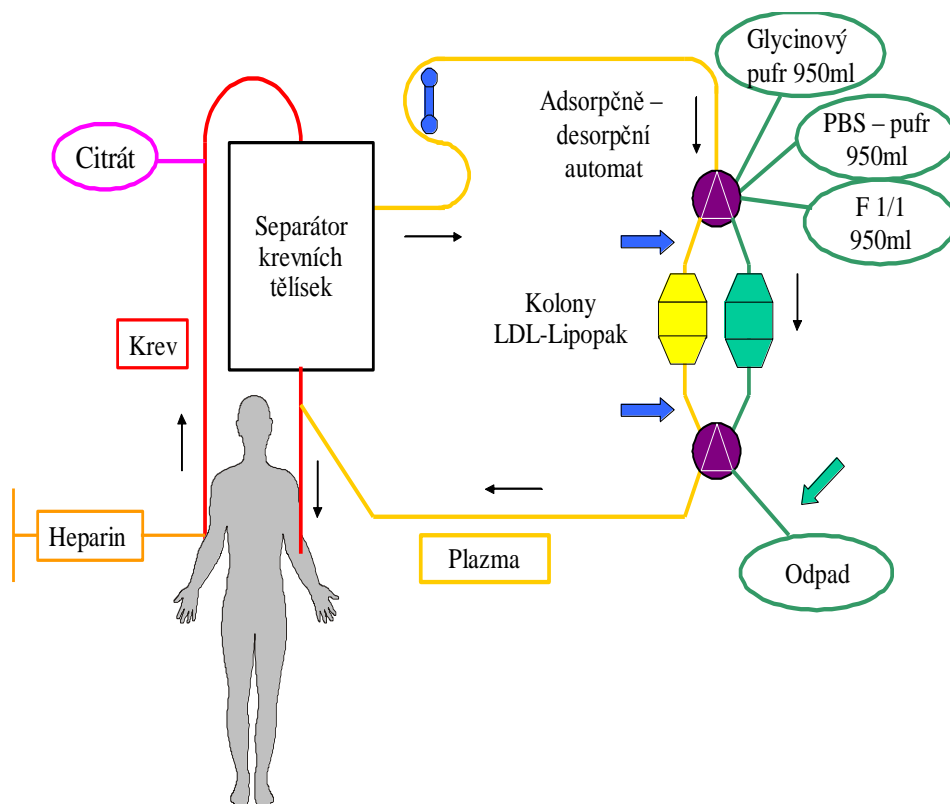
Imunoadsorpce LDL-cholesterolu (IA, LDL-imunoadsorpce) je nejstarší ze selektivních metod. Využívá specifickou interakci polyklonálních protilátek s antigenními strukturami apoB₁₀₀. Tento princip zajišťuje vysokou selektivitu eliminace.

Přístrojový systém (viz Obrázek č. 1: Schéma imunoadsorpce LDL-cholesterolu³³) se skládá ze separátoru krevních tělísek, pracujícího na principu buď centrifugace nebo filtrace, a adsorpčně-desorpčního automatu, který řídí střídavou adsorpci a regeneraci (desorpci) dvou kolon, obsahujících protilátky proti lidskému apoB₁₀₀. Kolony jsou určeny k opakovanému použití³⁴. K dispozici jsou například kolony Therasorb firmy Baxter (Unterschleissheim, Německo) nebo LDL-Lipopak, Pocard Ltd. (Moskva, Rusko).

Kolony LDL-Lipopak (Pocard), používané na pracovišti hemaferézy FN HK, obsahují na sepharózový gel navázané polyklonální ovčí protilátky proti lidskému apoB₁₀₀. Při průchodu kolonou jsou z plazmy odstraňovány LDL-částice a očištěná plazma se po spojení s krevními tělisky vrací zpět do oběhu pacienta. Když je kapacita kolony vyčerpána, adsorpčně-desorpční automat odkloní tok plazmy do druhé kolony a zároveň zahájí regeneraci první kolony roztokem glycinového pufru o pH 2,4 (Medicap Clinic, GmbH, Ulrichstein, Německo), který uvolňuje vazbu mezi protilátkami a apoB₁₀₀. Následně je pH v koloně upraveno roztokem PBS pufru o pH 7,4 (Medicap Clinic, GmbH, Ulrichstein, Německo), který je poté odstraněn pomocí fyziologického roztoku. V automatu tak současně jednou kolonou prochází plazma a druhá kolona je regenerována. Toto sekvenční použití adsorpce a desorpce vede k teoreticky neomezené

kapacitě systému, což má výhodu v možnosti nastavení délky procedury podle individuálních potřeb pacienta.

Mezi jednotlivými LDL-aferezami jsou regenerované kolony skladovány při teplotě 2-8°C, naplněny roztokem PBS pufru s příměsí 0,01% azidu sodného (Medicap



Clinic, GmbH, Ulrichstein, Německo), který je před dalším užitím zcela odstraněn fyziologickým roztokem (5000 ml F 1/1 na každou kolonu).

Obrázek č. 1 Schéma imunoadsorpce LDL-cholesterolu

Další vysoce selektivní metodou je **adsorpce na dextransulfát (DSA)**, firma Kaneka, Osaka, Japonsko), která pracuje na principu elektrostatické interakce mezi kladným nábojem apoB₁₀₀ a záporným nábojem řetězců dextransulfátu[31]. Kolona váže VLDL, LDL a lipoprotein (a) [(Lp(a)]. I zde je užívána dvojice kolon (Liposorber LA), které se střídají v pracovním a regeneračním cyklu.

4.5.3 Metody založené na filtraci částic plazmy

Metody založené na filtraci částic z plazmy, nazývané v anglosaské literatuře souhrnně „*secondary membrane plasma fractionation*“ odstraňují z plazmy vysokomolekulární proteiny pomocí sekundárního filtru. Selektivita filtrace závisí na fyzikálních vlastnostech použitého filtru, především na velikosti jeho pórů.

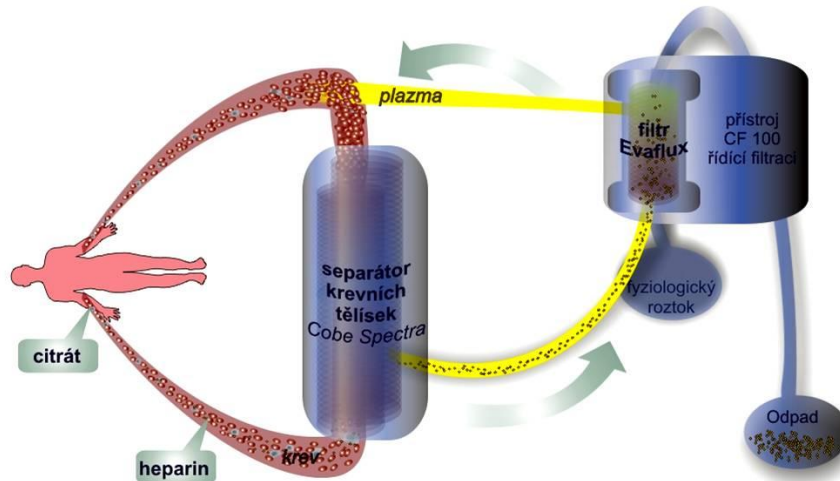
Kromě odstranění patologické substance, v našem případě LDL-částic, jsou eliminovány i další makromolekuly, jako je fibrinogen, α -2-makroglobulin, imunoglobuliny, fibronektin atd. Výsledkem je zlepšení reologických vlastností krve, dané především snížením viskozity plazmy, ale i snížením agregace a adhezivity trombocytů a erytrocytů a zlepšením jejich flexibility. Následkem je relativně setrvalé zlepšení mikrocirkulace a tím i tkáňové oxygenace.

V případě užití primárního přístroje, který pracuje na principu filtrace, jsou modifikace této metody nazývány dvojitá filtrační plazmaferéza - *double filtration plasmapheresis (DFPP)*, kaskádová filtrace, rheoferéza, nebo membránová diferenciální filtrace - *membrane differential filtration (MDF)*^{7,35}.

V uspořádání rheoferézy popisovaném v této rigorózní práci je plazma získávána kvalitním separátorem (Cobe- Spectra), je perfektně prostá buněčných elementů po vysokootáčkové centrifugaci. Pak je proháněna „druhým stupněm“- filtrem. Jako sekundární filtry se doporučují filtry Asii, Kuraray, Kaneka, Ciprex, Excorim i další^{36,37}. Na pracovišti FNHK se používají pro práci filtry Evalux 4A a 5a (Kurare) s etylen-vinyl-alkoholovými dutými vlákny, které mají otvory o velikosti 0,03 nebo 0,04 mikrometru. Průtok plazmy je kontinuální, antikoagulace je prováděna heparinem. Velikost pórů filtru umožňuje záchyt značného množství LDL-cholesterolu, lipoproteinu (a), fibrinogenu, alfa₂ makroglobulinu a imunoglobulinů, zejména IgM.

Princip modifikace hemorheoferézy prováděné na pracovišti FNHK je uveden na obrázku č 2³⁰.

SCHÉMA HEMOREOFERÉZY



Plazma je oddělena od krevních tělísek pomocí separátoru Cobe Spectra a dále je čerpána pumpou separátoru do linek přístroje CF100 (Infomed, Ženeva, Švýcarsko), který řídí průtok plazmy přes kapilární filtr Evaflux 4A nebo 5A (Kuraray, Osaka, Japonsko). Očištěná plazma se spojuje s krevními tělísky a je vedena zpět do krevního oběhu nemocného. Při vzestupu tlaku v kapilárahch filtru přístroj automaticky provede proplach kapilár filtru fyziologickým roztokem, který je spolu s odfiltrovanými částicemi odveden do odpadního vaku. Antikoagulace je zajištěna kontinuální nitrožilní aplikací citronanu sodného (ACD-A, Baxter, Mnichov, Německo) a iniciálním jednorázovým podáním heparinu 4000 i.v.

Obrázek č. 2: Princip modifikace hemoreoferézy prováděné na pracovišti FNHK

Na rozdíl od výše popsané mnohem selektivnější imunoadsorpce, dochází u těchto metod k významné eliminaci imunoglobulinů – IgG 15 %, IgA 24 %, IgM 63 %³⁸.

Z pohledu eliminace LDL-cholesterolu platí, že čím více je metoda selektivní, tím má menší účinky na rheologické vlastnosti krve.

4.5.4. Účinky léčby hemoreoferézou

Pro účely této práce se podařilo zajistit (nebo nově zavést) všechny plánované ukazatele ke kvalitnímu sledování změn po procedurách.

V současné době se kromě běžného biochemického a hematologického profilu, sledují tyto parametry:

- celkový cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, Lp(a)

- vzhledem k aktivnímu podílu selektinů nebo jiných adhezních molekul a makrofágů na aktivitě endotelu: vyšetření sP-selektinu, MCP-1 (monocyte chemotactic peptide) a endotelinů
- sledování parametrů patofyziologie a funkce krevní destičky:
 - parametry: počet, MPV (střední objem trombocytu), PDW (šíře distribuce histogramu destiček podle jejich objemu) a PCT (destičkový hematokrit)
 - markery aktivace destiček fenotypizací,
- analýza cirkulujících endoteliálních buněk a progenitorových buněk - studováno pomocí průtokové cytometrie;
- základní ukazatele aktivity endotelu (trombomodulin, vW-factor) a fibrinolýzy (fibrinogen, tPA = tkáňový aktivátor plazminogenu a jeho inhibitor PAI-1)
- rheologické parametry (viskozita krve a plazmy, fibrinogen, α_2 -makroglobulin, imunoglobuliny)

4.6 Charakteristika sledovaných markerů aterosklerózy a imunitního systému

V rozsáhlých klinických studiích byl ověřen význam mnohých ukazatelů imunitního systému popisujících zánětovou odpověď jako biomarkerů s prediktivní vahou určující klinické komplikace aterosklerózy. Jsou jimi zejména zvýšené hladiny prozánětových cytokinů (IL-6, IL-1, IL-18, TNF α), látek uvolňovaných degranulací buněk zánětu (myeloperoxidáza, metaloproteinázy), solubilní formy regulačních membránových molekul (solubilní CD40L), solubilní formy adhezních molekul leukocytů i endotelových buněk (sVCAM-1, sP-selektin, sE-selektin, sICAM-1), hsCRP, fibrinogen, či adipokiny nebo leptin³⁹.

Uvedené biomarkery jsou tvořeny různými buněčnými typy, které se podílejí v patogenezi aterosklerózy. Zdrojem nejsou pouze buňky imunitního systému, ale i jiné buněčné typy, např. endotelové buňky, buňky hladké svaloviny a hepatocyty.

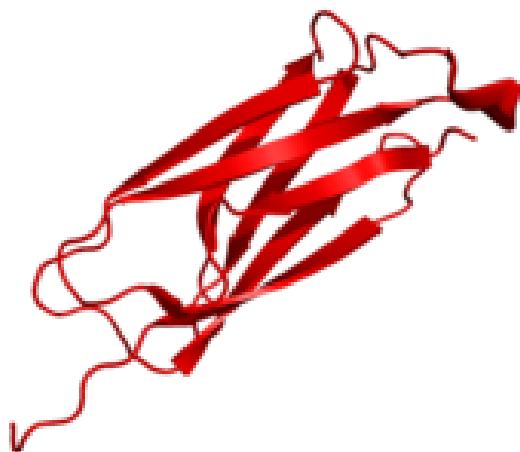
Nejvýznamnějším zdrojem bílkovin akutní fáze jsou hepatocyty, které je tvoří po stimulaci prozánětovými cytokiny, zvláště IL-6. Z bílkovin akutní fáze má nepochybně

největší význam pentraxinová molekula CRP. C-reaktivní protein je prokazatelný v aterosklerotických placích, kde se váže na chemicky modifikované LDL lipoproteiny. Jako solubilní pattern recognition receptor (PRR) stimuluje svou vazbou aktivaci komplementové kaskády a zesiluje akumulaci monocytových elementů. Navíc CRP snižuje tvorbu oxidu dusnatého v endotelových buňkách a zesiluje tvorbu chemokinů v buňkách hladké svaloviny a endotelových buňkách⁴⁰⁻⁴³. Tyto markery mohou sloužit nejenom jako diagnostická kritéria, ale i jako nástroje reflexe úspěšnosti extrakorporální intervence. Řada těchto molekul je sledována i v rámci hodnocení extrakorporálních LDL eliminačních metod^{30,31,44,45}.

V rámci této práce byly podrobněji studovány α -2-makroglobulin, solubilní forma adhezivní molekula P-selektin, solubilní forma endoglinu, interleukin IL-10, hs CRP, MCP1 a IgM.

4.7 Plazmatické glykoproteiny (α -2-makroglobulin)

α -2-makroglobulin (viz Obrázek č. 3) je plazmatický glykoprotein produkovaný játry, který se váže a inhibuje/štěpí proteinázy většiny podtříd. Jeho fyziologický význam tkví v inhibici nežádoucí excesivní proteinázové aktivity ve tkáních^{46,47}. Je jedním z nejdéle známých imunologických aterogenních faktorů a nověji se poukazuje i na význam jeho polymorfismu v aterogenezi⁴⁸.



Obrázek č. 3, 3D struktura α -2-makroglobulinu, převzato z PDB⁴⁹.

Štěpící schopnost α -2-makroglobulinu se prokazatelně podílí na rozvoji ATS plátů prostřednictvím poškozování intracelulární matrix^{50,51}. α -2-makroglobulin byl v aterosklerotických tepnách potvrzen ve zvýšeném množství⁵¹. U myši je prokázáno, že působí jako reaktant akutní fáze, u lidí se tento efekt však dokázat nepodařilo. Je známo, že α -2-makroglobulinový receptor je shodný s LDL-related jaterním receptorem a podílí se tak na odstraňování chylomikronů z oběhu^{52,53}. Proto se předpokládá, že α -2-makroglobulin může kompetitivně inhibovat vychytávání chylomikronových zbytků a vést tak k akceleraci ATS⁵⁴. α -2-makroglobulin byl také identifikován jako inhibitor proteinu C⁴¹. Jelikož protein C je proteolytickým inaktivátorem koagulačních faktorů VII a V, zvýšená hladina α -2-makroglobulinu má prokoagulační účinek.

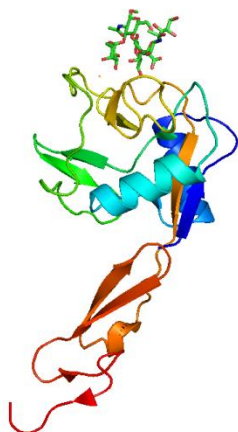
Z pohledu VPMD představuje α -2-makroglobulin významně reofereticky ovlivnitelný protein⁸ se zásadním reologickým významem⁵⁵. Významnou vlastností tohoto proteinu je i jeho schopnost tvorby agregátů červených krvinek⁵⁶.

4.7.1 Adhezivní molekuly (P-selektin)

Za zahájení první fáze průběhu aterosklerotických změn lze považovat interakce mezi leukocyty a endotelem jsou procesy zvané „capture“ a „tethering“ (volně přeloženo jako „zachycení“ či „zajetí“ a „uvázání“ leukocytu), po kterých následuje tzv. „rolling“, valivý pohyb leukocytu po aktivovaném endotelu. Tyto děje zprostředkovávají selektiny⁴². V další fázi postupně dochází k pevné adhezi leukocytů k endotelu, která je umožněna integrinovými molekulami na povrchu leukocytů a intracelulárními adhezními molekulami (např. ICAM-1) na straně endotelu. Po pevném přilnutí dochází k transmigraci leukocytů do stěny cévy⁴³.

K expresi adhezních molekul dochází po aktivaci endoteliálních buněk pomocí IL-1, TNF- α a INF- γ ⁴³. Interakce mezi endotelem a složkami cirkulující krve hraje významnou roli v patogenezi mnoha různých stavů, jako je například ateroskleróza a její komplikace a nádorová onemocnění. Solubilní formy selektinů a ICAM-1 jsou považovány za ukazatele zánětlivé aktivace endotelu⁵⁷.

P-selektin (CD62P), viz Obrázek č. 4⁴⁹) je transmembránovým proteinem typu I s typickým N-terminálním lektinem a EGF-like doménou, která umožňuje zachycení leukocyty na aktivovaném endotelu a tzv. tethering a rolling.



Obrázek č. 4, 3D struktura p-selektinu, převzato z PDB⁴⁹

Jeho vazebným partnerem je PSGL-1 (P-selectin Glycoprotein Ligand-1), přítomný na povrchu většiny leukocytů a v menší míře i na povrchu trombocytů. P-selektin je produkován a skladován v α granulích destiček a ve Weibel-Paladeho tělískách endoteliálních buněk a je exprimován na jejich membráně po stimulaci, například trombinem nebo histaminem⁵⁸. Kinetika membránového P-selektinu je velmi rychlá, během minut je přesunut z intracelulárních zásob do povrchové membrány trombocytů a endotelu, odkud je rychle uvolňován do plazmy, kde plní další funkce. Z membrány pak opět rychle vymizí⁵⁹. Poločas solubilní formy P-selektinu (sP-selektin) nebyl prozatím stanoven. U nemocných s ischemickou chorobou srdeční byl nalezen diurnální rytmus sP-selektinu s maximem hladin ve večerních hodinách, zatímco plazmatické hladiny sE-selektinu zůstaly během dne stabilní⁶⁰.

Ve vztahu k vaskulárním poruchám je exprese P-selektinu považována za indikátor endoteliální a/nebo trombocytární aktivity⁴². Množství cirkulujícího P-selektinu, který je uvolněn z membrán endotelu a trombocytů, odráží rozsah zánětlivého poškození. U myšičího modelu aterosklerózy byla prokázána zvýšená hladina

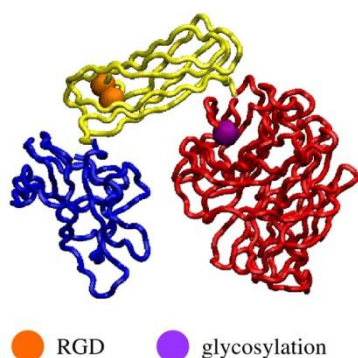
sP-selektinu, přičemž většina cirkulujících molekul P-selektinu byla endoteliálního původu⁶¹.

Podobně jako u leukocytů, iniciační fází adheze trombocytů je také tzv. rolling, závislý na expresi P-selektinu na povrchu endotelu⁶². Vlivem P-selektinu se aktivované cirkulující trombocyty sdružují s monocyty⁶³ a společně „rolují“ po endotelu⁶⁴. Destičkový i solubilní P-selektin hrají také významnou úlohu při vzniku a progresi aterosklerotických lézí⁴⁶. P-selektin je též považován za ukazatel destabilizace aterosklerotického plátu⁶⁵. V nepřítomnosti zranění nebo zánětlivého onemocnění může vysoká hladina solubilního P-selektinu sloužit jako ukazatel rizika kardiovaskulárních příhod a jejich komplikací⁶⁶.

S pohledu CNV je role monocytů a makrofágů zřejmá a jejich deplece prokázala pozitivní vliv při laserem indukované neovaskularizaci⁶⁷⁻⁶⁹. Studium myších makrofágů na modelu CNV však poukazuje na význam způsobu deplece a stáří leukocytů, které mohou mít na výslednou progresi zásadní vliv^{70,71}. Obecně se předpokládá, že mechanismy adheze a interakce adhezních molekul leukocytů jsou v choriodálním prostoru podobně jako v jiných tkáních. Obdobně jako u jiných endoteliálních buněk je exprese P-selektinu up-regulována řadou podnětů jako např. aktivací komplementu⁷². Na rozdíl od ostatních endoteliálních buněk, selektiny se váží na cílové struktury glykosylovaných proteinů prostřednictvím svých glykoproteinů⁷³.

4.7.2 Endoglin

Endoglin (CD105, viz Obrázek č. 5⁷⁴) je homodimerický transmembránový glykoprotein o molekulární hmotnosti 180 kDa (Obrázek č. 3D struktura lidského endoglinu)⁷⁴.



Obrázek č. 5, 3D struktura lidského endoglinu s vyznačením RGD (motivu buněčné adheze) a místa glykosylace⁷⁴.

Patří do rodiny transformujících růstových faktorů β_7 (TGF- β). Endoglin je vazebným partnerem TGF- β 1 a TGF- β 3 a prostřednictvím modulace buněčné odpovědi na tyto cytokiny ovlivňuje angiogenezi. Tato interakce je zprostředkována cytoplazmatickými proteiny z rodiny Smad⁷⁵. Je selektivně konstitutivně exprimován na aktivovaném endotelu, nejčastěji na kapilárách, arteriolách a venulách⁷⁶. Endoglin byl také popsán na liniích monocytů, buněk hladké svaloviny^{77,78}, kožních buněk⁷⁹ a fibroblastů⁸⁰. Zvýšená exprese endoglinu byla popsána na buňkách hladké svaloviny ve studii buněčných populací aktivovaných buněk aterosklerotických plátů, zatímco u kontrolních nepostižených buněk arteriálních stěn se jej detekovat nepodařilo⁸¹.

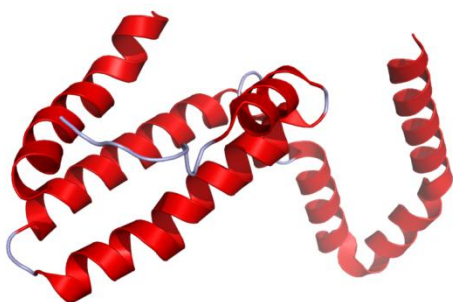
CD105 může být též uvolněn do oběhu z buněčné membrány jako solubilní endoglin (sCD105). Plazmatické nebo sérové hladiny sCD105 jsou užitečným znakem aktivace endotelu či jeho poškození nebo reparace^{82,83}. sCD105 a von Willebrandův faktor jsou zvýšeny u pacientů s ATS a korelují s celkovými hladinami cholesterolu⁸⁴. Normalizace hladin endoglinu je považována za důležitý indikátor regrese ATS u pacientů s familiární hypercholesterolémií, kde aktivace endoglinu (výše popsané buněčné typy) hraje zásadní roli^{77,79,80,83}. Elevace hladin sCD105 byla pozorována u pacientů s angiózními bolestmi (stenokardií), s pozitivním stresovým testem, ale s normálním nálezem kardiogramu. Naopak, u pacientů s extensivním poškozením koronárních arterií hladiny sCD105 zvýšeny nebyly. Elevace hladin sCD105 by tedy mohla sloužit jako indikátor časného poškození, zatímco jeho snížení spolu s hladinami TGF- β by hovořilo pro pozdější fáze. Vysvětlením tohoto jevu by mohlo být vyvázání volného aktivního TGF- β solubilním endoglinem⁸³. Ve vztahu k extrakorporální LDL

eliminaci terapii je endoglin sledovaným markerem a jeví se jako slibný kandidát na ukazatele účinnosti vlastní terapie³⁶.

V souvislosti s VPMD se ukázalo, že indukovaná CNV u krysího modelu má za následek expresi CD105 v prvních 7 dnech po aplikaci laserové noxy. Po 4 týdnech od zákroku, kdy se již předpokládá ústup angiogeneze, jsou však hladiny CD105 signifikantně sníženy. Navíc zde byla pozorována přímá korelace mezi hladinami CD105, positive-microvessel density a mezi hladinami VEGF ($r = 0.989$, $P < 0.01$)⁸⁵. Výzkum exprese CD105 u endoteliálních buněk u CNV u zkoumaných pacientů však prokázal pouze selektivní expresi. Nedetekovatelnost CD105 v přítomnosti proliferačního markeru Ki-67 naznačuje, že exprese CD105 nemusí být nezbytná pro endoteliální proliferaci, přesnější zdůvodnění však vyžaduje rozsáhlejší studie. Nicméně, CD105 byl detekován i u neproliferujících neovaskulárních struktur, což pravděpodobně odráží jejich postmitotickou aktivitu⁸⁶.

4.7.3 IL-10

IL-10 (viz. Obrázek č. 6) je jeden z hlavních imunoregulačních cytokinů zánětlivé reakce.



Obrázek č. 6, 3D struktura Interleukinu 10, převzato z PDB⁴⁹

Hraje zásadní roli v negativní regulaci adaptivní i přirozené imunity zodpovědné za chronický zánět. Původně byl popsán jako inhibitor produkovaný T_H2 lymfocyty⁸⁷. Jeho hlavní fyziologickou funkcí je restrikce zánětové odpovědi, blokování tvorby proinflamatorních cytokinů a regulace proliferace řady buněčných populací jako např. T

a B lymfocytů, NK buněk, dendritických a žírných buněk. V současnosti stoupá i jeho význam v regulaci prozánětlivé odpovědi u alergií⁸⁸. Bylo prokázáno, že respirační expozice alergenům může indukovat T buněčnou toleranci a tlumit rozvoj astmatické reakce. Klíčovou roli v tomto procesu hraje právě produkce IL-10 dendritickými buňkami s následnou indukcí tolerance⁸⁹. Mimoto, T_H2 odpověď charakteristická pro manifestaci alergie je regulována přirozenými CD4+ T regulačními lymfocyty produkující IL-10⁹⁰.

Ve vztahu k ATS inhibuje IL-10 produkci řady cytokinů⁹¹ a jeho schopnost atenuace progresu byla nezpochybnitelně prokázána na několika animálních modelech⁹². Řada studií se pak zabývá vztahem IL-10 a koronárního arteriálního syndromu a akutní koronární ATS a výsledky naznačují, že právě IL-10 by mohl být klíčovým momentem stabilizace anginy pectoris proti zánětovým působlům (např. TNF α)⁹³. Uvažuje se o jeho stabilizačním působení na ATS plát⁹⁴. V jiné studii byla nalezena nižší exprese IL-10 v ATS plátu oproti hladinám proinflammatorních cytokinů, což teorii o nerovnováze způsobené jeho nedostatečnou produkcí podporuje⁹⁵. Podání IL-10 zhoršilo LDL-indukovanou monocyto/endoteliální interakci *in-vivo* a experimenty s IL-10 transgenními a deficientními myšmi modely jeho kritickou roli jak v tvorbě, tak při stabilizaci ATS lézí jen potvrzují⁹⁵. IL-10 pozitivně ovlivňuje příjem cholesterolu makrofágy, avšak zároveň podporou jeho exfluxu brání jeho toxickému působení na tyto buňky a jejich přeměně na buňky pěnové⁹⁶. Asi nejvýstižněji lze IL-10 ve vztahu k ATS označit jako „imunologický skalpel“ .

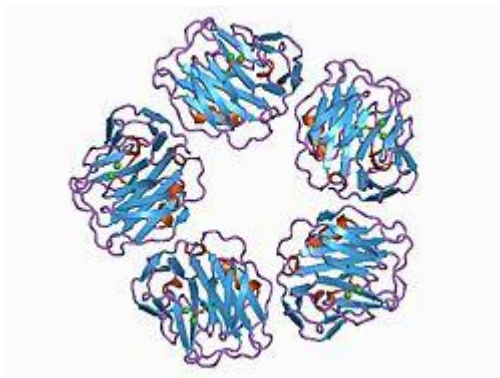
V souvislosti s VPMD se ukázalo, že aktivita cytotoxických, oxidativních a prozánětlivých oxysterolů navozujících na modelu ARPE-19 lidské retinální buněčné linie angiogenezi může být inhibována pomocí flavonoidu resveratrolu. Inhibice tohoto poškození pak koreluje s měřenými hladinami VEGF, MCP1 a IL-10⁹⁸.

Studie indukované CNV u IL-10 (-/-) deficientních myší prokázala zvýšenou infiltraci makrofágů v porovnání s kontrolní skupinou. IL-10 ovlivňuje aktivitu makrofágů v oblasti oka a byl navržen jako potenciální cíl k supresi či inhibici CNV u VPMD⁹⁹. Později však byly zobecněné závěry této studie zpochybněny s tím, že v případě IL-10 se jednalo o systémový, nikoliv pouze lokální efekt inhibice. Bylo poukázáno, že například v případě experimentální autoimunitní encefalopatie, u níž se

předpokládá zásadní rekonvalescenční role IL-10 může být efekt tohoto interleukinu nepřímo zprostředkován aktivací B buněk a CD4+ CD25+ T buněk¹⁰⁰.

4.7.4 hsCRP

C- reaktivní protein (CRP) , ze skupiny krátkých pentraxinů (viz. Obrázek č. 7), působí jako klasický protein akutní fáze. Jako hs-CRP (high-sensitivity CRP) se pak označuje citlivými metodami CRP stanovitelný do velmi nízkých koncentrací (sensitivita až do 0.04 mg/L).



Obrázek č. 7, 3D struktura CRP, převzato z PDB⁴⁹

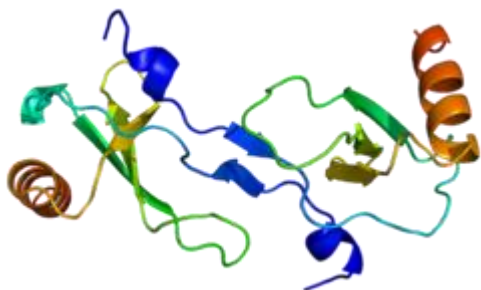
Mezi hlavní funkce CRP patří opsonizace patogenů, aktivace klasické dráhy komplementové kaskády nebo indukce exprese cytokinů v monocytech. Zároveň brání adhezi neutrofilů na endotelové buňky, a tím znesnadňuje migraci do míst zánětu. Řadí se tím mezi důležité regulační molekuly imunitního systému. Je produkován hepatocyty jako odpověď na cirkulující prozánětlivé cytokiny¹⁰¹. Avšak tento marker zánětu je příliš nespecifický a lékařská intervence pouze na základě jeho zvýšených hodnot není oprávněná¹⁰².

CRP jako prozánětlivý marker je považován rovněž za významný rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění^{103,104}. Vztah VPMD a hladin CRP je však stále předmětem diskusí. Názorová diskrepance pramení z různých kategorizací VPMD, ze spektra diagnostických metod, designu studií, ale především z aplikací poolování pro odds ratio v případě spojitosti vysokých hladin CRP (nad 3mg/l) a pozdních fází VPMD.

Nezpochybnitelnou skutečností však zůstává signifikantní korelace mezi zvýšenými hladinami CRP a pozdním stádiem VPMD. Vysoká hladina (>3mg/l) je spojena s více než dvojnásobným rizikem VPMD, zatímco spojitost hladin CRP s časnějšími stádii je slabší¹⁰⁵.

4.7.5 MCP-1

Jako MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), též Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) se označuje malý rozpustný indukibilní cytokin A2. MCP-1 je malý cytokin, patří do CC chemokinové rodiny a je zodpovědný za aktivaci monocytů, paměťových T-buněk a dendritických buněk v místě zánětlivé reakce. Je produkován jak při poranění tkáně, tak při infekci^{106,107}. MCP-1 je monomerní polypeptid o Mw přibližně 13 kDa (viz. Obrázek č. 8), ukotvený v plazmatické membráně endoteliálních buněk pomocí glykosaminoglykanového bočního řetězce proteoglykanu. MCP-1 vykazuje významnou chemotaktickou aktivitu vůči monocytům a basofilům. Tento peptid sehrává klinicky významnou roli v řadě onemocnění charakterizovaných monocytární infiltrací, např. psoriatická revmatoidní artritida a ATS¹⁰⁸.



Obrázek č. 8, 3D struktura MCP-1, převzato z PDB⁴⁹

Při VPMD se kromě mikrovaskulárních poruch předpokládá oxidativní poškození fosfolipidů světlem, při kterém dochází ke zvýšené expresi MCP-1 a následné kumulaci makrofágů s gradací zánětlivého procesu. Tento proces lze uměle navodit i subretinální aplikací oxidovaných fosfolipidů a indukovat tak neovaskularizaci a příslušné patofyziologické změny charakteristické pro vlhký typ VPMD. Tomuto procesu lze zabránit zablokováním MCP-1¹⁰⁹.

4.7.6 IgM

Immunoglobulin M (IgM) patří mezi základní imunoglobuliny produkované B buněčnými liniemi. Jedná se o morforlogicky největší imunoglobulin v lidském systému a je součástí časné protilátkové odpovědi na expozici antigenem. Za místa jeho hlavní produkce jsou považovány slezina a kostní dřeň. IgM je pentamer spojený pomocí disulfidických můstků o celkové Mw přibližně 970 kDa. Z důvodů své velikosti nemůže difundovat přes buněčnou stěnu a jeho intersticiální koncentrace jsou minimální. Funkčně je tato molekula spjata mimo jiné s aktivací komplementu, jejíž prostřednictvím přispívá k opsonizaci¹¹⁰.

Z pohledu VPMD a extrakorporálních eliminačních metod LDL-cholesterolu tvoří IgM významný faktor korelující s účinností terapie. Vlastní efekt snížení obecných hladin se u VPMD projeví zlepšením reologických vlastností⁵⁵.

5. Cíl práce

Cílem této rigorozní práce v návaznosti na předchozí zkušenosti s rheoferézou (prováděnou kaskádovitou filtrací), nyní již za standardizovaných podmínek, bylo ověřit její účinnost v léčbě pacientů s VPMD a její dopad na sledované parametry imunitního systému.

Byly sledovány změny vybraných markerů, které mohou upřesnit sledování choroby, bezpečnost léčby, ale zajistí také dosažení nových unikátních poznatků. Jedná se o markery, které by mohly svědčit pro zánětlivou aktivitu, markery stavu buněčné imunity, aktivity endotelu, adhezní molekuly.

Jednalo se o sledování těchto znaků:

1. plazmatický glykoprotein α -2-makroglobulin
2. solubilní forma adhezivní molekuly P-selektinu (CD62P)
3. solubilní forma endoglinu (CD105)
4. IL-10
5. hsCRP
6. MCP-1
7. imunoglobulin M (IgM)

Ke stanovení hladin vyšetřovaných markerů v plazmě byly využity metody enzymoimunoanalýzy a imunonefelometrie.

6. Experimentální část

6.1 Charakteristika souboru pacientů

Do studie bylo zahrnuto celkem 107 v případě α -2 makroglobulinu, II-10, sP-selektinu a endoglinu, 106 v případě hsCRP a MCP-1 a 105 pacientů u hladin IgM. U všech pacientů byla potvrzena VPMD. Diagnostika byla prováděna pomocí fotografie fundu, fluoresceinovou angiografií a OCT. Pacienti byli sledováni mezi léty 2005 a 2008. Věkový medián souboru byl 65 ± 7 let, rozmezí 54–82 let. Kritéria pro vyjmutí ze studie byla jiná retinální/choriodální onemocnění než VPMD, postižení zrakového nervu, glaukom, znesnadněná vizualizace fundu a akutní krvácení očí. U všech nemocných bylo provedeno 8 procedur hemorheoferézy, a to dvě za týden, 2 týdny pauza a puls opakován 4x.

6.2 Materiál a metody

6.2.1 Hemorheoferéza

Pro zkoumaný soubor byla použita modifikace hemorheoferézy dle Borberg et al.¹¹¹. Po vlastní separaci plazmy (separátor, Cobe- Spectra, Denver, USA) byla plazma filtrována přes rheofiltr (Evaflux 4A, Kuraray, Japan) k odstranění vysokomolekulárních reologických faktorů. Repetitivní eliminace vysokomolekulárních proteinů snižovala viskozitu plazmy a měla za následek zlepšení mikrocirkulace¹¹². Objem profiltrované plazmy odpovídal 1,5 násobku jejího celkového objemu. Jako kritická hodnota pro snížení filtrovaného objemu byl pokles plazmatických hladin fibrinogenu pod 0,7 g/L. V tomto případě byl objem profiltrované plazmy snížen na 1,0 násobek jejího celkového objemu.

6.2.2 Laboratorní metodika stanovení

Pacientům byly odebrány vzorky krve před a bezprostředně po provedené LDL-aféřeze či hemoreoferéze. Z ní získané vzorky plazmy či séra byly ihned zmrazeny a

uchovávány při teplotě -40°C . K detekci hladin vybraných ukazatelů aterogeneze byly využity metody enzymoimunoanalýzy (EIA) – ELISA a imunonefelometrie.

Sérové hladiny α -2-makroglobulinu, hsCRP a IgM byly stanoveny imunonefelometricky pomocí nefelometru IMMAGE 800 (Beckman Coulter, Velká Británie) a imunoreagencií téže firmy. Koncentrace IL-10 a MCP-1 byly stanoveny pomocí komerčních ELISA kitů (Bender MedSystems, Rakousko). Hladiny endoglinu (sCD105) a sP-selektinu byly změřeny za použití ELISA souprav (R&D Systems, USA).

Ve všech případech se jednalo o využití metody principu sandwichové imunoanalýzy. Na mikrotitrační desku byly navázány protilátky proti stanovovanému proteinu. Po napipetování vzorků, inkubaci a promytí byla do jamek přidána sekundární protilátka proti témuž proteinu značená enzymaticky. Po dalším promytí a přidání substrátu příslušného enzymu byla provedena fotometrická detekce vzniklého enzymatického produktu. Absorbance tohoto produktu je úměrná hladině stanovovaného proteinu.

Absorbance v jamkách byla změřena na fotometru (ELISA Readeru) Multiskan MC (Thermo Fisher Scientific, USA). Postup analýzy byl shodný s doporučením výrobce souprav.

7 Statistické zpracování výsledků

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí software MedCalc (Mariakerke, Belgie). Normalita rozložení hodnot v souboru i podsouborech byla testována pomocí *Kolmogorov-Smirnovova* testu. Základní charakteristikou zkoumaných souborů byl aritmetický průměr (v případě zjištěné normality) či medián (při nenormálním rozložení hodnot).

Testovací statistika

Po kontrole normality dat byly podsoubory sledovaného parametru porovnávány mezi sebou (PŘED aferézou × PO aferéze):

- Parametrickým párovým *t – testem* (tzv. Studentovým testem) v případě normálního rozložení dat
- neparametrickým *Wilcoxonovým testem* v případě nenormálního rozložení dat.

Úroveň statistických rozdílů je vyjádřena pomocí parametru p :

- vysoká statistická významnost $p < 0,001$
- střední statistická významnost $p (0,001 – 0,01)$
- nízká statistická významnost $p (0,01 – 0,05)$
- bez statistické významnosti $p > 0,05$

7.1 Výsledky

U vybraného souboru pacientů s věkem podmíněnou makulární degenerací byly sledovány hladiny vybraných ukazatelů (α -2 makroglobulin, sP-selektin, endoglin, Il-10, hsCRP, MCP-1 a IgM) a jejich změny po hemorheoferéze pomocí enzyimoimunoanalýzy a imunonefelometrie.

Hodnoty koncentrace sledovaných parametrů u nemocných před a po hemorheoferéze jsou uvedeny v Tabulce č. 1 a v Tabulce. č. 2.

Statistické zhodnocení jednotlivých parametrů před a po hemorheoferéze je uvedeno v Tabulce č. 3.

7.1.1 α -2 makroglobulin

- Podsoubor „ α -2 makroglobulin PŘED hemorheoferézou“ měl průměrnou koncentraci 139,14 pg/ml.
- Podsoubor „ α -2 makroglobulin PO hemorheoferéze“ měl průměrnou koncentraci 59,09 pg/ml.

Pokles koncentrace α -2 makroglobulinu po hemorheoferéze byl statisticky signifikantní ($p < 0,0001$; tj. vysoká statistická významnost) a je znázorněn v Grafu č. 1. Pokles koncentrace α -2 makroglobulinu po hemorheoferéze byl o 57,53%.

7.1.2 sP-selektin

- podsoubor „sP-selektin PŘED hemorheoferézou“ měl průměrnou koncentraci 162,06 ng/ml.
- Podsoubor „sP-selektin PO hemorheoferéze“ měl průměrnou hodnotu 144,79 ng/ml.

Pokles koncentrace sP-selektinu po hemorheoferéze byl statisticky signifikantní ($p < 0,0001$; tj. vysoká statistická významnost) a je uveden v Grafu č. 2. Pokles koncentrace sP-selektinu po hemorheoferéze je o 17,26%.

7.1.3 Endoglin (sCD105)

- Podsoubor „endoglin (sCD105) PŘED hemorheoferézou“ měl průměrnou koncentraci 6,43 ng/ml.
- Podsoubour „endoglin (sCD105) PO hemorheoferéze“ měl průměrnou koncentraci 5,45 ng/ml.

Pokles koncentrace endoglinu po hemorheoferéze byl statisticky signifikantní ($p < 0,0001$; tj. vysoká statistická významnost) a je uveden v Grafu č. 3. Pokles koncentrace endoglinu po hemorheoferéze byl o 15,18%.

7.1.4 IL-10

- Podsoubor „IL-10 PŘED hemorheoferézou“ měl průměrnou koncentraci 64,03 pg/ml.
- Podsoubor „IL-10 PO hemorheoferéze“ měl průměrnou koncentraci 58,89 pg/ml.

Pokles koncentrace IL-10 po hemorheoferéze byl statisticky signifikantní ($p = 0,0017$; tj. střední statistická významnost) a je uveden v Grafu č. 4. Pokles koncentrace IL-10 po hemorheoferéze byl o 8,07%.

7.1.5 hsCRP

- podsoubor „hsCRP PŘED hemorheoferézou“ měl průměrnou koncentraci 3,37 mg/l
- podsoubor „hsCRP PO hemorheoferéze“ měl průměrnou koncentraci 2,79 mg/l

Pokles koncentrace hsCRP po hemorheoferéze byl statisticky signifikantní ($p = 0,0000$; tj. vysoká statistická významnost) a je znázorněn v Grafu č. 5. Pokles hsCRP po hemorheoferéze byl o 22,11%.

7.1.6 MCP-1

- Podsoubor „MCP-1 PŘED hemorheoferézou“ měl průměrnou koncentraci 279,27 pg/ml
- Podsoubor „MCP-1 PO hemorheoferéze“ měl průměrnou koncentraci 239,252 pg/ml

Pokles koncentrace MCP-1 po hemorheoferéze byl statisticky signifikantní ($p = 0,0000$; tj. vysoká statistická významnost) a je uveden v Grafu č. 6. Pokles koncentrace MCP-1 byl o 14,15 %.

7.1.7 Imunoglobulin M

- Podsoubor „IgM PŘED hemorheoferézou“ měl průměrnou koncentraci 0,9136 g/l
- Podsoubor „IgM PO hemorheoferéze“ měl průměrnou koncentraci 0,3459 g/l

Pokles koncentrace IgM po hemorheoferéze byl statisticky signifikantní ($p= 0,000$; tj. vysoká statistická významnost) a je znázorněn v Grafu č. 7. Pokles koncentrace IgM po hemorheoferéze byla o 62,14%.

8 Tabulky a grafy

8.1 Přehled naměřených hodnot

V Tabulkách č. 1 a č. 2 jsou uvedeny naměřené hodnoty všech sledovaných ukazatelů před hemorheoferézou (Tabulka č. 1) a po hemorheoferéze (Tabulka č.2.). Přehled naměřených hodnot sledovaných parametrů u kontrolní skupiny uvádí Tabulka č.3.

8.2 Statistické zpracování výsledků

Vyhodnocení významnosti poklesu hodnot u sledovaných ukazatelů. Statistické zhodnocení jednotlivých parametrů před a po hemorheoferéze je uvedeno v Tabulce č. 3. Procento rozdílu poklesu hladiny sledovaných činitelů po hemorheoferéze ukazuje Tabulka č. 4.

8.3 Grafické zpracování výsledků

Změny sledovaných parametrů po hemorheoferéze jsou znázorněny pomocí sloupcových grafů (Grafy č. 1-7). Grafy jsou zobrazeny v podobě „Box and Whisker plotu“. Střed obdelníku představuje medián, spodní hrana 25% percentil, horní hrana 75% percentil a úsečky minimum a maximum po vyloučení odlehlých hodnot, které jsou znázorněny samostatnými body.

| parametr | n | před | |
|-------------|-----|----------------|---------|
| | | průměr | SD |
| A2M | 107 | 139,1374 pg/ml | 53,1719 |
| hsCRP | 106 | 2.7903 mg/l | 1.5598 |
| IgM | 105 | 0,9136 g/l | 0,579 |
| IL-10 | 107 | 64,0306 pg/ml | 25,3518 |
| MCP-1 | 106 | 279,2717 pg/ml | 82,4151 |
| sP-Selektin | 107 | 162,0626 ng/ml | 51,1445 |
| endoglin | 107 | 6,429 ng/ml | 1,5825 |

Tabulka č. 1 Přehled naměřených parametrů před hemorheoferézou

n= počet hodnot, SD= směrodatná odchylka

| parametr | n | po | |
|-------------|-----|----------------|---------|
| | | průměr | SD |
| A2M | 107 | 59,087 pg/ml | 35,1793 |
| hsCRP | 106 | 2,1734 mg/l | 1,2391 |
| IgM | 105 | 0,3459 g/l | 0,3956 |
| IL-10 | 107 | 58,8874 pg/ml | 23,3643 |
| MCP-1 | 106 | 239,7500 g/ml | 80,5732 |
| sP-Selektin | 107 | 144,7972 ng/ml | 54,5821 |
| endoglin | 107 | 5,4533 ng/ml | 1,6623 |

Tabulka č.2 Přehled naměřených parametrů po hemorheoferéze

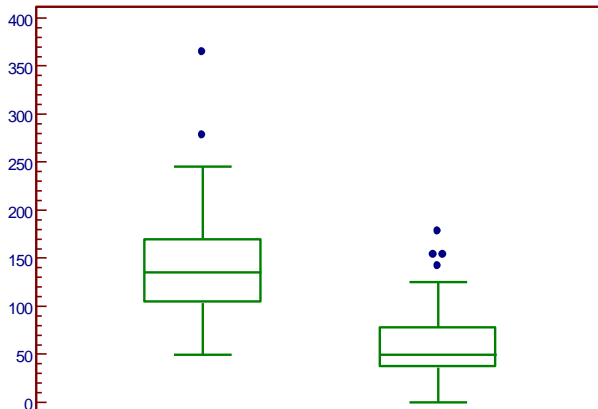
n= počet hodnot, SD= směrodatná odchylka

| parametr | před procedurou | | | po proceduře | | | před x po proceduře | |
|---------------------|-----------------|----------|--------------------|--------------|----------|--------------------|---------------------|-----------|
| | n | průměr | normální rozložení | n | průměr | normální rozložení | test | hodnota p |
| A2M (pg/ml) | 107 | 139,1374 | ANO | 107 | 59,087 | ANO | t-test | p<0,0001 |
| hsCRP (mg/l) | 106 | 2,7903 | NE | 106 | 2,1734 | ANO | Wilcoxon test | p=0,0000 |
| IgM (g/l) | 105 | 0,9136 | ANO | 89 | 0,3459 | NE | Wilcoxon test | p=0,0000 |
| IL-10 (pg/ml) | 107 | 64,0306 | ANO | 107 | 58,8874 | ANO | t-test | p=0,0017 |
| MCP-1 (pg/ml) | 106 | 279,2717 | NE | 106 | 239,7500 | ANO | Wilcoxon test | p=0,0000 |
| sP-Selektin (ng/ml) | 107 | 162,0626 | ANO | 107 | 144,7972 | ANO | t-test | p<0,0001 |
| Endoglin (ng/ml) | 107 | 6,429 | ANO | 107 | 5,4533 | ANO | t-test | p<0,0001 |

Tab. č. 3: Statistické zhodnocení jednotlivých parametrů před a po hemorheoferéze
n= počet hodnot, NE- nenormální rozložení, ANO= normální rozložení, P= statistická významnost

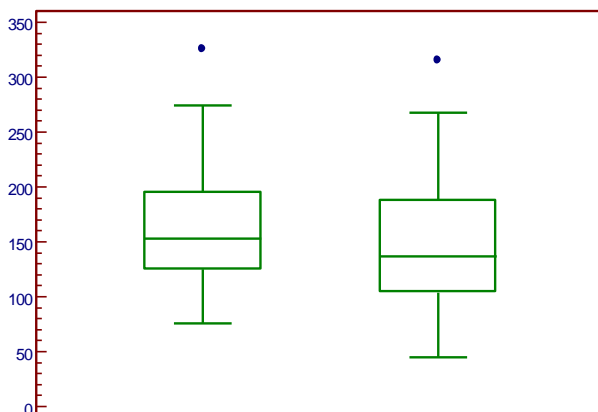
| parametr | před | | po | | procento rozdílu (před-po)/před x 100 |
|---------------------|------|----------|-----|----------|---------------------------------------|
| | n | průměr | n | průměr | |
| A2M (pg/ml) | 107 | 139,1374 | 107 | 59,087 | 57,53 |
| hsCRP (mg/l) | 106 | 2,7903 | 106 | 2,1734 | 22,11 |
| IgM (g/l) | 105 | 0,9136 | 89 | 0,3459 | 62,14 |
| IL-10 (pg/ml) | 107 | 64,0306 | 107 | 58,8874 | 8,07 |
| MCP-1 (pg/ml) | 106 | 279,2717 | 106 | 239,7500 | 14,15 |
| sP-Selektin (ng/ml) | 107 | 162,0626 | 107 | 144,7972 | 17,26 |
| Endoglin (ng/ml) | 107 | 6,429 | 107 | 5,4533 | 15,18 |

Tabulka č. 4: Procento rozdílu poklesu hladiny sledovaných činitelů po hemorheoferéze



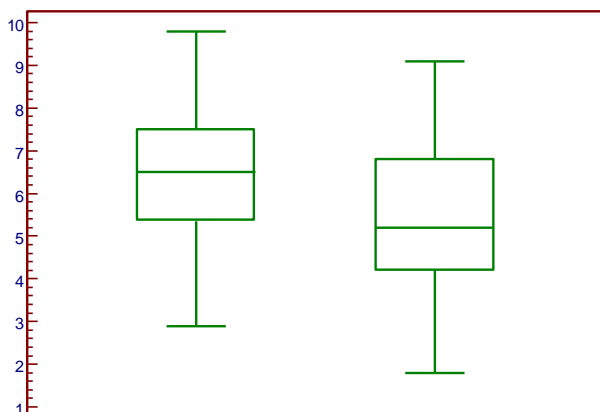
Graf č. 1 Hodnoty koncentrace α - 2 makroglobulinu po hemorheoferéze.

Pokles koncentrace α - 2 makroglobulinu po hemorheoferéze byl statisticky signifikantní ($p < 0,0001$; tj. vysoká statistická významnost)



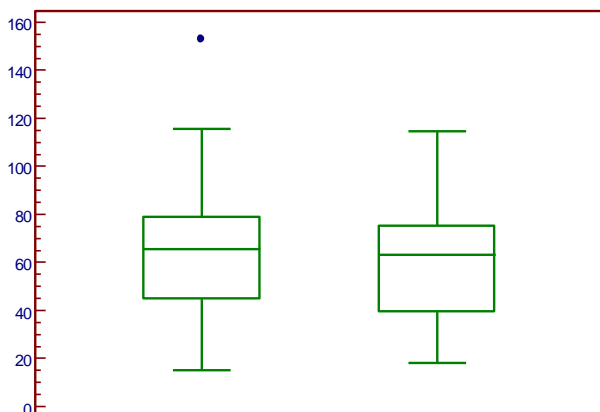
Graf č. 2 Hodnoty koncentrace sP-selektinu po hemorheoferéze

Pokles koncentrace sP-selektinu po hemorheoferéze byl statisticky signifikantní ($p < 0,0001$; tj. vysoká statistická významnost)



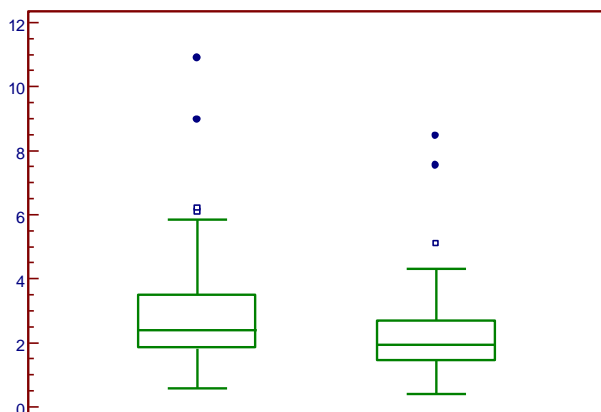
Graf č. 3 Hodnoty poklesu koncentrace endoglinu po hemorheoferéze

Pokles koncentrace endoglinu po hemorheoferéze byl statisticky signifikantní ($p < 0,0001$; tj. vysoká statistická významnost)



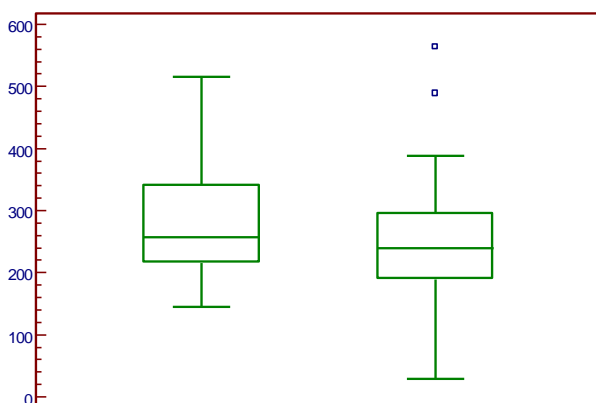
Graf č. 4 Hodnoty koncentrace IL-10 po hemorheoferéze

Pokles koncentrace IL-10 po hemorheoferéze byl statistický významný ($p=0,0017$, tj. střední statistická významnost)



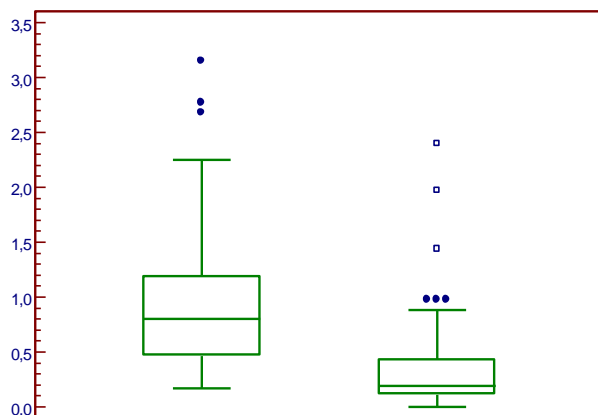
Graf č. 5 Hodnoty koncentrace hsCRP po hemorheoferéze

Pokles koncentrace hsCRP po hemoreopheréze byl statisticky signifikantní ($p=0,000$; tj. vysoká statistická významnost)



Graf č. 6 Hodnoty koncentrace MCP-1 po hemorheoferéze

Pokles koncentrace MCP-1 po hemorheoferéze byl statisticky signifikantní ($p=0,000$; tj. vysoká statistická významnost)



Graf č. 7 Hodnoty koncentrace imunoglobulínu M po hemoreoferéze

Pokles koncentrace IgM po hemoreoferéze byl statisticky signifikantní. $P=0,000$; tj. vysoká statistická významnosť)

9 Diskuze

Hemorheoferéza představuje v současnosti jedinou možnost intervence ve stavu pokročilé formy suché VPMD s cílem zastavení progresu onemocnění a odvrácení stavu nevratné slepoty. Hemorheoferéza může ovlivňovat řadu parametrů krevní složky a to jak ve vztahu k imunologii aterosklerotického poškození, tak i ve vztahu k reologickým parametrům. Ovlivnění těchto faktorů se pak projeví zásadním zlepšením klinického stavu a to i v případech selhávání ostatních terapeutických přístupů. Hemorheoferéza zlepšuje krevní mikrocirkulaci, viskozitu a agregabilitu erytrocytů a trombocytů¹¹³. Aplikací hemorheoferézy bylo studiem prokázáno zlepšení zrakové ostrosti^{7,112,114–116}. Kontroverzními se jevíly předběžné výsledky studie Mira 1, které jednoznačně pozitivní efekt ve srovnání s placebem neprokázaly^{117,118}. Konečná revize této studie však odhalila řadu nedostatků, především v kritériích zařazení pacientů a odhalení jiných neretinálních zrakových nedostatečností. Obecným nedostatkem těchto studií je pak výsledné hodnocení zrakové ostrosti, které však nemusí plně korelovat s komplexností zrakové funkčnosti, jako např. s viděním na dálku/blízko, barevným rozlišením, binokulárním viděním atd.¹¹².

Dopad rheoferézy na progresi VPMD je dán celým komplexem faktorů, mezi nimiž imunologické reologické proteiny hrají zásadní roli.

α -2-makroglobulin je jedním z nejdéle známých imunologických aterogenních faktorů⁴⁸, který z pohledu VPMD představuje významně reofereticky ovlivnitelný protein⁸. Jeho význam v patogenezi onemocnění je pravděpodobně založen na reologickém působení⁵⁵. Mimoto se tento protein vyznačuje i schopností tvorby agregátů červených krvinek⁵⁶. V této práci se podařilo prokázat aplikací hemorheoferézy statisticky signifikantní pokles plazmatických hladin α -2 makroglobulinu o více než 57 %. Tento pokles byl plně v souladu s předchozími studii a svědčí o významu tohoto markeru v sledování účinnosti intervence.

V případě **P-selektinu** byl prokázán statisticky signifikantní ($p < 0,0001$; tj. vysoká statistická významnost) pokles P-selektinu po hemorheoferéze o více než 17 % při poměrně velkém rozptylu výchozích a konečných hodnot (SD 51 před a 54 po aplikaci hemorheoferézy). Tento transmembránový protein, umožňující zachycení

leukocytu na aktivovaném endotelu a tzv. tethering a rolling je ve vztahu k vaskulárním poruchám považován za indikátor endoteliální a/nebo trombocytární aktivace⁴². P-selektin je též považován za ukazatel destabilizace aterosklerotického plátu⁶⁵. Z pohledu CNV je role monocytů a makrofágů a jejich adheze zřejmá a jejich deplece má pozitivní vliv při laserem indukované neovaskularizaci⁶⁷⁻⁶⁹. Tato práce tak potvrdila pozitivní vliv hemorheoferézy na hladiny tohoto prozánětlivého faktoru.

Statisticky signifikantní pokles koncentrace o více než 15 % po hemorheoferéze ($p < 0,0001$; tj. vysoká statistická významnost) byl pozorován i u hladin **endoglinu (CD105)**. Tento protein z rodiny TGF- β byl popsán ve zvýšených hladinách u buněk hladkého svalstva ve studii buněčných populací aktivovaných buněk aterosklerotických plátů, zatímco u kontrolních nepostižených buněk arteriálních stěn se jej detekovat nepodařilo⁸¹. V souvislosti s VPMD se ukázalo, že indukovaná CNV u krysího modelu má za následek expresi CD105 pouze prvních 7 dnech po aplikaci laserové noxy⁸⁵. Nedetekovatelnost CD105 v přítomnosti proliferačního markeru Ki-67 naznačuje, že exprese CD105 nemusí být nezbytná pro endoteliální proliferaci, a uvažuje se o něm, že jeho hladiny reflektují postmitotickou aktivitu neovaskulárních struktur⁸⁶. I přes průkaz významného poklesu endoglinu aplikací hemorheoferézy však objasnění jeho významu v patogenezi VPMD vyžaduje další pozornost.

Pokles koncentrace **IL-10** po hemorheoferéze byl statisticky signifikantní ($p = 0,0017$; tj. střední statistická významnost) při celkovém poklesu koncentrace po hemorheoferéze o 8,07 %. IL-10 je považován za jeden z hlavních imunoregulačních cytokinů zánětlivé reakce hrající zásadní roli v down-regulaci adaptivní i přirozené imunity zodpovědné za chronický zánět. V souvislosti s VPMD se ukázalo, že reparativní schopnosti flavonoidu resveratrolu přímo korelují s VEGF, MCP1 a IL-10⁹⁸. Určité pochybnosti však vyvstávají v souvislosti s předpokládanou supresí či inhibicí IL-10 u CNV u VPMD⁹⁹. Předpokládá se, že inhibice IL-10 působí nikoliv lokálním, ale systémovým efektem prostřednictvím aktivace B buněk a CD4+ CD25+ T buněk¹⁰⁰. Ve světle těchto poznatků pak lze celkové snížení jeho plazmatických hladin prokázané i touto prací považovat za významný ukazatel inhibice progresu VPMD.

Statisticky významný pokles koncentrace po hemorheoferéze ($p = 0,0000$; tj. vysoká statistická významnost) byl zaznamenán i u hladin **hsCRP** (22,11 %). Klasický

protein akutní fáze CRP je prozánětlivým markerem považovaným rovněž za významný rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění^{103,104}. Obecný vztah VPMD a hladin CRP je však stále předmětem diskusí, kde signifikantní korelace je dosahováno pouze mezi zvýšenými hladinami CRP a pozdním stádiem VPMD¹⁰⁵. Rozdíl v této práci je dokumentován s dostatečnou hladinou statistické významnosti. Obecné snížení plazmatických hladin hemorheoférou však podporuje hypotézu její prospěšnosti při ovlivnění zánětu.

Pokles koncentrace po hemorheoféře byl statisticky signifikantní ($p=0,0000$; tj. vysoká statistická významnost) i v případě sledování hladin **MCP-1** (pokles koncentrace MCP-1 byl o 14,15 %). MCP-1 je zodpovědný za aktivaci monocytů, paměťových T-buněk a dendritických buněk v místě zánětlivé reakce a sehrává klinicky významnou roli i v případě ATS¹⁰⁸. Neovaskularizačním a patologickým změnám navozeným oxidativním poškozením světlem u VPMD, při kterém dochází ke zvýšené expresi MCP-1, lze zabránit zablokováním MCP-1¹⁰⁹. V případě této studie je pokles hladin po hemorheoféře dostatečně vysoký. Pro extrapolaci systémového účinku snížení či inhibice MCP-1 je potřeba ještě následných studií.

Pokles koncentrace **IgM** po hemorheoféře (o 62,14 %) byl statisticky signifikantní ($p= 0,000$; tj. vysoká statistická významnost). IgM je součástí časné protilátkové odpovědi na expozici antigenem. Funkčně je tato molekula rovněž spjata s aktivací komplementu, jejíž prostřednictvím přispívá k opsonizaci¹¹⁰. V případě hemorheoféry tvoří IgM významný faktor korelující s účinností terapie prostřednictvím zlepšením reologických vlastností⁵⁵. V této práci byl prokázán vysoký statisticky významný pokles, který plně koreluje s nálezy předešlých studií. Validita tohoto nálezu je mírně oslabena neparametrickým rozdělením hodnot hladin ve skupině po aplikaci hemorheoféry.

Sledováním výše uvedených imunologicko-reologických parametrů byl tak po aplikaci hemorheoféry prokázán statisticky významný pozitivní dopad na hladiny α -2-makroglobulin, sP-selektinu, endoglinu, IL-10, hsCRP a IgM.

10 Závěr

Tato práce se zabývala sledováním vybraných imunologicko-reologických parametrů u pacientů s VPMD. Aplikací hemorheoferézy byl prokázán statisticky významný pozitivní dopad na hladiny α -2-makroglobulinu, sP-selektinu, endoglinu, IL-10, hsCRP, IgM a CMP-1. Všechny tyto parametry korelují s pozitivním vlivem rheoferetické intervence a jsou v souladu s poznatky soudobé literatury. Výsledky studie vyzdvihují tedy pozitivní vliv této léčby na imunologické parametry onemocnění a podporují použití této techniky u pacientů s VPMD.

11 Přehled použité literatury

1. Donaldson, M. J. & Pulido, J. S. Treatment of nonexudative (dry) age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol* **17**, 267–274 (2006).
2. Klein, R., Meuer, S. M., Knudtson, M. D., Iyengar, S. K. & Klein, B. E. K. The epidemiology of retinal reticular drusen. *Am. J. Ophthalmol.* **145**, 317–326 (2008).
3. Klein, R. *et al.* Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* **114**, 253–262 (2007).
4. Zion, I. B. *et al.* Pulsatile ocular blood flow: relationship with flow velocities in vessels supplying the retina and choroid. *Br J Ophthalmol* **91**, 882–884 (2007).
5. Brunner, R. *et al.* Influence of membrane differential filtration on the natural course of age-related macular degeneration: a randomized trial. *Retina (Philadelphia, Pa.)* **20**, 483–491 (2000).
6. Klein, R., Meuer, S. M., Knudtson, M. D., Iyengar, S. K. & Klein, B. E. K. The epidemiology of retinal reticular drusen. *Am. J. Ophthalmol.* **145**, 317–326 (2008).
7. Klingel, K. *et al.* Molecular pathology and structural features of enteroviral replication. Toward understanding the pathogenesis of viral heart disease. *Herz* **25**, 216–220 (2000).
8. Borberg, H. & Tauchert, M. Rheohaemapheresis of ophthalmological diseases and diseases of the microcirculation. *Transfus. Apher. Sci.* **34**, 41–49 (2006).
9. Bláha, M. *et al.* Safety and tolerability of long lasting LDL-apheresis in familial hyperlipoproteinemia. *Ther Apher Dial* **11**, 9–15 (2007).
10. Klein, R., Klein, B. E. & Moss, S. E. Diabetes, hyperglycemia, and age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* **99**, 1527–1534 (1992).
11. Kolář, P. *Věkem podmíněná makulární degenerace.* (Grada, 2008).
12. Sandberg, M. A. & Gaudio, A. R. Slow photostress recovery and disease severity in age-related macular degeneration. *Retina (Philadelphia, Pa.)* **15**, 407–412 (1995).
13. Leibowitz, H. M. *et al.* The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975. *Surv Ophthalmol* **24**, 335–610 (1980).

14. Vingerling, J. R. *et al.* The prevalence of age-related maculopathy in the Rotterdam Study. *Ophthalmology* **102**, 205–210 (1995).
15. Wang, Q. *et al.* Pattern of age-related maculopathy in the macular area. The Beaver Dam Eye Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **37**, 2234–2242 (1996).
16. Bressler, N. M., Bressler, S. B., West, S. K., Fine, S. L. & Taylor, H. R. The grading and prevalence of macular degeneration in Chesapeake Bay watermen. *Arch. Ophthalmol.* **107**, 847–852 (1989).
17. Burns, R. P. & Feeney-Burns, L. Clinico-morphologic correlations of drusen of Bruch's membrane. *Trans Am Ophthalmol Soc* **78**, 206–225 (1980).
18. Ramrattan, R. S. *et al.* Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 2857–2864 (1994).
19. Bressler, N. M., Bressler, S. B., Seddon, J. M., Gragoudas, E. S. & Jacobson, L. P. Drusen characteristics in patients with exudative versus non-exudative age-related macular degeneration. *Retina (Philadelphia, Pa.)* **8**, 109–114 (1988).
20. Folkman, J. Angiogenesis: initiation and control. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **401**, 212–227 (1982).
21. Wolfe, D. R. Fluorescein angiography basic science and engineering. *Ophthalmology* **93**, 1617–1620 (1986).
22. FOX, J. J., YUNG, N. & WEMPEN, I. Spectrophotometric studies of nucleic acid derivatives and related compounds as a function of pH. IV. On the structure of orotidine. A study of N-methylated orotic acids. *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 295–305 (1957).
23. Hayashi, K. & de Laey, J. J. Indocyanine green angiography of choroidal neovascular membranes. *Ophthalmologica* **190**, 30–39 (1985).
24. Guyer, D. R., Duker, J. S. & Puliafito, C. A. Indocyanine green angiography and dye-enhanced diode laser photocoagulation. *Semin Ophthalmol* **7**, 172–176 (1992).
25. Puzyeyeva, O. *et al.* High-resolution optical coherence tomography retinal imaging: a case series illustrating potential and limitations. *J Ophthalmol* **2011**, 764183 (2011).
26. Grunwald, J. E. *et al.* Foveolar choroidal blood flow in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**, 385–390 (1998).

27. Curcio, C. A., Saunders, P. L., Younger, P. W. & Malek, G. Peripapillary chorioretinal atrophy: Bruch's membrane changes and photoreceptor loss. *Ophthalmology* **107**, 334–343 (2000).
28. Fine, S. L., Berger, J. W., Maguire, M. G. & Ho, A. C. Age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* **342**, 483–492 (2000).
29. Ambati, J., Ambati, B. K., Yoo, S. H., Ianchulev, S. & Adamis, A. P. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol* **48**, 257–293 (2003).
30. Bláha, M. Extracorporeal LDL-cholesterol elimination in the treatment of severe familial hypercholesterolemia. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **46**, 3–7 (2003).
31. Borberg, H. 26 years of LDL-apheresis: a review of experience. *Transfus. Apher. Sci.* **41**, 49–59 (2009).
32. Thompson, G. R. *et al.* Efficacy criteria and cholesterol targets for LDL apheresis. *Atherosclerosis* **208**, 317–321 (2010).
33. Blaha, M. *et al.* Optimization of the therapeutic procedure during LDL-apheresis--a computerized model. *Transfus. Apher. Sci.* **32**, 149–156 (2005).
34. Boberg, K. M. & Skrede, S. Content of sitosterol, cholestanol, and cholesterol in very low density lipoproteins of rat liver perfusate. *Scand. J. Gastroenterol.* **23**, 442–448 (1988).
35. Agishi, T. *et al.* Double filtration plasmapheresis. 1980. *Ther Apher* **4**, 29–33 (2000).
36. Blaha, M. *et al.* Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* **197**, 264–270 (2008).
37. Nakaji, S. Current topics on immunoadsorption therapy. *Ther Apher* **5**, 301–305 (2001).
38. Matic, G. *et al.* Comparison of two filter combinations for low-density lipoprotein apheresis by membrane differential filtration: a prospective crossover controlled clinical study. *Artif Organs* **26**, 371–377 (2002).
39. Siervo, M. *et al.* Angiogenesis and biomarkers of cardiovascular risk in adults with metabolic syndrome. *J. Intern. Med.* **268**, 338–347 (2010).
40. Parhami, F. *et al.* Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. *J. Clin. Invest.* **92**, 471–478 (1993).

41. Hoogendoorn, H., Toh, C. H., Nesheim, M. E. & Giles, A. R. Alpha 2-macroglobulin binds and inhibits activated protein C. *Blood* **78**, 2283–2290 (1991).
42. Somers, W. S., Tang, J., Shaw, G. D. & Camphausen, R. T. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell* **103**, 467–479 (2000).
43. Springer, T. A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**, 425–434 (1990).
44. Blaha, M. *et al.* Extracorporeal LDL cholesterol elimination (25 years of experience in CZ). *Atheroscler Suppl* **10**, 17–20 (2009).
45. Bláha, M. *et al.* Selectins and monocyte chemotactic peptide as the markers of atherosclerosis activity. *Physiol Res* **53**, 273–278 (2004).
46. Abe, K., Yamamoto, K. & Sinohara, H. Proteinase inhibitory spectrum of mouse murinoglobulin and alpha-macroglobulin. *J. Biochem.* **106**, 564–568 (1989).
47. Fryksmark, U., Ohlsson, K., Rosengren, M. & Tegner, H. Studies on the interaction between leukocyte elastase, antileukoproteinase and the plasma proteinase inhibitors alpha 1-proteinase inhibitor and alpha 2-macroglobulin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **364**, 793–800 (1983).
48. Larionov, S. *et al.* The intronic deletion polymorphism of the Alpha2-macroglobulin gene modulates the severity and extent of atherosclerosis in the circle of Willis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **32**, 451–454 (2006).
49. World wide protein databank, in <http://www.wwpdb.org/>.
50. Barrett, A. J. & Starkey, P. M. The interaction of alpha 2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem. J.* **133**, 709–724 (1973).
51. Smith, E. B. Molecular interactions in human atherosclerotic plaques. *Am. J. Pathol.* **86**, 665–674 (1977).
52. Kristensen, T. *et al.* Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the alpha 2-macroglobulin receptor. *FEBS Lett.* **276**, 151–155 (1990).
53. Strickland, D. K. *et al.* Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J. Biol. Chem.* **265**, 17401–17404 (1990).
54. Mori, T. *et al.* Serum glycoproteins and severity of coronary atherosclerosis. *Am. Heart J.* **129**, 234–238 (1995).

55. Rencová, E. *et al.* Haemorheopheresis could block the progression of the dry form of age-related macular degeneration with soft drusen to the neovascular form. *Acta Ophthalmol* **89**, 463–471 (2011).
56. Kirschkamp, T., Schmid-Schönbein, H., Weinberger, A. & Smeets, R. Effects of Fibrinogen and α_2 -Macroglobulin and Their Apheretic Elimination on General Blood Rheology and Rheological Characteristics of Red Blood Cell Aggregates. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* **12**, 360–367 (2008).
57. Giddings, J. C. Soluble adhesion molecules in inflammatory and vascular diseases. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 406–408 (2005).
58. Cambien, B. & Wagner, D. D. A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. *Trends Mol Med* **10**, 179–186 (2004).
59. McEver, R. P., Moore, K. L. & Cummings, R. D. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J. Biol. Chem.* **270**, 11025–11028 (1995).
60. Osmancik, P., Kvasnicka, J., Widimsky, P. & Tarnok, A. Diurnal variation of soluble E- and P-selectin, and intercellular adhesion molecule-1 in patients with and without coronary artery disease. *Cardiology* **102**, 194–199 (2004).
61. Burger, P. C. & Wagner, D. D. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood* **101**, 2661–2666 (2003).
62. Frenette, P. S., Johnson, R. C., Hynes, R. O. & Wagner, D. D. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 7450–7454 (1995).
63. Michelson, A. D., Barnard, M. R., Krueger, L. A., Valeri, C. R. & Furman, M. I. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation* **104**, 1533–1537 (2001).
64. Frenette, P. S. *et al.* P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J. Exp. Med.* **191**, 1413–1422 (2000).
65. Draz, N., Hamdy, M. S., Gomaa, Y. & Ramzy, A. A. Soluble P-selectin is a marker of plaque destabilization in unstable angina. *Egypt J Immunol* **10**, 83–87 (2003).

66. Hillis, G. S. *et al.* Elevated soluble P-selectin levels are associated with an increased risk of early adverse events in patients with presumed myocardial ischemia. *Am. Heart J.* **143**, 235–241 (2002).
67. Espinosa-Heidmann, D. G. *et al.* Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 3586–3592 (2003).
68. Sakurai, E., Anand, A., Ambati, B. K., van Rooijen, N. & Ambati, J. Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 3578–3585 (2003).
69. Zhou, J. *et al.* Neutrophils promote experimental choroidal neovascularization. *Mol. Vis.* **11**, 414–424 (2005).
70. Apte, R. S., Richter, J., Herndon, J. & Ferguson, T. A. Macrophages inhibit neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. *PLoS Med.* **3**, e310 (2006).
71. Kelly, J., Ali Khan, A., Yin, J., Ferguson, T. A. & Apte, R. S. Senescence regulates macrophage activation and angiogenic fate at sites of tissue injury in mice. *J. Clin. Invest.* **117**, 3421–3426 (2007).
72. Bless, N. M. *et al.* Differing patterns of P-selectin expression in lung injury. *Am. J. Pathol.* **153**, 1113–1122 (1998).
73. Sperandio, M., Gleissner, C. A. & Ley, K. Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunol. Rev.* **230**, 97–113 (2009).
74. Llorca, O., Trujillo, A., Blanco, F. J. & Bernabeu, C. Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J. Mol. Biol.* **365**, 694–705 (2007).
75. Del Re, E., Babitt, J. L., Pirani, A., Schneyer, A. L. & Lin, H. Y. In the absence of type III receptor, the transforming growth factor (TGF)-beta type II-B receptor requires the type I receptor to bind TGF-beta2. *J. Biol. Chem.* **279**, 22765–22772 (2004).
76. Wong, S. H., Hamel, L., Chevalier, S. & Philip, A. Endoglin expression on human microvascular endothelial cells association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF-beta signalling receptors. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5550–5560 (2000).

77. McAllister, K. A. *et al.* Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat. Genet.* **8**, 345–351 (1994).
78. Li, D. Y., Zhang, Y. C., Philips, M. I., Sawamura, T. & Mehta, J. L. Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation. *Circ. Res.* **84**, 1043–1049 (1999).
79. Van de Kerkhof, P. C., Rulo, H. F., van Pelt, J. P., van Vlijmen-Willems, I. M. & De Jong, E. M. Expression of endoglin in the transition between psoriatic uninvolved and involved skin. *Acta Derm. Venereol.* **78**, 19–21 (1998).
80. Guerrero-Esteo, M. *et al.* Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* **78**, 614–623 (1999).
81. Tashiro, H., Shimokawa, H., Sadamatu, K. & Yamamoto, K. Prognostic significance of plasma concentrations of transforming growth factor-beta in patients with coronary artery disease. *Coron. Artery Dis.* **13**, 139–143 (2002).
82. Li, C. G. *et al.* The significance of CD105, TGFbeta and CD105/TGFbeta complexes in coronary artery disease. *Atherosclerosis* **152**, 249–256 (2000).
83. Li, C. *et al.* CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J.* **14**, 55–64 (2000).
84. Blann, A. D., Wang, J. M., Wilson, P. B. & Kumar, S. Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis. *Atherosclerosis* **120**, 221–226 (1996).
85. Xu, J., Wang, Y., Yang, X., Zhang, P. & Chen, L. Correlation of CD105 and vascular endothelial growth factor in laser-induced choroidal neovascularization in rats. *Yan Ke Xue Bao* **22**, 166–174, 183 (2006).
86. Grisanti, S. *et al.* Expression of endoglin in choroidal neovascularization. *Experimental Eye Research* **78**, 207–213 (2004).
87. Fiorentino, D. F., Bond, M. W. & Mosmann, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* **170**, 2081–2095 (1989).
88. Woszczek, G., Chen, L.-Y., Nagineni, S. & Shelhamer, J. H. IL-10 inhibits cysteinyl leukotriene-induced activation of human monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **180**, 7597–7603 (2008).

89. Akbari, O., DeKruyff, R. H. & Umetsu, D. T. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* **2**, 725–731 (2001).
90. Hawrylowicz, C. M. & O'Garra, A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 271–283 (2005).
91. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 683–765 (2001).
92. Pinderski Oslund, L. J. *et al.* Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 2847–2853 (1999).
93. Brunetti, N. D. *et al.* Inflammatory cytokine imbalance after coronary angioplasty: links with coronary atherosclerosis. *J Interv Cardiol* **20**, 248–257 (2007).
94. Waehre, T. *et al.* Inflammatory imbalance between IL-10 and TNFalpha in unstable angina potential plaque stabilizing effects of IL-10. *Eur. J. Clin. Invest.* **32**, 803–810 (2002).
95. Mallat, Z. *et al.* Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 611–616 (1999).
96. Han, X., Kitamoto, S., Lian, Q. & Boisvert, W. A. Interleukin-10 facilitates both cholesterol uptake and efflux in macrophages. *J. Biol. Chem.* **284**, 32950–32958 (2009).
97. Terkeltaub, R. A. IL-10: An 'immunologic scalpel' for atherosclerosis? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 2823–2825 (1999).
98. Dugas, B. *et al.* Effects of oxysterols on cell viability, inflammatory cytokines, VEGF, and reactive oxygen species production on human retinal cells: cytoprotective effects and prevention of VEGF secretion by resveratrol. *Eur J Nutr* **49**, 435–446 (2010).
99. Apte, R. S., Richter, J., Herndon, J. & Ferguson, T. A. Macrophages inhibit neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. *PLoS Med.* **3**, e310 (2006).
100. McGeachy, M. J. & Anderton, S. M. Cytokines in the induction and resolution of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cytokine* **32**, 81–84 (2005).
101. Pitiphat, W. *et al.* Plasma C-reactive protein in early pregnancy and preterm delivery. *Am. J. Epidemiol.* **162**, 1108–1113 (2005).
102. Van de Laar, R. *et al.* Accuracy of C-reactive protein determination in predicting chorioamnionitis and neonatal infection in pregnant women with premature rupture of

- membranes: a systematic review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **147**, 124–129 (2009).
103. Ridker, P. M., Hennekens, C. H., Buring, J. E. & Rifai, N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N. Engl. J. Med.* **342**, 836–843 (2000).
104. Rifai, N. & Ridker, P. M. High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease. *Clin. Chem.* **47**, 403–411 (2001).
105. Hong, T., Tan, A. G., Mitchell, P. & Wang, J. J. A Review and Meta-analysis of the Association Between C-Reactive Protein and Age-related Macular Degeneration. *Survey of Ophthalmology* **56**, 184–194 (2011).
106. Carr, M. W., Roth, S. J., Luther, E., Rose, S. S. & Springer, T. A. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 3652–3656 (1994).
107. Xu, L. L., Warren, M. K., Rose, W. L., Gong, W. & Wang, J. M. Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 365–371 (1996).
108. Xia, M. & Sui, Z. Recent developments in CCR2 antagonists. *Expert Opin Ther Pat* **19**, 295–303 (2009).
109. Suzuki, M. *et al.* Chronic photo-oxidative stress and subsequent MCP-1 activation as causative factors for age-related macular degeneration. *Journal of Cell Science* **125**, 2407–2415 (2012).
110. Wellek, B., Hahn, H. & Opferkuch, W. Opsonizing activities of IgG, IgM antibodies and the C3b inactivator-cleaved third component of complement in macrophage phagocytosis. *Agents Actions* **6**, 260–262 (1976).
111. Bláha, M. *et al.* The importance of rheological parameters in the therapy of microcirculatory disorders. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **42**, 37–46 (2009).
112. Koss, M. J. *et al.* Prospective, randomized, controlled clinical study evaluating the efficacy of Rheopheresis for dry age-related macular degeneration. Dry AMD treatment with Rheopheresis Trial-ART. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **247**, 1297–1306 (2009).
113. Hazel, C. A., Petre, K. L., Armstrong, R. A., Benson, M. T. & Frost, N. A. Visual function and subjective quality of life compared in subjects with acquired macular disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 1309–1315 (2000).

114. Klingel, R. *et al.* Rheopheresis in patients with critical limb ischemia--results of an open label prospective pilot trial. *Ther Apher Dial* **9**, 473–481 (2005).
115. Klingel, R., Fassbender, C., Fassbender, T. & Göhlen, B. Clinical studies to implement Rheopheresis for age-related macular degeneration guided by evidence-based-medicine. *Transfus. Apher. Sci.* **29**, 71–84 (2003).
116. Klingel, R. *et al.* Rheopheresis in patients with ischemic diabetic foot syndrome: results of an open label prospective pilot trial. *Ther Apher Dial* **7**, 444–455 (2003).
117. Pulido, J. S. & Multicenter Investigation of Rheopheresis for AMD (MIRA-1) Study Group. Multicenter prospective, randomized, double-masked, placebo-controlled study of Rheopheresis to treat nonexudative age-related macular degeneration: interim analysis. *Trans Am Ophthalmol Soc* **100**, 85–106; discussion 106–107 (2002).
118. Pulido, J. S., Winters, J. L. & Boyer, D. Preliminary analysis of the final multicenter investigation of rheopheresis for age related macular degeneration (AMD) trial (MIRA-1) results. *Trans Am Ophthalmol Soc* **104**, 221–231 (2006).